

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 43046

( P2003 - 43046A )

(43)公開日 平成15年2月13日 (2003.2.13)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* ( 参考 )
G 0 1 N 33/574		G 0 1 N 33/574	A 2 G 0 4 5
	33/48	33/48	B 4 B 0 6 4
	33/53	33/53	P
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	V
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L ( 全 4 数 )			

(21)出願番号 特願2001 - 231731(P2001 - 231731)

(22)出願日 平成13年7月31日(2001.7.31)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年2月5日 発行の「THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS VOL.85 NO.2」に発表

(71)出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所  
熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

(72)発明者 福留 健司

佐賀県佐賀市八戸溝3 - 10 医大宿舍512

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA13 BA14 BB03  
BB20 BB22 BB24 CA25 CB01  
CB17 DA36 DA44 DA78 FB03  
FB06  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15

(54)【発明の名称】 乳癌判定用マ-カ-及び該マ-カ-を用いる乳癌の判定方法

(57)【要約】

【目的】 乳癌の進行度や発病の危険性を知るための判定方法を提供し、また判定に使用するマ-カ-となる物質を提供することを目的とする。

【構成】 内皮細胞特異的プロテインCレセプター(E P C R)を好適なマ-カ-とし、抗E P C R抗体を用いた免疫学的検出方法を適用する。

【効果】 細胞や核の形態の観察だけでは見逃す可能性のある乳癌細胞の検出、手術のリンパ節の廓清の程度を決定する為のリンパ節における乳癌細胞の検出及び転移後の同様な判定と治療に用いられ得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 内皮細胞特異的プロテインCレセプター(Endothelial Protein C Receptor:以下、EPCRと称することがある)を本態とする乳癌判定用マーカー。

【請求項2】 生物学的試料中のEPCRの存否を確認し、該物質の存在により陽性と判断することを特徴とする乳癌の判定方法。

【請求項3】 生物学的試料中のEPCRの存否を確認するに当たり、抗EPCR抗体を用いた免疫学的検出方法を適用する請求項2記載の乳癌の判定方法。

【請求項4】 前記免疫学的検出方法が免疫染色法である請求項3記載の乳癌の判定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本願発明は癌の判定方法に関し、詳細には、内皮細胞特異的プロテインCレセプター(Endothelial Protein C Receptor:以下、EPCRと称することがある)を本態とする乳癌判定用マーカー及び該マーカーの存在を抗EPCR抗体を用いて検出する乳癌判定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】癌を確定診断(判定)する場合、一般に病理診断が行われる。その際、細胞及び核の形状等で診断するが、さらに免疫染色により予後の推測に関わる情報が得られる。現在免疫染色で乳癌細胞を高率に検出する抗原は見い出されていない。この事は手術後の残存した乳癌細胞及びリンパ節等の転移における乳癌細胞の検出を困難としている。また、血清中の腫瘍マーカーとして特異性の優れた腫瘍マーカーはない。

【0003】現在用いられている乳癌の腫瘍マーカーはCAE、CA15-3、TPA、BCA225、NCC-ST-439等であるが、原発性乳癌では10%程度の検出率であり、再発乳癌では50%程度の発現である(広岡保明等、臨床検査、vol.39、p.1163-1167、1995)。従って、乳癌を特異的にしかも高率に検出できる腫瘍マーカーが望まれている。

## 【0004】

【課題を解決するための手段、構成】本願発明者らは、上記課題を克服するために鋭意研究を重ねた結果、内皮細胞特異的プロテインCレセプター(EPCR)が乳癌細胞に発現すること、そして、EPCRに対する抗体による免疫染色により乳癌細胞が高率(95%以上)に染色される事を見出し、本願発明を完成した。EPCRは238アミノ酸からなり、CD1/主要組織抗原複合体とホモロジーを持つ1型膜貫通型糖タンパク質である。当該レセプターはプロテインCまたは活性化プロテインC(PC/APC)と高親和性を持ち、PCのG1ドメインと結合し、機能的には膜上でのPCの活性化を促進する(Fukudome K. et al., J. Biol. 50

Chem. vol.269, p.26496-26491, 1994)。EPCRは生体内では大血管の内皮細胞に主に発現し、毛細血管では発現していない(Laszik Z. et al., Circulation, vol.96, p.3633-3640, 1997)。また、その他の正常細胞の組織での発現は確認されていない。

【0005】EPCRが乳癌の組織に高率に発現している事は、乳癌の確定診断(判定)や治療に高い有用性をもたらす。細胞や核の形態の観察だけでは見逃す可能性のある癌細胞の検出、手術のリンパ節の廓清の程度を決定する為のリンパ節における癌細胞の検出及び転移後の同様な判定と治療に用いられ得る。

【0006】なお、本願発明のEPCRとは内皮細胞上に発現し、プロテインCもしくは活性化プロテインCに結合するレセプターを意味する。文献等(Fukudome K. et al., J. Biol. Chem. vol.269, p.26496-26491, 1994)には配列が示されているが、人種及び個人差からプロテインCもしくは活性化プロテインCに結合能を示すものであれば、配列もしくは発現部位からの制約を受けない。これらの配列から発現してくる蛋白に結合能を有する抗体もしくは蛋白の調製法に関して、後述の(a)-(r)に何ら制約を受けない。

【0007】また、EPCRは血中に於いてはsEPCRが確認されており、これは、EPCRの細胞外領域(soluble EPCR:sEPCR)が発現しているものと考えられている(Kurosawa S. et al., J. Clin. Invest., vol.100, p.411-418, 1997)。乳癌に於いて発現したEPCRが切断されたsEPCRが血中に存在すれば、血中の有効な腫瘍マーカーとなりうる。

【0008】本願発明のEPCR検出による乳癌の判定方法の工程は、概略下記のとおりである。EPCRまたはsEPCRに対する抗体を調製する。ここで、抗原は前記範疇のEPCRまたはsEPCRであれば特段の制約はない。抗体は種々の方法で調製することができ、動物種及びポリクローナル、モノクローナルの制約はない。抗体調製の好適な例は、遺伝子組換え由来のEPCRまたはsEPCRを抗原としてハイブリドーマ法に基づいてモノクローナル抗体を調製する方法、または抗体ファージライブラリー法によって選択した好適なファージもしくは当該ファージが感染した微生物が産生するポリペプチドを利用する方法等が推奨される。

【0009】本願発明で推奨される抗EPCR抗体の調製方法は以下のとおりである。(1)(a)EPCRをコードし、哺乳動物由来の細胞で複製、転写及び翻訳されるDNA配列を含む組換えプラスミド発現ベクター、及びラット由来細胞よりなる宿主-ベクター発現系を準備し、形質転換、形質導入及びトランスフェクションからなる群から選択される方法により、組換えプラスミド発

現ベクターをラット由来の細胞に導入する。ラットの尾部に前記細胞を完全アジュバントと共に免疫する。免疫したラットのリンパ節よりリンパ球を取り出し、もしくは、(b)EPCRをコードし、哺乳動物由来の細胞で複製、転写及び翻訳されうるDNA配列を含む組換えプラスミド発現ベクター、及び哺乳動物由来細胞よりなる宿主-ベクター発現系を準備し、形質転換、形質導入及びトランスフェクションからなる群から選択される方法により、組換えプラスミド発現ベクターを哺乳動物由来の細胞に導入、培養しその上清を回収する。その上清より

sEPCRを各種クロマトグラフィー等で精製し、動物に免疫し、数週間後にリンパ節もしくは脾臓を取り出しリンパ球を回収する。そして、前記リンパ球と不死化した細胞とでハイブリドーマを形成し、EPCRと反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択する。そのハイブリドーマを大量に培養して培養上清を調製する。もしくはそのハイブリドーマを免疫不全マウスに移植し、腹水を調製する。上清もしくは腹水より抗体を調製する。

【0010】(2)ヒトの抗体ファージライブラリーを動物細胞由来のsEPCRを抗原としてスクリーニングし、sEPCRと特異的に反応するファージを選択する。そのファージもしくはそのファージが感染した大腸菌が産生するsEPCRに結合する抗体のV領域を持つポリペプチドもしくはタンパク質を精製する。

【0011】得られた抗体を用いて乳癌の組織染色、もしくは酵素免疫測定法(Enzyme Immuno Assay)等免疫学的測定方法により血中のsEPCRの定量を行なう。対象となる生物学的試料は各々組織切片と血液である。組織染色では、抗EPCR抗体を組織切片に対して反応させた後、HRP(horseradish peroxidase)等各種標識物質を結合した2次抗体を反応させ発色させる。発色の有無により乳癌判定する。適用され得る免疫学的測定方法としては、酵素免疫測定法、放射免疫測定法、ウェスタンブロット法、凝集法、免疫比濁法または免疫拡散法等が例示される。

【0012】

【発明の効果】本願発明により、EPCRとの結合能を有する抗体を用いて組織染色もしくは血中のEPCR(sEPCR)を検出することより、乳癌細胞の有無を知ることができる。以下に実施例を挙げて本願発明を具体的に説明するが、本願発明はこれらの例に何ら限定されるものではない。

【0013】

【実施例】実施例1  
(モノクローナル抗体の作製)EPCRの発現プラスミド(pEF-BOS-EPCR)(Fukudome K. et al., J. Biol. Chem. vol.269, p.26496-26491, 1994)をrat3Y1繊維芽細胞にリン酸Ca法(Graham et al.,

Virology, vol.52, p.456-467,)により導入し、G418によりプラスミド導入細胞を選択した。その発現細胞(RE-1)を完全アジュバントと共に一匹のラット当たり $5 \times 10^7$ 個を尾部に注入した。一週間後に鼠径部のリンパ節より細胞を採取し、マウスのSP2/0ミエローマ細胞(CRL1581, ATCC)とポリエチレングリコールと融合させた。そのハイブリドーマをHAT培地により選択した(Galfrè et al., Nature, vol.266, p.550-552)。その上清に於けるEPCR結合抗体の有無を調べる為に、EPCRを発現する293細胞(CRL1573, ATCC)がRE-1と同様に作製された(以下、SE-1)。

【0014】EPCR発現細胞(SE-1)、 $1 \times 10^5$ と上清を1%BSA Hanks balanced salt solution(HBSS)中で室温で遮光して反応させた。洗浄後、FITCラベル抗ラット抗体を反応させフローサイトメーター、FACScan(Becton Dickinson)により解析した。その結果染色された上清を陽性とした。さらにそれらの細胞を限界希釈法により反応・解析を2サイクル行なって、陽性細胞をクローニングした。クローニングされた陽性細胞を免疫不全マウスに移植し、腹水を調製した。上清もしくは腹水より、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって抗EPCR抗体を精製した。好適な抗体としてRCR-379が得られた。

【0015】実施例2

(乳癌組織切片の免疫染色)組織標本は外科手術より得られたものである。その乳癌のホルマリン固定組織もしくはパラフィン包埋組織より $4 \mu\text{m}$ の切片を作製した。その切片を水酸化珪素をコートしたスライドガラスの上で切断し、キシレンで脱パラフィンを行ないエタノールで再水和化を行なった。内在性のペルオキシダーゼ活性を除去する為に10分間0.3%過酸化水素を含むメタノールでその切片を反応させた。抗原性を増強する為に煮沸温度で10mMクエン酸バッファー(pH6.0)で15分間超音波処理を実施した。抗EPCR抗体であるRCR-379を用いて $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で室温一昼夜組織切片に対して反応させた。その後の検出反応は、ビオチン化抗体及びhorseradish peroxidase標識アビジン-ビオチン複合体はVectastain Elite ABC kit(Vector Laboratories)に含まれている試薬を用いてマニュアルに従って反応させた。発色は3,3'-diaminobenzidine(含0.005% $\text{H}_2\text{O}_2$ /10mM NaN<sub>3</sub>)により行なった。封入する前にヘマトキシリンエオジンで対比染色を行なった。

【0016】乳癌患者の浸潤性乳管癌の切片に対して96%の高頻度に陽性の結果が得られた。しかし、腸管線腫の切片では染色されなかった。その結果を図1に示

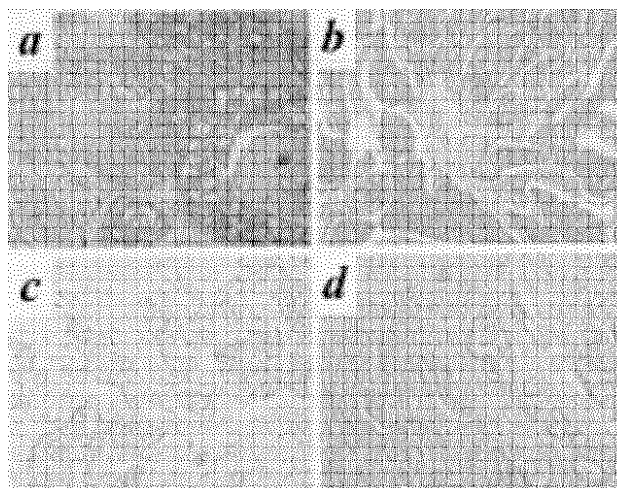
す。

【図面の簡単な説明】

【図1】本願発明の乳癌の判定方法を浸潤性乳管癌及び

腸管線腫の切片に適用し、乳癌特異的に判定可能であることを示す免疫染色図(浸潤性乳管癌切片(a, b)、腸管線腫切片(c, d))である。

【図1】



专利名称(译)	用于确定乳腺癌的标记物和使用标记物确定乳腺癌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003043046A</a>	公开(公告)日	2003-02-13
申请号	JP2001231731	申请日	2001-07-31
申请(专利权)人(译)	财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	福留健司		
发明人	福留 健司		
IPC分类号	G01N33/574 C12P21/08 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/574.B G01N33/48.P G01N33/53.V C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/DA78 2G045/FB03 2G045/FB06 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[目的]提供一种判断乳腺癌进展程度和发病风险的判断方法，并提供用作判断标志的物质。 构建性内皮细胞特异性蛋白C受体 ( EPCR ) 用作合适的标记物，并且应用使用抗EPCR抗体的免疫学检测方法。 【效果】检测乳腺癌细胞可能仅通过观察细胞和细胞核的形态，检测淋巴结中的乳腺癌细胞，确定淋巴结清扫的程度和转移后的类似测定可用于治疗。

【图 1】

