(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 12 月 31 日(31.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/208157 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058148

(22) 国際出願日: 2014 年 3 月 18 日(18.03.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2013-136784 2013 年 6 月 28 日(28.06.2013) JP

(71) 出願人: 栄研化学株式会社(EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1108408 東京都台東区台東４丁目１９番９号 Tokyo (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 関 泰宏(SEKI, Yasuhiro); 〒3290114 栃木県下都賀郡野木町野木１４３ 栄研化学株式会社 野木事業所内 Tochigi (JP). 柴田 典緒(SHIBATA, Norio); 〒3290114 栃木県下都賀郡野木町野木１４３ 栄研化学株式会社 野木事業所内 Tochigi (JP). 浅島 誠(ASASHIMA, Makoto); 〒3058562 茨城県つくば市東１－１－１ 中央第４ 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 栗崎 晃(KURISAKI, Akira); 〒3058562 茨城県つくば市東１－１－１ 中央第４ 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2014/208157 A1

(54) **Title**: NOVEL LUNG-CANCER MARKER (PRDX4)

(54) 発明の名称 : 新規肺癌マーカー（PRDX4）

(57) **Abstract**: The first problem addressed by this invention is the provision of a novel lung-cancer marker. The second problem addressed by this invention is the provision of a lung-cancer marker that exhibits a high detection efficiency. The third problem addressed by this invention is the provision of a lung-cancer marker that is capable of identifying lung-cancer type (histological type). This invention resulted from the discovery that PRDX4 (peroxiredoxin 4) is expressed more in multiple lung-cancer-derived cell lines than in normal lung-derived epithelial cells, indicating a high probability that lung cancer results in PRDX4 hyperexpression.

(57) 要約: 本願発明は、新規な肺癌マーカーを提供することを第１の課題とする。また、本願発明は、検出効率が高い肺癌マーカーを提供することを第２の課題とする。更に、本願発明は、肺癌の種類（組織型）を特定することができる肺癌マーカーを提供することを第３の課題とする。 本願発明者らは、PRDX4（peroxiredoxin 4）は複数の肺癌由来細胞株で正常肺由来上皮細胞と比較して発現が亢進し、肺癌において高発現している可能性が高いことを見出し、本願発明を完成させた。

明 細 書

発明の名称

新規肺癌マーカー（PRDX4）

技術分野

本願発明は、癌の診断を補助する臨床検査薬の技術分野に関する。更に、本願発明は、肺癌検出用の肺癌マーカーに関する。

背景技術

肺癌は早期発見が困難でその5年生存率は20%に満たない予後不良な疾患の一つである。しかし、Stage IA、IBの早期肺癌に限ればその5年生存率は70%程度と大幅に上昇する。肺癌の種類（組織型）は病理学的にはその形態から小細胞性肺癌及び非小細胞性肺癌に分類され、後者はさらに扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌に分類されている。肺癌マーカーとして現在良く使用されているものには、CYFRA21-1、CEA、SLX、SCC、ProGRP、NSEなどがある。CEAはもっとも一般的な腫瘍マーカーであり、SLXは腺癌に特異性が高い。CYFRA21-1やSCCは扁平上皮癌に特異性が高いとされ、ProGRPやNSEは小細胞癌に特異性が高いといわれている。

また、例えば、特許文献1には、従来からのCYFRA 21-1、CEA、NSE、SCC等のマーカーと組み合わせてNNMTを用いると感度が向上することを報告している。非特許文献1には、糖鎖を利用した肺癌マーカーが報告されている。

先行技術文献

特許文献

特許文献1　特表2009-545731号

非特許文献

非特許文献1　実験医学増刊 Vol.25 No.17 「肺癌における糖鎖標的腫瘍マーカーの探索」植田幸嗣，醍醐 弥太郎，中村祐輔

発明の概要

CEA 等、臨床で使用されているマーカーは早期肺癌の検出率は 30%程度であり、より高感度な新規マーカーが望まれている。そこで本願発明は、新規な肺癌マーカーを提供することを第１の課題とする。また、本願発明は、検出効率が高い肺癌マーカーを提供することを第２の課題とする。更に、本願発明は、肺癌の種類（組織型）を特定することができる肺癌マーカーを提供することを第３の課題とする。その上、他の肺癌マーカーと組み合わせることにより、検出効率及び／又は検出特異性を向上させることができる肺癌マーカーを提供することを第４の課題とする。

本願発明者らは、PRDX4（peroxiredoxin 4）は複数の肺癌由来細胞株で正常肺由来上皮細胞と比較して発現が亢進し、肺癌において高発現している可能性が高いことを見出し、本願発明を完成させた。

さらに本願発明者らは、肺癌組織マイクロアレイを用いた免疫組織染色の結果、PRDX4 は肺腫瘍組織で染色が見られたが間質組織では染色が見られず、臨床サンプルのタンパク質レベルにおいても肺腫瘍組織での発現が亢進することを明らかにした。PRDX4 タンパク質の発現を肺癌の組織型別に見てみると、肺腺癌で７０％、細気管支肺胞上皮癌で９０％と高い陽性率を示した一方で、肺扁平上皮癌及び大細胞癌で４０％、小細胞癌で２０％と陽性率は低く、ＰＲＤＸ４タンパク質が非小細胞肺癌で特異的に発現するタンパク質であることを見出した。これらの知見に基づき、本願発明者らは、肺癌の組織型を特定するマーカーを提供する。

本願発明は、新規な、高い信頼性の肺癌マーカーを提供するという優れたものである。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2013-136784 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１は、肺癌マーカーの肺癌細胞株における発現を示す。

図２は、肺癌マーカーPRDX4 の肺癌組織における発現を示す。

図３は、PRDX4 の発現を肺癌組織型別に観察した結果を示す。

図４は、健常人とがん患者における PRDX4 の血清中の検出量を示す。

発明を実施するための形態

１．はじめに

本願発明者らは、肺癌で発現が有意に高いと予想される候補遺伝子をまず選抜し、その候補遺伝子の中から、複数の肺癌由来細胞株で正常肺由来上皮細胞と比較して発現量が高いものを更に選抜し、本願発明を完成させた。

２．肺癌マーカー遺伝子

本願発明者らは、肺癌マーカーとして、PRDX4（peroxiredoxin 4）遺伝子を同定した。

PRDX4 の遺伝子配列としては、配列番号１で表される配列が例示できる。また PRDX4 によりコードされるアミノ酸配列としては、配列番号２で表される配列が例示できる。

以下の実施例に示されるとおり、上記遺伝子は、複数の種類の肺癌由来細胞株で、正常肺由来細胞と比較して発現が亢進していたことが確認されている。

３．肺癌マーカー遺伝子の発現の確認

遺伝子発現の確認には、当該遺伝子の ｍＲＮＡ又は当該遺伝子がコードする蛋白質を検出する周知の方法を用いることができる。mRNA の存在を確認する方法としては、例えば、LAMP 法、PCR 法、マイクロアレイ法などを用いることができる。蛋白質の確認方法としては、免疫染色法、ELISA 法などの抗体を用いる方法などを用いることができる。

４．肺癌マーカーを用いた、肺癌細胞の存在を確認する方法及び肺癌診断を補助する方法

４－１．サンプル

肺癌細胞の存在を確認する方法に使用するためのサンプル（試料）としては、任意の試料を用いることができるが、好適には被験者からの採取物、具体的には、任意の採取された体液、生検された試料を挙げることができ、特に好適には、被験者の肺疾患部の生検試料または喀痰試料を挙げることができる。

４－２．サンプル中のｍＲＮＡの検出法並びにそのための試薬及びキット

例えば、生検試料は、細胞を、例えば、界面活性剤、ホモジナイザー、又はフ

リーズソーイングなどの定法により、破砕し、全RNAを抽出することができる。目的のmRNAの定量には、LAMP法、ディファレンシャルディスプレイ法やDNAアレイ（DNAチップ）を用いる方法、定量PCR法、リアルタイムPCR法、コンペティティブPCR法を利用することができる。

例えば、リアルタイムPCR法では、マーカー遺伝子の増幅産物の生成をリアルタイムでモニタリングし、解析する方法があげられる。前記リアルタイムモニタリング試薬としては、例えば、ＳＹＢＲＧｒｅｅｎ Ｉ、ＴａｑＭａｎプローブ等が挙げられる。

また、コンペティティブＰＣＲ法としては、例えば、細胞内の全ＲＮＡやｍＲＮＡから逆転写酵素を用いてｃＤＮＡを調製し、当該ｃＤＮＡ及びＤＮＡコンペティターを同一チューブ内で反応させる方法や、さらに前記逆転写反応時にｍＲＮＡ とともにＲＮＡコンペティターを加えて反応させる方法等があげられる。またコンペティターのプライマー配列以外の内部配列としては、例えば、増幅目的ｍＲＮＡの配列と相同配列でもよく、非相同な配列でもよい。

また、リアルタイムPCR法を利用する場合について、より具体的に例示すると、全抽出RNAからOligo dTプライマーを用いて逆転写反応で、cDNAを調製し、これをリアルタイムPCRで計測することができる。RNA抽出には、例えば、ISOGEN法（ニッポンジーン）を用いることができる。また、逆転写法には、例えば、PrimeScript(R) II 1st strand cDNA Synthesis Kitを用いることができる。リアルタイムPCRには、例えば、THUNDERBIRD（商標） SYBR Mix（TOYOBO社）やTaqManプローブなどを用いて増幅産物を測定することができる。

また、PRDX4の配列又は同配列に１から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列に相補的な配列の標識したプローブによるハイブリダイゼーション方法も含まれる。

なお、プライマーとしては、肺癌マーカー遺伝子であるPRDX4をPCR法などの遺伝子増幅方法で増幅できるプライマーであれば、いずれのプライマーでもよい。例えば、配列番号１で示される配列又は同配列に１から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列について、その配列の任意の連続する15塩基長以上の塩基、好ましくは16－30塩基長、より好ましくは、18～28塩基長からなるプラ

イマーを使用することができる。具体的には、以下の表１に記載のものを用いることができる。

表１

PRDX4	forward	CGTCTCGGTGGACTCTCAGT
	reverse	TCAGACAAGCGTCTGGTCAC

また、ディファレンシャルディスプレイ法やDNAアレイ（DNAチップ）を用いることもできる。

更にハイブリダイゼーション法には、配列番号１で示される配列又は同配列に１から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列に相補的な配列の標識したプローブを用いることができる。

プローブの標識としては、例えば、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、酵素などを挙げることができる。放射性同位元素としては、例えば、〔３２Ｐ〕、〔３３Ｐ〕、〔１２５Ｉ〕、〔１３１Ｉ〕などを用いることができる。蛍光物質としては、例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレスカミン、ローダミンなどを用いることができる。酵素としては、例えば、標識として常用される、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが挙げられる。

４－２－１．

上記ｍＲＮＡ検出方法を実施するためのキットとしては、例えば、（１）PRDX4（peroxiredoxin 4）肺癌マーカー遺伝子をLAMP法などの遺伝子増幅方法で増幅できるプライマー又は１組のプライマー(プライマーセット）を含むキット、（２）一例を挙げれば、表１に掲げた１組のプライマー(プライマーセット）を含むキットが挙げられる。

４－３．サンプル中のタンパク質の検出方法

本願発明では、マーカー蛋白質の検出法として、例えば、抗体を用いて検出する方法や質量分析法などマーカー蛋白質を特異的に検出できる方法であればいかなる方法を用いても良い。抗体を用いる方法では、上記PRDX4遺伝子によりコー

ドされるタンパク質に対する抗体は、既に市販されているものを利用しても良いが、定法により調製してもよい。抗体を用いるマーカー蛋白質の検出法としては、免疫染色法、免疫蛍光法、各種のエンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）・酵素結合免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、二重モノクローナル抗体サンドイッチイムノアッセイ法、モノクローナルポリクローナル抗体サンドイッチアッセイ法、ウェスタンブロッティング法、ビオチンーアビジン法、免疫沈降法などを挙げることができる。

４－３－１．

例えば、上記４．３のタンパク質検出方法を実施するためのキットとしては次のようなものが挙げられる。

（１）（ｉ）酵素標識化モノクローナル抗体及び（ｉｉ）基質溶液

サンドイッチＥＬＩＳＡ法を実施するためのキットとしては下記の試薬を含むものがある。

（２）（ｉ）モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、（ｉｉ）酵素標識化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、及び（ｉｉｉ）基質溶液

ビオチンーアビジン法を実施するためのキットは下記の試薬を含むものである。

（３）（ｉ）ビオチン化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、（ｉｉ）酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン、及び（ｉｉｉ）基質溶液

サンドイッチＥＬＩＳＡ法及びビオチンーアビジン法を実施するためのキットは下記の試薬を含むものである。

（４）（ｉ）モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、（ｉｉ）ビオチン化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、（ｉｉｉ）酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン及び（ｉｖ）基質溶液

なお上記の基質溶液とは、抗体に標識した酵素の基質であって、酵素反応により検出可能な変化を生じる基質を含有する溶液のことである。例えば、基質溶液としては、アルカリフォスファターゼ（ＡＰ）で標識した場合はｐ－ニトロフェニルリン酸含有緩衝液が、ホースラディシュパーオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）で標識した場合はｏ－フェニレンジアミン含有緩衝液が、β－ガラクトシダーゼで標識した場合は、４－メチルウンベリルフェリルーβ－ガラクトシドを含有する緩

衝液を用いることができる。

ビオチン化抗体を用いる方法としては公知の方法を用いることができるが、好ましくはストレプトアビジンとパーオキシダーゼとのコンジュゲートをビオチンに結合させる方法を用いる。このようなパーオキシダーゼとしては、ホースラディッシュパーオキシダーゼが挙げられる。さらに、パーオキシダーゼの検出には、そのパーオキシダーゼの作用によって発色する物質を用いることが好ましい。

以下に本願発明を、実施例を用いてより具体的に説明する。但し、本願は以下の実施例により限定されるものではない。

[実施例１]

本願発明者らは、肺癌で発現が有意に高いと予想される候補遺伝子をまず選抜する予備的研究により、8 種の新規肺癌マーカー候補因子を得た。これら因子の肺癌における発現を検証するため肺癌由来細胞株を用いて qPCR を行い、mRNA レベルでの各候補因子の発現を検証した。表２記載の細胞を同表記載の培地を用いて、16 種類の肺癌由来細胞株および 2 種類の正常肺由来細胞を 6-well プレートでコンフルエントまで培養した。次に、ISOGEN（ニッポンジーン社）あるいは RNA easy mini kit（QIAGEN 社）を用いて RNA の抽出を行った。抽出した 500ng の全 RNA を鋳型とし PrimeScriptII 1st strand synthesis kit（タカラバイオ社）を用いて cDNA の合成を行った。そして合成した cDNA を鋳型とし THUNDERBIRD SYBR Mix（TOYOBO 社）を用いて qPCR を行った。

PRDX4（peroxiredoxin 4）についての結果を図１に示す。正常肺由来上皮細胞（SAEC ：小気道上皮細胞、NHBE：肺胞上皮細胞）と比較し、複数の肺腺癌細胞株で２倍以上の発現が確認された。また、肺扁平上皮癌細胞株で発現が上昇していた。図中グラフの縦軸は遺伝子の発現量を内部標準遺伝子 GAPDH の発現量で除した値を、PC-3 細胞の発現量との相対値で示している。

表２

表2. 肺癌マーカー候補因子の発現検討に用いた細胞及び培地

細胞名	培養条件	由来	提供元
正常ヒト小気道上皮細胞 (SAEC)	小気道上皮細胞培地キット(無血清) (SAGM™ BulletKit™)	-	タカラバイオ (Lonza)
正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE)	気管支上皮細胞培地キット(無血清) (BEGM™ BulletKit™)	-	タカラバイオ (Lonza)
PC-3	EMEM+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
PC-14	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	IBL
RERF-LC-KJ	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	BRC
RERF-LC-MS	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
ABC-1	EMEM+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
RERF-LC-Ad1	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
RERF-LC-Ad2	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
VMRC-LCD	EMEM+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
LC-2 Ad	(HamF12:RPMI1640=1:1)+ 15%FBS+25mM HEPES(pH7.2)	肺腺癌	BRC
PC-1	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	IBL
LC-1 sq	(HamF12:RPMI1640=1:1)+ 10%FBS+25mM HEPES(pH7.2)	肺扁平上皮癌	BRC
RERF-LC-AI	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	BRC
RERF-LC-sq1	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB
EBC-1	EMEM+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB
HARA	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB
LK-2	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB

提供元略称	
IBL	免疫生物学研究所
HSRRB	ヒューマンサイエンス研究資源バンク
BRC	理研バイオリソースセンター

[実施例２]

タンパク質レベルでの発現を検証するため、市販の組織マイクロアレイ（上海Outdo 社）に対する免疫染色を行った。用いた組織マイクロアレイには肺癌組織60 検体および癌検体と同一ドナー由来の周辺正常組織 60 検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片がスポットされている。肺癌のタイプは、肺扁平上皮癌、肺腺癌、肺腺扁平上皮癌、細気管支肺胞上皮癌、大細胞癌および小細胞肺癌各 10 検体である。

まず、キシレン処理を 10 分間、2 回、100% EtOH（エタノール）で 10 分間処理

を2回、した後、90% EtOHで10分間処理し、最後に、70% EtOHエタノールで10分間処理して、脱パラフィンし、親水化した。

次に、10mM クエン酸緩衝液中で110℃10分間オートクレーブを行うことで抗原の賦活化を行った。0.3% H_2O_2/MeOHで30分処理して、内在性ペルオキシダーゼを失活させた。その後、Vectastain ABCキット（Vector社）を用いて免疫染色を行い、DAB Peroxidase Substrate Kit（Vector社）を用いて発色を行った。また、免疫染色後にヘマトキシリン(Sigma社)で対比染色を行った。

顕微鏡（BX50(OLYMPUS社)、EOS kiss X6iで観察し、撮影した結果を図2に示す。肺腺癌組織において、腫瘍細胞の細胞質で強く発現していることが確認された。

[実施例３]

実施例1及び2の結果より、PRDX4は、新規肺癌マーカー候補として有力であると判断した。そこで、以下に肺癌組織型別にPRDX4が高発現している割合を検討し、その結果を示す（図３）。図中の数値は組織マイクロアレイにスポットされている10検体中どのくらいの割合でPRDX4が高発現しているかを示している。結果、肺腺癌（AC)では70%と高い割合でその発現が確認でき、腺癌と類似した乳頭状所見を示す細気管支肺胞上皮癌（BAC)でも同じく 90%と非常に高い割合で発現が確認できた。一方、肺扁平上皮癌（SCC)および大細胞癌（LCC)では 40%とやや低く、小細胞肺癌（SCLC)では10検体中2検体でのみその発現が確認され、非小細胞肺癌に特異的であることが示唆された。

[実施例４]

次に、肺がん患者血清検体と健常人検体とを、抗PRDX4抗体を用いてELISA法で分析した。

肺癌血清検体はビジコムジャパン社より購入し、健常者対照検体はボランティアより得、ELISA は、USCN life science 社の ELISA-Kit-for-Peroxiredoxin-4を用いて次のようにして行った。

抗体固相プレートで、100μl の「キットに添付の標準物質（測定レンジは0-2000pg/ml)」あるいは「10倍希釈血清サンプル（希釈バッファーは20%ブロックエース/PBS +0.05% Tween 20)」を添加して37℃ 2時間反応させた。次に、サ

ンプルを捨てて 100μl 一次抗体(キットに添付の抗体をキットに添付のバッファーで 100 倍希釈）を加えて 37℃ 1 時間反応させた。キットに添付の洗浄液で 3 回洗浄後、100μl 二次抗体（キットに添付の抗体をキットに添付のバッファーで 100 倍に希釈）を加えて 37℃ 30 分間反応させた。キットに添付の洗浄液（上記洗浄操作と同じバッファー）で 5 回洗浄後、90μl TMB 基質液を添加し 37℃ 20 分発色反応させた。その後、50μl キットに添付の反応停止液を加えて発色反応を停止させ、450nm の吸光度を測定した。結果を図 4 に示す。

図 4 からわかるように、PRDX4 抗体を用いた ELISA 法で、肺癌患者を特異的に検出できた。

産業上の利用可能性

本願発明は、診断剤及び診断キット製造を製造する産業で利用することができる。より具体的には、腫瘍診断剤及び診断キットを製造業で利用することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1． PRDX4 遺伝子によりコードされるポリペプチドである肺癌マーカー。

2． PRDX4 をコードする mRNA である肺癌マーカー。

3． 配列番号１で示される配列又は同配列に１から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列に相補的な配列の標識したプローブ。

4． PRDX4 遺伝子を検出するための PRDX4 遺伝子配列中の連続する 15 塩基以上の塩基を含む肺癌検出用プライマー。

5． 配列番号１で示される配列又は同配列に１から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列について、その配列の任意の連続する 15 塩基長以上の塩基を含む肺癌検出用プライマー。

6． PRDX4 に対する抗体を含む肺癌検出剤。

7． 抗体がモノクローナル抗体である請求項６記載の肺癌検出剤。

8． 請求項４又は５記載のプライマーを含む肺癌検出キット。

9． 請求項６又は７記載の肺癌検出剤を含む肺癌検出キット。

図 1

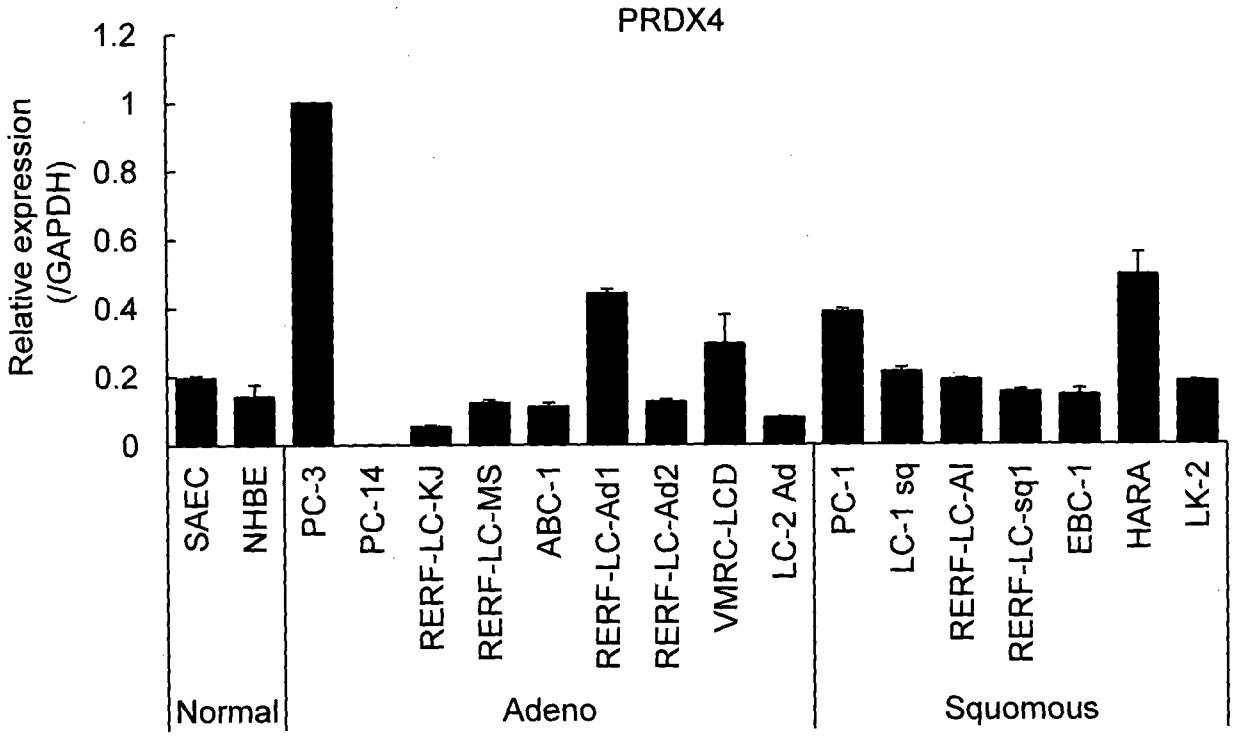
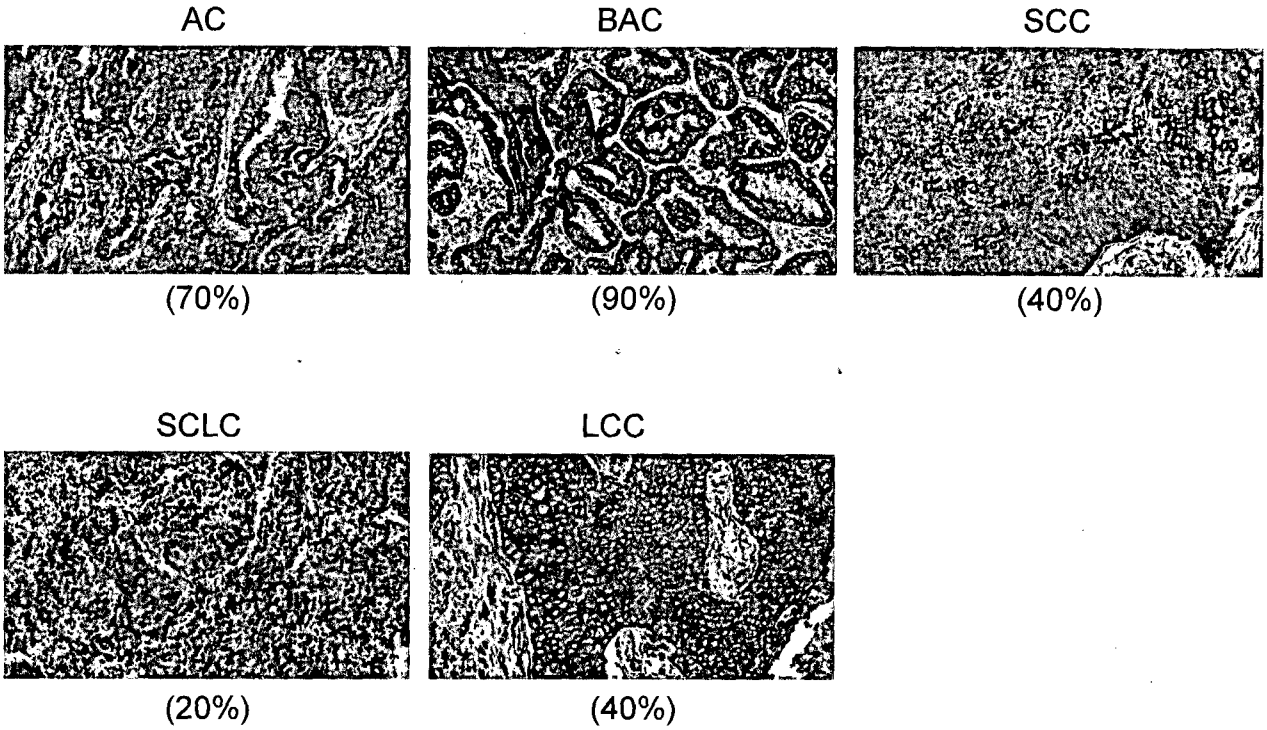

PRDX4
Relative expression (/GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
SAEC
NHBE
PC-3
PC-14
RERF-LC-KJ
RERF-LC-MS
ABC-1
RERF-LC-Ad1
RERF-LC-Ad2
VMRC-LCD
LC-2 Ad
PC-1
LC-1 sq
RERF-LC-AI
RERF-LC-sq1
EBC-1
HARA
LK-2
Normal
Adeno
Squomous

図２

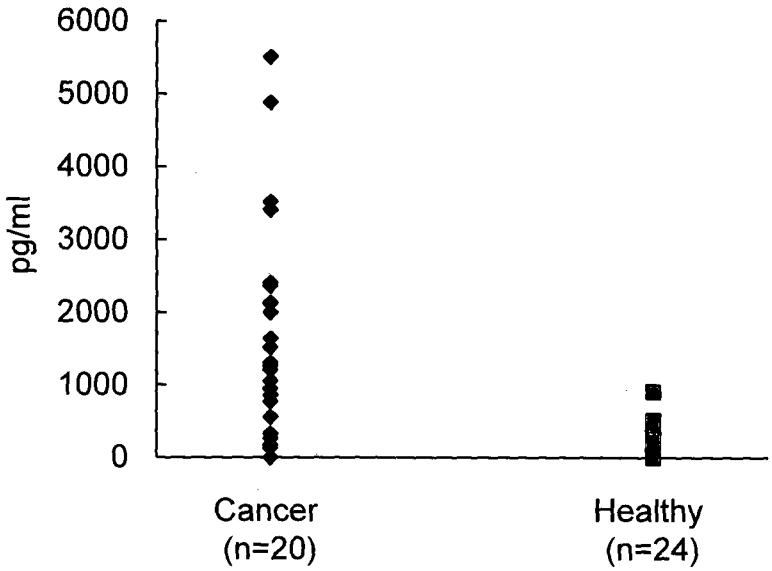


図3



AC:肺腺癌、BAC:細気管支肺胞上皮癌、SCC:肺扁平上皮癌、SCLC:小細胞肺癌、LCC:大細胞癌

図4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/058148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/574(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12Q1/68*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *G01N33/577*(2006.01)i, *C07K14/705*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/574, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/577, C07K14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2008-0107327 A (Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation), 10 December 2008 (10.12.2008), abstract; claims (Family: none)	1-9
A	Dong-Yan Jin et al., Regulatory Role for a Novel Human Thioredoxin Peroxidase in NF-kB Activation, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No.49, Page.30952-30961, Fig.1A	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 May, 2014 (23.05.14)	17 June, 2014 (17.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/058148

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Leydold, Sandra M. et al., Peroxireduxin-4 is over expressed in colon cancer and its down-regulation leads to apoptosis, Cancer Growth and Metastasis (2011), 4, 7-23, Abstract (line 5)	1-9
X	US 2012/0225954 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK), 06 September 2012 (06.09.2012), claim 1; table 7 & CA 2751835 A1	1-9
X	JP 2011-206049 A (Sumio SUGANO), 20 October 2011 (20.10.2011), paragraph [0005] & US 2012/0328528 A1 & US 2013/0040311 A1 & EP 2546266 A1 & EP 2546269 A1 & WO 2011/111694 A1	1-9
A	WO 2005/116082 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONG SANG NATIONAL UNIVERSITY), 08 December 2005 (08.12.2005), sequence no.7, 8 & KR 10-2006-0045902 A	1-9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０５８１４８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/574(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/574, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/577, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	KR 10-2008-0107327 A （경북대학교 산학협력단） 2008.12.10, 요약, 특허청구의 범위（ファミリーなし）	１－９
A	Dong-Yan Jin et al., Regulatory Role for a Novel Human Thioredoxin Peroxidase in NF-kB Activation, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No.49, Page.30952-30961, Fig.1A	１－９
A	Leydold, Sandra M. et al., Peroxireduxin-4 is over expressed in	１－９

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２３．０５．２０１４	国際調査報告の発送日 １７．０６．２０１４
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　３３１２ 三木　隆 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	colon cancer and its down-regulation leads to apoptosis, Cancer Growth and Metastasis (2011), 4, 7-23, Abstract(５行目)	
X	US 2012/0225954 A1 (UNIVERSITY HEALTH NETWORK) 2012.09.06, Ｃｌａｉｍ１，Ｔａｂｌｅ７ & CA 2751835 A1	１－９
X	JP 2011-206049 A（菅野　純夫）2011.10.20, 【０００５】 & US 2012/0328528 A1 & US 2013/0040311 A1 & EP 2546266 A1 & EP 2546269 A1 & WO 2011/111694 A1	１－９
A	WO 2005/116082 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONG SANG NATIONAL UNIVERSITY) 2005.12.08, 配列番号７、配列番号８ & KR 10-2006-0045902 A	１－９