

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4779115号
(P4779115)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	Z N A A
GO 1 N 33/533	(2006.01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78	C
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	

請求項の数 13 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-363082 (P2005-363082)
 (22) 出願日 平成17年12月16日(2005.12.16)
 (65) 公開番号 特開2007-163407 (P2007-163407A)
 (43) 公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)
 審査請求日 平成20年12月1日(2008.12.1)

(73) 特許権者 504157024
 国立大学法人東北大学
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 (73) 特許権者 504160781
 国立大学法人金沢大学
 石川県金沢市角間町ヌ7番地
 (74) 代理人 100100181
 弁理士 阿部 正博
 (72) 発明者 久保 裕司
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号国
 立大学法人東北大学内
 (72) 発明者 小林 誠一
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 早期肺癌の術後予後検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

肺癌患者由来の検体試料中の内在性分泌型 R A G E (e s R A G E) の発現量を測定することを含む、該肺癌患者の予後検査方法。

【請求項2】

肺癌患者が臨床病期 I 期である、請求項1記載の検査方法。

【請求項3】

検体試料として術後に摘出した肺組織切片を使用する、請求項1又は2に記載の検査方法。

【請求項4】

検体試料として術前の気管支鏡下生検標本を使用する、請求項1又は2に記載の検査方法。

【請求項5】

抗 e s R A G E 抗体を使用する抗原抗体反応によって e s R A G E の発現量を測定する、請求項1～4のいずれか一項に記載の検査方法。

【請求項6】

標識抗体を使用する、請求項5記載の検査方法。

【請求項7】

e s R A G E の発現量を免疫染色法で測定する、請求項5又は6のいずれか一項に記載の検査方法。

【請求項 8】

抗 es R A G E 抗体から成る、肺癌患者の予後検査用試薬。

【請求項 9】

標識抗体である、請求項 8 記載の試薬。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 のいずれか一項に記載の試薬を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の検査方法に使用するため検査キット。

【請求項 11】

es R A G E をコードする核酸分子を有効成分として含有する抗肺癌剤。

【請求項 12】

核酸分子がベクターに組み込まれている、請求項 11 記載の抗肺癌剤。

【請求項 13】

es R A G E を有効成分として含有する抗肺癌剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、内在性分泌型RAGE (Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End products :esRAGE) の発現量を測定することを含む、肺癌患者の術後予後検査方法、それに使用する検査キット、抗esRAGE抗体から成る肺癌患者の予後検査用試薬等に関する。

【背景技術】

【0002】

全世界的に肺癌の症例数が増加している。遠隔転移のない肺癌では、手術治療がもっとも予後の良い治療法である。しかし、臨床病期の早期 (Stage I) の肺癌であっても、その手術後5年生存率は65%にとどまり、残りの35%は治癒切除術が施行されているにもかかわらず再発または遠隔転移で命を落としている(参考文献1-3)。これらの予後不良症例は、手術が終了した段階では区別することが出来ず、その後の長期経過観察期間を必要とする。

【0003】

従って、この予後不良症例を術後早期に判断することが可能になれば、術後の追加治療 (抗癌剤による化学療法) 及び慎重な経過観察による再発の早期発見が可能になり、早期肺癌症例の生命予後を延ばすことが可能になると考えられる。それとともに、予後良好例に対しては、不必要な検査・治療が軽減でき、医療費抑制にもつながる。以上のことより、早期肺癌の術後予後予測因子の開発が重要である。

【0004】

後期糖化反応生成物 (Advanced Glycation Endproducts: AGE) に対する受容体 (Receptor for AGE: RAGE) は様々な物質をリガンドに持つレセプターであり、炎症、糖尿病性血管症、癌転移などに関与している(参考文献4,5)。特に、RAGEとそのリガンドであるHMB-1/amphoterinが癌浸潤転移に大きく関わっていることが明らかになった(参考文献6, 7, 8)。最近、このRAGEには一つの遺伝子から選択的スプライシングによって作り出される内在性分泌型RAGE (esRAGE) というイソフォームがあることが発見された(参考文献9、特許文献1、特許文献2)。

【0005】

esRAGEはRAGEのリガンドと結合し、本来のレセプターとしてのRAGE (full-length RAGE) と競合してRAGEを介した細胞の反応を抑制すると考えられている。しかし、その生体内における働きは明らかではない。特許文献1及び特許文献2には、それをコードする核酸及び抗esRAGE抗体等が糖尿病合併症等の様々な疾病の治療又は予防に使用できる可能性、esRAGE抗体を用いたesRAGEの測定方法、並びに、esRAGEを定量することによる糖尿病合併症罹患感受性、抵抗性の予測可能性が記載されている。又、特許文献3には、肺癌予後検査方法に関する発明が記載されているが、実際に検討されているのは臨床病期III及びIV

10

20

30

40

50

の後期の患者に関するものである。

【特許文献1】特開2003-125786号公報

【特許文献2】特開2003-128700号公報

【特許文献3】特開平11-230966号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明の目的は、esRAGEの生体内における働きを明らかにすると共に、その測定を利用した肺癌患者の予後検査方法等を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は上記課題を解決すべく、182例の非小細胞肺癌手術症例を用いて癌組織及び健常組織でesRAGEの発現を検討して予後との関係を明らかにし、本発明を完成した。

【0008】

即ち、本発明は、以下の各態様に係るものである。

[1] 肺癌患者由来の検体試料中の内在性分泌型RAGE(esRAGE)の発現量を測定することを含む、該肺癌患者の予後検査方法。

[2] 肺癌患者が臨床病期I期である、態様1記載の検査方法。

[3] 検体試料として術後に摘出した肺組織切片を使用する、態様1又は2に記載の検査方法。

[4] 検体試料として術前の気管支鏡下生検標本を使用する、態様1又は2に記載の検査方法。

[5] 抗esRAGE抗体を使用する抗原抗体反応によってesRAGEの発現量を測定する、態様1～4のいずれか一項に記載の検査方法。

[6] 標識抗体を使用する、態様5記載の検査方法。

[7] esRAGEの発現量を免疫染色法で測定する、態様5又は6のいずれか一項に記載の検査方法。

[8] 抗esRAGE抗体から成る、肺癌患者の予後検査用試薬。

[9] 標識抗体である、態様8記載の試薬。

[10] 態様8又は9のいずれか一項に記載の試薬を含む、態様1～7のいずれか一項に記載の検査方法に使用するため検査キット。

[11] esRAGEをコードする核酸分子を有効成分として含有する抗肺癌剤。

[12] 核酸分子がベクターに組み込まれている、11記載の抗肺癌剤。

[13] esRAGEを有効成分として含有する抗肺癌剤。

【発明の効果】

【0009】

従来、早期肺癌患者術後症例において、その予後を予測する因子は存在しなかった。本発明により、癌細胞のesRAGE発現低下が症例の予後と相関することが明らかになった。この相関は早期肺癌症例において特に認められた。このことから、肺癌手術組織のesRAGE発現を測定することにより、その発現量に基き、長期の経過を見ることなく、肺癌患者、特に、早期肺癌患者症例の予後を検査判断することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の予後検査方法において測定の対象となる内在性分泌型RAGE(esRAGE)は可溶性RAGEのうちでも生体内で積極的に産生・分泌される、通常、ヒト由来の蛋白質を意味する。該物質に関しては、例えば、特許文献1又は特許文献2中(但し、「可溶性RAGE」と標記されている)に詳細に説明されており、当業者には公知の物質である。

【0011】

即ち、より具体的には、「内在性分泌型RAGE(esRAGE)」とは、糖尿病性合併症と関連の深いReceptor for advanced glycation endproducts (RAGE)に関連したペプチドであっ

10

20

30

40

50

て、RAGEのスプライシング バリエーションで膜貫通領域を有しないペプチドを指している。

【 0 0 1 2 】

該esRAGEは、347個のアミノ酸残基からなるペプチド（但し、実際に細胞外に分泌される場合には22個のアミノ酸残基からなるシグナル配列が外れて325個のアミノ酸残基からなるペプチドとなる）であり、そのC 末端側には特徴的な配列：GluGlyPheAspLysValArgGluAlaGluAspSerProGlnHisMet、

を有しており、膜貫通型RAGE（膜型RAGE又は膜結合型RAGEともいう）に存在する膜貫通ドメインを欠いていることを特徴としている。該esRAGEは、advanced glycation endproducts (AGE) 結合活性を有するか、あるいはAGE とそのレセプターとの間の相互作用に障害あるいは抑制活性を有することが挙げられる。典型的には、本発明のesRAGEは、生体内に存在する天然型ペプチド（内在性ペプチドあるいは内因性ペプチド）で、C 末端部分の16個のアミノ酸残基においてRAGE蛋白質と異なっているものである。本発明の代表的な可溶性RAGEとしては、特許文献 1 又は 2 に記載の配列表の配列番号:1のDNA でコードされて産生されるポリペプチド、例えば配列表の配列番号:2のアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。また、本発明の代表的な可溶性RAGEは、配列表の配列番号: 2 のアミノ酸配列Glu³³² ~ Met³⁴⁷のうちの少なくとも 1 ~ 16個の連続したアミノ酸残基をそのC 末端側に有し且つAGE 結合活性を有するもの、配列表の配列番号: 2 のアミノ酸配列Met¹ ~ Val¹¹⁷のうちの少なくとも 1 ~ 117 個の連続したアミノ酸残基をN 末端側に有し且つAGE 結合活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ配列表の配列番号: 2 のアミノ酸配列Tyr¹¹⁸ ~ Gly³³¹に対し少なくとも60% の相同性を有するもの等が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

ここで、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における 2 本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), *Computer Analysis of Sequence Data: Part I*, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), *Sequence Analysis Primer*, M-Stockton Press, New York, (1991) 等）。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), *Guide to Huge Computers*, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988) 等に関示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータープログラム法としては、GCG プログラムパッケージ (Devereux, J. et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 (1990)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

【 0 0 1 4 】

検体試料としては、肺癌患者から抽出した肺組織の任意の部分を使用することが出来、好適な検体試料の例として、例えば、術後に抽出した肺組織切片、又は、術前の気管支鏡下生検標本を挙げることが出来る。これらの検体試料は測定方法等に応じて、適当な処理

10

20

30

40

50

をした後に検査方法に供される。例えば、該組織標本等から当業者に公知の適当な手段で抽出・調製された試料を使用することも可能である。

【0015】

検査の対象となる肺癌患者の臨床病期に特に制限はないが、特に、臨床病期（TNM病期）I期のような早期の肺癌患者由来の検体試料を使用した場合に、より有意な予後検査結果を得ることが出来るので有利である。

【0016】

esRAGEの発現量は当業者に公知の任意の方法で測定することが可能である。例として、例えば、抗esRAGE抗体を用いた免疫染色及びEIA等の各種の免疫学的特異反応を利用する方法、エドマン法を用いた気相シーケンサー等ペプチドのアミノ酸配列分析法、更には、MALDI-TOF/MS及びESI-Q-TOF/MS法等に代表される質量分析によって検出することが出来る。

【0017】

上記の方法の中でも、抗esRAGE抗体を使用する抗原抗体反応によってesRAGEの発現量を測定する検査方法が好適である。該抗体は、上記のesRAGE若しくはその適当な部分ペプチド（ペプチド断片）又はそれらの各種誘導体又は複合体等を抗原物質又は免疫原として用いて、当業者に公知の適当な方法で調製することが可能である。例えば、ポリクローナル抗体の場合には、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリ等の適当な動物に投与し、その抗血清から調製することが可能である。或いは、モノクローナル抗体作成法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）等に記載の公知の細胞融合を用いる方法でモノクローナル抗体として調製することも可能である。例えば、特許文献1又は特許文献2に記載の方法で調製することが可能である。このような方法で作成された抗esRAGE抗体の具体例として、同特許文献の表1に挙げられた抗ヒトesRAGE抗体を挙げる事が出来る。

【0018】

尚、このような抗esRAGE抗体は、その元来の抗体活性を失わない限り、遺伝子工学（DNA組換え技術）により、例えば、Fab、F(ab')₂、Fv断片等の完全な抗体由来の各種誘導体を含む、当業者に公知の様々な形態に改変された誘導体、組換え体又はフラグメントであっても良い。

【0019】

又、esRAGE自体は、本明細書の実施例に記載するように、それをコードする遺伝子を形質転換した各種細胞株を培養して、該形質転換細胞にesRAGEを産生させてそこから調製したり、或いは、化学合成法により製造することが可能である。

【0020】

esRAGEをコードする遺伝子は、初代培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞又はヒト脳組織等の様々なヒト組織に基き調製された適当なcDNAライブラリーを鋳型として、特許文献1等に記載された該遺伝子の塩基配列に基づき適宜設計したプライマーを使用したPCR、並びに、その他のNASBA（Nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法及びSDA（Strand Displacement Amplification）法等の当業者に公知の任意DNA増幅技術を用いることにより、該遺伝子のcDNAとして容易に得ることが可能である。

【0021】

或いは、上記遺伝子は当業者に周知の方法により上記cDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。更に、該遺伝子のcDNAに、当業者に公知の部位特異的突然変異誘発に基づき、市販のミューテーションシステム等を用いて塩基変異を導入して調製することも可能である。

【0022】

又、上記遺伝子は、公知の方法（例えば、Carruthers（1982）Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418；Adams（1983）J. Am. Chem. Soc. 105:661；Belousov（19

10

20

30

40

50

97) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号)に記載されているような周知の化学合成技術により、*in vitro*において合成することもできる。また、本発明のポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切断する等の方法によって作製することもできる。

【0023】

このように、抗esRAGE抗体を使用して肺癌患者由来の検体試料中のesRAGEの発現量を測定することにより、該肺癌患者の予後を検査することが出来る。尚、発現量の測定は必ずしも定量的である必要はなく、具体的な測定法・手段に応じて、目視などによる定性的又は半定量的な判定であっても本発明の効果は十分に得ることが出来る。従って、抗esRAGE抗体は、肺癌患者の予後検査用試薬としての用途を有する。

10

【0024】

本発明の肺癌患者の予後検査方法において、肺癌患者由来の検体試料中のesRAGEの発現量は、それをコードするmRNAの量により測定することも可能である。

【0025】

このようなmRNAの測定は、本明細書中の実施例に記載のように、例えば、特許文献1等に記載された該遺伝子の塩基配列に基づき適宜設計したプライマーを使用したRT-PCR法等の各種定量的PCR法、並びにマイクロアレイ(DNAチップ)法等の当業者に公知の方法で行うことが出来る。

20

【0026】

更に、肺癌患者の予後検査方法に使用される、例えば上記のような予後検査用試薬を含む検査キットは、esRAGEの具体的な測定原理等に応じて、適当な構成をとることが出来る。該キットは、例えば、抗esRAGE抗体から成る予後検査用試薬、又は、上記のmRNAの測定の為の、esRAGE遺伝子の増幅用プライマー及びハイブリダイゼーション用のプローブを含むことが出来る。これらは、その用途に応じて、適当な長さ、例えば、10~100個の連続した塩基配列から成る。

【0027】

これまでに記載した、esRAGEポリペプチドの化学合成及びその遺伝子の調製、各種のプライマー又はプローブの設計等に際しては、特許文献1又は特許文献2に記載されたesRAGEのアミノ酸配列情報及びその遺伝子の塩基配列情報を参考にすることができる。

30

【0028】

以上のキットに構成要素として含まれる、各種のプライマー、プローブ、又は、抗体は、当業者に公知の任意の放射性物質、蛍光物質、色素等の適当な標識物質によって標識されていても良い。更に、上記キットには、その構成・使用目的などに応じて、当業者に公知の他の要素又は成分、例えば、各種試薬、酵素、緩衝液、反応プレート(容器)等が含まれる。

【0029】

本発明の抗肺癌剤は、esRAGEをコードする核酸分子又はesRAGE自体を有効成分として含有する。本明細書の実施例に示されるように、esRAGEをコードする核酸分子を癌細胞内で導入して強制的にesRAGEを発現させることにより、又は、esRAGE活性成分として含む抗肺癌剤を投与することによってesRAGE活性成分を癌細胞に作用させることによって、癌細胞の増殖を抑制することが可能である。

40

【0030】

esRAGEをコードする核酸分子は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクター等の各種ウイルスベクター、非ウイルス型ベクター又は混成型ベクター等の遺伝子治療に使用される適当なベクターに挿入して使用することが好ましい。このようなベクターには各種の遺伝子発現調節配列、クローニング部位、薬剤耐性遺伝子等の各種要素が適宜含まれており、当業者に公知の任意の方法で作製することができる。

50

【 0 0 3 1 】

上記の抗肺癌剤には、有効成分と組合せて、薬学上許容できる、当業者に公知の任意の医薬キャリア - 又は希釈剤等のその他の成分を含むことが出来る。

【 0 0 3 2 】

本発明の有効成分の薬学的な有効量及び投与方法又は投与手段は、有効成分の種類、病状の重さ、治療方針、患者の年齢、体重、性別、全般的な健康状態、及び患者の（遺伝的）人種的背景に応じて、当業者が適宜選択することができる。例えば、esRAGE自体を有効成分として含有する場合には、該有効成分の投与量は0.1～100mg / 日 / 成人、より一般的には1～10mg / 日 / 成人である。

【 0 0 3 3 】

本発明の抗肺癌剤は投与方法・投与経路等に応じて当業者に公知の任意の形状とすることが出来る。それらは適当な方法で投与することが出来る。例えば、形状としては、液体状、粉末状、及びコロイド状等があり、上記のキャリア - 又は希釈剤を伴った形で、静脈内、腹腔内、皮下に注射するか、又は、経口投与等が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例の記載によって何ら限定して解釈されるものではない。又、特に記載のない場合には、以下の実施例は、当該技術分野における常法及び当業者に公知の標準的な方法、例えば、 Sambrook and Maniatis, in *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995等に記載されている遺伝子工学及び分子生物学的技術に従い実施した。又、本明細書中に参考文献などとして引用された文献の記載内容は本明細書の開示内容の一部を構成するものである。

【 実施例 】

【 0 0 3 5 】

症例

1993年より1995年まで仙台厚生病院にて手術を受け、また術後化学療法・放射線療法を施行されなかった182例の非小細胞肺癌症例を対象とした。症例の平均年齢は65.3歳（23 - 82歳）だった。また、36症例で凍結組織が得られ、RNAの解析に使用した。この研究は東北大学および仙台厚生病院の倫理委員会の認定を受けている。

【 0 0 3 6 】

統計解析

本実施例で得られた各種結果の統計解析は、“ a one-way ANOVA and Bonferroni test ” 又は 2検定を使用して行った。全生存曲線及び非疾患生存曲線はカプランメイヤー法（Kaplan-Meier method）に従い作成した。単変量解析及び多変量解析はPROC PHREGを用いるCoxの比例ハザードモデルにより行い、フィッシャーの直説法をSASソフトで実施した。本試験に於いては、0.05未満のP値を有意と判定した。

【 0 0 3 7 】

免疫染色

摘出肺は10%フォルマリンで固定・パラフィン包埋後、薄切し、抗ヒトesRAGE抗体を用いて染色した。また、癌細胞の増殖性を見るため抗Ki-67抗体を用い染色した。esRAGE染色の特異性を見るため、リコンビナントesRAGEタンパクを用い、吸収試験を行った。

尚、抗ヒトesRAGE抗体は、まず、ヒトesRAGEに特徴的な16個のアミノ酸（EGFDKVVREAEDS PQHM）のN末側にCysを付加したペプチドを常法で化学合成し、ヘモシアニンと結合させ、ウサギに免疫することにより調製した。又、リコンビナントesRAGEタンパクは、ヒトesRAGE cDNAを組み込んだ発現ベクター（pCI-neo-mammalian expression vector, Promega）（作製方法については後述）を培養COS-7細胞及び293細胞に強制発現し、その培養上清から高純度に精製して得た。

【 0 0 3 8 】

esRAGEは正常気道上皮細胞および間質細胞の細胞質に発現しており（図1A, B）、これは

10

20

30

40

50

以前に報告された結果(参考文献10)と一致した。しかし、癌細胞においてはesRAGE発現にばらつきがあり、目視による判定の結果、182例中、癌細胞のesRAGE陽性症例(+)は45例(24.7%)、発現低下症例(+/-)は78例(42.9%)、陰性例(-)は59例(32.4%)であった。病理学的T因子が高く($P = 0.0063$)、組織学的に低分化で($P = 0.0061$)、増殖が盛んな症例で($P < 0.0001$) esRAGE発現低下例又は陰性例が多かった(表1)。尚、表1は、182例の非小細胞肺癌症(NSCLCs)例におけるesRAGE免疫染色及び臨床病理学的パラメーターとの相関を示したものである。

【0039】

更に、esRAGE発現と生存率との相関を検討すると、esRAGE発現が癌細胞で落ちている症例では生存率が低いことが判明した($P = 0.0003$) (図2A)。この傾向は、特にTNM Stage Iの早期肺癌症例において顕著であった($P = 0.0001$) (図2B)。単変量解析においてTNM病期分類($P < 0.0001$)と癌細胞のesRAGE染色性(-, +/- vs. +)($P < 0.001$)が予後因子であることが示され、さらに多変量解析でTNM病期分類($P < 0.0001$)と癌細胞のesRAGE染色性($P = 0.0085$)は独立した予後因子であることが明らかとなった(表2)。表2は、182例の非小細胞肺癌症(NSCLCs)例の臨床結果に関する単変量及び多変量解析の結果を示したものである。

【0040】

癌細胞におけるesRAGE mRNA発現

癌細胞におけるesRAGE mRNA発現を調べるため、レーザーキャプチャー法にて凍結癌組織より非小細胞肺癌症(NSCLCs)例における癌細胞と周辺細胞を分けて分離し、それぞれからtotal RNAを抽出し、RT-PCRでesRAGE mRNAおよび完全長(full-length) RAGEの発現を解析した。内因性のコントロールとして、 β -アクトチンを使用した。使用したプライマー塩基配列は、human esRAGE, 5'-TCT GTG GGG GGC AGT AGT A-3'(配列番号1)及び5'-CTT TAT CAA ACC CCT CAC CT-3'(配列番号2); full length RAGE, 5'-TCT GTG GGG GGC AGT AGT A -3'(配列番号3)及び5'-TGC CGC CTT TGC CAC AAG AT-3'(配列番号4); human beta-actin, 5'-GCT GTG CTA TCC CTG TAC G-3'(配列番号5)及び5'-TGC CTC AGG GCA GCG GAA-3'(配列番号6)であった。

【0041】

その結果、癌細胞でのみ、36例中25例(70%)でesRAGEまたはfull-length RAGEの発現が欠失していた(表3A)。しかしながら、esRAGEとfull-length RAGE mRNAs発現に相関は認めなれなかった($p = 0.72$, 表3B)。

【0042】

esRAGEの癌細胞増殖に及ぼす影響

esRAGEの癌細胞増殖に及ぼす影響を検討するため、肺癌細胞A549及びOBA-LK-1細胞にプロモーターをつけたesRAGE, full-length RAGE、又はdominant negative RAGE(dnRAGE)のcDNAを導入し、それぞれを強制発現させてその細胞増殖に及ぼす影響を検討した。即ち、A549またはOBA-LK-1細胞 5×10^5 個に、リポソーム法を用いてヒトesRAGE、full-length RAGE、dominant negative RAGE、または空ベクターを導入した。導入後の増殖はalarBlue(Biosource, Camarillo, CA)を培養細胞に添加し、培養後24、48、72、96時間の時点における蛍光強度で測定した。

ここで、esRAGE、full-length RAGE cDNAは培養血管細胞からクローニングしたものを、dnRAGEはfull-length RAGEの膜貫通領域配列の直後に終止コドンが入るような遺伝子操作(PCR)によって人工的に調製し、これらをpCI-neo mammalian expression vector(Promega)にそれぞれ組み込むことによって作製した。尚、このベクターのプロモーターはヒトサイトメガロウイルスimmediate-earlyエンハンサー/プロモーター領域を使用している。

具体的には、full-length RAGE cDNAは、夫々、AB036432(Genbank登録番号)のヌクレオチド第1-22番目及び第1246-1268番目に該当する、5'-GAGAATTCGCCAGGACCCTGGAAGGAAGCA-3'(配列番号7)と5'-GATCTAGACTGATGGATGGGATCTGTCTGTG-3'(配列番号8)、esRAGEは、夫々、AB061668(Genbank登録番号)のヌクレオチド第1-22番目及び第10

10

20

30

40

50

69-1088に該当する、5' -GAGAATTCGCCAGGACCCTGGAAGGAAGCA-3' (配列番号9) と5' -GATCTAGAGCTTGTGACCATCCCCCAG-3' (配列番号10) でRT-PCRを行い、dnRAGEは、5' -GAGAA TTCGCCAGGACCCTGGAAGGAAGCA-3' (配列番号11) と5' -GATCTAGATCATCGGCGTTGCCGCCTTTG-3' (配列番号12) でPCRを行い、それぞれシーケンスを確認後、制限酵素EcoRI及びXbaIで切断しpCI-neo mammalian expression vector (Promega)に組み込み、夫々の発現ベクターを作成した。尚、肺癌細胞 A549 (ID:TKG 0184) 及びOBA-LK-1細胞(ID: TKG 0572)はいずれも東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターに保存されており自由に分譲可能である。

【0043】

その結果、esRAGEを癌細胞に強制発現することにより、癌細胞増殖の抑制が認められた (図3)。このことは、肺癌症例においてesRAGE発現が低下することにより、癌の増殖が促進されていると考えられる。

【0044】

【表 1】

	esRAGE 免疫染色			P 値	
	+	+/-	-		
性別					
男性	23 (12.6%)	63 (34.6%)	48 (26.4%)	0.0007	
女性	22 (12.1%)	15 (8.2%)	11 (6.0%)		
年齢	65.3±1.2	64.4±1.2	67.4±1.0	0.2596	10
TNM 病期					
I	30 (16.5%)	43 (23.6%)	28 (15.4%)	0.0661	
II	3 (1.6%)	11 (6.0%)	3 (1.6%)		
III	12 (6.6%)	24 (13.2%)	28 (15.4%)		
pT 因子					
pT1	25 (13.7%)	29 (15.9%)	25 (13.7%)	0.0063	
pT2	16 (8.8%)	40 (22.0%)	17 (9.3%)		
pT3+4	4 (2.2%)	9 (4.9%)	17 (9.3%)		
腫瘍径 (mm)	30.6±2.2	35.3±1.7	38.5±2.9	0.0838	20
pN 因子					
pN0	33 (18.1%)	47 (25.8%)	35 (19.2%)	0.4595	
pN1	3 (1.6%)	11 (6.0%)	6 (3.3%)		
pN2+3	9 (4.9%)	20 (11.0%)	18 (9.9%)		
組織学的型					
Adeno	37 (20.3%)	44 (24.2%)	23 (12.6%)	0.0001	30
Large	4 (2.2%)	5 (2.7%)	11 (6.0%)		
SCC	4 (2.2%)	29(15.9%)	25 (13.7%)		
組織分化度*					
高分化	15 (9.3%)	9 (5.6%)	11 (6.8%)	0.0061	
中分化	20 (12.3%)	37 (22.8%)	18 (11.1%)		
未分化	6 (3.7%)	27 (16.7%)	19 (11.7%)		
Ki-67 LI (%)	13.3±1.9	22.8±2.0	22.9±2.7	<0.0001	
p53 染色					
陽性	27 (14.9%)	62 (34.3%)	44 (24.3%)	0.099	40
陰性	17 (9.4%)	16 (8.8%)	15 (8.3%)		

Adeno; 腺癌, Large; 大細胞癌, and SCC; 扁平上皮癌

*;大細胞癌例は除外 (n = 162, in total).

P-値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

【表 2】

変量	Overall survival		
	単変量	多変量	
	P	P	相対的危険率 (95% CI)
TNM 病期 (II, III / I)	<0.0001*	<0.0001*	3.540 (2.118 - 5.917)
esRAGE 免疫染色 (- or +/- 対 +)	0.0010*	0.0085*	2.415 (1.145 - 4.935)
組織分化 (未分化/ 中高分化)	0.0262*	0.8641	
Ki-67 LI (≥ 10 / < 10)	0.236		
性別 (男性 / 女性)	0.2571		
p53 染色 (陽性 / 陰性)	0.4692		
組織学的型 (Large / Adeno / SCC)	0.8877		

*; 単変量解析において有意と判断され、多変量解析の対象とした値

【 0 0 4 6 】

【表 3】

A :

	esRAGE		P
	陽性	陰性	
完全長 RAGE			
陽性	11	13	0.363 ^a
陰性	4	8	

B :

	esRAGE		P
	陽性	陰性	
完全長 RAGE			
陽性	36	0	0.0016 ^a
陰性	0	0	

a: Fisher's exact test

【 0 0 4 7 】

【参考文献】

- Williams DE, Pairolero PC, Davis CS, et al. Survival of patients surgically treated for stage I lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 1981;82(1):70-6.
- Nesbitt JC, Putnam JB, Jr., Walsh GL, Roth JA, Mountain CF. Survival in

10

20

30

40

50

Early-Stage Non--Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg* 1995;60(2):466-72.

3. Spiro SG, Porter JC. Lung Cancer--Where Are We Today? Current Advances in Staging and Nonsurgical Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(9):1166-96.

4. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267(21):14998-5004.

5. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108(7):949-55. 10

6. Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, et al. The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8 Suppl 3):S259-63.

7. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signaling suppresses tumor growth and metastases. *Nature* 2000;405(6784):354-60.

8. Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res* 2002;62(16):4805-11.

9. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 2003;370(Pt 3):1097-109. 20

10. Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, et al. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol* 2005;18(10):1385-1396.

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明により、予後不良早期肺癌患者が術後すぐ同定することが可能となり、それらの患者に対して早期の追加治療（抗癌剤治療）を行うことにより予後の改善が図れるものとする。また反対に、予後良好な症例が同定されれば、不必要な術後療法及び過度の術後検査・外来診察を省くことが出来、医療費の抑制につながるものとする。 30

【0049】

尚、本発明において、esRAGE発現の測定は、手術後だけではなく術前の気管支鏡下生検標本でも測定可能である。このことは、手術前にその術後の予後が評価できることにつながり、そういった症例に対する新たな治療戦略の開発につながるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】非小細胞肺癌組織における esRAGE の発現を示す顕微鏡写真である。A: 肺癌組織、B: 健常肺組織、C: esRAGE吸収試験。棒のスケール = 100 μm。

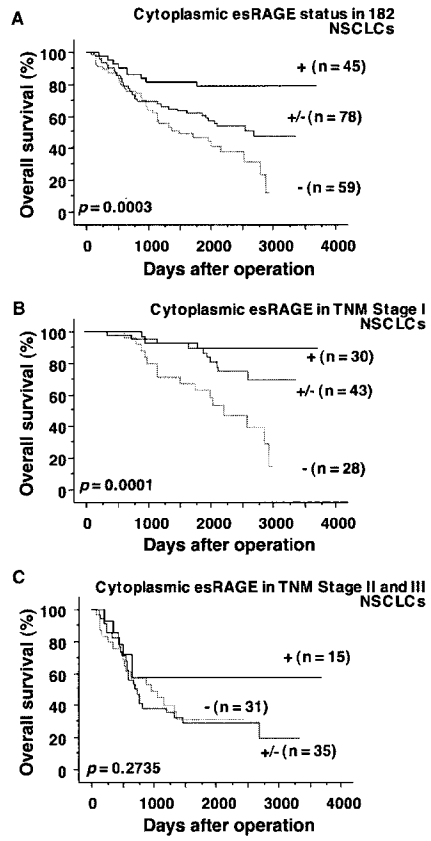
【図2】肺癌手術症例の術後生存曲線を示す。A: 全症例、B: TNM stage I期症例、C: TNM stage IIおよびIIIA期症例。 40

【図3】esRAGE 過剰発現により、A549 培養肺癌細胞(A) および OBA-LK-1 (B) 培養肺癌細胞の増殖が抑制されることを示す。* P < 0.05 (対 empty vector); † P < 0.05 (対 full-length RAGE)。

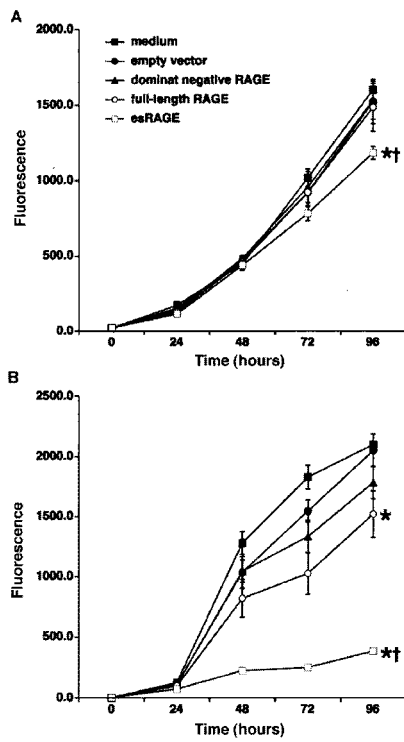
【 ④ 1 】



【 ④ 2 】



【 ④ 3 】



【配列表】

0004779115000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 鈴木 貴
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 鈴木 聡
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 石沢 興太
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 山本 博
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内
- (72)発明者 米倉 秀人
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内
- (72)発明者 渡邊 琢夫
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内
- (72)発明者 山本 靖彦
石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開2003-128700(JP,A)
特開2005-337952(JP,A)
特表2002-512038(JP,A)
Babett Bartling, Hans-Stefan Hofmann, Bernd Weigle, Rolf-Edgar Silber, Andreas Simm, D
own-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non
-small cell lung carcinoma, Carcinogenesis, BR, 2005年 2月, vol. 26, No. 2 pp. 2
93-301

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - G 0 1 N 3 3 / 9 8
A 6 1 K 3 8 / 0 0
A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 4 3 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 0 2
G 0 1 N 2 1 / 7 8
C 1 2 N 1 5 / 0 9
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)
P u b M e d

专利名称(译)	早期肺癌的术后预后检查		
公开(公告)号	JP4779115B2	公开(公告)日	2011-09-28
申请号	JP2005363082	申请日	2005-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人金沢大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东北大学 国立大学法人金沢大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人东北大学 国立大学法人金沢大学		
[标]发明人	久保裕司 小林誠一 鈴木貴 鈴木聡 石沢興太 山本博 米倉秀人 渡邊琢夫 山本靖彦		
发明人	久保 裕司 小林 誠一 鈴木 貴 鈴木 聡 石沢 興太 山本 博 米倉 秀人 渡邊 琢夫 山本 靖彦		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533 G01N21/78 C12Q1/02 A61K48/00 A61K38/00 A61P43/00 A61P35/00 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/533 G01N21/78.C C12Q1/02 A61K48/00 A61K37/02 A61P43/00.111 A61P35/00 C12N15/00.A A61K38/00 G01N33/574.AZN.A G01N33/574.BZN.A		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB05 2G054/CA23 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA01 4B024 /AA12 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063 /QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZC422		
代理人(译)	阿部正弘		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2007163407A		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：为肺癌患者提供预后检测方法等，明确体内esRAGE的工作，同时利用其测量。ZSOLUTION：这种肺癌患者的术后预后检测方法，包括测量内源性分泌物RAGE（晚期糖基化终产物的内源性分泌受体：esRAGE）的表现量，用于上述方法的检测试剂盒，a肺癌患者的预后检测试剂包括抗esRAGE抗体等

	esRAGE 免疫染色			P 値
	+(n = 45)	+/- (n = 78)	-(n = 59)	
性別				
男性	23 (12.6%)	63 (34.6%)	48 (26.4%)	0.0007
女性	22 (12.1%)	15 (8.2%)	11 (6.0%)	
年齢	65.3 ± 1.2	64.4 ± 1.2	67.4 ± 1.0	0.2596
TNM 病期				
I	30 (16.5%)	43 (23.6%)	28 (15.4%)	0.0661
II	3 (1.6%)	11 (6.0%)	3 (1.6%)	
III	12 (6.6%)	24 (13.2%)	28 (15.4%)	
pT 因子				
pT1	25 (13.7%)	29 (15.9%)	25 (13.7%)	0.0063
pT2	16 (8.8%)	40 (22.0%)	17 (9.3%)	
pT3+4	4 (2.2%)	9 (4.9%)	17 (9.3%)	
腫瘍径 (mm)	30.6 ± 2.2	35.3 ± 1.7	38.5 ± 2.9	0.0838
pN 因子				
pN0	33 (18.1%)	47 (25.8%)	35 (19.2%)	0.4595
pN1	3 (1.6%)	11 (6.0%)	6 (3.3%)	
pN2+3	9 (4.9%)	20 (11.0%)	18 (9.9%)	
組織学的型				
Adeno	37 (20.3%)	44 (24.2%)	23 (12.6%)	-
Large	4 (2.2%)	5 (2.7%)	11 (6.0%)	0.0001
SCC	4 (2.2%)	29 (15.9%)	25 (13.7%)	
組織分化度*				
高分化	15 (9.3%)	9 (5.6%)	11 (6.8%)	0.0061
中分化	20 (12.3%)	37 (22.8%)	18 (11.1%)	
未分化	6 (3.7%)	27 (16.7%)	19 (11.7%)	
Ki-67 LI (%)	13.3 ± 1.9	22.8 ± 2.0	22.9 ± 2.7	<0.0001
p53 染色				
陽性	27 (14.9%)	62 (34.3%)	44 (24.3%)	0.099
陰性	17 (9.4%)	16 (8.8%)	15 (8.3%)	

Adeno: 腺癌, Large: 大細胞癌, and SCC: 扁平上皮癌
*: 大細胞癌例は除外 (n = 162, in total).
P-値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。