

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7300687号
(P7300687)

(45)発行日 令和5年6月30日(2023.6.30)

(24)登録日 令和5年6月22日(2023.6.22)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876

Z

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

D Z N A

G 0 1 N 33/574(2006.01)

G 0 1 N 33/574

A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

請求項の数 9 (全28頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-556490(P2021-556490)

(86)(22)出願日 令和2年3月23日(2020.3.23)

(65)公表番号 特表2022-526131(P2022-526131
A)

(43)公表日 令和4年5月23日(2022.5.23)

(86)国際出願番号 PCT/KR2020/003963

(87)国際公開番号 WO2020/197227

(87)国際公開日 令和2年10月1日(2020.10.1)

審査請求日 令和3年11月17日(2021.11.17)

(31)優先権主張番号 10-2019-0032863

(32)優先日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 509159333

ユニヴァーシティー オブ ウルサン フ
ァウンデーション フォー インダストリ
ー コーオペレーション大韓民国 ウルサン 680-749 ナ
ム-グ ダエハク-ロ 93

(73)特許権者 515267910

ジ アサン ファウンデーション
大韓民国 05505 ソウル ソンパ-グ
オリンピック-ロ 43-ギル 88

(74)代理人 110002262

TRY国際弁理士法人

(72)発明者 イ ギョンジン

大韓民国 12917 ギョンギ-ド ハ
ナム-シ、ミサガンビョン-デロ、55
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝細胞癌診断用バイオマーカーセレブロンと、これに特異的な新規なモノクローナル抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

CRBN遺伝子のmRNAまたはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する製剤を含む、肝細胞癌の診断または予後予測のための組成物。

【請求項2】

前記遺伝子のmRNAレベルを測定する製剤は、前記遺伝子に特異的に結合するプライマー対、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドを含む、請求項1に記載の肝細胞癌の診断または予後予測のための組成物。

【請求項3】

前記タンパク質のレベルを測定する製剤は、前記タンパク質に特異的な抗体、またはアプタマーを含む、請求項1に記載の肝細胞癌の診断または予後予測のための組成物。

【請求項4】

(a) 個体から分離された生物学的試料からCRBN遺伝子のmRNAまたはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する段階と、

(b) 前記測定されたレベルを、正常個体から分離された生物学的試料で測定されたレベルと比較する段階、を含む、肝細胞癌の診断のための情報提供方法。

【請求項5】

(c) 前記(a)段階の生物学的試料で測定されたmRNAまたはそれから発現されるタンパク質のレベルが、正常個体または前記(b)段階の個体の生物学的試料から分離された生物学的試料で測定されたものより高い場合は、肝細胞癌であると分類される段階をさら

に含む、請求項 4 に記載の肝細胞癌の診断のための情報提供方法。

【請求項 6】

(a) 肝細胞癌患者の肝細胞癌組織とその周辺の正常組織から分離された生物学的試料中のそれぞれ CRBN 遺伝子の mRNA またはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する段階と、

(b) 前記各試料で測定されたレベルを比較する段階、を含む、肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法。

【請求項 7】

(c) 前記 (a) 段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定された CRBN 遺伝子の mRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものより 2 倍以上高い場合、不良な予後を有すると分類される段階をさらに含む、請求項 6 に記載の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法。

【請求項 8】

(d-1) 前記 (a) 段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定された CRBN 遺伝子の mRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものより 2 倍以上高い場合、CRBN 高発現群に分類し、2 倍未満の場合、CRBN 低発現群に分類する段階と、

(d-2) 高発現群患者及び低発現群から分離された血液で、それぞれ AFP (α -fetoprotein) 値を測定する段階と、

(d-3) 高発現群患者から分離された血液で測定された AFP 値が、低発現群の患者から分離された血液で測定された数値より高い場合、高発現患者群患者の患者が不良な予後を有すると分類される段階、をさらに含む、請求項 7 に記載の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法。

【請求項 9】

前記不良な予後は、病期 II への進行、微小血管の浸潤、累積腫瘍再発率の増加及び生存率の低下からなる群から選択されるいずれか一つ以上を有することを意味する、請求項 7 または請求項 8 に記載の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝細胞癌診断用バイオマーカーとしてのセレブロン[®]の用途とセレブロン (Ce reblon、CRBN) に特異的な新規なモノクローナル抗体に関するものであり、より詳細には、CRBN を肝細胞癌診断用バイオマーカーとして、肝細胞癌を診断または予後を予測するための組成物、キット、肝細胞癌の診断または予後予測のための情報提供方法、CRBN に特異的に結合する 2 種の新規なモノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマ細胞に関するものである。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌は肝臓で発生する原発性肝癌であり、2014 年国家癌登録統計によると、癌全体のうち発生率で 6 位に該当するが、5 年生存率は 32.8% に過ぎず、発生頻度と比較して死亡率が非常に高い癌である。特に肝炎ウイルスの保菌率が高い韓国を含むアジア圏では、発生頻度が高いだけでなく、癌の発生と比較して 2~3 位の死亡率を示すほど予後が不良な癌の一つで、予防と早期発見が重要である。

【0003】

現在まで、肝細胞癌の切除後の予後判定には、腫瘍サイズと数、微小血管浸潤 (microv ascular invasion)、FDG-PET CT 所見と腫瘍マーカー (AFP、PIVKA-II [DCP]) などを参照していたが、早期肝細胞癌では、このような腫瘍の特性を示す因子がほとんど低く出て、識別力が低下するという深刻な限界があった。

【0004】

国内の診断マーカーの開発のためにゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスのよ

10

20

30

40

50

うなオーミクスをベースにした研究が進行中で、BT/ITなどを応用した診断バイオチップ分野は、次世代の成長動力事業の一環として推進中だが、まだ国内で開発されたバイオマーカーを利用した製品は、それほど多くないのが実情である。非常に多様な臨床経過を示す肝細胞癌において、信頼性のある予後予測は、非常に重要な役割を果たす。

【0005】

最近、いくつかの研究で、細胞内のエネルギーセンサーであるAMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) の活性制御による抗癌効果が確認されている。AMPKは、 α 、 β 、 γ の三つのサブユニットからなるヘテロ三量体タンパク質複合体 (heterotrimeric protein complex) であり、糖、脂質、コレステロール代謝の調節に重要な役割を担っている。最近、CRL (cullin-ring ubiquitin lipase) の基質受容体として知られているセレブロン (cereblon、CRBN) が、AMPK三量体の α サブユニットと直接結合してAMPKの活性を抑制できるのが確認された。

【0006】

CRBNタンパク質は、脳、胎盤、網膜、骨格筋、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、睾丸、前立腺、小腸などを含む様々な組織で見られる。従来のCRBNの研究によると、CRBN数値を介して、多発性骨髄腫と白血病で免疫調節薬 (immunomodulatory drugs) への反応を予測することができ、高いCRBN数値は、免疫調節薬の効果を高め、患者の生存と関連があることが明らかになっていた。CRBNは、内因性AMPKの活性を抑制する唯一のタンパク質として知られており、これを活用した、他の腫瘍に対するバイオマーカーの開発が期待されている。

【0007】

一方、大韓民国公開特許第10-2014-0024914号には、予測因子としてセレブロン (CRBN) を使用する、癌や炎症性疾患の治療のための方法が開示されているが、CRBN-DBD1及び/又はCRBN E3ユビキチン-リガーゼ複合体に直接結合してCRBNが正しく機能できないようにする (malfunction)、化合物を用いた治療方法のみが提示されているだけで、CRBNに特異的に結合するモノクローナル抗体については言及されていない。

【0008】

そこで、本発明者らは、肝細胞癌患者の組織からCRBNタンパク質の発現を調査し、研究対象患者の手術後の肝細胞癌の再発と生存を分析して、肝細胞癌の早期診断と予後予測のためのバイオマーカーとしてのCRBNの可能性を評価及び検証し、また、CRBNに特異的に結合する新規な2種のモノクローナル抗体を産生し、肝細胞癌の診断と予後予測の可能性を立証することで、本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明の目的は、CRBNを用いた肝細胞癌の診断または予後予測のための組成物及びキットを提供することである。

【0010】

本発明の他の目的は、CRBNを用いた肝細胞癌の診断または予後予測のための情報提供方法を提供することである。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、CRBNに特異的に結合するモノクローナル抗体及びそれを産生するハイブリドーマ細胞を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上述した課題を解決するために、本発明は、CRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する製剤を含む、肝細胞癌の診断または予後予測のための組成物を提供する。

【0013】

本発明の好適な一実施形態によると、上記の遺伝子のmRNAレベルを測定する製剤は、

上記の遺伝子に特異的に結合するプライマー対、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドを含むことができる。

【0014】

本発明の好ましい他の一実施形態によると、上記のタンパク質のレベルを測定する製剤は、上記のタンパク質に特異的な抗体またはアプタマーを含むことができる。

【0015】

本発明の好ましい別の一実施形態によると、上記の抗体は、受託番号KCTC18596Pのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体と、受託番号KCTC18598Pのハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体からなる群から選択される1種以上のモノクローナル抗体を含むことができる。

10

【0016】

本発明は、また、前述した組成物を含む肝細胞癌の診断または予後予測用キットを提供する。

【0017】

本発明の好適な一実施形態によれば、上記のキットは、RT-PCRキット、競合RT-PCRキット、リアルタイムRT-PCRキット、DNAチップキットまたはタンパク質チップキットであり得る。

【0018】

本発明は、さらに、以下のステップを含む、肝細胞癌の診断のための情報提供方法を提供する。

20

(a) 個体から分離された生物学的試料でCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する段階と、

(b) 上記の測定されたレベルを、正常個体から分離された生物学的試料で測定されたレベルと比較する段階

【0019】

本発明の好適な一実施形態によれば、上記の肝細胞癌の診断のための情報提供方法は、(c) 上記(a)段階の生物学的試料で測定されたmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、正常個体または上記(a)段階の個体の生物学的試料から分離された生物学的試料で測定されたものより高い場合、肝細胞癌であると判断する段階をさらに含むことができる。

30

【0020】

本発明は、さらに、以下のステップを含む、肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法を提供する。

(a) 肝細胞癌患者の肝細胞癌組織とその周辺の正常組織から分離された生物学的試料中のそれぞれCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する段階と、

(b) 上記の各試料で測定されたレベルを比較する段階

【0021】

本発明の好ましい一実施形態によると、上記の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法は、(c) 上記(a)段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定されたCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものより2倍以上高い場合、不良な予後を有すると判断する段階をさらに含むことができる。

40

【0022】

本発明の好ましい他の一実施形態によると、上記の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法は、以下のステップを追加で含む：

(d-1) 上記(a)段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定されたCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものより2倍以上高い場合、CRBN高発現患者群に分類し、2倍未満の場合はCRBN低発現患者群に分類する段階と、

50

(d-2) 高発現群患者および低発現群患者から分離された血液から、それぞれAFP (α -fetoprotein) 値を測定する段階と、

(d-3) 高発現群患者から分離された血液で測定されたAFP値が、低発現群の患者から分離された血液で測定された数値よりも高い場合、高発現患者群の患者が不良な予後を有すると判断する段階

【0023】

さらに、本発明は、受託番号KCTC18596Pのハイブリドーマ細胞及びそれによって産生される、セレブロン (CRBN) に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0024】

本発明の好ましい一実施形態によると、上記のモノクローナル抗体は、配列番号3と6からなる群から選択される、一つ以上のアミノ酸配列を含むセレブロンの領域に特異的に結合することができる。

【0025】

本発明は、さらに、受託番号KCTC18598Pのハイブリドーマ細胞及びそれによって産生される、セレブロン (CRBN) に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0026】

本発明の好ましい一実施形態によると、上記のモノクローナル抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含むセレブロンの領域に特異的に結合することができる。

【発明の効果】

【0027】

本発明のCRBN特異的モノクローナル抗体は、従来のCRBNポリクローナル抗体と比較して、診断感度と特異性が大幅に改善されたものであり、肝細胞癌の早期診断と手術後の予後を予測するのに有効である。また、CRBNタンパク質の発現量の差は、肝細胞癌患者の早期診断だけではなく、従来の肝細胞癌の予後予測にとって重要な因子である微小血管浸潤の有無よりも優れた予測力を示し、肝細胞癌の診断と肝切除手術後の予後を評価するための診断マーカーとして活用できると期待される。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、肝細胞癌の腫瘍細胞の組織とその周辺部の正常細胞組織のCRBNタンパク質の発現程度を免疫組織化学法で確認した写真である。

【図2】図2は、肝細胞癌組織 (T) と周辺部正常組織 (N) でCRBN発現量をウェスタンブロッティングで確認した結果である。

【図3】図3は、CRBN高発現群 (下のグラフの線) と低発現群 (上のグラフの線) の累積腫瘍再発率 (左) と患者の生存率 (右) を比較して示したグラフである。

【図4】図4は、微小血管浸潤の有無による累積腫瘍再発率 (左) と患者の生存率 (右) を比較して示したグラフである (上のグラフの線; 微小血管浸潤が起こらなかった患者群、下のグラフの線; 微小血管浸潤が起こった患者群)。

【図5】図5の (A) は、細胞株によるCRBN発現程度を比較したウェスタンブロッティング分析、図5の (B) は、細胞株によるMMP-9、MMP-2の発現程度を比較したウェスタンブロッティング分析の結果を示したものである。

【図6】図6は、siRNAを用いてCRBN遺伝子発現を抑制させたHepG2細胞株で、CRBN、MMP-9及びMMP-2の発現量を比較した結果である (Scram; 対照群、#1; siRNA処理群)。

【図7】図7は、HA-CRBN (pCDNA3) を利用して、CRBNを活性化させたヒト由来の肝細胞癌の一次培養細胞株で、MMP-9とMMP-2の発現量を比較した結果である (110621; 対照群、HA-CRBN; CRBN発現活性化)

【図8】図8は、WTとCRBNノックダウン一次肝細胞癌の細胞株 (CRBN KD-HCC) を移植したNudeマウスで腫瘍体積を測定した結果を示したものである。

【図9】図9は、ヒトCRBNタンパク質配列のうち、モノクローナル抗体の産生に適した抗原ペプチド配列を示したもので、マウスの配列と相同性を示した図である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0029】

上述したように、肝細胞癌は死亡率が非常に高い癌であり、予防と早期発見が非常に重要で、これを信頼性高く早期に診断できるバイオマーカーを開発する必要がある。そこで、本発明者らは、肝細胞癌の早期診断と予後予測のためのバイオマーカーとしてのCRBNの可能性を評価および検証し、また、CRBNに特異的に結合する新規な2種のモノクローナル抗体を産生し、肝細胞癌の診断と予後予測の可能性を立証することによって、上述した問題の解決策を模索した。

【0030】

したがって、本発明の第1の側面は、CRBN遺伝子のmRNAまたはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する製剤を含む、肝細胞癌の診断または予後予測のための組成物及びこれを含むキットに関するものである。

【0031】

本発明の用語「CRBN」は「セレブロン」を指す。本発明において、用語、「CRBN (cereblon) タンパク質」は、CRL (cullin-ring ubiquitin ligase) の基質受容体であり、セレブロン遺伝子に変異が生じると、軽度の精神遅滞が現れることが知られている。また、CRBNはAMPKと直接結合してAMPKの活性化を抑制するタンパク質として知られており、CRBNの発現を抑制することにより、AMPKを活性化させ、代謝疾患を治療できることが報告されている。上記のCRBNタンパク質は、その種類は特に制限されていないが、好ましくは、ヒトCRBNタンパク質であり得る。

【0032】

CRBNタンパク質は、CRBN遺伝子によってコードされ、CRBNタンパク質及びこれをコードする遺伝子は、診断しようとする個体で発生できるすべての形態のCRBNタンパク質とCRBN遺伝子をそれぞれ含んでいる。具体的には、本発明の用語「CRBNタンパク質」は、公知の442個のアミノ酸からなる非変異形態、または特定のアミノ酸の置換、挿入、欠失などが生じた変異型のCRBNタンパク質を含むことができ、上記の非変異、または変異されたCRBNタンパク質の一部を含むこともできる。また、用語「CRBN遺伝子」は、上記のすべての形態のCRBNタンパク質をコードする塩基配列を含んでいる。

【0033】

CRBNの情報は、アメリカ国立衛生研究所のGenBankなどの公知のデータベースから得ることができ、その例として、Accession NumberがBC_067811 (Gene ID: 51185) であるCRBNタンパク質の情報であり得る。本発明のCRBNタンパク質は、下記の配列番号1のHuman CRBN (442 aa) のアミノ酸配列で表示される、ヒトセレブロンタンパク質であり得るが、これらに限定されない。

[配列番号1]

MAGEGDQQDA AHNMGNHLPL LPAESEEDE MEVEDQDSKE AKKPNIINFDTSLPT
SHTYL

GADMEEFHGR TLHDDSCQV IPVLPQVMMI LIPGQTLPLQ LFHPQEVSMV RNLIQ
KDRTF

AVLAYSNVQE REAQFGTTAE IYAYREEQDF GIEIVKVKAI GRQRFKVLLEL RTQSDGI
QQA

KVQILPECVL PSTMSAVQLE SLNKCQIFPS KPVSREDQCS YKWWQKYQKR KFHCA
NLTSW

PRWLYSLYDA ETLMDRIKKQ LREWDENLKD DSLPSNPIDF SYRVAACLPI DDVLRI
QLLK

IGSAIQRLRC ELDIMNKCTS LCCKQCQETE ITTKNEIFSL SLCGPMAAYV NPHGYV
HETL

TVYKACNLNL IGRPSTESHW FPGYAWTVAQ CKICASHIGW KFTATKKDMS PQKF
WGLTRS

ALLPTIPDTE DEISPDKVIL CL

【0034】

本発明において、用語「CRBNのmRNAまたはそのタンパク質の発現レベルを測定する製剤」とは、本発明のCRBN遺伝子またはこれらの遺伝子によってコードされたタンパク質の発現レベルを確認するために使用できる分子を意味し、好ましくは、CRBN遺伝子に特異的に結合するプライマー対、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドであるか、またはCRBN遺伝子によってコードされるタンパク質に特異的な抗体またはアプタマーであり得る。

【0035】

本発明において、用語「抗体」とは、当該分野で公知の用語で、抗原性部位に対して指示される特異的なタンパク質分子を意味する。本発明の目的上、抗体は、本発明のマーカーに特異的に結合する抗体を意味し、これらの抗体は、それぞれの遺伝子を通常の方法によって、発現ベクターにクローニングして上記のマーカー遺伝子によってコードされるタンパク質を得て、得られたタンパク質から通常の方法により製造することができる。ここでは、上記のタンパク質から作られる部分ペプチドも含まれており、本発明の部分ペプチドは、少なくとも7個のアミノ酸、好ましくは9個のアミノ酸、より好ましくは12個以上のアミノ酸を含んでいる。本発明の抗体の形態は特に制限されず、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または抗原結合性を有するものであれば、その一部も本発明の抗体に含まれ、すべての免疫グロブリン抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊な抗体も含まれる。このような本発明のバイオマーカー遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体は、当業界の公知の方法で製造できるすべての抗体であり得る。例えば、本発明の癌の診断マーカーの検出に使用される抗体は、2つの全体の長さの軽鎖及び、2つの全体の長さの重鎖を有する完全な形だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含むことができる。上記の抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv などであってもよいが、特にこれに限定されない。

【0036】

本発明の一実施形態では、上記のキットは、受託番号KCTC18596Pのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体と、受託番号KCTC18598Pのハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体からなる群から選択される1種以上のモノクローナル抗体を含み、これらの抗体の説明は、下記の本発明の第4の側面でより詳細に記述する。

【0037】

本発明において、用語「アプタマー」とは、一本鎖オリゴヌクレオチドを意味するもので、所定の標的分子に対し結合活性を有する核酸分子を指す。上記のアプタマーは、塩基配列に基づいて、様々な3次元構造を有することができ、抗原-抗体反応のように特定の物質に対して高い親和性を有することができる。アプタマーは所定の標的分子に結合することにより、所定の標的分子の活性を阻害することができる。

【0038】

本発明のアプタマーはRNA、DNA、修飾(modified)核酸またはこれらの混合物であることができ、その形態は直鎖状または環状であり得るが、これらに限定されない。上記のCRBNに結合活性を有するアプタマーは、それぞれの塩基配列を参照して当該技術分野における通常の知識を有する者が、公知の方法により容易に作製することができる。

【0039】

本発明において、用語「プライマー」は、短い遊離3'末端ヒドロキシ基(free 3' hydroxyl group)を有する核酸配列で、相補的な鋳型(template)と塩基対(base pair)を形成することができ、鋳型のコピーのための開始点として機能する短い核酸配列を意味する。本発明では、本発明のマーカーポリヌクレオチドのセンス及びアンチセンスプライマーを用いてPCR増幅を実施し、目的生成物の生成程度を介して肝細胞癌の診断または予後を予測することができる。PCR条件、センス及びアンチセンスプライマーの長さは、当業界で公知のものに基づいて変更することができる。

【0040】

本発明において、用語「プローブ (probe)」とは、mRNAと特異的な結合を行うことができる、短くは数塩基から長くは数百塩基に該当するRNAまたはDNAなどの核酸断片を意味し、標識 (labeling) されているので特定のmRNAの存在の有無を確認することができる。プローブは、オリゴヌクレオチドプローブ、一本鎖DNA (single stranded DNA) プローブ、二本鎖DNA (double stranded DNA) プローブ、RNAプローブなどの形で作製することができる。本発明では、本発明のCRBNポリヌクレオチドと相補的なプローブを用いて混成化を行い、混成化程度を介して肝細胞癌の予後を予測することができる。適切なプローブの選択及び混成化条件は、当業界で公知のものに基づいて変更することができる。

10

【0041】

本発明のプライマーまたはプローブは、ホスホロアミダイト固体支持体方法、または他の周知の方法を使用して化学的に合成することができる。これらの核酸配列は、また、当該分野で公知の多くの手段を利用して修飾することができる。このような修飾の非限定的な例としては、メチル化、キャッピング、天然ヌクレオチド一つ以上の同族体への置換及びヌクレオチド間の変形、例えば、荷電されていない接続体 (例えば、メチルホスホナート、ホスホトリエステル、ホスホロアミダイト、カルバメートなど) または荷電された接続体 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど) への修飾がある。

【0042】

本発明のキットは、CRBN遺伝子のmRNA発現レベルまたはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質の発現レベルを確認することにより、肝細胞癌の診断と予後予測に使用することができる。

20

【0043】

本発明の一実施例によると、CRBN遺伝子のmRNA発現レベルを測定するためのキットは、RT-PCRを実施するために必要な必須要素を含むキットであり得る。RT-PCRキットは、マーカー遺伝子に特異的なそれぞれのプライマー対に加えて、テストチューブや他の適切な容器、反応緩衝液、デオキシヌクレオチド (dNTPs)、Taq-ポリメラーゼと逆転写酵素、DNase、RNase阻害剤、DEPC-水 (DEPC-water)、滅菌水などを含むことができる。

【0044】

本発明の他の実施例によると、本発明のキットは、DNAチップを実施するために必要な必須要素を含む、CRBNを検出するためのキットであり得る。DNAチップキットは、遺伝子またはその断片に該当するcDNAがプローブとして付着している基板を含み、基板は、定量対照群の遺伝子またはその断片に該当するcDNAを含むことができる。

30

【0045】

本発明の別の実施例によると、本発明でCRBNによってコードされたタンパク質の発現レベルを測定するためのキットは、抗体の免疫学的検出のために基質、適切な緩衝液、発色酵素または蛍光物質で標識された2次抗体及び発色基質などを含むことができる。上記の基質は、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂で合成された96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂で合成された96ウェルプレート及びガラスのスライドグラスなどが利用することができる。発色酵素はペルオキシダーゼ (peroxidase)、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase) を使用することができる。蛍光物質は、FITC、RITCなどを使用することができる。発色基質液は、ABTS (2,2'-アジノ-ビス- (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) またはOPD (o-フェニレンジアミン)、TMB (テトラメチルベンジジン) などを使用することができる。

40

【0046】

本発明のキットは、本発明で提供される受託番号KCTC18596Pのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体及び/又は受託番号KCTC18598Pのハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体を含むことができる。

【0047】

50

本発明のキットは、分析方法に適した一つ以上の他の構成要素を有する組成物、溶液または装置を追加で含んで構成することができる。

【0048】

本発明の第2の側面は、以下のステップを含む、肝細胞癌の診断のための情報提供方法に関するものである。

(a) 個体から分離された生物学的試料でCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する段階と、

(b) 上記の測定されたレベルを、正常個体から分離された生物学的試料で測定されたレベルと比較する段階

【0049】

本発明の肝細胞癌の診断のための情報提供の方法は、(c) 上記(a)段階の生物学的試料で測定されたmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、正常個体または上記(a)段階の個体の生物学的試料から分離された生物学的試料で測定されたものより高い場合には、肝細胞癌であると判断する段階をさらに含むことができる。

【0050】

本発明において、用語「mRNA発現レベルの測定」とは、生物学的試料でCRBN遺伝子のmRNAの存在有無と発現程度を確認する過程で、mRNAの量を測定することによって知ることができる。そのための分析方法としては、RT-PCR、競合RT-PCR (competitive RT-PCR)、リアルタイムRT-PCR (Real-time RT-PCR)、RNaseプロテクション分析法 (RNase protection method)、ノーザンブロッティング (northern blotting) またはDNAチップ (DNA chip technology) などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0051】

本発明において、用語「タンパク質の発現レベルの測定」とは、生物学的試料でCRBN遺伝子から発現されたタンパク質の存在有無と発現程度を確認する過程で、上記の遺伝子から発現されたタンパク質に対し、特異的に結合する抗体を利用してタンパク質の量を確認することができる。そのための分析方法としては、ウェスタンブロッティング (western blotting)、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、放射免疫測定 (RIA: radioimmunoassay)、放射免疫拡散法 (radial immunodiffusion)、オクタロニー免疫拡散法 (Ouchterlony immunodiffusion)、ロケット免疫電気泳動 (rocket immunoelectrophoresis)、免疫組織化学染色 (immunohistochemical staining)、免疫沈降法 (immunoprecipitation assay)、補体結合反応 (complement Fixation assay)、免疫蛍光法 (immunofluorescence)、イムノクロマト法 (immunochromatography)、FACS分析法 (fluorescenceactivated cell sorter analysis) またはプロテインチップ (protein chip technology) などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0052】

本発明において、用語「生物学的試料」とは、組織、細胞、全血、喀痰、血清、血漿、唾液、脳、皮膚、リンパ節、脊髄、細胞培養上清液、唾液、尿、破裂した真核細胞や細菌の発現系などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの生物学的試料を操作しまたは操作せずに本発明のモノクローナル抗体と反応させて、CRBNタンパク質の存在、または肝細胞癌の診断と予後を予測することができる。

【0053】

本発明の用語「個体」とは、肝細胞癌を発症しているか、発症する可能性があるヒトを含むすべての動物を意味することができる。上記の動物は、ヒトだけでなく、同様の症状の治療を必要とする牛、馬、羊、豚、ヤギ、ラクダ、レイヨウ、犬、猫などの哺乳動物であり得るが、これらに限定されない。

【0054】

本発明の用語「正常個体」とは、肝細胞癌を発症していないか、または発症が疑われていない個体を意味する。

10

20

30

40

50

【0055】

本発明の肝細胞癌の診断のための情報提供の方法において、上記のCRBN遺伝子の発現レベルをmRNAレベルまたはタンパク質レベルで測定することができ、生物学的試料からmRNAまたはタンパク質を分離することは、公知のプロセスを用いて行うことができる。mRNAレベルを測定するための分析方法及びタンパク質のレベルを測定するための分析方法は、上記の説明通りである。

【0056】

本発明の肝細胞癌の診断のための情報提供の方法は、本発明で提供される受託番号KCTC18596Pのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体及び/又は受託番号KCTC18598Pのハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体を利用

10

【0057】

したがって、本発明の一実施例として、本発明は、上記のモノクローナル抗体を用いて肝細胞癌が疑われる個体または肝細胞癌の手術後の予後を確認しようとする個体の分離された生物学的試料のCRBNタンパク質を、抗原-抗体反応により検出する段階を含む、肝細胞癌の診断または予後予測のための情報提供の方法を提供する。

【0058】

本発明の肝細胞癌の診断または予後予測のための情報提供方法は、本発明のCRBNに特異的なモノクローナル抗体を、肝細胞癌が疑われる個体または肝細胞癌患者の分離された生物学的試料と反応させて、抗原-抗体複合体の形成を検出することにより、CRBNタンパク質を検出することができ、これにより肝細胞癌の診断または予後予測のための情報を提供することができる。CRBNは肝細胞癌で過剰発現されているので、正常細胞または周辺の正常組織のような対照群と発現量を比較して肝細胞癌を診断することができ、手術後の予後を予測することができるが、これらに限定されない。

20

【0059】

本発明において、用語「抗原-抗体複合体」とは、試料中のCRBNタンパク質抗原と、これを認識する本発明に係るモノクローナル抗体の結合物を意味し、これらの抗原-抗体複合体の形成は、比色法 (colormetric method)、電気化学法 (electrochemical method)、蛍光法 (fluorimetric method)、発光法 (luminometry)、粒子計数法 (particle counting method)、肉眼測定法 (visual assessment) 及びシンチレーション計数法 (scintillation counting method) からなる群から選択される任意の方法で検出することができる。しかし、必ずしもこれらのみに限定されず、様々な応用と適用が可能である。

30

【0060】

本発明では、抗原-抗体複合体を検出するためのものとして、いくつかの標識体を使用することができる。具体的な例としては、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子、放射性同位元素からなる群から選択することができるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0061】

検出標識体として使用される酵素には、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ラクタマーゼなどが挙げられ、蛍光物にはフルオレセイン、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} キレートまたはクリプテートなどが含まれ、リガンドにはビオチン誘導体などが含まれ、発光物にはアクリジニウムエステル、イソルミノール誘導体などが含まれ、微小粒子には、金コロイド、着色されたラテックスなどが含まれ、放射性同位元素には ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{125}I -ボントン(Bonton)ハンター (Hunter) 試薬などが含まれる。

40

【0062】

好ましくは、抗原-抗体複合体を酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を用いて検出することができる。酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) には、固体支持体に付着した抗原を認識する、標識された抗体を用いる直接ELISA、固体支持体に付着した抗原を認識する抗体の

50

複合体で、捕捉抗体を認識する、標識された二次抗体を用いる間接ELISA、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体で抗原を認識する、標識された別の抗体を利用する直接サンドイッチELISA、固体支持体に付着した抗体と抗原の複合体で抗原を認識する別の抗体と反応させた後、この抗体を認識する標識された二次抗体を用いる間接的サンドイッチELISAなど、様々なELISA方法が含まれている。

【0063】

上記のモノクローナル抗体は、検出標識を有してもよく、検出標識を有さない場合は、これらのモノクローナル抗体を捕捉することができ、検出標識を有する別の抗体を処理して確認することができる。

【0064】

本発明の一実施例では、抗原-抗体反応を利用して、本発明のモノクローナル抗体がCRBNを特異的に認識することを確認しており、このとき、商業的に販売されているCRBNポリクローナル抗体と比較して優れた検出能力があることが確認されたことにより、本発明の抗体は、肝細胞癌の診断または予後予測に有効であることが立証された。

【0065】

本発明の第3の側面は、以下のステップを含む、肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法に関するものである。

(a) 肝細胞癌患者の肝細胞癌組織とその周辺の正常組織から分離された生物学的試料中のそれぞれCRBN遺伝子のmRNAまたはそれから発現されるタンパク質のレベルを測定する段階と、

(b) 上記の各試料で測定されたレベルを比較する段階

【0066】

本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法は、(c) 上記(a)段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定されたCRBN遺伝子のmRNAまたはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものより2倍以上高い場合、不良な予後を有すると判断する段階をさらに含むことができる。

【0067】

本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供の方法において、上記(a)段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定されたCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものよりも2倍以上高い場合、CRBN高発現群に、2倍未満の場合はCRBN低発現群に分類することができ、高発現群の患者から分離された生物学的試料から追加の肝細胞癌バイオマーカーのレベルを確認することにより、予後予測の精度を向上させることができる。

【0068】

そのため、本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法は、具体的には以下のステップをさらに含むことができる。

(d-1) 上記(a)段階の肝細胞癌組織から分離された生物学的試料で測定されたCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベルが、周囲の正常組織から分離された生物学的試料で測定されたものより2倍以上高い場合、CRBN高発現群に分類し、2倍未満の場合はCRBN低発現群に分類する段階と、

(d-2) 高発現群患者及び低発現群患者から分離された血液で、それぞれAFP (α -feto protein) 値を測定する段階と、

(d-3) 高発現群患者から分離された血液で測定されたAFP値が、低発現群の患者から分離された血液で測定された数値より高い場合、高発現患者群の患者が不良な予後を有すると判断する段階

【0069】

本発明の一実施例によると、多数の肝細胞癌患者からCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質の発現レベル及び/又は発現パターンを測定し、測定された値をこれらの患者の予後と共にデータベース化した後、予後が知りたい患者のCRBN遺伝子

10

20

30

40

50

のmRNA、またはそれから発現されるタンパク質のレベル及び/又は発現パターンを、上記のデータベースに入力し予後を予測することができる。この場合、発現レベルまたは発現パターンを比較するための公知のアルゴリズム、統計分析プログラムなどを使用することができる。また、上記のデータベースは、肝細胞癌患者を病理学的病期、治療を受けた治療法などでさらに細分化することができる。

【0070】

本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法において、上記のCRBN遺伝子の発現レベルをmRNAレベルまたはタンパク質レベルで測定することができ、生物学的試料からmRNAまたはタンパク質を分離することは、公知のプロセスを用いて実施することができる。mRNAレベルを測定するための分析方法及びタンパク質のレベルを測定するための分析方法は、上記の肝細胞癌の診断のための情報提供方法で説明した通りである。

10

【0071】

上記の分析方法により、予後が知られている肝細胞癌患者の試料から測定したCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されたタンパク質の発現量と、予後が知りたい患者の試料から測定したCRBN遺伝子のmRNA、またはそれから発現されたタンパク質の発現量を比較することができ、発現量の増減を判断し、肝細胞癌患者の予後を予測するために活用することができる。つまり、発現量を比較した結果、予後が知りたい患者のサンプルが、良好な予後として知られている患者の試料と同様の発現量または発現パターンを示した場合、良好な予後を有すると予測することができ、逆に不良な予後で知られている患者の試料と同様の発現量または発現パターンを示した場合、これは不良な予後を有すると予測することができる。

20

【0072】

したがって、本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供の方法によれば、肝細胞癌患者の予後を正確に予測することができ、予測された予後に応じて適切な治療計画を立てることができるという利点を得ることができる。例えば、良好な予後を有すると判断された患者には、標準的な治療または低侵襲治療（invasive treatment）オプションを追求するように決定することができ、不良な予後を有すると判断された患者については、上位レベルの病期の肝細胞癌患者に使用する治療方法、または非常に積極的もしくは実験的な治療を求めるよう決定することができる。

【0073】

本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法において、用語「良好な予後」は、病期IIに進んでいなかったり、微小血管浸潤が起こらなかったり、手術後の累積腫瘍再発率が低かったり、手術後の生存率が高いことを意味することができる。これとは対照的に、用語「不良な予後」は病期IIに進んだり、微小血管浸潤が起きたり、手術後の累積腫瘍再発率が高かったり、手術後の生存率が低いことを意味することができる。用語「予後が知られている肝細胞癌患者」は、肝細胞癌の診断を受けた患者の中で病気の進行経過が明らかになった患者を意味し、例えば、肝細胞癌による外科手術を受けた後、再発して不良な予後を有すると確定された患者、または外科手術を受けた後に再発せずに生存しているか、完治して良好な予後を有すると確定された患者などである。これらの予後が知られている患者から採取した試料と予後が知りたい患者から採取した試料から、CRBN遺伝子のmRNAまたはそれから発現されるタンパク質の発現レベルまたは発現パターンを得て比較することにより、予後が知りたい患者の予後を正確に予測することができる。

30

40

【0074】

本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法において、「不良な予後」で現れる「病期II」への進行は、世界的に通用している肝細胞癌の病期体系の一つであるAJCC分類によるもので、AJCC分類は、手術患者の予後分類に効率的であることが知られている（Ueno S et al.、Hepatol Res 2002; 24: 395-403）。本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法に基づいて不良な予後を有すると予測された患者は、AJCC分類以外にもUICC/AJCC、Okuda病期、CLIP（Cancer of the Liver Italian Program）病期、French病期、CUPI（Chinese University Prognostic Index）、JIS（Japan Integrat

50

ed Staging) 及びBCLC (Barcelona-Clinic Liver Cancer) 病期分類に基づいて、上位レベルの病期への進行を意味することができる。

【0075】

本発明の肝細胞癌の予後予測のための情報提供方法において、「AFP」はアルファ・フェトプロテインを指し、腫瘍マーカー検査の中で血液（または血清）AFP測定は、最も一般的に使用されている幹細胞癌種の診断検査である。しかし、肝細胞癌は、腫瘍学的多様性と肝硬変を伴う患者の特性により、単一のバイオマーカーが有する予後予測能力には明らか限界があることが知られている。

【0076】

本発明者らは、CRBN単独及びCRBNとAFPを複合的に検出することにより、肝細胞癌の診断と予後予測の精度を高めることができることを確認しており（表3）、これを受けてCRBN単独及びCRBNとAFPの組み合わせを検出することによって肝細胞癌を早期に迅速かつ正確に診断して、手術後の肝細胞癌患者の予後をより正確かつ詳細に予測できる方法を提案した。

【0077】

本発明の第4の側面は、CRBNに特異的に結合するモノクローナル抗体に関するものであり、受託番号KCTC18596Pのハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体及び/又は受託番号KCTC18598Pのハイブリドーマ細胞によって産生される、セレブロン（CRBN）に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【0078】

本発明において、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同一の抗体集団から得られた単一分子組成の抗体分子を指しており、このようなモノクローナル抗体は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性と親和性を示す。典型的には、免疫グロブリンは重鎖及び軽鎖を有し、それぞれの重鎖及び軽鎖は、定常領域及び可変領域（上記部位は、ドメインとしても知られている）を含んでいる。軽鎖と重鎖の可変領域は、相補性決定領域（complementarity-determining region、以下「CDR」という）と呼ばれる3つの多変可能な領域と、4つの構造領域（framework region、FR）を含んでいる。上記のCDRは、主に抗原のエピトープ（epitope）に結合する役割をする。それぞれの鎖のCDRは、典型的にはN末端から始まり、順にCDR1、CDR2、CDR3と呼ばれ、また特定のCDRが位置している鎖によって識別される。

【0079】

一方、上記のモノクローナル抗体は、人に適用するために、免疫原性を低下させたキメラ抗体またはヒト化抗体の形態であり得る。

【0080】

本発明において、用語「キメラ抗体（chimeric antibody）」は、DNA組換え技術によってマウス抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域を組換えた形態の抗体であり、上記のキメラ抗体の免疫反応は、マウス抗体と比較して大幅に改善されるので臨床的に使用することができる。

【0081】

本発明において、用語「ヒト化抗体（humanized antibody）」は、マウスのモノクローナル抗体のCDR配列の全部または一部を、ヒト抗体に移植した形態の抗体を意味し、その例として、マウスのモノクローナル抗体のCDRをヒト抗体由来のFRと組換えしてヒト化可変領域を製造し、これを所望のヒト抗体の定常領域と組換えして製造することができるが、これらに限定されない。また、上記のマウス由来のCDRのみを移植する場合、ヒト化抗体の親和性が低下するので、CDRの3次元構造に影響を与えると思われるFRのアミノ酸残基をマウス抗体のアミノ酸に置換させ、親和性を増進させることができるが、これに限定されない。

【0082】

本発明において、用語「CRBN（cereblon）タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体」は、CRBNタンパク質に結合してCRBNタンパク質の生物学的活性を抑制するこ

10

20

30

40

50

とができる抗体を意味し、本発明では抗-CRBN抗体と混合して使用することができる。

【0083】

本発明のモノクローナル抗体の形態は、上記で説明したように、全体の抗体と抗体の断片の両方を含むことができ、キメラ抗体またはヒト化抗体に変形させることができる。

【0084】

CRBNタンパク質は、細胞内のエネルギーセンサーであるAMPK三量体の中でαサブユニットと直接結合することにより、AMPKのリン酸化（活性化）を抑制することが知られている。本発明者らは、肝細胞癌患者のCRBNの発現が顕著に増加していることを発見し、これを特異的に検出することができるモノクローナル抗体を製造した。本発明のモノクローナル抗体は、CRBNのPep2：C-DMEEFHGRTLHD（配列番号3）、及び/又はPep5：C-DRIKKQLREWDENLKD（配列番号6）の部位に特異的に結合してCRBNの発現量を特異的に検出することができ、特に、肝細胞癌の診断または手術後の予後予測において高い感度と特異性を有するため、肝細胞癌の診断と予後予測に有効に使うことができる。本発明の一実施形態では、CRBNアミノ酸Pep2：C-DMEEFHGRTLHD（63～74 aa）（配列番号3）、Pep4：C-GRQRFKVLRLTQSD（161～175aa）（配列番号5）の部位、またはPep5：C-DRIKKQLREWDENLKD（255～270aa）（配列番号6）の部位を含む融合タンパク質を抗原タンパク質として用いて、本発明のCRBNに特異的に結合するモノクローナル抗体を作製した（実施例1）。

10

【0085】

本発明の一実施例によると、本発明で提供されるモノクローナル抗体は、CRBNに特異的に結合するだけでなく、商業的に販売されているCRBNポリクローナル抗体と比較して著しく強い結合力を有することが確認された。本発明のモノクローナル抗体は、周囲の正常組織よりも肝細胞癌細胞で著しく過剰発現されることを確認しており、CRBN発現が抑制された肝癌細胞株では、癌転移関連のMMP-2及びMMP-9の活性を低下させる一方で、CRBNの過剰発現した肝癌細胞株では、MMP-9の活性をCRBNタンパク質依存的に高めることを確認した。さらに、CRBN発現量に基づいて高発現群と低発現群に分類して臨床的指標を追跡調査した結果、肝細胞癌病期の進行状況、肝細胞癌の手術による生存率、腫瘍再発率を有意な水準で予測できることを確認した。

20

【0086】

本発明の第4の側面に関連して、本発明は、前述したモノクローナル抗体を製造する方法を提供する。

30

【0087】

本発明のモノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体製造技術で容易に製造することができる。例えば、モノクローナル抗体を製造する方法は、免疫を有する動物から得られたBリンパ球を使用してハイブリドーマを製造することによって実施でき（Koeher and Milstein、1976、Nature、256：495）、またはファージディスプレイ（phage display）技術を利用することによって実施できるが、これらに限定されるものではない。

【0088】

本発明のモノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の細胞融合方法によって産生されたハイブリドーマ細胞から得ることができる。一般的に、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞は、抗原タンパク質を注射したマウスのような、免疫学的に適切な宿主動物から得た免疫細胞と癌細胞株を融合することによって作られる。これら2つの細胞の融合は、当業界で公知のポリエチレングリコール（polyethyleneglycol）を利用する方法によって融合させ、抗体産生細胞を標準的な培養方法により増殖させる。限界希釈法（limited dilution）によるサブクロニングを行い、均一な細胞集団を収得した後、抗原に特異的な抗体を産生できるハイブリドーマ細胞を、試験管または生体内で大量に培養する。

40

【0089】

細胞融合に使用される骨髓腫細胞としては、マウス由来のp3/x63-Ag8、p3-U1、NS-1、MPC-11、SP-2/0、F0、P3x63 Ag8、V653、S194、ラット由来のR210など様々

50

な細胞株を使用することができる。本発明の具体的な実施例で使用される細胞株は、骨髄腫細胞SP-2/0である。

【0090】

上記のハイブリドーマ細胞が産生するモノクローナル抗体は、精製していない状態で使用することができ、また、様々な通常の方法、例えば、透析、塩沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィーなどを利用して、高純度に精製して使用することができる。

【0091】

CRBNタンパク質を選択的に認識するモノクローナルを選別するために、通常使用される様々な方法、例えば、放射能免疫法（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫蛍光法（Immunofluorescence）、ウェスタンブロッティング（Western blotting）とフローサイトメトリー分析法などを使用することができるが、これらに限定されるものではない。本発明の具体的な一実施例によれば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって、モノクローナルを選別する。

【0092】

本発明のモノクローナル抗体は、当該技術分野で公知のファージディスプレイ法によって製造することができる。ファージディスプレイ技術を利用した抗体ライブラリーは、ハイブリドーマを作製せず、Bリンパ球から抗体遺伝子を得てファージの表面に抗体を発現させる方法である。ファージディスプレイ技術を利用すれば、B-細胞不死化（immortalization）によってモノクローナル抗体を産生するのに関連する既存の多くの困難が克服することができる。一般的に、ファージディスプレイ技術は、1）ファージの外皮タンパク質（coat protein）pIII（またはpIV）N-末端に該当する遺伝子の部位に、ランダムな配列のオリゴヌクレオチド（oligonucleotide）を挿入する段階；2）天然型の外被タンパク質の一部と上記のランダムな配列のオリゴヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの融合タンパク質を発現させる段階；3）上記のオリゴヌクレオチドによってコードされたポリペプチドと結合できる受容体物質を処理する段階；4）受容体に結合されたペプチド-ファージ粒子を低pHや結合競争力のある分子を用いて溶出させる段階；5）パニング（panning）によって溶出されたファージを宿主細胞内で増幅させる段階；6）希望する量を得るために、上記の方法を繰り返す段階；及び 7）パニングによって選別されたファージクローンのDNA配列から、活性のあるペプチドの配列を決定する段階で構成されている。

【0093】

好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞から製造することができる。

【0094】

本発明のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体、またはファージディスプレイクローンをコードするポリヌクレオチドは、通常の手順を使用して、簡単に単離され、配列を分析することができる。その例として、ハイブリドーマまたはファージ鑄型DNAから、当該重鎖及び軽鎖のコーディング領域を、特異的に増幅させるように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。一度、上記のポリヌクレオチドが単離されると、これを発現ベクター内に入れることができ、その後上記の発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換された宿主細胞（すなわち、形質転換体）から希望するモノクローナル抗体を産生することができる。したがって、本発明の上記のモノクローナル抗体の製造方法は、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを増幅させるステップを含む、モノクローナル抗体の製造方法であり得るが、これらに限定されない。

【0095】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例により制限されると解釈されないことは、当業界で通常の知識を有する者にとって自明である。

【0096】

[実施例1]

セレブロン (CRBN) 抗原の産生

1-1. CRBN配列中の抗原決定ペプチドの選定

配列番号1で示されるヒトCRBNタンパク質配列のうち、モノクローナル抗体の産生に適した抗原ペプチド配列を選定するために、各配列の親水性と疎水性の測定を行った。

【0097】

その結果、配列番号3 (PEP2)、配列番号5 (PEP4) または配列番号6 (PEP5) で示されるペプチド配列に対するモノクローナル抗体の作製の可能性が高いことが分かった。

[配列番号2]

予測 1: C-EDEMEVEDQDSKEAK (28-42aa、16mer)

10

[配列番号3]

予測 2: C-DMEEFHGRTLHD (63-74aa、13mer)

[配列番号4]

予測 3: C-EIYAYREEQDFGIE (140-153aa、15mer)

[配列番号5]

予測 4: C-GRQRFKVLELRTQSD (161-175aa、16mer)

[配列番号6]

予測 5: C-DRIKKQLREWDENLKD (255-270aa、17mer)

【0098】

1-2. 抗原の産生

20

合成されたペプチドは、SMCC (Succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) を利用して、KLH (Keyhole limpet hemocyanin) とBSA (Ban deiraea simplicifolia agglutinin) に接合 (conjugation) させた後、ELISAスクリーニングした。

【0099】

[実施例2]

ハイブリドーマ細胞の作製

2-1. モノクローナル抗体の産生細胞株を製造するためのマウスの免疫

ハイブリドーマ細胞の製造に必要な免疫化されたマウスを得るために、上記の実施例1で製造された組換えCRBN抗原タンパク質PEP2、PEP4及びPEP5 (それぞれ30 µg/µl) を混合してリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) 150 µl に希釈し、同じ体積のフロイント完全アジュバント (complete Freund's adjuvant, Sigma) と混合してエマルジョンを製造した。上記のエマルジョンを3週間隔で4回BALB/C (雌、8週齢) のマウスの腹腔内に200 µl ずつ注射した。4回目の免疫から一ヶ月後、尾静脈に精製された組換えCRBNタンパク質を投与した3日後に、脾臓を摘出し細胞融合に使用した。

30

【0100】

2-2. 細胞融合

まず、細胞融合のために骨髄腫細胞 (myeloma cell) を準備した。骨髄腫細胞であるSP2/O細胞を培養し、細胞密度を $2.5 \sim 5 \times 10^4/\text{ml}$ にした。細胞融合の24時間前に、SP2/O細胞を3分の1に希釈して準備した。

40

【0101】

細胞融合は、ポリエチレングリコールを使用する一般的な方法 (Ed Harlow、David Lane: Antibodies, A laboratory manual. Cold Springs Harbor press、1988 P139-244) に従って次のように実施した。

【0102】

上記の実施例2-1で免疫化されたマウスの血清からELISA法で抗体の力価を確認し、抗体産生力があることを確認した後、免疫化されたマウスをエーテルで麻酔し、胴体の左側に位置する脾臓細胞 (spleen cell) を摘出した。摘出した脾臓から脾臓細胞 (splenocytes) をセルストレーナー (cell strainer) (Falcon、アメリカ) を用いて分離し、 1×10^8 細胞/mlの濃度に希釈した。 1×10^7 細胞/mlの骨髄腫 (myeloma) 細胞と1ml

50

のPEG1500 (Sigma、米国) を混合して融合させた。融合が完了した細胞を200m l のHAT (Sigma、米国) 培地に希釈した後、96ウェルマイクロプレートに100 μ l ずつ分注して、5%炭酸ガスが供給される37℃の培養器で培養した。

【0103】

2-3. モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別及びクローニング

上記の実施例2-2で製造した融合細胞群の中から、CRBNにのみ特異的に反応する融合細胞を選別し、抗体の産生有無を確認するために酵素免疫測定法を用いてスクリーニングした。

【0104】

細胞融合後、8～9日目に培地を交換し、96ウェルから24ウェルまでよく育つまでcDMEM2で培養した。培地を交換した後、5～7日目に変色したウェルの上清液を取り出し、cDMEM2で満たした後、ELISA試験を行った。ELISA試験後、ウェルを選択して24ウェル移し培養した。24ウェルで培養した後、再度ELISA試験を行った。具体的には、24ウェルの融合細胞の濃度を確認し、96ウェルプレートに0.5細胞/ウェルになるように15m l の培養液に融合細胞を希釈した。融合細胞の希釈液を各ウェル当り150 μ l ずつ分注した。顕微鏡で検鏡し、1つの細胞が含まれているウェルをチェックした。細胞がある程度育ったウェルの上清液を取り出し、ELISAとウェスタンブロッティングで確認して、1次スクリーニングを行った。1次スクリーニングに基づいて選択された融合細胞を、24ウェルに移して培養し遠心分離した後、上清液を取り出しELISAとウェスタンブロッティングで確認してから、2次スクリーニングを行った。24ウェルで育てた融合細胞の450 nm吸光度(OD値)をELISAで確認し、吸光度が1を超える融合細胞のみを選択して、25T/C培養フラスコに移して培養し遠心分離した後、上清液を取り出しELISAとウェスタンブロッティングで確認してから、3次スクリーニングを行った。3次スクリーニングに基づいて選択された融合細胞を再度75T/C培養フラスコに移して培養し、ELISAで吸光度を確認して吸光度が1を超える融合細胞のみを選択した。最終的に選択された融合細胞をそれぞれ1D3と4E11と命名し、韓国生命工学研究院遺伝子銀行(KCTC)に、それぞれ2017年08月30日付けで寄託した(受託番号: KCTC18596P(4E11)、KCTC18598P(1D3))。

【0105】

[実施例3]

CRBNに対するモノクローナル抗体の産生と精製

3-1. CRBNに対するモノクローナル抗体の産生

上記の実施例2で選択した最終的なハイブリドーマ細胞(「1D3」と「4E11」)からCRBNに対するモノクローナル抗体を産生するために、7～8週齢の雌Balb/Cマウス腹腔(abdominal cavity)にプリスタン(pristane)500 μ l を注射した。75T/C培養フラスコで培養した融合細胞を回収し遠心分離した後、上清液を除去し、リン酸緩衝液に入れてピペット操作した。プリスタン投与から7～10日後に、上記の実施例2で選択した融合細胞[1D3と4E11]をそれぞれ $8 \times 10^5 \sim 4 \times 10^7$ にしてマウスの腹腔内に注射した。5～7日後、マウスの腹腔内に腹水(ascites)が満水になった時、18G注射針を用いて腹水を抜いた。腹水を4℃で一晩置き、翌日遠心分離して黄色の脂肪層を含む塊状物質を除去し、上清液だけを分離した。分離した上清液は、分注して-20℃で保管した。

【0106】

3-2. CRBNに対するモノクローナル抗体の精製

保存液(20%のエタノール)に保存されているProtein G Fast Flow Bedの適量をカラムに詰め、20%のエタノールを流し出した後、5 Bed Volumeの結合緩衝液(20 mM sodium phosphate、pH 7.0)で洗浄した。腹水液をリン酸緩衝液で適量希釈した後、Protein Gカラムにロードした。3 Bed Volumeの結合緩衝液(20 mM sodium phosphate、pH 7.0)に結合した後、3 Bed Volumeの溶出緩衝液(0.1 M glycine buffer、pH 3.0～2.5)で0.5m l ずつ分画を溶出した。各分画を35 μ l の中和緩衝液(1 M Tris-HCl、pH 9.0)で中和した。70%エタノールで冷蔵温度で一晩置いた後、再び保存液(20%のエタノール)で、次回使用する時まで冷蔵保管した。各分画の純度を確認する

ためにSDS-PAGEを行い、Amersham GEカラムで脱塩（desalting）した。

【0107】

その結果、1130 μ gの腹水液から、1938 μ gのCRBNに対するモノクローナル抗体が、Protein Gカラムによって精製され、GEカラムを利用して塩が除去されたCRBNに対するモノクローナル抗体は、1309 μ gだった。回収率は11.7%であった。

【0108】

[実施例4]

ハイブリドーマ細胞（1D3と4E11）のCRBN抗原に対する結合特異性の実験-ELISA
本発明のハイブリドーマ細胞（1D3と4E11）のCRBN抗原（PEP2、PEP4及びPEP5）の結合特異性を確認するために、ELISA実験により確認した。

【0109】

本発明のハイブリドーマ細胞（1D3と4E11）のCRBN抗原（PEP2、PEP4及びPEP5）の結合特異性をELISAを使用して確認した結果は、下記 [表1]に示した。

【表1】

	PEP2	PEP4	PEP5	対照群
1D3	1.511	0.062	0.229	0.068
4E11	1.270	0.091	0.827	0.079

【0110】

したがって、本発明のハイブリドーマ細胞（1D3と4E11）は、いずれもセレブロン由来ペプチドと結合反応をすることが確認されており、特に4E11クローンは、PEP2及びPEP5と交差反応をすることがわかった。

【0111】

[実施例5]

アイソタイピング（isotyping）によるモノクローナル抗体の選別

上記の実施例3で製造したモノクローナル抗体のアイソタイプ（isotype）の決定のためELISAを実施した。具体的には、ウサギから採取した、それぞれのマウス（mice）のアイソタイプに対する精製抗体を、炭酸塩緩衝液（carbonate buffer、pH 9.4）で10 μ g/ml濃度に希釈した後、Maxisorp ELISAプレート（Nunc、アメリカ）の各ウェル当たり100 μ lずつ添加し、4℃で16時間反応させ、抗体をコーティングした。それぞれのアイソタイプ抗体がコーティングされた各ウェルに1%のBSAが含まれたブロッキング緩衝液（PBS、0.05% Tween-20、1%のBSA、3%熱不活性化ウマ血清）を処理して、37℃で1時間、非特異的反応を遮断した。各ウェルにモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞培養液を50 μ lずつ添加し、4℃で1時間反応させた後、洗浄緩衝液（PBS、0.05% Tween-20、0.05% BSA）で3回洗浄した。洗浄後、1:1000倍に希釈したHRP（Horseradish peroxidase）-縮合 抗-マウスIgG+IgA+IgM抗体（1:2000; Sigma、米国）を各ウェル当たり100 μ lずつ添加し、37℃で1時間反応させた後、洗浄緩衝液で3回洗浄した。洗浄後、TMB（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine）（Sigma、米国）基質溶液を各ウェルに100 μ lずつ添加し、雌牛で30分間反応させ発色させた後、2N H₂SO₄を処理して酵素反応を停止させた。反応後、ELISAリーダー（Perkinelmer Victor X3）を利用して、450nmで吸光度を測定した。その結果を [表2] に示した。

【0112】

下記 [表2] に示したように、アイソタイプを分析した結果、重鎖（heavy chain）のサブクラスに従って分類することができ、4種類のハイブリドーマ細胞から産生されたモノクローナル抗体は、いずれもIgG1/Kappaサブクラスアイソタイプであることが確認できた。

10

20

30

40

50

【表2】

	1D3	4E11
IgG1	2.792	2.412
IgG2a	0.269	0.164
IgG2b	0.064	0.051
IgG3	0.080	0.058
IgA	0.090	0.065
IgM	0.226	0.107
Kappa	2.555	0.606
Lambda	0.082	0.068

10

【0113】

[実施例6]

CRBN発現を確認するための免疫組織化学法 (immunohistochemistry)

ソウル峨山病院の臨床試験審査委員会の承認を受けて、2009年9月から2011年12月まで、ソウル峨山病院の外科で肝細胞癌の手術を受けた患者の中で、AJCC (The American Joint Committee on Cancer) 7版病期IとIIに該当する40人の患者を対象に、ソウル峨山病院のBio-Resource Centerに保管されている手術後の肝組織のうち肝細胞癌組織と周辺の正常肝組織を、それぞれ40件ずつ移送してもらい実験に使用した。

20

【0114】

肝細胞癌組織と周辺の正常肝組織を凍結状態でミクロトームを用いて5 μ mに切った後、室温で30分間、リン酸緩衝液 (1 M Na₂HPO₄ 77.4 ml、1 mM Na₂HPO₄ 22.6 ml、蒸留水900 ml) に入れて、4%のパラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) でスライドに固定した。固定された組織を0.5% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) に5分間透過させ、室温で1時間、2%のNGS (normal goat serum) とPBS (phosphate-buffered saline) に2%のNGS (normal goat serum) を加えた溶液に培養してブロッキング (blocking) した。その後、4℃で一晩、1次抗体 (E-cadherin、1:500、Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA and N-cadherin、1:500、Abcam) と培養した。1次抗体は、フルオレセインイソチオシアネート (FITC, fluorescein isothiocyanate) またはCY3 (cyanin) (Invitrogen社, Carlsbad, CA, USA) で検出し、2次抗体である抗-ウサギ (anti-rabbit、1:500、Invitrogen) または抗-マウス (anti-mouse、1:2000、Invitrogen) と室温で約1時間結合させた。蛍光顕微鏡 (fluorescence microscope, Leica, Heidelberg, Germany) を使用して正常群と肝細胞癌群でのCRBN発現量を比較し、その結果を、図1に示した。

30

【0115】

図1に示したように、肝細胞癌組織と周辺の正常組織の凍結切片に、実施例3で製造したCRBNモノクローナル抗体を使用して、免疫組織化学法で確認した結果、正常肝組織と比較して肝細胞癌組織でCRBNタンパク質の発現が2倍以上増加したことが確認できた。

40

【0116】

[実施例7]

CRBN発現の定量化のためのウェスタンブロッティング (Western blot)

総タンパク質は、30分間-20℃でPro-Prep protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Boca Raton, FL, USA) に溶解し、培養抽出した。ライセートは、4℃で5分間20,217 xgで遠心分離した。タンパク質の濃度は、Standard Bradford Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用して測定した。抽出した60 μ gのタンパク

50

質は、10%SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) で室温80～120 Vの条件で電気泳動し、分離されたタンパク質をPVDF (polyvinylidene fluoride) 膜で4℃260 mAで90分間移動させた後、5%のスキムミルク (skim milk) を使用して室温で1時間固定した。上記の固定させた細胞膜に1次抗体を追加して、4℃で一晩中培養した。1次抗体は、ポリクローナルCRBN抗体 (polyclonal CRBN antibody、Sigma) を5%のスキムミルクに1:1000に希釈し、対照群としてアクチン (Actin、anti-rabbit) は、5%のスキムミルクに1:5000に希釈して使用し、4℃で一晩培養した後、1X TBST (NaCl 8.766 g/Tris-base 1.211 g/Tween20 500 μ l) で20分間3回繰り返し洗浄した。2次抗体として抗-マウス (anti-mouse) を5%のスキムミルクに1:2000に希釈して、室温で2時間培養した後、1X TBSTで20分間3回繰り返し洗浄し、タンパク質バンドをECL (electrogenenerated chemiluminescent) 試薬 (Millipore、Billerica、MA、USA) を使用して視覚化した。適切なバンドの密度は、Bio-Rad GS-670 imaging densitometerの反射率濃度測定で分析した。

10

【0117】

その結果、図2に示したように、周囲の正常肝組織 (N) と比較して肝細胞癌組織 (T) でCRBN発現量が高いことが分かった。

【0118】

ウェスタンブロッティング分析で、CRBNが周囲の肝組織と比較して肝細胞癌組織で2倍以上高く測定された場合、CRBN発現のカットオフ値 (cut-off value) として定義し、CRBN高発現群と低発現患者群に分類した。

20

【0119】

[実施例8]

臨床データの収集及び有意性の分析

研究対象の患者40人に対して医療記録を遡及的に調査した。手術当時の患者の年齢、性別、手術名、手術前のICG値、B型肝炎表面抗体の有無、手術前のAFPとPIVKAを調査した。手術後の組織検査をもとに、肝硬変の有無、肝細胞癌の大きさと数、微小血管浸潤の有無、病期を調査した。手術後の無病期間、再発の有無、生存期間及び生存の有無を調査した。

【0120】

まず、CRBNタンパク質の発現の程度に応じた臨床指標と、手術後の再発及び生存の有無を比較した。カテゴリ変数については、カイ二乗検定 (Chi-Square test) を使用し、連続変数は、スチューデントt-検定 (Student's t-test) で比較した。再発率と生存率は、カプラン-マイヤー法 (Kaplan-Meier method) を使用し、ログランク検定 (Log-rank test) で比較した。p値 0.05以下の場合、統計的有意性があると判定した。

30

【0121】

研究対象の患者の臨床的及び病理学的特性は、下記の[表3]にまとめた。上記の実施例7のウェスタンブロッティング分析で、肝細胞癌で周囲の組織より2倍以上のCRBNが発現した患者 (CRBN高発現群) は19人 (47.5%) で、CRBNが2倍未満に発現した患者 (CRBN低発現群) は21人 (52.5%) と同様に現れた。

【0122】

40

【表3】

CRBN発現量に応じた臨床病理学的特徴

		CRBN 高発現N=19 (47.5%)	CRBN 低発現N=21 (52.5%)	p値	
患者の平均年齢、y、範囲		56.3±5.7	53.1±7.5	0.25	
性別（男/女）		16/3	15/6	0.94	
肝硬変の発生数、n（%）		15（78.9）	20（95.2）	0.120	
HBsAg（+）、n（%）		19（100）	20（95.2）	0.335	
手術前のICG-R15、%、平均		15.3±6.2	16.4±5.4	0.692	
手術名、n（%）				0.755	
	肝右葉切除術	2（10.5）	1（4.8）		
	肝左葉切除術	1（5.3）	2（9.5）		
	肝右葉前区域切除術	5（26.3）	4（19）		
	肝右葉後区域切除術	4（21.1）	8（38.1）		
	肝左葉外側区域切除術	1（5.3）	1（5.3）		
	肝左葉内側区域切除術	0（0）	1（4.8）		
	肝部分切除術	6（31.6）	4（19）		
腫瘍マーカー（手術前）					
	AFP、平均 ng/mL		929.9 ± 1595.8	198.1 ± 370.8	0.001
	PIVKA II、平均 mAU/mL		1988.9 ± 4676.2	649.8 ± 1510.7	0.052
平均腫瘍サイズ、cm	4.3±2.3	3.6±1.6	0.278		
平均腫瘍の数、n	1（100）	1（100）			
AJCC病期、n（%）			0.005		
	I期		13（68.4）	21（100）	
	II期		6（31.6）	0（0）	
微小血管浸潤（+）、n（%）	6（31.6）	0（0）	0.005		
BCLC病期、n（%）			0.087		
	0期		0（0）	3（14.3）	
	A期		19（100）	18（85.7）	
腫瘍の再発回数、n（%）	14（73.7）	10（47.6）	0.093		
HCC-関連死亡者数、n（%）	10（52.6）	4（19）	0.026		

【0123】

CRBN高発現群と低発現群の患者を比較したとき、性別及び手術当時の年齢、肝硬変の程度、B型肝炎表面抗体、ICG-R15の値は、両群間に統計学的差異はなかった（ $p > 0.05$ ）。手術後の組織検査で発見された腫瘍の大きさは、両群の間に差はなかったが（ $p = 0.278$ ）、CRBNの発現が高い患者群で病期IIに該当する患者が有意に多かった（ $p = 0.005$ ）。肝細胞癌の診断マーカーであるAFPは、CRBNが高く発現された患者で有意に高く測定されており（高発現群 929.9 ± 1595.8 ng/mL；低発現群 198.1 ± 370.8 ng/mL、 $p = 0.001$ ）、PIVKA-IIの場合、CRBN高発現患者群で高く測定されたが、統計学的差異は見られなかった（高発現群 1988.9 ± 4676.2 mAU/mL；低発現群 649.8 ± 1510.7 mAU/mL、 $p = 0.052$ ）。CRBNが低く発現された患者群では、組織学的に肝細胞癌の微小血管浸

潤 (microvascular invasion) が発見されなかったが、CRBNが高く発現された患者群では31.6%が発見された ($p = 0.005$)。

【0124】

このことから、肝細胞癌患者のCRBN発現程度は、肝細胞癌の診断マーカーのAFP発現量、AJCC病期II期への進行状況、微小血管浸潤の有無、生存の有無と有意な関係があることが分かった。

また、AJCC 7版病期IとIIに基づいて分類した患者の臨床病理学的特性を比較して下記[表4]にまとめた。

【0125】

幹細胞癌診断マーカーであるAFPとPIVKA-IIのいずれも、病期IIの患者で有意に高いレベルで測定されており ($p = 0.000$)、病期Iの患者では、CRBN低発現患者 (61.8%) の方が多かったが、病期IIの患者はすべてCRBNタンパク質高発現群であることが分かった ($p = 0.005$)。

【表4】

		I期N=34 (85%)	II期N=6 (15%)	p値
患者の平均年齢、y、範囲		55.7±6.6	49.8±5.8	0.466
性別 (男/女)		25/9	6/0	0.152
肝硬変、n (%)		29 (85.3)	6 (100)	0.315
HBsAg (+)、n (%)		33 (97.1)	6 (100)	0.671
平均ICG R15、%、範囲		15.8±5.5	16.3±7.6	0.354
手術名、n (%)				0.215
	肝右葉切除術	1 (2.9)	2 (33.3)	
	肝左葉切除術	2 (5.9)	1 (16.7)	
	肝右葉前区域切除術	8 (23.5)	1 (16.7)	
	肝右葉後区域切除術	11 (32.4)	1 (16.7)	
	肝左葉外側区域切除術	2 (5.9)	0 (0)	
	肝左葉内側区域切除術	1 (2.9)	0 (0)	
	肝部分切除術	9 (26.5)	1 (16.7)	
腫瘍マーカー (手術前)				
	AFP、平均ng/ml	264.4±539.8	2140±2296.7	0.000
	PIVKA II、平均mAU/mL	687.9±1512.3	4674±7754.1	0.000
平均腫瘍サイズ、cm		3.7±1.5	4.9±3.6	0.004
平均腫瘍の数、n		1 (100)	1 (100)	
CRBN発現、n (%)				0.005
	高発現	13 (38.2)	6 (100)	
	低発現	21 (61.8)	0 (0)	
BCLC病期、n (%)				0.449
	0期	3 (8.8)	0 (0)	
	A期	31 (91.2)	6 (100)	
腫瘍の再発回数、n (%)		19 (55.9)	5 (88.3)	0.206
HCC-関連死亡者数、n (%)		11 (32.4)	3 (50)	0.403

【0126】

[実施例9]

CRBN発現量に応じた予後予測の可能性の分析

上記の実施例7で分類したCRBN高発現群とCRBN低発現群を対象に、肝細胞癌の手術後の累積腫瘍再発率と生存率を比較した。

【0127】

その結果、図3に示したように、CRBN高発現群が低発現群と比較して累積腫瘍再発率が有意に高く（図3の（A）、 $p = 0.017$ ）、患者の生存率が有意に低かった（図3の（B）、 $p = 0.025$ ）。

【0128】

CRBNタンパク質の発現量の差が、手術後の肝細胞癌の予後予測にどれくらい効率的なのか確認するために、肝細胞癌病期の進行状況を決定する微小血管浸潤の有無による、肝細胞癌の手術後の累積腫瘍再発率と生存率を比較した。その結果、図4に示したように、微小血管浸潤の有無による累積腫瘍再発率（ $p = 0.114$ ）と患者の生存率（ $p = 0.334$ ）の両方に有意な差は見られなかった。

【0129】

このことから、患者の手術後の予後を予測する上でCRBNタンパク質の発現量は、病期I、II期の単一肝細胞癌を患っている患者にとって伝統的に最も重要な予後因子である微小血管浸潤より、優れた予測力を有することが確認できた。

【0130】

[実施例10]

既存の細胞株を用いたCRBNタンパク質発現の検証

10-1. 細胞株別CRBN発現量とMMP-2、MMP-9活性の比較

互いに異なる肝細胞でCRBN発現量を比較するために、上記の実施例6の方法で3つの細胞株のウェスタンブロッティング分析を行った。実験対象の細胞株は以下の通りである。

i) Chang Liver (HeLa derivative) cell line (Sigma-Aldrich) : HeLaに由来する正常肝細胞に似た細胞株

ii) HepG2 cell line (Korean Cell Line Bank) : 15歳の男性の肝芽腫 (hepatoblastoma) から得たもので、ヒトの肝モデルの研究に最も代表的な細胞株

iii) Hepa1c1c7 cell line (CRL-2026) : マウス由来の肝癌細胞株

その結果、図5の（A）に示したように、人の正常肝細胞株であるChang Liver、人の肝芽腫細胞株であるHepG2、マウスの肝癌細胞株であるHepa1c1c7で、それぞれCRBNの発現を確認しており、正常細胞のChang Liverより腫瘍細胞のHepG2とHepa1c1c7でCRBN発現量が増加した。このことから、正常の肝細胞より肝癌細胞でCRBN発現量が増加することを確認した。これはCRBNタンパク質の発現が細胞の癌化過程または癌化が進行した後に発現が増加したものだと考えられる。

【0131】

また、これらの細胞株の腫瘍特性を確認するために、各細胞株で癌の転移関連のタンパク質であるMMP-2とMMP-9の活性分析を行った。その結果、図5の（B）に示したように、CRBNタンパク質の発現量が高かった肝細胞癌細胞株（HepG2、Hepa1c1c7）で、癌転移関連のタンパク質であるMMP-9の活性が増加したことが分かった。

【0132】

10-2. CRBN発現量の変化によるMMP-2、MMP-9活性の変化

CRBNの発現量と癌転移タンパク質の活性の変化を確認するために、CRBNタンパク質発現を抑制、または過剰発現させた後、MMP-2及びMMP-9の活性を確認した。

【0133】

具体的には、siRNA CRBN（251、ジェノルション）またはHa-CRBN（pCDNA 3、ジェノルション）を利用し、それぞれのヒトの肝癌細胞株（HepG2）とヒト由来の肝細胞癌の一次培養細胞にトランスフェクション（transfection）させた後、24時間後にウェスタンブロッティング分析を使用しCRBNタンパク質の発現量の変化を調べた。ゼラチン・ザイモグラフィ（Gelatin zymography）は、ゼラチンを含有したポリアクリルアミドゲル（polyacrylamide gel）上で電気泳動すると、組織に含まれているタンパクの分解酵素によってゲル内のゼラチンが分解され、ゲルの染色後には透明な帯になって残る現象を利用した手法であって、MMP-2及びMMP-9の場合、72 kDaと95 kDaを同時にゲル上で確認できるため、MMP-2及びMMP-9が活性化したかどうかを簡単に確認することができる。1%のゼラチン（Sigma、USA）が含まれている10%のSDS-ポリアクリルアミド

10

20

30

40

50

ゲル (8×10 cm) を作り、対照群と一緒に試料10 μ l に3×ローディングバッファー[pH 6.8、62 mM Tris-HCl、2 % SDS、10 % glycerol、0.05 % bromphenol blue] 5 μ l を混合した試料15 μ l をゲルにロードし、Vertical Electrophoresis Unit (Hoefer、USA) で100 V4時間、電気泳動した。ゲルを2.5 % Triton X-100溶液で30分間2回洗浄した後、コラゲナーゼバッファー[50 mM Tris、5 mM CaCl₂、1 % Triton X-100]を入れて37℃振とう機に入れて反応させた。24時間後、ゲルを2.5 % Triton X-100溶液で1回洗浄した後、クマシー・ブルー(Coomassie Blue) 溶液[1 % Coomassie brilliant blue R250、30 % methanol、10 % acetic acid]で2時間染色し、脱色溶液[30 % methanol、10 % acetic acid]で30分間、2回脱色させてゲルを観察した。

【0134】

その結果、ヒトの肝芽腫細胞株であるHepG2にsiRNA CRBNを処理してCRBNの発現を阻害した時(図6の(A))、癌転移酵素であるMMP-2及びMMP-9の活性が低下した(図6の(B))。これは肝癌細胞株でCRBNタンパク質が肝細胞癌の転移に関連するタンパク質であるMMP-2及びMMP-9の活性を調節することを意味する。

【0135】

逆に、ヒト由来の肝細胞癌から分離した一次培養細胞にHA-CRBN (pCDNA 3) を導入してCRBNタンパク質を過発現させた場合(図7の(A))、CRBN発現量の増加に応じてMMP-9の活性が増加することを確認した。一方、MMP-2は、CRBN過剰発現の有無とは関係なく、有意な増加を確認することができなかった(図7の(B))。

【0136】

このような結果を総合して見ると、正常または肝癌細胞株及び一次培養癌細胞の生体外(in vitro) 実験で、正常肝細胞と比較して、肝癌細胞でCRBNタンパク質の発現が有意に増加しており、このように増加したCRBNタンパク質が癌転移関連のMMP-9の活性の調節に関与することが分かる。

【0137】

[実施例11]

CRBNノックダウン(Knock down) 一次肝細胞癌の細胞株を用いた腫瘍の成長の確認
生体内(in vivo) でCRBN発現による腫瘍の成長の変化を確認するために、shRNA CRBN (251、ジェノルション) を利用して、CRBNがノックダウンされた一次肝細胞癌の細胞株(CRBN KD-HCC) を確立し、このような肝細胞癌細胞株をNudeマウスに移植した後、CRBN WT-HCCを移植したマウスと比較し観察した。

【0138】

図8に示したように、CRBN KD-HCCを移植したマウスの腫瘍の体積が、CRBN WT-HCCを移植したマウスの腫瘍の体積より有意に減少したことを確認し、これらの結果を使用してCRBNの発現が腫瘍の成長に影響を与えることがわかる。

【0139】

本発明をサポートした国家研究開発事業は、下記の通りである。

(1) [この発明をサポートした国家研究開発事業]

[課題固有番号] 2018R1D1A1A02049905

[部署名] 韓国研究財団

[研究管理専門機関] 韓国研究財団

[研究事業名] 理工分野の基礎研究事業

[研究課題名] 多発性骨髄腫で免疫調節薬のcereblon依存的抗癌メカニズムの研究

[寄与率] 1/2

[主管機関] 蔚山大学産学協力団

[研究期間] 2018.05.01~2021.04.30

(2) [この発明をサポートした国家研究開発事業]

[課題固有番号] NCCR-HA16C0014010019

[部署名] 保健福祉部

[研究管理専門機関] 国立がんセンター

10

20

30

40

50

[研究事業名] がん征服推進研究開発事業

[研究課題名] 多発性骨髄腫の治療の際、セレブロンタンパク質発現による治療薬の選別基準の研究

[寄与率] 1/2

[主管機関] 蔚山大学産学協力団

[研究期間] 2016.05.01～2019.04.30

寄託機関名：韓国生命工学研究院

受託番号：KCTC18596P

受託日付：20170830

寄託機関名：韓国生命工学研究院

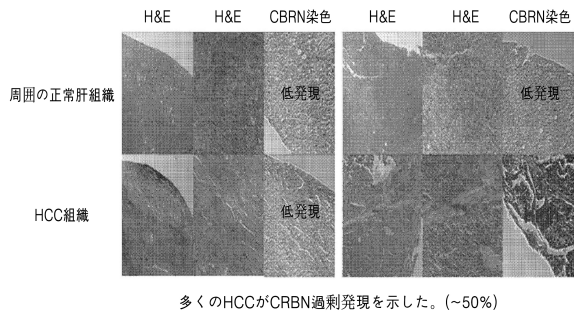
受託番号：KCTC18598P

受託日付：20170830

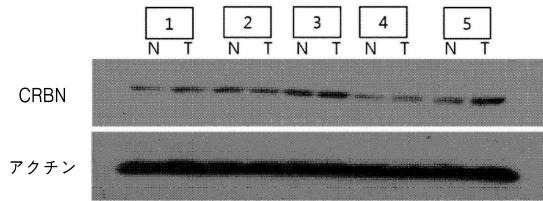
10

【図面】

【図 1】



【図 2】



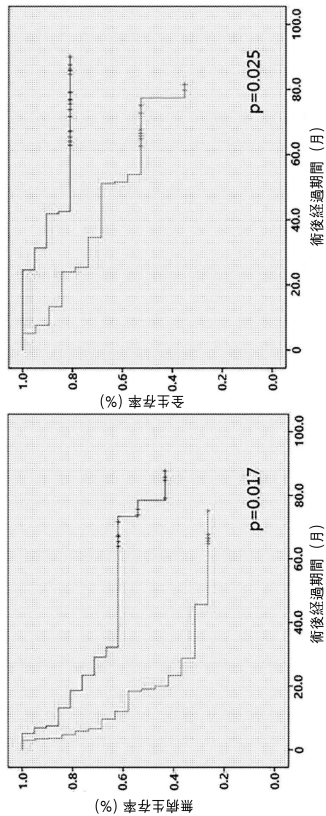
20

30

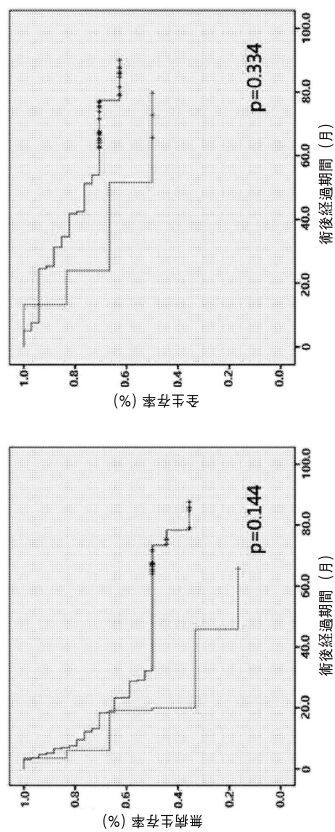
40

50

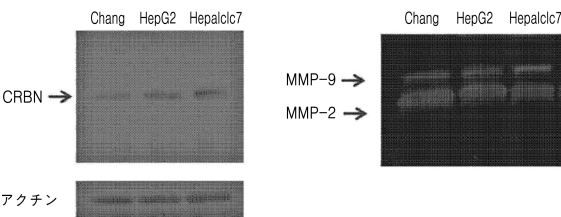
【図 3】



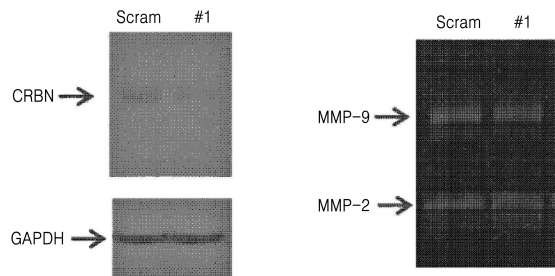
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

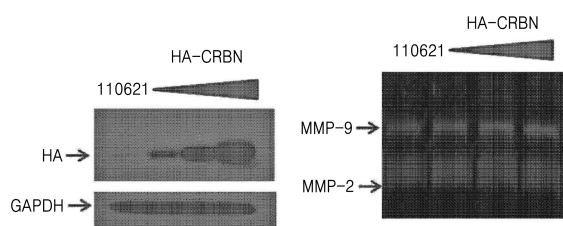
20

30

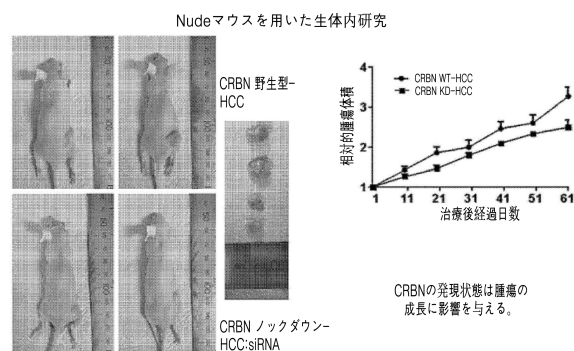
40

50

【圖 7】



【圖 8】



【圖 9】

1
 ヒト MAGEG000A AHMIGNH1PL LPAESSEED--EIEVEGD00 SKEARPNII NFDTSLPTSH TYLGA MEEF HGRTHOODS
 マウス MAGEG000A AHMIGNH1PL LPAESSED E0 EIEVEGD00 SKEARPNII NFDTSLPTSH TYLGA MEEF HGRTHOODS
 予測 2

81
 ヒト C0V1PVLPEV IMILIPG0TL PQLQHPREV SNMRNL0KD RITFAVLAYSN VOEREAFGT TEIYAYREE Q0FGIE MKV
 マウス C0V1PVLPEV IMILIPG0TL PQLSHP0EV SNMRNL0KD RITFAVLAYSN VOEREAFGT TEIYAYREE Q0FGIE MKV
 予測 1

161
 ヒト KA1P0QHFHY LELRTGSD1 Q0AKV01LPE C0LPSTMSAV QLESIN001 FFSKPVSGRED QCSYNNW0KY QKQKHFCAHL
 マウス KA1P0QHFHY LELRTGSD1 Q0AKV01LPE C0LPSTMSAV QLESIN00V FFSKPVSWED QCSYNNW0KY QKQKHFCAHL
 予測 3

241
 ヒト TSINPRM1YLS YDAETLMIRI KQQLREWDEN LK0LSLSPNP IDFSVRVAAC LP1DDVLR10 LLK1GSA10R LRCELD1M1KK
 マウス TSINPRM1YLS YDAETLMIRI KQQLREWDEN LK0LSLSPNP IDFSVRVAAC LP1DDVLR10 LLK1GSA10R LRCELD1M1KK
 予測 4

321
 ヒト CTSLCK0C0Q ETE1ITKN1E1 FSLSL0GPM AYNPHGYVH ETLTVKACN LNL1IGRPSTE HSWFPGVAYT VAQCK1CASH
 マウス CTSLCK0C0Q ETE1ITKN1E1 FSLSL0GPM AYNPHGYVH ETLTVKASN LNL1IGRPSTV HSWFPGVAYT VAQCK1CASH
 予測 5

401
 ヒト IQWKFATYK DMSPOKEFWL TRSALPTTIP OTEDE1SP0K VILCL
 マウス IQWKFATYK DMSPOKEFWL TRSALPTTIP ETEDE1SP0K VILCL
 445

【配列表】

0007300687000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

F I

C 0 7 K 16/18

、 2 3 0 3 - 3 0 1 (ブンサンードン ミサ ガンビョン ザ シャープ セントラル フォア)

(72)発明者 ファン シン

大韓民国 0 5 5 0 4 ソウル ソンパーグ、オリンピックーロ 3 5 -ギル、1 0 4、6 -1 4 0
7 (シンチョンードン ジャンミ アパート)

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 3 3 7 2 7 (J P, A)

J.Med.Chem., 2019年, 62, 2508-2520

Pflugers Arch Eur J Physiol, 2016年, 468, 1299-1309

Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2016年, 24,10, 695-702

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 Q 1 / 6 8 - 1 / 6 8 9 7

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

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

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

P u b M e d