

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4395004号
(P4395004)

(45) 発行日 平成22年1月6日(2010.1.6)

(24) 登録日 平成21年10月23日(2009.10.23)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	Z N A D
C 1 2 Q 1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2004-135222 (P2004-135222)	(73) 特許権者	596001036
(22) 出願日	平成16年4月30日(2004.4.30)		株式会社キューリン
(65) 公開番号	特開2005-315763 (P2005-315763A)		福岡県北九州市八幡西区森下町27番25号
(43) 公開日	平成17年11月10日(2005.11.10)	(74) 代理人	100104673
審査請求日	平成19年4月26日(2007.4.26)		弁理士 南條 博道
		(72) 発明者	河野 公俊
			福岡県北九州市八幡西区大浦3-15-3-306
		(72) 発明者	笹栗 靖之
			福岡県福岡市中央区警固2-6-14
		審査官	白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胚細胞腫瘍の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗 d b p C 抗体を用いて胚細胞腫瘍の d b p C を免疫組織化学的に染色する工程を含む、胚細胞腫瘍の検出方法。

【請求項2】

前記抗 d b p C 抗体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

標識された抗 d b p C 抗体を含む、胚細胞腫瘍検出用キット。

【請求項4】

抗 d b p C 抗体、および該抗 d b p C 抗体に対する標識抗体を含む、胚細胞腫瘍検出用キット。

【請求項5】

前記抗 d b p C 抗体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体である、請求項3または4に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍の検出方法に関する。より詳細には、胚細胞腫瘍を特異的に検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌や腫瘍の確定診断は、早期診断とともに治療法や治療時期を決定する上で重要である。確定診断において、手術などにより摘出した腫瘍組織の分化度などの判定は、判定者の主観に依存し、診断の再現性あるいは診断判定が困難である場合が存在する。

【0003】

癌細胞に過剰発現していることが知られているタンパク質として、Y-box-bindingタンパク質(YB-1)がある(非特許文献1)。YB-1は、MHCクラスIIプロモーターのY-ボックスに結合する転写因子として見出されたタンパク質であり(非特許文献2)、生物進化上よく保存されており、コールドショックドメイン(CDS)タンパク質スーパーファミリーのメンバーである。YB-1は、転写調節、翻訳調節、DNA修復、薬物耐性、およびストレス反応を含む様々な細胞機能に役割を果たすと考えられている。そのため、YB-1の発現は、癌細胞で過剰発現し、細胞増殖に密接に関連すると考えられている。

10

【0004】

YB-1には、遺伝子レベルで相関性の高い関連タンパク質が存在することが報告されている。YB-1関連タンパク質としては、現在までに、3種類のタンパク質、dbpA、dbpB(YB-1と同一; dbpB/YB-1と記載する場合もある)、およびdbpC(Contrinと同一; dbpC/Contrinと記載する場合もある)が同定されている(非特許文献1)。このうち、ヒトのdbpC/Contrinは、胚細胞特異的なY-box-bindingタンパク質のホモログであり、マウスのY-box-bindingタンパク質であるMSY2と、非常に高い相関性がある。

20

【非特許文献1】Kohno, Kら, BioEssays, 2003年, 257巻, pp.691-698

【非特許文献2】Didier, DKら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988年, 85巻, pp.7322-7326

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、胚細胞由来の腫瘍を特異的かつ容易に検出する方法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、YB-1関連タンパク質のうち、dbpC/Contrin(以下、dbpCという)の胚細胞腫瘍における発現を、抗dbpC抗体を用いる免疫組織化学的手段によって非常に特異的に検出できることを見出した。

【0007】

本発明は、抗dbpC抗体を用いて胚細胞腫瘍のdbpCを免疫組織化学的に染色する工程を含む、胚細胞腫瘍の検出方法を提供する。

【0008】

好適な実施態様では、上記抗dbpC抗体は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体である。

40

【0009】

本発明はまた、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を提供する。

【0010】

本発明はさらに、標識された抗dbpC抗体を含む、胚細胞腫瘍検出用キットを提供する。

【0011】

本発明はまた、抗dbpC抗体、および該抗dbpC抗体に対する標識抗体を含む、胚細胞腫瘍検出用キットも提供する。

50

【0012】

好適な実施態様では、上記のいずれかのキットにおいて、上記抗dbpC抗体は、上記の抗体である。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、胚細胞を由来とする腫瘍を特異的にかつ容易に検出することができる。したがって、臨床診断において有力な情報を与える。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の胚細胞腫瘍の検出方法は、抗dbpC抗体を用いて胚細胞腫瘍のdbpCを免疫組織化学的に染色する工程を含む。ヒトdbpCは、上記のように胚細胞（生殖細胞）特異的なタンパク質であり、YB-1と同様に癌細胞で過剰発現すると予想される。そこで、本発明においては、胚細胞腫瘍に特異的に発現したdbpCを抗dbpC抗体を用いて免疫組織化学的に染色することによって、胚細胞腫瘍の存在を検出する。本発明において「免疫組織化学的に染色する」とは、組織中の抗原に対する特異的な抗体および標識を用いて、抗原が存在する部分を標識の発色、蛍光などによって可視化することをいう。

【0015】

本発明の抗dbpC抗体は、公知のdbpCのアミノ酸配列の任意の部分のアミノ酸配列に対する抗体であり得、dbpCに特異的に結合する抗体であれば特に限定されない。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、ポリクローナル抗体が好ましい。

【0016】

このような抗体を産生するために用いられるdbpCのアミノ酸配列の情報は、当業者が通常用いる配列のデータベースより入手可能である。このdbpCのアミノ酸配列において、エピトープとして用い得る部分は、遺伝子ファミリーを形成しているdbpAやdbpBと相同性のない部分で、かつ抗原となりやすい部分を選定する。本発明においては、C末端領域より選定した配列番号1に記載のペプチドが特に好ましい。エピトープとして用いるペプチドは、当業者が通常用いる手段（例えば、自動ペプチド合成機）によって合成され得る。

【0017】

ポリクローナル抗体を産生する場合は、選択された哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど）に、エピトープを免疫する。この場合、エピトープペプチドは、適切なキャリアタンパク質と予め結合させた後、動物に免疫することが好ましい。当業者が通常用いる手段によって動物に免疫し、適切な免疫期間の後動物から採血し、そして公知の手順に従って処理して血清を得る。所望のdbpCエピトープに対するポリクローナル抗体を含む抗血清が、他の抗原に対する抗体を含む場合、ポリクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによって精製され得る。

【0018】

モノクローナル抗体を作成する場合、ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作成するための一般的方法論（例えば、細胞融合による不死化抗体産生細胞株の調製）、または他の技法（例えば、発癌性DNAでのBリンパ球の直接形質転換、またはエプスタイン-バーウイルスでのトランスフェクション）が用いられ得る。1つの実施態様では、抗体は、IgG、IgM、またはIgAイソタイプファミリーに属する。

【0019】

本発明の抗dbpC抗体は、それ自体が標識されていてもよく、標識されていなくてもよい。抗dbpC抗体が標識されていない場合は、さらに、抗dbpC抗体に対する標識された二次抗体を用いて検出する。二次抗体は、抗dbpC抗体に対する抗体であり、通常、一次抗体（抗dbpC抗体）の起源動物の免疫グロブリンに対する抗体である。

【0020】

標識としては、酵素標識、蛍光標識、放射標識などが挙げられるが、取り扱いの点で、

10

20

30

40

50

酵素標識および蛍光標識が好ましい。酵素標識は、少量でも活性が検出可能な高感度の酵素を抗体に結合させるものであり、酵素としては、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが挙げられる。蛍光標識は、蛍光物質を抗体に結合させるものであり、蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどが挙げられる。このような標識を一次抗体または二次抗体に結合させる方法は、当業者に周知である。

【0021】

本発明の胚細胞腫瘍の検出方法は、例えば、以下のように行われ得る。まず、卵巣または精巣の組織片などの検体を、抗d b p C抗体を含む溶液と適切な条件下で接触させた後、適切な洗浄液で未結合抗体を洗浄する。蛍光標識されている抗d b p C抗体を用いる場合は、そのまま、蛍光顕微鏡などの下で観察する。酵素標識されている抗d b p C抗体を用いる場合は、洗浄後の検体と酵素の基質とを適切な条件下で接触させて酵素反応させた後、標識に応じて光学顕微鏡や電子顕微鏡の下で観察する。また、標識されていない抗d b p C抗体を用いる場合は、洗浄後の検体を標識された二次抗体を接触させ、未結合二次抗体を洗浄後、標識に応じた検出機器下で観察する。

10

【0022】

本発明のキットは、少なくとも抗d b p C抗体を含む。このキットに含まれる抗d b p C抗体は、標識されている抗体であっても、非標識抗体であってもよい。必要に応じて、標識された二次抗体、洗浄用緩衝液、ブロッキング液、作業手順指示書などが含まれ得る。

20

【実施例】

【0023】

(実施例1：抗d b p A抗体、抗d b p B抗体、および抗d b p C抗体の作成)

(1) MBS法によるキャリアタンパク質の調製

Imject Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin (mcKLH、PIERCE社製) 20 mgを超純水2 mLに溶解して、10 mg/mLのmcKLH溶液を調製した。スルホ-m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド (Sulfo-MBS; PIERCE社製) を15 mg/mLになるように超純水に溶解してMBS溶液を得た。50 μ LのMBS溶液に、mcKLH溶液を200 μ Lを加えて、30分間穏やかに攪拌しながら混合し、mcKLH/MBS溶液を得た。

30

【0024】

(2) ペプチドの調製

抗d b p C抗体のエピトープとして、公知のd b p Cのアミノ酸配列中、C末端領域より選定した配列番号1のペプチドをペプチド合成機 (PE Biosystems社製) により作成した。また、抗d b p A抗体および抗d b p B抗体のエピトープとして、それぞれ配列番号2および3に記載のアミノ酸配列をペプチド合成機により合成した。各ペプチド3 mgを、200 μ LのImject Purification Buffer Salts (IPBS溶液、PIERCE社製) に溶解し、0.1 N水酸化ナトリウム水溶液でpH 7~8に調整し、5分間静置し、ペプチド溶液を得た。

【0025】

(3) mcKLH/MBSとペプチドとの結合

40

NAP-10カラム (アマシャム社製) を3 mLのIPBS溶液で平衡化した後、上記(1)で調製したmcKLH/MBS溶液をアプライした。このカラムを750 μ LのIPBS溶液で洗浄し、さらに3 mLのIPBS溶液でmcKLH/MBSを溶出させて回収した。回収したmcKLH/MBSに、上記(2)で調製した各ペプチド溶液をそれぞれ加え、穏やかに攪拌しながら2時間混合して、各ペプチド-KLH結合物を得た。NAP-10カラムを3 mLのIPBS溶液で平衡化した後、1 mLのペプチド-KLH結合物をそれぞれカラムに通し、カラム内の溶液を捨てた。次いで、残りのペプチド-KLH結合物をそれぞれアプライし、3 mLのIPBS溶液で溶出させて、50 mLのチューブ中に5 mLの各ペプチド-KLH結合物を回収した。

【0026】

(4) ウサギへの免疫

50

上記(3)で調製した各ペプチド-KLH結合物1mLを、完全フロイントアジュバント1mLと混和した後、ウサギ(日本白色種、雄、2.5~3.0kg)の皮下にそれぞれ0.8mL/kgの量を初回免疫した。その後、2週間隔で5回追加免疫を行った。追加免疫には、不完全フロイントアジュバント1mLと各ペプチド-KLH結合物1mLとの混和物を用いて、0.7~0.8mL/kgの投与量で行った。免疫完了後1週間に採血して、それぞれの抗体を含む抗血清を得た。抗血清の抗体価をウェスタンブロッティングにより確認した。ウェスタンブロッティングは、抗血清を10000倍希釈したものを一次抗体として用い、その後二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を用いて行った。

【0027】

(実施例2:抗dbpC抗体による各種腫瘍細胞の免疫組織化学染色)

種々の腫瘍の免疫組織化学染色による判定を、YB-1関連タンパク質に対する抗体(抗dbpA抗体、抗dbpB抗体、および抗dbpC抗体)を用いて検討した。

【0028】

(1)卵巣または精巣の胚細胞腫瘍

卵巣または精巣の胚細胞腫瘍の組織片(10検体)を、それぞれパラフィン包埋切片とした。上記実施例1で得た抗血清を5000倍希釈したものを一次抗体として用い、次いで二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス・ウサギIgG(DAKO社製)を用いて、各検体を免疫染色した。結果を表1に示す。

【0029】

【表1】

年齢	性別	原発部位	病期および組織学的タイプ	抗dbpA抗体	抗dbpB抗体	抗dbpC抗体
12	女	卵巣	未分化胚細胞腫	—	±	+
34	女	卵巣	未分化胚細胞腫	—	±	+
53	男	精巣	精上皮腫	—	±	+
40	男	精巣	精上皮腫	—	±	+
31	男	精巣	卵黄囊腫瘍、奇形腫瘍	—	±	+
28	男	精巣	卵黄囊腫瘍、奇形腫瘍	—	±	+
37	男	精巣	卵黄囊、胎生期癌、精上皮腫	—	±	±
28	男	精巣	胎生期癌、絨毛癌	—	+	+
33	男	精巣	胎生期癌、精上皮腫、卵黄囊	—	±	+
43	男	精巣	卵黄囊腫瘍、胎生期癌、奇形腫	—		

+:染色、±:染色微弱、—:染色不能

【0030】

表1に示すように、抗dbpC抗体は、卵巣および精巣における胚細胞腫瘍を特異的に染色した。一方、抗dbpA抗体は同一検体について染色不能であった。抗dbpB抗体は、染色性が抗dbpC抗体に比べて著しく低かった。このことから、抗dbpC抗体は、胚細胞腫瘍の染色性が非常に良好であることがわかる。

【0031】

(2)卵巣の胚細胞腫瘍に分類されない癌

卵巣の胚細胞腫瘍に分類されない癌の組織片(19検体)を、上記(1)と同様に免疫染色した。結果を表2に示す。

【0032】

【表 2】

年齢	性別	原発部位	病期および組織学的タイプ	抗dbpB抗体	抗dbpC抗体
52	女	卵巣	明細胞腺癌	+	±
20	女	卵巣	莢膜細胞腫	±	—
33	女	卵巣	明細胞腺癌	+	+
50	女	卵巣	粘液性嚢胞腺癌	±	—
72	女	卵巣	漿液性乳頭腺癌	+	±
77	女	卵巣	漿液性乳頭腺癌	+	±
59	女	卵巣	悪性ブレンナー腫瘍	+	—
51	女	卵巣	粘液性嚢胞腺癌	+	—
56	女	卵巣	悪性中胚葉性混合腫瘍	±	—
63	女	卵巣	明細胞腺癌	+	±
59	女	卵巣	内膜腺癌	+	—
46	女	卵巣	癌肉腫	+	—
20	女	卵巣	莢膜細胞腫	±	—
62	女	卵巣	莢膜細胞腫	±	—
71	女	卵巣	漿液性乳頭腺癌	+	—
74	女	卵巣	粘液性嚢胞腺癌	+	±
38	女	卵巣	漿液性乳頭腺癌	+	—
49	女	卵巣	粘液性嚢胞腺癌	±	—
14	女	卵巣	間質性カルチノイド	±	—

+: 染色、 ±: 染色微弱、 —: 染色不能

【 0 0 3 3 】

19検体中12検体が、抗dbpB抗体により染色され、他の7検体では染色微弱であった。抗dbpC抗体については、19検体中13検体が染色不能であり、5検体が染色微弱であった。したがって、抗dbpC抗体は、胚細胞腫瘍に分類されない癌を染色しにくいことがわかる。

【 0 0 3 4 】

(3) 乳癌

乳癌の組織片について、上記(1)と同様に免疫染色した。結果を表3に示す。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

【表 3】

年齢	性別	原発部位	病期および組織学的タイプ	抗dbpB抗体	抗dbpC抗体
56	女	乳房	湿潤性乳管癌乳頭腺管癌	+	±
57	女	乳房	湿潤性乳管癌乳頭腺管癌	±	—
58	女	乳房	湿潤性乳管癌充実腺管癌	+	+
63	女	乳房	湿潤性乳管癌充実腺管癌	±	—
71	女	乳房	湿潤性乳管癌乳頭腺管癌	+	±
78	女	乳房	湿潤性乳管癌硬癌	+	±
62	女	乳房	湿潤性乳管癌硬癌	+	—
66	女	乳房	湿潤性乳管癌充実腺管癌	+	—
86	女	乳房	湿潤性乳管癌充実腺管癌	±	—
70	女	乳房	湿潤性乳管癌硬癌	+	±

+:染色、±:染色微弱、—:染色不能

10

20

【0036】

抗dbpC抗体は、10検体のいずれについても乳癌に対して染色不能または染色微弱であった。抗dbpB抗体は、検体によって染色性が大きくばらついていた。

【0037】

(4)大腸癌

大腸癌の組織片について、上記(1)と同様に免疫染色した。結果を表4に示す。

【0038】

【表 4】

年齢	原発部位	病期および組織学的タイプ	抗dbpB抗体	抗dbpC抗体
56	大腸	高分化型腺癌	±	—
58	大腸	高分化型腺癌	+	—
71	大腸	高分化型腺癌	—	—
69	大腸	高分化型腺癌	—	—
43	大腸	高分化型腺癌	—	—
40	大腸	高分化型腺癌	—	—
56	大腸	高分化型腺癌	—	—
53	大腸	高分化型腺癌	—	—

+:染色、±:染色微弱、—:染色不能

30

40

【0039】

抗dbpC抗体は、8検体のいずれについても乳癌に対して染色不能であった。抗dbpB抗体は、検体によって染色性が大きくばらついていた。

【0040】

50

以上の(1)～(4)の結果から、抗dbpC抗体は、胚細胞腫瘍特異的に染色することがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0041】

本発明によれば、胚細胞を由来とする腫瘍を特異的にかつ容易に検出することができる。したがって、癌や腫瘍の臨床診断において有力な情報を与えることができ、早期診断、あるいは治療法や治療時期を決定するために有用である。

【配列表】

0004395004000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平07-209299(JP,A)

特表2005-532050(JP,A)

特開2003-235582(JP,A)

特表2007-533311(JP,A)

TEKUR,S. et al., Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization, J.Androl., 1999年, Vol.20, No.1, p.135-44

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

C12Q 1/04

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	检测生殖细胞肿瘤的方法		
公开(公告)号	JP4395004B2	公开(公告)日	2010-01-06
申请号	JP2004135222	申请日	2004-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	Kyurin		
申请(专利权)人(译)	株式会社キューリン		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社キューリン		
[标]发明人	河野 公俊 笹栗 靖之		
发明人	河野 公俊 笹栗 靖之		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/04 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.D C12Q1/04 G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/574.DZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GB03 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2005315763A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性和容易地检测来自生殖细胞的肿瘤的方法。解决方案：这种检测生殖细胞肿瘤的方法包括使用抗dbpC抗体免疫组织化学染色生殖细胞肿瘤的dbpC的方法。抗dbpC抗体优选是具有序列号1中描述的氨基酸序列的肽的抗体

年齢	性別	原発部位	病期および組織学的タイプ	抗dbpA抗体	抗dbpB抗体	抗dbpC抗体
12	女	卵巢	未分化胚細胞腫	-	±	+
34	女	卵巢	未分化胚細胞腫	-	±	+
53	男	精巣	精上皮腫	-	±	+
40	男	精巣	精上皮腫	-	±	+
31	男	精巣	卵黄囊腫瘍、奇形腫瘍	-	±	+
28	男	精巣	卵黄囊腫瘍、奇形腫瘍	-	±	+
37	男	精巣	卵黄囊、胎生期癌、精上皮腫	-	±	±
28	男	精巣	胎生期癌、絨毛癌	-	+	+
33	男	精巣	胎生期癌、精上皮腫、卵黄囊	-	±	+
43	男	精巣	卵黄囊腫瘍、胎生期癌、奇形腫	-		