

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-20930
(P2014-20930A)

(43) 公開日 平成26年2月3日(2014.2.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 K	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 H O 4 5
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-159927 (P2012-159927)
(22) 出願日 平成24年7月18日 (2012.7.18)

(71) 出願人 504160781
国立大学法人金沢大学
石川県金沢市角間町ヌ7番地
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72) 発明者 金子 周一
石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内
(72) 発明者 酒井 佳夫
石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵癌診断及び治療効果予測判定バイオマーカー

(57) 【要約】

【課題】本発明は、膵癌検出、膵癌の治療方法決定、膵癌の予後予測のための特異的マーカーの提供を目的とする。

【解決手段】本発明は、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子の発現を測定することを含む、膵癌を検出し、膵癌の治療方法を決定し、又は膵癌の予後を予測するための検査方法である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定する工程を含む、膵癌を検出するための検査方法。

【請求項 2】

被験体の末梢血液からCD4陽性細胞を単離する工程、及び単離したCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を検出する工程を含み、CD4陽性細胞におけるPD-1の発現が健常人に対して上昇している場合に被験体が膵癌に罹患していると判断される、請求項 1 記載の検査方法。

【請求項 3】

CD4陽性細胞におけるPD-1の発現レベルを、CD4陽性細胞中のPD-1を発現している細胞の存在割合で判断する、請求項 1 又は 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】

CD4陽性細胞におけるPD-1の発現が、フローサイトメトリーによる発現しているPD-1の測定又はCD4陽性細胞中のPD-1のmRNAの測定により検出される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

【請求項 5】

末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現に加え、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるcEBPファミリーに属する遺伝子の発現を測定することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

【請求項 6】

末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定することを含む、膵癌の治療方法を選択するための検査方法。

【請求項 7】

末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定することを含む、膵癌の予後予測を行うための検査方法。

【請求項 8】

PD-1遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを含む、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定して膵癌を検出し、膵癌の治療方法を選択し、又は膵癌の予後予測を行うための検査試薬。

【請求項 9】

さらに、cEBPファミリーに属する遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを含む、請求項 8 記載の検査試薬。

【請求項 10】

抗PD-1抗体を含む、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定して膵癌を検出し、膵癌の治療方法を選択し、又は膵癌の予後予測を行うための検査試薬。

【請求項 11】

さらに、cEBPファミリーに属するタンパク質に対する抗体を含む、請求項 10 記載の検査試薬。

【請求項 12】

PD-1からなる、膵癌を検出するための診断用マーカー。

【請求項 13】

cEBPファミリーメンバーからなる、膵癌を検出するための診断用マーカー。

【請求項 14】

PD-1を発現しているCD4陽性細胞を、膵癌治療候補薬剤と接触させて、PD-1の発現レベルが低下した場合に、該候補薬剤を膵癌治療用薬剤として選択する、膵癌治療薬の選択方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は膵癌を特異的に検出し又は膵癌の治療効果を予測するためのバイオマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

膵癌は難治性癌の一つであり、外科的手術以外の有効な治療法は確立されておらず、早期治療が重要となる。膵癌は、検出の難しい癌であり（5年後生存率：5.3%）、日本では、年間22,000人を超える方が膵癌で亡くなっている。近年、死亡率は上昇傾向にあり、早期発見、および、治療法の改善が急務である。

【0003】

従来、膵癌のマーカーとして、CA19-9、DUPAN-2、Span-1、エラスターゼ1、CEA等が用いられている。また、腫瘍細胞に特異的に発現している遺伝子に基づいて、膵癌を検出可能な膵癌検出用マーカーが開発されている（特許文献1、2及び3を参照）。CA19-9は、膵癌以外では進行した消化器系癌（胃癌や大腸癌）、胆嚢癌、胆管癌などの胆道癌で特に高値になるケースが多い。DUPAN-2は膵癌や胆嚢癌、胆管癌、肝臓癌などで高い陽性率を示す。Span-1は良性疾患に有用な指標とされる。エラスターゼ1は進行癌では正常値ないし低値を示す傾向にある。また、CEAは膵癌以外にも大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌などで数値の上昇がみられる。このように、従来用いられていたマーカーで膵癌を検出しようとした場合、特異性は必ずしも高くなく、また感度も十分ではなかった。

10

【0004】

一般的なT細胞におけるアネルギーは、T細胞受容体の刺激が補助刺激分子(co-stimulatory molecule)の不十分な刺激と共に与えられるときに起こることが知られている。CD279は、補助刺激分子でありPD-1(programmed death-1)としても知られる、55 kDaの免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質であり、主に活性化Tリンパ球に発現している。PD-1 (CD279) 及びそのリガンドであるPD-L1間の相互作用により、T細胞受容体媒介増殖が減少し、癌細胞による免疫回避現象が発生すると考えられる。PD-1及びPD-L1が関与する免疫回避経路をPD-1/PD-L1免疫抑制経路と呼ぶ。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2004-248585号公報

30

【特許文献2】特開2004-248575号公報

【特許文献3】特開2007-051880号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、従来膵癌の検出用マーカーとして用いられていたマーカーよりも、膵癌を特異的に検出することができ、さらに、膵癌の早期検出、及び、治療効果の予測を可能とするバイオマーカーの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、高感度で特異的に膵癌を検出し得る新たなマーカーの開発を試み、膵癌患者において、健常人や他の癌患者に対して、発現が変化している遺伝子を探索しようとする包括的遺伝子発現の差異を調べた。その結果、本発明者は、末梢血液のリンパ球に多く認められるCD4陽性細胞の内、上記のPD-1 (CD279) を発現している、CD4陽性かつPD-1 (CD279) 陽性細胞が、膵癌患者末梢血液に増加していることを見出した。

40

【0008】

本発明者は、また、膵癌患者の中でもCD4陽性かつPD-1 (CD279) 陽性細胞の割合が増加していない患者では、抗癌剤であるゲムシタビン (Gemcitabine) による化学療法の高い奏功率が期待されることも発見し、この細胞集団の割合による化学療法の効果予測因子の可能性となることを見出した。

50

【 0 0 0 9 】

さらに、膵癌患者の臨床背景を確認したところ、CD4陽性かつPD-1 (CD279) 陽性細胞の割合が増加している膵癌患者では、予後が極めて厳しい可能性が示唆されるデータを得た。このことは、PD-1の発現レベルに応じ、患者ごとに膵癌の適切な治療方法を選択することができる可能性を意味する。

【 0 0 1 0 】

上記より、CD4陽性かつPD-1 (CD279) 陽性細胞の割合は膵癌患者のバイオマーカーとして有用であることを見出した。

【 0 0 1 1 】

さらに、本発明者は、膵癌患者のCD4陽性細胞での遺伝子発現を網羅的に調べ、遺伝子群のネットワークを確認し、ネットワークの中心にcEBP (CCAAT/ enhancer binding protein) 遺伝子が存在することを見出した。さらに、膵癌患者のCD4陽性細胞において、cEBP 遺伝子の発現の増加も認められることを見出した。

【 0 0 1 2 】

上記の結果、CD4陽性細胞のPD-1遺伝子の発現又はcEBP 遺伝子の発現が膵癌検出のマーカーとなり得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定する工程を含む、膵癌を検出するための検査方法。

[2] 被験体の末梢血液からCD4陽性細胞を単離する工程、及び

単離したCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を検出する工程を含み、CD4陽性細胞におけるPD-1の発現が健常人に対して上昇している場合に被験体が膵癌に罹患していると判断される、[1]の検査方法。

[3] CD4陽性細胞におけるPD-1の発現レベルを、CD4陽性細胞中のPD-1を発現している細胞の存在割合で判断する、[1]又は[2]の検査方法。

[4] CD4陽性細胞におけるPD-1の発現が、フローサイトメトリーによる発現しているPD-1の測定又はCD4陽性細胞中のPD-1のmRNAの測定により検出される、[1]~[3]のいずれかの検査方法。

[5] 末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現に加え、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるcEBPファミリーに属する遺伝子の発現を測定することを含む、[1]~[4]のいずれかの検査方法。

[6] 末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現をフローサイトメトリーにて測定することを含む、膵癌の治療方法を選択するための検査方法。

[7] 末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現をフローサイトメトリーにて測定することを含む、膵癌の予後予測を行うための検査方法。

[8] PD-1遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを含む、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定して膵癌を検出し、膵癌の治療方法を選択し、又は膵癌の予後予測を行うための検査試薬。

[9] さらに、cEBPファミリーに属する遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを含む、[8]の検査試薬。

[1 0] 抗PD-1抗体を含む、末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現を測定して膵癌を検出し、膵癌の治療方法を選択し、又は膵癌の予後予測を行うための検査試薬。

[1 1] さらに、cEBPファミリーに属するタンパク質に対する抗体を含む、[1 0]の検査試薬。

[1 2] PD-1からなる、膵癌を検出するための診断用マーカー。

[1 3] cEBPファミリーメンバーからなる、膵癌を検出するための診断用マーカー。

[1 4] PD-1を発現しているCD4陽性細胞を、膵癌治療候補薬剤と接触させて、PD-1の発現レベルが低下した場合に、該候補薬剤を膵癌治療用薬剤として選択する、膵癌治療薬の選択方法。

【発明の効果】

【0014】

PD-1をマーカーとして用い、又はPD-1及びcEBP の遺伝子発現をマーカーとして用い、末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1、あるいはPD-1とcEBP の遺伝子発現を指標にすることにより、膵癌を特異的にかつ早期に検出することができる。さらに、膵癌患者の末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現レベルに基づいて、患者に適した膵癌の適切な治療法を選択することができ、また、膵癌の予後予測も可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】膵癌患者と健常者の包括的遺伝子発現の差異の検討に用いた膵癌患者と健常者の臨床背景を示す図である。 10

【図2】膵癌患者と健常者のCD4陽性細胞のクラスター解析の結果を示し、24065遺伝子の遺伝子発現パターンの分布を示す図である。

【図3】膵癌患者のCD4陽性細胞における遺伝子ネットワークを示す図である。

【図4-1】膵癌患者のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現のFACSによる検討の結果を示す図である(その1)。

【図4-2】膵癌患者のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現のFACSによる検討の結果を示す図である(その2)。

【図5-1】膵癌患者のCD4陽性細胞におけるcEBP 遺伝子の発現の定量的RT-PCRによる検討の結果を示す図である。 20

【図5-2】膵癌患者のCD4陽性細胞におけるPD-1をコードする遺伝子の発現の定量的RT-PCRによる検討の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

PD-1(programmed death-1、CD279)は、補助刺激分子であり、55 kDaの免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質であり、主に活性化Tリンパ球に発現している。PD-1をコードする遺伝子であるPDCD1遺伝子の塩基配列を配列番号1に示す。

【0018】 30

cEBP(CCAAT/ enhancer binding protein)ファミリーは、急性期反応に重要な転写因子である。cEBPファミリーの一員であるcEBP 遺伝子のChain Bの塩基配列を配列番号2に示す。

【0019】

本発明においては、末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現を測定し、膵癌を検出し、あるいは膵癌の予後予測や治療効果の判定を行う。本発明は、膵癌を検出し、あるいは膵癌の予後予測や治療効果の判定を行うための検査方法、検査試薬、検査キットを含む。

【0020】

本発明を適用することのできる対象(被験体)は、膵癌に罹患しているか否かが判明していない被験体又は膵癌に罹患していることが判明している被験体である。前者については、被験体が膵癌に罹患しているか否かを検出することができ、後者については予後を予測し、あるいは治療効果の判定を行うことができる。 40

【0021】

被験試料は、末梢血液であり、末梢血液からCD4陽性細胞を単離し、該CD4陽性細胞における、PD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現を測定すればよい。cEBPファミリーメンバーとして、cEBP 、cEBP 、cEBP 等が存在するが、この中でもcEBP が好ましい。

【0022】

末梢血液からのCD4陽性細胞の単離は、公知の方法で行うことができる。例えば、末梢 50

血液からFicoll (商標)、Percoll (商標)、Lymphoprep (商標) 等を用いた密度勾配遠心分離により、単核球を分離することができる。次いで、分離した単核球からCD4陽性細胞を単離すればよい。CD4陽性細胞の単離は、抗CD4抗体を用いたフローサイトメトリーや抗CD4抗体を結合させた磁性粒子(磁気ビーズ)を用いた方法により単離することができる。フローサイトメトリーに用いるフローサイトメーターとしては例えばFACS Aria(ベクトン・ディッキンソン社製)、FACS vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)、FACS Calibur(ベクトン・ディッキンソン社製)等を用いることができる。また、磁性粒子としては、市販の細胞単離用の磁性粒子を用いることができる。

【0023】

このようにして得られたCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現レベルを測定すればよい。本発明において、遺伝子の発現レベルとは、遺伝子の発現量、発現強度又は発現頻度をいい、通常、遺伝子に対応する転写産物の産生量、又はその翻訳産物の産生量、活性等により解析することができる。遺伝子の発現レベルは、絶対値で表してもよく、また相対値で表してもよい。さらに、本発明においては、末梢血液より分離したCD4陽性細胞における、PD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子を発現している細胞(CD4陽性かつPD-1若しくはcEBPファミリーメンバー陽性細胞)の割合で表すこともできる。遺伝子の発現レベルは、遺伝子がコードするタンパク質を測定してもよいし、該遺伝子のmRNAを測定してもよい。

10

【0024】

PD-1の発現は、標識した抗PD-1タンパク質抗体又はcEBPファミリーに属するタンパク質に対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定することができ、この方法により、CD4陽性細胞の中からPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子を発現している細胞を単離し、全CD4陽性細胞中のPD-1陽性細胞又はcEBPファミリーに属するタンパク質が陽性である細胞の割合を産出することができる。また、個々のCD4陽性細胞について、PD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現レベルを測定することもできる。さらに、蛍光等で標識した抗PD-1タンパク質抗体又はcEBPファミリーに属するタンパク質に対する抗体を用いた細胞免疫染色法によりCD4陽性細胞中のPD-1発現細胞又はcEBPファミリーに属するタンパク質を発現している細胞を顕微鏡観察等により検出することもできる。

20

【0025】

mRNAを測定する場合、被験体のCD4陽性細胞から全RNAを抽出する。全RNAの抽出は、例えば、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159)等により行うことができる。

30

【0026】

遺伝子の転写産物の測定は、PD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の塩基配列の全部又は一部を含むヌクレオチドをプローブ又はプライマーとして用いて遺伝子発現の程度を測定すればよい。遺伝子発現の程度は、マイクロアレイ(マイクロチップ)を用いた方法、ノーザンブロット法、定量しようとする遺伝子又はその断片をターゲットとした定量PCR法等で測定することが可能である。定量PCR法としては、アガロースゲル電気泳動法、蛍光プローブ法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、ATAC-PCR法(Kato, K. et al., Nucl. Acids Res., 25, 4694-4696, 1997)、Taqman PCR法(SYBR(登録商標)グリーン法)(Schmittgen TD, Methods 25, 383-385, 2001)、Body Map法(Gene, 174, 151-158(1996))、Serial analysis of gene expression(SAGE)法(米国特許第527,154号、第544,861号、欧州特許公開第0761822号)、MAGE法(Micro-analysis of Gene Expression)(特開2000-232888号)等がある。ここに挙げた方法はいずれも公知の方法で行うことができる。これらの方法を用いて、上記遺伝子の全部又は一部から転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)の量を測定すればよく、該mRNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブ又はプライマーの使用により測定することができる。測定に用いるプローブ又はプライマーの塩基長は、10~50bp、好ましくは15~25bpである。

40

50

【0027】

DNAマイクロアレイ（DNAチップ）は、前記遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを適当な基板上に固定化することにより作製することができる。

【0028】

固定基板としては、ガラス板、石英板、シリコンウェハなどが挙げられる。基板の大きさとしては、例えば3.5mm×5.5mm、18mm×18mm、22mm×75mmなどが挙げられるが、これは基板上のプローブのスポット数やそのスポットの大きさなどに応じて様々に設定することができる。ポリヌクレオチド又はその断片の固定化方法としては、ヌクレオチドの荷電を利用して、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリアルキルアミンなどのポリ陽イオンで表面処理した固相担体に静電結合させたり、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基などの官能基を導入した固相表面に、アミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどの官能基を導入したヌクレオチドを共有結合により結合させることもできる。固定化は、アレイ機を用いて行えばよい。PD-1遺伝子若しくはcEBPファミリーに属する遺伝子又はそれらの断片を基板に固相化してDNAマイクロアレイを作製し、該DNAマイクロアレイと蛍光物質等で標識した被験体由来のmRNAまたはcDNAを接触させ、ハイブリダイズさせ、DNAマイクロアレイ上の蛍光強度を測定することにより、mRNAの種類と量を決定することができる。その結果、被験体において発現が変動している遺伝子の発現レベルがわかる。被験体由来のmRNAを標識する蛍光物質等は、限定されず、市販の蛍光物質等を用いることができる。例えば、Cy3、Cy5、フルオレセン（FITC）、スルホローダミン（SR）、テトラメチルローダミン（TRITC）等を用いればよい。また、放射性同位体としては、³²P、¹²⁵I、³⁵Sなどを用いることができる。さらに、ルシフェリン、緑色蛍光タンパク質（GFP）等の発光物質を用いてもよい。mRNAの標識は公知の方法で行うことができる。

10

20

【0029】

標識物質からのシグナル強度の検出は、標識を検出するための当技術分野で公知の方法であればいずれの方法も使用できる。例えば、標識として蛍光物質を用いた場合には、その蛍光を蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー、蛍光スキャナーなどを用いて検出することができる。また、標識として放射性同位体を用いた場合には、放射活性を、液体シンチレーションカウンター、 β -カウンターなどにより計測することができる。

【0030】

本発明は、PD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを含む腫瘍を検出し、腫瘍の治療方法を選択し、あるいは腫瘍の予後予測を行うための試薬又はキットを包含する。該試薬は、前記遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドをプローブ又はプライマーとして含む試薬であり、また前記遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを固相化したマイクロアレイ等の基板である。

この試薬又はキットは、上記2種類の遺伝子の一方又は両方を含む。

【0031】

さらに、本発明は上記遺伝子翻訳産物であるタンパク質に対する抗体を含む腫瘍を検出し、腫瘍の治療方法を選択し、あるいは腫瘍の予後予測を行うための試薬又はキットを包含する。該キットは、上記2種類の遺伝子翻訳産物に対する一方又は両方の抗体を含む。

30

40

【0032】

末梢血液中のCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現を検出することにより、腫瘍の有無を検出することができ、腫瘍の予後予測をすることができ、さらに腫瘍の治療効果を予測若しくは判定することができる。特に、PD-1の発現は腫瘍の有無の検出、腫瘍の予後予測及び腫瘍の治療効果の予測・判定の良いマーカーとなり、cEBPファミリーに属する遺伝子の発現は腫瘍の有無の検出のよいマーカーとなり得る。好ましくは、腫瘍の有無の検出には、PD-1遺伝子のみの発現を指標にするか、PD-1遺伝子の発現及びcEBPファミリーに属する遺伝子の両方の発現を指標にし、治療効果の予測又は予後予測にはPD-1のみの発現を指標にする。

50

【0033】

被験体の末梢血液から単離したCD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現が亢進している場合、その被験体は膵癌を有している、すなわち膵癌に罹患していると判断することができる。ここで、CD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現が亢進しているとは、健常人又は膵癌以外の癌患者と比較して発現レベルが高くなっていることをいう。被験体のCD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現を測定する際に、健常人又は膵癌以外の癌患者のCD4陽性細胞をコントロールとして測定し、比較してもよいし、あらかじめ健常人又は膵癌以外の癌患者の末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現レベルを測定し、発現レベルのカットオフ値を定めておき、被験体の末梢血液のCD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現レベルがカットオフ値を超えた場合に、該被験体は膵癌に罹患していると判断することができる。この際、CD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現レベルをCD4陽性細胞中のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子が発現している細胞の割合で表してもよく、例えば、あらかじめ健常人又は膵癌以外の癌患者の末梢血液のCD4陽性細胞中のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子が発現している細胞の割合、すなわち、末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子発現陽性率を算出し、割合についてカットオフ値を定めておいてもよい。CD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子は従来膵癌マーカーとして用いられていたCA19-9等に比較してもより特異的に膵癌を検出することができ、膵癌の早期検出も可能である。本発明は、被験体が膵癌に罹患しているかどうかを判断するための検査方法でもあり、被験体が膵癌に罹患しているかどうかを判断するためのデータを収集する方法も包含する。

10

20

【0034】

また、膵癌に罹患している被験体の末梢血液から単離したCD4陽性細胞のPD-1の発現レベルにより、膵癌の治療効果を予測することができる。例えば、CD4陽性細胞におけるPD-1の発現レベルに応じて、化学療法、外科的療法等の治療方法を決定することができ、さらに、化学療法に用いる薬剤の種類も決定することができる。例えば、PD-1の発現レベルが低い場合、抗がん剤の奏効を期待して化学療法を選択することができ、一方、PD-1の発現レベルが高い場合は、化学療法での延命効果は低いと判断することができ、他の化学療法を選択するか、又は疼痛緩和ケアを選択することができる。膵癌患者の末梢血液のCD4陽性細胞のPD-1の発現レベルを定期的に測定することにより、その都度適切な治療方法を決定することができる。本発明は、膵癌に罹患している被験体の治療方法を選択するための検査方法でもあり、膵癌に罹患している被験体の治療方法を選択するためのデータを収集する方法も包含する。

30

【0035】

さらに、膵癌に罹患している被験体の末梢血液から単離したCD4陽性細胞のPD-1の発現レベルにより、膵癌患者の予後を予測できる。例えば、CD4陽性細胞におけるPD-1の発現レベルが高い場合に、予後が不良であると評価することができる。本発明は、膵癌に罹患している被験体の予後を予測するための検査方法でもあり、膵癌に罹患している被験体の予後を予測するためのデータを収集する方法も包含する。

40

【0036】

被験体の末梢血液から単離したCD4陽性細胞のPD-1遺伝子又はcEBPファミリーに属する遺伝子の発現レベルの測定を膵癌の治療薬開発に利用することもできる。すなわち、末梢血液のCD4陽性細胞のPD-1遺伝子の発現レベルの変化で候補薬の薬効を評価することができる。該方法はin vivoで行うことも、in vitroで行うこともできる。in vivoで行う場合、膵癌患者に候補薬剤を投与し、該患者の末梢血液のCD4陽性細胞におけるPD-1遺伝子発現レベルを、例えば、CD4陽性細胞におけるPD-1陽性細胞率を調べる。CD4陽性PD-1陽性細胞率発現レベルが低下した場合に、前記候補薬は膵癌治療に有用であると判断することができる。in vitroで行う場合、膵癌患者の末梢血液よりCD4陽性細胞を単離し、該細胞を候補薬剤を含む培地で培養すること等により、細胞と候補薬剤を接触させ、細胞における

50

PD-1遺伝子発現レベルの変化を測定すればよい。PD-1遺伝子発現レベルが低下した場合に、前記候補薬は膀胱癌治療に有用であると判断することができる。

【実施例】

【0037】

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。

【0038】

[実施例1] 癌患者と健常者の包括的遺伝子発現の差異の検討

癌患者 (n=16) (そのうち膀胱癌患者 (n=9)) と健常者 (n=7) から、CD4陽性細胞を末梢血液から単離して、Microarray法により包括的遺伝子発現の差異を検討した。癌患者と健常者の臨床背景を図1に示す。具体的には以下の方法で行った。

【0039】

患者より、約5mlの血液を採取し、Ficoll法により末梢血液単核球 (PBMC) を分離した。Magnetic beads (Militery社) を用いたpositive selection法にて、Militery社のプロトコールに従って、CD4陽性細胞をPBMCから単離した。Microarray (Agilent社) を用いて、単離したCD4陽性細胞の遺伝子発現パターンを解析した。ノイズデータを除去するためにQuality controlを行い、Quality control後のCD4陽性細胞のクラスター解析を行った。図2に、24065遺伝子の遺伝子発現パターンの分布を示す。図2中、N、C、CO、Pk、CCCはそれぞれ、健常人、癌患者、大腸癌患者、膀胱癌患者、胆管癌患者を示す。図2に示すように、癌患者は健常者と比べて遺伝子発現パターンに差を認めた。

【0040】

どのような遺伝子群のネットワーク (関連をもっている遺伝子群) が癌患者のCD4陽性細胞で特徴的であるかをコンピューターによって解析した。解析にはMetaCore GeneSpring GXソフトウェアを用いた。図3にネットワークを表示した図を示す。図3に示すように、ネットワークの中心として、cEBP 遺伝子が挙げられた。cEBP 遺伝子の発現は、癌患者で健常者の4.80倍であった (p=0.0123)。

【0041】

前述のmicroarrayの結果から、どのようなパスウェイによって癌患者の末梢血液のCD4陽性細胞の遺伝子発現パターンが健常者と異なるかをMetaCore GeneSpring GXソフトウェアを用いて検討した。その結果、T細胞レセプターに関連したパスウェイが主要な因子であることが判明した。そこで、T細胞の活性化や増殖を抑制する補助刺激受容体PD-1 (Programmed Cell Death-1) タンパク質の発現について検討を行った。

【0042】

[実施例2] 膀胱癌患者のCD4陽性細胞におけるPD-1の発現のFACSによる検討

膀胱癌患者14人、非癌患者17人、膀胱癌以外の癌患者 (大腸癌、胆管癌及び肝癌患者) 9人のCD4陽性細胞を、実施例1に記載の方法で単離し、単離したCD4陽性細胞100000個に対して、抗CD4抗体-FITC及び抗PD-1-PE抗体 (Becton Dickinson社) を用いて、4、15分で染色した。染色後PBSで2度洗浄し、フローサイトメトリー (Becton Dickinson社) にてCD4陽性かつPD-1陽性細胞を定量化した。図4-1にグラフで結果を示し、図4-2に散布図を示す。図4-1及び図4-2には、膀胱癌患者、非癌患者、及び膀胱癌以外の癌患者のCD4陽性細胞におけるPD-1発現が陽性である細胞の割合の大きさ (分離群の平均値) を示す。図4-1及び図4-2中、Gは膀胱癌以外の癌患者を、Nは非癌患者を、PKは膀胱癌患者を示す。図4-1及び図4-2の結果から、統計学的に有意差を持って膀胱癌においてPD-1陽性細胞となる割合が増加していることが判明した。

【0043】

[実施例3] 膀胱癌患者のCD4陽性細胞におけるcEBP 遺伝子及びPDCD1遺伝子 (PD-1遺伝子) の発現の定量的RT-PCRによる検討

膀胱癌患者、非癌患者、膀胱癌以外の癌患者のCD4陽性細胞を実施例2と同様の方法で単離し、CD4陽性細胞のcEBP 遺伝子及びPDCD1遺伝子の発現レベルを定量的RT-PCRにて検討した。RT-PCRは以下の方法で行った。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

MicroRNA isolation kit(Stratagene, La Jolla, CA)を用いて、検体からtotal-RNAを抽出した。1 μ g oligo (dT) primer及びSuper Script II Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて逆転写した。プライマー及びプローブはTaqMan assay reagents libraryを用いて、ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)にてmRNAを定量化した。Internal control geneには β -actin 及び18srRNAを用いた。図5 - 1 にcEBP 遺伝子の発現を、図5 - 2 にPDCD遺伝子の発現程度を示す。図5 - 1 及び図5 - 2 に示すように、膵癌患者のCD4陽性細胞でcEBP 遺伝子及びPDCD1遺伝子発現は非癌患者、膵癌以外の癌患者のCD4陽性細胞に比べ亢進している傾向が認められた。

10

【 0 0 4 5 】

[実施例4] 個別の膵癌症例における、PD-1の発現程度と臨床背景の関係の検討

実施例4で用いた膵癌患者の中から、CD4陽性細胞においてPD-1発現が上昇している患者とPD-1発現が上昇していない患者について、臨床背景とPD-1発現の関係を確認した。

【 0 0 4 6 】

確認した膵癌症例の例としては以下の症例が挙げられる。

- 1 . CD4陽性細胞におけるPD-1発現が上昇してない(3.4%)膵癌症例： 62歳 男性；膵体部4.5cm、外来通院にてGemcitabineによる化学療法を受けながら就労を続けている。
- 2 . CD4陽性細胞におけるPD-1発現が上昇している(14.18%)膵癌症例： 80歳 男性；膵体部 癌性腹膜炎、膵癌と診断された22日後に死亡した。
- 3 . CD4陽性細胞におけるPD-1発現が上昇している(11.34%)膵癌症例： 72歳 女性；膵体部、膵癌と診断された92日後に死亡した。

20

【 0 0 4 7 】

この検討により、臨床的な病期が進行している方が、PD-1の発現が亢進している可能性が示唆された。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 4 8 】

本発明により膵癌の早期検出、治療法の選択及び予後予測が可能になる。

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 0 4 9 】

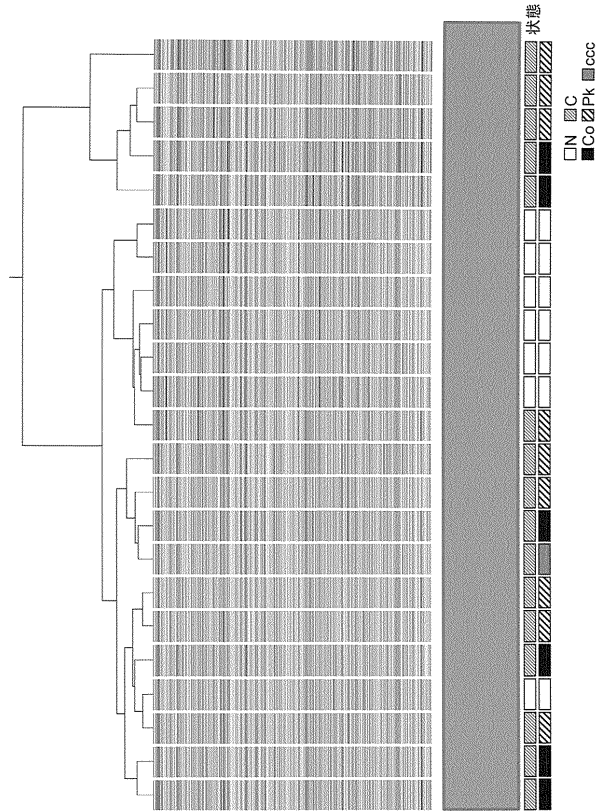
配列番号2 合成

30

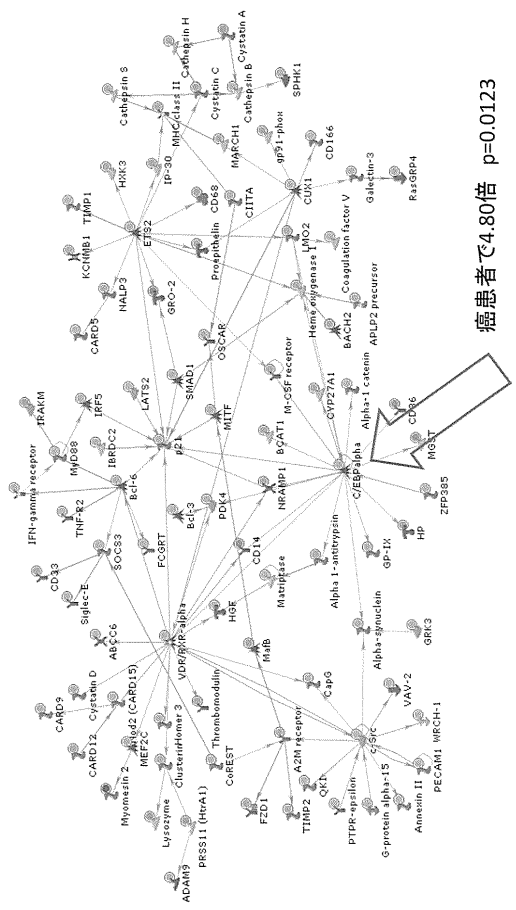
【 図 1 】

	年齢 (平均)	性別 (男/女)	ステージ (3/4)
健常人 (n=17)	64	3/4	
肺癌以外の癌患者 (n=9)	68	4/3	2/5
肺癌患者 (n=14)	70	7/2	2/7

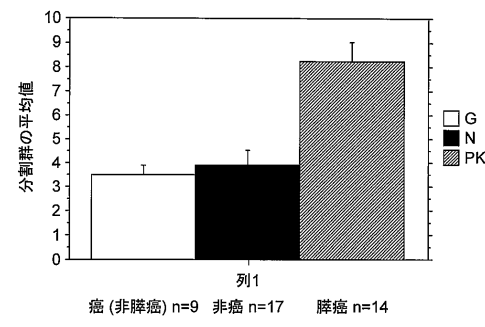
【 図 2 】



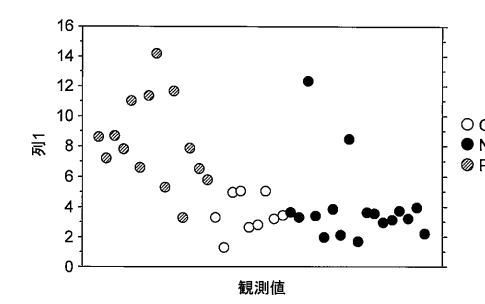
【 図 3 】



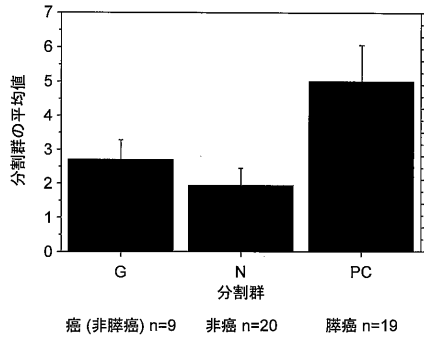
【 図 4 - 1 】



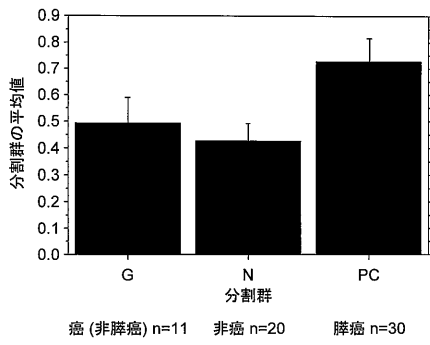
【 図 4 - 2 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】



【 配 列 表 】

2014020930000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
		C 0 7 K 16/24	

(72)発明者 小村 卓也

石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内

Fターム(参考) 2G045 AA02 AA26 AA40 BA13 BB24 CA25 DA14 DA36 FA16 FA37
 FB01 FB03 FB08 FB12 FB15 GC15 JA01
 4B024 AA12 CA12 DA03 HA14
 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR55 QR72
 QR77 QS33 QS34 QX01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA51 FA71

专利名称(译)	胰腺癌诊断和治疗效果预测确定生物标志物		
公开(公告)号	JP2014020930A	公开(公告)日	2014-02-03
申请号	JP2012159927	申请日	2012-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人金沢大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人金沢大学		
[标]发明人	金子周一 酒井佳夫 小村卓也		
发明人	金子 周一 酒井 佳夫 小村 卓也		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/49 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/04 C12Q1/68 C12Q1/02 C12N15/09 C07K16/24		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/49.K G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/04 C12Q1/68.A C12Q1/02 C12N15/00.A C07K16/24 C12N15/12 C12Q1/6827.Z C12Q1/6886.Z G01N33/574.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA12 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA71		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：为胰腺癌的检测提供一种特异性标志物，确定胰腺癌的治疗方法，预测胰腺癌的预后。解决方案：用于检测胰腺癌，确定胰腺癌的治疗方法和预测胰腺癌的预后的检查方法，包括测量外周血中CD4阳性细胞中PD-1基因的表达的步骤。

	年齢(平均)	性別(男/女)	ステージ(3/4)
健常人(n=17)	64	3/4	
肺癌以外の癌患者(n=9)	68	4/3	2/5
肺癌患者(n=14)	70	7/2	2/7