

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5605375号
(P5605375)

(45) 発行日 平成26年10月15日(2014.10.15)

(24) 登録日 平成26年9月5日(2014.9.5)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		N
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574		A

請求項の数 11 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2011-550906 (P2011-550906)	(73) 特許権者	000003975
(86) (22) 出願日	平成23年1月18日 (2011.1.18)		日東紡績株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/050720		福島県福島市郷野目字東1番地
(87) 国際公開番号	W02011/090017	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成23年7月28日 (2011.7.28)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成24年9月6日 (2012.9.6)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	特願2010-12976 (P2010-12976)		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成22年1月25日 (2010.1.25)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Ku 8 6 に対する自己抗体の免疫測定方法、それに用いるキット、及びそれを用いた原発性肝細胞癌の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中の Ku 8 6 に対する自己抗体と試薬としての Ku 8 6 抗原とを反応させ、生成する Ku 8 6 に対する自己抗体と Ku 8 6 抗原との免疫複合体を測定することにより、その自己抗体を測定することを特徴とする、原発性肝細胞癌判定用の、Ku 8 6 に対する自己抗体の免疫測定方法。

【請求項 2】

検体が血液由来検体である、請求項 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 3】

免疫測定方法が、酵素免疫測定方法、蛍光免疫測定方法、化学発光免疫測定方法、又は放射免疫測定方法である、請求項 1 又は 2 に記載の免疫測定方法。

【請求項 4】

試薬成分として少なくとも Ku 8 6 抗原を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法のためのキット。

【請求項 5】

Ku 8 6 抗原が水不溶性担体に結合されている、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

さらに、抗ヒトイムノグロブリン抗体を含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

抗ヒトイムノグロブリン抗体が標識物で標識されている、請求項 6 に記載のキット。

10

20

【請求項 8】

K u 8 6 に対する自己抗体を測定することにより、原発性肝細胞癌であることを判定する、原発性肝細胞癌判定方法。

【請求項 9】

血液由来検体中の自己抗体を測定する、請求項 8 に記載の原発性肝細胞癌判定方法。

【請求項 10】

K u 8 6 に対する自己抗体からなる、原発性肝細胞癌判定用マーカー。

【請求項 11】

血液由来検体を用いて判定するための、請求項 10 に記載の原発性肝細胞癌判定用マーカー。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、K u 8 6 に対する自己抗体を測定するための免疫測定方法及び免疫測定用キットに関するものである。K u 8 6 に対する自己抗体は、特に原発性肝細胞癌患者の血中に特異的に出現するものであり、したがって、本発明は、自己抗体を単に測定する方法を提供するだけでなく、原発性肝細胞癌の判定にも利用することができる。

【背景技術】

【0002】

K u 8 6 は、二重鎖 DNA 切断に関与する蛋白質であり、K u 7 0 と共に、K u と呼ばれるヘテロ二量体を形成し、その K u ヘテロ二量体は、DNA 依存性プロテインキナーゼ等と共同で、二重鎖 DNA 切断を修復することができるとされている（非特許文献 1）。

他方、アガロース 2 次元電気泳動に 2 D - D I G E 法（two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis）を適用した改良アガロース 2 次元電気泳動法（非特許文献 2）により、原発性肝細胞癌の癌部および周辺の非癌部組織の蛋白発現量の比較をプロテオーム解析により行ない、K u 8 6 という蛋白質が癌部に多く発現されることが明らかになっている（非特許文献 3）。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.9, No.2, 832-837, 2002

【非特許文献 2】Takeshi Tomonaga et al., Clin. Cancer Res. 2004;10:2007-2014

【非特許文献 3】Masanori Seimiya et al., Hepatology 2008;48:519-30

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、癌が疑われる患者または癌患者由来の組織検体中に存在する、K u 8 6 の発現レベルを測定して、それらの組織の癌部と非癌部の判別をすることができることを見出した。本発明者らは、さらに血液検体中の K u 8 6 の存在について研究を続けたところ、驚くべきことに、血液検体中に K u 8 6 に対する自己抗体が存在する場合があります、原発性肝細胞癌患者の場合、その自己抗体の量が特異的に多いことを見出した。したがって、本発明の目的は、原発性肝細胞癌判定に応用することのできる、K u 8 6 に対する自己抗体の測定方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、検体中の K u 8 6 に対する自己抗体を、試薬としての K u 8 6 抗原と反応させて、生成する自己抗体と K u 8 6 抗原との免疫複合体を標識抗ヒトイムノグロブリン抗体により測定することにより、その自己抗体を測定することができ、それによって癌

50

判定が可能になることを見出し、本発明を完成させた。

従って、本発明は、検体中のKu86に対する自己抗体と試薬としてのKu86抗原とを反応させ、生成するKu86に対する自己抗体とKu86抗原との免疫複合体を測定することにより、その自己抗体を測定することを特徴とする、Ku86に対する自己抗体の免疫測定方法に関する。

更に、本発明は、試薬成分として少なくともKu86抗原を含むことを特徴とする、Ku86に対する自己抗体免疫測定用キットに関する。

更に、本発明は、Ku86に対する自己抗体を測定することにより、原発性肝細胞癌であることを判定する、原発性肝細胞癌判定方法に関する。

更に、本発明は、Ku86に対する自己抗体からなる、原発性肝細胞癌判定用マーカーに関する。

【発明の効果】

【0006】

本発明においては、検体中、特に、血液由来検体中に存在するKu86に対する自己抗体を簡単に測定でき、原発性肝細胞癌患者の判定に有効である。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】Ku86抗原を感作したELISAプレートを用いて健常人検体、C型肝炎患者血清検体、C型肝炎硬変患者血清検体、初発原発性肝細胞癌（以下、初発HCCということもある）患者血清検体および再発原発性肝細胞癌（以下、再発HCCということもある）患者血清検体においてKu86に対する自己抗体を測定した結果である。なお、図中、横軸は疾患名を示し、縦軸は波長450nm光に対する吸光度を示している。また、アスタリスクは、健常人血清検体群、C型肝炎患者検体群またはC型肝炎硬変患者血清検体群との比較をした全ての場合に、Wilcoxonの2標本検定による有意差（ $p < 0.0001$ ）が存在する血清検体群を示している。

【図2】Ku86抗原を感作したELISAプレートを用いて健常人血清検体、初発HCC患者血清検体、大腸癌患者血清検体、胃癌患者血清検体、膵臓癌患者血清検体、乳癌患者血清検体、肺癌患者血清検体および食道癌患者血清検体においてKu86とその自己抗体との複合体を測定した結果である。なお、図中、横軸は疾患名を示し、縦軸は波長450nm光に対する吸光度を示している。また、アスタリスクは、健常人血清検体群、大腸癌患者血清検体群、胃癌患者血清検体群、膵臓癌患者血清検体群、乳癌患者血清検体群、肺癌患者血清検体群または食道癌患者血清検体群との比較をした全ての場合に、Wilcoxonの2標本検定による有意差（ $p < 0.0001$ ）が存在する血清検体群を示している。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明のKu86に対する自己抗体の免疫測定方法は、検体中のKu86に対する自己抗体と試薬としてのKu86抗原とを反応させ、生成するKu86に対する自己抗体とKu86抗原との免疫複合体を測定することによりKu86に対する自己抗体を測定することを特徴とする。

【0009】

本発明において、検体とは、生体由来の試料が好適で、特に、血液由来検体が好適であり、血液由来検体としては、全血、血漿、血清を例示できる。

【0010】

本発明の免疫測定方法の測定対象は、Ku86に対する自己抗体である。Ku86は、前記したとおり、二重鎖DNA切断に参与する蛋白質であり、その正式名は、ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2であり、別名としてXRCC5とも言われている。また、Ku86は、米国の国立生物工学情報センター（NCBI）の受け入れ番号（accession No）がgi-10863945である、732個のアミノ酸からなる82kDaの蛋白質である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

本発明の免疫測定方法を実施するには、試薬としてのKu86抗原を用いる。試薬としてのKu86抗原としては、Ku86に対する自己抗体と抗原抗体反応しうる抗原であれば特に限定しないが、Ku86全長蛋白質、Ku86全長蛋白質の変異体であって該蛋白質と同様のKu86に対する自己抗体と抗原抗体反応しうる機能を有し且つ該アミノ酸配列と90%以上の相同性を有する蛋白質もしくはKu86全長蛋白質のアミノ酸配列において1個から数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体、Ku86の断片ペプチドであってKu86の自己抗体と抗原抗体反応しうるペプチドを例示できる。Ku86全長蛋白質は、Abnova社より入手可能であるが、全アミノ酸配列が上記の通り既知であるので、Ku86全長蛋白質やその変異体は、遺伝子組換え技術によっても合成できる。本発明においてKu86の断片ペプチドを用いるときは、Ku86全長蛋白質を酵素分解等によって各種のペプチド断片に切断して作成してもよいし、市販の自動ペプチド合成装置を用いても容易に作成することができる。また、標的のKu86の断片ペプチドを遺伝子組み換え技術によっても作成することができる。

10

【 0 0 1 2 】

本発明においては、そのようにして得られたKu86全長蛋白質の変異体や断片ペプチドを、Ku86に対する自己抗体と反応させ抗原抗体反応をするものを選択して試薬としてのKu86抗原として用いることができる。本発明においては、上記した各ペプチド断片の全体のほか、その一部も使用できるし、それらの混合物も使用でき、これらも試薬としてのKu86抗原に包含される。

20

【 0 0 1 3 】

本発明においてKu86に対する自己抗体を免疫測定するには、例えば、試薬としてのKu86抗原をマイクロプレートその他の担体に固相化しておき、得られる水不溶性担体に該自己抗体を含有すると予想される検体を適用して試薬としてのKu86抗原と抗原抗体反応させて結合させ、次いで酵素等で標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を適用して該自己抗体に反応結合させる。

【 0 0 1 4 】

水不溶性担体の調製は、蛋白質を固相面に結合する既知の方法を用いて容易に行うことができる。例えば、固相化担体としては、通常、ビーズ、マイクロプレート、チューブ等が用いられる。これらの固相面に試薬としてのKu86抗原を結合する方法としては、物理吸着、化学結合等既知の固定化技術が適宜利用できる。

30

このようにして固相化したKu86抗原とその自己抗体含有検体とを接触させると、Ku86に対する自己抗体のみが特異的に試薬としてのKu86抗原と結合する。そこで、標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を加えると、抗ヒトイムノグロブリン抗体はKu86に対する自己抗体と結合するので、この標識を利用して測定を行うことができる。

【 0 0 1 5 】

標識としては、酵素、ラジオアイソトープ、FITC、ローダミン、ルミノールといった蛍光物質、化学発光物質等常用される標識が適宜使用される。これらの各種標識を用いて、酵素免疫測定方法、放射免疫測定方法、蛍光免疫測定方法、化学発光免疫測定方法等の方法により、Ku86に対する自己抗体を測定することができる。

40

酵素免疫測定方法に用いる標識酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ等の酵素免疫分析法(EIA)に常用される酵素が適宜使用され、これらの酵素に適合しEIAで常用される発色基質が適宜使用される。発色基質としては、例えばHRPの場合は、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)、TMBZ \cdot HCl、TMBZ \cdot PS、ABTS、*o*-フェニレンジアミン、*p*-ヒドロキシフェニル酢酸等が使用され、アルカリフォスファターゼの場合は、*p*-ニトロフェニルフォスフェート、4-メチルウンベリフェリルフォスフェート等が使用され、 α -ガラクトシダーゼの場合は、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル-

50

D - ガラクトピラノシド等が使用される。

放射免疫測定方法、蛍光免疫測定方法、化学発光免疫測定方法等においても、通常用いられる公知の標識を採用することができる。

本発明の免疫測定方法においては、上記した方法のほか、ウエスタンブロット法、免疫組織染色法、ラテックス免疫比濁法及び免疫沈降法等の免疫測定法、液体クロマトグラフィー法によっても、Ku86に対する自己抗体を測定することができる。

【0016】

本発明の免疫測定方法は、試薬成分として少なくともKu86抗原を含む、Ku86に対する自己抗体免疫測定用キットにより実施することができる。Ku86抗原は、例えば、マイクロプレートなどの水不溶性担体に結合させた形態で、キットの試薬成分とすることができる。キットの他の試薬成分としては、抗ヒトイムノグロブリン抗体が挙げられ、この抗ヒトイムノグロブリン抗体は、採用する酵素免疫測定方法、放射免疫測定方法、蛍光免疫測定方法、化学発光免疫測定方法などの測定方法に応じて、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質などの標識物で標識されたものが用いられる。その他の試薬成分として、界面活性剤、緩衝剤を適宜、加えてもよい。

【0017】

本発明においては、Ku86に対する自己抗体を測定することにより、原発性肝細胞癌の判定をすることができる。本発明の測定方法によりKu86に対する自己抗体を測定することは、患者の癌疾患の判別に有効である。本発明の測定方法の利用は、例えば、健常人と、初発原発性肝細胞癌患者や再発原発性肝細胞癌患者との判別に有効である。また、本発明の測定方法を利用することにより、大腸癌患者、胃癌患者、膵臓癌患者、乳癌患者、肺癌患者または食道癌患者等の癌患者と、初発原発性肝細胞癌患者や再発原発性肝細胞癌患者との判別が可能である。さらに、本発明の測定方法を利用することで、C型肝炎患者またはC型肝炎硬変等の肝臓疾患患者と、初発原発性肝細胞癌患者または再発原発性肝細胞癌患者等の原発性肝細胞癌患者との判別が可能である。

【0018】

以上の説明から明らかな通り、Ku86に対する自己抗体は、原発性肝細胞癌判定用マーカーとなるものであり、原発性肝細胞癌の判定用マーカーとして使用できるものである。また、Ku86に対する自己抗体は、全血、血漿、血清などの血液由来検体を用いて原発性肝細胞癌を判定するマーカーとして好適なものである。

【実施例】

【0019】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に何ら制限されるものではない。

実施例 1

Ku86に対する自己抗体の測定

健常人、C型肝炎患者、C型肝炎硬変患者、初発原発性肝細胞癌患者、再発原発性肝細胞癌患者、大腸癌患者、胃癌患者、膵臓癌患者、乳癌患者、肺癌患者および食道癌患者から採取した血清検体について、Ku86に対する自己抗体を、以下に具体的に説明する酵素免疫測定法(ELISA法)にて測定した。

【0020】

1. 方法

(1) Ku86のELISAプレートの作成

水不溶性担体としてELISAプレート(Nunc社製, Maxisorp)を用い、それにKu86としてXRCC5全長体(リコンビナントタンパク質 GSTタグ付き: Abnova社製 5 µg/mL, 100 µL/well)を1晩4 静置して感作し、その後、0.05% Tween 20を含むPBS(200 µL/well)で3回洗浄を行った。ついで、1.5% BSA、10% サッカロースを含むPBS(200 µL/well)で1晩コーティングしてKu86のELISAプレートを作成した。

【0021】

(2) Ku86に対する自己抗体の測定

各サンプル血清はPBSにて100倍に希釈し、それを100 μ L/wellずつKu86のELISAプレートに加え、1時間37 $^{\circ}$ Cで静置し、その後、そのプレートを0.05%Tween20を含むPBS(200 μ L/well)で3回洗浄した。そのプレートもHRP標識免疫グロブリン(HRP標識されたanti-HumanIgG(Zymed社製)を0.05%Tween20を含むPBSにて4000倍に希釈したものを100 μ L/wellずつ加え、30分間37 $^{\circ}$ Cで静置した。ついで、そのプレートを0.05%Tween20を含むPBS(200 μ L/well)で3回洗浄した後、TMBZを100 μ L/wellずつ加え、10分間室温で静置の後、反応停止剤として100 μ L/wellの1N硫酸を加えた。吸光度はマイクロプレートリーダー(BioRad社製)を用いて、波長450nmにて測定を行った。

10

なお、検体は健常人48例、C型肝炎患者16例、C型肝炎硬変患者21例、初発原発性肝細胞癌患者検体35症例、再発原発性肝細胞癌患者52例、大腸癌患者検体16例、胃癌患者16例、膵臓癌患者16例、乳癌患者20例、肺癌患者10例、食道癌患者18例を用いた。

【0022】

2. 結果

Ku86のELISAプレートを用いてKu86に対する自己抗体を測定した結果を、図1に示す。有意差検定はKaleidaGraph4.0を用い、Wilcoxonの2標本検定にて統計処理した。

20

図1に示すように、健常人群、C型肝炎群およびC型肝炎硬変群と比較し、初発原発性肝細胞癌患者検体群および再発原発性肝細胞癌患者検体群のKu86に対する自己抗体量は、明らかな有意差を認めた。したがって、血中のKu86に対する自己抗体の免疫測定は、肝臓疾患の中でも、原発性肝細胞癌の判別に有効であることが示された。

図2に示すように、健常人群や種々の癌患者検体群、すなわち、大腸癌患者検体群、胃癌患者検体群、膵臓癌患者検体群、乳癌患者検体群、肺癌患者検体群および食道癌患者検体群と比較して、原発性肝細胞癌患者検体群のKu86に対する自己抗体量は、明らかな有意差を認めた。したがって、血中のKu86に対する自己抗体の免疫測定は、健常人と原発性肝細胞癌患者との判別に有効であることが示された。さらに、血中のKu86に対する自己抗体の免疫測定は、大腸癌患者、胃癌患者、膵臓癌患者、乳癌患者、肺癌患者または食道癌患者等の癌患者と原発性肝細胞癌患者との判別にも有効であることが示された。

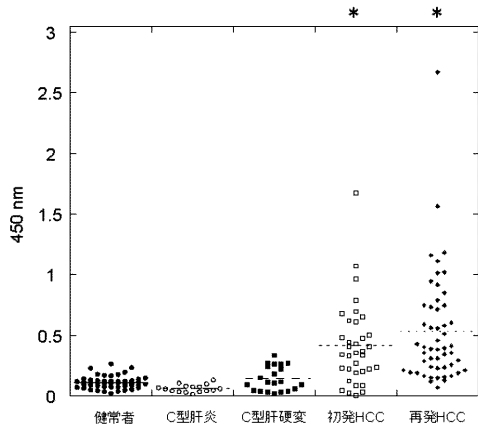
30

【産業上の利用可能性】

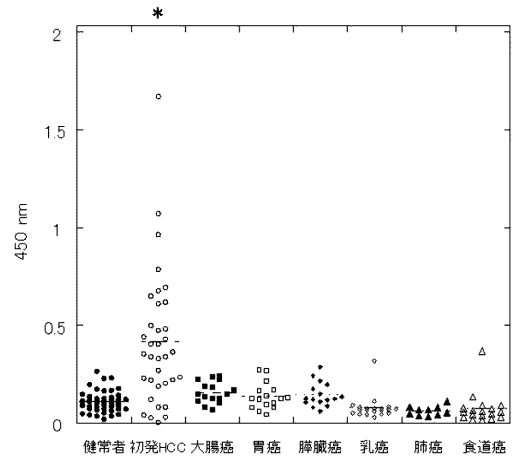
【0023】

以上に詳細に説明したように、血液由来検体などの検体中のKu86に対する自己抗体を、試薬としてのKu86抗原と反応させて、生成する自己抗体とKu86抗原との免疫複合体を測定することにより、その自己抗体を測定することができ、それによって、原発性肝細胞癌の判定が可能である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 小島 良
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーボーマディカル株式会社内
- (72)発明者 野田 健太
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーボーマディカル株式会社内
- (72)発明者 清宮 正徳
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内
- (72)発明者 曾川 一幸
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内
- (72)発明者 野村 文夫
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 Yaneva M, Arnett FC, Antibodies against Ku protein in sera from patients with autoimmune diseases, *Clin Exp Immunol*, 1989年6月, 76(3), 366-372
Hwee Tong Tan et al, Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection, *FEB S Journal*, 2009年12月26日, 276(23), 6880-6904

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53 - 33/574

专利名称(译)	用于抗Ku86的自身抗体的免疫测定方法，用于该方法的试剂盒，以及使用该方法测定原发性肝细胞癌的方法		
公开(公告)号	JP5605375B2	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	JP2011550906	申请日	2011-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	小島良 野田健太 清宮正徳 曾川一幸 野村文夫		
发明人	小島良 野田健太 清宮正徳 曾川一幸 野村文夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/564 G01N33/57438 G01N33/57484 G01N2333/47 G01N2333/90		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/574.A		
代理人(译)	池田幸		
优先权	2010012976 2010-01-25 JP		
其他公开文献	JPWO2011090017A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

标本中抗Ku86的自身抗体与Ku86抗原作为试剂反应，用标记的抗人免疫球蛋白抗体测定产生的自身抗体和Ku86抗原之间的免疫复合物，从而测量其自身抗体。从而可以确定原发性肝细胞癌。

【图 1】

