

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4317913号
(P4317913)

(45) 発行日 平成21年8月19日 (2009. 8. 19)

(24) 登録日 平成21年6月5日 (2009. 6. 5)

(51) Int. Cl.	F 1	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	M
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68	A
GO 1 N 33/483 (2006. 01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/483	C

請求項の数 15 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-576470 (P2001-576470)	(73) 特許権者	599075070
(86) (22) 出願日	平成13年4月16日 (2001. 4. 16)		ベンタナ・メデイカル・システムズ・イン コーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-512495 (P2004-512495A)		アメリカ合衆国アリゾナ州85737トウ ーソン・イノベーションパークドライブ1 910
(43) 公表日	平成16年4月22日 (2004. 4. 22)	(73) 特許権者	501394136
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/012288		ボード オブ トラストィーズ オブ ザ ユニヴァースティ オブ イリノイ
(87) 国際公開番号	W02001/079855		アメリカ合衆国 61801 イリノイ州 アーバナ サウス ライト ストリート 506 ヘンリー アドミニストレイシ ョン ビルディング 352
(87) 国際公開日	平成13年10月25日 (2001. 10. 25)	(74) 代理人	100083806
審査請求日	平成14年12月9日 (2002. 12. 9)		弁理士 三好 秀和
(31) 優先権主張番号	60/197, 780		最終頁に続く
(32) 優先日	平成12年4月14日 (2000. 4. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 AKTタンパク質発現の定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 複数の対照細胞ペレット中のAKTタンパク質の量及びAKTタンパク質の活性レベルの少なくとも一方はそれぞれ既知であり、複数の対照細胞ペレットの各々はAKTタンパク質の発現及び活性レベルの少なくとも一方が同一ではない、複数の対照細胞ペレット中のAKTタンパク質を、AKTタンパク質を検出可能な標識抗体を用いて免疫組織化学的に染色する工程と、

(b) 前記工程(a)において染色された各複数の対照細胞ペレット中の細胞面積の1画素あたりの染色されたAKTタンパク質の平均光学密度を決定する工程と、

(c) 前記工程(a)において染色されたAKTタンパク質の既知量及び染色されたAKTタンパク質の既知活性レベルの少なくとも一方と、前記工程(b)で決定された各染色された複数の対照細胞ペレット中の細胞面積の1画素あたりの染色されたAKTタンパク質の平均光学密度とを関連付けた標準曲線を作成する工程と、

(d) AKTタンパク質を検出可能な前記標識抗体を用いてサンプル中のAKTタンパク質を免疫組織化学的に染色する工程と、

(e) サンプル中の細胞面積の1画素あたりの染色されたAKTタンパク質の平均光学密度を決定する工程と、

(f) 前記工程(e)で決定された細胞面積の1画素あたりの染色されたAKTタンパク質の平均光学密度と、前記工程(c)で作成した標準曲線を比較することにより、サンプル中のAKTタンパク質の量及びAKTタンパク質の活性の少なくとも一方を決定する

10

20

工程と、

を含む細胞サンプル中の A K T タンパク質の量及び A K T タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を決定する方法。

【請求項 2】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方は同一ではない請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 1 タンパク質の量及び A K T 1 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方は同一ではない請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) により決定する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、高密度オリゴヌクレオチドアレイをそこから調製した細胞性 m R N A または c D N A でハイブリダイズすることにより決定する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、細胞性 R N A または m R N A の R T - P C R により決定する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、ノーザン・プロットハイブリダイゼーションにより決定する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、免疫組織化学検出により決定する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、タンパク質マイクロアレイにより決定する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) により決定する請求項 3 に記載の方法。

【請求項 11】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、高密度オリゴヌクレオチドアレイをそこから調製した細胞性 m R N A または c D N A でハイブリダイズすることにより決定する請求項 3 に記載の方法。

【請求項 12】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) により決定する請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、ノーザン・プロットハイブリダイゼーションにより決定する請求項 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、免疫組織化学検出により決定する請求項 3 に記載の方法。

【請求項 15】

各複数の対照細胞ペレット中の A K T 2 タンパク質の量及び A K T 2 タンパク質の活性レベルの少なくとも一方を、タンパク質マイクロアレイにより決定する請求項 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は 2000 年 4 月 14 日出願の米国特許仮出願番号第 60 / 197780 号に対する優先権を請求する。

10

【0002】

(技術分野)

本発明は病態、とりわけ癌の病態の診断および処置に関連する細胞または組織サンプルにおけるタンパク質発現を定量するための方法に関する。具体的には、本発明は撮像系を用いて A K T 1 および A K T 2 タンパク質発現を定量する、A K T 1 および A K T 2 タンパク質発現および活性化状態を定量する方法に関する。

【0003】

(背景技術)

癌診断は従来、患者から取り出した細胞または組織サンプルの組織学的試験により確認される。臨床病理学者は、かかるサンプルが良性または悪性であるかどうかを正確に決定でき、かつ悪性であると考えられる腫瘍サンプルの攻撃性を分類できる必要がある。なぜならばこれらの決定はしばしば患者の処置の適当なコースを選択する基礎になるからである。

20

【0004】

組織学的試験は従来、サンプルの形態学的特徴を光学顕微鏡下で容易に観察できる組織染色方法を必要とする。病理学者は染色サンプルを試験した後、典型的には腫瘍サンプルが悪性かどうかを定性的に決定する。しかしながら単にサンプルの組織学的試験により腫瘍の攻撃性を確認するのは困難である。

【0005】

当該分野で公知の自動(コンピューターを使用)画像分析系によりサンプルの視覚試験が増加し得る。代表的な系では細胞または組織サンプルの拡大画像を特異的生物学的マーカーを検出する試薬に暴露し、画像を電荷結合素子(CCD)またはカメラ、例えばテレビカメラからの画像を受け取るコンピューターにより加工する。かかる系を用いて例えば特定のサンプル中のエストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PR)、またはオンコジーンHER-2/neuの発現レベルを検出および測定できる。この方法を用いてより有効な治療の投与計画を実行することができる。例えばサンプルがERおよびPRに関して陽性であるかを試験する場合、ホルモン治療を用いることができ、サンプルがHER-2/neuに関して陽性であるかを試験する場合、抗オンコジーンレセプター治療を用いることができる。例えばいくつかの技術が報告されている(非特許文献1~7参照。):

30

ナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス・コンセンサス・デベロプメント・コンフェレンス:「乳癌におけるステロイドレセプター」Breast Cancer(1991)、ベテスダ、メリーランド州;

Hancockら、Cancer Res. 51:4574-4580(1991);

Arteagaら、Cancer Res. 54:3758-3765(1994);

Bacusら、Anal. Quant. Cytol. Histol. 19:316-328(1997);

Sliwowskiら、Semin. Oncol. 26:60-70(1999);

Shak、Semin. Oncol. 26:71-77(1999);

50

Cobleighら、J. Clin. Oncol. 17: 2639 - 2648 (1999)。

【0006】

正常な哺乳動物の発達の一部として生じるアポトーシス、すなわちプログラム細胞死がほぼ100年前に最初に観察された。発達上の細胞死の誘導は種々の細胞外刺激により抑制され得る高度に制御された過程である。例えば、アポトーシスの成長抑制因子の意味深い生物学的な結果は、ニューロンの生存および機能的ニューロン回路の維持における標的由来のニューロトロフィンの重大な役割により例示される(PettmannおよびHenderson、Neuron 20: 633 - 647 (1998))。生存を促進する栄養因子の能力は少なくとも部分的にホスファチジルイノシタイド3'-OHキナーゼ(PI3K) / c - a k tキナーゼカスケードに寄与する。生存を促進し、アポトーシスを妨げる制御カスケードの能力の基礎となり得るPI3K / c - a k tシグナル発生経路のいくつかの標的が同定されている。細胞生存およびアポトーシス回避が癌細胞の無制限な増殖特性に必要な部分であるので、この挙動は癌診断に適切である。

10

【0007】

従って、患者から得られる細胞および組織標本を診断、ステージングおよび評価するための良好な方法の一部として；癌細胞を調節または切除する臨床努力の効果をモニター観察するといった最初の癌診断の一部として；または1次腫瘍細胞の再発もしくは転移疾患の存在を検出するために；アポトーシスを妨げることができる細胞とりわけ癌細胞を検出する技術が必要とされている。

20

特に、疾患の経過中できるだけ早期に改善された診断および正確な診断を行うために、腫瘍マーカー遺伝子生成物の発現の改善された検出法が当技術分野において必要とされている。

【0008】

(発明の開示)

本発明は動物、最も好ましくはヒト癌患者または癌を有していることが疑われる個体から得られる細胞または組織サンプル中のAKT1またはAKT2タンパク質発現および活性化レベルを定量する方法を提供する。具体的には本発明は撮像系を定量的に用いてAKT1およびAKT2タンパク質発現または活性化レベルを定量する方法を提供する。さらに具体的には本発明は撮像系を用いてAKTタンパク質特異的な色素で染色されている細胞または組織サンプルの画像を受け取り、増強し、加工する方法を提供し、かかる動物からの細胞または組織サンプルで発現されるAKTタンパク質の量または活性化レベルを決定する。

30

【0009】

本発明の方法の好ましい実施形態では、異なる量のAKTタンパク質を発現する少なくとも2つの細胞系に関してAKT1およびAKT2タンパク質の標準曲線を作成する。次いで標準曲線を用いて細胞または組織サンプル中で発現されたAKTタンパク質の量を定量的に決定する。活性化の特徴に特異的な試薬を用いて、活性化されたAKT1またはAKT2タンパク質に関して類似の標準曲線を作成できる。これを用いて臨床上の癌処置の前後でAKT(AKT1およびAKT2)の量および活性化状態の変化を決定することもできる。

40

【0010】

本発明の方法の1つの実施形態では細胞または組織サンプル中のAKT2タンパク質発現を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を用いて定量し、異なる量のAKT2タンパク質を発現する少なくとも2つの調節細胞系から調製した細胞ペレットの部分のAKT2タンパク質の量を決定し、これを細胞または組織サンプル中のAKT2の発現と比較する。本発明の方法の別の実施形態では、細胞または組織サンプルから単離されるc - a k t 2 m R N A の高密度オリゴヌクレオチドアレイへのハイブリダイゼーション、またはRT - P C Rによるかもしくはノーザンブロットハイブリダイゼーション実験によるc - a k t 2 m R N A 発現の決定により細胞または組織サンプルにおいて発現するAKT2

50

タンパク質の量を間接的に定量する。重要なことに、同一細胞ペレットの別個の部分を使い、抗AKT2抗体で染色し、続いて免疫組織学的分析により、好ましくはAKT-2タンパク質を検出するために使用される免疫組織学的染色に特異的な波長でサンプルの光学密度を測定することによりサンプル中のAKT2タンパク質の量を決定する。本発明の好ましい実施形態の実施において、最も好ましくはELISAにより決定されるAKT2タンパク質濃度をAKT2タンパク質に関する光学密度測定に対してプロットする標準曲線を準備する。細胞または組織サンプル中に発現されるAKT2タンパク質の量を決定するために、AKT2タンパク質に関して光学密度を測定し、対照細胞系から作成した標準曲線と比較する。

【0011】

本発明の具体的な好ましい実施形態が以下の特定の好ましい実施形態および請求の範囲のより詳細な記載から明らかになる。

【0012】

(好ましい形態の説明)

本発明は細胞性タンパク質、AKT1およびAKT2の発現および活性化レベルを定量的に決定する方法を提供し、これは個体からの細胞または組織サンプルにおいて検出される腫瘍細胞、とりわけヒト腫瘍細胞におけるアポトーシスの回避の媒介に関与する。これらの方法は哺乳動物とりわけヒトの正常および腫瘍細胞におけるアポトーシスの重要なメディエーターであるAKTタンパク質の同定に依存する。

【0013】

細胞の生存の重要なレギュレーターであるAKT(c-akt遺伝子により産生されるタンパク質)の同定は腫瘍形成および薬物抵抗に関して重大な意味を有する。例えばヒト腫瘍サプレッサーであるPTENの欠如はAKT活性の増加に相関する(Liら、Science 275:1943-1947(1997); Liawら、Nat. Genet. 16:54-67(1997); Nelenら、Hum. Mol. Genet. 6:1383-1387(1997); CantleyおよびNeel、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:4240-4245(1999); Dattaら、Genes Dev. 13:2905-2927(1999))。加えて、アポトーシスの抑制はAKTが発癌性を助長するときには有し得る機能のみではない。ある環境で、AKTは細胞サイクルの進行をも誘導できる。しかしながら、PTENの削除による活性ラスの過剰発現かまたは活性PI3Kの過剰発現のいずれかにより細胞がアポトーシスに対する抵抗性を付与できるという知見に鑑み、AKTがアポトーシスを抑制し得るといふ観察はオンコジーンがAKTの過剰活性化により適応性のある細胞性アポトーシスを遮断できることを示唆する。

【0014】

アポトーシスの機構が複雑であれば、AKTが細胞の生存を促進し、細胞死を阻止するように作用できる多くの経路が存在する。Bcl-2ファミリー遺伝子(これは細胞生存または細胞死において役割を果たすことが知られている)のメンバーの発現または作用を制御することにより、AKTはアポトーシスを遮断できる。また別に、AKTはタンパク質のカスパーゼファミリーの発現もしくは活性、または死レセプター経路の機能を制御できる。AKTの制御効果は直接的メカニズム、例えばアポトーシスの機構の構成要素のリン酸化によるか、または間接的メカニズム、例えば死機構の構成要素をコードする遺伝子の発現レベルを変化させることによる。最近の研究によりAKTが複数の部位でアポトーシスを制御することが示唆されている。BAD、カスパーゼ-9、転写因子のフォークヘッドファミリーおよびNFκBレギュレーターIKKなどの多くのAKT標的が同定されており、これらは全て細胞死の媒介において重大な役割を果たしている(Dattaら、前出(1999))。

【0015】

AKTによりリン酸化されることが解っているアポトーシスの機構の第1の構成要素はBcl-2ファミリーのメンバーのBADである。BCL-2に結合するその能力に基づい

10

20

30

40

50

てBADが同定された；Badの1次構造の分析により、これはBcl-2に類似することが示された（Yangら、Cell 80：285-291（1995））。AKTがBADの直接リン酸化によりBAD誘起の細胞死を抑制するという知見は、内因性PI3K/AKT経路が最高潮に達してBADのリン酸化に至ることを示唆する相関的な証拠に合致する。加えて、セラミド、紫外線（UV）照射、赤外線放射（IR）、およびソルビトールのごとき刺激は未知のメカニズムによりAKT活性を下方制御し、各々はまたBADリン酸化を阻止する（ZundelおよびGiaccia、Genes Dev. 12：1941-1946（1998））。

【0016】

AKTはまたカスパーゼ-9をリン酸化する。AKTを過剰発現する細胞系からの抽出物はインビトロでチクロームC媒介カスパーゼ-9活性化を遮断するので、このリン酸化事象は機能的に作用する。これらの結果はチクロームC放出の下流でのカスパーゼ-9の不活性化によりAKTが細胞生存を促進することを示唆している。カスパーゼ-9のリン酸化がどのようにその不活性化に至るのかは明らかではないが、カスパーゼ-9のリン酸化がタンパク質の内在性触媒活性を不活性化するようである。

10

【0017】

加えて、AKTがErbBファミリー遺伝子発現の腫瘍形成効果の媒介に関与するという明白な証拠がある。オンコジーンレセプターのErbBファミリー（HER）は4つのメンバー、HER（EGFR）、HER-2、（ErbB-2）、HER-3、およびHER-4を含有する。このレセプターファミリーにおける興味は、HER-2の過剰発現は細胞を形質転換し、ヒト乳癌および卵巣癌の進行および転移の増加に相関するという知見により大いに鼓舞されている。極最近では、HER-2のヒト化モノクローナル抗体がHER-2が過剰発現されている乳癌患者の処置に関して承認されている。このように乳癌の発達におけるHER-2過剰発現の重要性が確立されている（Liuら、Viochem. Biophys. Res. Commun. 261：897-903（1999））。

20

【0018】

HER-3（ErbB-3）およびHER-4（ErbB-4）レセプター双方のリガンドであるヘレグリンはヘテロ二量体の形成によりHer-2/neuを活性化できる。ヘレグリンはまたHER-2を発現するMCF-7細胞においてAKT酵素活性の強力および迅速なアクチベーターでもある。この活性化はPI3K経路のHER-2またはHER-3刺激により媒介される。さらに、BT474乳癌細胞中のHER-2の過剰発現はAKTの基礎活性の増加に相関する。最後に、乳癌患者の処置に用いられるHER-2のモノクローナル抗体はこれらの細胞における基礎AKT活性を低下させる。これはヘレグリン/HER-2の下流標的の1つであるPI3K/AKT経路に関与する。このように、PI3K/AKTカスケードは、HER-2過剰発現がさらに攻撃的な乳癌表現型を生じる能力において役割を果たし得る。

30

【0019】

AKT2はまた放射線または化学療法処置の後の細胞生存において、およびプログラム細胞死において重要な役割を果たす。例えば、AKT2は膵臓、乳房および卵巣癌において過剰発現されることが見出された。HER-2/neu過剰発現が検出された患者ではc-akt2遺伝子が転写的に活性化されることが見出されるのみならず、AKT2タンパク質もまた過剰発現されることが示されている。基礎レベルのHER-2/neuを発現するMCF-7細胞、およびHER-2/neu発現構築物でトランスフェクトされたMCF-7細胞を比較して、c-akt2 mRNAレベルはHER-2/neuトランスフェクトされたMCF-7において27倍増加した。HER-2/neuが過剰発現することが見出された腫瘍サンプルではAKT2が上方制御されることが見出された（表I）。

40

【0020】

【表1】

(表 I)

乳癌細胞におけるHER-2/neuおよびAKT2の画像定量分析

サンプル 番号	HER-2/neu 結果	Akt2 結果
00-98	0.01 (neg)	0.09
00-020	0.01 (neg)	0.08
00-024	0.01 (neg)	0.27
00-074	0.07 (neg)	0.10
00-248	0.10 (+1)	0.12
00-365	0.10 (+1)	0.02
00-373	0.10 (+1)	0.05
00-388	0.10 (+1)	0.05
00-52	0.10 (+1)	0.09
00-302	0.11 (+1)	0.07
00-201	0.11 (+1)	0.14
00-376	0.11 (+1)	0.02
00-392	0.11 (+1)	0.08
00-221	0.11 (+1)	0.09
00-51	0.12 (+1)	0.03
00-319	0.12 (+1)	0.04
00-117	0.13 (+1)	0.10

10

20

30

【表 2】

00-49	0.14 (+1)	0.21
00-407	0.14 (+1)	0.01
00-380	0.14 (+1)	0.13
00-79	0.14 (+1)	0.12
00-299	0.15 (+1)	0.04
00-332	0.15 (+1)	0.15
00-250	0.16 (+1)	0.02
00-28	0.16 (+1)	0.04
00-07	0.16 (+1)	0.04
00-202	0.21 (+3)	0.30
00-386	0.23 (+3)	0.34
00-162	0.23 (+3)	1.30
00-163	0.25 (+3)	0.70
00-352	0.26 (+3)	0.29
00-377	0.27 (+3)	0.48
00-04	0.27 (+3)	0.08
00-316	0.28 (+3)	0.26
00-123	0.29 (+3)	0.60
00-411	0.34 (+4)	0.48
00-412	0.34 (+4)	0.42
00-288	0.36 (+4)	0.38
00-278	0.36 (+4)	0.60
00-153	0.37 (+4)	0.97
00-154	0.38 (+4)	2.50
00-308	0.44 (+4)	0.38
00-349	0.50 (+4)	0.58
00-08	0.54 (+4)	0.79
00-314	0.54 (+4)	0.33
99-2415	0.57 (+4)	1.45
00-124	0.59 (+4)	0.48
99-2430	0.65 (+4)	1.29
00-408	0.70 (+4)	0.93
00-25	0.99 (+4)	1.00
00-335	1.00 (+4)	1.00
00-05	1.12 (+4)	0.61

10

20

30

40

表中、AKT2の結果は光学密度の任意の単位で示し、一方HER-2/neuの結果は細胞あたりのHER-2/neuのピコグラムで示す。

【0021】

これらの結果は、HER-2/neuを過剰発現する乳癌におけるAKT2の活性化およ

50

び過剰発現がこれらの癌の攻撃的な生物学的挙動の重要な因子であり得ることを示唆している。A K Tシグナル発生経路の構成要素を指向する治療薬およびA K Tタンパク質のレベルを検出および測定し、並びにかかる活性化状態を検出および測定する診断試験はかかる癌の処置において重要である。当該分野では患者から得られた細胞または組織サンプルにおけるA K Tタンパク質レベルおよびその活性化状態を決定するための信頼性のあるアッセイが必要とされている。また満足できる方法では病理学者が分析から正常組織を排除することが可能でなければならない。

【0022】

本発明の方法の好ましい実施形態の実施において、2成分免疫組織化学的染色系を用いて細胞ペレットまたは組織が1色で対比染色され、一方細胞ペレットまたは組織サンプル中の目的のタンパク質は別の色で染色される。次いで細胞ペレットおよび組織サンプル中の細胞の画像を光学顕微鏡で拡大し、一对の別個の画像に分割する。各々の特定の色素に関して最大吸収を有するように特に適合させた一对の光学フィルターを用いて分割された画像を増強する。光学フィルターの1つは対比染色された組織の吸収波長の波長を有する光を優先的に透過させる。別の狭い帯域光学フィルターは目的のタンパク質を検出するために用いられる色素に関するスペクトル吸収の領域で優先的に透過させる。画像分析フィルターを用いて、種々成分、例えば膜、細胞質および核などにおける異なる細胞性タンパク質を定量できる。いずれかの測定を行う前に最適な結果に関して撮像系を換算する。

10

【0023】

本発明の好ましい実施形態およびその利点は実施例1から5を参考にすると最もよく理解される。これらの実施例は本発明の具体的な実施形態、およびその種々の使用を説明するものである。これらは説明目的でのみ提示するものであり、本発明を限定すると考えるべきではない。

20

【0024】

(実施例1)

A K T 2タンパク質発現の画像分析

前記するように2成分免疫組織化学的染色系を用い、K A T 2タンパク質の異なる量を発現する少なくとも2つの細胞系を用いて標準曲線を作成する。ヒト癌患者からの細胞または組織サンプルを対照細胞ペレットの第2の部分と同一の様式で染色し、免疫組織化学的染色の程度を測定する光学密度を各被験組織サンプルに関して決定する。本発明の方法の好ましい実施形態では、組織サンプルおよび細胞ペレットの第2部分を同時に染色して、使用した色素のロット間で起こり得るいずれかの差異または染色方法における変化を明らかにする。対照細胞系におけるA K T 2タンパク質の測定値から作成した標準曲線を用いて組織サンプル中の生物学的タンパク質の量を決定する。

30

【0025】

画像分析で換算した画素あたりの平均合計光学密度をA K T 2タンパク質陽性染色された画像の全光学密度を考慮して、対比色素、例えばファスト・グリーンまたはエチル・グリーンを用いて染色された画像全画素数でそれを割り、膜または核部分を含んでなる全画素数を誘導する。各々の染色後に標準曲線を作成する。

【0026】

標準曲線を誘導して、細胞ペレットを標準として用いて組織中のA K T 2タンパク質レベルを定量できるように系を換算する。当該分野で公知のE L I S Aにおける酵素反応により形成される色の強度は、アッセイの動作範囲内でサンプル中のA K T 2タンパク質の濃度に比例する。A K T 2タンパク質濃度(E L I S Aよりフェムトモル/mg)または細胞あたりのレセプターを、これらの3つのペレットの別個の部分からの染色スライドカットの画像分析からの平均O . D . データに対してプロットすることにより曲線が得られる。

40

【0027】

(実施例2)

H E R - 2 / n e uタンパク質発現の画像分析

50

一例としてHER-2/neuを用いて、ELISAで決定されたタンパク質mgあたりHER-2/neuの量(フェムトモル)が公知である、HER-2/neu発現細胞に対応する4つの凍結細胞キャリブレーターペレットを切断し、染色の各ラウンドで患者の組織切片と共に染色した。各組織に関して2つの部分を試験した：一方は凍結薄切をO.C.T.(オプティマル・カッティング・テンパーチャー、バクスター・サイエンティフィック・プロダクツ、マックグロウ・パーク、イリノイ州)に包埋したものであり、他方はELISAアッセイで使用するために液体窒素中ですりつぶし、ホモジナイゼーションバッファー中に入れたものであった。各組織のELISA部分を、カルピオケムELISAキットを用いてHER-2/neuのために加工した。次いでこれらの染色したスライドを画像分析を用いて定量し、平均O.D.(HER-2/neu)を決定した。ELISAにより決定したキャリブレーター細胞系において発現されたHER-2/neuタンパク質の量および画像分析を表I Iに示す。

10

【0028】

【表3】

(表I I)

HER-2/neu ELISAおよびHER-2/neu画像分析(IA)

20

4つの細胞ペレットに関する定量データ

ペレット	ELISA fm/ μ g	IA fm/ μ g
MCF-7	0.28	0.24
HER-2でトランスフェクトされたMCF-7	0.53	0.55
MDA-MB543	1.31	1.37
SKBR3	>3.07	3.04

30

各キャリブレーターペレットに関する平均O.D.を、同一のキャリブレーターペレットのELISAから誘導したタンパク質mgあたりのHER-2/neuの値に対してプロットした。次いでこのグラフからの等式を用いて、定量値からの平均O.D.を用いて5つの患者組織サンプルのHER-2/neuの量(フェムトモル)を誘導した。組織サンプルの染色の各々のラウンドを1組のキャリブレーターペレットからの切片と組み合わせて行った。一連の組織を試験した各時間での染色の実施にペレットを含め、その定量値(平均O.D.)を用いて標準曲線を作成した。ELISAにより決定される患者組織サンプルにおいて発現されたHER-2/neuタンパク質の量および画像分析を表I I Iに示す。

40

【0029】

【表4】

(表 I I I)

HER-2/neu ELISAおよびHER-2/neu画像分析 (IA)

5つの乳癌組織における定量

組織サンプル	ELISA fm/μg	IA fm/μg
98-510	0.23	0.30
98-511	1.74	1.12
98-551	0.05	0.08
98-594	0.16	0.76
98-664	0.17	0.20

10

これらの方法の結果は、この方法が腫瘍細胞により発現されるHER-2/neuの量に関する定量値を生じること示している。表Iは正常レベル(+1)HER-2/neuまたは過剰発現HER-2/neuのいずれかを発現する乳房組織におけるAKT2タンパク質のレベルを決定するために抗体単位の光学密度を用いて得られた予備試験の結果を示す。HER-2/neuを過剰発現する癌(+3または+4)では高レベルのAKT2

20

【0030】

(実施例3)

AKT上方制御はHER-2/neu過剰発現に随伴し、インビトロでアポトーシスに抵抗性を付与する

空気中に8% CO₂を伴う加湿インキュベーター中37℃で、MCF7(ミシガン・キャンサー・ファウンデーション、デトロイト、ミシガン州より入手)および、予めMCF7細胞をErbB-2 cDNA発現ベクターで形質導入することにより作製した(Bacusら(1996); Pelesら(1993); Dalyら(1997))、発現が5から8倍増のHER-2/neuを発現するMCF7/HER-2/neu細胞を、10% ウシ胎児血清、ペニシリン(100 μg/ml)を補充したRPMI 1640(ギブコ、グランド・アイランド、ニューヨーク州)中で成長させた。PI3キナーゼ/Aktインヒビターウォルトマニン(カルビオケム、サンディエゴ、カリフォルニア州)の存在下または不在下、低酸素条件を増強させながら細胞にアポトーシスを誘導した。ウォルトマニンで処置した細胞を、細胞をプレートしてから7から48時間後、1から3日間50 μMのインヒビターに暴露した。低酸素条件下、MCF7細胞はアポトーシスに鋭敏であった。ウォルトマニンの存在下でのみ、低酸素下でのMCF7細胞の生存に関して限界有効性を有した。しかしながら、MCF7/HER-2/neu細胞は低酸素下でアポトーシスに抵抗したが、ウォルトマニンに暴露したMCF7/HER-2/neu細胞の生存性は大きく減少した。従って、HER-2/neuを過剰発現する細胞の低酸素に対する細胞の抵抗性はAKT経路の活性化に随伴する。低酸素下での細胞生存性におけるPI3キナーゼ/AKTおよびHER-2/neu経路の役割が低酸素条件下の種々細胞系の成長により確認され、生存性とHER-2/neuの発現は相関した。

30

40

【0031】

MDA-MB-435およびMDA-MB-435/HER-2細胞をATMD アンダーソン癌センター、ヒューストン、テキサス州のDr. Yuより入手した。8% CO₂中37℃で、前記のように補充したRPMI 1640中細胞を成長させた。以下のとおり

50

ウェスタン・プロットを行った。溶解バッファー（50 mM トリス - HCl、pH 7.4、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1% ノンダイエット P-40、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM フッ化ナトリウム、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、1 μg/ml ペプスタチン、2 μg/ml ロイペプチン、2 μg/ml アプロチニン）中細胞を溶解し、6500 g、4 で5分間遠心し、バイオラッド・プロテイン・アッセイキット（バイオラッド、ヘルクレス、カリフォルニア州）でタンパク質濃度を決定した。ビス・トリス NuPAGE システムを用いて 1×MOP S ランニングバッファー（ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州）で電気泳動してタンパク質を分離し、ハイボンド C エクストラ・メンブラン（アメルシヤム・ファルマシア・バイオテック、ピスカッタウェイ、ニュージャージー州）に移した。膜を脱脂粉乳で遮断し、適当な抗体と共にインキュベートし、PBS（リン酸塩緩衝生理食塩水）で洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート 2 次抗体と共にインキュベートした。ルネサンス・ケミルミネセンス・リージェント・プラス（NEN ライフ・サイエンス、ボストン、マサチューセッツ州）で検出を実施した。HER-2/neu を 10 倍過剰に発現する MDA-MB-435/HER-2 細胞を、ウェスタン・プロット分析により決定した親の MDA-MB-435 細胞系と比較した。これらの細胞からのライゼートを収集し、2つの異なる AKT-2 に対する抗体、ポリクローナル抗体（サンタ・クルーズ、カリフォルニア州）およびモノクローナル抗体（dr. Testa、フォックス・チェース癌センター、フィラデルフィア、ペンシルバニア州）を用いるウェスタン・プロット分析により AKT-2 発現を試験した。HER-2/neu を過剰発現する細胞において AKT-2 レベルの増加が観察された。

10

20

【0032】

（実施例 4）

AKT-2 上方制御は癌における HER-2/neu の過剰発現に相関する
42 人の患者からの腫瘍サンプルを c-akt1 および c-akt-2 発現に関して試験した。組織を 2 群：正常レベル（+1 まで）の HER-2/neu を発現する群および HER-2/neu を過剰発現する（+2 から +3 まで）群に分けた。組織を AKT-1 および AKT-2 に関して染色した。AKT-1 レベルは双方の群で類似したが、画像分析により HER-2/neu 過剰発現組織では AKT-2 が 10 倍まで上方制御されたことが示された（図 1）。図 2 は免疫組織化学分析により、乳癌腫瘍のパラフィン切片で AKT-2 の高発現が HER-2/neu の過剰発現と相関することを示している。

30

【0033】

（実施例 5）

HER-2/neu を過剰発現する細胞における c-akt の活性化
HER-2/neu を過剰発現する細胞における全 AKT（AKT-1 プラス AKT-2）の活性化（リン酸化）状態を測定し、HER-2/neu 過剰発現細胞および癌における c-akt の機能的な重要性を研究した。全て HER-2/neu を過剰発現する SKBR3、BR474、および AU565 細胞（セル・カルチャー・ラボラトリー・ネービー・バイオサイエンス・ラボラトリー、ネービー・サプライ・センター、オークランド、カリフォルニア州）を、プレート後 7 から 48 時間に 1 から 3 日間、公知の c-akt アクチベーター、NDF/ヘレグリン（10 ng/ml；Y. Yarden、レオボット、イスラエルより贈呈）、または HER-2/neu に対するモノクローナル抗体、ヘルセプチン（20 mg/ml）で処理した。SKBR3、BR474、および AU565 細胞からの細胞ライゼートを前記のようにウェスタン・プロットにより試験した。AKT タンパク質のリン酸化状態を特異的に認識する抗体により活性化された AKT を測定した。細胞を前記のように溶解し、抗 AKT-1 および抗 AKT-2 抗体を用いる免疫沈澱に供した。以下のとおり免疫沈澱を実施した。細胞ライゼート（バッファー 500 μl あたりタンパク質 250 μg）をプロテイン A + プロテイン G アガロース・ビーズ（ギブコ BR L ライフ テクノロジーズ、ロックビル、メリーランド州）と共にプレインキュベートし、抗 AKT-1 または抗 AKT-2 抗体（アップステート・バイオテクノロジー、レー

40

50

ク・プラシッド、ニューヨーク州) 0.5 μ g と共に 4 で一晩インキュベートし、続いてプロテイン A + プロテイン G アガロース・ビーズ 40 μ l と共に 1 時間インキュベートした。免疫複合体を冷溶解バッファーで洗浄し、抗ホスホ-Akt を用いるウェスタン・プロットにより試験して、AKT-1 または AKT-2 のリン酸化形態を検出した (図 3)。

【0034】

AKT の全量および AKT-1 のリン酸化はヘレグリンで処理した細胞において増加した。ヘルセプチンでの処理により全 AKT および AKT-1 のリン酸化が低減した。AKT-2 リン酸化の基礎レベルは高く、ヘレグリンまたはヘルセプチンでの処理の後高いままであった。ヘルセプチンおよびヘレグリンに 3 日間暴露することにより AKT-1 のリン酸化状態が下方制御されたが、AKT-2 には影響しなかった。従って、NDF / ヘレグリンによる HER-2 / Her-3 レセプターの活性化により AKT および AKT-1 の活性化に至る。HER-2 / neu の下方制御に導くヘルセプチンでの処理によっても、AKT-1 の下方制御に至るが、AKT-2 では至らなかった。HER-2 および HER-3 のヘテロ二量体形成が AKT-1 の活性化において役割を果たすかどうかを決定するために、未処理 NDF およびヘルセプチン処理 MDA-MB-474 細胞から HER-3 を免疫沈澱させた。免疫沈澱物を抗 HER-2 抗体を用いるウェスタン・プロットにより分析した。AKT 活性化の下方制御は HER-2 / Her-3 ヘテロ二量体の下方制御に相関する。ヘルセプチンでの処理はこれらのヘテロ二量体の下方制御を随伴し、これは AKT-1 活性の下方制御に至る。リン酸化 AKT-2 の基礎レベルはヘレグリンまたはヘルセプチンでの処理により影響を受けなかった。

10

20

【0035】

前記の開示は本発明の特定の具体的な実施形態を強調するものであって、それらに等価な全ての修飾または変更は添付の請求の範囲に示す発明の精神および範囲内であることを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は腫瘍切片の乳癌細胞の画像分析による HER-2 / neu および AKT-2 定量の結果を示すチャートである。AKT-2 の結果は光学密度の任意の単位を示し、一方 HER-2 / neu の結果は細胞あたりの HER-2 / neu タンパク質をピコグラムで表現する。HER-2 / neu を過剰発現しない細胞 (+1 および陰性) を黒く塗りつぶした四角で示し、+2 および +3 に対応するレベルで HER-2 / neu を発現する細胞を灰色の四角で示す。

30

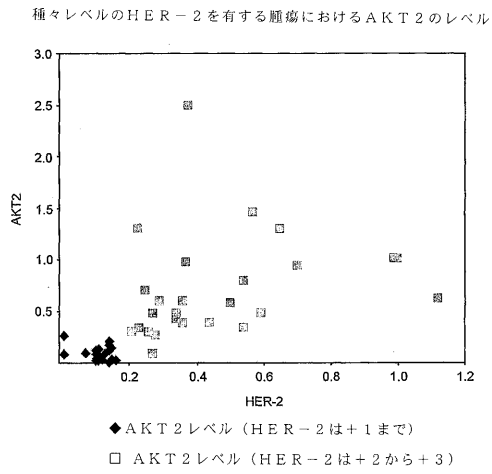
【図2】 図2は HER-2 / neu に関して (2114 Her-2 IHC)、AKT-2 に関して (2114 AKT2 IHC)、またはアルカリ性ホスファターゼ技術により染色し、蛍光インサイチュアハイブリダイゼーション (FISH) 分析 (2114 HER-2 FISH) を提供するフォイルゲン法により対比染色した乳癌組織のパラフィン切片の免疫組織学的分析である。

【図3】 図3はリン酸化および非リン酸化形態の AKT1 および AKT2 のレベルを示すウェスタン・プロットである。レーン1: 負制御、レーン2: AKT 活性 NDF / ヘレグリン使用の治療、レーン3: ヘルセプチン使用の治療。

40

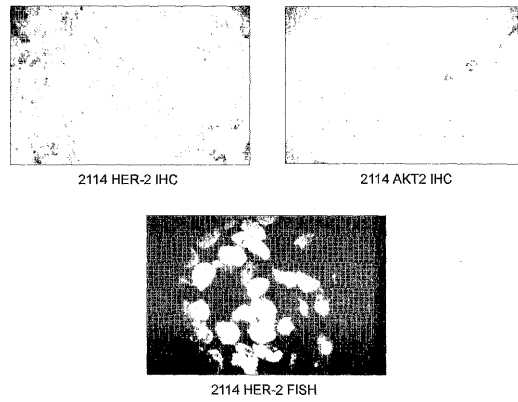
【 図 1 】

FIG. 1



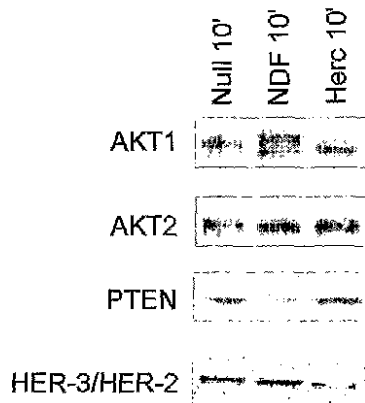
【 図 2 】

FIG. 2



【 図 3 】

FIG. 3



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 2
C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 バッカス、 サラ エス .
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 1 2 6 エルムハースト エス . ルート 8 3 9 2 5
(72)発明者 グドコフ、 アンドレイ
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 2 2 グレンコー サンセット レーン 7 0 0

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特開昭 6 3 - 0 6 6 4 6 5 (J P , A)
特表 2 0 0 0 - 5 1 0 2 6 6 (J P , A)
特表 2 0 0 1 - 5 1 8 3 0 2 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53
C12Q 1/68
G01N 33/48
G01N 33/483
G01N 37/00
C12N 15/09

专利名称(译)	定量测定AKT蛋白表达的方法		
公开(公告)号	JP4317913B2	公开(公告)日	2009-08-19
申请号	JP2001576470	申请日	2001-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司 伊利诺伊州的盐湖研究所董事会		
当前申请(专利权)人(译)	每次塔纳Medeikaru系统公司的Rete 伊利诺伊州的盐湖研究所董事会		
[标]发明人	バックスサラエス グドコフアンドレイ		
发明人	バックス、サラ エス. グドコフ、アンドレイ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/483 G01N37/00 C12N15/09 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/5008 G01N33/5011 G01N33/5091 G01N33/57484 G01N33/68 G01N33/6845 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.A G01N33/48.P G01N33/483.C G01N37/00.102 C12N15/00.A		
代理人(译)	三好秀		
优先权	60/197780 2000-04-14 US		
其他公开文献	JP2004512495A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测和定量细胞或组织样本中AKT蛋白及其活化状态的方法。具体地，本发明涉及免疫组织化学测定，其被翻译用于另一种免疫学，生物化学或分子生物学测定以量化这些蛋白质的表达或活化水平。与用于检测AKT1或AKT2蛋白或其活化衍生物的成像系统组合。

サンプル 番号	HER-2/neu 結果	Akt2 結果
00-98	0.01 (neg)	0.09
00-020	0.01 (neg)	0.08
00-024	0.01 (neg)	0.27
00-074	0.07 (neg)	0.10
00-248	0.10 (+1)	0.12
00-365	0.10 (+1)	0.02
00-373	0.10 (+1)	0.05
00-388	0.10 (+1)	0.05
00-52	0.10 (+1)	0.09
00-302	0.11 (+1)	0.07
00-201	0.11 (+1)	0.14
00-376	0.11 (+1)	0.02
00-392	0.11 (+1)	0.08
00-221	0.11 (+1)	0.09
00-51	0.12 (+1)	0.03
00-319	0.12 (+1)	0.04
00-117	0.13 (+1)	0.10