

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/004430

発行日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(43) 国際公開日 平成31年1月3日(2019.1.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>GO 1 N 33/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 1
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/573 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/573 A	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>GO 1 N 27/62 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 V	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2019-527058 (P2019-527058)	(71) 出願人	505314022 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
(21) 国際出願番号	PCT/JP2018/024806		
(22) 国際出願日	平成30年6月29日(2018.6.29)		
(31) 優先権主張番号	特願2017-129941 (P2017-129941)	(71) 出願人	大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号 591125371
(32) 優先日	平成29年6月30日(2017.6.30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
		(72) 発明者	朝長 毅 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 大腸がんを検出するためのバイオマーカー

## (57) 【要約】

大腸がんを早期に検出するためのバイオマーカーの提供。

以下の1～22の22個のタンパク質の少なくとも1つのタンパク質、または1～22のタンパク質の部分ペプチドの少なくとも1つのペプチドからなる大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー：1．アネキシンA11；2．アネキシンA3；3．アネキシンA4；4．テネイシン-N；5．トランスフェリン受容体タンパク質1；6．グルコーストランスポーター1；7．補体成分C9；8．CD88 抗原；9．78kDa グルコース制御タンパク質；10．-1-酸性グリコプロテイン；11．マトリックスメタロプロテアーゼ9；12．アンジオポエチン-1；13．CD67 抗原；14．ムチン-5B；15．アダプタータンパク質 GRB2；16．アネキシンA5；17．オルファクトメジン-4；18．中性アミノ酸トランスポーターB(0)；19．トリペプチジルペプチダーゼ1；20．熱ショック関連70kDaタンパク質2；21．プロテアソームサブユニット タイプ-5；または22．好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の 1 ~ 22 の 22 個のタンパク質の少なくとも 1 つのタンパク質、または 1 ~ 22 のタンパク質の部分ペプチドの少なくとも 1 つのペプチドからなる大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー：

- 1 . アネキシンA11 (Annexin A11) (ANXA 11) (配列番号 1) ;
- 2 . アネキシンA3 (Annexin A3) (ANXA 3) (配列番号 2) ;
- 3 . アネキシンA4 (Annexin A4) (ANXA 4) (配列番号 3) ;
- 4 . テネイシン-N (Tanascin-N) (TNN) (配列番号 4) ;
- 5 . トランスフェリン受容体タンパク質 1 (Transferrin receptor protein 1) (TFRC) (配列番号 5) ;
- 6 . グルコーストランスポーター 1 (GLUT-1) (SLC2A1) (配列番号 6) ;
- 7 . 補体成分C9 (Complement component C9) (C9) (配列番号 7) ;
- 8 . CD88抗原 (CD88 antigen) (C5AR1) (配列番号 8) ;
- 9 . 78kDa グルコース制御タンパク質 (78kDa glucose-regulated protein) (HSPA5) (配列番号 9) ;
- 10 . -1-酸性グリコプロテイン (-1-acid glycoprotein) (ORM1) (配列番号 10) ;
- 11 . マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (Matrix metalloproteinase-9) (MMP9) (配列番号 11) ;
- 12 . アンジオポエチン - 1 (Angiopoietin-1) (ANGPT1) (配列番号 12) ;
- 13 . CD67抗原 (CD67 antigen) (CEACAM8) (配列番号 13) ;
- 14 . ムチン-5B (Mucin-5B) (MUC5B) (配列番号 14) ;
- 15 . アダプタータンパク質 GRB2 (Adapter protein GRB2) (GRB2) (配列番号 15) ;
- 16 . アネキシンA5 (Annexin A5) (ANXA 5) (配列番号 16) ;
- 17 . オルファクトメジン-4 (Olfactomedin-4) (OLFM4) (配列番号 17) ;
- 18 . 中性アミノ酸トランスポーターB(0) (Neutral amino acid transporter B(0))(SLC1A5) (配列番号 18) ;
- 19 . トリペプチジルペプチダーゼ 1 (Tripeptidyl-peptidase 1) (TPP1) (配列番号 19) ;
- 20 . 熱ショック関連70kDaタンパク質 2 (Heat shock-related 70kDa protein 2) (HSPA2) (配列番号 20) ;
- 21 . プロテアソームサブユニット タイプ-5 (Proteasome subunit alpha type-5) (PSMA5) (配列番号 21) ; または
- 22 . 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) (LCN2) (配列番号 22) 。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の 1 ~ 22 の 22 個のタンパク質の 2 以上のタンパク質、または 1 ~ 22 のタンパク質の部分ペプチドの 2 以上のペプチドを組合せてなる、請求項 1 記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載の 1 ~ 22 のタンパク質の部分ペプチドが配列番号 23 ~ 59 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

## 【請求項 4】

以下の 12 個のタンパク質の少なくとも 1 つのタンパク質、または該 12 個のタンパク質の部分ペプチドの少なくとも 1 つのペプチドからなる、請求項 1 記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー：

- 1 . アネキシンA11 (配列番号 1) ;
- 2 . アネキシンA3 (配列番号 2) ;

- 3 . アネキシンA4 ( 配列番号 3 ) ;
- 4 . テネイシン-N ( 配列番号 4 ) ;
- 5 . トランスフェリン受容体タンパク質 1 ( 配列番号 5 ) ;
- 6 . グルコーストランスポーター 1 ( 配列番号 6 ) ;
- 8 . CD88抗原 ( 配列番号 8 ) ;
- 1 1 . マトリックスメタロプロテアーゼ 9 ( 配列番号 1 1 ) ;
- 1 6 . アネキシンA5 ( 配列番号 1 6 ) ;
- 1 7 . オルファクトメジン- 4 ( 配列番号 1 7 ) ;
- 1 9 . トリペプチジルペプチダーゼ 1 ( 配列番号 1 9 ) ; または
- 2 2 . 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン ( 配列番号 2 2 ) 。

10

## 【請求項 5】

請求項 4 記載の 1 2 個のタンパク質の 2 以上のタンパク質、または該 1 2 個のタンパク質の部分ペプチドの 2 以上のペプチドを組合せてなる、請求項 4 記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

## 【請求項 6】

請求項 4 記載の 1 2 個のタンパク質の部分ペプチドが配列番号 2 3 ~ 3 4、3 7、3 8、4 3、4 4、5 3、5 4、5 6 および 5 9 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 4 または 5 に記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

## 【請求項 7】

アネキシンA4若しくはアネキシンA11、またはそれらの部分ペプチドからなる、請求項 1 記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

20

## 【請求項 8】

アネキシンA4とアネキシンA11、またはアネキシンA4の部分ペプチドとアネキシンA11の部分ペプチドを組合せてなる、請求項 7 記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

## 【請求項 9】

アネキシンA4およびアネキシンA11の部分ペプチドが配列番号 2 3、2 4、2 7 および 2 8 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 7 または 8 に記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

## 【請求項 1 0】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の大腸がんバイオマーカーとCEAとを組合せてなる、大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

30

## 【請求項 1 1】

生体試料中の請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の大腸がんバイオマーカーを測定することを含む大腸がんの検出方法。

## 【請求項 1 2】

生体試料中の請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の大腸がんバイオマーカーを測定し、該バイオマーカーが健常人と比較して高濃度で存在する場合に、大腸がん罹患していると判断する、大腸がんの検出方法。

## 【請求項 1 3】

生体試料が血液中の細胞外小胞(EV)である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の大腸がんの検出方法。

40

## 【請求項 1 4】

検出が免疫学的測定法または質量分析法により行われる、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の大腸がんの検出方法。

## 【請求項 1 5】

生体試料中の請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の大腸がんバイオマーカーに対する抗体を含む大腸がんの検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、大腸がんの検出に用い得る新規なタンパク質又はペプチドバイオマーカに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

大腸がん（CRC）は、世界で最も頻度の高いがんの1つであり、CRCのための効果的バイオマーカの開発は、ヒトの生存率向上に不可欠である。しかし、現在用いられる大腸がんの診断法は便潜血やCEAなど非常に精度の低いものばかりで、大腸がんを早期に高精度に診断できる新しいバイオマーカは見つかっておらず、血中バイオマーカが切実に求められている。

10

## 【0003】

これまで大規模なオミクス研究により、多数のがん関連因子およびがんのバイオマーカ候補が発見されてきたにもかかわらず、臨床応用に至った血中バイオマーカは未だ存在しない。それを裏付ける証拠として、近年の、米食品医薬品局（FDA）により承認されたバイオマーカは、毎年2件以下と極めて少ない。この停滞の原因の1つは、バイオマーカ開発の戦略に深刻な問題があると考えられている。

## 【0004】

従来、多くの臨床検査において、タンパク質バイオマーカの検出は抗体ベースの定量分析（主に酵素結合抗体免疫測定法（ELISA）を用いた）によって行われてきた。これらの方法は抗体の品質に大きく依存しているため、精度、特に特異度に問題があり、また多項目のマーカ候補を同時に評価することは難しい。

20

## 【0005】

質量分析計（MS）の最近の進歩によりは、臨床検査法が大きく変わる可能性が出てきた。その理由として、ターゲットプロテオミクスを代表する手法である選択反応モニタリング/多重反応モニタリング法（SRM/MRM）は、高精度でバイオマーカタンパク質の定量ができるだけでなく、多項目のマーカを同時に定量することができるからである。以前の報告で、Whiteakerらは、SRM/MRM法を用いて患者血漿中の多項目の乳がんバイオマーカ候補タンパク質の定量を実施した（非特許文献1を参照）。それ以外にも、SRM/MRM法を使って種々のがんのバイオマーカ候補タンパク質を検証した例は本発明者らのグループの報告も含めていくつかが報告されている（非特許文献2～4を参照）。

30

## 【0006】

このように、SRM/MRM法を用いたターゲットプロテオミクスは、バイオマーカ発見のための強力なツールとなる。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0007】

【非特許文献1】Whiteaker, J. et al., Nat. Biotechnol. 29, 625-634 (2011)

【非特許文献2】Kume, H. et al., Mol. Cell. Proteomics 13, 1471-1484 (2014)

【非特許文献3】Muraoka, S. et al., J. Proteome Res. 11, 4201-4210 (2012)

【非特許文献4】Narumi, R. et al., J. Proteome Res. 11, 5311-5322 (2012)

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、大腸がんを早期に検出するためのバイオマーカの提供を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者らは、まずPubMedの文献検索からCRCバイオマーカ候補タンパク質を検索した。それらのバイオマーカ候補タンパク質を血中で検出するために、血中の細胞外小胞（EV）に着目した。なぜならば、EVは細胞間コミュニケーションの仲介者として働くことが最近注目されているだけでなく、種々の病気の発症や進展に関わると言われ、バイオマ

50

ーカーク候補を多く含んでいると考えられているからである。また、質量分析計を用いて血中の微量なタンパク質を検出しようとする際に、アルブミン等の血中に多量に存在する夾雑タンパク質により、微量なマーカー候補タンパク質の検出が阻害されることがある。しかし、血中のEVを精製する際に、多量な夾雑タンパク質が除去されるので、EV中の微量なバイオマーカー候補タンパク質の検出が可能になる。従って、EV含有タンパク質は有望なバイオマーカー候補であると考えられた。

【0010】

本発明者らは文献検索で見つかったバイオマーカー候補タンパク質の中で、血中EVに存在する可能性があるタンパク質に候補を絞り、SRM/MRM法を用いてそれらのタンパク質の定量を行った。その結果として、CRCの早期診断のためのいくつかのバイオマーカー候補を特定し、本発明を完成させるに至った。

10

【0011】

すなわち、本発明の態様は以下のとおりである。

[1] 以下の1～22の22個のタンパク質の少なくとも1つのタンパク質、または1～22のタンパク質の部分ペプチドの少なくとも1つのペプチドからなる大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー：

1. アネキシンA11 (Annexin A11) (ANXA 11) (配列番号1)；
2. アネキシンA3 (Annexin A3) (ANXA 3) (配列番号2)；
3. アネキシンA4 (Annexin A4) (ANXA 4) (配列番号3)；
4. テネイシン-N (Tanascin-N) (TNN) (配列番号4)；
5. トランスフェリン受容体タンパク質1 (Transferrin receptor protein 1) (TFRC) (配列番号5)；
6. グルコーストランスポーター1 (GLUT-1) (SLC2A1) (配列番号6)；
7. 補体成分C9 (Complement component C9) (C9) (配列番号7)；
8. CD88抗原 (CD88 antigen) (C5AR1) (配列番号8)；
9. 78kDa グルコース制御タンパク質 (78kDa glucose-regulated protein) (HSPA5) (配列番号9)；
10. -1-酸性グリコプロテイン (-1-acid glycoprotein) (ORM1) (配列番号10)；
11. マトリックスメタロプロテアーゼ9 (Matrix metalloproteinase-9) (MMP9) (配列番号11)；
12. アンジオポエチン-1 (Angiopoietin-1) (ANGPT1) (配列番号12)；
13. CD67抗原 (CD67 antigen) (CEACAM8) (配列番号13)；
14. ムチン-5B (Mucin-5B) (MUC5B) (配列番号14)；
15. アダプタータンパク質 GRB2 (Adapter protein GRB2) (GRB2) (配列番号15)；
16. アネキシンA5 (Annexin A5) (ANXA 5) (配列番号16)；
17. オルファクトメジン-4 (Olfactomedin-4) (OLFM4) (配列番号17)；
18. 中性アミノ酸トランスポーターB(0) (Neutral amino acid transporter B(0)) (SLC1A5) (配列番号18)；
19. トリペプチジルペプチダーゼ1 (Tripeptidyl-peptidase 1) (TPP1) (配列番号19)；
20. 熱ショック関連70kDaタンパク質2 (Heat shock-related 70kDa protein 2) (HSPA2) (配列番号20)；
21. プロテアソームサブユニット タイプ-5 (Proteasome subunit alpha type-5) (PSMA5) (配列番号21)；または
22. 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) (LCN2) (配列番号22)。

20

30

40

[2] [1]の1～22の22個のタンパク質の2以上のタンパク質、または1～22のタンパク質の部分ペプチドの2以上のペプチドを組合せてなる、[1]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

50

[3] [1]の1~22のタンパク質の部分ペプチドが配列番号23~59で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、[1]または[2]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[4] 以下の12個のタンパク質の少なくとも1つのタンパク質、または該12個のタンパク質の部分ペプチドの少なくとも1つのペプチドからなる、[1]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー：

1. アネキシンA11(配列番号1)；
2. アネキシンA3(配列番号2)；
3. アネキシンA4(配列番号3)；
4. テネイシン-N(配列番号4)；
5. トランスフェリン受容体タンパク質1(配列番号5)；
6. グルコーストランスポーター1(配列番号6)；
8. CD88抗原(配列番号8)；
11. マトリックスメタロプロテアーゼ9(配列番号11)；
16. アネキシンA5(配列番号16)；
17. オルファクトメジン-4(配列番号17)；
19. トリペプチジルペプチダーゼ1(配列番号19)；または
22. 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(配列番号22)。

[5] [4]の12個のタンパク質の2以上のタンパク質、または該12個のタンパク質の部分ペプチドの2以上のペプチドを組合せてなる、[4]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[6] [4]の12個のタンパク質の部分ペプチドが配列番号23~34、37、38、43、44、53、54、56および59で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、[4]または[5]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[7] アネキシンA4若しくはアネキシンA11、またはそれらの部分ペプチドからなる、[1]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[8] アネキシンA4とアネキシンA11、またはアネキシンA4の部分ペプチドとアネキシンA11の部分ペプチドを組合せてなる、[7]の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[9] アネキシンA4およびアネキシンA11の部分ペプチドが配列番号23、24、27および28で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、[7]または[8]に記載の大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[10] [1]~[9]のいずれかの大腸がんバイオマーカーとCEAとを組合せてなる、大腸がん検出のための大腸がんバイオマーカー。

[11] 生体試料中の[1]~[10]のいずれかの大腸がんバイオマーカーを測定することを含む大腸がんの検出方法。

[12] 生体試料中の[1]~[10]のいずれかの大腸がんバイオマーカーを測定し、該バイオマーカーが健常人と比較して高濃度で存在する場合に、大腸がん罹患していると判断する、大腸がんの検出方法。

[13] 生体試料が血液中の細胞外小胞(EV)である、[11]または[12]の大腸がんの検出方法。

[14] 検出が免疫学的測定法または質量分析法により行われる、[11]~[13]のいずれかの大腸がんの検出方法。

[15] 生体試料中の[1]~[10]のいずれかの大腸がんバイオマーカーに対する抗体を含む大腸がんの検出キット。

【0012】

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2017-129941号の開示内容を包含する。

【発明の効果】

【0013】

10

20

30

40

50

本発明のバイオマーカーにより大腸がんを高感度かつ高特異的に検出することができ、特に早期の大腸がんを検出することができる。さらに、バイオマーカーを組合せることにより、さらに高感度かつ高特異的な検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】細胞外小胞(EV)中の大腸がんマーカーの探索のための戦略を示す図である。図中には、それぞれの工程で選抜された候補タンパク質の数を示す。

【図2】EVにおける、CRCバイオマーカー候補タンパク質のためのショットガン・プロテオミクス分析の方法を示す図である。図2aはEVの調製及びMS分析の工程を示し、図2bはショットガンプロテオーム解析によって同定されたバイオマーカー候補タンパク質及びEVタンパク質のベン図解析の結果を示す。血清又は細胞培養上清から同定されたEVタンパク質のうち、356個の大腸がんバイオマーカー候補タンパク質がEVタンパク質として同定された。

【図3】SRM標的タンパク質(46)及びペプチド(71)を示す図である。

【図4】高度の正確さ(AUC>0.7)で検証されたタンパク質のリストを示す図である。

【図5-1】SRM分析による3群(N、C及びCm)の間の血清中ペプチドの相対的定量的結果を示す図である。Nは非がん対照患者を示し、Cは転移のないがん患者を示し、Cmは転移のあるがん患者を示す。ドットプロットグラフは、SIペプチドに対する内在的ペプチドのピーク面積比を示す(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, N.S.; 有意差なし)。縦軸はArea Ratio(面積比)を示す。

【図5-2】SRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す図である(図5-1の続き)。

【図5-3】SRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す図である(図5-2の続き)。

【図5-4】SRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す図である(図5-3の続き)。

【図5-5】SRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す図である(図5-4の続き)。

【図5-6】SRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す図である(図5-5の続き)。

【図6-1】標的ペプチドの統計的解析の結果を示す図である(その1)。図6-1aはSRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す。Nは非がん対照を示し、Cは転移のないがんを示し、Cmは転移のあるがんを示す。ドットプロットグラフは、SIペプチドに対する内在的ペプチドのピーク面積比を示す(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, N.S.; 有意差なし)。縦軸はArea Ratio(面積比)を示す。図6-1bはNとCを識別するためのROC曲線分析の結果(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線分析の結果(2)を示す。識別のための曲線下の面積(AUC)をそれぞれのグラフに示す。縦軸はsensitivity(感度)を示し、横軸は1-specificity(特異性)を示す。

【図6-2】標的ペプチドの統計的解析の結果を示す図である(その2)。図6-2cはSRM分析による3群(N、C及びCm)の間のペプチドの相対的定量的結果を示す。Nは非がん対照を示し、Cは転移のないがんを示し、Cmは転移のあるがんを示す。ドットプロットグラフは、SIペプチドに対する内在的ペプチドのピーク面積比を示す(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, N.S.; 有意差なし)。縦軸はArea Ratio(面積比)を示す。図6-2dはNとCを識別するためのROC曲線分析の結果(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線分析の結果(2)を示す。識別のための曲線下の面積(AUC)をそれぞれのグラフに示す。縦軸はsensitivity(感度)を示し、横軸は1-specificity(特異性)を示す。

【図7-1】NとCを識別するためのROC曲線(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線(2)を示す図である(その1)。識別のための曲線下の面積(AUC)をそれぞれのグラフに示す。縦軸はsensitivity(感度)を示し、横軸は1-specificity(特異度)を示す。

【図7-2】NとCを識別するためのROC曲線(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線(

10

20

30

40

50

2)を示す図である(図7-1の続き)。

【図7-3】NとCを識別するためのROC曲線(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線(2)を示す図である(図7-2の続き)。

【図7-4】NとCを識別するためのROC曲線(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線(2)を示す図である(図7-3の続き)。

【図7-5】NとCを識別するためのROC曲線(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線(2)を示す図である(図7-4の続き)。

【図7-6】NとCを識別するためのROC曲線(1)及びCとCmを識別するためのROC曲線(2)を示す図である(図7-5の続き)。

【図8-1】標的ペプチドの組合せのROC曲線分析の結果を示す図である(その1)。ペプチドを組合せたときの診断の感度をNとCの間で評価した。曲線下の面積(AUC)、感度(sensitivity)及び特異度(specificity)をそれぞれのグラフに示した。

【図8-2】標的ペプチドの組合せのROC曲線分析の結果を示す図である(その2)。ペプチドを組合せたときの診断の感度をNとCの間で評価した。曲線下の面積(AUC)、感度(sensitivity)及び特異性(specificity)をそれぞれのグラフに示した。

【図9】標的ペプチドの組合せのROC曲線分析の結果を示す図である。ペプチドの組合せたときの診断の感度をNとCの間で評価した。曲線下の面積(AUC)、感度(sensitivity)及び特異度(specificity)をそれぞれのグラフに示した。図9は、高い正確性(AUC>0.9)の組合せを示す。他の組合せは図8-1及び図8-2に示した。

【図10-1】標的ペプチドとCEAの感度(sensitivity)の比較の結果を示す図である。カットオフ値をNの最大ピーク面積に設定した場合の感度は、サンプルの割合として算出される(点線は、特異度が100%であることを示す)。縦軸はArea Ratio(面積比)を示す。

【図10-2】標的ペプチドとCEAの感度(sensitivity)の比較の結果を示す図である(図10-1の続き)。

【図10-3】標的ペプチドとCEAの感度(sensitivity)の比較の結果を示す図である(図10-2の続き)。

【図11】標的ペプチドとCEAの感度の比較の結果を示す図である。カットオフ値(Cutoff)をNの最大ピーク面積に設定した場合の感度(sensitivity)は、サンプルの割合として算出される(点線は、特異性が100%であることを示す)。図11においては、NとCの識別における感度がトップ3つのペプチドを示す。3つのペプチドについてのグラフの縦軸はArea Ratio(面積比)を示す。CEAより感度が高い他のペプチドは図10-1~10-3に示した。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

本発明は、大腸がん(CRC:colorectal cancer)を検出するためのバイオマーカーとしてのタンパク質又はその部分ペプチドである。また本発明は、該バイオマーカーを用いて大腸がんを検出する方法である。さらに本発明は、該バイオマーカーを用いて大腸がんを診断するための補助的データを取得する方法である。本発明のバイオマーカーを用いることにより、大腸がんを早期で検出することが可能である。

【0017】

本発明で用いるバイオマーカーは、例えば、プロテオーム解析技術により探索することができる。例えば、以下の工程で探索することができる。

【0018】

最初に、大腸がん患者の組織を用いて定量ショットガン・プロテオミクスによりバイオマーカーの候補となるタンパク質を探索する。この際、健康人の大腸組織若しくは大腸良性腫瘍組織と転移のない大腸がん症例の組織と転移のある大腸がん症例の組織の間で比較定量を行い、組織間で変動が認められるタンパク質を候補タンパク質として絞ることができる。また、バイオマーカー候補タンパク質の探索は、先行研究において、大腸がんの発

10

20

30

40

50

症や進展に関連すると言われたタンパク質を用いることによっても行える。それらのバイオマーカー候補に対して、特定の質量の親イオンを選択的に破壊し、生成した娘イオンの中の特定のイオンを検出することにより複雑なサンプル内から標的とするタンパク質由来のペプチドを高感度に検出することができるSRM/MRM (Selected reaction monitoring (選択反応モニタリング) / Multiple reaction monitoring (多重反応モニタリング))法 (Gillette MA et al., Nat Methods. 2013; 10:28-34)を用いたターゲットプロテオミクス法により組織間での発現量の変動の検証を行うことができる。この検証により、大腸がんバイオマーカーの最終候補を選抜することができる。次いで、これらのバイオマーカー候補が血液等の生体試料中で検出、定量ができるかを確認する。この際、好ましくは血中の細胞外小胞 (EV)画分中で検出、定量を行う。

10

## 【0019】

本発明の方法において、以下のタンパク質が大腸がん検出のためのバイオマーカーとして挙げられる。

- 1 . アネキシンA11 (Annexin A11) (ANXA 11) (配列番号 1 )
- 2 . アネキシンA3 (Annexin A3) (ANXA 3) (配列番号 2 )
- 3 . アネキシンA4 (Annexin A4) (ANXA 4) (配列番号 3 )
- 4 . テネイシン-N (Tanascin-N) (TNN) (配列番号 4 )
- 5 . トランスフェリン受容体タンパク質 1 (Transferrin receptor protein 1) (TFRC) (配列番号 5 )
- 6 . グルコーストランスポーター 1 (GLUT-1) (SLC2A1) (配列番号 6 )
- 7 . 補体成分C9 (Complement component C9) (C9) (配列番号 7 )
- 8 . CD88抗原 (CD88 antigen) (C5AR1) (配列番号 8 )
- 9 . 78kDa グルコース制御タンパク質 (78kDa glucose-regulated protein) (HSPA5) (配列番号 9 )
- 10 . -1-酸性グリコプロテイン (-1-acid glycoprotein) (ORM1) (配列番号 10 )
- 11 . マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (Matrix metalloproteinase-9) (MMP9) (配列番号 11 )
- 12 . アンジオポエチン - 1 (Angiopoietin-1) (ANGPT1) (配列番号 12 )
- 13 . CD67抗原 (CD67 antigen) (CEACAM8) (配列番号 13 )
- 14 . ムチン-5B (Mucin-5B) (MUC5B) (配列番号 14 )
- 15 . アダプタータンパク質 GRB2 (Adapter protein GRB2) (GRB2) (配列番号 15 )
- 16 . アネキシンA5 (Annexin A5) (ANXA 5) (配列番号 16 )
- 17 . オルファクトメジン-4 (Olfactomedin-4) (OLFM4) (配列番号 17 )
- 18 . 中性アミノ酸トランスポーターB(0) (Neutral amino acid transporter B(0))(SLC1A5) (配列番号 18 )
- 19 . トリペプチジルペプチダーゼ 1 (Tripeptidyl-peptidase 1) (TPP1) (配列番号 19 )
- 20 . 熱ショック関連70kDaタンパク質 2 (Heat shock-related 70kDa protein 2) (HSPA2) (配列番号 20 )
- 21 . プロテアソームサブユニット タイプ-5 (Proteasome subunit alpha type-5) (PSMA5) (配列番号 21 )
- 22 . 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) (LCN2) (配列番号 22 )

20

30

40

## 【0020】

また、大腸がん検出のためのバイオマーカーとして用い得る上記タンパク質の部分ペプチドとして、

配列番号 23 若しくは 24 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド (アネキシンA11の部分ペプチド)、

配列番号 25 若しくは 26 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド (アネキシンA3の部分ペプチド)、

50

配列番号 27 若しくは 28 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（アネキシンA4の部分ペプチド）、  
 配列番号 29 若しくは 30 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（テネイシン-Nの部分ペプチド）、  
 配列番号 31 若しくは 32 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（トランスフェリン受容体タンパク質 1 の部分ペプチド）、  
 配列番号 33 若しくは 34 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（グルコーストランスポーター 1 の部分ペプチド）、  
 配列番号 35 若しくは 36 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（補体成分C9の部分ペプチド）、  
 配列番号 37 若しくは 38 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（CD88抗原の部分ペプチド）、  
 配列番号 39 若しくは 40 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（78kDa グルコース制御タンパク質の部分ペプチド）、  
 配列番号 41 若しくは 42 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（ -1-酸性グリコプロテインの部分ペプチド）、  
 配列番号 43 若しくは 44 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（マトリックスメタロプロテアーゼ 9 の部分ペプチド）、  
 配列番号 45 若しくは 46 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（アンジオポエチン - 1 の部分ペプチド）、  
 配列番号 47 若しくは 48 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（CD67抗原の部分ペプチド）、  
 配列番号 49 若しくは 50 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（ムチン-5Bの部分ペプチド）、  
 配列番号 51 若しくは 52 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（アダプタータンパク質 GRB2の部分ペプチド）、  
 配列番号 53 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（アネキシンA5の部分ペプチド）、  
 配列番号 54 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（オルファクトメジン-4の部分ペプチド）、  
 配列番号 55 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（中性アミノ酸トランスポーターB(0)の部分ペプチド）、  
 配列番号 56 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（トリペプチジルペプチダーゼ 1 の部分ペプチド）、  
 配列番号 57 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（熱ショック関連70kDaタンパク質 2 の部分ペプチド）、  
 配列番号 58 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（プロテアソームサブユニットタイプ-5の部分ペプチド）、  
 配列番号 59 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（好中球ゼラチナーゼ関連リボカリンの部分ペプチド）等が挙げられる。

10

20

30

40

#### 【0021】

本発明においては、上記のタンパク質あるいはそのタンパク質の部分ペプチドをバイオマーカーとして用いるが、配列番号 1 ~ 59 に表されるアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加したアミノ酸配列からなるタンパク質又はペプチドも含み、これらのタンパク質又はペプチドも本発明の方法においてバイオマーカーとして用いることができる。ここで、「1個若しくは数個」とは「1個若しくは3個」、「1個若しくは2個」又は「1個」をいう。

#### 【0022】

ペプチドは、一般的には分子量 1 万以下のアミノ酸がペプチド結合により連結したものをいい、アミノ酸残基の数としては数個から 50 個以下程度のものをいう。本明細書におい

50

ては、タンパク質又はその部分ペプチドをバイオマーカーとして用いることができ、部分ペプチドという場合、タンパク質の有するアミノ酸配列の一部の部分的アミノ酸配列を有するペプチドであって分子量は限定されないが、好ましくは1万以下のものをいう。部分ペプチドは、転写・翻訳による発現合成過程で生成する場合もあり、またタンパク質として合成された後に、生体内で消化分解を受けて消化分解産物ペプチドとして生成する場合もある。

#### 【0023】

これらのタンパク質及びペプチドの中でもROC解析の結果、良好な検出感度及び特異度で大腸がんを検出し得ることが判明した、グルコーストランスポーター1、トランスフェリン受容体タンパク質1、アネキシンA5、マトリックスメタロプロテアーゼ9、アネキシンA4、アネキシンA11、テネイシン-N、アネキシンA3、オルファクトメジン-4、CD88抗原、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン若しくはトリペプチジルペプチダーゼ1、又はそれらの部分ペプチドが大腸がん検出のためのバイオマーカーとして用いるのが好ましい。さらに、アネキシンA4若しくはアネキシンA11、又はそれらの部分ペプチドを大腸がん検出のためのバイオマーカーとして用いるのが好ましい。

10

#### 【0024】

本発明において、バイオマーカーとして上記の22個のタンパク質及び部分ペプチドのうち少なくとも一つのタンパク質および/または部分ペプチドを用いることができるが、好ましくは2種類以上、さらに好ましくは3種類以上、4種類以上、5種類以上、6種類以上、7種類以上、8種類以上、9種類以上、10種類以上、11種類以上、12種類以上、13種類以上、14種類以上、15種類以上、16種類以上、17種類以上、18種類以上、19種類以上、20種類以上、21種類以上、又は22種類のタンパク質または部分ペプチドを用いるとより高精度で大腸がんを検出することができる。この場合、異なるタンパク質の組み合わせでもよいし、あるタンパク質とそのタンパク質以外のタンパク質の部分ペプチドあるいは部分ペプチドの組み合わせであってもよい。また、複数のインタクトなタンパク質のみをバイオマーカーとしてもよい。このように、複数のタンパク質または部分ペプチドをバイオマーカーとして用いることにより、大腸がんをより正確に検出することができ、また大腸がんの進行状態を的確に判断することができる。

20

#### 【0025】

例えば、グルコーストランスポーター1とトランスフェリン受容体タンパク質1の組合せ、グルコーストランスポーター1とアンジオポエチン-1の組合せ、マトリックスメタロプロテアーゼ9とトランスフェリン受容体タンパク質1の組合せ、トランスフェリン受容体タンパク質1と好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンの組合せ、トランスフェリン受容体タンパク質1とアンジオポエチン-1の組合せ、トランスフェリン受容体タンパク質1とアダプタータンパク質の組合せ、78kDa グルコース制御タンパク質とトリペプチジルペプチダーゼ1の組合せ、テネイシン-Nと好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンの組合せ、トランスフェリン受容体タンパク質1と好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンとアンジオポエチン-1の組合せ、トランスフェリン受容体タンパク質1とオルファクトメジン-4の組合せ、テネイシン-Nとアンジオポエチン-1の組合せ、オルファクトメジン-4とアンジオポエチン-1の組合せ、テネイシン-Nとオルファクトメジン-4の組合せ、オルファクトメジン-4とトリペプチジルペプチダーゼ1の組合せ等が挙げられる。それぞれのタンパク質の部分ペプチドの組合せでもよい。

30

40

#### 【0026】

また、上記のタンパク質又は部分ペプチドを、従来より大腸がんのバイオマーカーとして知られているCEA(がん胎児性抗原)と組合わせて大腸がん検出のためのバイオマーカーとして用いることにより、単独で用いるよりも高感度かつ高特異度で検出することができる。

#### 【0027】

大腸がん患者において、上記タンパク質又は部分ペプチドの発現が上昇する。従って、血液中のこれらのタンパク質又は部分ペプチドを定量すればよい。ここで、血液は、血清

50

及び血漿を含む。また、上記タンパク質は細胞外小胞(EV)中に存在する。従って、血中に存在するEVを単離し、必要ならば濃縮後、EV中のタンパク質又は部分ペプチドを検出してもよい。EVは、例えば、超遠心分離によりEV画分として分離することができる。また、EVに特異的なマーカーにより単離することができる。EVのマーカーとして、CD9、CD63、CD81等が挙げられ、これらのマーカーに対する抗体を結合させた磁気ビーズ等を利用して分離することができる。また、他のEVのマーカーとしてホスファチジルセリン(PS)が挙げられ、ホスファチジルセリンに対して親和性を有するホスファチジルセリン結合蛋白を結合させた磁気ビーズ等を利用して分離することができる。ホスファチジルセリン結合蛋白としては例えばT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4(Tim4)、アネキシンA5(Annexin A5)、アネキシンV(Annexin V)、乳脂肪球-EGF因子蛋白8(MFG-E8)などがある。

10

**【0028】**

本発明の方法において、生体試料中のタンパク質/部分ペプチドプロファイルを調べるが、用いる生体試料は限定されない。例えば、生体から採取し得る液体試料、例えば全血、血清、血しょう、尿、唾液等の体液が挙げられる。なお、生体試料の保存状態によっては、生体試料中のタンパク質、部分タンパク質および部分ペプチドがさらに分解を受けることもあるので、生体試料は凍結融解を繰り返さずに用いるのが好ましい。また、生体試料中にプロテアーゼインヒビター等を添加してもよい。あるいは、FACS又はフローサイトメーターを用いて、上記マーカーを指標にエクソソームを分離することもできる。

**【0029】**

単離したエクソソームからタンパク質やペプチドを抽出し、上記タンパク質又はペプチドを測定すればよい。

20

**【0030】**

タンパク質又は部分ペプチドは種々の方法で検出することができる。以下に例示するが、それらには限定されない。

**【0031】**

例えば、検出しようとするそれぞれのタンパク質又は部分ペプチドに対する抗体を用いた免疫学的測定法により測定することができる。免疫学的測定法としては、例えば、固相免疫測定法(RIA、EIA、FIA、CLIA等)、ドット・プロット法、ラテックス凝集法(LA: Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay)、イムノクロマト法などが挙げられる。抗体は基板上に固定化し用いることができる。

30

**【0032】**

この中でも、定量性の観点からEIA(Enzyme Immunoassay)法の1種であるELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法が好ましい。ELISA法では、抗体を固相化したマイクロタイタープレートのウェルに検体を添加し、抗原・抗体反応を行わせ、さらに酵素標識した抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定してサンプル中のマーカータンパク質又は部分ペプチドを検出すると共に、その測定値から検体中のタンパク質又は部分ペプチド濃度を算出することができる。また、蛍光標識した抗体を用いて、抗原・抗体反応をさせた後に蛍光を測定してもよい。抗原抗体反応は4~45、より好ましくは20~40、さらに好ましくは25~38で行うことができ、また、反応時間は、10分~18時間、より好ましくは10分~1時間、さらに好ましくは30分~1時間程度である。

40

**【0033】**

免疫学的方法において用いられるマーカータンパク質又は部分ペプチドに対する抗体は、モノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体のFab、F(ab')<sub>2</sub>等の結合活性断片を用いることもできる。

**【0034】**

本発明は上記の22種のタンパク質あるいはその部分ペプチドの1つ又は複数に対する抗体を含む、大腸がん検出用検査試薬又はキットをも包含する。

**【0035】**

50

大腸がん検出のためのバイオマーカータンパク質又はその部分ペプチドを質量分析計を用いた質量分析法により解析することもできる。質量分析法は、特に部分ペプチドの検出に適している。

【0036】

また、質量分析計を用いて検出することもできる。特に、バイオマーカータンパク質の部分ペプチドの検出には質量分析計の利用が適している。質量分析計は、試料導入部、イオン化室、分析部、検出部、記録部等を含む。イオン化法としては電子衝撃イオン化(EI)法、化学イオン化(CI)法、フィールドデソープション(FD)法、二次イオン化(SIMS)法、高速原子衝突(FAB)法、matrix-assisted laser desorption ionization(MALDI)法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法等を用いればよい。また、分析部は、二重収束質量分析計、四重極型質量分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計等が用いられる。精密な分析のために質量分析計を2台結合した、タンデム質量分析計(MS/MS)を用いることもできる。

10

【0037】

質量分析計は単独で用いられてもよいし、液体クロマトグラフィーなどの分離機器や測定機器などと接続してもよく、高速液体クロマトグラフィーと組み合わせた液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS、LC/MS/MS)で分析することができる。質量分析はペプチドの定量的検出のために当分野において広く用いられているLC/MS(LC/MS/MS)システムの、トリプル四重極型質量分析計による選択反応モニタリング(SRM: Selected reaction monitoring, SRM)または多重反応モニタリング(MRM: Multiple reaction monitoring)によって行うことができる。SRM/MRMにより、多因子を同時に測定することができ、1回の測定で数百種類のタンパク質やペプチドを同時に測定することができる。

20

【0038】

被験体から採取したサンプル中に上記バイオマーカータンパク質又は部分ペプチドが多く存在している場合、すなわち陽性である場合、該被験体は大腸がん罹患していると判断することができる。

【0039】

本発明においては、健常人から採取したサンプルを陰性対象として同時に測定してもよい。この場合、被験体が大腸がん罹患している場合、被験体の検体中のバイオマーカータンパク質又は部分ペプチド濃度が健常人に比べて上昇するので、被験体におけるバイオマーカータンパク質又は部分ペプチド濃度が健常人よりも多い場合、バイオマーカータンパク質又は部分ペプチドは陽性と判断され、被験体が大腸がん罹患していると判断することができる。サンプル中のバイオマーカータンパク質又は部分ペプチドが陽性か否かは、あらかじめSRM/MRM法で検出されたバイオマーカーペプチドのピークの面積値と内部標準である安定同位体標識ペプチドのピークの面積値の比又は抗体測定値についてカットオフ値を定めておき、該カットオフ値を基準としカットオフ値を超えた場合に、陽性であると判断することができる。

30

【0040】

カットオフ値は、例えば、ROC(receiver operating characteristic curve: 受信者動作特性曲線)解析により定めることができる。また、ROC解析により本発明の方法による診断精度(感度及び特異性)を決定することができる。ROC解析は、試料として大腸がん患者から採取した試料と健常者から採取した試料についてバイオマーカータンパク質又は部分ペプチドを測定し、各カットオフ値での感度及び偽陽性率(1 - 特異性)を算出し、横軸と1 - 特異性とし、縦軸を感度とした座標上にプロットする。

40

【0041】

本発明の方法の測定結果についてROC解析により診断精度を解析した場合の、曲線下面積(AUC: area under the curve)は0.9以上と高く、感度は70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上であり、特異性は70%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上である。本発明の方法により、非常に高い精度で初期の大腸がんを検出することができる。

50

## 【実施例】

## 【0042】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

## 【0043】

方法

大腸がん患者および健常者血清および大腸がん培養細胞

大腸がん患者51名、および健常者26名の血清(千葉大医学部にて採取)を採取した。各検体血清サンプルは、解析まで-80℃に保存しておいた。

## 【0044】

4つの大腸がん細胞株HCT116(ATCC; CCL-247), DLD-1(ATCC; CCL-221), SW480(ATCC; CCL-228) and SW620(ATCC; CCL-227)は10%牛血清(FBS)及び抗生物質含有RPMI-1640培地(Gibco Laboratories)で培養した。

## 【0045】

細胞がサブコンフルエントまで増殖するまで、各細胞は5%CO<sub>2</sub>のインキュベーターで37℃に維持したで培養し、サブコンフルエントまで増殖させた。その後、これらの培養細胞は、FBS非含有培地で洗浄し、新鮮FBS非含有培地を添加した。さらにインキュベーターで48時間培養した後に、馴化上清培地を集め、EV(extracellular vesicle)を単離用のサンプルとした。

## 【0046】

EV(extracellular vesicle:細胞外小胞)の単離

EVの単離は、超遠心法により行った。遠心管の底にショ糖緩衝剤を敷くことで、EV回収時に低密度の夾雑物を効率よく分離することができる。超遠心前の処理として、血清100μlを300gで10分間、遠心分離し、大きな夾雑物を除去した。その後、回収した上清を、0.22μmスピンフィルタ(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)に通し、100,000gで90分間、30%のショ糖/D<sub>2</sub>O緩衝剤で遠心分離を行った。緩衝剤を回収し、さらに100,000gで70分間超遠心分離機に二度かけた後、遠心管に沈殿したEV画分を回収した。

## 【0047】

EVからのタンパク質抽出及び消化

タンパク質抽出及びタンパク質消化は、相間移動溶解剤(PTS:Phase transfer surfactant)プロトコール(Masuda T et al. J. Proteome Res. 7, 731-740 (2008))により行った。EV画分タンパク質はMPEX PTS試薬キット(GL Science、日本)で溶解した後、ジチオトレイトールを終濃度5mMで加えて室温で30分間還元反応を行い、さらにヨードアセトアミドを終濃度20mMで加えてアルキル化反応を行った。

## 【0048】

その後、サンプルに1%(w/w)トリプシン(proteomics grade; Roche Mannheim, Germany)を加えて、37℃オーバーナイトで消化した。消化後、液量と等量の酢酸エチルと終濃度1%の三フルオロ酢酸を加えてボルテックスし、液中の界面活性剤を有機層に分離した。遠心分離後、ペプチドを含んでいる水相を回収し、Stage Tips(Rappsilber J. et al., Nat. Protoc. 2, 1896-1906 (2007))による脱塩を行った。

## 【0049】

液体クロマトグラフィー(LC)-質量分析計(MS/MS)及びプロテオームのデータ分析

消化されたペプチドは、C18-SCX StageTipクロマトグラフィーカラムによって7分画した。その後、LC(UltiMate3000 Nanoflow HPLC system (Dionex、サニーヴェール、CA))を連結した質量分析計(Q-Exactive (Thermo Scientific、ブレーメン、ドイツ))で分析した。サンプルの質量分析器への導入は、内径75μm長さ300mmのニードルに1.9μmのC18-AQ樹脂を封入した自作の分析カラムを用いた。LCの移動相は、緩衝液A(0.1%ギ酸及び2%アセトニトリル)及びB(0.1%ギ酸及び90%アセトニトリル)から構成される。消化されたペプチドを緩衝液Aに溶解し、トラップカラム0.075 × 20 mm, Acclaim PepMap RSLC Nano-Trap Column; Thermo Scientific)にロードした。ナノLCは280nL/分で送液され、

10

20

30

40

50

移動相は120分で5～35%Bの勾配で展開された。質量分析はFull MSスキャン(350～1800m/z、イオン積算 $3 \times 10^6$ 分解能70,000)およびMS/MSスキャン(Top10プリカーサーイオン、インジェクションタイム120ms、分解能35,000、MS/MSイオン選択閾値 $5 \times 10^4$ カウント、分離幅3.0Da)で測定した。データファイルの解析は、MaxQuantソフトウェア(Ver 1.5.1.2)により行った。検索エンジンにはAndromeda、UniProtヒトタンパク質データベースに対して、ピークリストの検索を行った。プリカーサー質量誤差範囲は7ppm、断片イオン質量誤差範囲は0.01Daに設定した。同定タンパク質およびペプチドは、リバーデータベースに対する1%未満の偽陽性率(FDR 1%>)で判定した。

【0050】

#### LC-SRM/MRM解析

LC-SRM/MRM解析は以前に報告された方法により行った(Kume, H. et al., Mol. Cell. Proteomics 13, 1471-1484 (2014); Muraoka, S. et al., J. Proteome Res. 11, 4201-4210 (2012); Narumi, R. et al., J. Proteome Res. 11, 5311-5322 (2012))。消化ペプチドは0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含む2%のアセトニトリル溶液に溶解され、その後、ナノフローLC Paradigm MS2 (Michrom BioResources, Auburn, CA)を連結したトリプル四重極質量分析計 TSQ-Vantage(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)を用いて分析した。サンプルの質量分析器への導入は、内径75 $\mu$ m長さ100mmのニードルに1.9 $\mu$ mのC18-AQ樹脂を封入した自作の分析カラムを用いた。LCの移動相は、緩衝液A(0.1%ギ酸及び2%アセトニトリル)及びB(0.1%ギ酸及び90%アセトニトリル)から構成される。消化されたペプチドを緩衝液Aに溶解し、トラップカラム0.075 x 20 mm, Acclaim PepMap RSLC Nano-Trap Column; Thermo Scientific)にロードした。ナノLCは280nL /分で送液され、移動相は60分で5～35%Bの勾配で展開された。SRMモードでの解析は以下の条件で行った(Q1 Peak Width 0.7 FWHM, Cycle time:1 sec, Collision Gass Pressure 1.8 mTorr)。衝突エネルギーはSRMトランジションごとに最適化され、各トランジションの強度はピーク時間幅5分のスケジュールモードで測定した。

【0051】

#### SI-ペプチドを用いた標的ペプチドの定量

SRMによる標的ペプチドの定量は、内部標準として標的ペプチドと同配列のStable isotope-labeled peptide (SI-ペプチド)を各検体血清から調製したEVに混合し、SRM解析により検出された内在性ペプチド/SI-ペプチドのピークエリア比(Peak Area Ratio)により算出した。標的ペプチドと同配列のSI-ペプチドのスパイク量は事前分析を実行することによって内在性ペプチドに近くなるように調整した。

【0052】

#### SRM解析によるピークエリア比率の統計分析

SRM解析により算出された各検体のPeak Area Ratioより、標的ペプチドの大腸バイオマーカーとしての評価を行うため、SRMデータの統計分析を行った。統計分析には、SPSSソフトウェア(バージョン23)(SPSS Inc., Chicago, IL)を用いた。まず、それぞれの標的ペプチド単独でのバイオマーカーとしての評価を、ROC解析(ROC: Receiver Operating Characteristic)によるAUC(AUC: Area under the Curve)の値を算出して行った。さらに、複数の標的ペプチドを組み合わせた、マルチマーカーとしての評価も行った。標的ペプチドの組み合わせにはSPSSソフトウェアを用いてロジスティック回帰モデルを作成し、評価した。モデルが有効なペプチドの組み合わせに対して、同じくROC解析により算出したAUCの値により評価した。

【0053】

#### 結果

##### CRC関連バイオマーカー候補タンパク質の探索

図1に、本件のバイオマーカー候補探索の戦略を示す。CRCバイオマーカー候補タンパク質のリストを、医学と生物学文献のPubMed Databaseから得た。検索式として、「cancer」AND「colorectal」AND「expression」を用いて、2003年から2014年のデータベース上の文献検索を行い、大腸癌関連の687のタンパク質についてCRCバイオマーカー候補とし

10

20

30

40

50

てリスト化した。候補タンパク質の選択は以下の(1)~(4)の基準により行った。

(1) ヒトCRC組織又は血液におけるタンパク質発現を、ウエスタンブロット、ELISA又は免疫組織化学によって確認している。

(2) 標的タンパク質ががんにおいて発現上昇していることが確認されている。(発現が上昇するタンパク質は発現が減少するタンパク質よりも検出が容易であるため、バイオマーカーに適している)。

(3) がんの発現及び進行に関連する標的タンパク質の分子機能が、RNAiまたは分子の過剰発現によって実験的に確認されている。

(4) 大規模な分析(例えばomics分析)で特定されただけのタンパク質は、除外した。

#### 【0054】

さらに、本発明者らは、以前臨床検体の標的プロテオミクスによって、44のCRCバイオマーカー候補タンパク質を特定していた(Kume, H. et al., Mol. Cell. Proteomics 13, 1471-1484 (2014))。これらの44のタンパク質は上記のバイオマーカー候補と合わせ、重複するタンパク質を除いた、合計725のタンパク質を、CRCバイオマーカー候補として選択した。

#### 【0055】

ショットガン・プロテオミクス解析によるEV含有バイオマーカー候補の選択

選択されたバイオマーカー候補タンパク質の中から、EVに存在するタンパク質を選択するために、血清および培養細胞上清から調製したEVを用いて、ショットガン・プロテオミクス解析によりEVタンパク質の定性解析を行った。ショットガン・プロテオミクスのワークフローを図2aに示す。

#### 【0056】

血清と細胞上清からのEVの調製は超遠心法によって行った。血清EVは、健常者、転移のない癌患者、転移のある癌患者それぞれ8人より採取した。培養細胞上清は、4つのCRC細胞(HCT116、DLD-1、SW480、SW620)から採取した。抽出したタンパク質は相関移動溶解剤(PTS)法を用いることによって消化した後、C-18 Stage SCX Tipカラムにより分画した(Masuda, T et al., J. Proteome Res. 7, 731-740 (2008); Adachi, J. et al. Anal. Chem. 88, 7899-7903 (2016))。分画サンプルをLC-MS/MSで分析し、マスケット・データベース検索により、それぞれ702(血清EV)および4749の(細胞上清EV)タンパク質を同定した。これらのEV同定タンパク質とバイオマーカー候補タンパク質の比較により、356のタンパク質が、EVタンパク質含有のバイオマーカー候補であると同定された(図2b)。

#### 【0057】

EV中に同定されたバイオマーカー候補タンパク質からのSRMターゲットペプチドの選択

候補タンパク質がバイオマーカーとして有効か検証するため、CRC患者血清から採取したEV分画のSRM解析を行った。SRM候補ペプチドは、ショットガン・プロテオミクスで特定されたペプチドから選択した。候補ペプチド選択の基準として、以下の(1)~(3)を用いた。

(1) 同定されたタンパク質はタンパク質に固有のペプチド配列であり、複数ある場合はショットガン解析において強度の高い標的を選択した。

(2) トリプシンによる切断ミスや、SRM解析に適さないアミノ酸修飾(例えば、酸化されたメチオニン等)を有するペプチドは除外した。

(3) 長すぎるペプチド(>20アミノ酸)は、安定同位体標識ペプチド(SI-ペプチド)を合成することが困難であるため、標的ペプチドから除外した。

#### 【0058】

これらの基準を満たすペプチドは、すべての同定されたペプチドの中で3316ペプチド(346のタンパク質)存在した。

#### 【0059】

次に、これらの候補からSRM標的ペプチドを選ぶために、非がんコントロールの健常者(N)プール血清(n=26)、転移のないがん患者(C)のプール血清(n=26)、転移のあるがん

10

20

30

40

50

患者(Cm)のプール血清(n=25)から調製したEV分画を用いてSRM分析を行った。ショットガン解析の結果から、ペプチドあたりに3つまたは4つのトランジション(プリカーサーイオンとプロダクトイオンの対)を選択した。SRM解析はそれぞれのプールごとに3回繰り返し測定し、ペプチドピーク面積はSkylineソフトウェアを用いて定量化した。ピーク面積がプールサンプル(N対CまたはC対Cm)の間で2倍以上有意(p<0.01)に増加した標的ペプチドをマーカー候補ペプチドとして選択した。二つ以上の候補ペプチドが検出されたタンパク質については、SRM解析でのピーク強度が高い2つのペプチドを選択した。これらの基準を考慮して、71のペプチド(46のタンパク質)を、バイオマーカー候補の標的ペプチドとして選択した(図3)。

#### 【0060】

血清EV画分における標的ペプチドのSRMによる定量

個々の患者の血清から調製したEV画分中の37バイオマーカー候補ペプチドについて、SRMによる定量解析を行った。個々のEV画分は、3つの群の患者血清(健常者(N); n=26、転移なしがん患者(C); n=26、転移ありがん患者(Cm); n=25)のグループから調製した。各検体には等量のSI-peptideを内部標準として加え、内在性の標的ペプチドに対するピーク面積比をSkylineソフトウェアを用いて算出した。それぞれの標的ペプチドについて、N、C、およびCmのグループ間での定量値の比較をt検定により行ったところ、NとCまたはCとCmの間で有意な定量値の増加が見られた(p<0.05)(図4及び図5-1、5-2、5-3、5-4、5-5及び5-6)。

#### 【0061】

標的ペプチドの統計分析によるバイオマーカーとしての評価

バイオマーカーの候補ペプチドの評価をするために、37ペプチドについてROC(Receiver Operating Characteristic、受信者動作特性)分析を行った。各候補ペプチドについて、NとCとの間およびCとCmとの間の区別を評価した。4つのペプチド(3つのタンパク質)は非常に感度が高いタンパク質(AUC>0.9、図6-1a,b)であった。そして、22のペプチドはNとCを識別するために十分に感度が高かった(0.7-0.9AUC、図7-1、7-2、7-3、7-4、7-5及び7-6)。一方、11のペプチドはCとCm(図6-2c,d)を識別するために十分に感度が高かった。

#### 【0062】

次に、候補ペプチドを組合せてマルチマーカーとしてより高い感度が得られるかどうかを、ロジスティック回帰分析により調べた。ペプチドの有意な組み合わせについては、SPSSソフトウェアを用いて評価した。2つ以上のペプチドによるロジスティック分析の結果は、マルチマーカーのROC曲線のAUCにより評価した。候補ペプチドの14の組合せについてはAUCはマーカー単独の値よりも増加し(図8-1及び8-2)、特に8つの組合せについてはAUCが0.9<であった(図9)。最も高いAUC(0.97)は、3つのペプチド(トランスフェリン受容体タンパク1、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンおよびアンジオポエチン-1)の組合せによって得られた。これらの結果は、複数のマーカーの組み合わせが大腸がんの診断の精度を改善するのに有効であることを示唆している。

#### 【0063】

広く使われている腫瘍マーカー(がん胎児性抗原CEA)と標的ペプチドの感度の比較

CEAは今日、最も広く利用されている大腸がんの血中マーカーの1つである。しかし、CEAの感度は、早期のステージ患者を見つけるのに十分ではなく、ステージ2の患者に対する感度は30%程度であることが報告されている。そこで、新たに確立した37のバイオマーカー候補とCEA比較の比較を行った。各標的ペプチドのSRM定量値のカットオフ点は、CEA特異性がほぼ100%であるため、100%の特異性に設定した。検証に用いた検体グループCに対するCEAの感度は、38.8%であった。一方、37の標的ペプチドのうち17のペプチド(12のタンパク質; Annexin A3、Annexin A4、Annexin A5、Annexin A11、Tenascin-N、Transferrin受容体タンパク1、GLUT-1、マトリックスメタロプロテインナーゼ-9、Olfactomedin-4、CD88抗原、Tripeptidyl-ペプチダーゼ1、Neutrophilゼラチナーゼ関連のlipocalin)の感度はCEAを大きく上回っていた(図10-1、10-2及び10-3)。特に、Ann

10

20

30

40

50

exin A4およびA11の3つのペプチドの感度は、80%<であった(図11)。

【産業上の利用可能性】

【0064】

本発明の方法により大腸がんを早期で検出することができる。

【配列表フリーテキスト】

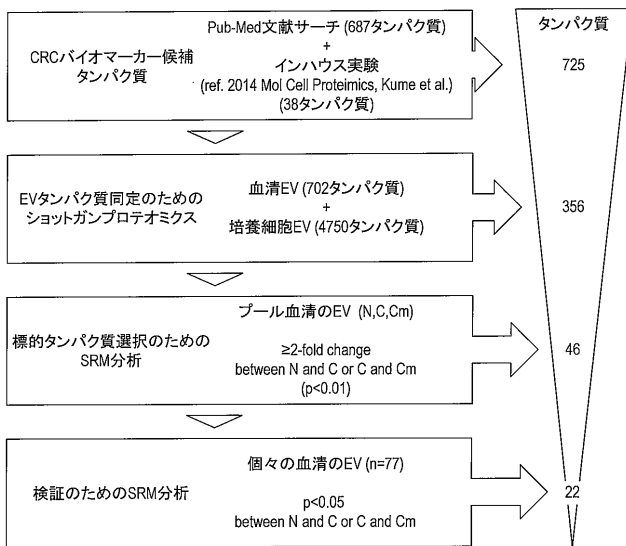
【0065】

配列番号23~59 合成

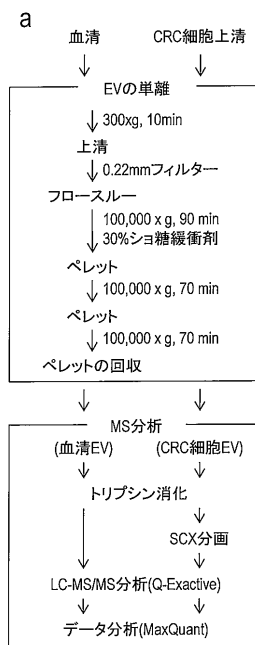
【0066】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

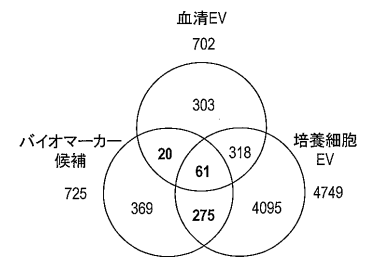
【図1】



【図2】



b



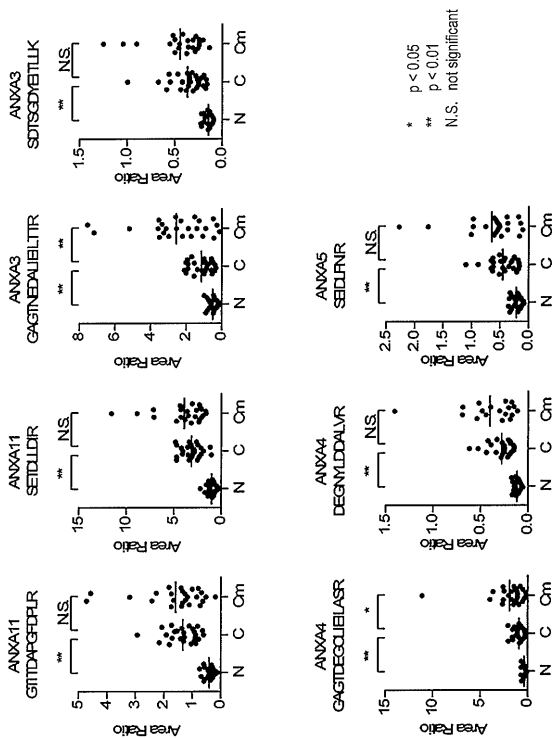
【 図 3 】

ID	タンパク質名	ペプチド1	ペプチド2
P31947	14-3-3 protein sigma	GEELSCER	YLAEVATGDDK
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	SDIDEVLVGGSTR	VLEDSDLK
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	YVGGQEHFAHLLLR	EQLGEFYALDCLR
Q15389	Angiotensin-1	LEIQLLENSLSTYK	ENLQGLVTR
P50995	Annexin A11	GTITDAPGFDPRLR	SETDLLDIR
P12429	Annexin A3	GAGTNEDALIEILTR	SDTSGDYEITLLK
P09525	Annexin A4	GAGTDEGCLIEILASR	DEGNLYDDALVR
Q8N9Q3	CD177 antigen	GGGIFSNLR	QIGIFASR
P31997	CD67 antigen	EVLLLVHNLPPQDPR	LFIPNITTK
P21730	CD88 antigen	SLPSLLR	NVLTEESVVR
P01024	Complement C3	TGLQEVVK	AAVYHFISDGWR
P02748	Complement component C9	AIEDYINEFSVR	LSPIYLVVVK
P27487	Dipeptidyl peptidase 4	EGGFLHLTLR	IQLSDYTK
P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	DFVLHPR	FIDEELFGQTHQELK
P55060	Exportin-2	TGNIPALVR	SANVNEFPVLR
P49327	Fatty acid synthase	EGGFLHLTLR	FPQLDSTSFANSR
P11166	GLUT-1	VITILELFR	TFDEIASGFR
P62993	Growth factor receptor-bound protein 2	YFLWVVK	NQQIFLR
P04792	Heat shock protein beta-1	QDEHGYISR	DGVVEITGK
P14780	Matrix metalloproteinase-9	QSTLVLPFGDLR	FQTFEGDLK
Q9HC84	Mucin-5B	VGCLCGNFDDNAINDFATR	AAGGAVCEQPLGLECR
P31949	Protein S100-A11	DGYNNTLSK	CIESLIAVFK
P08702	Protein S100-A9	LGHPTLNLQGEFK	DLQNLK
Q9UQP3	Tenascin-N	AQTEIDGPK	EEQNIIFR
P02786	Transferrin receptor protein 1	LLNENSYVPR	VSASPLYLTLEK
P08758	Annexin A5	SEIDLFNIR	
Q15717	ELAV-like protein 1	NVALLSPLYHSPAR	
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	LFIFETFCR	
Q96PY5	Formin-like protein 2	VEELEENISLSEK	
P06396	Gelsolin	EVQGFEASFLGYFK	
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	NALESYTYNIK	
P05362	Intercellular adhesion molecule 1	VELEAPLPSWQPVGK	
P50579	Methionine aminopeptidase 2	HLLNVINENFGTLAFCR	
Q15427	Monocarboxylate transporter 4	AVSVFEK	
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	GPAGDATVASEK	
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	ELTSELK	
C00592	Podocalyxin	ATFNPAQDK	
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	PFGVALLFGGVDEK	
P06109	Protein S100-A8	ALNSIDIVYHK	
P00352	Retinal dehydrogenase 1	TIPIDGNFFTYTR	
P36952	Serpin B5	ELETVDFK	
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	FNILGTHTK	
P24557	Thromboxane-A synthase	EAQQDCEVLGQR	
Q14773	Tripeptidyl-peptidase 1	LFGGNFAHQASVAR	
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	DSLIFLVDASK	
Q6UX06	Olfactomedin-4	VQSINYNPFQDK	

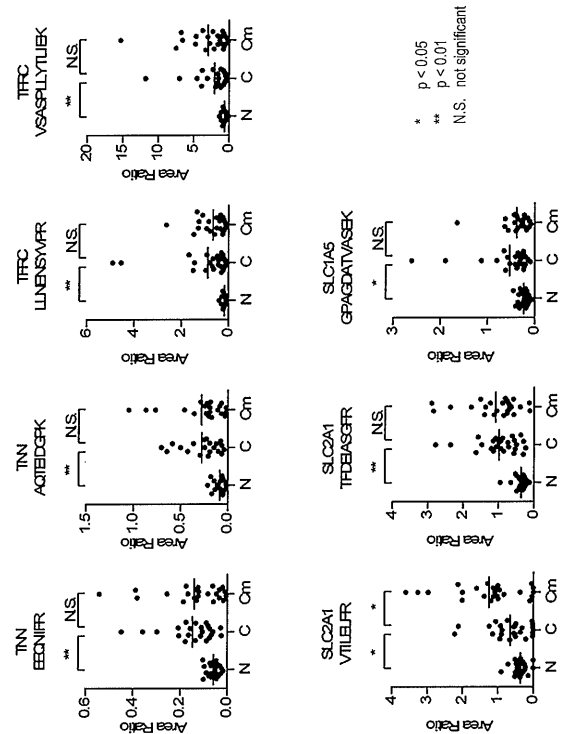
【 図 4 】

	タンパク質名	アクセッション	p-Value		AUC		
			N vs C	C vs Cm	N and C	C and Cm	
1	Annexin A11	P50995	GTITDAPGFDPRLR SETDLLDIR	P<0.01 P<0.01	N.S. N.S.	0.99 0.97	0.53 0.54
2	Annexin A3	P12429	GAGTNEDALIEILTR SDTSGDYEITLLK	P<0.01 P<0.01	P<0.01 N.S.	0.84 0.95	0.75 0.58
3	Annexin A4	P09525	GAGTDEGCLIEILASR DEGNLYDDALVR	P<0.01 P<0.01	P<0.05 N.S.	0.82 0.96	0.70 0.60
4	Tenascin-N	Q9UQP3	EEQNIIFR	P<0.01	N.S.	0.85	0.57
5	Transferrin receptor protein 1	P02786	AQTEIDGPK LLNENSYVPR VSASPLYLTLEK	P<0.01 P<0.01 P<0.01	N.S. N.S. N.S.	0.85 0.85 0.74	0.50 0.50 0.61
6	GLUT-1	P11166	VITILELFR	P<0.05	P<0.05	0.67	0.71
7	Complement component C9	P02748	TFDEIASGFR LSPIYLVVVK AIEDYINEFSVR	P<0.01 P<0.05 P<0.05	N.S. P<0.05 N.S.	0.88 0.81 0.74	0.53 0.64 0.63
8	CD88 antigen	P21730	SLPSLLR NVLTEESVVR	P<0.05 P<0.01	N.S. P<0.01	0.71 0.78	0.59 0.71
9	78 kDa glucose-regulated protein	P11021	VLEDSDLK SDIDEVLVGGSTR	P<0.01 P<0.05	P<0.05 P<0.01	0.74 0.71	0.63 0.72
10	Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763	YVGGQEHFAHLLLR EQLGEFYALDCLR	N.S. N.S.	P<0.05 P<0.05	0.51 0.60	0.70 0.62
11	Matrix metalloproteinase-9	P14780	QSTLVLPFGDLR FQTFEGDLK	N.S. P<0.01	P<0.01 N.S.	0.59 0.87	0.72 0.52
12	Angiotensin-1	Q15389	LEIQLLENSLSTYK ENLQGLVTR	N.S. P<0.01	P<0.05 N.S.	0.55 0.77	0.68 0.53
13	CD67 antigen	P31997	EVLLLVHNLPPQDPR LFIPNITTK	N.S. P<0.01	P<0.01 P<0.01	0.56 0.70	0.63 0.70
14	Mucin-5B	Q9HC84	AAGGAVCEQPLGLECR VCCLCGNFDDNAINDFATR	N.S. N.S.	P<0.05 P<0.01	0.61 0.64	0.67 0.85
15	Adapter protein GRB2	P62993	YFLWVVK NQQIFLR	N.S. P<0.01	N.S. N.S.	0.51 0.74	0.68 0.56
16	Annexin A5	P08758	SEIDLFNIR	P<0.01	N.S.	0.84	0.61
17	Olfactomedin-4	Q6UX06	VQSINYNPFQDK	P<0.01	N.S.	0.78	0.50
18	Neutral amino acid transporter B(0)	Q15758	GPAGDATVASEK	P<0.05	N.S.	0.77	0.55
19	Tripeptidyl-peptidase 1	Q14773	LFGGNFAHQASVAR	P<0.01	P<0.05	0.72	0.65
20	Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	NALESYTYNIK	P<0.05	N.S.	0.53	0.64
21	Proteasome subunit alpha type-5	P28066	PFGVALLFGGVDEK	N.S.	P<0.05	0.63	0.71
22	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188	ELTSELK	P<0.01	N.S.	0.78	0.53

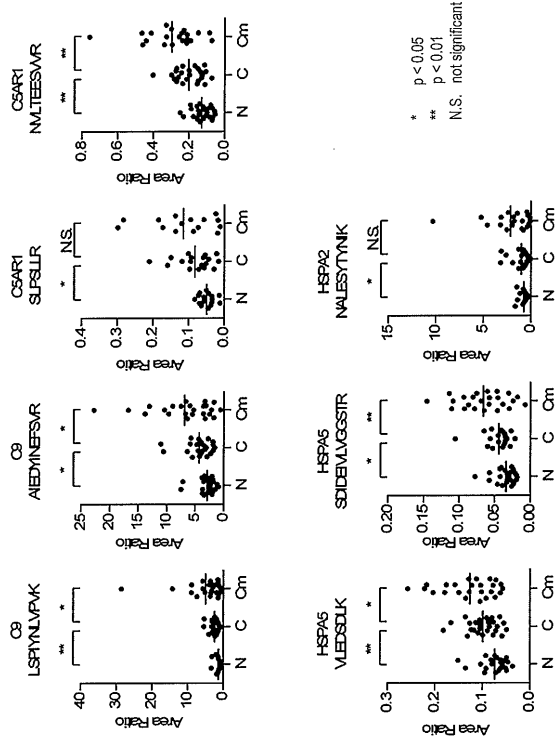
【 図 5 - 1 】



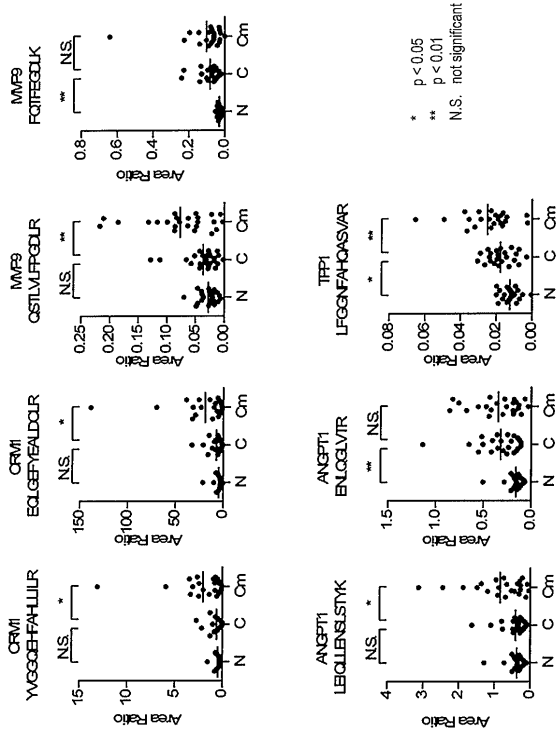
【 図 5 - 2 】



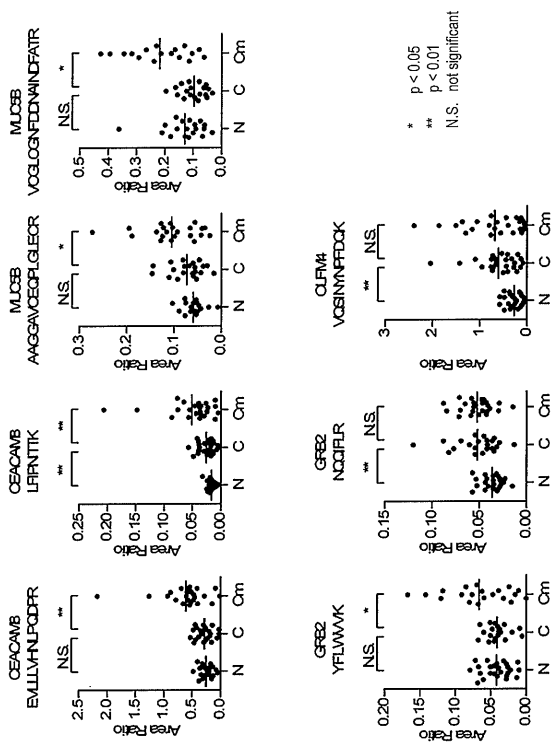
【 5 - 3 】



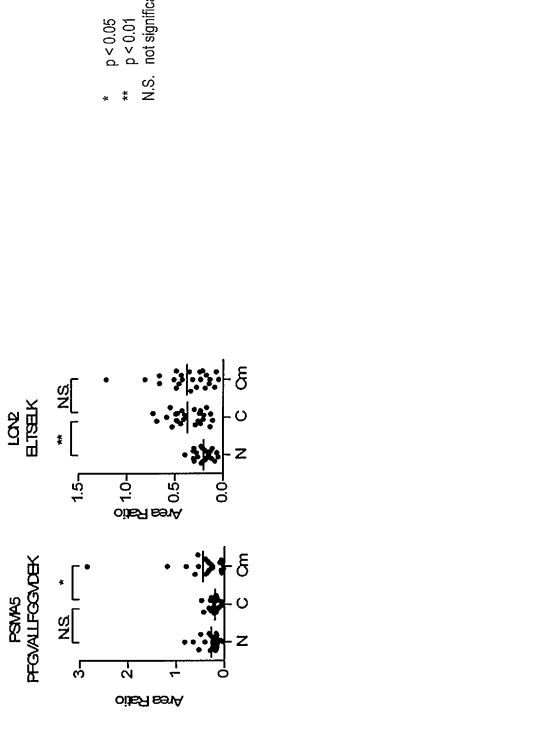
【 5 - 4 】



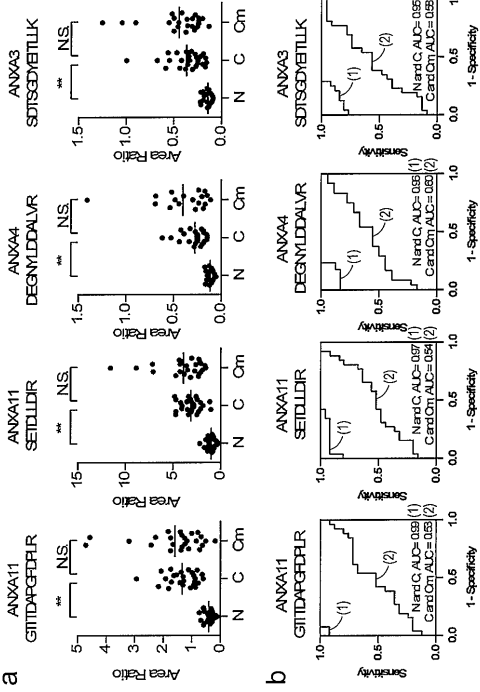
【 5 - 5 】



【 5 - 6 】

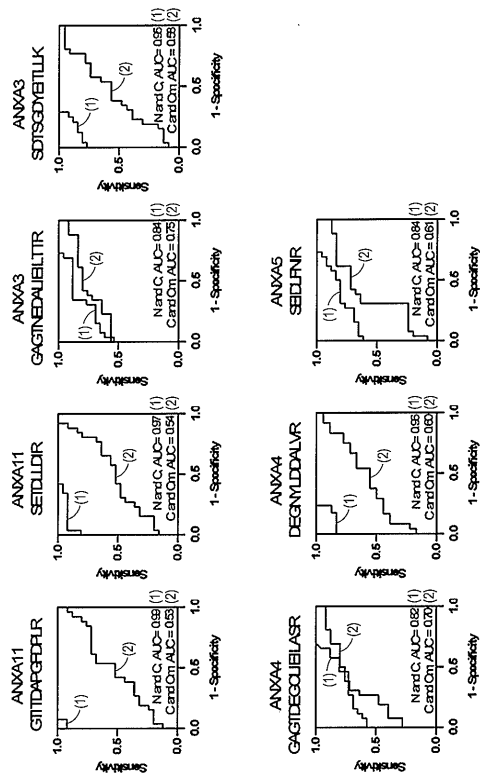


【 ☒ 6 - 1 】

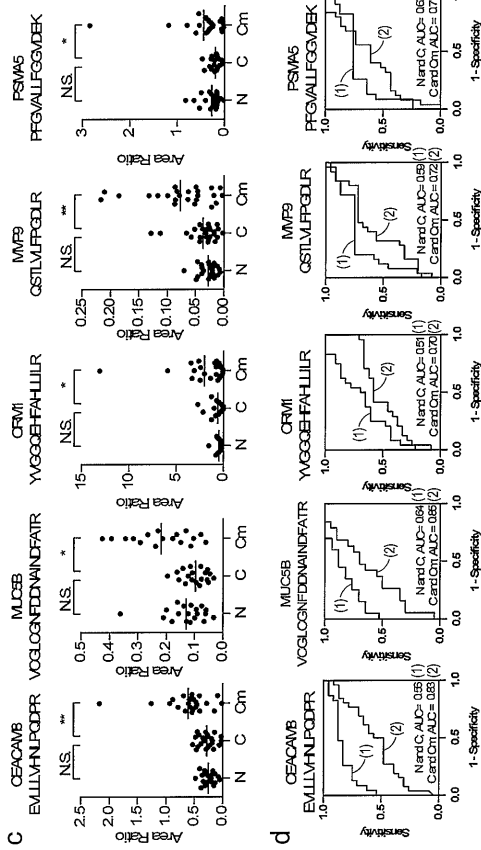


\* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 N.S. not significant

【 ☒ 7 - 1 】

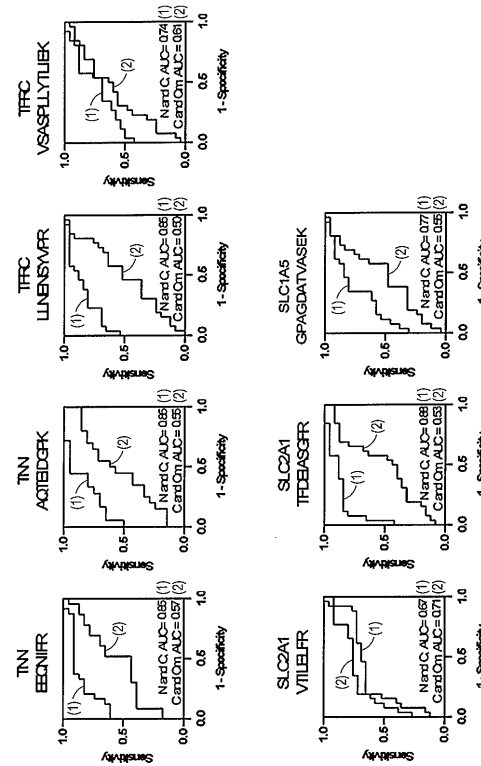


【 ☒ 6 - 2 】

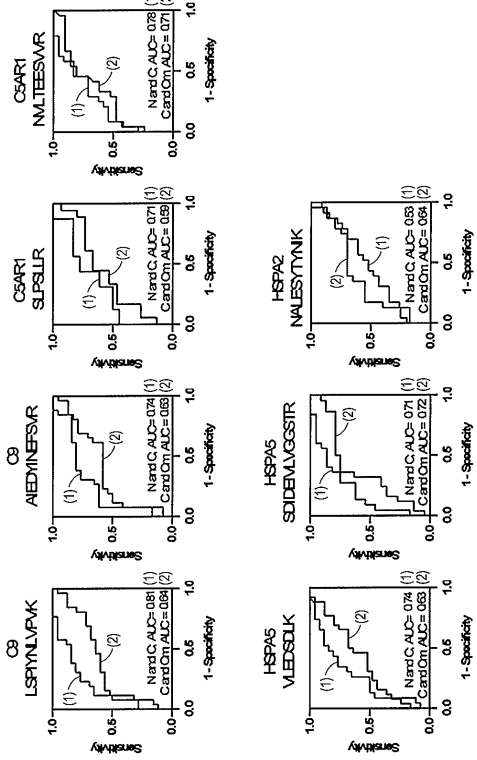


\* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 N.S. not significant

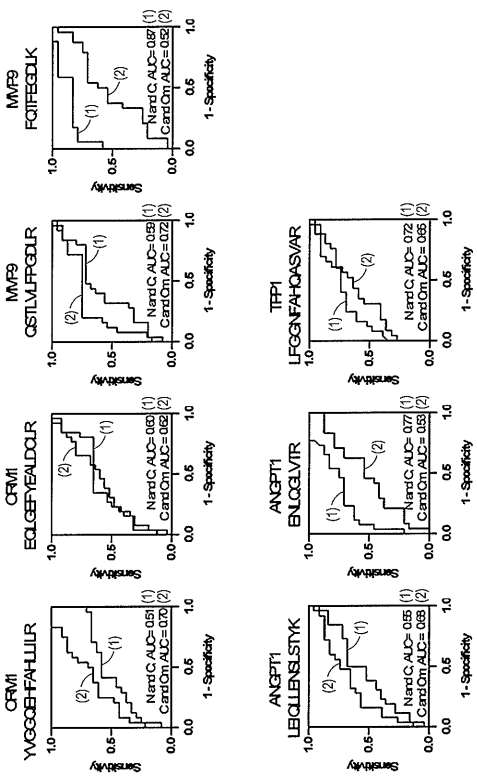
【 ☒ 7 - 2 】



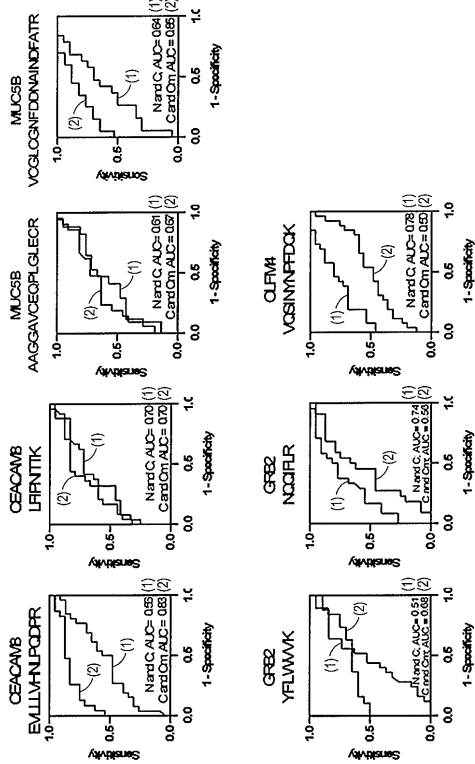
【 7 - 3 】



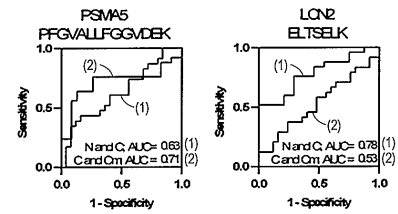
【 7 - 4 】



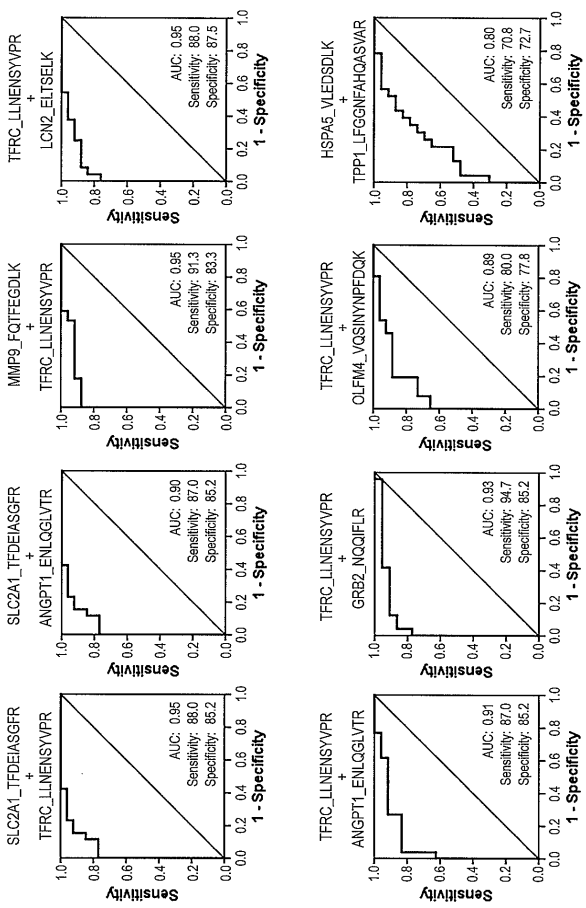
【 7 - 5 】



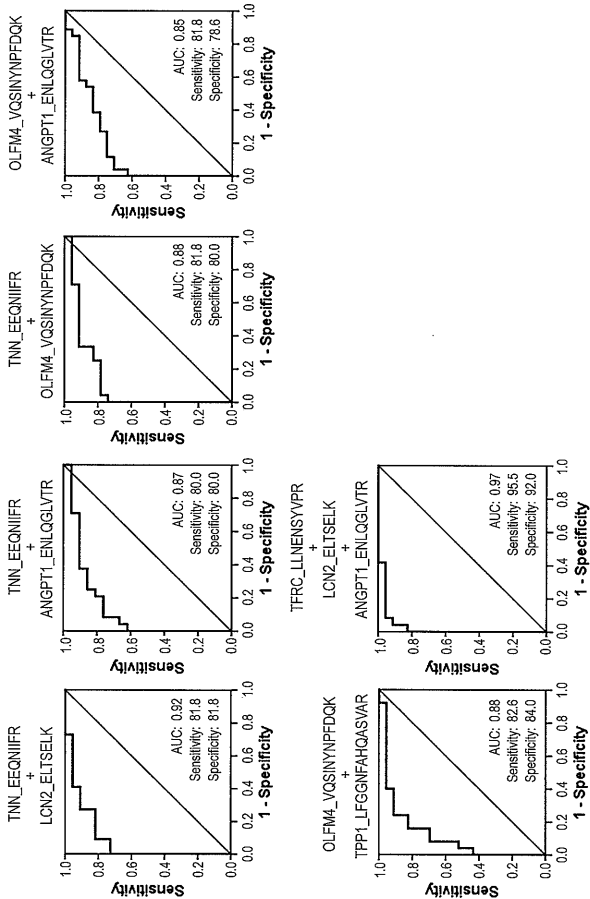
【 7 - 6 】



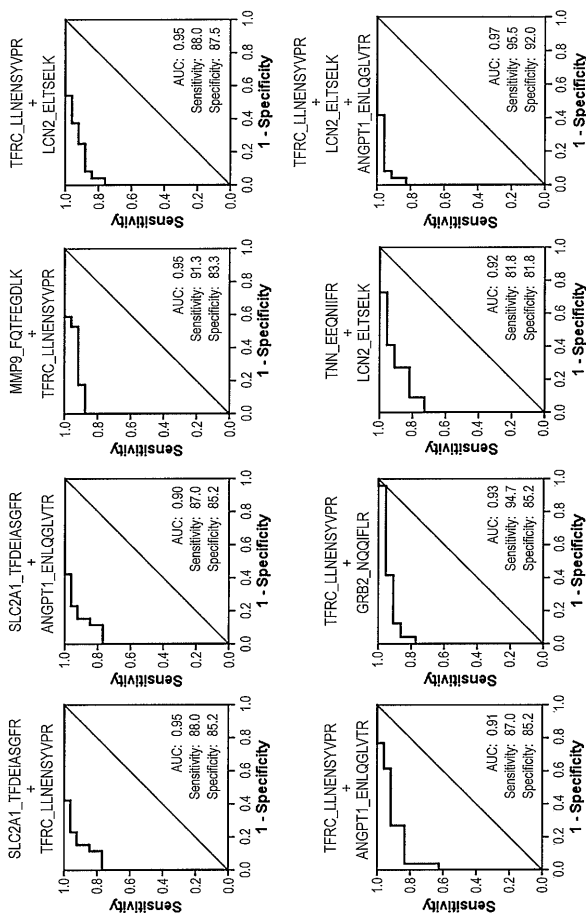
【 8 - 1 】



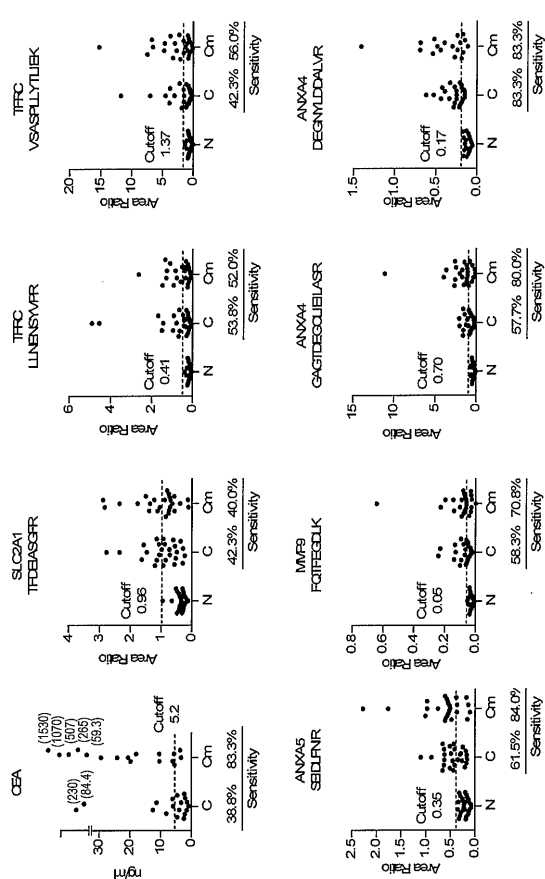
【 8 - 2 】



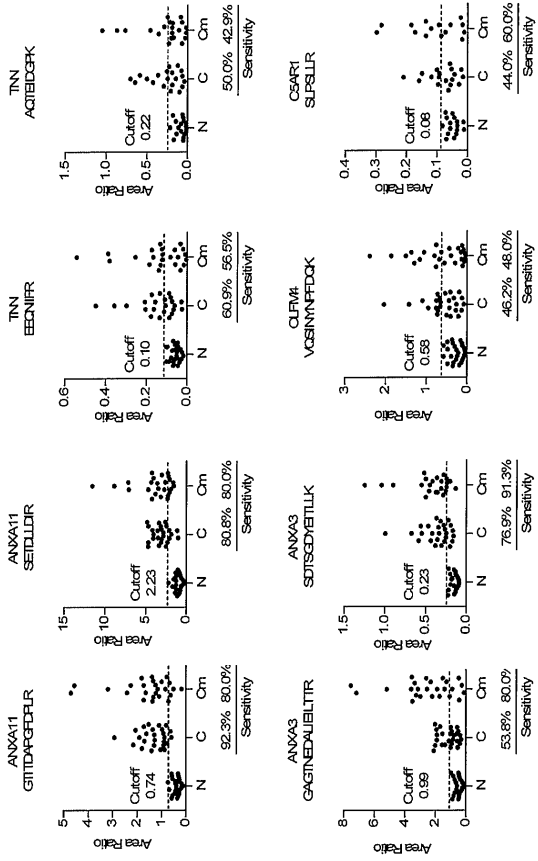
【 6 】



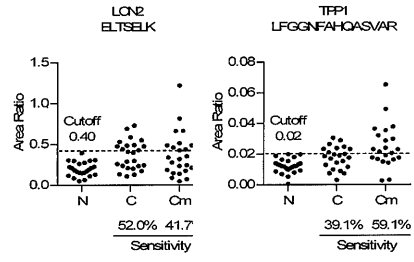
【 10 - 1 】



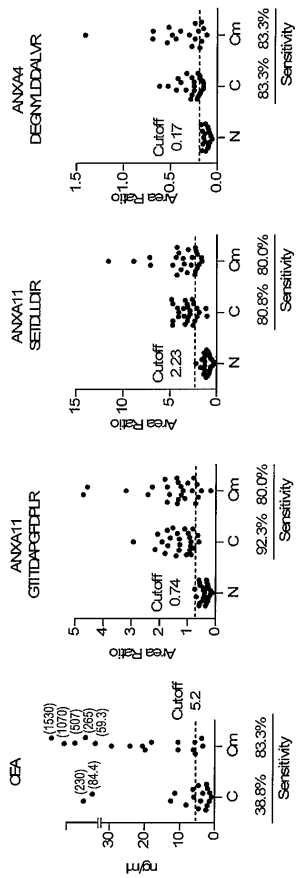
【 ☒ 1 0 - 2 】



【 ☒ 1 0 - 3 】



【 ☒ 1 1 】



【配列表】

2019004430000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/024806
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. G01N33/68, C07K14/47, C07K14/705, C12N9/64, G01N33/53, G01N33/574 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/0188883 A1 (MURRAY, GI et al.) 24 August 2006, abstract, claims 1, 40, table 2 & WO 2004/079368 A2 & EP 1601969 A2	1-15
A	US 2015/0141273 A1 (BOSCH, LJW et al.) 21 March 2015, claims 1, 58, tables & WO 2013/162368 A1 & EP 2841947 A1	1-15
A	GURLULER, E. et al., "Serum annexin A2 levels in patients with colon cancer in comparison to healthy controls and in relation to tumor pathology", Med Sci Monit., 2014, 20, 1801-1807	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 September 2018 (12.09.2018)		Date of mailing of the international search report 25 September 2018 (25.09.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/024806

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YU, J. et al., "High-throughput proteomics integrated with gene microarray for discovery of colorectal cancer potential biomarkers", ONCOTARGET, 20 September 2016, vol. 7, no. 46, 75279-75292	1-15
X	DUNCAN, R. et al., "Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer", BRITISH JOURNAL OF CANCER, 2008, 98(2), 426-433	1-9, 11-12, 14-15
Y		10
A		13
Y	JP 2013-130477 A (SHIMADZU CORPORATION) 04 July 2013, claims & US 2013/0165340 A1 (claims)	10
A	JP 2008-545634 A (PROTEOSYS AG) 18 December 2008, claims & US 2008/0200385 A1 (claims) & WO 2006/125580 A1 & EP 1724585 A1	13
P, X	SHIROMIZU, T. et al., "Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics", SCIENTIFIC REPORTS, 06 October 2017, 7: 12782, 1-13	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/024806

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims 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.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: US 2006/0188883 A1 (MURRAY, GI et al.) 24 August 2006, abstract, claims 1, 40, table 2 & WO 2004/079368 A2 & EP 1601969 A2

Document 2: US 2015/0141273 A1 (BOSCH, LJW et al.) 21 May 2015, claims 1, 58, tables & WO 2013/162368 A1 & EP 2841947 A1

Document 3: GURLULER, E. et al., "Serum annexin A2 levels in patients with colon cancer in comparison to healthy controls and in relation to tumor pathology", Med Sci Monit., 2014, 20, 1801-1807

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.: Invention in claims 1-15 in which annexin A11 is selected

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/024806

Document 4: YU, J. et al., "High-throughput proteomics integrated with gene microarray for discovery of colorectal cancer potential biomarkers", ONCOTARGET, 20 September 2016, Vol. 7, No. 46, 75279-75292

Document 5: DUNCAN, R. et al., "Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer", BRITISH JOURNAL OF CANCER, 2008, 98(2), 426-433

(Invention 1) 1. Invention in claims 1-15 in which annexin A11 is selected  
Documents 1-5 disclose a biomarker including annexin, and this feature is not recognized to be a special technical feature. In addition, it is also not recognized that annexins A11, A3, and A4 have properties or structurally remarkable parts that are more in common with each other than other annexins. Thus, biomarkers 1-22 in claim 1 are not considered to comprise a single chemical substance group, and the invention in claims 1-15 in which 1. annexin A11, which is the first option, is selected is classified as invention 1, and the inventions in claims 1-15 in which the markers below are respectively selected are classified as inventions 2-22.

(Invention 2) 2. Invention in claims 1-15 in which annexin A3 is selected

(Invention 3) 3. 2. Invention in claims 1-15 in which annexin A4 is selected

(Invention 4) 4. 2. Invention in claims 1-15 in which annexin-N

(Invention 5) 5. Invention in claims 1-15 in which transferrin receptor protein 1 is selected

(Invention 6) 6. Invention in claims 1-15 in which glucose transporter 1 is selected

(Invention 7) 7. Invention in claims 1-15 in which complement component C9 is selected

(Invention 8) 8. Invention in claims 1-15 in which CD 88 antigen is selected

(Invention 9) 9. Invention in claims 1-15 in which 78 kDa glucose-regulated protein is selected

(Invention 10) 10. Invention in claims 1-15 in which  $\alpha$ -1-acid glycoprotein is selected

(Invention 11) 11. Invention in claims 1-15 in which matrix metalloprotease 9 is selected

(Invention 12) 12. Invention in claims 1-15 in which angiotensin-1 is selected

(Invention 13) 13. Invention in claims 1-15 in which CD67 antigen is selected

(Invention 14) 14. Invention in claims 1-15 in which mucin-5B is selected

(Invention 15) 15. Invention in claims 1-15 in which adaptor protein GRB2 is selected

(Invention 16) 16. Invention in claims 1-15 in which annexin A5 is selected

(Invention 17) 17. Invention in claims 1-15 in which olfactomedin-4 is selected

(Invention 18) 18. Invention in claims 1-15 in which neutral amino acid transporter is selected

(Invention 19) 19. Invention in claims 1-15 in which tripeptidyl peptidase 1 is selected

(Invention 20) 20. Invention in claims 1-15 in which heat shock-related 70 kDa protein 2 is selected

(Invention 21) 21. Invention in claims 1-15 in which proteasome subunit  $\alpha$  type-5 is selected

(Invention 22) 22. Invention in claims 1-15 in which neutrophil gelatinase-related lipocalin is selected

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 4 8 0 6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i		
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. G01N33/68, C07K14/47, C07K14/705, C12N9/64, G01N33/53, G01N33/574		
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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 請求項の番号
A	US 2006/0188883 A1 (MURRAY, GI et al.) 2006.08.24, ABSTRACT, Claims 1, 40, TABLE 2 & WO 2004/079368 A2 & EP 1601969 A2	1-15
A	US 2015/0141273 A1 (BOSCH, LJW et al.) 2015.03.21, Claims 1, 58, TABLES & WO 2013/162368 A1 & EP 2841947 A1	1-15
A	GURLULER, E et al., Serum annexin A2 levels in patients with colon cancer in comparison to healthy controls and in relation to tumor pathology, Med Sci Monit., 2014, 20, 1801-1807	1-15
<input checked="" 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 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 12.09.2018	国際調査報告の発送日 25.09.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3316

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 4 8 0 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 請求項の番号
A	YU, J et al., High-throughput proteomics integrated with gene microarray for discovery of colorectal cancer potential biomarkers, ONCOTARGET, 2016.09.20, Vol. 7, No. 46, 75279-75292	1-15
X	DUNCAN, R et al., Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer, BRITISH JOURNAL OF CANCER, 2008, 98(2), 426-433	1-9, 11-12, 14 -15
Y		10
A		13
Y	JP 2013-130477 A (株式会社島津製作所) 2013.07.04, 特許請求の範囲 & US 2013/0165340 A1(特許請求の範囲)	10
A	JP 2008-545634 A (プロテオジス アクチェンゲゼルシャフト) 2008.12.18, 特許請求の範囲 & US 2008/0200385 A1(特許請求の範囲) & WO 2006/125580 A1 & EP 1724585 A1	13
P, X	SHIROMIZU, T et al., Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics, SCIENTIFIC REPORTS, 2017.10.06, 7:12782, 1-13	1-15

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 4 8 0 6

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1: US 2006/0188883 A1 (MURRAY, GI et al.) 2006.08.24, ABSTRACT, Claims 1, 40, TABLE 2 & WO 2004/079368 A2 & EP 1601969 A2

文献2: US 2015/0141273 A1 (BOSCH, LJW et al.) 2015.05.21, Claims 1, 58, TABLES & WO 2013/162368 A1 & EP 2841947 A1

文献3: GURLULER, E et al., Serum annexin A2 levels in patients with colon cancer in comparison to healthy controls and in relation to tumor pathology, Med Sci Monit., 2014, 20, 1801-1807

(特別ページに続く)

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項1-15のうち、アネキシンA11を選択した発明

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2015年1月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 4 8 0 6

## 第 III 欄の続き

文献 4 : YU, J et al., High-throughput proteomics integrated with gene microarray for discovery of colorectal cancer potential biomarkers, ONCOTARGET, 2016.09.20, Vol. 7, No. 46, 75279-75292

文献 5 : DUNCAN, R et al., Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer, BRITISH JOURNAL OF CANCER, 2008, 98(2), 426-433

(発明 1) 1. アネキシン A11 を選択した請求項 1-15 に係る発明  
文献 1-5 には、アネキシンを含む大腸がんバイオマーカーが記載されており、この点は、特別な技術的特徴とは認められない。また、アネキシン A11、A3、A4 の間に、他のアネキシンに比した共通の性質や、構造的に顕著な部分が共通しているとも認められない。よって、請求項 1 の 1~22 の各バイオマーカーは、一群の化学物質群として認識されず、最初の選択肢である、1. アネキシン A11 を選択した請求項 1-15 に係る発明を、発明 1 に区分すると共に、下記の各マーカーを選択した請求項 1-15 に係る発明を、発明 2-22 に区分する。

- (発明 2) 2. アネキシン A3 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 3) 3. アネキシン A4 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 4) 4. テネイシン-N を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 5) 5. トランスフェリン受容体タンパク質 1 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 6) 6. グルコーストランスポーター 1 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 7) 7. 補体成分 C9 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 8) 8. CD88 抗原を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 9) 9. 78kDa グルコース制御タンパク質を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 10) 10.  $\alpha$ -1-酸性グリコプロテインを選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 11) 11. マトリックスメタロプロテアーゼ 9 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 12) 12. アンジオポエチン-1 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 13) 13. CD67 抗原を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 14) 14. ムチン-5B を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 15) 15. アダプタータンパク質 GRB2 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 16) 16. アネキシン A5 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 17) 17. オルファクトメジン-4 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 18) 18. 中性アミノ酸トランスポーター-B(0)を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 19) 19. トリペプチジルペプチダーゼ 1 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 20) 20. 熱ショック関連 70kDa タンパク質 2 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 21) 21. プロテアソームサブユニット  $\alpha$  タイプ-5 を選択した請求項 1-15 に係る発明
- (発明 22) 22. 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンを選択した請求項 1-15 に係る発明

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
G 0 1 N 27/62 V

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

(72) 発明者 白水 崇

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 6 番 8 号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内

F ターム(参考) 2G041 CA01 DA04 DA05 DA09 DA13 DA16 EA04 FA12 GA03 GA05  
GA06 GA09 HA01 LA08  
2G045 AA26 CB01 DA20 DA36 DA44

(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)	用于检测结直肠癌的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2019004430A1</a>	公开(公告)日	2020-05-21
申请号	JP2019527058	申请日	2018-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 デンカ生研株式会社		
[标]发明人	朝長毅 白水崇		
发明人	朝長毅 白水崇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/573 G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/705 C12N9/64 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68 G01N33/57419 G01N33/6848		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/574.A G01N33/573.A G01N33/53.D G01N33/53.V G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/DA05 2G041/DA09 2G041/DA13 2G041/DA16 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/GA03 2G041/GA05 2G041/GA06 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/LA08 2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA44		
优先权	2017129941 2017-06-30 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供用于大肠癌早期检测的生物标志物。用于检测结直肠癌的结直肠癌生物标志物，由以下22种1-22中的蛋白质中的至少一种或1-22中蛋白质的部分肽中的至少一种构成。2. 2. Annexin A3; 3. Annexin A4; 4. Tenascin-N; 5. 转铁蛋白受体蛋白1; 6. 葡萄糖转运蛋白1; 7. 补体成分C9; 8. CD88抗原; 9. 78kDa葡萄糖调节蛋白; 10 α-1-酸糖蛋白; 11. 基质金属蛋白酶9; 12. 血管生成素-1; 13. CD67抗原; 14. 粘蛋白5B; 15. 衔接蛋白GRB2; 16. 膜联蛋白A5; 17. 嗅觉素- 4; 18. 中性氨基酸转运蛋白B ( 0 ) ; 19. 三肽基肽酶1; 20. 热休克相关的70 kDa蛋白2; 21. 蛋白酶体亚基α-5型; 或22. 中性粒细胞明胶酶相关的脂蛋白。

(19) 日本国特許庁 (JP)	<b>再公表特許(A1)</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO2019/004430</b>
発行日 令和2年5月21日 (2020. 5. 21)	(43) 国際公開日 平成31年1月3日 (2019. 1. 3)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G01N 33/68 (2006. 01)</b>	G01N 33/68 ZNA	2G041
<b>G01N 33/574 (2006. 01)</b>	G01N 33/574 A	2G045
<b>G01N 33/573 (2006. 01)</b>	G01N 33/573 A	
<b>G01N 33/53 (2006. 01)</b>	G01N 33/53 D	
<b>G01N 27/62 (2006. 01)</b>	G01N 33/53 V	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2019-527058 (P2019-527058)	(71) 出願人 505314022	
(2) 国際出願番号 PCT/JP2018/024806	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所	
(2) 国際出願日 平成30年6月29日 (2018. 6. 29)	大阪府茨木市彰部あさぎ7丁目6番8号	
(31) 優先権主張番号 特願2017-129941 (P2017-129941)	(71) 出願人 591125371	
(32) 優先日 平成29年6月30日 (2017. 6. 30)	デンカ生研株式会社	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 110002572	
	(74) 代理人 110002572	
	特許業務法人平本国際特許事務所	
	(72) 発明者 朝長毅	
	大阪府茨木市彰部あさぎ7丁目6番8号	
	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 大腸がんを検出するためのバイオマーカー