

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-518781

(P2005-518781A)

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/68 | Z N A A |
| A 6 1 K 49/00 | A 6 1 K 49/00 | Z |
| A 6 1 K 51/00 | C 1 2 Q 1/37 | |
| C 1 2 N 15/09 | G O 1 N 21/78 | C |
| C 1 2 Q 1/37 | G O 1 N 33/53 | M |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 39 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-526936 (P2003-526936) | (71) 出願人 | 503435310 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年9月9日 (2002.9.9) | | ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシテ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成16年5月7日 (2004.5.7) | | ィ スクール オブ メディシン |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2002/028518 | | アメリカ合衆国, メリーランド州 212 |
| (87) 国際公開番号 | W02003/022863 | | 02, バルチモア, スイート 906, マ |
| (87) 国際公開日 | 平成15年3月20日 (2003.3.20) | | ーケット プレイス 111, オフィス |
| (31) 優先権主張番号 | 60/317,494 | | オブ テクノロジー ライセンシング |
| (32) 優先日 | 平成13年9月7日 (2001.9.7) | (74) 代理人 | 100102978 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 清水 初志 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/383,805 | (74) 代理人 | 100108774 |
| (32) 優先日 | 平成14年5月30日 (2002.5.30) | | 弁理士 橋本 一憲 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100128048 |
| | | | 弁理士 新見 浩一 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 良性および悪性の結腸直腸腫瘍中で発現する分泌遺伝子および細胞表面遺伝子

(57) 【要約】

直腸結腸の良性および悪性の腫瘍において発現した分泌タンパク質かまたは細胞表面タンパク質をコードしている転写産物を同定するために、遺伝子発現の連続分析 (SAGE) を用いた。正常の、腺腫の、および癌の結腸上皮から合計290,394個のタグを分析した。観察された21,343個の異なる転写産物のうちの957個が、正常と腺腫の間でまたは正常と癌の間で差次的に発現することが見出された。腺腫では49個のタグが20倍以上増加し、癌では40個のタグが20倍以上増加し、9つの転写産物とその両方において20倍以上増加した。これらの9つの転写産物のうち6つの生成物 (TGFB1、LYS、RDP、MIC-1、REGAおよびDEHL) が分泌されたか細胞表面にあることが予想され、これらについてより詳細に検討した。これら6つの遺伝子各々の定量PCR分析によって、SAGEにより予想された異常な発現レベルが確認された。更に、原発腫瘍から免疫親和性精製された上皮細胞のインサイチュウハイブリダイゼーションおよびPCR分析によって、発現増加の原因となる細胞型を同定した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の便から mRNA 試料を単離する段階；

該 mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA を検出する段階；および

該 mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、該 mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量と比較する段階。

【請求項2】

mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量の増加が見られた場合、患者が結腸直腸癌を有すると同定する段階を更に含む、請求項1記載の方法。 10

【請求項3】

腎ジペプチダーゼ mRNA が RT-PCR により検出される、請求項1記載の方法。

【請求項4】

腎ジペプチダーゼ mRNA が コピー mRNA 核酸アレイのハイブリダイゼーションによって検出される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

表3または表5からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子由来の mRNA が mRNA 試料中でも検出され、該一つまたは複数の遺伝子由来の mRNA 量が正常被験者中の量と比較され、ここで該群よりおよび腎ジペプチダーゼより選択される少なくとも1つの該 mRNA 量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、請求項1記載の方法。 20

【請求項6】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の血液から上皮細胞を単離する段階；

上皮細胞から mRNA 試料を単離する段階；

該 mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA を検出する段階；および

該 mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、該 mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量と比較する段階。

【請求項7】

mRNA 試料中の腎ジペプチダーゼ mRNA 量の増加が見られた場合、患者が結腸直腸癌を有すると同定する段階 30

を更に含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】

腎ジペプチダーゼ mRNA が RT-PCR により検出される、請求項6記載の方法。

【請求項9】

核酸アレイへのコピー mRNA のハイブリダイゼーションによって腎ジペプチダーゼ mRNA が検出される、請求項6記載の方法。

【請求項10】

表3および表5からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子由来の mRNA が mRNA 試料中でも検出され、かつ該一つまたは複数の遺伝子由来の mRNA 量が正常被験者中の量と比較され、ここで該群よりおよび腎ジペプチダーゼより選択される少なくとも1つの該 mRNA 量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、請求項6記載の方法。 40

【請求項11】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の血液を腎ジペプチダーゼ基質と接触させる段階；

反応生成物の増加または腎ジペプチダーゼ基質の減少の検出によって、該血中の腎ジペプチダーゼ活性を検出する段階；および

被験者の血中の腎ジペプチダーゼの活性量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、被験者の血中の腎ジペプチダーゼの活性量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼ活性量と比 50

較する段階。

【請求項12】

腎ジペプチダーゼ基質が蛍光で標識される、請求項11記載の方法。

【請求項13】

腎ジペプチダーゼ基質が放射性原子で標識される、請求項11記載の方法。

【請求項14】

腎ジペプチダーゼ基質がC末端D-アミノ酸を含む、請求項11記載の方法。

【請求項15】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の便を腎ジペプチダーゼ基質と接触させる段階；

反応生成物の増加または腎ジペプチダーゼ基質の減少の検出によって、該便中の腎ジペプチダーゼの活性を検出する段階；および

被験者の便中の腎ジペプチダーゼの活性量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、被験者の便中の腎ジペプチダーゼ活性の量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼ活性の量と比較する段階。

【請求項16】

腎ジペプチダーゼ基質が蛍光で標識される、請求項16記載の方法。

【請求項17】

腎ジペプチダーゼ基質が放射性原子で標識される、請求項16記載の方法。

【請求項18】

腎ジペプチダーゼ基質がC末端D-アミノ酸を含む、請求項16記載の方法。

【請求項19】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

抗体が被験者の体外から検出可能な成分で標識された、腎ジペプチダーゼと特異的に結合する抗体を被験者に投与する段階；および

被験者内であるが腎臓の近位細管の外側である該成分の局在領域により結腸直腸癌が同定される、被験者の体外から被験者内の該成分を検出する段階。

【請求項20】

成分が蛍光である、請求項19記載の方法。

【請求項21】

成分が放射性原子である、請求項19記載の方法。

【請求項22】

成分が脊髄コンピューター断層撮影用の造影剤である、請求項19記載の方法。

【請求項23】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

阻害剤が被験者の体外から検出可能な成分で標識された、被験者に腎ジペプチダーゼ阻害剤を投与する段階；および

被験者体内であるが腎臓の近位細管の外側である該成分の局在領域によって結腸直腸癌が同定される、被験者の体外から被験者内の該成分を検出する段階。

【請求項24】

成分が蛍光である、請求項23記載の方法。

【請求項25】

成分が放射性原子である、請求項23記載の方法。

【請求項26】

成分が脊髄コンピューター断層撮影用の造影剤である、請求項23記載の方法。

【請求項27】

阻害剤が腎ジペプチダーゼに不可逆的に結合する、請求項23記載の方法。

【請求項28】

阻害剤が結合し、4時間を上回る半減期で腎ジペプチダーゼから徐放される、請求項23記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

腎ジペプチダーゼの基質が検出可能な成分で標識された、該基質を被験者に投与する段階；

被験者から便を単離する段階；および

便中の腎ジペプチダーゼ反応生成物または検出可能な成分で標識された腎ジペプチダーゼ基質を検出する段階であって、便中の生成物の増加または基質の減少が被験者中の結腸直腸癌を示す段階。

【請求項 30】

基質が経口投与される、請求項29記載の方法。

10

【請求項 31】

基質が静脈内投与される、請求項29記載の方法。

【請求項 32】

基質が直腸投与される、請求項29記載の方法。

【請求項 33】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

腎ジペプチダーゼの基質が検出可能な成分で標識された、該基質を被験者に投与する段階；

被験者から血液を単離する段階；および

血中の腎ジペプチダーゼ反応生成物または検出可能な成分で標識された腎ジペプチダーゼ基質を検出する段階であって、血中の生成物の増加または基質の減少が被験者中の結腸直腸癌を示す段階。

20

【請求項 34】

基質が経口投与される、請求項33記載の方法。

【請求項 35】

基質が静脈内投与される、請求項33記載の方法。

【請求項 36】

基質が直腸投与される、請求項33記載の方法。

【請求項 37】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

30

被験者の便からmRNA試料を単離する段階；

該mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNAを検出する段階；および

該mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、該mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量を正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量と比較する段階。

【請求項 38】

mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量の増加が観察される場合に、患者が結腸直腸癌を有すると同定する段階

を更に含む、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

マクロファージ阻害サイトカインmRNAがRT-PCRにより検出される、請求項37記載の方法。

40

【請求項 40】

マクロファージ阻害サイトカインmRNAがコピーmRNAの核酸アレイへのハイブリダイゼーションによって検出される、請求項37記載の方法。

【請求項 41】

表3および表5からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子由来のmRNAがmRNA試料中でも検出され、かつ該一つまたは複数の遺伝子由来のmRNA量が正常被験者中の量と比較され、ここで該群およびマクロファージ阻害サイトカインより選択される少なくとも一つの該mRNA量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、請求項37記載の方法。

【請求項 42】

50

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の血液から上皮細胞を単離する段階；

上皮細胞から mRNA 試料を単離する段階；

該 mRNA 試料中のマクロファージ阻害サイトカイン mRNA を検出する段階；および

該 mRNA 試料中のマクロファージ阻害サイトカイン mRNA 量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、該 mRNA 試料中のマクロファージ阻害サイトカイン mRNA 量を正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカイン mRNA 量と比較する段階。

【請求項 43】

mRNA 試料中にマクロファージ阻害サイトカイン mRNA 量の増加が観察される場合に、患者が結腸直腸癌を有すると同定する段階

10

を更に含む、請求項 42 記載の方法。

【請求項 44】

マクロファージ阻害サイトカイン mRNA が RT-PCR により検出される、請求項 42 記載の方法。

【請求項 45】

マクロファージ阻害サイトカイン mRNA が、コピー mRNA の核酸アレイへのハイブリダイゼーションによって検出される、請求項 42 記載の方法。

【請求項 46】

表 3 および表 5 からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子由来の mRNA が mRNA 試料中でも検出され、かつ該一つまたは複数の遺伝子由来の mRNA 量が、正常被験者中の量と比較され、ここで該群よりおよびマクロファージ阻害サイトカインより選択される少なくとも

20

1 つの該 mRNA 量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、請求項 42 記載の方法。

【請求項 47】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の血中のマクロファージ阻害サイトカインを検出する段階；および

被験者の血中のマクロファージ阻害サイトカイン量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、被験者の血中のマクロファージ阻害サイトカインの量を正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインの量と比較する段階。

【請求項 48】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の便中のマクロファージ阻害サイトカインを検出する段階；および

被験者の便中のマクロファージ阻害サイトカイン量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、被験者の便中のマクロファージ阻害サイトカイン量を正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインの量と比較する段階。

30

【請求項 49】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の血中の腎ジペプチダーゼを検出する段階；および

被験者の血中の腎ジペプチダーゼの量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、被験者の血中の腎ジペプチダーゼ量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼ量と比較する段階。

【請求項 50】

結腸直腸癌の検出法であって、以下の段階を含む方法：

被験者の便中の腎ジペプチダーゼを検出する段階；および

被験者の便中の腎ジペプチダーゼ量の増加を被験者中の結腸直腸癌の指標とする、被験者の便中の腎ジペプチダーゼの量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼの量と比較する段階。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

発明の技術分野

本発明は結腸直腸腺腫および結腸直腸癌の早期検出に関し、特に、容易に採取可能な体試料における分泌マーカーまたは細胞表面マーカーの検出に関する。

50

【背景技術】

【0002】

背景技術

結腸直腸癌は、米国における癌による死亡の二番目に主要な原因であり、毎年約130,000名の患者が診断され、約50,000名が最終的にこの疾患で死亡する(1)。大部分の結腸直腸癌はゆっくりと成長し、これは、小さな良性の結腸直腸腺腫として始まり、大きく、より形成異常な病変へと数十年かけてゆっくりと進行し、最終的に悪性になる。この緩やかな進行のために、予防および介入の機会が多くある。実際、良性腺腫は単純な結腸鏡およびポリープ切除によって検出および除去でき、根治手術および補助治療を必要としない。従ってこれらの良性新生物の早期の検出と除去によって結腸直腸癌由来の罹病率と死亡率が最小化できると期待されている。便潜血検査、S状結腸鏡検査および結腸鏡検査(2に記載)のような、早期の結腸直腸癌を検出するための各種のスクリーニング法が利用できる。しかし、これらの方法はいずれも最適ではなく、新しい手法が必要である。

10

【発明の開示】

【0003】

発明の概要

第一の態様において、結腸直腸腺腫および結腸直腸癌の検出のための1つの方法が提供される。被験者の便からmRNA試料が単離される。mRNA試料中の腎ジペプチダーゼmRNAが検出される。mRNA試料中の腎ジペプチダーゼmRNA量を、正常な被験者中の腎ジペプチダーゼmRNA量と比較する。mRNA試料中の腎ジペプチダーゼmRNA量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

20

【0004】

本発明のもう一つの態様では、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法が提供される。被験者の血液から上皮細胞を単離する。上皮細胞からmRNA試料を単離する。mRNA試料中の腎ジペプチダーゼmRNAを検出する。mRNA試料中の腎ジペプチダーゼmRNA量を、正常被験者中の腎ジペプチダーゼmRNA量と比較する。mRNA試料中の腎ジペプチダーゼmRNA量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

【0005】

本発明の第三の態様では、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法が提供される。被験者の血液を腎ジペプチダーゼ基質と接触させる。血中の腎ジペプチダーゼの活性を、反応生成物の増加または腎ジペプチダーゼ基質の減少の検出によって測定する。被験者の血中の腎ジペプチダーゼの活性量を、正常被験者中の腎ジペプチダーゼ活性量と比較する。被験者の血中の腎ジペプチダーゼ活性量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

30

【0006】

本発明の他の態様では、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法が提供される。被験者の便を腎ジペプチダーゼ基質と接触させる。便中の腎ジペプチダーゼの活性を、反応生成物の増加または腎ジペプチダーゼ基質の減少の検出によって測定する。被験者の便中の腎ジペプチダーゼ活性の量を正常被験者中の腎ジペプチダーゼ活性量と比較するが、ここで被験者の便中の腎ジペプチダーゼ活性量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

40

【0007】

本発明の他の態様では、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法が提供される。被験者に抗体を投与する。抗体が腎ジペプチダーゼに特異的に結合し、被験者の体外から検出可能な成分で標識される。成分は被験者の体外から検出される。被験者内であるが腎臓の近位細管の外側である該成分の局在領域により、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌が同定される。

【0008】

結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための他の方法もまた提供される。被験者に腎ジペプチダーゼ阻害剤を投与する。阻害剤は、被験者の体外から検出可能な成分で標識さ

50

れる。被験者中の成分は、被験者の体外から検出される。被験者内であるが腎臓の近位細管の外側である該成分の局在領域により、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌が同定される。

【0009】

結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための更に別の方法では、被験者に腎ジペプチダーゼの基質を投与する。基質は検出可能な成分で標識される。被験者から便を単離する。腎ジペプチダーゼ反応生成物または検出可能な成分を有する腎ジペプチダーゼ基質を、便中で検出する。便中の反応生成物の増加または反応基質の減少は、被験者中の結腸直腸腺腫および結腸直腸癌を示す。

【0010】

本発明では、更に他の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出方法が提供される。被験者に腎ジペプチダーゼの基質を投与する。基質は検出可能な成分で標識される。続いて、被験者から血液を単離する。血中の腎ジペプチダーゼの反応生成物または検出可能な成分を有する腎ジペプチダーゼ基質を検出する。血中の生成物の増加または基質の減少は、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌を示す。

10

【0011】

本発明のさらに他の態様は、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法である。被験者の血中の腎ジペプチダーゼを検出し、正常被験者中の腎ジペプチダーゼの量と比較する。被験者の血中の腎ジペプチダーゼ量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

【0012】

本発明の更に他の態様は、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法である。被験者の便中の腎ジペプチダーゼを検出し、正常被験者中の腎ジペプチダーゼの量と比較する。被験者の便中の腎ジペプチダーゼ量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

20

【0013】

本発明の更に他の態様は、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法である。被験者の便からmRNA試料を単離する。mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNAを検出する。mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量を、正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量と比較する。mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

30

【0014】

本発明の他の態様は、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法である。上皮細胞を被験者の血液から単離する。上皮細胞からmRNA試料を単離する。mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNAを検出する。mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量を、正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量と比較する。mRNA試料中のマクロファージ阻害サイトカインmRNA量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

【0015】

本発明のさらに他の態様は、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法である。被験者の血中のマクロファージ阻害サイトカインを検出し、正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインの量と比較する。被験者の血中のマクロファージ阻害サイトカイン量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

40

【0016】

本発明のさらに他の態様は、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の検出のための方法である。被験者の便中のマクロファージ阻害サイトカインを検出し、正常被験者中のマクロファージ阻害サイトカインの量と比較する。被験者の便中のマクロファージ阻害サイトカイン量の増加を、被験者中の結腸直腸腺腫または結腸直腸癌の指標とする。

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、結腸の腺腫および癌の両方において特定の遺伝子が異常にかつ一貫して発現

50

していることを見出した。このような遺伝子産物により、結腸直腸新生物に対する細胞性マーカーおよび血清マーカーが提供される。理想的な腫瘍マーカーはいくつかの特徴を有することが期待される。第一にこれは腫瘍において高レベルで、正常組織において非常に低いレベルで発現しなければならない。第二に、発現の増加が早期に起こり、かつ新生物過程の間、増加したままでなければならない。第三に、そのようなマーカーが臨床試料の大部分において増加しなければならない。第四に、マーカーは細胞表面に存在するか、または容易に検出されるために分泌されなければならない。本発明者等は、これらの基準すべてを満たしかつ、従って、結腸直腸新生物の（前駆症状の結腸直腸新生物の早期検出についてさえ）早期検出の診断ツールとして特に有用でありうると思われるいくつかの遺伝子を同定している。表3および表5において同定した任意のマーカーを使用できるが、特に腎ジペプチダーゼおよびマクロファージ阻害サイトカインが使用される。 10

【0018】

血清マーカーは全血、血清、血漿またはそれらの画分において見出されかつ検出されうる。本明細書においてこれらを「血液」と総称する。マーカーは便中においても認められる。検査用の試料は、便または加工便もしくは分画された便である。このような試料は全て、本明細書において「便」とよぶ。

【0019】

腎ジペプチダーゼのような酵素であるマーカーの阻害剤は、マーカーを標識するための親和試薬として使用可能である。不可逆結合する阻害剤が好ましい。代替的な阻害剤は、結合および放出するが、放出速度が遅い。放出速度が適切に遅い阻害剤の結合半減期は、30分を上回る、または、1時間、2時間、3時間、5時間、8時間または10時間を上回る。市販のシラスタチン(cilastatin)およびホスフィン酸阻害剤を含む、多数の腎ジペプチダーゼ阻害剤が知られている。Parsonsら、"A new class of potent, slowly reversibly dehydropeptidase inhibitors", *Biochemistry International*, 第23巻, pp.1107-1115, 1991参照。腎ジペプチダーゼに共有結合するおよび/または腎ジペプチダーゼを修飾する阻害剤も知られており、使用可能である。WuおよびMobashery、"Targeting renal dipeptidase (dehydropeptidase I) for inactivation by mechanism-based inactivators", *J. Med. Chem.*, 第34巻, pp.1914-1916, 1991参照。阻害剤には、基質と生成物の間の遷移状態を模倣するものがある。いくつかの有用な阻害剤を図6に示す。これらはハロゲン置換を有する阻害剤を含む。そのような阻害剤は、腎ジペプチダーゼ標識の準備およびその容易な検出用の放射性ハロゲンを使用して、容易に作製されうる。他の酵素の同様な阻害剤も当技術分野で知られており、使用可能である。阻害剤は、蛍光および放射性原子を含むがこれに限定される訳ではない、当技術分野で公知の任意の検出可能な成分を用いて標識されうる。 20 30

【0020】

任意のマーカーに対するRNAは当技術分野で公知の周知の技術を用いて検出できる。考慮される標本から、マーカーに対するRNA量が非常に少ないと予想されるので、増幅段階を使用するのが好ましい。適した技術としては、RT-PCR、コピーmRNA(cRNA)の核酸プロブアレイへのハイブリダイゼーション、およびノーザンブロットティング等があげられる。 40

【0021】

タンパク質型のマーカーは当技術分野で公知の任意の技術を用いて検出できる。これらには活性アッセイ、免疫学的アッセイ、特定のリガンドへの結合等が含まれる。腎ジペプチダーゼ用に特に適したアッセイには、L-Lアミノ酸ジペプチド基質およびL-Dアミノ酸ジペプチド基質の使用が含まれる。腎ジペプチダーゼのアッセイに使用できる基質を図8に、ジペプチドおよびデヒドロジペプチドの遺伝子構造と共に示す。(DNP)-L-リジン-D-Ampも基質に用いることができ、着色した生成物が得られる。他の酵素の基質も、体内のまたは体試料中の腫瘍マーカー酵素の存在を評価するために同様に使用可能である。そのような基質は、蛍光および放射性原子を含むがこれらに限定される訳ではない、検出可能な成分で標識できる。一つの特に有用な標識スキームでは、基質開裂部位の互いに反対側に 50

において2つの成分で標識される基質を用いる。成分のうち一方は蛍光であり、もう一方はクエンチャーである。完全な基質においてと同様に、2つの成分が近接する場合は、蛍光成分の蛍光がクエンチングされる。開裂の際に、クエンチングは放出され、蛍光の増加が観察される。

【0022】

上述したように、阻害剤はまた標識されてもよく、適したマーカーを検出するために使用可能である。更に、タンパク質形状のマーカーを標識するために抗体を使用可能である。抗体は、当技術分野で公知のように標識できる。阻害剤、基質および抗体の標識に使用するのに適した放射性原子は、In-111、I-123、Tc-99m、Re-186、Re-188、Ga-67、Ga-68、Ti-201、Fe-52、Pb-203、Co-58、Cu-64、I-124、I-125、I-131、At-210、Br-76、Br-77 およびF-18ならびに、そのような目的に関して当技術分野で公知のその他の原子である。造影剤を、基質、阻害剤、および抗体に結合させることもできる。そのような薬剤にはガドリニウムが含まれる。更に、体内のそのような標識を検出するために画像技術を使用可能である。使用できる画像技術の例は、脊髄コンピューター断層撮影である。この技術に関して、阻害剤または抗体のような検出剤を、造影剤に結合できる。使用できる他の検出手段には、カメラ、核磁気共鳴画像、平面シンチグラフ画像、SPECT画像、PET画像および超音波画像が含まれる。従って、体内ではインサイチューで、あるいは体試料中ではインピトロで、マーカーを検出できる。

【0023】

上皮細胞は、マーカーまたはそのmRNAを増幅するために、血液または他の組織試料から単離できる。上皮細胞は、特に免疫親和性技術によって、単離できる。そのような技術をより詳細に以下に記載する。

【0024】

被験者に酵素マーカーの基質を投与でき、体試料中で反応生成物を測定できる。被験者に阻害剤を投与でき、被験者を、マーカーに結合した阻害剤を検出するために画像化できる。そのようなマーカーは分泌タンパク質でなく、腫瘍に結合しているものが好ましい。そのような薬剤の典型的な投与法は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、経皮および経直腸等を含むが、これらに限定されない適切な任意の方法でありうる。

【0025】

あるマーカーのバックグラウンドが高いと、発現の増加の検出が不明瞭になる可能性がある。そのような状況では、バックグラウンドマーカーと腫瘍によるマーカーを区別する手段として、腫瘍特異的糖型を使用可能である。腎ジペプチダーゼおよびMIC-1の腫瘍特異的糖型は、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 赤血球凝集素由来のLレクチンであるLPHAに結合し、従ってこれに基づいて区別されうる。Sambucus nigra (エルダーベリー) 樹皮から単離されたSambucus Nigraレクチンのような腫瘍特異的糖型に対する類似の特異性を有するものなど他のレクチンも、同様に使用可能である。

【0026】

便中または血中で観察されたマーカーの量が増加しているか否かを判定するために、正常な被験者が試験被験者に対する比較として使われる。好ましくは、正常な被験者が腫瘍不含有であることが、結腸鏡により確かめられている。複数の試料が統合されるか、その個々の値が平均されて正常値に達することがより好ましい。

【0027】

結腸直腸腺腫および結腸直腸癌中に見られる最も過剰発現した遺伝子のいくつかについて以下で考察する。REGA遺伝子にコードされた再生膵島由来膵石タンパク質は、慢性膵炎罹患患者由来の膵臓沈着物および膵石において初めて見つかった分泌ポリペプチドである(7)。このタンパク質をコードするcDNAは、再生膵島由来cDNAライブラリー中で高発現している遺伝子のランダムスクリーニングで単離され(8)、その後、結腸直腸癌中で増加していることが示された(9)。より最近になって、REGAは、結腸直腸癌中で増加している遺伝子についてのハイブリダイゼーションに基づいたスクリーニングで単離され、多くの結腸直腸腺腫で増加していることが示された(10)。これら公表された所見と一致し

て、本発明者らは、未精製腫瘍中のREGAの発現の顕著な増加を観察し、ある精製腫瘍中で同様の増加を観察した。インサイチュールハイブリダイゼーション実験で、REGAが腫瘍の上皮細胞中で強く発現することが証明されたが、間質中で発現する証拠はなかった(図5A)

【0028】

TGFβ誘導遺伝子(TGFBI)は、TGFによる処置に反応して誘導された遺伝子に対するディファレンシャルディスプレイスクリーニングによって最初に単離された、機能未知の小さなポリペプチドをコードする(11)。このタンパク質は角膜のケラチノサイト中で発現しており(12)、興味深いことにこの遺伝子の生殖細胞系変異は家族性角膜変性を引き起こす(13)。TGFBIは結腸直腸癌中で最も顕著に増加している遺伝子に含まれることが以前に示されており、本発明者らの新しいデータにより腺腫中でも同様に高レベルで発現していることが示された。定量PCRの結果は未精製腫瘍と精製腫瘍上皮細胞の両方での強い増加を示した。従ってインサイチュールハイブリダイゼーション実験によりTGFBIは間質および上皮コンパートメントの両方における多数の細胞型中で発現されることが示された(図5B)。

10

【0029】

リゾチーム(LYS、1,4-β-N-アセチルムラミダーゼ、EC 3.2.1.17)はグラム陽性菌の細胞壁中に見られるβ-1,4グリコシド結合を切断できる溶菌活性を有する酵素である(14)。この酵素は、単球、マクロファージおよび白血球の分泌顆粒、ならびに消化管のパネート細胞中で発現している。便中リゾチームレベルは炎症性腸疾患患者において劇的に上昇し(15、16)、血清リゾチーム活性はサルコイドーシス患者で顕著に増加するが(17)、どちらも異常な慢性炎症によって特徴づけられる疾患である。更に大腸の腺腫および癌の両方の上皮細胞にリゾチーム免疫反応性が観察されている(18)。本発明者らの研究において、LYS発現の増加の程度は、未精製試料中で4倍から55倍まで変化した。反対に、精製上皮細胞中で観察されるLYS発現の増加の程度は、わずか2倍~5倍であった。これにより、腫瘍中のこの遺伝子の発現の実質的な部分は、非上皮細胞に由来しうることが示唆された。この仮説と一致して、インサイチュールハイブリダイゼーション実験は、大部分のLY SmRNAが、マクロファージと思われる間質成分中に存在することを示した(図5C)。結腸直腸腫瘍のマクロファージコンパートメント中のLYS発現は、結腸直腸腫瘍(602LYSタグ/56,643全タグ)から精製した造血細胞(CD45+、CD64+、CD14+)から構築されたSAGEライブラリー中での提示(representation)の高さによっても裏付けられる(6)。

20

30

【0030】

最近の研究で同定された1つの興味深い遺伝子は、腎ジペプチダーゼ(RDP)である。RDPはGPI固定酵素であり、その発現の主要部位は腎臓の近位管の上皮細胞である(19)に示す)。様々な合成阻害剤によって、この触媒機構および阻害動態が広範に解析された。RDPは、C末端パートナーがDアミノ酸であるアミド結合を開裂できるという点で、ジペプチダーゼの中で唯一のものであり、インビボでのその検出に関する特定のプローブの開発に好適な機会を提供する。定量PCRにより、RDPが未精製および精製された腫瘍上皮細胞の両方で顕著に増加していることが示され、インサイチュールハイブリダイゼーション実験により、RDPが結腸直腸腫瘍の上皮細胞に排他的に局在していることが示された(図5D)

40

【0031】

マクロファージ阻害サイトカイン(MIC-1)は、マクロファージ活性化の際に誘導された遺伝子についてのディファレンシャルスクリーニングから初めて単離された、16kDaの小さなポリペプチドである(20)。同時にこれはIMAGEデータベース中で、成長および分化因子の骨形成タンパク質/TGFβファミリーに相同な分子の検索によって同定された(21)。活性化されたマクロファージ中で高発現されていることに加えて、MIC-1が、胎盤および正常な前立腺の上皮細胞中で高発現されていることに留意されたい。最近の試験で、本発明者らにより、未精製腫瘍中でMIC-1の発現が7倍から133倍の間で増加することが観察された。LYSについて観察されたように、精製した腫瘍細胞は顕著なMIC-1の発現を示し

50

たが、その増加はより少なく（5倍から7倍）、これは間接的に、幾つかの腫瘍に見られる劇的な増加に、間質発現が部分的に関係することを意味している。この仮説と一致して、インサイチュ-ハイブリダイゼーション実験は、腫瘍の上皮中および浸潤マクロファージに類似した細胞型中の両方における発現を示した（図5E）。

【0032】

実施例

実施例1：SAGE

早期の結腸直腸腫瘍の有力な分子マーカー候補を同定しようとして、本明細書中において本発明者らは、公平かつ広範な様式で、良性および悪性の結腸直腸腫瘍における遺伝子発現を解析した。本発明者らは、正常、良性および悪性の結腸直腸組織での全体的遺伝子発現を解析するのにSAGEを用いた。SAGEとは、個々のmRNA転写産物とそれらの3'末端近傍の特定位置に由来する15塩基タグとを関連づける遺伝子発現プロファイリング法である（3）。各タグの存在度から、試験されるmRNA集団内にある転写産物レベルの定量的測定値が得られる。SAGEは発現遺伝子の既存データベースに依存せず、従って公平な概観の遺伝子発現プロファイルを提供する。最近の試験では、2つの正常な結腸上皮試料、2つの結腸直腸腺腫、および2つの結腸直腸癌由来のSAGEライブラリーを解析した。これらのライブラリーは21,343個の異なる転写産物に相当する、合計290,394個の転写産物タグを含んでいた（表1）。

10

【0033】

（表1）SAGEデータの概要

20

| SAGEライブラリー | 観察されたタグの総数 | 観察された異なる転写産物数* |
|------------------|------------|----------------|
| <u>正常な結腸直腸上皮</u> | | |
| NC-1 | 49,610 | 9,359 |
| NC-2 | 48,479 | 9,610 |
| <u>腺腫</u> | | |
| Ad-A | 52,573 | 11,167 |
| Ad-B | 42,661 | 9,483 |
| <u>癌</u> | | |
| Tu-98 | 41,371 | 9,780 |
| Tu-102 | 55,700 | 11,039 |
| 合計 | 290,394 | 21,343 |

30

*潜在的な配列決定誤差の影響を最小化するために、所与のSAGEライブラリー中で2回以上観察されたタグだけを計数し、解析された、異なる転写産物の最小数の内輪の見積もりを得た。

【0034】

腺腫と正常標本の間、および癌と正常標本の間という、2種類の比較を行った。これらの比較により、正常と癌組織の間で2倍を上回って差次的に発現した957個の転写産物タグが示された（表2）。癌に対する、腺腫における変化倍数の比較により、規模はしばしば変化したものの多数の転写産物が腺腫と癌の両方で同様に増加または減少したことを示した（図1A）。実際、一致した増加を示すプロットの象限（quadrant）に、大部分（79%）の比較が存在した。

40

【0035】

（表2）良性および悪性の結腸直腸腫瘍における発現量の異なる転写産物

| 発現の変化倍数 | 腺腫において | | 癌において | | 腺腫および癌両方において | | 腺腫および癌両方において | | 合計 |
|---------|--------|----|-------|-----|--------------|-----|--------------|-----|----|
| | 増加 | 抑制 | 増加 | 抑制 | 増加 | 抑制 | 増加 | 抑制 | |
| 2 | 346 | | 170 | 313 | 50 | 380 | 192 | 957 | |
| 4 | 263 | | 119 | 225 | 23 | 270 | 117 | 735 | |
| 10 | 160 | | 79 | 134 | 10 | 157 | 58 | 462 | |
| 20 | 49 | | 40 | 72 | 9 | 52 | 23 | 181 | |

10

20

30

40

^a 正常と腫瘍組織の間でタグ数が有意に異なる ($p < 0.05$)、増加した転写産物は、解析した腫瘍両方で発現しており、その発現レベルは正常においてよりも腫瘍において、一列目に示した倍数だけ高かった。計算のため、正常標本においてタグが検出されなかった場合は分母を0.5に替えた。

^b 正常と腫瘍組織の間でタグ数が有意に異なる ($p < 0.05$)、減少した転写産物は、解析した正常組織両方で発現しており、その発現レベルは正常においてよりも腫瘍において、一列目に示した倍数だけ低かった。

50

【 0 0 3 6 】

実際的なおよび生物学的な見地の両方から、最も大きな変化を、最も興味あるものと見なした。この点で、腺腫では49個のタグが20倍以上増加したことが確認され、癌では40個のタグが20倍以上増加したことが確認された(表2)。反対に、腺腫では72個の転写産物が1/20倍以下に減少したことが確認され、癌では52個の転写産物が1/20倍以下に減少したことが確認された(表2)。

【 0 0 3 7 】

9つの転写産物が腺腫と癌の両方で20倍以上増加し(図1Bおよび表3)、23個の転写産物が1/20倍以下に減少した(表4)。細胞表面に分泌するまたは発現すると予想される産物を有する遺伝子はそれぞれ前駆症状新生物の血清学的検査または画像検査の開発に特に適しているので、特に興味深い。本発明者らは、腺腫と癌のSAGEライブラリーの両方において転写産物タグが増加した遺伝子の中から、6つのそのような遺伝子(TGFBI、LYS、RDP、MIC-1、REGAおよびDEHL)を同定できた。

10

【 0 0 3 8 】

(表3) 腺腫および癌において最も増加した転写産物^a

| タグ配列 | 正常 | | | 腺腫 | | | 癌 | | | 転写産物名 |
|------------|------|------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|---|-------|
| | NC-1 | NC-2 | AD-A1 | AD-B2 | Tu-98 | Tu-102 | Tu-98 | Tu-102 | 転写産物名 | |
| ATGTAAAAAA | 0 | 0 | 26 | 32 | 2 | 12 | 2 | 12 | リンチーム (LYS) | |
| TAATTTTTC | 0 | 1 | 99 | 12 | 20 | 37 | 20 | 37 | 造血系内差次的発現 (DEHL) | |
| GTGTGTTTGT | 0 | 0 | 17 | 29 | 17 | 15 | 17 | 15 | β 誘導型トランスフオオミンゲン成長因子 (TGFB1) | |
| GTGCTCATTC | 0 | 0 | 13 | 7 | 2 | 10 | 2 | 10 | マクロファージ阻害サイトカイン, 1 (MIC-1) | |
| TTCAGCTGC | 0 | 0 | 7 | 6 | 2 | 9 | 2 | 9 | アダプター関連タンパク質複合体 2, α 2 サブユニット ^b | |
| ACCATGGAT | 0 | 0 | 3 | 10 | 3 | 9 | 3 | 9 | インターフェロン誘導型膜貫通タンパク質 1 (9-27) ^b | |
| TTTCCACTAA | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 6 | 4 | 6 | 再生腺島由来 1 α (REGA) | |
| CAAGGACCAG | 0 | 0 | 5 | 6 | 10 | 12 | 10 | 12 | 腎ジペプチダーゼ (RDP) | |
| AGGACCATCG | 0 | 0 | 8 | 2 | 1 | 18 | 1 | 18 | デフェンシン, α 5, パネート細胞特異的 ^c | |

10

20

30

40

^a これらのタグは両新生物状態において少なくとも20倍の増加を示した。示した数字は、各ライブラリーで観察された各タグのタグ数の生データである。転写産物名として、対応するUniGeneクラスター(3/13/01作成)の記載を与える。太字で示した列は、定量PCRによって差次的に発現することが確認された遺伝子である。

^b 定量PCRにより差次的発現が確認できず、これにより、タグが示されたものと異なる転写産物から由来することを示唆している。

50

°試験せず

【0039】

(表4) 腺腫および癌において最も抑制された転写産物^a

| タグ配列 | 正常 | | | 腺腫 | | | 癌 | | | 転写産物名 |
|-------------|------|-----|-------|------|--------|--------|--------|--|--|-------|
| | NC-1 | NC2 | AD-A1 | AD-B | Tu-981 | Tu-102 | UNI ID | | | |
| GTCATCACCA | 35 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32966 | グアニル酸シクラーゼアクチンタータ2B | | |
| CCITCAAATC | 29 | 17 | 0 | 0 | 1 | 0 | 23118 | 炭酸脱水酵素 I | | |
| TCTGAATTAT | 24 | 16 | 0 | 0 | 1 | 0 | 50964 | 癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1 | | |
| TTATGGTGTG | 11 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 271499 | EST | | |
| CTGGCAAAGG | 14 | 22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 72789 | 仮想タンパク質 FLJ20217 | | |
| AGGTGACTGG | 10 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 対応なし | | |
| CTTATGGTCC | 36 | 11 | 0 | 1 | 1 | 0 | 179608 | レチノールデヒドロゲナーゼ相同体 | | |
| ATGATGGCAC | 12 | 32 | 1 | 0 | 1 | 0 | 84072 | 膜貫通 4 スーパーファミリーメンバー 3 | | |
| GTCCGAGTGC | 17 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3337 | 膜貫通 4 スーパーファミリーメンバー 1 | | |
| ATTTCAAAGAT | 35 | 21 | 0 | 2 | 1 | 0 | 155097 | 炭酸脱水酵素 II (C42) | | |
| CAAGAGTTTC | 14 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 183617 | EST | | |
| GCCATCCTCC | 9 | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 | | 対応なし | | |
| ACCCAACTGC | 12 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 232604 | ホモサビエンセンスcDNA: FLJ22675 fis, クローン HSI10553 | | |
| GCCCACGTCA | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 対応なし | | |
| TTTGGTTTCA | 2 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 対応なし | | |
| CTCAGAACTT | 18 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 194710 | N-アゼチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 3, ムチン型 | | |
| CCAACACCCAG | 9 | 19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 181165 | 真核性翻訳伸長因子 1 α1 | | |
| GCCACATACT | 3 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4984 | KIAA0828 タンパク質 | | |
| GTATTGGGGC | 5 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 対応なし | | |
| CCGGCTTGAG | 7 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2722 | イノシトール 1,4,5-3 リン酸 3-キナーゼ A | | |
| GATATGTAAA | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 227059 | 塩素チヤンネル, カルシウム活性化, ファミリーメンバー 4 | | |
| CATAGGTTTA | 66 | 39 | 4 | 1 | 5 | 0 | 1650 | 溶質担体ファミリー 26, メンバー 3 (DRA) | | |
| GTCCTGAACA | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 78546 | ATPase, Ca++ 輸送, 血漿膜 1 | | |

^aこれらのタグは、両新生物状態で少なくとも1/20倍の減少を示す。示された数字は、各ライブラリーで観察された各タグのタグ数の生データである。転写産物名として、対応するUniGeneクラスター(3/13/01作成)の記載を与える。太字で示した列は、定量PCRによ

10

20

30

40

50

て試験され、差次的に発現することが確認された遺伝子である。

【0040】

SAGE

良性腫瘍の最初のSAGE³のために、FAP患者由来の手術標本から新鮮な腺腫を得た。FAP患者由来の腺腫を用いた理由とは、小さな病変が容易に利用できるから、および大半の散发性腫瘍の形成を開始するAPC経路の不活性化が確実であるからである。新生物性の病変の組織病理学的確認後 (>70%新生物細胞)、組織をRNAgent Lysis Buffer (Promega、Madison、WI) に溶解し、その後塩化セシウム勾配上で超遠心分離して、全RNAを単離した。mRNAの選択は、精製した全RNAからオリゴ(dT)セルロース (Life Technologies、Gaithersburg、MD) を用いて行った。2つの腺腫SAGEライブラリーを、記載のように調製し(3、4)、90,000個を上回る転写産物タグの全深度に対して配列決定した。正常および悪性組織のSAGEのために、前に記載した4つの正常(NC-1およびNC-2)および原発癌(Tu-98およびTu-102)のSAGEライブラリーを用いた(4)。癌ゲノム解剖学プロジェクト(CGAP)と協力して(5)、これらのライブラリーの解析は、以前に公表された研究における全123,046個の転写産物から本研究における195,160個の転写産物まで拡大された。生の配列データからタグを抽出し、反復2タグ(ditag)、リンカー配列、および多型主要組織適合性遺伝子座由来のタグを除いた後、得られたタグライブラリーを比較して、SAGEソフトウェア・バージョン4.0を用いて統計解析を行った。ライブラリー由来のデータは、ncbi.nlm.nih.govのドメイン名およびディレクトリSAGEへのパスを有する、wwwホストサーバー上で見られるhttpファイル型に対するUniform Resource Locator (URL) アドレスにおいて公然と利用可能である。また、詳細なSAGEプロトコールは、sagenet.orgのドメイン名およびsage_protocol.htmのファイル名を有する、wwwホストサーバー上で見られるhttpファイル型に対するUniform Resource Locator (URL) アドレスにおいて利用可能である。

10

20

30

40

【0041】

実施例2: RT-PCR

これらの6つの遺伝子の発現の増加を確認するために、本発明者らは定量RT-PCR技術を用いて、7つの結腸直腸新生物(3つの散发性腺腫と4つの散发性癌)および対応する正常結腸粘膜における発現を解析した。これらのアッセイのために、ゲノムDNAからではなくcDNAゲノムからの増幅を生じる特異的プライマーを開発した。その発現が正常および新生物結腸(アミロイド前駆体タンパク質)のSAGEライブラリー中で非常に類似していることが見出された遺伝子の同様の定量PCRアッセイによって、対照を得た。定量PCR実験によって、選択された遺伝子6つのうち5つ(TGFBI、LYS、RDP、MIC-1、REGA)が、患者の対応する正常粘膜に比べて、解析したすべての新生物標本中で顕著に高いレベルで発現することが確認された(図2)。複数の腫瘍が、SAGEで予想された通り、患者の対応する正常結腸粘膜に比べて20倍以上高いレベルの被験転写産物を示した。その発現が、正常な結腸粘膜由来のものと比較して、腺腫と癌から調製されたSAGEライブラリー中で減少したことが観察された4つの遺伝子の定量PCR分析によって、もう一つの対照を得た。図3に示したように、定量PCRによって、これらの各遺伝子の発現が低レベルであることが確認され、これにより図2で観察された劇的な発現の上昇は遺伝子特異的な現象を表すことが強調された。

50

【0042】

定量PCR

腫瘍を採取し、瞬間冷凍し、-80 で貯蔵した。組織病理学検査により、それらが圧倒的に新生物細胞から構成されていることが確認された。腫瘍および患者の対応する正常結腸粘膜から、QuickPrep試薬(Amersham Pharmacia Biotech UK、Buckinghamshire、England)を用いてmRNAを単離し、一本鎖cDNAを、SuperscriptII(Life Technologies、Gaithersburg、MD)を用いて合成した。定量PCRは、iCycler(Bio-Rad、Hercules、CA)を用いて実施し、閾値サイクル数は、iCyclerソフトウェア・バージョン2.1を用いて決定した。反応は3つ組で行い、閾値サイクル数を平均化した。被験遺伝子はすべて、対照遺伝子(全結腸直腸標本において同等なレベルで発現していることがSAGEで示された、-アミロ

イド前駆体タンパク質) に対して正規化し、誘導倍数を、式 $2^{(R_t - E_t)} / 2^{(R_n - E_n)}$ に従って計算した。式中、 R_t は腫瘍中に見られる参照遺伝子に対する閾値サイクル数であり、 E_t は腫瘍中に見られる実験遺伝子に対する閾値サイクル数であり、 R_n は正常中に見られる参照遺伝子に対する閾値サイクル数であり、かつ E_n は正常中に見られる実験遺伝子に対する閾値サイクル数である。定量PCRに用いたプライマーはGeneLink (Hawthorne, NY) から入手したものであり、その配列は請求によって入手できた。

【0043】

実施例3：単離された上皮細胞中での発現

腫瘍全体から単離したmRNAから得られた定量PCRデータにより、SAGEが結腸直腸新生物中の遺伝子発現変化の正確な指示を与えるという、独立した証拠が提供された。しかし、10
いずれの解析でも、発現の増加の原因となる細胞型は確認できなかった。腫瘍内の非新生物間質細胞は、正常結腸粘膜中のものとはかなり異なっている可能性があり(6)、遺伝子発現の差が上皮に由来することを直接裏付ける証拠なしに、確実に結論づけることはできない。従って本発明者らは、癌の上皮細胞が図2に示した、増加したレベルの6つの遺伝子を発現するかどうかの判定を試みた。本発明者らはまず、新鮮な手術試料からの癌および患者の対応する正常な上皮細胞を、汎上皮マーカーBer-EP4に向けられた免疫磁気ビーズを用いて、親和性精製し、cDNAを調製し、上述の増加した遺伝子の発現レベルを測定するために定量PCR分析を行った。検討した6つの遺伝子各々の精製腫瘍上皮細胞中で発現の増加が見られ(図4)、これは、発現の増加のうち少なくとも一部が上皮細胞由来であることを示している。しかし、精製上皮細胞では、LYSの相対的発現は、未分画腫瘍由来のmRNA 20
Aにおけるほど顕著ではなく、または再現性がなく、これは他の細胞型がこの遺伝子由来の転写産物に寄与する可能性を示唆している。

【0044】

上皮細胞の免疫親和性精製

腫瘍上皮細胞を、腫瘍内皮細胞の単離用に以前開発した手順の改良法を用いて精製した(6)。簡単に言うと、腫瘍および対応する正常組織の新鮮な手術試料を採取し、コラゲナーゼで消化して、得られた材料をナイロンメッシュで濾過し、単細胞の懸濁物を得た。続いて、細胞を抗CD14免疫磁気ビーズおよび抗CD45免疫磁気ビーズ(Dynal, Oslo, Norway)の混合物と結合させ、造血細胞群を枯渇させた(陰性選択)。その後、残りの細胞懸濁物を抗Ber-EP4免疫磁気ビーズとインキュベーションし、上皮細胞を単離した(陽性選 30
択)。精製した細胞をビーズ上で直接溶解し、QuickPrep試薬(Amersham Pharmacia Biotech UK, Buckinghamshire, England)を用いてmRNAを精製した。

【0045】

実施例4：多発癌におけるインサイチューハイブリダイゼーション

本発明者らは、最も一貫した増加を示す5つの遺伝子に関して、腫瘍の凍結切片中のRNAに対するインサイチューハイブリダイゼーションを行った。検討した9つの腫瘍中僅か5つでしかDEHLの増加が見られ図、詳細な調査は行わなかった。検出の感度を上げるために、本発明者らはインビトロ転写技術を用いて、各被験遺伝子に対する複数のRNAプローブを作製した。得られた結果を、関心対象の5つの遺伝子各々の簡単な概観と関連させて、以下で考察する。 40

【0046】

インサイチューハイブリダイゼーション

非放射性インサイチューハイブリダイゼーションを、記載通り実施した(6)。解析された各々の遺伝子について、感度を上げるために、インビトロ転写によって作製したアンチセンスプローブのカクテルを用いた。インサイチューリボプローブの合成用鋳型を作製するために用いたプライマーは、GeneLink (Hawthorne, NY) から入手し、その配列は請求によって入手できた。

【0047】

解析した結腸直腸組織中で多数のタグが観察されるが、良性または悪性の新生物組織中では小さな画分(957/21,343、<5%)が差次的に発現したことが、上で要約した結果に 50

より示された。オリゴヌクレオチドアレイを用いて、同様に小さな遺伝子画分（66/4000、1.7%）が、結腸直腸新生物中で異常発現しているのが見られた（22）。差次的に発現するこれら遺伝子の解析は、ヒト新生物の生物学への洞察を提供する可能性を有するだけでなく、臨床的に有用な用途も有しうる。最も注目すべき可能な用途の1つは、その産物が結腸直腸新生物の細胞性マーカーおよび血清マーカーを提供するような遺伝子の同定に関する。本試験において、本発明者らは、これらの基準をすべて満たすと思われ、かつ従って前駆症状の結腸直腸新生物の早期検出用の診断ツールとして特に有用でありうる、複数の遺伝子を同定した。実際に、これらの遺伝子の1つの産物（MIC-1）が結腸直腸癌および他の癌を有する患者の血清中で増加することが最近見出されており、この手法のさらなる妥当性が提供されている（24）。

10

【0048】

現時点で好ましい本発明の実施様式を含む特定の実施例に関して、本発明を記載しているが、当業者は、添付の特許請求の範囲で規定した本発明の目的および範囲に適合する、上述のシステムおよび技術の変法および変更が多数あることを認識すると考えられる。

【0049】

（表5）

| タグ配列 | NC1 | NC2 | AD1 | AD2 | CA1 | CA2 | UNI ID | 説明 |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|--|
| AAAAGAAACT | 1 | 3 | 33 | 52 | 7 | 16 | 172182 | ポリ(A)-結合タンパク質,細胞質1 |
| AACGAGGAAT | 8 | 0 | 24 | 26 | 17 | 23 | | |
| AAGAAGATAG | 6 | 6 | 28 | 25 | 21 | 34 | 184776 | リボソームタンパク質 L23a |
| AATAGTCCA | 12 | 9 | 32 | 36 | 22 | 22 | 113029 | リボソームタンパク質 S25 |
| ACAACTCAAT | 1 | 1 | 7 | 7 | 8 | 6 | 244125 | EST |
| ACAACTCAAT | 1 | 1 | 7 | 7 | 8 | 6 | 75922 | 脳タンパク質 I3 |
| ACATCATCGA | 10 | 18 | 50 | 66 | 34 | 46 | 182979 | リボソームタンパク質 L12 |
| ACCATTGGAT | 0 | 0 | 3 | 10 | 3 | 9 | 146360 | インターフェロンの誘導型膜貫通タンパク質 1 (9-27) |
| ACCTGTATCC | 5 | 3 | 20 | 6 | 26 | 35 | 182241 | インターフェロンの誘導型膜貫通タンパク質 3 (1-8U) |
| ACTCCAAAAA | 9 | 12 | 21 | 65 | 21 | 37 | 133230 | リボソームタンパク質 S15 |
| AGCACCTCCA | 37 | 37 | 108 | 81 | 57 | 108 | 75309 | 真核性翻訳伸長因子 2 |
| AGGACCATCG | 0 | 0 | 8 | 2 | 1 | 18 | | |
| AGGGCTTCCA | 26 | 41 | 74 | 108 | 50 | 85 | 29797 | リボソームタンパク質 L10 |
| ATGGCTGGTA | 18 | 46 | 79 | 75 | 81 | 136 | 182426 | リボソームタンパク質 S2 |
| ATGTAAAAAA | 0 | 0 | 26 | 32 | 2 | 12 | 178112 | DNA断片,単一コピープロローブ LNS-CAI/LNS-CAII (ポリボロシスにおいて欠失) |
| ATGTAAAAAA | 0 | 0 | 26 | 32 | 2 | 12 | 234734 | リゾチーム (腎アミロイドシス) |
| ATGTAAAAAA | 0 | 0 | 26 | 32 | 2 | 12 | 83715 | シェーグレン症候群抗原 B (自己抗原 La) |
| ATTCTCCAGT | 8 | 20 | 20 | 48 | 43 | 28 | 234518 | リボソームタンパク質 L23 |
| CAAGGACCAG | 0 | 0 | 5 | 6 | 10 | 12 | 109 | ジベプチダーゼ 1 (腎) |
| CAATAAATGT | 8 | 6 | 40 | 76 | 33 | 67 | 179779 | リボソームタンパク質 L37 |
| CAGCTCACTG | 4 | 17 | 9 | 35 | 21 | 24 | 158675 | リボソームタンパク質 L14 |
| CATTTGTAAT | 48 | 27 | 102 | 57 | 36 | 125 | | |
| CCTAGCTGGA | 16 | 27 | 58 | 45 | 48 | 66 | 182937 | ペプチジルプロリルリソメラーゼ A (シクロプロリンA) |
| CCTTCGAGAT | 6 | 12 | 13 | 29 | 7 | 41 | 76194 | リボソームタンパク質 S5 |
| CTCCTCACCT | 7 | 13 | 38 | 36 | 24 | 75 | 242908 | レシチンコレステロールアルシトランスフェラーゼ |
| CTGACTTGTG | 0 | 0 | 1 | 20 | 9 | 2 | 77961 | 主要組織適合性複合体,クラス I, B |
| CTGGGTTAAT | 14 | 24 | 84 | 83 | 42 | 112 | 126701 | リボソームタンパク質 S19 |
| CTGTTGATTG | 13 | 3 | 60 | 58 | 52 | 27 | 249495 | 異種起源核リボヌクレオタンパク質 A1 |
| CTGTTGTTGA | 9 | 19 | 37 | 59 | 31 | 61 | 3463 | リボソームタンパク質 S23 |
| GAATAAATGGT | 7 | 12 | 49 | 47 | 25 | 27 | 181357 | ラミネン受容体 1 (67kD),リボソームタンパク質 SA |
| GAGTCAGGAG | 2 | 0 | 8 | 6 | 9 | 7 | 181271 | CGI-120 タンパク質 |
| GCATAATAGG | 11 | 16 | 22 | 54 | 50 | 21 | 184108 | リボソームタンパク質 L21 (遺伝子または偽遺伝子) |

【 0 0 5 0 】
(兼 6)

| | | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|-----|----|----|--------|--|
| GCATTTAAAT | 1 | 2 | 10 | 18 | 12 | 7 | 261802 | 真核性翻訳伸長因子 1 β 1 |
| GCATTTAAAT | 1 | 2 | 10 | 18 | 12 | 7 | 275959 | 真核性翻訳伸長因子 1 β 2 |
| GCAATTTGACA | 2 | 5 | 27 | 17 | 9 | 20 | 172129 | ホモサビエンセンス cDNA: FLJ121409 fis, クローン COL03924 |
| GCATTTAAGG | 2 | 8 | 14 | 32 | 16 | 17 | 8102 | リボソームタンパク質 S20 |
| GGACCACTGA | 18 | 39 | 76 | 57 | 48 | 83 | 119598 | リボソームタンパク質 L3 |
| GGGGGTAAC | 1 | 2 | 8 | 11 | 14 | 13 | 99969 | 融合, r(12;16) 悪性脂肪肉腫由来 |
| GTGGCTGAG | 0 | 0 | 75 | 0 | 20 | 18 | 277477 | 主要組織適合性複合体, クラス I, C |
| GTGCTCATT | 0 | 0 | 13 | 7 | 2 | 10 | 116577 | 前立腺分化因子 |
| GTGCTCATT | 0 | 0 | 13 | 7 | 2 | 10 | 25945 | EST |
| GTGTGTTGT | 0 | 0 | 17 | 29 | 17 | 15 | 118787 | トランスフォーミング成長因子, β 誘導型, 68KD |
| GTTTCGTGCCA | 1 | 13 | 18 | 43 | 24 | 18 | 179606 | 核RNAヘリカーゼ, DEADボックスファミリーの DECD 変種 |
| GTTTCGTGCCA | 1 | 13 | 18 | 43 | 24 | 18 | 179666 | 未特徴的胚床下部タンパク質 HSMNP1 |
| TAATAAAGGT | 4 | 11 | 37 | 62 | 24 | 27 | 151604 | リボソームタンパク質 S8 |
| TAATTTTTGC | 0 | 1 | 99 | 12 | 20 | 37 | 273321 | 造血系における差次的発現 |
| TCACAAGCAA | 10 | 7 | 17 | 21 | 13 | 38 | 146763 | 発生期ポリペプチド関連複合体 α ポリペプチド |
| TCAGATCTTT | 14 | 32 | 37 | 108 | 31 | 87 | 75344 | リボソームタンパク質 S4, X 結合 |
| TCCTGCCCA | 1 | 5 | 10 | 14 | 7 | 16 | 171814 | パラチモシン |
| TGAAATAAAA | 0 | 2 | 2 | 14 | 13 | 11 | 173205 | ヌクレオホスミン(核小体リニンタンパク質 B23,ヌマトリン) |
| TGAAATAAAA | 0 | 2 | 2 | 14 | 13 | 11 | 192822 | 染色体 6q24.3-25.3 上のクローン RP5-1179L24 由来の ヒト DNA 配列 |
| TGATGCTGG | 0 | 0 | 2 | 6 | 8 | 2 | 83883 | マウス類似の新規タンパク質遺伝子の 3' 端を含む |
| TGTAATCAAT | 2 | 3 | 13 | 11 | 8 | 11 | 249495 | タンパク質 PNG, EST, STS および GSS に隣接するホスホリパーゼ C |
| TTACCATATC | 10 | 5 | 22 | 30 | 26 | 22 | 300141 | 膜貫通, 前立腺アンドロゲン誘導型 RNA |
| TTATGGGATC | 6 | 4 | 24 | 37 | 36 | 47 | 5662 | 異種起源核リボヌクレオタンパク質 A1 |
| TTCAATAAAA | 8 | 14 | 78 | 111 | 36 | 50 | 177592 | リボソームタンパク質 L39 |
| TTCCAGCTGC | 0 | 0 | 7 | 6 | 2 | 9 | 112442 | グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質), β ポリペプチド 2 様 1 |
| TTCCAGCTGC | 0 | 0 | 7 | 6 | 2 | 9 | 19121 | リボソームタンパク質, 大型, P1 |
| TTCCAGCTGC | 0 | 0 | 7 | 6 | 2 | 9 | 227277 | EST, 類似性が少ない |
| TTTCCACTAA | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 6 | 1032 | アダプター関連タンパク質複合体 2, α 2 サブユニット |
| TTTCCACTAA | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 6 | 289088 | sine oculis ホメオボックス(シヨウジョウバエ)相同体 3 |
| TTTTTAATGT | 0 | 2 | 12 | 18 | 8 | 7 | 161307 | 再生腔島由来 1 α (腔石タンパク質, 腔臓系状タンパク質) |
| | | | | | | | | 熱ショック 90kD タンパク質 1, α |
| | | | | | | | | H3 ヒストン, ファミリー 3A |

| タグ配列 | NC1 | NC2 | AD1 | AD2 | CA1 | CA2 | UNI ID | 説明 |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|---|
| AAATCTGGCA | 16 | 15 | 2 | 4 | 2 | 0 | 430 | ブラスチン1 (1アイソフォーム) |
| AACGTGCAGG | 29 | 31 | 13 | 6 | 7 | 8 | 160786 | アルギニコハク酸シンセターゼ |
| AAGAAAGCTC | 20 | 6 | 0 | 2 | 1 | 5 | 25264 | DKFZP434N126 タンパク質 |
| AAGAAAGCTC | 20 | 6 | 0 | 2 | 1 | 5 | 97011 | 前方勾配2 (アフリカツメガエル) 相同体 |
| AAGAAGCAGG | 8 | 16 | 3 | 4 | 1 | 3 | 11441 | 染色体1 オープンリーディングフレーム8 |
| AAGGTAGCAG | 15 | 16 | 2 | 4 | 2 | 4 | 104125 | アデニルシクラーゼ関連タンパク質 |
| AAATAAAGGCT | 25 | 11 | 3 | 7 | 3 | 4 | 179735 | ras 相同体遺伝子ファミリー, メンバーC |
| AAATAGTTCC | 7 | 16 | 2 | 3 | 6 | 1 | 272620 | 妊娠特異的β1糖タンパク質9 |
| AATCACAAAT | 18 | 45 | 1 | 4 | 14 | 3 | 74466 | 癌胎児性抗原関連細胞接着分子7 |
| AATGAGAAGG | 11 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 198248 | UDP-Gal:βGlcNAcβ1,4ガラクトシルトランスフェラーゼ, ポリペプチド1 |
| ACAATTGGTC | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 155097 | 炭酸脱水酵素II |
| ACACCCATCA | 2 | 27 | 1 | 0 | 5 | 3 | 110445 | CGI 97 タンパク質 |
| ACAGGTTGAC | 25 | 13 | 1 | 8 | 7 | 6 | 174050 | 内皮分化関連因子1 |
| ACATTTGGTG | 377 | 334 | 67 | 34 | 96 | 33 | 275086 | PRドメイン含有10 |
| ACATTTGGTG | 377 | 334 | 67 | 34 | 96 | 33 | 5241 | 脂肪酸結合タンパク質1, 肝臓 |
| ACCCAACTGC | 12 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 232604 | ホモサピエンズcDNA: FLJ22675 fis, クロームHS10553 |
| ACCCACGTCA | 22 | 10 | 3 | 5 | 3 | 1 | 198951 | jun 8 癌原遺伝子 |
| ACCCCCCGC | 44 | 38 | 7 | 13 | 16 | 6 | 229413 | EST |
| ACCCCCCGC | 44 | 38 | 7 | 13 | 16 | 6 | 2780 | jun D 癌原遺伝子 |
| ACCTGCATCC | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| ACCTGGGGAG | 35 | 11 | 1 | 3 | 4 | 3 | 131748 | EST, 中程度類似 |
| ACCTGGGGAG | 35 | 11 | 1 | 3 | 4 | 3 | 209119 | 1-アシルグリセロール-3-ホスホアチジン酸アシルトランスフェラーゼ2 |
| ACGGTCCAGG | 5 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 | 72924 | (リソホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ, β) |
| ACTCTTGTGG | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5378 | シチジンデアミナーゼ |
| ACTGTGCGG | 17 | 34 | 9 | 12 | 9 | 4 | 12242 | スポンジン1, (f-スポンジン)細胞外マトリックスタンパク質 |
| AGAAATAGCTT | 44 | 67 | 3 | 9 | 11 | 30 | 24133 | EST |
| AGCAGGAGCA | 50 | 14 | 6 | 3 | 7 | 6 | 178292 | KIAAC18C タンパク質 |
| AGCAGGAGCA | 50 | 14 | 6 | 3 | 7 | 6 | 738 | 早期成長応答1 |
| AGCCCGACCA | 16 | 3 | 2 | 4 | 1 | 3 | 104114 | ホモサピエンズ HCG1 mRNA |
| AGGATGTTCC | 34 | 19 | 5 | 3 | 6 | 8 | 71779 | 染色体19由来のホモサピエンズDNA: コスミドF2.856 |
| AGCCCAAGGG | 21 | 6 | 3 | 1 | 3 | 4 | 76057 | ガラクトース4-エピメラーゼ, UDP |

| | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|--|
| CCTCCCGAA | 89 | 54 | 9 | 14 | 18 | 7 | 5940 | 仮想タンパク質 FLJ20063 |
| CCGCTGCACT | 127 | 102 | 55 | 46 | 37 | 30 | | |
| CCGGCTTGAG | 7 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2722 | イノシトール1,4,5-3リン酸 3-キナーゼ A |
| CCTCCAGCTA | 715 | 458 | 142 | 125 | 131 | 147 | 242463 | クラチン 8 |
| CCTCCAGTAC | 20 | 8 | 2 | 3 | 2 | 4 | | |
| CCTGCCCCC | 20 | 30 | 6 | 3 | 11 | 4 | 861 | マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 3 |
| CCTGCTGCAG | 7 | 34 | 0 | 1 | 6 | 9 | 102482 | ムチン 5, サブタイプ B, 気管気管支 |
| CCTGCTTGTC | 20 | 23 | 0 | 3 | 0 | 5 | 268171 | EST, 類似性が少ない |
| | | | | | | | | 精巢上体特異的, 乳酸酸性タンパク質型, 4つのジスルフィドコア; 推定 |
| CCTGCTTGTC | 20 | 23 | 0 | 3 | 0 | 5 | 2719 | 卵巣癌マーカー |
| | | | | | | | | プロコラーゲンプロリン, 2-オキソグルタルレート4-ジオキシシグナラーゼ(プロリン4-ヒドロキシラーゼ), βポリペプチド(タンパク質ジスルフィドイソメララーゼ; 甲状腺ホルモン結合 |
| CCTGGAAGAG | 30 | 26 | 11 | 4 | 12 | 16 | 75655 | タンパク質 p55) |
| CCTGCTGCC | 14 | 22 | 0 | 1 | 1 | 1 | 107139 | 仮想タンパク質 |
| | | | | | | | | 酸化タンパク質 2 (非セレニウムグルタチオンペルオキシダーゼ, 酸性カルシウム |
| CCTGTGACAG | 22 | 27 | 0 | 4 | 3 | 1 | 120 | 非依存性ホスホリパーゼ A2) |
| CCTTCAAATC | 29 | 17 | 0 | 0 | 1 | 0 | 23118 | 炭酸脱水酵素 1 |
| CGAGGGCCA | 110 | 47 | 18 | 18 | 12 | 32 | 182485 | アクチニン, α 4 |
| CGCTGTGGG | 58 | 53 | 19 | 8 | 8 | 6 | 7486 | 甲状腺内に発現したタンパク質 |
| CGGACTCACT | 20 | 45 | 5 | 14 | 14 | 10 | 284134 | 血清学的に定義された結腸癌抗原 28 |
| CGGACTCACT | 20 | 45 | 5 | 14 | 14 | 10 | 84700 | ホスファチジルコリン転移タンパク質 2 と類似 |
| CGGGAGTCGG | 28 | 30 | 13 | 2 | 9 | 1 | 236720 | EST, 類似性が少ない |
| CGGTGGGACC | 7 | 14 | 1 | 1 | 3 | 3 | 99175 | ホモサビエンセンス cDNA: FLJ21606 fis, クローム COL07302 |
| CGTGGGTGGG | 1 | 10 | 1 | 0 | 0 | 1 | 202833 | ヘムオキシゲナーゼ (デサイクリング) 1 |
| CTACCCCTCAC | 172 | 90 | 30 | 53 | 35 | 58 | 14376 | アクチン, γ 1 |
| CTCAGAACTT | 18 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 194710 | グルコサミニル(N-アセチル)トランスフェラーゼ 3, ムチン型 |
| CTGAACCTCC | 5 | 15 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4205 | 仮想タンパク質 FLJ20124 |
| CTGACCTGTG | 88 | 130 | 48 | 18 | 16 | 46 | 77961 | 主要組織適合性複合体, クラス I, B |
| CTGGATCTGG | 21 | 21 | 3 | 9 | 5 | 10 | 75658 | ホスホリラーゼ, ブドウ糖; 脳 |
| CTGCCAAAGG | 14 | 22 | 1 | 0 | 0 | 0 | | |
| CTGCCCTCG | 186 | 52 | 1 | 3 | 15 | 14 | 1406 | 三葉型因子 1 (乳癌, エストロゲン誘発配列が発現) |
| CTGCCCTCG | 186 | 52 | 1 | 3 | 15 | 14 | 166184 | インターセクチン 2 |
| CTGCCCTCG | 186 | 52 | 1 | 3 | 15 | 14 | 7720 | ダイニン, 細胞質, 車ベプチド 1 |

| | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|----|----|----|----|----|--------|--|---|---|-------|------------------|
| CTGGCTATCC | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10784 | 仮想タンパク質 FLJ20037 |
| CTGGCCTCT | 22 | 22 | 2 | 2 | 3 | 3 | 50868 | 溶質担体ファミリー 22 (有機カチオン輸送体), メンバー1様 | | | | |
| CTGTACTTG | 9 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 75678 | FBJ マウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子相合体 B | | | | |
| CTGTGTGGCT | 0 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 127610 | アシルコエンザイムAデヒドロゲナーゼ, C2からC3までの短鎖 | | | | |
| CTGTGTGGCT | 0 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 54277 | 染色体X (両布) 9928 発現配列上のDNA断片 | | | | |
| CTTACAAGCA | 21 | 13 | 2 | 3 | 4 | 3 | mito | タグはミトコンドリア配列に対応 | | | | |
| CTTAGAGGG | 16 | 22 | 0 | 1 | 1 | 1 | 155191 | ビルン2 (エズリン) | | | | |
| CTTATGGTCC | 36 | 11 | 0 | 1 | 1 | 0 | 179608 | レチノールデヒドロゲナーゼ相合体 | | | | |
| CTCCAGCTA | 64 | 31 | 22 | 20 | 14 | 19 | 217493 | アネキシンA2 | | | | |
| CTTCTGGCC | 29 | 2 | 2 | 2 | 0 | 1 | 251577 | ヘモグロビン, α1 | | | | |
| CTTGACATAC | 18 | 20 | 4 | 4 | 0 | 0 | 171695 | 二重特異性ホスファターゼ1 | | | | |
| CTTGATTCCC | 26 | 9 | 5 | 0 | 2 | 5 | 77266 | クイエスチン (quiescin) Q6 | | | | |
| GACATCAAGT | 198 | 87 | 23 | 14 | 47 | 17 | 182265 | ケラチン19 | | | | |
| GACCAGCCCA | 23 | 21 | 3 | 2 | 12 | 5 | 75799 | プロテアーゼ, セリン, 8 (プロスタシン) | | | | |
| GACCAGTGGC | 21 | 44 | 4 | 0 | 2 | 0 | 143131 | 糖タンパク質A33 (膜貫通) | | | | |
| GACGGGGCC | 30 | 47 | 10 | 17 | 12 | 17 | 301684 | RNAポリメラーゼ1および転写放出因子 | | | | |
| GAGAGCTCCC | 5 | 11 | 3 | 0 | 2 | 1 | mito | タグはミトコンドリア配列に対応 | | | | |
| GACCACCGTG | 7 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | | | | | | |
| GATATGTA | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| GATCCCAACT | 9 | 29 | 5 | 7 | 1 | 1 | 118786 | メタロチオネイン 2A | | | | |
| GATGAATCCG | 12 | 14 | 2 | 2 | 1 | 2 | 283552 | EST, 類似性が少ない | | | | |
| GATGACCCC | 42 | 49 | 4 | 3 | 3 | 3 | mito | タグはミトコンドリア配列に対応 | | | | |
| GCAAGAAAGT | 48 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 155376 | ヘモグロビン, β | | | | |
| GCACAGGTCA | 5 | 9 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | | | |
| GCACCCCTTC | 13 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | | | |
| GCACCTGTCG | 2 | 9 | 0 | 0 | 1 | 0 | 109059 | ミトコンドリアリボソームタンパク質 L12 | | | | |
| GCACCTGTCG | 2 | 9 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1239 | アラニル(膜)アミノペプチダーゼ (アミノペプチダーゼ N, アミノペプチダーゼ M, ミクロソームアミノペプチダーゼ, CD13, p150) | | | | |
| GCAGCTCCTG | 13 | 47 | 3 | 2 | 7 | 3 | 19257 | emsl 配列 (乳癌および鱗状細胞癌関連) (p80/85 src 基質) | | | | |
| GCAGGAGGTG | 2 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1441 | 染色体1 オープニングインディーティングフレーム8 | | | | |
| GCAGGAGGTG | 2 | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 | 76040 | KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) 小胞体タンパク質保持受容体1 | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|----|----|--------|--|
| GCCAGGGCTC | 128 | 165 | 41 | 69 | 39 | 51 | 92323 | FXD ドメイン含有イオン輸送レギュレーター 3 |
| GCCACATACT | 3 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4984 | KIAA0828 タンパク質 |
| GCCACGTGGA | 19 | 16 | 5 | 2 | 7 | 1 | 103665 | ピリン様 |
| GCCAGACACC | 19 | 9 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3804 | DKFZP564C1940 タンパク質 |
| GCCAGGTTGC | 14 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 42824 | 仮想タンパク質 FLJ10718 |
| GCCAGGTTGC | 14 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 55682 | 真核性翻訳開始因子 3, サブユニット 7 (α , 66/67kD) |
| GCCAGGTTGC | 14 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 78996 | 増殖細胞核抗原 |
| GCCATCCTCC | 9 | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1690 | ヘパリン結合成長因子結合タンパク質 |
| GCCACACAG | 15 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 10326 | ユートマタンパク質複合体, サブユニット 4 |
| GCCACAGTCA | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 1 | 229417 | EST, 中程度の類似性あり |
| GCCACAGGCC | 4 | 44 | 2 | 1 | 2 | 1 | 229546 | EST |
| GCCACAGGCC | 4 | 44 | 2 | 1 | 2 | 1 | 154903 | EST, 類似性が少ない |
| GCCAGGTCA | 519 | 447 | 136 | 128 | 58 | 22 | 143131 | 糖タンパク質 A33 (膜貫通) |
| GCCAGTGGC | 51 | 0 | 8 | 15 | 2 | 5 | 75741 | アミノリド結合タンパク質 1 (アミノキシダーゼ (銅含有)) |
| GCCGACAGG | 46 | 47 | 15 | 8 | 19 | 9 | 74631 | ベーシジン (basigin) |
| GCCGGTGGG | 207 | 149 | 18 | 24 | 68 | 67 | 80680 | 主要円蓋タンパク質 |
| GCCGTGGAGA | 32 | 23 | 4 | 11 | 7 | 7 | 5662 | グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質), β ポリペプチド 2 様 1 |
| GCCTGGCCAT | 26 | 34 | 4 | 6 | 10 | 14 | 63042 | DKFZp564J157 タンパク質 |
| GCCTGGCCAT | 26 | 34 | 4 | 6 | 10 | 14 | 98 | |
| GCGAAACCCCT | 167 | 565 | 123 | 43 | 64 | 64 | 0 | |
| GCGAAACTCG | 5 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 108124 | リボソームタンパク質 L41 |
| GCGCAGAGGT | 2 | 16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 33455 | ペプチジルアルギニンゼンゲイミナーゼ, II 型 |
| GCTCTTCCCC | 9 | 21 | 1 | 2 | 2 | 0 | 272897 | チューブリン, α , 脳特異的 |
| GCTGCCCTTG | 44 | 6 | 13 | 6 | 6 | 18 | 278242 | チューブリン, α , 遍在 |
| GCTGCCCTTG | 44 | 6 | 13 | 6 | 6 | 0 | 179704 | メブリン A, α (PABA ペプチド加水分解酵素) |
| GCTGGCACAT | 15 | 14 | 1 | 0 | 6 | 1 | 8185 | CGI44 タンパク質; 硫化物脱水素酵素様 (酵母) |
| GCTGGCCCCG | 5 | 11 | 0 | 0 | 0 | 3 | 58247 | プロテアーゼ, セリン, 4 (トリプシン 4, 豚) |
| GCTGTGCCTG | 36 | 42 | 2 | 4 | 11 | 0 | 5394 | ミオシン, 重ポリペプチド様 (110kD) |
| GCTTGGGGAT | 11 | 8 | 2 | 0 | 0 | 2 | 102336 | Rho GTPase 活性化タンパク質 8 |
| GGAACAGGGG | 1 | 13 | 1 | 0 | 0 | 2 | 272972 | 仮想タンパク質 FLJ20185 |
| GGAACAGGGG | 1 | 13 | 1 | 0 | 0 | 2 | 77961 | 主要組織適合性複合体, クラス I, B |
| GGAACAGGGG | 1 | 13 | 1 | 0 | 0 | 2 | | |

| | | | | | | | | |
|------------|-----|----|----|----|----|----|--------|---|
| GGAACTGTGA | 90 | 84 | 10 | 18 | 10 | 2 | 38972 | テトラスパン1 |
| GGAAAGGCAC | 21 | 11 | 1 | 1 | 2 | 5 | 75268 | シアリルトランスフェラーゼ 4C(β -ガラクトクトシターゼ α -2,3-シアリアルトランスフェラーゼ) |
| GGAGCCGAG | 13 | 9 | 5 | 0 | 2 | 5 | 301342 | EST, 類似性が少ない |
| GGAGCCGCTC | 5 | 11 | 1 | 1 | 0 | 1 | 33455 | ペプチジルアルギニンゼイミナーゼ, II型 |
| GGATGGCTTA | 25 | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 64179 | 仮想タンパク質 |
| GGCACCGTC | 22 | 44 | 8 | 10 | 8 | 4 | 120912 | EST |
| GGCCCTGCAG | 14 | 7 | 1 | 0 | 5 | 1 | 105463 | sir2 関連タンパク質 6型 |
| GGCTCGGGAT | 15 | 11 | 2 | 4 | 3 | 5 | 2575 | カルバイン1, (mu/l) 大サブユニット |
| GGCTGCCTGC | 13 | 11 | 4 | 3 | 5 | 2 | 180958 | EST |
| GGCTGCCTGC | 13 | 11 | 4 | 3 | 5 | 2 | 197314 | EST |
| GGCTGGGCT | 46 | 25 | 14 | 5 | 10 | 8 | 144102 | EST |
| GGCTGGGCT | 46 | 25 | 14 | 5 | 10 | 8 | 14846 | ホモサビエンス mRNA; cDNA DKFZp564D016 (クロールン DKFZp564D016 由来) |
| GGCTGGGCT | 46 | 25 | 14 | 5 | 10 | 8 | 73919 | クラスリン, 軽ペプチド (Lcb) |
| GGGAAGCAGA | 32 | 17 | 18 | 4 | 8 | 9 | | |
| GGGACGAGTG | 20 | 6 | 1 | 3 | 6 | 1 | 3337 | 膜貫通4 スーパーファミリーメンバー1 |
| GGGGCTGTG | 11 | 27 | 3 | 8 | 4 | 5 | 8372 | ユビキノールチトクロームc 還元酵素 (6.4KD) サブユニット |
| GGGGCAGGC | 48 | 64 | 27 | 10 | 15 | 31 | 119140 | 真核性翻訳開始因子 5A |
| GGTGAAGAGG | 16 | 32 | 5 | 3 | 10 | 9 | 233950 | セリンプロテアーゼ阻害剤, Kunitz型1 |
| GTAGCAGGTG | 24 | 27 | 11 | 7 | 7 | 7 | 140452 | cargo 選択タンパク質(マンノース6リン酸受容体結合タンパク質) |
| GTATTGGGC | 5 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| GTCATCACCA | 35 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 107382 | KIAA1517 タンパク質 |
| GTCATCACCA | 35 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 257045 | ホモサビエンス cDNA: FLJ23415 fis, クロールン HEP20738 |
| GTCATCACCA | 35 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32966 | グアニルシクラーゼ活性化剤 2B (ウログアニリン) |
| GTCATCACCA | 35 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 68877 | チトクローム b-245, α ポリペプチド |
| GTCGAGTGC | 17 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3337 | 膜貫通4 スーパーファミリーメンバー1 |
| GTCCTGAACA | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 78546 | ATPase, Ca++ 輸送, 血漿膜 1 |
| GTCCTGAACA | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8258 | DKFZP434D1335 タンパク質 |
| GTGCACTGAG | 118 | 45 | 14 | 7 | 12 | 13 | 181244 | 主要組織適合性複合体, クラス I, A |
| GTGCACTGAG | 118 | 45 | 14 | 7 | 12 | 13 | 277477 | 主要組織適合性複合体, クラス II, C |
| GTGCCTGAGA | 18 | 15 | 2 | 6 | 7 | 3 | 77886 | ラミン A/C |
| GTGGCGGAA | 3 | 15 | 1 | 0 | 4 | 0 | | |
| GTGGGGGCC | 5 | 22 | 2 | 0 | 1 | 0 | 254105 | エノラーゼ 1, (α) |
| GTGGTGGCAG | 29 | 11 | 1 | 1 | 10 | 3 | 194691 | レチン酸誘導型 3 |

| | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|----|----|----|----|--------|-----------------------------------|------------------------------------|
| TGGCCATCTG | 30 | 24 | 8 | 7 | 3 | 4 | 184052 | PP1201 | タンパク質 |
| TGGCGCGTGT | 25 | 8 | 0 | 0 | 9 | 5 | 25640 | クラウジン3 | |
| TGGCTACTTA | 6 | 9 | 1 | 0 | 1 | 2 | 117950 | SAICAR | シンセターゼおよびAIRカルボキシラーゼに類似した多機能ポリペプチド |
| TGGGGAGAGG | 43 | 18 | 20 | 7 | 3 | 7 | 288998 | S100型 | カルシウム結合タンパク質 A14 |
| TTAACCCCTC | 34 | 14 | 5 | 9 | 1 | 5 | 78224 | リボヌクレアーゼ, RNase A | ファミリー1 (脳臓) |
| TTATGGTGTG | 11 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 271499 | EST | |
| TTCCACTAAC | 29 | 9 | 7 | 4 | 5 | 5 | 79706 | プレクチン1, 中間フィラメント結合タンパク質 | , 500KD |
| TTCCGGTTC | 5 | 16 | 0 | 0 | 2 | 2 | 137274 | EST | , 類似性が少ない |
| TTCTGGTGCG | 8 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 119251 | ユビキノールチクロロムc | 還元酵素核タンパク質 1 |
| TTCTGTAGCC | 13 | 23 | 4 | 2 | 4 | 2 | 5541 | ATPase, Ca++ | 輸送, 遍在 |
| TTGGACCTGG | 33 | 31 | 7 | 18 | 12 | 16 | 89761 | ATPシンターゼ, H+ 輸送 | , ミトコンドリア F1複合体, δサブユニット |
| TTGGGGTTC | 111 | 184 | 50 | 81 | 67 | 50 | 62954 | フェリチン, 鉄ポリペプチド 1 | |
| TTTAACGGCC | 93 | 67 | 36 | 35 | 11 | 30 | mito | タグはミトコンドリア配列に対応 | |
| TTTCCTCTCA | 21 | 8 | 6 | 2 | 4 | 3 | 184510 | ストラチアフィン | |
| TTTCCTCTCA | 21 | 8 | 6 | 2 | 4 | 3 | 303400 | EST | |
| TTTCTCGTCG | 10 | 16 | 2 | 3 | 0 | 2 | 1686 | グアニニヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質), α 11 | (Gqクラス) |
| TTTGGTTTCA | 2 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| TTTTCTGCAT | 8 | 7 | 1 | 0 | 1 | 2 | 50964 | 癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1 | (肝糖タンパク質) |
| TTTTCTGCAT | 8 | 7 | 1 | 0 | 1 | 2 | 77318 | 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ, アイソフォーム Ib, α | サブユニット(45KD) |
| TTTTTACTGA | 32 | 19 | 10 | 10 | 8 | 1 | 111577 | 膜内在性タンパク質 2C | |

【 0 0 5 1 】

参考文献

10

20

30

40

1. Cancer Facts & Figures 1998: American Cancer Society, 1998.
2. Inger, D. B. Colorectal cancer screening, *Prim Care*. 26: 179-187, 1999.
3. Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Serial Analysis Of Gene Expression, *Science*. 270: 484-487, 1995.
4. Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Gene Expression Profiles in Normal and Cancer Cells, *Science*. 276: 1268-1272, 1997. 10
5. Lal, A., Lash, A. E., Altschul, S. F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R. E., Marra, M. A., Prange, C., Morin, P. J., Polyak, K., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Strausberg, R. L., and Riggins, G. J. A public database for gene expression in human cancers, *Cancer Res*. 59: 5403-5407, 1999.
6. St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Genes expressed in human tumor endothelium, *Science*. 289: 1197-1202, 2000. 20
7. Guy-Crotte, O., Amouric, M., and Figarella, C. Characterization and N-terminal sequence of a degradation product of 14,000 molecular weight isolated from human pancreatic juice, *Biochem Biophys Res Commun*. 125: 516-523, 1984. 30
8. Terazono, K., Yamamoto, H., Takasawa, S., Shiga, K., Yonemura, Y., Tochino, Y., and Okamoto, H. A novel gene activated in regenerating islets, *J Biol Chem*. 263: 2111-2114, 1988.
9. Watanabe, T., Yonekura, H., Terazono, K., Yamamoto, H., and Okamoto, H. Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal

- and tumoral tissues. The reg protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene, *J Biol Chem.* 265: 7432-7439, 1990.
10. Rechreche, H., Montalto, G., Mallo, G. V., Vasseur, S., Marasa, L., Soubeyran, P., Dagorn, J. C., and Iovanna, J. L. pap, reg Ialpha and reg Ibeta mRNAs are concomitantly up-regulated during human colorectal carcinogenesis, *Int J Cancer.* 81: 688-694, 1999. 10
11. Skonier, J., Neubauer, M., Madisen, L., Bennett, K., Plowman, G. D., and Purchio, A. F. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta, *DNA Cell Biol.* 11: 511-522, 1992.
12. Escribano, J., Hemando, N., Ghosh, S., Crabb, J., and Coca-Prados, M. cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to beta ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium, *J Cell Physiol.* 160: 511-521, 1994. 20
13. Munier, F. L., Korvatska, E., Djemai, A., Le Paslier, D., Zografos, L., Pescia, G., and Schorderet, D. F. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies, *Nat Genet.* 15: 247-251, 1997. 30
14. Fleming, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, *Proceedings of the Royal Society.* 93: 306-317, 1922.
15. Sugi, K., Saitoh, O., Hirata, I., and Katsu, K. Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins, *Am J Gastroenterol.* 91: 927-934, 1996.

16. van der Sluys Veer, A., Brouwer, J., Biemond, I., Bohbouth, G. E., Verspaget, H. W., and Lamers, C. B. Fecal lysozyme in assessment of disease activity in inflammatory bowel disease, *Dig Dis Sci.* 43: 590-595, 1998.
17. Tomita, H., Sato, S., Matsuda, R., Sugiura, Y., Kawaguchi, H., Niimi, T., Yoshida, S., and Morishita, M. Serum lysozyme levels and clinical features of sarcoidosis, *Lung.* 177: 161-167, 1999. 10
18. Ho, S. B., Itzkowitz, S. H., Frieria, A. M., Jiang, S. H., and Kim, Y. S. Cell lineage markers in premalignant and malignant colonic mucosa, *Gastroenterology.* 97: 392-404, 1989.
19. Yamada, R. and Kera, Y. D-amino acid hydrolysing enzymes, *Exs.* 85: 145-155, 1998.
20. Bootcov, M. R., Bauskin, A. R., Valenzuela, S. M., Moore, A. G., Bansal, M., He, X. Y., Zhang, H. P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., Walsh, B. J., Nicholson, R. C., Fairlie, W. D., Por, S. B., Robbins, J. M., and Breit, S. N. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 11514-11519, 1997. 20
21. Paralkar, V. M., Vail, A. L., Grasser, W. A., Brown, T. A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H. Z., Qi, H., Owen, T. A., and Thompson, D. D. Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family, *J Biol Chem.* 273: 13760-13767, 1998. 30
22. Notterman, D.A., Alon, U., Sierk, A.J., Levine, A.J., Transcriptional Gene Expression Profiles of Colorectal Adenoma, Adenocarcinoma, and Normal Tissue Examined by Oligonucleotide Arrays, *Cancer Res.* 61: 3124-3130, 2001.
23. Zhou, W., Sokoll, L. J., Brusek, D. J., Zhang, L., Velculescu, V., Goldin, S. B., Hruban, R. H., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Chan, D. W., Vogelstein, B., and 40

Kinzler, K. W. Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis, *Can Epid Bio & Prev.* 7: 109-112, 1998.

24. Brown, D. A., Liu, T., Ward, R. L., Hawkins, N. J., Fairlie, W. D., Bauskin, A. R., Russell, P. J., Quinn, D. I., Grygiel, J. J., Moore, A. G., Sutherland, R. L., Turner, J., Kingsley, E. A., and Breit, S. N. Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1) in epithelial neoplasia, Submitted., 2001.

10

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1Aは、差次的に発現した転写産物タグの倍変化の分布を示す。正常と腺腫または正常と癌の間の比較において、有意基準を満たした ($p < 0.05$ 、全体で957タグ) 転写産物を、図にプロットした。正常に対する腺腫の割合および正常に対する癌の割合を、対数スケールでプロットした。図1Aにおける、および図1Bにおいて拡大された網掛け四角 (shaded box) は、表3に詳細を示した転写産物タグを囲む。標識されていない2つの点は、その差次的発現が定量的PCRで確認できなかったタグに対応しており、これにより、タグが、表3に示した転写産物と異なる転写産物に由来することを示唆している。

【図2】腺腫と癌の両方において増加される遺伝子の定量PCR分析を示す。5名の患者 (Pt) 由来の癌および対応する正常組織における遺伝子発現の定量値を、対応する正常結腸粘膜における定量値の倍上昇として示す。各バーは3回の独立した測定の平均値を示す。TGFBI、LYS、RDP、MIC-1、REGAおよびDEHLは、表3に記載した通りである。

20

【図3】腺腫と癌の両方において減少した遺伝子の定量PCR分析を示す。5名の患者 (Pt) 由来の癌および対応する正常組織の遺伝子発現の定量値を、対応する正常組織の関数として示す。各バーは、3回の独立した測定の平均値を示す。CA2およびDRAは表4に記載された。二重特異性ホスファターゼ (DUSP1) および酸スフィンゴミエリナーゼ様ホスホジエステラーゼ (ASML3a) は、抑制されるが表4に含まれるのに必要な厳格な基準は満たしていない、転写産物を示す。SAGEデータはDUSP1が腺腫および癌においてそれぞれ5倍および76倍抑制されたことを示した。ASML3aは、腺腫および癌の両方において15倍抑制された。

30

【図4】腺腫と癌の両方において増加した遺伝子の精製上皮細胞由来のmRNAの定量PCR分析を示す。2名の患者由来の、精製された正常 (N) 上皮細胞または癌 (Ca) 上皮細胞の遺伝子発現の定量値を、対応する正常に対しての倍増として示す。検討された遺伝子は図2と同じである。

【図5】図5A~図5Eは、増加した遺伝子のインサイチュウハイブリダイゼーション分析を示す。被験遺伝子は、REGA (図5A)、TGFBI (図5B)、LYS (図5C)、RDP (図5D) およびMIC-1 (図5E) であった。陽性細胞は赤色を示し、矢印は悪性上皮細胞を指し、矢印の頭はマクロファージを指す。

【図6】腎ジペプチダーゼの阻害剤は、0.6nMから19.5nMの範囲内の阻害定数を示す。

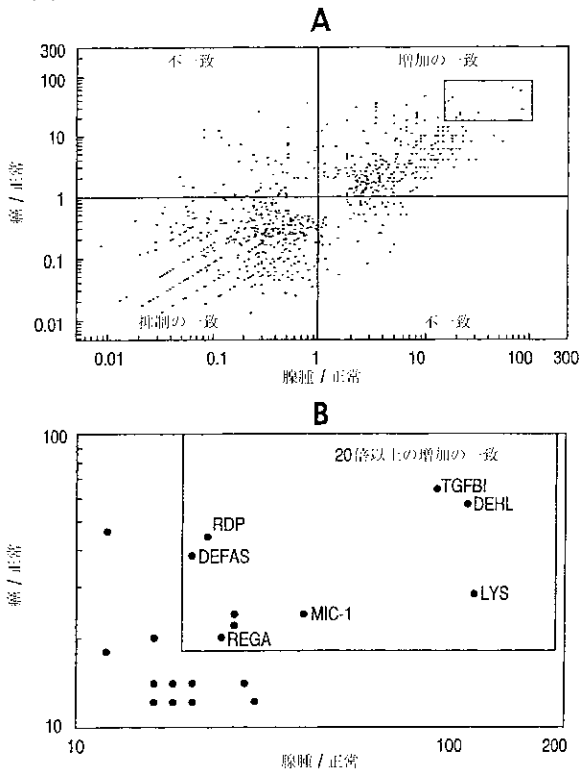
【図7】阻害率を阻害剤の濃度関数として比較した、図6に示す阻害剤の比較を示す。

40

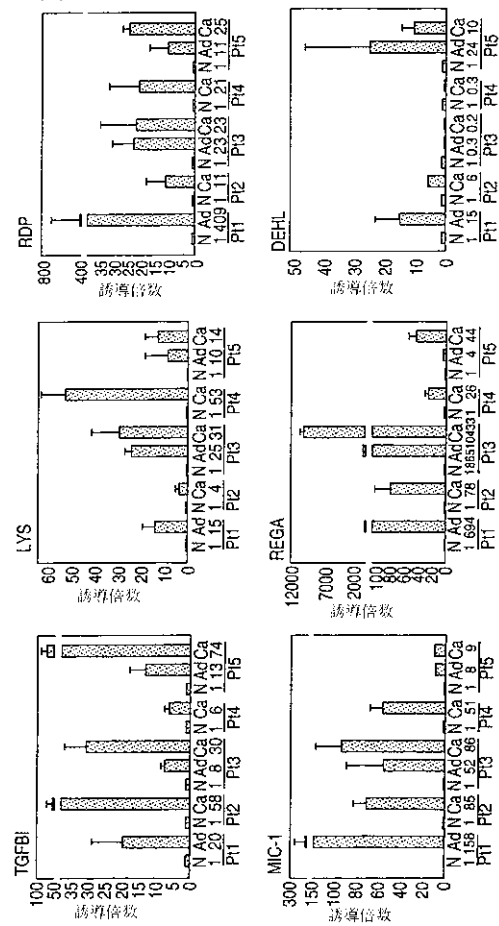
【図8】腎ジペプチダーゼの基質を示す。

【図9】正常結腸組織と比較した腺腫、癌および転移において見出される腎ジペプチダーゼ活性の差を示す。

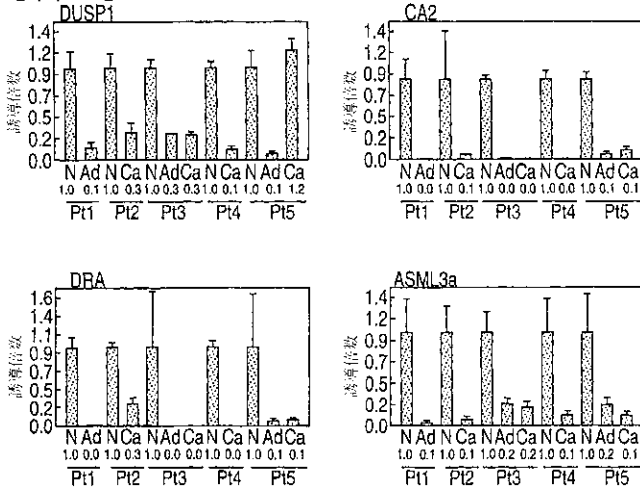
【図1】



【図2】



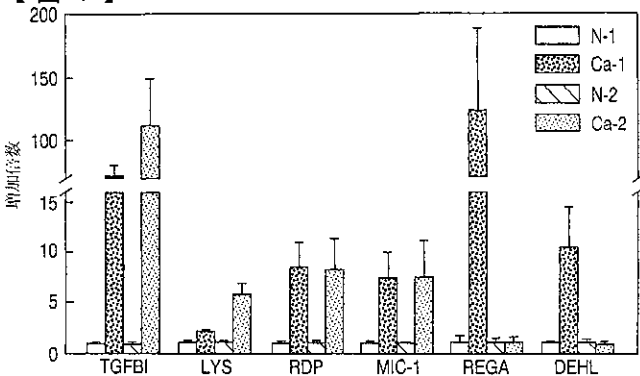
【図3】



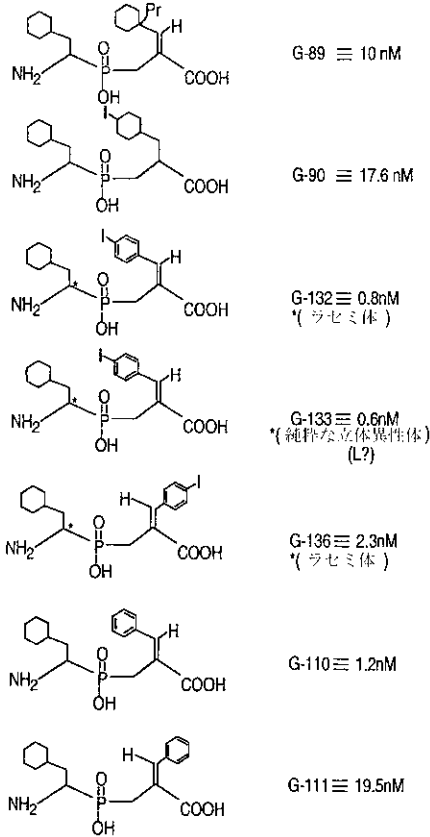
【図5】



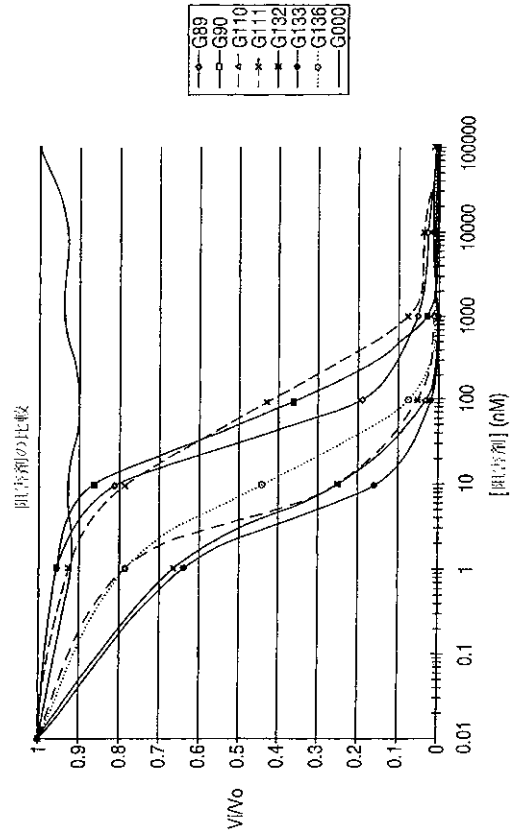
【図4】



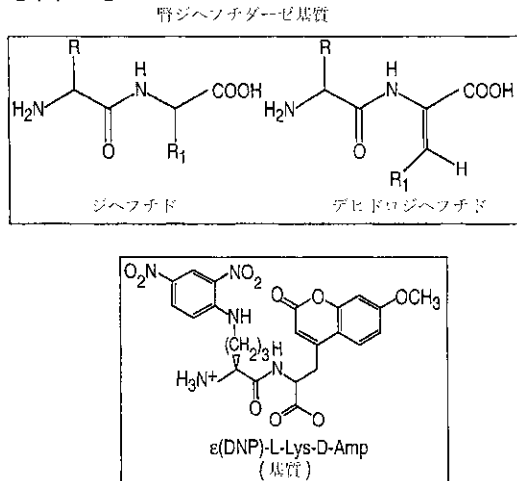
【 図 6 】



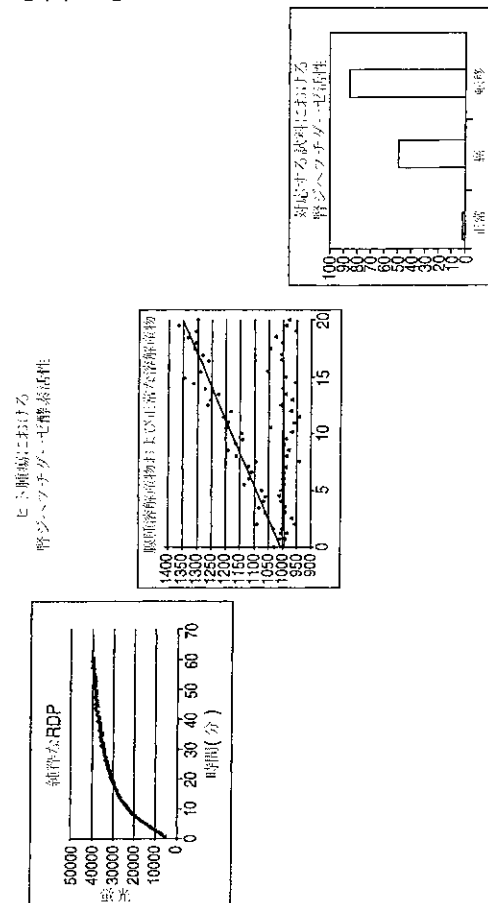
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US02/28518 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : C07H 21/04 US CL : 435/6, 91.2 | | |
| 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) U.S. : 435/6, 91.2 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X, P | BUCKHAULTS et al. Secreted and Cell Surface Genes Expressed in Benign and Malignant Colorectal Tumors. Cancer Research. 01 October 2001, Vol. 61, pages US 6,333, 152 B1 (VOGELSTEIN et al.) 25 December 2001 (25.12.2001), columns 16-17, sequence 50 | 1-10 |
| X, P | ISHIGAMI et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. British Journal of Cancer. 1998, Vol. 78, No. 10, pages 1379-1384. | 1-10 |
| A | OTTE et al. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in colorectal cancer. European Journal of Clinical Investigation. 2000, Vol. 30, pages 222-229. | 1-10 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <i>Special categories of cited documents:</i> | | |
| * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | |
| Date of the actual completion of the international search 09 December 2002 (09.12.2002) | | Date of mailing of the international search report 31 JAN 2003 |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230 | | Authorized officer Juliet C. Einmann <i>Janice Ford for</i> Telephone No. (703) 308-0196 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/28518

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Claims 1-10, species Lysosyme

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/28518

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group 1, claims 1-10, drawn to methods for detecting colorectal cancer wherein renal dipeptidase mRNA is detected.

Group 2, claims 11-18, drawn to methods for detecting colorectal cancer which target the peptide renal dipeptidase in a detection assay.

Group 3, claims 19-22, drawn to methods for detection of colorectal cancer wherein an antibody is administered to a patient.

Group 4, claims 23-28, drawn to methods for detection of colorectal cancer wherein an inhibitor is administered to a subject.

Group 5, claims 29-36, drawn to methods for detection of colorectal cancer wherein a substrate for renal dipeptidase is administered to a patient.

Group 6, claims 37-46, drawn to a method for the detection of colorectal cancer wherein macrophage inhibitory cytokine mRNA is detected.

Group 7, claims 47-50, drawn to methods for detecting colorectal cancer which target the macrophage inhibitory cytokine in a detection assay.

Further species election for groups 1 and 6. These groups further recite dependent claims wherein one of a multitude of sequences selected from table 3 or table 5 are utilized in the assay. Each of these is a separate species, and if applicant wishes for more than one to be examined in the claims, appropriate fees must be paid.

The invention which is the first invention to be searched is group 1, claims 1-10, with respect to the recited sequence in table 3.

The inventions listed as groups 1-7 do not relate to a single general concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features because each of the recited groups is drawn to a method which has a unique feature that is not shared with the other groups. The special technical feature of group 1 is considered to be a method in which renal dipeptidase mRNA is detected as an indicator of colorectal cancer, while in group 2 has a special technical feature wherein peptide renal dipeptidase is detected. The special technical feature of group 3 is that an antibody is administered to a patient for the detection of colorectal cancer. The special technical feature of group 4 is that an inhibitor is administered to a patient for the detection of colorectal cancer. The special technical feature of group 5 is that a substrate for renal dipeptidase is administered to a patient for the detection of colorectal cancer. Groups 6 and 7 are not joined to groups 1-4 because they employ macrophage inhibitory cytokine as a target for the detection of colorectal cancer. The special technical feature of group 6 is considered to be a method in which macrophage inhibitory cytokine mRNA is detected as an indicator of colorectal cancer, while in group 7 has a special technical feature wherein macrophage inhibitory cytokine is detected.

Further, the separate species recited in table 3 and table 5 are not joined to one another because they are each distinct nucleic acids with separate structures and functions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/28518

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

USPATS, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS

keywords: renal dipeptidase (and synonyms), colorectal, colon, rectum, cancer, carcinoma, tumor

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| G 0 1 N 21/78 | G 0 1 N 37/00 | 1 0 2 |
| G 0 1 N 33/53 | A 6 1 K 49/02 | A |
| G 0 1 N 37/00 | A 6 1 K 49/02 | C |
| | C 1 2 N 15/00 | A |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バックハルツ フィリップ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 エリコット シティ フォーリー クォーター ロード 3
 6 2 1

(72) 発明者 キンズラー ケネス ダブリュ.
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルチモア ハルカーク ウェイ 1 4 0 3

(72) 発明者 ボゲルステイン バート
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルチモア プレトン ウェイ 3 7 0 0

F ターム(参考) 2G054 AB03 CE02 EA03
 4B024 AA12 BA14 CA04 CA05 CA11 HA14
 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ36 QQ44 QQ53 QQ79 QR16 QR32
 QR36 QR48 QR55 QR62 QS03 QS25 QS34 QX02 QX07
 4C085 HH03 HH11 KA27 KB07 KB09 KB18 KB19 KB20 LL18

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 分泌基因和细胞表面基因在良性和恶性结直肠肿瘤中表达 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005518781A | 公开(公告)日 | 2005-06-30 |
| 申请号 | JP2003526936 | 申请日 | 2002-09-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 医学的约翰霍普金斯大学医学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 医学的约翰霍普金斯大学医学院 | | |
| [标]发明人 | バックハルツフィリップ キンズラーケネスダブリュ ボゲルステインバート | | |
| 发明人 | バックハルツ フィリップ キンズラー ケネス ダブリュ. ボゲルステイン バート | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K49/00 A61K51/00 C07K14/47 C07K14/495 C07K14/705 C12N9/48 C12N15/09 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N21/78 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | C07K14/495 C07K14/47 C07K14/705 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.A A61K49/00.Z C12Q1/37 G01N21/78.C G01N33/53.M G01N37/00.102 A61K49/02.A A61K49/02.C C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G054/AB03 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA12 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA27 4C085/KB07 4C085/KB09 4C085/KB18 4C085/KB19 4C085/KB20 4C085/LL18 | | |
| 代理人(译) | 清水初衷 | | |
| 优先权 | 60/317494 2001-09-07 US 60/383805 2002-05-30 US | | |
| 其他公开文献 | JP2005518781A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

基因表达的系列分析 (SAGE) 用于鉴定在结肠的良性和恶性肿瘤中表达的分泌蛋白或编码细胞表面蛋白的转录物。从正常, 腺瘤和癌症结肠上皮分析总共290,394个标签。发现观察到的21,343种不同转录物中的957种在正常和腺瘤之间或正常和癌症之间差异表达。在腺瘤中, 49个标签增加超过20倍, 在癌症中40个标签增加超过20倍, 9个转录物增加超过20倍。六个产品这九个转录物 (TGFBI, LYS, RDP, MIC-1, 和 REGA DEHL) 的预计将在任一细胞表面被分泌检查这些更多的细节。这6个基因中的每一个的定量PCR分析证实了SAGE预测的异常表达水平。此外, 通过来自原发性肿瘤的免疫亲和纯化的上皮细胞的原位杂交和PCR分析鉴定了负责增加表达的细胞类型。

| SAGEライブラリー | 観察されたタグの 総数 | 観察された異なる 転写産物数* |
|------------|----------------|--------------------|
| 正常な結腸直腸上皮 | | |
| NC-1 | 49,610 | 9,359 |
| NC-2 | 48,479 | 9,610 |
| 腺腫 | | |
| Ad-A | 52,573 | 11,167 |
| Ad-B | 42,661 | 9,483 |
| 癌 | | |
| Tu-98 | 41,371 | 9,780 |
| Tu-102 | 55,700 | 11,039 |
| 合計 | 290,394 | 21,343 |