

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/032759

発行日 平成22年1月28日 (2010.1.28)

(43) 国際公開日 平成20年3月20日 (2008.3.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 9 頁)

出願番号 特願2008-534372 (P2008-534372)	(71) 出願人 304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/067786	
(22) 国際出願日 平成19年9月13日 (2007. 9. 13)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-247814 (P2006-247814)	(72) 発明者 島田 英昭 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
(32) 優先日 平成18年9月13日 (2006. 9. 13)	(72) 発明者 朝長 毅 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 西森 孝典 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
	(72) 発明者 松下 一之 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌の検出マーカー及びそれを用いた検出キット並びに肺癌の判定方法

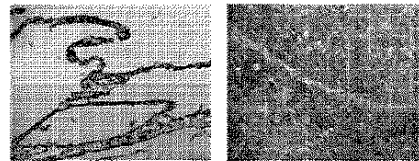
(57) 【要約】

肺癌の検出を行うための検出マーカー及び診断キット並びに肺癌の判定方法を提供する。

periplakinからなる肺癌の検出マーカーによるものとする。

【選択図】 図 1

AA 肺組織のperiplakin免疫染色



BB 非癌部肺組織 CC 扁平上皮癌

AA IMMUNOSTAINING OF LUNG TISSUE WITH PERIPLAKIN
BB NON-CANCEROUS LUNG TISSUE
CC SQUAMOUS CELL CARCINOMA

【特許請求の範囲】

【請求項1】

periplakinからなる肺癌の検出マーカー。

【請求項2】

抗periplakin抗体を含有する肺癌の検出マーカー。

【請求項3】

抗periplakin抗体を含有する肺癌の検出キット。

【請求項4】

細胞を採取し、採取した前記細胞におけるperiplakinの発現量を求める肺癌の判定方法。 10

【請求項5】

非癌部組織における細胞と判定対象の組織における細胞を採取し、前記非癌部組織における細胞と前記判定対象の組織における細胞におけるperiplakinの発現量をそれぞれ求め、それらの比又は差を求める肺癌の判定方法。

【請求項6】

前記periplakinの発現量をウエスタンブロット又は免疫組織化学染色法の少なくともいずれかで求める請求項4又は5記載の肺癌の判定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】 20

【0001】

本発明は、肺癌の検出マーカー及びそれを用いた検出キット並びに肺癌の判定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌に対する対策としては癌腫の早期発見が最も重要な課題である。食道、肺、子宮頸癌、泌尿器（腎臓、尿管、膀胱）などに発生した癌は自覚症状が少なく、発見時には病状が進行している危険性が高いためより早期発見がより重要である。

【0003】

ところで、癌の簡便かつ確実な判断を可能とする方法として、癌組織特異的タンパク質マーカーを用いた分子生物学的診断方法が提案されている。この方法は大がかりな設備を必要とせず、被験体への負担も少ないため、自覚症状のない多くの被験体に対しても広範囲に実施することが可能である。例えば、下記特許文献1には、糖タンパク質39の腫瘍マーカーとしての利用が開示されている。また、下記特許文献2には、新規抗原ペプチドを用いた癌診断のためのマーカーが開示されている。 30

【0004】

【特許文献1】特開平7-51065号公報

【特許文献2】国際公開第2004/018679号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】 40

【0005】

しかしながら、上記特許文献1に記載の技術は胃癌に関する技術であって、肺癌についてまで適用できるものではない。また特許文献2に記載の技術も大腸癌に関する技術であって、肺癌についてまで適用できるものではなく、また検討されていない。

【0006】

以上、本発明は、肺癌の検出を行うための検出マーカー及び診断キット並びに肺癌の判定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】

【0007】

本発明者らは、上記課題について鋭意検討を行っていたところ、細胞間接着で重要な役 50

割を果たすタンパク質 *periplakin* の発現が肺癌の組織において低下していることに基づきなされた。

【0008】

即ち、本発明の一手段に係る肺癌の検出マーカーは、*periplakin* からなる。

【0009】

また、本発明の他の一手段に係る肺癌の検出マーカーは、抗 *periplakin* 抗体を含有する。

【0010】

また、本発明の他の一手段に係る肺癌の検出キットは、抗 *periplakin* 抗体を含有する。

10

【0011】

また、本発明の他の一手段に係る肺癌の判定方法は、細胞を採取し、採取した細胞における *periplakin* の発現量を求める。なおこの手段において、限定されるわけではないが、*periplakin* の発現量を求める方法としてウエスタンブロット又は免疫組織化学染色法の少なくともいずれかを用いることが好ましい。

【0012】

また本発明の他の一手段に係る肺癌の判定方法は、非癌部組織における細胞と判定対象の組織における細胞を採取し、非癌部組織における細胞と前記判定対象の組織における細胞における *periplakin* の発現量をそれぞれ求め、それらの比又は差を算出する。なおこの手段において、限定されるわけではないが、*periplakin* の発現量を求める方法としてウエスタンブロット又は免疫組織化学染色法の少なくともいずれかを用いることが好ましい。

20

【発明の効果】

【0013】

以上、本発明は、肺癌の検出を行うための検出マーカー及び診断キット並びに肺癌の判定方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明の実施形態について詳細に説明するが、本発明は多くの異なる態様による実施が可能であり、以下に示す実施形態に狭く限定されるものではない。

30

【0015】

(*periplakin* からなる検出マーカー)

本発明の一態様は、*periplakin* からなる肺癌の検出マーカーである。後述する実験例において明らかなように、肺癌細胞においてはタンパク質 *periplakin* の発現が有意に低下しているため、タンパク質 *periplakin* を検出マーカーとすることで、肺癌細胞であるか否かを判定できる。

【0016】

患者から採取する細胞としては、限定されるわけではないが、血液、尿、喀痰、擦過細胞診などから採取する細胞を用いることができる。また、発現量を解析する方法としては、限定されるわけではないが、プロテオーム解析、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色法等を用いることができる。

40

【0017】

また、判定をより確実なものとするため、非癌部組織における細胞と肺癌細胞ではないかと疑われる細胞の双方を採取し、それぞれの細胞における *periplakin* の発現量をそれぞれ求め、それらの比又は差を算出することも好ましい態様である。

【0018】

(抗 *periplakin* 抗体を含む検出マーカー及びこれを用いた検出キット)

また、*periplakin* に特異的に反応する抗 *periplakin* 抗体を用いてこれを検出マーカーとして用いる態様も考えられる。抗体としてはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれであってもよく、この作製は周知の方法を採用することがで

50

き特には限定されない。

【0019】

またこの抗periplakin抗体を担体に保持させて検出キットとすることもできる。担体は、抗periplakin抗体を保持できる限り限定されるわけではないが、例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド等の有機高分子化合物、アガロースゲル、セルロース等の多糖類、ガラス、シリカゲル等の無機物が好ましい。

【0020】

また、担体の形状としても上記機能を奏する限りにおいて限定されず、使用状態に応じて適宜選択可能であるが、例えば板状、粒子状、繊維状、フィルム状、カプセル状等が好ましい。 10

【0021】

(実験例)

上記実施形態の効果について確認するため以下の実験を行った。以下図面を用いて説明する。

【0022】

(組織試料の調整)

組織試料は、組織試料採取前にいかなる抗癌補助療法も受けていない5症例の肺癌患者それぞれから癌部組織及び非癌部組織を採取することによって得た。ここで「癌部組織」とは、肺癌病変部であって肉眼的に変性の無い部位における組織であり、「非癌部組織」 20
とはこの肺癌病変部から3cm以上離れた組織をいう。なお組織試料は、採取後1時間以内に20%ホルマリン液にて固定し、パラフィンに包埋し常温にて保存した。

【0023】

(免疫組織化学染色)

当施設での肺癌手術症例5例の手術切除組織標本より4 μ m厚の薄切切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。DAKO抗原賦活用クエン酸緩衝液(S2031)(DAKO Japan, 京都)を用いて95℃にて40分間抗原賦活処理を行った後、0.3% H₂O₂/メタノール溶液15分室温にて処理、PBSにて3回洗浄の後1%ブタ血清/PBS 1時間でブロッキング、50倍希釈(1% BSA/PBS)抗periplakin抗体(Santa Cruz)30分間(室温)にて一次抗体反応を行いPBS 30
にて洗浄後DAKO LSAB+キット(DAKO Japan, 京都)にてマニュアルに従いDAB発色にて検出した。30秒間ヘマトキシリンで核染色を行った後100%エタノールおよびキシレンで脱水透徹、マリノールとカバーガラスで封入し、観察した。

【0024】

periplakinはplakin族に属するタンパク質であり、重層扁平上皮で表層に分化した角化細胞の細胞膜表面に発現する蛋白として見つかった。なお、増殖型類天疱瘡ではperiplakinに対する自己抗体の産生が分かっており、抗原であるperiplakinとの抗原抗体反応が発症に関わっていることが分かりつつある。

【0025】

発現量の変化だけでなく細胞内の局在の変化も観察した。手術標本切片より抗periplakin抗体を用いた免疫組織化学染色を示す(図1参照)。非癌部粘膜においてはperiplakinは主に非癌細胞の細胞膜に発現しているが、対照的に癌部ではperiplakinは発現していなかった。特に表層型の早期癌の症例ではその発現により癌部と非癌部の境界が明瞭に認識できた。2例の癌部においてはperiplakinが若干発現しているのが確認されたが、これらの症例ではperiplakinの発現は細胞質内であり、局在が変化していた。 40

【0026】

(考察)

以上の結果により、デスモソーム関連の195kDaのタンパク質であるperiplakinが肺癌において発現の低下を示すことが示された。以上、上記実施形態について効 50

果の確認することができ、肺癌を検出するマーカー及びそれを用いた診断キット等を提供することができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

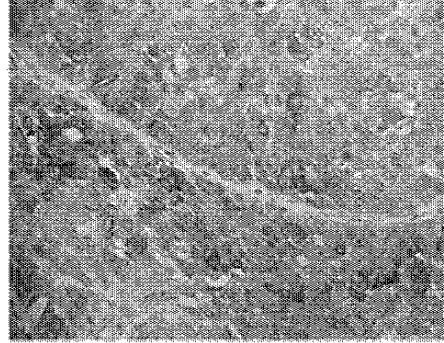
【図1】肺癌組織における抗Periplakin抗体を用いた免疫組織化学染色によるPeriplakinの発現解析の画像を示す図である。

【図1】

肺組織のperiplakin免疫染色



非癌部肺組織



扁平上皮癌

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/574, G01N33/48, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takanori Nishimori, et.al, "Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin", Proteomics, Vol.6, pp.1011-1018, (2006)	1-6
A	Fumio NOMURA, "Rinsho Kensa to Proteomics", The Japanese Journal of Clinical Pathology, Vol.54, No.4, pages 413 to 420, (2006)	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 October, 2007 (25.10.07)		Date of mailing of the international search report 06 November, 2007 (06.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 7 7 8 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574, G01N33/48, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus(STN), PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	Takanori Nishimori, et. al, "Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin", Proteomics, Vol.6, pp.1011-1018, (2006)	1-6									
A	野村 文夫, "臨床検査とプロテオミクス", 臨床病理, 第54巻, 第4号, pp.413-420, (2006)	1-6									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 25.10.2007		国際調査報告の発送日 06.11.2007									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典	2 J 9507								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 落合 武徳

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(72)発明者 野村 文夫

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】 第6部門第1区分
 【発行日】 平成22年10月28日(2010.10.28)

【国際公開番号】 WO2008/032759
 【年通号数】 公開・登録公報2010-004
 【出願番号】 特願2008-534372(P2008-534372)
 【国際特許分類】

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/574 A

G 0 1 N 33/53 N

【手続補正書】

【提出日】 平成22年9月10日(2010.9.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質periplakinからなる肺癌の検出マーカー。

【請求項2】

抗periplakin抗体を含有する肺癌の検出キット。

【請求項3】

細胞を採取し、該細胞におけるタンパク質periplakinの発現量を求めることを特徴とする肺癌の判定方法。

【請求項4】

肺において、非癌部組織における細胞と判定対象の組織における細胞を採取し、非癌部組織における細胞と判定対象の組織における細胞のタンパク質periplakinの発現量を求め、判定対象の組織における細胞の発現量が非癌部組織における細胞の発現量に比べ有意に低下している場合、判定対象の組織の細胞が肺癌であると判定する方法。

【請求項5】

タンパク質periplakinの肺癌の検出マーカーとしての使用。

【請求項6】

抗periplakin抗体を用いて、細胞内のタンパク質periplakin発現量を求め、非癌部組織の細胞との発現を比較し、該組織の細胞より有意に低下している場合、該組織を肺癌と判定する方法における、タンパク質periplakinの肺癌の検出マーカーとしての使用。

【請求項7】

肺において、非癌部組織における細胞と判定対象の組織における細胞を採取し、非癌部組織における細胞と判定対象の組織における細胞のタンパク質periplakinの発現量を抗periplakin抗体を用いて求め、判定対象の組織における細胞の発現量が非癌部組織における細胞の発現量に比べ有意に低下している場合、判定対象の組織の細胞が肺癌であると判定する方法におけるタンパク質periplakinの肺癌の検出マーカーとしての使用。

专利名称(译)	肺癌的检测标记物，使用其的检测试剂盒和肺癌的测定方法		
公开(公告)号	JPWO2008032759A1	公开(公告)日	2010-01-28
申请号	JP2008534372	申请日	2007-09-13
申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶		
[标]发明人	島田英昭 朝長毅 西森孝典 松下一之 落合武徳 野村文夫		
发明人	島田 英昭 朝長 毅 西森 孝典 松下 一之 落合 武徳 野村 文夫		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57423		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.N		
优先权	2006247814 2006-09-13 JP		
其他公开文献	JPWO2008032759A5 JP5273659B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开：用于检测肺癌的检测标记；诊断套件；和确定肺癌的方法。肺癌的检测标志物包括周质。

肺癌的检测标记物、使用其的检测试剂盒和肺癌的测定方法

