

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6683722号
(P6683722)

(45) 発行日 令和2年4月22日(2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年3月30日(2020.3.30)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	D
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577	B
CO 7 K 16/30 (2006.01)	CO 7 K 16/30	Z N A
請求項の数 4 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-545431 (P2017-545431)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月10日 (2016.3.10)
 (65) 公表番号 特表2018-509618 (P2018-509618A)
 (43) 公表日 平成30年4月5日 (2018.4.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/001361
 (87) 国際公開番号 W02016/143356
 (87) 国際公開日 平成28年9月15日 (2016.9.15)
 審査請求日 平成31年2月22日 (2019.2.22)
 (31) 優先権主張番号 62/131,679
 (32) 優先日 平成27年3月11日 (2015.3.11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 506334311
 ジェイファーマ株式会社
 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1
 (74) 代理人 100105315
 弁理士 伊藤 温
 (72) 発明者 柳澤 信之
 日本国神奈川県藤沢市片瀬海岸3-24-
 22-409
 (72) 発明者 岡安 勲
 日本国東京都杉並区高井戸東1-31-3
 -219
 審査官 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の悪性度を決定するためのキット及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Gleasonスコア7未満又はD'Amicoリスクカテゴリー低リスク群の患者の前立腺癌の標本組織に抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を投与する工程、この標本組織に免疫組織化学染色を行い、LAT1スコア及び/又は強度を決定する工程、及び前記スコア及び/又は強度に基づいて前記患者の前立腺癌が安定疾患であるか局所進行であるかを判定する工程を含む、前立腺癌の悪性度を決定するための方法
に用いられるキットであって、抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を含むキット。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体がヒトLAT1のN末端から1~52位のアミノ酸残基を特異的に認識する、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

LAT1分子標的治療薬の適用によって前立腺癌の重症度を臨床的に区別するための方法であって、請求項1に記載の方法に従って前立腺癌の悪性度を決定する工程、及び前記決定結果に基づいて前立腺癌の治療薬を投与するべきかどうかを決定する工程を含む、前記方法
に用いられるキットであって、抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を含むキット。

【請求項4】

前記モノクローナル抗体がヒトLAT1のN末端から1~52位のアミノ酸残基を特異的に認識する、請求項3に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、前立腺癌の悪性度を決定（診断）し、患者の予後を予測するためのキット及び方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

前立腺癌(PC)は、アメリカの人々に影響を与える最も一般的な非皮膚癌であるが[1]、その自然史は変化しやすく、しばしば無痛である。組織学的には、Gleasonスコア(GS)は、PC患者の予後の最も強力な予測法の一つである[2, 3, 4]。また、GSは、現在、最も広く受け入れられている組織学的グレード方法であり、前立腺針生検によって提供される最も重要な予測法の一つである[5, 6]。非前立腺特異的抗原(PSA)再発を予測するための前立腺生検における他の病理上の性質は、癌を含む生検コアの数[7]、癌を含む各々の生検コアにおける障害の長さ又は割合[8, 9]、神経周囲の浸潤の存在[10]、及び反応性間質[11]を含む。前立腺生検は、根治的前立腺摘除、放射線治療、又は術前補助/補助治療などの治療介入の前に、PCを評価することができる。しかしながら、これらのサンプルは小さく、限定された情報を提供するので、前立腺生検標本において正確にバイオマーカーを評価することはしばしば難しい[12, 13]。生検サンプルにおける追加的なバイオマーカーは、患者を管理するための予測能力を改善させるであろう。

【0003】

積極的監視(AS)は、治療アプローチを後に経験する患者にとっては適切であるかもしれない。これらの患者は、非常に低い又は低いリスクを有し、初めのうちは治療されず、定期的にフォローアップされる。もしASが進行又は進行の恐れを示したら、これらの患者は治癒的な意図をもって治療を経験する。ASは、臨床的に限定された非常に低い又は低いリスクのPCを有する患者を過剰治療することを減らすために用いられる。これに対して、経過観察(WW)は、局所療法が必須ではない局所的に進行したPCを有する患者をモニターするために用いられる。WWは、アンドロゲン抑制療法に対する代替療法であり、同等の腫瘍効果を有すると考えられる[14]。

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

しかしながら、介入と過剰治療の間のバランスを決定することは難しく、そのバランスは、患者の年齢、合併症、全身状態、寿命、及び生検GSを含む臨床病理的因子によるであろう。また、ほとんどのASプロトコルは、積極的な治療を開始するための引き金として、PSAの化学速度論を使用する。それにも関わらず、PSA倍加時間(PASDT)及びPSA速度を含むPSAの化学速度論は、信頼し得る治療介入の引き金ではない[15]。新規なバイオマーカーの同定は、PCの致死率をより予測できるかもしれない。したがって、本発明の課題は、GSに関わらず、局所進行(LP)の信頼し得る、予後バイオマーカーを提供すること、より正確且つ容易に前立腺癌の悪性度を決定することができる手段を提供すること、及び積極的監視を受けることができる人をスクリーニングするために低リスク患者のPCに対する評価を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明(1)は、
抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を含む、免疫組織化学染色による前立腺癌の悪性度を決定するために用いられるキット
である。

本発明(2)は、

前記モノクローナル抗体がヒトLAT1のN末端から1~52位のアミノ酸残基を特異的に認識する、本発明(1)に記載の、前立腺癌の悪性度を決定するために用いられるキット

10

20

30

40

50

である。

本発明(3)は、

予後において低リスクと関連する患者に使用される、本発明(1)に記載の、前立腺癌の悪性度を決定するために用いられるキット

である。

本発明(4)は、

標本組織に抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を投与する工程を含む、免疫組織化学染色によって前立腺癌の悪性度を決定するための方法

である。

本発明(5)は、

前記モノクローナル抗体がヒトLAT1のN末端から1~52位のアミノ酸残基を特異的に認識する、本発明(4)に記載の前立腺癌の悪性度を決定するための方法

である。

本発明(6)は、

予後において低リスクと関連する患者に使用される、本発明(4)に記載の前立腺癌の悪性度を決定するための方法

である。

本発明(7)は、

LAT1分子標的治療薬の適用によって前立腺癌の重症度を臨床的に区別するための方法であって、本発明(4)~(6)に記載の方法に従って前立腺癌の悪性度を決定する工程、及び診断結果に基づいて前立腺癌の治療薬を投与すべきかどうかを決定する工程を含む、前記方法

である。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、GSに関わらず、局所進行(LP)の信頼し得る、予後バイオマーカーを提供すること、より正確且つ容易に前立腺癌の悪性度を決定することができる手段を提供すること、及び積極的監視を受けることができる人をスクリーニングするために低リスク患者のPCに対する評価を提供することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、免疫組織化学によって分析された前立腺癌(PC)細胞におけるL型アミノ酸トランスポーター(LAT)1発現を示す。癌腫細胞膜の免疫強度は、A、0、染色なし；B、1、弱いまたは斑状に陽性の染色；C、2、中程度の細胞膜染色；およびD、3、強く完全な膜染色と分類された。活性化リンパ球もLAT1発現を示した。スライドをメチルグリーン溶液で対比染色した。元の倍率、400(A-D)。

【図2】図2は、局所進行(LP)および安定疾患(SD)を有する前立腺癌患者におけるLAT1スコアおよび強度の比較を示す。LAT1発現は、SD患者よりもLP患者において有意に高かった。A、LAT1スコア；B、LAT1強度；C、Gleasonスコア(GS)7病変；D、LAT1発現をD'Amicoリスクカテゴリー(低、中、高リスク群)で割ったもの。各カテゴリー内で、LAT1発現は、SD群よりもLP群で大きかった。E、低GS患者(GS<7)におけるLAT1、LAT2、CD98発現およびKi-67標識指数(LI)の比較。LAT1発現のみが、SD患者よりもLP患者において有意に高かった。* p<0.0001、# p<0.01、¶ p<0.05。

【発明を実施するための形態】

【0008】

上記の課題を解決するために、本発明者は、癌由来の培養細胞、及び胎児肝に特異的に発現するアミノ酸トランスポーターに最初に注意を向けた。L型アミノ酸トランスポーター(LATs)は、大型の中性アミノ酸の輸送の原因である。これらのトランスポーターの多くは、細胞膜に位置する、LAT1(SLC7A5)及びLAT2(SLC7A8)を含む軽鎖と重鎖(CD98/4F2hc)との2つのサブユニットからなる[16, 17]。LAT2は、小腸上皮細胞及び腎近位尿細管を含む

10

20

30

40

50

正常細胞に広く発現される。これは、LAT2が、アミノ酸の経上皮輸送の活性に重要な役割を果たすことを示唆している[16]。これに対して、LAT1は、前立腺癌、胃癌、肺癌及び膵臓癌を含む多くの癌腫細胞に発現される[18, 19, 20, 21]。さらに、いくつかの胎児細胞はLAT1を発現し、これはLAT1が癌胎児性タンパク質であるかもしれないことを示唆している[22]。我々は、最近、高LAT1発現は、Ki-67標識指数(LI)に従う細胞増殖活性とは無関係に、膵管腺癌および胆管腺癌の患者における予後不良を予測することを報告した[21, 23]。これらの知見は、高レベルのLAT1発現は悪性腫瘍の積極的な表現型と関連していることを強く示唆している。

【0009】

いくつかのLAT1を標的とする臨床試験が異なる医療機関において開始された。LAT1阻害剤であるJPH203は、ヒト悪性腫瘍に適用される予定である[24, 25]。これに加えて、合成アミノ酸類似体の抗¹⁻⁸Fフルオロシクロブタン-1-カルボン酸(FACBC)を含有する新規なポジトロン断層法(PET)放射性トレーサーであるNMK36は、LAT1を介して腫瘍細胞によってよく取り込まれる。フェーズIIa臨床試験の結果は、初代PC病変および転移病変を描くための抗¹⁻⁸F-FACBC-PETの可能性を示唆し、現在このフェーズIIb臨床試験が進行中である(JapicCTI-121807として登録されている)[26, 27]。したがって、LAT1は、治療上効果的な薬及びヒト悪性腫瘍に対する診断の重要な分子標的になるであろう。このため、我々は、変化したLAT1発現がPCの悪性腫瘍挙動に関連するかどうかを決定するために、EMを受けている患者のPC生検試料におけるLAT1発現をアッセイした。

【0010】

本発明(1)は、抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を含有する免疫組織化学染色により前立腺癌の悪性度を判定するキットである。ここで、このような抗ヒトLAT1モノクローナル抗体は、LAT1を特異的に認識することができれば特に限定されない。それは、例えば、LAT1の細胞内領域のN末端から1~52位のアミノ酸残基を特異的に認識する抗体(Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys Ser Ala Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr Leu Gln Arg Asn Ile Thr Lue)(例えば、ヒトLAT1マウスモノクローナル抗体)である。ヒトLAT1のアミノ酸配列及び塩基配列は、特開2000-157286号公報に記載されている。さらに、本明細書で使用される用語「悪性度」の文脈において、癌は、前立腺癌により患者が死亡した場合には重度の悪性度を有し、癌と診断されたとしても前立腺癌により直接死ぬことがない場合には軽度の悪性度である。

【0011】

ここで、抗ヒトLAT1モノクローナル抗体は、抗原としてLAT1を取り込み、そのような抗原に結合するものであれば特に限定されない。従って、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体等を適宜用いることができる。

【0012】

また、基本的には、以下のような公知の技術を用いて、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製することができる。具体的には、所望の抗原および/または所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として用い、従来免疫法により免疫し、得られた免疫細胞を公知の親細胞と融合させ、従来スクリーニング法によりモノクローナル抗体生産細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングすることによって、モノクローナル抗体を作製することができる。ハイブリドーマの作製は、例えば、Milsteinら(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)などに従って行われる。抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を産生する際には、LAT1またはその断片を抗原として使用することができる。したがって、LAT1またはタンパク質の断片を発現する細胞も抗原として使用することができる。タンパク質のLAT1またはその断片は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Vols. 1-3、Sambrook, J.ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1989に記載された方法に従って、得ることができる。また、LAT1またはそのタンパク質の断片を発現する細胞は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual

10

20

30

40

50

、第2版、Vols.1-3、Sambrook, J.ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1989に記載された方法に従って、得ることができる。

【0013】

当該キットは、次の構成要素を含んでいてもよい。

【0014】

- (1) 抗ヒトLAT1モノクローナル抗体に対するペルオキシダーゼで標識された抗体
- (2) 内因性のペルオキシダーゼを阻害する過酸化物質(ペルオキシド)
- (3) 酸化により発色する酸化還元色素
- (4) 抗原タンパク(LAT1)と抗体が結合しやすくするための賦活化試薬
- (5) 組織中のLAT1以外のタンパクと抗体との非特異的な結合を阻害するブロッキング試薬
- (6) 各ステップにおいて標本に付着した試薬を取り除くための洗浄剤

10

【0015】

ここで、上記の(3)の酸化還元色素に関しては、強度測定が可能な信号は多々あるが(例えば蛍光)、可視光領域での変色確認ができることが必要である。これは、理由は定かでないが、他の信号の場合、本発明に係る抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を用いても、悪性の前立腺癌と良性の前立腺癌との区別が明確にできないからである。他方、本発明に係る抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を、可視光領域での変色確認ができる試薬と組み合わせることで(すなわち、免疫組織化学染色)、悪性の前立腺癌と良性の前立腺癌との区別が明確にできるようになる。

20

【0016】

本発明(4)は、標本組織に抗ヒトLAT1モノクローナル抗体を投与する工程を含む、免疫組織化学染色によって前立腺癌の悪性度を決定するための方法である。

【0017】

ここで、当該方法は、他に次の工程のいずれか又はすべてを含んでいてもよい。

- ・検体組織に過酸化物質を適用する工程
- ・賦活化試薬に検体組織を浸漬し、マイクロウェーブ処理を施す工程
- ・ブロッキング試薬を検体組織に適用する工程
- ・抗ヒトLAT1モノクローナル抗体に対する標識化抗体を適用する工程
- ・酸化により発色する酸化還元色素を適用する工程
- ・場合により、一次抗体陰性コントロールを検体組織に適用する工程

30

【0018】

本発明(7)は、LAT1分子標的治療薬の適用によって前立腺癌の重症度を臨床的に区別するための方法であって、本発明(2)の方法に従って前立腺癌の悪性度を決定する工程、及び診断結果に基づいて前立腺癌の治療薬を投与するべきかどうかを決定する工程を含む、前記方法である。

【実施例】

【0019】

材料と方法

<製造例1 一次抗体の製造例>

40

一次抗体(2.0 μ gタンパク質/mL)には、抗ヒトL-タイプアミノ酸トランスポーター1(hLAT1)マウスモノクローナル抗体を含有する。当該抗体は、インビトロ翻訳法によりhLAT1クローニングベクターより合成したhLAT1の1~52位のタンパクを抗原として使用し、BALB/cマウスに免疫し、その脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞を融合し、ハイブリドーマを得て、そのハイブリドーマをマウス腹腔内に接種し、得られた腹水を、硫酸分画法及びProtein Gカップリングカラムクロマトグラフィーにより精製し、1%ウシ血清アルブミンを含む10mM PBS(pH7.4)に溶解することによって、製造された。なお、LAT1のアミノ酸配列及び当該タンパク質をコードする塩基配列は、特開2000-157286号公報に記載されている。

【0020】

50

《製造例2 決定キットの構成例》

本発明に係る決定キットは、以下の6種類の試薬から構成される。

・ブロッキング試薬

正常ブタ血清を2%に希釈して調製する。

・一次抗体

抗LAT1マウスモノクローナル抗体(製造例1)を緩衝液(1%BSA、0.25%カゼインナトリウム、15mMアジ化ナトリウム、0.1%Tween 20)で2µg/mLに希釈して調製する。

・ポリマー試薬

ニチレイ ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(M)(商標)を用いる。尚、当該試薬は、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体(Fab')を4µg/mL含有している。

・一次抗体陰性コントロール

マウスIgG(Vector Laboratories)を上記緩衝液で溶解し、2µg/mLとする。

・基質緩衝液

トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタンおよびトリス[ヒドロキシメチル]アミノメタンクロライドを精製水で希釈し、調製する。

・発色基質

DAB(3-3'ジアミノベンジンテトラヒドロクロライド)を緩衝液(上記の基質緩衝液)で溶解し、0.2mg/mLとする。

【0021】

更に、本製造例に係る決定キットは、染色で用いる以下の試薬を含んでいてもよい。

【0022】

・内因性ペルオキシダーゼブロッキング試薬：1%H₂O₂/メタノール過酸化水素水をメタノールで希釈し、1%とする。

・賦活化試薬：0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)

クエン酸一水和物(0.36g)、クエン酸三ナトリウム二水和物(2.44g)を精製水に溶解し、1Lに調製する。

・洗浄液：PBS

リン酸水素二ナトリウム12水和物(2.90g)、リン酸二水素ナトリウム二水和物(0.296g)、塩化ナトリウム(8.5g)を精製水に溶解し、1Lに調整する。

【0023】

以上を整理すると、本製造例に係る診断キットの構成薬(必須6種類)は、以下の表1に示すものである。

【0024】

【表1】

表1 本製造例に係る診断用キットの構成試薬の一例

試薬名	用手法用キット	自動免染装置用キット
ブロッキング試薬(2%ブタ血清)	7.0 mL	2×11 mL
一次抗体(2µg/mL抗hLAT1抗体含有)	3.5 mL	1×15 mL
ポリマー試薬(シンプルステインMAX-PO(M))	7.0 mL	2×11 mL
一次抗体陰性コントロール(マウスIgG)	3.5 mL	1×15 mL
基質緩衝液(トリス緩衝液)	10 mL	15×11 mL
発色基質(0.2mg/mL DAB溶液)	0.5 mL	2×2 mL

【0025】

操作方法及び決定方法

1. 操作方法

10

20

30

40

50

表 2 に操作手法の概要に示す。

【 0 0 2 6 】

【表 2】

表 2 免疫組織化学検出系

ステップ	試薬	操作
1 内因性パーオキシダーゼ賦活	1% H_2O_2	加湿状態で室温 30 分処理
2 抗原賦活	抗原賦活液	マイクロウェーブ 5 分処理後室温 20 分処理
3 ブロッキング	ブロッキング試薬	加湿状態で室温 30 分処理
4 一次抗体処理	検討対象参照	加湿状態で室温 1 時間処理
5 二次抗体処理	ニチレイ ヒストファイン シンプルステイン MAX PO(M)	加湿状態で室温 30 分
6 DAB 発色	発色基質液	室温 15 分
7 対比染色	ヘマトキシリン	室温 1 分後水洗

10

【 0 0 2 7 】

1 - 1 . 手動操作による方法

20

脱パラフィン後、検体組織スライドを、染色バット中で内因性ペルオキシダーゼブロッキング試薬に浸漬し、室温で30分間処理後、水洗する。標本の余分な水分を取り除き、賦活化試薬に浸漬し、5分間マイクロウェーブ処理する。処理後室温まで十分に冷却した後、水洗し、さらに洗浄液で洗浄する。標本の余分な水分を取り除き、ブロッキング試薬を組織切片に満遍なくいきわたる十分量滴下し、湿潤箱中で、室温30分間反応させる。標本の余分な水分を取り除き、一次抗体を十分量滴下し、湿潤箱中で室温1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する（5分間、3回）。陰性コントロール用検体組織スライドには、一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロールを十分量滴下し、同様に処理する。標本の余分な水分を取り除き、ポリマー試薬を十分量滴下し、湿潤箱中で室温30分間反応させ、洗浄液で洗浄する（5分間3回）。標本の余分な水分を取り除き、検体に基質溶液を所定量滴下もしくは浸漬し、湿潤箱中、もしくは染色つぼ中で室温15分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。標本を対比染色液（例：マイヤーのヘマトキシリン液）で染色した後、水洗する。アルコール系列で脱水して、キシレンで置換後、標本を顕微鏡検査のために載せる。

30

【 0 0 2 8 】

1 - 2 . 自動免疫染色装置による操作方法

検体組織スライド、ブロッキング試薬、一次抗体、一次抗体陰性コントロール、ポリマー試薬、基質溶液、精製水、洗浄液、対比染色液を機器の所定の位置に設置し、それぞれの試薬を所定時間、室温、湿潤状態で反応させる。検体の水分をアルコール、次いでキシレンで置換後、標本を顕微鏡検査のために載せる。

40

【 0 0 2 9 】

< 患者、フォローアップ及び組織サンプル >

この研究は、北里大学病院にて1991年～2006年に前立腺癌と診断され、EMを受けている109人を含むものであった。これらの診断は、前立腺生検または経尿道的切除（TUR）の組織学的検査から確立され、その組織学は1人の病理学者（N.Y.）によって Gleasonシステムに従って再検討された。患者は、2009年改訂TNM分類に従って病期分類された[28]。研究患者に関するその他の詳細は表3に示す。

【 0 0 3 0 】

【表3】

表3

患者の特性			
	安定症例 (n=65)	局所進行症例 (n=44)	p
年齢	73.9±7.6 (53-87)	73.9±5.2 (60-83)	0.6831
Gleason スコア (GS)	7.0±0.8	7.3±0.8	0.0744
GS6/7/8/9	19/29/14/3	6/22/13/3	
開始 PSA (ng/ml)	10.5±16.6 (0.4-124)	22.4±35.7 (0.7-203)	0.0015*
臨床 TNM ステージ I / II / III / IV	51/13/1/0	22/16/6/0	
D'Amico のリスク分類 低/中(Int)/高	15/30/20	4/16/24	
略語: GS, Gleason スコア; Int, 中; PSA, 前立腺特異的抗原 *p 値は有意差を示す。			

10

20

【0031】

治療を受けていない患者は、最初の生検後少なくとも12ヶ月間（平均80ヶ月間であり、範囲は13～215ヶ月間である）追跡され、PSAは少なくとも3回測定された。血清PSAレベルを3ヶ月ごとにモニターした。局所進行（LP）は、以前に報告されたように、直腸診及び/又は放射線検査による臨床T期の増加として定義された[29]。すべての患者は、腹部/骨盤腔及び骨シンチグラフィの胸部X線、CTスキャン又はMRIを少なくとも1年に1回受けて転移の存在を除外した。

30

【0032】

組織サンプルは、腺癌の初期診断時に前立腺生検またはTURによって得られたものであった。これらの検体はすべて10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。各患者由来の1つまたは2つの癌含有生検コアまたはTURチップを選択し、ヘマトキシリン-エオジン染色および免疫組織化学分析に使用した。109人のPC患者から合計172のPC病変が検査された。

【0033】

<免疫組織化学>

組織厚さ4µmの組織切片を記載のように免疫組織化学的に染色した[20、23]。簡潔に述べると、内因性ペルオキシダーゼをメタノール中の1%過酸化水素で30分間ブロックした。抗原回収後、切片を、マウスモノクローナル抗LAT1（2µg/ml、J-Pharma Co., Ltd., Kanagawa, Japan）、ウサギポリクローナル抗LAT2（2µg/ml、Trans Genic Inc., Kumamoto, Japan）、マウスモノクローナル抗CD98（クローンH-300、1:200、Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX）およびマウスモノクローナル抗Ki-67（1:100、Dako, Glostrup, Denmark）を含む一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。抗LAT1および抗LAT2抗体の抗原特異性は、以前に確認されていた[20、30]。ペルオキシダーゼ標識ポリマー（ChemMate EnVisionキット、Dako）で30分間インキュベートした後、サンプルを色素原3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）とともにインキュベートした。核を0.3%メチルグリーンで対比染色した。

40

50

【0034】

<免疫組織化学染色の評価>

LAT1、LAT2およびCD98の発現を、以前に記載したように、わずかな改変とともに評価した[21、23]。腫瘍細胞膜の免疫強度は、4つのカテゴリーに分けられた：0 染色なし；1 弱くまたは斑状に陽性；2 中等度；および3 強く完全な膜染色（図1、A-D）。腫瘍領域の陽性染色は、以下のように分けられた：0 none；1（焦点） 1mm未満；2（部分） 1-2mm；3（拡散） > 2mm。免疫反応性スコアは、領域のスコアと陽性の最高強度とを掛け合わせるによって計算した。すべてのスライドは、臨床情報に盲目化された2人の病理学者（N.Y.およびI.O.）によって得点され、さらなるレビューおよびコンセンサスによって相違する不一致が解決された。免疫反応性スコア4~9は、以前の結果に基づいて、高いと分類され、0~3は低いと分類された[20]。少なくとも1,000細胞あたりのKi-67陽性細胞の数を計数し、Ki-67 LIをパーセンテージとして計算した。全PC病変（ $2.9 \pm 3.5\%$ ）の平均Ki-67 LIおよび以前の結果に基づいて、Ki-67 LIs <3%および3%以上が、それぞれ低および高に分類された[20]。患者あたりの最大値を分析に使用した。

10

【0035】

<統計解析>

データは平均 ± 標準偏差として表した。グループはマンホイットニーU検定を用いて比較した。LAT1、LAT2、CD98のスコアとKi-67LIの相関をスピアマンの順位相関係数検定を用いて分析し、これらのタンパク質の発現と臨床病理学的因子との関係をカイ二乗検定法を用いて分析した。ロジスティック回帰テストを多変量解析として使用した。StatViewソフトウェア（バージョン5.0、Abacus Concepts Inc.、Berkeley、CA）をすべての統計分析に使用し、p値<0.05は統計的に有意であるとみなした。

20

【0036】

<倫理承認>

患者の書面によるインフォームドコンセントとともに組織サンプルを使用した。この研究は、北里大学医学部および北里大学病院倫理委員会（B05-34）の承認を受けた。

【0037】

結果

<患者の特徴>

患者の特徴を表3に示す。109人のPC患者の診断時の平均年齢は 73.9 ± 6.7 歳（53~87歳）であった。D'Amicoのリスク分類は、19人が低リスク（18%）、46人が中リスク（42%）、44人が高リスク（40%）と分類されている。109人の患者のうち、65人（60%）が安定疾患（SD）を有し、44人（40%）がLPを示した。これらの44例のLP患者は、放射線またはホルモン療法を中心とした延期した確定的または全身的治療を受けたが、4例（4%）はこの疾患で死亡した。2005年国際泌尿器病学会のコンセンサス会議のガイドラインに従って[2]、172例のPC病変のうち、1例（0.6%）がGS5、48例（28%）がGS6、77例（45%）がGS7、35例（20%）がGS8、11例（6%）がGS9と分類された。

30

【0038】

<LAT1発現>

いくつかの活性化リンパ球は中程度のLAT1発現を示したが、前立腺の正常な上皮におけるLAT1発現は、無~軽度であった。これらの細胞を内部対照として使用した。ほとんどのPCサンプルは、異常に増加したLAT1発現を示した。LP病変は、SD病変より有意に高いLAT1スコア（ 2.2 ± 1.4 対 1.0 ± 1.0 、 $p < 0.0001$ 、図2A）および強度（ 1.4 ± 0.7 対 0.8 ± 0.7 、 $p < 0.0001$ 、図2B）を示した。さらに、LPを有すると分類された患者は、SDを有すると分類された患者と比較して、顕著に高いLAT1スコア（ 2.5 ± 1.4 対 1.2 ± 1.1 ； $p < 0.0001$ 、図2A）および強度（ 1.6 ± 0.7 対 0.9 ± 0.7 、 $p < 0.0001$ 、図2B）を有していた。GS7病変（ $n=77$ ）であっても、LPとして分類された患者は、SDとして分類された患者より、顕著に高いLAT1スコア（ 2.2 ± 1.3 対 1.1 ± 1.0 、 $p = 0.0002$ ）および強度（ 1.4 ± 0.7 対 0.8 ± 0.7 、 $p = 0.0015$ ）を有していた（図2C）。さらに、各々のD'Amicoリスクカテゴリー内で、LAT1スコア（低 2.3 ± 1.3 対 1.1 ± 0.7 、 $p = 0.0523$ ；中間 2.3 ± 1.1 対 1.0 ± 1.0 、 $p = 0.0006$ ；高 2.

40

50

7±1.6対1.6±1.3、p = 0.0024) および強度 (低 1.8±0.5対0.9±0.6、p = 0.0241 ; 中間 1.3±0.7対0.7±0.8、p = 0.0114、高 1.8±0.7対1.2 ±0.8、p =0.0113) は、SDとして分類される患者より、LPとして分類された患者において有意に高かった (図2D)。最終的に、低GS患者 (GS <7) (n = 25) のうち、LPとして分類される患者 (n = 6) は、SDとして分類される患者 (n=19)より、顕著に高いLAT1スコア (2.5±1.0対0.9±0.7、p=0.0031) および強度 (1.8±0.8対0.8±0.6、p = 0.0072) を有していた (図2E)。

【 0 0 3 9 】

< LAT2およびCD98およびKi-67標識指数の発現 >

前立腺の正常上皮は、極性のない無～軽度のLAT2膜発現を示した。LAT1と同様に、軽度から中程度のLAT2膜発現がいくつかのリンパ球で観察された。LAT2スコア (2.8±1.8対2.1±1.2、p=0.0113) および強度 (1.5±0.6対1.3±0.6 ; LP、p=0.0478) は、SDとして分類される病変より、LPとして分類された病変において有意に高かった。さらに、LAT2スコア (3.4±2.0対2.3±1.3、p = 0.0026) および強度 (1.6±0.6対1.4±0.6、p = 0.0464) は、SDとして分類される患者より、LPとして分類される患者において有意に高かった (データは示さず)。CD98の発現は、正常細胞およびPCにおいて、同じパターンのLAT1発現およびLAT2発現を示したが、LPおよびSDとして分類された患者または病変の間では異ならなかった (データは示さず)。最終的に、Ki-67 LIは、SD病変および患者より、LP病変および患者において、優位に高かった [患者 (3.5±4.0%対2.3±3.0%、p=0.0118) および患者 (4.4±4.6%対2.6±3.1%、p=0.0063)] (データは示さず)。しかしながら、LAT2発現およびCD98発現およびKi-67LIは、LPまたはSDとして分類された低GS患者 (図2E) なら

10

20

【 0 0 4 0 】

< 臨床病理学的特徴および免疫組織化学的所見 >

免疫組織化学的解析の全体的な結果を表4に要約する。LAT1およびLAT2発現、Ki-67 LI、初期PSAおよびD'Amicoリスクカテゴリーは、LPおよびSDとして分類される患者において有意に異なった。

【 0 0 4 1 】

【表 4】

表 4

予後管理下の前立腺癌患者における臨床病理学的因子と局所進行との関連				
		安定症例 (n=65)	局所進行症例 (n=44)	P
年齢				
	<70 歳	17	8	0.4585
	≥70	48	36	
開始 PSA				
	低 (<10ng/ml)	46	17	0.0017*
	高 (≥10)	19	27	
Gleason スコア				
	低 (<7)	19	6	0.0949
	高 (≥7)	46	38	
コアを含有する癌 の数				
	≤3 コア	51	29	0.0923
	>4 コア	9	13	
LAT1 スコア				
	低 (0-3)	64	35	0.0025*
	高 (4-9)	1	9	
LAT1 強度				
	低 (0-1)	54	19	<0.0001*
	高 (2-3)	11	25	
LAT2 スコア				
	低 (0-3)	57	29	0.0125*
	高 (4-9)	8	15	
CD98 スコア				
	低 (0-3)	58	37	0.6186
	高 (4-9)	7	7	
Ki-67 LI				
	低 (<3%)	50	23	0.0132*
	高 (≥3%)	15	21	
D'Amico リスク				
	低 / 中	45	20	0.0223*
	高	20	24	
略語: Int、中; LAT、L型アミノ酸トランスポーター; LI、標識指数; PSA、前立腺特異的抗原; *p 値は有意差を示す。				

< LAT1、LAT2およびCD98の発現、Ki-67 LIおよびGleasonスコアの相関 >

免疫組織化学的に、16病変（9%）はLAT1およびLAT2の両方の発現の高い強度を示し、15（9%）はLAT1、LAT2およびCD98の高い強度を示した。PCにおけるLAT1、LAT2およびCD98発現、Ki-67 LIおよびGSの間の相関を表5に示す。LAT2とCD98は陽性に相関していた（ $\rho = 0.525$ 、 $P < 0.0001$ ）。CD98およびGS（ $\rho = 0.438$ 、 $P < 0.0001$ 、それぞれ）も同様であった。これに対して、LAT1とCD98との間の相関（ $\rho = 0.384$ 、 $P < 0.0001$ ）およびLAT2およびGSとの間の相関（ $\rho = 0.396$ 、 $p < 0.0001$ ）は弱かった。他の相関は見つからなかった。特に、LAT1発現はGSまたはKi-67 LIのいずれにも相関していなかった。

【0043】

【表5】

表5

LAT1、LAT2 および CD98 発現、Ki-67 標識指数および Gleason スコアの相関		
	ρ	p
LAT1 スコア / GS	0.213	0.0053*
LAT1 スコア / LAT2 スコア	0.320	<0.0001*
LAT1 スコア / CD98 スコア	0.384	<0.0001*
LAT1 スコア / Ki-67 LI	0.208	0.0065*
LAT2 スコア / GS	0.396	<0.0001*
LAT2 スコア / CD98 スコア	0.525	<0.0001*
LAT2 スコア / Ki-67 LI	0.160	0.368
CD98 スコア / GS	0.438	<0.0001*
CD98 スコア / Ki-67 LI	0.290	0.0002*
GS / Ki-67 LI	0.263	0.0006*
略語：GS, Gleason スコア；LAT, L 型アミノ酸トランスポーター；LI, 標識指数		
*p 値は有意差を示す。		

【0044】

< 臨床病理学的因子と局所進行との相関の多変量解析 >

多変量ロジスティック回帰分析では、LAT1スコアはLPに対するリスクがより高かった（オッズ比、3.268；95%信頼区間、1.794-5.956、表6）。

【0045】

10

20

30

40

【表6】

表6

予後管理下の前立腺癌患者の臨床病理学的因子と局所進行との相関の多変量ロジスティック回帰分析		
変数	OR (95% CI)	p
開始 PSA	1.024 (1.001 - 1.048)	0.0378*
Gleason スコア	1.153 (0.585 - 2.272)	0.6803
LAT1 スコア	3.268 (1.794 - 5.956)	0.0001*
LAT2 スコア	1.504 (1.048 - 2.159)	0.0268*
CD98 スコア	0.569 (0.364 - 0.889)	0.0133*
Ki-67 LI	1.107 (0.927 - 1.321)	0.2623
略字：CI, 信頼区間；LAT, LAT, L型アミノ酸トランスポーター；LI, 標識指数；OR, オッズ比；PSA, 前立腺特異的抗原 *p 値は有意差を示す。		

10

20

【0046】

ディスカッション

いくつかの最近の報告は、PSAベースのPCスクリーニングがかなりの過剰診断および過剰治療をもたらすという確かな証拠を提供する[31]。1986年以降に米国で導入された血清PSAスクリーニングは、初期段階においても多くのPCの検出をもたらした[32]。しかし、多くの付随的なPCは症状や死を引き起こさないもので、早期発見は過診断と関連していた。実際、PSAの検出は、過剰診断された男性20人ごとに、PCからの1人の死亡を回避すると推定された[32]。さらに、ヨーロッパの試験では、1人のPC死亡を避けるために1,410人の男性をスクリーニングしなければならないと報告された[33]。過度の診断と過度の処置のリスクは、攻撃的なPCと怠惰なPCを強く区別することによって回避することができる。本研究は、LAT1過剰発現がLPを予測することができることを見つけた。これは、LAT1発現がPCの悪性挙動の有用なバイオマーカーであり得ることを示した。LAT2発現およびKi-67 LIは予後バイオマーカーでもあり得るが、LAT1発現のみが、低GS患者(GS <7)および各々のD'Amicoリスク分類群においてLPおよびSDの間で有意に異なっており、これは、LAT1が高グレード悪性度の優れたマーカーであり得ることを示している。さらに、高いLAT1スコアおよび高いLAT1強度の両方がLPと関連しており、これは、癌細胞によるLAT1の高強度発現の存在が腫瘍進行の重要な因子であることを示唆している。前立腺生検は、通常、小さな試料であり、腫瘍面積の評価を制限する。したがって、生検試料のLAT1強度は、より信頼性の高いLPの予後マーカーであり得る。この研究は後向きであるため、前向き試験も必要である。

30

40

【0047】

PSADTを含む上昇した血清PSA濃度は、PC増殖のマーカーであると報告されている[34]。術前のPSA濃度は根治的前立腺切除標本の腫瘍体積と有意に関連するため[36]、PSADTはASの選択基準として使用される[31; 35]。しかしながら、PSAレベルのみでは、PCに対する感度および特異性が低い。上昇したPSAはPCの存在を示唆しているが、過形成および前立腺炎のような前立腺の良性状態を有する男性においても起こる[37]。さらに、一般に正常範囲内にあると考えられる4.0ng/ml以下のPSA濃度を有する男性において生検で検出され

50

たPCはまれではない。したがって、PSAスクリーニングおよびPSADT評価だけでは、PCの進行が見逃される可能性がある。我々の知見は、前立腺生検におけるLAT1発現の免疫組織化学的スクリーニングが、進行性疾患を有する患者を同定するために使用され得ることを示唆している。GS、血清PSAおよびKi-67 LIのような従来のバイオマーカーと共に、LAT1発現はLPと一緒に予測する可能性がある。

【 0 0 4 8 】

LAT1は様々な器官の癌細胞の細胞膜で発現していることが報告されており[17; 18; 19; 20; 21; 23]、必須アミノ酸を積極的に取り込むと考えられている。対照的に、多くの正常細胞は、第2のLイソフォームであるLAT2を遍在的に発現する[16; 39]。しかし、LAT2とLAT1のアミノ酸の特異性と親和性は異なる[16]。LAT1のN末端ペプチド(アミノ酸1~52)に対するモノクローナル抗体を用いて、我々は、高LAT1発現が、他の癌の所見と同様に、進行性PCと関連していることを発見した[19; 20; 21; 23]。さらに、いくつかのLAT1阻害剤は癌細胞株の増殖を阻害することが報告されている。これらの阻害剤の一つであるJPH203 (KYT-0353) は、インビトロおよびインビボのヒト結腸癌細胞の増殖を有意に阻害し[40]、別の阻害剤である2-アミノピシクロ-(2,2,1)-ヘプタン-2-カルボン酸は、肺癌細胞の生存能力を減少させた[41]。これらは、LAT1阻害剤が癌化学療法において臨床的に有用であり得ることを示唆している。これらの結果は、LAT1阻害剤が、特に、高レベルのLAT1を発現するヒト悪性腫瘍に対して有効であることを示している。

【 0 0 4 9 】

我々は、以前に、LAT1発現がPCにおいて信頼できる予後マーカーであり得ることを実証した[20]。他のグループは、LAT1発現とGSとの間に有意な相関を報告した[42]。しかし、我々の以前の研究と現在の研究の両方とも、LAT1発現とGSとの間に有意な相関はないことを見出した[20]。これらの相違は、検体の違いや、生検や根治的前立腺切除標本の使用の違いによるものかもしれない。高い増殖活性を有する腫瘍細胞がLAT1過剰発現を示すことは合理的であるが、GSは低倍率で検査した腫瘍の全体的な増殖パターンに基づく組織学的格付けの系である[4]。従って、GSは、LAT1発現とは異なり、増殖活性よりも腫瘍分化とより強く関連していると考えられる。我々の知見と一致して、LAT1発現と胃癌、膵癌および胆管癌における腫瘍の分化との関連は観察されていない[18; 21; 23]。この研究では観察されなかったが、LAT1発現は、Ki-67 LIと有意に相関することが見出されており[18; 19; 43]、これは、LAT1と増殖活性とのより密接な関連を示唆している。LAT1発現およびGSは、PCを評価してLPを予測するために互いに補完するかもしれない。

【 0 0 5 0 】

LAT発現は、ヒトPC細胞系において報告されている。さらに、初代PCではLAT3の発現が増加しており、転移ではLAT1の発現が増加している[44]。アンドロゲン受容体シグナル伝達は、一次PCにおいてLAT3転写を活性化し得る一方で、ATF4翻訳をもたらすホルモン切断療法から生じるアンドロゲンシグナル伝達およびLAT3発現の低下は、LAT1転写を開始し得る[44]。PC細胞株におけるLAT3またはLAT1発現のノックダウンは、インビトロおよびインビボの両方において、mTORC1経路活性化ならびに細胞増殖および細胞周期を阻害することが見出されている[45]。これは、PC細胞におけるLATの重要性を示している。興味深いことに、我々は異常なLAT2発現を初めてPCで免疫組織化学的に観察した。我々は、ヒトのPC組織におけるLAT3を調べることができず、さらなる研究の必要性を示唆している。

【 0 0 5 1 】

結論

結論として、我々の知見は、PCにおけるLAT1発現の上昇が高グレード悪性度の新規なバイオマーカーであることを示唆した。GSとは無関係に、異常なLAT1過剰発現を用いて、医学的に治療すべきPCの積極的な表現型をスクリーニングすることができる。前立腺生検は、通常、小さな試料であり、腫瘍領域の評価を制限する。したがって、前立腺生検試料中のLAT1強度は、LPのより信頼できる予後マーカーであり得る。特に、我々は、積極的監視を受けることができる人をスクリーニングするために、低リスク患者のPCに対するLAT1評価を提案する。いくつかのLAT1阻害剤が癌細胞増殖を抑制することが判明しているので、

10

20

30

40

50

LAT1の阻害は、PCおよび他のヒト癌の治療戦略の可能性がある。

【 0 0 5 2 】

文献

- [1] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64 (2014), 9-29.
- [2] J.I. Epstein, W.C. Allsbrook, Jr., M.B. Amin, and L.L. Egevad, The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29 (2005), 1228-1242.
- [3] D.F. Gleason, Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 23 (1992), 273-279. 10
- [4] D.F. Gleason, and G.T. Mellinger, Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111 (1974), 58-64.
- [5] D.G. Bostwick, Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. *Am J Surg Pathol* 18 (1994), 796-803.
- [6] S.E. Spires, M.L. Cibull, D.P. Wood, Jr., S. Miller, S.M. Spires, and E.R. Banks, Gleason histologic grading in prostatic carcinoma. Correlation of 18-gauge core biopsy with prostatectomy. *Arch Pathol Lab Med* 118 (1994), 705-708.
- [7] J.C. Presti, Jr., K. Shinohara, P. Bacchetti, V. Tigrani, and V. Bhargava, Positive fraction of systematic biopsies predicts risk of relapse after radical prostatectomy. *Urology* 52 (1998), 1079-1084. 20
- [8] R.A. Badalament, M.C. Miller, P.A. Peller, D.C. Young, D.K. Bahn, P. Kochie, G.J. O'Dowd, and R.W. Veltri, An algorithm for predicting nonorgan confined prostate cancer using the results obtained from sextant core biopsies with prostate specific antigen level. *J Urol* 156 (1996), 1375-1380.
- [9] M.K. Terris, D.J. Haney, I.M. Johnstone, J.E. McNeal, and T.A. Stamey, Prediction of prostate cancer volume using prostate-specific antigen levels, transrectal ultrasound, and systematic sextant biopsies. *Urology* 45 (1995), 75-80.
- [10] A. de la Taille, M.A. Rubin, E. Bagiella, C.A. Olsson, R. Buttyan, T. Burchardt, C. Knight, K.M. O'Toole, and A.E. Katz, Can perineural invasion on prostate needle biopsy predict prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy? *J Urol* 162 (1999), 103-106. 30
- [11] N. Yanagisawa, R. Li, D. Rowley, H. Liu, D. Kadmon, B.J. Miles, T.M. Wheeler, and G.E. Ayala, Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy. *Hum Pathol* 38 (2007), 1611-1620.
- [12] R. Arora, M.O. Koch, J.N. Eble, T.M. Ulbright, L. Li, and L. Cheng, Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 100 (2004), 2362-2366.
- [13] P.D. Sved, P. Gomez, M. Manoharan, S.S. Kim, and M.S. Soloway, Limitations of biopsy Gleason grade: implications for counseling patients with biopsy Gleason score 6 prostate cancer. *J Urol* 172 (2004), 98-102. 40
- [14] A. Heidenreich, P.J. Bastian, J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, T. van der Kwast, M. Mason, V. Matveev, T. Wiegel, F. Zattoni, and N. Mottet, EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol* 65 (2014), 124-137.
- [15] A.E. Ross, S. Loeb, P. Landis, A.W. Partin, J.I. Epstein, A. Kettermann, Z. Feng, H.B. Carter, and P.C. Walsh, Prostate-specific antigen kinetics during follow-up are an unreliable trigger for intervention in a prostate cancer surveillance program. *J Clin Oncol* 28 (2010), 2810-2816. 50

- [16] H. Segawa, Y. Fukasawa, K. Miyamoto, E. Takeda, H. Endou, and Y. Kanai, Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274 (1999), 19745-19751.
- [17] Y. Kanai, H. Segawa, K. Miyamoto, H. Uchino, E. Takeda, and H. Endou, Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273 (1998), 23629-23632.
- [18] M. Ichinoe, T. Mikami, T. Yoshida, I. Igawa, T. Tsuruta, N. Nakada, N. Anzai, Y. Suzuki, H. Endou, and I. Okayasu, High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol Int* 61 (2011), 281-289. 10
- [19] K. Kaira, N. Oriuchi, H. Imai, K. Shimizu, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Hisada, T. Ishizuka, Y. Kanai, T. Nakajima, and M. Mori, Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 66 (2009), 120-126.
- [20] T. Sakata, G. Ferdous, T. Tsuruta, T. Satoh, S. Baba, T. Muto, A. Ueno, Y. Kanai, H. Endou, and I. Okayasu, L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int* 59 (2009), 7-18.
- [21] N. Yanagisawa, M. Ichinoe, T. Mikami, N. Nakada, K. Hana, W. Koizumi, H. Endou, and I. Okayasu, High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 65 (2012), 1019-1023. 20
- [22] N. Nakada, T. Mikami, K. Hana, M. Ichinoe, N. Yanagisawa, T. Yoshida, H. Endou, and I. Okayasu, Unique and selective expression of L-amino acid transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of oncofetal protein. *Histol Histo pathol* 29 (2014), 217-227.
- [23] N. Yanagisawa, K. Hana, N. Nakada, M. Ichinoe, W. Koizumi, H. Endou, I. Okayasu, and Y. Murakumo, High expression of L-type amino acid transporter 1 as a prognostic marker in bile duct adenocarcinomas. *Cancer Med* 3 (2014), 1246-1255. 30
- [24] M.F. Wempe, P.J. Rice, J.W. Lightner, P. Jutabha, M. Hayashi, N. Anzai, S. Wakui, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, and H. Endou, Metabolism and pharmacokinetic studies of JPH203, an L-amino acid transporter 1 (LAT1) selective compound. *Drug Metab Pharmacokinet* 27 (2014), 155-161.
- [25] D.W. Yun, S.A. Lee, M.G. Park, J.S. Kim, S.K. Yu, M.R. Park, S.G. Kim, J.S. Oh, C.S. Kim, H.J. Kim, H.S. Chun, Y. Kanai, H. Endou, M.F. Wempe, and K. Kim do, JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells. *J Pharmacol Sci* 124 (2014), 208-217.
- [26] Y. Asano, Y. Inoue, Y. Ikeda, K. Kikuchi, T. Hara, C. Taguchi, T. Tokushige, H. Maruo, T. Takeda, T. Nakamura, T. Fujita, Y. Kumagai, and K. Hayakawa, Phase I clinical study of NMK36: a new PET tracer with the synthetic amino acid analogue anti-[18F]FACBC. *Ann Nucl Med* 25 (2011), 414-418. 40
- [27] Y. Inoue, Asano. Y., Satoh, T., Tabata, K., Kikuchi, K., Woodhams, R., Baba, S., Hayakawa, K., Phase IIa Clinical Trial of Trans-1-Amino-3-18F-Fluoro- Cyclobutane Carboxylic Acid in Metastatic Prostate Cancer. *Asia Oceania J Nucl Med Biol* 2 (2014), 87-94.
- [28] L. Sobin, M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, (Eds.), *UICC;TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th edn., Wiley-Blackwell, Oxford, 2009.
- [29] R.T. Vollmer, S. Egawa, S. Kuwao, and S. Baba, The dynamics of prostate specific antigen during watchful waiting of prostate carcinoma: a study of 94 Japan 50

ese men. *Cancer* 94 (2002), 1692-1698.

[30] R. Kurayama, N. Ito, Y. Nishibori, D. Fukuhara, Y. Akimoto, E. Higashihara, Y. Ishigaki, Y. Sai, K. Miyamoto, H. Endou, Y. Kanai, and K. Yan, Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 91 (2011), 992-1006.

[31] L.H. Klotz, Active surveillance with selective delayed intervention: walking the line between overtreatment for indolent disease and undertreatment for aggressive disease. *Can J Urol* 12 Suppl 1 (2005), 53-57; discussion 101-102.

[32] H.G. Welch, and P.C. Albertsen, Prostate cancer diagnosis and treatment after the introduction of prostate-specific antigen screening: 1986-2005. *J Natl Cancer Inst* 101 (2009), 1325-1329.

[33] G. Draisma, R. Boer, S.J. Otto, I.W. van der Cruijsen, R.A. Damhuis, F.H. Schroder, and H.J. de Koning, Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 95 (2003), 868-878.

[34] H.P. Schmid, J.E. McNeal, and T.A. Stamey, Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer* 71 (1993), 2031-2040.

[35] Y. Takechi, T. Kamoto, T. Shiraishi, O. Ogawa, Y. Suzukamo, S. Fukuhara, Y. Saito, K. Tobisu, T. Kakizoe, T. Shibata, H. Fukuda, K. Akakura, H. Suzuki, N. Shinohara, S. Egawa, A. Irie, T. Sato, O. Maeda, N. Meguro, Y. Sumiyoshi, T. Suzuki, N. Shimizu, Y. Arai, A. Terai, T. Kato, T. Habuchi, H. Fujimoto, and M. Niwakawa, Prospective evaluation of selection criteria for active surveillance in Japanese patients with stage T1cN0M0 prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol* 38 (2008), 122-128.

[36] T.A. Stamey, and J.N. Kabalin, Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J Urol* 141 (1989), 1070-1075.

[37] W.J. Catalona, D.S. Smith, T.L. Ratliff, K.M. Dodds, D.E. Coplen, J.J. Yuan, J.A. Petros, and G.L. Andriole, Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 324 (1991), 1156-1161.

[38] I.M. Thompson, D.K. Pauler, P.J. Goodman, C.M. Tangen, M.S. Lucia, H.L. Parnes, L.M. Minasian, L.G. Ford, S.M. Lippman, E.D. Crawford, J.J. Crowley, and C.A. Coltman, Jr., Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 350 (2004), 2239-2246.

[39] M. Pineda, E. Fernandez, D. Torrents, R. Estevez, C. Lopez, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano, and M. Palacin, Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274 (1999), 19738-19744.

[40] K. Oda, N. Hosoda, H. Endo, K. Saito, K. Tsujihara, M. Yamamura, T. Sakata, N. Anzai, M.F. Wempe, Y. Kanai, and H. Endou, L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* 101 (2010), 173-179.

[41] H. Imai, K. Kaira, N. Oriuchi, K. Shimizu, H. Tominaga, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Ishizuka, S. Nagamori, K. Promchan, T. Nakajima, N. Yamamoto, M. Mori, and Y. Kanai, Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 30 (2010), 4819-4828.

[42] A. Segawa, S. Nagamori, Y. Kanai, N. Masawa, and T. Oyama, L-type amino acid transporter 1 expression is highly correlated with Gleason score in prostate c

10

20

30

40

50

ancer. Mol Clin Oncol 1 (2013), 274-280.

[43] H. Imai, K. Kaira, N. Oriuchi, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Ishizuka, Y. Kanaï, H. Endou, T. Nakajima, and M. Mori, L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer. Histopathology 54 (2009), 804-813.

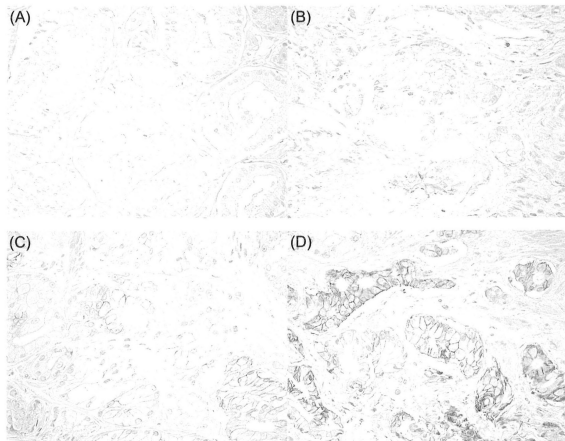
[44] Q. Wang, C.G. Bailey, C. Ng, J. Tiffen, A. Thoeng, V. Minhas, M.L. Lehman, S.C. Hendy, G. Buchanan, C.C. Nelson, J.E. Rasko, and J. Holst, Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. Cancer Res 71 (2011), 7525-7536.

[45] Q. Wang, T. Grkovic, J. Font, S. Bonham, R.H. Powner, C.G. Bailey, A.M. Moran, R.M. Ryan, J.E. Rasko, M. Jormakka, R.J. Quinn, and J. Holst, Monoterpene Glycoside ESK246 from Pittosporum Targets LAT3 Amino Acid Transport and Prostate Cancer Cell Growth. ACS Chem Biol 9 (2014), 1369-1376.

10

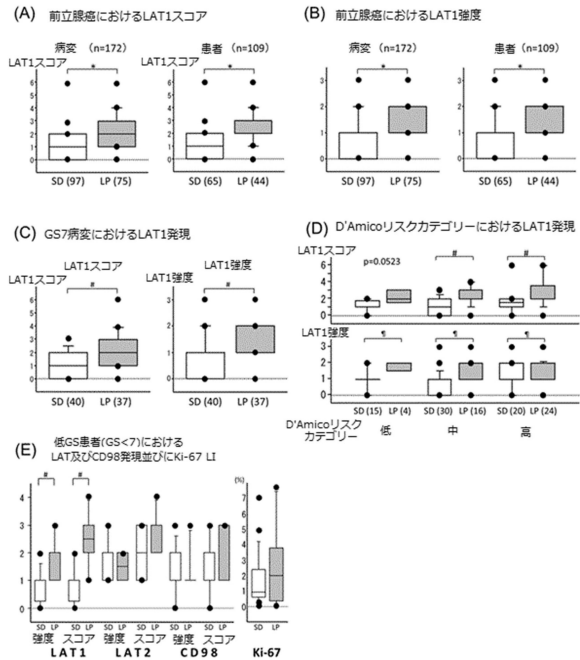
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2



 フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I
C 1 2 Q	1/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08

(56) 参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 9 6 4 1 6 (W O , A 1)

Nobuyuki Yanagisawa, L-amino acid transporter 1 may be a prognostic marker for local progression of prostatic cancer under expectant management, Cancer Biomarkers, 2015年, Vol.15 No.4, Page.365-374

SAKATA Takeshi, L-TYPE AMINO-ACID TRANSPORTER 1 AS A NOVEL BIOMARKER FOR HIGH-GRADE MALIGNANCY IN PROSTATE CANCER, PATHOL INT, 2009年, VOL.59 NO.1, PAGE.7-18

大槻英男, 前立腺癌に対する抗LAT療法の基礎的検討, 第127回 日本薬理学会関東部会 プログラム・要旨集, 2012年, Page.51 YIA-4

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

G 0 1 N 3 3 / 4 8

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 7 7

C 0 7 K 1 6 / 3 0

C 1 2 P 2 1 / 0 8

C 1 2 Q 1 / 2 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	用于确定前列腺癌恶性程度的试剂盒和方法		
公开(公告)号	JP6683722B2	公开(公告)日	2020-04-22
申请号	JP2017545431	申请日	2016-03-10
申请(专利权)人(译)	杰制药社		
当前申请(专利权)人(译)	杰制药社		
[标]发明人	柳澤信之 岡安勲		
发明人	柳澤 信之 岡安 勲		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/577 C07K16/30 C12Q1/28 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/28 G01N33/53 G01N33/57434 G01N2800/56 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/577.B C07K16/30.ZNA C12Q1/28 C12P21/08		
审查员(译)	三木隆		
优先权	62/131679 2015-03-11 US		
其他公开文献	JP2018509618A5 JP2018509618A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于确定(诊断)前列腺癌恶性肿瘤并预测患者预后的试剂盒和方法。我们的发现表明,PC中升高的LAT1表达是高级别恶性肿瘤的新型生物标志物。独立于GS,异常的LAT1过表达可用于筛选应行药物治疗的PC的侵袭性表型。前列腺活检通常是小样本,限制了肿瘤区域的评估。因此,前列腺活检样本中的LAT1强度可能是更可靠的LP预后标志物。特别是,我们建议针对低危患者的PC进行LAT1评估,以筛查可以接受主动监测的患者。已经发现几种LAT1抑制剂可抑制癌细胞的增殖,因此抑制LAT1可能是PC癌和其他人类癌症的潜在治疗策略。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6683722号 (P6683722)
(45) 発行日 令和2年4月22日(2020.4.22)	(24) 登録日 令和2年3月30日(2020.3.30)	
(5) Int. Cl. F I		
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574	D
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48	P
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D
GO1N 33/577 (2006.01)	GO1N 33/577	B
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30	ZNA
請求項の数 4 (全 19 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2017-545431 (P2017-545431)	(73) 特許権者 506334311 ジェイファーマ株式会社 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1	
(86) (22) 出願日 平成28年3月10日(2016.3.10)	(74) 代理人 100105315 弁理士 伊藤 温	
(65) 公表番号 特表2018-509618 (P2018-509618A)	(72) 発明者 柳澤 信之 日本国神奈川県横浜市片瀬海岸3-24-2 22-409	
(43) 公表日 平成30年4月5日(2018.4.5)	(72) 発明者 岡安 勲 日本国東京都杉並区高井戸東1-31-3 -219	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2016/001361	審査官 三木 隆	
(87) 国際公開番号 W02016/143356		最終頁に続く
(87) 国際公開日 平成28年9月15日(2016.9.15)		
審査請求日 平成31年2月22日(2019.2.22)		
(31) 優先権主張番号 62/131,679		
(32) 優先日 平成27年3月11日(2015.3.11)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(54) 【発明の名称】 前立腺癌の悪性度を決定するためのキット及び方法		