

(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2006-125899

(P2006-125899A)

(43) 公開日 平成18年5月18日(2006.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 P	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-311692 (P2004-311692)	(71) 出願人	802000031 財団法人北九州産業学術推進機構
(22) 出願日	平成16年10月27日 (2004.10.27)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	小山 倫浩 福岡県北九州市戸畑区一枝一丁目2-25-107
		(72) 発明者	安元 公正 福岡県北九州市八幡西区鉄王一丁目8-15-101
		(72) 発明者	杉尾 賢二 福岡県福岡市早良区百道浜一丁目5-1-304

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 悪性腫瘍の診断方法

(57) 【要約】

【課題】 従来の腫瘍マーカーよりも悪性腫瘍の存在診断に関して特異性及び感度に優れ、特に早期悪性腫瘍の診断に有用な新規腫瘍マーカーを利用した悪性腫瘍の診断方法を提供する。

【解決手段】 ヒトを含む哺乳類動物から分離した生体試料中のチトクロームP450を腫瘍マーカーとして例えば抗チトクロームP450抗体により測定する工程を含む肺腺癌などの悪性腫瘍の診断方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトを含む哺乳類動物から分離した生体試料中のチトクローム P450 を腫瘍マーカーとして測定する工程を含む悪性腫瘍の診断方法。

【請求項 2】

チトクローム P450 1A1、チトクローム P450 1B1、チトクローム P450 2A6、チトクローム P450 2E1、及びチトクローム P450 3A4 からなる群から選ばれる 1 種又は 2 種以上のチトクローム P450 を腫瘍マーカーとして測定する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

悪性腫瘍が肺悪性腫瘍である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

チトクローム P450 の測定をチトクローム P450 をコードする mRNA の発現の測定により行う請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

チトクローム P450 の測定を抗チトクローム P450 抗体を用いて免疫組織化学染色により行う請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

チトクローム P450 を悪性腫瘍診断のための腫瘍マーカーとして測定するために用いる試薬であって、ヒトを含む哺乳類動物から分離した生体試料中のチトクローム P450 を測定することができる物質を含む試薬。

20

【請求項 7】

上記物質が抗チトクローム P450 抗体である請求項 6 に記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規な腫瘍マーカーを利用した悪性腫瘍の診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

平成 13 年度には悪性腫瘍による我が国の死亡者数は 30 万人を超え、悪性腫瘍を正確に診断することは社会的な課題となっている。悪性腫瘍の診断には X 線 CT や NMR などの画像診断のほか、特定の悪性腫瘍において特異的に発現し、あるいは血液や組織中の濃度が高くなる物質を腫瘍マーカーとして検出する診断方法も汎用されている。腫瘍マーカーとしては、(1)上皮マーカー；(2)細胞接着因子；(3)浸潤・転移に関与するマーカー；(4)テロメラーゼ；(5)抗悪性腫瘍剤感受性マーカー；及び(6)癌関連遺伝子など多様な種類の腫瘍マーカーが知られており、上皮マーカーである CEA (carcinoembryonic antigen) などが臨床的に最も汎用されている。

30

【0003】

しかしながら、一般的に悪性腫瘍の診断率が 5 割を超える腫瘍マーカーは少なく、従来使用されている腫瘍マーカーでは陰性と判定された患者において実際には悪性腫瘍が発症していた例は多数認められる。また、悪性腫瘍の酵素発現の観点から開発された腫瘍マーカーは少なく、腫瘍マーカーの特異性にはさらに改良すべき点が残されている。さらに、従来用いられている腫瘍マーカーは、早期の悪性腫瘍に比べて、進行した悪性腫瘍において高頻度に陽性となり高値を示すという特徴がある。現在の悪性腫瘍の治療では、リンパ節転移のない患者に対しては積極的に縮小手術を選択するなど患者の QOL を考慮した治療方法の選択が試みられており、例えば、早期悪性腫瘍の手術療法の選択に際して、従来の定型的なリンパ節郭清を行うか、又はある程度限定したリンパ節切除でよいのかを画像的な情報とともに腫瘍マーカー値などの臨床的な情報を総合的に評価して判断しているのが現状である。このような観点から、従来腫瘍マーカーよりも悪性腫瘍の存在診断に関して特異度及び感度に優れた腫瘍マーカーが求められており、特に早期悪性腫瘍の診断に有

40

50

用な腫瘍マーカーが切望されている。

【0004】

一方、タバコ煙中などの外因性化学物質の解毒には解毒酵素であるチトクロームP450(本明細書において「CYP」と略す場合がある)が大きな役割を担っている。CYPは、肝臓のみならず気管支上皮など化学物質に暴露し易い部位に発現しており、肝臓で主として発現したCYPは抗腫瘍剤などを含む薬剤に対して主要な代謝酵素として作用し、薬物代謝の主な経路を担っている。例えば、乳癌で投与されるシプロキサンは肝臓のチトクロームP450 3A4 (CYP3A4)で代謝されて活性化することにより抗癌作用を発揮すると考えられているが、肺癌や乳癌に対して投与されるタキソール、タキソテル、ナベルピン、又はイレッサなどは肝臓のCYP3A4で代謝されて不活性化され、体外へ排泄されると考えられている。このように、CYP3A4により多くの抗癌剤は不活性化されるが、活性化する場合もある。また、チトクロームP450 1B1は代謝活性化作用により癌の悪性化に関与している。

10

【0005】

このCYPを悪性腫瘍に診断に利用する方法としては、慢性肝炎患者における肝臓の悪性腫瘍の検出にCYPを用いる方法が提案されている(特開2004-105013号公報)。この方法では、CYP2E1が肝臓で発現していることに着目し、肝悪性腫瘍細胞においてCYP2E1の発現が低下していることを利用して肝臓の悪性腫瘍を診断する。しかしながら、この方法は、悪性腫瘍自体がCYPの発現を亢進していることを診断原理としているものではなく、CYPを腫瘍マーカー(特定の悪性腫瘍において特異的に発現し、血液や組織中の濃度が高くなる物質)として利用するものではない。切除された悪性腫瘍細胞にCYPの発現を認めたとする報告はほとんどなく、従来、悪性腫瘍におけるCYP発現を腫瘍マーカーとして用いる報告はない。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は新規な腫瘍マーカーを利用した悪性腫瘍の診断方法を提供することを課題としている。より具体的には、従来の腫瘍マーカーよりも悪性腫瘍の存在診断に関して特異性及び感度に優れ、特に早期悪性腫瘍の診断に有用な腫瘍マーカーを利用した悪性腫瘍の診断方法を提供することが本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、悪性腫瘍においてCYPが発現しており、CYPを腫瘍マーカーとして利用することができること、及びリンパ節転移のない早期の悪性腫瘍ではCYP陽性率が高く、かつCYP陽性種類も多いことからCYPが早期悪性腫瘍の診断のための腫瘍マーカーとして利用できことを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0008】

すなわち、本発明により、ヒトを含む哺乳類動物から分離した生体試料中のチトクロームP450を腫瘍マーカーとして測定する工程を含む悪性腫瘍の診断方法が提供される。本発明の好ましい態様によれば、チトクロームP450 1A、チトクロームP450 1B、チトクロームP450 2A、チトクロームP450 2E、及びチトクロームP450 3Aからなる群から選ばれる1種又は2種以上のチトクロームP450を腫瘍マーカーとして測定する工程を含む上記の方法、チトクロームP450 1A1、チトクロームP450 1B1、チトクロームP450 2A6、チトクロームP450 2E1、及びチトクロームP450 3A4からなる群から選ばれる1種又は2種以上のチトクロームP450を腫瘍マーカーとして測定する工程を含む上記の方法；悪性腫瘍が肺悪性腫瘍である上記の方法；チトクロームP450の発現の測定を含む上記の方法；チトクロームP450の発現の測定をチトクロームP450をコードするmRNAの発現の測定により行う上記の方法；発現の測定を抗チトクロームP450抗体を用いて行う上記の方法；発現の測定を抗チトクロームP450抗体を用いた免疫組織化学染色により行う上記の方法が提供される。

40

【0009】

50

別の観点からは、本発明により、チトクロームP450を悪性腫瘍診断のための腫瘍マーカーとして検出するために用いる試薬であって、チトクロームP450の発現を測定することができる物質を含む試薬が提供される。この発明の好ましい態様によれば、抗チトクロームP450抗体を含む上記の試薬；及びチトクロームP450をコードするmRNAの発現を測定するためのプライマーセットを含む上記の試薬が提供される。これらの試薬は、チトクロームP450 1A、チトクロームP450 1B、チトクロームP450 2A、チトクロームP450 2E、及びチトクロームP450 3Aからなる群から選ばれる1種又は2種以上のチトクロームP450、好ましくはチトクロームP450 1A1、チトクロームP450 1B1、チトクロームP450 2A6、チトクロームP450 2E1、及びチトクロームP450 3A4からなる群から選ばれる1種又は2種以上のチトクロームP450をそれぞれ測定できるように、複数のプライマーセット又は抗体を含むことが好ましい。

10

さらに別の観点からは、本発明により、ヒトを含む哺乳類動物において悪性腫瘍を診断する方法であって、チトクロームP450を腫瘍マーカーとして測定する工程を含む方法が提供される。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、従来の診断方法よりも悪性腫瘍に対する特異性及び感度に優れ、特に早期の悪性腫瘍の診断に有用な診断方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の方法は、悪性腫瘍の診断方法であって、ヒトを含む哺乳類動物から分離した生体試料中のチトクロームP450を腫瘍マーカーとして測定する工程を含むことを特徴としている。

20

測定のための生体試料としては、例えば、患者から分離採取した生検組織、血液やリンパ液などの体液、手術により分離した器官や組織などを用いることができるが、これらに限定されることはない。

チトクロームP450としては、チトクロームP450に属する一群の酵素を全部測定対象としてもよいが、好ましくは、チトクロームP450 1A、チトクロームP450 1B、チトクロームP450 2A、チトクロームP450 2E、及びチトクロームP450 3Aからなる群から選ばれる1種又は2種以上のチトクロームP450、より好ましくはチトクロームP450 1A1、チトクロームP450 1B1、チトクロームP450 2A6、チトクロームP450 2E1、及びチトクロームP450 3A4からなる群から選ばれる1種又は2種以上のチトクロームP450をそれぞれ測定対象とすることができる。

30

【0012】

生体試料中のチトクロームP450の測定方法は特に限定されず、チトクロームP450の存在を証明でき、好ましくは発現量を測定可能なものであれば、いかなる測定方法を採用してもよい。遺伝子レベル又は蛋白質レベルのいずれでも測定を行うことができる。例えば、mRNAを定量するノーザンブロッティング法や、チトクロームP450に特異的な抗体（抗チトクローム抗体）、好ましくはモノクローナル抗体を用いる方法などを適宜採用できる。2種以上の測定方法を組み合わせて用いてもよい。

40

【0013】

例えば、ノーザンブロッティング法では、生体試料から全RNAを抽出した後、通常の方法に従ってアガロースゲル電気泳動を行ってmRNAを分離し、例えば、ニトロセルロースフィルターに転写した後に標識プローブを作用させ、チトクロームP450に対応するスポットを検出できる。このスポットの大きさや濃さでmRNAの定量を行うことができる。また、抗体を用いる方法では、免疫組織化学染色法により、生体試料中に発現しているチトクロームP450を方法を採用することもできる。さらにマイクロアレイ法による検出も可能である。チトクロームP450に特異的に反応するモノクローナル抗体は、例えばGentest社から入手可能である。これらの測定にあたり、対照となる正常細胞を用いることが好ましい。

【0014】

50

より具体的には、本発明の方法は、下記に示す工程に従って行うことができる。

(1)患者から分離採取した生検組織、患者の血液、手術により分離した器官や組織などの生体試料からmRNAを抽出する。この抽出操作は、例えば、SV total RNA Isolation System, Promega社製で行うことができる。

(2)Real-Time PCRによりチトクロームP450 1A1、チトクロームP450 1B1、チトクロームP450 2A6、チトクロームP450 2E1、及びチトクロームP450 3A4についてmRNA発現量を測定する。この測定は、例えば、ABI PRISM 7000, Applied Biosystem社製で行うことができる。

(3)上記工程(2)に加えて、あるいは上記工程(2)に替えて、生体試料をホルマリン固定した後、組織切片を作成し、免疫組織化学染色により細胞におけるチトクロームP450 1A1、チトクロームP450 1B1、チトクロームP450 2A6、チトクロームP450 2E1、及びチトクロームP450 3A4の発現量を測定する。これらの各チトクロームP450に特異的に反応する標識抗体は、例えば、Gentest社から入手できる(商品名:MAB-2A6及びMAB-2E1)。もっとも、本発明の方法は上記に説明した特定の態様に限定されることはない。

10

【0015】

本発明の診断方法により診断可能な悪性腫瘍の種類は特に限定されないが、肺の悪性腫瘍は好ましい診断対象である。実施例に詳細かつ具体的に説明するように、例えば、肺腺癌のCYP免疫組織化学染色の結果、肺腺癌にはCYP2A6、CYP2E1、CYP1A1、又はCYP3Aのうち少なくとも1種類が効率的に発現している。従って、本発明の方法により、例えば肺腺癌の診断を行なうことが可能である。また、進行した肺腺癌においてCYP2A6、CYP2E1、CYP1A1、又はCYP3Aのうち3種類以上発現しているが、早期肺腺癌(リンパ節転移のない早期癌)ではこれらのCYPの3種類以上の発現が進行癌よりもはるかに高率に認められる。早期の悪性腫瘍ではCYP陽性率が高く、かつCYP陽性種類も多いことから、本発明の方法により、悪性腫瘍の存在を証明できるばかりでなく、早期の悪性腫瘍であるか否かを判定する診断を行うことも可能である。

20

【実施例】

【0016】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例 1

30

まず、市販の抗チトクロームP450抗体を用いて肝臓の免疫組織化学染色を行ない、CYP(CYP1A1、CYP2A6、CYP2E1、又はCYP3A)の発現を検出できることを確認した。CYP3A抗体による肝臓の免疫組織化学染色の結果、CYP3Aは主として中心静脈周囲の肝細胞に高度に発現していることが確認できた(図1、上段の写真)。つぎに、肺腺癌の生体試料について同様に抗チトクロームP450抗体を用いて免疫組織化学染色を行なったところ、褐色に染色されたCYP3A染色陽性の肺腺癌を認めた(図1、最下段の写真)。図1の中段の写真は対照としてヘマトキシリン・エオシン(HE)染色を行なった結果を示す。HE染色で示した肺腺癌も褐色に染色され、CYP3A染色陽性と判断された。

【0017】

48例の切除されたヒト肺腺癌において抗チトクロームP450抗体(抗CYP1A1抗体、抗CYP2A6抗体、抗CYP2E1抗体、及び抗CYP3A抗体)による免疫組織化学染色を行い、腫瘍細胞の10%以上が発現陽性である症例を陽性例と判定した。その結果、68.7%の肺腺癌にCYP2A6、CYP2E1、CYP1A1、又はCYP3Aのうち少なくとも1種類が発現していた(表1)。早期(stage I期)及び進行した(stage II-IV期)肺腺癌に分けて検討すると、進行した肺腺癌の57.1%(16/28)においてCYP2A6、CYP2E1、CYP1A1、又はCYP3Aのうち少なくとも1種類が発現していたが、早期肺腺癌では85.0%(17/20)にこれらのCYPのうちの少なくとも1種類の発現が認められ、有意に高値を示した($p < 0.05$ 、表1)。さらに、進行した肺腺癌の14.3%(4/28)においてCYP2A6、CYP2E1、CYP1A1、又はCYP3Aのうち3種類以上が発現していたが、早期肺腺癌では75.0%(15/20)にこれらのCYPのうちの3種類以上の発現が認められ、有意に高値を示した($p < 0.01$ 、表1)。

40

50

【 0 0 1 8 】

【 表 1 】

	患者数	0種	1種	2種	3種	4種	p
n (%)	48 (100)	15 (31.3)	10 (20.8)	4 (8.3)	13 (27.1)	6 (12.5)	
Stage I	20 (100)	3 (15.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	10 (50.0)	5 (25.0)	
Stage II-IV	28 (100)	12 (42.9)	9 (32.1)	3 (10.7)	3 (10.7)	1 (3.6)	<0.01

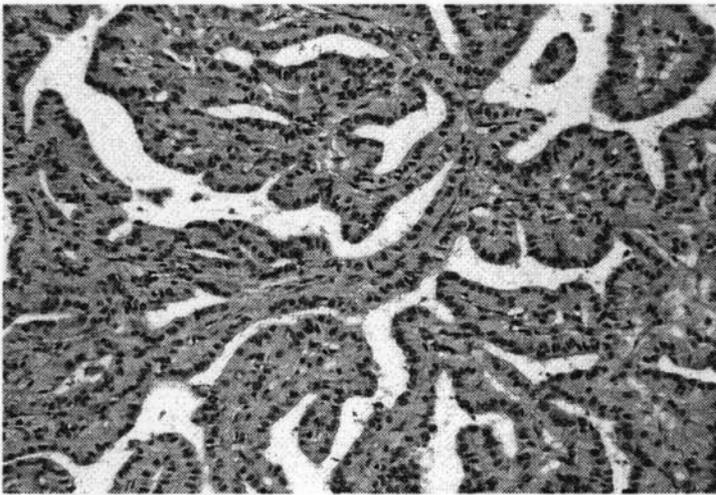
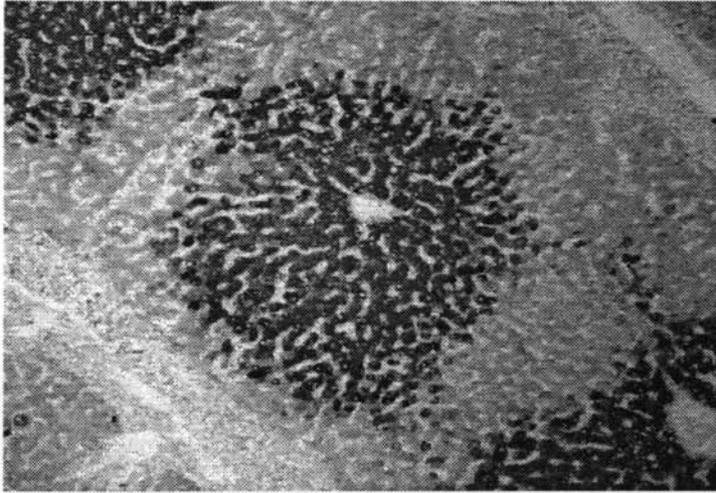
10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 9 】

【 図 1 】 抗チトクロームP450抗体(抗CYP3A抗体)による肝臓及び肺腺癌の免疫組織化学染色の結果を示した写真である。図中、上段の写真は肝臓の免疫組織化学染色、下段の写真は肺腺癌の免疫組織化学染色の結果を示し、中央の写真はヘマトキシリン・エオシン(HE)染色の結果を示す。

【 図 1 】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

F ターム (参考) 2G045 AA13 AA24 BA13 BA14 BB24 CA25 CB01 DA20 FA16 FA20
FB03 FB11 GB01
4B024 AA12 CA12 HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QQ58 QR08 QR32 QR56
QR62 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	诊断恶性肿瘤的方法		
公开(公告)号	JP2006125899A	公开(公告)日	2006-05-18
申请号	JP2004311692	申请日	2004-10-27
申请(专利权)人(译)	北九州产业学术振兴机构		
[标]发明人	小山 倫浩 安元 公正 杉尾 賢二		
发明人	小山 倫浩 安元 公正 杉尾 賢二		
IPC分类号	G01N33/573 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/573.A C12Q1/68.A G01N33/48.P G01N33/50.P G01N33/53.Y C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA24 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA20 2G045/FA16 2G045/FA20 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/GB01 4B024/AA12 4B024/CA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种诊断恶性肿瘤的方法，与常规肿瘤标志物相比，其在诊断恶性肿瘤的存在方面具有改善的特异性和敏感性，特别是利用用于诊断恶性肿瘤的肿瘤标志物。肿瘤很容易。解决方案：用于诊断恶性肿瘤（例如肺腺癌）的方法包括测量从哺乳动物（包括作为肿瘤标志物的人）分离的生物样品中的细胞色素P450的方法，例如通过抗细胞色素P450抗体。Z

	患者数	0種	1種	2種	3種	4種	p
n (%)	48 (100)	15 (31.3)	10 (20.8)	4 (8.3)	13 (27.1)	6 (12.5)	
Stage I	20 (100)	3 (15.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	10 (50.0)	5 (25.0)	
Stage II-IV	28 (100)	12 (42.9)	9 (32.1)	3 (10.7)	3 (10.7)	1 (3.6)	<0.01