

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4253233号
(P4253233)

(45) 発行日 平成21年4月8日 (2009.4.8)

(24) 登録日 平成21年1月30日 (2009.1.30)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/574 (2006.01)

GO 1 N 33/574 B

GO 1 N 27/447 (2006.01)

GO 1 N 27/26 3 1 5 F

GO 1 N 33/561 (2006.01)

GO 1 N 27/26 3 1 5 H

GO 1 N 27/26 3 1 5 J

GO 1 N 27/26 3 1 5 K

請求項の数 6 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-299467 (P2003-299467)
 (22) 出願日 平成15年8月25日 (2003.8.25)
 (65) 公開番号 特開2005-69846 (P2005-69846A)
 (43) 公開日 平成17年3月17日 (2005.3.17)
 審査請求日 平成18年4月19日 (2006.4.19)

特許法第30条第1項適用 平成15年7月3日に発行された「第24回日本糖質学会年会要旨集」に発明者の発表要旨が掲載されている。

(73) 特許権者 000206956
 大塚製薬株式会社
 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100068700
 弁理士 有賀 三幸
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100089048
 弁理士 浅野 康隆
 (74) 代理人 100101317
 弁理士 的場 ひろみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 術後癌患者の予後判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌に侵食された臓器組織切除手術後の患者の予後を判定する方法であって、癌患者由来の血液サンプル中に存在する α_1 - 酸性糖タンパク質について3鎖及び4鎖構造を有するN型糖鎖の存在比率と当該N型糖鎖に付加したフコースの修飾率を求め、健常人の算出値と比較した場合、術後癌患者の当該数値が健常人から割り出したカットオフ値を共に上回るときに、予後不良の可能性ありと判定することを特徴とする術後癌患者の予後を検査する方法。

【請求項2】

3鎖及び4鎖構造を有するN型糖鎖の存在比率及び当該N型糖鎖に付加したフコースの修飾率を、交叉親和性免疫電気泳動により測定するものである請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

交叉親和性免疫電気泳動により得られる α_1 - 酸性糖タンパク質画分 C o、C w、A w 及び A s (ここで、C o は C o n A レクチンに対して無反応である画分、C w : C o n A レクチンに対して弱く反応する画分、A w は A A L レクチンに対して弱く反応する画分、A s は A A L レクチンに対して強く反応する画分を示す) についてその存在率を算出し、C o + C w × 4 / 5 の値を3鎖及び4鎖構造を有するN型糖鎖の存在比率とし、A w + A s の値をN型糖鎖に付加したフコースの修飾率とするものである請求項2記載の方法。

【請求項4】

癌に侵食された臓器組織切除手術後の患者の予後を判定する方法であって、癌患者由来

20

の血液サンプル中に存在する α_1 - 酸性糖タンパク質を交叉親和性免疫電気泳動により分画し、得られた画分 C o、A w 及び A s (ここで、C o は C o n A レクチンに対して無反応である画分、A w は A A L レクチンに対して弱く反応する画分、A s は A A L レクチンに対して強く反応する画分を示す) についてその存在率を算出して以下の I ~ V にグレード分けし、グレード IV 又は V の状態が持続したときに、予後不良の可能性ありと判定することを特徴とする術後癌患者の予後を検査する方法。

- I) C o 50% で、且つ A w + A s 70%
- II) C o 50% で、且つ A w + A s > 70%
- III) C o > 50% で、且つ A w + A s 70%
- IV) C o > 50% で、且つ 70% < A w + A s 80%
- V) C o > 50% で、且つ 80% < A w + A s

10

【請求項 5】

グレード IV 又は V の状態が 30 日以上持続したときに、再発又は転移を生ずると判定するものである請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法を実施するためのキットであって、マンノースと親和性を有するレクチン、フコースと親和性を有するレクチン、抗 A G P 抗体及び電気泳動用の試薬・器具類を含有する術後癌患者の予後判定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、術後癌患者の予後を予測判定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌に侵食された臓器組織は、外科的手段により当該臓器組織を切除して、それ以上の癌組織の拡大を阻むことが一般に行われている。しかしながら、癌組織の摘出手術が成功した患者であっても、その後、再発や転移を起こす事例も数多く存在する。従って、術後においても化学療法ならびに再発モニタリングを実施することが必要であり、この場合に再発や転移が起こる可能性を簡易に予測できれば治療方針を決定する上で極めて有用である。

30

【0003】

現在、腫瘍マーカーを用いた癌診断方法が広く行われており、これにより癌の有無、癌種の絞り込み、或いは形成部位の判別ができる可能性が高いが、一方で多くの腫瘍マーカーには、癌に関係なく数値が高値を示す場合など不確実なところもあり、検査には慎重を要する。また、検査方法の多くは、抗体を用いた R I A 法、E L I S A 法による血液検査が主体であり、現在少なくとも 27 種類の腫瘍マーカーが知られているが、ヒトに生じる全ての癌を網羅しているわけではない。さらに、低分化癌のグループに属する癌は、特徴的な腫瘍マーカーを産生せず、進行癌においても腫瘍マーカーは正常値を示すことが知られている。また、癌以外の疾患たとえば慢性肝炎、結核などにおいても腫瘍マーカーが陽性になることがあり注意を要する。

40

【0004】

また最近では、肝癌(原発性、転移性問わず)及び胚細胞性腫瘍などの診断に以前から用いられてきた α フェトプロテインの糖鎖構造が癌種によって異なることが明らかになってきており、糖鎖構造の違いから癌種を特定しようという試みがなされている。しかし、特定できる癌種は肝癌等の α フェトプロテインの発現が認められるものに限定される。

【0005】

このように、癌の種類を問わず、術後の再発をモニタリングできるマーカーは未だ見出されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 6 】

本発明は、癌に浸食された臓器や組織を摘出した術後癌患者の予後をより正確に且つ簡便に予測判定する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

発明者らは、炎症マーカーの1つとして従来から知られている α_1 -酸性糖タンパク質の糖鎖構造の変化に着目し、癌組織を切除した患者の術後の癌再発、転移の状況を詳細に観察した結果、該タンパク質糖鎖構造の変化及びフコースの付加修飾率が、癌再発や転移と有意に相関し、これを用いて予後の判定が可能であることを見出し本発明を完成した。

【 0 0 0 8 】

すなわち本発明は、癌に侵食された臓器組織切除手術後の患者の予後を判定する方法であって、患者の血液中に存在する α_1 -酸性糖タンパク質について3鎖及び4鎖構造を有するN型糖鎖の存在比率と当該N型糖鎖に付加したフコースの修飾率を求め、健常人の算出値と比較した場合、術後癌患者の当該数値が健常人から割り出したカットオフ値を共に上回るときに、予後不良の可能性ありと判定することを特徴とする術後癌患者の予後判定方法を提供するものである。

【 0 0 0 9 】

また本発明は、癌に侵食された臓器組織切除手術後の患者の予後を判定する方法であって、患者の血液中に存在する α_1 -酸性糖タンパク質を交叉親和性免疫電気泳動により分離し、得られた画分C o、A w及びA s（ここで、C oはC o n Aレクチンに対して無反応である画分、A wはA A Lレクチンに対して弱く反応する画分、A sはA A Lレクチンに対して強く反応する画分を示す）についてその存在率を算出して以下のI～Vにグレード分けし、グレードIV又はVの状態が持続したときに、予後不良の可能性ありと判定することを特徴とする術後癌患者の予後判定方法を提供するものである。

- I) C o 50%で、且つA w + A s 70%
- II) C o 50%で、且つA w + A s > 70%
- III) C o > 50%で、且つA w + A s 70%
- IV) C o > 50%で、且つ70% < A w + A s 80%
- V) C o > 50%で、且つ80% < A w + A s

【 0 0 1 0 】

更に本発明は、マンノースと親和性を有するレクチン、フコースと親和性を有するレクチン、抗A G P抗体及び電気泳動用の試薬・器具類を含有する術後癌患者の予後判定用キットを提供するものである。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明の予後判定方法及び予後判定用キットによれば、特定の癌種を対象とした従来の腫瘍マーカーによる癌診断法とは異なり、癌全般を対象にした術後癌患者の再発や転移等の予後を客観的に且つ高い確率で予測することが可能であり、これにより術後の化学療法ならびに再発モニタリングを効率的に実施することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

本発明の術後癌患者の予後判定方法は、患者の血液中に存在する α_1 -酸性糖タンパク質について、3鎖及び4鎖構造を有するN型糖鎖の存在比率と当該N型糖鎖に付加したフコースの修飾率を指標として再発や転移等の予後を判定するものである。

【 0 0 1 3 】

α_1 -酸性糖タンパク質は、オロソムコイドとも呼ばれ、血液中に約0.5mg/mlと極めて多量に存在している糖タンパク質であり、炎症時速やかにその値が上昇することから炎症マーカーの1つとして従来から知られている。

本タンパク質はその45%が糖鎖から成り、分子中に5箇所N型糖鎖結合部位が存在する。該糖鎖は、2鎖、3鎖及び4鎖構造の形態が存在し、3鎖及び4鎖にシアリルルイ

10

20

30

40

50

スX構造が1カ所乃至2カ所付加することによって形成される。そして、シアリルルイスX構造部分には、フコースの付加が起こる。

後記実施例において示したとおり、術後癌患者において、癌が転移、再発を起こす場合に、斯かる3鎖及び4鎖構造を有するN型糖鎖の存在比率が増加し、併せて当該N型糖鎖に付加したフコースの修飾率が増加することが、有意な相関を持って認められた。

従って、これらを測定・算出し、健常人の算出値と比較した場合、術後癌患者の当該数値が健常人から割り出したカットオフ値を共に上回るときに、予後不良の可能性ありと判定することができる。

【0014】

3鎖及び4鎖のN型糖鎖を有する α_1 -酸性糖タンパク質の分離は、一般に糖鎖のヘテロジェネイティ(heterogeneity)に起因した不均一な糖タンパク質を糖鎖構造により分画する方法として汎用されている、糖又は糖鎖構造に対して親和性を有するレクチンタンパク質を利用する方法により行うことができる。すなわち、該 α_1 -酸性糖タンパク質の糖鎖は、全てN型糖鎖構造であるためマンノースと親和性を有するレクチンタンパク質を用いることにより分離可能である。該レクチンとしては、例えばタチナタマメレクチン(ConA)、スイートピーレクチン(Lath-O)、ラシルスサチブスレクチン(Lath-S)、ラシルスチンジタヌスレクチン(Lath-T)、レンズマメレクチン(LCA)、イガマメレクチン(sainfoin)、エンドウマメレクチン(PSA)、クサフジレクチン(Vc/Ma)、ビシアエルビリアレクチン、ソラマメレクチン(VFA)及びカラスノエンドウレクチンなどを用いることができるが、特にConAレクチンが好適に用いられる。

【0015】

また、フコースの付加された各 α_1 -酸性糖タンパク質の分離に関しては、ヒヨコチャワンタケレクチン(AAL)、ウナギ血清由来レクチン(ESH)、ミヤコグサレクチン(lotus)、エニシダレクチン(SAS-F)、ストレプトマイセス エスピーレクチン(SFL 16-3)、ハリエニシダレクチン(UEA-I)などフコースに親和性を有するレクチンを用いることができ、特にAALレクチンを用いるのが好ましい。

【0016】

α_1 -酸性糖タンパク質の分離手段としては、当該レクチンと当該タンパク質との親和性を利用した生化学的分離方法であれば特に制限はないが、好適には、例えば交叉親和性免疫電気泳動、抗体親和性プロッティング法、レクチンELISA、キャピラリー電気泳動、レクチンイムノセンサー等が挙げられ、特に交叉親和性免疫電気泳動を用いて分離するのが好ましい。以下に交叉親和性免疫電気泳動を用いた分離手法に関して詳述する。

【0017】

交叉親和性免疫電気泳動は、上記レクチンを用いた糖タンパク質の分離工程である一次元電気泳動と、分離された各糖タンパク質の量を求める二次元目の免疫電気泳動の工程からなる。

まず、 α_1 -酸性糖タンパク質を糖鎖構造により分離する場合、例えばConAレクチン5~15mg/mlゲルを分離用ゲル内に含有した状態で電気泳動を行い、ConAレクチンとの親和性により各 α_1 -酸性糖タンパク質を分離する。次いで各々の α_1 -酸性糖タンパク質の含有量を求めるために泳動後一次元目とは直角に抗 α_1 -酸性糖タンパク質抗体含有ゲルに対して二次元電気泳動を行う。この場合、ゲルとしては通常タンパク質の電気泳動に使用するアガロースゲル、アクリルアミドゲルを好適に使用することができる。一次元、二次元何れのゲルを用いても良いが、例えば一次元ゲルとしてアクリルアミドゲル、二次元ゲルとしてアガロースゲルを上げることができる。ゲル濃度に関しては、目的タンパク質の分子量に従って、適宜選択すればよいが、該 α_1 -酸性糖タンパク質に関しては分子量約45kDaであるため、例えばアクリルアミドゲルを使用する場合であれば5~15%の間でゲル濃度を好適に選択することができ、より好適には6~8%の範囲で使用することができる。アガロースゲルであれば、0.5~1.5%の間でゲル濃度を好適に選択することができ、より好適には0.8~1.2%の範囲で使用できる。

【 0 0 1 8 】

二次元ゲルの泳動に際しては、直接一次元ゲルと直角に接触させることにより泳動を行っても良いが、ゲル間に緩衝用のゲルをセットすることにより、更に好適に電気泳動を実施することができる。該ゲルには、泳動時 α_1 - 酸性糖タンパク質がレクチンと複合体形成し泳動が妨げられるのを防止するために、C o n A レクチンの場合には、メチル - α - D - マンノシド又はメチル - α - D - グルコシド、又はこれらを組み合わせて使用することができ、例えばメチル - α - D - グルコシドとメチル - α - D - マンノシドの組み合わせにより良好に泳動を行い得る。また、個々の濃度に関しては、10 ~ 200 mM の範囲で設定でき、より好適には50 ~ 100 mM の間で使用できる。一方、A A L レクチンの場合には、 α - L - フコースをゲル内に包含することにより好適な泳動を行うことができ、濃度に関しては1 ~ 20 mM の範囲で設定でき、より好適には5 ~ 10 mM の間で使用できる。

10

【 0 0 1 9 】

泳動条件は、 α_1 - 酸性糖タンパク質が等電点 $pI = 2.7$ であることを考慮した pH であれば特に制限はなく、好適には $pH 7 \sim 10$ 、より好適には $pH 8 \sim 9$ で泳動を行うことができ、該 pH を維持できる緩衝液を使用すれば特に問題はない。緩衝液としては、トリス緩衝液、ヘペス緩衝液、炭酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液など好適に用いることができる。また、泳動条件あるいは分離条件を良好に保つために種々の塩、安定化剤を組み合わせることもでき、例えばバルビタール、乳酸カルシウムを含むトリス緩衝液等を使用すれば好適に泳動することができ、一次元、二次元共に同様の緩衝液にて泳動を行うことができる。

20

【 0 0 2 0 】

二次元電気泳動に用いる抗 α_1 - 酸性糖タンパク質抗体（「抗 A G P 抗体」ともいう）は、 α_1 - 酸性糖タンパク質を特異的に認識できる抗体であれば特に制限はなく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を問わない。モノクローナル抗体の場合は、腹水の状態でもあるいは精製抗体でもよく、ポリクローナル抗体にあつては抗血清の状態でも、力価が弱ければ精製濃縮された状態の抗体であっても良い。該二次元ゲルによる免疫電気泳動により、 α_1 - 酸性糖タンパク質は沈降線として量的に把握でき、沈降線から得られるピーク内の面積を求めることにより、各糖鎖構造の比率を求めることができる。沈降線は、そのままでも視覚的に観察できることが可能であるが、一般的にはゲルを乾燥させた後、タンパク質染色液にて染色を行い、脱色操作により α_1 - 酸性糖タンパク質の糖鎖構造をより視覚的に分離することができる。染色液としては、タンパク質染色に通常用いられている染色液ならば特に制限はないが、アミドブラック 10 B、クマーシーブリリアントブルー（C B B）R - 250、及び G - 250 を好適に用いることができる。また、必要に応じて沈降線の感度を高めるために市販の標識化抗体を利用したタンパク検出用キットを用いることができ、好適にはペルオキシダーゼ標識 - プロテイン A を使用することができる。また、フコース付加修飾率を解析する場合にあつては、一次元に使用するゲル内にフコースと親和性を有するレクチン例えば O 型赤血球に対する凝集価 1 : 100 ~ 1000 の力価 300 $\mu l / ml$ ゲルを含有すればよい。

30

【 0 0 2 1 】

このようにして、交叉親和性免疫電気泳動によって糖鎖構造の違い又はフコースの付加により α_1 - 酸性糖タンパク質の分離がなされる。マンノースと親和性を有するレクチンとして C o n A を用いた交叉親和性免疫電気泳動によれば、以下のピークを得ることができ、 α_1 - 酸性糖タンパク質を3種類に分画できる（図1）。

40

C o : C o n A レクチンに対して無反応である画分で、分子中に3鎖、4鎖糖鎖のみを含む。従って、2本鎖グリカン鎖は含まない。

C w : C o n A レクチンに対して弱く反応する画分で、分子中に1本の2本鎖グリカン鎖を含む。

C s : C o n A レクチンに対して強く反応する画分で、分子中に2本以上の2鎖グリカン鎖を含む。

50

【 0 0 2 2 】

また、フコースと親和性を有するレクチンとして A A L を用いた交叉親和性免疫電気泳動からは、以下の 3 種のピークを得ることができる(図 1)。

A o : A A L レクチンに対して反応しない画分で、フコシル化糖鎖を含まない。

A w : A A L レクチンに対して弱く反応する画分で、フコシル化の度合いが低い。

A s : A A L レクチンに対して強く反応する画分で、フコシル化の度合いが高い。

【 0 0 2 3 】

これらピークの面積を求めることにより目的の糖鎖構造の比率を算出することが可能となる。具体的には、3 鎖及び 4 鎖 α_1 - 酸性糖タンパク質のインデックスを「 $C o + C w \times 4 / 5$ 」、フコシル化 α_1 - 酸性糖タンパク質のインデックスを「 $A s + A w$ 」とし、
10
該インデックスを基に、健常人からカットオフ値を求める。尚、炎症時においては、 α_1 - 酸性糖タンパク質の量的変化、糖鎖構造の変動、フコースの付加が報告されているため、コントロールに用いる健常人は風邪気味の人或いは傷を負っている人など炎症を伴っている状態の人を除外することが望ましい。また、コントロール群は人数を多く取れば誤差も少なくカットオフ値のバラツキも少なくなるのは言うまでもない。更には、毎回多数の健常人の値を算出するのが困難な場合は、標準 α_1 - 酸性糖タンパク質を用意しておき診断毎に補正を行っても良い。

【 0 0 2 4 】

そして、同様の操作を癌術後患者に対して適応し、算出された値が上述カットオフ値と共に上回れば予後不良の可能性あり、即ち再発転移の危険性があると予測することができ
20
、慎重な観察が必要となる。また、このような状態が長期間持続すればさらに予後不良の可能性が高まる。

【 0 0 2 5 】

また、上記 C o n A レクチンと A A L レクチンを用いた交叉親和性免疫電気泳動によれば、各分離画分の存在率は、健常人 7 4 例の計算値が、 $C o = 4 2 . 7 \%$ 、 $C w = 4 0 . 0 \%$ 、 $C s = 1 7 . 3 \%$ 、 $A o = 4 1 . 7 \%$ 、 $A w = 3 7 . 9 \%$ 、 $A s = 2 0 . 4 \%$ であった。フコースの付加は、3 鎖及び 4 鎖からなる N 型糖鎖において生じるため、3 鎖及び 4 鎖のみを有する α_1 - 酸性糖タンパク質を含有している C o 画分の値が低いほどフコース付加率が低く、逆に C o 画分の値が高値であるほどフコースの付加している率も高くなる可能性が高い。
30

【 0 0 2 6 】

$C o = 4 2 . 7 \%$ から、測定誤差を考慮に入れ少なくとも 5 0 % 以下又は以上の場合に分けることができる。次に、各場合においてフコシル化糖鎖を含む画分は、カットオフ値 $A s + A w = 5 8 . 3 \%$ から、測定誤差を考慮に入れ少なくとも 7 0 % 以下又は以上の場合に分けることができ、更に 7 0 % 以上で非常にフコース修飾率の高まった状態を区別するために 8 0 % 以上を区分すると、患者の状態を以下の 5 つのグレードに分けることができる。また、各グレードにおける交叉親和性電気泳動のパターンを図 2 に示した。

【 0 0 2 7 】

- I) $C o \leq 5 0 \%$ 、且つ $A w + A s \leq 7 0 \%$ 、
- II) $C o \leq 5 0 \%$ 、且つ $A w + A s > 7 0 \%$ 、
- III) $C o > 5 0 \%$ 、且つ $A w + A s \leq 7 0 \%$ 、
- IV) $C o > 5 0 \%$ 、且つ $7 0 \% < A w + A s \leq 8 0 \%$ 、
- V) $C o > 5 0 \%$ 、且つ $8 0 \% < A w + A s$

【 0 0 2 8 】

この場合、健常人においては、ほとんどの場合グレード I に存在し、すべてグレード I 及び II に包含される。癌患者の場合、癌種や術後の進行過程などによりグレード I からグレード V までの間で種々分布する。これに対して、グレード IV 乃至 V の状態が少なくとも 3 0 日以上持続した場合は、すべて再発または転移が生じるとする予後不良の予測診断を行うことができる。また、短期間でもグレード IV 以上の状態が持続した場合においては、再発、転移の可能性が高まった状態であると認識することができ、注意深い観察が必要と
50

なり、今後の治療の目安とすることができる。

【0029】

以上、交叉親和性免疫電気泳動を例に取り本発明を実施するうえでの態様を説明してきたが、いうまでもなく糖鎖構造の分離とこれに基づく解析には、他の手法によっても良く、前述に記した種々の分離手法について簡単に以下に述べる。

まず、抗体親和プロット法に関しては、レクチン含有ゲル上に被検試料を塗布し電気泳動を行った後、抗AGP抗体（例えば、ウマ抗血清由来）をコートしたニトロセルロース膜をゲル上に敷きプロット操作を行う。その後抗AGP抗体（例えば、ウサギ抗血清由来）を反応させ、続いてペルオキシダーゼ標識 - 抗ウサギIgG抗体（例えば、ヤギ抗血清由来）を反応させた後、発色試薬を反応させることにより、抗 α_1 -酸性糖タンパク質を糖鎖構造の違いにより検出する。なお、プロット法用の膜としてはPVD F膜を用いてもよい。

10

【0030】

レクチン E L I S Aにおいては、予め抗AGP抗体をコートしておいたプレートに被検試料を添加し、次いでビオチン標識レクチン例えばAALレクチンを反応させる。その後、ストレプトアビジン及び基質を加え比色定量を行い、患者におけるフコース付加修飾率を算定することができる。

レクチン - イムノセンサーに関しては、例えばピアコア2000バイオセンサーを用いて行う。予め抗AGP抗体をコートしておき α_1 -酸性糖タンパク質を結合させる。さらに、レクチンたとえばAALレクチン反応させフコース付加修飾率の測定を行う。

20

【0031】

また、キャピラリー電気泳動では、精製した α_1 -酸性糖タンパク質をキャピラリー電気泳動で糖鎖のヘテロジェネイティ (heterogeneity) に基づき分画し、酵素消化により糖鎖を切り離した後、HPLCで各糖鎖を分離後質量分析などで直接糖鎖構造を決定する。

なお、HPLCに用いるクロマトグラフィーとしては、下記に述べる手法を適宜使用することができる。

【0032】

一方、レクチンを用いない糖鎖構造の解析手段としては、 α_1 -酸性糖タンパク質に対して、酵素的、又は化学的に糖鎖を切断した後、各種生化学的手法を用いて分離分画し、各糖鎖を、例えばNMR、質量分析により直接糖鎖構造あるいはフコース修飾の有無を解析することが可能である。

30

【0033】

酵素的切断にあつては、N - グリカナーゼ、グリコペプチダーゼ、エンド - β - N - アセチルグルコサミニダーゼ群酵素 (Endo D, H, F, CI, CIIなど) などにより好適にタンパク質から糖鎖部分を切断することができる。糖鎖分離方法としては、カラムクロマトグラフィーにおいては、陰イオン交換クロマトグラフィー、ホウ酸陰イオン交換クロマトグラフィー、高pH陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アミン吸着クロマトグラフィー、逆層クロマトグラフィー、レクチンカラムクロマトグラフィー等を用いて分離することができ、分画部分を前述NMRもしくは質量分析解析等を用いて糖鎖構造を決定できる。したがって、該測定値を基に相対的糖鎖構造の比率を算出することが可能である。また、この他にフコースの付加修飾率の算出に関しては、 α フコシダーゼ処理によりフコースを遊離せしめフコース量を上記機器により解析することによりフコース付加量を算出することも可能である。さらには、糖鎖部分を分離した後、前述フコース親和性レクチンを使用し回収することも可能であり、例えばAALレクチン固定化カラムに対しての吸着の有無により全糖鎖に対し、フコース付加糖の存在比率を算出することもできる。また、糖鎖末端をベンジル化標識することによっても好適に分離、解析することが可能である。

40

【0034】

本発明における、術後癌患者とは、癌に侵食された臓器や組織の切除手術を受けた患者

50

をいい、その癌種は問わない。すなわち、本発明の予後判定方法は、癌種によって測定が不能になることはなく、切除手術が施行された全ての担癌患者に適用できる。尚、好適には、術前からモニターを行うことが望ましい。

【0035】

測定は定期的に行うことが望ましく、また、間隔の短いほど信頼性の良い結果が得られるが、好適には1日～1ヶ月毎、より好適には1日～2週間毎、もっとも好適には1日～1週間毎に行うのが望ましい。

【0036】

α_1 -酸性糖タンパク質の被検試料としては、血清又は血漿の何れを用いても良い。また、患者の状態によっては、血液中の成分のうち特定成分、例えば他の糖タンパク質などが高値或いは低値であり交差親和性免疫電気泳動又は他の分離法において α_1 -酸性糖タンパク質の分離に悪影響を及ぼす恐れがあると判断した場合は、部分精製又は脱塩処理等の操作を行った後、被検試料とすることも可能である。また、前述糖鎖分離をまず行う場合は、予め α_1 -酸性糖タンパク質を精製しておく必要がある。

【0037】

このような精製手段としては、タンパク質の物理化学的性質を利用した通常使用されている精製手法を制限なく使用することができ、または組み合わせることができる。例えば、硫酸沈殿、エタノール沈殿、等電点沈殿、アセトン沈殿、電気泳動、各種陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーまたは、疎水クロマトグラフィー及び逆層クロマトグラフィー、及び順層クロマトグラフィーを組み合わせることができる。また、この他にもタンパク質との親和性を利用した分離法を適用することができ、例えば α_1 -酸性糖タンパク質に対して抗体を取得している場合は、該抗体を担体に固定化させたものを好適に用いることができ、固定化に使用する試薬としては、例えばBrCN活性化セファロース4B（アマシャム）などを使用することにより簡便に抗体カラムを作製することができる。担体としては一般に市販されている担体であれば特に制限はなく、デキストラン誘導体、ポリアクリルアミドゲルおよびアガロースゲルなどのゲルを用いることができる。精製度のチェックに際しても、通常使用されている生化学的手法を使用することができ、例えば電気泳動法、HPLCによるゲルろ過法により純度を確認することができる。また、厳密を期す場合は、N末端アミノ酸配列分析、またはアミノ酸分析または、質量分析により純度をチェックすることも可能である。また、前述のように塩類の影響により泳動パターンに影響を及ぼす可能性のある場合には、透析、限外濾過等の前処理により、塩を除去した後泳動を行うことができる。

【0038】

精製工程を例示すれば、以下の如く行うことにより達成されるが、もちろんこれに制限されるものではない。

まず、血漿を20mMクエン酸バッファー、pH4.0に対して透析操作を行う。次いで、該バッファーにて平衡化しておいたDEAE-Sepharose CL-6Bカラム（アマシャム）にかけ、カラム内を20mMクエン酸バッファー、pH7.0で交換した後、ゲル保持タンパク群を0.1M、0.2M、及び0.5M NaClを溶出する。ほとんどの α_1 -酸性糖タンパク質は、0.2Mに溶出される。該溶出画分を濃縮後、再び20mMクエン酸バッファー、pH4.0に対して平衡化し、SP-Sepharose CL-6Bカラム（アマシャム）にかける。殆どの α_1 -酸性糖タンパク質は、カラム内に結合保持され、20mMクエン酸バッファー、pH4.8にて溶出され精製することができる。

【0039】

診断に使用する血液量は、 α_1 -酸性糖タンパク質として3 μ g以上含んでいれば良く、上述したように血清の状態でも、血漿状態でも何れでも良い。従って、通常は血液中に0.5mg/ml程度の α_1 -酸性糖タンパク質が存在し、また癌患者においては α_1 -酸性糖タンパク質量が上昇傾向にあることを考え合わせると、血液量としては6 μ l程度あれば本診断に用いることができる。このように本診断には極めて微量の血液により術後癌

10

20

30

40

50

患者の診断が可能となる。また、前述のように癌状態においては血液中の α_1 -酸性糖タンパク質濃度が高まっていることも予想されるため、測定時に先立って血液中の α_1 -酸性糖タンパク質濃度を測定しておき、一定量を予後診断に用いることが望ましい。該 α_1 -酸性糖タンパク質の測定法としては、特に制限はないが抗 α_1 -酸性糖タンパク質抗体を利用したE L I S A法、R I A法などが高感度であり、簡便であることから好適に用いることができる。このように濃度測定用のために使用する血液量を考慮しても15 μ l以下で一連の操作が完了できる。

【0040】

本発明の術後癌患者の予後判定用キットは、マンノースと親和性を有するレクチン、フコースと親和性を有するレクチン、抗A G P抗体及び電気泳動用の試薬・器具類を含有するものであり、上記の予後判定方法を実施するためのキットである。

10

ここで、電気泳動用の試薬・器具類としては、電気泳動用ゲル、ゲル作製用の試薬、ゲル作製用器具等が挙げられる。

電気泳動用ゲルは、一次元用及び二次元用のゲルを含み、アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルを好適に用いることができる。また、ゲル濃度としては、 α_1 -酸性糖タンパク質の分子量を勘案し最良の分離能を期待できる濃度であり、アガロースゲルであれば、0.5~1.5%の範囲内で好適に用いることができ、より好適には0.8~1.2%の範囲で用いることができる。アクリルアミドゲルにおいては、好適には5.0~15%の範囲内のゲル濃度で好適に用いることができ、より好適には6.0~8.0%の範囲で用いることができる。

20

【0041】

泳動条件は、 α_1 -酸性糖タンパク質の等電点 $pI = 2.7$ であることを考慮に入れた pH であれば特に制限はなく、好適には $pH 7 \sim 10$ 、より好適には $pH 8 \sim 9$ で泳動を行うことができ、該 pH を維持できる緩衝液では特に問題はない。即ち、トリス緩衝液、ヘプス緩衝液、炭酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などを好適に用いることができる。また、泳動条件あるいは分離条件を好適に保つために種々の塩、安定化剤を組み合わせることもでき、例えばバルビタール、乳酸カルシウムを含むトリス緩衝液等を好適に使用することができる。従って、上記緩衝液、または緩衝液作製試薬を必要に応じてキットに含めることも可能である。

【0042】

30

マンノースと親和性を有するレクチンとしては、好ましくはC o n Aレクチンが挙げられ、二次元ゲル中にC o n Aレクチンを5~15mg/ml濃度、特に11~13mg/ml濃度となるよう含有せしめるのが好ましい。

また、フコースと親和性を有するレクチンとしては、好ましくはA A Lレクチンが挙げられ、フコース付加率の算定のためには、A A LをO型赤血球に対する凝集素価1:100~1000濃度、より好適には1:400~600濃度となるようにゲルを作製するのが好ましい。

【0043】

抗A G P抗体は、二次元ゲル中に含有させるのが好ましく、 α_1 -酸性糖タンパク質を特異的に認識できる抗体であれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を問わない。モノクローナル抗体の場合は、腹水の状態でもあるいは精製抗体でもよく、ポリクローナル抗体にあっては抗血清の状態でも、力価が弱ければ精製濃縮された状態の抗体であっても良い。

40

【0044】

また、必要に応じて二次元泳動を行う際に一次元と二次元ゲルの間に設置するゲルもキットに含めることができる。該ゲルには、泳動時 α_1 -酸性糖タンパク質がレクチンと複合体形成を防止するために、C o n Aの場合にはメチル-a-D-マンノシド、メチル-a-D-マンノシド、メチル-a-D-グルコシド及びメチル-a-D-グルコシド又はそれらを組み合わせて使用することができ、A A Lレクチンの場合には、 α -L-フコースを添加することにより好適な泳動を行うことができる。従って、上記糖を含む試薬が

50

、または糖含有ゲルをキットに含めることができる。

【 0 0 4 5 】

更に、得られる沈降線検出用として、タンパク染色用色素を含めることができるが、クマーシブリリアントブルー R - 2 5 0 または G - 2 5 0、アミドブラック、あるいはマラカイトグリーンなどを好適に用いることができるため、該色素を試薬の状態、又は酸及び/又はアルコールに溶かした溶液としてキットに加えることも可能である。

【実施例】

【 0 0 4 6 】

次に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例 1

10

交叉親和性免疫電気泳動による α_1 - 酸性糖タンパク質の糖鎖構造の解析

約 $3 \mu\text{g}$ の α_1 - 酸性糖タンパク質を含む血清サンプル（癌患者由来血液、インフォームドコンセントにより同意の基に供与）を一次元目のゲルに乗せ泳動を行う。この一次元ゲルは、7.9% (w/v) のアクリルアミドゲルであって、Con A 12 mg/ml か、もしくは AAL (O 型血液細胞に対する血球凝集反応が 1:512) $300 \mu\text{l/ml}$ を含有しており、100V、3 時間泳動を行った。二次元電気泳動では、抗 α_1 - 酸性糖タンパク質抗体 $30 \mu\text{l}$ を含有する 1% アガロースゲルを、1 cm 幅のゲルを間に設置することにより、一次元ゲルと分離して設置し、5 にて 2V、18 時間泳動を行った。この 1 cm ゲルは、泳動時 α_1 - 酸性糖タンパク質がレクチンと複合体形成を防止するために、Con A の場合には 69 mM メチル - α - D - マンノシド及び 69 mM メチル - α - D - グルコシド、また AAL の場合には、8.1 mM α - L - フコースを含有する。また、一次元ゲルは二次元ゲルに対して直角となるように設置し泳動を行った。泳動バッファは、一次元及び二次元電気泳動共に 24.32 mM バルビタール、0.34 mM 乳酸カルシウムを含む 73.12 mM トリスバッファ、pH 8.6 を用いた。泳動後、免疫沈降線をクマーシブリリアントブルー R 250 で染色し、曲線内の面積を測定プログラム (NIH Image software, NIH) を使用し算出した。この値を基に、各糖鎖構造相対量、即ち Co, Cw, Cs 及びフコース付加修飾率 Ao, Aw, As を算出した。更に、該数値を基に、3 鎖及び 4 鎖 AGP インデックス: $\text{Co} + \text{Cw} \times 4/5$ 、フコシル化 AGP インデックス: $\text{As} + \text{Aw}$ を求めた。また、Co 及び $\text{As} + \text{Aw}$ を基にグレード分けを行った。コントロールとしては、 α_1 - 酸性糖タンパク質標準品 (ヒト血清タンパク

20

30

キャリブレーター、DAKO) を用いた。なお、患者血液は血清の状態で使用し、各血清は術後可能な限り患者同意のもと健康状態を考慮した上で定期的に採血したものを交叉親和性免疫電気泳動に供した。該電気泳動被検サンプル量は、血清を前以て ELISA により α_1 - 酸性糖タンパク質の濃度を求めておき、 $3 \mu\text{g}$ となる血清量を電気泳動に供した。

【 0 0 4 7 】

以上より、術後癌患者のうち 30 日以上グレード IV 以上の状態が続いた場合 (P - 12 ~ 18) であり、全て予後不良、即ち全例において再発又は転移が認められ、内 4 名は死亡した。一方、グレード IV 以上の状態になっても一過性であり 30 日以内にグレードが II 以下に下がった患者に関しては、予後は良好であった (表 1)。図 3 A には、予後良好であった患者 P - 7 の結果を、また図 3 B には予後不良であった患者 P - 15 の結果を示す。

40

【 0 0 4 8 】

また、予後不良患者 P - 12 ~ 18 は、3 鎖及び 4 鎖 AGP インデックス: $\text{Co} + \text{Cw} \times 4/5$ 、フコシル化 AGP インデックス: $\text{As} + \text{Aw}$ の算出値に基づくカットオフ値を何れも上回っていた。

【表 1】

進行癌患者における α_1 酸性糖タンパク質 (AGP) の術後グライコフォーム

患者	癌種	ステージ	術後 日数	AGP量 (μ g/mL)	グレード	3鎖4鎖 存在率	フコース 付加率	予後
P-1	食道	Ⅲ	231	1221	I	79.6	55.4	良好
P-2	胃	Ⅲa	184	309	Ⅲ	82.8	53.3	良好
P-3	胃	Ⅲa	279	491	Ⅱ	79.1	84.8	良好
P-4	胃	Ⅲb	216	640	I	78	67	良好
P-5	胃	Ⅳ	344	217	Ⅲ	85.7	39.3	良好
P-6	胃	Ⅳ	237	647	I	75.6	56	良好
P-7	肺	Ⅲa	268	1573	Ⅱ	75.1	78.4	良好
P-8	肺	転移	323	969	Ⅲ	77.7	66.2	良好
P-9	肝	Ⅲ	283	527	I	79.4	55.6	良好
P-10	脾	転移	156	736	Ⅲ	86	47.1	良好
P-11	大腸	Ⅲa	224	3215	I	72.9	52.5	良好
P-12	胃	Ⅳ	188	656	V	82.9	81	不良
P-13	肝臓	Ⅲ	245	1371	Ⅳ	86.4	73.8	不良
P-14	膵	Ⅲ	267	1309	Ⅳ	85.9	79.9	不良
P-15	大腸	Ⅳ	206	2328	Ⅳ	87.7	78.3	不良
P-16	大腸	Ⅳ	195	1958	Ⅳ	80.5	72.2	不良
P-17	大腸	再発	141	2451	V	87.2	91.9	不良
P-18	大腸	再発	301	980	V	86.3	87.8	不良
健常人						80.5	64.3	

【0049】

【図面の簡単な説明】

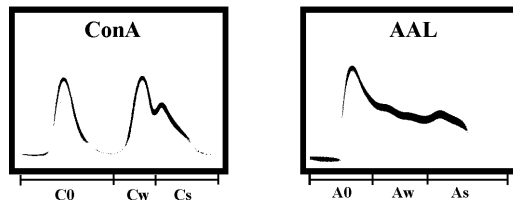
【0050】

【図1】図1は、ヒト血清中 α_1 -酸性糖タンパク質の交叉親和性免疫電気泳動のパターンを示す。Con A: Con Aレクチンを用いた泳動パターン、AAL: AALレクチンを用いた泳動パターン。

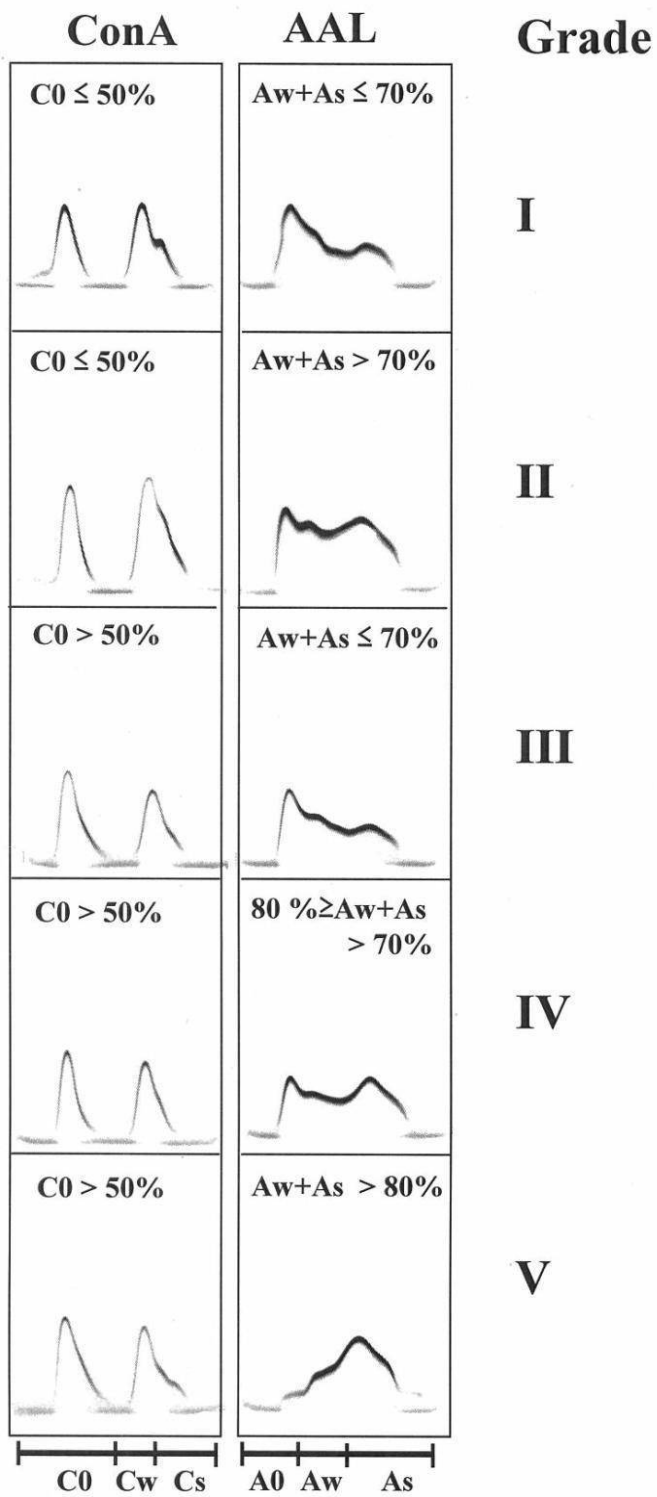
【図2】図2は、5段階グレード分けした場合の、各グレードにおける交差免疫電気泳動のパターンを示している。

【図3】図3は、進行癌患者の術後における α_1 -酸性糖タンパク質のグレードの推移を示している。図3A: 表1中の患者7を示す。図3B: 表1中の患者15を示す。

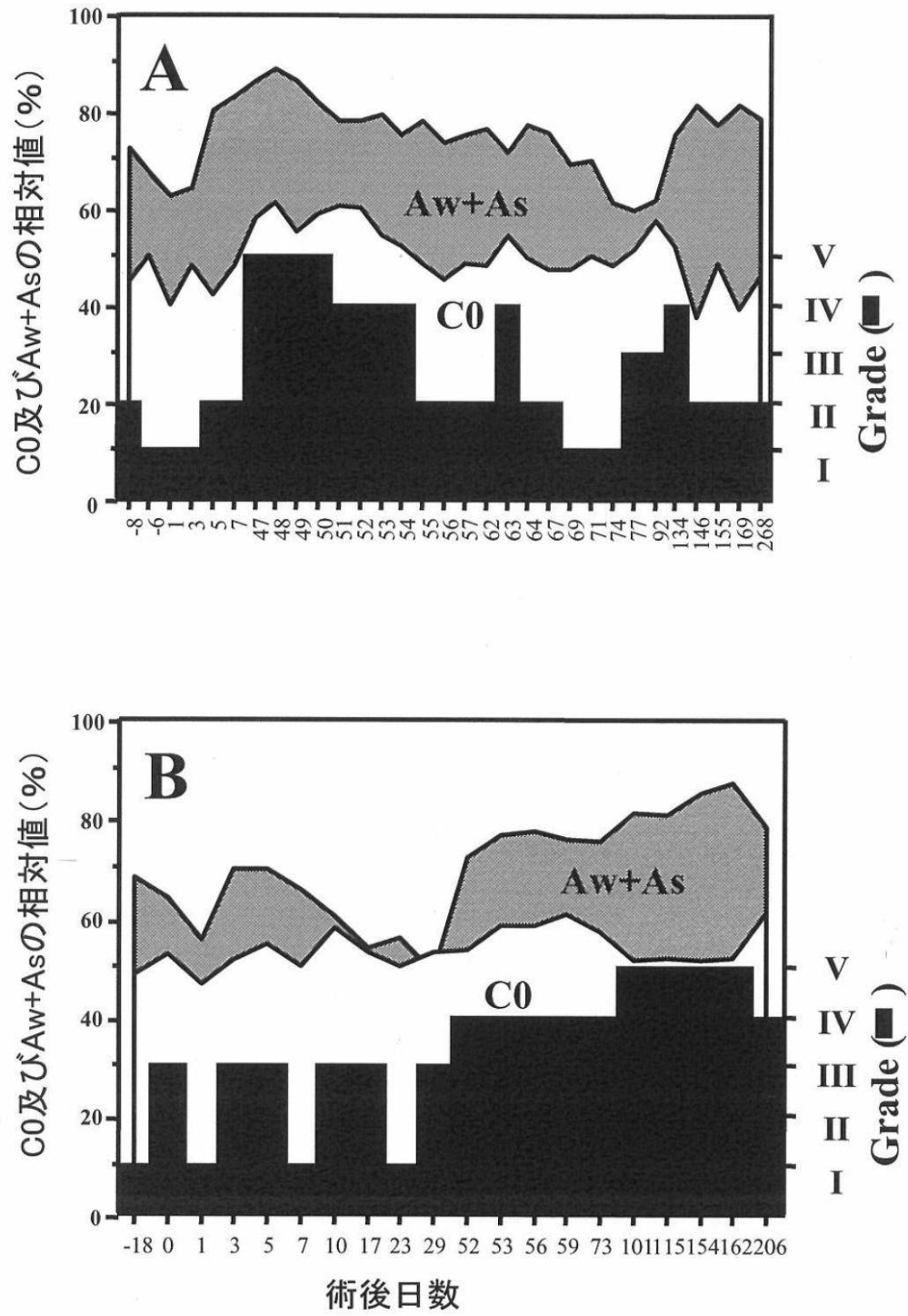
【図 1】



【図 2】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 27/26 3 1 5 G
G 0 1 N 33/561

(74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
(74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
(72)発明者 矢澤 伸
群馬県前橋市六供町 3 0 1 - 1 オーネストマンション 2 0 6
(72)発明者 高橋 順子
群馬県高崎市島野町 1 1 4 0 川多ハイツ 1 0 6
(72)発明者 八木橋 裕子
群馬県前橋市下新田町 5 0 2 - 4 アピタシオンエル B - 1 0 1
(72)発明者 西村 東洋
群馬県高崎市大沢町 2 2 7 - 3 ファミールスズキ 9
(72)発明者 浅尾 高行
群馬県前橋市下小出町 2 - 1 7 - 2 サーパス下小出 5 0 5
(72)発明者 橋本 信次
群馬県前橋市昭和町 2 - 2 - 2 第一ビル 3 0 A
(72)発明者 巨智部 直久
群馬県前橋市荒牧町 1 1 6 8 - 3 2

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開平 0 3 - 0 7 3 8 5 2 (J P , A)
特開平 0 7 - 3 2 5 0 8 3 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 2 8 9 8 6 0 (J P , A)
特開昭 6 1 - 0 4 4 3 5 5 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 0 0 4 6 3 2 (J P , A)
特表平 0 3 - 5 0 3 2 8 1 (J P , A)
八木橋裕子 他, 「癌患者血しょうオロソムコイドにおける N 型糖鎖のフコシル化」, 「第 7 5 回日本生化学会大会発表抄録集」, 2 0 0 2 年 8 月 2 5 日, Vol.74, No.8, p.726 2P-078
橋本信次 他, 「血清オロソムコイド糖鎖の癌性変化と予後予測への応用」, 第 5 8 回日本消化器外科学会総会, 2 0 0 3 年 7 月, Vol.36, No.7, p.1081 PP-2-599

(58)調査した分野(Int.Cl., DB 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 9 8
J M E D P l u s (J D r e a m I I)
J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)
J S T P l u s (J D r e a m 2)

专利名称(译)	术后癌症患者的预后方法		
公开(公告)号	JP4253233B2	公开(公告)日	2009-04-08
申请号	JP2003299467	申请日	2003-08-25
申请(专利权)人(译)	大冢制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	大冢制药有限公司		
[标]发明人	矢澤伸 高橋順子 八木橋裕子 西村東洋 浅尾高行 橋本信次 巨智部直久		
发明人	矢澤 伸 高橋 順子 八木橋 裕子 西村 東洋 浅尾 高行 橋本 信次 巨智部 直久		
IPC分类号	G01N33/574 G01N27/447 G01N33/561 G01N33/483 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.B G01N27/26.315.F G01N27/26.315.H G01N27/26.315.J G01N27/26.315.K G01N27/26.315.G G01N33/561 G01N27/447.315.F G01N27/447.315.G G01N27/447.315.H G01N27/447.315.J G01N27/447.315.K G01N33/483.F G01N33/53.S		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB03 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/GC12 2G045/JA01		
代理人(译)	村田正树		
其他公开文献	JP2005069846A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，准确，简单地预测和确定癌症患者的器官和组织被癌症消除后的预后。ZSOLUTION：在确定癌症消除的器官和组织切除手术后患者预后的方法中，具有三链和四链结构的α连接糖链的丰度比 α SB>1 / SB>- 患者血液中存在的酸性糖蛋白，确定添加到N-连接糖链的岩藻糖的修饰比，并与健康人的计算值进行比较。当术后癌症患者的这些数值均超过从健康人计算的截止值时，在确定患者预后的方法中认识到存在预后失败的可能性。Z

進行癌患者における α_1 酸性糖タンパク質(AGP)の術後グライコフォーム

患者	癌種	ステージ	術後 日数	AGP量 (μ g/ml)	グレード	3鎖4鎖 存在率	フコース 付加率	予後
P-1	食道	Ⅲ	231	1221	I	79.6	55.4	良好
P-2	胃	Ⅲa	184	309	Ⅲ	82.8	53.3	良好
P-3	胃	Ⅲa	279	491	Ⅱ	79.1	84.8	良好
P-4	胃	Ⅲb	216	640	I	78	67	良好
P-5	胃	Ⅳ	344	217	Ⅲ	85.7	39.3	良好
P-6	胃	Ⅳ	237	647	I	75.6	56	良好
P-7	肺	Ⅲa	268	1573	Ⅱ	75.1	78.4	良好
P-8	肺	転移	323	969	Ⅲ	77.7	66.2	良好
P-9	肝	Ⅲ	283	527	I	79.4	55.6	良好
P-10	脾	転移	156	736	Ⅲ	86	47.1	良好
P-11	大腸	Ⅲa	224	3215	I	72.9	52.5	良好
P-12	胃	Ⅳ	188	656	V	82.9	81	不良
P-13	肝臓	Ⅲ	245	1371	Ⅳ	86.4	73.8	不良
P-14	脾	Ⅲ	267	1309	Ⅳ	85.9	79.9	不良
P-15	大腸	Ⅳ	206	2328	Ⅳ	87.7	78.3	不良
P-16	大腸	Ⅳ	195	1958	Ⅳ	80.5	72.2	不良
P-17	大腸	再発	141	2451	V	87.2	91.9	不良
P-18	大腸	再発	301	980	V	86.3	87.8	不良
健常人						80.5	64.3	