

(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2015-21800

(P2015-21800A)

(43) 公開日 平成27年2月2日(2015.2.2)

(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	Y

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2013-148969 (P2013-148969)	(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25年7月17日 (2013.7.17)	(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	大家 基嗣 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大 学内
		(72) 発明者	三上 修治 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大 学病院内

(54) 【発明の名称】 腎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】腎癌の再発に特異的な因子であって、腎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、腎癌の再発予測手段としての有用性が高い、腎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】腎癌再発リスク予測用診断薬: A M A P 1、G E P 1 0 0、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。この診断薬を含む腎癌再発リスク予測用キット。腎癌の再発リスク予測方法: (A) 腎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、G E P 1 0 0、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

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

腎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、G E P 1 0 0、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】

腎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。

【請求項 4】

(A) 腎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、G E P 1 0 0、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、上記患者の腎癌の再発リスクを予測すること、

を含む、腎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、G E P 1 0 0、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。

【請求項 6】

上記生体試料が腎組織である、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。

【請求項 9】

工程 (A) において、上記患者の非癌性腎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腎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、上記患者は腎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、上記患者は腎癌の再発リスクが低いと予測する。

【請求項 10】

工程 (A) において、上記患者の非癌性腎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腎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、上記患者は腎癌の再発リスクが高いと予測する；又は

10

20

30

40

50

(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、上記患者は腎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、腎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、並びに腎癌の再発リスクを予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

腎臓に局限した(転移のない)腎癌の治療法としては、腎温存手術(腎部分切除術)及び根治的腎摘出術の外科的療法が主体である。しかし、根治的腎切除術を行った症例でも約30%の症例において経過観察中に転移が認められる。転移性腎細胞癌では、抗癌化学療法および放射線治療が無効であると考えられているので、インターフェロン又はインターロイキン2等の免疫療法が行われてきたものの、その奏効率は約10%と低い。近年、vascular endothelial growth factor: VEGFおよびその受容体を標的とした薬剤であるソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブやmammalian target of rapamycin (mTOR)阻害剤であるエベロリムス、テムシロリムスによる分子標的治療が導入され、一定の成果が得られているものの、最終的には治療に対して耐性となることが知られている。腎癌の確定診断の後、遠隔転移の有無、病期、及び腫瘍の大きさ等を調べ、その結果に基づいて、これらの治療法から適切なものが選択され実施される。これら治療法に基づく腎癌の治療後においては、再発や転移に対処するために、CT検査等の画像検査による予後の経過観察が必須とされており、腎癌の治療においては具体的な治療後に腎癌の再発や転移の有無を含めた予後予測が重要になっている。

【0003】

腎癌の再発予測因子としては、赤沈、CRP(C-reactive protein)及びIAP(Immunosuppressive Acidic Protein)などの炎症反応に関わる因子が注目されている。赤沈及びCRP値については腎癌特異的生存率と有意な相関を有することが示されており(非特許文献1~7)、これら因子は治療前検査の対象として推奨されている。一方、IAPについては、臨床症例に基づいた調査から腎癌再発予測因子としての有用性が示唆されているものの(非特許文献8~11)、調査に用いた症例数が必ずしも十分な数とは言えず、腎癌再発予測因子としての有用性は不明である。

【0004】

さらに、近年、腎癌の再発予測因子として、血中ビルビン酸キナーゼM2及びチミジンキナーゼ1が腎摘出術後の腎細胞癌の再発予測因子になり得る可能性が示唆されている(非特許文献12)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Sengupta S, Lohse CM, Chevillie JC, Leibovich BC, Thompson RH, Webster WS, Frank I, Zincke H, Blute ML, Kwon ED. The preoperative erythrocyte sedimentation rate is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Cancer*. 2006;106(2):304-12.

【非特許文献2】Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T. Serum acute phase reactants and prognosis in renal cell carcinoma. *Cancer*. 1995;76(8):1435-9.

【非特許文献3】Lamb GW, McMillan DC, Ramsey S, Aitchison M. The relationship between the preoperative systemic inflammatory response and cancer-specific survival in patients undergoing potentially curative resection for renal clear cell cancer. *Br J Cancer*. 2006;94(6):781-4.

【非特許文献4】Masuda H, Kurita Y, Fukuta K, Mugiya S, Suzuki K, Fujita K. Sign

10

20

30

40

50

ificant prognostic factors for 5-year survival after curative resection of renal cell carcinoma. *Int J Urol*. 1998;5(5):418-22.

【非特許文献5】Fujikawa K, Matsui Y, Oka H, Fukuzawa S, Takeuchi H. Serum C-reactive protein level and the impact of cytoreductive surgery in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol*. 1999;162(6):1934-7.

【非特許文献6】Atzpodien J, Royston P, Wandert T, Reitz M; DGCIN -- German Cooperative Renal Carcinoma Chemo-Immunotherapy Trials Group. Metastatic renal carcinoma comprehensive prognostic system. *Br J Cancer*. 2003;88(3):348-53.

【非特許文献7】Michela de Martino, Tobias Klatte, Christoph Seemann, Matthias Waldert, Andrea Haitel, Georg Schatzl, Mesut Remzi† and Peter Weibl. Validation of serum C-reactive protein (CRP) as an independent prognostic factor for disease-free survival in patients with localized renal cell carcinoma (RCC). *BJU International* Early View, Article first published online: 15 MAR 2013

【非特許文献8】Masuda H, Kurita Y, Suzuki K, Fujita K, Aso Y. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for staging renal cell carcinoma: comparison with other tumour markers. *Br J Urol*. 1997;80(1):25-9.

【非特許文献9】Igarashi T, Tobe T, Kuramochi H, Akakura K, Ichikawa T, Hamano S, Suzuki N, Furuya Y, Ito H. Serum immunosuppressive acidic protein as a potent prognostic factor for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2001;31(1):13-7.

【非特許文献10】Matsumoto K, Iwamura M, Muramoto M, Suyama K, Tabata K, Minei S, Hirai S, Baba S. [Prognostic value of serum immunosuppressive acidic protein in renal cell carcinoma] *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 2002;93(4):548-54.

【非特許文献11】Kawata N, Yamaguchi K, Hirakata H, Hachiya T, Yoshida T, Takimoto Y. Immunosuppressive acidic protein detects high nuclear grade localized renal cell carcinoma. *Urology*. 2005;66(4):736-40.

【非特許文献12】Benjamin Nisman, Vladimir Yutkin, Hovav Nechushtan, Ofer N. Gofrit, Tamar Peretz, Simon Gronowitz, and Dov PodeOBJECTIVES Pyruvate kinase type M2 Circulating Tumor M2 Pyruvate Kinase and Thymidine Kinase 1 Are Potential Predictors for Disease Recurrence in Renal Cell Carcinoma After Nephrectomy. *Urology*. 2010 Aug;76(2):513.e1-6.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上述の通り、赤沈及びCRP値は腎癌特異的生存率と有意な相関を有することが示されているものの、これら因子は治療前検査の対象として推奨されるに留まることおよび上記因子は炎症の程度を示す一般的なマーカーであり、腎癌の再発を予測し得る特異的な因子としての有用性は決定的なものではない。IAPについては、上述の通り、IAPの腎癌再発予測因子としての有用性は不明のままである。

【0007】

さらに、血中ピルビン酸キナーゼM2及びチミジンキナーゼ1についても、腎摘出術後の腎細胞癌の再発予測因子として有用性は示唆されているものの、実際の臨床現場において腎癌の再発予測因子として応用可能な技術には至っていない。

【0008】

加えて、上記バイオマーカー(CRP)は、当該蛋白質がどのようにして癌の悪性度や再発に関係しているのか、に関する分子メカニズムが明確に示されていない。従って、これらのバイオマーカー陽性患者をどのように治療すべきであるかに関する知見が欠けており、当該バイオマーカー陽性であることが判明しても、患者、医師共に戸惑うばかりである。

【0009】

10

20

30

40

50

そこで、本発明の目的は、腎癌の再発に特異的な因子を用いた、腎癌の再発予測手段としての有用性が高い、腎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、腎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。

【課題を解決するための手段】

【0010】

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、Arf6経路に属する特定の遺伝子群のうち少なくとも1つの遺伝子の発現が腎癌の再発に有意に関連することを見出した。本発明は、係る知見により完成されたものである。

10

【0011】

即ち、本発明は以下の(1)~(3)に関する。

(1) 腎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、GEP100、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。

(2) 腎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) 腎癌の治療を受けた患者から採取した生体試料において、AMAP1、GEP100、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と；並びに

20

(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、上記患者の腎癌の再発リスクを予測すること、を含む、腎癌の再発リスクを予測する方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、腎癌の再発に特異的な因子を用いた、腎癌の再発予測手段としての有用性が高い、腎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、腎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。

30

【図面の簡単な説明】

【0013】

【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EPB41L5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腎癌の治療完了から再発までの期間(図2A~2D)、及び生存期間(図2E)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。

40

【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。

【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。

50

【図 1 3】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。

【図 1 4】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。

【図 1 5】GEP100のcds領域塩基配列(NCBI Reference Sequence: NM_014869.3)を示す。

【図 1 6】GEP100のアミノ酸配列(NCBI Reference Sequence: NP_055684.3)を示す。

【図 1 7】ヒトゲノムにおいてGEP100と類似性があるタンパク質群を示す。

【図 1 8】GEP100と相同性がある遺伝子群を示す。

【図 1 9】GEP100と相同性があるBRAG1遺伝子のcds領域塩基配列(NCBI Reference Sequence: NM_015075.1)を示す。

10

【図 2 0】GEP100と相同性があるBRAG1のアミノ酸配列(NCBI Reference Sequence: NP_055890.1)を示す。

【図 2 1】GEP100と相同性があるBRAG1のアライメント解析のデータを示す。

【図 2 2】GEP100と相同性があるBRAG3遺伝子のcds領域塩基配列(NCBI Reference Sequence: NM_015232.1)を示す。

【図 2 3】GEP100と相同性があるBRAG3のアミノ酸配列(NCBI Reference Sequence: NP_056047.1)を示す。

【図 2 4】GEP100と相同性があるBRAG3のアライメント解析のデータを示す。

【図 2 5】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。

20

【図 2 6】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 2 7】EPB41L5抗体のアフィニティー精製の結果を示す。

【図 2 8】EPB41L5抗体のアフィニティー精製の結果を示す。

【図 2 9】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、抗原の調製、ウサギへの免疫、抗血清の採取、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて示す。

【図 3 0】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、抗原の調製、ウサギへの免疫、抗血清の採取、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0014】

診断薬

本発明の一の態様によれば、腎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、GEP100、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。

【0015】

本発明において、「腎癌」とは、腎臓原発の悪性新生物の最も多くを占める腎細胞癌を指す。また、腎細胞癌の大部分は淡明細胞型腎細胞癌である。

40

【0016】

本発明において、「再発リスク」とは、腎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、腎癌及び転移性腎細胞癌のいずれか一方または両方を包含する。再発リスクは、腎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、腎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、腎癌の治療法は、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、インターフェロン及び/又はインターロイキン2および近年転移性腎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腎臓を部分的に切除して腎臓を温存する腎部分切除術等が挙げられる。

50

【 0 0 1 7 】

「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、腎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、腎癌の治療を受け、かつその後腎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。腎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、腎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、統計的に腎癌の治療後、比較的早期（例えば、5年以内）に腎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、A M A P 1、G E P 1 0 0、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つの遺伝子である。これら遺伝子の何れか1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り、上記遺伝子の3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最も高くなる。即ち、腎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、当該患者は腎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、腎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「腎癌の再発リスクの予測」とは、腎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、A M A P 1、G E P 1 0 0、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ものである。

10

20

【 0 0 1 8 】

< 遺伝子 E P B 4 1 L 5 >

遺伝子 E P B 4 1 L 5 (略称 E B L 5) (Gene ID: 57669) は、癌浸潤における A M A P 1 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・アクセシオン番号	NCBI Reference Sequence: NM_020909.3 (配列番号1) (図3)
プロテイン・アクセシオン番号	NCBI Reference Sequence: NP_065960.2 (配列番号2) (図4)

30

【 0 0 1 9 】

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。

40

【 0 0 2 0 】

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タンバ

50

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。

【0021】

< 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と同一性がある遺伝子（ArfGAP family）の情報を示す。図12にAMAP1と同一性があるAMAP2遺伝子のcds領域塩基配列（NCBI Reference Sequence：NM_003887.2）（配列番号7）を示す。図13にAMAP1と同一性がある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と同一性があるAMAP2のアライメント解析のデータを示す。

10

【0022】

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。

20

【0023】

< 遺伝子 GEP100 >

遺伝子 GEP100（Gene ID：9922）は、癌浸潤における Arf6 活性化因子である。

図15にGEP100のcds領域塩基配列（NCBI Reference Sequence：NM_014869.3）（配列番号9）を示す。図16にGEP100のアミノ酸配列（NCBI Reference Sequence：NP_055684.3）（配列番号10）を示す。図17にヒトゲノムにおいてGEP100と同一性があるタンパク質群を示す。図18にGEP100と同一性がある遺伝子群を示す。GEP100はBRAG familyと同一性が高いことが分かる。図19にGEP100と同一性が高いBRAG1遺伝子のcds領域塩基配列（NCBI Reference Sequence：NM_015075.1）（配列番号11）を示す。図20にGEP100と同一性が高いBRAG1のアミノ酸配列（NCBI Reference Sequence：NP_055890.1）（配列番号12）を示す。図21にGEP100とBRAG1のアライメント解析のデータを示す。図22にGEP100と同一性が高いBRAG3遺伝子のcds領域塩基配列（NCBI Reference Sequence：NM_015232.1）（配列番号13）を示す。図23にGEP100と同一性が高いBRAG3のアミノ酸配列（NCBI Reference Sequence：NP_056047.1）（配列番号14）を示す。図24にGEP100とBRAG3のアライメント解析のデータを示す。

30

【0024】

図21に示すGEP100（NCBI Reference Sequence：NP_055684.3）（配列番号10）とBRAG1（NCBI Reference Sequence：NP_055890.1）（配列番号12）についてのアライメント解析の結果、図24に示すGEP100（NCBI Reference Sequence：NP_055684.3）（配列番号10）とBRAG3のアミノ酸配列（NCBI Reference Sequence：NP_056047.1）（配列番号14）についてのアライメント解析の結果から、それぞれ両者配列には大きく異なる配列領域が存在し、これらの配列領域の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、GEP100タンパク質に対する特異的な抗体またはその断片は、GEP100（配列番号10）の139番目から248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

【0025】

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

50

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。

【0026】

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。

【0027】

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る場合には、例えば、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。

【0028】

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。

【0029】

本発明の診断薬は、後述する腎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。

【0030】

キット

10

20

30

40

50

本発明の別の態様によれば、腎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。

【0031】

本発明のキットは、後述する腎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。

【0032】

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、AMAP1、GEP100、及びEPB41L5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。

【0033】

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、腎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(BSA)等を挙げることができる。

【0034】

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、腎癌の再発リスクを予測する方法が提供される。

(A)腎癌の治療を受けた患者から採取した生体試料において、AMAP1、GEP100、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、上記患者の腎癌の再発リスクを予測する工程、

【0035】

本発明の方法において、「腎癌」、並びに「腎癌の治療」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、腎癌の治療を受けた患者である。

【0036】

本発明の方法において、「生体試料」とは、腎癌の治療を受けた患者から採取された任意の生体試料である。生体試料は、腎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、腎組織としては、例えば、腎癌の治療において腫瘍摘出術の際に患者から摘出した腎臓病変部位の組織、又は、病変部位が存在していた近傍の腎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腎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、腎組織は、腫瘍摘出術の際に患者から摘出した腎臓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腎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。

【0037】

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、GEP100、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、腎癌患者の腎組織においてA r f 6経路に属する遺伝子が組織レベルで発現し、A r f 6経路の稼働が推定される場合には、当該患者は相対的に腎癌の治療後に早期再発するリスクが高い。従って、A r f 6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、腎癌の治療後の再発を促進するものと考えられるA r f 6経路の稼働が推定され、当該患者は早期に腎癌を再発する蓋然性が高いと判断し得る。

【0038】

本発明方法の工程(A)において、A M A P 1、G E P 1 0 0、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出来る。

10

【0039】

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。

20

30

【0040】

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。

【0041】

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出来る。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、非癌性腎組織)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、非癌性腎組織)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

40

50

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。

【0042】

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、上記患者の腎癌の再発リスクを予測する。

【0043】

工程(B)において腎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、腎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、腎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、腎癌の再発リスクが相対的により高いと理解することができ、3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、腎癌の再発リスクが相対的に最も高いと理解することができる。

それに対して、対象生体試料における上記3つの遺伝子全ての翻訳産物発現レベルが「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、腎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、スコア自体から腎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腎癌の再発リスクを「高い」、「低い」又は「中程度」等と理解することもできる。腎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、腎癌の治療後から腎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。

【0044】

治療又は予防方法

さらに、本発明の別の態様によれば、腎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、腎癌の再発を治療又は予防する方法とは、上記腎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、腎癌の再発を治療又は予防する方法である。

【0045】

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、任意の腎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、腎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、腎癌の再発を治療又は予防し得る。

【0046】

本方法は、上記腎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、腎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、上記腎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。

【0047】

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】

【0048】

10

20

30

40

50

< 材料及び方法 >

(材料及び方法)

(1) 患者集団

尚、今回の検討は腎細胞癌の分子標的治療の耐性機構を調べる研究プロジェクトとして慶應義塾大学倫理委員会の許可を得て行われた研究の一環として行われた。具体的には過去に慶應義塾大学病院（日本国、東京）にて腎癌摘出手術を受けた112人の患者を対象にし、解析を行った。

【 0 0 4 9 】

(2) 免疫組織化学 (Immunohistochemistry ; I H C)

EPB41L5抗体は、以下に具体的に説明するように、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。

【 0 0 5 0 】

図25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。

EPB41L5抗原部位のクローニング手順

HUVEC 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融合蛋白質発現用ベクター-pGEX-4Tに挿入した。

EPB41L5抗原の調製

GST融合蛋白質発現用ベクター-pGEX-4T-2にEPB41L5抗原部位の遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、Escherichia coli BL21株の形質転換を行う。形質転換した大腸菌をLB培地中で37℃で振とう培養しOD₆₀₀が0.7に達した時に終濃度0.2mMになるようにIPTGを添加し発現の誘導を行う。25℃で2時間培養後、集菌を行った。

【 0 0 5 1 】

抗原蛋白質を大量発現させた大腸菌をPBS緩衝液で懸濁後、超音波破碎機により氷上で破碎し、遠心操作にて煩雑物の除去を行った後、上清を回収する。抗原蛋白質はGST融合蛋白質として発現するので、GSTタグを特異的に認識し吸着するGlutathione Sepharose 4Bをカラムに充填し、カラムを平衡後サンプル溶液を添加する。カラムを洗浄し煩雑蛋白質を除去した後、glutathione含有の緩衝液により、GST融合蛋白質の溶出を行った。

得られた抗原を常法によりウサギに免疫し、抗血清を採取、抗体の精製を行った。一連の操作は図26に示すスキームに基づいて実施した。EPB41L5抗体のアフィニティ精製の結果を図27及び28に示す。

【 0 0 5 2 】

< AMAP1に対する抗体 >

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、抗原の調製、ウサギへの免疫、抗血清の採取、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて図29に示す。

【 0 0 5 3 】

< GEP100に対する抗体 >

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、抗原の調製、ウサギへの免疫、抗血清の採取、及びに抗体の精製等に関する情報をまとめて図30に示す。

【 0 0 5 4 】

尚、AMAP1及びGEP100に対する抗体については過去に報告がある（Onodera et al., 2006; Morishige et al., 2008）。

【 0 0 5 5 】

免疫組織化学染色は、以下の通り、厚さ4µm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。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

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) E P B 4 1 L 5 (E B L 5) : クエン酸緩衝液 (p H 6 . 0) で 9 5 、 4 0 分インキュベート ;

(i i) A M A P 1 又は G E P 1 0 0 : 抗原賦活化液 (EDTA solution、 p H 9、 Nichirei から購入) で 9 5 、 4 0 分インキュベート ;

【 0 0 5 7 】

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 T B S で洗浄した後、 A M A P 1 (1 : 5 0 0)、 G E P 1 0 0 (1 : 1 0 0)、又は E P B 4 1 L 5 (E B L 5 ; 1 : 1 0 0 0) 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 3 0 分間、インキュベートした。さらに T B S 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。

10

【 0 0 5 8 】

(3) 評価

全ての試料は、それぞれ独立に、盲検下で、腎臓腫瘍を専門とする病理学会認定医と Arf6 経路の研究に精通した研究者がその染色度合いに応じて「高い」 (非癌性腎組織の染色度合いと比較して染色が濃い場合) 又は「低い」 (非癌性腎組織の染色度合いと比較して染色が同程度又は薄い場合) の 2 段階評価をした。

20

【 0 0 5 9 】

(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。分析の候補となった予測因子変数は、 A M A P 1、 G E P 1 0 0、 E P B 4 I L 5 (E B L 5)、 0 . 0 5 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、Stat View ver.5 for WINDOWS を用いて実施した。

【 0 0 6 0 】

< 結果 >

(1) 患者における A M A P 1、 E P B 4 1 L 5、 G E P 1 0 0 の翻訳産物発現と臨床病理学的特徴との関係

30

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を以下の表 1 に示す。

【 0 0 6 1 】

【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

	高 AMAP1 発現 %(n)	高 EPB41L5 発現 %(n)	高 GEP100 発現 %(n)
全患者 (n=112)	34.8 (39)	55.4 (62)	47.3 (53)
年齢			
<59 歳 (n=54)	27.8 (15)	53.7 (29)	40.7 (22)
>59 歳 (n=58)	41.0 (24)	56.9 (33)	53.4 (31)
P 値	0.1311	0.734	0.178
性別			
男性 (n=86)	33.7 (29)	58.1 (50)	46.5 (40)
女性 (n=26)	38.5 (10)	46.2 (12)	50.0 (13)
P 値	0.675	0.281	0.755
組織学的異型度			
低い (n=73)	19.2 (14)	38.4 (28)	35.6 (26)
高い (n=39)	64.1 (25)	87.2 (34)	69.2 (27)
P 値	<0.0001	<0.0001	0.0007
原発巣の進展度 (pT)			
pT1-2 (n=79)	22.8 (18)	44.3 (35)	45.6 (36)
pT3-4 (n=33)	63.6 (21)	81.8 (27)	51.5 (17)
P 値	<0.0001	0.0003	0.566
リンパ節転移 (pN)			
pN0 (n=107)	32.7 (35)	55.1 (59)	47.7 (51)
pN1 (n=5)	80.0 (4)	60.0 (3)	40.0 (2)
P 値	0.030	0.831	0.737
遠隔転移 (pM)			
pM0 (n=100)	30.0 (30)	52.0 (52)	44.0 (44)
pM1 (n=12)	75.0 (9)	83.3 (10)	75.0 (9)
P 値	0.002	0.039	0.042
血管浸潤			
陰性 (n=70)	20.0 (14)	38.6 (27)	42.9 (30)
陽性 (n=42)	59.5 (25)	83.3 (35)	54.8 (23)
P 値	<0.0001	<0.0001	0.222

(解析結果)

図2 A ~ CはA M A P 1、E P B 4 1 L 5、G E P 1 0 0の各遺伝子の翻訳産物が高発現の患者と低発現の患者について、再発を免れた期間とその割合を示す Kaplan-Meier 曲線である。A M A P 1、E P B 4 1 L 5、G E P 1 0 0のいずれにおいても、それが高発現の患者は低発現の患者と比べて有意(それぞれ $P < 0.0001$ 、 < 0.0001 、 $= 0.0003$)に早期再発していることがわかった。

【0063】

また図2 Dに示すように、A M A P 1、E P B 4 1 L 5、G E P 1 0 0の3つ全てが高発現の場合は、3つ全てが低発現又は3つのうち1~2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の傾向が見られた。

【0064】

さらに、A M A P 1、E P B 4 1 L 5、G E P 1 0 0の3つ全てが高発現の場合は有意($P = 0.0002$)な生存期間短縮傾向も見られた(図2 E)。

【産業上の利用可能性】

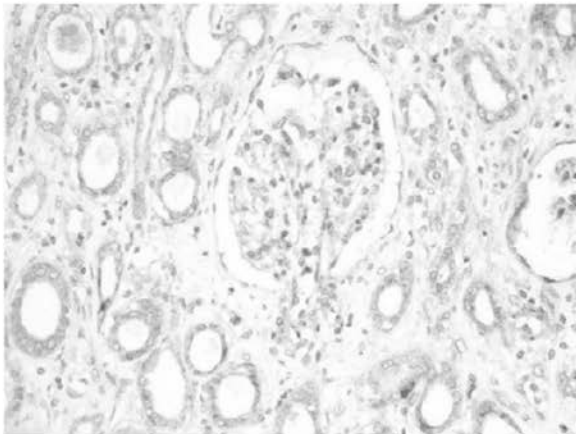
【0065】

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。

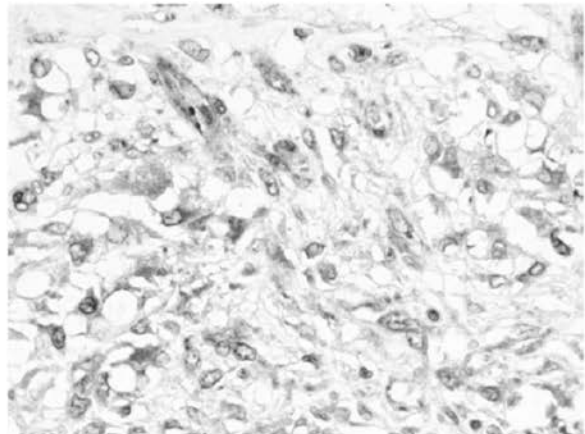
10

【図1】

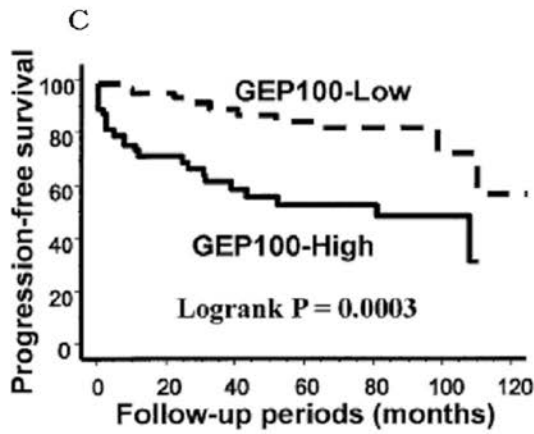
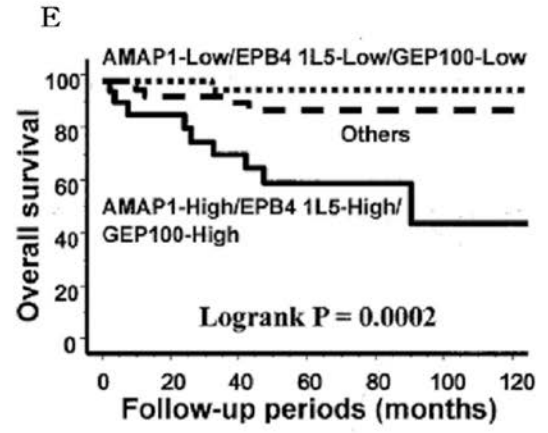
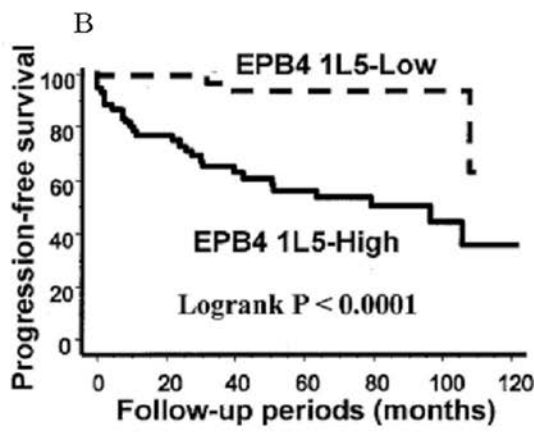
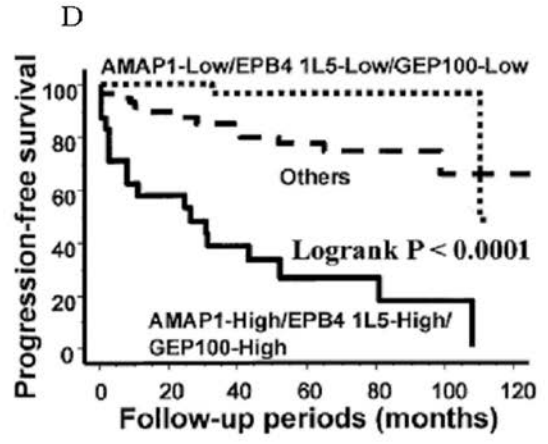
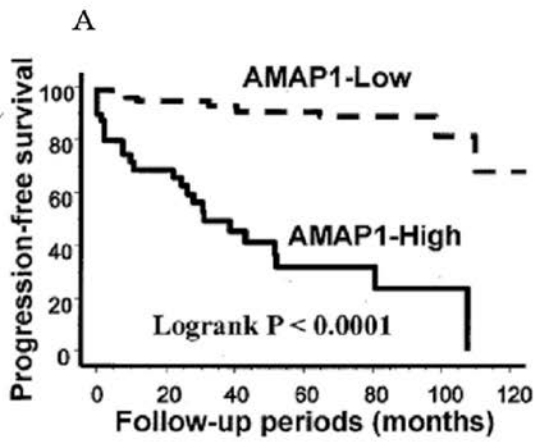
非癌性腎組織



腎明細胞癌(高異型度)



【 図 2 】



EPB41L5

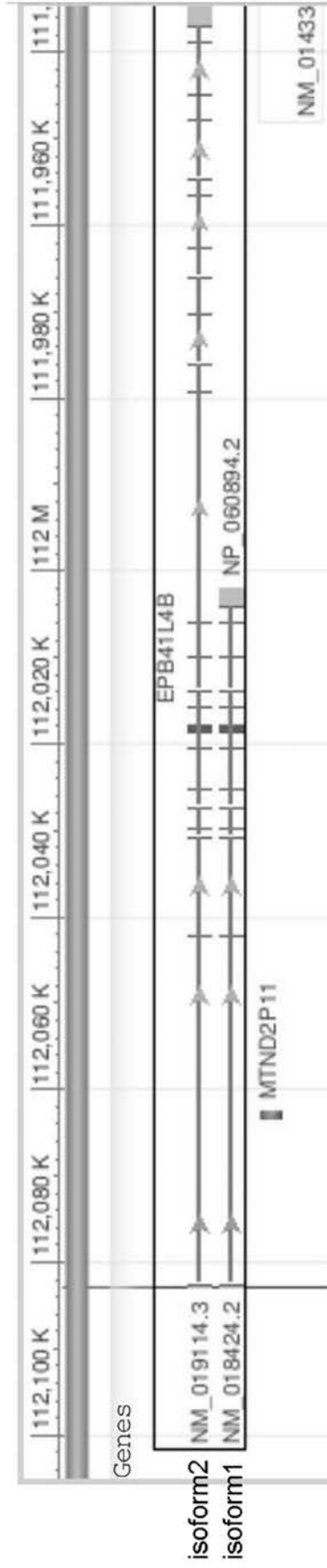
【 3 】

NCBI Reference Sequence: NM_020909.3

cds領域塩基配列

atgctgagttcttccgtagaacactaggcgctgggtctatgcgtaaacatgcagagaaggaacgactccgagaagcacaacgcgcgcgc
cacacataattccgcagctggagattctaagtcacatcacagctgctgggtgctccctctggatggtagctgatgtagtggaacttgc
caaaaaagccaaggaagagtggttgatcagattatgtaccaccctggaccctgatgaaagcgactatcttggcttgagattatg
gattcagcacaagtagcacattgggtggatggtacaaaaagcatcaaaaaagcaagtaaaaaatgggtcacccctattgtctgcacatctcg
agttaagtttattctcagaaccaaataacctcgtgaggagctaacccggtatttattgttcttcagttaaaaacaagatatctca
gtggaaaaattagactgtcccttgatatacagcagtgcaattggcagcttataatctgcaagctgaaactggtagactatgatcttgcctgag
catagctcctgaacttgctcagagttcagattcgtgcttatcagactgaagagatggaaactggcctatcttggagaaatgggaaggaata
cagaggtcaaacaccagcacaggctgaaaccaattatctgaataaagccaaaatggctagaatgtatggsgtggatgataatgcatgtggtca
aggctagagatgggaatgactatagtttgggactaacaccaagagctccttggtttgaaggagataccaaaaatggccttattttt
tggccgaagataaccagattggatttlaagaagaaataaatctgggtggtgtagaagatgatgatacagggcaaaagaacaggaaca
tacatttgctcttagactggatcatccaaaagcatgcaaacattatggaaatgtgctgtggagcatcatgcttcttccgcctcagag
gccccgtccaaaagagttctcatcgatcaggatttatctgacttaggatacagatttagataatagtgggaaaaaacagagatcagaccaca
aaaaaccaataaagcaagaagatacaacatccttgaagaagagcccaaacgataattctagacgaaactacaaaatgaaaagcatgtgc
tacaaaacctgaagaacttagtgtcacataatgtctgacccaagtaatggctcccaacaggcttgggggatggagatcgtctctgc
ctgtgagtccttccatttccctctgctcctgtgccagtgagagatagagaatctccacagagctccggaaacagaccagcatgacaggaaa
tgcaattcctctgaaatatgatttgcgtgaatagcccagacttattggaagcaacgatlggtgatgtaattggggcattctgacactatgga
aaca tcccaagcactgaaatgacgttaattgtagccaccaggcttccgggatlagggaaacctgaagttgaaatagagacatlaaaagaca
cctcagagaagctcaaacagcttgagatggagaacagctccttgcctgccccctcgatccaacatcgatgtaacataaacagccaggag
gaaatgggtgaagtgactgagaaatgccttaataatgtcatlgagagcccaggattgaaatgcatgagagttcctcctgactcaagag
taacatttgaaggctcaagtagaacagtgcataaagttacaaaagaagatagcttattaagtcataaaaaatgccaatgttccagatg
ctgccacaaaacagtgctgtgttaaatgagaaataatgtgccccctccccaaagagctctcttgagactctgatgcttatcacacctgcccag
agtggttctgtctctaaaggaagctacagatgaaatggatgccttgcttgcatctctaaactgagaatctaaatgatcacacagttgcacc
tcaggtgtcttccacatccatgatcacaccccgggtggattgttccgcagagtggtgccatgtctaaatgacttgcgggatgtaaaatgc
ttttgacaggaagggagacatggtaataaagatggaatctcacatgactcttccccccagcccatcttggtagatgctgtgaccagg
tctgggtcccat t tggcagaagaagctgcttgaagcagaagtgttactgaccactgagctctga

band 4.1-like protein 4B isoform2 vs isoform1



band 4.1-like protein 4B **isoform2** [Homo sapiens], 900 aa

NM_019114.3 / NP_061987.3

band 4.1-like protein 4B **isoform1** [Homo sapiens], 518 aa

NM_018424.2 / NP_060894.2

EPB41L5 vs EPB41L4B

```

EPB41L5 1 : MLSFFRRTLG RRSM----- --RKHA--E KER-----L REA-----
EPB41L4 1 : MLRFLRRTEG RRSQRYARG AAGRGAAGLG DERDGGPRGG PAAASSSAL PAAPGGSVFP
27 : -----QR AATHIPAAGD SKSIITCRVS LLDGTOVSVD LPKKAKGQEL FDQIMYHLDL
61 : AGGPELLTGG AAVHISAAGA AKATLYCRVF LLDGTEVSVD LPKHAKGQDL FDQIVYHLDL
79 : IESDYFGLRF MDSAQVAHWL DGTKSIAKQV KIGSPYCLHL RVKYSSESPEL NLREELTRYL
121 : VETDYFGLQF LDSAQVAHWL DHAKPIKKQM KIGPAYALHF RVKYYSSEPN NLREEFTRYL
139 : FVLQKQDIL SGKLDQPFDT AVQLAAYNLQ AELGDYDLAE HSELVSEFR FVPIQTEEME
181 : FVLQLRHDIL SGKLCQPYET AVELAALCLQ AELGECELPE HTELVSEFR FIPNQTEAME
199 : LAIFEKWKY RGTQPAQAE NYLNKAKWLE MYGDMHVVK ARDNDYSLG LPTGVLVFE
241 : FDIFQWKEC RGKSPAQAE SYLNKAKWLE MYGDMHVVR GRDGEYSLG LPTGILIFE
259 : GOTKIGLFFW PKITRDFEK NKLTVVVED DDOGKEQHT FVFRLDHPKA CKHLWKCAVE
301 : GANKIGLFFW PKITKDFEK SKLTVVVED DDOGREQHT FVFRLDSART CKHLWKCAVE
319 : HHAFRLRGP VQKSSHRSGF IRLGSRFRYS GKTEYQTTKT NKARRSTFE RRP SKRY-SR
361 : HHAFRLRTP GNSKSNRSDF IRLGSRFRFS GRTEYQATHG SRLRRSTFE RPKSKRYPSR
378 : RTLQMK-----CAT KPEELSVHNN VSTQNGSQQ AWGMR-----ALPVSPSIS
421 : RHSTFKASNP VIAAQLCSKT NPEVHNYQPQ YHPNIHPSQP RWHHPSPNV YPLPSVLSS
423 : SAPVPEIE- -----NLPOS PGTDOH-----DRKC IPLNIDLNS
481 : SORLPFGIEE NGTFFLTA SGRHHHQH QHQHQHSNY SLSLTLENKE GPLRSPNSSS
457 : PDLEATTIGD VIGAS--DTM ETSQALNDVN VATRLPGLGE PEVEYETLKD TSEKLGQLEM
541 : KSLTKLSPGT PALFSEAAAH LKKELETVK AAGPWPPLHI NINKAE-EKK VSEKTLQTP
541 : ENSP----- --LLSPRN -IDVNI-NSQ EE--VVKLTE KCLNNVIESP GLNVMRV---
600 : LPSVADHVK CNILKAQLEN ASRVNIQGGK EESPEVNINK KSLQDASVR SPIPIRVETA
559 : -PPDEKSNIL KAQV--EAVH KYTKEDSL-----LS HKNANVODAA TNSAV----L
660 : QPAVEKPEIK PPRVKLTRQ YSFEDEDLPP DLAEAVGVTT STTNTTTAA TQVSVPLPSP
602 : NENNYPLPKE SLETLMLIIP ADSGVLKEA -TDELDA LLA SLIENLIDHT VAPOVSSISM
720 : KYQNVSSPHK SEGKLLSPG AKSPSORGGA FTLEPGDLLM DFTE---ATP LAEPASNPHC
661 : ITPRWIVPOS GAMSNGLAGC EM -----LLTGK EGHGKDGIS
777 : AHSRCSPPLS LPMKEETGV CNYPPPIKTRL IKTFPVDTMN PFPDTFTTGP QFTADFRDCK
698 : L-----ISP --PAPFL-----VDV-----TSSGPILA EEA-VLKO-----KCLL
837 : LQCCPGTSP LIPAATLRPL TETVSTVQTI YTRKPVSLA ASAETLRQEL EREKMKRLL
733
730 : TTEL
897 : MTEL

```

— Antigen site for anti-EPB41L5 antibody

AMAP1

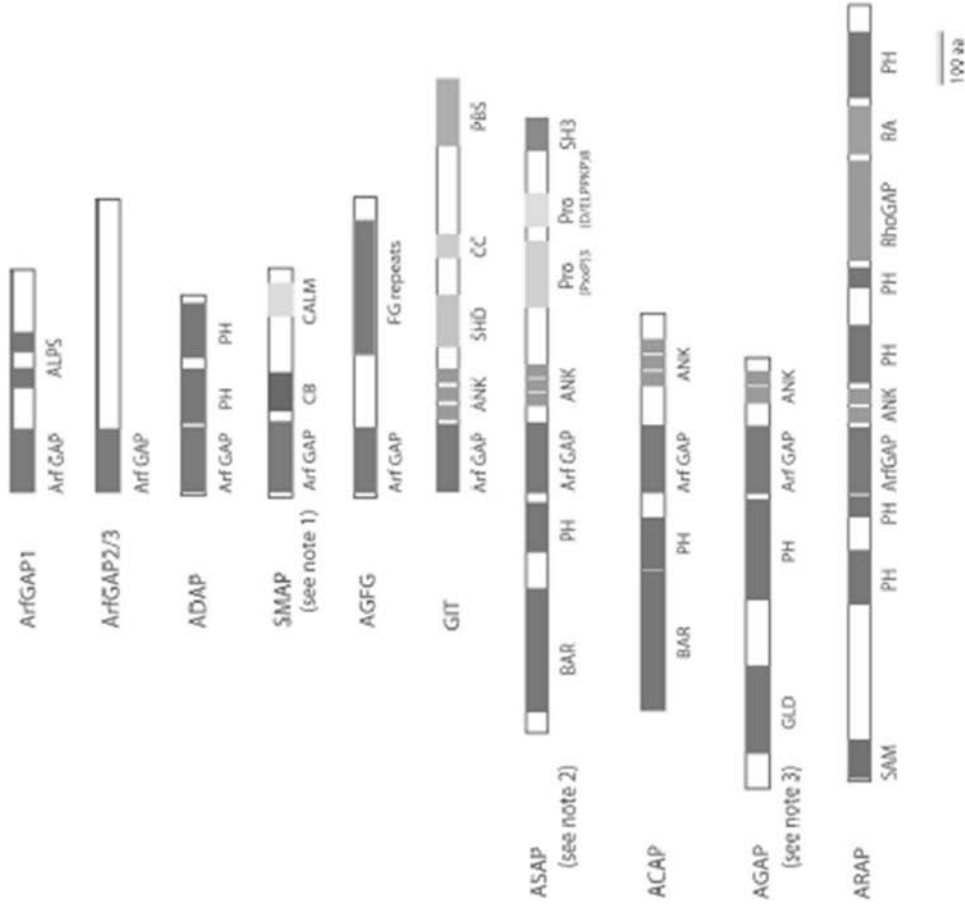
NCBI Reference Sequence: NP_060952.2

アミノ酸配列

MRSSASRLSSFSSRDSLWNRMPDQISVSEFIAETTEDYNSPTTSSFTTRLHNCRNTVT
LLEEALDQDRALQKVKKSVKAIYNSGQDHDVQNEENYAQVLDKFGSNFLSRDNPDLGT
AFVKFSTLTKELSTLLKNLLQGLSHNVIFTLDSLLKGDLLKGVKGDLLKPPDKAWKDYET
KFTKIEKEKREHAKQHGMIRTEITGAEIAEEMEKERRLFQLQMCEYLKIVNEIKTKKGVD
LLQNLIKYYHAQC�FFQDGLKTADKLLQYIEKLAADLYNIKQTQDEEKQLTALRDLIKS
SLQLDQKEDSQSRQGGYSMHQLQGNKEYGSEKKGYYLLKKSDBGIRKVVWQRRKCSVKN
GILTISHATSNRQPAKLNLLTCQVKPNAEDKKSFDLISHNRTYHFQAEDEQDYVAWISVL
TNSKEEALTMAFRGEQSAGENSLEDLTKAIIEDVQRLPGNDICCCDGSSEPTWLSTNL
GILTCIECSGIHREMGVHISRIQSLELDKLGTSSELLAKNVGNNSFNDIMEANLPSPPK
PTPSSDMTVRKEYITAKYVDHRFSRKTCSSTSSAKLNELEAIKSRDLLALIQVYAEGVEL
MEPLLEPGQELGETALHLAVRTADQTSHLVDFLVQNCGNLDKQTALGNTVLHYCSMY
SKPECLKLLRSKPTVDIVNQAGETALDIARKLKAQCEDLLSQAKSGKFNPHVHVEYE
WNLRQEEIDESDDLDKPSPIKKERSPRPQSFCSSSISPDKALALPGFSTPRDKQR
LSYGAFNQIFVSTSDSPTSPTTEAPPLPPRNAGKGTGPPSTLPLSTQTSSGSSTLS
KKRPPPPPGHKRTLSDPPSPLPHGPPNKGAVPWGNDGGPSSSSKTTNKFEGLSQQ
SSTSSAKTALGPRVLPKLPQKVALRKTDLHSLDKATIPPEIFQKSSQLAELPKPPPGDL
PPKPTELAPKPIGDLPPKPGELPPKQGLDLPKPKQLSDLPKPKQMKDLPKPKQLGD
LLAKSQTGDVSPKAAQQPSEVTLKSHPLDLSPNVQSRDAIQKQASEDSNDLPTLPETP
VPLPRKINTGKNKVRRTIYDCQADNDELTFIEGEVIIVTGEEDQEWVWIGHIEGQPE
RKGVFPVSFVHILSD

【 1 1 】

ArfGAP family



AMAP1はAMAP2
と相同性が高い

ASAP1	DDEF1	AMAP1	DEF1/DDEF1	PAG2/SHAG1 Cent. Beta4	KIAA1249	50807	8q24.1-q24.2	NM_018482; NP_060952 (1129aa)
ASAP2	DDEF2	AMAP2	PAP/DDEF2	SHAG2/PAG3 Cent. Beta3	KIAA0400	8853	2p24	NM_003887; NP_003878 (1006aa)

Kahn R.A., *J. Cell Biol.* 2008;182:1039-1044

AMAP2

NCBI Reference Sequence: NM_003887.2

cds領域塩基配列

```
atgccggaccagatcctcgtgtcggaaattcgtggccgagaccatgaggactacaagggccccagcctccagctccaccocgcaaggcagtcgaggaaacactgtggcg  
gcatcgaggaggttgacgtggacggatggttcttfaaaatgaagaaatccgtaaacagctctggctggctcactgggaaatcaaacagctctggctggctcactgggaaatgaagagcagtagtacaccca  
ggctctggagaagtttggcgaactgtgtatcagagatgacccagattaggaagtcgcttcgaagttcagtttacaagaggttgacagcactttcaaaaacacctgattcag  
aatatgaacacataatcctcccttggacagtttctgaaggggacctgaagggagtgaaaagccttttgataaagcttggaaaggactatgaacacaaaa  
ataaccaagatagaaaaggagaaaaggaaacacgccaagctccatgggatgattcggactgaataaagcggagcggaaattgccgaagagatggaanaaggagaggcgtctc  
ttccagctacagatgtcagatcgtcgaaggtcaacgaaatcaagattaaaagggtagatttactcagaatctgatcaaatcttcatgcccaatgcaattttttcaggatgg  
actcaaaagcgtggaaaagcctcaaaccttcattgaaacgctgtctacggatcttcacacgataaacaggccccaggatgaaagaagaggcagttgatacagcttcgagatatttt  
gaaatccgatttcaggttgaacagaaagaggactcccaaatctgtcagagcacagcttatagcttaccagcctcagggaaacaaggaaacatgggaccgagcggaacggca  
gcctctacaagaagagtgacgggatccgaaaagtgtggcagaaaaggaaatgttcagttaaaatgtgttctgaccatacccattgtaccgctaaccggcctcctgcaaaagctca  
acctgtcaacctgccaggtagaaccaacctgaggagaagaagtgttgaccttaccatgacagaaactaccacttcaagctgaagatgaacaggaaatgtcaaatatggat  
gtctgtctgcaaaatagcaagaagactttaaaccaatgcatthaaggggatgacaatactcgtcgaagaataacatcgtccaaagaactgacaanaaggagatc-atc-agaagtg  
cagaggatgacgggcaatgacgtctgtgactgtggggcgcagatcctacatggcttccaccaacctgggcatcctgacctgacatcagctgagttctcgggaatccaccgagagctg  
gggttcttattccaggatgacgtcccagctttagtactgggaacatcgtgagctgtcctcgaagaatattgggaatcaggcttfaatgagatcatggaatgttgcctaccag  
ctgaggactcagtcaaaaccccaaccaggcagcagatgaatgcaagaaaggactacatcacagccaagctacatcgagaggatcgcgaaggaagaagcagcgggataac  
gctgggaagctcacaagcttttgcgaggcgtcaaacgagagatatttttgattgtctccaagcttatgtctgattgtgtgactctacggaaaaaatcccactggccaaacgggacatga  
gccggatgaacggcccctccacctgcagtcagatccgtggatcgaaacctctctcacattgtagacttttttagtcaacaagctgggaacctgggataaacagacaggggaaaggcag  
cacagcccctgacactacgtcagcagcaaatgcccagtgcccaagttgctcctcagggggaagggcctccatcgagatagcaaacgagctcaggagagactccgctggacattg  
ccaagcctcaagcacgagcactgtgaggagctgtgacccaagccttattctggaagatttaattctacgcttcaagttgaaatgaaatggtgactactccacgaagaccctggatga  
aagtgatgacgacatggatgagaattgcagcccagctcccaaccggcgggaagaccggccccatcagcttaccagctgggctccaaccagctc-agtctaaccgctgtatctfttggc  
cagagatgctgcaaaccttgcacaaggagaagcagagggcttctatgccagatctgcagaatgagacttcaggagccccctcagtgaggcagcccaccctcccccagccctgca  
gccccagcaccaccagcgcctccctccacgggaatgttggcaagttcagacagcctcctctgctaacacctgtggaagacaaactctgtaagtgtgacgggtggaag  
ccggcagcagcttctcagatccgacgctgtccatcaaccgctgccccctctcgtgacatctacaaatcccctgacccccacgcccaccctccctcccaagacgcccag  
cgtaatggaagccttgaccagccgagcaagcctgccccctggatctcacagatcagggccccaccctcgtccccacagcccagcctcccccagagaagaagcctg  
cgccggggctgacaagttccaccctcagcctgaccacaagggccaccgagaggacctgtggatctctcgaacgggaagctcgtggctcctctgtccaaatgatagtctcctcagcccc  
cctgcacccatgacctaggaagtcgcagggcaaccgaattgaagccttaagccttaactgtgtgctgacacccccgatgactcaccctccgaggggggtgatg  
gatcatcgtggacggggaggagaccaggaggtgtggattggccacattgatggatcctcgtgcaaggccttccctgctcatttctcgtgacatttctcgtgactga
```

AMAP2

NCBI Reference Sequence: NP_003878.1

アミノ酸配列

MPDQISVSEFVAETHEDYKAPTASSFTTRTAQCRNTVAIEEALDVRMVLKMKKSVK
AINSSGLAHVENEEQYTALEKFGGNCVCRDDPDLGSAFLKFSVFTKELTALFKNLIQN
MNNISFPLDLLKGDLLKGVKGDLLKPPFDKAWKDYETKITKIEKEKEHAKLHGMIRTEI
SGAEIAEEMEKERFFFQLQMCCEYLLKVNIEIKKGVDDLQNLIKYFHAQC�FFQDGLKA
VESLKPSIETLSTDLHTIKQAQDEERRQLIQLRDILKSALQVEQKEDSQIRQSTAYSLHQ
PQGNKEHGTERNGSLYKKSDBGIRKVVQKRKCSVKNGLTISHGTANRPPAKLNLTCQ
VKTNPEEKCFDLISHDRTYHFQAEDEQECQIWMVSLQNSKEEALNNAFKGDDNTGE
NNIVQELTKEIIEVQRMTGNDVCCDCGAPDPTWLSTNLGILTCIECSGIHRELGVHYSR
MQSLTDLVLTSELLAKNIGNAGFNEIMECCLPÆEDSVKPNPGSDMNAARKDYITAKYI
ERRYARKKHADNAAKLHSLCEAVKTRDIFGLLQAYADGVDLTEKIPLANGHEPDETAH
LAVRSVDRSLHIVDFLVQNSGNLDKQTGKGSTALHYCCCLTDNAECLKLLLRGKASIEIA
NESGETPLDIAKRLKHEHCEELLTQALSGRFNSHVHVEYEWRLLEDLDESDDDMDEK
LQSPNRRREDRPIFYQLGSNQLQSNVSLARDAANLAKKQRAFMP SILQNETY GAL
LSGSPPPAQAAPSTTSAPPLPPRNVGKVQTASSANTLWKTNSVSDGGSQRSSSD
PPAVHPPPLPLRVSTNPLTPTPPPVAKTPSVMEALSQPSKPAPPGISQIRPPPLPPQP
PSRLPQKKPAPGADKSTPLTNKGQPRGPVDSLATEALGPLSNAMVLQPPAPMPRKSQ
ATKLPKRVKALYNCVADNPDELTFSEGDIIVDGEEDQEWIGHIDGDPGRKGAFPV
SFVHFIAD

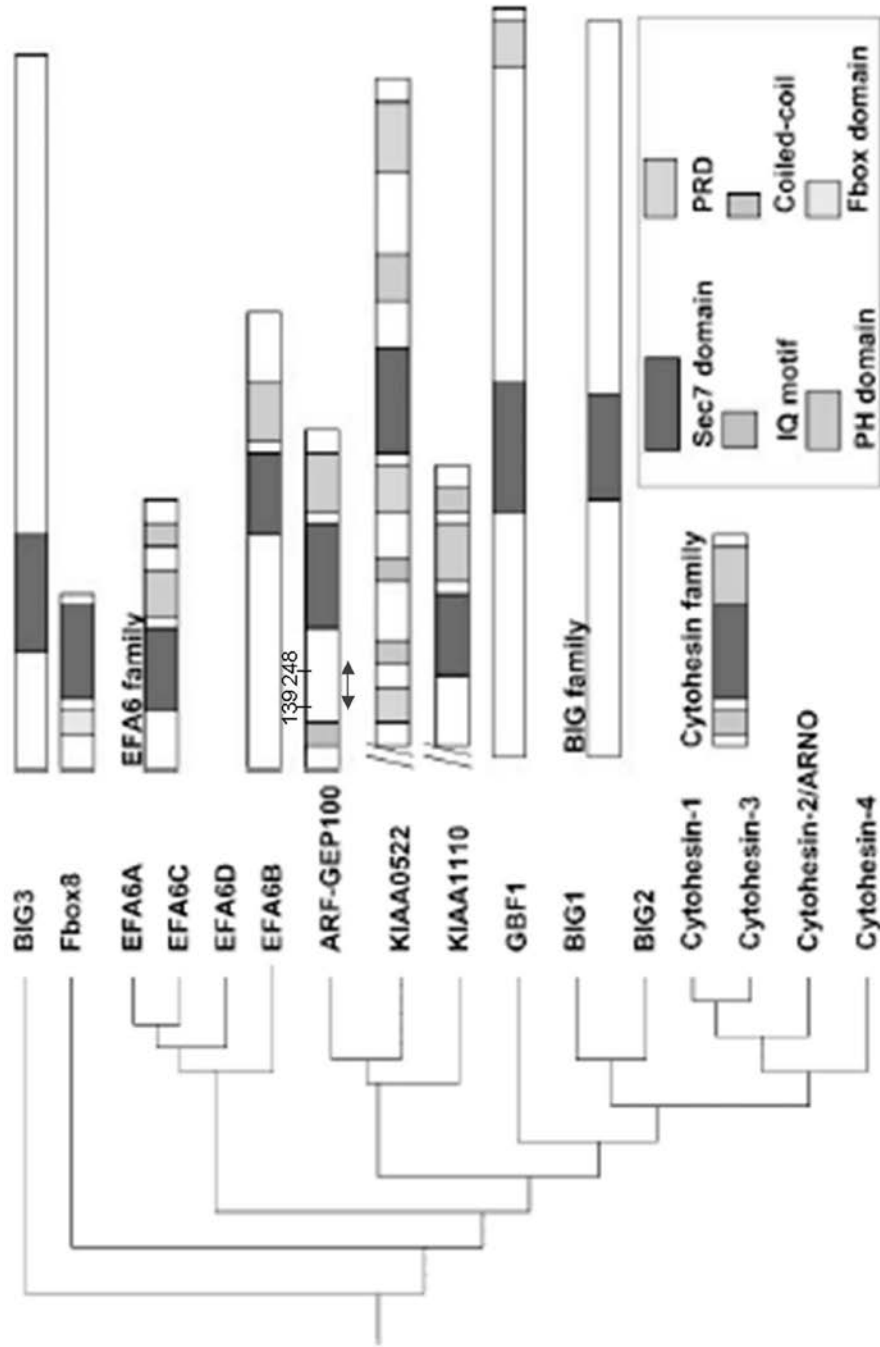
GEP100

NCBI Reference Sequence: NP_055684.3

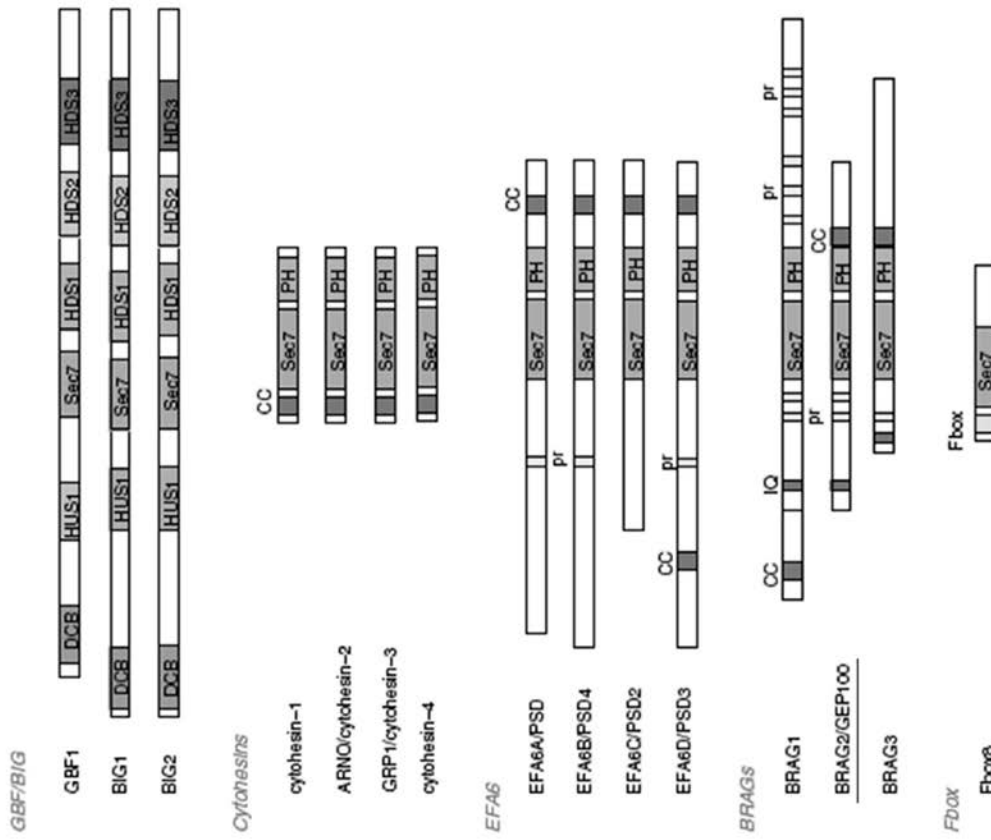
アミノ酸配列

MWCLHCNERTQSLLELDSDGVEGEAPSSSETGTSLDSPSAYPQGPLVPGSSLSPDH
YEHTSVGAYGLYSGPPGQQRRPKLQHSTILRKQAEEEAIKRSRSLSEYELSSD
LQDKQVEMLERKYGGRLVTRHAARTIQTAFRQYQMKNKFERLRSSMSENRRRIVL
SNMRMQSFEGPEKVVHSSYFEGKQVSVTNDGSQLGALVSPCEGDLSEPTTLKSPAPS
SDFADATELEDAFSRQVKSLAESIDDALNCRSLHTEEAPALDAARARDTEPQTALHGM
DHRKLDEMTASYSDVTLYIDEEELSPPLSQAGDRPSSSTESDLRLRAGGAAPDYWAL
AHKEDKADTDTSRSTPSLERQEQLRVEHLPLLTIEPPSDSSVDLSDRSEKSLKRQ
SAYERSLGGQSPKHGPHSGAPKSLPREPELPRPPRPLDHLAINGSANRQSKS
ESDYSDGDNDSINSTSNSNDTINCSSSRDSLREQTLKQTYHKEARNSWDSPAFS
NDVIRKRHYRIGLNLFNKKPEKGVQYLIERGFVPTPVGVAHFLLQKGLSRQMIGEFL
GNRQKQFNRDVLDCVDEMDFSTMELDEALRKFQAHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRY
CICNPGVVRQFRNPDTIFILAFIILLNTDMYSPNVKPERKMKLEDFIKNLRGVDDGEDIP
REMLMGIYERIRKRELKTNEHDHVSQVQKVEKLVGKKPIGSLHPGLGCVLSLPHRRLLVC
YCRLEFVDPNPKQLGLHQREIFLNDLLVTKIFQKKKNSVTYSFRQSFSLYGMQVL
LFENQYYPNGIRLTSSVPGADIKVLINFNAPNPQDRKKFTDDLRESIAEVQEMEKHRIES
ELEKQKGVWRPMSQCSSLKESGNGTLSRACLDDSYASGEGKRSALSSSLRDISE
AGKRGRSSAGSLESNVEFQPFEPQLQPSVLCS

ArfGEF Proteins in Human Genome



GEP100と相同性のある遺伝子



GEP100は
BRAG familyと
相同性が高い

Figure 1: Domain organization of the Sec7 family Arf GEFs.

Casanova J.E., *Traffic* 2007;8:1476-1485

BRAG1

NCBI Reference Sequence: NP_055890.1

アミノ酸配列

MEPPGRSSRSTASHTLHQYCCPTQVLDSMKLTSPGRLAESSVEGDAPGSDLSTAVDS
PGSQPPYRLSQLPPSSSHMGGPPAGVGLPWAQRARLQPASVALRKQEEEEIKRSKAL
SDSYELSTDLDQDKKVMLEKRYGGFSLRRARTIQTAFRQYRMNKNFERLRSSASES
RMSRRIILSNMRMQFSFEEYEKAQNPAYFEGKPAASLDEGAMAGARSHRLERGLPYGG
SCGGIDGGSSVTTSGEFSNDITELEDSFSKQVKS LAESIDEALNCHPSGPMSEEPG
SAQLEKRESKEQQEDSSATSFSDLPLYLDDTVPQQSPERLPSTEPQQGRPEFWAPA
PLPPVPPVPSGTREDGSRREEGTRRGPGCLECRDFLRAAHLPLLTIEPPSSVDLS
DRSDRGSVHRQLYEADGCSPHGLKHKGPPGRAPIPHRHYPAPAGPAPPGPLPP
APNSGTGPSVAGGRRLLGKCEAAGENSDDGDNESLESSNSNETINCSSGSSSRDS
LREPPATGLCKQTYQRETRHSWDSPAFNNDVQRRHYRIGLNLFNKKPEKGIQYLIER
GFLSDTPVGVVAHFILERKGLSRQMIGEFLGNRQKQFNRDVLDVDCVDEMDFSSMDLDD
ALRKFSHIRVQGEAQKVERLIEAFSQRYCVCNPALVRQFRNPDTIFILAFAILLNTDMY
SPSVKAERKMKLDDFIKNLRGVNDGEDIPRDLLVGIYQRIQGRELRTNDDHVSQVQAV
ERMIVGKKPVLSPHRRLVCCCLYEVPDPNRPQRLGLHQREVLFNDDLWTKIFQKK
KILVTYSFRQSFPLVEMHMQLFQNSYYQFGIKLLSAVPGGERKVLIFNAPSLQDRLRFT
SDLRESIAEVQEMEKYRVESELEKQKGMMPNASQPGGAKDSVNGTMARSSLEDTY
GAGDGLKRGALSSSLRDLSDAGVCY

GEP100 aa vs BRAG1 aa

```

GEP100 1 : M-----WCLHCNS ERTQSLLELE L-----DS GVEGEAPSSSE TGTSLDSPSA
BRAG1  1 : MEPPGRSSRS TASHLHQYC CPTQVLDSMK LTPSGRLAES SVGEDAPGSD LSTAVDSPGS
      42 : YPQGPLVPGS SLSPDHYEHT SVGAYGLYSQ PGQQQQRTTR PKLQHSSTIL RKQAEFEAIIK
      61 : QPPYRL---S QLPP---SSS HMGPPAGVG LPHAQ---R ARLOPASVAL RKQ-EEEEKI
      102 : RSRLSSEYE LSSDLQDKOV EMLERKYGR LVTRHAARTI QTAFRQYQWN KNFERLRSSM
      110 : RSKALSDSYE LSTDLQDKKV EMLERKYGGS FLSSRAARTI QTAFRQYRWN KNFERLRSSA
      162 : SENRMSRRIV LSNMRNQFSF EGPEK-VHSS YFEGKQVSVT NDSQLGA---LVSP
      170 : SESRMSRRII LSNMRNQFSF EYEKAQNPAA YFEGKQVSVT NDSQLGA---LVSP
      213 : ECGDLSEPTI LKSPAPSSDF ADAITELEDA FSRQVKS LAE SIDDALNC-R SLHTEAPAL
      229 : GSCGGGIDGG GSSVTTSGEF SNDITELEDS FSKQVKS LAE SIDAALNCHP SGMHSEEPGS
      272 : DAARARTEP QTALHGMQHR KLDENTASYS DWTLY-IDEE ELSPLPLSQ AGDRPSSTES
      289 : AQLEKRESKE Q-----QEDSSATSFS DLPLYLDDTV PQQSPERLPS TEPQQGRPE
      331 : DLRLRAGGAA PDYWALAHKE DKADTDTSCR STPSLERQEQ RLRVEHLPLL TIEPPSSSV
      340 : FWAPAPLPPV PPPVPSGTRE DGSREEGTRR GP6CLECRDF RLRAAHLPLL TIEPPSSSV
      391 : DLSDRSERGS LKRQSAVERS LGGQCGSPKH -GPHSGAP-K SLPREEPE-L RPRPRPL--
      400 : DLSDRSERGS VHRQLVYEAH GCSPHGTLKH KPPGRAPIP HRHYPAPEGP APAPPGPLPP
      446 : --DHLAING SA--NRQSKS E--SDYSD-G DNDINSTSN SNDTINCSSSE SSSRDSLRE--
      460 : APNSGTGPGS VAGRRRLGKC EMAGENSDDG DNESSLSSN SNETINCSSG SSSRDSLREP
498 : --QTLKQTY HKEARNSWDS PAFSNDVIRK RHYRIGLNLF NKKPEKGVQY LIERGFVPDI
520 : PATGLCKQTY QRETRHSWDS PAFNNDVVQR RHYRIGLNLF NKKPEKGIQY LIERGLSDT
556 : PVGVAHFLLQ RKGLSRQMG EFLGNRQKQF NRDLDCVVD EMOFSTMELD EALRKFAQHI
580 : PVGVAHFILQ RKGLSRQMG EFLGNRQKQF NRDLDCVVD EMOFSSMDLD DALRKFQSHI
616 : RVQGEAQKVE RLIEAFSORY CICNPGVVQR FRNPDTIFIL AFAILLNTD MYSPPVKKPER
640 : RVQGEAQKVE RLIEAFSORY CYCNPALVQR FRNPDTIFIL AFAILLNTD MYSPPVKAER
676 : KMKLEDFIKN LRGVDDGEDI PREMLMGTYE RIRKRELKTN EDHWSQVQVY EKLIVGKKPI
700 : KMKLDDFIKN LRGVDDGEDI PRDLLVGIYQ RIQGRELRTN DDHWSQVQVY ERMIVGKKP-
736 : GSLHPGLGCV LSLPHRRLVC YCRLFEPVDP NKPQKLGHLQ REIFLNDLL VVTKIFQKKK
759 : -----V LSLPHRRLVC CCQLYEVVDP NRPQRLGLHQ REVFLNDLL VVTKIFQKKK
796 : NSVTYSFROS FSLYGMQVLL FENQYYPNGI RLTSSVPGAD IKVLINFNAP NPQQRKXFTD
810 : ILVTSYFROS FPLVEMHML FQNSYYQFGI KLLSAVPGGE RKVLIIFNAP SLQDRLRFTS
856 : DLRESTAEVQ EMEKHRIESE LEKQKGVVVR SMSQCSSLKK ESGNGTLSRA CLDDSYASGE
870 : DLRESTAEVQ EMEKYRVESE LEKQKGMHRP NASQ-PGGAK DSVNGTMAKS SLEDTYGAGD
916 : GLKRSALSSS LRDLSAAGKR GRRSSAGSLE SNWEFQPFEP LQPSVLS
929 : GLKRGALSSS LRDLSDAG-- -----V

```

Antigen site for anti-GEP100 antibody

BRAG3

NCBI Reference Sequence: NM_015232.1

cds領域塩基配列

```

atgctagaacataagtaaggcggtaacctgtgtccggcgccgcttgaccatccaaaccgacctcgccaataccagctcagcaagaacttc
gagaaaatccgcaactcgtcttgagagccgctgccaaggatccctgocgcaaggtaggtcaccaccgocgagagacctggcggccg
agaaagcgtcatgaggctacgctcgtgggctgcccgtggtgctgctgcccctccctgcccaccctcgcaggcacccctcacogagctgg
aggactcctcaaccgagcaggtgcaatccctggccaagtcctatgacgacgctcagcaogtggagcctcaagaccatgtctccctgctgggag
agtggccttaccagctcaccaggccctgcaggcggcgccggggccccaggccctggaggccgaggggcccggagagcggcgggccc
ccgggcccggggtgacgcgcgggagacccccggcctgccccggccccacagcgggaccctcatgtagtcttcgggacgtcacggtgcaga
tgcacaaccagaaacatatccgtctcctcctcaccaggctctgctggctgccaactgcctggcgctcagaccgtccaggccccccgagagccccg
cgggcaaggccgagcaggcgagacctctggcgggagcccccggagccccccgctgggaggacgcgctcagccgagggactcat
gcccagaggctgctgtagtgggcccggatggggccacagcccccaaaacagaggaggaagaggaggagagagagagagagagagaggtg
gggagagggccgagccgagcaggcgaactggagcagctgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cggcctccgctccaaggaccctgcaggccatgatcctgagcctgcgctaccactgcgagacccccagccagctgcaagctgcccacgct
ctcaccgacacccctgcgcaaggcctctaccgcatggcctcaacctctcaacataacccccgacaaggccatccagttcctgatctcacgcgg
cttcatccgggacacccccatcgggtgtggcccatttctcctccagcgaaaggccctcagccgagatgattggagagttcctgggcaacagcaag
aagcagttcaaccgcgactgctgactgcgtggtggaogagatggaactctccagcatggagctggaogaggccctgcgcaagttccaggcaca
catcctgtgcaggggagctcagaaaggtggagcggctcattgaggccttcagccagcctactgctatgcaacccccgaagtggttcagcagtt
ccacaaccccgacaccatcttcatcctcgccttcgcccatacctcctcaaacccgacatgtacagcccccaacatcaagcctgaccggaagatgatg
ctggaggacttcatcggaaaccttcgaggtgtggaogatggcgctgacatccccaggagctggtgtaggcatctatgatgagaggatacagcagaaa
ggagctcaagtccaatgaggaccaactcagtaogtcaaccaaggtggagaagctccattgtggcatgaaagacagttgctcgtccccccacogcc
gcccgtgtgctgcagccgctctcaggtgacggatgtgaaacaagctgcagaagcaggcagcgcagcagagggagggttctcctctcaatgacct
gctggtgattctcaaaactttgcccgaagaagaagagctctccaogtaacacttttgcagttcagttggcctgctgggcatgacagttccagctctttgag
aacgagattactctcatggtcaccactggtagccccgcctcctgggctcggagaaagacaggtgctgcaatttctgtgccccctgggctcggacgat
gcagaagttcgtggaggacctgaaggagtcattgctgaggtgacggagctggagcagatccgaatagatgaggagctggagagagagagagagagggg
aacaagacactctcctcaagcccctgcggagcccagggggaccacagtcaaagcaaggatgccgacagccaaagggaagccgcgctc
agggagagccggcgggagacgggtggagggttaatacatgacctccccagcccgactcaacttttaccaatttcaagagagatacaattaaagtt
actgctag

```

BRAG3

NCBI Reference Sequence: NP_056047.1

アミノ酸配列

MLEHKYGGHLVSRRAACTIQTAFRQYQLSKNF EKIRNSLLESRLPRRISLRKV
RSPTAESLAAEKALMEGYGLVGLPLVRSPLPPTFAGTLTELEDSFTEQVQS
LAKSIDDALSTWSLKTMC SLRESGAYQLHQAALQAAAGPPGLEAEGRAPESA
GPGPGDDAAETPGLPPAHSGTLMMAFRDVTVQIANQNISVSSSTALSVANC
LGAQTVQAPAEPAAGKAEQGETSGREAPEAPEAVGREDAEASAEEDSCAEAAAS
GAADGATAPKTEEEEEETAEVGRGAEAEAGDLEQLSSSSTSTKSAKSGS
EASASAKDALQAMILSLPRYHCENPASCKSPTLSTDTLRKRLYRIGLNLFNI
NPDKGIQFLISRGFIPDTPIGVAHFLLRKGLSRQMIGEF LGNSKKQFN RDVL
DCVDEMDFSSMELDEALRKFAQHIRVQGEAQKVERLIEAFSQR YCMCNPE
VVQQFHNPDTIFILAFAIILLNTDMYSPNIKPDRKMMLEDFIRNLRGVDDGADI
PRELVGIYERIQKELKSNEDHVTYVTKVEKSIVGMKTVLSVPHRRLVCCS
RLFVTDV NKLQKQAAHQREVF LFN D LLVILKLCPKKKSSSTYTFCKSVGLL
GMQQLFENEYSHGITLVTPLSGSEKKQVLHFCALGSD EMQKFVEDLKESI
AEVTELEQIRIEWELEKQQGKTLSFKPCGAQQGDPQSKQGSPTAKREAAALR
ERPAESTVEVLINASPARLTILPISRDTIKSYC

GEP100 aa vs BRAG3 aa

【 ☒ 2 4 】

```

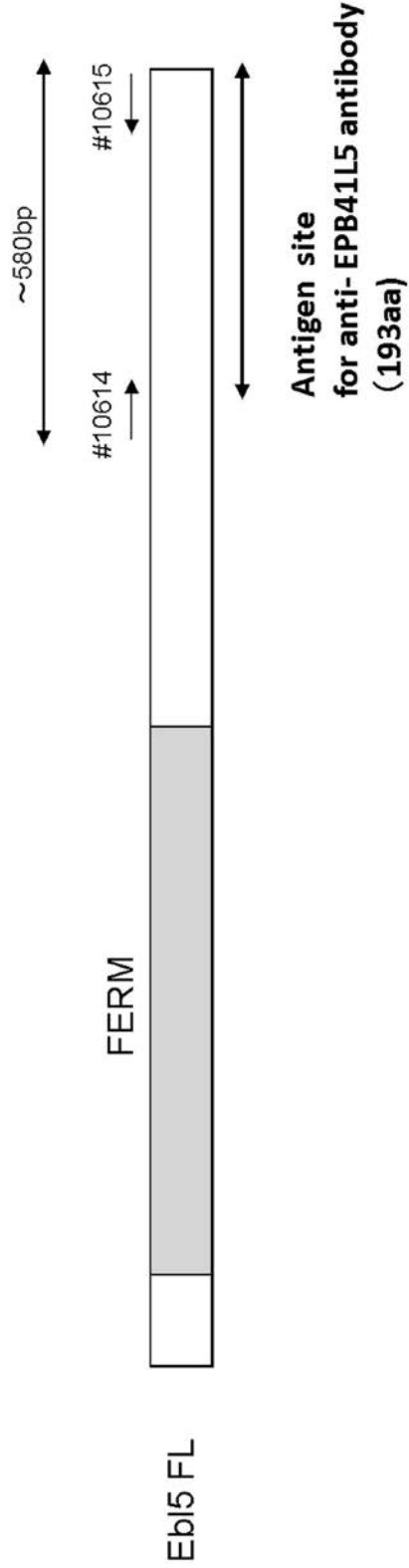
GEP100 1 : MWLCHNSER TQSLLELED SGVEGEPSS ETGTSLDSPS AYPQGPLVPG SSLSPDHYEH
BRAG3 1 : -----
61 : TSVGAYGLYS GPPGQQQTR RPKLQHSTSI LRKQAEIEAI KRSRLSSESY ELSDDLQDKQ
1 : -----
121 : VEHLEKRYGG RLVTIRHAART IQTAFROYOM NKNFERLRSS MSENRMRSRI VLSNRMQFSS
1 : --MLEHKYGG HLVSRRAACT IQTAFROYQL SKNFEKIRNS LLESRLPRI SL-----
181 : FEGPEKVHSS YFEGKQVSVT NDGSQLGALV SPECGDLSSEP TTLKSPAPSS DFADAIIELE
51 : ----RKVRSP TAE----- --SLAAEKA LMEGYGLVGL PLVRSPLPP TFAGTLTELE
241 : DAFSROVKSL AESIDDALNC RSLHTEEAPA LDAARARDE PQTALHGMHDH RKLDEMTASY
97 : DSFTEQVQSL AKSIDDALST WSLKTMCSLR ESGAYQLHQA LQAA--AGPP GLEAEGRAPE
301 : SDWTLYIDEE ELSPPPLSQ AGDRPSSSTES DLRLRAGGAA PDYWALAIHKE DKADDTISCR
155 : SAGPGPGDDA AETPLPPAH SG----TLMN AFROVTVOIA NQNSVSSST ALSVANCLGA
361 : STPSLERQEQ RLRVEHLPLL TIEPPSDSSV DLSDRSERGS LKRQSAYERS LGQQGSPKH
211 : QTVQAPAEPA AGKAEQGETS GREMPEAPAV GREDASAEDS ----CAEAAA SGAADG----
421 : GPHSGAPKSL PREEPELRPR PPRPLDHLA INGSANROSK SESDYSDDGN DSINSTS-NS
263 : ---ATAPKTE EEEEE----- --ETAEVGRG AEAAGDLEQ LSSSSTSTKS
480 : NDTINCSSSES SSRDLSREQT LSKQTYHKEA RNSWDSPAFS NDVIRKRHYR IGLNLFNKPP
304 : AKSGSEASAS ASKALQAMI LSLPRYHCEN PASCKSPTLS TOTLRKRLYR IGLNLFNPN
540 : EKGQVYLIER GFVPDTPYGV AHFLLRQKGL SRQMIGEFLG NRQKQFNRDV LDCVVDEMDF
364 : DKGIQFLISR GFIPDTPIGV AHFLLRQKGL SRQMIGEFLG NSKKQFNRDV LDCVVDEMDF
600 : STMELDEAR KFAQHIRVQG EAQKVERLIE AFSORYCICN PGVVRQFRNP DTIFILAFAI
424 : SSMELDEAR KFAQHIRVQG EAQKVERLIE AFSORYCMCN PEVVQZFHP DTIFILAFAI
660 : ILLNTDMYSP NVKPERKMKL EDFIKNLRGV DDGEDIPREM LMGYIERIRK RELKTNEHDH
484 : ILLNTDMYSP NIKPDRKMWL EDFIRNLRGV DDGADIPREL VYGIYERIQQ KELKSNEHDH
720 : SQVQVKEKLI VGKPPIGSLH PGLGCVLSLP HRRLLVCYCR L FEVPDPNKPQ KGLGHQREIF
544 : TYVTKVEKSI VGMK----- ----TVLSVP HRRLLVCCSRL FEVTDVKNKLO QMAHQREVF
780 : LFNDDLVTIK IFQKKKNSVT YSFRQSFSLY GMQVLLFENQ YYPNGIRLTS SVPGADIKVL
594 : LFNDDLVIK LCPKKKSSST YTFCKSVGLL GMQQLFENE YYSHGITLVT PLSGSEKKQV
840 : INFNAPNQD RKKFTDOLRE SIAEVOEMEK HRIESELEKQ KGWVRPMSQO CSSLKKESGN
654 : LHFALGSDE MQKFEVDLKE SIAEVELEKQ IRIEWELEKQ QGTKTLSEFKP C-----
900 : GTLSRACL D- DSYASGEGLK RSALSSSLRD LSEAGKRGRR SSAGSLESNV EFOPFEPLQ
705 : ----GAQGDQ QSKQGSPTAK REAALRERPA ESTVEVLINA SPA-----RL TILPISRDTI
959 : SVLCS
756 : KSYC-

```

----- Antigen site for anti- GEP100 antibody

Antigen site for anti- EPB4115 antibody

EPB41L5 : NCBI Reference Sequence: NM_020909.3, NP_065960.2



Eb15 FL

BamHI

#10614 : AT GGATTC GAG AAA TGC CTT AAT AAT GTC ATT

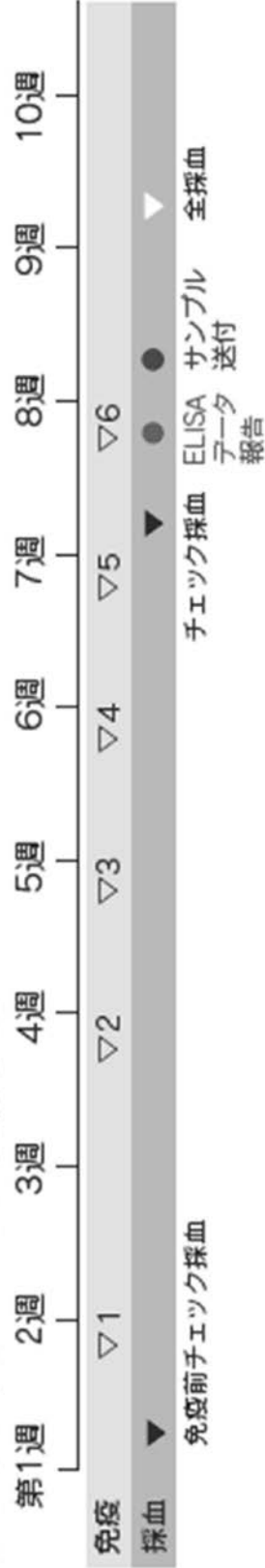
NotI Stop

#10615 : AT GCGGCCGC TCA GAG CTC AGT GGTCAG TAA ACA

【 図 2 6 】

ウサギへの免疫、抗血清の採取、抗体の精製

1) ウサギポリクローナル抗体作製



上記スケジュールにて5回免疫後、チェックを行い、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 2 7 】

Affinity 精製 (Ebl5 Ab)

lot. 1 (1:5000)

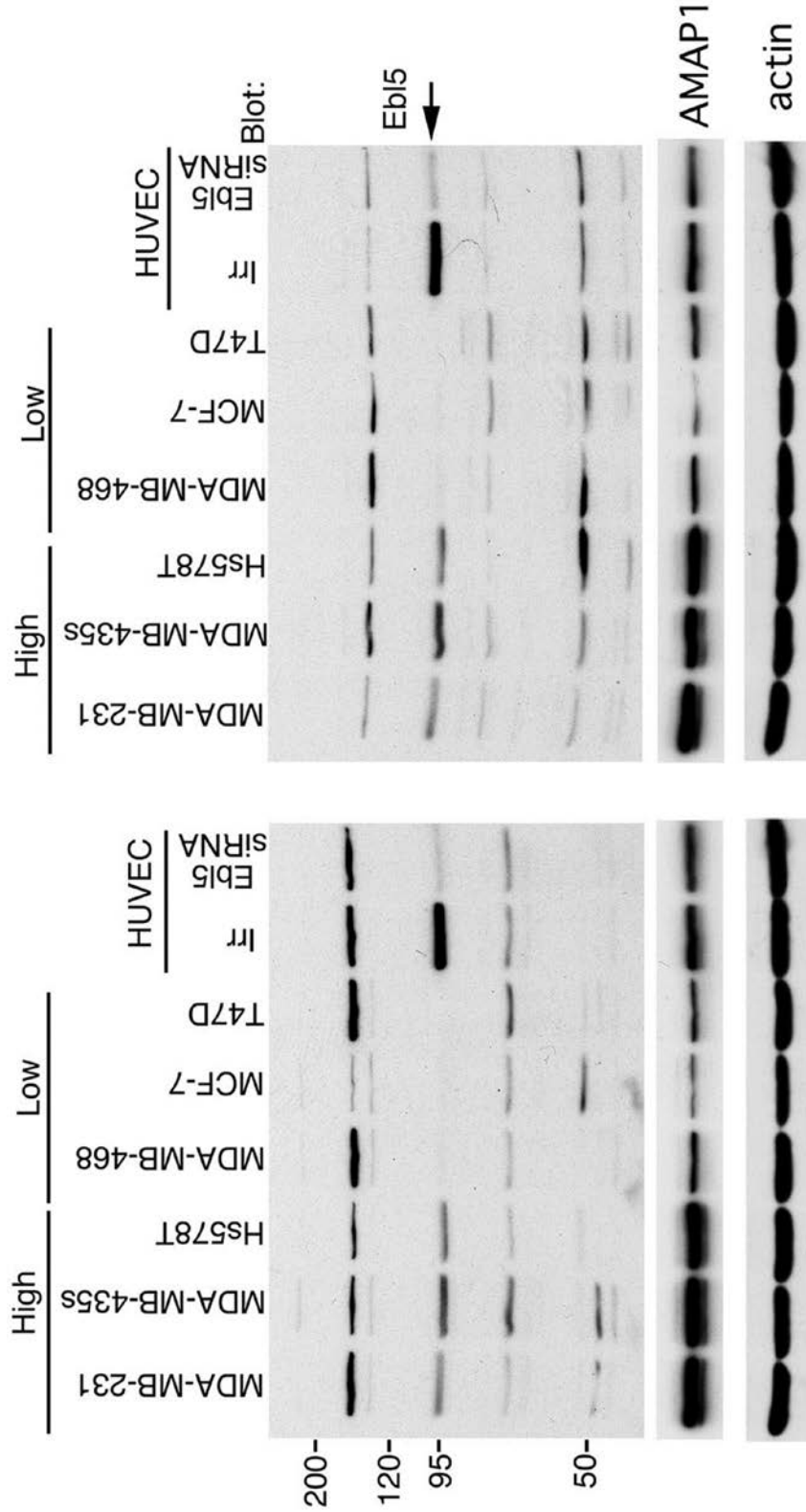
~ 0.3 ug/ml

Blocking with 5% Skim milk

lot. 2 (1:10000)

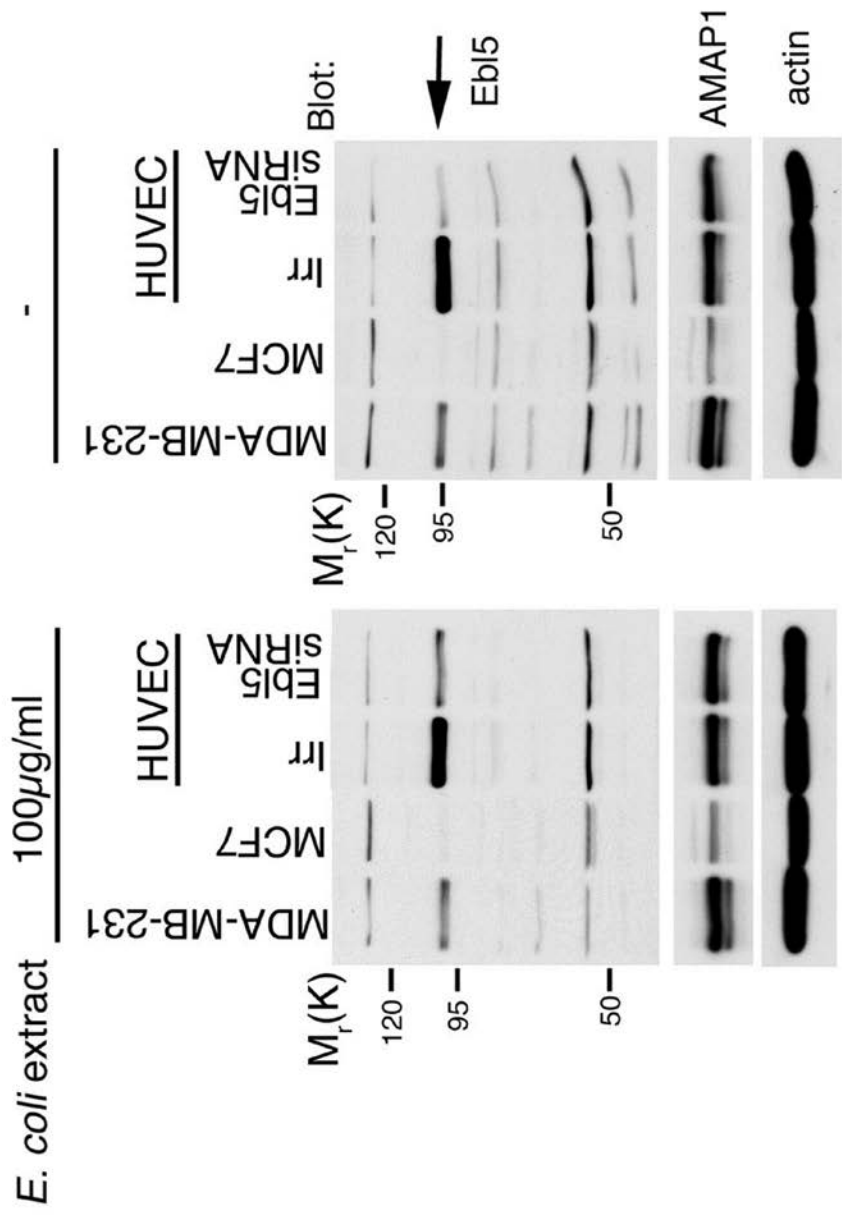
~ 0.3 ug/ml

Blocking with 5% Skim milk



Total lysate : 20 ug

Ebl5 lot. 2 (1:10000)

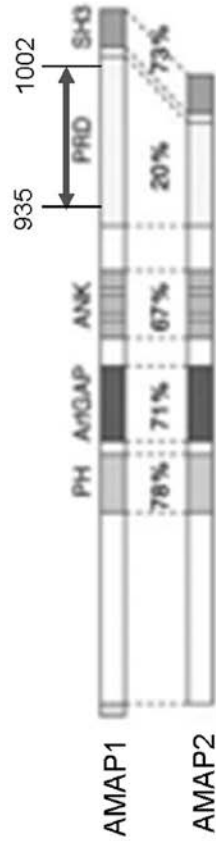


Total lysate : 20 ug

Blocking : 5% skim milk

AMAP1 Rabbit polyclonal Ab

Antigen site for anti-AMAP1 antibody



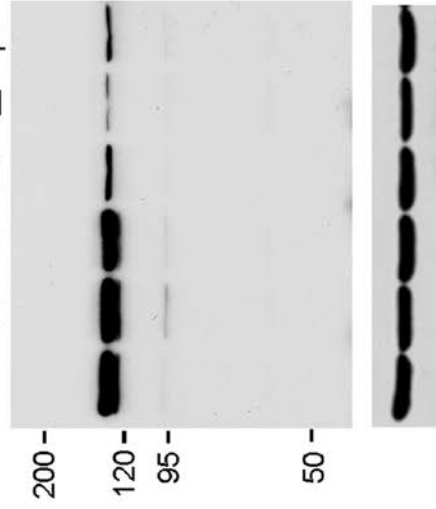
Western Blotting

AMAP1 Rabbit polyclonal Ab (1 : 2000)

Blocking with 5% Skim milk

High Low

MDA-MB-231	MDA-MB-435s	Hs578T	MDA-MB-468	MCF-7	T47D
------------	-------------	--------	------------	-------	------



Total lysate : 20 ug

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融合蛋白質発現用ベクター pGEX-4T1に挿入した。

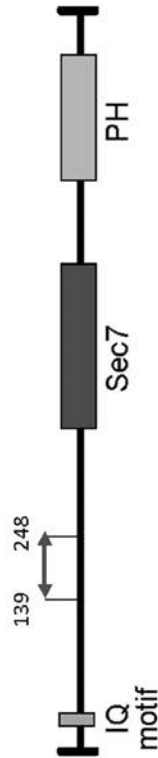
抗原の調整、ウサギへの免疫、抗血清の採取、抗体の精製

EPB41L5と同様の方法で行う。

【 図 3 0 】

GEP100 Rabbit polyclonal Ab

Antigen site for anti- GEP100 antibody



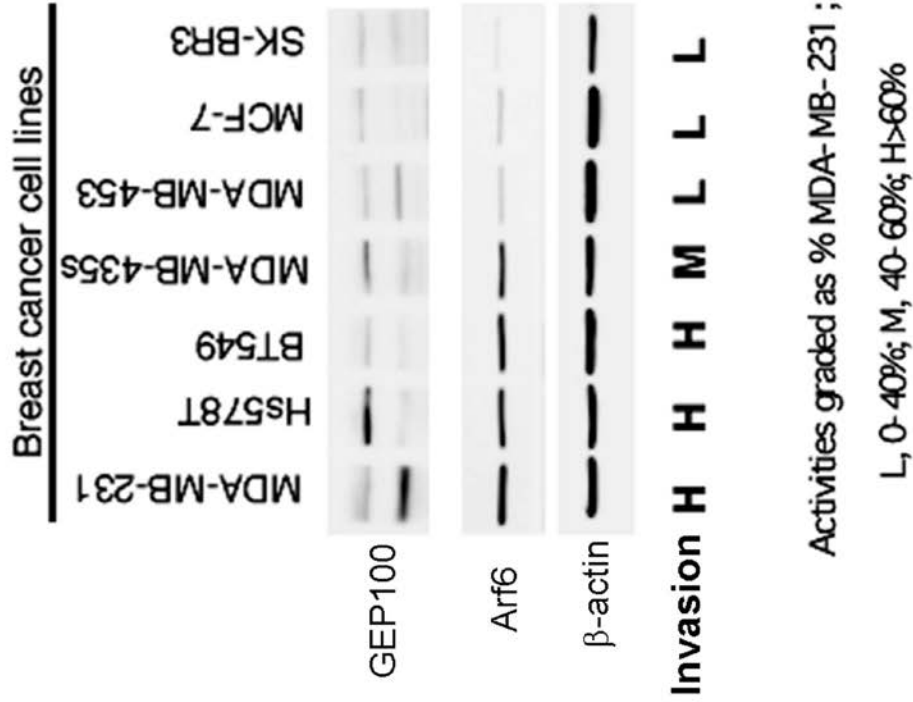
GEP100抗原部位のクローニング手順

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-4T1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



专利名称(译)	用于预测肾癌复发风险的诊断剂和试剂盒，以及预测方法		
公开(公告)号	JP2015021800A	公开(公告)日	2015-02-02
申请号	JP2013148969	申请日	2013-07-17
[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 大家基嗣 三上修治		
发明人	佐邊 壽孝 大家 基嗣 三上 修治		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.Y		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：使用特定于肾癌复发的因子，并且能够将肾癌复发风险的预测结果与治疗联系起来，并且作为预测肾癌复发的方法非常有用。提供了用于肾癌复发风险的预测诊断剂和试剂盒，以及预测方法。用于预测肾癌复发风险的诊断剂：包含能够特异性识别选自AMAP1，GEP100和EPB41L5的任何一种基因的翻译产物的蛋白质和/或多肽。包含该诊断剂的预测肾癌复发风险的试剂盒。预测肾癌复发风险的方法：(A) 确定从接受肾癌治疗的患者收集的生物样品中至少一种选自AMAP1，GEP100和EPB41L5的基因的翻译产物表达水平 (B) 根据步骤(A)中确定的翻译产物表达水平，预测患者肾癌复发的风险。[选择图]无

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

	高 AMAP1 発現 % (n)	高 EPB41L5 発現 % (n)	高 GEP100 発現 % (n)
全患者 (n=112)	34.8 (39)	55.4 (62)	47.3 (53)
年齢			
<59 歳 (n=54)	27.8 (15)	53.7 (29)	40.7 (22)
>59 歳 (n=58)	41.0 (24)	56.9 (33)	53.4 (31)
<i>P</i> 値	0.1311	0.734	0.178
性別			
男性 (n=86)	33.7 (29)	58.1 (50)	46.5 (40)
女性 (n=26)	38.5 (10)	46.2 (12)	50.0 (13)
<i>P</i> 値	0.875	0.281	0.755
組織学的異型度			
低い (n=73)	19.2 (14)	38.4 (28)	35.6 (26)
高い (n=39)	64.1 (25)	87.2 (34)	69.2 (27)
<i>P</i> 値	<0.0001	<0.0001	0.0007
原発巣の進展度 (pT)			
pT1-2 (n=79)	22.8 (18)	44.3 (35)	45.6 (36)
pT3-4 (n=33)	63.6 (21)	81.8 (27)	51.5 (17)
<i>P</i> 値	<0.0001	0.0003	0.566
リンパ節転移 (pN)			
pN0 (n=107)	32.7 (35)	55.1 (59)	47.7 (51)
pN1 (n=5)	80.0 (4)	60.0 (3)	40.0 (2)
<i>P</i> 値	0.030	0.831	0.737
遠隔転移 (pM)			
pM0 (n=100)	30.0 (30)	52.0 (52)	44.0 (44)
pM1 (n=12)	75.0 (9)	83.3 (10)	75.0 (9)
<i>P</i> 値	0.002	0.039	0.042
血管浸潤			
陰性 (n=70)	20.0 (14)	38.6 (27)	42.9 (30)
陽性 (n=42)	59.5 (25)	83.3 (35)	54.8 (23)
<i>P</i> 値	<0.0001	<0.0001	0.222