

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6192123号  
(P6192123)

(45) 発行日 平成29年9月6日(2017.9.6)

(24) 登録日 平成29年8月18日(2017.8.18)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>G O 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/543 5 4 5 A
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 U
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574 A
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
請求項の数 8 (全 30 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2014-550608 (P2014-550608)  
 (86) (22) 出願日 平成24年1月9日(2012.1.9)  
 (65) 公表番号 特表2015-503922 (P2015-503922A)  
 (43) 公表日 平成27年2月5日(2015.2.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2012/070151  
 (87) 国際公開番号 W02013/104104  
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日(2013.7.18)  
 審査請求日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(73) 特許権者 514173825  
 スージョウ マイクロダイアグ バイオメ  
 ディスン カンパニー リミテッド  
 中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2  
 3 スージョウ インダストリアル パー  
 ク ディストリクト バイオベイ 2 1 8  
 シンフー ロード シー4 ビルディン  
 グ スイート 2 0 1  
 (74) 代理人 100116872  
 弁理士 藤田 和子  
 (74) 代理人 100107560  
 弁理士 佐野 惣一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌の予測および診断のためのバイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)~(4)のいずれかの、乳癌転移検出用、乳癌の微小転移巣検出用、乳癌の p T N M ステージ判定用、乳癌治療の間の腫瘍のリアルタイムモニタリング用又は乳癌予後予測用の検査キット。

(1) 配列番号1で示されるプライマー、配列番号2で示されるプライマー及び配列番号3で示されるプローブを含み、T a q M a n (登録商標) プローブに基づいて C S T 4 の m R N A をリアルタイムで定量する検査キット

(2) 配列番号2で示される C S T 4 用プライマー、配列番号32で示される C S T 4 用プライマー、及び配列番号3でプローブを含み、核酸ベース増幅(N A S B A)または転写媒介増幅(T M A)に基づいて C S T 4 の m R N A を定量する検査キット

(3) 配列番号33~36で示される4つのプローブを含み、リガーゼ連鎖反応(L C R)に基づいて C S T 4 の m R N A を定量する検査キット

(4) 配列番号37~40で示されるプライマーおよび配列番号41で示されるプローブを含み、好熱性鎖置換増幅(t S D A)に基づいて C S T 4 の m R N A を定量する検査キット

【請求項 2】

陽性対照および陰性対照ならびにブランクサンプルを含む、請求項1に記載の検査キット。

【請求項 3】

前記検査キットを介して測定される乳癌マーカーの発現レベルまたは定量的含有量が健常者の前記検査キットを介して測定される乳癌マーカーの発現レベルまたは定量的含有量と比較され、その結果が陽性が否かを決定し、またはその結果がカットオフ値より高ければ陽性と決定する、請求項 1 に記載の検査キットであって、前記カットオフ値が乳癌患者および健常者の体液または組織サンプル中の乳癌マーカー発現 / レベルの比較を通して得られ、前記カットオフ値が統計的に有意であり、前記サンプルが血液、尿、骨髄、乳癌細胞株、乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織ならびにリンパ節組織よりなる群から選択される 1 以上を含有する、請求項 1 に記載の検査キット。

【請求項 4】

乳癌転移診断用又は乳癌 p T N M ステージ判定用の検査キットであって、前記検査キットが、血液のシスタチン S レベルを検出し、固体基質、前記基質上に固定されたキャプチャー、ならびにビオチン化キャプチャーおよび比色検出用の対応する基質を包含し、固定されたキャプチャーは特異的モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体であるか、または

10

前記検出キットが、血液シスタチン S レベルを検出し、固体基質、前記固体基質上に固定されたシスタチン S、マウス抗シスタチン S モノクローナル抗体、酵素標識化二次抗体および比色検出用の対応する基質を包含するか、または

前記検出キットが、血液シスタチン S レベルを検出し、固体基質、キャプチャー、酵素標識化二次抗体および比色検出用の対応する基質を包含し、キャプチャーが特異的モノクローナル抗体を包含し、ビオチン化キャプチャーがポリクローナル抗体である、乳癌転移診断用又は乳癌 p T N M ステージ判定用の検査キット。

20

【請求項 5】

二重抗体サンドイッチ E L I S A キット、免疫プロットティングキット、又は競合 E L I S A キットである、請求項 4 に記載の乳癌転移診断用又は乳癌 p T N M ステージ判定用の検査キット。

【請求項 6】

前記検査キットが二重抗体サンドイッチ E L I S A キットであり、モノクローナル抗体がラット抗シスタチン S 抗体であり、固体基質が E L I S A プレートであり、ビオチン化ポリクローナル抗体がビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体である、請求項 5 に記載の乳癌転移診断用又は乳癌 p T N M ステージ判定用の検査キット。

30

【請求項 7】

ラット抗シスタチン S 抗体により E L I S A プレートをコーティングし、その後 3 % B S A でバックフィルされ、8 倍に希釈したサンプルを前記プレートにアプライし、それを 37 °C でインキュベートし、T B S によってサンプルを含む前記穴を洗浄し、ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体を加え、37 °C で前記プレートをインキュベートし、T B S によってサンプルを含む穴を洗浄し、ストレプトアビジン - ビオチン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) 複合体を加え、37 °C で前記プレートをインキュベートし、続いて、T B S でプレートを洗浄し、最後に検体をアルカリホスファターゼ ( A L P ) を添加し、マイクロプレートリーダーにおける O D ( 405 nm ) で読んで定量化される、請求項 6 に記載の乳癌転移診断用又は乳癌 p T N M ステージ判定用の検査キット

40

【請求項 8】

前記検査キットが二重抗体サンドイッチ E L I S A キットであり、E L I S A プレートが固体基質であり、固定されたキャプチャーがラット抗シスタチン S モノクローナル抗体であり、前記ビオチン化キャプチャーがウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体 ( 価数 1 : 1000 である ) でありおよび前記比色検出用基質がアルカリホスファターゼであるか、または

前記検査キットが競合 E L I S A キットであり、E L I S A プレートが前記固体基質であり、シスタチン S の濃度が 5 μ g / m L であり、前記特異的モノクローナル抗体がラット抗シスタチン S 抗体 ( 価数 1 : 2000 である ) であり、酵素ラベル化二次抗体が A L

50

Pラベル化ヤギ抗マウスIgG（価数1：2000であり）であり、および前記比色検出用基質がALP基質であり、シスタチンS、酵素ラベル化二次抗体およびALP基質の体積比が1：2であるか、または

前記検査キットが免疫プロットングキットであり、前記固体基質はニトロセルロース膜であり、前記キャプチャーはモノクローナルシスタチンS抗体（価数1：1000である）であり、前記酵素ラベル化二次抗体はペルオキシダーゼラベル化ヤギ抗ウサギIgGであり、および前記酵素基質はTMB溶液である、請求項5に記載の乳癌転移診断用又は乳癌pTNMステージ判定用の検査キット。

#### 【発明の詳細な説明】

10

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は生物医療技術についてである。乳癌用のバイオマーカーおよびそれらの乳癌の診断への利用、動的検出および進行決定は本発明において述べられる。検査試薬および検査キットならびにそれらの個々のプロトコルも本発明に含まれる。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

WHOによる癌についての報告によると、約1200万件の乳癌の発生が毎年報告されている。40万件超の乳癌が中国において毎年報告されており、その発生率は増加している。北京や上海などの都市部での乳癌発生率は他の癌よりも高い。上海での乳癌の発生率は過去三十年で17.7/100000～70/100000に増加している。すべての悪性腫瘍の中で乳癌の発生率の順位は2番から1番に増加した。5年後の生存率は60%未満である。

20

#### 【0003】

早期発見と5年生存率は、近年かなり改善されているが、乳癌による54万の死亡がWorld Cancer Report 2008（WHO）において報告された。乳癌の国内死亡率は、毎年3%増加している。乳癌の予防および治療における多くの問題は、乳癌の早期発見および早期介入、乳癌治療評価、腫瘍診断モニタリングおよび治療後の患者の乳癌の再発および転移の正確な予測を包含する解決を必要とする。

#### 【0004】

30

高感度および特異性を有する乳癌の診断方法は乳癌の早期スクリーニングおよび患者の診断の改善に重要である。シスタチンスーパーファミリーは、カテプシン阻害作用を有するタンパク質の配列である。それらタンパク質は癌の発生および成長において重要な役割を演ずる。シスタチンスーパーファミリーに属するタンパク質は、組織および体液中のシステインプロテアーゼと可逆的に結合し、カテプシンの過剰活性化を抑制する。シスタチンCは、カテプシンBに最も高い親和性を有するリガンドである。卵巣癌および頭頸部癌の腫瘍における発現レベルは増加している。ステフィンA（シスタチンスーパーファミリーのメンバー）は非小細胞性肺癌（NSCLC）腫瘍における発現を増加している。ステフィンBのmRNAの発現は髄膜腫変化において阻害されている。シスタチンF（またはLeukocystatin、CMAF）は種々の腫瘍において発現する可能性が高い。調査は、増加したシスタチンの発現が、カテプシン発現が上昇し、シスタチンの発現の増加をもたらし、フィードバック機構を通してカテプシンの過剰活性化を阻害する間に腫瘍の発生およびつきぬきにおいてカテプシンの関与に起因する可能性が高いことを示す。しかしながら、シスタチンの発現は必ずしも腫瘍増殖と積極的に関連しているわけではないことに注意されたい。例えば、シスタチンCの低発現は、神経膠腫患者の後期、予後不良および高転移の可能性を示す。mRNAおよびタンパク質の発現の両方は調査され、その結論は両方の研究において確認されている。

40

#### 【0005】

本発明において、CST4（シスタチンスーパーファミリーのメンバー）とそのスプライスと乳癌腫瘍との強い関係は確認されている。CST4、またはシスタチンSは、14

50

1個のアミノ酸残基を含むシステインプロテアーゼ阻害剤の一つである。シスタチンSは、涙、唾液、血漿および血清などの種々の体液ならびに分泌物に見られる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の第一の目的は、CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA、CST4特異的プライマー用増幅産物、シスタチンSのCST4遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質の新規な用途を提供することである。これらの用途は、乳癌の新たな診断方法を開発する点でかなり重要である。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明に包含される技術を以下に記載する。

乳癌の診断および予防におけるCST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA、CST4特異的プライマー用増幅産物、シスタチンSのCST4遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質の利用。CST4遺伝子の配列は配列番号42に存在する。CST4遺伝子、CST4のmRNAおよびCST4のスプライスのcDNAのプローブは配列番号3に示されるような配列を有する。増幅産物の特異的プライマーは配列番号1、4、6、8、10、12、14、16、18、20（プライマー1）および配列番号2、5、7、9、11、13、15、17、19、21（プライマー2）に示される配列を有する。配列番号1における配列は、配列番号2における配列と対にされる。配列番号4における配列は、配列番号5における配列と対にされる。配列番号6における配列は、配列番号7における配列と対にされる。配列番号8における配列は、配列番号9における配列と対にされる。配列番号10における配列は、配列番号11における配列と対にされる。配列番号12における配列は、配列番号13における配列と対にされる。配列番号14における配列は、配列番号15における配列と対にされる。配列番号16における配列は、配列番号17における配列と対にされる。配列番号18における配列は、配列番号19における配列と対にされる。配列番号20における配列は、配列番号21における配列と対にされる。シスタチンSのエピトープペプチドの配列は配列番号50に示される。本願の診断およびスクリーニングは乳癌の転移および微小転移巣、pTNMステージ判定、癌治療および予後予測の間の腫瘍のリアルタイムモニタリングを意味する。これらの配列は本発明の範囲を限定しないということに留意されたい。それらの機能の全配列は本発明に含まれる。

20

30

【0008】

本発明の第二の目的は乳癌マーカーと特異的に相互作用する種々のキャプチャーを提供することである。

【0009】

上記目的を実現するために、技術を以下に記載する：

乳癌マーカー用のキャプチャーであり、キャプチャーは乳癌予測用および診断用の乳癌マーカー用キャプチャーである。乳癌マーカーは、CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA、CST4 - 特異的プライマー用の増幅産物シスタチンSのCST4遺伝子およびエピトープペプチドによってコードされるシスタチンSタンパク質である。

40

【0010】

特異的プライマーの配列は、配列番号1～2に存在する。

【0011】

CST4遺伝子、CST4のmRNA、CST4のスプライスのcDNA用プローブの配列は、配列番号3に存在する。

【0012】

増幅産物の配列は、配列番号43に存在する。

50

## 【 0 0 1 3 】

本願明細書で述べられるキャプチャーは、シスタチンSまたはそのエピトープペプチドを具体的に実現する分子である。

## 【 0 0 1 4 】

シスタチンSのエピトープペプチドの配列は、配列番号50に示される。

## 【 0 0 1 5 】

本発明の第3の目的は、キャプチャーの新規な用途を提供することである。検査キットおよびそれらの個々のプロトコルはキャプチャーに基づく。新規な方法論として、これらの用途および乳癌検出用の検査キットは高い精度、簡易操作および大スケール診療の実現可能性を有する。

10

## 【 0 0 1 6 】

上述の目的の実現のために、技術は以下に記載されている。

乳癌検出用の検査試薬および検査キットの製造におけるキャプチャーの利用

これらのキャプチャーを含むすべての診断キット。

## 【 0 0 1 7 】

診断キットの詳細は以下のとおりである。

## 【 0 0 1 8 】

1) TaqManプローブを用いるCST4のmRNA用のリアルタイムかつ定量的検査キット。プライマー配列は配列番号1~2に示される。プローブの配列は配列番号3に示される。

20

2) プローブとして蛍光色素を用いるCST4のmRNA用のリアルタイムかつ定量的検査キット。プライマー配列は配列番号1~2に示される。内部基準用のプライマーの配列は配列番号30~31に示される。または

3) 核酸ベースのCST4のmRNA用定量的検査キットは増幅(NASBA)または転写メジアン増幅(TMA)。両方のキットは、CST4用のプライマーおよびプローブを包含し、その配列は、配列番号2、32(プライマー用)および3(プローブ用)に示される。または

4) リガーゼ連鎖反応(LCR)に基づくCST4のmRNA用の定量的検査キット。4つのプローブは、その配列が配列番号33~36に示されるように包含される。または

5) 好熱性鎖置換増幅(tSDA)に基づくCST4のmRNA用の定量的検査キット。プライマー(配列番号37~40に示される配列)およびプローブ(配列番号41)は包含されている。

30

## 【 0 0 1 9 】

診断キットは以下であり得る：

1) 固体基質、固体基質に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび酵素基質(比色分析)を包含している二重抗体サンドイッチELISAキット。固定されたキャプチャーはモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。または、

2) 固体基質、キャプチャー、酵素標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含しているプロットングキット。キャプチャーはモノクローナル抗体およびビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。または

40

3) 固体基質、固定された抗原、ビオチン化キャプチャー、比色検出用酵素基質および特異的モノクローナル抗体を包含している競合ELISAキット。ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

## 【 0 0 2 0 】

陽性対照および陰性対照ならびにブランクサンプルは診断キットに包含される。

## 【 0 0 2 1 】

ダブル抗体ELISAキットの成分として、モノクローナル抗体はラット抗シスタチンS抗体であり、固体基質はELISAプレートであり、およびビオチン化ポリクローナル抗体はビオチン化ウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体である。

50

## 【0022】

または、彼は、検査キットはダブル抗体ELISAキットに基づくと述べ、ここで、固体基質はELISAプレートであり、固体基質上に固定されたキャプチャーはラット抗シスタチンSモノクローナル抗体(R&D、MAB 1926、5 µg/mL)であり、ビオチン標識ポリクローナル抗体は、ビオチン化ウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体である。

## 【0023】

または、検査キットは競合ELISAキットに基づき、ここで、アッセイの固体基質は、ELISAプレートであり、シスタチンSの濃度は5 µg/mLであり、モノクローナル抗体は、価数1:2000であるラット抗シスタチンS抗体であり、酵素標識二次抗体は、価数1:2000であるALP標識ヤギ抗マウスIgGである。酵素基質はALPであり、シスタチンSおよび酵素標識第二抗体の基質に対する体積比は1:2である。

10

## 【0024】

または、検査キットは免疫プロット法に基づき、ここで、固体基質はニトロセルロース膜であり、キャプチャーは価数1:1000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、酵素標識第二抗体はHRP標識ヤギ抗ウサギIgG(Jackson Immunoresearch)であり、比色検出用酵素基質はTMB溶液(Kirkegaard and Perry Laboratories Inc(ゲイザースバーグ、メリーランド)、「TMBペルオキシダーゼ基質(TMB Peroxidase Substrate)」溶液カタログ番号50-76-01)である。

20

## 【0025】

検査キットの述べられたプロトコルの詳細は以下に記載されている。

## 【0026】

ELISAプレート(Corning)をシスタチンS(Abnova、カタログ番号H00001472-P01、5 µg/mL)で被覆し、BSA3%でバックフィル(裏込め)をする。ラット抗シスタチンSモノクローナル抗体(R&D、カタログ番号MAB1296、価数1:2000)をサンプリングし、血清(8倍希釈)を調製し、4で一晚インキュベートする。サンプルを前処理したELISAプレート上にアプライ(付与)しおよび1時間37でインキュベートした。サンプルを含む穴をTBS緩衝液(10 mM Tris-HCl、154 mM NaCl、pH7.5)で洗浄する。0.3%BSAを含むTBSに溶解させたALP標識ヤギ抗マウスIgG(Jackson Immunoresearch、価数1:2000)を穴にアプライし、1時間37でインキュベートした。ALPの基質(KPL、Blue Phos溶液、Kirkegaard and Perry Laboratories Inc(ゲイザースバーグ、メリーランド)、カタログ番号508805)をアプライし、OD(405 nm)をマイクロプレートリーダーで測定した。

30

## 【0027】

本発明の第4の目的は、簡単操作、高感度および優れた特異性の乳癌診断用のインビトロ方法およびインビトロ診断用の検査キットを提供することである。

## 【0028】

上記目的の実現のため、本発明の技術は以下に詳細に記載されている。

40

## 【0029】

検査キットを用いて測定された乳癌マーカーの発現レベルまたは定量的成分は健常者の乳癌マーカーの発現レベルまたは定量的成分と比較され、その結果が陽性であるか否かを決定し、またはその結果は、カットオフ値より高い場合に陽性であると考えられるかどうか決定する。カットオフ値は、乳癌患者および健常者の体液または組織サンプルにおける乳癌マーカー発現/レベルの比較を通して得られる。カットオフ値は統計的有意性を有する。サンプルは以下の1以上を包含する:血液、尿、骨髄、乳癌細胞株、乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織ならびにリンパ節組織。例えば、この場合において、カットオフ値は3.434 ng/mLである。

50

## 【0030】

乳癌予測用および診断用検査キットは、シスタチンSタンパク質発現の測定用キットである。キットは、固体基質、固体基質上に固定されたキャプチャー、ビオチン化キャプチャーおよび比色検出用酵素基質を包含する。固定されたキャプチャーは、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

## 【0031】

または、シスタチンSタンパク質発現測定用検査キットは、固体基質、プレートに被覆されたシスタチンSタンパク質、ラット抗シスタチンSモノクローナル抗体、酵素標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含する。

## 【0032】

または、シスタチンSタンパク質発現測定用検査キットは、固体基質、キャプチャー、酵素標識第二抗体および比色検出用酵素基質を包含する。キャプチャーは、モノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーはポリクローナル抗体である。

## 【0033】

検査キットは、二重抗体サンドイッチELISAに基づき、ここで、アッセイの固体基質はELISAプレートであり、固定されたキャプチャーはラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、ビオチン化キャプチャーは、価数1:1000であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体である。酵素基質はALPである。

## 【0034】

または、キットは競合ELISAに基づき、ここで、アッセイの固体基質は、ELISAプレートであり、シスタチンSの濃度は5 $\mu$ g/mLであり、モノクローナル抗体は、価数1:2000であるラット抗シスタチンS抗体であり、酵素標識二次抗体は、価数1:2000であるALP標識ヤギ抗マウスIgGである。酵素基質はALPであり、シスタチンSおよび酵素標識第二抗体の基質に対する体積比は1:2である。

## 【0035】

または、検査キットは免疫ブロット法に基づき、ここで、固体基質はニトロセルロース膜であり、キャプチャーは価数1:1000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体であり、酵素標識第二抗体は、HRP標識ヤギ抗ウサギIgGであり、比色検出用酵素基質はTMB溶液である。

## 【0036】

本発明の利点は、1)乳癌の診断における発現CST4のmRNAおよびシスタチンSタンパク質の利用、癌の成長および乳癌予後予測のリアルタイムモニタリングは、大量スケールのサンプルの場合本発明において変動する。当該結果はかなり正確であり、本発明は、乳癌診断およびリアルタイムモニタリングならびに乳癌予後予測用の新規な方法の開発において用いられ得、2)乳癌診断およびリアルタイムモニタリングならびに乳癌予後予測用の検査試薬および高感度のキットは本発明に包含される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0037】

【図1】CST4を含む組み換えプラスミドPmd18-Tを示す図である。

【図2】扁桃腺、下垂体後葉、甲状腺、唾液腺、骨格筋、骨髄、赤血球および血小板を含まない末梢血、肺、胃、肝臓、心臓、腎臓、副腎、腸管、結腸、膵臓、脾臓、膀胱、前立腺、卵巣、子宮、胎盤および精巣、ヒト乳癌細胞株(HCC1937、SK-BR-3、およびMCF-7)ならびに正常な乳房組織細胞株(Hs578Bst)を包含している、正常組織におけるCST4遺伝子の発現を示す図である。

【図3】プローブとして蛍光色素を含むリアルタイムqPCRを用いる乳癌腫瘍およびそれらの個々の腫瘍隣接組織の20個の場合におけるCST124、CST1、CST2、CST4の発現比較を示す図である。

【図4】乳癌腫瘍およびそれぞれの腫瘍隣接組織の100個の場合におけるリアルタイムPCRにより定量化されるCST4の発現を示す図である。

【図5】乳癌腫瘍の40個の場合と40個の生検サンプルにおけるリアルタイムPCRに

10

20

30

40

50

より定量化されるCST4の発現を示す図である。

【図6】乳房癌転移を有する30個のリンパ節サンプルおよび乳房癌転移を有しない30個のリンパ節サンプル中のリアルタイムPCRにより定量化されたCST4の発現を示す図である。

【図7】細胞学的研究およびリアルタイムPCRにより定量化された末梢血におけるCST4発現を用いる乳癌診断の正確さの比較を示す図である。

【図8】細胞学的研究およびリアルタイムPCRにより定量化されたCST4発現を用いる乳癌骨髄転移予想の正確さの比較を示す図である。

【図9】リアルタイムPCR(A)および受信者動作特性(ROC)曲線(B)により定量化された50人の乳癌患者、30人の健常者および30人の乳腺炎患者の無細胞RNAにおけるCST4発現を示す図である。ROC曲線は、乳腺炎および通常から乳癌を区別する方法の感度および特異性の評価のために用いられる。

【図10】LCRにより定量化された50人の乳癌患者、30人の健常者および30人の乳腺炎患者の無細胞RNAにおけるCST4発現を示す図である。

【図11】逆転写ストランド置換増幅(rtsDA)により定量化された50人の乳癌患者、30人の健常者および30人の乳腺炎患者の無細胞RNAにおけるCST4発現を示す図である。

【図12】核酸ベース増幅(NASBA)により定量化される30人の乳癌患者、20人の健常者および20人の乳腺炎患者の尿サンプルにおけるCST4発現を示す図である。

【図13】種々のpTNMステージ(30人のI+IIの例および50人のIII+IVの例)にある80人の乳癌患者の転写増幅法(TMA)によるCST4発現を示す図である。

【図14】乳癌細胞株の培養上清(cultersupernatant)および健常者の血清におけるシスタチンS発現を示す図である。

【図15】乳癌細胞株および健常者の血清におけるシスタチンS発現を示す図である。

【図16】30人の乳癌患者および20人の健常者の血清サンプルにおける競合ELISAによるシスタチンS発現を示す図である。

【図17】乳癌予測のためのシスタチンSおよびCEAの特異性および感度比較(ELISAにより測定)を示す図である。

【図18】中央値より高いまたは低いシスタチンS発現を有する処置後の乳癌患者の無病生存率(DFS)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0038】

#### 1. 分子検出

上述されている分子生物学的技術は以下の実施例に例証されている。これらの実施例は、本発明の用途を限定する代わりに本発明を明確にするためのものであることに留意されたい。Molecular Cloning: A Laboratory Manual (J. Sambrookら編)におけるプロトコルは、実験手順が記載されていない場合、厳密に従った。または、製造業者の取扱説明書は以下の通りであった。もし述べられていない場合、百分率および割合は重量に基づく。

【0039】

材料および方法

全ての臨床サンプルはBeijing Friendship Hospitalから、病院の厳密な観察および患者に署名された同意書の基準と共に得られる。

【0040】

腫瘍の可能性のある生検サンプルまたはそれらの隣接組織を比較する。これらのサンプルとリンパ節サンプル中のRNAは、サンプル取得の後すぐ抽出され、または液体窒素またはRNA later (Ambion)中に保存されるだろう。

【0041】

末梢血、骨髄または尿サンプルは20分間(4000rpm、4 )で遠心分離される

10

20

30

40

50

。上清は別の10分間(13000rpm、4 )遠心分離される。上清および沈殿を分離する。RNA抽出をすぐに続けて行い、またはサンプルを-20 または-80 で貯蔵する。

【0042】

TaqManプローブを用いるリアルタイムPCR:

サンプルから市販キットを用いて核酸を抽出した。限定を意図しない例は、フェノール-クロロホルム抽出である。サンプル中のRNAは、Invitrogen(インビトロゲン)により製造されたトリゾールキット(Trizol kit)を続けて用いて得られた。抽出されたRNAの品質は、Molecular Biology Experiments(分子生物学実験)(J. Liによる)などの参考文献中のプロトコルに従って分析された。mRNAの逆転写は市販キットにより行われ、その指針は以下の通りであった。cDNA溶液を適切な濃度勾配で調製した。生化学反応用のプライマーを最適化した。CST4用のプライマーをエクソン1に基づき設計した。CST4増幅産物を含む組み換えプラスミドは、Pegm-T(Promega(図1に示されているように))から市販されている。プライマーをエクソン1および3に基づき設計した。PCRプロセスをTaqManプローブの加水分解により観測した。

10

【0043】

CST4のプライマー用に最適化された配列は、

【化1】

gctctcaccctcctctcctg(配列番号1) および tctctattctctcctctg(配列番号2)

20

である。プローブの配列は、

【化2】

5'-fam-ctccagctttgtgctctgcctctg-tamra-3'(配列番号3)

である。増幅産物の部分は142bpである。

【0044】

CST4増幅産物を含有する組み換えプラスミドのプライマー用に最適化された配列は、

【化3】

tgctctgggctctcaccctcctc(配列番号22) および tgggtggtggtcggtgactggc(配列番号23)

30

である。

【0045】

典型的に試験において、サンプル、陽性対照および陰性対照ならびに組み換えプラスミド標準は同時に増幅される。組み換えプラスミド標準と濃度に対する適当な濃度勾配との交差点(CP)をプロットし、校正曲線を得る。サンプルおよび対照サンプル中の遺伝子発現のコピーを、当該校正曲線を用いて定量化する。

【0046】

プローブとして蛍光色素を用いるリアルタイムPCR:

サンプルの前処理は、TaqManプローブを用いるリアルタイムPCRのセクションに記載されているものと同じである。同時に増幅されるCST1、CST2およびCST4の増幅用のプライマーの配列は、

40

【化4】

agtcccagcccaacttgga(配列番号24) および gggaacttcgtagatctggaaaga(配列番号25)

である。CST4増幅用のプライマーの配列は

## 【化5】

agtacaacaaggccaccgaagat (配列番号4) および agaagcaagaaggaaggaggag (配列番号5)、  
 または tacaacaaggccaccgaagatga (配列番号6) および agaagcaagaaggaaggagg gag (配列  
 番号7)、または tgctactctgatggctaccctg (配列番号8) および gtggccttgtgtactcctgat (配  
 列番号9)、または agtacaacaaggccaccgaagat (配列番号10) および  
 taccaggtctattagaagcaagaagga (配列番号11)、または tgctactctgatggctaccctg (配列番号  
 12) および catcttgggtggccttgtgtac (配列番号13)、または tgctactctgatggctaccctg (配列  
 番号14) および tactcatctt cgggtggccttgtt (配列番号15)、または tgggattatctattctcctctg  
 (配列番号16) および ctccagcttt gtgctctgctct (配列番号17)、または  
 tgctactctgatggctaccctg (配列番号18) および ctcatcttctg gtggccttgt tgt (配列番号19)、ま  
 たは tacagtgggtgggagtggtgtgt (配列番号20) および gagtgggtac agcgtgcctt tea (配列番号  
 21)

10

である。C S T 2 増幅用のプライマーの配列は、

## 【化6】

cagaagaaacagttgtgctc (配列番号26) および ggagtaggaggtggctcag (配列番号27)

20

である。C S T 1 増幅用のプライマーの配列は、

## 【化7】

tctcacctctctcctg (配列番号28) および ttatctatctctcctctgg (配列番号29)

である。 - アクチンは内部基準として用いられる。 - アクチン増幅用のプライマーの  
 配列は、

## 【化8】

aagatcattgctcctcctg (配列番号30) および cgtcactactcctgcttgc (配列番号31)

である。癌性腫瘍、腫瘍隣接組織 ( T A T ) および内部基準遺伝子中の遺伝子を同時に増  
 幅する。遺伝子のコピーは以下の等式によって定量化され、ここで、蛍光シグナルがバック  
 グラウンドを超える時、c t はサイクル数である。S Y B R Green k、E v e  
 Green、L C Greenなどはアプライする蛍光色素に含まれる。

30

## 【0047】

## 【数1】

$$\text{発現}_{\text{相対}} = \frac{2^{ct_{\text{腫瘍}} - ct_{\text{標準}}}}{2^{ct_{\text{TAT}} - ct_{\text{標準}}}}$$

## 【0048】

核酸ベース増幅 ( N A S B A ) によるインビトロでのRNA増幅：キットは、T7RNA  
 Aポリメラーゼ、リボヌクレアーゼH、鳥骨髄性白血病ウイルス ( A M V ) 逆転写酵素、  
 リボヌクレオチド三リン酸 ( N T P )、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 ( d N T P )  
 、「TaqManプローブを用いるリアルタイムPCR」の区分に述べられていたC S T  
 4 増幅用プライマー、( R i b o - G r e e n 蛍光色素 ) を観測するRNA増幅用蛍光色  
 素を包含する。RNAテンプレートは、42 で2時間のインキュベートした後、2<sup>9</sup> ~  
 2<sup>12</sup> 倍に増幅される。増幅された製品の蛍光を増幅前のテンプレート濃度の定量化のた  
 めに測定した。

40

## 【0049】

実施例1 . C S T 4 およびC S T スーパーファミリーの他のメンバーの発現

50

### 1. 種々のヒト組織中のCST4

全組織サンプルを、Beijing Friendship Hospital (BFH) から得られる乳房組織を除いて購入した。種々のヒト組織サンプル中のCST4のmRNA発現をHG-U95AV Human GeneChip Array (Affymetrix) 上で測定した(使用マニュアルからのプロトコルは以下の通りであった)。CST1 mRNA発現の定量化を、 $\beta$ -アクチン蛍光校正曲線により実現した。

#### 【0050】

図2に示されているように、CST4発現は、唾液腺中でだけ高い。CST4発現は、試験されている他の組織において全く観察されなかった。当該結果は、その低いバックグラウンドシグナルのため、CST4は、病理診断の良好な候補であることを示す。CST4は、HCC1937、SK-BR-3およびMCF-7(乳癌細胞株である)中に過剰発現し、およびHs578Bst(正常な乳房組織細胞株である)中に発現しない。CST4は乳癌診断用のマーカーでとして使用され得ることが結論付けられた。

10

#### 【0051】

2. 乳房癌性腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4、CST124、CST1およびCST2のmRNA発現

乳癌腫瘍とそれらの個々の隣接組織の20の組み合わせ(C1、C2...C20と番号づけられた)におけるCST4、CST124、CST1およびCST2のmRNAの発現を比較した。腫瘍およびそれらの隣接組織におけるCST4のmRNA発現差異は有意であり、CST1を除いて全遺伝子より大きい(図3)。全サンプルを乳癌について病理学的に診断した。プローブとして蛍光色素を用いるリアルタイムPCRを、遺伝子発現を定量化するために用い、そのリアルタイムPCRは陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプルの同時に生じる増幅により変動した。当該対照の結果は予測と合致していた。

20

#### 【0052】

mRNA発現の定量化用のプローブとして蛍光色素を有するリアルタイムPCRに基づく検査キットは、以下を含有する。

1) CST4増幅用プライマー(その配列は以下に示される)：

## 【化9】

上流プライマー: agtacaacaa ggccaccgaa gat (配列番号 4)

下流プライマー: agaagcaaga aggaaggagg gag (配列番号 5)

または

上流プライマー: tacaacaagg ccaccgaaga tga (配列番号 6)

下流プライマー: agaagcaaga aggaaggagg gag (配列番号 7)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号 8)

下流プライマー: gtggccttgt tgtactcgt gat (配列番号 9)

または

上流プライマー: agtacaacaa ggccaccgaa gat (配列番号 10)

下流プライマー: taccaggtct attagaagca agaagga (配列番号 11)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号 12)

下流プライマー: catcttcggt ggcttgttg tac (配列番号 13)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号 14)

下流プライマー: tactcatctt cggtggcctt gtt (配列番号 15)

または

上流プライマー: tgggattatc ctattctcct ccttg (配列番号 16)

下流プライマー: ctccagcttt gtgctctgcc tct (配列番号 17)

または

上流プライマー: tgctactcct gatggctacc ctg (配列番号 18)

下流プライマー: ctcatcttcg gtggccttgt tgt (配列番号 19)

または

上流プライマー: tacagtgggt gggagtgggt ggt (配列番号 20)

下流プライマー: gagtgggtac agcgtgcct tca (配列番号 21)

10

20

30

内部基準としての - アクチンの増幅用プライマー

## 【化10】

上流プライマー: aagatcattgctcctctg (配列番号 30)

下流プライマー: cgctcactcctgcttgc (配列番号 31)

40

## 【0053】

2) 核酸抽出用試料および逆転写用試料、SYBR Green 蛍光色素、dNTP、Taqポリメラーゼ、リボヌクレアーゼを含まない水、標準溶液、陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプル、10倍緩衝液および塩化マグネシウム溶液。

## 【0054】

実施例2種々の組織および位置におけるCST4発現

1. 乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4発現

TaqManプローブを有するリアルタイムPCRに基づくCST4のmRNA発現用

50

検査キット。当該キットは以下を含有する。

【 0 0 5 5 】

1) プライマーおよびプローブ：

【 化 1 1 】

上流プライマー: gctctcacctctctctctg (配列番号 1)

下流プライマー: tctctattctctctctgg (配列番号 2)

プローブ: 5'-fam-ctccagctttgtgctctgctctg-tamra-3' (配列番号 3)

【 0 0 5 6 】

2) 核酸抽出用試料および逆転写用試料、SYBR Green 蛍光色素、dNTP、Taq ポリメラーゼ、リボヌクレアーゼを含まない水、標準溶液、陽性対照サンプルおよび陰性対照サンプル、CST4 遺伝子を含む組み換えプラスミドサンプル、10倍緩衝液および塩化マグネシウム溶液。

【 0 0 5 7 】

全サンプルは、cDNA が得られることで、RNA 抽出および逆転写の前に乳癌と診断された。リアルタイムPCRは、乳癌腫瘍およびそれらの個々の隣接組織におけるCST4の発現の定量化に用いられた。100のサンプルがこの試験において検査された。校正曲線および増幅収率の直線性は個々の必須要件を満たした。陽性対照および陰性対照サンプルの増幅のための結果は予想したものだった。鋳型のないサンプルの増幅は観測されな

10

20

【 0 0 5 8 】

図4において示されるように、CST4のmRNA発現は、病理学上診断される悪性乳癌腫瘍において高く、個々の隣接組織において低い。腫瘍中のCST4発現の中央値は、隣接組織中のものより7.08倍高く、CST4のmRNAは乳癌の優れたマーカーであることを示す。乳癌組織は264.92のコピーがカットオフ値である場合、正常組織から区別され得、乳癌の臨床診断用の参照として提案される。

【 0 0 5 9 】

2. 乳癌患者および乳腺炎患者の生検サンプル中のCST4発現

生検サンプルは、腫瘍細胞の百分率が変動する外科サンプルと大きく異なる。腫瘍組織はときどき、全生検サンプルの非常に小さな一部であり、または腫瘍組織は生検サンプル中に含まれない。発明者らは試験し、乳腺炎患者からの40個の生検サンプルおよび乳癌患者からの40個の乳癌生検サンプル中のCST4発現と比較した。癌性サンプルにおけるCST4発現の中央値は、腸炎サンプル中におけるより9.15倍大きいことがわかった。もし113.795がカットオフ値である場合、癌性腫瘍は炎症から区別されえ、生検サンプルを用いる乳癌診断用の参照文献を提供する。当該結果は、図5でまとめている。リアルタイムPCRを遺伝子発現の定量化に用いた。校正曲線および増幅収率の直線性は個々の需要を満たした。陽性対照および陰性対照サンプルの増幅の結果は予想通りであった。鋳型のないサンプルの増幅は観測されなかった。

30

【 0 0 6 0 】

3. 乳癌転移を伴うまたは伴わないリンパ節サンプル中のCST4発現

異なるサイズの薬理的診断された乳房転移を含むリンパ節の30個の外科サンプルおよび初期段階の非転移性乳癌を伴う患者からの30のリンパ節サンプルを得た。初期段階の癌患者は、検出できないリンパ節転移および得られたアーチファクトを避けるために選択された。リアルタイムPCRはCST4の発現の定量化に用いられ、詳細な実験手順は実施例2(乳癌腫瘍および腫瘍隣接組織におけるCST4発現)に記載しているものと同じである。校正曲線および増幅収率の直線性は個々の要求を満たした。陽性対照および陰性対照サンプルの増幅のための結果は予想通りであった。鋳型のないサンプルの増幅は観測されなかった。

40

【 0 0 6 1 】

50

図6に示されているように、CST4発現は、乳癌転移を伴うサンプルにおいて高く、癌転移を伴わないサンプルにおいて比較的低い。転移を伴うサンプル中のCST4発現の中央値は、乳癌転移を伴わないサンプル中に中央値より8.458倍高い。120.66のコピーのカットオフ値は転移を区別するのは可能である。CST4発現の2つの陽性の場合を非転移グループにおいて報告した。これらのサンプルは、注意深く研究され、そして微小転移巣は両方において発見された。これらの2つの場合が転移性のサンプルとして考えられる場合、CST4のmRNA発現試験は、検査においてすべての転移の場合を区別することができる。伝統的な病理学的研究の可能性を超えている微小転移巣は発見され、より高い感度を示す。

【0062】

4.リアルタイムPCRおよび末梢血中に循環している乳癌細胞の発見のための細胞学的研究によるCST4発現測定の精度比較

【0063】

RNAは、赤血球および血小板を含まない末梢血から抽出され、CST4のmRNA発現をリアルタイムPCRで定量化し、乳腺炎患者および健常者からのサンプルと比較して、循環する乳癌細胞の存在を決定した。得られた結果を細胞学的研究と比較した。

【0064】

図7にまとめるように、CST4発現方法は、細胞学的研究により診断される全ての癌のケースを検出することができる。癌転移は細胞学的陰性な患者において発見され、本発明で述べられるその方法は細胞学的な方法より感度がよく、細胞学的な方法がし得るものを超えている微小転移巣も検出され得ることを証明する。

【0065】

5.リアルタイムPCRおよび細胞学的研究により検出される骨髄転移

乳癌患者からの生検骨髄サンプルのCST4のmRNAをリアルタイムPCRにより定量化した。得られた結果を転移または微小転移巣の発見用の通常の骨髄サンプルと比較した。これらの検査結果を細胞学的研究と比較した。

【0066】

図8に示されるように、骨髄転移を伴う95%のサンプル(細胞学的研究に基づく)はCST4のmRNA検査により検出され得る。細胞学的研究よりより高い陽性の割合はより高い感度を示す。

【0067】

実施例3.乳癌患者、乳腺炎患者および健常者におけるCST4発現

1.乳癌患者、乳腺炎患者および健常者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

乳癌患者(50例)、乳腺炎患者(30例)および健常者(30例)からの血漿サンプルを集めた。無細胞RNAを市販キットを通して抽出し、リアルタイムPCRをCST4発現の定量化に用いた。

【0068】

癌性のグループのCST4発現の中央値は、炎症グループおよび正常グループのそれぞれおよそ8.87倍および25.62倍高い(図9A)。71.218のカットオフ値は、非癌性サンプルから癌性サンプルを区別することができる。乳癌診断のための方法としてCST4発現検査の受信者動作特性(ROC)曲線は図9Bに存在する。高感度および特異性を0.987の曲線の積分により結論付ける。CST4は、血漿サンプルによる非浸潤性の乳癌診断用の特異的なマーカーである。

【0069】

2.リガーゼ連鎖反応(LCR)により検査された乳癌患者、乳腺炎患者および健常者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

CST4のmRNA発現用の検査キットは以下を含有する。

【0070】

1)ハプテン標識化した4つのプローブ:

10

20

30

40

## 【化12】

gggctctggcctcgagctccaagga (配列番号 33)、ataggataatcccaggtggcatctatgatg (配列番号 34)、  
tctcctccttggagctcgaggccagagccc(配列番号 35)、catcatagatgccacctgggattatctat(配列番号 36)

## 【0071】

2) 市販の核酸抽出用試料および逆転写用試料。他の試薬は、LCxキット(Abbott Laboratories)と同一である。

無細胞RNAを乳癌患者(50例)、乳腺炎患者(30例)および健常者(30例)の血漿サンプルから抽出した。CST4のmRNAの発現をLCR方法により検査した。図10に示すように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症を伴うサンプルや正常サンプルのそれぞれの10.881倍および35.286倍高い。乳癌サンプルは17.458RLUのカットオフ値と区別し得る。

10

## 【0072】

3. 逆転写ストランド置換増幅(rtsDA)により検査された乳癌患者、乳腺炎患者および健康者の血清無細胞RNAにおけるCST4発現

rtsDAに基づくCST4のmRNA発現の定量化用の検査キットは以下を含有する：  
1)

## 【化13】

CST4 B1 プライマー: cccggcctctgtgtaccctgcta (配列番号 37)

20

CST4 S1 プライマー: gaa-ctcgagctaccctggctgggctctgg (配列番号 38)

CST4 B2 プライマー: ggtggccttgtgtactcgctgat (配列番号 39)

CST4 S2 プライマー: gct-ctcgag agtgaaggcacgctgtac (配列番号 40)

検査プローブ: 5' -<sup>32</sup>P-ttactcgag ctccaaggaggagaatagga-3' (配列番号 41)

## 【0073】

2) 核酸抽出および逆転写用試料、dCTP、S、dATP、dGTP、dTTP、BsoBIおよびexo-BcaI。

## 【0074】

30

無細胞RNAを、乳癌患者(50例)、乳腺炎患者(30例)および健常者(30例)の血漿サンプルから抽出した。CST4のmRNAの発現を好熱性鎖置換増幅(rtsDA)により検査した。図11に示すように、癌性サンプルの相対発光量(RLU)の中央値は、炎症および正常サンプルをそれぞれ伴うサンプルより、34.58倍および35.89倍高い。乳癌サンプルは、24.095RLUのカットオフ値と区別され得る。

## 【0075】

4. 乳癌患者、乳腺炎患者および健常者の尿無細胞RNAにおけるCST4発現  
核酸ベース増幅(NASBA)に基づくCST4のmRNA発現定量化用の検査キットは、以下を含有する。

## 【0076】

40

1) CST4用のプライマーおよびプローブ：

## 【化14】

上流プライマー: aattctaatacgaactactataggg-gctctcaccctcctcctctg (配列番号 32)

下流プライマー: tatectattctcctcttgg (配列番号 2)

分子指標プローブ: 5' -fam-gcggcctccagcttctgtctctgctctggccgc-dabsyl-3' (配列番号 3)

## 【0077】

2) RNA抽出用および逆転写用試薬、T7RNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼH、鳥骨髄性白血病ウイルス(AMV)逆転写酵素、リボヌクレオチド三リン酸(NTP)、

50

デオキシリボヌクレオチド三リン酸 ( d N T P ) および R N A 蛍光色素 ( リボグリーン蛍光色素 )

【 0 0 7 8 】

無細胞 R N A を乳癌患者 ( 3 0 例 )、乳腺炎患者 ( 2 0 例 ) および健常者 ( 2 0 例 ) の尿サンプルから抽出した。C S T 4 の m R N A の発現を N A S B A により検査した。図 1 2 に示されているように、癌性サンプルの相対発光量 ( R L U ) の中央値は、炎症および正常サンプルを伴うサンプルよりそれぞれ 1 5 . 8 6 および 3 8 . 3 5 倍高い。乳癌サンプルは、3 0 . 9 2 R L U のカットオフ値と区別され得る。それゆえ、C S T 4 は、乳癌診断用の非浸潤性の尿検査における優れたマーカーである。

【 0 0 7 9 】

実施例 4 乳癌 p T N M ステージ判定、治療中の腫瘍成長のリアルタイムモニタリングおよび乳癌予後診断予測用のマーカーとしての C S T 4

C S T 4 の m R N A 発現定量化用診断キットは、以下を含有する転写増幅法 ( T M A ) に基づく。

【 0 0 8 0 】

1 ) 増幅用のプライマーおよびプローブ :

【 化 1 5 】

上流プライマー: aattctaatacgaactcactataggg-gctctcaccctcctctcctg (配列番号 32)

下流プライマー: tatectattctcctccttgg (配列番号 2)

分子指標プローブ: 5' -fam-gcggcctccagctttgtgctctgcctctggccgc-dabsyl-3' (配列番号 3)

【 0 0 8 1 】

2 ) プライマーおよびプローブ以外の G e n - p r o b e の T M A アッセイに包含されている任意の試薬

【 0 0 8 2 】

1 . C S T 4 発現および乳癌 p T N M ステージ判定

8 0 人の乳癌患者 ( I + I I ステージの 3 0 例および I I I + I V ステージの 5 0 例 ) からの血漿サンプルにおける無細胞 R N A を市販キットによって抽出した。C S T 4 発現を、T M A ( 転写増幅 ) 方法を用いて測定した。図 1 3 に示すように、末期患者の R L U 中央値 ( ステージ I I I + I V ) は、初期患者 ( ステージ I + I I ) より 7 . 2 倍高い。当該結果は、C S T 4 は乳癌ステージの良好な指標であり、癌ステージ決定のために用いられうる。

【 0 0 8 3 】

2 . 乳癌治療におけるリアルタイムモニタリングにおける C S T 4 発現の利用

治療を受ける乳癌患者の血清 C S T 4 発現 ( 化学療法での 6 人の患者および放射線療法での 4 人の患者 ) は、リアルタイム P C R により観測された。腫瘍レベル成長を血液中の C S T 4 発現レベルと比較し対応させた。

【 0 0 8 4 】

表 1 にまとめるように、C S T 4 発現は効果的な治療をする患者で減少し、これは、腫瘍の減少した大きさから明らかであった。C S T 4 発現は、効果的でない治療をする患者の治療の継続とともに増加し、これは腫瘍の増加した大きさからも明らかであった。したがって、C S T 4 を治療の有効性のリアルタイムモニタリング用のマーカーとして提案する。

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

【表1】

リアルタイムPCRによる治療の間、乳癌患者の血液中のリアルタイムCST4発現

	CST4発現(コピー)			腫瘍サイズ(cm)			
	サイクル1	サイクル2	サイクル3	サイクル1	サイクル2	サイクル3	
有効	化学療法1	781.32	521.78	80.64	2.5	1.5	<1
	化学療法3	1533.6	1314.6	125.25	3.5	2.5	<1
	化学療法5	1213.5	439.89	66.64	3	2	<1
	放射線療法2	1434.58	1160.33	116.83	3	1.5	1
	放射線療法3	2062.66	1689.44	189.65	3	2.5	1.5
無効	化学療法2	1466.14	1984.62	2433.57	3	3	3.5
	化学療法4	956.92	1156.34	1846.21	2	2	2.5
	化学療法6	646.2	826.7	1032.55	1	1	1.5
	放射線療法1	1032.4	1246.8	1989.61	2	2.5	3
	放射線療法4	936.4	1048	1678	1	1.5	2

10

【0086】

## 3. 乳癌の予後予測用CST4発現

5人の処置後の乳癌患者の血液CST4発現を定量的リアルタイムPCRによる治療後1月後、3月後および1年後に観測した。表2に示されているように、2人の患者は癌が再発した。CST4発現の増加はこれらの2人の患者で観測された。癌の再発は、CST4発現がおよそ1000のコピーに達するまで検出されなかった。他の3人の患者は癌が再発せず、あまりCST4発現の増加は彼らに観測されなかった。したがって、CST4は癌の予後予測に良好なマーカーである。

20

【0087】

【表2】

定量的なリアルタイムPCRにより処置後の乳癌患者のCST4発現モニタリング

		CST4(コピー)			腫瘍サイズ(cm)		
		1月	3月	1年	1月	3月	1年
癌の再発	患者1	56.84	198.87	1135.24	ND	ND	1
	患者5	15.25	64.34	786.59	ND	ND	<1
癌の再発なし	患者2	23.6	40.5	36.3	ND	ND	ND
	患者3	52.43	39.8	48.65	ND	ND	ND
	患者4	67.9	79.6	86.79	ND	ND	ND

30

40

【0088】

## (パートII) マーカーとしてのタンパク質

非浸潤性のタンパク質プローブ、検査キット、乳房疾患診断の方法およびプロトコル、観測および治療評価を本発明の以下の部分において議論されている。

【0089】

組み換えシスタチンSタンパク質をAbnovaから購入した(0.06 μg/μL、カタログ番号H00001472-P01)。価数1:2000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体をR&Dから購入した(カタログ番号MAB1296)。価数1:1800であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体をAbcamから購入した(

50

カタログ番号 a b 5 8 5 1 5 )。

【 0 0 9 0 】

本発明は、乳癌の再発および転移の乳房組織状態の決定および予測のための方法を提供する。治療の評価は本発明に記載されている方法により理解され得る。この方法は、患者に与えられるサンプル中の少なくとも1つのタンパク質の濃度を測定する。サンプル中のシスタチンSタンパク質およびその定量的なまたは半定量的な測定は非常に好ましい。様々な分子は、タンパク質検出のために繰り返されたが、シスタチンの特定の抗体またはそれらのフラグメントは、本発明において好ましい。方法検出プロトコルおよび検査キットは、癌の兆候のないヒトの乳癌検診に用いられうる。

【 0 0 9 1 】

少なくとも1つの(好ましい)抗体またはシスタチンSの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するフラグメントは本願明細書に述べられている検出において利用される。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好ましいモノクローナル抗体は、シスタチンSを配列番号50に示される配列と結合する。抗体はシスタチンSを免疫原として獲得される。免疫原濃度は好ましい成分である。それゆえ、本発明は、シスタチンSの存在に対する抗体の免疫応答によるシスタチンSの定量化方法を提供する。

【 0 0 9 2 】

本発明における被検体はヒトであり、ここで、試験特徴的な抗体およびヒトペプチド中の免疫応答である。免疫反応は任意の好ましい方法によって測定されてよく、これらに限定されないが、ELISA、免疫プロット法または両方の組み合わせ、競合ELISAおよび二重抗体のサンドイッチELISAキットを包含する。

【 0 0 9 3 】

乳癌組織状態のモニタリングおよび診断、乳房疾患の治療の有効性のモニタリングは、シスタチンS発現の定量化を介する免疫反応により定量化され得る。

【 0 0 9 4 】

我々は、サンプル中のマーカー(シスタチンSおよびその本願明細書におけるエピトープ)の検出のための全ての検査キットを本願明細書において主張する。乳房組織および乳房疾患の状況は上記キットを介して診断され得る。乳房疾患の治療のモニタリングならびに癌の再発および転移の予測はキットの利用の範囲内でもある。抗シスタチンS抗体またはそれらのフラグメントはキットに包含される。これらの抗体またはそれらのフラグメントは、血清のような流体サンプル中のシスタチンSと結合する。抗体またはそのフラグメントおよびシスタチンSの結合事象はモニタリングされ、報告単位によって検出される。

【 0 0 9 5 】

好ましいまたは最適化されたキットの報告単位は抗体またはそれらの機能を標識化したフラグメントであり得る。ここで、報告単位は、適切なIgGまたはIgM抗体として好ましい。当該標識は、ペルオキシダーゼによるなど基質の色の変化を伴う反応を触媒する酵素としてあり得、好ましい。当該標識は二次抗体に共有結合しているのが好ましい。または、当該標識は蛍光色素であり得る。

【 0 0 9 6 】

ELISAに基づく検査キットは本発明において好ましい。

【 0 0 9 7 】

述べられるELISA検査キットは、競合ELISAキットまたは二重抗体のサンドイッチELISAキットであり、その詳細は次に記載されている。抗体またはそのフラグメントは、検体をインキュベートされている。抗体はモノクローナル抗体である。抗体はモノクローナル抗体である。抗シスタチンS抗体の製造用の免疫源であるシスタチンSタンパク質を、マイクロプレート(本願明細書の固体基質)とコンジュゲートさせている。事前にインキュベートした混合物をELISAプレート上で利用し、その後結合されていない抗体をプレート上に固定されているタンパク質に結合している。報告単位は、免疫グロブリン、とりわけIgGおよびIgMであり、プレート上で抗体を検出することができる。抗体は、酵素または検出用の蛍光標識とコンジュゲートされているということに留意され

10

20

30

40

50

たい。

【 0 0 9 8 】

本発明の別の方法論は免疫プロット法、またはウエスタンブロット法であり、ここで、サンプル中のタンパク質を、PAGEなどのゲル電気泳動によって分離し、次いでニトロセルロース膜などの固体基質に移す。当該移す方法の1つは電気移動である。当該検体は、特定の抗体（モノクローナル抗体が好ましい）と関係する。免疫反応は、酵素/フルオロフォア標識抗体などによる適切な方法で観測され得る。

【 0 0 9 9 】

本発明における別の好ましい方法論は親和性カラムに基づく検査キットである。典型的なプロセスにおいて、抗体またはそのフラグメントはカラム上で固定され、サンプル溶液はカラムをゆっくり通過する。本願明細書において、抗体はモノクローナルまたはポリクローナルである。上述されている抗体は好ましい。

10

【 0 1 0 0 】

サンプル溶液はカラムを通過する。検体のタンパク質が固定された抗体と接触するとき、そのタンパク質はカラム中に残る。その後、検体のタンパク質は、抗体用の競合抗原を利用することにより、またはランニングバッファー条件を変更することにより溶出される。複数のタンパク質を分析する場合、異なるときにタンパク質を溶出するのが好ましい。タンパク質は、UV吸光度検出など、周知の種々の補法により定量化され得る。

【 0 1 0 1 】

シスタチンS検査キットは本発明において提供される。2つのチャンネルシスタチンS指標は、シスタチンSレベルが通常より高いかどうかを正確に示す。流体サンプルは前記試験に好ましい。キットはサンプル、抗体およびそれらのフラグメントならびに指示薬のための容器を包含する。モノクローナル抗体、とりわけ、上述した抗体は好ましい。試験および操作やデータ解釈に必要な全溶液および緩衝液は、キットに包含されるだろう。キットは病院、診療所および家などの任意の場所において専門家により行われるだろう。

20

【 0 1 0 2 】

本発明の受験者は、乳房の心地悪いヒトであり得る。当該検査はその受験者の乳癌の早期スクリーニングを包含する。

【 0 1 0 3 】

本発明の受験者は乳腺炎であるヒトであり得る。その試験は、受験者の乳癌の早期スクリーニングを包含する。

30

【 0 1 0 4 】

本発明の受験者は乳癌の家族歴を有するヒトであり得る。その試験は受験者の乳癌の早期スクリーニングを包含する。

【 0 1 0 5 】

本発明に用いるサンプルは、これらに限定されないが、全血液またはその画分を包含する血清、血漿、尿および血液を包含する。

【 0 1 0 6 】

上記のように、本発明における抗体は、乳癌の診断ならびに乳癌の再発および転移の予測のために用いられうる。この出願において周知の方法は、キットと組み合され得る。例えば、蛍光方法は、血漿、血清または尿、次いで、特定の疾患の存在におけるシスタチンSの量を試験するためのキットと組み合され得る。

40

【 0 1 0 7 】

本発明の目的、利点および特徴部は、以下の実施例において明らかとなる。その上、請求項および上記になされる結論を支持する実験の詳細も、以下の実施例に包含される。

【 0 1 0 8 】

材料および方法

組み換えシスタチンSタンパク質をAbnovaから購入した(0.06 μg / μL、カタログ番号H00001472 - P01)。

【 0 1 0 9 】

50

抗体：価数1：2000であるラット抗シスタチンSモノクローナル抗体をR&Dから購入した（カタログ番号MAB1296）。価数1：1800であるウサギ抗シスタチンSポリクローナル抗体をAbcamから購入した（カタログ番号ab58515）。

【0110】

免疫沈澱：2mMフッ化フェニルメタンシルホニル（PMSF）、ブドウ球菌タンパク質Aの固定されたアガロースゲルおよびシスタチンS抗体を、サンプル中に添加する。混合物を、4℃で一晩穏やかに攪拌する。ジメチルピメルイミドエステルを、アガロースゲルに抗シスタチンS抗体をコンジュゲートするために用いる。その沈殿を、N-グリコシダーゼFで洗浄かつ処理し、タンパク質をSDS-PAGEによって精製する。

【0111】

N-グリコシダーゼFの塗布前に、沈殿物は10μLのクエン酸塩緩衝液（50mM、pH6.0、0.5%のSDS）中で沸騰させられる。10μLのリン酸塩緩衝液（200mM、pH8.0（40mMのEDTAを含む））およびN-オクチルグルコシド（3%）およびN-キシラナーゼは混合物（40mU）に添加され、一晩（37℃）培養される。添加液は、その後添加され、SDS-PAGE精製のために沸騰させられる。他に示されない限り、15%ポリアクリルアミドゲルはPAGEに用いられる。ゲルは20%の2,5-ジフェニルオキサゾール溶液によりイメージ化する。

【0112】

タンパク質の電子移動および免疫プロット法：タンパク質を、5%の脱脂粉乳および0.1%のPBS緩衝液を含むBrij-35を含むPBS緩衝液に2時間（常温）であるニトロセルロース膜に転移する。当該幕をPBS緩衝液（0.1%のBrij-35を含む）で3倍洗浄する。それをペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG溶液（0.27μL）で1時間（37℃）インキュベートし、続いて、緩衝液（0.1%Brij-35）で4回、PBSの洗浄を1回行った。膜は、市販のTMB溶液（TMBペルオキシターゼ基板、Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.（ゲイザースバーグ、メリーランド）カタログ番号50-76-01）により撮像される。または、膜が5.4mMの過酸化水素溶液、2.5nMのluminolおよび400mMp-クマル酸（100mMのTris-HClに溶解され、pH8.5）に浸されれば、ELC方法によって試験され、Agfa CP-BU-foil上にイメージ化される。

【0113】

競合ELISA：

ELISAプレート（コーニング）をシスタチンS溶液（5μg/mL）で被覆し、3%のBSA溶液によってバックフィルする。8つの血清サンプル（2倍希釈物）およびポリクローナルラット抗シスタチンS抗体（価数1：1000である）を一晩（4℃）でインキュベートし、および前処理したELISAプレート上にアプライされた。プレートは37℃で1時間37℃でインキュベートする。サンプルの穴をTBS緩衝液（10mMのTris-HCl、154mMのNaCl、pH7.5）によって洗浄する。添加したアルカリのホスファターゼ（ALP）標識ヤギ抗マウスIgG（価数1：2000のであるJackson ImmunoResearch）溶液を添加し、1時間（37℃）の間インキュベートした。TMB溶液（TMBペルオキシダーゼ基質、Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.（ゲイザースバーグ、メリーランド）カタログ番号50-76-01）を添加し、405nmにおけるODをマイクロプレートリーダーにより定量化する。

【0114】

二重抗体サンドイッチELISA：

ELISAプレート（コーニング）をモノクローナルラット抗シスタチンS溶液（5μg/mL）により被覆し、3%BSA溶液によりバックフィルした。8個の血清サンプル（2倍希釈）を1時間（37℃）プレートの穴にインキュベートした。プレートをTBS緩衝液（10mMのTris-HCl、154mMのNaCl、pH7.5）で洗浄する

10

20

30

40

50

。ビオチン化ウサギ - 抗シスタチン S ポリクローナル抗体 (価数: 1 : 1 0 0 0) を穴にアプライし、1 時間 (3 7 ) インキュベートする。当該穴を T B S 緩衝液で洗浄し、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体 ( A B C コンプレックス) を添加する。プレートを 1 時間 3 7 でインキュベートし、穴を T B S 緩衝液で洗浄する。T M B 溶液 ( T M B ペルオキシダーゼ基質、Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (ゲイザースバーグ、メリーランド) カタログ番号 5 0 - 7 6 - 0 1 ) を添加し、4 0 5 n m における O D をマイクロプレートリーダーにより定量化する。

#### 【 0 1 1 5 】

##### 実施例 1

10

##### 1 . 乳癌細胞株培養上清におけるシスタチン S 検出

C S T 4 の m R N A を上で論じたように乳癌腫瘍中で過剰発現する。分泌タンパク質として、シスタチン S は種々の体液および分泌物中に見られうる。乳癌のマーカーとしてシスタチン S を樹立するため、C S T 4 の m R N A の高発現を伴う H C C 1 9 7 3 ( 乳癌細胞株) の上清を 1 5 % ポリアクリルアミドゲル ( レーン 1 ~ 2、図 1 4 ) に充填し、対照試料 ( 健常者の血清) をゲル ( レーン 3 ~ 4、図 1 4 ) に充填した。電気泳動の後、タンパク質をニトロセルロース膜に移し、ペルオキシダーゼ標識抗シスタチン S 抗体およびヤギ抗ウサギ I g G と反応させた。T M B をタンパク質のイメージ化に用いた。上記方法に従った。

#### 【 0 1 1 6 】

20

図 1 4 に示されているように、 $\alpha$ - アクチン ( 内部基準) はゲルのボトムにある。1 6 k D a タンパク質を伴うバンドをレーン 1 ~ 2 で観測し、レーン 3 ~ 4 は、バンドが非常に薄かった。

#### 【 0 1 1 7 】

##### 2 . 乳癌患者の血清におけるシスタチン S 検出

セクション「 1 」に記載されているプロトコルは以下の通りであった。図 1 5 に示されているように、 $\alpha$ - アクチン ( 内部基準) は、ゲルのボトムにある。1 6 k D a タンパク質を有するバンドはレーン 1 ~ 2 ( 癌性サンプル) に観測され、レーン 3 ~ 4 ( 対照試料) のバンドは極めてかすかであった。

#### 【 0 1 1 8 】

30

##### 3 . モノクローナル抗体を用いた E L I S A による血清シスタチン S レベルの測定

実験: シスタチン S ( 5  $\mu$  g / m L ) を E L I S A プレートにアプライし、一晚 ( 4 ) インキュベートした。5 0 個の血清サンプル ( 乳癌患者から 3 0 個および健常者から 2 0 個) を抗シスタチン S モノクローナル抗体 ( 価数 1 : 2 0 0 0、3 % の B S A を T B S に溶解させた) と混合し、当該サンプル混合物を前処理した E L I S A プレートにアプライし、1 時間 ( 常温) インキュベートした。当該 E L I S A プレートを T B S 緩衝液で洗浄し、ヤギ抗ウサギ抗体 ( 0 . 0 8  $\mu$  g / m L、T B S に溶解させた) でインキュベートした。プレートを p - ニトロフェニルホスフェート ( p - N P P ) と反応させた。マイクロプレートリーダーを定量化のために用いた。

#### 【 0 1 1 9 】

40

図 1 6 に示されているように、正常な血清中のシスタチン S レベルの中央値は 1 . 3 5 n g / m L であり、乳癌血清中で 2 . 9 5 n g / m L である。3 . 1 0 5 n g / m L のカットオフ値は、癌性サンプルおよび健常サンプルを区別するのが可能である。

#### 【 0 1 2 0 】

##### 4 . 乳癌診断および予測のためにシスタチン S および C E A の感度および特異性の比較

シスタチン S をセクション「 3 」に記載されている方法に従って測定した。C E A を市販キット ( D R G、ドイツ、カタログ番号 E I A 5 0 7 1 ) を用いて測定し、取扱説明書に従っている。

#### 【 0 1 2 1 】

図 1 7 および表 3 に示されているように、受信動作特性 ( R O C ) 曲線 ( A U C ) の積

50

分值は、シスタチンSが0.832およびCEAが0.776であり、前者はより感度と選択性が良いことを意味する。

【0122】

【表3】

ROC曲線の積分値

変数	積分値	標準偏差	P:積分値と0.5の比較	信頼区間(cI95%)	
				下限	上限
シスタチンS	0.832	0.052	0.000	0.730	0.935
CEA	0.776	0.061	0.000	0.657	0.894

10

【0123】

5.方法、検査キットおよびプロトコル

限定を意図せず、例証的な方法、検査キットおよびプロトコル

【0124】

乳癌の検出方法は以下を包含する。シスタチンSアンチゲンを基板上に固定する。R & D抗体(MAB1296)を前処理した基板にアプライする。当該基板を洗浄し、ALP標識ヤギ抗ウサギIgG(Beyotime Inc.、カタログ番号A239)などの二次抗体をアプライする。当該基板を洗浄し、直接的または間接的に標識(例におけるALP)からの応答からタンパク質の量を測定および検出する。

20

【0125】

基板は、これに限定されないが、セルロースシート、プラスチックプレートおよび粒子などのセルロースペース材料である樹脂粒子を包含する。

【0126】

抗原を共有結合でまたは非共有結合で固定し得る。試験用サンプルはヒト血清である。選択されまたは好ましい基板は、血清および基板中の他の成分間の非特異的相互作用を最小化するために、サンプルの添加前にBSAによってバックフィルすべきである。その後、当該基板を界面活性剤を含むリン酸緩衝液などの適切な緩衝液によって洗浄する。

【0127】

標識二次抗体の限定を意図しない例は標識抗マウスポリクローナル抗体である。当該標識は、ALP、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよび蛍光色素(フルオロセイン(fluorocsein)など)などの酵素を包含するが、これらに限定されない。ピオチン、アビジン、ストレプトアビジンおよびジギタリス配糖体などの分子は、抗体およびその標識の結合のために用いられてよい。

30

【0128】

酵素が標識である場合、その定性的検出および/または定量的検出は、酵素基質の添加および酵素による比色反応および/または発光反応により実現され得る。蛍光色素が標識である場合、その定性的検出および/または定量的検出は、UV露光および蛍光測定/検出により実現され得る。感光薬が必要に応じて用いられる。

40

【0129】

本発明の応用として、シスタチンSまたはそのエピトープ(配列番号50)に結合する分子は、必要に応じて、抗シスタチンS抗体またはそれらのフラグメント、二次抗体および固体基質、および1つまたは複数の補助供給品である。これらの必要な試薬または任意の試薬は検査キット内に供給される。上述した試薬は乳癌診断、pTNMステージ判定、転移検出および治療の有効性の評価に用いられてよい。

【0130】

例えば、検査キットは、特異的抗体またはそのフラグメントとなる。また、検査キットは、サンプル中のターゲットタンパク質の検出のため任意にまたは好ましくは報告単位となる。報告単位は好ましくは適切な二次抗体であり、任意にまたは好ましくは(必要に

50

じて) 検出のための標識化を含む。キットは任意にまたは好ましくは、タンパク質の基板インキュベート用およびサンプル中のタンパク質の非特異的相互作用の除去用のタンパク質のバックフィル用ならびに基板に固定されたタンパク質用の緩衝液などの1以上の緩衝液やサンプル、二次抗体および/または上述された試薬をインキュベートした後の基板の洗浄用緩衝液を包含する。

【0131】

任意に、キットは、競合方法用のコントロールタンパク質の固定化のための固体基質を提供する。この場合、抗体およびサンプルは事前にインキュベートされ、その後、その混合物は、基板にアプライされる。報告単位は抗体および基板の検出に用いられる。専門家は、抗体が血清サンプルからエピトープと結合するかどうかを決定し、血清エピトープと結合する抗体の量を定量的に測定するかもしれない。したがって、当該ターゲットタンパク質の量は決定され得る。

10

【0132】

任意に、キットは、二重抗体サンドイッチ法において用い得、抗シスタチンS抗体を基板上に固定する。シスタチンS標準溶液および前処理したサンプル血清を基板にアプライする。報告単位標識 (reporting-unit-labeling) を有する抗シスタチンSポリクローナル抗体を基板にアプライする。専門家は、抗体が血清サンプルからのエピトープと結合しているかどうか確かめ、血清エピトープに結合する抗体の量を定量的に測定できる。このようにして、ターゲットタンパク質の量は決定され得る。

20

【0133】

検査試薬および/または検査キット、ならびに/または測定器具および/またはキットおよび器具の組み合わせの必要条件の選択は検出に用いる方法に依存する。上述のように、これらの方法はタンパク質プロットングおよびフローサイトメトリを包含するが、これに限定されない。ELISA方法は上述されており、プロットングはより正しいが、さらなる設備および/または操作時間を必要とする。

【0134】

6. 実証的検査キットおよびそのプロトコル

取得物をサンプルし貯蔵する。血清について、血液サンプルを2時間室温で保存しまたは一晩4で保存する。当該サンプルを20分間(1000g)遠心分離し、上清を血清として収集する。得られた血清サンプルを-20または-80で保存かつ繰り返し解凍し、凍結しないようにすべきである。血漿について、抗凝固薬としてEDTAまたはヘパリンを用いる。当該サンプルを、血液の収集後30分未満の、15分間(2~8、1000g)遠心分離する。得られた血漿サンプルを-20または-80で保存し、解凍を繰り返して、凍結しないようにすべきである。

30

【0135】

前処理物をサンプリングする。血清または血漿サンプルを10倍に薄めることを勧める。例えば、100μL血清または血漿サンプルを900μLのPBS緩衝液と混ぜる。得られたサンプルを0.1MのPBS緩衝液(pH7.0~7.2)で希薄する。

【0136】

検査キットは以下を包含するだろう: 1) プラスチック箔で閉じたELISAプレート、2) シスタチンS標準溶液。シスタチンS溶液を1%BSAを含むPBS緩衝液を用いて10ng/mLの濃度で調製する。当該原液を薄めて、5ng/mL、2.5ng/mL、1ng/mLおよび0.5ng/mLの濃度の一連の溶液を調製する。1%BSAを含むPBS緩衝液を0ng/mLシスタチンSを含む溶液として用いる。得られた溶液を試験前に15分以内に調製すべきである。例えば、4ng/mLシスタチンSの調製を、エッペンドルフチューブ中、0.5mL(0.5mLも)シスタチンS溶液(8ng/mL)および0.5mLの希釈緩衝液を混合して行うことができる。他の濃度を同様にして実現し得る。3) バックフィル用の3%BSAを含むPBST緩衝液。4) コーティング用抗体: 5μg/mLのラット抗シスタチンSモノクローナル抗体および希釈用緩衝液(0.05M NaHCO<sub>3</sub>溶液、pH9.0)。5) ビオチン化ウサギ抗シスタチンS(

40

50

価数 1 : 200) および希釈緩衝液 (1% BSA を含む PBST)。6) ABC (ストレプトアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体)。7) 比色検出用 TMB 溶液。8) BSA 緩衝液 (PBS 中、0.05% トウイン - 20)。9) 停止液: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

【0137】

詳細な操作プロトコルを以下に記載する。

【0138】

1) コーティング: ラット抗シスタチン S 溶液を炭酸水素ナトリウム緩衝液 (0.05 M、pH 9.0) を用いて 5 µg/mL に希釈する。得られた溶液をポリスチレンプレート上の穴 (0.1 mL / 1つの穴) にアプライする。当該プレートを一晩インキュベートする。穴の中の溶液を廃棄し、その穴を各 3 分間かけて 3 回洗浄する。

10

【0139】

2) バックフィル: 上記穴に 3% BSA を含む 200 µL PBST 緩衝液を加える。当該プレートを 1 時間 (37 °C) または一晩 (4 °C) でインキュベートする。その穴の中の溶液を廃棄し、当該穴を洗浄緩衝液を用いて 3 回、各回 3 分間洗浄する。

【0140】

3) サンプル充填: 穴にブランク、標準溶液およびサンプル溶液を割り当てる。希釈緩衝液 100 µL、標準溶液およびサンプル溶液をブランクの穴、標準穴およびサンプル穴のそれぞれに添加する。気泡をできないようにする。上記溶液を当該穴のボトムで充填し、溶液が穴の壁と接しないようにする。プレートを緩やかに振り、蓋またはプラスチック箱によって穴を閉じる。プレートを 120 分間 (37 °C) インキュベートする。標準溶液を新たに調製し、結果物の精度を確かめる。

20

【0141】

4) 穴の残留溶液を廃棄し、プレートを乾燥する。プレートを洗浄しない。ビオチン化ウサギ抗シスタチン S ポリクローナル抗体溶液 (1% BSA を含む PBST で 200 倍に希釈する) を加える。蓋またはプラスチック箱によって穴を閉じる。60 分間 (37 °C)、プレートをインキュベートする。

【0142】

5) 60 分間、プレートをインキュベートし、穴の中の残留液体を廃棄する。当該プレートを乾燥した後に、プレートを 3 回、各回 1 ~ 2 分間、300 µL 洗浄緩衝液に浸して洗浄する。プレートを乾燥し、プレートをシェイクして、穴の中の残留液体を除去する。

30

【0143】

6) 100 µL の ABC 溶液を穴に加える。箱によって穴を閉じ、60 分間 (37 °C)、プレートをインキュベートする。

【0144】

7) 60 分間、プレートをインキュベートし、穴の中の液体を廃棄し、プレートを乾燥する。プレートを 5 回、各回 1 ~ 2 分間、300 µL 洗浄緩衝液を浸して洗浄する。プレートを乾燥し、プレートを振盪して、穴の中の残留液体を除去する。

【0145】

8) 続けて、穴の中に 50 µL 酵素基質溶液を加え、プレートを箱で閉じ、プレートを 15 分未満、暗闇 (37 °C) でインキュベートする。標準穴の中の溶液が濃度に応じて青色であり、ブランクの穴において無色であるときに反応を止める。

40

【0146】

9) 反応を 50 µL 停止溶液を加えて止める。溶液は青から黄に変化する。停止溶液の添加の順番は、酵素基質の添加の順番と同一である。停止溶液を、反応が、終了しかけているときに、すぐに添加し、試験の精度を確認する。

【0147】

10) 酵素反応の停止後すぐに生じる穴の中の溶液の OD 値の測定 (405 nm)

【0148】

計算: OD 値に対して個々の溶液の濃度をプロットする。校正方程式を、データ調整を

50

通して得、 $R^2$ を計算し、それは効果的試験用の0.95より高いはずである。検体を、サンプルおよび校正方程式のOD値を用いて計算する。

【0149】

7. 乳癌pTNMステージ判定用のシスタチンS発現

実験の詳細は、セクション6と同一である。乳癌患者(20個のTステージの例、30個のNステージの例および30個のMステージの例)サンプルを細胞的に80人診断する。癌の成長を表4にまとめるように、シスタチンS発現は増加し、シスタチンSタンパク質発現はpTNMステージ判定のために用いられうることを示す。

【0150】

【表4】

種々のpTNMステージにある乳癌患者のシスタチンS発現

	シスタチンS発現の中央値(ng/mL)
ステージT(20例)	1.16
ステージN(30例)	2.89
ステージM(30例)	4.34

10

20

【0151】

8. 乳房癌転移診断用のシスタチンS発現

実験の詳細は、セクション7と同一である。乳癌患者50人のサンプルを細胞的に診断し、そのうち30人の患者は癌転移している。表5にまとめるように、シスタチンS発現は、癌転移をしていない患者より転移する患者において高く、シスタチンS発現が乳癌転移診断用のマーカーであることを示している。

【0152】

【表5】

転移している乳癌患者と転移していない乳癌患者のシスタチンS発現

	シスタチンS発現の中央値(ng/mL)
転移なし(20例)	1.43
転移性癌(30例)	4.19

30

【0153】

9. 乳癌の治療のために化学療法と組み合わせられる内分泌セラピーの評価用シスタチンS発現

実験の詳細は、セクション7と同一である。2885人の乳癌(N0-1ステージ)を研究した。患者をAC(ドキシソルピシン+シクロホスファミド)又は(ドキシソルピシン+パクリタキセル)の4サイクルで処理した。内分泌セラピーは、ホルモン受容体条件に基づいて行われた。すべての患者は、76ヶ月間追跡した。シスタチンS発現を上記セラピーの最終サイクルの後測定した。776人の場合が研究で検証され、そのシスタチンS発現中央値は3.96ng/mLだった。図18に示されているように、中央値よりも高いシスタチンS発現を有する患者の無病生存率(DFS)は49%であり、中央値よりも低いシスタチンS発現を有する群の生存率(64%)より低かった。

40

【0154】

全実施例は本発明のいくつかの特徴部をよりよくかつより明らかに説明することに留意

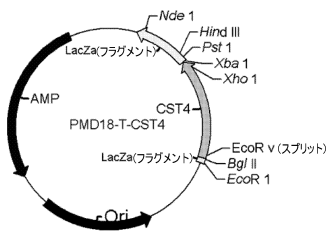
50

されたい。それは、一つの特徴部と組み合わせられうる。全特徴部またはそれに隣接する特徴部を必要に応じて組み合わせ得る。

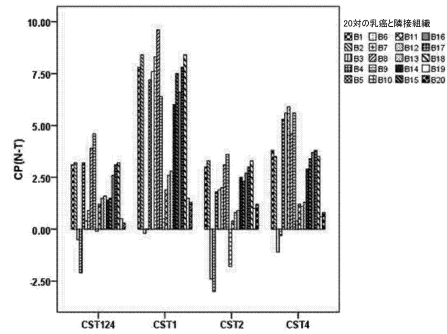
【 0 1 5 5 】

本発明における方法は実施例により例示され提供された。多くの置換、改良および変更がこの分野での専門家に進められている。これらの置換、改良および変更の任意の効果は請求項およびそれらの妥当な拡張の部分である。本特許において参照されている任意の出版物、特許および特許出願は、実施工程および本発明に包含されていないプロトコルの詳細を説明するために用いられるべきである。本発明に述べられている任意の参照は本発明の技術の代替として認知されていない。

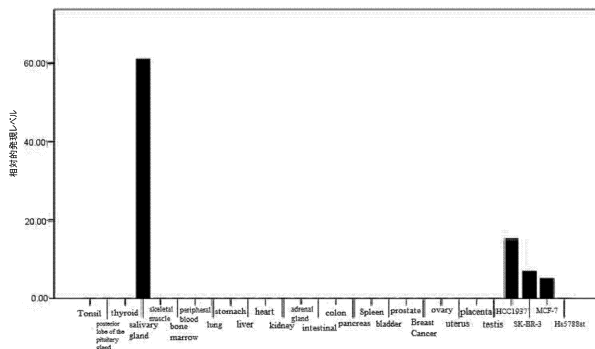
【 図 1 】



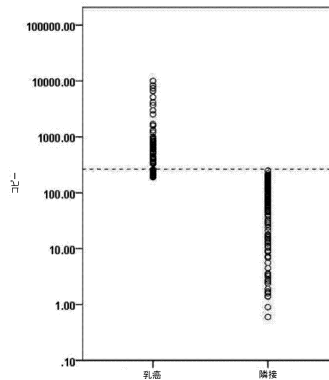
【 図 3 】



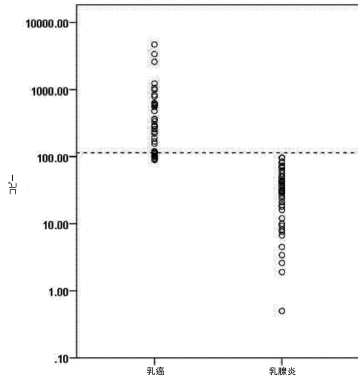
【 図 2 】



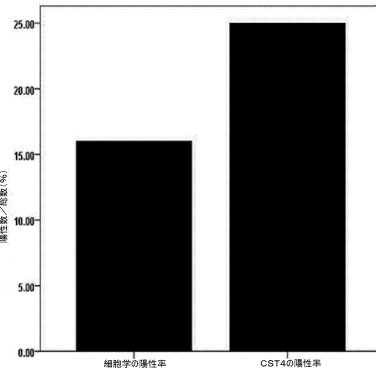
【 図 4 】



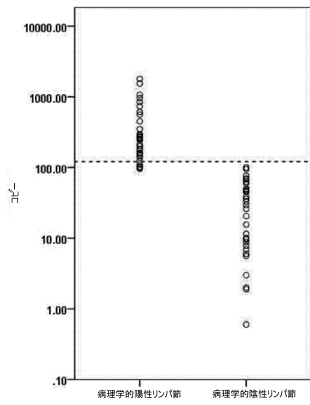
【図5】



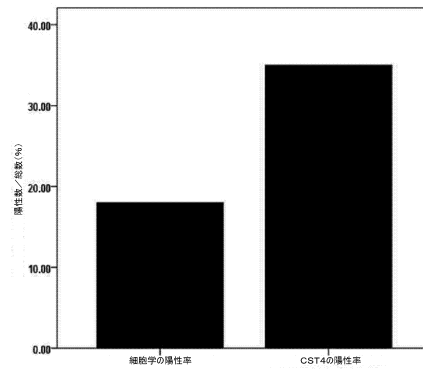
【図7】



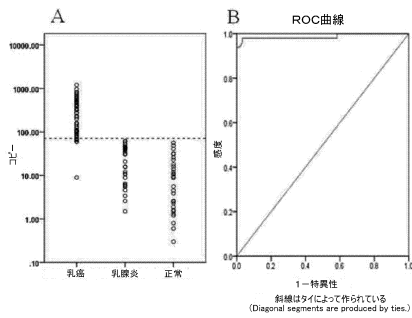
【図6】



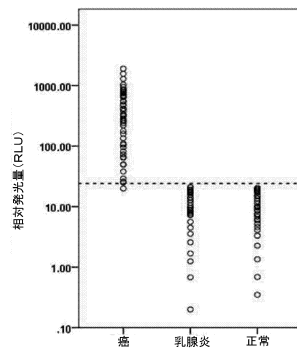
【図8】



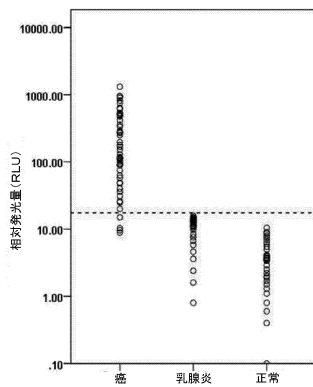
【図9】



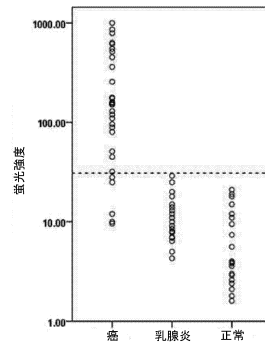
【図11】



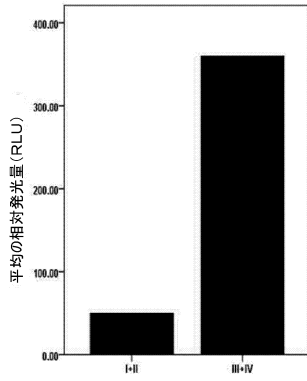
【図10】



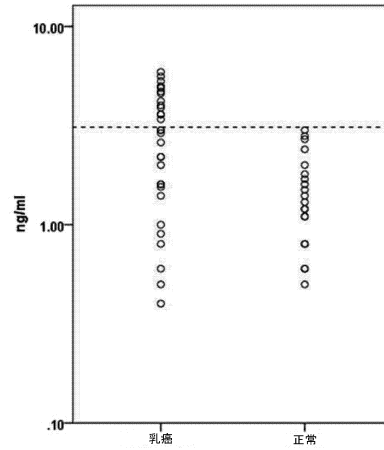
【図12】



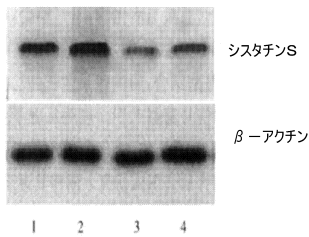
【図13】



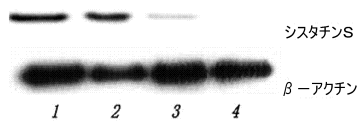
【図16】



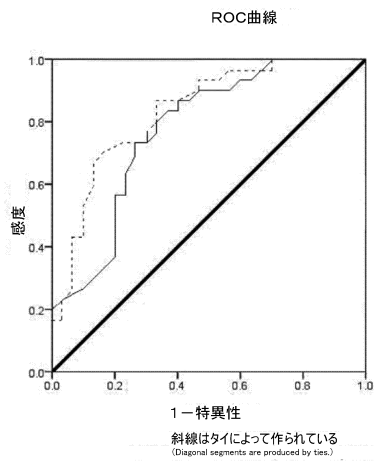
【図14】



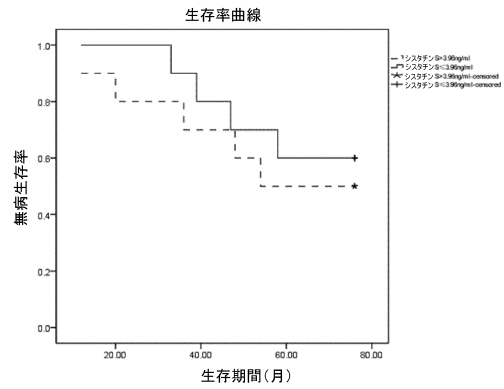
【図15】



【図17】



【図18】



【配列表】

0006192123000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
 C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 A  
 C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 M 1/34 F

(72) 発明者 ワン タオ  
 中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2 3 スージョウ インダストリアル パーク ディスト  
 リクト バイオベイ 2 1 8 シンファー ロード シー4 ビルディング スイート 2 0 1

(72) 発明者 チュー シャンユン  
 中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2 3 スージョウ インダストリアル パーク ディスト  
 リクト バイオベイ 2 1 8 シンファー ロード シー4 ビルディング スイート 2 0 1

(72) 発明者 チェン フェイ  
 中華人民共和国 ジアンスー 2 1 5 1 2 3 スージョウ インダストリアル パーク ディスト  
 リクト バイオベイ 2 1 8 シンファー ロード シー4 ビルディング スイート 2 0 1

審査官 川口 裕美子

(56) 参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 3 1 5 0 0 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 4 - 5 2 7 2 1 0 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 5 - 5 0 3 9 2 1 ( J P , A )  
 Parle-McDermott A et al. , Serial analysis of gene expression identifies putative metas  
 tasis-associated transcripts in colon tumour cell lines. , Br J Cancer , 2 0 0 0 年 9  
 月 , Vol.83, No.6 , 725-728

(58) 調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0  
 C 0 7 K 1 6 / 0 0  
 C 1 2 M 1 / 0 0  
 C 1 2 Q 1 / 0 0  
 G 0 1 N 3 3 / 5 3  
 C 1 2 P 2 1 / 0 0  
 J S T P l u s / J M E D P l u s ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	用于预测和诊断乳腺癌的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP6192123B2</a>	公开(公告)日	2017-09-06
申请号	JP2014550608	申请日	2012-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	苏周微诊断生物医药有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	苏州微诊断生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州微诊断生物医药有限公司		
[标]发明人	ワンタオ チューシャンユン チェンフェイ		
发明人	ワン タオ チュー シャンユン チェン フェイ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 C12M1/00 C12M1/34		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/57415 C07K16/18 C12Q2600/112 G01N2333/8139		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/543.545.A G01N33/53.U G01N33/574.A C12N15/00.ZNA.A C12M1/00.A C12M1/34.F		
代理人(译)	藤田和子		
其他公开文献	JP2015503922A5 JP2015503922A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)  
提供了CST4基因，CST4基因mRNA，CST4基因剪接体cDNA的cDNA，CST4特异性引物对应的扩增子，CST4基因编码的Cystatin-S蛋白的表位以及胱抑素-S蛋白在制备乳腺癌诊断和指征标记物中的应用。同样适用于乳腺癌的诊断，动态监测和预后。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6192123号 (P6192123)
(45) 発行日 平成29年9月6日 (2017.9.6)	(24) 登録日 平成29年8月18日 (2017.8.18)	
(51) Int. Cl.	F I	
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543 545A	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 U	
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/574 A	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNA A	
請求項の数 8 (全 30 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-550608 (P2014-550608)	(73) 特許権者 514173825	
(86) (22) 出願日 平成24年1月9日 (2012.1.9)	スージョウ マイクロダイアグ バイオメ	
(65) 公表番号 特表2015-503922 (P2015-503922A)	ディスン カンパニー リミテッド	
(43) 公表日 平成27年2月5日 (2015.2.5)	中華人民共和国 ジアンズー 21512	
(86) 国際出願番号 PCT/CN2012/070151	3 スージョウ インダストリアル パー	
(87) 国際公開番号 W02013/104104	ク ゲイストリクト バイオベイ 218	
(87) 国際公開日 平成25年7月18日 (2013.7.18)	シンフー ロード シー4 ビルディン	
審査請求日 平成26年12月11日 (2014.12.11)	グ スイート 201	
	(74) 代理人 100116872	
	弁理士 藤田 和子	
	(74) 代理人 100107560	
	弁理士 佐野 慧一郎	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 乳癌の予測および診断のためのバイオマーカー		