

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/098464

発行日 平成20年8月28日 (2008. 8. 28)

(43) 国際公開日 平成18年9月21日 (2006. 9. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

出願番号 特願2007-508241 (P2007-508241)	(71) 出願人 502019933
(21) 国際出願番号 PCT/JP2006/305480	リンク・ジェノミクス株式会社
(22) 国際出願日 平成18年3月14日 (2006. 3. 14)	東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3
(31) 優先権主張番号 特願2005-71387 (P2005-71387)	(71) 出願人 504176911
(32) 優先日 平成17年3月14日 (2005. 3. 14)	国立大学法人大阪大学
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号
(31) 優先権主張番号 特願2005-241414 (P2005-241414)	(71) 出願人 505295101
(32) 優先日 平成17年8月23日 (2005. 8. 23)	P C A I n t e r M e d 株式会社
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	兵庫県神戸市中央区港島南町 2 丁目 2 番地
	(74) 代理人 100092783
	弁理士 小林 浩
	(74) 代理人 100095360
	弁理士 片山 英二
	(74) 代理人 100126354
	弁理士 藤田 尚

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺がんの診断方法

(57) 【要約】

本発明は、被験者の体液試料中の P C A - 1 を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法を提供する。本発明はまた、被験者の体液試料中の抗 P C A - 1 自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法を提供する。本発明は、前立腺がんの診断をより簡易、迅速、安価にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者由来の体液試料中の P C A - 1 を前立腺がんマーカーとして検出および / または定量する方法。

【請求項 2】

前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記体液試料が、尿である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

質量分析装置を用いて、P C A - 1 を検出および / または定量する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 5】

抗 P C A - 1 抗体を用いて、P C A - 1 を検出および / または定量する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記体液試料と抗 P C A - 1 抗体とを接触させる工程、および

前記体液試料中の P C A - 1 と前記抗 P C A - 1 抗体との結合を検出および / または定量する工程

を包含する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出および / または定量する工程が、標識された抗 P C A - 1 抗体を用いて、P C A - 1 と抗 P C A - 1 抗体との結合を検出および / または定量することを包含する、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法 (F I A)、時間分解蛍光免疫測定法 (T R F I A)、酵素免疫測定法 (E I A)、発光免疫測定法 (L I A)、電気化学発光免疫測定法 (E C L I A)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテイン A 免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法に従う、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 9】

前立腺がんの診断に用いるための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

抗 P C A - 1 抗体を含有する、被験者由来の体液試料中の P C A - 1 を前立腺がんマーカーとして検出および / または定量するための、前立腺がん診断剤。

【請求項 11】

P C A - 1 遺伝子、P C A - 1 m R N A、またはその断片の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する、被験者由来の体液試料中の P C A - 1 遺伝子、P C A - 1 m R N A、またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および / または定量するための前立腺がん診断剤。

40

【請求項 12】

前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、請求項 10 または 11 に記載の診断剤。

【請求項 13】

前記体液試料が、尿である、請求項 10 または 11 に記載の診断剤。

【請求項 14】

抗 P C A - 1 抗体を含有する、被験者由来の体液試料中の P C A - 1 を前立腺がんマーカーとして検出および / または定量するためのキット。

50

【請求項 15】

標識された抗 P C A - 1 抗体をさらに含有する、請求項 14 に記載のキット

【請求項 16】

ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法 (F I A)、時間分解蛍光免疫測定法 (T R F I A)、酵素免疫測定法 (E I A)、発光免疫測定法 (L I A)、電気化学発光免疫測定法 (E C L I A)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテイン A 免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法に従って前記検出および / または定量を行うための、請求項 14 または 15 に記載のキット。

10

【請求項 17】

P C A - 1 遺伝子、P C A - 1 m R N A、またはその断片の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する、被験者由来の体液試料中の P C A - 1 遺伝子、P C A - 1 m R N A、またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および / または定量するためのキット。

【請求項 18】

前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載のキット。

20

【請求項 19】

前記体液試料が、尿である、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載のキット

【請求項 20】

前立腺がんの診断に用いるための、請求項 14 ~ 19 のいずれかに記載のキット

【請求項 21】

被験者由来の体液試料中の抗 P C A - 1 自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および / または定量する方法。

【請求項 22】

前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記体液試料が、尿である、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 24】

P C A - 1 抗原を用いて、前記抗 P C A - 1 自己抗体を検出および / または定量する、請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記体液試料と P C A - 1 抗原とを接触させる工程、および

前記体液試料中の抗 P C A - 1 自己抗体と P C A - 1 抗原との結合を検出および / または定量する工程

を包含する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記検出および / または定量する工程が、抗 P C A - 1 自己抗体に対する標識された抗体を用いて、P C A - 1 と抗 P C A - 1 自己抗体との結合を検出および / または定量することを包含する、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法 (F I A)、時間分解蛍光免疫測定法 (T R F I A)、酵素免疫測定法 (E I A)、発光免疫測定法 (L I A)、電気化学発光免疫測定法 (E C L I A)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテイン A 免疫検定法からなる群から選択される免疫

50

測定法に従う、請求項 2 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 8】

前立腺がんの診断に用いるための、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

P C A - 1 抗原を含有する、被験者由来の体液試料中の抗 P C A - 1 自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキット

【請求項 3 0】

抗 P C A - 1 自己抗体に対する標識された抗体をさらに含み、当該抗体を、前記 P C A - 1 抗原と前記抗 P C A - 1 自己抗体との結合を検出および/または定量するために利用する、請求項 2 9 に記載のキット。

10

【請求項 3 1】

ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法 (F I A)、時間分解蛍光免疫測定法 (T R F I A)、酵素免疫測定法 (E I A)、発光免疫測定法 (L I A)、電気化学発光免疫測定法 (E C L I A)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテイン A 免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法に従って前記検出および/または定量を行うための、請求項 2 9 または請求項 3 0 に記載のキット。

【請求項 3 2】

前立腺がんの診断に用いるための、請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれかに記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、前立腺がんの診断方法に関し、特に、被験者の体液 (例えば、血液、尿) 試料中の P C A - 1 をマーカーとして前立腺がんを診断する方法およびそのためのキットに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

前立腺がんは、欧米では男性がん死亡者の約 2 0 % を占める頻度の高いがんであり、日本でも食事の欧米化および高齢化社会に伴い、その頻度は増加傾向にある。泌尿器科領域におけるがんでは、日本においても最も多いがんであり、罹患者の早期発見は医学上重要な意義がある。

30

現在、前立腺がんの診断には、前立腺特異抗原 (P S A) が一般的に使用されており、抗原抗体反応を用いた血液成分中の P S A 検出キットが多数市販されている。血中 P S A 測定は、鋭敏に前立腺がんの存在を検出できる検査であり、また、がんの進行とともに P S A 値も上昇するため、病期までも予測できるなどの利点がある。

しかしながら、血中 P S A 値は前立腺肥大症や前立腺炎でも上昇することがしばしばあり、また前立腺がんの初期段階では P S A 値は正常である場合もあるため、偽陰性の診断を生じるという問題がある。したがって、前立腺がんの確定診断のためには、さらに、穿刺吸引生検法や経直腸または経会陰的針生検にて前立腺の組織を採取し、顕微鏡で検査する組織診断をしなければならない。

40

一方、がんにおいて発現が亢進しているタンパク質のどれが抗原性でありまたは体液中で濃度増加することがあるかについて予測できる知見はほとんどない。前立腺がんの細胞または組織において発現が亢進している遺伝子およびタンパク質は極めて多数存在するが、これらの極多数の増幅遺伝子またはタンパク質の全てが前立腺がんの診断マーカーとして利用可能であるわけではない。例えば、現在、I n v i t r o g e n 社から前立腺がんが発現している多数の c D N A が販売されているが、これらの遺伝子の前立腺がん患者における動態は全く未知である。なお、P C A - 1 (p r o s t a t e c a n c e r a n t i g e n - 1) が前立腺がん細胞または組織において発現が亢進している遺伝子とし

50

て同定されたという報告がある（第123回日本薬学会年会要旨集4、p15、2003年）。

【発明の開示】

【0003】

現状では、前立腺がんの診断は、患者および医師にとって負担が大きく、労力と時間がかかるものである。そこで、前立腺がんの診断をより簡易、迅速、かつ患者および医師の負担を少なくするための新たな方法が求められている。特に、体液（例えば、血液、尿）試料を用いて迅速、確実な診断を可能にするための、あらたな前立腺がんマーカーの開発が望まれている。

上記のような従来の課題を解決するために、本発明は、以下のような、被験者の体液試料中のPCA-1、PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、または抗PCA-1自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出する方法および検出用キット、ならびに診断剤を提供する。

(1) 被験者由来の体液試料中のPCA-1を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法。

(2) 前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、(1)に記載の方法。

(3) 前記体液試料が、尿である、(1)に記載の方法。

(4) 質量分析装置を用いて、PCA-1を検出および/または定量する、(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 抗PCA-1抗体を用いて、PCA-1を検出および/または定量する、(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(6) 前記体液試料と抗PCA-1抗体とを接触させる工程、および

前記体液試料中のPCA-1と前記抗PCA-1抗体との結合を検出および/または定量する工程

を包含する、(5)に記載の方法。

(7) 前記検出および/または定量する工程が、標識された抗PCA-1抗体を用いて、PCA-1と抗PCA-1抗体との結合を検出および/または定量することを包含する、(6)に記載の方法。

(8) ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法(FIA)、時間分解蛍光免疫測定法(TRFIA)、酵素免疫測定法(EIA)、発光免疫測定法(LIA)、電気化学発光免疫測定法(ECLIA)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテインA免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法に従う、(5)~(7)のいずれかに記載の方法。

(9) 前立腺がんの診断に用いるための、(1)~(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 抗PCA-1抗体を含有する、被験者由来の体液試料中のPCA-1を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するための、前立腺がん診断剤。

(11) PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する、被験者由来の体液試料中のPCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するための、前立腺がん診断剤。

(12) 前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、(10)または(11)に記載の診断剤。

(13) 前記体液試料が、尿である、(10)または(11)に記載の診断剤。

(14) 抗PCA-1抗体を含有する、被験者由来の体液試料中のPCA-1を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキット。

(15) 標識された抗PCA-1抗体をさらに含有する、(14)に記載のキット。

(16) ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着検

10

20

30

40

50

定法（ELISA）、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法（FIA）、時間分解蛍光免疫測定法（TRFIA）、酵素免疫測定法（EIA）、発光免疫測定法（LIA）、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテインA免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法に従って前記検出および/または定量を行うための、（14）または（15）に記載のキット。

（17）PCA-1 遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する、被験者由来の体液試料中のPCA-1 遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキット。

（18）前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、（14）～（17）のいずれかに記載のキット。

（19）前記体液試料が、尿である、（14）～（17）のいずれかに記載のキット。

（20）前立腺がんの診断に用いるための、（14）～（19）のいずれかに記載のキット。

（21）被験者由来の体液試料中の抗PCA-1 自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法。

（22）前記体液試料が、全血、血清、または血漿である、（21）に記載の方法。

（23）前記体液試料が、尿である、（21）に記載の方法。

（24）PCA-1 抗原を用いて、前記抗PCA-1 自己抗体を検出および/または定量する、（21）～（23）のいずれかに記載の方法。

（25）前記体液試料とPCA-1 抗原とを接触させる工程、および

前記体液試料中の抗PCA-1 自己抗体とPCA-1 抗原との結合を検出および/または定量する工程

を包含する、（24）に記載の方法。

（26）前記検出および/または定量する工程が、抗PCA-1 自己抗体に対する標識された抗体を用いて、PCA-1 と抗PCA-1 自己抗体との結合を検出および/または定量することを包含する、（25）に記載の方法。

（27）ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法（FIA）、時間分解蛍光免疫測定法（TRFIA）、酵素免疫測定法（EIA）、発光免疫測定法（LIA）、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテインA免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法に従う、（21）～（26）のいずれかに記載の方法。

（28）前立腺がんの診断に用いるための、（21）～（27）のいずれかに記載の方法。

（29）PCA-1 抗原を含有する、被験者由来の体液試料中の抗PCA-1 自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキット。

（30）抗PCA-1 自己抗体に対する標識された抗体をさらに含み、当該抗体を、前記PCA-1 抗原と前記抗PCA-1 自己抗体との結合を検出および/または定量するために利用する、（29）に記載のキット。

（31）ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法（FIA）、時間分解蛍光免疫測定法（TRFIA）、酵素免疫測定法（EIA）、発光免疫測定法（LIA）、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテインA免疫検定法からなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れる免疫測定法に従って前記検出および/または定量を行うための、(29)または(30)に記載のキット。

(32)前立腺がんの診断に用いるための、(29)~(31)のいずれかに記載のキット。

(33)PCA-1抗原を含有する、被験者由来の体液試料中の抗PCA-1自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するための、前立腺がん診断剤。

本発明により、PCA-1を被験者の体液(例えば、血液、尿)試料中の前立腺がんマーカーとして利用する方法が初めて提供される。本発明は、単独の検査によって前立腺がんの診断が可能な正確な前立腺がん診断方法を提供し得る。また、必要に応じて既存の前立腺がんの診断方法と組み合わせることにより、より確実な前立腺がんの診断を可能にする。本発明は、体液試料を用いて非浸襲的または浸襲性の程度の低い測定形態を採り得るため、患者および医者の両方にとって負担が少なく、迅速かつ簡易な前立腺がんの診断方法を提供し得る。本発明は、前立腺がんの診断のみならず、予後評価、がんの疾病素質を有する被験者の同定、およびがんの治療を受けている患者の観察のために有用である。

10

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、LC-MS質量分析装置によりモニタリングした前立腺がんを有する被験者由来の血液試料の溶出プロファイルを示す図である。

図2は、(A)、(B)PCA-1のin silicoトリプシン分解ペプチド断片及び当該ペプチドから生じ得る開裂ペプチドの質量を有する分子をLC-MS質量分析装置で選択的にモニタリングした場合、ならびに(C)、(D)比較のために、PSAのin silicoトリプシン分解ペプチド断片及び当該ペプチドから生じ得る開裂ペプチドの質量を有する分子をLC-MS質量分析装置で選択的にモニタリングした場合の、溶出プロファイルを示す図である。

20

図3は、図2(A)で保持時間68分付近に観察されたPCA-1ピークに対するMSMS解析によって決定されたアミノ酸配列を示す図である。

図4は、図2(B)で保持時間62分付近に観察されたPCA-1ピークに対するMSMS解析によって決定されたアミノ酸配列を示す図である。

図5は、比較のために、図2(C)及び(D)で保持時間64分付近に観察されたPSAピークに対するMSMS解析によって決定されたアミノ酸配列を示す図である。

30

図6は、図2に示す実験の比較例として、前処理およびトリプシン処理を施した健常者由来の血液試料について、図2に示す実験と同様の設定で特定の質量を有する分子のモニタリングを行った場合の溶出プロファイルを示す図である。

図7は、前立腺がん患者由来の尿試料中のPCA-1の存在を示すウェスタンブロット分析の結果を示す写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明者らは、血液中の標的ポリペプチドの存在とその量を迅速に解析するための手法として、質量分析装置を用いた新たな解析手法を開発し、これを用いて血液試料中のPCA-1の検出を試みた。その結果、前立腺がん患者由来の血液試料中にPCA-1が存在すること、および健常者由来の血液試料中ではPCA-1が実質的に検出されないことを確認した。本発明は、このような新たな知見に基づくものであり、PCA-1が血液のような体液試料中の前立腺がんマーカーとして使用し得ることを初めて実証するものである。

40

さらに本発明者らは、前立腺がん患者の尿試料中においてもPCA-1が検出され得ること、および健常者由来の尿試料中ではPCA-1がわずかに検出されるのみかまたは実質的に検出されないことを確認した。このように、本発明はまた、PCA-1が尿のような体液試料中においても前立腺がんマーカーとして使用し得ることを初めて実証するものである。

したがって、本発明は、1つの態様において、被験者由来の体液試料中のPCA-1を

50

前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法を提供する。本発明の方法は、前立腺がんの診断または予後評価等に適用し得る。

本発明はまた、別の態様において、被験者由来の体液試料中の抗PCA-1自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法を提供する。すなわち、本発明は、前立腺がんの診断または予後評価等に適用するための抗PCA-1自己抗体の体液中発現を検出および/または定量する方法を提供する。

(体液中のPCA-1または抗PCA-1自己抗体の検出および/または定量)

被験者から採取された血液または尿のような体液試料中のPCA-1タンパク質の検出には、多くの方法があり、そのいずれかを用いて検出を行うことが可能である。上記のような質量分析装置を用いた検出法のほかに、例えば、PCA-1タンパク質がPCA-1タンパク質に特異的に結合する抗体(抗PCA-1抗体)によって検出される免疫測定法が使用され得る。本発明に有用な抗体は、PCA-1タンパク質またはその断片の存在を定量的にまたは定性的に検出するために使用され得る。したがって、1つの態様において、本発明は、抗PCA-1抗体を用いて、被験者由来の体液試料中の前立腺がんマーカーを検出する方法を提供する。

また、被験者から採取された血液または尿のような体液試料中のPCA-1ポリヌクレオチドの検出には、多くの方法があり、そのいずれかを用いて検出を行うことが可能である。検出可能なポリヌクレオチドには、例えば、PCA-1遺伝子またはその断片、PCA-1 mRNA、選択的スプライス変異型のPCA-1 mRNA、およびPCA-1ポリヌクレオチドを含む組換えDNAまたはRNA分子が含まれる。

PCA-1ポリヌクレオチドの増幅および/またはその存在の検出を行うための数多くの方法が当該分野で周知であり、本発明のこの局面の実施において使用し得る。例えば、1つの態様において、体液試料中のPCA-1 mRNAを検出するための方法は、少なくとも1つのプライマーを使用する逆転写によって試料からcDNAを作製する工程、そのようにして作製したcDNAをその中のPCA-1 cDNAを増幅するためにPCA-1ポリヌクレオチドをセンスおよびアンチセンスプライマーとして用いて増幅する工程、ならびに増幅されたPCA-1 cDNAの存在を検出する工程を包含する。さらに、別の態様において、体液試料中のPCA-1遺伝子を検出するための方法は、体液試料からゲノムDNAをまず単離する工程、単離されたゲノムDNAをその中のPCA-1遺伝子を増幅するためにPCA-1ポリヌクレオチドをセンスおよびアンチセンスプライマーとして使用して増幅する工程、ならびに増幅されたPCA-1遺伝子の存在を検出する工程を含む。

本明細書中、「PCA-1」または「PCA-1タンパク質」とは、その遺伝子がGenBank Accession No. AB042029で特定されるヒトPCA-1タンパク質のことをいい、PCA-1タンパク質のアミノ酸配列は、公にアクセス可能なタンパク質データベースのAccession No. NP_631917(配列番号: 2)で特定される。また、本明細書中、体液試料中のPCA-1を前立腺がんマーカーとして使用する態様で「PCA-1」という場合には、PCA-1の全長タンパク質に限らず、体液試料中のプロテアーゼによるPCA-1の分解産物もしくはPCA-1の断片、またはこれらの誘導体をも含むものとする。ここで、「誘導体」とは、PCA-1タンパク質またはその断片のアミノ酸配列において1または数個(例えば、6個)のアミノ酸残基の変異、置換、欠失および/または付加を含み、実質的にPCA-1タンパク質と同じ抗原特異性を有するペプチドまたはポリペプチドを含むものとする。誘導体の典型的な例には、PCA-1多型、スプライシングなどによる配列変化がある。

本明細書中、体液試料中のPCA-1を前立腺がんマーカーとして使用する態様で使用する「抗PCA-1抗体」には、PCA-1、ならびにプロテアーゼによるPCA-1の分解産物もしくはPCA-1の断片、またはこれらの誘導体に特異的に結合する抗体が含まれるものとする。これらのプロテアーゼ分解産物または断片の長さとしては、抗PCA-1抗体に特異的な抗原として認識され得る長さであれば制限はないが、好ましくは6アミノ酸以上、より好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは10アミノ酸以上である

(例えば、アミノ酸配列：R R A P E P R V I D R E G (配列番号34)またはその部分配列を含む断片)。また、これらの分解産物または断片は、P C A - 1タンパク質の任意の部分であり得るが、P C A - 1タンパク質のエピトープに対応するか、エピトープに対応する部分を含んでいることがより好ましい。また、「誘導体」とは、P C A - 1タンパク質またはそのプロテアーゼ分解産物もしくは断片のアミノ酸配列において、1または数個(例えば、6個)のアミノ酸残基の変異、置換、欠失および/または付加を含み、実質的にP C A - 1タンパク質と同じ抗原特異性を有するペプチドまたはポリペプチドを含むものとする。

本明細書中、体液試料中の抗P C A - 1自己抗体を前立腺がんマーカーとして使用する態様で使用する「P C A - 1」、「P C A - 1タンパク質」または「P C A - 1抗原」には、P C A - 1タンパク質のみならず、P C A - 1タンパク質のエピトープを含むかまたはエピトープとして抗P C A - 1抗体に認識され得る断片、およびこれらの誘導体をも含むものとする。ここで、断片の長さとしては、抗P C A - 1抗体に特異的な抗原として認識され得る長さであれば制限はないが、好ましくは6アミノ酸以上、より好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは10アミノ酸以上である。また、これらの分解産物または断片は、P C A - 1タンパク質の任意の部分であり得るが、P C A - 1タンパク質のエピトープに対応するか、エピトープに対応する部分を含んでいることがより好ましい。また、「誘導体」とは、P C A - 1タンパク質またはその断片のアミノ酸配列において1または数個(例えば、6個)のアミノ酸残基の変異、置換、欠失および/または付加を含み、実質的にP C A - 1タンパク質と同じ抗原特異性を有するペプチドまたはポリペプチドを含むものとする。

本明細書中、抗体があるタンパク質または分解産物または断片に「特異的に結合する」とは、その抗体が他のアミノ酸配列に対するその親和性よりも、これらのタンパク質または分解産物または断片の特定のアミノ酸配列に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、所望の測定装置によって、その特定のアミノ酸配列を他のアミノ酸配列から区別して検出することが可能なほどに高い親和性を意味する。

本明細書中、「前立腺がんマーカー」とは、被験者の体液(例えば、血液、尿、リンパ液、唾液、汗、精液等)または細胞もしくは組織中における、正常前立腺組織に由来していないか、あるいは前立腺がん細胞または組織において選択的に発現の亢進している分子のことをいい、被験者の体液または細胞もしくは組織中における当該分子の存在が前立腺がんの存在を示すかまたは示唆するものをいう。

本明細書中、「体液試料」には、被験者由来の血液、尿、リンパ液、唾液、汗、精液等の体液試料が含まれるものとする。本発明において使用される体液試料の好ましい例は、血液または尿であり、特に好ましくは血液試料である。

本明細書中、「血液試料」とは、被験者から得られた血液試料を指すが、全血に限定されず、血清、血漿等の血液成分分画、もしくはさらにアルブミン、イムノグロブリン等を除いた血液成分分画または血液製剤等をも含むものとする。

本明細書中、「前立腺がん」とは、前立腺において発生したがんを広く包含する概念であり、前立腺に発生した腺がんのみならず、扁平上皮がん、移行上皮がん、神経内分泌がん、未分化がん等をも包含する。好ましくは、前立腺がんは、前立腺に発生した腺がんである。

本明細書中、「被験者」とは、広く本発明の方法を用いた検査の対象となる体液試料を採取されるヒトをさすが、主として、男性ヒトであり、より具体的には、健康診断等の被験男性ヒト、あるいは前立腺がんの自覚症状(例えば、残尿感)、触診検査(前立腺のしこり等)、血清中等のP S A濃度検査(高値のP S A濃度等)等により、前立腺がんを発症していることが疑われる男性ヒトなどが含まれる。

(抗体)

本発明において使用する抗P C A - 1抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。さらに、「抗体」とは一般に、任意の抗体断片また

10

20

30

40

50

は誘導体、特に、実質的に同じ抗原特異性を示す前記モノクローナルまたはポリクローナル抗体の断片または誘導体を含む。後者は、抗体断片 (Fab、Fab'、CDRなど)、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体 (ScFv) などを含む。本発明に使用する抗体は、動物を免疫化し、血清 (ポリクローナル) または脾臓細胞を回収すること (適切な細胞系との融合によるハイブリドーマの作製のため) を含む、従来の方法により作製することができる。

抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMであり、精製の容易性を考慮すると、より好ましくはIgGである。

マウス、げっ歯類、霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、家禽などを含む種々の種に由来するポリクローナル抗体の作製法は、例えばVaitukaitisら (Vaitukaitis、Robbinsら、J Clin Endocrinol Metab. 33(6):988-91, 1971) に見いだすことができる。抗原をアジュバント (例えばフロイントのアジュバント) と合わせ、動物に、典型的には皮下注射により投与する。繰り返し注射してもよい。血液試料を回収し、免疫グロブリンまたは血清を単離する。

異なる種からモノクローナル抗体を作製する方法は、例えばHarlowら (Harlow and Lane (ed.), Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 139-282. 1988) またはKohlerら (KohlerおよびMilstein Nature. 256(5517):495-7, 1975) に見いだすことができる。この方法は、動物を抗原で免疫化し、その後、脾臓細胞を回収し、これをその後、骨髄腫細胞などの不死化細胞と融合することを含む。得られたハイブリドーマはモノクローナル抗体を生じ、

限界希釈により選択して個々のクローンを単離することができる。抗体はまた、例えばWardら (Ward、Gussowら Nature. 341(6242):544-6, 1989) に開示されているようなコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーの選択により作製することができる。

FabまたはFab'断片は、従来の方法によるプロテアーゼ (例えば、ペプシンまたはパイン) を用いた消化により作製することができる。ヒト化抗体は、例えばRiechmannら (Riechmann J Mol Biol. Oct 5; 203(3):825-8, 1988)、およびJonesら (Jonesら Nature 321:522-525, 1986) に記載のような方法の1つにより調製することができる。

また、キメラ抗体は、例えば、「実験医学 (臨時増刊号)、Vol. 1. 6, No. 10, 1988」、特公平3-73280号公報等を、ヒト化抗体は、例えば、「Nature Genetics, Vol. 15, p. 146-156, 1997」、「Nature Genetics, Vol. 7, p. 13-21, 1994」、特表平4-504365号公報、国際出願公開WO94・25585号公報等、「日経サイエンス、6月号、第40~第50頁、1995年」、「Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994」、特表平6-500233号公報等を参考にそれぞれ製造することができる。

(免疫アッセイ)

1. PCA-1検出のためのアッセイ

本発明の実施に有用な免疫測定法の1つの態様では、被験者由来の体液試料と抗PCA-1抗体とを接触させ、次いで、体液試料中のPCA-1と抗PCA-1抗体との免疫複合体が検出される。

本発明の上記態様の免疫アッセイには、ウエスタンブロット法のような手法を用いた測定システムに限らず、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法 (FIA)、時間分解蛍光免疫測定法 (TRFIA)、酵素免疫測定法 (EIA)、発光免疫測定法 (LIA)、電

気化学発光免疫測定法 (E C L I A)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、プロテイン A 免疫検定法等が使用され得る。このような手法では、通常、抗 P C A - 1 抗体は標識されており、標識の種類としては、例えば、蛍光基、発光基、フリーラジカル基、粒子、バクテリオファージ、細胞、金属、酵素、補酵素、ラジオアイソトープなどが挙げられる。

さらに、例えば、P C A - 1 タンパク質に特異的に結合するポリペプチドのような抗体以外の薬剤が P C A - 1 タンパク質発現のレベルを測定するために使用され得る。

P C A - 1 の発現を検出するための免疫測定は、代表的には、前立腺がんを有すると疑われるか、前立腺がんの危険性を有する被験体から採取した体液試料を、特異的抗原 - 抗体結合を生じさせる条件下で抗 P C A - 1 抗体と接触させ、次いで、抗体による免疫特異的結合量を測定することを包含する。特定の態様において、例えば、このような抗体の結合を使用して、P C A - 1 タンパク質の存在および / または増大した発現が検出される。この場合、増大した P C A - 1 タンパク質発現の検出が疾病状態の指標となる。必要に応じて、体液試料中の P C A - 1 タンパク質のレベルを、前立腺がんを有しない健常者のレベルと比較してもよい。

上記免疫測定法の 1 つの態様では、血清試料などの体液試料を、試料中に存在する全部のタンパク質を固定する目的で、ニトロセルロースなどの固相支持体または担体と接触させる。次いで、この支持体を緩衝液で洗浄し、続いて検出可能に標識した抗 P C A - 1 抗体により処理する。次いで、この固相支持体を緩衝液で 2 回洗浄し、未結合抗体を除去する。固相支持体上の結合した抗体の量を、周知の方法に従って測定する。各測定に適する検出条件は、慣用的な試験方法を使用して当業者により適宜決定され得る。

抗 P C A - 1 抗体を検出可能に標識する方法の 1 つにおいて、当該抗体を、酵素、例えば、酵素イムノアッセイ (E I A) に使用されるもののような酵素に結合させる [Voiler, A. による「酵素標識した免疫吸着アッセイ」(" The Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (E L I S A) , 1978, Diagnostic Horizons, 2: 1 ~ 7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voiler, A. による J. Clin. Pathol., 31: 507 ~ 520, 1978; Butier, J. E. による Meth. Enzymol., 73: 482 ~ 523, 1981]。抗体に結合する酵素を、例えば分光光度測定により、可視手段による蛍光測定により検出することができる化学分子が生成されるような方法で、適当な基質、好ましくは色素原性基質と反応させる。抗体に検出可能な標識を付けるために使用することができる酵素は、ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼを包含するが、これらに限定されない。この検出はまた、酵素に対する色素原性基質を用いる比色法により達成することができる。

抗 P C A - 1 抗体の検出はまた、その他の種々の方法を用いて行うことができる。一例として、抗体または抗体断片を放射性物質で標識することによって、放射線イムノアッセイ (R I A) の使用により P C A - 1 タンパク質発現を検出することができる [例えば、Weintraub, B. による放射線免疫検定の原理、ラジオリガンド検定技術に関する第 7 回トレーニング コース (Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques), The Endocrine Society, 1986 年 3 月参照]。放射性同位元素は、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターのよう手段の使用により、もしくはオートラジオグラフィにより検出することができる。

抗体はまた、蛍光化合物により標識することができる。最も慣用の蛍光標識化合物の中には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエワトリンおよびフルオレスカミンがある。同様に、生体発光性化合物を用いて、抗体 P C A - 1 抗体を標識することもできる。生体発光性タンパク質の存在は、蛍光の存在を検出することによって測定

10

20

30

40

50

される。この標識目的に重要な生体発光性化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびイエクオリンである。

本発明の特定の態様において、体液試料中のPCA-1タンパク質の発現水準は、二次元電気泳動法により分析することができる。二次元ゲル電気泳動法は、当業者に公知である。血清試料などの体液試料を、第一段階で電荷に基づいてタンパク質を分離する等電点焦点化分離用電気泳動用ゲル上に装填する。不動化した勾配に基づく分離用のゲルストリップまたは担体両性電解質に基づく分離用の管状ゲルを包含する多数の第一段階ゲル標本を使用することができる。第一次分離後、タンパク質を第二段階ゲル上に移し、次いで平衡化し、次いでタンパク質をその分子量に基づいて分離するSDS-PAGEを用いて分離する。異なる被験者から採取した血清試料を比較する場合、複数のゲルを各血清試料から調製する。

分離後、この第二段階ゲルからウエスタンブロッティング法に慣用の膜上にタンパク質を移す。ウエスタンブロッティング法および引き続くタンパク質の可視化はまた、当業者に周知である[Sambrookらによる「分子クローニング。実験指針」(Molecular Cloning. A Laboratory Manual), 第2版、第3巻、1989, Cold Spring Harbor]。標準的方法を用いることができ、またはこの方法を特定の種類のタンパク質、例えば高度に塩基性または酸性、もしくは脂質可溶性などの種類のタンパク質の同定にかかわり当該技術で知られているように修正することもできる[例えば、Ausubelらによる「分子生物学における現在の方法」(Current Protocols in Molecular Biology), Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. 参照]。PCA-1タンパク質に結合する抗体を、ウエスタンブロッティング分析法におけるようなインキュベーション工程に用いる。第一の抗体に対して特異性の第二の抗体をウエスタンブロッティング分析法で使用し、第一抗体と反応するタンパク質を可視化する。

2. 抗PCA-1自己抗体検出のためのアッセイ

本発明は、別の態様において、被験者の体液試料中の抗PCA-1自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量する方法を提供する。この本発明の方法は、前立腺がんの診断に使用することができる。さらに抗PCA-1自己抗体レベルのモニタリングにより、前立腺がんの進行を予知することができる。

被験者からの体液試料中の抗PCA-1自己抗体の検出は、任意の多くの方法で行うことができるが、代表的な方法には、免疫アッセイがあり、例えば、ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ、ELISA、サンドイッチ免疫測定法、蛍光免疫測定法(FIA)、時間分解蛍光免疫測定法(TRFIA)、酵素免疫測定法(EIA)、発光免疫測定法(LIA)、電気化学発光免疫測定法(ECLIA)、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、プロテインA免疫検定法等が挙げられる。

このようなイムノアッセイは、様々な方法で実施することができる。例えば、このようなアッセイを実施するための1つの方法は、PCA-1タンパク質の固相支持体上への繫留、およびそれに対して特異的な抗PCA-1抗体の検出を包含する。本発明のアッセイに用いられるPCA-1タンパク質は、当該分野において周知の組換えDNA技術によって調製し得る。例えば、PCA-1タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクター中に遺伝子組換え技術により導入して、PCA-1タンパク質を大規模に発現することができる。好ましくは、PCA-1の標識、固定化または検出を容易にすることができる融合タンパク質が遺伝子操作される(例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載された技術を参照)。別法として、PCA-1タンパク質は天然の供給源から精製することができる。たとえば、当該分野において周知のタンパク質分離技術を用いて前立腺がん細胞から精製する。このような精製技術には、分子シーブクロマトグラフィーお

よび/またはイオン交換クロマトグラフィーが包含されるが、これらに限定されない。実際にはPCA-1タンパク質の固体支持体としては、マイクロタイタープレートが好都合に使用される。

上記本発明のPCA-1検出のためのアッセイまたは抗PCA-1自己抗体検出のためのアッセイは、単独で、前立腺がんの診断および/または予後評価等に使用し得る新たな方法であり得るが、本発明はそのような形態に限定されず、例えば、他の前立腺がんの診断方法と組み合わせて用いることで、診断の精度をさらに向上させることもできる。そのような他の前立腺がんの診断方法としては、触診検査、PSA検査、前立腺がん生検試料を用いた病理検査(病理学的Tステージ)、グレーソン癌スコア、超音波検査、MRI、CT、骨シンチ等が挙げられる。

(診断剤)

本発明はまた、1つの態様において、抗PCA-1抗体を含有する、被験者の体液試料中のPCA-1タンパク質またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するための、前立腺がん診断剤を提供する。

さらに本発明は、PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する、被験者の体液試料中のPCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するための、前立腺がん診断剤を提供する。

本発明はさらに別の態様において、PCA-1またはその断片を含有する、被験者の体液試料中の抗PCA-1自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するための、前立腺がん診断剤を提供する。

本発明の診断剤は、被験者の体液試料(例えば、血液、尿)中の例えば、PCA-1タンパク質、PCA-1遺伝子、または抗PCA-1自己抗体を検出するための成分を含有する。

(1)抗PCA-1抗体を用いる診断剤

例えば、被験者の体液試料中のPCA-1タンパク質またはその断片がELISAで検出および/または定量される場合、このような成分は、例えば、血液や尿のような体液試料中のPCA-1のレベルを検出および/または定量するために使用され得るPCA-1タンパク質のエピトープに向けられた抗体から構成される。抗体はそれ自体で検出可能なように放射能、蛍光、比色、または酵素標識で標識されていてもよい。

(2)核酸(またはヌクレオチド)プローブまたはプライマーを用いる診断剤

例えば、被験者の体液試料中のPCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片がプローブとのハイブリダイゼーションによって検出および/または定量される場合、このような成分は、例えば、PCA-1遺伝子の塩基配列に基づいて設計されるプローブ又はプライマーから構成される。このようなプローブまたはプライマーは、配列番号1に示されるPCA-1遺伝子のヌクレオチド配列から、任意の数の適した(センスまたはアンチセンスの)プローブまたはプライマーを設計して得ることができる。このような診断剤を用いる診断は、具体的には、例えば、(a)被験者由来の体液試料と、PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチド(プローブ)とを接触させる工程、および(b)前記試料中での前記ポリヌクレオチドと、PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片とのハイブリダイゼーションを検出および/または定量する工程を包含する方法を実施することによって行われる。

本発明の診断剤を用いる診断方法では、被験者由来の生体試料中のPCA-1遺伝子のDNA(もしくはその断片)またはmRNA(もしくはその断片)等を、上記プローブを使用して検出および/または定量する。プローブとして用いる塩基配列の長さは、例えば、12塩基以上、15塩基以上、18塩基以上、21塩基以上、24塩基以上、27塩基以上、30塩基以上、またはさらに長い長さのポリヌクレオチド断片であり得る。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュ

10

20

30

40

50

ラー・クローニング (Molecular Cloning Third Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。ここで、「ストリンジェントな条件」は、低ストリンジェントな条件、中ストリンジェントな条件及び高ストリンジェントな条件のいずれでもよい。「低ストリンジェントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、32 の条件である。また、「中ストリンジェントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、42 の条件である。「高ストリンジェントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、50 の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

10

なお、本明細書中、「PCA-1 遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列」には、PCA-1 遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列に相補的な塩基配列 (アンチセンスDNA) も含まれるものとする。プローブおよび核酸のハイブリダイゼーションの方法は当業者に知られており、例えば国際公開公報第89/06698号、EP-A0200362、米国特許第2,915,082号、EP-A0063879、EP-A0173251、EP-A0128018に記載されている。

20

上記本発明の診断剤および診断方法を用いるに際しては、PCA-1 遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片に対する特異的プローブまたはプライマーを用いて、公知の手法を用いて標的配列を検出または定量することができる。そのような公知の手法として、例えば、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR法、PCR-SSCP法 (Genomics, 第5巻, 874~879頁 (1989年))、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766~2770頁 (1989年))、FISH法、DNAチップあるいはアレイCGH法などを用いることができる。定量的な検出は、定量RT-PCRによって実施可能である。

30

(3) PCA-1 抗原を用いる診断剤

例えば、自己抗体がELISAによって検出および/または定量される場合、このような成分は、固相支持体に結合された少なくとも1種、好ましい複数種の異なるPCA-1 抗原またはそれらのエピトープの形態における標的抗原、および標的抗原に結合する抗PCA-1 自己抗体を検出するための手段から構成される。このような検出手段は、例えば、抗PCA-1 自己抗体の定常部領域に向けられた抗体 (例えば、ウサギ抗ヒトIgG抗体) であり、それ自体で検出可能なように標識されている (例えば、放射能、蛍光、比色、または酵素標識) か、または標識された二次抗体 (例えば、ヤギ抗-ウサギ抗体) によって検出される。この診断剤は、上述の免疫学的手法により、前立腺がんマーカーを検出するために用いられる。

40

(キット)

本発明はまた、1つの態様において、抗PCA-1 抗体を含有する、被験者の体液試料中のPCA-1 タンパク質またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキットを提供する。このキットは、上述の免疫学的手法により、前立腺がんマーカーを検出するために用いられる。

さらに、本発明は別の態様において、PCA-1 遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダ

50

イズ可能な塩基配列を含有する、被験者由来の体液試料中のPCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキットをも提供する。このキットは、上述のハイブリダイゼーション法により、前立腺がんマーカーを検出するために用いられる。

さらに、本発明はさらに別の態様において、PCA-1またはその断片を含有する、被験者の体液試料中の抗PCA-1自己抗体を前立腺がんマーカーとして検出および/または定量するためのキットを提供する。このキットは、上述の免疫学的手法により、前立腺がんマーカーを検出するために用いられる。

上記第一の態様のキットは、被験者からの体液試料中のPCA-1抗原を検出および/または定量する成分を含有する。例えば、PCA-1タンパク質がELISAで検出および/または定量される場合、このような成分は、例えば、血液や尿のような体液試料中のPCA-1のレベルを検出および/または定量するために使用され得るPCA-1タンパク質のエピトープに向けられた抗体から構成される。抗体はそれ自体で検出可能なように放射能、蛍光、比色、または酵素標識で標識されていてもよい。別法として、キットは、標識された二次抗体を含有していてもよい。

10

上記第二の態様のキットは、被験者からの体液試料中のPCA-1遺伝子もしくはその断片、または該遺伝子の転写産物(mRNA)もしくはその断片等を検出および/または定量する成分を含有する。このような成分は、例えば、PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドから構成される。例えば、本発明のキットは、DNAチップ上に固定された上記ポリヌクレオチドを含有し得る。

20

上記第三の態様のキットは、被験者からの体液試料中の抗PCA-1自己抗体を検出および/または定量するために必要な成分を含有する。例えば、自己抗体がELISAによって検出および/または定量される場合、このような成分は、固相支持体に結合された少なくとも1種、好ましい複数種の異なるPCA-1抗原またはそれらのエピトープの形態における標的抗原、および標的抗原に結合する抗PCA-1自己抗体を検出するための手段から構成される。このような検出手段は、例えば、抗PCA-1自己抗体の定常部領域に向けられた抗体(例えば、ウサギ抗ヒトIgG抗体)であり、それ自体で検出可能なように標識されている(例えば、放射能、蛍光、比色、または酵素標識)か、または標識された二次抗体(例えば、ヤギ抗-ウサギ抗体)によって検出される。

30

本発明のキットは、抗PCA-1抗体、PCA-1遺伝子、PCA-1 mRNA、またはその断片の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチド、PCA-1抗原または抗PCA-1自己抗体に対する抗体等の他に、容器およびラベル等を含んでいてもよい。容器上のまたは容器に伴うラベルには、薬剤が前立腺がんマーカーの検出に使用されることが示されていてもよい。また、他のアイテム、例えば、使用説明書、標識二次抗体等がさらに含まれていてもよい。

以下、実施例を用いて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されない。

40

【実施例】

【0006】

(実施例1)

(質量分析装置を用いた血中PCA-1の検出)

1. 試料の前処理

(血球成分、アルブミン、IgG等の除去)

前立腺がんの罹患者由来の血清は、採血直後の血液を室温で40分間静置させた後、遠心分離によって血球成分を除去し調製した。検体サンプル(血清)12.5μlを、予め100mM炭酸水素アンモニウムで平衡化したBlue Sepharose 6 Fast Flow樹脂(Amersham Biosciences社)50μlに加えて、穏やかに混合して静置した。5分後、1.5mlのマイクロチューブにセットしたミ

50

ニカラム (Wizard Minicolumns, Promega社) に Blue Sepharose 6 Fast Flow 樹脂と一緒に移し、遠心分離によってアルブミンを分離除去した。

次に、1.5 ml マイクロチューブに回収された分画を、予め 100 mM 炭酸水素アンモニウムで平衡化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow 樹脂 (Amersham Biosciences 社) 50 μ l に加えて、穏やかに混合して静置し、上記と同様の遠心分離を行って、IgG を分離除去した。

最終的に、これらの操作から得られた分画の液量は 65 μ l 程度になった。

(トリプシン処理)

上記の処理から得られた分画から 25 μ l を取り、25 μ l の 100 mM 炭酸水素アンモニウムと混合し、0.5 μ g のトリプシンを加えて、37 $^{\circ}$ C で一晩保温をした。直ちに測定を行わない場合は、これを -80 $^{\circ}$ C で保存した。

10

2. 血中 PCA-1 の検出

本実施例においては、HPLC で分離した試料中の成分をイオン化してその質量を計測する HPLC と結合した質量分析装置を用いた。具体的には、イオン源として nanoESI イオン源およびガラスキャピラリーとして PicoTip needle (本体内径 20 μ m、先端内径 10 μ m) (LC Packings 社) を装備したイオントラップ型の液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS) である HCTplus (ブルーカー・ダルトニクス社) を、キャピラリー電圧 1.2 kV ~ 1.5 kV で使用した。プレカラムとして、0.1% 蟻酸を含有する 2% アセトニトリルで平衡化させた 0.3 \times 10 mm カラムを、流速 30 μ L / 分で使用した。本カラムとして、0.075 \times 150 mm のカラムを 200 nL / 分の流速で使用した。試料の溶出液として、溶出液 A (0.1% 蟻酸を含有する 2% アセトニトリル) および溶出液 B (0.1% 蟻酸を含有する 80% アセトニトリル) を、以下のような勾配に従って使用した：0 / 0 - 5 / 0 - 90 / 50 - 95 / 100 - 100 / 100 - 100 / 0 (分 / B%) 。

20

上記質量分析装置の LC カラムの試料ホルダに、上記のようにトリプシン処理した試料をセットして、測定を開始した。

(結果)

図 1 は、上記 LC - MS 質量分析装置によりモニタリングした前立腺がんを有する被験者由来の血液サンプルの溶出プロファイルを示す。グラフの縦軸はイオン強度、そして横軸は保持時間に対応する。図示されるように、血液サンプル中にはトリプシン分解ペプチド断片のピークが多数存在している。当該前立腺がん患者の血液試料中に PCA-1 が存在しているとすれば、これらのピークのいずれかは PCA-1 由来のトリプシン分解ペプチド断片であるはずである。

30

本発明者らは、これらのピークの中に PCA-1 に由来するペプチド断片のピークが存在しているか否かを確認するために、PCA-1 に特有のトリプシン分解ペプチド断片の質量をそのアミノ酸配列に基づいて算出し、その特定の質量を有するペプチド断片を選択的にモニタリングすることを試みた。

表 1 は、in silico での算出により得られた PCA-1 のトリプシン分解ペプチド断片 (ペプチド質量 600 以上)、ならびに予想される質量、予想される 2 価のイオン質量電荷比 (m/z)、および各ペプチド断片の PCA-1 アミノ酸配列中での位置を示す。

40

【表 1】

(表 1)

The peptide masses from PCA-1

[Theoretical pI 8.58 / Mw (average mass): 33374.70 / Mw (monoisotopic mass): 33353.88]

配列番号	質量	2価時の質量電荷比	position	peptide sequence
3	2501.249	1251.624	237-258	IPLDHGTLIMEGATQADWQ HR
4	2129.011	1062.505	165-182	IEENTGHTFNSLCNLYR
5	1971.940	986.970	101-116	EADWLEQLCQDVPWK
6	1792.827	897.413	220-234	KPPPEENGQDYTYVER
7	1725.877	863.939	146-159	ITMEPNPHWHPVLR
8	1718.830	860.415	132-145	LTAWYGELPYTYSR
9	1713.723	857.862	186-200	DSVDWHSDEPSLGR
10	1592.805	797.402	75-89	EGVYEISLSPTGVSR
11	1445.753	723.876	32-43	SHLHQQPQQTWK
12	1334.702	668.351	201-213	CPIASLSFGATR
13	1238.637	620.318	90-100	VCLYPGFVDVK
14	1185.635	593.818	20-31	SQAIAQPATTAQ
15	1148.546	575.273	123-131	EDITYGQPR
16	1025.566	513.783	10-19	VQGAWAAPVK
17	892.415	447.208	46-52	EHHLSDR
18	854.461	428.231	58-64	EPQGVVR
19	846.424	424.212	276-282	TVYPDPR
20	748.423	375.212	270-275	VNLTFR
21	690.309	346.154	262-266	EYHSR
22	682.311	342.155	214-218	TFEMR
23	668.353	335.177	53-57	EFVFK

The peptide masses from PSA

[Theoretical pI 6.20 / Mw (average mass): 21039.35 / Mw (monoisotopic mass): 21025.72]

配列番号	質量	2価時の質量電荷比	position	peptide sequence
24	4131.184	2066.592	1-37	PQAYHLHPESCVMWVPVVF LTLSVTWIGAAPLILSR
25	3492.692	1747.346	91-120	HSLFHPEDTQQVFQVSHSFP HPLYDMSLLK
26	3466.631	1734.316	151-182	VMDLPTQEPALQTTTCYASGW GSIEPEEFLTPK
27	2229.165	1115.583	61-81	AVCGGLVHPCQWVLTAAHCI R
28	1870.936	936.468	123-138	FLRPGDSSHDMLLR
29	1406.742	704.371	47-58	HSQFQWLVASR
30	1271.661	636.830	139-150	LSEPAELTDAVK
31	1019.475	510.737	38-46	IVGGWECEK
32	756.486	379.243	84-90	SVILLGR
33	689.342	345.671	184-189	LGGVDL

上記質量分析装置では、HPLCから溶出されるペプチドの質量のみならず、そのペプチドをイオン化する際に当該ペプチドに過剰なエネルギーを与えることによってそのペプチドが開裂して生じる様々な長さの断片化ペプチド（開裂ペプチド）の質量も測定することができる。そして、これらの開裂ペプチドの質量の差を解析することによって、ペプチドを構成するアミノ酸配列を決定することができる。

一方、この原理を利用すれば、多数の異なる質量を有するペプチドの混合物の中から、アミノ酸配列の分かっている特定のペプチドを、そのアミノ酸配列の質量および当該ペプチドから生じ得る開裂ペプチドの質量とを用いて検出することができるはずである。すなわち、PCA-1のトリプシン分解ペプチド断片のアミノ酸配列から予測される質量と、当該ペプチドから予測される開裂ペプチドの質量とを用いて、前立腺がん患者からの血液サンプル中にPCA-1に特有の配列を有する分子が存在するか否かを確認することができる。

そこで、表1に示されるPCA-1ペプチド断片の中から、PCA-1のアミノ酸位置75-89位のペプチド断片：EGVYEISLSPTGVSR（配列番号：10）およびアミノ酸位置10-19位のペプチド断片：VQGAWAAPVK（配列番号：16）を任意に選び、これらの分子のアミノ酸配列から導かれる質量（それぞれ、1592.805および1025.566）からさらに予想される開裂ペプチドの質量を有する分子を選択的にモニタリングした。図2AおよびBはその溶出プロファイルを示す。

図2Aに示されるように、配列番号10の質量から予測される2価時の質量電荷比797.4 m/zおよび当該ペプチドから生じ得る開裂ペプチドの1価時の質量電荷比703 m/zを選択的に捕捉するように測定条件を設定すると、保持時間68分付近に単一の強いピーク（図中、矢印を付した）を観察した。これは、PCA-1に特有の配列を有するペプチドが被検サンプル中に存在することを強く示唆する。また、図2Bに示されるよう

れは、配列番号29のペプチド断片の一部と一致しており、これにより、配列番号29のペプチド断片が被検サンプル中に存在したことが確認できた。

図6は、図2に示す実験の比較例として、前処理およびトリプシン処理を施した健常者由来の血液試料について、図2に示す実験と同様の測定条件で特定の質量を有する分子のモニタリングを行った場合の溶出プロファイルを示す。図示されるように、特定の高強度のピークは観察されなかった。これは、健常者の血液試料中に予測されるPCA-1トリプシン分解ペプチド断片およびPSAトリプシン分解ペプチド断片の質量に相当する質量を有する分子が、本発明者らの開発したLC-MS質量分析装置による検出法では検出できないほど微量に存在するかもしれないことを示す。

このように、本発明者らの開発した、LC-MS質量分析装置による血液試料中の特定配列の検出方法により、PCA-1が前立腺がん患者由来の血液中に存在すること、そして健常者の血液試料中には検出可能には存在しないことが示された。

このことは、PCA-1が血中の前立腺がんマーカーとして、PSAと同様に使用され得ることを示す。さらに、この結果は、PCA-1タンパク質自体が前立腺がん患者中で自己抗原になり得ること強く示唆するものである。それゆえPCA-1に対する自己抗体もまた、血中の前立腺がんマーカーとして使用し得ることも示すことを当業者は理解し得る。

(実施例2)

(ウエスタンブロッティングによる尿中PCA-1の検出)

(手順)

尿検体16 μ l(健常人2検体、前立腺がん患者2検体)を12% NuPAGE Novex Bis-Tris GelならびにNuPAGE Novex Bis-Tris電気泳動システム(Invitrogen社製)を用いて電気泳動した。泳動後、セミドライブロッティング装置(BioRad)を用いてPVDF(polyvinylidene fluoride)膜(BioRad)に蛋白質を転写した。PVDF膜は、3%ウシ血清アルブミン-リン酸緩衝生理食塩水を用いて4-12時間ブロッキングした。TBS-T(20mM Tris-HCl、pH8.0、137mM NaCl、0.1% Tween20)により3回洗浄後、抗PCA-1ポリクローナル抗体(1 μ g/ml)とともに室温で1時間インキュベートし、TBS-Tで3回洗浄した。抗原抗体結合を検出するために当該膜をTBS-Tで希釈した0.1 μ g/ml HRP(Horseradish peroxidase)架橋抗ウサギIgG(Santa Cruz Biotech社製)中で室温1時間インキュベートした。TBS-Tにて3回洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection System(Amersham Bioscience社製)を用いて化学発光を惹起し、Light-Capture(ATTO社製)を用いてその化学発光を検出した。

(結果)

図7にその結果を示す。示されるように、前立腺がん患者の尿検体において、抗PCA-1抗体により検出される顕著な単一バンドが認められた。マーカーを用いた解析により、その位置はPCA-1タンパク質の推定分子量に一致した。一方、健常人の尿においては1例で弱いながら前立腺がん患者の尿検体で検出されたバンドと同じ位置にバンドが認められたが、もう1例は検出限界以下であった。

このように、PCA-1は、健常人の尿検体中ではわずかに検出されるのみかまたは実質的に検出されなかったが、前立腺がん患者由来の尿検体では顕著に検出された。この結果は、PCA-1が尿中の前立腺がんマーカーとして使用し得ることを示す。

【産業上の利用可能性】

【0007】

本発明は、前立腺がんの診断を、正確かつ迅速、簡易に行い得、また患者および医師の両方の負担を軽減し得る前立腺がんマーカーとして有用である。

[配列表]

10

20

30

40

50

SEQUENCE LISTING

<110> Link Genomics, Inc.
 PCA InterMed
 Osaka University

<120> Method for diagnosing prostate cancer

<130> PCT06-0024

<150> JP 2005-071387

<151> 2005-03-14

<150> JP 2005-241414

<151> 2005-08-23

<160> 34

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1520

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (407)..(1267)

<400> 1

```

aggtcacaga ctgcggagtg ggtcaggggc tgcgagggtc gcccccaagtc ctaccggggtt      60
tgcacggggcg cgccccgctc cgccccgcaag tgcgccttcc tgaattactg ctgggtgctc      120
ggggctgggg gtgcgagtac caccctgaa gtctcttctt gggcgacctc cggggcctca      180
ttctaggcct ccttaaagag aaggatctaa attaggaaaa ggaagtgccc ttatccacga      240
ccaagetctt ccacctgctg agctcgctta gtctgcacct caaccgtgctg gaaagtgact      300
gccctgttta ctgaggaaaa actggggctc agaaagatac catggagtag tttgaaacag      360
gaacaaaatc ttctgaaagc tcggagcaga agcctttttg gtcaac atg gag gaa      415
Met Glu Glu

```

aaa aga cgg cga gcc cga gtt cag gga gcc tgg gct gcc cct gtt aaa	463
Lys Arg Arg Arg Ala Arg Val Gln Gly Ala Trp Ala Ala Pro Val Lys	
5 10 15	
agc cag gcc att gct cag cca gct acc act gct aag agc cat ctc cac	511
Ser Gln Ala Ile Ala Gln Pro Ala Thr Thr Ala Lys Ser His Leu His	
20 25 30 35	
cag aag cct ggc cag acc tgg aag aac aaa gag cat cat ctc tct gac	559
Gln Lys Pro Gly Gln Thr Trp Lys Asn Lys Glu His His Leu Ser Asp	
40 45 50	
aga gag ttt gtg ttc aaa gaa cct cag cag gta gta cgt aga gct cct	607
Arg Glu Phe Val Phe Lys Glu Pro Gln Gln Val Val Arg Arg Ala Pro	
55 60 65	
gag cca cga gtg att gac aga gag ggt gtg tat gaa atc agc ctg tca	655
Glu Pro Arg Val Ile Asp Arg Glu Gly Val Tyr Glu Ile Ser Leu Ser	
70 75 80	
ccc aca ggt gta tct agg gtc tgt ttg tat cct ggc ttt gtt gac gtg	703
Pro Thr Gly Val Ser Arg Val Cys Leu Tyr Pro Gly Phe Val Asp Val	
85 90 95	
aaa gaa gct gac tgg ata ttg gaa cag ctt tgt caa gat gtt ccc tgg	751
Lys Glu Ala Asp Trp Ile Leu Glu Gln Leu Cys Gln Asp Val Pro Trp	
100 105 110 115	
aaa cag agg acc ggc atc aga gag gat ata act tat cag caa cca aga	799
Lys Gln Arg Thr Gly Ile Arg Glu Asp Ile Thr Tyr Gln Gln Pro Arg	
120 125 130	
ctt aca gca tgg tat gga gaa ctt cct tac act tat tca aga atc act	847
Leu Thr Ala Trp Tyr Gly Glu Leu Pro Tyr Thr Tyr Ser Arg Ile Thr	
135 140 145	
atg gaa cca aat cct cac tgg cac cct gtg ctg cgc aca cta aag aac	895
Met Glu Pro Asn Pro His Trp His Pro Val Leu Arg Thr Leu Lys Asn	
150 155 160	
cgc att gaa gag aac act ggc cac acc ttc aac tcc tta ctc tgc aat	943
Arg Ile Glu Glu Asn Thr Gly His Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Asn	
165 170 175	
ctt tat cgc aat gag aag gac agc gtg gac tgg cac agt gat gat gaa	991
Leu Tyr Arg Asn Glu Lys Asp Ser Val Asp Trp His Ser Asp Asp Glu	
180 185 190 195	

Pro Val Lys Ser Gln Ala Ile Ala Gln Pro Ala Thr Thr Ala Lys Ser
 20 25 30

His Leu His Gln Lys Pro Gly Gln Thr Trp Lys Asn Lys Glu His His
 35 40 45

Leu Ser Asp Arg Glu Phe Val Phe Lys Glu Pro Gln Gln Val Val Arg
 50 55 60

Arg Ala Pro Glu Pro Arg Val Ile Asp Arg Glu Gly Val Tyr Glu Ile
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Pro Thr Gly Val Ser Arg Val Cys Leu Tyr Pro Gly Phe
 85 90 95

Val Asp Val Lys Glu Ala Asp Trp Ile Leu Glu Gln Leu Cys Gln Asp
 100 105 110

Val Pro Trp Lys Gln Arg Thr Gly Ile Arg Glu Asp Ile Thr Tyr Gln
 115 120 125

Gln Pro Arg Leu Thr Ala Trp Tyr Gly Glu Leu Pro Tyr Thr Tyr Ser
 130 135 140

Arg Ile Thr Met Glu Pro Asn Pro His Trp His Pro Val Leu Arg Thr
 145 150 155 160

Leu Lys Asn Arg Ile Glu Glu Asn Thr Gly His Thr Phe Asn Ser Leu
 165 170 175

Leu Cys Asn Leu Tyr Arg Asn Glu Lys Asp Ser Val Asp Trp His Ser
 180 185 190

Asp Asp Glu Pro Ser Leu Gly Arg Cys Pro Ile Ile Ala Ser Leu Ser
 195 200 205

Phe Gly Ala Thr Arg Thr Phe Glu Met Arg Lys Lys Pro Pro Pro Glu
 210 215 220

Glu Asn Gly Asp Tyr Thr Tyr Val Glu Arg Val Lys Ile Pro Leu Asp
 225 230 235 240

His Gly Thr Leu Leu Ile Met Glu Gly Ala Thr Gln Ala Asp Trp Gln
 245 250 255

His Arg Val Pro Lys Glu Tyr His Ser Arg Glu Pro Arg Val Asn Leu
 260 265 270

Thr Phe Arg Thr Val Tyr Pro Asp Pro Arg Gly Ala Pro Trp
 275 280 285

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 1 by tryptic digestion

<400> 3

Ile Pro Leu Asp His Gly Thr Leu Leu Ile Met Glu Gly Ala Thr Gln
 1 5 10 15

Ala Asp Trp Gln His Arg
 20

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 2 by tryptic digestion

<400> 4

Ile Glu Glu Asn Thr Gly His Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Asn Leu
1 5 10 15

Tyr Arg

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 3 by tryptic digestion

<400> 5

Glu Ala Asp Trp Ile Leu Glu Gln Leu Cys Gln Asp Val Pro Trp Lys
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 4 by tryptic digestion

<400> 6

Lys Pro Pro Pro Glu Glu Asn Gly Asp Tyr Thr Tyr Val Glu Arg
1 5 10 15

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 5 by tryptic digestion

<400> 7

Ile Thr Met Glu Pro Asn Pro His Trp His Pro Val Leu Arg
1 5 10

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PCA-1 peptide fragment 6 by tryptic digestion

<400> 8

Leu Thr Ala Trp Tyr Gly Glu Leu Pro Tyr Thr Tyr Ser Arg
1 5 10

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PCA-1 peptide fragment 7 by tryptic digestion

<400> 9

Asp Ser Val Asp Trp His Ser Asp Asp Glu Pro Ser Leu Gly Arg
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PCA-1 peptide fragment 8 by tryptic digestion

<400> 10

Glu Gly Val Tyr Glu Ile Ser Leu Ser Pro Thr Gly Val Ser Arg
1 5 10 15

Glu His His Leu Ser Asp Arg
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 16 by tryptic digestion

<400> 18

Glu Pro Gln Gln Val Val Arg
1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 17 by tryptic digestion

<400> 19

Thr Val Tyr Pro Asp Pro Arg
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 18 by tryptic digestion

<400> 20

Val Asn Leu Thr Phe Arg
1 5

<210> 21

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 19 by tryptic digestion

<400> 21

Glu Tyr His Ser Arg
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 20 by tryptic digestion

<400> 22

Thr Phe Glu Met Arg
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> PCA-1 peptide fragment 21 by tryptic digestion

<400> 23

Glu Phe Val Phe Lys
1 5

<210> 24
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> PSA peptide fragment 1 by tryptic digestion

<400> 24

Pro Gln Ala Tyr His Leu His Pro Glu Ser Cys Val Thr Met Trp Val
1 5 10 15

Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly Ala Ala Pro
 20 25 30

Leu Ile Leu Ser Arg
 35

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PSA peptide fragment 2 by tryptic digestion

<400> 25

His Ser Leu Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser
1 5 10 15

His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys
 20 25 30

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PSA peptide fragment 3 by tryptic digestion

<400> 26

Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr
1 5 10 15

Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys
20 25 30

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PSA peptide fragment 4 by tryptic digestion

<400> 27

Ala Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala
1 5 10 15

Ala His Cys Ile Arg
20

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PSA peptide fragment 5 by tryptic digestion

<400> 28

Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg
1 5 10 15

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PSA peptide fragment 6 by tryptic digestion

<400> 29

His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PSA peptide fragment 7 by tryptic digestion

<400> 30

Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys
1 5 10

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PSA peptide fragment 8 by tryptic digestion

<400> 31

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PSA peptide fragment 9 by tryptic digestion

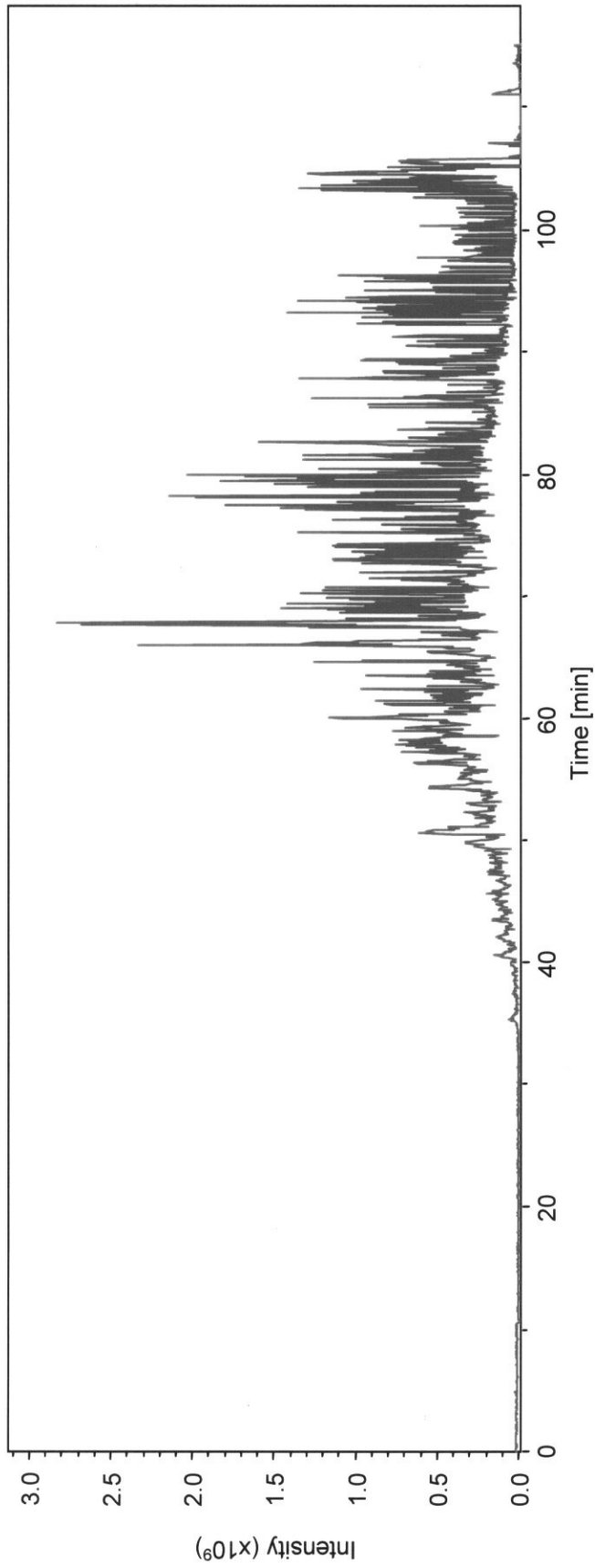
<400> 32

Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg
1 5

<210> 33

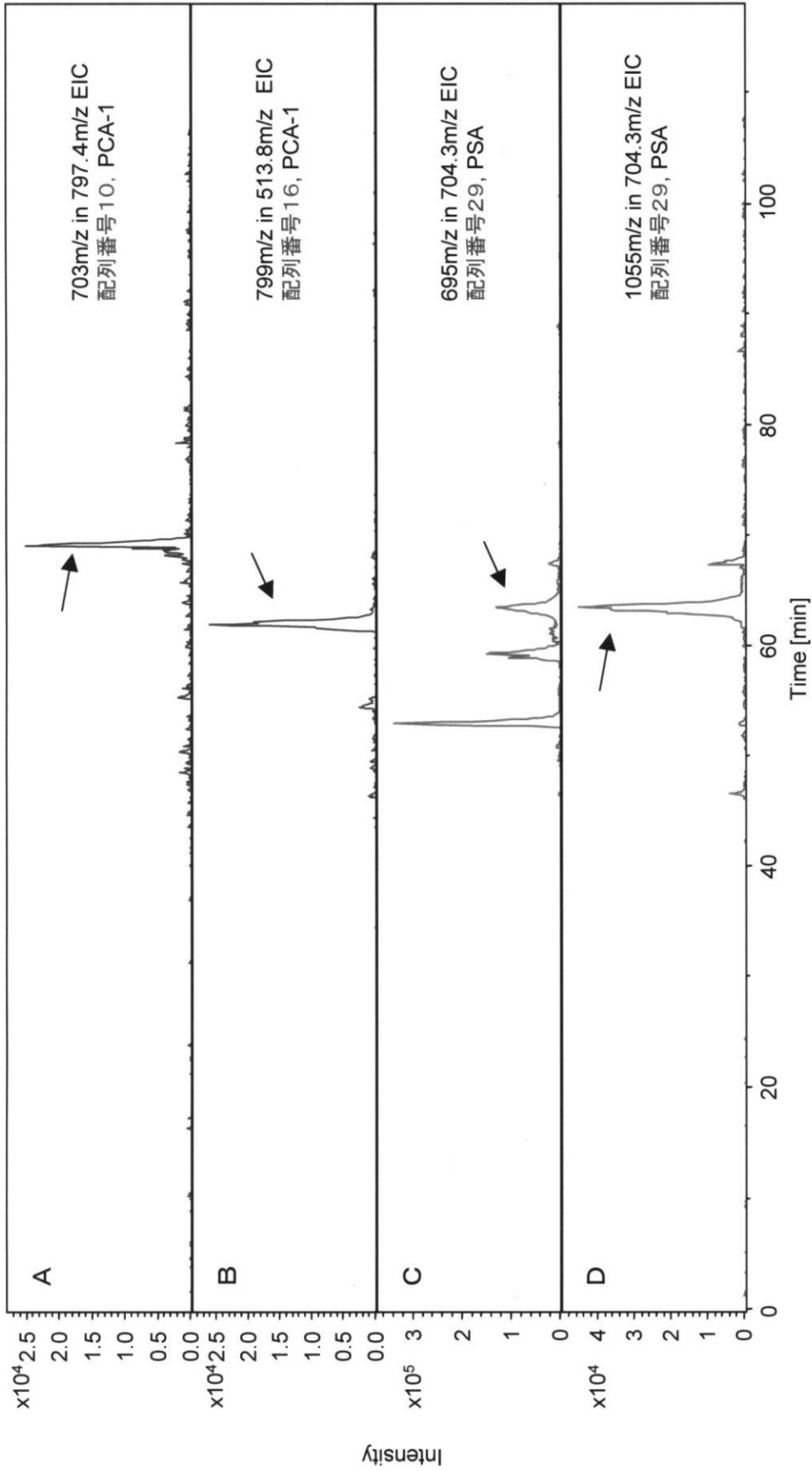
【 図 1 】

Fig. 1



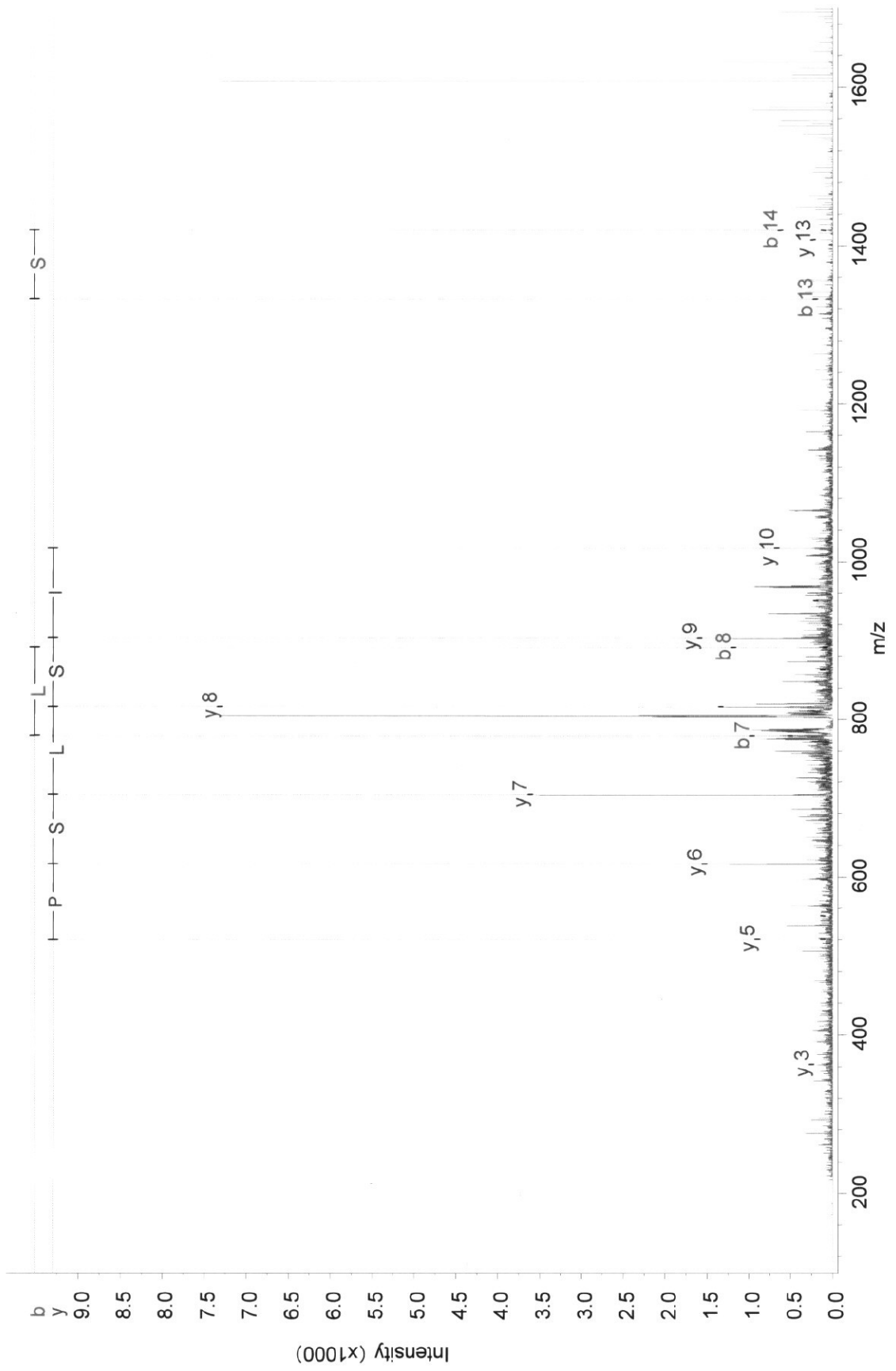
【 図 2 】

Fig. 2



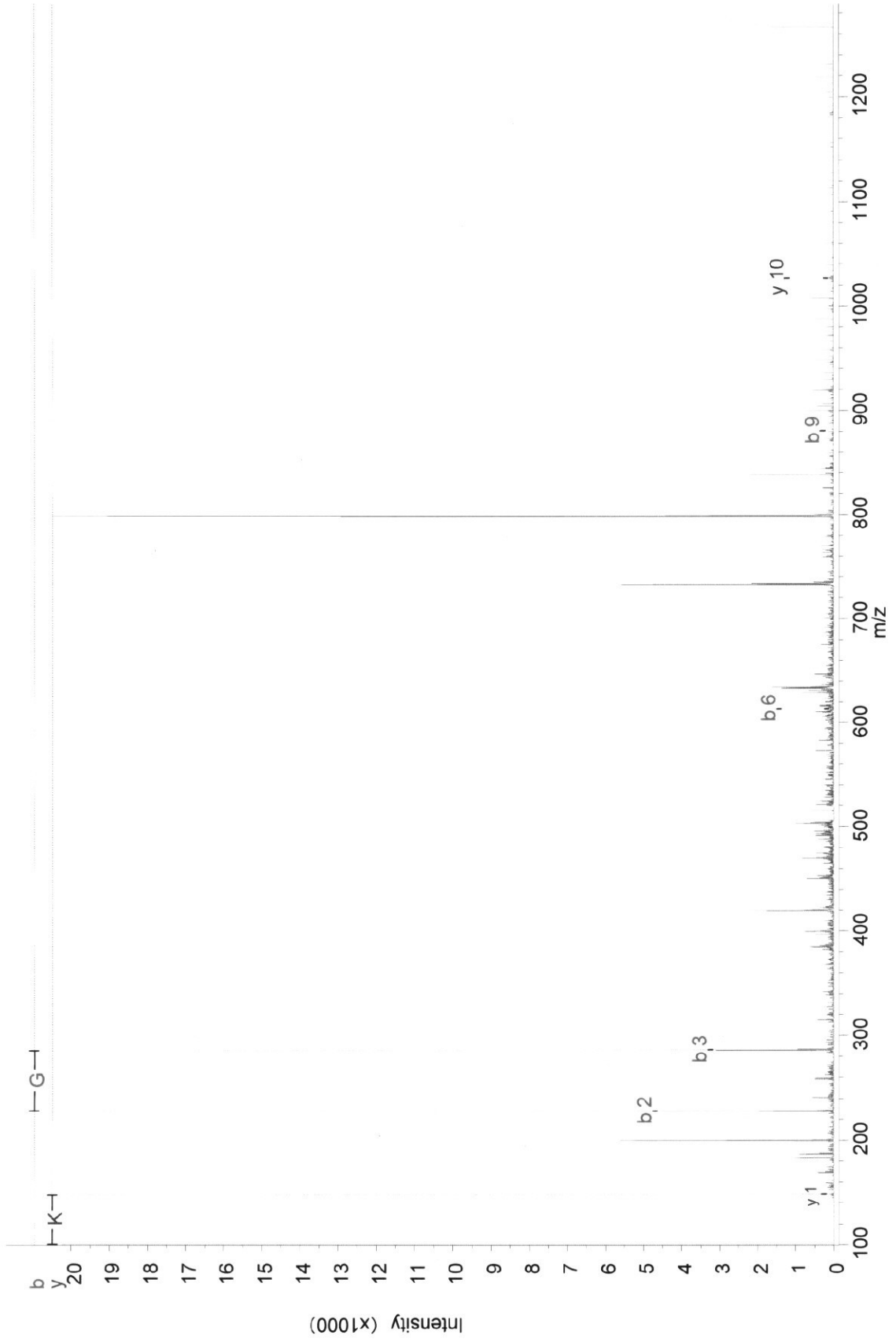
【 図 3 】

Fig. 3



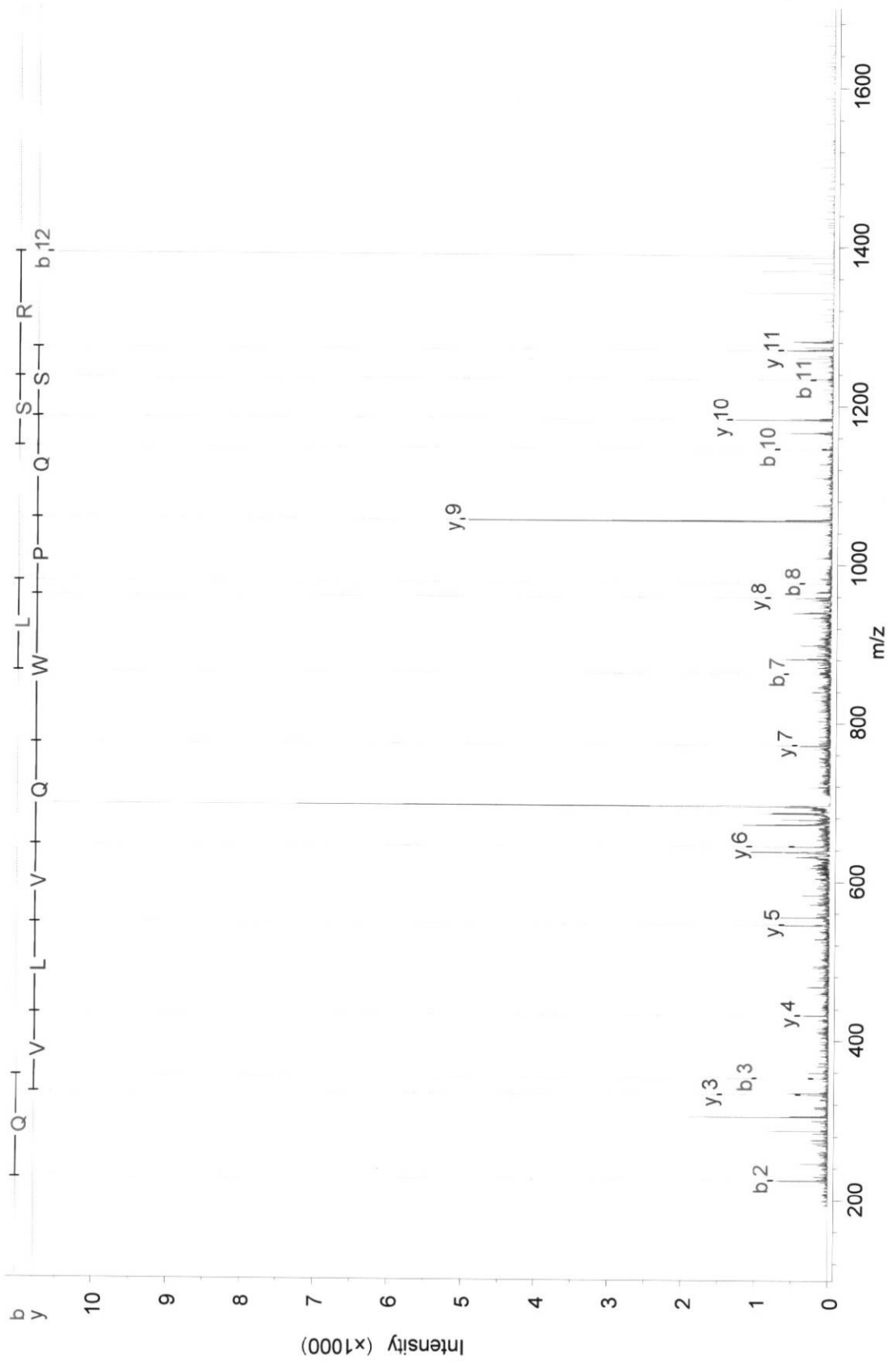
【 図 4 】

Fig. 4



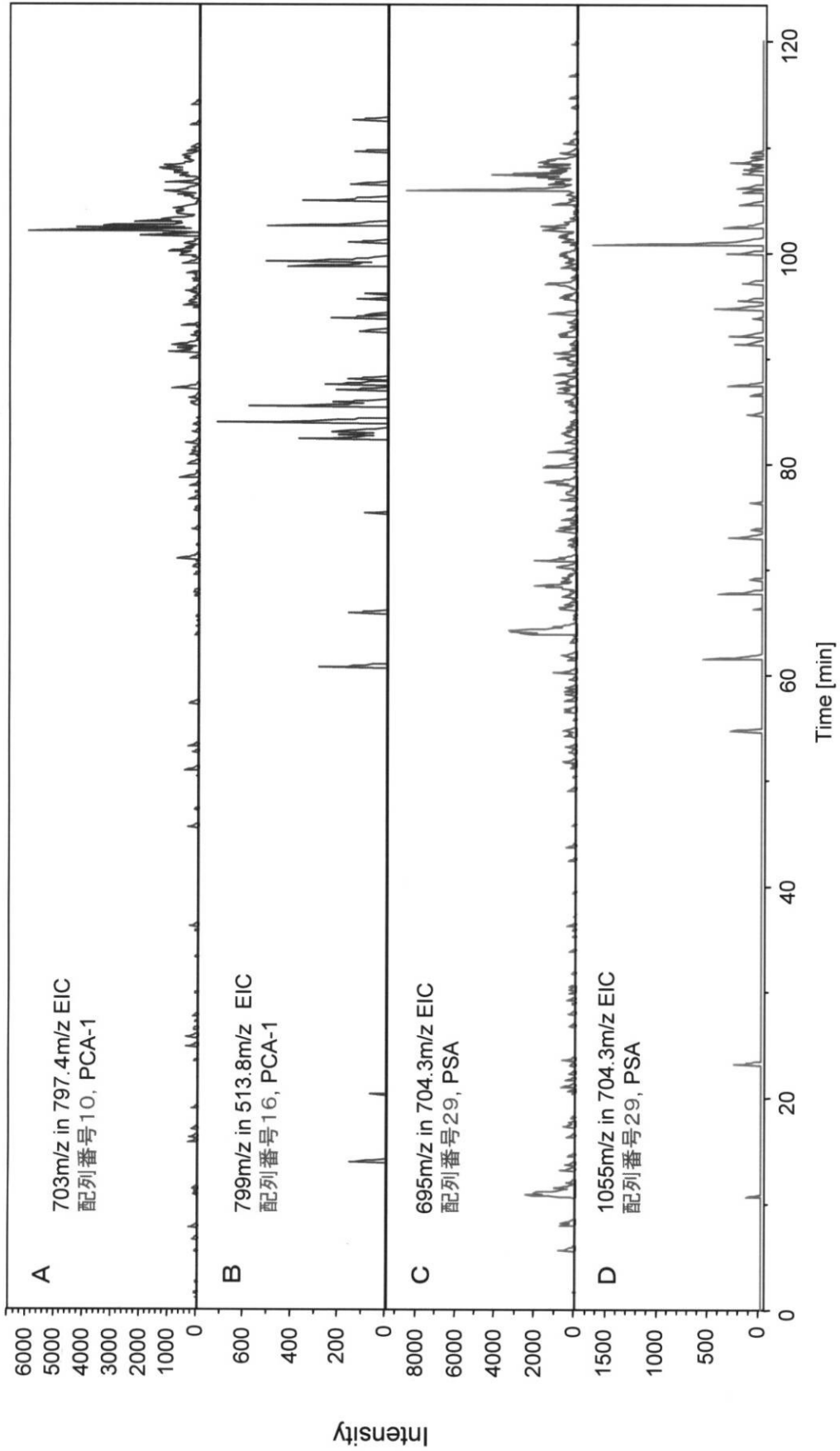
【 図 5 】

Fig. 5



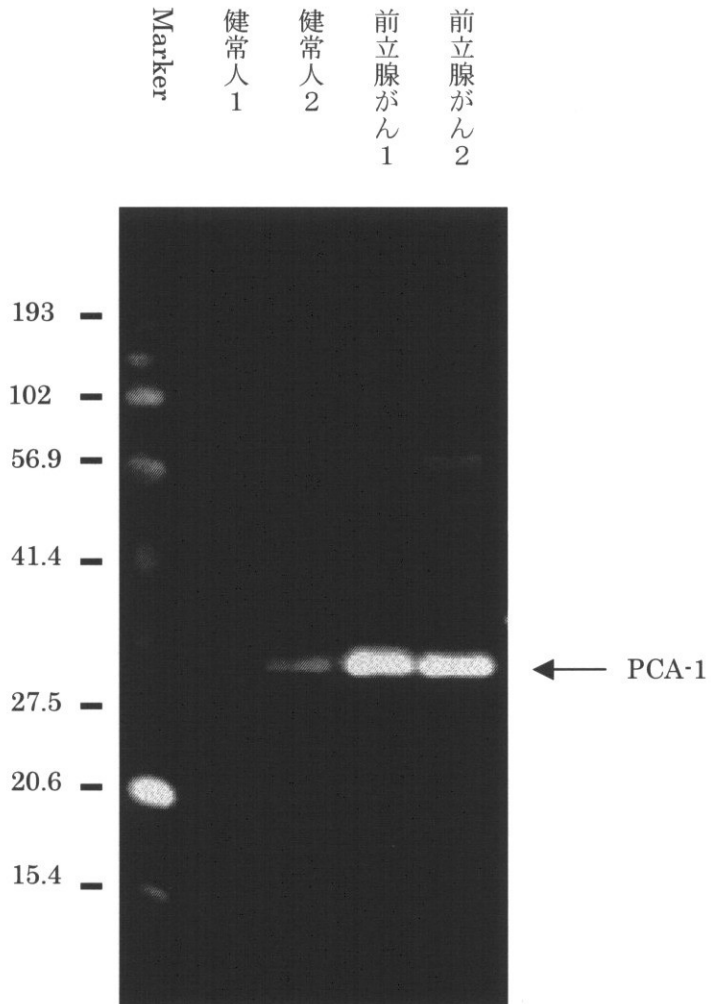
【 図 6 】

Fig. 6



【図 7】

Fig. 7



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/305480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), G01N27/62 (2006.01)		
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) G01N33/574 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), G01N27/62 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shiei KAN et al., "Zenritsusengan ni okeru Prostate Cancer Antigen-1 (PCA-1) no Hatsugen to Kino", Nippon Yakugakukai Nenkai Koen Yoshishu, Vol.124, No.3, page 110, (2004)	1-32
A	Kazutake TSUJIKAWA et al., "DNA, RNA Datsu Methylete Koso PCA-1 (hABH3) no Cloning to Hatsugen Kaiseki", Nippon Gan Gakkai Sokai Kiji, Vol.62, pages 387 to 388 (2003)	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 28 June, 2006 (28.06.06)		Date of mailing of the international search report 11 July, 2006 (11.07.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/305480									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01), C07K16/18(2006.01), G01N27/62(2006.01)											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01), C07K16/18(2006.01), G01N27/62(2006.01)											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2006年										
日本国実用新案登録公報	1996-2006年										
日本国登録実用新案公報	1994-2006年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	韓孜泳ほか, 「前立腺癌における Prostate Cancer Antigen-1 (PCA-1) の発現と機能」, 日本薬学会年会講演要旨集, 第124巻, 第3号, 110ページ, (2004)	1-32									
A	辻川和文ほか, 「DNA, RNA脱メチル化酵素PCA-1 (hABH3) のクローニングと発現解析」, 日本癌学会総会記事, 第62巻, 387-388ページ, (2003)	1-32									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献									
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 28.06.2006		国際調査報告の発送日 11.07.2006									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典	2J 9507								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

フロントページの続き

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

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 辻川 和丈

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 山元 弘

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 小西 登

奈良県橿原市四条町 8 4 0 番地 奈良県立医科大学医学部内

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA54 BA58 CA01 CA11 HA08 HA12 HA15

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25

QS36 QX02

4H045 AA11 AA30 CA41 DA75 EA50 FA72

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	诊断前列腺癌的方法		
公开(公告)号	JPWO2006098464A1	公开(公告)日	2008-08-28
申请号	JP2007508241	申请日	2006-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 PCA INTERMED株式会社		
申请(专利权)人(译)	链接基因组公司 国立大学法人大阪大学 PCA INTERMED株式会社		
[标]发明人	辻川和丈 山元弘 小西登		
发明人	辻川 和丈 山元 弘 小西 登		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09 C07K16/30		
CPC分类号	C07K16/3069 G01N33/564 G01N33/57434		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/53.M C12Q1/68.A C12N15/00.A C07K16/30		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/BA58 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 藤田 尚 铃木康仁		
优先权	2005071387 2005-03-14 JP 2005241414 2005-08-23 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测和/或定量来自受试者的体液样品中的PCA-1作为前列腺癌标记物的方法。本发明还提供了检测和/或定量来自受试者的体液样品中抗PCA-1自身抗体作为前列腺癌标记物的方法。本发明允许更简单，更快速和更低成本地进行前列腺癌的诊断。

The peptide masses from PCA-1
(Theoretical pt: 3.58 / Mw (average mass): 33374.70 / Mw (monoisotopic mass): 33353.88)

配列番号	質量	2個時の質量荷荷比	position	peptide sequence
3	2501.246	1251.624	237-255	IRDQSTLLIMEGATQADWQHR
4	2123.011	1062.505	165-182	IEENTGHTFNSLGNLYR
5	1971.940	986.970	101-118	EADWLEQLCQDVPWK
6	1792.827	897.413	220-234	KPPPEENGSDYTYVER
7	1725.877	863.939	146-159	ITMEFNPVHWVPLR
8	1718.830	859.415	135-145	LTAWYSELPPYYSR
9	1713.723	857.862	186-200	DSVDWHSDDPSLGR
10	1592.805	797.402	75-89	EGVYEISLSPGVSR
11	1445.753	723.876	32-43	SHLHGRPGDTWK
12	1334.702	668.351	201-213	CPHSLSFQATK
13	1234.837	609.318	90-100	VCLTPGFVDYK
14	1185.835	593.818	20-31	SGAIAGPATTAK
15	1148.546	575.273	123-131	EDITYGQPR
16	1025.566	513.783	10-19	VQGAWAAPVK
17	892.415	447.208	46-52	FHHLSDR
18	854.461	428.231	58-64	FPGQVYR
19	846.424	424.212	275-282	TVYPDPR
20	748.423	375.212	270-275	VNLTFR
21	690.308	346.154	262-265	EYHSR
22	682.311	342.155	214-218	ITFEMR
23	669.359	335.177	53-57	IEFYK

The peptide masses from PSA
(Theoretical pt: 5.20 / Mw (average mass): 21039.35 / Mw (monoisotopic mass): 21025.72)

配列番号	質量	2個時の質量荷荷比	position	peptide sequence
24	4131.184	2066.592	1-37	PQAHTLHPESCVMWVYVFLTLVTVGAAPIILSR
25	3492.692	1747.346	91-120	HSLEHPEDTGVVGVSNHFPNPLVDMSLK
26	3455.831	1728.815	161-182	VNLDPTGSEALGTCTAAGWSSPEEFLTPK
27	2229.166	1115.583	61-81	AVCSGVLVHPQWVLAAHGR
28	1870.936	936.468	123-138	FLRPDSSDSDLMLR
29	1406.742	704.371	47-58	HQPWQVLYASR
30	1271.661	636.830	139-150	LSEPAELTDAVK
31	1019.476	510.137	38-46	IVRGVDFEK
32	758.496	379.248	84-90	ISWILGR
33	689.342	345.671	184-189	LGCVDI