

(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2008-267963

(P2008-267963A)

(43) 公開日 平成20年11月6日(2008.11.6)

| (51) Int.Cl.            | F 1           |         |  | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------|---------|--|-------------|
| GO 1 N 33/574 (2006.01) | GO 1 N 33/574 | A       |  | 4 B 0 6 3   |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/68  | Z N A A |  | 4 H 0 4 5   |
| GO 1 N 33/53 (2006.01)  | GO 1 N 33/53  | M       |  |             |
| GO 1 N 33/577 (2006.01) | GO 1 N 33/577 | B       |  |             |
| C O 7 K 14/47 (2006.01) | C O 7 K 14/47 |         |  |             |

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 20 頁)

|           |                              |          |  |
|-----------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2007-110549 (P2007-110549) | (71) 出願人 | 000003159<br>東レ株式会社<br>東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号                    |
| (22) 出願日  | 平成19年4月19日 (2007.4.19)       | (74) 代理人 | 100091096<br>弁理士 平木 祐輔                                       |
|           |                              | (74) 代理人 | 100096183<br>弁理士 石井 貞次                                       |
|           |                              | (74) 代理人 | 100118773<br>弁理士 藤田 節  |
|           |                              | (72) 発明者 | 田中 祥徳<br>神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東<br>レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内           |
|           |                              | (72) 発明者 | 小林 道元<br>神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東<br>レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内<br>最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】大腸ガンの診断または検出のための組成物及び方法

## (57) 【要約】

【課題】大腸ガンの診断に有用なマーカーおよび大腸ガンの検出方法を提供する。

【解決手段】被験者由来の生体試料中の配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸、のいずれか1つまたは複数を測定することを含む、大腸ガンを検出する方法、ならびに、大腸ガンを診断または検出するための組成物。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者由来の生体試料中の配列番号 1 ~ 12 で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸、のいずれか 1 つまたは複数を測定することを含む、大腸ガンをインピトロで検出する方法。

**【請求項 2】**

前記ポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは前記核酸、の量またはその存在を測定する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記ポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは前記核酸、の量が、対照試料のものと比べて有意に増大していることを指標にする、請求項 1 または 2 に記載の方法。 10

**【請求項 4】**

前記ポリペプチド、その変異体またはその断片の測定が免疫学的方法によるものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記核酸の測定がハイブリダイゼーション法または定量ポリメラーゼ連鎖反応法によるものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記測定が、前記ポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは前記核酸、と結合可能な物質を用いて行われる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

**【請求項 7】**

前記結合可能な物質が抗体またはその断片である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記抗体が標識されている、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記結合可能な物質が前記核酸、その相補的な核酸、またはその少なくとも 15 ヌクレオチドの断片である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記核酸、その相補的な核酸またはその断片が標識されている、請求項 9 に記載の方法。 30

**【請求項 11】**

前記ポリペプチド、その変異体またはその断片と特異的に結合する抗体またはその断片を用いて、前記試料中の該ポリペプチド、その変異体またはその断片のうちの 1 つまたは複数の量または存在を免疫学的に測定し、該ポリペプチド、その変異体またはその断片の量が対照試料のものと比べて増大していることを指標にするか、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片の存在を指標にして大腸ガンを検出することを含む、請求項 1 ~ 4 、 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記ポリペプチド、その変異体もしくはその断片をコードする核酸またはその相補的な核酸と特異的に結合する該核酸、その相補的な核酸またはその断片を用いて、前記試料中の該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸のうちの 1 つまたは複数の量または存在をハイブリダイゼーション法または定量ポリメラーゼ連鎖反応法によって測定し、該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸の量が対照試料のものと比べて増大していることを指標にするか、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸の存在を指標にして大腸ガンを検出することを含む、請求項 1 ~ 3 、 5 、 6 、 9 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

**【請求項 13】**

前記核酸が DNA 、 RNA 、 mRNA 、 cDNA または cRNA である、請求項 1 ~ 3 、 5 、 6 、 9 ~ 10 、 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 14】**

10

20

30

40

50

前記試料が血液、血漿、血清または尿である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記試料が大腸由来の組織または細胞である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体が、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 7、8 または 11 に記載の方法。

【請求項 17】

配列番号 1 ~ 12 で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片の少なくとも 1 つと特異的に結合する、抗体もしくはその断片またはそれらの化学修飾誘導体、のうちの 1 つまたは複数を含む、大腸ガンの診断または検出のための組成物。 10

【請求項 18】

前記ポリペプチドまたは変異体の断片が、少なくとも 7 個のアミノ酸からなるエピトープを含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

配列番号 1 ~ 12 で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸またはその相補的核酸と特異的に結合する、該核酸、その相補的な核酸もしくはその少なくとも 15 ヌクレオチドの断片、またはそれらの化学修飾誘導体、のうちの 1 つまたは複数を含む、大腸ガンの診断または検出のための組成物。 20

【請求項 20】

前記ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸、その相補的な核酸またはその断片がプローブまたはプライマーである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

キットの形態である、請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物の、被験者における大腸ガンのインビトロ検出のための使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】 30

【0001】

本発明は、大腸ガンの診断又は検出に有用な組成物に関する。

本発明はまた、該組成物を使用した大腸ガンの検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

大腸は、全長が約 1.6 メートルの管であり、盲腸からはじまり上行結腸、横行結腸、下行結腸、S 状結腸、直腸で構成される。大腸は消化吸収された残りの腸内容物をため、そこから水分を吸収しながら大便にする、重要な消化器系器官である。また多量の腸内の細菌を排泄することによって防御する役割を持つ。

【0003】

大腸ガンは大きく分けて、腺ガン、扁平上皮ガン、腺扁平上皮ガンがあり、大部分が腺ガンで大腸ポリープ (polyp) より発生する。有茎のポリープはキノコの様な形状に増殖し、通常は良性腫瘍であるが、そのうちの一部が腺ガンに進行する。また現在は、ポリープ由来でない平坦な病変や陥凹性病変から進行大腸ガンになることがあることも明らかになっている。

【0004】

日本人においては S 状結腸と直腸が大腸ガンのできやすい部位である。食生活の欧米化に応じて増加する傾向にあり、日本における 2004 年の器官別死亡数では、結腸と直腸を合わせた場合、肺、胃について 3 位である。年齢別にみた大腸ガン（結腸・直腸・肛門ガン）の罹患率は、50 歳代付近から増加し始め、加齢につれて高くなる。大腸ガンの罹

10

20

30

40

50

患率、死亡率はともに男性のほうが女性の約2倍と高い傾向にあり、結腸ガンより直腸ガンにおいて男女差が大きい傾向がある。大腸ガンの危険因子としては遺伝学的要因も知られているが、一般的には喫煙、肥満、飲酒などを挙げることができる。

#### 【0005】

大腸ガンの治療としては内視鏡治療、外科手術、化学療法、放射線療法などが、病期、腫瘍の大きさ・深達度、転移の度合などを勘案し施される。治療方針の決定にあたっては大腸癌研究会により作成された「大腸癌治療ガイドライン」が参考にされる。早期大腸ガンである場合は内視鏡切除、あるいは外科手術によって完全に切除することが可能であり、再発率も非常に低い。進行大腸ガンである場合は肺、肝臓、リンパ節や腹膜などに切除困難な転移がおこり、また切除した部位に局所再発がおこることもある。こうした時期では、手術に加え放射線療法や化学療法（抗癌剤治療）が行われる。

10

#### 【0006】

このように、大腸ガンは比較的早期で発見された場合、予後は比較的良好く、初期ガンでの治療ではほぼ100%近くが完治する。しかし、大きな腫瘍や転移のある腫瘍の治療成績は劣り、早期発見の重要性が認識されている。

#### 【0007】

しかしながら、大腸ガンを自覚症状によって早期発見することは難しい。ほとんどの早期大腸ガンの段階では無症状であり、ガンが進行してからではないとはっきりとした自覚症状が現れないことが多いからである。大腸ガンの進行につれて血便、便が細くなる（便柱細少）、残便感、腹痛、下痢と便秘の繰り返しなど排便に関する症状や、貧血、嘔吐などの症状が現れる。最も多いのが血便であるが、痔等と混同される場合も多い。

20

#### 【0008】

大腸ガンの検査法としては直腸指診、便潜血検査、超音波検査、CT検査、大腸内視鏡検査、注腸造影検査などがある。大規模な集団検診で行われる代表的な検査法は大便の免疫学的潜血反応である。この段階で精密検査を受ける人をスクリーニングできるが、偽陰性、偽陽性判定も多い。精密検査で大腸ガンの確定診断を行う方法には大腸内視鏡検査、注腸造影検査、画像診断などの方法があるが、便を全て排出しなければならない、場合によつては苦痛を伴うなど、患者の肉体的、精神的負担が大きく、事前のスクリーニング段階での偽陰性、偽陽性判定を減らすことが求められている。

30

#### 【0009】

そこで、大腸ガンをスクリーニング段階で検出するために、便潜血検査に加えて、特異的で感受性が高い血中腫瘍マーカー（tumor marker）を発見しそれを用いた検査を行うことが強く望まれている。血中マーカーのレベルを計測することにより、比較的安価でハイスループットな検査・診断が可能になると考えられる。これまでに、大腸ガンのマーカーとしてCEA、CA19-9などが臨床応用されている。しかしながら、大腸ガンを特異的に、早期に発見できる腫瘍マーカーは現時点において存在せず、進行大腸ガンであつても約半数が陽性を示すのみである。

#### 【0010】

また、近年のゲノム解析またはプロテオーム解析の進歩に伴い、様々な新規の腫瘍マーカー候補が発見されている。たとえばInorganic Pyrophosphatase（特許文献1）、RS15A（特許文献2）、CBP2（特許文献3）、ASC（特許文献4）などがある。また組織においてはAnnexin IVなど13種（非特許文献1）、Mortalin（非特許文献2）、Cytochorome P450 enzymes（非特許文献3）、HSP70など5種（非特許文献4）、Adenosyl homocysteinateなど23種（非特許文献5）、などのマーカー候補が発見されている。

40

#### 【0011】

【特許文献1】国際公開WO2005/124353

【特許文献2】国際公開WO2005/124355

【特許文献3】国際公開WO2005/124356

50

【特許文献4】国際公開WO2006/066917

【非特許文献1】Alfonso, P.ら、Proteomics、2005、第5巻、  
p.2602-2611

【非特許文献2】Dundas, S.R.ら、Journal of pathology、  
2005、第205巻、p.74-81

【非特許文献3】Lane, C.S.ら、European journal of  
cancer、2004、第40巻、p.2127-2134

【非特許文献4】Stulik, J.ら、Electrophoresis、1999、  
第20巻、p.3638-3646

【非特許文献5】Friedman, D.B.ら、Proteomics、2004、第  
4巻、p.793-811 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

しかしながら、上記の既存のマーカー、およびマーカー候補は特異性及び／又は感受性に乏しいことや、生体試料からのその効率的な検出方法が確立していないことから一般に臨床上の利用は行われておらず、より特異性及び感受性が高い大腸ガンのマーカーが切望されている。

【0013】

本発明は、大腸ガンの診断に有用な組成物、および該組成物を用いた大腸ガンの検出方法を提供することを目的とする。 20

【課題を解決するための手段】

【0014】

マーカー探索の方法としては、大腸ガン細胞と非ガン細胞における遺伝子発現やタンパク質発現、又は細胞の代謝産物などの量を何らかの手段によって比較する方法や、大腸ガン患者と非ガン患者の体液中に含まれる遺伝子、タンパク質、代謝産物などの量を測定する方法が挙げられる。

【0015】

上記の課題を解決するために、本発明者らは、今回、大腸ガン患者と健常人の血漿について、大腸ガン患者に特異的に検出されるタンパク質マーカーを見出した。 30

本発明は、以下の特徴を有する。

(1) 被験者由来の生体試料中の配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸、のいずれか1つまたは複数を測定することを含む、大腸ガンをインピトロで検出する方法。

(2) 前記ポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは前記核酸、の量またはその存在を測定する、(1)に記載の方法。

(3) 前記ポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは前記核酸、の量が、対照試料のものと比べて有意に増大していることを指標にする、(1)または(2)に記載の方法。 40

【0016】

(4) 前記ポリペプチド、その変異体またはその断片の測定が免疫学的方法によるものである、(1)～(3)のいずれか1つに記載の方法。

(5) 前記核酸の測定がハイブリダイゼーション法または定量ポリメラーゼ連鎖反応法によるものである、(1)～(3)のいずれか1つに記載の方法。

(6) 前記測定が、前記ポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは前記核酸、と結合可能な物質を用いて行われる、(1)～(5)のいずれか1つに記載の方法。

【0017】

(7) 前記結合可能な物質が抗体またはその断片である、(6)に記載の方法。

(8) 前記抗体が標識されている、(7)に記載の方法。 50

(9) 前記結合可能な物質が前記核酸、その相補的な核酸、またはその少なくとも15ヌクレオチドの断片である、(6)に記載の方法。

(10) 前記核酸、その相補的な核酸またはその断片が標識されている、(9)に記載の方法。

#### 【0018】

(11) 前記ポリペプチド、その変異体またはその断片と特異的に結合する抗体またはその断片を用いて、前記試料中の該ポリペプチド、その変異体またはその断片のうちの1つまたは複数の量または存在を免疫学的に測定し、該ポリペプチド、その変異体またはその断片の量が対照試料のものと比べて増大していることを指標にするか、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片の存在を指標にして大腸ガンを検出することを含む、(1)～(4)、(6)～(8)のいずれか1つに記載の方法。 10

(12) 前記ポリペプチド、その変異体もしくはその断片をコードする核酸またはその相補的な核酸と特異的に結合する該核酸、その相補的な核酸またはその断片を用いて、前記試料中の該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸のうちの1つまたは複数の量または存在をハイブリダイゼーション法または定量ポリメラーゼ連鎖反応法によって測定し、該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸の量が対照試料のものと比べて増大していることを指標にするか、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸の存在を指標にして大腸ガンを検出することを含む、(1)～(3)、(5)、(6)、(9)～(10)のいずれか1つに記載の方法。 20

#### 【0019】

(13) 前記核酸がDNA、RNA、mRNA、cDNAまたはcRNAである、(1)～(3)、(5)、(6)、(9)～(10)、(12)のいずれか1つに記載の方法。

(14) 前記試料が血液、血漿、血清または尿である、(1)～(13)のいずれか1つに記載の方法。

(15) 前記試料が大腸由来の組織または細胞である、(1)～(13)のいずれか1つに記載の方法。

(16) 前記抗体が、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、(7)、(8)または(11)に記載の方法。

#### 【0020】

(17) 配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片の少なくとも1つと特異的に結合する、抗体もしくはその断片またはそれらの化学修飾誘導体、のうちの1つまたは複数を含む、大腸ガンの診断または検出のための組成物。 30

(18) 前記ポリペプチドまたは変異体の断片が、少なくとも7個のアミノ酸からなるエピトープを含む、(17)に記載の組成物。

(19) 配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸またはその相補的核酸と特異的に結合する、該核酸、その相補的な核酸もしくはその少なくとも15ヌクレオチドの断片、またはそれらの化学修飾誘導体、のうちの1つまたは複数を含む、大腸ガンの診断または検出のための組成物。

#### 【0021】

(20) 前記ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸、その相補的な核酸またはその断片がプローブまたはプライマーである、(19)に記載の組成物。 40

(21) キットの形態である、(17)～(20)のいずれかに記載の組成物。

(22) (17)～(20)のいずれかに記載の組成物の、被験者における大腸ガンのインピトロ検出のための使用方法。

#### 【0022】

本明細書中で使用する用語は、以下の定義を有する。

本明細書において「変異体」とは、配列番号1～12で表されるアミノ酸配列又はその部分配列において1以上、好ましくは1もしくは数個、のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含む変異体、あるいは該アミノ酸配列又はその部分配列と約80%以上、約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、約97%以上、約98% 50

以上、約99%以上の%同一性を示す変異体を意味する。

【0023】

また、該変異体をコードする核酸についても、同様に、配列番号1～12のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその部分配列において、1以上、好ましくは1もしくは数個、のヌクレオチドの欠失、置換、付加又は挿入を含む核酸、あるいは該ヌクレオチド配列又はその部分配列と約80%以上または約85%以上、好ましくは約90%以上または93%以上、より好ましくは約95%以上、約97%以上、約98%以上または約99%以上、の%同一性を示すヌクレオチド配列を有する核酸を意味する。

ここで、「数個」とは、約10、9、8、7、6、5、4、3又は2個の整数を指す。

【0024】

また、「%同一性」は、上記のBLASTやFASTAによるタンパク質または核酸のホモロジー検索プログラムを用いて、ギャップを導入してまたはギャップを導入しないで、決定することができる(Karlin, S.ら、1993年、Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.、第90巻、p.5873-5877; Altschul, S.F.ら、1990年、Journal of Molecular Biology、第215巻、p.403-410; Pearson, W.R.ら、1988年、Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.、第85巻、p.2444-2448; 高木利久・金久實編、ゲノムネットのデータベース利用法(第2版)1998年、共立出版社)。

10

20

30

40

【0025】

本明細書において「化学修飾誘導体」は、酵素、蛍光団、放射性同位元素などのラベルによるラベル化誘導体、あるいはアセチル化、グリコシル化、リン酸化、硫酸化などの化学修飾を含む誘導体を意味する。

【0026】

本明細書において「診断または検出のための組成物」とは、大腸ガンの罹患の有無、罹患の程度もしくは改善の有無や改善の程度を診断または検出するために、あるいは大腸ガンの予防、改善又は治療に有用な候補物質をスクリーニングするために、直接的又は間接的に使用しうるものをいう。

【0027】

本明細書において検出・診断対象となる「生体試料」とは、大腸ガンの発生にともない出現する標的ポリペプチドを含有する、あるいはその含有が疑われる、生体から採取された試料をいう。

【0028】

本明細書において「特異的に結合する」とは、抗体またはその断片が、本発明における大腸ガンマーカーである標的ポリペプチド、その変異体またはその断片とのみ抗原-抗体複合体を形成し、他のペプチド性またはポリペプチド性物質とは該複合体を実質的に形成しないこと、あるいは、相補的核酸またはその断片が、該標的ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸とのみ結合し、他の核酸とは実質的に結合しないことを意味する。ここで、「実質的」とは、程度は小さいが非特異的な複合体形成が起こり得ることを意味する。

【0029】

本明細書において「核酸」とは、DNA、RNA、mRNA、cDNAまたはcRNAのいずれかを、また一本鎖または二本鎖を、意味する。

【0030】

本明細書において「エピトープ」とは、本発明の標的ポリペプチド、その変異体またはその断片において、抗原性または免疫原性を有する部分アミノ酸領域(抗原決定基)指す。エピトープは通常、少なくとも5アミノ酸、好ましくは少なくとも7アミノ酸または少なくとも8アミノ酸、より好ましくは少なくとも10アミノ酸からなる。

【発明の効果】

50

## 【0031】

本発明における大腸ガンマーカーは、大腸ガン患者の血液などの生体試料中に見出されるが、健常人にはほとんど、または全く見出されないため、単に該マーカーの存在または量を指標にすることによって、例えば血液を用いて、容易に大腸ガンを検出することができるという格別の作用効果を有する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0032】

以下に本発明をさらに具体的に説明する

## &lt;大腸ガンマーカー&gt;

本発明の大腸ガンの診断または検出のための組成物を使用して大腸ガンをインビトロで検出するための大腸ガンマーカーは、配列番号1～12で表されるアミノ酸配列を有すポリペプチド、その変異体またはその断片である。またさらに、当該大腸ガンマーカーは、該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸でありうる。

## 【0033】

本発明の配列番号1～12のポリペプチドを、その遺伝子名およびタンパク質番号（GenBank登録名および登録番号）、ならびにそれらの特性とともに下記の表1に示す。これらのポリペプチドは、大腸ガン患者血漿中に特異的に検出され、健常者の血漿には検出されないか、または大腸ガン患者血漿に比べて検出が有意に減少していた。なお、これらのポリペプチドまたは遺伝子（cDNA）のアミノ酸配列またはヌクレオチド（もしくは、塩基）配列は、NCBI、GenBank等のデータバンクにアクセスすることによって入手可能である。

## 【0034】

## 【表1】

| 配列番号 | 遺伝子名   | タンパク質番号 | 特性  |
|------|--------|---------|---|
| 1    | DSP    | P15924  | Desmoplakin (DP) (250/210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) |
| 2    | ITIH3  | Q06033  | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3                    |
| 3    | CENTB1 | Q15027  | Centaurin-beta 1 (Cnt-b1)                                       |
| 4    | NPHP1  | O15259  | Nephrocystin-1 (Juvenile nephronophthisis 1 protein)            |
| 5    | DSC1   | Q08554  | Desmocollin-1 (Desmosomal glycoprotein 2/3)                     |
| 6    | ACVR1B | P36896  | Activin receptor type 1B  |
| 7    | SEMA4F | O95754  | Semaphorin-4F (Semaphorin W) (Sema W) (Semaphorin M)            |
| 8    | RAB23  | Q9ULC3  | Ras-related protein Rab-23                                      |
| 9    | DCD    | P81605  | Beta-2-glycoprotein 1   |
| 10   | HPX    | P02790  | Hemopexin   |
| 11   | PFN1   | P07737  | Profilin-1 (Profilin I)   |
| 12   | HRG    | P04196  | Histidine-rich glycoprotein                                     |

10

20

30

40

## 【0035】

本発明において大腸ガン検出のための上記標的ポリペプチドはいずれも、大腸ガン患者において、血液などの生体試料中の該ポリペプチドのレベルが、健常人と比べて大腸ガンに罹患した被験者において有意にまたは格別に高いことによって特徴付けられる。また、当業者にとって明らかであるように、該ポリペプチドに対応する核酸（転写産物等）もまた、健常人と比べて大腸ガンに罹患した被験者において有意にまたは格別に高いレベルで発現していると考えられる。

## 【0036】

したがって、被験者の生体試料中に上記大腸ガンマーカーポリペプチド、または該ポリペプチドに対応する核酸のいずれか1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3～5つ

50

以上、さらに好ましくは4～12個が検出される場合、大腸ガンであると判定することができる。

#### 【0037】

本発明におけるポリペプチドまたは核酸は、例えば当業界で慣用の技術である化学合成（ペプチド合成、DNA/RNA自動合成など）またはDNA組換え技術によって作製することができる。手順や精製の簡易さの点で、DNA組換え技術の使用が好ましい。

#### 【0038】

はじめに本発明におけるポリペプチドの部分配列をコードするポリヌクレオチド配列を、DNA自動合成装置を用いて化学的に合成する。この合成には一般にホスホアミダイト法が使用され、この方法によって約100塩基までの一本鎖DNAを自動合成することができる。DNA自動合成装置は、例えばPolygen社、ABI社などから市販されている。

10

#### 【0039】

得られたポリヌクレオチドをプローブまたはプライマーとして用いて、周知のcDNAクローニングによって、具体的には、標的である上記遺伝子が発現される大腸組織などの生体組織から抽出した全RNAをオリゴdTセルロースカラムで処理して得られるポリA (+) RNAからRT-PCR法によってcDNAライブラリーを作製し、このライブラリーからハイブリダイゼーションスクリーニング、発現スクリーニング、抗体スクリーニングなどのスクリーニングによって、目的のcDNAクローンを得る。必要に応じて、cDNAクローンをさらにPCR法によって増幅することもできる。これによって目的の遺伝子に対応するcDNAを得ることができる。

20

#### 【0040】

プローブ又はプライマーは、配列番号1～12に示されるポリペプチド配列に基づいて15～100塩基の連続する配列の中から選択し、上記のようにして合成しうる。また、cDNAクローニング技術は、例えばSambrook, J.およびRussel, D.著、Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001年1月15日発行、の第1巻7.42～7.45、第2巻8.9～8.17に記載されている。

30

#### 【0041】

次に、上記のようにして得られたcDNAクローンを発現ベクターに組み込み、該ベクターによって形質転換又はトランスフェクションされた原核又は真核宿主細胞を培養することによって該細胞又は培養上清から、目的のポリペプチドを得ることができる。このとき、目的の成熟ポリペプチドをコードするDNAの5'末端に、分泌シグナル配列をコードするヌクレオチド配列をフランкиングすることによって細胞外に成熟ポリペプチドを分泌させることができる。

#### 【0042】

ベクター及び発現系はNovagen社、宝酒造、第一化学薬品、Qiagen社、Stratagene社、Promega社、Roche Diagnostics社、Invitrogen社、Genetics Institute社、Amersham

40

Bioscience社などから入手可能である。宿主細胞としては、細菌などの原核細胞（例えば大腸菌、枯草菌）、酵母（例えばサッカロマイセス・セレビシアエ）、昆虫細胞（例えばSf細胞）、哺乳動物細胞（例えばCOS、CHO、BHK、NIH3T3など）などを用いることができる。ベクターには、該ポリペプチドをコードするDNAの他に、調節エレメント、例えばプロモーター（例えばlacプロモーター、trpプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、SV40ウイルスプロモーター、3'-ホスホグリセレートキナーゼプロモーター、解糖系酵素プロモーターなど）、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルおよびリボソーム結合部位、複製開始点、ターミネーター、選択マーカー（例えばアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子；LEU2、URA3などの栄養要求性マーカーなど）などを含むことができる

50

。

## 【0043】

また、ポリペプチドの精製を容易にするために、標識ペプチドをポリペプチドのC末端またはN末端に結合させた融合ポリペプチドの形態で発現産物生成させることもできる。代表的な標識ペプチドには、6～10残基のヒスチジンリピート(Hisタグ)、FLAG、mycペプチド、GFPポリペプチドなどが挙げられるが、標識ペプチドはこれらに限られるものではない。

## 【0044】

標識ペプチドを付けずに本発明に係るポリペプチドを生産した場合には、その精製法として例えばイオン交換クロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。またこれに加えて、ゲルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、電気泳動、硫安分画、塩析、限外ろ過、透析などを組み合わせる方法でもよい。さらにまた、該ポリペプチドにヒスチジンリピート、FLAG、myc、GFPといった標識ペプチドを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれの標識ペプチドに適したアフィニティクロマトグラフィーによる方法を挙げができる。この場合、単離・精製が容易となるような発現ベクターを構築するとよい。特にポリペプチドと標識ペプチドとの融合ポリペプチドの形態で発現するように発現ベクターを構築し、遺伝子工学的に当該ポリペプチドを調製すれば、単離・精製も容易である。

10

## 【0045】

核酸の精製は、アガロースゲル電気泳動、DNA結合性樹脂カラムなどを使用した精製法によって行うことができる。また、自動核酸精製装置や核酸精製キットなどが市販されているので、これらを使用して、核酸精製を行うこともできる。

20

## 【0046】

本発明における上記ポリペプチドの変異体は、上記定義のとおり、配列番号1～12で表されるアミノ酸配列又はその部分配列において1以上、好ましくは1もしくは数個、のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を含む変異体、あるいは該アミノ酸配列又はその部分配列と約80%以上、約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、約97%以上、約98%以上、約99%以上の%同一性を示す変異体である。このような変異体には、例えば、ヒトと異なる哺乳動物種のホモログ、同種の哺乳動物(例えば人種)間での多型性変異に基づく変異体などの天然変異体が含まれる。

30

## 【0047】

また、上記ポリペプチド変異体をコードする核酸は、同様に、配列番号1～12のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその部分配列において、1以上、好ましくは1もしくは数個、のヌクレオチドの欠失、置換、付加又は挿入を含む核酸、あるいは該ヌクレオチド配列又はその部分配列と約80%以上または約85%以上、好ましくは約90%以上または93%以上、より好ましくは約95%以上、約97%以上、約98%以上または約99%以上の%同一性を示すヌクレオチド配列を有する核酸を包含する。

## 【0048】

本発明における上記ポリペプチドの断片は、該ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも15個、好ましくは少なくとも20個、少なくとも25個、より好ましくは少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基からなり、1個または複数のエピトープを保持する。このような断片は、本発明に関わる抗体またはその断片と免疫特異的に結合することができるものである。上記ポリペプチドが、例えば血液中に存在する場合には、そこに存在するプロテアーゼやペプチダーゼなどの酵素によって切断され断片化されて存在することが想定される。

40

## 【0049】

<大腸ガンの診断または検出のための組成物>

本発明は、配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片と特異的に結合する、抗体もしくはその断片、またはそれらの化学修飾誘導体、のうちの1つ

50

または複数を含む、大腸ガンの診断または検出のための組成物を提供する。

【0050】

大腸ガンマーカーであるポリペプチドを認識する抗体は、抗体の抗原結合部位を介して、該ポリペプチドに特異的に結合し得るものである。本発明で使用しうる抗体は、配列番号1～12のアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変異体、またはその断片、あるいはその融合ポリペプチドを1または複数の免疫原として使用して慣用の技術によって作製することができる。これらのポリペプチド、断片、変異体または融合ポリペプチドは、抗体形成を引き出すエピトープを含むが、これらエピトープは、直鎖でもよいし、より高次構造(断続的)でもよい。なお、該エピトープは、当該技術分野に知られるあらゆるエピトープ解析法、例えばファージディスプレイ法、リバースイムノジェネティックス法など、によって同定できる。

10

【0051】

本発明で使用しうる抗体は、いずれのタイプ、クラス、サブクラスも含まれるものとする。そのような抗体には、例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2などが含まれる。

【0052】

さらにまた、本発明に係るポリペプチドによってあらゆる態様の抗体が誘導される。該ポリペプチドの全部もしくは一部またはエピトープが単離されていれば、慣用技術を用いてポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれも作製可能である。方法には例えば、Kennetら(監修), Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, 1980に挙げられた方法がある。

20

【0053】

ポリクローナル抗体は、鳥類(例えば、ニワトリなど)、哺乳動物(例えば、ウサギ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ネズミなど)などの動物に本発明に係るポリペプチドを免疫することによって作製することができる。目的の抗体は、免疫された動物の血液から、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどの手法を適宜組み合わせて精製することができる。

30

【0054】

モノクローナル抗体は、各ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を、慣用技術によってマウスにおいて産生することを含む手法によって得ることができる。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物を本発明に係るポリペプチドで免疫し、免疫された動物から脾臓細胞を採取し、該脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し、そして該ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。モノクローナル抗体は、慣用技術によって回収可能である。

モノクローナルおよびポリクローナル抗体の作製について以下に詳しく説明する。

【0055】

A. モノクローナル抗体の作製

40

(1) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られた免疫原を、哺乳動物、例えばラット、マウス(例えば近交系マウスのBalb/c)、ウサギなどに投与する。免疫原の1回の投与量は、免疫動物の種類、投与経路などにより適宜決定されるものであるが、動物1匹当たり約50～200μgとされる。免疫は主として皮下、腹腔内に免疫原を注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、初回免疫後、数日から数週間間隔で、好ましくは1～4週間間隔で、2～10回、好ましくは3～4回追加免疫を行う。初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法などにより繰り返し行い、抗体価がplatteに達したときは、免疫原を静脈内または腹腔内に注射し、最終免疫とする。そして、最終免疫の日か

50

ら2～5日後、好ましくは3日後に、抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞または局所リンパ節細胞が好ましい。

#### 【0056】

##### (2) 細胞融合

各タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマ細胞株は、慣用的技術によって产生し、そして同定することが可能である。こうしたハイブリドーマ細胞株を产生するための1つの方法は、動物を本発明のポリペプチドで免疫し、免疫された動物から脾臓細胞を採取し、該脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し、そして該酵素に結合するモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。抗体産生細胞と融合させる骨髄腫細胞株としては、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。また株化細胞は、免疫動物と同種系の動物に由来するものが好ましい。骨髄腫細胞株の具体例としては、Balb/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPRT）欠損細胞株であるP3X63-Ag.8株（ATCC TIB9）などが挙げられる。

10

#### 【0057】

次に、上記骨髄腫細胞株と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないD MEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、抗体産生細胞と骨髄腫細胞株とを約1：1～20：1の割合で混合し、細胞融合促進剤の存在下にて融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1500～4000ダルトンのポリエチレングリコール等を約10～80%の濃度で使用することができる。また場合によっては、融合効率を高めるために、ジメチルスルホキシドなどの補助剤を併用してもよい。さらに、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞と骨髄腫細胞株とを融合させることもできる。

20

#### 【0058】

##### (3) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を、例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釀後、マイクロタイタープレート上に200万個/ウェル程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。培養温度は、20～40、好ましくは約37

30

である。ミエローマ細胞がHGPRT欠損株またはチミジンキナーゼ欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジンを含む選択培地（HAT培地）を用いることにより、抗体産生能を有する細胞と骨髄腫細胞株のハイブリドーマのみを選択的に培養し、増殖させることができる。その結果、選択培地で培養開始後、約14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

#### 【0059】

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採取し、酵素免疫測定法（EIA：Enzyme Immuno Assay、及びELISA）、放射性免疫測定法（RIA：Radio Immuno Assay）等によって行うことができる。融合細胞のクローニングは、限界希釀法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。ハイブリドーマは、RPMI-1640、D MEM等の基本培地中での培養において安定であり、本発明のポリペプチド性ガンマーカーと特異的に反応するモノクローナル抗体を产生、分泌するものである。

40

#### 【0060】

50

#### (4) 抗体の回収

モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。すなわち樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法または腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地または無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度)で2~10日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約1000万個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2週間後に腹水または血清を採取する。

#### 【0061】

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、またはこれらを組み合わせることにより、精製された本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。

#### 【0062】

#### B. ポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体を作製する場合は、前記と同様に動物を免疫し、最終の免疫日から6~60日後に、酵素免疫測定法(EIA及びELISA)、放射性免疫測定法(RIA)等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。その後は、抗血清中のポリクローナル抗体の反応性をELISA法などで測定する。

#### 【0063】

また本発明においては、上記抗体の抗原結合断片も使用しうる。慣用的技術によって產生可能な抗原結合断片の例には、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、dsFvなどの断片が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子工学技術によって產生可能な抗体断片および誘導体もまた含まれる。そのような抗体には、例えば合成抗体、組換え抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、単鎖抗体などが含まれる。

#### 【0064】

本発明の抗体は、in vitro及びin vivoのいずれにおいても、本発明において、ポリペプチドまたはその(ポリ)ペプチド断片の存在を検出するためのアッセイに使用可能である。アッセイにおける特異的検出を可能にするために、モノクローナル抗体の使用が好ましいが、ポリクローナル抗体であっても、精製ポリペプチドを結合したアフィニティカラムに抗体を結合させることを含む、いわゆる吸収法によって、特異抗体を得ることができる。

#### 【0065】

したがって、本発明の組成物は、配列番号1~12のポリペプチド、その変異体、またはその断片と特異的に結合可能な抗体またはその断片を少なくとも1つ含む、好ましくは複数種、例えば少なくとも2~5、少なくとも3~5または少なくとも4~5、より好ましくは5~全て(12)の種類を含むことができる。

#### 【0066】

好ましくは、本発明の組成物はキットの形態である。このようなキットにおいては、上記の各ポリペプチドに特異的に結合可能な抗体またはその断片を、それぞれ別個に、あるいは混合物として、収容する容器を含む。抗体またはその断片は、例えばポリスチレン製などのマルチウェルプレート、ラテックスビーズ、磁性ビーズなどの球状担体などの固相担体上に付着または結合させてよい。

#### 【0067】

本発明で使用される抗体またはその断片には、必要に応じてラベル、例えば蛍光団、酵素、放射性同位元素などを結合させてもよいし、あるいは二次抗体にこのようなラベルを結合してもよい。

#### 【0068】

蛍光団には、例えばフレオロレセインとその誘導体、ローダミンとその誘導体、ダンシ

10

20

30

40

50

ルクロリドとその誘導体、ウンベリフェロンなどが含まれる。

酵素には、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが含まれる。

#### 【0069】

放射性同位元素には、例えばヨウ素( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、リン( $^{32}\text{P}$ )、イオウ( $^{35}\text{S}$ )、金属類(例えば $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ など)などが含まれる。

#### 【0070】

その他のラベルには、例えばルミノールなどの発光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリンなどの生物発光物質などが含まれる。

10

#### 【0071】

また、必要に応じて、アビジン・ビオチン系またはストレプトアビジン・ビオチン系を利用することも可能であり、この場合、本発明の抗体またはその断片に例えばビオチンを結合することもできる。

#### 【0072】

本発明はまた、配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸と特異的に結合する、該核酸と相補的な核酸もしくはその少なくとも15ヌクレオチドの断片、またはそれらの化学修飾誘導体、のうちの1つまたは複数を含む、大腸ガンの診断または検出のための組成物を提供する。

#### 【0073】

上記の相補的な核酸またはその断片は、被験者からの生物試料中の大腸ガンマーカーの存在又は量を測定し、これによって大腸ガンを診断または検出するために使用される。配列番号1～12で表わされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、NCBI、GenBankなどのデータバンクにアクセスすることによって容易に入手可能であり、例えば表1の遺伝子DSP、ITIH3、CENTB1、NPHP1、DSC1のヌクレオチド配列はそれぞれ、NM77830、X67055、BC018543、AJ001815、Z34522として登録されている。入手可能なヌクレオチド配列に基づいて、大腸ガンマーカーである核酸、その相補的核酸、およびそれらの核酸の少なくとも15ヌクレオチドの断片を、DNA組換え技術、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、DNA/RNA自動合成などの公知の技術および手法を用いて合成することができる(例えば、Sambrook, J. および Russell, D. 著、Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001)。

20

#### 【0074】

上記相補的核酸は、プローブとして使用されるときには、配列番号1～12のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の相補的配列において、例えば15ヌクレオチド以上から全数、30ヌクレオチド以上から全数、50ヌクレオチド以上から全数、100ヌクレオチド以上から全数、150ヌクレオチド以上から全数、200ヌクレオチド以上から全数、250ヌクレオチド以上から全数、300ヌクレオチド以上から全数、500ヌクレオチド以上から全数、などのヌクレオチド配列を有することができる。

30

#### 【0075】

また、上記核酸およびその相補的核酸は、プライマーとして使用されるときには、配列番号1～12のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列およびその相補的配列において、例えば15～40ヌクレオチド、好ましくは19～30ヌクレオチド、より好ましくは20～25ヌクレオチドからなる配列を有することができる。

40

#### 【0076】

本発明の組成物はさらに、キットの形態をとってもよい。大腸ガンマーカーを検出するための上記の抗体類または核酸類を個別に、または適宜混合して、個別の容器(例えばバイアルなど)に入れて包装することができる。

#### 【0077】

50

## &lt;大腸ガンの検出&gt;

本発明によれば、上記大腸ガンマーカーと結合可能な物質を用いて、被験者由来の生体試料中の配列番号1～12、好ましくは配列番号1～6、で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片、あるいは該ポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸、のうちの1つまたは複数について、その量または存在を調べることを含む方法によって、大腸ガンを検出することができる。本発明の方法によって大腸ガンマーカーが検出されるか、又は対照と比べて遺伝子発現レベルが有意に高いと判定されるときには、被験者は大腸ガンに罹患していると診断しうる。

## 【0078】

本発明の方法では、上記大腸ガンマーカーの検出は、単一のマーカーでもよいが、好ましくは複数、例えば2以上、3以上、4以上、5以上から10、11または12以下のマーカーについて行うのがよい。これは、予期せぬ非特異的複合体の検出、言い換えれば誤診、を回避するためである。

## 【0079】

本発明の組成物は、大腸ガンの診断、判定又は検出、すなわち罹患の有無や罹患の程度の診断、のために有用である。大腸ガンの診断においては、正常組織、正常体液などの陰性対照との比較を行い、被験者の生体試料中の上記大腸ガンマーカーの存在または量を検出し、その存在または量の差が有意であれば、被験者について大腸ガンの罹患が疑われる。

## 【0080】

本発明方法で用いられる検体試料としては、例えば大腸組織、その周辺組織、大腸細胞、あるいは体液、例えば血液、血清、血漿、大腸液、尿などである。被験者の生体組織は、バイオプシーなどで採取するか、もしくは手術によって得ることができる。

## 【0081】

本発明において、被験者とは、ヒトを含む哺乳動物、好ましくはヒトである。

上記大腸ガンマーカーと結合可能な物質は、例えば上記抗体またはその断片、アブタマー、Affibody (Affibody社商標)、それぞれの大腸ガンマーカーの受容体、それぞれの大腸ガンマーカーの特異的作用阻害物質、それぞれの大腸ガンマーカーの特的的作用活性化物質などを含み、好ましくは抗体もしくはその断片、またはそれらの化学修飾誘導体である。

## 【0082】

本発明の実施形態において、測定は、慣用の酵素又は蛍光団で必要により標識した抗体又は断片と、組織切片又はホモゲナイズした組織または体液とを接触させる工程、抗原-抗体複合体を定性的に又は定量的に測定する工程を含むことができる。検出は、例えば免疫電顕により標的ポリペプチドの存在とレベルを測定する方法、酵素抗体法(例えばELISA)、蛍光抗体法、放射性免疫測定法、均一法、不均一法、固相法、サンドイッチ法などの慣用法によって標的ポリペプチドの存在またはレベルを測定する方法などによって行うことができる。体液または大腸ガン組織もしくは細胞、好ましくは血液、において、標的ポリペプチドが存在する場合、あるいは陰性対照と比較して標的ポリペプチドのレベルが有意に増大または高い場合、大腸ガンであると決定する。ここで、「有意に」とは、統計学的に有意であることを意味する。

## 【0083】

免疫学的方法に代わる測定方法として、質量分析法を用いる方法が含まれる。この方法は、具体的には実施例に記載される手法で行うことができる。すなわち、生物試料、例えば血清または血漿をフィルターでろ過して夾雑物を除き、緩衝液(例えばpH約8)で希釈して約10mg/ml～約15mg/mlの濃度に調整したのち、分子量5万以上のタンパク質を除去可能な中空糸フィルター(下記参考例(1))または遠心型平膜フィルターを通して分子量分画し、画分をプロテアーゼ(例えばトリプシン)で処理してペプチド化し、これを質量分析計(マトリックス支援レーザー脱離イオン化法、またはエレクトロスプレーイオン化法を利用したタイプ)に掛けて、目的のポリペプチド由来の特定ピーク

10

20

30

40

50

の質量／荷電数と強度に基づいて、大腸ガン摘出手術前の患者と健常人の間における試料中のポリペプチドの存在量の差異を測定することができる。

【0084】

核酸を検出する方法としては、例えばハイブリダイゼーション法または定量RT-PCR法を使用することができる。これらの方法において、大腸ガンマーカーと結合可能な別の好ましい物質とは、配列番号1～12で表されるポリペプチド、その変異体またはその断片をコードする核酸と特異的に結合する、該核酸と相補的な核酸もしくはその少なくとも15ヌクレオチドの断片、またはそれらの化学修飾誘導体である。

【0085】

ハイブリダイゼーション法には、例えばノーザンプロット法、サザンプロット法、DNAチップ解析法、in situハイブリダイゼーション法、サザンハイブリダイゼーション法などを使用することができる。10

【0086】

ノーザンプロット法を使用する場合は、本発明の組成物をプローブとして用いることによって、RNA中の各遺伝子発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、本発明の組成物（相補鎖）を放射性同位元素（<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>35</sup>Sなど）や蛍光物質などで標識し、それを常法にしたがってナイロンメンブレンなどにトランスファーした被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせたのち、形成された診断用組成物（DNA）とRNAとの二重鎖を診断用組成物の標識物（放射性同位元素又は蛍光物質）に由来するシグナルを放射線検出器（例えば、BAS-1800II、富士写真フィルム株式会社）又は蛍光検出器（例えば、STORM860、Amersham Bioscience社）を用いて検出および測定することが可能である。20

【0087】

DNAアレイ解析を利用する場合は、本発明の組成物の相補的核酸またはその断片の複数、好ましくは全数、をDNAプローブ（一本鎖又は二本鎖）として基板に貼り付けたDNAチップまたはDNAマイクロアレイを用いる。

【0088】

定量RT-PCRを含む定量PCR法を使用する場合には、本発明の組成物をプライマーとして用いることによって、RNA中の遺伝子発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、被験者の生体組織由来のRNAから常法にしたがってcDNAを調製して、これを鑄型として標的の各遺伝子の領域が増幅できるように、本発明の組成物から調製した1対のプライマー（上記cDNAに結合する正鎖と逆鎖からなる）をcDNAとハイブリダイズさせて常法によりPCR法を行い、得られた二本鎖DNAを検出する方法を例示することができる。なお、二本鎖DNAの検出法としては、上記PCRをあらかじめ放射性同位元素又は蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行う方法、PCR産物をアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイドなどで二本鎖DNAを染色して検出する方法、産生された二本鎖DNAを常法にしたがってナイロンメンブレンなどにトランスファーさせて標識した診断用組成物をプローブとしてこれとハイブリダイズさせて検出することを含む方法をとることができる。30

【0089】

ハイブリダイゼーション条件は、ストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションが好ましく、限定されないが、例えば30～50で、3～4×SSC、0.1～0.5%SDS中で1～24時間のハイブリダイゼーション、より好ましくは40～45で、3.4×SSC、0.3%SDS中で1～24時間のハイブリダイゼーション、そしてその後の洗浄を含む。洗浄条件としては、例えば、2×SSCと0.1%SDSを含む溶液、及び1×SSC溶液、0.2×SSC溶液による室温での連続した洗浄などの条件を挙げることができる。ここで、1×SSCは、150mM塩化ナトリウムおよび15mMクエン酸ナトリウムを含む水溶液（pH7.2）である。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが望ましい。40

【0090】

50

20

30

40

50

ハイブリダイゼーションにおける「ストリンジエントな条件」の他の例については、例えば Sambrook, J. & Russell, D. 著、Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001に記載されている。

### 【実施例】

#### 【0091】

本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、この実施例によって制限されないものとする。

#### <参考例>

##### (1) 中空糸フィルターの作製

分画分子量約5万の孔径を膜表面に有するポリスルホン中空糸を100本束ね、中空糸中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管に固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュール(モジュールA)は血清または血漿中の高分子量タンパク質の除去に用いられ、その直径は約7mm、長さは約17cmである。同様に低分子量タンパク質の濃縮に用いられるミニモジュール(モジュールB)を分画分子量約3千の孔径の膜を用いて作成した。ミニモジュールは片端に中空糸内腔に連結する入口があり、反対側の端は出口となる。中空糸入口と出口はシリコンチューブによる閉鎖循環系流路であり、この流路内を液体がペリスタポンプに駆動されて循環する。また、中空糸外套のガラス管には、中空糸から漏出してきた液体を排出するポートを備え、1つモジュールセットが構成される。流路途中にT字のコネクターによって、モジュールを連結し、モジュールA3本と、モジュールB1本をタンデムに連結してひとつの中空糸フィルターとした。この中空糸フィルターを蒸留水にて洗浄し、PBS(0.15mM NaCl)を含むリン酸緩衝液、pH7.4)水溶液を充填した。分画原料の血清または血漿は該中空糸フィルターの流路入口から注入され、分画・濃縮後に流路出口から排出される。該中空糸フィルターに注入された血清または血漿は、モジュールA毎に分子量約5万で分子篩いがかかり、分子量5万よりも低分子の成分はモジュールBで濃縮され、調製されるようになっている。

10

20

30

40

#### 【0092】

#### <実施例1>

##### (1) 健常人および大腸ガン患者血漿のタンパク質同定

50~70歳代の摘出手術前の大腸ガン患者19名、および同年代の健常人8名からEDTA血漿を得て、それぞれについて測定を行った。血漿をポアサイズ0.22μmのフィルターでろ過して夾雑物質を取り除き、タンパク質濃度50mg/mLとなるように調整した。この血漿をさらに25mM重炭酸アンモニウム溶液(pH8.0)12.5mg/mLに希釈し、参考例(1)に示した中空糸フィルターによって分子量による分画を行った。分画後の血漿サンプル(全量1.8mL、最大250μgのタンパク質を含む)をProteomeLab(登録商標)PFD System(Beckman Coulter社)逆相クロマトグラフィーで7分画に分離し、それぞれのフラクションを凍結乾燥した後、100μLの25mM重炭酸アンモニウム溶液(pH8.0)に再溶解した。このサンプルをタンパク質の50分の1量のトリプシンで37、2~3時間の条件で消化し、ペプチド化を行った。各分画のペプチドをさらにイオン交換カラム(KYATEKノロジーズ)によって4分画化した。その各々の分画を、逆相カラム(KYATEKノロジーズ)でさらに分画し、溶出してきたペプチドについて、オンラインで連結された質量分析計Q-TOF Ultima(Micromass社)を用いて、サーベイスキャンモードで測定した。

#### 【0093】

(2) 大腸ガン患者の大腸ガン摘出手術前および健常人の血漿のStandardモードでの信頼性スコア表示によるタンパク質発現比較

上記(1)において測定したデータを、タンパク質同定ソフトウェアであるMASCOT(Matrix Science)を用いて解析することにより、網羅的にタンパク質

50

同定を行った。M A S C O T 解析の信頼性スコアを通常のモード（S t a n d a r d モード）で表示させ、タンパク質に対するスコアが50以上のタンパク質について、大腸ガン摘出手術前の患者と健常人の間で比較を行い、10人以上の大腸ガン患者で検出され、健常人での検出人数が3人以下であるタンパク質を、健常人と比べ大腸ガン摘出手術前の患者の血漿中でその発現が有意に増強するタンパク質として見いだした。これらのタンパク質は、下記表1に示した配列番号1～6で表されるポリペプチドであり、大腸ガンマーカーとして大腸ガンの検出において有用であることが判明した。

【0094】

【表2】

10

| 配列番号 | タンパク質番号 | 各群の検出人数 |           |
|------|---------|---------|-----------|
|      |         | 健常人     | 大腸ガン摘出手術前 |
| 1    | P15924  | 2       | 19        |
| 2    | Q06033  | 1       | 19        |
| 3    | Q15027  | 1       | 16        |
| 4    | O15259  | 1       | 15        |
| 5    | Q08554  | 1       | 15        |
| 6    | P36896  | 1       | 15        |

20

【0095】

(3) 大腸ガン患者の大腸ガン摘出手術前および健常人の血漿のM u d P I T モードでの信頼性スコア表示によるタンパク質発現比較

次に、M A S C O T 解析における信頼性スコアをM u d P I T モードを用いて計算させることでタンパク質同定を行った。M u d P I T モードでは、少なくとも一本以上のペプチドが、ペプチド単独でスコア34以上の高い信頼性を持つようなタンパク質がヒットする。このモードでタンパク質検出を行うことによって、S t a n d a r d モードではタンパク質のスコアが50未満になり検出されたとみなされないが、信頼性の高いペプチドを含むようなタンパク質が新たに検出される。M u d P I T モードで新たに検出されたタンパク質のうち、2人以上の大腸ガン患者で検出され、健常人では全く検出されていないタンパク質を健常人と比べ大腸ガン摘出手術前の患者の血漿中でその発現が有意に増強するタンパク質として見いだした。これらのタンパク質は、下記表2に示した配列番号1, 5, 7～12で表されるポリペプチドであり、故に大腸ガンマーカーとして大腸ガンの検出および術後経過の診断において有用であることが判明した。

30

【0096】

【表3】

30

| 配列番号 | タンパク質番号 | 各群の検出人数 |           |
|------|---------|---------|-----------|
|      |         | 健常人     | 大腸ガン摘出手術前 |
| 1    | P15924  | 0       | 3         |
| 5    | Q08554  | 0       | 3         |
| 7    | O95754  | 0       | 2         |
| 8    | Q9ULC3  | 0       | 3         |
| 9    | P81605  | 0       | 5         |
| 10   | P02790  | 0       | 3         |
| 11   | P07737  | 0       | 3         |
| 12   | P04196  | 0       | 2         |

40

50

**【産業上の利用可能性】****【0097】**

本発明は、特異性および感受性に優れた、大腸ガンの診断または検出のための組成物を提供することができるため、特に製薬および医薬産業上有用である。

**【配列表】**

2008267963000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 鄭 基晩  
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内

(72)発明者 秋山 英雄  
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究所先端融合研究所内

(72)発明者 坂井 義治  
京都府京都市左京区吉田近衛町36番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 嶋田 裕  
兵庫県西宮市武庫川町1番1号 学校法人兵庫医科大学内

(72)発明者 井上 立崇  
京都府京都市左京区吉田近衛町36番地1 国立大学法人京都大学内

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QQ52 QQ53 QR55 QR62 QS25  
QS34  
4H045 BA10 CA41 EA50

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于诊断或检测结肠癌的组合物和方法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2008267963A</a>  | 公开(公告)日 | 2008-11-06 |
| 申请号            | JP2007110549   | 申请日     | 2007-04-19 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东丽株式会社   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 东丽株式会社   |         |            |
| [标]发明人         | 田中祥徳<br>小林道元<br>鄭基晚<br>秋山英雄<br>坂井義治<br>嶋田裕<br>井上立崇   |         |            |
| 发明人            | 田中 祥徳<br>小林 道元<br>鄭 基晚<br>秋山 英雄<br>坂井 義治<br>嶋田 裕<br>井上 立崇  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/574 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/577 C07K14/47   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/574.A C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/577.B C07K14/47 C12Q1/68.AZN.A  |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063 /QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/EA50 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

## 摘要(译)

要解决的问题：提供用于诊断结肠癌的标记物和检测结肠癌的方法。 溶液：编码衍生自受试者的生物样品中的SEQ ID NO：1至12所示多肽，其突变体或其片段的核酸，或编码所述多肽的核酸，其突变体或其片段用于检测结肠癌的方法，包括测量一种或多种，以及用于诊断或检测结肠直肠癌的组合物。 【选择图】无

| 配列番号 | 遺伝子名   | タンパク質番号 | 特性  |
|------|--------|---------|---|
| 1    | DSP    | P15924  | Desmoplakin (DP) (250/210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) |
| 2    | ITIH3  | Q06033  | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3                    |
| 3    | CENTB1 | Q15027  | Centaurin-beta 1 (Cnt-b1)                                       |
| 4    | NPHP1  | O15259  | Nephrocytin-1 (Juvenile nephronophthisis 1 protein)             |
| 5    | DSC1   | Q08554  | Desmocollin-1 (Desmosomal glycoprotein 2/3)                     |
| 6    | ACVR1B | P36896  | Activin receptor type 1B  |
| 7    | SEMA4F | O95754  | Semaphorin-4F (Semaphorin W) (Sema W) (Semaphorin M)            |
| 8    | RAB23  | Q9ULC3  | Ras-related protein Rab-23                                      |
| 9    | DCD    | P81605  | Beta-2-glycoprotein 1   |
| 10   | HPX    | P02790  | Hemopexin   |
| 11   | PFN1   | P07737  | Profilin-1 (Profilin I)   |
| 12   | HRG    | P04196  | Histidine-rich glycoprotein                                     |