

(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2017-108686

(P2017-108686A)

(43) 公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B O 2 4
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z 4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2015-246132 (P2015-246132)	(71) 出願人	504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
(22) 出願日	平成27年12月17日 (2015.12.17)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	佐邊 壽孝 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内
		(72) 発明者	平野 聡 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内
		(72) 発明者	古川 聖太郎 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内
		Fターム(参考)	2G045 AA26 CB01 DA36 FB03 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに予測方法

(57) 【要約】

【課題】膵癌の再発に特異的な因子であって、膵癌の再発リスクの予測結果を治療に結びつけることが可能な因子を用いた、膵癌の再発予測手段としての有用性が高い、膵癌の再発リスクの予測診断薬及びキット、並びに予測方法を提供する。

【解決手段】膵癌再発リスク予測用診断薬: A M A P 1 及び E P B 4 1 L 5 からなる群から選択されるいずれか1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び/又はポリペプチドを含有する。この診断薬を含む膵癌再発リスク予測用キット。膵癌の再発リスク予測方法: (A) 膵癌の治療を受けた患者から採取した生体試料において、 A M A P 1 及び E P B 4 1 L 5 から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定すること; 並びに (B) 工程 (A) において決定した翻訳産物発現レベルに基づいて、上記患者の膵癌の再発リスクを予測することを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬であって、
A M A P 1 及び E P B 4 1 L 5 からなる群から選択されるいずれか1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び / 又はポリペプチドを含有する、診断薬。

【請求項 2】

上記タンパク質及び / 又はポリペプチドが、抗体及び / 又はその断片である、請求項 1 に記載の診断薬。

【請求項 3】

膵癌の再発リスクの予測に用いるためのキットであって、請求項 1 又は 2 に記載の診断薬を含む、キット。

10

【請求項 4】

(A) 膵癌の治療を受けた患者から採取した生体試料において、A M A P 1 及び E P B 4 1 L 5 から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定すること ; 並びに

(B) 工程 (A) において決定した翻訳産物発現レベルに基づいて、上記患者の膵癌の再発リスクを予測すること、

を含む、膵癌の再発リスクを予測する方法。

【請求項 5】

工程 (A) において、A M A P 1 及び E P B 4 1 L 5 から成る群から選択される全ての遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定すること請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

上記生体試料が膵組織である、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (A) において、上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルが、それら遺伝子の翻訳産物をそれぞれ特異的に認識可能なタンパク質及び / 又はポリペプチドを用いた免疫組織化学法により決定される、請求項 4 から 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

上記タンパク質及び / 又はポリペプチドが抗体及び / 又はその断片である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

工程 (A) において、上記患者の非癌性膵組織における上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物それぞれの発現レベルを対照として上記生体試料における上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定し、かつ工程 (B) において、以下の判断基準により上記患者の膵癌の再発リスクを予測する、請求項 4 から 8 の何れか 1 項に記載の方法 :

(i) 工程 (A) において決定した上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルが、対応する対照の発現レベルよりも高い場合には、上記患者は膵癌の再発リスクが高いと予測する ; 又は

(ii) 工程 (A) において決定した上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルが、対応する対照の発現レベルよりも低いか、若しくは同等である場合には、上記患者は膵癌の再発リスクが低いと予測する。

40

【請求項 10】

工程 (A) において、上記患者の非癌性膵組織における上記全ての遺伝子の翻訳産物それぞれの発現レベルを対照として上記生体試料における上記全ての遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定し、かつ工程 (B) において、以下の判断基準により上記患者の膵癌の再発リスクを予測する、請求項 4 から 8 の何れか 1 項に記載の方法 :

(i) 工程 (A) において決定した上記全ての遺伝子の翻訳産物発現レベルが、対応する対照の発現レベルよりも高い場合には、上記患者は膵癌の再発リスクが高いと予測する ; 又は

(ii) 工程 (A) において決定した上記全ての遺伝子の翻訳産物発現レベルが、対応する

50

対照の発現レベルよりも低いか、若しくは同等である場合には、上記患者は膵癌の再発リスクが低いと予測する。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに膵癌の再発リスクを予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

膵癌の唯一の根治的治療は外科的根治切除である。しかし、症状に乏しいため、約80%の症例は初診断時すでに切除不能である（非特許文献1、2）。したがって、予後延長のためには化学療法が重要となるが、膵癌は概して化学療法抵抗性を有する（非特許文献3）。初回治療後の再発は、化学療法抵抗性株が選択的に増殖して形成されると考えられ、治療前に比べてさらに化学療法抵抗性が増強していると予想される。近年、新規化学療法レジメンの開発やEGFRチロシンキナーゼ阻害薬であるエルロチニブによる分子標的治療が導入され、ある程度の成果が得られているものの（非特許文献4、5）、最終的にはこれらに対する抵抗性株が出現し、病勢コントロール不能となる。また、根治切除できたとしても高率で再発することが知られている。悪性腫瘍は自らの生存に適した新たな遺伝子変異を次々に獲得していく（非特許文献6）と言われているため、予後延長のためにはより早期に根治切除することは元より、より早期に再発・転移を診断し、治療を開始することが重要である。

10

20

【0003】

膵癌の再発予測因子としては、術前血清CA19-9値（非特許文献7）、術前CRP値（非特許文献8）、術前血小板数（非特許文献8）などが一般的に言われている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Donghui L, Keping X, Robert W, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363: 1049-1057.

【非特許文献2】Butturini G, Stocken DD, Wente MN, et al. Influence of resection margins and treatment on survival in patients with pancreatic cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg* 2008; 143: 75-83.

30

【非特許文献3】Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5820-5828.

【非特許文献4】Conroy T, Desseigne F, Ychou M et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; 364: 1817-1825.

【非特許文献5】Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 1960-1966.

40

【非特許文献6】Yachida S and Donahue-Iacobuzio CA. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene* 2013; 32: 5253-5260.

【非特許文献7】Humphris JL, Chang DK, Johns AL, et al. The prognostic and predictive value of serum CA19.9 in pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2012; 23(7): 1713-1722.

【非特許文献8】Miura T, Hirano S, Nakamura T, et al. A new preoperative prognostic scoring system to predict prognosis in patients with locally advanced pancreatic body cancer who undergo distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection: a retrospective cohort study. *Surgery*. 2014; 155(3): 457-467.

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

膵癌の再発予測因子として挙げられている術前血清CA19-9値、術前CRP値、術前血小板数は、報告により様々である。また、術前血清CA19-9値、術前CRP値、術前血小板数はいずれも膵癌特異的とは言えず、その有効性に関しては一定の見解が得られていない。

【0006】

そのため、臨床的に利用可能な再発予測因子の解明が求められている。

【0007】

そこで、本発明の目的は、膵癌の再発に特異的な因子を用いた、膵癌の再発予測手段としての有用性が高い、膵癌の再発リスクの予測診断薬及びキット、並びに予測方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、膵癌の再発リスクの予測結果を治療に結びつけることが可能な因子を用いた予測診断薬及びキット、並びに予測方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】**【0008】**

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、局所進行膵癌切除組織におけるA M A P 1 蛋白およびE P B 4 1 L 5 蛋白の高発現が有意な早期再発と生存期間短縮に寄与していることを見出した。

本発明は、この知見により完成されたものである。

20

【0009】

即ち、本発明は以下の(1)~(3)に関する。

(1)膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬であって、A M A P 1 及びE P B 4 1 L 5 からなる群から選択されるいずれか1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び/又はポリペプチドを含有する、診断薬。

(2)膵癌の再発リスクの予測に用いるためのキットであって、上記本発明の診断薬を含む、キット。

(3)(A)膵癌の治療を受けた患者から採取した生体試料において、A M A P 1 及びE P B 4 1 L 5 から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定すること；並びに

30

(B)工程(A)において決定した翻訳産物発現レベルに基づいて、上記患者の膵癌の再発リスクを予測すること、を含む、膵癌の再発リスクを予測する方法。

【発明の効果】**【0010】**

本発明によれば、膵癌の再発に特異的な因子を用いた、膵癌の再発予測手段としての有用性が高い、膵癌の再発リスクの予測診断薬及びキット、並びに予測方法を提供することができる。本発明で用いる因子であるバイオマーカーは、癌の浸潤転移や治療抵抗性に関与するシグナル経路を形成する一群の蛋白質からなるものである。このシグナル経路を阻害すると、癌の浸潤転移などを著しく減じる事も本発明者は見いだしている。従って、本発明の予測診断薬及びキット、並びに予測方法を用いて、膵癌の再発が予測される患者について治療方針を提供することも可能である。

40

【図面の簡単な説明】**【0011】**

【図1】実施例において取得した免疫組織化学染色(例として抗E P B 4 1 L 5 抗体を使用)の顕微鏡写真を示す。

【図2】各遺伝子の翻訳産物発現と生存期間との相関関係を調べた結果を示す。

【図3】EPB41L5のcds領域塩基配列(NCBI Reference Sequence: NM_020909.3)を示す。

【図4】EPB41L5のアミノ酸配列(NCBI Reference Sequence: NP_065960.2)を示す。

【図5】EPB41L5とEPB41L4bの一次構造比較を示す。

【図6】EPB41L4b isoform1とisoform2のゲノムの比較を示す。

50

【図 7】EPB41L4b isoform1とisoform2のアミノ酸の比較を示す。

【図 8】EPB41L5(NP_065960.2)とEPB41L4b(NP_061987.3061987.3)についてアラインメント解析を示す。

【図 9】AMAP1のcds領域塩基配列 (NCBI Reference Sequence: NM_018482.3) を示す。

【図 10】AMAP1のアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NP_060952.2) を示す。

【図 11】AMAP1と相同性がある遺伝子 (ArfGAP family) の情報を示す。

【図 12】AMAP1と相同性があるAMAP2遺伝子のcds領域塩基配列 (NCBI Reference Sequence: NM_003887.2) を示す。

【図 13】AMAP1と相同性があるAMAP2のアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NP_003878.1) を示す。

10

【図 14】AMAP1と相同性があるAMAP2のアラインメント解析のデータを示す。

【図 15】EPB41L5に対するポククローナル抗体の抗原部位 (アミノ酸541番目から733番目までを含むペプチド(193アミノ酸)) を図示する。

【図 16】抗原をウサギに免疫し、抗血清を採取、抗体の精製を行う一連の操作のスキームを示す。

【図 17】EPB41L5抗体のアフィニティー精製の結果を示す。

【図 18】EPB41L5抗体のアフィニティー精製の結果を示す。

【図 19】AMAP1に対する抗体の抗原部位の情報、抗原部位のクローニング手順、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて示す。

【図 20】GEP100に対する抗体の抗原部位の情報、抗原部位のクローニング手順、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0012】

診断薬

本発明の一の態様によれば、膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬であって、AMAP1及びEPB41L5からなる群から選択されるいずれか1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び/又はポリペプチドを含有する、診断薬が提供される。

【0013】

本発明において、「膵癌」とは、膵臓原発の悪性新生物の最も多くを占める膵管腺癌を指す。

30

【0014】

本発明において、「再発リスク」とは、膵癌の治療を受けた患者が、当該治療の完了後に癌を再発するリスクを意味する。再発する癌は、局所再発膵癌及び転移性再発膵癌のいずれか一方または両方を包含する。再発リスクは、膵癌の治療を受けた後、例えば、5年以内の早期再発リスクを主に意味する。但し、再発リスクは、膵癌の治療を受けた後5年を超え、10年以内の中期再発リスク、あるいは10年を超える後期再発リスクを含み得る。さらに、膵癌の治療法は、特に限定されるものではない。例えば、抗癌剤投与を含む化学療法、近年転移性膵癌に導入されている分子標的薬の投与、或いは病巣部を含めて膵頭部側を切除する膵頭十二指腸切除術や膵体尾部側を切除する尾側膵切除術等が挙げられる。

40

【0015】

「再発リスクの予測」の方法については、「予測方法」において後述する。

本発明の診断薬は、膵癌の再発リスクの予測に用いることができる。このことは、膵癌の治療を受け、かつその後膵癌が再発した患者群における以下の結果から理解できる。膵組織で特定遺伝子の翻訳産物の高発現が見られる患者は、膵組織で当該特定遺伝子の翻訳産物の高発現が見られない患者と比較して、統計的に膵癌の治療後、比較的早期 (例えば、5年以内) に膵癌を再発する事が統計的有意差を持って示される。この点は、後述する実施例で具体的に示される。特定遺伝子とは、具体的には、AMAP1及びEPB41L5から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子である。これら遺伝子の何れか1つ

50

の翻訳産物の高発現が見られる患者は統計的有意差を持って再発するリスクが高い。さらに、上記遺伝子の何れか2つの翻訳産物の高発現が見られる患者は、統計的有意差を持って再発するリスクがさらに高くなる。即ち、膵癌組織において上記遺伝子の翻訳産物の高発現が認められる場合、当該患者は膵癌の治療後に早期に癌を再発するリスクが高いと予測される。詳細は、後述する、膵癌の再発リスクを予測する方法において説明する。このように、本発明において「膵癌の再発リスクの予測」とは、膵組織における上記特定遺伝子の翻訳産物の高発現を検出することを前提としている。そのため、当該予測に用いるための本発明の診断薬は、具体的にはそれら遺伝子翻訳産物の検出に用いるための試薬であって、AMAP1及びEPB41L5からなる群から選択されるいずれか1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び/又はポリペプチドを含有するものである。

10

【0016】

< 遺伝子 EPB41L5 >

遺伝子 EPB41L5 (略称 EBL5) (Gene ID: 57669) は、癌浸潤における AMAP1 の結合パートナーであり、浸潤仮足形成に必須である。

・ Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5 (EPB41L5), transcript variant 1, mRNA	
タンパク質名	(band 4.1-like protein 5 isoform 1)
ヌクレオチド・アクセション番号	NCBI Reference Sequence: NM_020909.3 (配列番号1) (図3)
プロテイン・アクセション番号	NCBI Reference Sequence: NP_065960.2 (配列番号2) (図4)

20

【0017】

2 EPB41L5ファミリーの中でもEPB41L5に最も相同性があるのはEPB41L4bである。EPB41L4bには、band 4.1-like protein 4B isoform 1 [Homo sapiens](NP_060894.2) (配列番号3) と band 4.1-like protein 4B isoform 2 [Homo sapiens](NP_061987.3) (配列番号4) がある。isoform1は、short formである。図5にEPB41L5とEPB41L4bの一次構造比較を示す。図6にEPB41L4b isoform1とisoform2のゲノムの比較を示す。図7にEPB41L4b isoform1のアミノ酸配列とisoform2のアミノ酸配列の比較を示す。図8にEPB41L5(NP_065960.2) (配列番号2) とEPB41L4b(NP_061987.3) (配列番号4) についてアラインメント解析を示す。

30

【0018】

図8に示すように、EPB41L5(NP_065960.2) (配列番号2) とEPB41L4b(NP_061987.3) (配列番号4) についてアラインメント解析の結果、C末端側(EPB41L5 基準で541番目以降の配列)において両者配列は大きく異なっており、EPB41L5のC末端配列は当該タンパク質に対する特異的な抗体を作製する上で有効な抗原になる。本発明においては、EPB41L5タンパク質に対する特異的な抗体またはその断片は、EPB41L5 (配列番号2) の541番目から733番目付近のアミノ酸配列領域にエピトープとなるアミノ酸配列を有する抗体またはその断片であることが適当である。

40

【0019】

< 遺伝子 AMAP1 >

遺伝子 AMAP1 (Gene ID: 50807) は、癌浸潤における Arf6 の下流エフェクターである。図9にAMAP1のcds領域塩基配列 (NCBI Reference Sequence: NM_018482.3) (配列番号5) を示す。図10にAMAP1のアミノ酸配列 (NCBI Reference Sequence: NP_060952.2) (配列番号6) を示す。図11にAMAP1と相同性がある遺伝子 (ArfGAP family) の情報を示す。図12にAMAP1と相同性があるAMAP2遺伝子のcds領域塩基配列 (NCBI R

50

reference Sequence: NM_003887.2) (配列番号7)を示す。図13にAMAP1と相同性があるAMAP2のアミノ酸配列(NCBI Reference Sequence: NP_003878.1) (配列番号8)を示す。図14にAMAP1と相同性があるAMAP2のアライメント解析のデータを示す。

【0020】

図14に示すように、AMAP1(NCBI Reference Sequence: NP_060952.2) (配列番号6)とAMAP2(NCBI Reference Sequence: NP_003878.1) (配列番号8)についてのアラインメント解析の結果、両者配列に大きく異なる領域がある。AMAP1のこの領域は、当該タンパク質に対する特異的な抗体を作製する上で有効な抗原になる。本発明においては、AMAP1タンパク質に対する特異的な抗体またはその断片は、AMAP1(配列番号6)の935番目から1002番目付近のアミノ酸配列領域にエピトープとなるアミノ酸配列を有する抗体またはその断片であることが適当である。

10

【0021】

上記遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び/又はポリペプチドとは、上記遺伝子のうちの遺伝子の翻訳産物に特異的に結合し得るものであれば特に限定されるものではない。例えば、当該翻訳産物に対する抗体及び/又はその断片が挙げられる。抗体及び/又はその断片としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。上記遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及びポリペプチドの調製方法については、遺伝子翻訳産物に対する特異的結合を保持し得る限り、どのような方法も採用し得る。例えば、当該遺伝子翻訳産物となるタンパク質及び/又はその断片を抗原として、公知の手法により所望のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等を調製することが出来る。

20

【0022】

尚、上記遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及びポリペプチドが有する遺伝子翻訳産物に対する特異的結合性は、当該遺伝子の翻訳産物を、当該遺伝子の翻訳産物と共存可能性がある他の遺伝子の翻訳産物と識別できる程度であれば良い。従って、例えば、上記遺伝子に一部改変(置換、欠失、付加等)が加わっている遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及びポリペプチドであっても、上記遺伝子の翻訳産物を、当該遺伝子の翻訳産物と共存可能性がある他の遺伝子の翻訳産物と識別できる程度の遺伝子翻訳産物に対する特異的結合性を有するものであれば、本発明の「遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質及び/又はポリペプチド」に含めることができる。

30

【0023】

さらに、本発明の診断薬においては、単一の診断薬に、上記遺伝子のうち1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質又はポリペプチド1種のみが含まれていてもよいし、或いは上記遺伝子の翻訳産物それぞれをそれぞれ特異的に認識可能な2種以上のタンパク質及び/又はポリペプチドが含まれていてもよい。加えて、上記タンパク質及び/又はポリペプチドは、遺伝子翻訳産物の検出のために、標識物質で標識されていてもよい。標識物質としては、蛍光物質(例えば、GFP等の蛍光タンパク質、並びにフルオロセイン等の蛍光低分子化合物を含む)等が挙げられる。但し、これら標識物質による標識を有する物に限定される意図ではない。本発明の診断薬において上記タンパク質及び/又はポリペプチドが標識されていない場合には、当該遺伝子の翻訳産物を公知の方法により検出することができる。そのような検出には、例えば、それらタンパク質及び/又はポリペプチド(一次抗体)に結合する二次抗体を用いたシステムを用いることができる。二次抗体を用いたシステムには市販の検出キットがある。このシステムでは、例えば、一次抗体に対する二次抗体がペルオキシダーゼで標識されており、試料中で目的遺伝子翻訳産物に特異的に結合した一次抗体にさらに上記二次抗体を特異的に結合させ、ペルオキシダーゼの発色基質(例えば、3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド)を当該試料に添加して発色を観察することにより遺伝子翻訳産物の検出することが出来る。さらに、本発明において、1つの診断薬に、上記遺伝子の翻訳産物それぞれをそれぞれ特異的に認識可能な2以上のタンパク質及び/又はポリペプチドが含まれていている場合には、例え

40

50

ば、それら2以上のタンパク質及び/又はポリペプチドをそれぞれ異なる波長の蛍光を発する異種の蛍光物質で標識することができる。これにより、同一試料において目的の遺伝子翻訳産物それぞれを検出することが出来る。

【0024】

診断薬は、任意に、緩衝剤、防腐剤、凍結防止剤等を含み得る。緩衝剤としては、例えば、トリス塩酸塩、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム等を挙げることができる。防腐剤としては、例えば、アジ化ナトリウム等を挙げることができる。凍結防止剤としては、例えば、グリセロール等を挙げることができる。

【0025】

本発明の診断薬は、後述する膵癌の再発リスクを予測する方法の工程(A)において、所定の遺伝子翻訳産物の発現レベルを決定するために当該遺伝子の翻訳産物検出に用いることができる。

10

【0026】

キット

本発明の別の態様によれば、膵癌の再発リスクの予測に用いるためのキットであって、上述の診断薬を含む、キットが提供される。

【0027】

本発明のキットは、後述する膵癌の再発リスクを予測する方法を実施する上で用い得る試薬及び部材等の要素をキットとして提供するものであり、上記診断薬を含むことを特徴とする。

20

【0028】

本発明のキットにおいては、本発明の診断薬は、(1)単一の診断薬において、A M A P 1及びE P B 4 1 L 5のうち1つの遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質又はポリペプチド1種のみが含まれることにより1つの遺伝子の翻訳産物の検出が可能である診断薬であることができる。あるいは、本発明の診断薬は、(2)単一の診断薬においてそれら遺伝子の翻訳産物それぞれをそれぞれ特異的に認識可能な2種以上のタンパク質及び/又はポリペプチドが含まれることにより当該単一の診断薬が複数の上記遺伝子翻訳産物を検出可能である単一の診断薬であってもよい。さらに、本発明のキットにおいては、上記(1)の1つの遺伝子の翻訳産物の検出が可能である診断薬、及び/又は上記(2)の複数の遺伝子翻訳産物の検出が可能である単一の診断薬が含まれ得る。

30

【0029】

本発明のキットには、上記診断薬に加えて、ブロッキング試薬、診断薬に含まれるタンパク質及び/又はポリペプチド(抗体)の検出に用いるための標識化二次抗体、発色試薬、膵癌の再発リスクを予測する方法に関する実験プロトコルを記述した指示書等が任意に含まれ得る。ブロッキング試薬としては、例えば、牛血清アルブミン(B S A)等を挙げることができる。

【0030】

予測方法

本発明の別の態様によれば、以下工程(A)及び(B)を含む、膵癌の再発リスクを予測する方法が提供される。

40

(A)膵癌の治療を受けた患者から採取した生体試料において、A M A P 1及びE P B 4 1 L 5から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定する工程、

(B)工程(A)において決定した翻訳産物発現レベルに基づいて、上記患者の膵癌の再発リスクを予測する工程、

【0031】

本発明の方法において、「膵癌」、並びに「膵癌の治療」については、前記の通りである。本発明の方法において、患者とは、膵癌の治療を受けた患者である。

【0032】

本発明の方法において、「生体試料」とは、膵癌の治療を受けた患者から採取された任

50

意の生体試料である。生体試料は、膵組織であることが再発リスクを精度良く予測し得るというという観点で好ましい。さらに、膵組織としては、例えば、膵癌の治療において腫瘍摘出術の際に患者から摘出した膵臓病変部位の組織、又は、病変部位が存在していた近傍の膵組織であって腫瘍摘出術の後に、摘出術とは別に採取した膵組織を挙げることができる。但し、患者への負担を極力軽減し、かつ再発リスクを精度良く予測し得るという観点から、膵組織は、腫瘍摘出術の際に患者から摘出した膵癌病変部位の組織であることが好ましい。尚、本発明では病理診断のために膵臓原発巣および転移巣の外科切除検体から作製されたパラフィン包埋組織を用いて上述の予測因子を検出可能であるため、病理診断が行われたすべて症例について検索が可能である。

【0033】

本発明の方法の工程(A)においては、前記生体試料において、AMAP1及びEPB41L5から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定する。これら遺伝子は、Arf6経路に属する遺伝子である。実施例で示すように、膵癌患者の膵組織においてArf6経路に属する遺伝子が組織レベルで発現し、Arf6経路の稼働が推定される場合には、当該患者は相対的に膵癌の治療後に早期再発するリスクが高い。従って、Arf6経路に属する遺伝子のうちの少なくとも1つの遺伝子の高発現が確認された場合、膵癌の治療後の再発を促進するものと考えられるArf経路の稼働が推定され、当該患者は早期に膵癌を再発する蓋然性が高いと判断し得る。

【0034】

本発明方法の工程(A)において、AMAP1及びEPB41L5から成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルの決定は、上記生体試料に対して実施される限り、その方法については特に限定されるものではない。上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルの決定は、例えば、上記生体試料全体に対して実施してもよいし、或いは生体試料において特定種の細胞に対して実施してもよいし、或いは生体試料に存在する細胞において細胞質及び細胞核それぞれ別々に実施してもよい。上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルの決定が、生体試料に存在する細胞において細胞質及び細胞核それぞれ別々に実施された場合、決定した翻訳産物発現レベルの結果は、細胞質についての結果と細胞核についての結果の2種類が得られる。それら2種類の結果は、後述の工程(B)にそれぞれ用いることができる。

【0035】

本発明方法の工程(A)において使用される、生体試料における上記所定の遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定する方法は、特に限定されない。具体的には、本発明の診断薬について上記した如く、検出の対象となる遺伝子の翻訳産物を特異的に認識可能なタンパク質又はポリペプチド(診断薬)を用いて当該遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定する方法を利用可能である。具体的には、生体試料である組織切片において遺伝子翻訳産物の発現強度及び発現分布を正確に把握して発現レベルを決定することが好ましい。特に、それらタンパク質及び/又はポリペプチド(診断薬)を用いた免疫組織化学法により当該遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定することが、遺伝子翻訳産物の発現強度及び発現分布をより正確に把握できるという観点から好ましい。なお、免疫組織化学法については、各種公知の手法を用いることができる。本発明においては、それら公知の手法を用いてもよいし、或いは新たに開発された手法を用いてもよい。免疫組織化学法等の翻訳産物発現レベル決定方法は、対象となる遺伝子翻訳産物の発現レベルを決定できるものである限り、特に限定されるものではない。

【0036】

さらに、本発明においては、遺伝子翻訳産物の特異的な検出を確保するために、上記タンパク質及び/又はポリペプチドは、検出の対象となる遺伝子翻訳産物に対する抗体及び/又はその断片であることが好ましい。この点は、本発明の診断薬についての説明で既述の通りである。

【0037】

本発明方法の工程(A)において、本発明所定の遺伝子の翻訳産物の発現レベル決定に

10

20

30

40

50

は、生体試料において任意のタンパク質検出法で検出されたシグナル強度を基準とし、この基準との比較を用いることができる。基準に用いる生体試料の例としては、同一患者から採取した非癌性組織（特に、非癌性膵組織）を挙げることができ、この組織における本発明所定の遺伝子翻訳産物発現レベルを対照とすることができる。この場合、同一患者から採取した非癌性組織（特に、非癌性膵組織）における本発明所定の遺伝子翻訳産物発現シグナル強度と、対象生体試料における本発明所定の遺伝子翻訳産物発現シグナル強度を、同一のタンパク質検出法で検出し、比較するそれにより、本発明所定の少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルを決定することができる。さらに、「翻訳産物発現レベルの決定」においては、上記基準との比較において、対象生体試料における本発明所定の少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現のシグナル強度が、例えば、「高い」、「同等」又は「低い」等のランク付けをすることもできる。或いは、例えば上記基準として用いるシグナル強度を基準として対象生体試料における本発明所定の少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現のシグナル強度をスコア化することもできる。シグナル強度のスコア化は、例えば、基準として用いた試料における遺伝子翻訳産物のシグナル強度を0とし、そのシグナル強度と対象生体試料における遺伝子翻訳産物のシグナル強度を比較して、例えば、-1から3等の整数でスコア化することが出来る。遺伝子翻訳産物のシグナル強度のランク付けやスコア化は、適宜決定できる。

10

【0038】

本発明方法の工程（B）においては、工程（A）において決定した翻訳産物発現レベルに基づいて、上記患者の膵癌の再発リスクを予測する。

20

【0039】

工程（B）において膵癌の再発リスクを予測するには、具体的には、工程（A）に関し上記に説明した通り、上記基準との比較により決定した「高い」、「同等」又は「低い」等のランク、或いはスコア化した値に基づいて、膵癌治療後の再発リスクを予測することが出来る。より具体的には、対象生体試料における上記少なくとも1つの遺伝子の翻訳産物発現レベルが「高い」とのランク付けが得られた場合には、当該患者については、膵癌の再発リスクが相対的に高いと理解することができる。さらに、対象生体試料における上記いずれか2つの遺伝子の翻訳産物発現レベルが「高い」とのランク付けが得られた場合には、当該患者については、膵癌の再発リスクが相対的に高いと理解することができる。

30

【0040】

それに対して、対象生体試料における上記2つの遺伝子の翻訳産物発現レベルがいずれも「同等」又は「低い」とのランク付けが得られた場合には、当該患者については、膵癌の再発リスクが相対的に低いと理解することができる。翻訳産物発現レベルをスコア化した場合には、スコア自体から膵癌の再発リスクを理解することができる。或いは、予めスコアに再発リスクが「高い」、「低い」又は「中程度」等の判定を割り振っておき、得られたスコアから膵癌の再発リスクを「高い」、「低い」又は「中程度」等と理解することもできる。膵癌の再発リスクの予測は、「高い」、「低い」又は「中程度」のような結果を得るだけでなく、膵癌の治療後から膵癌を発症するリスクが50～90%（例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%等）である期間がどの程度であるかを示す指標を含むこともできる。

40

【0041】

治療又は予防方法

さらに、本発明の別の態様によれば、膵癌の再発を治療又は予防する方法が提供される。具体的には、膵癌の再発を治療又は予防する方法とは、上記膵癌の再発リスクを予測する方法により得られた予測結果に基づいて、膵癌の再発を治療又は予防する方法である。

【0042】

具体的には、本方法は、抗癌剤を用いた化学療法、ホルモン療法、放射線療法、外科的処置、食事療法、生活指導等、任意の膵癌の再発を治療又は予防し得る手段を含む。本発明で用いる遺伝子の翻訳産物（バイオマーカー）は、癌の浸潤転移や治療抵抗性に関与す

50

るシグナル経路を形成する一群の蛋白質からなるものである。このシグナル経路を阻害すると、癌の浸潤転移などを著しく減じる事も本発明者は見いだしている。従って、本発明の予測方法を用いて、膵癌の再発が予測される患者について、上記シグナル経路を阻害することを含む治療方法を施して、膵癌の再発を治療又は予防し得る。

【0043】

本方法は、上記膵癌の再発リスクを予測する方法により得られた予測結果に基づいて、膵癌の再発を治療又は予防する限り特に限定されるものではなく、上記膵癌の再発リスクを予測する方法の方法工程を含んでもよいし、含まなくてもよい。

【0044】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

【実施例】

【0045】

<材料及び方法>

(1) 患者集団

過去に北海道大学病院（日本国、札幌）にて膵癌摘出手術を受けた70人の患者を対象にし、解析を行った。

【0046】

(2) 免疫組織化学（Immunohistochemistry；IHC）

EPB41L5抗体、AMAP1抗体、GEP100抗体の作成方法は特開2015-21800号公報の段落0049～0053にその詳細を記載している。

【0047】

EPB41L5抗体は、ヒト蛋白質のアミノ酸558番目から733番目までを含むペプチドを抗原としウサギに免疫した後、標準的手法によって抗血清を採取、抗原にてアフィニティ精製したものをを用いた。図15にEPB41L5に対するポククローナル抗体の抗原部位（アミノ酸541番目から733番目までを含むペプチド（193アミノ酸））を図示する。図16に抗原をウサギに免疫し、抗血清を採取、抗体の精製を行う一連の操作のスキームを示す。得られたEPB41L5抗体のアフィニティ精製の結果を図17及び18に示す。

【0048】

AMAP1に対する抗体に関しては、AMAP1に対する抗体の抗原部位の情報、抗原部位のクローニング手順、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて図19に示す。

【0049】

参考として、GEP100に対する抗体の抗原部位の情報、抗原部位のクローニング手順、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて図20に示す。

【0050】

尚、AMAP1及びGEP100に対する抗体については上記公報発行以前にも報告がある（Onodera et al., 2006; Morishige et al., 2008）。

【0051】

免疫組織化学染色は、以下の通り、厚さ4 μmのホルマリン固定パラフィン包埋連続切片を用いて実施した。全てのスライドは、最初にキシレンにおいて脱パラフィン処理を行い、段階的なアルコールにおいて脱水処理を実施し、次いで、切片をトリス緩衝食塩水（TBS: 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)でリンスした。

【0052】

その後、以下の条件により、各抗原について切片の抗原賦活化処理を行った。

(i) EPB41L5 (EBL5) : クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で95℃、40分インキュベート;

(ii) AMAP1又はGEP100: 抗原賦活化液 (EDTA solution、pH 9、Nichireiから購入) で95℃、40分インキュベート;

次いで、室温で0.3% H₂O₂/メタノールにインキュベートすることにより、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。切片をTBSで洗浄した後、AMAP1 (1:750)、GEP100

10

20

30

40

50

(1:750)、又はEPB41L5 (EBL5; 1:1000) に対する一次抗体 (括弧内の比率は希釈倍率) と共に、室温で30分間、インキュベートした。

さらにTBSで洗浄した後、二次抗体としてEnVision (商標) (DAKO、日本国) を用いて各一次抗体の検出を行い、ジアミノベンジジンを用いて発色させた。各切片は、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、水洗した後、定常法に従い透徹処理・封入処理を行った。

【0053】

(3) 評価

全ての試料は、盲検下で、Arf6経路の研究に精通した研究者がその染色度合いを判定した。腫瘍細胞の染色強度毎に2点 (非癌性膵組織の染色度合いと比較して染色が非常に濃い場合) 又は1点 (非癌性膵組織の染色度合いと比較して高い場合) 又は0点 (非癌性膵組織の染色度合いと比較して同程度か低い場合) と点数付けした。また、それらの腫瘍細胞の組織全体に占める割合を0.0~1.0 (0%なら0, 10~90%なら0.1~0.9, 100%なら1.0) で表し、0× (0点の占める割合) + 1× (1点の占める割合) + 2× (2点の占める割合) をIHC scoreと定義した。患者毎にIHC scoreを計算し、中央値より高い患者を高発現群、低い患者を低発現群とした。

10

【0054】

(4) 統計分析

今回の解析では、Kaplan-Meier法により生存率を算定し、Log-rank法により有意差の検定を行った。多変量解析にはコックス比例ハザード回帰を用い、単変量解析にて有意差を認めた因子を独立変数として採用した。0.05未満のp値は、統計的に有意な相関があると判断した。これらの解析は、EZR (Bone Marrow Transplant 2014;48:452-458) を用いて実施した。

20

【0055】

< 結果 >

(1) 患者におけるAMAP1、EPB41L5、GEP100の翻訳産物発現と臨床病理学的特徴との関係
今回対象となった患者の臨床病理学的特徴を表1に示す。

【0056】

【表 1】

表 1 患者における各遺伝子の翻訳産物発現と臨床病理学的特徴との関係

臨床病理学的特徴	患者数 (%)
手術時年齢中央値 (範囲)	67 (35-89)
性別	
男	43 (61.4)
女	27 (38.6)
腫瘍マーカー	
CEA 上昇	34 (48.6%)
CA19-9 上昇	53 (75.7%)
DUPAN-2 上昇	40 (57.1%)
術前治療施行例	0 (0%)
術後治療施行例	8 (11.4%)
腫瘍部位	
膵頭部	54 (77.1%)
膵体尾部	16 (22.9%)
施行術式	
膵頭十二指腸切除術 (PD)	54 (77.1%)
尾側膵切除術 (DP)	16 (22.9%)
病理学的腫瘍分化度	
高分化～中分化	66 (94.2%)
低分化	4 (5.8%)
腫瘍径	
≤2cm	11 (15.7%)
2cm<	59 (84.3%)
病理学的進行期	
局所	0 (0%)
局所進行	70 (100%)
遠隔転移	0 (0%)
リンパ節転移陽性	46 (65.7%)
治癒切除例	60 (85.7%)

10

20

30

40

【0057】

代表的な染色像を図 1 に示す。

70名の患者のmedian IHC scoreは、AMAP1(0.13)、EPB41L5(0.07)、GEP100 (0.14)であった。

【0058】

(解析結果)

図 2 A ~ B はAMAP1、EPB41L5、GEP100の各遺伝子の翻訳産物が高発現の患者と低発現の

50

患者について、全生存率と無再発生存率を示すKaplan-Meier曲線である。AMAP1、EPB41L5において、それが高発現の患者は低発現の患者と比べて有意に早期に再発し（それぞれ $P=0.0014$ 、 $P=0.00768$ ）、予後不良（それぞれ $P=0.0012$ 、 $P=0.000127$ ）であることがわかった。

【0059】

また図2C～Dに示すように、AMAP1、EPB41L5、GEP100のいずれか2つが高発現の場合は、もしくは3つ全てが高発現の場合は（図中「All-high」と表記、3つのうち少なくとも1つが低発現（図中「Others」と表記）の場合と比べてより顕著に早期再発および予後不良の傾向が認められた。

【0060】

これらの結果を臨床病理学的特徴と併せて単変量解析および多変量解析を施行すると、腫瘍径2cmより大きい、およびAMAP1・EPB41L5の高発現が独立した予後不良因子であることがわかった（表2）。

【0061】

【表 2】

表 2 患者における全生存率に関する単変量・多変量解析結果

因子	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95%信頼区間	P値	ハザード比	95%信頼区間	P値
年齢 ＜ 67 / 67 ≤	0.951	0.569 1.590	- .848			
性別 男 / 女	1.189	0.700 2.020	- .521			
CEA (U/mL) 5.0 ≤ / < 5.0	1.684	1.006 2.818	- .0473	1.362	0.738 - 2.136	.4006
CA19-9 (U/mL) 37.0 ≤ / < 37.0	2.011	1.061 3.812	- .033	1.374	0.683 - 2.763	.3729
DUPAN-2 (U/mL) ＜ 150 / ≤ 150	1.584	0.930 2.696	- .0903			
術後治療 + / -	1.321	0.620 2.816	- .471			
腫瘍部位 膵頭部 / 膵体尾部	1.434	0.760 2.707	- .266			
術式 PD / DP	1.434	0.760 2.707	- .266			
腫瘍分化度 高分化～中分化 / 低分化	0.446	0.158 1.257	- .127			
腫瘍径 2cm < / ≤ 2cm	2.846	1.293 6.268	- .00939	2.407	1.077 - 5.378	.03221
リンパ節転移陽性 + / -	2.085	1.178 3.689	- .0099	1.690	0.950 - 3.005	.0742
治癒切除 - / +	2.265	1.082 4.742	- .0307	1.955	0.902 - 4.236	.0894
GEP100 高 / 低	1.433	0.858 2.393	- .1696			
AMAP1 高 / 低	2.385	1.389 4.096	- .0016			
EPB41L5 高 / 低	2.777	1.614 4.779	- .00022			
AMAP1 and EPB41L5 共に高い/それ以外	2.996	1.726 5.201	- .000096	2.650	1.522 4.615	- .000574

【産業上の利用可能性】

【0062】

本発明は、癌の診断および治療に関連する分野に有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0063】

10

20

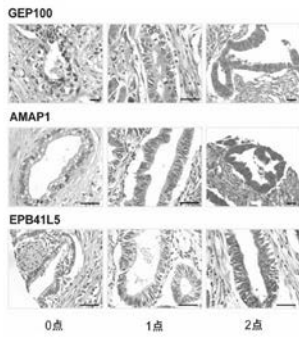
30

40

50

- 配列番号 1 : EPB41L5遺伝子の塩基配列
- 配列番号 2 : EPB41L5のアミノ酸配列
- 配列番号 3 : band 4.1-like protein 4B isoform 1の塩基配列
- 配列番号 4 : band 4.1-like protein 4B isoform 2の塩基配列
- 配列番号 5 : AMAP1遺伝子のcds領域塩基配列
- 配列番号 6 : AMAP1のアミノ酸配列
- 配列番号 7 : AMAP2遺伝子のcds領域塩基配列
- 配列番号 8 : AMAP2のアミノ酸配列

【 図 1 】



【 図 3 】

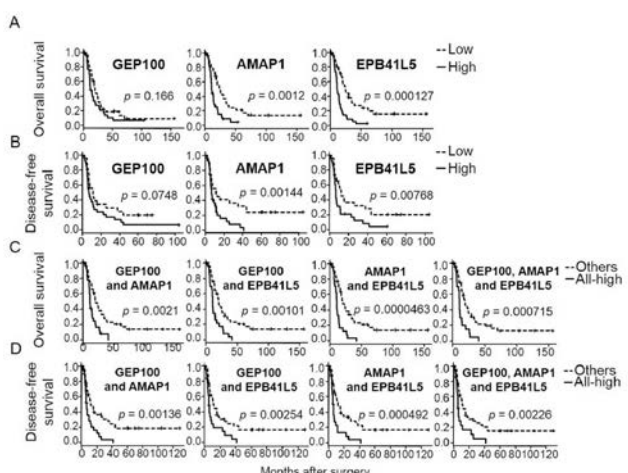
NCBI Reference Sequence: NM_020909.3
 cds領域塩基配列

```

atctggatcttccctagaaacattgagctgcttgcgtaaacatgacgaggaaggaacgacccgagagaacacacacgcccgc
cacacattctcgcagctggagattcgaagcattcattcagctgctggctgctccctcctcctcctcctcctcctcctcctc
caaaaagccaaagacacagagatggttgaicagattatgaccaccctggcccctggatggaagcacttctggctcagattatg
gatccagcaagtagcacttggtagtacaanaagcacaanaagcagaataaagatggatcaccctcctcctcctcctcctcctc
agttcaatttattctcagaccataaactctcggagcctaacctgatttatttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
stggaaattagactgctccttggatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
catgctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cagagctcaaacaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
agcctagagaagggaatgactatggttggagcaaacacacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
tggccagagaiaaccagatgggatllaaagaalaaatlaacctgggtggtagaagatgagatcagcagcaagacagcaaga
tacattgcttttagctggatcctcaaaagcagcaaacattatggaaatgctgtggagcactcactcctcctcctcctcctc
gccctccaaaagagctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
aaaaaacataaagcaaggaagcaaaccttggaaagagcccccagcaaacgattctagcagcactctacaatgaaagcattg
tacaacctggagcacttagtctcaacatbaatgttccgacaaagtaatggctccmccagcctggggatgagatcctcctcctc
ctgtagctctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
tgcattctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
aaca tcccagcactgaatgagcttaatgtagccaccagcctccggataggagaccctgaaatgaaatgaaatgaaatgaa
cctcagagagcctcaaacagctggagatggagagacagccttctgctccctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
ggaagctgagatggcctggaaatggcctggaaatggcctggaaatggcctggaaatggcctggaaatggcctggaaatgg
taacatttgaagctcgaagtagagcagtagcaataggcttacaanaagatagcttatttaagctcaaaaatgccaatgctcagatg
ctggcaaaaagctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
agtggtctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
tcagctctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
ttttgacaggaagagggagacatggtaataaagatggaatcactcactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
cttgctccattttggcagaagaagcctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
cttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc

```

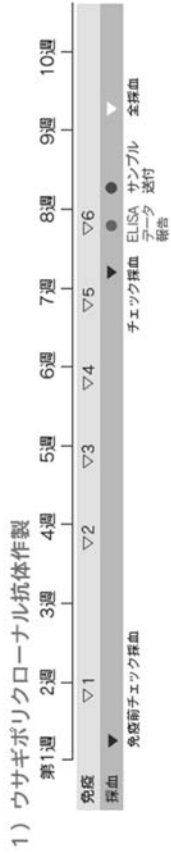
【 図 2 】



EPB41L5

【 図 1 6 】

ウサギへの免疫、抗血清の採取、抗体の精製



上記スケジュールにて5回免疫後、チエックを行い、追加免疫を行った後に全採血を行う。
全採血後の抗血清を用いて、アフィニティー精製を行う。

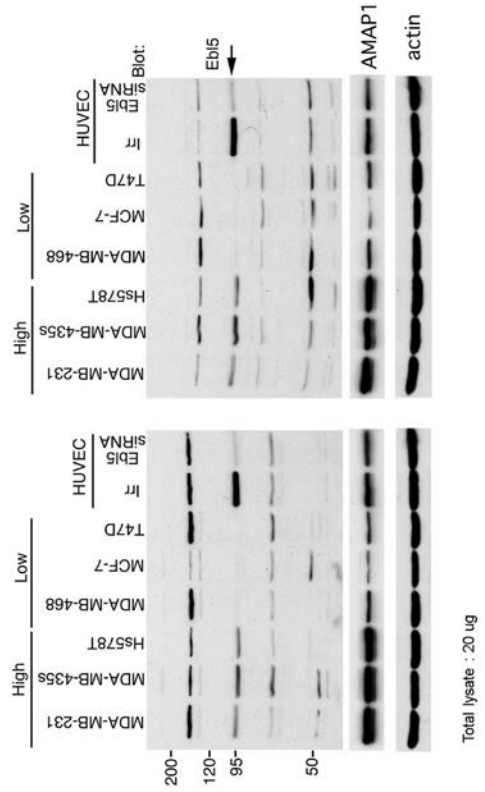
【 図 1 7 】

Affinity 精製 (Ebi5 Ab)

lot. 1 (1:5000) ~0.3 ug/ml

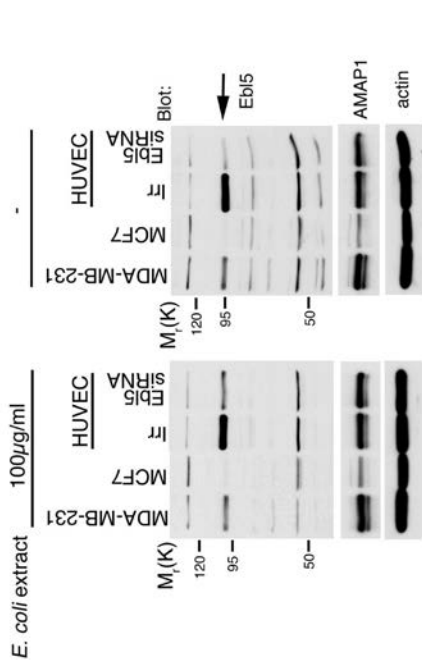
lot. 2 (1:10000) ~0.3 ug/ml

Blocking with 5% Skim milk



【 図 1 8 】

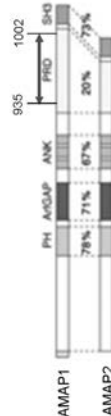
Ebi5 lot. 2 (1:10000)



【 図 1 9 】

AMAP1 Rabbit polyclonal Ab

Antigen site for anti-AMAP1 antibody



AMAP1抗原部位のクローニング手順

抗原領域の両端に作製したプライマーを用いて抗原部位のクローニングを行い、GST融合蛋白発現用ベクターpGEX-4TIに挿入した。

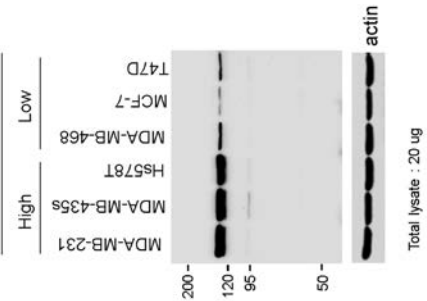
抗原の調整、ウサギへの免疫、抗血清の採取、抗体の精製

EPB41L5と同様の方法で行う。

Western Blotting

AMAP1 Rabbit polyclonal Ab (1:2000)

Blocking with 5% Skim milk



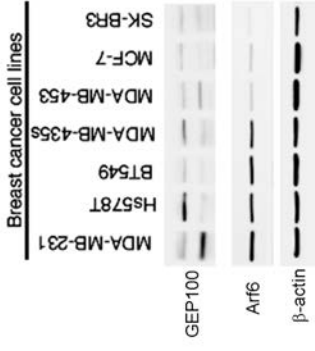
【 図 2 0 】

GEP100 Rabbit polyclonal Ab

Antigen site for anti-GEP100 antibody



Western Blotting



Invasion H H M L L L

Activities graded as % MDA-MB-231 ;
L, 0-40%; M, 40-60%; H-60%

GEP100抗原部位のクローニング手順

Fetal brain cDNAをtemplateにし、抗原領域の両端に作製したプライマーを用いて抗原部位のクローニングを行い、GST融合蛋白発現用ベクターpGEX-4TIに挿入した。

抗原の調整、ウサギへの免疫、抗血清の採取、抗体の精製

EPB41L5と同様の方法で行う。

【 配列表 】

2017108686000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA04 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ02 QR55 QS33

专利名称(译)	用于预测胰腺癌复发风险的诊断试剂和试剂盒，以及预测方法		
公开(公告)号	JP2017108686A	公开(公告)日	2017-06-22
申请号	JP2015246132	申请日	2015-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人北海道大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人北海道大学		
[标]发明人	佐邊 壽孝 平野 聡 古川 聖太郎		
发明人	佐邊 壽孝 平野 聡 古川 聖太郎		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/50.Z C12N15/00.A C12N15/11.Z C12N15/12 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6813.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QR55 4B063/QS33		
其他公开文献	JP6695586B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供用于预测胰腺癌复发风险的诊断试剂和试剂盒，这是一种非常有效的手段，可以使用能够预测风险预测结果的因子预测胰腺癌的复发胰腺癌复发的一种治疗方法，是胰腺癌复发的特异性因素；发明内容本发明提供了一种用于预测胰腺癌复发风险的诊断剂：含有能够特异性识别选自该组的任何一种基因的翻译产物的蛋白质和/或多肽。由AMAP1和EPB41 L5组成。提供了用于预测胰腺癌风险的试剂盒，其包含诊断剂。提供了胰腺癌复发风险的预测方法：包括(A)确定从患者收集的生物样品中至少一种选自AMAP1和EPB41L5的基因的翻译产物的表达水平。接受胰腺癌治疗的人；(B)根据步骤(A)中确定的翻译产物表达水平预测患者胰腺癌复发的风险。图纸：无

(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2017-108686 (P2017-108686A)
	(43) 公開日	平成29年6月22日(2017.6.22)
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード(参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	ZNA A 2G045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D 4B024
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50	Z 4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A
	審査請求 未請求	請求項の数 10 O L (全 22 頁)
(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2015-246132(P2015-246132) 平成27年12月17日(2015.12.17)	(71) 出願人 504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目 110000109
		(74) 代理人 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者 佐邊 壽孝 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
		(72) 発明者 平野 聡 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
		(72) 発明者 古川 聖太郎 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
		Fターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA36 FB03 最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに予測方法	