

(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2019-158613

(P2019-158613A)

(43) 公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)

| (51) Int.Cl.             | F 1           | テーマコード (参考) |
|--------------------------|---------------|-------------|
| GO 1 N 33/68 (2006.01)   | GO 1 N 33/68  | 2 G O 4 5   |
| GO 1 N 33/53 (2006.01)   | GO 1 N 33/53  | D 4 B O 6 3 |
| GO 1 N 33/574 (2006.01)  | GO 1 N 33/53  | M 4 H O 4 5 |
| GO 1 N 33/48 (2006.01)   | GO 1 N 33/574 | A           |
| C 0 7 K 14/705 (2006.01) | GO 1 N 33/48  | P           |

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

|           |                            |          |   |
|-----------|----------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2018-45882 (P2018-45882) | (71) 出願人 | 504160781<br>国立大学法人金沢大学<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地            |
| (22) 出願日  | 平成30年3月13日 (2018.3.13)     | (71) 出願人 | 502285457<br>学校法人順天堂<br>東京都文京区本郷2-1-1               |
|           |                            | (74) 代理人 | 110002572<br>特許業務法人平木国際特許事務所                        |
|           |                            | (72) 発明者 | 藤原 浩<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法<br>人金沢大学内               |
|           |                            | (72) 発明者 | 荒木 慶彦<br>千葉県浦安市富岡二丁目1番1号 順天堂<br>大学大学院医学研究科 環境医学研究所内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Laeverinを用いたPSTT(胎盤部トロホラスト腫瘍)の検出

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、PSTTに特異的な腫瘍マーカーを用いてPSTTを検出する方法及び該方法を行うための試薬又はキットの提供を目的とする。

【解決手段】Laeverinをマーカーとして用い、PSTT(胎盤部トロホラスト腫瘍)を検出する方法。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

laeverinをマーカーとして用い、PSTT（胎盤部トロホラスト腫瘍）を検出する方法。

**【請求項 2】**

子宮筋組織におけるlaeverinの転写又は発現の程度を指標にPSTT（胎盤部トロホラスト腫瘍）を検出する方法であって、子宮筋組織におけるlaeverinの転写又は発現を測定し、laeverinの転写又は発現が認められる場合にPSTTが存在すると判断する、請求項1記載のPSTT（胎盤部トロホラスト腫瘍）を検出する方法。

**【請求項 3】**

採取した子宮筋組織又は細胞を試料として用い、抗laeverin抗体を用いた免疫組織化学染色または免疫細胞化学染色を行いlaeverinの発現を測定する、請求項2記載のPSTT（胎盤部トロホラスト腫瘍）を検出する方法。

**【請求項 4】**

少なくとも抗laeverin抗体を含む、laeverinをマーカーとして用い、免疫組織化学染色又は免疫細胞化学染色によりPSTT（胎盤部トロホラスト腫瘍）を検出するための検出試薬。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、laeverinをマーカーとして用いるPSTT（胎盤部トロホラスト腫瘍）の病理学的診断による検出方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

絨毛性疾患は、胎盤の栄養膜細胞（トロホラスト）が異常増殖をきたす疾患であり、胞状奇胎や絨毛癌の他に胎盤部トロホラスト腫瘍（PSTT: placental site trophoblastic tumor）が知られている。これらの腫瘍は流産も含めあらゆる妊娠に続発し得るが、その大部分は他人である胎児細胞に由来する点で一般臓器の悪性疾患と大きく異なる。中でも、PSTTは化学療法に対する感受性が低く、子宮外病変や転移を有する症例では生存率は30～50%と低値であるが、日本におけるPSTTの頻度は5年間で20症例程度と推定される極めて稀な疾患であり、有効な診断法や治療法は確立していない。そのため、子宮温存は考慮できない。

**【0003】**

本発明者は、PSTTの起源とされる絨毛外栄養膜細胞（EVT: extravillous trophoblast）について研究を行い、極めて特異的にEVTの細胞表面に発現する膜タンパク質であるlaeverinを発見しその機能解析を進めていた（特許文献1及び2を参照）。

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0004】****【特許文献1】特開2005-160473号公報****【特許文献2】特開2009-31307号公報****【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明は、PSTTに特異的な腫瘍マーカーを用いてPSTTを検出する方法及び該方法を行うための試薬又はキットの提供を目的とする。

**【課題を解決するための手段】****【0006】**

本発明者はlaeverinの機能解析の仮定で、特異性に優れたマウスモノクローナル抗laeverin抗体を作製した。

**【0007】**

10

20

30

40

50

本発明者は、子宮外へ転移して化学療法に抵抗性のPSTT症例を続けて2例経験した。これらは、いずれも病理診断においてはPSTTと診断されなかつたが、本発明者が作製した抗Iaeverin抗体を用いてIaeverinの発現を免疫組織化学的に同定したことがきっかけとなり、PSTTと最終診断された。

#### 【0008】

このように、本発明者は、Iaeverinの発現がPSTTの診断の指標となることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0009】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] Iaeverinをマーカーとして用い、PSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を検出する方法。10

[2] 子宮筋組織におけるIaeverinの転写又は発現の程度を指標にPSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を検出する方法であつて、子宮筋組織におけるIaeverinの転写又は発現を測定し、Iaeverinの転写又は発現が認められる場合にPSTTが存在すると判断する、[1]のPSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を検出する方法。

[3] 採取した子宮筋組織又は細胞を試料として用い、抗Iaeverin抗体を用いた免疫組織化学染色または免疫細胞化学染色を行いIaeverinの発現を測定する、[2]のPSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を検出する方法。

[4] 少なくとも抗Iaeverin抗体を含む、Iaeverinをマーカーとして用い、免疫組織化学染色又は免疫細胞化学染色によりPSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を検出するための検出試薬。20

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

子宮筋粗組織におけるIaeverinの転写又は発現を、免疫組織化学若しくは免疫細胞化学の手法により調べることにより、子宮筋層にPSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）が存在するかどうかを検出することができる。また、本発明の方法によれば、PSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を他の絨毛性疾患と鑑別して検出することできる。本発明の方法は、世界的にIaeverin発現の有無が標準の病理診断基準となることが予想される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0011】

【図1】子宮筋層内へ浸潤するPSTT病変でのIaeverinの発現を示す図である。子宮内膜を越えて子宮筋層内へシート状に浸潤しているPSTT細胞において特異的なIaeverinの強い発現が観察される。

【図2】PSTTのリンパ節転移病変でのIaeverinの発現を示す図である。摘出した骨盤内リンパ節内に転移しているPSTT細胞にIaeverinの発現が観察される。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

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。

#### 【0013】

本発明は、Iaeverin（リーベリン、LVN）をマーカーとして用いて、PSTT（胎盤部トロホblast腫瘍）を病理学的診断により検出する方法である。ここで、検出とは、PSTTが存在するかどうかを判定すること、患者がPSTTに罹患しているかどうか判定すること等を含む。

#### 【0014】

PSTTは、胎盤の栄養膜細胞（トロホblast）が異常増殖をきたす疾患である絨毛性疾患の1つであり、他人である胎児細胞に由来する点で一般臓器の悪性疾患と大きく異なる。PSTTは化学療法に抵抗性であり、転移症例の生存率は50%以下と低い。これまでには、PSTTについての有効な診断法は確立されておらず、本発明によりPSTTの確定診断が可能にな40

30

40

50

る。

【0015】

PSTTにおいては、胎児の絨毛外栄養膜細胞（EVT）が、母体免疫による攻撃を免れて浸潤し、浸潤は子宮筋（子宮平滑筋）層内に達して停止し異常増殖する。

【0016】

PSTT細胞は、細胞膜結合型ペプチダーゼであるlaeverinを発現している。本発明において、被験体の子宮筋層におけるlaeverinをマーカーとして用いて、laeverinの発現を指標にPSTTを検出する。すなわち、本発明においては、laeverinの子宮筋層での発現を測定してPSTTを検出する。

【0017】

絨毛性疾患には、PSTTの他に、胞状奇胎、侵入胞状奇胎（侵入奇胎）、絨毛癌が存在する。PSTTと侵入奇胎及び絨毛癌は症状や画像検査所見が類似しており、確定診断が容易ではない場合がある。laeverinをマーカーとして用いることにより、PSTTと他の絨毛性疾患を鑑別して検出することができる。

【0018】

また、子宮筋層におけるlaeverinの発現量が多いほど、PSTTが重症である、あるいは進行していると評価し判断することができる可能性がある。

【0019】

本発明においては、PSTTと他の絨毛性疾患を鑑別して検出すること、PSTTの重症度や進行度を評価することを含めて、PSTTの検出という。

【0020】

さらに、PSTTの化学治療において、被験体の子宮筋層におけるlaeverinの発現量を指標に治療効果を評価することができ、laeverinの発現量が低下するほど治療効果が奏されたと判断することができる。

【0021】

1. 病変組織のmRNA又はタンパク質の測定

子宮筋組織、例えば子宮筋層の癌組織におけるlaeverinの発現を組織染色又は細胞染色により測定することにより、PSTTを検出することができる。

laeverinの発現は以下の方法で測定することができる。

【0022】

子宮筋層に癌等の病変を有する被験体の子宮筋層の病変部組織におけるlaeverinの発現をlaeverin mRNAの発現（転写）又はlaeverinタンパク質の発現により測定する。この際、mRNA又はタンパク質の発現のいずれか又は両方を測定すればよい。

【0023】

mRNAを検出する場合、子宮筋層の病変部組織を生体試料として採取し、該試料中に含まれるlaeverinをコードするmRNAを測定すればよい。また、被験体の子宮筋層の組織だけではなく、リンパ節を生体試料として用いてもよい。この際、生検により癌組織等の病変組織の一部を採取して用いればよい。例えば、生検用の器具を子宮筋層内に挿入し、病変組織を採取すればよい。mRNAは、採取した組織からRNAを抽出して測定することができる。

あるいは、組織切片標本を作製し、in situハイブリダイゼーション法により染色することにより測定することができる。さらに、抽出したRNAをRT-PCR、ノーザンプロット法などの公知のmRNA測定法により測定してもよい。mRNAを測定するときには、laeverinをコードするmRNAのDNA配列に相補的な部分配列からなるプローブ又はプライマーを用いてハイブリダイゼーションにより測定することができる。laeverin遺伝子の塩基配列及びlaeverinタンパク質のアミノ酸配列公知であり（DNA配列を配列番号1に表し、アミノ酸配列を配列番号2に表す）、DNA配列情報に基づいて、プローブやプライマーを設計すればよい。プライマーとして用いるポリヌクレオチドの塩基の数は5～50、好ましくは10～30、さらに好ましくは15～25である。プローブとして用いるヌクレオチドの塩基の数は5～数百、好ましくは10～200である。

【0024】

10

20

30

40

50

病変組織において、laeverinタンパク質を検出する場合、癌組織等の病変組織を生体試料として採取し、該試料中に含まれるlaeverinタンパク質を測定すればよい。この際、病変組織からタンパク質を抽出し、抽出したlaeverinタンパク質を測定してもよい。抽出したタンパク質の測定は、抗laeverin抗体を用いた免疫学的手法により測定することができる。免疫学的手法としては、固相免疫測定法(RIA、EIA、FIA、CLIA等)、イムノクロマト法、ウエスタンプロット法、ラテックス凝集法(LA: Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay)等の公知の免疫学的手法が挙げられる。あるいは、免疫組織化学又は免疫細胞化学の手法により測定することもできる。抗体は、ポリクローナル抗体もモノクローナル抗体も用いることができるが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。また、抗体のFab、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub>等の結合活性断片を用いることもできる。抗体は必要に応じて、蛍光物質、酵素等により標識して用いることができる。

10

#### 【0025】

免疫組織化学又は免疫細胞化学の手法による測定は、採取した病変組織の切片標本を作製するか、採取した細胞をスライドガラス上に固定して行えばよい。免疫組織化学の手法による測定のためには、組織を、例えばホルムアルデヒド等の固定液で固定し、パラフィンに包埋し、1～数μm程度の厚さの切片標本を作製して染色すればよい。染色は、酵素、蛍光物質等で標識したlaeverinに対する抗体を用いればよい。また、抗laeverin抗体を切片標本中のlaeverinに結合させた後に、蛍光物質、酵素等で標識した2次抗体を結合させてもよい。標識に用いる蛍光物質として、例えばFITC(Fluorescein Isothiocyanate)、Alexa、Cy色素等が挙げられる。酵素として、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフェオヌクターゼ(ALP)等が挙げられる。また、ビオチン-アビジン複合体を利用したABC法等により染色してもよい。免疫細胞化学は採取した細胞をホルムアルデヒド等の固定液によりスライドガラス上に固定し、免疫組織化学の手法と同様の方法で細胞中のlaeverinを染色すればよい。免疫組織化学又は免疫細胞化学において、染色は蛍光顕微鏡等を用いて肉眼的観察で判断することもできるし、適当な光学的測定装置を用いて測定することもできる。

20

#### 【0026】

上記の方法で、病変組織におけるlaeverinの発現を検出することにより、laeverinの発現が病変組織において認められる場合、病変部にはPSTT細胞が存在し、被験体はPSTTに罹患していると判断することができる。この際、正常組織におけるlaeverinの発現を同時に測定し、発現レベルを正常組織と比較してもよい。正常組織に比べ、強くlaeverinが発現している場合、被験体はPSTTに罹患していると判断することができる。具体的には、例えば、組織または細胞の抽出物中のlaeverin mRNA又はlaeverinタンパク質を測定する場合、あらかじめPSTTに罹患していない正常人の単位重量組織又は単位細胞数当たりのlaeverin mRNA量又はlaeverinタンパク質量を測定し、laeverin mRNA又はlaeverinタンパク質が正常人よりも多く発現している場合、被験体は、PSTTに罹患していると判定し得る。また、検査において、子宮筋層に癌が存在すると診断された被験体より癌組織を採取し、該組織におけるlaeverinの発現を測定すればよい。この際、癌が存在した部位と同じ組織の正常部位からも組織を採取して、対照試料として用いることができる。また、あらかじめ、ヒトの各正常組織のlaeverinの発現量を測定しておき、その値を正常値として比較の対象としてもよい。あるいは、PSTTでない正常組織およびPSTT組織の染色組織切片標品又は染色細胞標品をあらかじめ作製しておき、該標品と比較してもよい。

30

#### 【0027】

また、リンパ節において、laeverinの発現が認められる場合、PSTTがリンパ節に転移(リンパ行性転移)したと判断することができる。

#### 【0028】

##### 2. PSTT検出キット

本発明は、被験体におけるPSTTを検出するための試薬又はキットを包含する。該キットは、少なくとも抗laeverin抗体を含む、免疫組織化学又は免疫細胞化学の手法によりlaeverinタンパク質を測定するためのキットである。該キットは、その他、酵素標識2次抗体

40

50

、緩衝液、標準物質、説明書等を含む。

#### 【0029】

また、被験体におけるPSTTを検出するための試薬又はキットは、病変組織におけるlaeverin mRNAを検出するためのプライマーセット又はプローブを含む。該プライマー又はプローブは、laeverin mRNAの断片にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。該キットは、該試薬又はキットは、例えば、laeverin mRNAを増幅するための試薬又はキットである。また、該試薬又はキットは、laeverin mRNAの抽出試薬を含んでいてもよい。

#### 【実施例】

##### 【0030】

検体材料

金沢大学附属病院 (n=1) で病理診断によりPSTTの確定診断が得られた症例を対象とした。対象症例のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから薄切切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。なお、本研究は、金沢大学医学倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号2608、2017年11月15日)。

##### 【0031】

免疫組織染色法

ホルマリン固定パラフィン包埋切片をキシレンにて脱パラフィン後、pH6.0クエン酸緩衝液で30分間処理し、抗原を賦活化した。続いて内因性ペルオキシダーゼの不活性化のため、室温で10分間3%過酸化水素水に反応させ、PBSで洗浄後、ブロッキングのため1%ヤギ血清アルブミンで室温30分間反応させた。一次抗体は、ウサギポリクローナル抗laeverin抗体を10 µg/mlで使用し(Horie A et al., Hum Reprod. 2012 May;27(5):1267-76. doi: 10.1093/humrep/des068. Epub 2012 Mar 8.)、4で一晩反応させた。二次抗体は、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体 (PK-4001, Vector Laboratories) を用いて室温で30分反応させ、アビジン-ビオチン標識酵素複合体を室温で更に30分反応させた。最後にDAB (K3468, Dako) にて発色させた。核染色としてマイヤー・マトキシリン液を用いたのち、封入して検鏡した。

##### 【0032】

結果

手術で摘出した子宮においてlaeverinは子宮筋層にシート状に浸潤している病変を含めてPSTT細胞に特異的に発現していることが観察された(図1、図1の左側部分が染色されている)。またリンパ節に転移しているPSTT細胞にも特異的に発現しており(図2の矢印部分が染色されている)、PSTTの有用なマーカーであることが示された。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0033】

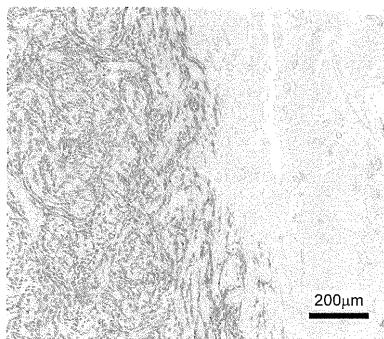
laeverinはPSTT(胎盤部トロホblast腫瘍)を検出するためのマーカーとして用いることができる。

10

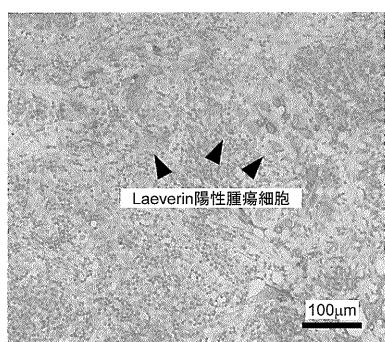
20

30

【図1】



【図2】



【配列表】

2019158613000001.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 0 7 K 16/28 (2006.01)  | C 0 7 K 14/705 | Z N A      |
| C 1 2 Q 1/6841 (2018.01) | C 0 7 K 16/28  |            |
| C 1 2 N 15/11 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/6841 | Z          |
|                          | C 1 2 N 15/11  | Z          |

## (72)発明者 服部 明

京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

F ターム(参考) 2G045 AA26 BA13 BB24 CB01 DA14 DA36 FB03  
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32  
QR35 QR55 QR62 QS25 QS32  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA50

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 橡胶蛋白检测胎盘部位滋养细胞肿瘤 ( PSTT )  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2019158613A</a>  | 公开(公告)日 | 2019-09-19 |
| 申请号            | JP2018045882   | 申请日     | 2018-03-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立大学法人金沢大学<br>学校法人順天堂  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 国立大学法人金沢大学<br>学校法人順天堂  |         |            |
| [标]发明人         | 藤原浩<br>荒木慶彦<br>服部明   |         |            |
| 发明人            | 藤原 浩<br>荒木 廉彦<br>服部 明  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/48 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/6841 C12N15/11   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/574.A G01N33/48.P C07K14/705.ZNA C07K16/28<br>C12Q1/6841.Z C12N15/11.Z  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063<br>/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42<br>4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4H045<br>/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76<br>4H045/EA50 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

## 摘要(译)

提供一种使用PSTT特异的肿瘤标志物检测PSTT的方法，并提供用于实施该方法的试剂或试剂盒。解决方案：本文提供了一种使用laeverin作为标志物检测胎盘部位滋养细胞肿瘤 ( PSTT ) 的方法。绘图：无

| (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<br>特開2019-158613<br>(P2019-158613A)  |
|--|---|---|
| (43)公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)   |   |   |
| (51)Int.Cl.<br><i>G01N 33/68 (2006.01)</i> <i>G01N 33/53 (2006.01)</i> <i>G01N 33/574 (2006.01)</i> <i>G01N 33/48 (2006.01)</i> <i>C07K 14/705 (2006.01)</i> | F I<br>G01N 33/68<br>G01N 33/53<br>G01N 33/574<br>G01N 33/48<br>C07K 14/705   | テーマコード(参考)<br>2 G 0 4 5<br>4 B 0 6 3<br>4 H 0 4 5<br>A<br>P   |
| (21)出願番号 特願2018-45882 (P2018-45882)<br>(22)出願日 平成30年3月13日 (2018.3.13)  | (71)出願人 504160781<br>国立大学法人金沢大学<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地<br>502285457<br>学校法人順天堂<br>東京都文京区本郷2-1-1<br>(74)代理人 110002572<br>特許業務法人平木国際特許事務所<br>(72)発明者 藤原 浩<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人<br>金沢大学内<br>(72)発明者 荒木 廉彦<br>千葉県浦安市富岡二丁目1番1号 順天堂<br>大学大学院医学研究所 環境医学研究所内 | (71)出願人 504160781<br>国立大学法人金沢大学<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地<br>(71)出願人 502285457<br>学校法人順天堂<br>東京都文京区本郷2-1-1<br>(74)代理人 110002572<br>特許業務法人平木国際特許事務所<br>(72)発明者 藤原 浩<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人<br>金沢大学内<br>(72)発明者 荒木 廉彦<br>千葉県浦安市富岡二丁目1番1号 順天堂<br>大学大学院医学研究所 環境医学研究所内 |
|  |   | 最終頁に続く  |

(54)【発明の名称】 laeverinを用いたPSTT(胎盤部トロホブラスト腫瘍)の検出