

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4868152号
(P4868152)

(45) 発行日 平成24年2月1日(2012.2.1)

(24) 登録日 平成23年11月25日(2011.11.25)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04 Z N A
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 P
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 7 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-527867 (P2006-527867)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月29日(2005.7.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2005/013911
 (87) 国際公開番号 W02006/011587
 (87) 国際公開日 平成18年2月2日(2006.2.2)
 審査請求日 平成20年5月7日(2008.5.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2004-224280 (P2004-224280)
 (32) 優先日 平成16年7月30日(2004.7.30)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2005-79435 (P2005-79435)
 (32) 優先日 平成17年3月18日(2005.3.18)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 805000018
 財団法人名古屋産業科学研究所
 愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 三浦 裕
 愛知県名古屋市瑞穂区中山町4丁目8-1
 6番地
 (72) 発明者 川口 誠
 富山県射水市南太閤山12-54
 (72) 発明者 岩瀬 弘敬
 愛知県名古屋市南区呼統一丁目20番2号
 (72) 発明者 浜崎 豊
 静岡県静岡市葵区北1765-163

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌細胞の悪性度判定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体から分離された被検癌細胞内のATBF1量を検出するステップであって、ATBF1量として、(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域(第1領域)の核内存在量及び/又は細胞質内存在量、及び/又は(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域(第2領域)の核内存在量及び/又は細胞質内存在量、が検出されるステップと、

以下の基準、即ち、

- (a) 第1領域が核主体に局在していると悪性度が低い；
- (b) 第1領域が細胞質主体に局在していると悪性度が高い；
- (c) 第1領域が細胞質内及び核内で欠落していると悪性度が高い；
- (d) 第2領域が核主体に局在していると悪性度が低い；及び
- (e) 第2領域が細胞質主体に局在していると悪性度が高い；

に従い被検癌細胞の悪性度を判定するステップと、

を含んでなる、被検癌細胞の悪性度判定法。

【請求項2】

更に、(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域(第3領域)の核内存在量及び/又は細胞質内存在量も検出され、該検出の結果を補助的に用いて被検癌細胞の悪性度を判定する、請求項1に記載の悪性度判定法。

【請求項3】

前記検出が免疫組織化学的染色法を利用して実施される、請求項1又は2に記載の悪性

度判定法。

【請求項 4】

以下の(1)及び(2)の抗体を含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の悪性度判定法用の悪性度判定用キット：

- (1)ATBF1遺伝子のエクソン 10 に対応する領域（第 1 領域）を認識する抗体、
- (2)ATBF1遺伝子のエクソン 11 に対応する領域（第 2 領域）を認識する抗体。

【請求項 5】

以下の(3)の抗体を更に含んでなる、請求項 4 に記載の悪性度判定用キット：

- (3)ATBF1遺伝子のエクソン 3 に対応する領域（第 3 領域）を認識する抗体。

【請求項 6】

ATBF1を更に含んでなる、請求項 4 又は 5 に記載の悪性度判定用キット。

【請求項 7】

前記抗体が、ATBF1と、タグ又はキャリアタンパク質との融合タンパク質を抗原として作製されたものであって、

前記タグ又はキャリアタンパク質を更に含んでなる、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の悪性度判定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は癌細胞の悪性度を判定する手段に関する。詳しくは、癌細胞の悪性度判定法、並びにそれに使用される試薬及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

悪性腫瘍全般を指す癌は、それが形成される組織、患者の遺伝的素因、環境要因などによって様々な病態を呈する。癌の治療では一般に、化学療法や放射線療法或いは外科的手術などの中から有効性の最も高いと考えられる療法が優先的に選択される。癌の治療方針の決定にあたっては癌細胞の悪性度を正確に把握することが極めて重要である。癌の悪性度は一般に癌細胞の増殖能と化学療法または放射線療法の効果により決定される。悪性度が低い癌とは増殖能が低く外科的切除が容易であるか、化学療法又は放射線療法が有効であり予後が良好となる。悪性度が高い癌は増殖能が高く、外科的切除が困難か、化学療法や放射線療法が無効であり予後が不良となる。悪性度が特に高い癌の場合には迅速、的確な外科的摘出が望まれるし、的確な補助治療（放射線療法又は化学療法）が必須となる。もし悪性度の判定を誤れば、期待される治療効果が得られず、病態の悪化や、重篤な副作用の発生、或いは再発が引き起こされる。実際、癌の特性、とくに悪性度を判定する有効な手段がないために誤った治療方針の下で治療が実施され、有効な治療効果が得られないまま不幸な結果に至った症例報告も多い。

これまでのところ、病態や腫瘍マーカー、病理組織検査などによって癌の悪性度を判定（鑑別）することが試みられている。しかしながら、ほぼすべての悪性腫瘍に共通して採用できる決定的な判定手法は確立されていないのが現状である。また、従来の判定手法では、同程度の悪性度と判定される二つの病態であってもそれらの予後が全く異なることも多く経験されるために、それらの鑑別が望まれているところである。

尚、本発明に関連する報告を以下に列挙する。

【0003】

【非特許文献 1】 Miura et al. Cloning and characterization of an ATBF1 isoform that expresses in a neuronal differentiation-dependent manner. J. Biol. Chem. (1995) 270: 26840-26848

【非特許文献 2】 Kataoka et al. Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATBF1. Oncogene (2001) 20: 869-873

【非特許文献 3】 Ishii et al. ATBF1-A protein, but not ATBF1-B, is preferentially expressed in developing rat brain. J. Comparative Neurology (2003) 465: 57-71

10

20

30

40

50

【非特許文献4】Kataoka et al., ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effectson p53. *Cancer Res.* (2003)15:5785-92.

【非特許文献5】野口ら. 脳転移をきたしたAFP産生胃癌の長期生存の一例. *日消外会誌* (2003) 36 (12):1659-1664

【非特許文献6】Miura et al. Susceptibility to killer T cells of gastric cancer cells enhanced by mitomycin-C induction of ATBF1 and activation of p21(Waf1-/Cip1) promoter. *Microbiol. Immunol* (2004) 48: 137-145

【非特許文献7】Iida et al. Alteration of the AT motif binding factor-1 expression in alpha-fetoprotein producing gastric cancer: is it an event for differentiation and proliferation of the tumors? *Oncology Report* (2004) 11: 3-7

【非特許文献8】Kaspar et al. Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein. *J. Biol. Chem.* (1999) 274:14422-1442

【非特許文献9】Sun X et al. Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet.* (2005) Mar 6; [Epub ahead of print]

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

以上のように、癌の悪性度を正確に判定することは、治療方針を決定する上で極めて重要である。一方、癌の悪性度の判定では、正確であることは勿論のこと迅速性も要求される。即ち、正確で且つ迅速な治療方針の決定が行えてはじめて高い治療効果を期待できる。正確であることに加えて、迅速に且つ過度の負担を患者にかけることなく癌の悪性度を判定できる手法が開発されれば、癌治療に対する貢献は計り知れず、癌患者への大きな福音となる。

本発明は以上の背景に鑑み、癌細胞の悪性度を簡便に判定するための手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

以上の目的の下、本発明者らはATBF1(ATモチーフ結合因子1)に注目し、そのタンパク質の細胞内局在に関する様々な検討を行った。尚、ATBF1は異なったプロモーターの使用及び選択的スプライシングにより形成される、分子量の異なった2つのアイソフォームであるATBF1-A(404kDa、アミノ酸配列を配列番号2に示す。また、ATBF1-Aをコードする塩基配列(GenBank accession number:L32832を参照)を配列番号3に示す。)とATBF1-B(306kDa、アミノ酸配列を配列番号4に示す。また、ATBF1-Bをコードする塩基配列(GenBank accession number:L32833を参照)を配列番号5に示す。)の存在が知られている(非特許文献1を参照)。尚、ATBF1-Aはタンパク質N末端側がATBF1-Bよりも920アミノ酸長い構造を有している。

【0006】

まず、培養癌細胞を用いて、ATBF1の核・細胞質移行と細胞周期との関連性について検討した(基礎実験1)。即ち、P19マウス未分化胚性癌細胞株の培養細胞を使用し、レチノイン酸刺激により、未分化な癌細胞を神経細胞に分化させる実験を行った。その結果、(1)P19癌細胞に特に分化刺激を加えない未分化増殖状態で、ATBF1は核、細胞質ともに発現を認めず、癌細胞は増殖状態を示した。(2)神経分化を促してもなお癌細胞が未分化増殖状態を維持する場合、ATBF1の細胞質での発現が始まるが、癌細胞はなお増殖状態を維持した。(3)癌細胞が神経突起を有する分化した細胞群に変化すると、ATBF1は細胞質から核に移動し、核主体の発現に変化した。細胞周期の停止、増殖抑制が認められた。これらの実験結果はATBF1が、2箇所の核内保留シグナルの存在より予想されたごとく、実際に細胞質から核に移行するタンパク質である事と、この移行が細胞周期の停止と関連する事を意味している。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

次に、培養癌細胞を用いて、ATBF1の細胞質から核への移行と、核から細胞質への移出の調節機構に関して検討した（基礎実験2）。その結果、P19細胞を使用した、ATBF1の細胞質と核の移行に関する制御系への関連の検討で、フィブロネクチン、ラミニン、ゲラチン、ポリ-L-オルニチンなどを培養皿へ塗布した場合にのみP19細胞培養皿によく付着することができ、その条件下でATBF1の核への移行が観察された。これは浮遊状態から付着状態への変化で細胞表面に存在する受容体が関与し、細胞外部環境に応じた情報を細胞内へ伝えることでATBF1の細胞内局在が決定されている可能性を示唆する。次に、ATBF1の核から細胞質への移出機構に関連した検討で、CRM1(Exportin 1 or chromosome region maintenance 1)の阻害剤Leptomycin Bの作用で、実際に核からの細胞質へのATBF1核外輸出阻害が起こりATBF1の核内濃度が明らかに増大する事実と、アポトーシスに陥る細胞数が明らかに増加する事実が証明された。これらの実験結果からATBF1濃度が核内で増加する状態は、癌細胞のアポトーシスを促進する状態であると判断でき、癌の治療方針に重要な示唆を与えていると考えられる。さらに、ATBF1の核移行の調節機構に関する検討で、培養皿接着状態で、さらにレチノイン酸処理を行ったP19培養細胞にPI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)の拮抗剤2種(Wortmannin, LY294002)を作用させると、P19細胞のATBF1産生自体は影響を受けなかったが、核周囲の細胞質部分にATBF1タンパク質が核周囲リング状となるように集合するも、核内へのタンパク質の移行は阻止される傾向(作用はWortmanninがLY294002より強い)を示すとともに、細胞自体は増殖状態を維持した。この実験結果はATBF1の核への移行がPI3Kに依存した事象である事、核へのATBF1移行が行われない場合、細胞は増殖状態を維持出来る事を意味している。続いて、上記検討の際に確認したPI3Kファミリータンパク質の中で、どのタンパク質がATBF1の核移行の際のリン酸化に関与しているかを決定する検討で、ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated, 毛細血管拡張性小脳運動失調症の原因遺伝子)の作用を特に特異的に阻害するとされる薬剤、カフェインを作用させた。その結果、PI3K阻害剤、Wortmannin, LY294002を使用した場合には核移行の阻害が不完全であったのに比較して、カフェインによって、殆ど全ての培養細胞におけるATBF1の核への移行が阻害された。この結果はATBF1の核内保留シグナル部位のリン酸化に関与するPI3KはATMである事を意味している。さらにATBF1が核に導入されるのにはATMの活性化(リン酸化)、すなわち放射線などによるDNA障害の感知によって促進される事を意味している。

【 0 0 0 8 】

以上の基礎実験1、2の結果、ATBF1が細胞質から核へ、さらに細胞質へと行き来をする事で細胞周期の時期や増殖状態に切り替わる事が明らかとなった。ATBF1のみが主な原因でそれらの事象が起こったのか、他の何らかの因子が作用した結果なのかを明らかにする目的で、ATBF1単独発現ベクターを用いて、マウス神経芽細胞腫由来の培養細胞株Neuro 2A細胞で強制発現実験を行った（基礎実験3）。その結果、ATBF1の強制発現を認める細胞は、例外なくBrdU(5-bromodeoxyuridine)取り込みを認めない事が明らかとなり、ATBF1が誘因となり細胞周期が停止する事実が明らかとなった。

【 0 0 0 9 】

続いて、胎生14日ラット胎仔脳の神経細胞におけるATBF1の核移行と神経細胞の増殖能との関連性について検討した（基礎実験4）。まず、胎生14日のラット胎仔脳組織を検索したところ、傍脳室領域に存在する神経上皮細胞はBrdU取り込みを認めるとともにATBF1が細胞質に局在していた。分化領域に存在する神経細胞はBrdU取り込みが無いことから細胞周期が停止していることが分かり、ATBF1は核に局在した。胎仔期の、分裂増殖能を有した神経上皮細胞と、分裂能を失い最終分化した神経細胞におけるATBF1の細胞内局在の比較観察は、癌の悪性度を考える上で非常に参考になる。癌細胞は、未分化で分裂能を有する点で正常神経上皮細胞に類似し、また、ATBF1が細胞質に存在する点においても類似している。正常神経上皮細胞ではATBF1が細胞質から核へ移行することによって、細胞増殖を停止した神経細胞へと最終分化して性質を変える。癌細胞においてもATBF1の細胞内局在に関して二つの様式が認められ、ATBF1が細胞質だけに存在する悪性度の高い種

類と、核にATBF1が存在する比較的悪性度が低い種類に分類できる。

【 0 0 1 0 】

一方、ATBF1の核内濃度の増大は細胞周期の停止を誘導し、細胞の分化傾向の指標となることを実証した。ATBF1の核への移行の分子機構には、PI3Kファミリータンパク質の一員であるATMが直接関与することを実験的に確認した。

また既報（非特許文献6）ですでに示したごとく、胃癌の培養細胞において、ATBF1は癌抑制遺伝子p53と蛋白-蛋白結合し機能する。このATBF1とp53複合体が癌抑制遺伝子p21のプロモーターを活性化して、p21の発現上昇を導き、癌細胞をアポトーシスに陥らせることが想定される。実際にある種の抗ガン剤（アルキル化剤）を作用させてDNA修飾シグナルを活性化するとATBF1の発現を誘導する事実も明らかになっている。癌治療効果はATBF1の誘導および、ATBF1を細胞質から核へ移動させる効果に大きく依存する。これは本発明者らが、以下臨床的な応用実験でATBF1の発現様式から各種癌細胞のアポトーシス、各種治療の効果を評価する原理となっている。

【 0 0 1 1 】

上記基礎実験によるATMシグナルによるATBF1の細胞質から核への移行、ATBF1とp53の結合、さらにp21の発現誘導、DNA修復シグナルによる活性化などの事実を踏まえ、本発明者らは、乳癌、膀胱癌、胃癌、肺癌、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍（GIST）、髄膜腫、前立腺癌をはじめとする各種癌細胞（ここでの癌細胞には、良性腫瘍、良性悪性境界病変、悪性腫瘍に至る一連の細胞も含む）におけるATBF1の細胞内存在量及び局在態様を検索した（比較検討材料として腫瘍以外の正常ヒト細胞についても検討した）。さらに患者の予後を検討できる症例は、ATBF1発現様式と予後との関連も検討した。その結果、ヒト各種癌細胞でATBF1発現を認める症例は、その発現部位が核か細胞質かを問わず、発現を認めない症例よりも予後が良好な傾向があった。さらにATBF1の核・細胞質局在を含めて検討すると、予後不良であった症例では細胞の核内ATBF1量が減少しており、癌の悪性度と核内ATBF1量とが明らかに関連することが判明した。具体的には、予後不良の症例では、ATBF1が核よりも細胞質内に多量に存在するか、細胞質のみに局在する傾向を示し、さらに予後不良な例の中には核、細胞質ともにATBF1が欠落する例が存在した。

【 0 0 1 2 】

以上の結果から、ATBF1の細胞全体、細胞質、核での染色性は、（1）核主体の局在を示す場合、（2）細胞質主体の局在を示す場合、（3）核細胞質ともに欠落する傾向を示す場合で癌の悪性度が異なり、その区別により癌細胞における悪性度を判定できることが明らかとなった。

【 0 0 1 3 】

本発明者らはATBF1と癌細胞の悪性度との関係について更に詳細な検討を行った。即ち、以上の各実験で使用した抗体D1-120（ATBF1タンパク質の中央部、即ちATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域を特異的に認識する抗体）に加えて、ATBF1-Aタンパク質のN末端側（ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域）を特異的に認識する2種類の抗体（抗体名；NT440及び1-12、図31を参照）及びATBF1タンパク質のC末端側（ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域）を特異的に認識する抗体（抗体名；AT6、図31を参照）を使用して各種癌細胞におけるATBF1タンパク質の局在部位の検討を行った。その結果、以下の知見が得られた。

（1）癌の悪性度によって局在が大きく異なるのはD1-120が認識する部位（D1-120部位）とAT6が認識する部位（AT6部位）である。従ってこれらの部位を検出することは、癌の悪性度を判定する上での重要度が高い。また、D1-120単独での検索が癌の悪性度の判定の指標となることが明らかとなっており（後述の実施例を参照）、癌細胞の悪性度判定においてD1-120部位の検出が最も重要であると考えられる。一方で、D1-120部位とAT6部位の局在を同時に検討する事により、より特異性の高い悪性度判定法を提供できることが判明した。

（2）D1-120以外の抗体を使用した研究により、ATBF1は腫瘍の種類あるいは悪性化に伴い、一つの巨大タンパク質として常に存在している訳ではなく、タンパク質のプロセッシ

10

20

30

40

50

ングを受けたり、あるいは時にはATBF1遺伝子転写の際にmRNAのalternative splicingによりエクソンのスキッピングが起こり、タンパク質構造に変化が起こる病態が存在する事が明らかになった。(図47を参照)。

(3) NT440と1-12の染色性はともに概して核主体に局在する傾向であった。従って、これらの抗体が認識する部位、即ちATBF1遺伝子のエクソン3に対応するN末端のATBF1部位の検出は細胞全体でのATBF1量が増加、減少したのか、あるいはATBF1が欠落するかの指標になる。またNT440が細胞質に残り1-12が核に存在する場合には148番のセリンがリン酸化を受けATBF1のN末端が核に移行するという動きが存在する事を意味するから、NT440と1-12で染色されるタンパク質量の比率を求めれば同部の核移行の比率を知る事が可能である。さらにNT440部位又は1-12部位の存在、欠落、核細胞質の局在位置を、ATBF1タンパク質中央を認識する抗体(D1-120)及びノ又はC末端側を認識する抗体の染色性と比較する事で、ATBF1タンパク質のプロセッシングの状況、さらにはmRNAレベルで起こる異常なスプライシングによるエクソンスキップの判定が可能である。以上の理由から巨大な転写因子であるATBF1のゲノム構造異常の全体像を正確に把握するには、重要なDNA結合ドメインをコードするエクソン10に対応する抗体のみならず、N末端をコードするエクソン3に対応する抗体(さらにはC末端をコードするエクソン11に対応する抗体)でそれぞれ染色して比較することが有効である。このように、ATBF1-AのN末端側を認識する抗体の染色性を調べることは、癌の悪性度を判定する上で補助的ながらも有益な情報を与える。

(4) 現在までの検討結果を、D1-120部位が核主体に存在する場合と細胞質主体或いは欠落する場合の二つに分けて考える。まず、D1-120が核主体に存在する場合はさらに、AT6部位が核主体に存在する症例と、細胞質主体に存在する症例の二つに分かれる。Bcl-2やBcl-x_Lが発現する腫瘍においてその発現をATBF1発現と関連づけると、[A] AT6部位が核主体に存在すれば、Bcl-2, Bcl-x_Lの発現が抑制される傾向が明確であり、悪性度が低いと判定できる。[B] AT6部位が細胞質主体に存在すれば、腫瘍によってはBcl-2, Bcl-x_Lの発現が抑制できず、AT6部位が核主体に存在する場合よりは悪性度が高いと判定できる。

次に、D1-120部位が細胞質主体に存在する場合、あるいは欠落する傾向のある場合であるが、大部分の腫瘍でAT6部位の局在は細胞質主体となる。一般にD1-120部位とAT6部位は同時に細胞質に検出される。しかしながらある種の腫瘍でD1-120部位が欠落した場合でも、AT6の染色性が細胞質ではなく核に局在する例外が認められた(現在までの検索では後述のごとくB細胞リンパ腫のある特定の部位)。この場合、D1-120部位が欠落する観察だけでは極めて悪性度が高いと判断される可能性があるが、実際にはAT6が核に局在するとBcl-2が抑制される事が理論的に予想され、かつ観察自体がそれを証明している。従って同じD1-120部位が欠落する悪性度が高い腫瘍の中でも、AT6が核に局在する腫瘍の診断は注意を要し、AT6が細胞質に存在する腫瘍に比較すると悪性度は低いと判断する必要があると考えられる。

【0014】

以上をまとめると、D1-120で検出できるATBF1部位の局在検討が癌の悪性度判定の際に最も重要と位置づける事が可能である。しかし、ここにAT6, 1-12, NT440による所見を加える事によりさらに詳細な判定が可能であるといえる。

上述したNT440, 1-12, D1-120, AT6の染色性から、同一腫瘍において、ATBF1のN末端部位(NT440, 1-12)、中央に近い部位(D1-120)、C末端部位(AT6)の三箇所の染色性が全て核主体、あるいは全て細胞質主体であるといった統一性が症例ごとに存在しないことは、ATBF1はタンパク質プロセッシングによる断片化や、エクソンの使われ方や突然変異など遺伝子レベルの変異などの影響で、タンパク質の全体構造に変化が起こる病態が存在する事実を表している。

【0015】

ここで、エクソン3に対応する領域を認識する抗体の中で1-12は148番のセリンがリン酸化されている状態を認識し、NT440はリン酸化の有無にかかわらずN末端のATBF1部位を認識する。エクソン3に対応する領域には核内保留シグナルが存在する一方、核外輸出シグナルは存在しないことがわかっており(図31および図33を参照)、この領域が他の

10

20

30

40

50

領域から分断された場合には、核だけに存在して、細胞質には存在しない特異的な状態となる。1-12抗体とNT440抗体はこの特異的な状態を検出することが可能である。一方、AT-6はエクソン11に対応する領域を認識する。この領域には核内保留シグナルも核外輸出シグナルも構造的には存在しないために(図31および図33を参照)、他の領域から分断された場合には、核には積極的に移動できない断片となり、主に細胞質に集積することが予想される。この状態をAT-6は特異的に検出することが可能である。以上のことから、ATBF1がプロセッシングを受けることなどによりATBF1の全体構造に変化が起こる病態が予想される全ての癌(腫瘍)において、D1-120に加えて、1-12、NT440、AT-6の所見も総合して検討することが好ましい。結論として、4つの抗体を同時に使用し、D1-120の所見を中心とし、他の抗体の所見、特にAT6の所見を総合し、悪性度判定を行うことによって、判定の確実性が一層向上するといえる。

10

【0016】

理論的なさらなる側面として、前立腺癌で見出されたATBF1ゲノムに蓄積する各種の変異、mRNA段階でのAlternative splicing異常の可能性を詳細に検討していくと、ホメオドメイン1から4を含むエクソン10がスキップされたATBF1タンパク質の存在の可能性を指摘出来る(非特許文献9、及び図37を参照)。これはつまり、種々の腫瘍におけるD1-120部位(エクソン10に対応、図31を参照)の染色性の欠落が(後述の実施例を参照)、腫瘍の悪性度の高さを指摘できる事だけに止まらずに、エクソン10がスキップされた異常タンパク質の存在をすでに指摘できている可能性もある。しかもこのD1-120染色性の欠落は前立腺癌以外の腫瘍でもすでに観察されており、前立腺癌ですでに認められたATBF1ゲノムの変異、mRNAレベルのAlternative splicing異常は広く他の腫瘍にも共通して存在する可能性が示唆される。またこのようにエクソン3, 10, 11に対応する抗体を使用したATBF1の特定の部位の細胞内の発現、核、細胞質の局在検索をゲノムのシーケンス、mRNAのシーケンスの異常の検索と平行して継続することにより、種々の腫瘍の悪性度だけでなく、予想されるmRNAのAlternative splicingの遺伝子レベルの異常を容易に検出できるようになる。

20

【0017】

本発明は以上の成果に基づき完成されたものであって、以下の構成を提供する。即ち本発明は、生体から分離された被検癌細胞内のATBF1量を検出するステップを含んでなる、被検癌細胞の悪性度判定法である。

30

本発明の一形態では、ATBF1量として、以下の(1)~(3)からなる群より選択される一又は二以上が検出される。

(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域の核内存在量及び/又は細胞質内存在量、(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域の核内存在量及び/又は細胞質内存在量、(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域の核内存在量及び/又は細胞質内存在量。

本発明の好ましい一形態では少なくとも(1)が検出される。本発明のさらに好ましい一形態では上記(1)~(3)が検出される。

本発明の方法では、検出法として免疫組織化学的染色法が好適に利用される。

本発明は他の局面として、本発明の方法に利用可能な試薬(被検癌細胞の悪性度判定用試薬)及びキット(被検癌細胞の悪性度判定用キット)を提供する。本発明の試薬は抗ATBF1抗体からなる。抗ATBF1として、(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域を認識する抗体、(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域を認識する抗体、又は(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域を認識する抗体を用いることができる。

40

本発明のキットは以下の(1)~(3)からなる群より選択される一以上の抗体を含む。

(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域を認識する抗体、(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域を認識する抗体、及び(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域を認識する抗体。

好ましい形態では、本発明のキットは付加的にATBF1を含む。また、タグ又はキャリアタンパク質との融合タンパク質である抗原を用いて作製された抗体をキットに使用する場合には、付加的にタグ又はキャリアタンパク質を更に含めてキットとしてもよい。

50

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、被検癌細胞の悪性度を簡便に判定することができる。本発明の悪性度判定法は様々な種類の癌において、増殖速度、浸潤傾向、易転移性という指標で表現される癌の増殖能の予測に利用され得る。さらに本発明の判定結果は例えば化学療法又は放射線療法の有効性を予測することにも利用され得る。このように癌の悪性度を決定するのに重要な因子である2項目、(1)癌の増殖能および(2)各種治療の有効性を予測、判定する事により、本発明は、治療法の選択における有用な情報を提供することとなる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、ATBF1とp21及びp53との関連を模式的に示す図である。DNA傷害が起こることにより細胞周期が止まる機構を概説してある。

【図2】図2はP19細胞におけるATBF1発現と、フローサイトメトリーによる検索を示す。上段はいずれもDAPI(核DNAの染色)、ATBF1、 α -tubulinの3重染色像を示す。図2aはレチノイン酸(RA)を作用させてないP19細胞である。ATBF1、 α -tubulinともに発現を認めない。図2bはレチノイン酸(RA)の作用後24時間のP19細胞であり、 α -tubulinは陰性だが、細胞質にATBF1が染色される。図2cはレチノイン酸(RA)作用を中止し、さらに4日間培養を続けたP19細胞である。核にATBF1の染色性が集中し、細胞質からは細胞群の周辺には、 α -tubulin陽性の神経突起が伸びてくる。図2d、2e、及び2fはそれぞれ図2a、2b、及び2cに示したP19細胞のフローサイトメトリーによる解析である。図2fにのみ細胞周期の停止を認める。

【図3】図3aはATBF1における核内保留シグナルのコンピュータ解析による潜在的な位置を示す。共通配列に類似の配列の存在が2箇所(それぞれ、アミノ酸277番、及び2987番から始まる)に予想される。図3bは同じくATBF1における核外輸出シグナルの潜在的な位置を示す。核外輸出シグナルの存在が3箇所(それぞれ、アミノ酸1267番、2471番、2504番から始まる)に予想される。

【図4】レチノイン酸処理後、培養皿にフィブロネクチンと、ポリ-L-オルニチンを塗布した場合と塗布しない場合の、P19細胞におけるATBF1の発現部位を示す。図4aは塗布しない場合のP19細胞のATBF1発現を示す。細胞は浮遊状態にあり、ATBF1は細胞質には出現するが、核へ移行しない。図4bは培養皿にフィブロネクチンと、ポリ-L-オルニチンを塗布後培養3時間のP19細胞のATBF1発現である。ATBF1の核への移行が観察される。図4cは24時間後の状態を示し、核のATBF1発現は明らかに増強する。

【図5】図5はP19培養細胞におけるATBF1の核移行に対する、Leptomycin Bの影響を示す。図5aはLeptomycin Bを作用させない場合のP19細胞でのATBF1の発現状態である。核でのATBF1の存在を認める。図5bはLeptomycin Bを作用させた時の、P19細胞におけるATBF1の発現状態である。ATBF1の核内濃度が増大した事が明らかである。

【図6】図6はP19細胞におけるATBF1の核への移行に関し、PI3Kファミリータンパク質の拮抗剤3種(Wortmannin, LY294002, カフェイン)を作用させた場合の影響を調べるための実験の結果である。図6aはP19細胞の核でのATBF1発現を示す。図6bはWortmanninの作用によりATBF1が核内に移行が阻害され、ATBF1が細胞質中心に存在する事を示す。図6cはLY294002の作用により部分的にATBF1の核への移行が阻害される事を示す。しかしその阻害効果はWortmanninより小さい事が解る。図6dはカフェインの作用を示す。Wortmannin, LY294002に比較してより完全にATBF1の核への移行が阻害された事が解る。

【図7】図7はマウス神経芽腫由来細胞株Neuro2A細胞へ完全長のATBF1 cDNAを強制発現させた共焦点レーザー顕微鏡写真の所見を示している。細胞を固定観察する直前の1時間だけ培養液にBrdUを添加してDNA合成細胞を標識した。BrdU取込み細胞を緑の蛍光を発する二次抗体で検出すると同時に強制発現ベクターに付加されているHAタグを赤の蛍光を発する二次抗体で検出した。図7aの矢印で示されるようにBrdU陽性細胞の緑色が、HAタグの赤色と重なり、黄色の発色をしている細胞群が検出された。一方図7bの矢印の頭で示されるようにHAタグ付きのATBF1導入細胞群はすべて赤色を呈し、BrdU陽性細胞の緑色と重

10

20

30

40

50

ならないことを示している。この実験結果はATBF1cDNAの強制発現によって細胞周期が完全に抑制されることを示している。これらの事実は図7cの棒グラフとしてまとめられる。図7cにはATBF1のないHAタグだけの導入実験結果で、斜線部分に示されるように、約40%のBrdU陽性細胞がHAタグと二重陽性となり黄色を呈したことを示している。一方ATBF1のcDNAを含むHAタグの遺伝子導入細胞は、すべて赤色を呈しBrdU陰性であることが示されている。これらの遺伝子導入実験の結果に加え、さらにFACScanを使ってそれぞれの細胞群の細胞周期を検定した。図7dに示したHAタグだけ入った遺伝子導入群の細胞周期と比較して、図7eに示したATBF1 cDNAの遺伝子導入群の細胞周期はM1領域、即ちG1/G0期の細胞群が10%以上増加していることから、DNA導入効率と合わせて考えるとATBF1の強制発現によってほぼ完全に細胞周期がG1/G0期に停止されることが明らかとなった。

【図8】図8は胎仔期14日目のラット脳の峡部(isthmus)の組織所見を示す。図8aはBrdU染色像である。傍脳室領域(実線)および分化領域(点線)の位置でBrdUの発現が明らかに異なる。傍脳室組織領域ではBrdU陽性細胞が多数存在し、分化領域では大部分でBrdU陰性となる。図8bはATBF1染色像である。傍脳室領域(実線)ではATBF1は細胞質にも局在を認めるのに比較して、分化領域(点線)では核主体にATBF1が局在する。その部位を拡大したものを図8c, 8dに示す。図8cの黒矢印で示すごとくDABの反応物(黒色)が核主体に存在する。図8eは蛍光染色像(白色が陽性)であり、ATBF1が白矢印で示すごとく核主体に存在する事が明らかである。図8dの黒矢印で示すごとく、DABの反応物(黒色)は細胞質にも局在する。図8fの蛍光染色像(白色が陽性)ではATBF1は細胞質に存在する事が明瞭で、白矢印で示すごとく核は黒色調で抜けており発現を認めない。

【図9】図9は膀胱の尿路上皮癌のうち非浸潤癌、浸潤癌症例それぞれに行った抗原賦活法による染色性の差異を示したものである。各種バッファーを使用しオートクレーブ処理を行い、ATBF1染色を施行した。黒丸(●)は核主体の染色結果が得られた事を示す。白丸(○)は細胞質主体の染色結果が得られた事を示す。

【図10】図10は膀胱の尿路上皮癌のうち非浸潤癌、浸潤癌症例それぞれに行った抗原賦活法による染色性の差異を示したものである。各種バッファーを使用し電子レンジ処理を行い、ATBF1染色を施行した。黒丸(●)は核主体の染色結果が得られた事を示す。白丸(○)は細胞質主体の染色結果が得られた事を示す。

【図11】図11は膀胱の尿路上皮癌のうち非浸潤癌、浸潤癌症例それぞれに行った抗原賦活法による染色性の差異を示したものである。各種バッファーを使用し圧力釜処理を行い、ATBF1染色を施行した。黒丸(●)は核主体の染色結果が得られた事を示す。白丸(○)は細胞質主体の染色結果が得られた事を示す。

【図12】図12は膀胱の尿路上皮癌のうち非浸潤癌、浸潤癌症例それぞれに行った抗原賦活法選択による染色性の差異の代表例を提示したものである。上段(図12a, c, e)は非浸潤癌、下段は(図12b, d, f)は浸潤癌例を示す。左(図12a, b)は50mMトリス塩酸バッファーpH10.0を使用し、オートクレーブ処理を行った症例を示す。非浸潤癌(図12a)、浸潤癌(図12b)ともに核でのATBF1染色性を認める。中(図12c, d)はDAKO TRS pH6.0を使用し電子レンジ処理を行った症例を示す。非浸潤癌(図12c)、浸潤癌(図12d)ともに矢印に示した細胞のごとく核周囲の細胞質主体の染色性を認める。右(図12e, f)は10mMクエン酸バッファーpH6.0を使用し圧力釜処理を行った症例を示す。非浸潤癌(図12e)ではATBF1が核に、浸潤癌(図12f)ではATBF1が矢印で示すごとく核周囲の細胞質主体に局在を示し、核と細胞質主体の局在の差を際立たせる事が可能となる事を示している。

【図13】図13は乳癌症例の切除例、生検例におけるATBF1染色結果を示す。図13a(HE染色), b(ATBF1染色)は53歳女性例で、乳頭腺管癌の乳管内に局限する部位を示す。組織学的に乳管内の部位(図13a、矢印四角囲み)をATBF1染色すると白矢印で示すごとく細胞質にATBF1が局在する細胞に混在して、黒矢印で示すごとく核に染色性が局限する細胞の混在が明らかである(図13b)。図13c(HE染色), d, e(ATBF1染色)は66歳女性例で、乳頭腺管癌が乳管内に存在し中心部が壊死に陥り、いわゆる面疱癌の様式を取る(図13c)。ATBF1は矢印で示すごとく乳管内面疱癌の大部分で核を中心とする局在を示

10

20

30

40

50

す(図13d, e)。図13f(HE染色), g(ATBF1染色)は50歳女性例で、乳腺内に限局して浸潤する乳頭腺管癌である(図13f)。ATBF1は殆ど全ての細胞の細胞質に限局しており(図13g)、矢印に示すごとく粗大顆粒状の染色性を示す。図13h(HE染色), i(ATBF1染色)は73歳女性例で、乳腺組織からさらに周囲の脂肪組織に浸潤を示す乳頭腺管癌である(図13h)。矢印のごとく細胞質に局在するATBF1を認める(図13i)。図13gの染色性に比較して、ATBF1の量は明らかに少ない傾向を示す。図13j(HE染色), k(ATBF11染色)は53歳女性例である。乳腺内に腫瘍が個々、バラバラとなる浸潤を示す硬癌である(図13j)。ATBF1は部分的に黒矢印のごとく細胞質に局在するが、白矢印のごとく癌細胞でATBF1が欠落する部位も観察される(図13k)。

【図14】図14は、ヒト膀胱癌細胞株のHE染色像(上段a, d, g、左から順にRT4、T24、HT1376の染色像)、ATBF1染色像(中段b, e, h、左から順にRT4、T24、HT1376の染色像)、及びp53染色像(下段c, f, i、左から順にRT4、T24、HT1376の染色像)である。RT4ではATBF1は細胞質にも存在するが、黒矢印で示すごとく明らかに核に局在を示す細胞が存在する(図14b)。p53も核に強い染色性を示す(図14c)。T24ではATBF1は黒矢印に示すごとく殆ど細胞質に限局し、染色性は粗大顆粒状である(図14e)。p53は核にごく薄い染色性を認める(図14f)。HT1376はATBF1はごく少量、黒矢印のごとく核に限局(図14h)。p53は核に染色性を認める(図14i)。

【図15】図15は、ヒト膀胱尿路上皮癌組織(a乳頭状粘膜内癌 WHO Grade I 低異型度の症例、b乳頭状粘膜内癌 WHO Grade I(低異型度)、WHO Grade II(中等度悪性度)が混在する症例、c粘膜下への浸潤癌 WHO Grade II 中等度異型度の症例、d粘膜下への浸潤癌 WHO Grade III高異型度の症例)であり、HE染色像(a1, b1, c1, d1)、およびATBF1染色像(a2, b2, c2, d2, d3)を示す。図15aの乳頭状上皮内癌は、核が小型で配列が整っておりWHO Grade I(a1)と判断できる。黒囲みの部位でのATBF1の発現は黒矢印のごとく核に限局する(a2)。図15bの乳頭状上皮内癌は、核が小型で配列が整ったWHO Grade I(b1の上方)および、それより核が大型で配列にやや乱れのあるWHO Grade II(b1の下方)の混在である。黒囲みの境界部位でのATBF1発現を検索すると、Grade Iの部位ではATBF1が黒矢印のごとく核中心に局在し、Grade IIの部位では白矢印のごとく細胞質中心に局在する(b2)。図15cの浸潤癌は、上皮下の結合組織、脈管内に腫瘍が浸潤、進展を示し細胞の大小不同からWHO Grade IIと判断できる(c1)。黒囲みの結合組織に浸潤する細胞でのATBF1発現を見ると黒矢印のごとく細胞質に粗大顆粒状の染色性を示す(c2)。図15dは細胞が密に配列し、非常に大型の核が混在するWHO Grade IIIの浸潤癌である(d1)。2箇所の黒囲みの浸潤部位でATBF1の発現を検索すると、白矢印に示すごとくATBF1が細胞質に局在を示す部位(d2)、黒矢印のごとくATBF1の発現が核、細胞質とも非常に少なく欠落する傾向がある部位(d3)が混在する。

【図16】図16は胃のGroup IIIと診断される腺腫におけるATBF1の発現を示す。図16a1は立方状の好酸性細胞からなる異型腺管の密な増殖を示す胃型腺腫あるいは異型上皮巢である。ATBF1は矢印で示すごとく核に局在を示し(a2)、p53の核での発現(a3)、p21の核での発現(a4)が明らかである。図16b1は不整な腸型小腺管の集まる中等度異型の腺腫あるいは異型上皮巢である。ATBF1は矢印で示すごとく核主体に局在し(b2)、p53、p21の発現も認める(b3, b4)。図16c1は腸型の腺管で、核が細長く、重層傾向が高度となる高度異型あるいは境界領域の腺腫あるいは異型上皮巢である。ATBF1は矢印で示すごとく細胞質に局在を示し(c2)、p53の染色は認めるものの(c3)、p21発現が欠落する(c4)。

【図17】図17は胃でGroup Vと診断される癌のうち、組織学的に高分化型あるいは中分化型の管状腺癌でのATBF1発現を示す。図17a1(HE染色)は食道扁平上皮(波線矢印)の上皮下に浸潤性に発育する大小の腺管構造よりなる高分化型管状腺癌である。部位により(四角黒枠)ATBF1が矢印で示すごとく細胞質に限局する部位(a2, ATBF1染色)と、ATBF1が欠落する部位(a3, ATBF1染色)が混在する。図17b1(HE染色)は大小の腺管が密に不規則癒合性に存在する中分化型の管状腺癌である。ATBF1は大部分の細胞で矢印に示すごとく細胞質に局在を示す(b2, ATBF1染色)。

【図18】図18は胃でGroup Vと診断される癌のうち、低分化腺癌でのATBF1発現を示す

10

20

30

40

50

。図 1 8 a1 (HE 染色) は充実性発育を示す腺癌を示し、a2, a4 (HE 染色) は四角囲みの部位の拡大である。充実性で腺管形成を欠く事が解る。HE 染色における組織像は類似しているにもかかわらず、ATBF1 が欠落する部位 (a3, ATBF1 染色)、および矢印で示すごとく ATBF1 が細胞質に局限する部位 (a5, ATBF1 染色) が混在する。図 1 8 b1 (HE 染色) は核/細胞質比の高い退形成性の癌細胞が個々バラバラに浸潤を示す。ATBF1 は矢印で示すごとく細胞質に局限する (b2, ATBF1 染色)。

【図 1 9】図 1 9 は胃で Group V と診断される癌のうち、印環細胞癌での胃での浸潤部 (図 1 9 a) および胆嚢への転移浸潤部 (図 1 9 b) での ATBF1 発現を示す。図 1 9 a1 (HE 染色) は粘液滴により核が周辺に押しやられた印環細胞の浸潤を示す。ATBF1 は黒矢印で示すごとく印環細胞の細胞質に局限する場合と、点線矢印で示すごとく染色性が欠落する場合があり、それらの細胞の混合で浸潤部が形成される。図 1 9 b1 (HE 染色) は胆嚢壁のリンパ管内 (左上部の四角囲い) および結合組織内に浸潤を示す (右下部の四角囲い) 印環細胞が存在する。ATBF1 はリンパ管内 (b2, ATBF1 染色) および浸潤部 (b3, ATBF1 染色) とともに欠落する。

【図 2 0】図 2 0 は陰茎に生じた乳房外パジェット病の各種悪性度段階での ATBF1 発現を示したものである。図 2 0 a (HE 染色) は陰茎皮膚に表皮内にパジェット細胞が存在する (a の左側の部位) と、徐々に浸潤し、腫瘤形成を来した部位 (a の右側の部) を示す。図 2 0 b1 (HE 染色) では表皮内に局限して存在するパジェット細胞の散在を示し、その部位では ATBF1 は核中心に局在する (b2, ATBF1 染色)。図 2 0 c1 (HE 染色) は表皮から下方に浸潤傾向が出てきた部位を示す。その部で ATBF1 が矢印で示すごとく細胞質に局限する (c2, ATBF1 染色)。腫瘤形成部 (a, HE 染色) での ATBF1 発現は腫瘍表面主体で (d, ATBF1 染色の矢印で示す部位)、腫瘍の内深部で欠落する傾向を認める。図 2 0 e1 と f1 (ともに HE 染色) ではともに索状の腫瘍が浸潤を示す。図 2 0 e2 (ATBF1 染色) で矢印に示すごとくの腫瘍表面では高度に ATBF1 が細胞質に局在しており、図 2 0 f2 (ATBF1 染色) で矢印で示すごとく腫瘍内深部では ATBF1 が欠落する。図 2 0 g1 (HE 染色) は鼠径部リンパ節で、リンパ組織内およびリンパ管 (点線矢印) 内に腫瘍の転移を認める。図 2 0 g2 (ATBF1 染色) ではリンパ管内 (点線矢印) 内に存在するパジェット細胞では矢印で示すごとく ATBF1 が欠落する事を示す。

【図 2 1】図 2 1 は骨髄における ATBF1 の発現を示す。図 2 1 a は HE 染色による骨髄の組織像で、軽度過形成性となる骨髄細胞で、図では明確でないが白血球系、赤血球系、血小板系 3 種類の造血細胞が混在する。図 2 1 b (ATBF1 染色) では骨髄の一部の細胞群で、ATBF1 が陽性となることを示している。その一部の拡大を図 2 1 c (ATBF1 染色) に示すが、波線矢印に示す細胞質主体に ATBF1 の局在を認める細胞とともに、矢印で示すごとく核にも細胞質にも ATBF1 の染色性が強い細胞群が存在する事が明らかである。

【図 2 2】図 2 2 は、小型末梢型肺腫瘍組織における組織像及び ATBF1 発現を示す。図 2 2 a1 (ATBF1 染色) は矢印で示すごとく肺内に存在する直径 1cm 程度の腫瘤形成である。図 2 2 a2 (ATBF1 染色) はその拡大像で、肺胞上皮を置換するように腫瘍細胞が増殖し、間質の結合組織が増生している事が解る。腫瘍細胞は扁平な傾向があり規則正しく配列を示し、核腫大も軽度にとどまるため、低グレードの異型腺腫様過形成 (low-grade AAH) と診断できる。さらに拡大を上げると、図 2 2 a3 (ATBF1 染色) で示すごとく、腫瘍細胞の核に ATBF1 の存在を認める。図 2 2 b1 (HE 染色) は矢印で示すごとく肺の細気管支周囲に存在する直径 0.7cm 程度の腫瘤形成である。図 2 2 b2 (HE 染色) はその拡大で、肺胞上皮を置換するように存在する腫瘍細胞の存在、間質の増生、リンパ球浸潤、腫瘍細胞の大小不同、図 2 2 a の low-grade AAH より細胞密度が高く、細胞の丈が高い事が明らかであり、高グレードの異型腺腫様過形成 (high-grade AAH) と診断できる。図 2 2 b3, b4 (ATBF1 染色、矢印) は殆どの腫瘍細胞の核主体に ATBF1 が局在する事を示す。図 2 2 c1 (HE 染色) は矢印で示す範囲に存在する直径約 1.8 cm 大の腫瘤形成で、波線矢印で示すように肺胞が虚脱し線維増生を示す部位が混在する。図 2 2 c2 (HE 染色) はその拡大で、図 2 2 b2 の組織像と類似するが、やや細胞密度が高く、核腫大が目立つ細胞が混在する。図 2 2 c3 (HE 染色) に示すごとく肺胞虚脱、線維化を伴う部での腫瘍は細胞密に配列しており、図 2 2 c2 は AAH との鑑別も問題

10

20

30

40

50

となるが、図 2 2 c2と総合的に判断して、細気管支肺胞上皮癌(BAC)、野口のtype Bと判断できる。肺胞上皮を置換するように腫瘍細胞が配列する部位では図 2 2 c4(ATBF1染色)の白矢印のごとく、部分的に核に染色が存在する部位が混在するものの大部分、黒矢印に示すごとく、ATBF1は細胞質に染色性を認める。さらに図 2 2 c5(ATBF1染色)は肺胞虚脱、線維化を示す部位でATBF1は矢印に示すごとく殆どの細胞で細胞質に局在する事が明らかである。

【図 2 3】図 2 3 は異型腺腫様過形成(a1, HE染色)および限局型の細気管支肺胞上皮癌(b1, HE染色)でのATBF1の発現を示す。異型腺腫様過形成では矢印で示す範囲でATBF1が核に強く局在する事で(a2, ATBF1染色)正常組織との境界が非常に明確である。さらに肺胞上皮癌では矢印で示す範囲でATBF1が細胞質に強く局在する事で(b2, ATBF1染色)正常組織との境界が非常に明確である。

10

【図 2 4】図 2 4 は化学療法が有効であった 1 症例(a, ATBF1染色)及び化学療法が無効であった 3 症例(b, c, d, ATBF1染色)の肺腺癌組織におけるプレパラート肉眼像(a1-d1)ならびに顕微鏡観察された低倍ATBF1染色像である。無効 3 例のプレパラートは肉眼的にDABの茶色が非常に薄いのに対し(b, c, d)、著効例 1 例のプレパラートは茶色で濃染している。肉眼像ではプレパラートの茶色の染色性が解りにくいが、低倍のATBF1染色を見ると、著効例では矢印に示すごとくATBF1の染色性が濃い(a2)のが明らかである。

【図 2 5】図 2 5 は、化学療法に著効を示した症例(a, 65歳、男性)及び無効であった症例(b, 65歳、女性)の治療前(a1, b1)、治療後(a2, b2)のCT像、初発時の肺腺癌の組織像(a3, b3, HE染色)及びATBF1発現部位(a4, b4, ATBF1染色)を示す。著効例のCT像は気管気管支リンパ節の腫脹(a1, 白矢印)及び消失(a2, 白矢印)を示す。腫瘍は一部管腔を有する低分化腺癌(a3)である。腫瘍細胞のATBF1発現(a4)は細胞質に局在する部位(白矢印)、核に局在する部位(黒矢印)が混在している。無効例のCT像は左腎臓上極に転移性腫瘍(b1, 黒矢印)の存在、及び増大(b2, 白黒矢印)を示す。組織学的に高分化の管状型腺癌(b3)である。ATBF1の発現は少量で、全てが細胞質に限局し(b4, 黒矢印)、核での局在は認めない。

20

【図 2 6】図 2 6 は 74 歳の男性の小細胞癌の組織像(a, HE染色)およびATBF1(b-g, ATBF1染色)を示す。図 2 6 aに示すごとく組織学的には、小型円形ないし短紡錘形細胞が、少量の血管結合織を伴って密に充実性に増生する腫瘍である。核分裂像は多く、増殖の速い腫瘍であることを示している。その配列は充実性、胞巢状を示す。図 2 6 bはATBF1染色低倍で、腫瘍のATBF1発現が他の種類の腫瘍細胞に比較して非常に大量である事が解る。図 2 6 c, dに示すごとく部位によっては核主体(c)、細胞質主体(d)の染色を示す部位が混在する。図 2 6 eは核主体の染色部位で、白矢印に示すごとく核に強いATBF1発現を認める。同時に核周囲の細胞質にもATBF1は染色を示し、腫瘍細胞が核、細胞質ともに染色される場合がある事が明らかである。図 2 6 fは核(波線矢印)、細胞質(矢印)が混在する部位、図 2 6 gは細胞質(矢印)主体の部位である。

30

【図 2 7】図 2 7 は生存例(a, b)、死亡例の(c, d)の神経芽細胞腫の組織像(a, c, HE染色)およびATBF1の細胞内局在(b, d, ATBF1染色)を示す。図 2 7 aは生後 8 ヶ月の女児の左副腎腫瘍で組織学的に poorly differentiated neuroblastoma、low MKI、favorable histology group と診断した。ATBF1は図 2 7 bの矢印に示すごとく、少数の細胞を除く殆ど全ての細胞で核に限局した。それに対し、図 2 7 cは 2 歳男児、後腹膜リンパ節の組織像で、脈管内に侵襲する腫瘍細胞を認め、組織学的には poorly differentiated neuroblastoma、low MKI、unfavorable histology group と診断した(詳細に観察すると、low MKIだが、anaplasiaが目立ち、mitosisも10個/高倍率視野程度と多く認められる)。ATBF1は図 2 7 dの矢印に示すごとく、殆どの細胞で細胞質に限局する傾向を示した。

40

【図 2 8】図 2 8 は、GIST組織(a: 胃原発GIST、b: 結腸原発GIST)について、左から順にHE染色像(a1, b1)、c-kit染色像(a2, b2)、CD34染色像(a3, b3)、ATBF1染色像(a4, b4)を示す。生存例胃原発のGISTは図 2 8 a1の波線矢印で示す胃粘膜の下方に存在する筋層内で腫瘍形成を認め(矢印)、比較的周囲との境界が明瞭である。図 2 8 a2, a3の矢印に示すごとく腫瘍細胞の大部分は細胞質にc-kit, CD34が陽性となる。図 2 8 a4の矢印に示

50

すごとく腫瘍細胞の大部分でATBF1が核に局在を示す。それに対し死亡例で結腸原発のGISTは図2 8 b1の波線矢印で示す結腸粘膜の下方の粘膜下組織に浸潤性の発育を示しており、周囲組織との境界が生存例(図2 8 a1を参照)より不明瞭である。腫瘍細胞はc-kit陽性(図2 8 b2の矢印)だが、CD34陰性である(図2 8 b3の矢印に示す小血管のみがCD34陽性であることに注意)。ATBF1は図2 8 b4の矢印で示すごとく腫瘍細胞の大部分で細胞質に局在を示す。

【図2 9】図2 9は、各種の髄膜腫組織；線維性髄膜腫 WHO grade I (a)、髄膜皮性髄膜腫 WHO grade I (b)、異型性髄膜腫 WHO grade II (c)、明細胞髄膜腫 WHO grade II (d)について、HE染色像(a1, b1, c1, d1)、ATBF1染色像(a2, b2, c2, d2)を示す。図2 9 a1は細長い線維性の腫瘍細胞からなる線維性髄膜腫で、矢印に示すごとく細長い細胞の核のみにATBF1は局在する(a2)。図2 9 b1は一部whorl formationを示す髄膜皮性髄膜腫で、ATBF1は腫瘍細胞の核のみに局在する(b2)。図2 9 c1は一部脳浸潤を示し、図a1, b1の髄膜腫に比較して明らかに細胞密度の高い異型生髄膜腫で、ATBF1は矢印に示すごとく腫瘍細胞の大部分で細胞質に局在する(c2)。図2 9 d1は細胞質が明るく抜けたグリコーゲンに富む細胞が主体となる明細胞髄膜腫で、矢印に示すごとく腫瘍細胞の大部分で、ATBF1が細胞質に局在する(d2)。

【図3 0】図3 0全ての顕微鏡像は、61歳、66歳、76歳男性症例の前立腺癌生検検体にATBF1染色を施したものである。組織学的にGleason gradeの順に写真を配列しATBF1染色性との比較検討を行った。図中の3A-5Bの記載はGleason gradeを示す。腺管の大きさが不規則ながら癒合傾向を示さないものがGrade 3Aで、より小型の腺管の混在が3B、さらに腺管が癒合傾向を示すと4A, hypernephroid patternを示すと4Bと判断した。癌細胞が充実性集塊を形成ないし、孤立性に浸潤傾向を示すと5Bと判断した。黒矢印はATBF1が腫瘍細胞の核に局在する例を示し、波線矢印はATBF1が腫瘍細胞の細胞質に局在する例を示す。Gleason grade 3AではATBF1は核に、grade 5Bでは細胞質に局在しており、grade 3Bからgrade 4Bでは核、細胞質の局在を示す腫瘍細胞が混在する。

【図3 1】図3 1は、ATBF1のN末端部を認識するNT440, 1-12、中央部を認識するD1-120、C末端を認識するAT6の部位の概略、ATBF1遺伝子の各エクソンと蛋白配列の対応、免疫に使用したポリペプチドのアミノ酸配列を示す。NT440, 1-12についてはヒトとマウスにおけるATBF1の配列との差異を示した。

【図3 2】図3 2は、71歳男性の正常リンパ節の組織所見である。図3 2 Aはリンパ濾胞および辺縁領域を含む部位でのBcl-2の分布を示す。図3 2 B-1は同部位のAT6染色で、図3 2 B-2はリンパ濾胞部位の拡大、図3 2 B-3は辺縁領域の拡大図である。辺縁領域およびリンパ濾胞部を同時に含む部位に対するAT6以外のATBF1染色を図3 2 C(NT440)、図3 2 D(1-12)、図3 2 E(D1-120)に示す。

【図3 3】図3 3は、71歳男性の正常リンパ節のATBF1の染色性のまとめを示す。図3 3 AはATBF1-A蛋白における抗体の位置の概略。図3 3 B, Cはリンパ濾胞および辺縁領域を含む部位での各抗体の染色強度、核と細胞質での局在比率、染色性から想定される蛋白のプロセッシングの位置、さらに核主体のAT6部位の局在がbcl-2遺伝子の転写を抑制、AT6部位の局在が細胞質に変化するとbcl-2遺伝子転写の抑制がはずれる状態を模式して示してある。

【図3 4】図3 4は、培養細胞3種類(P19, NB1, GOTO)のレチノイン酸処理の有無によるATBF1蛋白の分子量の変化を検索したウエスタンブロットングである。使用した抗体はエクソン10に対応するD1-120である。

【図3 5】図3 5は、52歳男性、胃のGISTの組織像を示す。図3 5 A(c-kit), 図3 5 B(CD34), 図3 5 C(ATBF1のAT6部分), 図3 5 D(Bcl-2)の局在を示す。図3 5 C, Dの矢印はAT6, Bcl-2の局在が相補的であることを図示しており、囲み1, 囲み2の部位のATBF1, Bcl-2の染色性の詳細を図3 6で検索している。

【図3 6】図3 6は、52歳男性、胃のGISTの組織像の詳細とまとめである。図3 5の囲み1(A1-E1), 囲み2(B2-E2)の部位での染色性、(A)NT440, (B)1-12, (C)D1-120, (D)AT6, (E)Bcl-2 および、Bcl-2発現が欠落する部位(F), Bcl-2発現を認める部位(G)

10

20

30

40

50

でのATBF1染色性のまとめを示す。

【図37】図37は、56歳女性、大細胞びまん型B細胞リンパ腫の組織像である。HE (A1 弱拡大, A2 強拡大)、CD20 (B), AT6 (C1 弱拡大, C2 強拡大), PCNA (D1 弱拡大, D2 強拡大), Bcl-2 (E1 弱拡大, E2 強拡大)の各染色性を示す。

【図38】図38は、56歳女性、大細胞びまん型B細胞リンパ腫のATBF1およびBcl-2の染色性の詳細とまとめである。NT440 (A), 1-12 (B), D1-120 (C), AT6 (D), Bcl-2 (E)の染色像および、染色性のまとめ (F)を示す。

【図39】図39は63歳男性、大脳の多形膠芽腫の組織像である。充実性の腫瘍部位 (A1, HE)と壊死の散在する部位 (B1, HE)におけるGFAPの局在 (A2, B2)を示す。B1, B2の矢印は壊死組織の範囲を示す。

【図40】図40は63歳男性、大脳の多形膠芽腫のGFAP, D1-120, AT6の染色像である。GFAPの欠落部位 (A, 囲み1)、GFAP陽性部位 (A, 囲み2)での染色性の詳細 (a1, a2)を示すとともに、その染色性のパターンの差異 (A矢印)が、D1-120 (B), AT6 (C)の染色性のパターンと類似 (B矢印, C矢印)する事を示す。GFAPの欠落部位 (A, 囲み1)ではD1-120 (b1), AT6 (c1)染色性が核主体 (b1, c1矢印)となり、GFAP陽性部位 (A, 囲み2)ではD1-120 (b2), AT6 (c2)染色性が細胞質主体 (b2, c2矢印)となる。

【図41】図41は63歳男性、大脳の多形膠芽腫のMIB1, Bcl-2, Bcl-xLの染色像である。図40でのGFAPの欠落部位 (図40A, 囲み1)、GFAP陽性部位 (図40A, 囲み2)での染色性のパターンと、MIB1 (A), Bcl-2 (B), Bcl-xL (C)染色性のパターン (A, B, C矢印)が類似する事を示す。さらにGFAPの欠落部位 (A, 囲み1)、GFAP陽性部位 (A, 囲み2)におけるMIB1 (a1, a2), Bcl-2 (b1, b2), Bcl-xL (c1, c2)の染色の詳細が図示してある。

【図42】図42は63歳男性、大脳の多形膠芽腫のNT440, 1-12の染色像およびATBF1染色性のまとめである。図40でのGFAPの欠落部位 (図40A, 囲み1)、GFAP陽性部位 (図40A, 囲み2)でのNT440 (A1, A2)および1-12 (B1, B2)の染色性の詳細を示す。本腫瘍におけるGFAP産生の無い部位のATBF1染色性 (C)、GFAP産生を示す部位でのATBF1染色性 (D)のまとめを図示する。

【図43】図43は52歳、男性、食道神経内分泌癌のHE、NCAMの所見である。食道の腫瘍形成像 (A, HE)、NCAM (CD56)陽性像 (B)、リンパ管侵襲 (C, HE)、組織学的に索状リボン状配列を示す部位 (D, HE, 黒矢印)、および充実性配列を示す部位 (D, HE, 白矢印)を図示する。

【図44】図44は52歳、男性、食道内分泌癌の組織構築とATBF1発現の比較を示す。索状リボン状で高分化な配列を示す部位 (A1-E1)と密、巣状で低分化な配列を示す部位 (A2-E2)の、HE (A1, 2), NT440 (B1, 2), 1-12 (C1, 2), D1-120 (D1, 2), AT6 (E1, 2)染色の結果とまとめ (F, G)を図示する。

【図45】図45は56歳、男性、副鼻腔の未分化癌、リンパ節転移部位の所見である。腫瘍のMIB1 (A), Bcl-2 (B)発現、NT440 (C), 1-12 (D), D1-120 (E), AT6 (F)発現とその染色性のまとめ (G)を図示する。

【図46】図46は47歳女性、脳の大細胞びまん型B細胞リンパ腫の所見である。腫瘍のHE (A1, 2), CD20 (B), CD79a (C), Bcl-2 (D), NT440 (E), 1-12 (F), D1-120 (G), AT6 (H)の染色像と、ATBF1染色性のまとめ (I)を図示する。

【図47】図47は非特許文献1、9に示された異なるプロモータ使用と、Alternative splicingにより、ATBF1-A, B2種類のmRNAが出来る仕組みと、ヒト悪性腫瘍におけるエクソン10の異常スキッピングによる変異蛋白産生の概略説明図である。D1-120部位の染色性の欠落を図46で示した47歳女性、脳の大細胞びまん型Bリンパ腫を例に取り図示する。

【図48】図48は68歳女性、脳の大細胞びまん型Bリンパ腫の所見である。図示したように腫瘍の中心部 (A)と腫瘍の辺縁部 (B)でのATBF1発現、Bcl-2染色性の差異を示す。腫瘍でのNT440 (A1, B1), 1-12 (A2, B2), D1-120 (A3, B3), AT6 (A4, B4), Bcl-2 (A5, B5)染色像を図示する。

10

20

30

40

50

【図49】図49は68歳女性、脳の大細胞びまん型Bリンパ腫のATBF1発現所見のまとめである。腫瘍の中心部(A)、および腫瘍の辺縁部(B)の染色性をまとめ、図示する。

【図50】ATBF1の各エクソン(エクソン2~11)の配列を示す図である。下線部がエクソン領域である。各エクソンの配列の右上にエクソン番号を付した。エクソン番号は、ATBF1遺伝子の5'側最上流に存在するATBF1-B特異的な非翻訳領域エクソンを1番、それに続くATBF1-A特異的な非翻訳領域エクソンを2番、最初のATBF1-A翻訳領域を含むエクソンを3番とし、以下これに続くエクソンを順に4~11番としている。

【図51】図50の続き。

【図52】図51の続き。

【図53】図52の続き。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明において「被検癌細胞」とは、本発明の方法において悪性度を判定する対象の細胞である。被検癌細胞は生体より分離される。即ち、生体より分離された状態の被検癌細胞に対して本発明が適用される。「生体より分離された」とは、被検癌細胞が存在する生体組織の一部を摘出することによって、被検癌細胞がその由来の生体と完全に隔離されている状態をいう。被検癌細胞は通常、生体で存在していた状態、即ち周囲の細胞と結合した状態で調製され、本発明の方法に使用される。尚、被検癌細胞を周囲の細胞から分離(単離)した後に本発明の方法に使用してもよい。

本発明における被検癌細胞には、他の診断法によって癌であると判断される細胞、癌である蓋然性が高いと判断される細胞、及び癌である可能性を有する細胞が含まれる。好ましくは、他の診断法によって癌であると判断される細胞、又は癌である蓋然性が高いと判断される細胞が用いられる。ここでの他の診断法としては例えば、X線造影検査、内視鏡検査、超音波検査、CT検査、MRI検査、PET検査、腫瘍マーカーを用いた診断法などが該当する。通常は、これらの一つ以上によって癌が疑われる組織から被検癌細胞が採取される。

本発明において「癌」は広義に解釈することとし、癌腫及び肉腫を含む。また、本発明において用語「癌」は「腫瘍」と互換的に使用される。また、病理学的に診断が確定される前の段階、すなわち腫瘍としての良性、悪性のどちらかが確定される前には、良性腫瘍、良性悪性境界病変、悪性腫瘍を総括的に含む場合もあり得る。

「ATBF1」とは、AT motif binding factor 1(ATモチーフ結合因子1)をいう。ATBF1は、AFP(アルファフェトプロテイン)調節因子のATリッチドメインに結合し、AFP遺伝子の発現を下方調節する転写因子であることが知られている(非特許文献1を参照)。上記の通り「ATBF1」には2つのアイソフォーム(ATBF1-A及びATBF1-B)が存在する。本明細書では用語「ATBF1」をこれら2つのアイソフォームを包括する表現として使用する。従って、特に言及しない限り、「ATBF1量」とは各アイソフォームの存在量の総和を意味する。本発明の方法では原則として当該総和を検出対象とする。但し、いずれかのアイソフォームの量のみを検出対象にすることを妨げるものではない。尚、単に「ATBF1」と記載した場合、その他の意味であることが明らかであるときを除いて、それはATBF1タンパク質を意味する。

ATBF1遺伝子の構造を図47に示す(非特許文献1、非特許文献9を参照)。また、ATBF1遺伝子のエクソン2~11の配列を図50~図53に示す。ATBF1遺伝子にはエクソン1~11が存在し、選択的スプライシングの結果としてATBF1-A及びATBF1-BのmRNAが形成される。尚、図47においてエクソン10及び11として示した領域は、非特許文献9ではそれぞれエクソン9及び10と記載されている。

エクソン3、エクソン10、及びエクソン11に対応するアミノ酸配列及び塩基配列については、添付の配列表に以下の配列番号で記載する。

エクソン3に対応する領域のアミノ酸配列(配列番号:11)、エクソン3の塩基配列(配列番号:12)、エクソン10に対応する領域のアミノ酸配列(配列番号:13)、エクソン10の塩基配列(配列番号:14)、エクソン11に対応する領域のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列（配列番号：15）、エクソン11の塩基配列（配列番号：16）。

「被検癌細胞内のATBF1量」とは、被検癌細胞の核内および細胞質におけるATBF1の存在量の総計をいう。本明細書において、「被検癌細胞内のATBF1量」のことを「被検癌細胞の細胞全体のATBF1量」ともいう。一方「被検癌細胞の核内のATBF1量」とは、被検癌細胞の核内におけるATBF1の存在量をいう。同様に、「被検癌細胞の細胞質内のATBF1量」とは、被検癌細胞の細胞質内におけるATBF1の存在量をいう。

「ATBF1量を検出する」とは、ATBF1の存在量を絶対量として又は相対量として把握することをいう。ここでの相対量の基準は例えば、悪性度に応じて用意した標準試料のATBF1量とすることができる。或いは核内のATBF1量が検出対象のときに、細胞質内のATBF1量を基準とし、同様に細胞質内のATBF1量が検出対象のときに核内のATBF1量を基準とすることもできる。尚、「ATBF1量を検出する」は、ATBF1が存在するか否かを調べることも含む。通常は、ATBF1の存否及び、存在する場合にはその量が調べられることになる。厳密にATBF1量を定量することは必須でなく、例えば、悪性度の指標となる対照のATBF1量と比較することによって、被検癌細胞の悪性度を判定することが可能な程度にATBF1量を測定できればよい。

【0021】

本発明の第1の局面は、被検癌細胞の悪性度を判定する方法（悪性度判定法）に関する

本発明において「悪性度判定法」とは、被検癌細胞の悪性度を判定する方法をいう。癌の悪性度は一般に細胞異型、細胞、組織構築の異形性、増殖性、浸潤性、転移性などを基準に分類（判定）される。一般に悪性度が低い癌では細胞の増殖速度が遅く、浸潤転移を来し難いため外科的切除が容易である場合と、化学療法や放射線療法が有効であるが故に腫瘍を容易に縮小させ得る場合が考えられ、これらが組み合わさって予後が良好となる。これに対して悪性度が高い癌では細胞の増殖速度が早く、浸潤転移を来し易いため外科的切除が困難となりやすい場合と、化学療法や放射線療法が無効であるが故に腫瘍を縮小させるのが困難な場合が考えられ、これらが組み合わさって予後が不良となる。悪性度が特に高い癌の場合には迅速、的確な外科的摘出が望まれるし、的確な補助治療（放射線療法又は化学療法）を含む集学的治療が必須となる。本発明では、癌の増殖速度に起因する浸潤、転移の容易さ、すなわち癌の増殖能の予測、および化学療法又は放射線療法による有効な治療効果が得られるか否かの予測をもって、悪性度判定の基準とすることができる。従って、増殖能が低く（細胞周期停止を来し易く）、化学療法又は放射線療法が有効と予測される（DNAダメージによりアポトーシスが導入され易い）癌の場合に悪性度が低いということができ、逆に増殖能が高く（細胞周期停止を来し難く）、化学療法又は放射線療法が無効と予測される（DNAダメージによってもアポトーシスが導入され難い）癌の場合に悪性度が高いということが出来る。ここで、増殖能、化学療法又は放射線療法の有効さという2つの因子を考慮すべき理由および注意点に関して、肺の小細胞癌（燕麦細胞癌）を例にあげて説明することにする。一般的に肺の小細胞癌は高度悪性とされ、予後が悪い事で有名な癌である。しかし希ながら症例によっては、早期に化学療法を施行する事により完全治癒が可能な場合もある。本発明者らの検索では、肺の小細胞癌は核にも細胞質にも強いATBF1の発現を認めた（エクソン10に対応する抗体を使用）。細胞質の染色性の強さから高い増殖能を予測すれば、早急に浸潤、転移して進展するため外科治療が不可能な場合が多い事を意味し、それは高度悪性と判断する事になる。しかし一方で、核の強い染色性よりDNAダメージによりアポトーシスを導入しやすい事を予測すると、化学療法に反応し易く、時に癌細胞を完全に死滅させ得る可能性から、低悪性度の癌と判断する事にもなる。従って悪性度を決める際には、癌の増殖能、化学療法又は放射線療法の有効さの2つの因子を常に考慮する必要があるのが現実であり、また実際の、実用的である。さらに悪性度を考える時の注意点でもある。但し、以上の2つの因子のいずれかを指標として癌の悪性度を評価することもできる。

【0022】

本発明では、a)被検癌細胞内のATBF1量を検出するステップが実施される。その結果得

られたATBF1検出量に基づいて被検癌細胞の悪性度を判定する。後述の実施例に示すように、例えば、細胞全体（核及び細胞質の両方）においてATBF1量が少ない症例の悪性度は非常に高いものであるのに対し、ATBF1の発現量が多い場合、予後が良好で、各種療法に反応しやすい事が多かった。従って、細胞全体のATBF1量がまず悪性度の判定指標として有効である。後述する乳癌の検討のごとく、免疫組織学的染色を施さない場合にはPCR法を使用したATBF1 mRNAの定量という方法によっても細胞全体のATBF1量を定量可能である。本発明において被検細胞の悪性度を判定する際に、まず第1に被検癌細胞の核内及び細胞質内を含む細胞全体のATBF1量を考慮することが好ましい。

【0023】

本発明の一形態では、b)被検癌細胞の核内のATBF1量を検出するステップが実施される。その結果得られたATBF1検出量に基づいて被検癌細胞の悪性度を判定する。具体的には例えば、核内に多量のATBF1が検出された場合に、増殖能が低く、化学療法又は放射線療法に感受性が高いと予測され、一般的には被検癌細胞の悪性度は低いと判定できる。しかし前述の肺小細胞癌のごとく、核にも細胞質にも同時にATBF1発現を示す場合は、増殖能、化学療法又は放射線療法の感受性を個別に判断しつつ、総合的に悪性度を決定することが望まれる。

【0024】

本発明の一形態では、c)被検癌細胞の細胞質内のATBF1量を検出するステップが実施される。この形態では、被検細胞の細胞質中に存在するATBF1量の有無に基づいて被検癌細胞の悪性度が判定される。具体的には例えば、細胞質内に多量のATBF1が検出された場合に、被検癌細胞の増殖能が維持されていると判定することができる。また細胞質内にATBF1が検出されない場合又は検出量が少ない場合にも、核でのATBF1発現が無いという条件下では、被検癌細胞の増殖能は維持されていると判定できる。ここでも最終的には核での発現状態を考慮した総合判定が好ましい。

【0025】

本発明の好適な一形態では、a)被検癌細胞内のATBF1量を検出するステップ、b)被検癌細胞の核内のATBF1量を検出するステップ、さらにc)被検癌細胞の細胞質内のATBF1量を検出するステップを実施した後、d)ステップbで得られた核内ATBF1量と、ステップcで得られた細胞質内ATBF1量とを比較するステップを実施する。この形態ではATBF1量が、被検細胞の核内と細胞質内との間で比較される。そして主にATBF1の局在状態に基づいて被検細胞の悪性度が判定される。このように核内と細胞質内のATBF1量を比較するようになれば、より正確に悪性度を評価できる。後述の実施例に示すように、増殖能が低い、あるいは化学療法又は放射線療法の感受性が高いとされ、悪性度が低いと予測、判断できる癌細胞ではATBF1が核に局在する傾向がある事が判明した。一方、ATBF1が細胞質に局限している場合（即ち、相対的に核内のATBF1量が少ない場合）には、組織学的に癌の上皮下浸潤など進展性が強くなるとともに、化学療法又は放射線療法の感受性が低くなる傾向を示し、より悪性度が高くなることが判った。さらに高度悪性とされる種類の癌の検索や、一般の癌でもその転移巣での検索などを通して、ATBF1が核にも細胞質にも欠落するようになると、より悪性度の高くなる傾向が明確となった。

本発明の方法では、典型的には、悪性度が順に高くなる複数の区分のいずれに被検癌細胞が分類されるかを判定する。ここでの区分の数は特に限定されない。例えば3区分（具体的には例えば悪性度1（低い）：ATBF1が核に局在する傾向、悪性度2（中程度）：ATBF1が細胞質に局在する傾向、悪性度3（高い）：ATBF1が核細胞質ともに欠落する傾向とする。あるいは悪性度4区分（具体的には例えば悪性度1（低い）：ATBF1が核に高度に局在する傾向、悪性度2（中程度）：ATBF1が核に軽度から中等度局在する傾向、悪性度3（高い）：ATBF1が細胞質に局限し、核での発現が少ない傾向、悪性度4（非常に高い）：ATBF1が核にも細胞質にも欠落する傾向とする）などを設けることが可能である。なお前述した化学療法前の肺小細胞癌のごとく核・細胞質ともに高度のATBF1発現を示し、増殖能も高度だが化学療法の感受性も高い癌を上記悪性度1～3、あるいは1～4のどの範疇に属する悪性度と捉えるかについては一律には判断が難しいと予想される。このような

10

20

30

40

50

場合には、増殖能、化学療法又は放射線療法の感受性という悪性度の指標2つを個別に考慮するとよい。

【0026】

本発明が対象とする癌の種類は特に限定されない。例えば、乳癌、膀胱癌、胃癌、肺癌、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍（GIST）、前立腺癌、髄膜腫などを含む各種の腫瘍の悪性度を判定することに本発明を適用することができる。

後述の実施例に示すように、本発明者らの検討によって様々な種類の癌において、その悪性度と細胞内ATBF1発現量との間に関連性が存在することが明らかとなった。また、癌の悪性度と癌細胞の核内及び細胞質内のATBF1量（ATBF1の核・細胞質局在）との間にも関連性が認められた。以下、ヒト各種癌（腫瘍）についての検討結果の概略を示す（例1～例12）。

例1） ATBF1 mRNA発現を指標としたヒト乳癌症例153例の検討で、ATBF1 mRNAの発現量の多い症例群は、発現量が低下または欠落している症例群より予後が良好であることが判明した。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑乳癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内ATBF1量を測定した結果、発現量が多い場合に悪性度が低い（または、被検癌細胞が由来する対象の予後が良好である）と判定することができる。これとは逆に、被検癌細胞内のATBF1量が少ない場合に悪性度が高い（または、被検癌細胞が由来する対象の予後が不良である）と判定することができる。

例2） 癌抑制遺伝子p21, p53の変異および抗ガン剤シスプラチンの効果がすでに確認されている膀胱癌培養細胞（Int J Cancer, 1996 Nov 15;68(4):501-5）において、抗ガン剤で腫瘍のアポトーシスを誘導できる細胞株ではATBF1が核に存在した。これに対して抗ガン剤が効果を示さない細胞株ではATBF1発現量が少ないか、発現総量は多くても細胞質に局在し、核での染色性が認められなかった。これらの結果から、本発明の方法では例えば、被疑膀胱癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内ATBF1量を測定した結果、発現量が多い場合に悪性度が低いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が核に局在している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞内のATBF1量が少ない場合に悪性度が高いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1量が細胞質に局在している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例3） ヒトの膀胱癌の臨床例、乳頭状尿路上皮癌ではATBF1が核に局在する傾向を示したが、上皮下への浸潤癌はATBF1が細胞質に局在する傾向を示した。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑乳頭状尿路上皮癌細胞又は被疑浸潤性膀胱癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内におけるATBF1の存在状態を調べた結果、ATBF1が核に局在している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞においてATBF1が細胞質に局在している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例4） 胃における一連の腺腫から癌腫のシリーズ（生検診断、Group III～V）の検索で、Group IIIの腺腫、軽度異型、中等度異型ではATBF1が核に局在したが、Group IIIの腺腫、高度異型ではATBF1が細胞質に局在した。Group Vの癌腫では、ATBF1が細胞質に存在する場合と欠落する場合を認めた。高悪性度とされるAFP産生胃癌では既報（非特許文献2、5、7）のごとくATBF1は欠落した。また胃原発の印環細胞癌の症例ではATBF1欠落する癌細胞とATBF1が細胞質のみに局在する癌細胞が混在した。さらに胃原発の印環細胞癌が胆嚢へ転移し浸潤性となった部位の観察で、印環細胞癌細胞でATBF1が完全に欠落していた症例を見出した。この例では、転移能のより高い癌細胞がリンパ行性に転移し、浸潤を示したと判断出来、ATBF1の欠落が悪性度をより高める可能性をも指摘できた。これらの結果から、本発明の方法では例えば、被疑腺癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内ATBF1量を測定した結果、ATBF1量が多い場合に悪性度が低いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が核に局在している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞の細胞内ATBF1量が少ない場合に悪性度が高いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が細胞質に局在している場合にも悪性度が高いと判定することができる。

10

20

30

40

50

例5) 肺腺癌で、化学療法に反応を示し腫瘍が縮小した例では細胞全体のATBF1発現量が多く、核、細胞質ともに発現を認めたが、治療に反応しない症例では、ATBF1の発現自体が少量で、細胞質のみに限局した。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑肺腺癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内ATBF1量を測定した結果、ATBF1量が多い場合に悪性度が低いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が核にも存在している場合若しくは核に局在している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞の細胞内ATBF1量が少ない場合に悪性度が高いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が細胞質に限局している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例6) 肺腺癌の前癌病変とされる異型腺腫様過形成ではATBF1が細胞質だけでなく、核にも存在した。それに対し、腺癌と判定できる場合は、大部分は核の染色性が無く、細胞質にATBF1が限局する傾向があった。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑肺腺癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内におけるATBF1の存在状態を調べた結果、ATBF1が核にも存在している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞においてATBF1が細胞質に限局している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例7) 正常の脊髄の造血細胞は核・細胞質ともに高度のATBF1発現を示した。この事実は骨髄造血細胞が増殖分裂の盛んな細胞群であることと、各種癌治療の際、正常細胞の中では造血機能を有する骨髄細胞が最も影響を受けやすい細胞群である事(骨髄抑制と称する。DNAダメージでアポトーシスに陥りやすい)の裏付けとなる。

例8) 骨髄造血細胞同様に、肺の小細胞癌(燕麦細胞癌)でも核・細胞質ともに非常に大量のATBF1が存在しており、これもやはり、小細胞癌の増殖の速さと化学療法への反応しやすさの裏付けとなる。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑肺小細胞癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内におけるATBF1の存在状態を調べた結果、ATBF1が細胞質に局在している場合に悪性度が高いと判定することができる。一方、被検癌細胞においてATBF1量が核に局在している場合に悪性度が低いと判定することができる。

例9) 高分化前立腺癌ではATBF1が核に限局、中分化、低分化となるとATBF1が細胞質に限局あるいは発現が欠落する傾向を認めた。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑前立腺癌細胞を被検癌細胞としてその細胞内ATBF1量を測定した結果、ATBF1量が多い場合に悪性度が低いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が核に限局している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞の細胞内ATBF1量が少ない場合(特にATBF1の発現を認めない場合)に悪性度が高いと判定することができる。または、被検癌細胞においてATBF1が細胞質に限局している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例10) 新生児、幼児の副腎腫瘍の中で、死亡例もあるが自然消退もある神経芽細胞腫が知られる。その予後予測は、医師にとっても、児の両親にとっても重要な問題である。結果として良性であり、最終的に生存し得た症例の殆どの腫瘍細胞でATBF1は核に局在した。逆に最終的に生存し得なかった症例で、解剖の結果、腫瘍が浸潤、転移、脈管侵襲などを示し、腫瘍の悪性度自体に起因する腫瘍死が明らかであった症例では、大部分の腫瘍細胞でATBF1が細胞質に局在していた。これは生検の段階で、腫瘍の進展、患者の予後を予測できる可能性を意味している。これらの結果から、本発明の方法では例えば、被疑神経芽腫細胞を被検癌細胞としてその細胞内におけるATBF1の存在状態を調べた結果、ATBF1が核に局在している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞においてATBF1が細胞質に局在している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例11) 消化管間質腫瘍(GIST)は通常ATBF1が核に限局するが、肝転移で死亡し、高度悪性GISTと診断された症例ではATBF1が細胞質に存在していた。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑GIST細胞を被検癌細胞としてその細胞内におけるATBF1の存在状態を調べた結果、ATBF1が核に限局している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞においてATBF1が細胞質にも存在している場合に悪性度が高いと判定することができる。

例12) 良性腫瘍に分類される髄膜腫(WHO Grade I)の腫瘍細胞では、ATBF1は核に

10

20

30

40

50

限局したが、悪性の経過を取りうるとされる異型髄膜腫（WHO Grade II）、明細胞髄膜腫（WHO Grade II）においては、ATBF1は細胞質で発現を認めた。この結果から、本発明の方法では例えば、被疑髄膜腫細胞を被検癌細胞としてその細胞内におけるATBF1の存在状態を調べた結果、ATBF1が核に限局している場合に悪性度が低いと判定することができる。一方、被検癌細胞においてATBF1が細胞質にも存在している場合に悪性度が高いと判定することができる。

【0027】

本発明者らの検討によって、ATBF1の特定の領域を検出することが被検癌細胞の悪性度を判定する上で有効であることが判明した。この知見に基づき、本発明の好ましい一形態では、生体から分離された被検癌細胞内のATBF1量として、以下の(1)～(3)の中の少なくとも一つが検出される。

(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域の核内存在量及び/又は細胞質内存在量

(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域（C末端領域）の核内存在量及び/又は細胞質内存在量。

(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域（N末端領域）の核内存在量及び/又は細胞質内存在量。

【0028】

(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域の核内存在量及び/又は細胞質内存在量の検出

この検出では、被検癌細胞において、ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域（部分タンパク質。以下、「ATBF1タンパク質の第1領域」又は省略して「第1領域」ともいう。当該領域のアミノ酸配列を配列番号：13に、当該領域をコードする塩基配列を配列番号：14にそれぞれ示す）の核内存在量及び/又は細胞質内存在量が検出対象となる。後述の実施例に示すように、いくつかの被検癌細胞を用いて第1領域の量及び局在態様と悪性度との関係を検証した結果、一般に、(a)第1領域が核主体に局在していると悪性度が低いこと、(b)第1領域が細胞質主体に局在していると悪性度が高いこと、及び(c)第1領域が欠落（細胞質内、核内）していると悪性度が高いことを認めた。即ち(a)～(c)が、癌細胞の悪性度を判定するための好適且つ重要な指標になることが判明した。従って例えば、被検癌細胞の核内に多量の第1領域が検出されたとき（又は第1領域が核主体に局在していたとき）、被検癌細胞の悪性度が低いと判定できる。同様に例えば、被検癌細胞の細胞質内に多量の第1領域が検出されたとき（又は第1領域が細胞質主体に局在していたとき）、被検癌細胞の悪性度が高いと判定できる。さらに例えば、被検癌細胞において第1領域の欠落が認められたとき（又は存在量が微量であったとき）、被検癌細胞の悪性度が高いと判定できる。

ここで、被検癌細胞内における第1領域の局在態様を指標として判定を行う場合は通常、第1領域の核内存在量及び細胞質内存在量を同時に検出する。そして、検出結果を比較することで第1領域の局在態様を調べ、第1領域が細胞質主体に局在していたとき又は第1領域の欠落が認められたとき、被検癌細胞の悪性度が高いと判定する。このように核内での検出量と細胞質での検出量とを比較することによって、第1領域の細胞内局在態様を明確に把握することが可能となる。尚、第1領域の核内存在量及び細胞質内存在量のいずれかの検出結果から第1領域の細胞内局在を予想し判定することにしてもよい。この場合、いずれかの存在量のみを検出すればよいことになる。

【0029】

(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域（ATBF1-Aタンパク質のC末端に位置する）の核内存在量及び/又は細胞質内存在量の検出

この検出では、被検癌細胞において、ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域（部分タンパク質。以下、「ATBF1タンパク質の第2領域」又は省略して「第2領域」ともいう。当該領域のアミノ酸配列を配列番号：15に、当該領域をコードする塩基配列を配列番号：16にそれぞれ示す）の核内存在量及び/又は細胞質内存在量が検出対象となる。

後述の実施例に示すように、いくつかの被検癌細胞を用いて第2領域の量及び局在態様と悪性度との関係を検証した結果、一般に、(a)第2領域が核主体に局在していると悪性度が低いこと、及び(b)第2領域が細胞質主体に局在していると悪性度が高いことを認めた。即ち(a)及び(b)が、癌細胞の悪性度を判定するための好適且つ重要な指標になることが判明した。従って例えば、被検癌細胞の核内に多量の第2領域が検出されたとき(又は第2領域が核主体に局在していたとき)、被検癌細胞の悪性度が低いと判定できる。同様に例えば、被検癌細胞の細胞質内に多量の第2領域が検出されたとき(又は第2領域が細胞質主体に局在していたとき)、被検癌細胞の悪性度が高いと判定できる。

ここで、被検癌細胞内における第2領域の局在態様を指標として判定を行う場合は通常、第2領域の核内存在量及び細胞質内存在量を同時に検出する。そして、検出結果を比較することで第2領域の局在態様を調べ、第2領域が細胞質主体に局在していたとき、被検癌細胞の悪性度が高いと判定する。このように核内での検出量と細胞質での検出量とを比較することによって、第2領域の細胞内局在態様を明確に把握することが可能となる。尚、第2領域の核内存在量及び細胞質内存在量のいずれかの検出結果から第2領域の細胞内局在を予想し判定することにしてもよい。この場合、いずれかの存在量のみを検出すればよいことになる。

【0030】

(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域(ATBF1-Aタンパク質のN末端に位置する)の核内存在量及び/又は細胞質内存在量の検出

この検出では、被検癌細胞において、ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域(部分タンパク質。以下、「ATBF1タンパク質の第3領域」又は省略して「第3領域」ともいう。当該領域のアミノ酸配列を配列番号:11に、当該領域をコードする塩基配列を配列番号:12にそれぞれ示す)の核内存在量及び/又は細胞質内存在量が検出対象となる。

後述の実施例に示すように、第3領域(NT440、1-12が認識する部位)の検出は細胞全体でのATBF1量が増加、減少したのか、あるいは欠落するかの指標になる。また、第3領域における148番セリンのリン酸化状態を検出することによって、第3領域の核移行の比率を知る事が可能である。さらにその存在、欠落、核細胞質の局在位置を、ATBF1タンパク質の中央領域(即ち第1領域)の局在状態などと比較する事で、ATBF1タンパク質のプロセッシングの状況、さらにはmRNAレベルで起こる異常なスプライシングによるエクソンスキップの判定が可能である。以上のように、第3領域の検出は、癌の悪性度を判定する上で補助的ながらも有益な情報を与える。

【0031】

好ましくは上記(1)~(3)の二以上を検出し、各検出結果を考慮して被検癌細胞の悪性度を判定する。このように二以上の検出を行えば、より詳細且つ正確な判定・評価が行える。

検出項目の中に、上記(1)、即ち第1領域の検出を含めることが好ましい。(1)で検出される第1領域の存在量又は細胞内局在態様は癌の悪性度を最も特徴付けるものといえる。従って、悪性度の判定において(1)の検出は特に重要度が高い。

【0032】

一層好ましい形態として、上記(1)と(2)を検出する形態、上記(1)と(3)を検出する形態を挙げることができる。このように検出項目を増加させれば、より確度の高い判定を行える。中でも上記(1)~(3)を検出し、各検出結果を用いて総合評価することが最も好ましい。詳細な情報が得られ、より一層確度の高い判定を行えるからである。

【0033】

ここで、上記(1)と(2)を検出する形態(第1領域と第2領域の検出を検出する形態)における具体的な判定基準の例を以下に示す。尚、悪性度1が最も悪性度の低い区分であり、数字が大きい区分ほどその悪性度が高いとする。

悪性度	第1領域の存在量又は局在	第2領域の存在量又は局在
4	欠落(検出されず)	細胞質に局在
3	細胞質に局在	細胞質に局在

10

20

30

40

50

2	核に局在	細胞質に局在
1	核に局在	核に局在

尚、悪性度4の代表例として副鼻腔の未分化癌、びまん性悪性リンパ腫の一部を挙げることができる。同様に悪性度3の代表例として多形膠芽腫の一部、びまん性悪性リンパ腫の一部を、悪性度2の代表例としてGISTの一部(Bcl-2⁺)、髄膜腫の一部を、悪性度1の代表例としてGISTの一部(Bcl-2⁻)、髄膜腫の一部を挙げることができる。

【0034】

ここで、ATBF1遺伝子にはエクソン1~11が存在する(図47参照)。この中でエクソン10は最も長い配列からなり、4個のホメオドメインすべてをコードする。後述の実施例に示すようにATBF1は翻訳後のプロセスにおいて、複数の部分に切断されることが示唆された。また、エクソン10の異常スキッピングによって、エクソン10に対応する領域が欠落した変異タンパク質が産生されることが報告された(非特許文献9)。

10

細胞内においてATBF1が完全な状態であれば(全長タンパク質として存在していれば)、「ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域(即ち第1領域)」、「ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域(即ち第2領域)」、及び「ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域(即ち第3領域)」はそれぞれ、このようなATBF1の一部として存在する。一方、翻訳後のプロセスにおいてATBF1が分断されたときは、分断によって生じた部分ATBF1の一つ(又はその中の一部)として各領域は存在する。

尚、第1領域は、ATBF1-Aタンパク質の中央領域の一部(エクソン10のホメオドメイン以外の領域)を抗原として作製された抗体D1-120によって認識される。同様に第2領域は、ATBF1-Aタンパク質のC末端領域の一部を抗原として作製された抗体AT6によって認識され、第3領域は、ATBF1-Aタンパク質のN末端領域の一部を抗原として作製された抗体NT440及び1-12によって認識される。これらの抗体の作製方法は後述の実施例の欄で詳述される。

20

【0035】

被検癌細胞は、被疑癌組織から採取することができる。具体的には、被疑癌組織の一部をバイオプシー(生検)で採取し、被検癌細胞を含む試料としてそれを本発明の方法に供することができる。

【0036】

本発明においてATBF1量の検出や、ATBF1タンパク質の第1領域、第2領域及び第3領域の検出は、これに限定されるものではないが、好ましくは免疫組織化学的染色法を利用し行う。免疫組織化学的染色法によれば、迅速に且つ感度よくATBF1量等を検出できる。また、操作も簡便である。従って、ATBF1量等の検出に伴う被検者(患者)への負担も小さくなる。

30

免疫組織化学的染色法では検出対象を特異的に認識する抗体(抗ATBF1抗体、抗第1領域抗体など)が使用され、当該抗体の結合性(結合量)を指標としてATBF1量が検出される。

免疫組織化学的染色法では通常、まず被検癌細胞に対して、検出対象に特異的な抗体(例えば抗ATBF1抗体)を接触させる。その後、細胞全体、核、及び/又は細胞質に対する当該抗体の結合量を測定する。そして測定結果から、被検癌細胞の細胞全体、核内、及び/又は細胞質内の検出対象の存在量を算出する。具体的には、以下に示す免疫組織化学的染色法に従って本発明の方法を実施することができる。

40

【0037】

生体組織の免疫組織化学的染色は一般に以下の手順(1)~(9)で実施される。尚、生体組織の免疫組織化学的染色法については様々な文献及び成書を参照することができる(例えば、「酵素抗体法、改訂第3版」、渡辺慶一、中根一穂編集、学際企画)。

(1)固定・パラフィン包埋

外科的に生体より採取した組織をホルマリンやパラフォルムアルデヒド、無水エチルアルコール等によって固定する。その後パラフィン包埋する。一般にアルコールで脱水した後キシレンで処理し、最後にパラフィンで包埋する。パラフィンで包埋された標本を所望

50

の厚さ（例えば3～5 μm厚）に薄切し、スライドガラス上に伸展させる。尚、パラフィン包埋標本に代えてアルコール固定標本、乾燥封入した標本、凍結標本などを用いる場合もある。

(2) 脱パラフィン

一般にキシレン、アルコール、及び精製水で順に処理する。

(3) 前処理（抗原賦活）

必要に応じて抗原賦活のために酵素処理、加熱処理及び/又は加圧処理等を行う。

(4) 内因性ペルオキシダーゼ除去

染色の際の標識物質としてペルオキシダーゼを使用する場合、過酸化水素水で処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去しておく。

10

(5) 非特異的反応阻害

切片をウシ血清アルブミン溶液（例えば1%溶液）で数分から数十分程度処理して非特異的反応を阻害する。尚、ウシ血清アルブミンを含有させた抗体溶液を使用して次の一次抗体反応を行うこととし、この工程を省略してもよい。

(5) 一次抗体反応

適当な濃度に希釈した抗体をスライドガラス上の切片に滴下し、その後数十分～数時間反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。

(6) 標識試薬の添加

標識物質としてペルオキシダーゼが頻用される。ペルオキシダーゼを結合させた2次抗体をスライドガラス上の切片に滴下し、その後数十分～数時間反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。

20

(7) 発色反応

トリス緩衝液にDAB（3,3'-diaminobenzidine）を溶解する。続いて過酸化水素水を添加する。このようにして調製した発色用溶液を数分間（例えば5分間）切片に浸透させ、発色させる。発色後、切片を水道水で十分に洗浄し、DABを除去する。

(8) 核染色

マイヤーのヘマトキシリンを数秒～数十秒反応させて核染色を行う。流水で洗浄し色出しする（通常、数分間）。

(9) 脱水、透徹、封入

アルコールで脱水した後、キシレンで透徹処理し、最後に合成樹脂やグリセリン、ゴムシロップなどで封入する。

30

【0038】

免疫組織化学的染色法に使用する抗体（検出用抗体）は、検出対象に特異的結合性を有する限りその種類や由来などは特に限定されない。検出用抗体はポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体（数種～数十種の抗体の混合物）、及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。ポリクローナル抗体又はオリゴクローナル抗体としては、動物免疫して得た抗血清由来のIgG画分のほか、抗原によるアフィニティー精製抗体を使用できる。抗ATBF1抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv抗体などの抗体断片であってもよい。

尚、ATBF1量の測定には、後述の実施例に示すD1-120抗体を使用することができる。この抗体は、ATBF1-AとATBF1-Bの共通部分であるD1-120部位（エクソン10に対応する領域であってホメオドメイン1のごく一部およびその直前の領域）を特異的に認識する。従って、この抗体を用いればATBF1-AとATBF1-Bの両者を同時に検出することが可能である。一方、この抗体はATBF1の第1領域に対して特異的に結合することから、この抗体による検出量は第1領域の存在量を反映したものとなる。従って、この抗体を用いれば、第1領域の量又はその局在を把握することが可能となる。同様に、ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域を認識する抗体AT6を用いれば、C末端領域である第2領域の量又はその局在を把握することが可能となり、ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域を認識する抗体NT440又は1-12を用いればN末端領域である第3領域の量又はその局在を把握することが可能となる。

40

【0039】

50

抗ATBF1抗体等は、免疫学的手法、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法などを利用して調製することができる。

免疫学的手法によるポリクローナル抗体の調製は次の手順で行うことができる。抗原（例えばATBF1のD1-120部位又はその一部）を調製し、これを用いてウサギ等の動物に免疫を施す。ヒト以外の種（例えばマウス）のATBF1（又はその一部）を抗原として用いることができる。抗原は生体試料を精製することにより得ることができる。また、遺伝子組換え技術を利用して得た抗原を用いることもできる。組換えヒトATBF1は例えば、ATBF1をコードする遺伝子（遺伝子の一部であってもよい）を、ベクターを用いて適当な宿主に導入し、得られた組換え細胞内で発現させることにより調製される。

低分子量のために有効な免疫惹起作用を期待できない場合には、キャリアタンパク質を結合させた抗原を用いることが好ましい。キャリアタンパク質としてはKLM (Keyhole Light Hemocyanin)、BSA (Bovine Serum Albumin)、OVA (Ovalbumin)などが使用される。キャリアタンパク質の結合にはカルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ縮合法、MBS (マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド)法などを使用できる。一方、ATBF1（又はその一部）を、GST、ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク、又はヒスチジン (His) タグ等との融合タンパク質として発現させた抗原を用いることもできる。このような融合タンパク質は、汎用的な方法により簡便に精製することができる。

【0040】

本発明者らは、胎仔および成ラットの脳組織、未分化胚性癌細胞株 (P19細胞) さらに2種類の神経芽細胞腫細胞株 (NB-1, GOTO) においてウエスタンブロットによる実際の組織中でのATBF1タンパク質のサイズを検定した。その際に使用した抗体はATBF1-A (40kDa) タンパク質の中央部を検出するD1-120である。これらの抗体を用いたウエスタンブロットの結果、抗体が認識するタンパク質 (即ちATBF1タンパク質) のサイズは腫瘍細胞によって40kDaを示す場合と、その約半分の210kDa、さらにそれより短い多数のサイズを示す場合があった。しかしながら、本発明の実施にあたりD1-120に相当する部位に対する抗体を癌細胞の悪性度判定に使用する場合には、このタンパク質サイズの差異を考慮する必要は無いと考えられる。但し、組換えATBF1を用いる場合において後述の実施例に示した結果 (D1-120を使用した染色結果) と同等の結果を出すためには、ATBF1遺伝子 (遺伝子の一部であってもよい) のうち、ATBF1-Aアミノ酸配列のD1-120部位をコードする遺伝子部分 (エクソン10に対応する部位) を選択し、ベクターを用いて適当な宿主に導入して調製した抗原を用いて作製した抗体を使用することが必要と考えられる。NT440、1-12、及びAT6を使用した実験の結果が示すようにD1-120部位から大きく離れた部位を認識する抗ATBF1抗体を使用した場合の検出結果 (局在態様など) は、D1-120を使用した場合の検出結果と全く異なったものとなる。しかしながらその近傍であれば、D1-120部位以外の部位を認識する抗体を用いても、D1-120が検出する部位 (第1領域) を同様に検出できる可能性がある。ある抗体がD1-120と同様の特異性を有するか否かはP19細胞等を用いた予備実験、癌細胞を使用したATBF1の局在の検索実験 (具体的にはウエスタンブロットティングなど) などによって検証することができる。その結果D1-120と同様の特異性を当該抗体が有すると判断されれば、当該抗体をD1-120と同様の目的で使用することができる。

【0041】

必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で採血し、遠心処理などによって血清を得る。得られた抗血清をアフィニティー精製する。一方、モノクローナル抗体については次の手順で調製することができる。まず、上記と同様の手順で免疫操作を実施する。必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で免疫動物から抗体産生細胞を摘出する。次に、得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合してハイブリドーマを得る。続いて、このハイブリドーマをモノクローナル化した後、目的タンパク質に対して高い特異性を有する抗体を産生するクローンを選択する。選択されたクローンの培養液を精製することによって目的の抗体が得られる。一方、ハイブリドーマを所望数以上に増殖させた後、これを動物 (例えばマウス) の腹腔内に移植し、腹水内で増殖させて腹水を精製することにより目的の抗体を取得することもできる。上記培養液の精製又は腹水

10

20

30

40

50

の精製には、プロテインG、プロテインA等を用いたアフィニティークロマトグラフィーが好適に用いられる。また、抗原を固相化したアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。更には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、硫酸分画、及び遠心分離等の方法を用いることもできる。これらの方法は単独ないし任意に組み合わせられて用いられる。

【0042】

検出対象への特異的結合性を保持することを条件として、得られた抗体に種々の改変を施すことができる。本発明では、このような改変抗体を利用してもよい。

【0043】

抗ATBF1抗体等として標識化抗体を使用すれば、標識量を指標に結合抗体量を直接検出することが可能である。従って、より簡易な方法となる。その反面、標識物質を結合させた抗ATBF1抗体等を用意する必要があることに加えて、検出感度が一般に低くなるという問題点がある。そこで、標識物質を結合させた二次抗体を利用する方法、二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用する方法など、間接的検出方法を利用することが好ましい。ここでの二次抗体とは、抗ATBF1抗体等に特異的結合性を有する抗体であって例えばウサギ抗体として抗ATBF1抗体等を調製した場合には抗ウサギIgG抗体が使用される。ウサギやヤギ、マウスなど様々な種の抗体に対して使用可能な標識二次抗体が市販されており（例えばフナコシ株式会社やコスモ・バイオ株式会社など）、本発明で使用する抗ATBF1抗体等に応じて適切なものを適宜選択して使用することができる。

【0044】

標識物質には、ペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質の中から任意に選択されるものが好適に用いられる。特に、ビオチンを標識物質として用いてアビジンペルオキシダーゼを反応させる方法によれば、より高感度の検出が可能である。

【0045】

本発明の第2の局面は、上記本発明の方法を実施するための試薬（被検癌細胞の悪性度判定用試薬）及びキット（被検癌細胞の悪性度判定用キット）を提供する。

本発明の試薬の一形態は、上記のように免疫学的手法によって本発明の方法を実施する際に使用される抗ATBF1抗体（抗第1領域抗体、抗第2領域抗体、抗第3領域抗体を含む。以下同様）である。ここでの抗体はポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体（数種～数十種の抗体の混合物）、及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。ポリクローナル抗体又はオリゴクローナル抗体としては、動物免疫して得た抗血清由来のIgG画分のほか、抗原によるアフィニティー精製抗体を使用できる。抗ATBF1抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv抗体などの抗体断片であってもよい。所望の標識化が施されている抗体であってもよいことは上記の通りである。

検出用抗体の抗体として、(1)ATBF1遺伝子のエクソン10に対応する領域を認識する抗体、(2)ATBF1遺伝子のエクソン11に対応する領域を認識する抗体、又は(3)ATBF1遺伝子のエクソン3に対応する領域を認識する抗体を好適に用いることができる。

(1)の抗体によれば、エクソン10に対応する領域（ATBF1タンパク質の第1領域）を検出可能である。(2)の抗体によれば、エクソン11に対応する領域（ATBF1タンパク質の第2領域）を検出可能である。(3)の抗体によれば、エクソン3に対応する領域（ATBF1タンパク質の第3領域）を検出可能である。

(1)の抗体、(2)の抗体、及び(3)の抗体の具体例として、後述の実施例において使用される以下のものを挙げることができる。

(1)の抗体：D1-120、(2)の抗体：AT6、(3)の抗体：1-12、NT440（NT440-1、NT440-2、NT440-3の混合物）

尚、認識する部位、ATBF1遺伝子のエクソンとの対応など、これらの抗体の特性の詳細については図31に示される。

10

20

30

40

50

【0046】

本発明のキットは、ATBF1に対して、又は第1領域などATBF1の一部に対して特異的結合性を有する試薬を含む。当該試薬の好適な例は抗ATBF1抗体であるが、これに限られるものではない。本発明のキットを用いることによって、本発明の方法をより簡便に且つより短時間で実施することが可能となる。

好ましい一形態として、抗ATBF1抗体を含む免疫学的測定（検出）用キットが提供される。抗ATBF1抗体の結合量を直接検出する方法用のキットの場合には、標識化された抗ATBF1抗体が用いられる。一方、間接的検出方法用のキットの場合には、未標識の抗ATBF1抗体が用いられる。この場合には、標識物質で標識化された二次抗体（標識二次抗体）をキットに含めてもよい。二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用した検出法用のキットとする場合には、当該ポリマーをキットに含めてもよい。

10

【0047】

一方、キットにATBF1（抗原）を更に含めることにしてもよい。典型的には、キットに使用する抗ATBF1抗体を作製する際の抗原として用いたものと実質的に同一、又は同等のATBF1をキットに含める。従って完全長のATBF1でなくともよい。また、組み換えATBF1であってもよい。ATBF1は、キットを使用して得られた染色性が抗ATBF1抗体とATBF1との特異的結合に基づくものであることを確認するために使用される。具体的にはまず、ATBF1で抗ATBF1抗体を処理する。処理後の抗ATBF1抗体を用いて免疫染色を行う。得られた染色像と、未処理の抗ATBF1抗体を使用して得られた染色像とを比較する。後者の染色像の方に強い染色性が認められれば、その染色性は抗ATBF1抗体とATBF1との特異的結合に基づくものであることを確認できる。

20

また一方で、タグやキャリアタンパク質（以下、タグ等という）との融合タンパク質を抗原として作製した抗ATBF1抗体をキットに使用する場合には、用いたタグ等をキットに更に含めることにしてもよい。キットを構成する抗ATBF1抗体中に、その作製過程で使用したタグ等に反応性を有する抗体が混在しているおそれのある場合に当該タグ等が必要となる。以下のように当該タグ等を利用すれば、キットを使用して得られた染色性が抗ATBF1抗体とATBF1抗体との特異的結合に基づくものであることを確認することができる。まず、このタグ等で抗ATBF1抗体を処理する。処理後の抗ATBF1抗体を用いて検体の免疫染色を行う。得られた染色像と、未処理の抗ATBF1抗体を使用して得られた染色像とを比較する。両者の間で染色性に相違がなければ、後者の染色像における染色性は抗ATBF1抗体とATBF1との特異的結合に基づくものであることを確認できる。

30

本発明のキットに、抗原抗体反応や染色等、免疫染色を実施する上で必要な一以上の試薬（例えば、組織固定・包埋用のホルマリンやパラフィン、非特異的結合を阻害するためのBSA、DAB等の発色試薬、核染色用のヘマトキシリン溶液など）や器具などを更に含めてもよい。また通常は、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

以下、実施例（実験例を含む）を用いて本発明をより詳細に説明する。

【実施例1】

【0048】

< ATBF1と細胞周期制御系との関連性の検討 >

本発明者らは分子生物学的手法である酵母ツーハイブリッド（yeast two-hybrid）法による分子相互作用の研究結果として、DNA結合転写調節因子であるATBF1が、DNAと結合するばかりでなく細胞質に存在する細胞骨格タンパク質GFAP（glial fibrillary acidic protein）と結合する新事実を発見した。従来から生理的な状態ではDNA結合タンパク質は核に存在することが当然のように予想され、観察されるが、ATBF1も核タンパク質と予想されながら、核で機能するだけでなく細胞質でも細胞骨格タンパク質と結合して存在する可能性が示されたわけである。これは今回の核細胞質移行を見出す原点となった。しかも、既報（非特許文献6）のごとく胃癌培養細胞を使用した別の実験系で、本発明者らはATBF1が核内ではp53タンパク質と結合し、p21のプロモーターを活性化、細胞周期を抑制する働きがあることを発見した（図1を参照）。故に、ATBF1の細胞周期制御機能に着目することとなり、種々の癌細胞におけるATBF1の動向を調べる事となった。その結果、癌細胞

40

50

の中には核タンパク質としてATBF1が核に局在する細胞以外に、細胞周期制御系が乱れ、増殖性の強くなった癌細胞においては、ATBF1が核から細胞質に移出が観察され、核のATBF1の染色性が極端に低下する例が存在するという新事実の重要性に本発明者らは気付く事となった（後述の種々の実施例を参照）。

【実施例 2】

【0049】

< 抗ATBF1抗体の作製 >

2 - 1 . 抗原の調製

マウスATBF1 (Ido et al. , (1996). Gene, 168, 227-231) の41アミノ酸残基 (2114 ~ 2154 : LQTLPAQLPPQLGPVEPLPADLAQLYQHQLNPTLLQQQNKR : 配列番号 1) をグルタチオンストラ

10

ンスフェラーゼ(GST)に融合した組み換えペプチドを抗原として使用した。尚、上記の41アミノ酸残基は、ヒトATBF1のアミノ酸残基 (2170 ~ 2147) と完全に一致する。具体的には、以下 (1) 及び (2) の手順で当該抗原を調製した。抗原調製、抗体作製の詳細は既報 (J. Compartive Neurology (2003) 465: 57-71 : 非特許文献 3) に記載される。

(1) 上記のごとく標的アミノ酸部分をマウスcDNAより切り出し、GST融合タンパク質作製のベクターpGEX-KT に組換え (サブクローニング) を行った。(2) 大腸菌 AD202 に遺伝子導入を行い、AD202に発現させたタンパク質をSephareose-glutathione beaded agarose (Sigma社)を使用して常法で精製を行った (例えば、「はじめての組換えタンパク質精製ハンドブック」1999年発行、アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社、を参照) 。

20

【0050】

2 - 2 . 免疫及び抗体の分離・精製

2 - 1 . で調製した抗原 (ATBF1-GST融合タンパク質) を用いて、以下 (1) ~ (4) の手順で抗ATBF1抗体 (D1-120) を取得した。

(1) PBS (pH7.5) に融解した抗原 (1 mg/ml) を Titer Max Gold (CytRx社) と等量混合して、免疫用エマルジョンを作成した。(2) 2 ml のエマルジョンをウサギ背部に皮下注射して免疫 (0 , 14 , 28 , 49 , 70 日目の5度にわたり) を行った。(3) 91 日間経過した時点で、屠殺採血して血清を分離した。(4) 免疫に使用した抗原による抗原カラムを作成し、血清から抗原抗体カラム精製後に抗ATBF1抗体を取得した (例えば、「はじめての抗体精製ハンドブック」2000年発行、アマシャム

30

【実施例 3】

【0051】

< 培養癌細胞におけるATBF1発現と細胞周期の関係 >

P19マウス胎児性癌 (embryonal carcinoma) 培養細胞を使用し、未分化な癌培養細胞を神経細胞に分化させる実験を行い、その過程におけるATBF1発現と細胞周期制御との関連に着目した検討を行った。

【0052】

3 - 1 . P19培養開始時のATBF1発現、細胞周期

40

P19癌細胞培養開始時、特に分化刺激を加えない未分化増殖状態の細胞を採取し以下に示す手順で免疫組織化学的染色 (ATBF1染色、D1-120使用) を実施した。細胞をチャンバースライドで培養しPBSで調整した4%パラホルムアルデヒドで固定し、固定後洗浄を行った。抗ATBF1抗体を5 µg/mlとなるように、0.05Mトリス緩衝液 (pH7.6、ウシ血清アルブミン1%溶液、アジ化ナトリウム含有) に溶解した一次抗体溶液を切片に滴下し、37度で約30分反応させた (一次抗体反応) 。十分に洗浄した後、2次抗体Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (以下の実施例中で示されるごとく、他のモノクローナル抗体と2重染色を行う場合はAlexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgGも同時に使用する。尚、いずれもMolecular Probes社製) を標本に作用させ、室温で約1時間反応させた (二次抗体反応) 。十分に洗浄した後、封入を行い。蛍光顕微鏡 (AX70 ; オリ

50

ンパス社製)か、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5; ZWISS社製)で観察を行った。染色の結果、ATBF1は核、細胞質ともに発現を認めず(図2 aを参照)、フローサイトメトリーを使用した検索では細胞は増殖状態を示し、細胞周期G1期の細胞とともに、S期の細胞、G2、M期の細胞が高い割合で混在した(図2 dを参照)。

【0053】

3 - 2 . P19、レチノイン酸処理後、24時間でのATBF1発現、細胞周期

培養細胞に神経分化を促す薬剤、レチノイン酸を投与した24時間後、上記3 - 1に記載した方法でATBF1染色、さらにフローサイトメトリー検索を行った。形態的には細胞はやはり未分化増殖状態を維持したが、ATBF1の細胞質での発現を認めるようになった(図2 bを参照)。フローサイトメトリーを使用した検索では細胞はやはり増殖状態を示し、G1期の細胞とともに、S期の細胞、G2、M期の細胞の割合は依然高かった(図2 eを参照)。

【0054】

3 - 3 . レチノイン酸中断、4日後のATBF1発現、細胞周期

レチノイン酸を中断し、さらに4日間培養後に上記3 - 1に記載した方法でATBF1染色、さらにフローサイトメトリー検索を行った。形態的に培養細胞は神経突起を有する分化した細胞群に変化した。するとATBF1は細胞質から核に移動し、核主体の発現に変化した(図2 cを参照)。フローサイトメトリーを使用した検索ではS期の細胞、G2、M期の細胞の割合が極端に減少し、ほとんどがG1期の細胞集団に変化した(図2 fを参照)。これは明らかな細胞周期の停止を意味し、G1期停止、言い換えると増殖抑制が認められた。この実験結果は、そのアミノ酸配列番号277及び2987から始まる2箇所(の)の推定核内保留シグナル(Nuclear localization signal)の存在(図3 aを参照)から予想されたごとくATBF1が実際に細胞質から核へ移行を示すタンパク質であることを証明しただけでなく、核へのATBF1移行により細胞周期の停止が起こることをも示すものである。

【実施例4】

【0055】

<培養癌細胞におけるATBF1の細胞質から核への移行、核から細胞質への移出の調節機構の検討>

4 - 1 . ATBF1の核への移入の促進機序の検討

P19細胞では、レチノイン酸又はその誘導化学物質を作用させると、ATBF1のmRNA転写量、細胞内タンパク量が增加する。しかしながらP19細胞を培養液に浮遊する状態で培養する限り、ATBF1は細胞質に留まり、核移行は観察されない。ここでは細胞を培養皿に接着するような条件設定をすることによりATBF1発現がどのように変化するかを検索するための検討を行った。生体内の細胞外部環境に類する特徴を持つフィブロネクチン、ラミニンや、ゲラチン、ポリ-L-オルニチン、ポリ-Lリジンを培養皿へ塗布した後の細胞におけるATBF1の局在を観察した。上記3 - 1 . に記載したのと同様の方法でATBF1染色(D1-120を使用)を施行した。フィブロネクチンなどを培養皿へ塗布しない場合、細胞は浮遊状態でATBF1は細胞質には出現するが、核へ移行しない(図4 aを参照)のに対して、培養皿にフィブロネクチンとポリ-L-オルニチンを塗布し細胞が付着できる状態にした場合、培養後3時間以内に、かなりの細胞においてATBF1の核への移行が観察され(図4 bを参照)、24時間では殆ど全ての細胞でATBF1の核への移行が観察された(図4 cを参照)。ラミニンやゲラチンを培養皿へ塗布した場合でも、培養皿表面にP19細胞はよく付着することができ、その条件でもやはりATBF1の核への移行が観察された。これはATBF1の細胞質から核への移行は、細胞の培養皿への接着を促進するフィブロネクチンのごとき因子(あるいは接着刺激それ自体)の影響で調節される事を意味している。浮遊状態から付着状態への変化は細胞表面に存在する受容体が関与する可能性があり、細胞外部環境に応じた情報を細胞内へ伝えることでATBF1の細胞内局在が変化すると思われた。

【0056】

4 - 2 . 核から細胞質へのATBF1輸出機序の検討

最近、CRM1(Exportin 1 or chromosome region maintenance 1)により様々な因子の核

から細胞質への運搬移出が調節される事実が報告されている。ATBF1では、CRM1の標的配列、即ち核外輸出シグナル (Nuclear export signal) の存在が三箇所 (アミノ酸配列の 1 2 6 7 番目、2 4 7 1 番目、及び 2 5 0 4 番目からそれぞれ始まる) 想定されている (図 3 b を参照)。従ってCRM1の阻害剤である抗生剤Leptomycin Bの作用により、核からの細胞質へのATBF1移出阻害が起こる事が予想された。今回、P19細胞を使用し、上記のフィブロネクチンおよびポリ-L-オルニチンを塗布した培養皿にレチノイン酸を作用させ、さらに抗生剤Leptomycin Bを加える実験を行い、上記 3 - 1 . に記載した方法でATBF1染色を施行することでATBF1の動向を観察した。その結果、Leptomycin Bを作用させない場合の発現量に比較して (図 5 a を参照)、Leptomycin Bを作用させる事で、P19細胞におけるATBF1の核内濃度が明らかに増大する (図 5 b を参照) とともに、アポトーシスに陥る細胞数が明らかに増加した。また、さらに 1 日培養を追加すると、翌日には殆どの細胞が死滅した。この実験結果はATBF1の核外輸出はCRM1に制御されている事と、ATBF1濃度が核内で増加する状態は、癌細胞のアポトーシスを促進する状態であることを示すとともに、癌の治療方針に重要な示唆を与えると思われた。

【 0 0 5 7 】

4 - 3 . 細胞質から核への移行の調節機序の検討

細胞周期に関連する種々の因子などに関して過去に検討された事実として、タンパク質の核・細胞質移行にはアミノ酸のリン酸化が関係する事が知られ、特に核移行には核内保留シグナルのリン酸化及び脱リン酸化が重要であることが判明している。リン酸化反応を触媒する酵素の中でもPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) ファミリータンパク質は良く研究されており、最近ATBF1と同様に、核・細胞質を移行し機能するN-CoR (The nuclear receptor co-repressor) の核から細胞質へ局在が移行する際、4 0 1 番セリンのリン酸化にPI3Kが関与している事が報告された (2002, Nature 419, 934-939)。本発明者らはラット胎仔の脳神経細胞におけるATBF1発現とN-CoR発現が相補的であるという事実から、N-CoRが核から細胞質に輸出される場合とは逆に、ATBF1が細胞質から核への移行する際に、PI3Kによる核内保留シグナルのリン酸化が関与する事を予想した。そこで上記同様に、P19細胞を使用し、フィブロネクチン塗布培養皿でレチノイン酸を作用させた後にPI3Kの拮抗剤 2 種 (Wortmannin, LY294002) を作用させる実験を行い、上記 3 - 1 . に記載した方法でATBF1染色を施すことでATBF1の動向を観察した。その結果、薬剤を加えない場合のP19細胞内のATBF1は核への移行を示す (図 6 a を参照) のに比較し、薬剤を加えた場合のP19細胞ではATBF1産生自体は影響を受けなかったものの、核内へのタンパク質の移行は阻止される傾向 (作用はWortmanninがLY294002より強い) を示した (図 6 b , 6 c を参照)。その際、細胞は分裂像が散在し増殖状態を維持した。細胞質のATBF1は核周囲の細胞質部分 (小胞体内を予想) にリング状となるように集合する像を認め、これは、ATBF1の細胞質 (小胞体) から核への移行がPI3Kに依存した事象である事、核へのATBF1移行が無いと細胞は増殖状態を維持出来る事を意味している。

【 0 0 5 8 】

続いて上記実験で確認したPI3Kファミリータンパク質の中で何れがATBF1の核移行の際のリン酸化に関与しているかを決定する検討を行った。ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) は毛細血管拡張性小脳運動失調症の原因遺伝子であり、PI3Kファミリータンパク質をコードする遺伝子の代表である。その機能は多彩であるが、特に放射線などによるDNA傷害の監視システムとして細胞死や細胞周期を制御している事が知られている。今回本発明者らはATMの作用を特異的に阻害する薬剤カフェインを使用した実験を行った。まず、P19細胞を培養して培養皿接着性となったのを確認した後、レチノイン酸処理を行い、続いてカフェインを作用させた。その結果、PI3K阻害剤、Wortmannin, LY294002を使用した場合に核移行の阻害が不完全であったのに比較して (図 6 b , 6 c を参照)、カフェインでは殆ど全ての培養細胞におけるATBF1の核への移行が阻害され (図 6 d を参照)、細胞の増殖性は完全に保たれた。この結果はATBF1の核内保留シグナル部位のリン酸化に関与するPI3KはATMである事を意味している。さらに、ATBF1の核への導入

10

20

30

40

50

が、ATMの活性化（リン酸化）、すなわち放射線などによるDNA傷害の感知によって促進される事を示唆している。

【実施例 5】

【0059】

< ATBF1強制発現と細胞周期の関連の検討 >

実施例 3、4 により、ATBF1が細胞質から核へ、さらに細胞質へと行き来をする事で細胞周期の時期や増殖状態が切り替わる事が明らかとなった。ATBF1のみが主な原因でこれらの事象が起こったのか、それとも他の何らかの因子が作用した結果なのかを明らかにするために、本発明者らはATBF1単独発現ベクターを用いて、マウス神経芽細胞腫由来の培養細胞株Neuro2A細胞で強制発現実験を行った。Neuro2AにATBF1発現ベクターを導入して強制的にATBF1を発現させた後、上記 3 - 1 . に記載した方法でATBF1染色を施すことでATBF1の動向を観察するとともに、フローサイトメトリーで細胞周期を検索した。また同時に培養液にBrdU (5-bromodeoxyuridine)を混入し、細胞のDNA複製のためのチミジン取り込みが行われているかどうかを検索した。その結果、ATBF1を強制発現させることで核への集積を認める細胞はBrdUが取り込まれない事が明らかとなり（図 7 b を参照）、培養細胞全体では細胞周期を停止している細胞の割合が増加した（図 7 c を参照）。この実験結果は、ATBF1の核での発現が、細胞のDNA複製の停止、細胞周期の停止の直接的原因となる事を意味している。

一方、ATBF1発現ベクターの遺伝子導入と同時に培養液にBrdU (5-bromodeoxyuridine)を添加し、DNA複製中の細胞を標識した。その結果、ATBF1の強制発現を認める細胞では、例外なくBrdUの取り込みを認めない事が明らかとなり、ATBF1が主な原因で細胞周期が停止する事実が明らかとなった。

【実施例 6】

【0060】

< 胎生 14 日ラット胎仔脳、神経細胞におけるATBF1の核移行と増殖能との関連 >

さらに本発明者らは、胎生 14 日のラット胎仔脳を使用してATBF1の核移行、増殖能との関係を検索した。胎生期の脳基底部の神経細胞は脳室直下の傍脳室領域では未分化な状態（神経上皮細胞と称される）を維持しており、そこで最終分裂を終えた細胞は脳室下領域を通過し、分化領域に移動し神経細胞に最終分化するとされる。ATBF1発現とBrdU取り込みとの関係を検索するために母親ラットの腹腔内にBrdUを投与して 3 時間後に屠殺し、胎仔の検索を行った。実際のATBF1およびBrdUの染色性の確認するため、以下に示す手順で免疫組織化学的染色を実施した。まず採取した胎仔組織を 4 %パラフォルムアルデヒドで固定・パラフィン包埋し、約 3 μm 厚に薄切し、スライドガラス上に伸展させた。脱パラフィン後、クエン酸緩衝液 (pH6.0) を使用して圧力釜で 4 分間 (1 1 0) 熱処理を実施した（当該抗原賦活法を選択した理由については実施例 7 を参照）。続いて過酸化水素水で処理して内因性ペルオキシダーゼを除去した。次に、実施例 2 で調製した抗ATBF1抗体を 5 μg/ml となるように 0.05M トリス緩衝液 (pH7.6、ウシ血清アルブミン 1% 溶液、アジ化ナトリウム含有) に溶解した一次抗体溶液を切片に滴下し、室温で約 1 時間反応させた（一次抗体反応）。十分に洗浄した後、二次抗体 (DAKO Enivision, Labelled polymer, HRP [Code No. K1491] Anti-mouse and Anti rabbit) を標本に作用させ、室温で約 1 時間反応させた（二次抗体反応）。十分に洗浄した後、トリス緩衝液に DAB を溶解し、過酸化水素水を添加した発色溶液を 5 分間標本に浸透させて発色させた（発色反応）。発色後、標本を水道水で十分に洗浄し、DAB を除去した。続いて、マイヤーのヘマトキシリンで 15 秒程度染色した後、流水で 8 分間洗浄して色出しを行った。最後にアルコール系列及びキシレン系列を通し、透徹及び封入を行った。以上の手順で胎仔ラット脳組織を染色することにより、ATBF1 (D1-120 を使用) の核・細胞質の同在を明確に出来た。BrdU 染色は一次抗体として抗BrdU抗体を使用し同様な染色手技を行った。DAB 発色より核細胞質の染色性の差異は蛍光発色が解りやすい場合もあり、実施例 3 (3 - 1 .) に示す同様の方法で蛍光染色も行い、蛍光顕微鏡 (AX70; オリンパス社製) による観察も同時に行った。その結果、傍脳室領域に存在する神経上皮細胞はBrdU取り込みを

認めるとともにATBF1が細胞質に局在した(図8 a、b、d、fを参照)。分化領域に存在する神経細胞はBrdU取り込みが無いことから細胞周期が停止していることが分かり、ATBF1は核に局在した(図8 a、b、c、eを参照)。今回の結果は、未分化で分裂能を有する性質で癌細胞との類似性がある正常神経上皮細胞では、ATBF1が細胞質から核へ移行することによって、細胞増殖を停止した神経細胞へと最終分化して性質を変える事を示している。胎仔期の、分裂増殖能を有した神経上皮細胞と、分裂能を失い最終分化した神経細胞におけるATBF1の細胞内局在の比較観察は、癌の悪性度を考える上で非常に参考になる。以下の実施例で詳述するが、癌細胞においてもATBF1の細胞内局在に関して二つの様式が認められており、ATBF1が細胞質だけに存在する悪性度の高い種類と、核にATBF1が存在する比較的悪性度が低い種類に分類できる点において、胎仔期の神経細胞の観察で得られる結果と同一であると判断できる。

10

【実施例7】

【0061】

<抗ATBF1抗体使用時の、最適なATBF1検出条件(抗原の賦活化条件)の検討>

外科的に採取され、ホルマリン固定後にパラフィン包埋された通常の病理検体からATBF1を抗体で精密に検出するには、抗原の賦活化反応条件を決定することが重要となる。核・細胞質ともに程良く抗原が賦活される事がATBF1の核細胞質移行を検索する上では特に重要となる。今回、外科的に採取され、診断された膀胱癌のうち、上皮内の乳頭状非浸潤性膀胱尿路上皮癌(非浸潤癌と略す)及び上皮下の浸潤性膀胱尿路上皮癌(浸潤癌と略す)を各一例使用し、最適な抗原賦活法を見出すべく以下の検討を行った。まず、ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、実施例6と同様の手技でATBF1染色(D1-120を使用)を行った。ただし抗原賦活法として、以下に示すごとく、熱処理3種類と賦活液9種類の組合せ(計27種類の組み合わせ)と、酵素処理3種類を使用しその染色性を検討した。熱処理3種類:(1)オートクレーブ、121、15分、(2)圧力釜、4分、(3)電子レンジ、煮沸しない程度の温度設定、15分。抗原賦活液9種類:(1)DAKO Target Retrieval Solution PH 6.0、(2)DAKO Target Retrieval Solution High pH, pH 10.0、(3)10mM クエン酸バッファー pH6.0、(4)10 mM NaOH加クエン酸バッファーpH7.0、(5)TEバッファー(1mM EDTA + 10 mM トリス塩酸バッファー) pH9.0、(6)50 mM トリス塩酸バッファー pH 10.0、(7)20 mM トリス/0.65 mM EDTA/0.0005% Tween 20、(8)1mM EDTA溶液、pH8.0、(9)5% Urea溶液。酵素処理3種類:(1)トリプシン、(2)ペプシン、(3)プロテイナーゼK;である。

20

30

【0062】

染色結果を概説すると、熱処理法、バッファーの種類により、非浸潤癌、浸潤癌における染色強度、細胞内で核、細胞質の染色パターンが変化した。27種類の染色性は全て異なったが、大きな傾向として、オートクレーブ処理を行うと核の染色性が際立ちやすく、バッファーの選択によっては細胞質の染色が得られなくなった(図9を参照)。逆に電子レンジ処理では核の染色性を出すのが難しくなり、細胞質の染色性が際立つ傾向があった(図10を参照)。圧力釜処理は、温度設定がオートクレーブ、電子レンジの中間で、核と細胞質の染色性を同時にさせる傾向を示した(図11を参照)。またいずれの酵素処理でも、非浸潤癌、浸潤癌とも全く染色性は得られなかった。抗原賦活法およびバッファーの種類により、非浸潤癌で核及び細胞質の両方に(図12 a、cを参照)、浸潤癌でも核及び細胞質の両方に(図12 b、dを参照)ATBF1は局在することになり、その評価に非常に困惑した。客観的な評価は一見不可能にも思われたが、27種類の染色全体を通しての傾向の評価は、以下の(1)及び(2)に示すように可能であった。つまり(1)ATBF1は核、細胞質両方に存在し得るタンパク質で、膜や血漿成分中には存在しない。(2)今回使用した非浸潤癌及び浸潤癌では、ATBF1は核、細胞質ともに存在を認める。しかし核/細胞質の細胞内局在のタンパク比率に差があり、非浸潤癌では核主体、浸潤癌では細胞質主体と判断できる。この2つの評価を基礎に考えると、外科的に切除されホルマリン固定された標本に対する対応を決定できる。すなわち、ATBF1染色後に、癌の悪性度を決

40

50

定するためには、癌細胞でのATBF1発現の有無だけでなく、核、細胞質のATBF1量の相対的な比較を実現することが重要であると思われ、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を使用し圧力釜で4分間(110)熱処理することが最適であると判断された(図12e、fを参照)。さらに、マイクロウェーブ(95)や、オートクレーブ(121)使用による熱処理は、核と細胞質を移動するATBF1局在の検出を明確には表現することは出来ないためATBF1染色には不相当であると考えられた。

【実施例8】

【0063】

<乳癌の悪性度とATBF1発現との関連性の検討>

8-1. 乳癌153症例を使ったATBF1 mRNA発現量と予後の評価

10

乳癌手術症例153例の臨床検体について、ATBF1 mRNAの発現量を調べるためにリアルタイム半定量PCRを実施した。尚、リアルタイム半定量PCRは、LightCycler ver.3.0(ロッシュダイアグノスティックス社製)を使用し、添付のマニュアルを参考にした上、常法で実施した。その結果、原発巣の大きさ、リンパ節転移の有無、エストロゲンレセプターの発現の有無などの従来の予後因子として重要なパラメータと、ATBF1 mRNAの発現量変化は統計学的に有意な相関を示す事実が判明した(結果は図示せず)。簡略に表現すれば、ATBF1の発現量が多い腫瘍の場合、患者の

予後が良く、発現量が低下するとより悪性で、予後が悪くなる事が明確であった。

【0064】

8-2. 乳癌におけるATBF1局在と組織学的な腫瘍の浸潤性との関連

20

組織切片上で4例の乳癌症例(73、66、53、50歳)に対し、実際のATBF1の染色性の確認するため、実施例6に示す手順でATBF1染色(D1-120を使用)を実施した。乳頭腺管癌、硬癌の場合を例示する。組織学的に乳管内に限局し、乳管周囲に浸潤を示さない癌腫(図13a、cを参照)ではATBF1核主体の染色性を認める傾向があった(図13b、d、eを参照)。乳腺内、脂肪組織に浸潤性の発育を示す部位(図13f、h、jを参照)では、ATBF1が細胞質のみに局在する(図13g、i、kを参照)場合と、ATBF1の染色性が欠落する場合(図13kを参照)が混在した。組織学的な浸潤性との関連で、ATBF1の細胞内局在を比較すると、乳管上皮内に限局し浸潤を示していない状態、つまり悪性度の低い状態ではATBF1は核にも局在するが、浸潤傾向、脂肪への進展傾向を示すとATBF1が細胞質に限局するか、発現欠落する傾向が明らかであった。これは実施例8の8-1で示したATBF1 mRNAの発現量の有無が予後を左右するという事実と矛盾しない結果であり、ATBF1の局在検討は乳癌の悪性度の予測に有用であると判断できる。

30

【実施例9】

【0065】

<ヒトの各種癌における悪性度とATBF1発現との関連性の検討>

以下に示す例はすべて、ヒト癌細胞におけるATBF1染色と、腫瘍の悪性度の関連に関する検討及びその結果である。すべての検討において実施例6に示す手順でATBF1染色(D1-120を使用)を実施した。

【0066】

9-1. 膀胱癌培養細胞(3種類のヒト膀胱癌細胞株におけるATBF1の発現の差異)

40

発明者の一人である三浦らが既に報告したように(非特許文献6: Microbilo. Immunol. 48(2), 137-145, 2004)、ATBF1は腫瘍の核の中において、p53と蛋白-蛋白結合して機能し、腫瘍の悪性度と関与する可能性のあることが解ってきている。すなわちその第一はアルファフェトプロテイン遺伝子の転写抑制する機能、第二はp21遺伝子の活性化による細胞周期抑制する機能である。特にp21を活性化して細胞周期を抑制する機能は放射線、化学物質などで細胞DNAが損傷される事がきっかけで発揮される(図1を参照)。

さて、実際の腫瘍の中でATBF1の核又は細胞質への移行が観察されるが、癌の悪性度を考える場合、その意味するところをより正確に解明するためには他因子との関連も重要である。本発明者らはその第一歩として、p21、p53という、それぞれATBF1と非常に関連の深い(再度図1を参照)2種の癌抑制遺伝子の異常がすでに明確となっているヒト膀胱癌

50

由来の培養細胞3株 (RT4, T24, HT1376) を用いてATBF1染色を行い、これらの培養細胞のどこにATBF1が局在するかを検討した。これら3種の培養株は抗ガン剤シスプラチンの効果の有無、p21が導入されるかどうかについてもすでに検索されている (Int J Cancer. 1996 Nov 15;68(4):501-5)。従ってATBF1発現の腫瘍の悪性度評価のためには最適な材料となると思われる。

【0067】

ATBF1染色の結果をに示す (図14を参照)。図14の左はRT4のHE染色像 (上段)、ATBF1染色像 (中段) 及びp53染色像 (下段) である。RT4はヒトの膀胱乳頭腫由来で、p21, p53ともに変異は無く、シスプラチンでアポトーシスを誘導でき、悪性度は3種の培養株で最も低い。ATBF1の染色性は細胞質にも少量存在するが、主体は核であり、ATBF1が核に導入されていることを示している。また変異の無いp53がほとんどの細胞の核に導入出来

10

ている。
図14の中央はT24のHE染色像 (上段)、ATBF1染色像 (中段) 及びp53染色像 (下段) である。T24は、p21の変異は無いが、p53ナンセンス変異株であり、p53タンパク質は途中で切断されている。通常のp53・p21の経路 (図1を参照) が働かないために、この細胞はシスプラチンによりアポトーシスを導入できず、悪性度はRT4より高い。T24ではATBF1は核にも存在するが、細胞質主体に顆粒状の染色性を示している。ナンセンス変異を持つp53が細胞の核に殆ど導入されていない。

図14の右はHT1376のHE染色像 (上段)、ATBF1染色像 (中段) 及びp53染色像 (下段) である。HT1376は、p53ミスセンス変異でタンパク質にポイントミューテーションが存在する事に加え、p21フレームシフト変異を伴うことで、シスプラチンでアポトーシスを導入できない。従ってT24同様に悪性度の高い培養株である。この細胞株ではRT4及びT24のいずれとも異なり、ATBF1の弱い発現が核に存在するという特徴を示した。一部、細胞の核でミスセンス変異を持つp53が導入されている。

20

【0068】

上記3種の培養株はともに定常状態ではp21の導入は軽微である。抗ガン剤シスプラチンを作用させると、RT4のみがp21を導入出来、細胞をアポトーシスに至らしめる事が可能となる。腫瘍の核内に導入されたATBF1が野生型のp53と蛋白-蛋白結合して安定化し、p21のプロモーター活性を上昇させるという考え方に従えば、RT4ではp53が野生型であることからp53-ATBF1が安定して核内に存在でき、これによってp21が正常に活性化されてアポトーシスを導入できると考えうる。しかしT24ではp53が途中で切断されているのでATBF1は核内に留まりにくく細胞質に移動してしまうと想定され、正常にp21を導入できないと判断できる。またHT1376においてもp53タンパク質に変異が入っているためやはりRT4のようにATBF1が大量に核内に存在できない。さらにp21に変異があるため、p21が正常に機能しない。従って結果として、これら二つの細胞株ではともにアポトーシスが導入されず、高い悪性度を示すと解釈する事が可能である。いずれにしてもATBF1が核に大量に染色されることが、悪性度が低い事の指標となり得る。さらにはATBF1の細胞内での局在を知ることによって、p53の導入の有無や、変異の有無を予想することも可能となると思われる。これら膀胱癌培養細胞の染色性およびp53発現との関連は、実際の膀胱癌においてATBF1染色後に癌の悪性度を考える際に、非常に重要な情報を提供してくれると判断される。

30

40

【0069】

9-2. 膀胱癌 (ヒト膀胱癌の悪性度判定におけるATBF1の有用性)

ヒト膀胱尿路上皮癌における悪性度判定におけるATBF1染色の有用性を検討すべく、悪性度の一つの指標となると考えられる腫瘍細胞の組織学的異型度から分類される様々なWHOグレードの症例についてATBF1染色性を検索した (図15を参照)。図15aは、65歳男性例の乳頭状粘膜内癌、WHO Grade I、組織学的低異型度の症例の染色像 (a1: HE染色像、a2: ATBF1染色) である。ATBF1染色性は核のみに認められる。この染色性は培養細胞RT4 (上記9-1. および図14bを参照) に類似する。

図15bは、81歳男性例の乳頭状粘膜内癌、WHO Grade I (組織学的低異型度)、WHO Grade II (組織学的中等度異型度) が混在する症例の染色像 (図15b1: HE染色像、図1

50

5 b 2 : ATBF1染色像)である。Grade Iの部分ではATBF1染色性は核のみに認められる。Grade IIの部分ではATBF1染色性は細胞質に認められる。核での染色性はやはり培養細胞RT4(上記9-1. および図14bを参照)に類似する。一方、細胞質での染色性は培養細胞T24(上記9-1. および図14eを参照)に類似する。

図15cは、55歳男性例の粘膜下への浸潤癌で、WHO Grade II(組織学的中等度異型度)症例の染色像(図15c1: HE染色像、図15c2: ATBF1染色像)である。ATBF1染色性は細胞質に認められる。染色性は培養細胞T24(上記9-1. および図14eを参照)に類似する。

図15dは、84歳男性例の粘膜下への浸潤癌、WHO Grade IIIの症例の染色像(図15d1: HE染色像、図15d2, d3: ATBF1染色像)である。ATBF1染色性が細胞質(図15d2、染色性は培養細胞T24に類似)に認められる細胞と、ATBF1染色性が薄く欠落する傾向(図15d3: 染色性は3種の培養細胞のうちHT1376に近い)の認められる細胞が混在する。

WHOのグレードである組織異型度とATBF1の発現が完全に一致するとは言えないが、WHOのグレードが上がるにつれ、また乳頭状の上皮内尿路上皮癌から浸潤性尿路上皮癌に移行するにつれ、ATBF1が核に局在、そしてATBF1が細胞質に局在、さらにはATBF1が欠落すると順番に移行する傾向があると考えられた。従って上記9-1.の結果をあわせて考えると、ATBF1の局在により膀胱癌の悪性度を判定する事が可能であると思われる。

【0070】

9-3. 胃腺腫、胃癌(胃の生検診断、一連のシリーズ、Group III~Group VとATBF1の発現の検討)

異型度の異なる胃腺腫、悪性が確実な胃癌についてATBF1染色(D1-120を使用)を実施し、ATBF1の発現局在との関連を検索した。

【0071】

胃腺腫(ここで示すのは55歳女性、同一胃内で数個のポリープに対してポリペクトミーが施行された例である)、のなかで胃型の異型上皮巢あるいは腺腫(Group III、図16a1を参照)は、経過の長い良性病変であることが多く、数年の経過観察でも大きさにあまり変化がない場合があるとされる。本例ではATBF1の染色性は核に局限しており(図16a2を参照)、核でのp53染色性が存在し(図16a3を参照)、p21の核への導入も認めた(図16a4を参照)。腸型の異型上皮巢あるいは腺腫(Group III)で中等度異型を認める病変(図16b1を参照)でも、ATBF1は主に核に局限し(図16b2を参照)、胃型の腺腫との染色性の強弱の差はあるもののp53、p21の発現を認めた(図16b3、b4を参照)。これに対し高度異型を伴い境界領域の病変と思われる腸型の異型上皮巢あるいは腺腫(Group III、図16c1を参照)では、ATBF1は細胞質に顆粒状の染色性を認め(図16c2を参照)、p53の発現も軽度散在性であり(図16c3を参照)、p21の核への導入を認めなかった(図16c4を参照)。

図1で示したごとく、核に導入されたATBF1がp53と蛋白-蛋白結合を行ってp21を導入し、細胞周期停止やアポトーシスに関わると考えると、同じ腺腫でも軽度、中等度異型の場合、核にATBF1が局在するうちはp21を導入できるが、高度異型と判断されるようになるとATBF1が細胞質へ移行し、p21を導入できないために腺腫の増殖を止められなくなると考える事が出来る。この結果はATBF1染色によって腺腫の悪性度(腺腫は悪性腫瘍ではないので、悪性度というよりは増殖能、アポトーシスに陥りやすさ)を予想する事が可能で、良性病変に留まる腺腫と、癌との鑑別が必要な境界領域病変との区別に有用であると言える。

【0072】

以下、各種の組織型の胃癌例についてATBF1染色を施行した結果を示す。

(1)高分化腺癌(tub1, Group V): 食道上皮下、噴門部に発生した胃癌の一例(78歳、男性、図17a1を参照)を示す。ATBF1は癌細胞の細胞質に存在する部位(図17a2を参照)、およびATBF1発現が欠落する部位(図17a3を参照)が混在した。

(2)中分化腺癌(tub2, Group V)

44歳女性の生検例を示す(図17b1を参照)。この例では細胞質主体にATBF1が存在した(図17b2を参照)。

(3)低分化腺癌、充実型 (por 1, Group V)

68歳女性の生検例を示す。粘膜内で膨張性の発育を示すpor1で(図18a1、a2、a4を参照)、ATBF1の染色性は、細胞全体で染色性が欠落する部位(図18a3を参照)、細胞質での局在を示す部位(図18a5を参照)が混在した。

(4)低分化腺癌、非充実型 (por2)及び印環細胞癌 (signet ring cell carcinoma, sig)

72歳女性の生検例を示す。粘膜内および胃壁全層にわたり浸潤性の発育を示すpor2, sig(図18b1を参照)では、ATBF1は細胞質に局限する染色性が主体であり、核での染色は全く認められなかった(図18b2を参照)。印環細胞癌の部位では(図19a1を参照)、ATBF1は細胞質に存在する細胞およびATBF1の欠落する細胞(図19a2を参照)が混在した。

10

(5)転移性の印環細胞癌(sig)

74歳のスキルス胃癌、切除不能例である。胆石症のために胆嚢摘出を行った際に胆嚢への転移が発見された症例である。リンパ管侵襲を經由して胆嚢壁に進展、浸潤を示した転移先(図19b1を参照)でATBF1の発現を示す。通常の胃癌原発部における印環細胞癌でATBF1は細胞質に局限する細胞、ATBF1が欠落する細胞の混在(図19a2を参照)を示す。しかし本例の胆嚢への転移を示す部位(図19b1を参照)では、リンパ管侵襲部位(図19b2を参照)、胆嚢壁の結合組織内への浸潤部位(図19b3を参照)ともに完全にATBF1が欠落していた。

20

(6)AFP産生胃癌

既報(非特許文献2, 5, 7)の通り、AFP産生胃癌のAFP産生部位ではATBF1発現が完全に欠落した(結果は図示せず)。

まずAFP産生胃癌が非常に悪性度の高い癌である事実を考えれば、ATBF1発現が欠落する現象は胃癌の悪性度を著しく高めると予想しうる。上記および現在継続中の多数の症例でのATBF1発現検索によると、ATBF1が核のみに局限する部位が局所的ではあるが高分化癌の一部および、充実型の低分化癌の一部において見出す事が出来る。しかし大部分の症例のあらゆる組織型の種々の癌に於いて、ATBF1は大部分が細胞質に存在するか、欠落するかのいずれかである。この結果は、胃癌が全般的に悪性度の高い腫瘍であることを意味しているとともに、細胞質主体のATBF1染色性が欠落すると、さらに悪性度が高まる可能性を指摘出来ると考える。胃腺腫、胃癌一連の発現検索を通して、胃においてもやはりATBF1染色は、腫瘍の悪性度、あるいは予後の予想に重要な役割を果たし得ると判断した。

30

【0073】

9-4.陰茎の乳房外パジェット病

72歳男性、陰茎摘出、鼠径リンパ節郭清を施行した症例を呈示する。パジェット病は元来、1874年、パジェット博士が乳腺の乳頭部で提唱した皮膚疾患の概念である。実際は乳腺以外の種々の部位にも起こる腺癌であり、初期には組織学的にクロマチンに富んだ核と豊富で明るい胞体を有する大型のパジェット細胞が表皮内に局限して存在する(いわゆる上皮内癌、carinoma in situ)。病態が進行するにつれて真皮に浸潤、さらにリンパ行性転移、多臓器浸潤を来す悪性疾患である。本症例ではパジェット細胞が陰茎皮膚の表皮内に局限する部位、真皮に浸潤する部位、さらに腫瘤形成を伴う部位、鼠径部のリンパ節転移部位といわゆる悪性度の異なる種々の段階の病態を同時に観察できたので、ATBF1発現検索(D1-120を使用)を各部位について行った(図20aを参照)。

40

【0074】

まず腫瘤形成部からやや離れた部位の陰茎皮膚上皮内を観察した(図20bを参照)。HE染色では大型で明調な胞体を有し、粘液を含有するパジェット細胞の散在を認めた。真皮への微少浸潤も無く、上皮内に局限する癌と判定できる状態である(図20b1を参照)。ATBF1はパジェット細胞の核主体の染色性を認めた(図20b2を参照)。次に腫瘤形成部近傍の表皮内にも連続性にパジェット細胞が存在し、真皮内に微少浸潤を伴うよう

50

になる部位では(図20c1を参照)、ATBF1は細胞質に染色を認めるようになり(図20c2を参照)、核には全く染色性を認めなかった。さらに浸潤が高度となり、表皮はびらん状で腫瘍形成を伴う部位では(図20a、dを参照)、ATBF1の細胞質での存在はより明瞭となった(図20e2を参照)。しかし腫瘍の表面、内深部ではATBF1の発現状況は全く異なっており、内部に行くに従いATBF1は欠落する傾向が明らかであった(図20f2を参照)。鼠径部のリンパ節内に転移した腫瘍の大部分はATBF1が欠落する細胞より構成され(図20g2を参照)、ATBF1が少量細胞質に存在する細胞の少量混在を認めた。遠隔転移を示した癌細胞は悪性度がより高いという観点から考えると、ATBF1染色で得られた結果と対応させ、ATBF1が欠落する傾向のあるリンパ節転移部の癌細胞、そして腫瘍形成性を示す腫瘍の内部に存在する癌細胞が最も悪性度が高いと判断でき、真皮に浸潤を始める部位あるいは腫瘍表面のATBF1が細胞質に存在する部位は次に悪性度高く、表皮内に限局して核にATBF1が局在する部位は最も悪性度が低いと判断できる。つまりパジェット細胞はATBF1が核に局在するうちは上皮内に留まり、細胞質に出て浸潤、腫瘍形成を来し、さらに発現が欠落する事で転移を起こすとも言い換える事が可能と考える。この結果は乳房外パジェット病のごとき腺癌においてもATBF1染色が腫瘍の進展、予後予測に有用である可能性を明確に示している。

10

【0075】

9-5. 正常ヒト骨髓造血細胞とATBF1との関連性の検討

血液疾患の疑いで骨髓穿刺を施行されたものの正常と診断された症例(67歳女性)の検体を使用、ホルマリン固定後にATBF1染色(D1-120を使用)を施行した。

20

【0076】

正常ヒト骨髓は造血のため細胞増殖およびアポトーシスの活発な組織であり、その細胞群におけるATBF1の発現を知ることは癌の悪性度、各種治療の効果を考える上で参考になると思われる。胎児期の組織以外の成熟したヒトにおいては免疫組織学的に検討する限り、ATBF1の発現は骨髓でかなり多量であり、細胞質に高度のATBF1染色性だけでなく核の染色性をも有した(図21b、cを参照)。現在の研究で、細胞質のATBF1の発現は増殖性維持を意味し、核での発現はDNA傷害に応じてその細胞をアポトーシスに陥らせることが容易であることを意味する。従って骨髓でのATBF1の染色性は骨髓造血細胞が増殖能を維持する細胞群であるとともに化学療法、放射線の影響を非常に受けやすい(骨髓抑制と称する)細胞群であることに矛盾しないと考えられ、癌の染色性を理解するのに重要な情報を提供してくれると思われる。

30

【0077】

骨髓で増殖後、アポトーシスに陥るのを免れ、末梢(リンパ節、末梢血)に出た血液細胞のATBF1発現は骨髓内とは全く異なり、核での発現は全く無く、ごく一部の細胞に細胞質での発現が存在するのみであった(リンパ節、各種臓器の静脈内を検索、図は提示せず)。

【0078】

9-6. 小型末梢型肺癌(小型末梢型肺癌の発生、進展過程検討、悪性度判定におけるATBF1の有用性の検討)

近年、画像診断技術の進歩、CTを使用した検診の普及などに伴い、非常に小型の末梢発生腺癌が数多く発見されるようになってきている。それらはCT上、gland glass opacity (GGO)として知られ、病理学的には異型腺腫様過形成(adenomatous atypical hyperplasia, AAH)、および限局型細気管支肺胞上皮癌(Bronchiolo-Alveolar Carcinoma, BAC)、野口分類(AからC)と診断され、予後に関するデータが蓄積しつつある。

40

1999年の肺癌のWHO分類ではAAHが記述され、大腸癌で提唱されたごときadenoma-carcinoma sequenceの考え方(AAHは大腸腺腫に対応)が導入され、すでに全てのAAHが腺癌に進行する訳では無いことや、AAHを経ることなく発生するde novoのBACの存在も示されている。GGOでAAHと診断された場合、手術選択の決断は難しく、経過観察の判断がなされる場合もある。

50

一方、2 cm以下のBACには野口分類が適応される。野口のType A, B は、リンパ節に転移を認めず5年生存率100%で非浸潤癌に相当するとされ、Type Cは30%にリンパ節転移を示し5年生存率75%の初期浸潤癌に相当するとされる。

このようにGG0として前癌病変、初期肺腺癌が多数見つけられるようになった現在、末梢肺腺癌における発癌機構を組織形態学的、細胞生物学的、分子生物学的に検討し病理学的に記述する事が、治療方針の決定、予後予測などの上から重要な課題である事は明らかである。しかしながら生検診断、細胞診診断あるいは手術時の迅速診断などでAAHかBACかの診断は決定的な診断基準を欠き、それほど簡単ではなく、病理医、外科医にとって悩みの種となっているのが現状である。

【0079】

10

今回、CT検診でGG0と診断された4症例(low-grade AAHからBAC野口のtypeBまで)について、肺腫瘍にATBF1染色(D1-120を使用)を施したところ、グレードの低い異型腺腫様過形成(low-grade AAH)、グレードの高い異型腺腫様過形成(high-grade AAH)を含む前癌病変の疾患群と、肺胞上皮を置換するように増殖し病巣内部の間質に活動性の線維芽細胞出現を伴わない限局型細気管支肺胞上皮癌(BAC, 野口のtype A, B 相当病変)、いわゆる早期非浸潤癌の群をATBF1の核、細胞質内局在により明確に区別できる可能性を示すことが出来た。従って小型末梢型腺癌の発生、進展過程研究、早期発見された癌腫の悪性度判定において、ATBF1染色の有用性が注目される。

【0080】

まず、前癌病変AAHの症例として、78歳女性例、Low-grade AAHに(図22aを参照)ATBF1染色を行い、ATBF1の局在部位を検索した。一部の細胞においてATBF1の細胞質局在を認めたが、大部分の細胞では核局在が主体であった(図22a3を参照)。次にややグレードの高い腫瘍について、57歳女性例で、high-grade AAHの検索を行った(図22bを参照)。Low-grade AAH同様にhigh-grade AAHでも細胞質にATBF1染色性の存在する部位も混在したが、核の染色性が主体であった。

20

【0081】

肺の早期の非浸潤癌に相当するBAC(野口のtype A, B相当の腺癌)に関して77歳女性(図22cを参照)、および64歳男性の腫瘍(図示せず)を検索した。肺胞上皮を置換して増殖する部位(図22c4を参照)でも、周囲肺胞組織の虚脱を示し線維増生を伴う部位(図22c5を参照)でも、ATBF1の局在部位はAAH症例の場合とは全く異なっていた。すなわち野口のType A, B相当のBACでは、一部ATBF1の局在が核の部位が混在するものの、大部分ATBF1は細胞質主体に局在を示した。

30

参考までに言及するが、野口のtype c相当の初期浸潤癌、さらに進行した浸潤癌でBACと判断できる腺癌については別に検討を行っている。その結果、ATBF1はいずれの症例でも細胞質での局在が主体であった(結果は図示せず)。

【0082】

現在までの研究によって、ATBF1の核での存在はp21を介した細胞周期の停止、化学療法、放射線療法の効き易さを意味すると考えられた。それに対し、ATBF1の細胞質の存在は細胞の増殖性が強い事、各種治療の効き難さを意味すると想定される。上記のようにlow-grade AAH、high-grade AAHでは核主体、BAC(野口のType A, B)では細胞質主体とATBF1発現部位の違いは明らかであった。

40

今回検討のために選択した症例は、いずれもGG0で、腫瘍の大きさは直径2cm以下、さらに肺の部分切除、あるいは肺葉切除がなされている。従っておそらくいずれもリンパ節転移を来さず、5年生存率は100%近くなると予想される。また組織学的にlow-grade AAH, high-grade AAH, BAC (type A, B)との最終診断が明確になっている症例に対するATBF1染色結果であり、AAHとBACがATBF1の核、細胞質の局在で区別出来ても、臨床的にはたして意味を持つのかという疑問もでてくる可能性がある。しかしながら実際の臨床の現場では完全に切除された腫瘍に対す

50

る診断確定を行うという理想的な状況ばかりとは限らない上にAAHとBACの組織学的な鑑別は容易ではないのが実状なのである。例えば、CT検診で非常に小さな腫瘍を指摘され、細胞診、あるいは生検を行った小検体に対して組織学的な観察を通して今後の予後予想、手術適応に関する示唆を行う状況は必ず生じてくると思われる。そのような場合、AAH、BACの鑑別はまぎらわしいが、「ATBF1が核に局限するので、AAHの可能性が高く、腫瘍径が特に小さいため、年齢も考慮して経過観察を行っても良い」とか、「ATBF1が細胞質に局限するので、BACの可能性が高く、今後の腫瘍の増殖速度が速い可能性も想定し、手術が勧められる」というような本当の意味での質的診断が、ATBF1染色により出来る可能性があると考えられる。今後、外科的に切除された末梢小型肺腫瘍に対し、AAH、BACの判断、野口分類に加え、ATBF1染色を施す事で、今後の予後研究のみならず細胞生物学的特性を検討するの

10

【0083】

9-7. 肺胞上皮癌

正常肺はもともとATBF1の発現量の多い組織であり、正常肺組織でも2型肺胞上皮細胞などで、量的には少ないがATBF1染色性(D1-120を使用)を示す。肺胞上皮癌(あるいは異型腺腫様過形成)になると、癌細胞の細胞全体のATBF1量が圧倒的に増加することが、低倍の顕微鏡観察によっても認められた(64歳男性例、57歳女性例を提示、図23を参照)。従って、ATBF1染色性が高いという事実だけでも、癌組織あるいは前癌病変を正常組織と鑑別できることが期待された。このように、ATBF1染色法が病理診断初学者にとって役に立つ鑑別手段となりうることを示された。

20

【0084】

9-8. 肺腺癌(進行した肺腺癌に対する化学療法選択決定の指標となる可能性)

進行した肺癌は手術後再発の可能性が高い。再発、転移に対する治療法は、延命や、患者に良質な余命を送ってもらうために、ますます重要な選択となる。中でも、増加を続ける腺癌の治療には定型が無いのが現状である。症例によって、化学療法が著効を示す場合と無効な場合があり、局所再発、リンパ節や他臓器転移に対し、化学療法選択の指標が無く、無駄な化学療法で患者に負担を強いる場合や、結果的に手術的摘出が第一の選択肢であったと後悔する例も存在する。今回、再発肺腺癌症例4例、化学療法著効1例(65歳男性)、無効3例(53歳男性、65歳女性、78歳男性)を用い、初回手術時の摘出標本に対してATBF1免疫染色を施し比較検討を行った。

30

【0085】

摘出標本に対するATBF1免疫染色(D1-120を使用、DAB発色)終了後、実際の検鏡前の段階で、各プレパラートの状態で肉眼的な観察を行った(図24 a1-d1及びa2-d2を参照)。著効例1例はプレパラートを肉眼的に見ただけでDABの茶色の着色が濃いことが明らかで、腫瘍のATBF1発現量が、無効例3例に比較して明らかに多かった。詳細に顕微鏡で検鏡後に観察すると、化学療法が著効を示した症例は腫瘍でのATBF1量が多く、部位によりATBF1の核での局在を認めた(図25 a4を参照、図24 aと同一症例)。それに対し化学療法が無効であった症例では腫瘍でのATBF1量が少ない上に、ATBF1が細胞質のみに局在を示すか(図25 b4を参照、図24 bと同一症例)、ATBF1が欠落する傾向を示した(詳細を図示せず)。

40

【0086】

化学療法著効例(図25 a1-a4を参照、65歳、男性)及び化学療法無効例(図25 b1-b4を参照、65歳、女性)を例に取り、化学療法前のCT像、化学療法後のCT像、HE染色像、及びATBF1染色像を検討した。

著効例は組織学的に低分化の腺癌(図25 a3を参照)で、CTで、気管気管支リンパ節の腫脹(図25 a1を参照)が明らかであるが、化学療法4ヶ月でほとんど消失した(図25 a2を参照)。ATBF1は細胞質に明らかな染色性を示す部位と、核の染色性を示す部位が混在した(図25 a4を参照)。

無効例は組織学的に高分化の腺癌で(図25 b3を参照)、CTで、左腎上極に転移性腫瘍(

50

図2 5 b1を参照)を認めた。化学療法にもかかわらず、4ヶ月後には腫瘍は明らかに増大を示した(図2 5 b2を参照)。ATBF1の発現は少量で、全てが細胞質に限局し、核の染色性は認めなかった(図2 5 b4を参照)。

【0087】

現在までの研究によって、ATBF1の核での存在はp21を介しての細胞周期停止、化学、放射線療法の効き易さを意味すると考え、一方でATBF1の細胞質の存在は細胞の増殖性が強い事、各種治療の効き難さを意味すると想定している。今回、化学療法著効例では腫瘍細胞のATBF1の発現量が際立って多く、核にATBF1が局在する腫瘍細胞が混在した。それに対し、無効例は腫瘍細胞のATBF1発現量は少なく、ATBF1が細胞質に局在するか、発現が欠落する傾向を認めた。従ってATBF1染色の結果に基づき、腺癌に対する化学療法選択の成否を予測するとともに、患者に無駄な化学療法の負担(骨髄抑制、脱毛などの全身的な副作用)を減ずる事、さらに手術療法など他の治療法選択へのシフトの適切な判断を行うことが可能になると考えられた。さらに今回の結果は、プレパラートを肉眼的に観察するだけで、ATBF1量を判断し、化学療法の効果を大まかに予測できる事を示しており、顕微鏡による詳細な観察に不慣れな医師に対しても、化学療法選択の正否に対する簡便な資料を提供できるようになる可能性もある。

【0088】

9 - 9 . 肺小細胞癌

肺小細胞癌は肺癌全体の約15~20%を占めている。非小細胞癌と比較した場合、早期に転移を認めるのが特徴であり、診断時には70%以上に縦隔リンパ節転移を認め、約60%が遠隔転移を有し、剖検の際、遠隔転移を認めないのはわずか4%である。

通常、ほとんどの場合手術適応がないのが特徴で、放置しておく急速な増大を示し、有効な治療が施されない場合、ほとんどの症例が1年以内に死亡する悪性度の高い腫瘍である。腫瘍の増殖速度が速い反面、抗癌剤、放射線治療に対する感受性が高く、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などとは著しく異なる臨床上的特徴を有している。近年の化学療法を中心とした治療法の進歩により、小細胞肺癌の治療成績は向上し、治療による明らかな延命効果が期待され、少数ではあるが治癒する症例も認められている。また一方で、同じ組織像を呈しながら化学療法に不応性を示す小細胞癌の存在も少なからずある事も知られている。

我々は診断目的で、肺の生検が行われた4症例(78、52、67、70歳いずれも男性)について、ATBF1染色(D1-120を使用)を行い、ATBF1の腫瘍細胞における局在を検討した。いずれの症例においても小細胞癌の細胞内のATBF1量は非常に多く、細胞質に染色性を示す部位、核に染色性を示す部位、両方とも染色性を有する部位の様々な混在を認めた(図2 6を参照)。症例によってその割合は種々で一定しなかった。

【0089】

現在までの研究で、ATBF1の核での存在はp21を介しての細胞周期停止、化学、放射線療法の効き易さを意味し、ATBF1の細胞質の存在は細胞の増殖性が強い事、各種治療の効き難さを意味すると想定している。今回検索した肺小細胞癌腫瘍細胞では、他に検索した種々の種類の腫瘍細胞と比較してATBF1発現量が際立って多く、細胞質のみならず、核にATBF1が局在する腫瘍細胞が種々の割合で混在する事が特徴であった。この検索結果は、肺小細胞癌が、腫瘍の増殖速度が非常に速い反面、抗癌剤、放射線治療に対する感受性が高いという特徴に良く合致する事実と思われる。今後生検された腫瘍切片にATBF1染色を施し、特に核にATBF1が局在する腫瘍細胞の全体での割合を検索する事により、治癒可能な症例(殆どが核での染色性を示す事を予測)あるいは化学療法への不応性を示す症例(殆どの腫瘍細胞で細胞質での染色性を示す事を予測)を指摘出来る可能性があると思われる。

【0090】

9 - 10 . 神経芽細胞腫

神経芽細胞腫は、小児悪性固形腫瘍のなかでは、最も多い腫瘍で、年齢、病期、発生部位、遺伝子数や染色体異常などの予後因子が知られ、治療法、予後が左右される。悪性度予測の判断で治療方針が全く異なり、手術だけで治療を終了する場合、化学療法だけで治

10

20

30

40

50

癒する症例も存在するだけでなく、最近では、自然治癒を期待し様子を見る場合もある。それに対し、進行した例や悪性度の高い神経芽細胞腫では、強力で長期間の化学療法が必要で、時に救命のために骨髄移植を用いた超大量化学療法が必要になる場合もある。従って現在は、予後良好な乳児神経芽細胞腫にはより軽減した治療を旨とし、予後不良の進行神経芽細胞腫にはより強力な化学療法のプロトコルの開発を目指す、という動向がある。

年齢、病期、部位といった臨床的な予後因子に加え、生検による種々の予後因子検査の追加される場合、腫瘍の組織像の他に、N-mycの増幅の有無、DNA ploidy検査（aneuploidの腫瘍は予後良好で、diploidやtetraploidの腫瘍は予後不良）、染色体の異常解析（1番染色体の短腕欠損の存在は予後不良）、Trk-A、Ha-rasの発現解析（これらのタンパク質発現が多いと予後良好）などの検査が行われる。

10

【0091】

今回、これらの予後因子検査の補助因子としてATBF1細胞内局在の判定が、有効か否かを検討する目的で、9症例の生存例（男児、女児を含む。全例、発見時1歳および0歳）および死亡例3例（いずれも男児、死亡時それぞれ10歳、3歳、2歳）を用いてATBF1染色（D1-120を使用）を行った。その結果、生存例9症例では、ほとんどの腫瘍細胞において核主体のATBF1染色性が存在した。それに対し死亡し、剖検し得た3例のうち、組織学的に腫瘍が浸潤、転移、脈管侵襲などを示し、腫瘍の悪性度が高く、11ヶ月の短期間で死亡し、腫瘍自体に起因する腫瘍死と考えられる2歳男児の1症例において、殆どの腫瘍細胞でATBF1が細胞質に局在していた（図27を参照）。この結果は、ATBF1染色による細胞質主体の染色性の存在が、悪性度の高い腫瘍群の判断材料の一つとなりうる事を示唆している。

20

【0092】

9-11. 消化管間質腫瘍(GIST)、GISTの予後予想におけるATBF1の有用性の検討

消化管に発生する間葉系腫瘍において、組織学的に平滑筋や神経細胞の形質を併せ持つ腫瘍、いずれの形質も有さない腫瘍の存在が明らかになってきており、消化管間質腫瘍、gastrointestinal stromal tumor (GIST)という概念が確立してきている。GISTは消化管自動運動のペースメーカー細胞であるカハール介在細胞由来とされ、未分化間葉系細胞抗原であるCD34、およびc-kit タンパク質(CD117)が診断時のマーカーとして使用される。腫瘍化の機序にはc-kit 遺伝子の機能獲得性突然変異によるチロシンキナーゼの持続的活性化が関与している。GISTに対する有効な治療法の第一選択は外科的手術療法であるが、完全切除が出来ても再発転移を起こす例が知られている。最近、チロシンキナーゼ阻害剤（メシル酸イマチニブ）が胃原発GISTの再発転移例に有効であるとの報告がされ、再発予防、切除不能例の治療薬として臨床使用が開始された。GISTの良、悪性の絶対的な判定基準は遠隔臓器への転移と周囲臓器への浸潤の有無である。しかし予後予想という必要性から現在では腫瘍の大きさが重要な基準として使用されている。2cm以下は超低リスク（経過観察）、2から5cmは低～中リスク（手術も考慮）、5cm以上は高リスク（手術）とするなどの基準が使用されている。その他、細胞密度、核分裂像の有無、患者の年齢、腫瘍の発生部位、DNA aneuploidy、MIB 1 labeling indexなどの有用性も指摘され、現状ではこれらの指標を組み合わせ、予後予測を行わざるを得ない。

30

【0093】

今回GIST 2例についてATBF1染色（D1-120を使用）を行い、核、細胞質の染色性を検索し、GISTの新しい予後予測のマーカーになる可能性を検討した。発見時2.0 x 1.8 cmで、良性に経過し再発も認めない胃のGIST 1例（52歳男性）、および発見時 3.3 x 2.9 cm、腹膜播腫を来し5ヵ月後には死の転帰をとった結腸原発GIST（58歳の女性）の2例についてATBF1染色性を図28に示す。尚、図28は上下段ともに、左から順にHE染色像、c-kit (CD117)染色像、及びCD34染色像、ATBF1染色像を示す。

40

臨床的に再発傾向の無い、胃原発GIST（図28の上段、CD117陽性、CD34陽性）では全ての組織部分で、核にATBF1の染色性を認め、細胞質のATBF1染色性は散在性で、軽度であった。それに対して、腹膜播腫で死去した結腸原発GIST症例（図28の下段、CD117陽性、CD34陰性）では核のATBF1染色性も残存したが、大部分の細胞の細胞質において高度で

50

、顆粒状のATBF1染色性が存在した。

現在までの研究で、ATBF1の核での存在はp21を介する細胞周期の停止を意味し、細胞質での存在は細胞の増殖傾向が強い事を意味することが想定されている。今回再発傾向の無いGISTおよび、増大傾向が著しくすでに患者が死去したGISTでのATBF1発現の違いは明らかであった。外科的に切除、生検されたGIST検体にATBF1染色を施し、染色性が核か細胞質かを明らかにする事により、腫瘍の再発、発育傾向を知り、予後や、各種治療追加の必要性を予測することが可能になると考えられる。

【 0 0 9 4 】

9 - 1 2 . 髄膜腫 (髄膜腫の病理診断、予後予想におけるATBF1の有用性の検討)

脳腫瘍のひとつである髄膜腫は髄膜皮細胞由来で、比較的緩徐な経過を取り、脳腫瘍全体の中では予後の良い腫瘍である。圧倒的に良性腫瘍が多いが、稀ながら組織型によって悪性の経過を辿るものがあり、WHOにより組織型に対応して低異型度から高異型度までGradingされている。MIB1 labeling indexなどが予後予想として使用されているが、その予後予測は容易でないのが現状である。今回、良性に経過し再発も認めない低異型度髄膜腫2例、60歳女性、(線維性髄膜腫 WHO grade I)、68歳男性(髄膜皮性髄膜腫 WHO grade I)と、再発および激しい出血を繰り返した中間異型度髄膜腫1例、52歳女性(異型性髄膜腫 WHO grade II)、組織型から今後の経過観察が必要と思われる中間異型度髄膜腫1例、63歳男性(明細胞髄膜腫 WHO grade II)について、ATBF1染色(D1-120を使用)を行った。

【 0 0 9 5 】

染色結果を図29に示す。図29は各症例のHE染色像(a1, b1, c1, d1)、ATBF1染色像(a2, b2, c2, d2)である。臨床的に再発傾向の無い、線維性髄膜腫(低異型度 grade I、図29a1, a2)、髄膜皮性髄膜腫(低異型度 grade I、図29b1, b2)では全ての組織部分において核にATBF1の染色性を認め、細胞質の染色性は全く認めなかった。

一方、すでに再発出血を繰り返す異型性髄膜腫(中間異型度 grade II、図29c1, c2)、および組織学的に腫瘍の増殖速度が速いとされ、今後の再発の可能性が高いと予想される明細胞髄膜腫(中間異型度 grade II、図29d1, d2)では核のATBF1染色性、核と細胞質のATBF1染色性、細胞質のみのATBF1染色性を示す細胞が混在した。

現在までの研究で、ATBF1の核での存在は細胞周期の停止、化学療法、放射線療法の効き易さを意味し、一方で細胞質での存在は細胞の増殖性が強い事、各種治療の効き難さを意味している。今回Grade I, Grade IIの腫瘍でのATBF1発現部位の違いは明らかであった。今後、外科的に切除された髄膜腫にATBF1染色を施す事で、組織型にかかわらず髄膜腫のgradeを予測出来る可能性(例えば細胞質の染色を見つけたら少なくとも中間異型以上を疑う事が出来る)、さらには再発の可能性を考慮し、各種治療追加の必要性などを予測できる可能性が示唆されると考える。

【 0 0 9 6 】

9 - 1 3 . 前立腺癌

高齢化に加えて、生活習慣、食餌の欧米化などが原因で、前立腺癌は年々増加している。前立腺特異抗原Prostate-specific antigen(PSA)検査の日常診療への導入により早い段階で発見されるようになったことも症例数増加の一因である。一般的に前立腺癌の進行は遅いといわれ、高齢者の前立腺癌は無治療で経過観察のみという方針も採用されることがあるが、長期間経過観察後の死亡率の上昇を予防するための外科手術、内分泌療法、放射線療法など局所療法の有用性も証明されてきている。最近の診断は血清中のPSA値の上昇によりスクリーニングし、経直腸的超音波下に Systematic biopsy (14カ所など)を行うのが一般的である。前立腺癌は一般に腺癌で、Gleasonによるグレードシステムが汎用される。このシステムは治療方針決定、予後との関連についてよく整理されているが、正確ではない場合もあり、理想的なgrade systemについて病理学者の間でまだ議論がある。

【 0 0 9 7 】

今回、ATBF1染色によるATBF1局在部位の評価が前立腺癌の悪性度判定の一助となる可能性を探るために、61歳、66歳、76歳男性症例の前立腺癌生検検体にATBF1染色(D1-

120を使用)を施してGleason gradeと染色性の比較検討を行った(図30を参照)。Gleason gradeが低く、組織学的に高分化である前立腺癌(Gleason grade 3A)ではATBF1が核に限局する傾向を認め、Gleason gradeが高く、低分化で浸潤傾向の明らかな前立腺癌(Gleason grade 5B)ではATBF1の存在が細胞質に限局する傾向を認めた。しかしながらGleason gradeが中間で、組織学的に中分化と判断される前立腺癌(Gleason grade 3B-4B)ではATBF1の局在部位は症例、部位により核、細胞質での染色性が混在していた。Gleason gradeとATBF1の局在が完全に合致するわけではないが、大きな傾向として、ATBF1の局在の差異がGleason gradeの高低とかなりの程度で平行する可能性が高いと判断した。

現在までの研究で、ATBF1の核での存在は細胞周期の停止、化学療法、放射線療法の効き易さを意味し、一方で細胞質での存在は細胞の増殖性が強い事、各種治療の効き難さを意味している。今回の結果は、生検前立腺癌組織を検索する際に、Gleason gradeを決定する事に加え、ATBF1の細胞内局在の検索を組み合わせる事により、患者の予後判定、治療方針決定のためのより正確な指標を提供できる可能性を示すものである。

【0098】

9 - 14 . その他の腫瘍におけるATBF1発現解析

現在までに検索した上記以外種々の腫瘍におけるATBF1染色(D1-120を使用)結果を以下に列挙する(いずれも図示せず)。

(1) 64歳男性、悪性リンパ腫(Mature

B-cell neoplasm, Mantle cell lymphoma); ATBF1は細胞質に存在する部位を認めたが、大部分の腫瘍細胞で欠落する傾向を示した。

(2) 40歳男性 左精巣腫瘍、(Embryonal

carcinoma 80%, Yolk sac tumor 20 %); ATBF1は細胞質に局在するか、欠落するかのいずれかであった。

(3) 62歳男性 C型肝硬変に合併した肝癌(moderately to poorly differentiated hepatocellular carcinoma); 腫瘍の辺縁部で周囲被膜に接する部位ではATBF1が細胞質に存在する傾向を認めた。しかし腫瘍の中心部位になるに従いATBF1が欠落する傾向を示した。

(4) 85歳女性、鼻の神経芽細胞腫(olfactory neuroblastoma of high grade malignancy); ATBF1はほとんど全ての細胞で細胞質に限局した。

(5) 88歳女性、悪性リンパ腫(Mature

B-cell neoplasma, Follicular lymphoma, Grade I); ほとんどの腫瘍細胞でATBF1は細胞質に局在した。

(6) 48歳男性、前縦隔腫瘍(Seminoma);

ほとんどすべての細胞でATBF1は細胞質に局在した。

(7) 56歳男性、胸膜腫瘍(Malignant

mesothelioma); ほとんどすべての細胞でATBF1は細胞質に局在した。

(8) 33歳男性、再発性脳腫瘍

(Hemangiopericytoma, WHO Grade III); ほとんどすべての細胞でATBF1は細胞質に局在した。

(9) 43歳女性、甲状腺癌

(Papillary carcinoma); ATBF1が核に局在を示す部分、細胞質に局在を示す部分の混合であった。

(10) 54歳男性の下垂体腫瘍(pituitary

adenoma); 一部細胞質にATBF1が局在する部位が混在したが、大部分の腫瘍細胞でATBF1は核に局在した。

(11) 25歳男性、膵腫瘍

(Endocrine tumor); ほとんどすべての腫瘍細胞でATBF1は核に限局した。

(12) 58歳女性、手掌腱膜腫瘍(Dupuytren's

palmar fibromatosis); 大部分の腫瘍細胞でATBF1は核に局在した。

【実施例10】

(図3 2 B1を参照)。胚中心では核主体、辺縁領域では細胞質主体であった(図3 2 B2, B3、図3 3 B, Cを参照)。

【0103】

ATBF1は癌遺伝子タンパク質c-mycと蛋白-蛋白結合を行い、その機能を抑制することが知られる(非特許文献8を参照)。細胞周期停止、アポトーシスへの移行に関し、Mybタンパク質ファミリーはBcl-2を導入し、細胞のアポトーシスを抑制する機能があると考えられている(Grassilli, E. et al. Resistance to Apoptosis in CTLL-2 Cells Overexpressing B-Myb Is Associated with B-Myb-dependent bcl-2 Induction, CANCER RESEARCH 59, 2451-2456, 1999を参照)。追加検索の範囲ではまだ直接的な証明には至っていないが、今回の正常のBリンパ球での検索結果は、ATBF1遺伝子エクソン11に対応するAT6部分が核でMyb癌遺伝子タンパク質との相互作用を介し、bcl-2遺伝子の抑制に関与している可能性を示すと発明者らは理解している(図3 3 Bを参照)。さらにB細胞の成熟、移動に伴って、核で機能を果たしているAT6部分が細胞質に移行すると、bcl-2遺伝子に対する抑制がはずれるためにBリンパ球はBcl-2タンパク質を発現出来るようになる可能性が示唆される(図3 3 Cを参照)。このATBF1のAT6部分の核から細胞質への移動はATBF1がD1-120, AT6の中間位置でプロセッシングされて機能する事を想定させるとともに、Bcl-2タンパク質を発現しアポトーシスから逃れる機序を獲得している腫瘍においてAT6部位が核に存在すれば、Bcl-2発現が抑制されるため、その腫瘍の悪性度は低いと判定でき、AT6部位が細胞質に移行していれば、Bcl-2発現の抑制が解除されるため、悪性度はより高いと判定できる事を示すと思われる(図3 3を参照)。

【0104】

10-3. 培養腫瘍細胞におけるATBF1タンパク質の発現(D1-120を使用したウエスタンブロッティングによるタンパク質断片の検討)

10-2. で想定されたATBF1がいくつかの部位で切断されて細胞の各分画で機能する可能性を確認するために、ヒト神経芽細胞腫由来の培養細胞株、NB1, GOTO; マウス未分化胚性癌細胞株P19、以上3種類の培養細胞を使用し抗ATBF1抗体(D1-120)を使用したSDS-PAGE,

ウエスタンブロッティングを行った。P19, NB1, GOTO,それぞれ血清入り培養液で培養した状態の細胞を採取して検索を行った対照群と、レチノイン酸処理(P19は4日間; NB1とGOTOは24時間)による神経細胞分化誘導群に分けて検索した。ただし、P19細胞の培養法は他の2種の細胞株とは異なり、まず4日間bacterial grade dish上に細胞を浮遊させた状態でレチノイン酸(濃度 5×10^{-7} モル)処理を行い、その後、レチノイン酸を除去した血清入り培養液で、通常のtissue culture dishに移し3日間継続して培養した。この方法でP19細胞は神経突起が認められるニューロンへ分化誘導された。

【0105】

以下にImmunoblot分析の手技の概略を示す。手技の詳細は非特許文献3に記載してある。

(SDS-PAGE, ウエスタンブロッティング (Immunoblot分析))

1) P19, NB1,

GOTOいずれの種類の培養細胞もtissue culture dishに付着培養後レチノイン酸で神経分化誘導を行った。ただし、P19細胞の神経分化誘導法は3-1. に記述のごとき手順を取った。

2) 培養過程を終了した細胞は培養皿から剥がしてPBS(pH 7.4)に浮遊させた。浮遊細胞は200 g、10分間遠心でペレット状に集め、proteinase inhibitorを加え氷冷したlysis buffer(10

mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100)に再浮遊させた。細胞浮遊液は10分間、氷上に静置した後に、15,000 gで20分間遠心し、Tritonに可溶性なフラクション部分をサンプルとし、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)に使用した。

3) サンプルは

SDS-PAGE sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol)と混合し、2分間煮沸した。21, 880 g、4 で30分間遠心後、上清を分離し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ATBF1-A全長の分子量は404kDaであるので、SDS-PAGEのためのゲルは4%を選択した。タンパク質はゲル各レーンに20 μ gずつマウントした。

4) 電気泳動後、ゲル内のタンパク質はpolyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに電氣的にトランスファーさせ、免疫染色を施行した。

5) メンブレンをBlock

Ace (雪印乳業、日本)で室温1時間ブロッキングを行った。

6) 抗ATBF1抗体、D1-120を0.5 μ g/mlとなるようにBlock Aceに溶解し、一次抗体溶液中にメンブレンを浸透させ、室温で2時間反応させた(一次抗体反応)。

7) 洗浄後、DAKO

Envision+ (DAKO社、デンマーク)と30分反応させ洗浄、さらにECL-kitで発色を行い、最終的にHyperfilm ECL (いずれもAmersham Pharmacia Biotech社製、Buckinghamshire, 英国)で感光、観察を行った。

【0106】

(結果)

P19細胞ではレチノイン酸処理をしない場合、ATBF1(D1-120部位で指摘)発現はほとんど認めなかった(図34レーン2を参照)。しかしレチノイン酸処理を施すと、404kDaの部位のタンパク質(ATBF1-Aのフルサイズに相当)のタンパク質発現が増加した(図34レーン3を参照)。未分化状態でP19細胞がATBF1の発現を示さず、レチノイン酸処理により神経細胞への分化を開始する時に劇的にATBF1発現を示す事はmRNAレベルでは報告されていた事実であり、404kDa(ATBF1-Aに相当)、306kDa(ATBF1-Bに相当)のタンパク質が検出されることが予想されていた。今回、さらに小さな断片である230, 210 kDaにバンドを認めることが新たな事実として明らかになった。

次に、NB1ではレチノイン酸処理前にすでにP19同様の全長404-kDaのタンパク質発現を認めた(図34レーン4を参照)、さらにレチノイン酸処理により、ATBF1の全長404-kDaより小さな、210kDaのタンパク質が主体となる事が明らかとなった(図34レーン5を参照)。

GOTOではレチノイン酸処理に反応せず、処理前後でタンパク質発現量の変化が無く、最初からすでに230kDa, 210kDaと小さなサイズのタンパク質発現が主体であった(図34レーン6, 7を参照)。GOTOにおける小さなサイズ主体のATBF1発現と、404-kDaのATBF1が検出できない事実は、タンパク質が細胞質で出来ると同時にすべてがプロセッシングを受けて分断されてしまう可能性と、GOTO特異的なエクソンの使い方により小さなサイズのタンパク質をコードするmRNAが作られて、404-kDaのタンパク質が発現出来ない機序が存在する可能性もある。

【0107】

10-4. 胃GISTにおけるATBF1、AT6部分の発現とBcl-2発現の関連性の検討

52歳の男性、胃に発生したGIST (Gastrointestinal stromal tumor)におけるATBF1発現(NT440, 1-12, D1-120, AT6)を検討しBcl-2タンパク質の発現と比較した。本例はc-kit陽性、CD34陽性(図35A, Bを参照)、胃粘膜下に限局する径20x18x20 mmの腫瘍で、他臓器への転移は無く、核分裂像は高倍率50視野に2個、壊死、出血も認めてない。従って臨床的に良性に準ずる取り扱いで良いと判断されている。D1-120を使用により検出可能なATBF1部位は腫瘍全体いずれの部位でも核に集中する染色性が主体で(図36C1, C2を参照)悪性度は低いと判定できた。さらに詳細な検討のために腫瘍内でのBcl-2タンパク質発現を4種類の抗体を使用したATBF1発現と比較したところ、NT440, 1-12もD1-120同様核主体の発現を示したが(図36A, B, Cを参照)、AT6による染色性は他の抗体による染色性とは異なる部位が見出された。すなわち腫瘍部位によりAT6染色性が明らかな部位とAT6染色性が欠落傾向を示す部

10

20

30

40

50

位がそれぞれ散在性に認められた(図3 5Cを参照)。そのまだらな散在する染色傾向をBcl-2発現と比較すると、その発現は相補的であり(図3 5Dを参照)、AT6の発現を認める部位ではBcl-2の染色性が欠落し、逆にAT6の発現が欠落する部位ではBcl-2の染色性を認めた。次にAT6局在の詳細を細胞レベルで確認した。AT6発現を認める部位では、細胞の細胞質にも染色性が観察されたが、染色性は核主体(図3 6D1を参照)でBcl-2発現はほぼ完全に抑制されていた(図3 6E1を参照)。一方AT6が細胞質に少量局在するか、核細胞質ともに欠落傾向を示す部位(図3 6D2を参照)ではBcl-2発現は全く抑制されず、核周囲での発現を認めた(図3 6E2を参照)。

【0108】

この現象は前述したリンパ濾胞部位と同様に、ATBF1遺伝子エクソン11に対応するAT6部分が核でMyb癌遺伝子タンパク質との相互作用を介し、bcl-2遺伝子を抑制すると考える事で説明できる(非特許文献8を参照)。このAT6部分の局在、染色性の有無のバリエーションはATBF1がD1-120、AT6の中間位置(図3 6F、Gを参照)でプロセッシングされる事を示し、核へ移行できずに細胞質に局在するAT6部分はやがてタンパク分解を受けて消失し同部位の担う機能を失う事が想定された。つまりGISTのごとく、腫瘍内のある部分のみでBcl-2タンパク質が発現しアポトーシスから逃れる機序を獲得している腫瘍において、AT6部位の発現量が多く、核局在が主体であれば、Bcl-2発現が抑制されるため、その腫瘍部分は腫瘍全体の中で悪性度はより低いと判定でき、AT6部位が細胞質に移行あるいは欠落していれば、Bcl-2発現の抑制が解除されるため、その腫瘍部分は腫瘍全体の中で悪性度はより高いと判定できる事を示すと思われる。このように臨床的に良性とする扱いでよいと判定され、さらにD1-120染色で、ATBF1のD1-120部位が核に存在するため腫瘍全体として悪性度は高くないという判定がなされる腫瘍においても、AT6を追加した悪性度の検索結果が、より詳細な判断であることは明らかであり、AT6が細胞質あるいは欠落する部位の多寡を検索する事が、この種の腫瘍の再発、転移の起こりやすさを予知する指標となる可能性を示唆している。

【0109】

10 - 5 . 悪性リンパ腫(大細胞びまん型B細胞)におけるATBF1のプロセッシング位置、さらにAT6部分の発現とBcl-2発現の関連性の検討

56歳の女性、右鎖骨の上部、右腋窩リンパ節の直径3cm大の腫大を認めたリンパ腫。病理学的にびまん性大型の細胞の増殖で(図3 7Aを参照)、Bリンパ球のマーカーを含むLCA、CD20(図3 7Bを参照)、CD79aが陽性であり、腫瘍細胞のほとんど全てにBcl-2タンパク質の発現を認め(図3 7Eを参照)、悪性リンパ腫(大細胞びまん型B細胞)と判断した。この悪性リンパ腫におけるATBF1発現(NT440、1-12、D1-120、AT6)を検討しBcl-2タンパク質の発現と比較した。

【0110】

ATBF1のN末端を認識するNT440、1-12は腫瘍細胞の核主体(図3 8A、Bを参照)、ATBF1の中央部を認識するD1-120、C末端を認識するAT6はいずれも細胞質主体の染色性(図3 8C、Dを参照)を示した。D1-120の染色性が細胞質主体であることはこの腫瘍の悪性度が高い事を意味する。悪性リンパ腫は一般的に悪性度の高い腫瘍として知られ、ほとんど全ての細胞がPCNA陽性(図3 7Dを参照)を発現する事もD1-120での悪性度の判断が的確である事を支持している。AT6の染色性がすべて細胞質に存在する事は、前述したリンパ濾胞辺縁部位、あるいはGISTの腫瘍の一部と同様であり、ATBF1遺伝子エクソン11に対応するAT6部分が核に存在しないため、bcl-2遺伝子を抑制出来ないと考えられる事で説明できる(非特許文献8を参照)。

まとめると、この悪性リンパ腫はD1-120の染色性が細胞質主体であり、さらにAT6の染色も細胞質主体で悪性度は高いと判断できた。また4種類の抗体の染色局在の比較によりATBF1タンパク質がその中間位置でプロセッシングを受けている可能性が指摘できる(図3 8Fを参照)。

【0111】

10 - 6 . 脳の多形膠芽腫におけるGFAP発現とATBF1タンパク質のプロセッシング位置の

関連性、さらにAT6の染色性局在とBcl-2, Bcl-xL発現の関連性の検討

63歳の男性、大脳半球に発生した多形膠芽腫である。この腫瘍におけるATBF1発現 (NT440, 1-12, D1-120, AT6) を検討しGFAP, Bcl-2, Bcl-xLタンパク質の発現、細胞増殖のマーカーであるMIB1発現と比較検討を行った。

Glioblastomaは中高年に好発し、脳腫瘍なのかでも頻度の高い悪性膠腫である。肉眼的にも組織学的にも多彩な像を示すので、glioblastoma multiforme (多形膠芽腫) と称される。組織に腫瘍内には大小の壊死巣が存在し、pseudopalisading necrosis が特徴である。一般にグリア系悪性腫瘍で、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) はグリア系細胞を特定する事を目的に使用される。脳腫瘍取り扱い規約には「免疫組織化学的にGFAPが一部の細胞に発現される。陽性細胞の頻度と形態は極めて多様である」とある。この文章における頻度、形態が多様であると言う事はつまりGFAP発現と腫瘍部位との関係は未だ明確にされていない事を意味すると思われる。

上述のように、ATBF1の核、細胞質移行の機序解明の端緒となったのは Yeast two-hybrid 法でのATBF1とGFAPとの蛋白-蛋白結合の証明であった。結合部位はATBF1-A のほぼ中央部とGFAPタンパク質のC末端である事、さらにはルシフェラーゼ分析でATBF1はGFAPのプロモーター活性を上げる事が明らかになっている。4つの抗体を使用する事によって、理論的に予測されていた分子機構が、実際の多形膠芽腫の臨床検体によって証明することができた。

【0112】

今回、まず発明者らは、充実性の胞巣を形成する腫瘍部位と、壊死巣およびその周辺部位でGFAP発現を比較した。図39A1に示すとき充実性の増殖部位では、ほとんど全ての細胞に強いGFAP発現を認めた(図39A2を参照)。本腫瘍は出血、壊死の頻度が高い事が知られる。図39B1の矢印で囲んだ部位は壊死組織とされる部位であり、増殖が強く、栄養のための血流がおぼつかず(阻血)、壊死や脱落を起こした結果と解釈される。壊死巣及びその近傍でGFAP発現を観察すると、壊死に乏しい充実性の部位に比較して、生存細胞でGFAP発現が微弱であるだけでなく、壊死組織にもGFAPタンパク質は全く検出されなかった(図39B2を参照)。これは壊死を起こした細胞の残骸にもGFAPが染色されないことを意味し、壊死に陥ったのはもともとGFAP発現の無い細胞であった可能性を示唆している。

次に腫瘍内でGFAP発現の有無が明確に区分けできる部位を選択して、両部位におけるATBF1発現(NT440, 1-12, D1-120, AT6), Bcl-2, Bcl-xLタンパク質発現、MIB1発現との比較検討を行った。腫瘍内で観察されるGFAPの発現の有無の差異による染色パターンの模様(図40A)は、D1-120(図40B), AT6(図40C), MIB1(図41A), Bcl-2(図41B), Bcl-xL(図41C)で出来る染色パターンの模様と酷似していた。詳細な観察により、GFAP産生の欠落する部位(図40a1)では、D1-120は核主体(図40b1)、AT6も核主体(図40c1)であり、MIB1 labeling indexは低く(図41a1), Bcl-2(図41b1), Bcl-XL(図41c1)発現は欠落傾向にあった。それとは逆に、GFAP産生をしめす部位(図40a2)では、D1-120は細胞質主体(図40b2)、AT6も細胞質主体(図40c2)であり、MIB1 labeling indexは高く(図41a2), Bcl-2(図41b2), Bcl-xL(図41c2)発現はともに高度となる傾向にあった。

ATBF1発現の中でN末端を検出可能なNT440, 1-12はGFAP産生の有無にかかわらず核主体の発現を示した(図42A, Bを参照)。

【0113】

本腫瘍に対し、ATBF1を使用した悪性度判定法を行うと、腫瘍の内部でGFAPを発現する部位は、D1-120, AT6は核主体に存在し、悪性度が低いと判定され、この部位は化学療法、放射線療法に反応してアポトーシスへの移行が容易と予想される。これに対しGFAPを発現する部位では、D1-120, AT6が細胞質主体に存在し、悪性度が高く化学療法、放射線療法に反応が悪いと予想される。すなわちこの多形膠芽腫は悪性度の高い部位、低い部位の混在する腫瘍であるが故に多形性を示していると考えらる。

実際の多形膠芽腫は手術、化学療法の発達にもかかわらず現在も高悪性の腫瘍とされ、

発見されてから一年以内に80%が死亡し、5年生存率の改善もほとんど期待出来ない状況が続いている。化学療法で一時的に腫瘍の縮小を見てもいずれは残存する治療抵抗性の癌細胞が再増殖して再発、進展し患者を死に至らしめる機構がATBF1染色によって理解できる。

【0114】

10 - 7 . 脳の多形膠芽腫、GFAP発現と腫瘍悪性化仮説

A. ATBF1とGFAPとの蛋白 - 蛋白結合 (細胞質での出来事)。

B. ATBF1の導入によるGFAPプロモーター活性の刺激 (核内での出来事)。

C. GFAPの産生の有無による、ATBF1のD1-120, AT6部位の細胞内局在変化と細胞増殖(MIB1)、アポトーシス抵抗性(Bcl-2, Bcl-x_L)の相関。

10

上記A, B, Cの事実より発明者らは以下のごとく腫瘍発生から、増殖進展の仮説を考え、ATBF1局在とGFAPの関係を考察している。

(1) 膠芽腫発生の初期、腫瘍の増殖が始まる。当然腫瘍血管も増生するが、阻血を起こし腫瘍細胞にDNAダメージが加わるとATBF1が核に出現する (NT440, 1-12, D1-120, AT6いずれの部位も核主体)。これは細胞周期を止め、アポトーシスへの移行を促進する。同時にATBF1の核での発現はGFAPプロモーターの活性化を引き起こす。この段階でGFAPを発現する前にアポトーシスへ導かれる細胞群も多い (壊死部の散在。壊死部近傍にGFAP陽性細胞が少ない理由)。

(2) 膠芽腫はやがて、GFAPを細胞質内に持つようになる。ATBF1の中央部はGFAPのC末端と蛋白 - 蛋白結合をする性質を有するため、タンパク質産生が細胞質で起こった後に核にATBF1が移行しようとしても細胞質でトラップされるため、ATBF1のN末端側のみが核に移行するも(NT440, 1-12は核に染色性がある)、中央からC末端側は細胞質に残ってしまう(D1-120, AT6いずれも細胞質に染色性)。D1-120, AT6が細胞質に存在する細胞は悪性度判定法が示すごとく悪性度が高く、化学療法によりアポトーシスに陥りにくい。これはGFAP陽性となった細胞群がMIB 1 labeling indexが高く、Bcl-2, Bcl-x_Lを発現してくる事からも明らかである。(図42B, Cを参照)。

20

(3) 上記(1)、(2)の過程が腫瘍の各部で起こるため小型の膠芽腫はやがてGFAP産生部位が散在し、出血、壊死の混在する多形性を有するようになる(多形膠芽腫)。

(4) さらにここに化学療法などで、ATBF1全体が核に存在しGFAP発現の無い細胞部分をアポトーシスに移行させると、最初は腫瘍の縮小を認めるが、やがてGFAP産生を認めアポトーシスに抵抗性を持つ細胞群が主体の腫瘍に変化する。

30

【0115】

以上、ATBF1を使用した悪性度判定では、悪性度の高い部位、低い部位の混在する腫瘍であるにもかかわらず実際は非常に悪性度が高く、予後の悪い腫瘍である事実に対する発明者らの解釈のまとめを以下に示す。

(1) 多形膠芽腫は特に悪性度が高く、予後の悪い腫瘍である。従来の病理診断からはその分子生物学的メカニズムは不明であったが経験的に、GFAP産生能が一つの悪性度の指標となっていた。

(2) 多形膠芽腫はATBF1の核での発現が原因でGFAP産生が活性化される。ATBF1, C末端側半分がATBF1-GFAPの蛋白 - 蛋白結合で細胞質内に安定化されることから、ATBF1の核移行が阻止されて悪性度が増すと想定される。

40

(3) 多形膠芽腫で、GFAPにATBF1がトラップされるのを予防する工夫を行えば、ATBF1が核移行を果たして放射線治療、化学療法が有効になる事が予想される。今後、新たな治療法が生まれる可能性がある。

【0116】

以上、ATBF1タンパク質の各部に対する抗体の同時使用は癌細胞の悪性度判定に加え、腫瘍に特徴的なタンパク質プロセッシングの異常や遺伝子構造変化を推定する事にも役に立つと判断された。

【0117】

10 - 8 . 高度悪性腫瘍、食道神経内分泌癌におけるATBF1蛋白の局在変化と腫瘍形態の

50

関連性の検討

52歳男性。食道の高度悪性とされる神経内分泌癌である。この腫瘍におけるATBF1発現(NT440, 1-12, D1-120, AT6)を検討し、腫瘍の形態学的特徴との比較検討を行った。食道悪性腫瘍の大部分は扁平上皮癌であり、未分化癌は稀である。中でも神経内分泌癌は悪性度が高く予後不良とされる。本例は食道原発の神経内分泌癌で、術後2ヶ月、肝転移を来し死亡した。腫瘍は門歯列より約30cmに存在した4.0×2.8×1.7 cm大、表在隆起型腫瘍であった(図4 3 Aを参照)。術後の病理検索で、腫瘍細胞はNSE, S-100蛋白が大部分陽性, chromograninA, CD56 (NCAM) (図4 3 Bを参照), Synaptophysinも陽性であることより神経内分泌癌と診断した。またリンパ管への侵襲も認めた(図4 3 Cを参照)。腫瘍はAE1/AE3, CAM5.2陽性で明らかに上皮性の性格を有する部位と、Vimentin陽性で肉腫様の部位が混在し多様な分化方向を持つ腫瘍であると判断された。

10

【0118】

腫瘍組織を詳細に観察すると、組織学的に細胞が規則正しく一列につながるような索状配列、リボン状配列を認める上皮様で高分化な部位(図4 3 D黒矢印を参照)と、密で巣状、低分化な配列を示す肉腫様な部位(図4 3 D白矢印を参照)が明らかに区別出来るだけでなく、ATBF1の染色性が異なる事が確認された。

索状、リボン状で高分化な配列を示す部位は、NT440, 1-12, D1-120, AT6いずれも核主体の染色性を認めた(図4 4 A1-E1, Fを参照)。それに対し、巣状、低分化な配列を示す部位では、NT440, 1-12が核主体、D1-120, AT6は細胞質主体の染色性を認めた(図4 4 A2-E2, Gを参照)。ATBF1による悪性度判定を行うと、高分化な部位はD1-120, AT6ともに核主体で悪性度は低く、低分化な部位はD1-120, AT6とも細胞質で悪性度が高いと判定できた。

20

【0119】

一般的に腫瘍病理学的には、腫瘍内で形態的に高分化な部位は腫瘍の発育が遅いと考えられ、腫瘍の悪性度が上がるにつれて発育が早くなり、低分化な密な部位主体に腫瘍の形態が変化し、やがて高度の進展や遠隔転移を示すようになると考えられている。今回、ATBF1を使用した悪性度判定では、より高分化な部位は悪性度は低いが、低分化な部位は悪性度が高く、それらの部位が混在する腫瘍と判断できた。これは旧来からの病理学的な観察結果を、ATBF1使用により実証していると解釈出来る。つまりATBF1のD1-120, AT6部位が核に局在出来る場合、腫瘍の発育が遅くアポトーシスへの移行もあるため、腫瘍の構築が高分化になる。ATBF1の中央部で蛋白プロセッシングが起きて、D1-120, AT6部位が細胞質に局在する場合、腫瘍の発育が早くなるため、腫瘍の構築が低分化となるという理解である(図4 4 F, Gを参照)。本症例のリンパ管内の腫瘍構築が低分化であった(図4 3 Cを参照)ことから考えて、今回は検索し得なかったが、肝転移の部位の腫瘍構築も低分化主体であった可能性がある。

30

以上ATBF1蛋白の各部に対する抗体の同時利用は、癌細胞の悪性度判定に加え、腫瘍に特徴的な蛋白プロセッシングの異常や、形態学的な特徴との関連さらに腫瘍進展様式の意味を推定する事にも役に立つと判断された。

【0120】

10-9. 副鼻腔の未分化癌および脳の大細胞びまん型B細胞リンパ腫におけるエクソン10の異常スキッピングによるATBF1変異蛋白産生、ATBF1蛋白の局在の関連性の検討

40

第1の例は56歳、男性、副鼻腔の未分化癌でリンパ節転移の部位である。MIB1でほとんどの腫瘍細胞がラベルされ(図4 5 Aを参照)、非常に高度のBcl-2蛋白の発現を認める高悪性度腫瘍である。第2の例は47歳女性、脳に発生した大細胞びまん型B細胞リンパ腫の部位である。脳血管周囲にびまん性の発育を示し(図4 6 Aを参照)、CD20, CD79aが陽性(図4 6 B, Cを参照)でB細胞性の悪性リンパ腫と判断でき、Bcl-2蛋白の発現が強い(図4 6 Dを参照)高悪性度の腫瘍である。この2症例においてATBF1(NT440, 1-12, D1-120, AT6)の染色性を検討した。

2例ともにNT440, 1-12の染色性は核に局限する傾向があり(図4 5 C, D, G, 1 6 E, F, Iを参照)、D1-120はほぼ完全に欠落していた(図4 5 E, G, 1 6 G, Iを参照)。またA

50

T6は細胞質主体の発現を認めた(図4 5 F, G, 1 6 H, Iを参照)。

【0 1 2 1】

ATBF1を使用し癌の悪性度を判定すれば、D1-120は欠落し、AT6は細胞質主体に局在し、悪性度は非常に高いと判断できる。

【0 1 2 2】

この所見から蛋白の構造あるいは、プロセッシングの部位を考えると、エクソン3に対応する部位が核、エクソン10に対応する部位が欠落、エクソン11に対応する部位が細胞質となりエクソン10の両側でプロセッシングが起こり、しかもエクソン10に対応する部位だけが消失しないと説明が難しいと思われた。しかしながら今回の非特許文献10において、前立腺癌で見出されたATBF1ゲノムに蓄積する各種の変異、mRNA段階でのAlternative splicing異常の可能性を詳細に検討していくと、ホメオドメイン1から4を含むエクソン10がスキップされたATBF1蛋白の存在の可能性を指摘出来る(図4 7を参照)。これはつまり、発明者らがすでに示した種々の腫瘍におけるD1-120部位(エクソン10に対応、図3 1を参照)の染色性の欠落は、この2例のごとく、腫瘍の悪性度の高さを指摘出来る事だけに止まらずに、エクソン10がスキップされた異常蛋白の存在を指摘出来ている可能性がある。

このようにエクソン3, 10, 11に対応する抗体を使用したATBF1部分の細胞内の発現、核、細胞質の局在を検索することは、対応するATBF1ゲノム領域が担うタンパク質を機能的に評価する意味として重要であり腫瘍の悪性度を決定する分子メカニズムとして、予想されるmRNAのAlternative splicingやゲノムDNA構造の異常をタンパク質レベルで容易に検出することが可能になると思われた。

【0 1 2 3】

10 - 10 . 大細胞びまん型Bリンパ腫の同一腫瘍内における、ATBF1蛋白の局在変化と悪性度の関連性の検討

68歳女性、脳に発生した大細胞びまん型Bリンパ腫である。CD20, CD79a陽性でびまん性の発育を示す悪性リンパ腫で、Bcl-2蛋白は大部分で欠落(図4 8の絵Aの部位)していたが、腫瘍の周囲に(図4 8の絵Bの部位)少量の発現を認めた。どちらの部位もMIB1ラベル、PCNA発現は高度であり、ともに高度悪性であることに変わりはないが、Bcl-2発現欠落部位は悪性度がやや低いと判断された。

このA, Bの部位でのATBF1 (NT440, 1-12, D1-120, AT6)の染色性を比較検討した。腫瘍の周辺の部位はNT440, 1-12は核に局在(図4 8のB1, B2, 図4 9 Bを参照)、D1-120, AT6は細胞質主体の局在(図4 8のB3, B4, 図4 9 Bを参照)を示した。D1-120が細胞質に存在することはこの腫瘍の悪性度が高い事を意味し、AT6が細胞質主体であり、Bcl-2発現がある事に矛盾は無い。それに比較して、腫瘍の中心部位ではNT440, 1-12, D1-120は欠落し(図4 8 A1, A2, A3, 図4 9 Aを参照)、AT6は核主体に局在した(図4 8 A4、図4 9 Aを参照)。D1-120が欠落する事はこの腫瘍の悪性度が高い事を意味し、AT6が細胞質主体であり、Bcl-2発現が抑制されている事に矛盾はない。しかしながらエクソン3および10に対応する部位が欠落して、エクソン11に対応する部位のみが核に局在するという染色性は発明者らが全く経験してない新たなパターンであった。

【0 1 2 4】

本例の検索結果は、一見全く組織学的に同じように見える同一の腫瘍内でも部位によってATBF1のプロセッシング状況や、発現の局在が変化しながら悪性度が増していく可能性を意味している。また今回提示してきた各種の大細胞びまん型Bリンパ腫はATBF1の局在部位は種々、異なっており、すでに確立された腫瘍概念内での新たな悪性度分類にATBF1が寄与する可能性を示していると思われる。

また今回のエクソン11に対応する部位のみが核に局在するパターンは、エクソン11部位には核内移行シグナルがそれ自身の配列の中には検出されていないが、Mybタンパク質など他の核移行シグナルを有する因子との蛋白相互作用領域を保存しているために、何らかの核移行タンパク質と結合して核移行を果たしている可能性が考えられる。

【0 1 2 5】

10 - 11 . まとめ

すでに既報（非特許文献6）で示したごとく、胃癌の培養細胞において、ATBF1は癌抑制遺伝子p53と蛋白-蛋白結合して機能する。このATBF1とp53複合体が癌抑制遺伝子p21のプロモーターを活性化して、p21の発現上昇を導き、細胞周期を止めるとともに、癌細胞をアポトーシスに陥らせることが想定された。実際にアルキル化剤（抗ガン剤）を作用させてDNA修飾シグナルを活性化するとATBF1の発現を誘導できる事実も明らかになっている[細胞周期調節に関するp53タンパク質の関与する経路]。

細胞周期停止、アポトーシスへの移行に関し、ATBF1は癌遺伝子タンパク質c-mybと蛋白-蛋白結合を行い、その機能を抑制することが知られている（非特許文献8を参照）。またMybタンパク質ファミリーはBcl-2を導入し、細胞のアポトーシスを抑制する機能があると考えられている（Grassilli,

E. et al. Resistance to Apoptosis in CTLL-2 Cells Overexpressing B-Myb Is Associated with B-Myb-dependent bcl-2 Induction, CANCER RESEARCH 59, 2451-2456, 1999を参照）。従ってそのMybタンパク質ファミリーの抑制はすなわち細胞周期停止、アポトーシスの誘導につながると想定される。[細胞周期調節に関するRB（retinoblastoma）タンパク質の関与する経路]。実際に後述の実施例で示すが、正常組織、腫瘍において、ATBF1遺伝子のエクソン11に相当するATBF1部分(AT6で検出)が核に存在する部位ではBcl-2の発現が抑制され、同部位が細胞質に移行する部位でBcl-2の発現が活性化される例が存在している。抗ATBF1抗体(AT6)は、癌遺伝子c-mybと蛋白-蛋白結合するATBF1のエクソン11を等位的に認識する（非特許文献8を参照）。今回の組織学的検索の結果は、ATBF1タンパク質が核に移動することでMyb癌遺伝子タンパク質との相互作用することが可能となり、bcl-2遺伝子の抑制に関与している可能性を示唆している。

以上の2つの細胞周期抑制経路に関する既報研究、および発明者らが行った検索により、癌細胞での細胞周期の停止、アポトーシスへの移行はATBF1発現総量のみならず、その機能断片の細胞内局在に強く依存している事実が明らかとなった。これがATBF1に対する複数の抗体（D1-120のみでなく、NT440, 1-12, AT6を含む）を使用することによる「癌細胞の悪性度判定法」の理論的な基礎となっている。

さらに非特許文献9では、前立腺癌においてATBF1をコードする遺伝子に各種の変異が存在することが明らかとなり、ATBF1の機能障害が前立腺癌の原因の一つである事実が報告された。前立腺癌以外の様々な癌細胞において16番の染色体異常は数多く報告されていたが、それぞれの癌化に関与する責任遺伝子は特定されてなかった。非特許文献9は16番の長腕に存在するATBF1が腫瘍抑制遺伝子（癌抑制遺伝子）の一つとして腫瘍の悪性度を決定する重要な役割を演じていることを明確にするものである。

【実施例11】

【0126】

<癌細胞の悪性度判定用キットの構築>

以下の試薬を組み合わせキットとした。

A試薬：抗ATBF1抗体原液（D1-120）

B試薬：ATBF1抗原液

C試薬：GST抗原液

A試薬は、実施例2で調製した抗ATBF1抗体を250µg/mlに調整して得られる。B試薬は、D1-120抗体作製時に調整したマウスATBF1の41アミノ酸残基（2114~2154：LQTLPAQLPPQLG PVEPLPADLAQLYQHQLNPTLLQQQNK R：配列番号1）をGSTに融合した組み換えペプチドを2mg/mlに調整して得られる。C試薬は、GST（例えばSigma社製）を2mg/mlに調整して得られる。

【0127】

以下、キットの使用法の一例（DAB発色による免疫組織学的染色）を示す。

(1)外科的或いは剖検時に切除した被検組織を、通常の病理検査と同様の手順で、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋する。ラット、マウスなどを使用した動物実験の検体はホルマリンの代わりにパラフォルムアルデヒド固定を使用してもよい。ATBF1の染色性に関してホルマリンとパラフォルムアルデヒド固定では特に差はない。採取後すぐにホルマリ

10

20

30

40

50

ン固定した外科病理組織材料を使用することが基本となる。

(2)パラフィン包埋後の組織を切削、薄切してスライドガラスに載せる。スライドガラスとしては例えばSuperfrost、MASコート付き、S-9441(商品名、マツナミ製)を使用する。当該スライドガラスは圧力釜による熱処理に対する耐久性に優れている。

(3)通常の病理標本作製に使用される、通常の脱パラフィン系列で切片を処理し、最終的にアルコールから精製水に置換する。

(4)(3)の間に圧力釜(一般的な調理に使用されるものを使用できる)にクエン酸緩衝液を2リットル入れ、強火で沸騰させる。市販のクエン酸緩衝液(例えば、三菱化学ヤトロン製、インスタントクエン酸緩衝液[20倍濃縮液RM-102C], pH6.0)を使用することができる。原則、一回熱処理を行った緩衝液は再使用しない。

(5)切片を金属製の標本かごに入れ、圧力釜の蓋をとり、緩衝液中に横向きで、切片の載っている面が上に向くように置く。

(6)蓋をした後、蒸気音が出始めるまで強火で加熱し、その後は弱火にして4分間加熱を続ける。加熱を停止し、1分間放置する。

(7)流水(水道水)で釜全体を冷却する。約40分後に圧力釜の蓋を取り、標本かごを釜から出して精製水に置換する。続いて内因性ペルオキシダーゼをブロックするために、過酸化水素水で処理を行う。次に精製水に置換し、過酸化水素水を除去した後、20mMトリス緩衝液になじませる。その後、0.05Mトリス緩衝液pH7.6に置換する。

(8)アジ化ナトリウム含有ウシ血清アルブミン1%溶液を添加した0.05Mトリス緩衝液pH7.6を用意し、これでA試薬を50倍希釈する(抗体溶液)。切片に抗体溶液を添加し、加湿条件下(モイストチャンパー内)、室温で1時間反応させる(一次抗体反応)。通常の検体には1回の反応に約40 μ l、比較的大きな検体には約80 μ lの抗体溶液を使用する。ピペットの先をプレパラート手前であて、切片に触れないように注意しながら抗体溶液を切片によくなじませる。

(9)0.05Mトリス緩衝液pH7.6を用いて切片を洗浄する(5分間、合計2回)。洗浄処理後、余分な洗浄液を拭き取る。

(10)HRP標識2次抗体(DAKO Enivision, Labelled polymer, HRP(Code No. K1491)Anti-mouse and Anti-rabbit)を切片に添加し、室温で1時間反応させる(二次抗体反応)。

(11)(9)と同様の洗浄を行う。

(12)DAB Chromogen (DAKO, Code. S3000)を2錠、40mlの0.05Mトリス緩衝液pH7.6に溶解する。これに過酸化水素水を30 μ l加えた後、切片に浸透させ(5分間)、発色させる。

(13)流水(水道水)でDAB液を洗浄、除去する。

(14)マイヤーヘマトキシリンで切片を15秒程度染色する。

(15)切片を流水中に8分間静置する(色出し洗浄)。

(16)通常の病理標本作製と同様にアルコール系列及びキシレン系列を通し、透徹、封入を行う。

(17)以上の結果得られた標本を用いて顕微鏡観察を行う。

【0128】

<ATBF1特異的染色であることの確認1>

DABによる発色(茶褐色)がATBF1特異的な免疫染色の結果であることを確認するためには以下の操作を行う。

(1)A試薬(ATBF1抗体原液)10 μ l、B試薬(ATBF1抗原)1 μ l、PBS 10 μ l、及び5% BSA 4 μ lをマイクロチューブ内で混合する。

(2)チューブ全体(全量25 μ l)を、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させる。

(3)反応終了後、抗体希釈時に使用する緩衝液(アジ化ナトリウム含有ウシ血清アルブミン1%溶液を添加した0.05Mトリス緩衝液pH7.6)を25 μ l添加する。このようにして得られた溶液全量50 μ lを1次抗体反応用の試薬として使用し、上記の方法で免疫組織化学染色を行う。その結果DABによる染色が認められなければ、ATBF1特異的な免疫染色が行われていることを確認できる。

【 0 1 2 9 】

< ATBF1特異的染色であることの確認 2 >

GST融合抗原を使用して調製したため、抗ATBF1抗体（A試薬）にはGSTに対する反応性が混在している可能性がある。DABによる発色が抗ATBF1抗体のGSTに対する反応性の結果でないことを確認するためには以下の操作を行う。

(1)A試薬（ATBF1抗体原液）10 μ l、C試薬（GST）1 μ l、PBS 10 μ l、及び5% BSA 4 μ lをマイクロチューブ内で混合する。

(2)チューブ全体（25 μ l）を、37℃で2時間反応させる。

(3)反応終了後、抗体希釈時に使用する緩衝液（アジ化ナトリウム含有ウシ血清アルブミン1%溶液を添加した0.05Mトリス緩衝液pH7.6）を25 μ l添加する。このようにして得られた溶液全量50 μ lを1次抗体反応用の試薬として使用し、上記の方法で免疫組織化学染色を行う。その結果DABによる染色が認められれば、ATBF1特異的な免疫染色が行われていることを確認できる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 3 0 】

本発明は様々な癌（肉腫を含む）の特性（悪性度、予後、各種治療への反応性など）を予測することに利用され得る。本発明を利用すれば、転移や再発を起こす可能性が高いにも拘わらずこれまでの判断手法によっては一般に良性腫瘍と捉えられているものに対しても、例えば中間悪性などとして指摘することも可能になると考えられる。また逆に、腫瘍の悪性度や治療効果の予測がたてられなかったために、結果として不必要で過剰な治療を選択せざるを得なかった症例に対して、より患者ADL(Activity of Daily Living、日常生活動作)やQOL(Quality Of Life、人生の質)の向上に焦点をあてた治療を可能にすると思われる。今後、神経芽細胞腫の悪性度判断に対する本発明の価値は特に重要となる可能性がある。幼児患者の生命予後、治療方針の迅速な決定を下すために重要な指標を提供する手段として、本発明が世界標準の病理診断基準となる可能性すら予想される。

【 0 1 3 1 】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

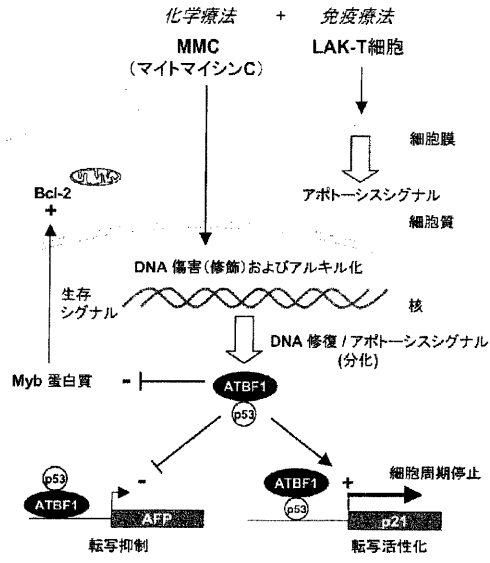
本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

10

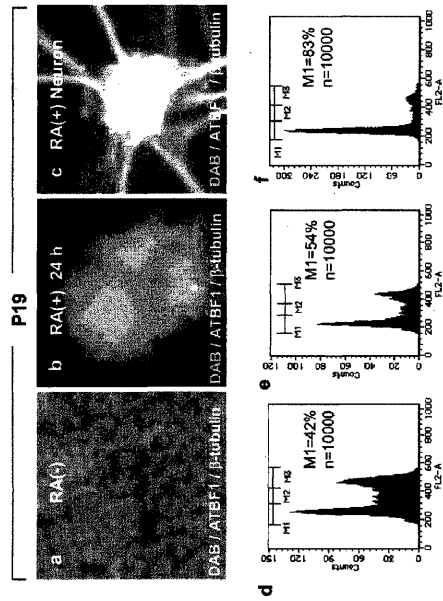
20

30

【 図 1 】



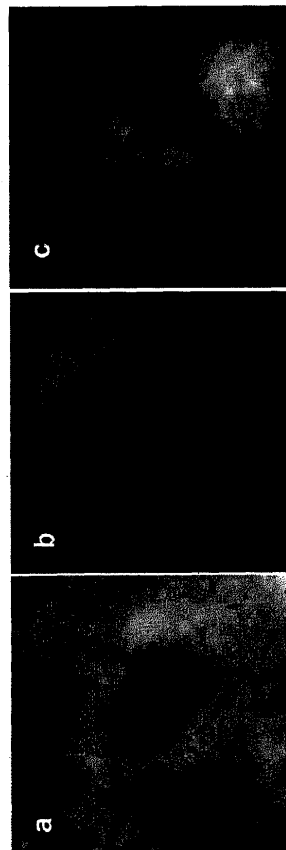
【 図 2 】



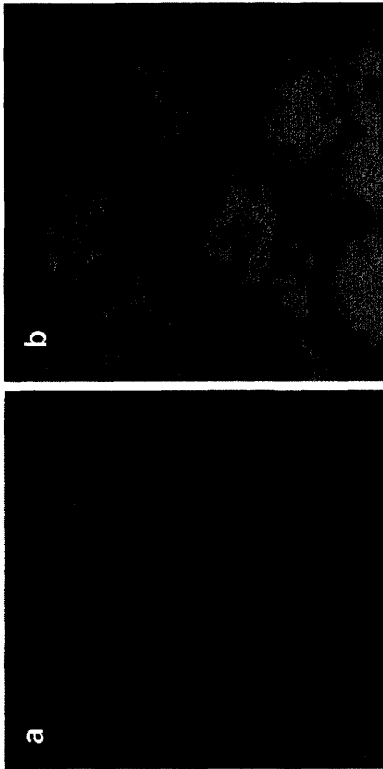
【 図 3 】

- a
- ATBF1における潜在的な核内保留シグナル
共通配列 "KR-----K"
ATBF1 277 KRKPILMCFLC-K
ATBF1 2987 KRVVQVWFQARAKEKSK
- b
- ATBF1における潜在的な核外輸送シグナル
共通配列 "L-L-L-L"
ATBF1 1267 LQL-HLTHL
ATBF1 2471 LPQLVSLPSL
ATBF1 2504 LSHL-PLKPL

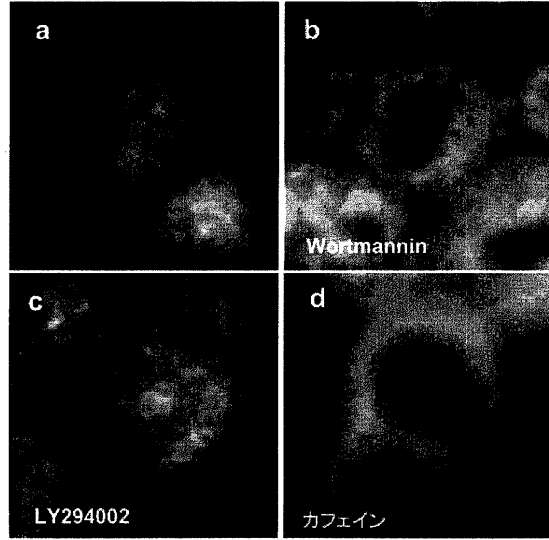
【 図 4 】



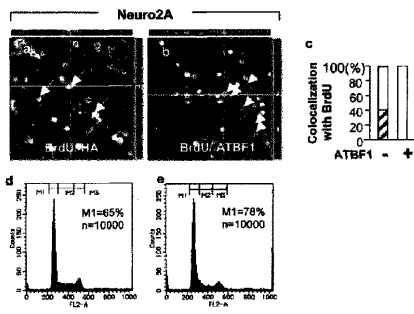
【 図 5 】



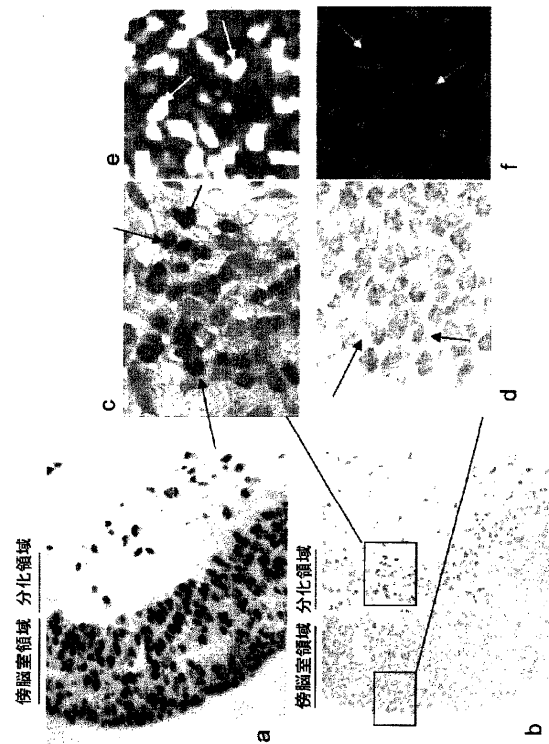
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

オートクレーブ処理

●核主体 ○細胞質主体

	非浸潤癌	浸潤癌
DAKO TRS	●	●
DAKO TRS High pH	●	●
クエン酸バッファー	●	●
NaOH加クエン酸バッファー	●	●
TEバッファー	●	●
トリス塩酸バッファー	●	●
トリス/EDTA/Tween20	●	●
EDTA溶液	●	●
Urea溶液	—	—

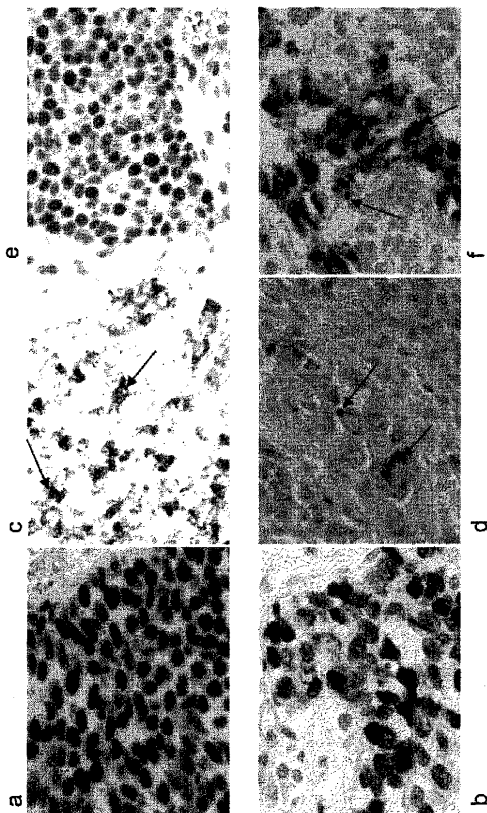
【 図 1 0 】

電子レンジ処理

●核主体 ○細胞質主体

	非浸潤癌	浸潤癌
DAKO TRS	○	○
DAKO TRS High pH	○	●
クエン酸バッファー	○	○
NaOH加クエン酸バッファー	○	○
TEバッファー	○	○
トリス塩酸バッファー	○	○
トリス/EDTA/Tween20	○	○
EDTA溶液	●	○
Urea溶液	●	●

【 図 1 2 】



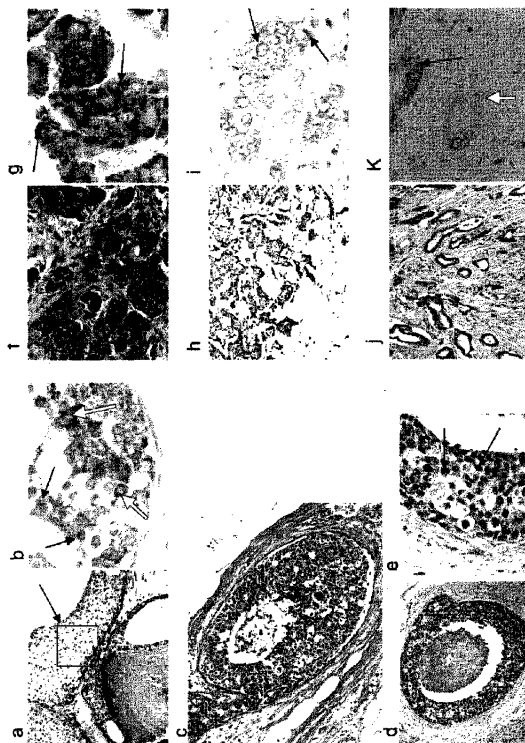
【 図 1 1 】

圧力釜処理

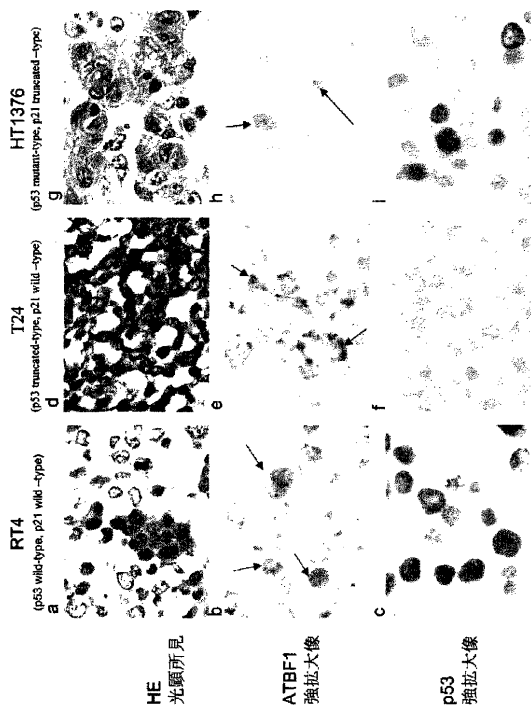
●核主体 ○細胞質主体

	非浸潤癌	浸潤癌
DAKO TRS	●	○
DAKO TRS High pH	●	●
クエン酸バッファー	●	○
NaOH加クエン酸バッファー	●	○
TEバッファー	●	○
トリス塩酸バッファー	●	○
トリス/EDTA/Tween20	●	○
EDTA溶液	●	●
Urea溶液	●	○

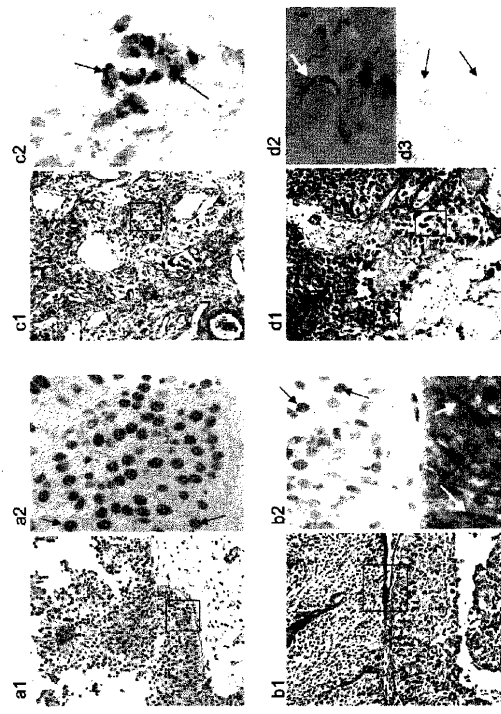
【 図 1 3 】



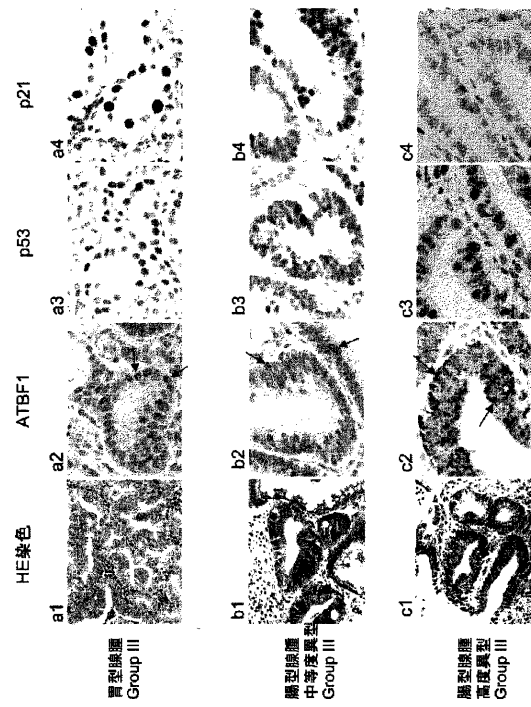
【 図 1 4 】



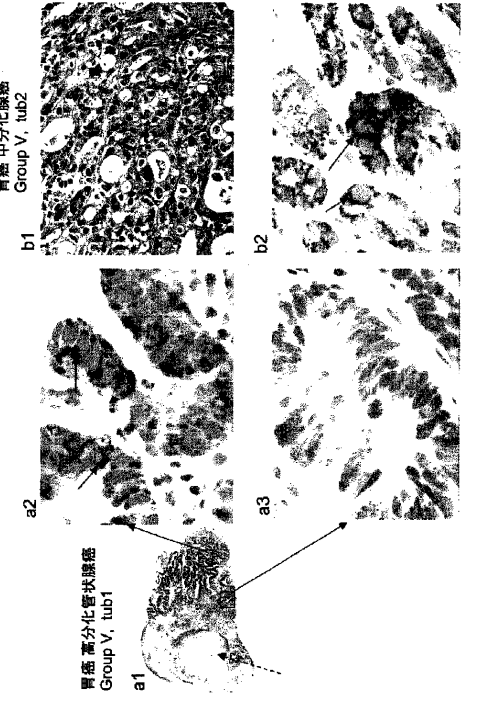
【 図 1 5 】



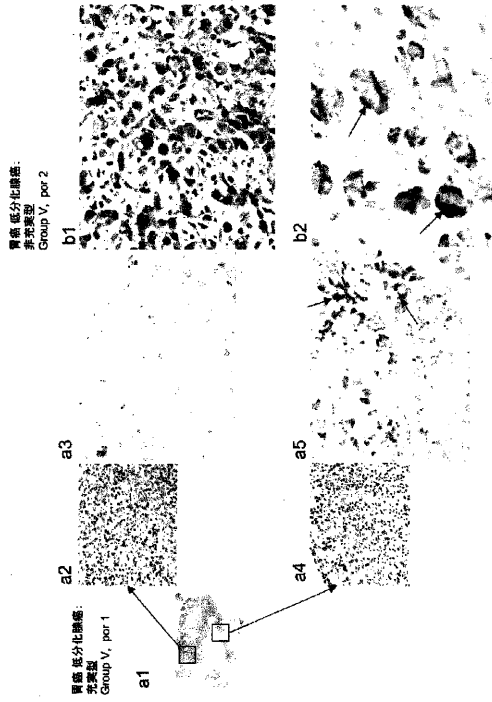
【 図 1 6 】



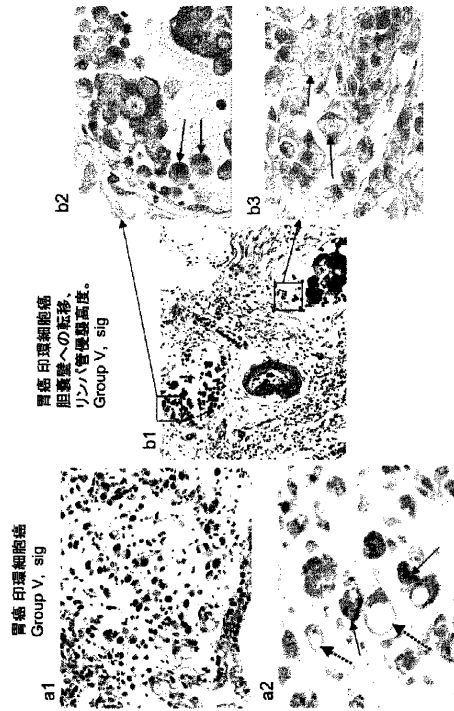
【 図 1 7 】



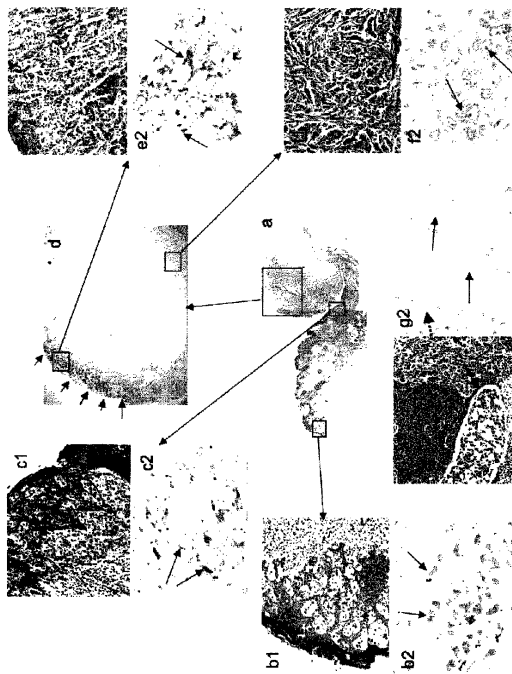
【 図 18 】



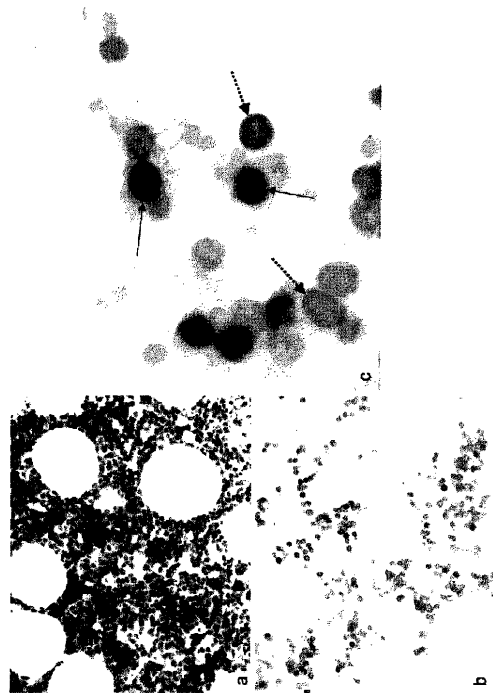
【 図 19 】



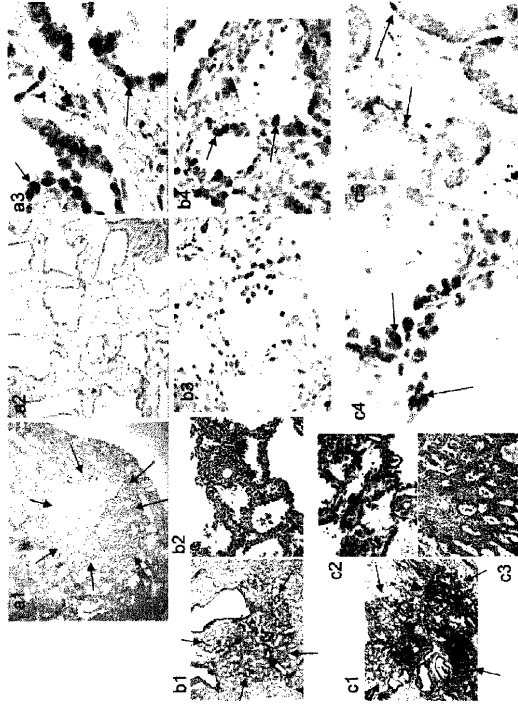
【 図 20 】



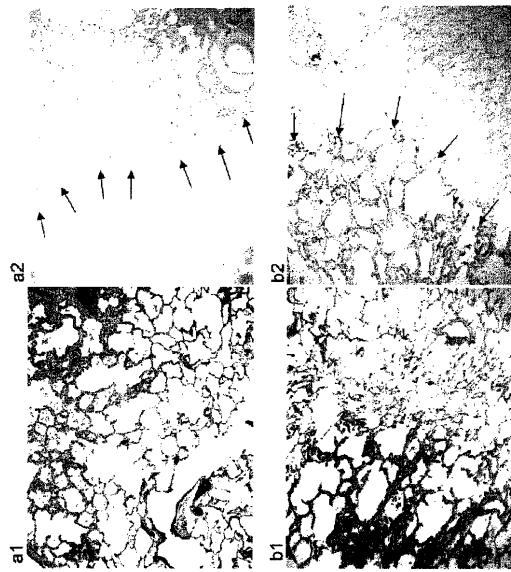
【 図 21 】



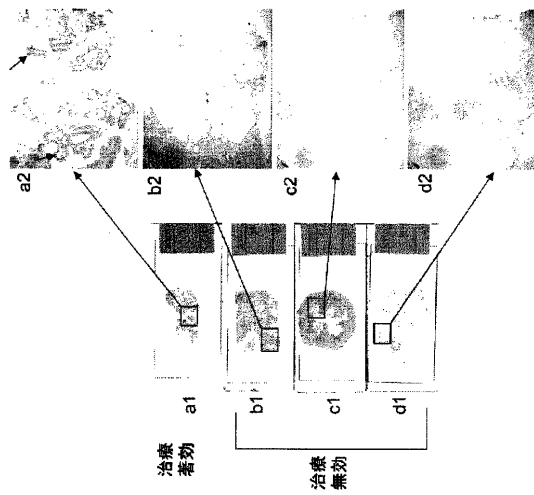
【 図 2 2 】



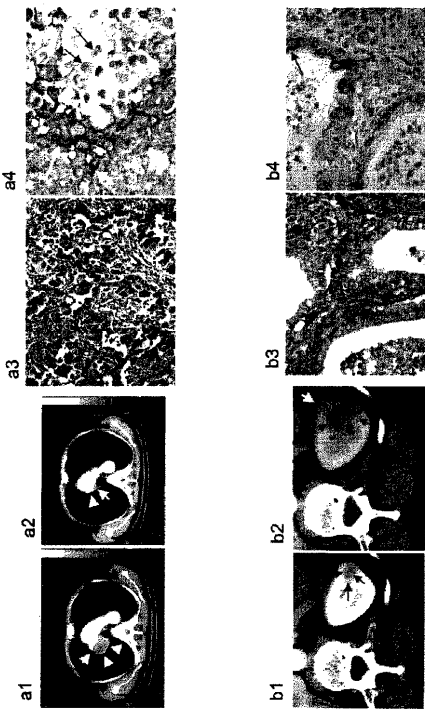
【 図 2 3 】



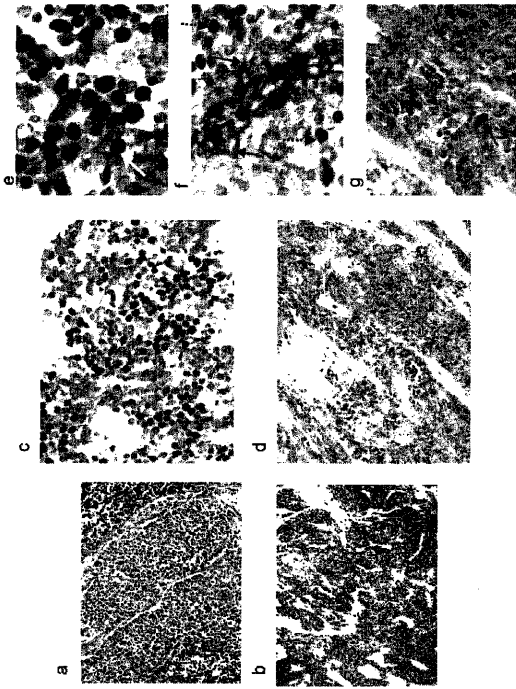
【 図 2 4 】



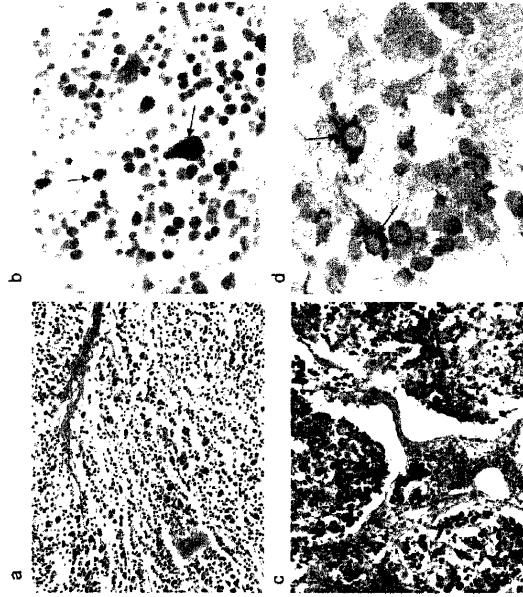
【 図 2 5 】



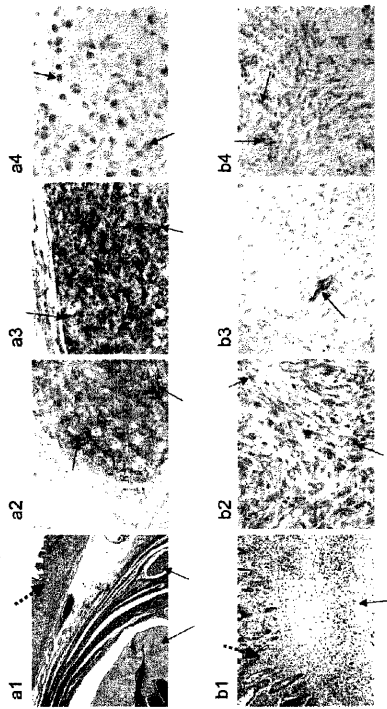
【 26 】



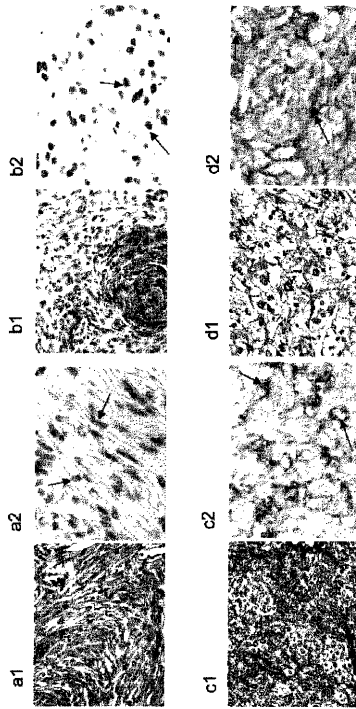
【 27 】



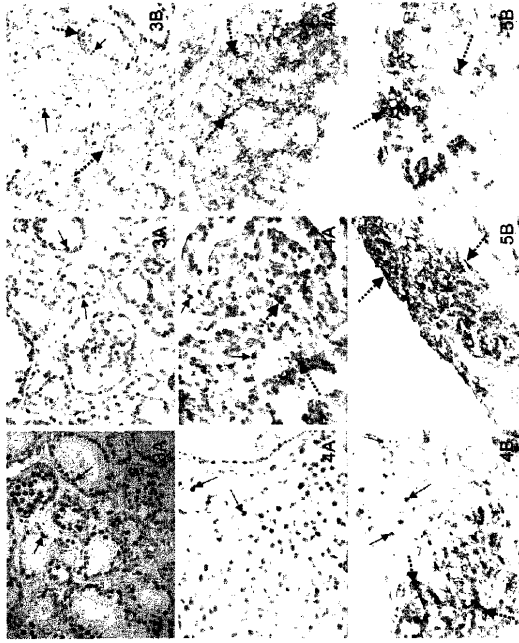
【 28 】



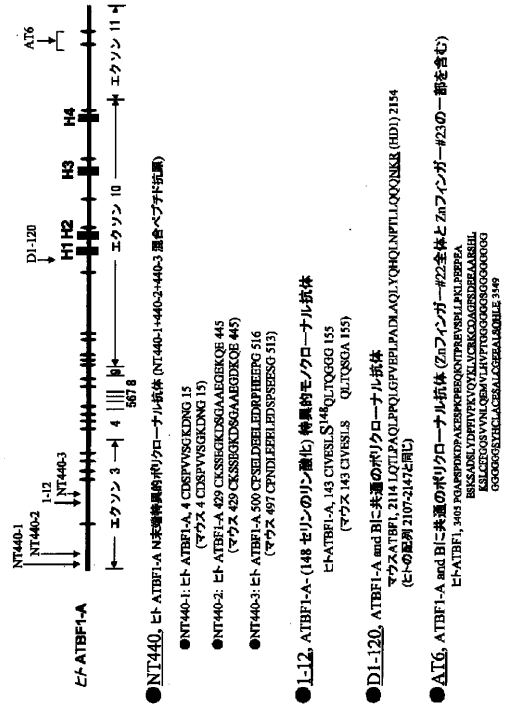
【 29 】



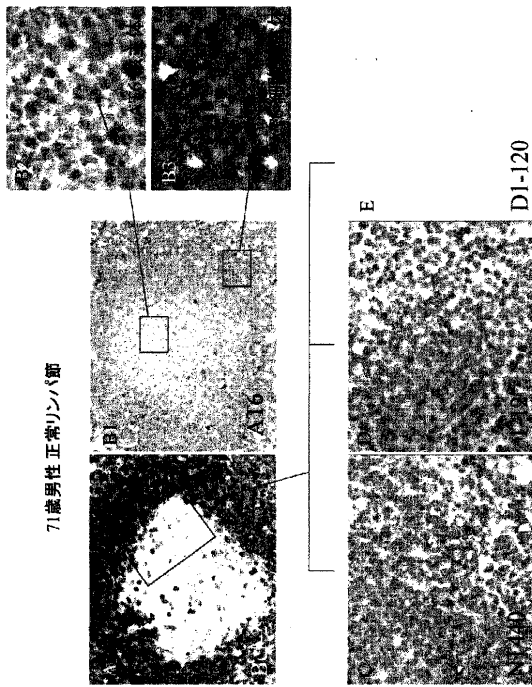
【図30】



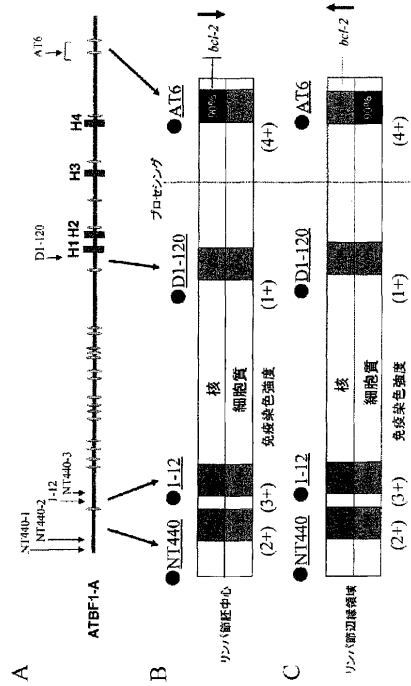
【図31】



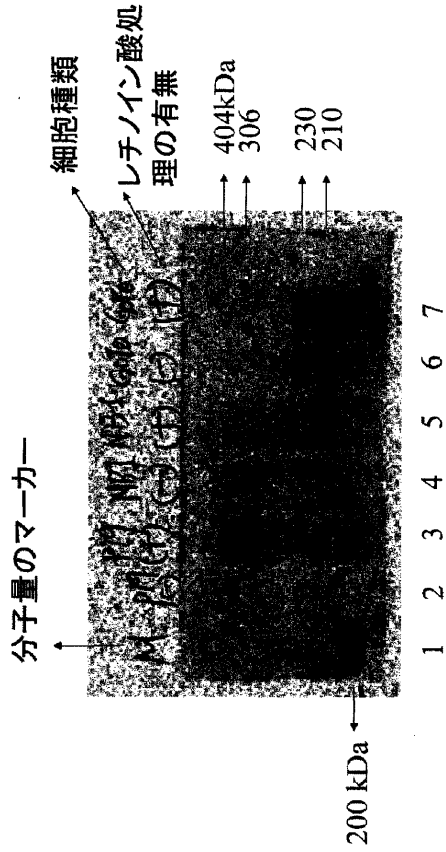
【図32】



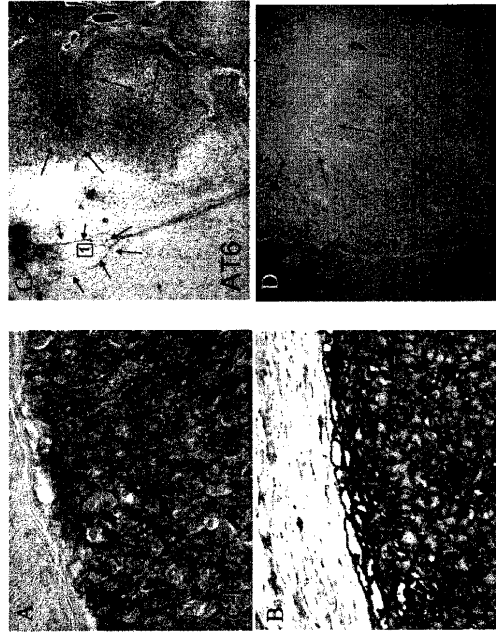
【図33】



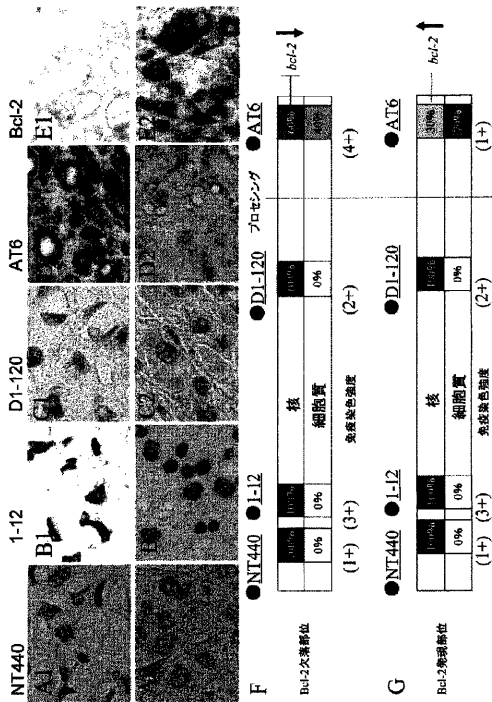
【 図 3 4 】



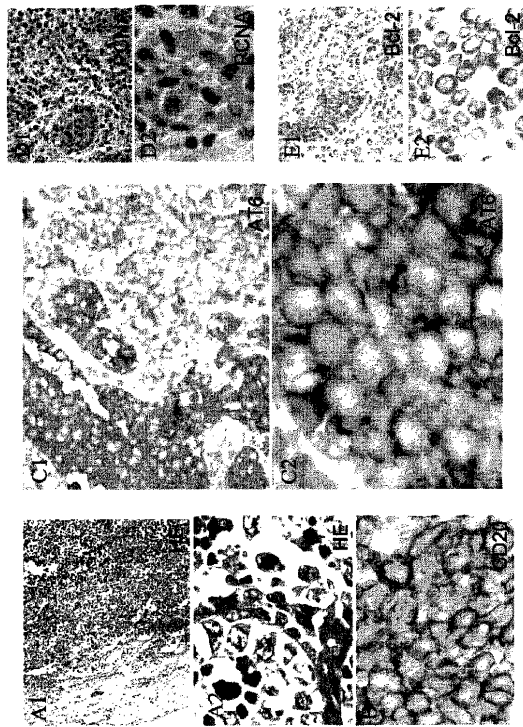
【 図 3 5 】



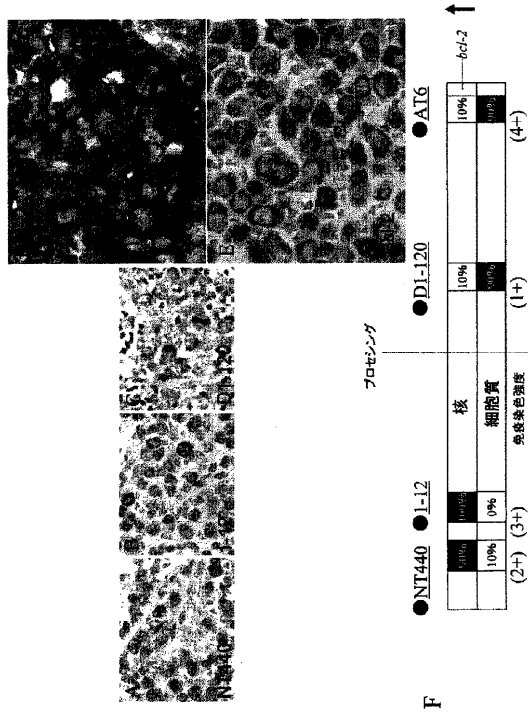
【 図 3 6 】



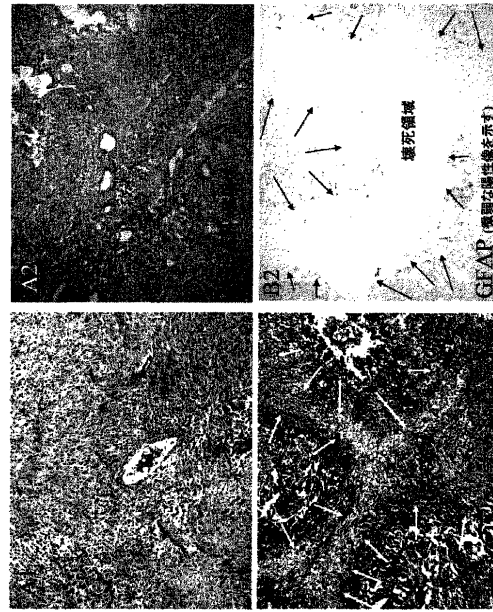
【 図 3 7 】



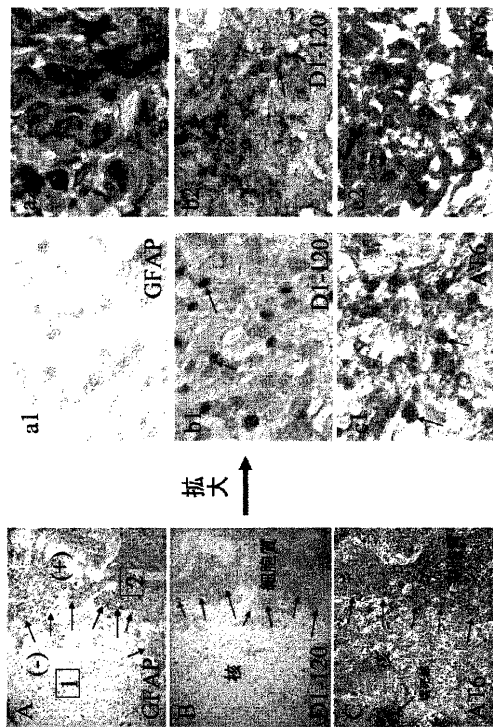
【 図 3 8 】



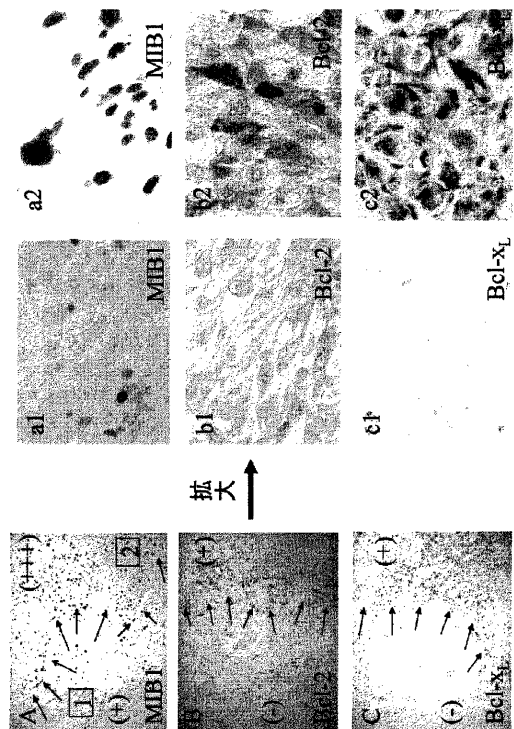
【 図 3 9 】



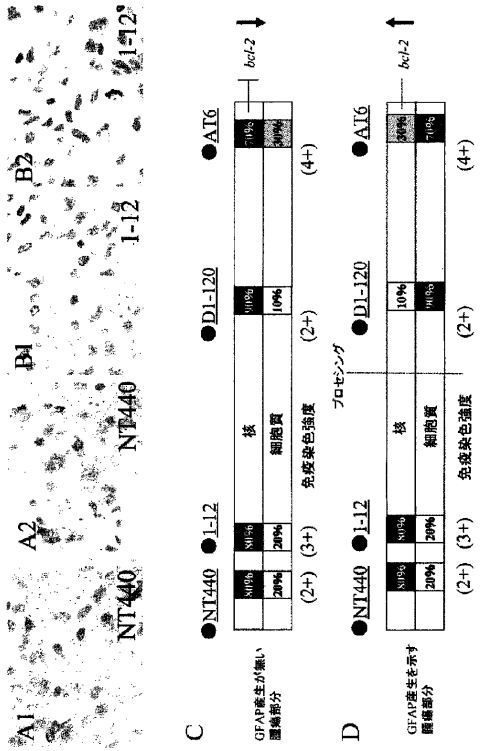
【 図 4 0 】



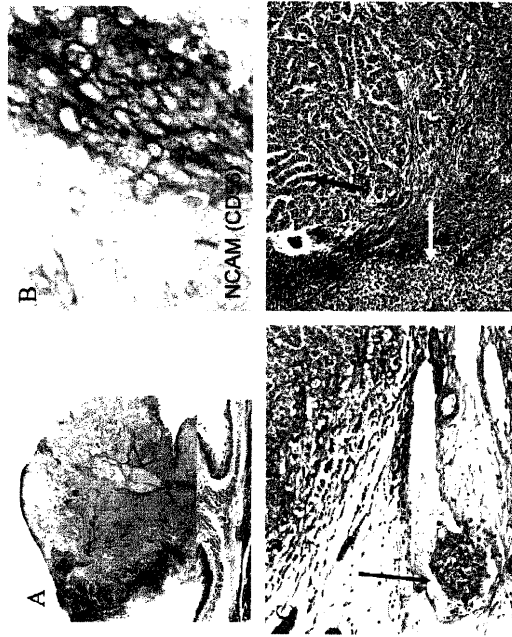
【 図 4 1 】



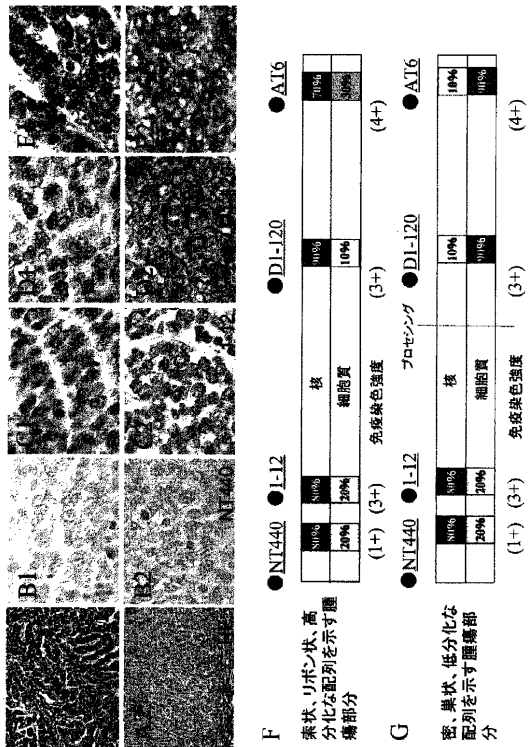
【 図 4 2 】



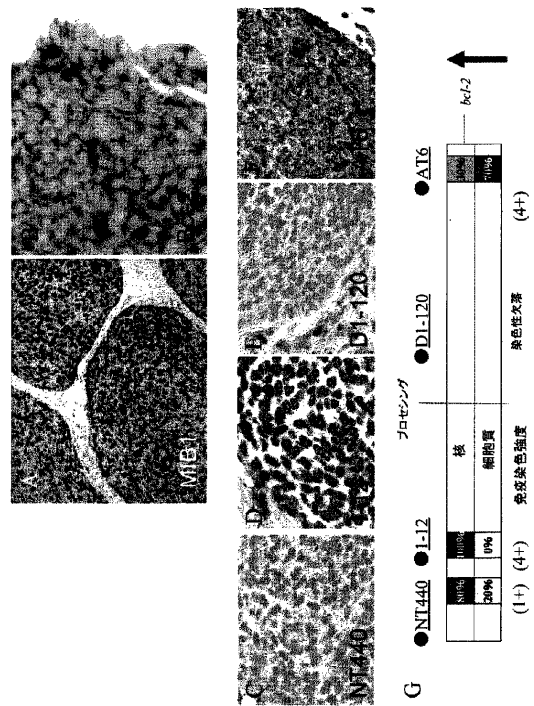
【 図 4 3 】



【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



【配列表】

0004868152000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18

(72)発明者 チャーギョン ジュン
愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1番地

(72)発明者 西野 仁雄
愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-423

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 Oncogene, (2001), Vol. 20, No. 7, p. 869-873

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/00

C12N 15/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	确定癌细胞恶性的方法		
公开(公告)号	JP4868152B2	公开(公告)日	2012-02-01
申请号	JP2006527867	申请日	2005-07-29
申请(专利权)人(译)	科学名古屋工业大学和工业研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	科学名古屋工业大学和工业研究基金会		
[标]发明人	三浦裕 川口誠 岩瀬弘敬 浜崎豊 チャーギョンジュン 西野仁雄		
发明人	三浦 裕 川口 誠 岩瀬 弘敬 浜崎 豊 チャーギョン ジュン 西野 仁雄		
IPC分类号	C12Q1/04 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/57496 C07K16/30 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118		
FI分类号	C12Q1/04.ZNA G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/574.D C12N15/00.A C07K16/18		
代理人(译)	萩野 干治		
审查员(译)	三罗·哈马达		
优先权	2004224280 2004-07-30 JP 2005079435 2005-03-18 JP		
其他公开文献	JPWO2006011587A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种方便地确定癌细胞恶性的方法。检测从活体分离的测试癌细胞的细胞中的ATBF1的总量，并使用检测结果判断待检查的癌细胞的恶性。或者检测从活体分离的测试癌细胞的细胞核中的ATBF1的量，并使用检测结果判断待检查的癌细胞的恶性。或者，检测从活体分离的测试癌细胞的细胞质中ATBF1的量，并使用检测结果判断待测癌细胞的恶性程度。在一个优选的实施方案中，ATBF1量包括(1)对应于ATBF1基因的外显子10的区域的核丰度和/或细胞质丰度，(2)对应于ATBF1基因的外显子11的区域的核存在。ATBF1基因的量或/或细胞质丰度，和(3)对应于ATBF1基因的外显子3的区域的核丰度和/或细胞质丰度。

【 図 3 】

a	<p>ATBF1における潜在的な核内保留シグナル 共通配列 "KR-----K"</p> <p>ATBF1 277 KRKPIILMCFLC-K ATBF1 2987 KRVVQVWFQNRARAKEKSK</p>
b	<p>ATBF1における潜在的な核外輸出シグナル 共通配列 "L-L-L-L"</p> <p>ATBF1 1267 LQL-HLTHL ATBF1 2471 LPQLVSLPSL ATBF1 2504 LSHL-PLKPL</p>