

(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2008-278798

(P2008-278798A)

(43) 公開日 平成20年11月20日(2008.11.20)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|------------------------------|----------------|-------------|
| C12Q 1/68 (2006.01) | C12Q 1/68 ZNAA | 4B063 |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 M | |
| GO1N 33/574 (2006.01) | GO1N 33/574 A | |

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 20 頁)

| | | | |
|---|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2007-125838 (P2007-125838) | (71) 出願人 | 504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島1-5-45 |
| (22) 出願日 | 平成19年5月10日(2007.5.10) | (71) 出願人 | 591083336 株式会社ビー・エム・エル 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号 |
| 特許法第30条第1項適用申請有り 2007年4月24日 インターネットアドレス「http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/」に発表 | | (74) 代理人 | 100103160 弁理士 志村 光春 |
| | | (72) 発明者 | 稲澤 譲治 東京都練馬区東大泉5丁目43番地1-904号 |
| | | (72) 発明者 | 井本 逸勢 東京都文京区本郷3丁目23番地3-406 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膀胱癌の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 膀胱癌の悪性度まで含めて検出可能な、遺伝子レベルの検出手段を提供すること。

【解決手段】 ヒトK L K 5、ヒトK L K 6、ヒトK L K 8及びヒトK L K 9、からなる群から選ばれる1種以上を、核酸又はタンパク質として検出し、当該検出高値を指標として膀胱癌を検出することにより、上記の課題を解決し得ることを見出し、本発明を完成した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト K L K 5、ヒト K L K 6、ヒト K L K 8、及び、ヒト K L K 9、からなる群から選ばれる 1 種以上を、核酸又はタンパク質として検出し、当該検出高値を指標として膀胱癌を検出することを特徴とする、膀胱癌の検出方法。

【請求項 2】

核酸が、ゲノム DNA 又は mRNA であることを特徴とする、請求項 1 記載の膀胱癌の検出方法。

【請求項 3】

膀胱癌の悪性度が検出されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の膀胱癌の検出方法。

10

【請求項 4】

膀胱癌の悪性度が、膀胱癌の浸潤能として示されることを特徴とする、請求項 3 記載の膀胱癌の検出方法。

【請求項 5】

膀胱癌の悪性度が、癌転移の可能性として示されることを特徴とする、請求項 3 又は 4 記載の膀胱癌の検出方法。

【請求項 6】

前記検出方法における検出手段が、DNA チップ法、サザンプロット法、ノーザンプロット法、リアルタイム RT-PCR 法、FISH 法、CGH 法、又は、免疫染色法、であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の膀胱癌の検出方法。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、癌の検出方法に関する発明である。より具体的には、本発明での癌の検出方法は、膀胱癌の検出方法に関し、特に、膀胱癌の悪性度を診断するために、さらには癌の浸潤を正確に予測するために、特定のカリクレイン（省略標記：K L K）遺伝子ファミリーの遺伝子増幅、遺伝子の発現レベル及びタンパク質のレベルを検出することを特徴とする発明である。

【背景技術】

30

【0002】

膀胱癌は、最も一般的な泌尿器領域の癌である。膀胱癌では浸潤（筋層浸潤とも言う）の程度がリンパ節や遠隔転移の頻度と相関することが知られている。膀胱癌の 7 割から 8 割は浸潤のない表在性の癌である。表在性膀胱癌の患者は経尿道的腫瘍切除を受け、その後、一部の患者では、膀胱内の免疫療法 / 化学療法で治療を受ける。その結果、表在性膀胱癌の患者の 5 年間の生存率は 90% に近い。しかし、表在性膀胱癌の患者の 5 割から 7 割は再発し、その後、再発した患者の 5～20% は筋層に浸潤する膀胱癌へと進展することが知られている。

【0003】

一方、膀胱癌患者の 2 割から 3 割は、筋層に浸潤する膀胱癌である。これらの患者については一般に膀胱全摘除術が行われ、その結果、尿路変更が必要となり、QOL (Quality of Life) が著しく低下する。そして、筋層に浸潤する膀胱癌の患者の過半数では、癌の再発及び転移が起こり、5 年生存率は約 6 割であり、主要な死亡原因は、膀胱癌の再発と転移である。

40

【0004】

このような状況下で膀胱癌の浸潤を正確に診断し、再発と癌の進行を予測することが極めて重要である。このような予測が簡便に行われることにより、膀胱癌の重篤度に対応した治療を行い、個々の膀胱癌患者の QOL を改善する効果が期待できる。

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】**

50

【 0 0 0 5 】

現状の膀胱癌の検査方法は、膀胱腫瘍抗原（省略標記：B T A）、核マトリックスプロテイン22（省略標記：N M P 2 2）、塩基性フェトプロテイン（省略標記：B F P）、テロメラゼ、C A - 5 0、I V型コラーゲン、組織ポリペプチド抗原（省略標記：T P A）、Fibrinogen degradation products（省略標記：F D P）等の尿中に出現する腫瘍マーカーの検出を行うものが主流であるが、これらの腫瘍マーカーでは、膀胱癌の悪性度、具体的には、癌の筋層への浸潤の度合いをモニタリングすることは困難である。しかしながら、この癌の浸潤の度合いを主要な指標とする癌の悪性度は、当該癌のリンパ節転移や遠隔転移の可能性を予測する上での本質的な要素となるものである。癌細胞では癌遺伝子、及び、細胞周期に關与する遺伝子等が増幅し、癌の悪性化に關与している例が報告されているが、膀胱癌においても、癌の浸潤に深く關与する遺伝子群を見出し、膀胱癌の悪性度をも検出することが可能な膀胱癌の検出手段を見出すことは、膀胱癌の治療上、極めて重要である。

10

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明が解決すべき課題は、膀胱癌の上記の悪性度をも検出することが可能な、癌の検出手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

今般、発明者は、ヒト膀胱癌細胞のゲノム異常を、全染色体を網羅的に解析するために4523種類のBAC DNAを搭載した高密度ゲノムアレイであるMCG Whole Genome Array-4500上でComparative Genomic Hybridization（CGH）を行い、さらに、FISH解析を行うことにより、膀胱癌細胞で増幅や欠失している染色体の領域を同定した。その結果、特定のK L K遺伝子の高レベルの増幅が認められることが判明した。そして、当該膀胱癌細胞の浸潤能を検討した結果、特定のK L K遺伝子ファミリーの染色体上での増幅を、上記の膀胱癌の悪性度の指標として用いることが可能であることを見出し、本発明を完成した。

20

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は、ヒトK L K 5、ヒトK L K 6、ヒトK L K 8、及び、ヒトK L K 9、からなる群から選ばれる1種以上を、核酸又はタンパク質として検出し、当該検出高値を指標として膀胱癌を検出することを特徴とする、膀胱癌の検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。なお、ここで「核酸」は、DNA又はRNA全般を意味するもので特に限定されるものではないが、最も典型的には、ゲノムDNA又はmRNAが挙げられる。

30

【 0 0 0 9 】

本検出方法における膀胱癌の検出の指標となる特定のK L Kは、上述のようにカリクレイン（Kallikrein）の略称である。カリクレインは、多様な生理活性を有するセリンプロテアーゼに属する蛋白質分解酵素の一群として知られている。ヒトにおいて、カリクレインをコードする遺伝子（K L K遺伝子）は、19番染色体上に15種類のカリクレインのサブファミリー遺伝子を構成しており、本検出方法における検出指標となる4種のカリクレインは、当該サブファミリー遺伝子の中から選択されるものである。これらの中で、K L K 3 mRNAから翻訳されたh K 3（通称前立腺癌抗原：P S A）は、前立腺癌の検査、診断、癌のステージ及び癌のモニタリングに關して広く使用され、その有用性は広く知られている（Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E.: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate, New England Journal of Medicine, 317, 909-916, 1987）。

40

【 0 0 1 0 】

ヒトにおけるK L K 5、6、8及び9（以下、特に断らない限り、本明細書中においてK L K又はカリクレインと記載した場合には、ヒトのK L K又はカリクレインを意味することとする）は、それぞれ、これらのアミノ酸配列とそれをコードする遺伝子配列は公開されている。具体的には、K L K 5（AF135028：配列番号1）、K L K 6（HUF62801：配

50

列番号 2)、K L K 8 (AB009849: 配列番号 3)、K L K 9 (AF135026: 配列番号 4)として公開されている。これらの中で、K L K 6 遺伝子は、卵巣癌の染色体上での増幅を伴い高発現していることが知られている (Ni X, Zhang W, Huang KC et.al.: Characterisation of human kallikrein6/ protease M expression in ovarian cancer, British Journal of Cancer 91, 725-731, 2004)。K L K 6 以外の K L K 遺伝子は癌で増幅していることは知られていない。

【 0 0 1 1 】

よって、当業者は、これらの情報を基にして、通常公知の方法により、これらのカリクレインタンパク質、当該タンパク質に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、当該タンパク質をコードする遺伝子を調製することが可能であり、これらを本検出方法にて必要に応じて用いることができる。

10

【 0 0 1 2 】

本検出方法は、膀胱癌と疑われる対象の生検により、得られた検体における遺伝子レベルでの検出又は免疫組織化学染色等によるタンパク質の検出を行い、さらには、血液検体中の対象タンパク質の検出を行うことにより、実施することができる。

【 0 0 1 3 】

[検出対象]

本検出方法の検出対象は、前述した通り、膀胱癌であるが、実質的には、膀胱癌の中でも約 90% を占める移行上皮癌である。その他、扁平上皮癌や線癌が、膀胱癌の類型として知られているが、本検出方法の主要な対象は移行上皮癌である。本発明における膀胱癌は、特に断らない限り、移行上皮癌を意味することとする。

20

【 0 0 1 4 】

膀胱癌 (移行上皮癌) のうち、筋層への浸潤が認められない表在性のものは約 70% であり、筋層まで浸潤する浸潤性のものは約 30% である。

【 0 0 1 5 】

膀胱癌の診断は、B T A、N M P 2 2、B F P、テロメラゼ、C A - 5 0、I V 型コラーゲン、T P A、F D P 等の尿中に出現する腫瘍マーカーが用いられ、腫瘍の存在の確認のために、腹部超音波検査、さらには、膀胱癌の種類や悪性度の確認のために、膀胱鏡による生検が行われる。しかしながら、膀胱癌が表在性が浸潤性かについて、一見して判断を下すことは、熟練を要する困難な作業である。

30

【 0 0 1 6 】

膀胱癌が表在性の場合には、膀胱の温存を目指して、経尿道的膀胱腫瘍切除術 (T U R - B t) が治療の基本となり、浸潤性の場合には膀胱全摘が治療の基本となる。膀胱全摘の場合には、尿路の変更、自排尿型膀胱の形成等が必要であり、Q O L が著しく損なわれることになる。よって、膀胱癌が表在性が浸潤性かにより治療方針が大きく異なり、被験者がいずれの型の膀胱癌であるのかを検出することは非常に重要な事柄である。また、当初は表在型であっても、癌の進行により癌が筋層に徐々に食い込み、浸潤性に移行する傾向が強いため、早期の悪性度や進行度を含めた診断が必要とされる。また、癌が当初より悪性度が高い、すなわち、浸潤性が高いものであればあるほど、リンパ節転移や遠隔転移の可能性が大きくなり、このような理由からも、悪性度や進行度の診断の早期化が必要となる。

40

【 0 0 1 7 】

[本検出方法]

本検出方法の指標となる、K L K 5、K L K 6、K L K 8、及び、K L K 9、から選ばれる 1 種以上 (以下、本発明の K L K ともいう) の核酸又はタンパク質は、いずれも、膀胱癌の悪性度と進行度に順相関して、その遺伝子発現量 (核酸量) 又はタンパク質量が増加する。よって、本発明の K L K の核酸又はタンパク質の検出高値を指標として、膀胱癌の存在と共に、その悪性度と進行度を検出することができる。前述したように、膀胱癌の悪性度は、膀胱の筋層への浸潤度と順相関の関係にあるので、被験者の生検試料における本発明の K L K の核酸又はタンパク質を直接検出する場合には、その生検試料自体が、悪

50

性であるのか否かのみならず、筋層への浸潤力の強い癌であるのか否か、又は、検出時点での癌の進行度を検出することができる。

【0018】

すなわち、はじめて本検出方法を適用する被験者の場合には、生検試料から、初診時の膀胱癌の悪性度又は進行度を的確に判断し、具体的な治療方針の確定に大きく役立てることができる。具体的には、本発明のK L Kの核酸又はタンパク質の値が、表在性の膀胱癌又は良性の腫瘍において認められる低値又は陰性値であれば、当該腫瘍に対して表在性の膀胱癌に適用すべき治療方針を原則とする判断を下すことが可能となる。

【0019】

また、膀胱癌の継続治療中の被験者の場合、本発明のK L K値の核酸又はタンパク質が以前の検出値よりも大きくなっている場合、又は、はじめて危険値（膀胱癌の筋層への浸潤を示唆する最低値）を上回った場合には、治療中の膀胱癌の進行や再発を意味することとなり、治療方針の変更を考慮する根拠とすることが可能である。

10

【0020】

本検出方法において検出対象となる検体を血液検体、すなわち、血清、血漿、全血等とする場合には、検査時における被験者の身体的な負担がわずかで済むために、一般的検診レベルでの、悪性度までを含めた膀胱癌の検出を行うことが可能である。このような血液検体を用いる場合も、上記の生検検体の場合と同様に、膀胱癌（良性腫瘍を含む）の確定している被験者や、継続的な膀胱癌のモニタリングを行っている被験者に対して行うことも可能である。さらに、本検出方法の検体として、尿検体を用いることも可能であり、この場合もまた、血液検体と同様に本検出方法を行うことができる。

20

【0021】

ここで、本発明のK L Kの核酸とは、本発明のK L Kをコードする遺伝子のゲノムDNA、当該遺伝子を鋳型として発現するmRNA、当該mRNAを鋳型とするcDNA、が該当する。また、本発明のK L Kのタンパク質とは、生体内、特に血中に存在するK L Kのタンパク質である。

【0022】

本検出方法においては、DNAチップ法、サザンプロット法、ノーザンプロット法、リアルタイムRT-PCR法、FISH法、CGH法、又は、免疫染色法、等を用いて、本発明のK L Kの核酸又はタンパク質の検出を行うことができる。

30

【0023】

すなわち、DNAチップ法においては、本発明のK L Kをコードする遺伝子DNA、mRNAを鋳型とするcDNA又は当該遺伝子配列の一部を有する合成オリゴヌクレオチド、を定着させたDNAチップと、被験者からの核酸試料（主に生検組織から常法にて抽出したmRNAを逆転写酵素反応により標識したものを）を接触させて、当該チップ上のDNAとハイブリダイズした核酸試料の提供者における本発明のK L K遺伝子の存在又は不存在を、また、存在量の多少を、蛍光標識等により検出することが可能である。

【0024】

サザンプロット法においては、被験者からの核酸試料を制限酵素消化し、それを電気泳動後、ニトロセルロース膜上に固定し、これと、本発明のK L K遺伝子（標識されたDNA）とのハイブリダイズを検出することにより、検体中の当該ゲノム遺伝子の存在量を検出する方法である。また、上記DNAのかわりにmRNAを用いたノーザンプロット法により、検体中の本発明のK L K遺伝子量を検出することも可能である。

40

【0025】

リアルタイムRT-PCR法においては、被験者からの核酸試料（cDNA）における本発明のK L K遺伝子の既知の遺伝子配列（前出）の全部又は一部を、当該遺伝子配列に相補的な増幅用プライマーを用いて遺伝子増幅産物として得ることにより、核酸試料における本発明のK L Kの有無及び存在量を検出することが可能である。

【0026】

免疫染色法においては、生検検体における本発明のK L Kタンパク質を、当該タンパク

50

質に対して特異的な抗体（モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体：既知の本発明の K L K 遺伝子又はタンパク質（通常は組換えタンパク質）を用いて常法により調製することが可能である）を用いて、本発明の K L K タンパク質に対する標識された抗体を用いた直接抗体結合法により直接的に、又は、好適には、標識された第 2 若しくは第 3 抗体を用いた二重抗体法又は三重抗体法により間接的に検出することが可能である。ここに述べた免疫染色法は常法に従い行うことができる。

【 0 0 2 7 】

また、本発明の K L K ゲノム遺伝子の検出を直接的に行うことができる代表的な方法として、C G H (Comparative Genomic Hybridization) 法と F I S H 法[蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH: Fluorescence in situ hybridization) :Yasui,K., Imoto,I., Fukuda,Y., Pimkahaokham,A., Yang,Z.Q., Naruto,T., Shimada,Y., Nakamura,Y., and Inazawa: Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer, 32, 112-118, 2001]を挙げることができる。この態様は、本発明の K L K 遺伝子を有する B A C (Bacterial Artificial Chromosome) D N A、Y A C (Yeast Artificial Chromosome) D N A または P A C (Phage Artificial Chromosome) D N A (以下、B A C D N A 等ともいう)を標識し、F I S H 法を行うと、本発明の K L K 遺伝子の増幅及び欠失を検出することができる。一方、C G H 法では、ゲノム D N A 定着基板を用いて行うことが、好適であり、かつ、現実的である。通常に得られる B A C D N A 等は、ゲノム D N A 定着基板を多数製造して実用化するには少量であるので、当該 D N A を遺伝子増幅産物として得る必要がある(この遺伝子増幅行程を「無尽蔵化又は無尽資源化」ともいう)。無尽蔵化においては、まず B A C D N A 等を、4 塩基認識酵素、例えば、RsaI、DpnI、HaeIII 等で消化した後、アダプターを加えてライゲーションを行う。アダプターは 10 ~ 30 塩基、好適には 15 ~ 25 塩基からなるオリゴヌクレオチドで、2 本鎖は相補的配列を有し、アニーリング後、平滑末端を形成する側の 3' - 末端のオリゴヌクレオチドをリン酸化する必要がある。次に、アダプターの一方のオリゴヌクレオチドと同一配列部分を有するプライマーを用いて、PCR 法により増幅し、無尽蔵化することができる。一方、各 B A C D N A 等に特徴的な 50 ~ 70 塩基のアミノ化オリゴヌクレオチドを、アレイ上にスポットし、検出基板上で使用することもできる。

【 0 0 2 8 】

このようにして無尽蔵化した B A C D N A 等を基板上、好適には固体基板上に定着させることにより、所望する D N A 定着基板を製造することができる。固体基板としては、ガラス、プラスチック、メンブレン、3 次元アレイ等があげられ、スライドガラス等のガラス基板が好ましい。ガラス等の固体基板は、ポリ-L-リジン、アミノシラン、金・アルミニウム等の凝着により基板をコートすることがより好ましい。

【 0 0 2 9 】

上記の無尽蔵化した D N A を基板上にスポットして乾燥させることにより、無尽蔵化した B A C D N A 等を基板上、好適には固体基板上に定着させることにより、所望する D N A 定着基板を製造することができる。

【 発明の効果 】

【 0 0 3 0 】

本発明により、膀胱癌の検出を、その悪性度を含めて行うことが可能な手段が提供される。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 1 】

[実施例 1] 膀胱癌細胞株を用いて C G H アレイによる遺伝子増幅の解析

上述したように、膀胱癌には移行上皮癌、扁平上皮癌、腺癌が発生し、その中で移行上皮癌が約 9 割を占める。移行上皮癌から株化した膀胱癌細胞株 7 種類 (K u 1、K u 7、E J 1、S N K 5 7、N K B 1、K K 4 7 と T 2 4 細胞株) を使用し、染色体のコピー数の増幅と欠失を C G H アレイ解析により調べた。この方法は癌化と密接に関係する癌遺伝

子及び癌抑制遺伝子を見出すために有用である。表1と表2は、 \log_2 比が2倍以上の高レベルの増幅と0.25倍以下のホモ接合体欠失をまとめたものである。表1は、MCG Whole Genome Array-4500を用いたCGHアレイ解析により膀胱癌細胞株で、 \log_2 比が2以上を示す高レベル増幅遺伝子座であり、表2は、MCG Whole Genome Array-4500を用いたCGHアレイ解析により膀胱癌細胞株で、 \log_2 比が-2以下を示すホモ接合体欠失遺伝子座である。

【0032】

【表1】

| No. | BAC | 染色体バンド | | 遺伝子座 ^a | | 細胞株 | | 候補遺伝子 ^b | 脆弱部位 | 既知の遺伝子数 |
|-----|-------------|--------------|-------------------------------|-------------------|-------|-----|-------|---------------------|---------------|---------|
| | | 位置 | 位置 | 数 | 名称 | | | | | |
| 1 | RP11-67P13 | 5p13.3 | chr5: 32,057,785-32,223,971 | 1 | Ku1 | 1 | Ku1 | <i>P/DZD2, CDH6</i> | FRASA | 4 |
| 2 | RP11-40O24 | 6q24.3 | chr6: 148,731,454-148,731,678 | 1 | Ku1 | 1 | Ku1 | | | 1 |
| 3 | RP11-3E12 | 11p13 | chr11: 34,624,076-34,624,267 | 1 | NKBI | 1 | NKBI | <i>EHF, CD44</i> | FRA11E | 1 |
| | RP11-89A24 | 11p13 | chr11: 34,735,446-34,883,935 | 1 | NKBI | 1 | NKBI | <i>EHF, CD44</i> | FRA11E | 1 |
| | RP11-90F13 | 11p13 | chr11: 34,768,184-34,949,951 | 1 | NKBI | 1 | NKBI | <i>EHF, CD44</i> | FRA11E | 2 |
| | RP11-30D23 | 11p13 | chr11: 34,988,168-35,150,821 | 1 | NKBI | 1 | NKBI | <i>EHF, CD44</i> | FRA11E | 1 |
| | RP11-91G22 | 11p13 | chr11: 35,278,495-35,446,305 | 1 | NKBI | 1 | NKBI | <i>EHF, CD44</i> | FRA11E | 2 |
| | RP11-143B20 | 11p13 | chr11: 35,369,512-35,369,679 | 1 | NKBI | 1 | NKBI | <i>EHF, CD44</i> | FRA11E | 1 |
| 4 | RP11-30O16 | 11q13.2-13.3 | chr11: 69,162,462-69,323,966 | 1 | SNK57 | 1 | SNK57 | <i>CCND1</i> | FRA11H/FRA11A | 4 |
| 5 | RP11-10I11 | 19q13.3 | chr19: 56,161,429-56,314,486 | 1 | Ku1 | 1 | Ku1 | <i>KLK1-15</i> | FRA19A | 11 |

^a UCSC遺伝子ブラウザの2006年3月のアセンブリとNCBIマップヒューアーに基づく。

^b BAC内に位置する典型的な候補遺伝子

10

20

30

40

【0033】

【表2】

| No. | BAC | 遺伝子座 ^a | | 細胞株 | | 脆弱部位 | 既知の遺伝子数 |
|-----|-------------|-------------------|-------------------------------|-----|-----------|-------------|---------|
| | | 染色体バンド | 位置 | 数 | 名称 | | |
| 1 | RP11-259N12 | 1p21.1 | chr1: 103,956,056-104,113,271 | 2 | T24, EJ1 | | 5 |
| 2 | RP11-91E8 | 3p21.31 | chr3: 45,989,824-46,150,261 | 1 | KK47 | | 2 |
| 3 | RP11-94D19 | 3p14.2 | chr3: 60,756,957-60,927,079 | 1 | KK47 | FRA3B | 1 |
| 4 | RP11-43B19 | 6q26 | chr6: 160,905,759-161,000,562 | 2 | Ku7, KK47 | | 1 |
| 5 | RP11-15P13 | 9p21.3 | chr9: 20,172,493-20,351,132 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | 1 |
| | RP11-113D19 | 9p21.3 | chr9: 20,996,401-21,158,464 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | 4 |
| | RP11-344A7 | 9p21.3 | chr9: 21,506,374-21,676,227 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | |
| | RP11-70L8 | 9p21.3 | chr9: 21,732,609-21,901,258 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | 1 |
| | RP11-408N14 | 9p21.3 | chr9: 22,155,847-22,309,629 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | |
| | RP11-44H15 | 9p21.3 | chr9: 22,309,530-22,479,595 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | 1 |
| | RP11-346N23 | 9p21.3 | chr9: 22,604,594-22,795,769 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | |
| | RP11-330I5 | 9p21.3 | chr9: 22,823,087-22,823,490 | 1 | SNK57 | FRA9A/FRA9C | |

^a UCSC遺伝子ブラウザの2006年3月のアセンブリとNCBIマップビューアーに基づく。

^b BAC内に位置する典型的な脆弱遺伝子

【0034】

それらは染色体の脆弱部位に存在する8種類の遺伝子座を含んでいた。即ち、脆弱部位FRA5A(5p13.3)、FRA11E(11p13)、FRA11H/FRA11A(11q13.2-13.3)、FRA19A(19q13.3)が高レベルの増幅を示し、脆弱部位FRA3B (3p14.2)及びFRA9A/FRA9C (9p21.3)はホモ接合体欠失を示した。

【0035】

ホモ接合体欠失は、5種類の膀胱癌細胞株(Ku1、EJ1、SNK57、KK47及びT24細胞株)で、12クローン5個の遺伝子座が検出された。ホモ接合体欠失を検出した5種類の遺伝子座を表2に示した。それらの中で染色体1p21.1に局在するBACクローンRP11-259N12と染色体6q26に局在するRP11-43B19はヒトゲノムで報告されている染色体多型(Large-scale copy-number variation: Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/>)の領域内に存在した。一方、染色体3p21.31の領域のBAC

10

20

30

40

50

RP11-91E8は癌抑制遺伝子を含んでいなかった。染色体9p21.3の領域でCDKN2A/p16遺伝子を含む領域のホモ接合体欠失は膀胱癌でしばしば検出され、C G Hアレイ解析によっても検出することができた (Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S. et al.: Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Research* **63**, 2872-2880, 2003)。染色体3p14.3に存在するFHIT遺伝子は、膀胱癌においても良く知られた癌抑制遺伝子である (Baffa R, Gomella LG, Vecchione A et. al.: Loss of FHIT expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder, *American Journal of Pathology* **156**, 419-424, 2000)。

【 0 0 3 6 】

10種類のクローンの中でKu1、SNK57、NK B1細胞株にて高レベルで増幅している遺伝子群が検出され、5種類の遺伝子座を表1に示した。CCND1、CD44、CDH6、EHF、KLK1 - KLK15及びPDZD2等の癌関連遺伝子群はこれらの遺伝子座に存在する。22種類の膀胱癌細胞株について、BACを搭載したC G Hアレイで解析することによりこれらの領域のコピー数が増加していることが報告されている。膀胱癌の臨床検体で、19q13の領域では19q13.1と19q13.2でコピー数の増加が報告されているが、19q13.3での高レベル増幅については報告がない。この領域に関して標的遺伝子を同定するためにさらに解析を進めた。

10

【 0 0 3 7 】

[実施例 2] FISHにより見出された19q13領域のアンプリコンの解析

19q13.3のKLK1 ~ 15 (KLK3と6は、前述したように、一定の癌との関係が知られている)の遺伝子座の増幅に着目して、C G Hアレイ解析で増幅が認められた3種類の膀胱癌細胞株 (Ku1、SNK57及びNK B1細胞株) について、アンプリコンに含まれるゲノム遺伝子を解析した。なお、アンプリコンとは、遺伝子群の増幅が認められるゲノムの領域を意味している。

20

【 0 0 3 8 】

具体的には、このアンプリコン領域に含まれる15種類のBAC DNAをプローブに用いてFISH解析を行った。図1は、膀胱癌細胞株を用いたC G Hアレイの解析結果を示す図面であり、19q13.3の領域に高レベルでの増幅が認められたことを示している。この中で、図1Aは、Ku1膀胱癌細胞株を用いた典型的な2重測定のC G Hアレイの画像を示している。図1Aにおいて、矢印は、KLK遺伝子が座位する染色体19q13.3の顕著なコピー数 (4倍以上) の増大が明確な緑色のシグナルとして検出されることを示している。Log₂比は、2.17及び2.13であり、4倍以上の遺伝子増幅を示す。図1Bは、Ku1膀胱癌細胞株での19番染色体のコピー数のプロファイルであり、矢印は染色体19q13.3の領域でのLog₂比が2以上の高レベル増幅を示すスポットである。

30

【 0 0 3 9 】

また、図2は、FISHでの染色体19q13.3上のアンプリコンの解析結果について示した図面である。中期と間期の染色体を用いたFISH解析により、アンプリコンの位置と同様にコピー数を算出した。

【 0 0 4 0 】

その中で、図2Aは、膀胱癌細胞で増幅した領域をカバーする19q13領域のマップを示している。SRO (Smallest Region of Overlap) 内に局在する遺伝子群を、UCSCとNCBIデータベースの情報に基づいて位置付けた。FISHで使用したBACプローブを縦のバーで表示した。これらのBAC DNAは染色体19q13.3の領域にマッピングされている。

40

【 0 0 4 1 】

上述した図2Bは、3種類の異なった膀胱癌細胞株でのFISH解析によるコピー数についての解析の結果を示している。図2Bにおいて、水平の軸 (コピー数で表示) はBACプローブを用いてFISH解析で求めたコピー数を示している。黒塗りの矢印 (SROと表示) はSmallest region of Overlapの領域を示している。図2Cは、Ku1膀胱癌細胞株 (Ku1と表示) と正常男性リンパ球 (normalと表示) の間期染色体を用いてKLK

50

遺伝子を含む緑色蛍光標識したRP11-10111及びコントロールとして赤色標識したRP11-18J6プローブをハイブリダイズして得られた典型的なFISH画像を示している。図2Cに示すように、RP11-10111プローブはKu1膀胱癌細胞株において、14ヶ所に緑色蛍光のシグナルを示した。

【0042】

図2BとCにて示すように、Ku1膀胱癌細胞株では、10種類のBAC DNA (RP11-795B6、RP11-10111、RP11-891J20、RP11-99113、RP11-1108B3、RP11-105H4、RP11-749C22、RP11-690A4、RP11-79A3及びRP11-344A8)をプローブに用いた時にマーカー染色体上で最も高いシグナル(14コピー)が観察された。

【0043】

また、これと比べると若干弱い増幅シグナルが、5種類のBAC DNA (45F3、1051H12、2215、184K19及び79116)をプローブに用いたときに検出されたので、これらのBAC DNAはアンプリコンの外側の領域に存在することが示唆された。FISH法で調べた他の2種類のセルラインは、5コピー以上のシグナルを示した。そのシグナルは、NK B1細胞で1051H12から105H4までのBAC DNAで1コピー高い増幅を示したことを除いて15種類のBAC DNA増幅度(コピー数)に差はなかった。

【0044】

それ故、SRO領域(smallest region of overlapの略で増幅がオーバーラップしている最小領域の意味)は、BAC RP11-795B6とRP11-105H4の間であることが明白である。SROのサイズはUCSCデータベース(<http://genome.ucsc.edu/>参照)より870kbであり、その中にバイオマーカーとしての標的遺伝子が含まれると考えられる。

【0045】

[実施例3]膀胱癌細胞の19q13.3領域のアンプリコンに存在する遺伝子群の発現

図3は膀胱癌細胞株での染色体19q13.3のアンプリコンに局在する遺伝子の発現について示した図面である。すなわち、19q13.3領域の染色体増幅と関連してその領域に存在するKLK1~KLK15遺伝子及び他の遺伝子が高レベルで発現しているか否かの解析を行った。正常膀胱組織を陰性コントロールに、膵臓と前立腺を陽性コントロールとして、RT-PCR法を用いて7種類の膀胱癌細胞でのこれらの遺伝子の発現状況を解析した。

【0046】

図3Aでは、7種類の膀胱癌細胞株、1正常膀胱(正常コントロール)、膵臓と前立腺(陽性コントロール)で、SRO領域に局在するKLK1~KLK15遺伝子及び他の遺伝子の発現を示している。RT-PCR法でそれぞれの遺伝子の発現を測定した。また、図3Bでは、KLK5、KLK6、KLK8及びKLK9遺伝子のコピー数の比較を行っている。正常リンパ球のゲノムDNA(Normal lymphocyteと表示)をコントロールとして使用し、標準化を行った。さらに、図3Cでは、KLK5、KLK6、KLK8、及びKLK9遺伝子の発現レベルの比較を行っている。正常膀胱組織(Normal bladderと表示)の全RNAをコントロールとして使用し、標準化を行った。

【0047】

これらの結果、Ku1、SNK57及びNK B1細胞株で、19q13.3領域に局在するKLK1、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK9、KLK10、KLK11、KLK14、SIGLEC9、SIGLEC10、GPR32、ATPBD3、ETFB、CLDND2、NKG7及びZNF175遺伝子の発現が認められた。しかし、T24膀胱癌細胞株で発現が検出されたCD33遺伝子を除いて、この領域に局在する他の遺伝子群(KLK2、KLK3、KLK4、KLK12、KLK13、KLK15、SIGLEC5、SIGLEC6、SIGLEC7、SIGLEC8及びSIGLEC12遺伝子)の発現は、検討した膀胱癌細胞で検出されなかった。

【0048】

発現が検出された遺伝子の中でKLK5、KLK6、KLK8及びKLK9遺伝子は3種類の膀胱癌細胞株(Ku1、SNK57、NK B1)で高発現しており、アンプリコンの増幅度と正の相関にある。特に、Ku1膀胱癌細胞株におけるCGHアレイ解析では、

10

20

30

40

50

染色体の増幅は14コピーと、最も高い増幅を示している(図1B)ことと相関して、KLK5、KLK6、KLK8及びKLK9遺伝子の発現は他の膀胱癌細胞株より遙かに高いレベルであった(図3BとC)。さらに、これらの遺伝子が高発現していることが報告されている、卵巣癌細胞株OVCA R-3、胃癌細胞株MKN28及びMKN74(Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T et.al.: Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer, Clinical Cancer Research 11, 6800-6806, 2005及びHarvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA: Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4, Journal Biological Chemistry 275, 37397-37406, 2000)では、その発現レベルはKu1膀胱癌細胞株のそれより遙かに低かった(図3B)。胃癌細胞株(MKN28及びMKN74)並びに卵巣癌細胞株OVCA R-3では、染色体19q13.3の領域でのコピー数増加は認められないため、Ku1膀胱癌細胞株でのKLK5、KLK6、KLK8及びKLK9遺伝子の著しい高発現は染色体19q13.3領域の増幅と密接に関連している。

10

【0049】

[実施例4] インビトロにおけるKu1膀胱癌細胞株の浸潤能のKLK5、KLK6、KLK8及びKLK9 siRNAによる阻害

染色体19q13.3領域の最も高い増幅と、4種類のKLK遺伝子の高レベル発現を示したKu1膀胱癌細胞株を用いて、KLK遺伝子のノックダウンをsiRNAの遺伝子導入により行い増殖と浸潤に関する影響を解析した。図4は、KLK5、KLK6、KLK8及びKLK9特異的siRNAを用いたKu1膀胱癌細胞株のインビトロにおける浸潤能の阻害について示した図面である。

20

【0050】

その中で、図4Aでは、siRNAを遺伝子導入したKu1膀胱癌細胞株のKLK5、KLK6、KLK8及びKLK9の発現解析の結果を示している。遺伝子導入2-4日後の細胞をRT-PCR法を用いて解析した。その結果、KLK5、KLK6、KLK8及びKLK9遺伝子のノックダウンは、それぞれのsiRNA遺伝子導入の2日後及び4日後に確認できた。これらのKLK遺伝子群の発現は、それぞれ特異的siRNAの導入により顕著に減少したことが示された。

30

【0051】

図4Bは、KLK5、KLK6、KLK8及びKLK9特異的siRNAで抑制された膀胱癌細胞株のインビトロでの増殖速度を示している。5% FBS存在下で培養し、遺伝子導入4日後に、細胞数をMicrotiter-plate colorimetric WSTアッセイ(Cell counting kit-8、同仁ラボラトリー、熊本、日本)によりカウントした結果を示している。

【0052】

図4Cでは、Matrigelアッセイ法でKu1膀胱癌細胞株の浸潤を示す典型的な位相差顕微鏡写真を示している。Ku1膀胱癌細胞株の浸潤能を調べるために、24-well transwell-chamber culture system(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)を使用した。8mmのポアサイズのフィルターの上層はMatrigelでコートしたもの(上図)及びコートしていないもの(下図)を使用した。siRNAで遺伝子導入48時間後に細胞を上部のチャンパーに加え、48時間培養した。下部のチャンパーにはD-MEM培地と5% FBSを満たしている。フィルターの上部に存在する浸潤していない細胞を取り除き、フィルターの下部に浸潤した細胞を固定し、Diff-Quik stain(シスメックス、神戸、日本)で染色した。染色した細胞の核を直接カウントした。3回繰り返し測定した。図中のバーは100µmである。

40

【0053】

図4Dでは、図4Cの浸潤の結果の定量値を示している。浸潤のパーセントは、Matrigelを通過してフィルターの下部に浸潤した細胞数/コントロールのフィルターを通過した細胞数×100で示している。また、浸潤能の指標は、試験した細胞の浸潤パーセント/コントロール細胞の浸潤パーセントで示している。

50

【 0 0 5 4 】

これらの結果、s i R N A 非存在下 (Non siRNAと表示) 及びルシフェラーゼ特異的 s i R N A (Control siRNAと表示) の導入ではK L K 遺伝子発現には影響しなかった (図 4 A)。それぞれの特異的 s i R N A の遺伝子導入によりK u 1 膀胱癌細胞株の増殖には影響はなかったが、これらの細胞におけるマトリゲルを用いた浸潤能の解析では、浸潤能は著しく減少した (図 4 C と D)。特に、K L K 6 のノックダウンは他のK L K 遺伝子と比較して、K u 1 膀胱癌細胞株の浸潤能を顕著に阻害した。これらの s i R N A の遺伝子導入により、K u 1 膀胱癌細胞株の形態には変化がなかった (図 4 C)。

【 0 0 5 5 】

[実施例 5] 膀胱癌の臨床検体での K L K 5、K L K 6、K L K 8 及び K L K 9 遺伝子の発現

図 5 は、膀胱癌の臨床検体での K L K 5、K L K 6、K L K 8 及び K L K 9 遺伝子の発現を示した図面である。

【 0 0 5 6 】

そのうち、図 5 A は、膀胱癌臨床検体での K L K 5、K L K 6、K L K 8 及び K L K 9 遺伝子の発現について示した図面である。4 2 種類の膀胱癌の臨床検体を用いて、R T - P C R 法により、4 種類の K L K 遺伝子 m R N A の発現頻度とレベルを解析した。症例 1 - 2 3 は表在性膀胱癌で、症例 2 4 - 4 2 は浸潤性膀胱癌である。遺伝子発現を R T - P C R 法を用いて MultiGauge (富士フイルム社製) により定量した。各々の転写産物を G A P D H m R N A により標準化した。正常膀胱組織の全 R N A を膀胱癌の臨床検体の正常コントロールとして使用した。棒グラフはコントロールに対する膀胱癌の臨床検体の K L K 遺伝子発現の相対値として表示した。その結果、正常膀胱癌組織と比較して、K L K 5、K L K 6、K L K 8 及び K L K 9 遺伝子の発現が、2 倍以上の膀胱癌症例は、各々 4 2 例中 6 例 (14.3%)、4 2 例中 1 例 (2.4%)、4 2 例中 3 例 (7.1%)、4 2 例中 8 例 (19.0%) で見出された。

【 0 0 5 7 】

図 5 B では、K L K 5、K L K 6、K L K 8 及び K L K 9 遺伝子発現の表在性膀胱癌と浸潤性膀胱癌での比較を行っている。この例では、Nonparametric Mann-Whitney U-test を用いて比較した。棒グラフ上に標準偏差を意味するバーを示した。その結果、K L K 5 m R N A の発現頻度は、浸潤性膀胱癌 (pT2-pT4: 1 9 例中 6 例) で表在性膀胱癌 (pTa、pT1: 23 例中 0 例) と比較すると著しく高かった。これは統計的に有意であり、Fisher's exact test での P 値は 0.0052 である。さらに、この頻度は G 3 の癌と G 1 - G 2 の癌の間で著しく異なり (G 3 で高く、G 1 - G 2 で低い)、Fisher's exact test での P 値は 0.0458 であった。さらに、K L K 5、K L K 6、K L K 8 及び K L K 9 遺伝子の発現レベルは、表在性膀胱癌よりも浸潤性膀胱癌で遙かに高く、その P 値は Mann-Whitney U-test で各々 $P < 0.0001$ 、 $P = 0.0043$ 、 $P = 0.0790$ 、及び $P = 0.0037$ であった。

【 0 0 5 8 】

表 3 は、膀胱癌患者の K L K 遺伝子発現と臨床病理的性状との関係を示しているが、これらの 4 種類の K L K 遺伝子の発現頻度と性差及び膀胱癌の過去の既往との間で関連はなかった。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

【表 3】

| | KLK5 発現 | | P value | KLK6 発現 | | P value | KLK8 発現 | | P value | KLK9 発現 | | P value |
|-----------|--------------|--------------|---------|----------|-------------|---------|--------------|--------------|---------|--------------|-------------|---------|
| | Positive | Negative | | Positive | Negative | | Positive | Negative | | Positive | Negative | |
| 人数 (%) | 6 (14.3%) | 36 (85.7%) | | 1 (2.4%) | 41 (97.6%) | | 3 (7.1%) | 39 (92.9%) | | 8 (19.0%) | 34 (81.0%) | |
| 年齢平均値(範囲) | 74.5 (56-80) | 70.0 (30-86) | | 78.0 | 70.0(30-86) | | 61.0 (56-78) | 71.0 (30-86) | | 72.0 (56-78) | 69.5(30-86) | |
| 性別 | | | | | | | | | | | | |
| 男性 | 6 | 26 | 0.3076 | 1 | 31 | >.9999 | 3 | 29 | >.9999 | 7 | 25 | 0.6545 |
| 女性 | 0 | 10 | | 0 | 10 | | 0 | 10 | | 1 | 9 | |
| T分類 | | | | | | | | | | | | |
| pT0 | 0 | 10 | 0.0023 | 0 | 10 | 0.4400 | 0 | 10 | 0.3274 | 0 | 10 | 0.2788 |
| pT1 | 0 | 13 | | 0 | 13 | | 1 | 12 | | 2 | 11 | |
| pT2 | 1 | 8 | | 0 | 9 | | 0 | 9 | | 3 | 6 | |
| pT3 | 4 | 5 | | 1 | 8 | | 2 | 7 | | 3 | 6 | |
| pT4 | 1 | 0 | | 0 | 1 | | 0 | 1 | | 0 | 1 | |
| pT0-pT1 | 0 | 23 | 0.0052 | 0 | 23 | 0.4524 | 1 | 22 | 0.5813 | 2 | 21 | 0.1122 |
| pT2-pT4 | 6 | 13 | | 1 | 18 | | 2 | 17 | | 6 | 13 | |
| グレード | | | | | | | | | | | | |
| G1 | 0 | 2 | 0.0798 | 0 | 2 | 0.2779 | 0 | 2 | 0.9142 | 0 | 2 | 0.7343 |
| G2 | 2 | 26 | | 0 | 28 | | 2 | 26 | | 6 | 22 | |
| G3 | 4 | 8 | | 1 | 11 | | 1 | 11 | | 2 | 10 | |
| G1-G2 | 2 | 28 | 0.0458 | 0 | 30 | 0.2857 | 2 | 28 | >.9999 | 6 | 24 | >.9999 |
| G3 | 4 | 8 | | 1 | 11 | | 1 | 11 | | 2 | 10 | |
| 膀胱癌の履歴 | | | | | | | | | | | | |
| 初診 | 5 | 31 | >.9999 | 1 | 35 | >.9999 | 3 | 33 | >.9999 | 6 | 30 | 0.3193 |
| 再発 | 1 | 5 | | 0 | 6 | | 0 | 6 | | 2 | 4 | |

10

20

30

表3

【 0 0 6 0 】

以上、実施例において開示した事項から、(1)膀胱癌が疑われる患者の膀胱から生検で癌の可能性のある組織の一部を採取し、DNAを調製する。(2)健常者のDNAあるいは採取した組織の正常部分のDNAを用いてCGHアレイ法でKLK5、KLK6、KLK8及びKLK9遺伝子群の増幅を解析する。或いは、(3)それらの遺伝子群の発現をRT-PCR法等で解析する。さらには、(4)免疫組織化学的方法でそれらのタンパク産物を検出することができる。このように、本検出方法により、膀胱癌の存在、悪性度及び筋浸潤能についての予測、診断を行うことができることが明らかになった。

40

【 図面の簡単な説明】

【 0 0 6 1 】

【図 1】膀胱癌細胞株を用いたCGHアレイの解析の結果を示す図面である。

【図 2】FISH法による染色体19q13.3上のアンブリコンのマップを示した図面である

50

。

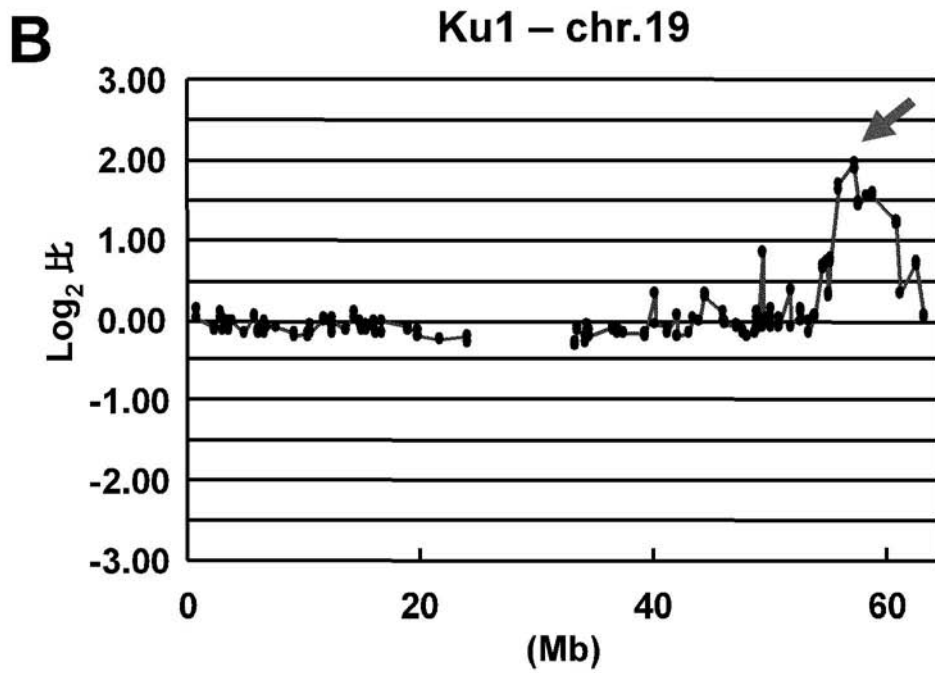
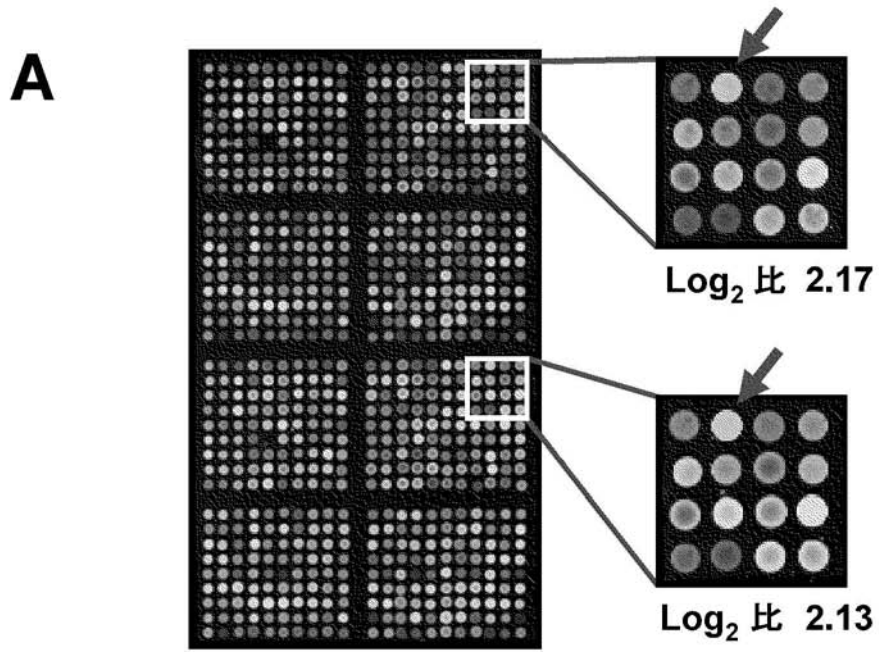
【図3】膀胱癌細胞株での染色体19q13.3のアンプリコンに局在する遺伝子の発現について示した図面である。

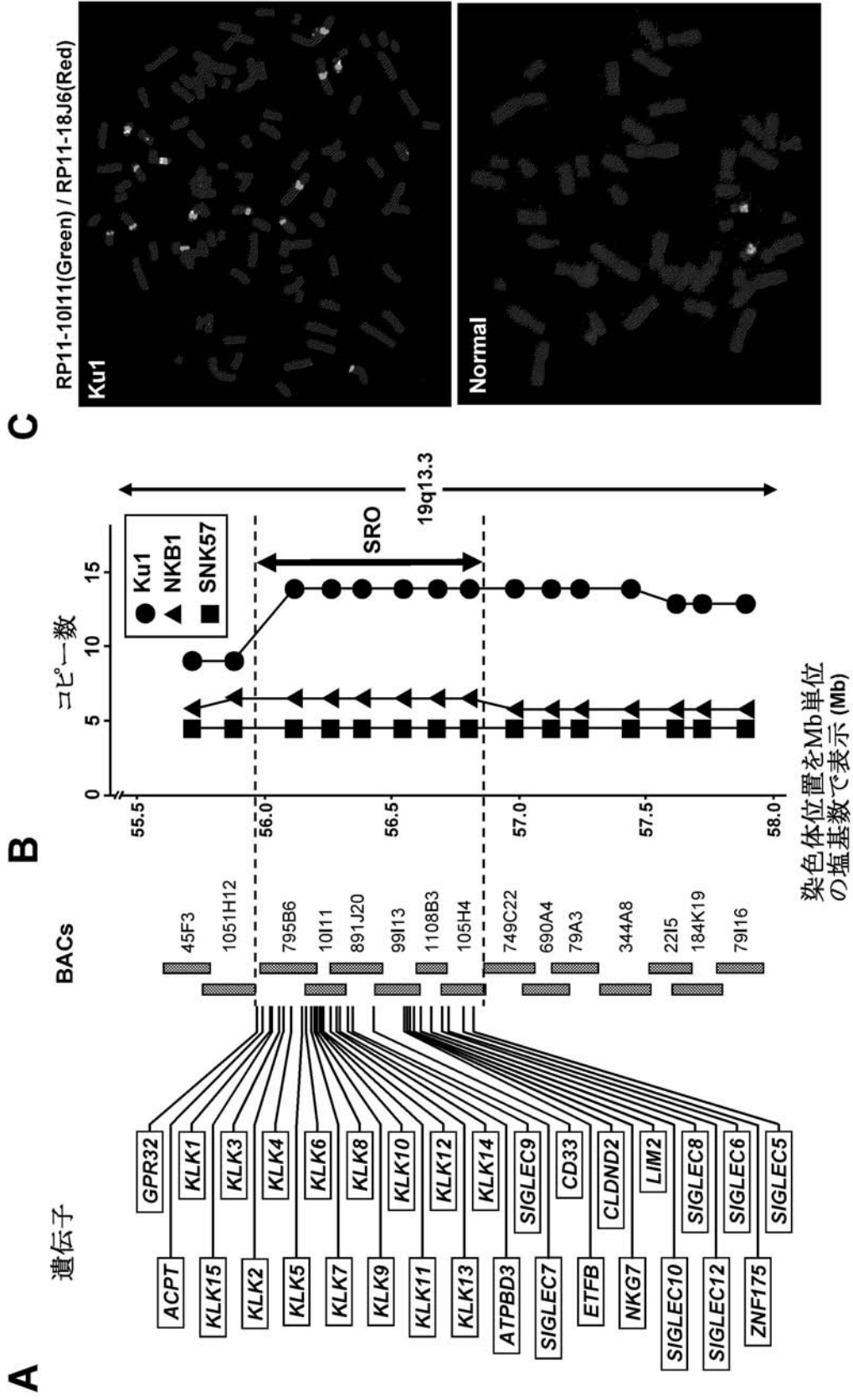
【図4】KLK5、KLK6、KLK8、及びKLK9特異的siRNAを用いたKu1膀胱癌細胞株のインビトロにおける浸潤能の阻害について示した図面である。

【図5】膀胱癌臨床検体における、KLK5、KLK6、KLK8、及びKLK9遺伝子の発現を示した図面である。

【 図 1 】

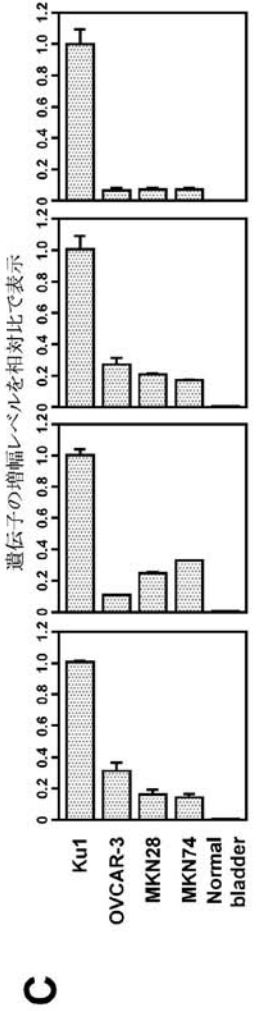
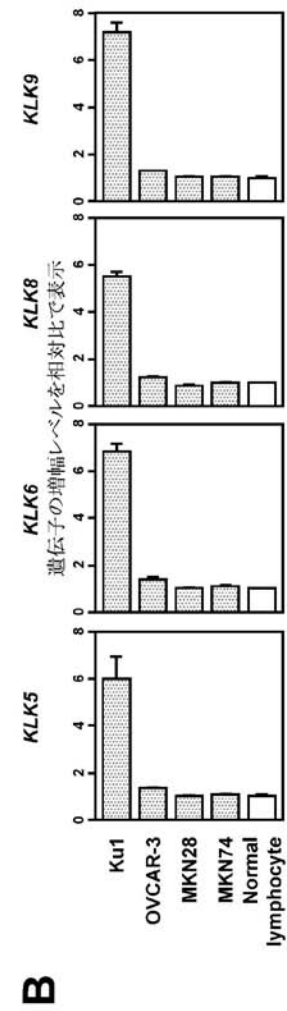
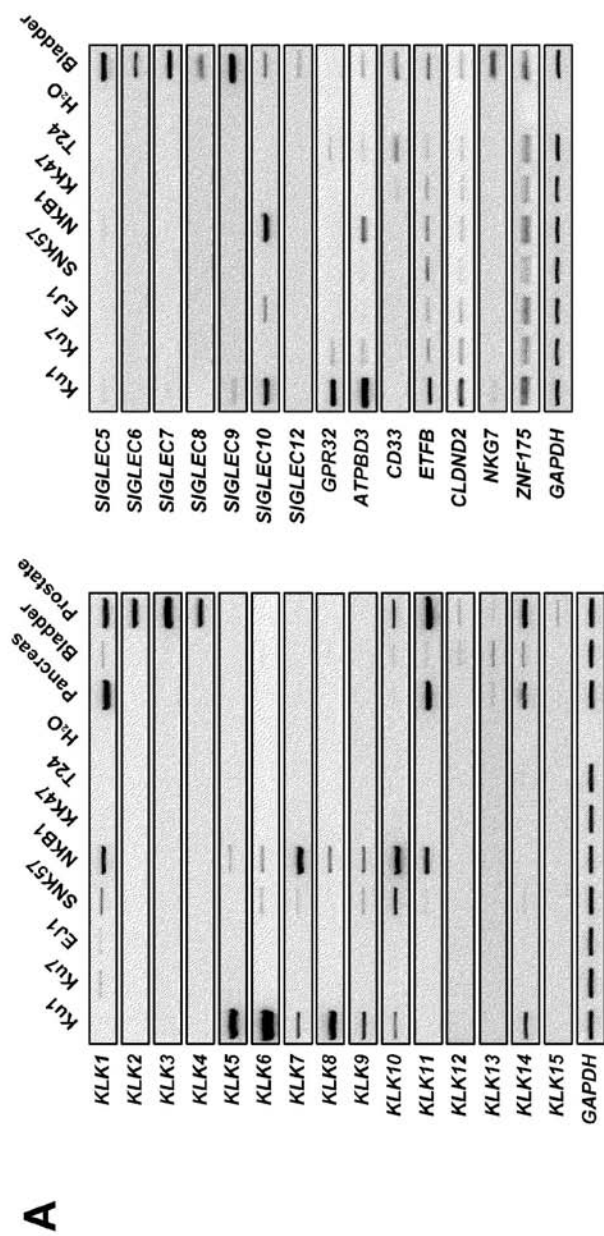
図 1

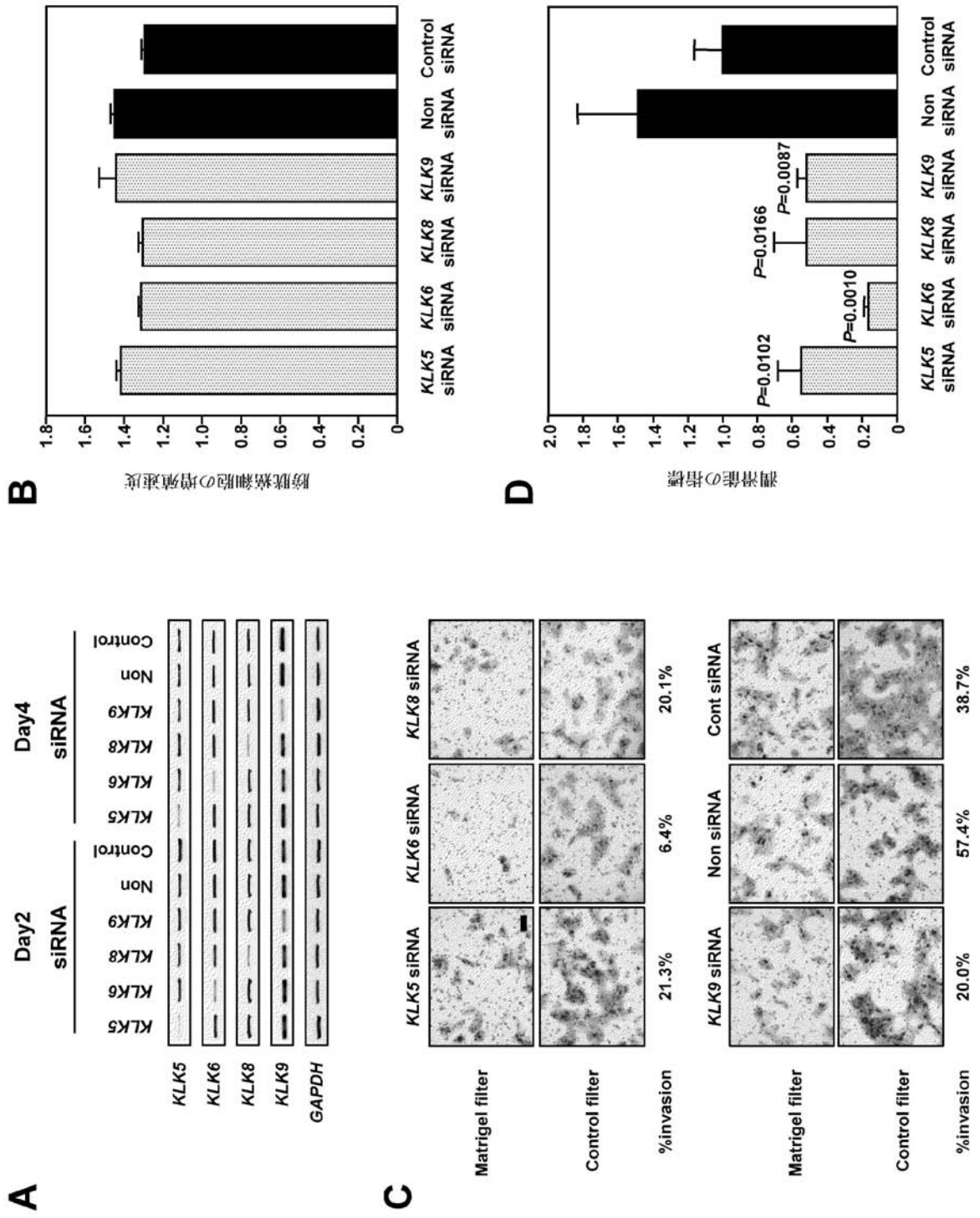




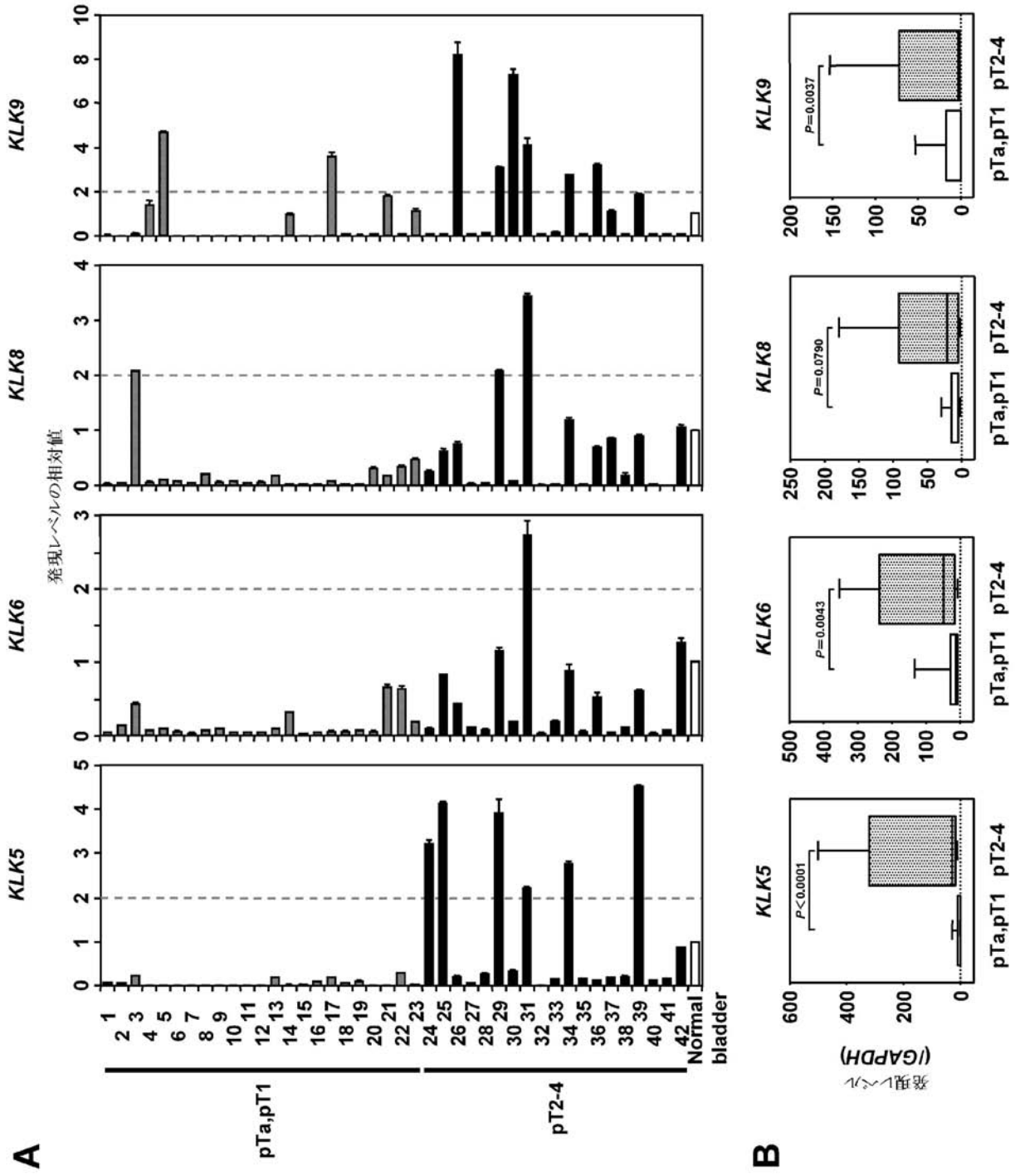
3

3





【 図 5 】



【 図 5 】

【 配列表 】

200827879800001.app

フロントページの続き

(72)発明者 篠田 康夫

滋賀県近江八幡市出町756-1 レセンテ出町A-101

(72)発明者 小崎 健一

東京都世田谷区上祖師谷1-41-5 プリミエール烏山405

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR42
QR50 QR56 QR62 QR66 QR72 QR77 QR82 QS16 QS25 QS28
QS34 QS36 QS39 QX01 QX02

