

(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
2015 年 6 月 11 日(11.06.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/083791 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/082122
- (22) 国際出願日: 2014 年 12 月 4 日(04.12.2014)
- (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 2013-251548 2013 年 12 月 4 日(04.12.2013) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN)
[JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
Saitama (JP).
- (72) 発明者: 植田 幸嗣(UEDA, Koji); 〒3510198 埼玉
県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研
究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人HARAKENZO W
ORLD PATENT & TRADEMA
R K (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-
MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁
目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (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, 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, ST, 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).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関
する申立て (規則 4.17(v))

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))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING LUNG CANCER AND DETECTION KIT

(54) 発明の名称: 肺癌の検出方法および検出キット

(57) Abstract: A method for detecting lung cancer, said method comprising a step for measuring the amount(s) of CD91 and/or CD317 in a sample collected from a living organism. A detection kit for detecting lung cancer, said detection kit comprising an anti-body or peptide probe capable of recognizing CD91 in a sample collected from a living organism and/or an antibody or peptide probe capable of recognizing CD317 in a sample collected from a living organism.

(57) 要約: 本発明に係る肺癌を検出する方法は、生体から採取された試料において、CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定する工程を含んでおり、また、本発明に係る肺癌を検出するための検出キットは、生体から採取された試料におけるCD91を認識する抗体またはペプチドプローブ、および、生体から採取された試料におけるCD317を認識する抗体またはペプチドプローブのうちの少なくとも一方を含んでいる。



WO 2015/083791 A1

明 細 書

発明の名称：肺癌の検出方法および検出キット

技術分野

[0001] 本発明は、肺癌の検出方法および検出キットに関するものである。

背景技術

[0002] 肺癌は、世界中で癌関連死の主要な原因であり、2011年には1,475,117人が死亡している（Global Health Observatory Data Repository, 世界保健機関）。この死亡者数の多さは、末期段階に診断されることおよび効果的な治療法がないことに大きく起因する。実際、近年の癌のスクリーニングテストでは、早期段階であり手術で切除可能と診断される患者はわずか30%であった（非特許文献1）。したがって、臨床成果および全体的な生存率を改善するためには、肺癌の新規なバイオマーカーの開発および早期検出システムの確立が重要である。

[0003] 近年、エクソソームの生物学的重要性および臨床的利用が広く議論されている。例えば、腫瘍由来のエクソソームが転移性の微環境の形成に寄与することは、それらの最も基本的な機能の1つであり、これは、癌の転移に対するより良い理解を提供し、また転移を防ぐための新規な治療法をも提供し得る（非特許文献2～4）。エクソソームを介した治療用RNAの送達、既に、癌治療の先駆段階にある（非特許文献5および6）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Lehtio J, De Petris L (2010) Lung cancer proteomics, clinical and technological considerations. J Proteomics 73: 1851-1863.
非特許文献2: Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, et al. (2012) Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. Cell 151: 1542-1556.

非特許文献3 : Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, et al. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18: 883-891.

非特許文献4 : Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, et al. (2013) Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem* 288: 10849-10859.

非特許文献5 : Grapp M, Wrede A, Schweizer M, Huwel S, Galla HJ, et al. (2013) Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun* 4: 2123.

非特許文献6 : El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhal-Littleton S, Li J, Seow Y, et al. (2012) Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc* 7: 2112-2126.

非特許文献7 : Sandoval M, Luarte A, Herrera-Molina R, Varas-Godoy M, Santibanez M, et al. (2013) The glycolytic enzyme aldolase C is up-regulated in rat forebrain microsomes and in the cerebrospinal fluid after repetitive fluoxetine treatment. *Brain Res* 1520: 1-14.

非特許文献8 : Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, et al. (2013) Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119: 1159-1167.

非特許文献9 : Khan S, Jutzy JM, Valenzuela MM, Turay D, Aspe JR, et al. (2012) Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One* 7: e46737.

非特許文献10 : Lasser C (2013) Identification and analysis of circulating exosomal microRNA in human body fluids. *Methods Mol Biol* 1024: 109-128.

非特許文献11: Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, et al. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. J Extracell Vesicles 2.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 癌の診断の分野において、エクソソームもその分子特性によりバイオマーカーの探索の魅力的なターゲットである（非特許文献7～9）。基本的には、オリジナルの固形腫瘍細胞で発現している分子のセットが、血液循環中でエクソソーム成分として検出され得る。理論上はエクソソームのバイオマーカーは実現可能であるが、生物の体液からエクソソームを分離することは困難であり、バイオマーカー候補の効率的な探索を顕著に妨げている。事実、超遠心分離に基づく方法は血清サンプルからエクソソームを分離する最も一般的な方法であるが（非特許文献10）、再現性、処理時間および純度が、多数の臨床サンプルを定量的に分析するバイオマーカーのスクリーニング研究に適切ではない（非特許文献11）。
- [0006] 本発明は、肺癌用の新規バイオマーカーによる、肺癌の検出方法および検出キット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

- [0007] 本発明に係る検出方法は、肺癌を検出する方法であって、生体から採取された試料において、CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定する工程を含む。
- [0008] 本発明に係る検出キットは、肺癌を検出するための検出キットであって、生体から採取された試料におけるCD91を認識する抗体またはペプチドプローブ、および、生体から採取された試料におけるCD317を認識する抗体またはペプチドプローブのうちの少なくとも一方を含む。
- [0009] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2013-251548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。

発明の効果

[0010] 本発明は、肺癌用の新規バイオマーカーによる、肺癌の検出方法および検出キットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例におけるエクソソームのバイオマーカー探索のワークフローの概要図である。エクソソームを、12チャンネルの自動ピペティングプラットホーム上の、抗CD9抗体の結合したモノリスチップ（抗CD9-MS1Aチップ）によって、46人からの血清サンプルから単離した。濃縮したエクソソーム画分をLC/MS/MSによって分析し、Expressionist proteomeサーバシステム上のRefinerMSソフトウェアによって、ラベルフリーの定量分析に供した。定量したペプチドはANOVAと、特徴排除法とからなる、2段階の統計学的な解析に供し、最終的に抽出されたバイオマーカーの候補のペプチドを、Sequestデータベース検索を用いて同定した。同定の閾値を偽陽性率（FDR）<1%において設定した。

[図2]図2は、実施例におけるExpressionist RefinerMSモジュールにおけるバイオマーカーのスクリーニング解析において用いられる処理のワークフローを示す図である。

[図3]図3は、実施例における抗CD9-MS1Aチップについて示す図である。（a）は、実施例における抗CD9-MS1Aチップの拡大図である。

（b）は、6個の独立した抗CD9-MS1Aチップを用いて共通の血清サンプルからエクソソーム画分を精製して、LC/MS/MSで分析する測定を、3回行った際の結果を示す図である。CD9₁₅₅₋₁₇₀ペプチド（GLAGGVEQFISDICPK, $m/z = 845.9266$; 配列番号1）またはCD81₁₄₉₋₁₇₁ペプチド（TFHETLDCCGSSTLTALTTSVLK, $m/z = 848.0733$; 配列番号2）に対応するピーク強度の変動係数（CV）を示した。

[図4]図4は、実施例における1601個の同定されたエクソソームのタンパク質のプロテオームの包括的な概要を示す。（a）は、タンパク質の細胞内の局在の分布を示す円グラフである。（b）は、DAVIDシステムにおけ

るフィッシャー正確確率統計 (Fisher Exact Statistics) を機能的なアノテーションクラスタ分析に用いた図である。1601個のエクソソームのタンパク質において検出された、10個の富んだ機能を、Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) スコアを用いて示した。

[図5]図5は、実施例におけるバイオマーカー候補の2段階の統計学的なセレクションを示す図である。第1の段階として、NC、IPおよびADC群 (a) またはNC、IPおよびSCC群 (b) を比較するために3群ANOVAを行った。基準値 $p < 0.001$ を満たすペプチドを、第2のランキングセレクションに用いた。クロス確認に基づくsupport vector machine recursive feature elimination (SVM-RFE) 法を、NC、IPおよびADC群の比較のために用い、最小の誤分類率を示す最小のバイオマーカーセットを算出した (c)。同様に、SVM-SVM法を、NC、IPおよびADC群の比較のために用いた。セレクションしたバイオマーカーの数および誤分類率を示した。NC：健常なコントロール、IP：間質肺炎、ADC：肺腺癌、SCC：肺扁平上皮癌。

[図6]図6は、実施例における同定された19個のエクソソームのバイオマーカー候補を示す図である。46人のサンプルから得られた19個のバイオマーカーの候補についてのLC/MS/MSシグナル強度を、ボックスプロットにおいて表した。UniProtKBエントリータンパク質名を、ボックスプロットの上部に示した。N：健常なコントロール、IP：間質肺炎、ADC：肺腺癌、SCC：肺扁平上皮癌。

[図7]図7は、実施例におけるCD91に対するエクソソームサンドイッチELISAに基づく検証試験を示す図である。(a)は、エクソソームサンドイッチELISAの原理を示す。SA-HRP：ストレプトアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ。212個の独立した血清サンプルを用いて、エクソソームのCD91およびCEAの濃度を測定した。(b)はCD9-CD9サンドイッチELISAによって決定した血清のエクソソーム濃度を示す。(c)は、市販のELISAキットによって測定したCEAの濃度を

示す。(d)は、CD9-CD91サンドイッチELISAによって決定したエクソソームのCD91の濃度を示す。値は(b)において算出したエクソソームの濃度を用いて標準化したものである。破線は 5.0 ng/mL におけるCEA(c)または 2.04 U/エクソソーム におけるエクソソームのCD91(d)についてのカットオフ値を示している。それぞれの肺癌の小群に対する感度(Sens)および特異度(Spec)を、ボックスプロットの下部に示した。N:健常なコントロール、IP:間質肺炎、ADC__1__2:ステージI、IIの肺腺癌、ADC__3__4:ステージIII、IVの肺腺癌、SCC__1__2:ステージI、IIの肺扁平上皮癌、SCC__3__4:ステージIII、IVの肺扁平上皮癌。

[図8]図8は、実施例におけるエクソソームのCD91およびCEAについてのROC曲線解析を示す図である。CEAについてのROC曲線(a)、エクソソームのCD91についてのROC曲線(b)、ロジスティック回帰に基づく組み合わせマーカーであるCEA+エクソソームのCD91(c)を、それぞれRによって示した。NC+IP($n=73$)と肺のADC患者($n=105$)との間の診断効率を評価した。カットオフ値を、(感度、特異度)=(1, 1)からの距離が最小値に到達したポイントに設定した。感度(Sens)、特異度(Spec)、陽性的中率(PV+)、陰性的中率(PV-)および曲線下面積(AUC)をそれぞれのグラフに示した。

[図9]図9は、実施例におけるCD317に対するエクソソームサンドイッチELISAに基づく検証試験を示す図である。CD9-CD317サンドイッチELISAにおけるOD450の値を示す。N:健常なコントロール、ADC__1:ステージIの肺腺癌、ADC__2:ステージIIの肺腺癌、ADC__3:ステージIIIの肺腺癌、ADC__4:ステージIVの肺腺癌、SCC__1:ステージIの肺扁平上皮癌、SCC__2:ステージIIの肺扁平上皮癌、SCC__3:ステージIIIの肺扁平上皮癌、SCC__4:ステージIVの肺扁平上皮癌。

発明を実施するための形態

[0012] 本願発明者は、今回、エクソソームを短時間で再現性よく精製し得るチップを独自に開発した。そして、肺癌用のバイオマーカーを同定するために、このチップを用いてエクソソームの精製を行い、エクソソームにおけるバイオマーカーの探索を試みた。その結果、肺癌患者のエクソソームにおいて特異的に発現しているタンパク質が存在することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0013] [1. 肺癌の検出方法]

本発明に係る肺癌の検出方法は、生体から採取された試料において、CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定する工程を含む。その他の具体的な工程、ならびに使用する器具および装置は特に限定されるものではない。

[0014] 本発明に係る肺癌の検出方法において用いる「試料」は、生体（被検体）から採取された試料（生体試料）である。生体から採取された試料としては、例えば、血液、尿および唾液などの体液に由来する試料が挙げられる。好ましくは、血液に由来する。血液に由来する試料としては、例えば、全血液、血清および血漿などが挙げられる。「試料」は、中でも、全血液、血清および血漿が好ましく、血清および血漿がより好ましい。本発明に係る肺癌の検出方法の一実施形態は、生体（被検体）から試料を採取する工程を含む。また、本発明に係る肺癌の検出方法の一実施形態は、生体（被検体）から採取された試料を前処理する工程を含む。試料の前処理としては、例えば、採取された全血液を精製して血清を得ること、および採取された全血液を精製して血漿を得ることなどが挙げられる。

[0015] 「生体（被検体）」としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルなど哺乳類が挙げられ、好ましくはヒトである。採血部位としては、例えば、肘窩皮静脈、橈側皮静脈、および尺側皮静脈などが挙げられる。

[0016] ここで、「肺癌」とは、肺腺癌、肺扁平上皮癌、小細胞癌、および大細胞癌、ならびにそれらの混成型を指す。本発明に係る肺癌の検出方法は、なか

でも、肺腺癌および肺扁平上皮癌の検出に好適であり、肺腺癌の検出により好適である。

[0017] 肺癌のステージは特に限定されないが、本発明に係る肺癌の検出方法では、CD91の量を測定する場合、特に従来検出が困難であった早期段階、例えばステージⅠおよびステージⅡの肺癌も検出することができる。CD317の量を測定する場合、ステージⅢおよびステージⅣの肺癌を好適に検出することができる。

[0018] 本発明に係る肺癌の検出方法において量が測定され得る、CD91 (Prolow-densitylipoprotein receptor-related protein 1) およびCD317 (Bone marrow stromal antigen 2) は、アミノ酸配列が公知であり、表2にヒトのCD91タンパク質およびヒトのCD317タンパク質のUniProtKBのアクセッション番号をそれぞれ示した。

[0019] 「CD91」には、CD91タンパク質の全長だけでなく、そのフラグメントも包含され、また、CD91タンパク質の前駆体も包含される。すなわち、例えば、「CD91の量を測定する」とは、全長のCD91ポリペプチド、CD91ポリペプチドのフラグメント、およびCD91ポリペプチドの前駆体のうちの少なくとも1つの量を測定することを意味する。量が測定されるCD91は、例えば、CD91₅₇₉₋₆₀₅であり得る。

[0020] 「CD317」には、CD317タンパク質の全長だけでなく、そのフラグメントも包含され、また、CD317タンパク質の前駆体も包含される。すなわち、例えば、「CD317の量を測定する」とは、全長のCD317ポリペプチド、CD317ポリペプチドのフラグメント、およびCD317ポリペプチドの前駆体のうちの少なくとも1つの量を測定することを意味する。量が測定されるCD317は、例えば、CD317₁₃₇₋₁₄₇であり得る。

[0021] 本明細書において、「CD91の量を測定する」とは、生体試料またはこれを精製して得られる試料におけるCD91の存在量または濃度を測定することを意図している。「CD91の量」は、絶対量（絶対質量または絶対濃

度) あってもよいし、相対量(相対質量または相対濃度)であってもよい。また、例えば、質量分析におけるピーク面積、発光測定における発光強度などであってもよく、所定の基準に対して何倍であるかを示す値であってもよい。「CD91の量」は、好ましくは、エクソソーム表面に存在するCD91の量である。また、「CD91の量」は、エクソソームあたりのCD91であることが好ましい場合がある。CD317についてもこれと同様のことがいえる。

[0022] なお、本発明において量が測定され得るものをまとめて、以下「肺癌マーカー」と称する。

[0023] 本発明に係る肺癌の検出方法の一例として、被験体由来の生体試料中におけるCD91の量を測定し、肺癌を有していない対照被験体由来の生体試料中におけるCD91の量を測定し、両者を比較することによって、肺癌を検出することができる。具体的には、被験体由来の試料におけるCD91の量と、対照被験体由来の試料におけるCD91の量とを比較して、被験体由来の試料におけるCD91の量が有意に増加している場合には、この被験体が肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定することができる。対照被験体由来の試料におけるCD91の量は予め測定したものを用いることが可能である。あるいは、予め肺癌を有していない対照被験体由来の生体試料におけるCD91の量を測定して、これに基づいて正常濃度範囲を定めておき、被験体由来の生体試料におけるCD91の量がその正常濃度範囲から外れて増加している場合に、肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定することも可能である。すなわち、本発明に係る肺癌の検出方法の一実施形態では、測定されたCD91の量が肺癌を有していない対照被験体と比較して増加している場合に、肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定する工程をさらに含む。なお、別の実施形態において、対照被験体として、肺癌を有していない対照被験体および肺癌患者の両方、または肺癌患者のみを含んでいてもよい。

[0024] 被検体のCD91の量と対照被験体のCD91の量とを比較する場合、そ

の有意差は、例えば、t検定、F検定、カイ二乗検定、またはMann-Whitney's U testなどの統計学的手法によって判断できる。

[0025] また、本発明に係る肺癌の検出方法の別の一例は、CD91の代わりにCD317の量を測定するものであり、上記と同様のことがいえる。したがって、本発明に係る肺癌の検出方法の別の実施形態では、測定されたCD317の量が肺癌を有していない対照被験体と比較して増加している場合に、肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定する工程をさらに含む。

[0026] 肺癌マーカーの量を測定する方法としては、肺癌マーカーの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、測定対象の肺癌マーカーを認識する抗体を用いた免疫学的手法を用いた方法、測定対象の肺癌マーカーを認識するペプチドプローブを用いた方法、液体カラムクロマトグラフィー法および質量分析法などを用いることができる。抗体を用いた方法としては、例えば、ELISA法、定量ウェスタンブロットティング法、ラジオイムノアッセイ法、イムノクロマトグラフィー法、および免疫沈降法などが挙げられる。ELISA法の種類としては、特に限定されないが、いわゆる抗原測定系（生物試料中に含まれる抗原量の測定）である、直接吸着法によるELISA、競合法によるELISA、サンドイッチ法によるELISA、およびマイクロ流路式またはマイクロビーズなどを利用した、微量試料の測定に特化したELISAなどが挙げられる。

[0027] 測定対象の肺癌マーカーを認識する抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。UniProtなどの公共データベースの情報に基づけば、当業者は容易にCD91を認識する抗体およびCD317を認識する抗体を作製するための抗原として適切なアミノ酸配列を決定することができる。CD91を認識する抗体は、CD91に特異的な抗体であることが好ましい。また、CD317を認識する抗体は、CD317に特異的な抗体であることが好ましい。

[0028] 本発明において「抗体」とは、免疫グロブリンのすべてのクラスおよびサブクラス、ならびに抗体の機能的断片を含む形態であることを意図している。当該抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の何れの天然型抗体も含む概念であり、その他に、遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体、ならびに当該抗体の機能的断片を含む。「抗体の機能的断片」とは、前述の抗体の一部分の領域を有し、かつ抗原結合能を有しているもの（結合性断片と同義）を指す。天然型抗体は、特に限定はされないが、ヒト、マウス、ラット、サル、ヤギ、ウサギ、ラクダ、ラマ、ウシおよびニワトリなどを含む、あらゆる生物種に由来し得る。遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体としては、特に限定はされないが、天然型抗体を遺伝子改変して得られるヒト化抗体および霊長類化抗体などのキメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、変異導入抗体およびグラフト結合抗体（例えば、他のタンパク質および放射性標識などがコンジュゲートまたは融合している抗体）が挙げられ、既に遺伝子組換え技術を用いて製造された抗体に対して、上述のように天然型抗体を遺伝子改変する場合と同様の改変を施した抗体も含まれる。また、抗体の機能的断片としては、具体的には例えば $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ (variable fragment of antibody)、 $s F v$ 、 $d s F v$ (disulphide stabilized Fv) および $d A b$ (single domain antibody) などが挙げられる。

[0029] さらに、本発明において結合性断片は、対象とする肺癌マーカーに対して反応性を維持する範囲において変異導入された抗体断片も結合性断片の概念として含んでいる。前述の変異導入は、当業者によって適宜選択される、遺伝子改変技術などの公知の技術を用いて行われる。

[0030] 上述の抗体の検出は、検出可能なシグナルを誘引できるレポーター分子で標識した二次抗体と複合体を形成させることによって行い得る。あるいは、上述の抗体がレポーター分子で予め標識されていてもよい。レポーター分子は、例えば、酵素、発蛍光団含有分子、または放射性核種含有分子である。このようなレポーター分子は、様々なものが公知であり、適宜選択すればよ

い。

- [0031] レポーター分子として酵素を用いる場合、酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどを用いることができる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物などの架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を用いることができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンなどを用いることができる。また、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、パラニトルフェノールなどを用いることができる。放射性核種としては、 ^{125}I または ^3H などを用いることができる。蛍光色素としては、フルオロレッセンスイソチオシアネート (FITC) またはテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) などを用いることができる。
- [0032] 二次抗体を固相化した金コロイドの凝集で検出するイムノクロマトグラフィーなどの簡便な測定系を用いることもできる。
- [0033] また、ペプチドプローブを用いた方法では、例えば、上述のレポーター分子が標識されたペプチドプローブを用いることができる。CD91を認識するペプチドプローブは、CD91に特異的なペプチドプローブであることが好ましい。また、CD317を認識するペプチドプローブは、CD317に特異的なペプチドプローブであることが好ましい。
- [0034] このように、肺癌マーカーの量の測定においては、発色もしくは蛍光測定を包含する発光測定法、または放射測定法などを用いることができる。
- [0035] 質量分析法は、公知の質量分析装置を用いて行えばよい。質量分析装置を用いた質量分析法は、感度および精度に優れているため、正確な判定を行うことができる。さらに、多成分同時分析が可能なマルチチャンネル型の質量分析装置を用いることにより、2以上の肺癌マーカー（例えば、CD91とCD317）の量を一度に測定することが可能となる。さらには、肺癌以外の他の疾患に関するバイオマーカーも同時に測定することが可能となり、一度

に様々な疾患についての検出を試みる事が可能となる。また、より精度よく検出をおこなうためには、タンデム質量分析装置（MS／MS）を用いることが好ましい。本発明の検出方法において用いられる質量分析装置としては定量可能であれば特に限定されず、四重極型および飛行時間型など従来公知の型の質量分析装置を用いることが可能である。

[0036] エクソソーム表面に存在する肺癌マーカーの量を測定する場合には、ELISA法が好ましく、サンドイッチELISAがより好ましい。一例として、エクソソーム表面に存在するCD91の量を測定するためのサンドイッチELISAを説明すると（図7の（a）も参照）、まず、エクソソーム表面に存在するタンパク質（CD91を除く）に対する抗体（捕捉抗体）が結合した基材を用意し、次いで、エクソソームを含む試料と接触させて、捕捉抗体－エクソソーム複合体を形成させる。さらに、標識された抗CD91抗体（検出抗体）と接触させて、捕捉抗体－エクソソーム－検出抗体複合体を形成させる。そして、発色強度などを測定することによって、エクソソーム表面に存在するCD91の量を測定することができる。上記の捕捉抗体は、肺癌患者と肺癌を有していない健常者とでエクソソーム表面における発現量に有意差がないタンパク質に対するものであることが好ましく、そのようなタンパク質としては、例えば、CD9（5H9 antigen；Cell growth-inhibiting gene2 protein；Leukocyte antigen MIC3；Motility-related protein MRP-1；Tetraspanin-29；p24）、CD63、CD81、およびその他テトラスパニンファミリーに属する分子などが挙げられ、その抗体としては、抗CD9抗体、抗CD63抗体、および抗CD81抗体などが挙げられる（参考文献：国際公開WO2013／099925号公報）。CD317についても上記と同様の方法で、エクソソーム表面に存在する量を測定することができる。

[0037] 本発明に係る肺癌の検出方法において、エクソソームあたりのCD91および／またはCD317の量を測定することが好ましい。この場合、生体試料またはこれを精製して得られる試料におけるエクソソームの量を測定し、

その結果を用いて、別途測定したCD91および／またはCD317の量を標準化して、エクソソームあたりのCD91および／またはCD317の量を算出する。「エクソソームの量」は、絶対量（絶対質量または絶対濃度）であってもよいし、相対量（相対質量または相対濃度）であってもよい。被験体によりエクソソームの量にばらつきがあるため、標準化することによって、より正確に肺癌を検出することができる。すなわち、本発明に係る肺癌の検出方法の一実施形態では、生体から採取された試料において、エクソソームの量を測定する工程を含む。また、本発明に係る肺癌の検出方法の他の実施形態では、測定したエクソソームの量と、測定したCD91の量とを用いて、エクソソームあたりのCD91の量を算出する工程を含む。また、本発明に係る肺癌の検出方法の他の実施形態では、測定したエクソソームの量と、測定したCD317の量とを用いて、エクソソームあたりのCD317の量を算出する工程を含む。

[0038] エクソソームの量を測定する方法としては、サンドイッチELISAが挙げられる。エクソソームの量を測定するためのサンドイッチELISAの一例を説明すると（図7の（a）も参照）、まず、エクソソーム表面に存在するタンパク質に対する第1の抗体（捕捉抗体）が結合した基材を用意し、次いで、エクソソームを含む試料と接触させて、捕捉抗体－エクソソーム複合体を形成させる。さらに、標識された第2の抗体（検出抗体）と接触させて、捕捉抗体－エクソソーム－検出抗体複合体を形成させる。そして、発色強度などを測定することによって、エクソソームの量を測定する。第1の抗体および第2の抗体は、肺癌患者と肺癌を有していない健常者とでエクソソーム表面における発現量に有意差がないタンパク質に対するものであることが好ましく、そのようなタンパク質としては、例えば、CD9、CD63、CD81、およびその他テトラスパニンファミリーに属する分子などが挙げられ、抗体としては、抗CD9抗体、抗CD63抗体、および抗CD81抗体などが挙げられる。第1の抗体と第2の抗体とは、同じ種類の抗体であってもよいし、異なる種類の抗体であってもよい。また、第1の抗体および第2

の抗体は、エクソソーム表面に存在するCD91および／またはCD317の量を測定するためのサンドイッチELISAに用いる抗体と、同じ種類であってもよいし、異なる種類であってもよい。

[0039] 本発明に係る肺癌の検出方法において、生体から採取された試料からエクソソームを精製してもよい。すなわち、本発明に係る肺癌の検出方法の一実施形態では、生体から採取された試料からエクソソームを精製する工程を含む。エクソソームを精製する方法としては、エクソソーム表面に存在するタンパク質に対する抗体を用いる方法、超遠心機を用いる方法、および市販精製キットを用いる方法などが挙げられる。エクソソーム表面に存在するタンパク質に対する抗体を用いる方法の一例では、当該抗体（例えば、抗CD9抗体）を固定した質量分析イムノアッセイ用ピペットチップを用いる（実施例も参照）。この方法を用いれば、短時間で、高純度で、再現性がよく試料からエクソソームを精製することができる。

[0040] 本発明に係る肺癌の検出方法は、生体から採取された試料において、CEA (carcinoembryonic antigen) の量を測定する工程をさらに含むことが好ましい。CD91および／またはCD317の量とCEAの量とを組み合わせることによって、感度および特異度が向上し、肺癌をより正確に検出することが可能となる（実施例も参照）。CEAは、アミノ酸配列が公知であり、UniProtKBのアクセッション番号はP06731である。

[0041] また、本発明に係る肺癌の検出方法は、生体から採取された試料において、CD91の量およびCD317の量を測定する工程とを含んでいてもよい。CD91の量とCD317の量とを組み合わせることによって、感度および特異度が向上し、肺癌をより正確に検出することが可能となり得る。

[0042] 「CEA」には、CEAタンパク質の全長だけでなく、そのフラグメントも包含され、また、CEAタンパク質の前駆体も包含される。すなわち、例えば、「CEAの量を測定する」とは、全長のCEAポリペプチド、CEAポリペプチドのフラグメント、およびCEAポリペプチドの前駆体のうちの少なくとも1つの量を測定することを意味する。

[0043] なお、「感度」とは、特定の疾患を発症している集団に対して検査を行ったときの陽性（異常被験体値）を示す割合（真の陽性の割合）を指す。また、「特異度」とは、特定の疾患を罹患していない集団に対して検査を行ったときの陰性（正常値）を示す割合（真の陰性の割合）を指す。また、「陽性的中率」は、検査において陽性を示した被験体のうち、実際に疾患を罹患している個体の割合を指す。また、「陰性的中率」は、検査において陰性を示した被験体のうち、実際に疾患を罹患していない個体の割合を意味している。

[0044] 複数種の肺癌マーカーの量を測定する場合、同一試料を用いて測定してもよいし、互いに異なる試料を用いて測定してもよい。

[0045] C D 9 1 の量と C E A の量とを組み合わせる場合、例えば、C D 9 1 の量および C E A の量を用いて、ロジスティック回帰スコアを算出する。算出方法は、例えば、文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), *Biometrics* 62, 221-229. に記載の方法を用いればよい。このロジスティック回帰スコアについて両者の間で有意な相違が見られた場合には、この被験体が肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定することができる。対照被験体由来の試料における C E A の量は予め測定したものを用いることが可能である。あるいは、予め対照被験体由来の生体試料における C E A の量および C D 9 1 の量を測定し、ロジスティック回帰スコアを算出して、これに基づいてロジスティック回帰スコアの正常値範囲を定めておき、被験体由来の生体試料においてロジスティック回帰スコアがその正常値範囲から外れた場合に、肺癌を有していると判定することも可能である。C D 3 1 7 の量と C E A の量とを組み合わせる場合、C D 9 1 の量と C D 3 1 7 の量とを組み合わせる場合、および C D 9 1 の量と C D 3 1 7 の量と C E A の量とを組み合わせる場合についても、上述と同様の方法を用いることができる。

[0046] 被検体のロジスティック回帰スコアと対照被験体のロジスティック回帰スコアとを比較する場合、その有意差は、例えば、t 検定、F 検定、カイ二乗

検定、またはMann-Whitney's U testなどの統計学的手法によって判断できる。

[0047] C E Aの量を測定する方法は、これらの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、C E Aを認識する抗体を用いた免疫学的手法を用いた方法、C E Aを認識するペプチドプローブを用いた方法、液体カラムクロマトグラフィー法および質量分析法などを用いることができる（詳細は上述と同様）。C E Aの量を測定するための試料は、C D 9 1 および／またはC D 3 1 7の量を測定するための試料と同一試料でもよいし、異なる試料であってもよい。C E Aを認識する抗体は、C E Aに特異的な抗体であることが好ましい。また、C E Aを認識するペプチドプローブは、C E Aに特異的なペプチドプローブであることが好ましい。

[0048] [2. 肺癌の検出キット]

本発明に係る肺癌の検出キットは、肺癌を検出するための検出キットであって、生体から採取された試料におけるC D 9 1 を認識する抗体またはペプチドプローブ、および、生体から採取された試料におけるC D 3 1 7 を認識する抗体またはペプチドプローブのうちの少なくとも一方を含んでいる。

[0049] 本発明に係る肺癌の検出キットを用いれば、C D 9 1 および／またはC D 3 1 7の量を測定することができ、当該C D 9 1 および／またはC D 3 1 7の量を用いて、例えば、上記[1. 肺癌の検出方法]の欄で説明した方法に従って、肺癌を検出することができる。

[0050] 本発明に係る肺癌の検出キットは、生体から採取された試料におけるC E Aを認識する抗体またはペプチドプローブをさらに含むことが好ましい。C D 9 1 および／またはC D 3 1 7の量とC E Aの量とを組み合わせることによって、感度および特異度が向上し、肺癌をより正確に検出することが可能となる。

[0051] ペプチドプローブとは、C D 9 1、C D 3 1 7またはC E Aを認識するペプチド性のプローブ、好ましくはC D 9 1、C D 3 1 7またはC E Aと特異

的に結合するペプチド性のプローブを指す。具体的には例えば、CD91、CD317またはCEAと特異的に結合するペプチド配列が挙げられる。検出キットに含まれるペプチドプローブは、天然アミノ酸の他に、非天然型アミノ酸を含んで構成されていてもよい。

[0052] 本発明に係る肺癌の検出キットでは、試料中のエクソソームを捕捉するための抗体（捕捉抗体）が結合した基材をさらに含んでいることが好ましい。エクソソームを捕捉するための抗体としては、エクソソーム表面に存在するタンパク質（CD91およびCD317を除く）に対する抗体が挙げられる。当該抗体は、肺癌患者と肺癌を有していない健常者とでエクソソーム表面における発現量に有意差がないタンパク質に対するものであることが好ましく、そのようなタンパク質としては、例えば、CD9、CD63、CD81、およびその他テトラスパニンファミリーに属する分子などが挙げられ、その抗体としては、抗CD9抗体、抗CD63抗体、および抗CD81抗体などが挙げられる。なお、本発明に係る肺癌の検出キットの一実施形態では、上記捕捉抗体と基材とを別個に含んでいてもよい。また、本発明に係る肺癌の検出キットの他の実施形態では、上記捕捉抗体と基材との何れか一方を含んでいてもよい。

[0053] 基材としては、例えば、タンパク質高吸着ポリプロピレンなどの材質のものが挙げられる。基材は、マイクロウェルプレート（例えば、96ウェル）であることが好ましい。多数の試料を並行して処理することができるからである。

[0054] 本発明に係る肺癌の検出キットは、さらに、必要に応じて、抗体またはペプチドプローブを免疫学的に検出するための各種試薬（二次抗体、レポーター分子、およびバッファーなど）および器具（プレートおよびピペットなど）、検出キットの使用説明書、測定の時に用いられる対照用となる試料、測定結果を解析するときに用いられる対照用のデータ、などのうちの少なくとも1つを含んでいてもよい。なお、検出キットの使用説明書には、上記〔1. 肺癌の検出方法〕の欄で説明した、本発明に係る肺癌の検出方法の内容が

記録されている。

[0055] 特に限定されないが、本発明に係る肺癌の検出キットは、例えば、E L I S A法に基づく検出キットであることが好ましく、サンドイッチE L I S A法に基づく検出キットであることがより好ましい。

[0056] [3. その他]

上記〔1. 肺癌の検出方法〕の欄で説明した検出方法を行うことによって得られた結果は、医師による診断を行う際の診断資料の1つとして利用することができる。また、上記〔1. 肺癌の検出方法〕の欄で説明した検出方法を行うことによって、肺癌を有している可能性ありという結果が得られた被験体については、必要に応じて医師による診断の結果を伴った上で、治療を行うことができる。ここで、治療の一例としては、医師、場合によっては医師以外の専門家が行う、化学療法、放射線治療、および外科手術などを挙げることができる。特に、本発明に係る検出方法では、早期の肺癌を検出し得るため、早期診断および早期治療を実現し得る。また、本発明に係る検出方法によれば、ステージⅠもしくはⅠⅠ、または、ステージⅠⅠⅠもしくはⅠⅣの肺癌であることを検出し得るため、医師が本発明に係る方法を行うことによって得られた結果に基づきそれぞれのステージに適した診断または治療を採用することができる。

[0057] より具体的には、例えば、本発明に係る方法を行うことによって得られた結果に基づき医師が「肺癌を有している可能性あり」と判断した場合には、他の検査方法（X線検査、C T検査、および内視鏡検査など）による所見、喫煙歴、被験体の年齢および家族歴なども考慮した上で、生検を行うことができる。通常、生検を行った結果に基づき肺癌の有無の確定診断がなされ、治療方針が立てられる。医師が「肺癌を有している可能性あり」と判断するに際しては、予め所定の基準値を設けておき、被験体の測定値がその基準値以上となった場合に「肺癌を有している可能性あり」と判断することができる。

[0058] [4. まとめ]

このように、本発明に係る検出方法は、肺癌を検出する方法であって、生体から採取された試料において、CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定する工程を含む。

[0059] 本発明に係る検出方法は、測定された上記CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量が肺癌を有していない対照被験体と比較して増加している場合に、肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定する工程をさらに含むことが好ましい。

[0060] 本発明に係る検出方法において、上記CD91の量は、エクソソーム表面に存在するCD91の量であり、上記CD317の量は、エクソソーム表面に存在するCD317の量であることが好ましい。

[0061] 本発明に係る検出方法は、生体から採取された試料において、CEAの量を測定する工程をさらに含むことが好ましい。

[0062] 本発明に係る検出方法において、上記肺癌は、ステージⅠまたはⅡであってもよい。

[0063] 本発明に係る検出方法において、上記肺癌は、ステージⅢまたはⅣであってもよい。

[0064] 本発明に係る検出方法において、ELISA法によって上記CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定することが好ましい。

[0065] 本発明に係る検出方法において、上記試料は、全血液、血清または血漿であることが好ましい。

[0066] 本発明に係る検出キットは、肺癌を検出するための検出キットであって、生体から採取された試料におけるCD91を認識する抗体またはペプチドプローブ、および、生体から採取された試料におけるCD317を認識する抗体またはペプチドプローブのうちの少なくとも一方を含む。

[0067] 本発明に係る検出キットは、上記試料中のエクソソームを捕捉するための抗体が結合した基材をさらに含むことが好ましい。

[0068] 本発明に係る検出キットにおいて、上記エクソソームを捕捉するための抗体は、抗CD9抗体であることが好ましい。

[0069] 本発明に係る検出キットは、生体から採取された試料におけるC E Aを認識する抗体またはペプチドプローブをさらに含むことが好ましい。

[0070] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

実施例

[0071] 〔実験手順〕

本実施例では、バイオマーカーの探索および検証を行った。バイオマーカーの探索の概要は、図1に示すとおりである。

[0072] (血清サンプル)

肺癌患者 ($n = 165$) および間質肺炎患者 ($n = 29$) から得た血清サンプルを、試験承認の上で、広島大学病院において回収した。健常のコントロールの血清サンプル ($n = 64$) を、広島NTT病院において回収した。文書化されたインフォームドコンセントをすべての協力者から得た。この研究は、理研の倫理委員会 (承認コード: 横浜H20-12) および広島大学病院の倫理委員会によって承認された。

[0073] (CD9-MSIAチップによるエクソソームの精製)

すべての手順は、Novus i 12チャンネル電子ピペットおよび調節可能なピペットスタンド (Thermo Fisher Scientific社製、米国) において行った。MSIA D.A.R.T.'s, Protein Gチップ (Thermo Fisher Scientific社製) を、 $500\mu\text{L}$ のPBS中でピペッティング ($300\mu\text{L} \times 10$ サイクル) して平衡化し、次いで $50\mu\text{L}$ のPBS中の $1\mu\text{g}$ の抗CD9抗体 (塩野義製薬株式会社製) をピペッティング ($25\mu\text{L} \times 100$ サイクル) して、抗CD9抗体を固定した。PBS中の 0.25mM のBS3 (Thermo Fisher Scientific

c社製)を用いてクロスリンク(100 μ L $\times$ 100サイクル)した後、反応を50 mMのエタノールアミン-HCl (pH 8.0)を用いて停止(100 μ L $\times$ 100サイクル)した。500 μ LのPBS中で平衡化(300 μ L $\times$ 10サイクル)し、次いでCD9-MS1Aチップを、350 μ Lの7倍希釈した血清サンプルと共にインキュベートした(300 μ L $\times$ 100サイクルのピペティングによる)。このチップを、500 μ LのPBS中でピペティング(300 μ L $\times$ 25サイクル)によって3回洗浄した。最後に、30 μ Lの8Mの尿素+50 mMの重炭酸アンモニウム溶液中でピペティング(20 μ L $\times$ 100サイクル)し、捕捉されたエクソソームを溶出した。

[0074] 5 mMのTCEPを用いて37℃で30分間還元し、25 mMのヨードアセトアミドを用いて室温で45分間アルキル化した。その後、サンプルを50 mM重炭酸アンモニウムで7倍希釈し、96ウェルフィルタープレートに入れ、5 μ Lの固定化トリプシン(Thermo Fisher Scientific社製)と共に37℃で6時間振とうして、消化させた。トリプシン消化物を、Oasis HLB 96-well μ Elution Plate (Waters Corporation社製、米国)を用いて脱塩し、LC/MS/MS分析に供した。

[0075] (LC/MS/MS分析)

乾燥したペプチドサンプルを、0.1%のトリフルオロ酢酸を含む、2%のアセトニトリル溶液に再懸濁し、Ultimate 3000 RSLC nano-flow HPLC system (DIONEX社製、米国)を備えるLTQ-Orbitrap-Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific社製)を用いて分析した。75 μ m $\times$ 150 mm C18 tip-column (日京テクノス社製)において、溶媒A(0.1%のギ酸)および溶媒B(アセトニトリル中の0.1%ギ酸)を用い、流速250 nL/分において、95分間で溶媒Bを6.4~30%、その後10分間で溶媒Bを30~95%とする多段階直線勾配で、サンプルを分離した。

[0076] 溶出したペプチドを、2000 Vのスプレー電圧でイオン化し、MSデータをデータ依存型フラグメント法で取得した。測定スキャン(survey scan)

は、 m/z 400~1600、分解度 60,000、AGCターゲット値 1.0×10^6 イオンカウントで行った。各測定スキャンにおける上位 20 の強度の前駆イオンを、リニアイオントラップで AGC ターゲット値 5000 イオンカウントのノーマル CID スキャンモードを用いた低分解能 MS/MS 取得に供した。

[0077] Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Fischer Scientific社製) を用いて SEQUEST データベースサーチを行い、タンパク質の同定を試みた。MS/MS スペクトルをヒトタンパク質データベース SwissProt 2013_03 (20,255 sequences) に対して検索した。検索パラメーターは次のとおりである: Enzyme Name = Semitrypsin、Precursor Mass Tolerance = 3 ppm、Fragment Mass Tolerance = 0.8 Da、Dynamic Modification = Oxidation (Met)、Static Modification = Carbamidomethyl (Cys)。SEQUEST Decoy Database Search における Peptide Validator activity による FDR (false discovery rate) が 1% 未満である場合に、そのペプチドと同定した。

[0078] (Expressionist サーバーにおけるラベルフリー定量分析)

LC/MS/MS のデータセットを、Expressionist RefinerMS module (Genedata AG 社製、スイス) にロードし、データ処理およびフリー定量分析を行った。RefinerMS software の全体的なワークフローを図 2 に示す。2D MS クロマトグラム面 ($x = m/z$ 、 $y = RT$) 上の 10 個のデータポイント毎に Spectrum Grid をセッティングした。次いで、第 1 および第 2 の Chemical Noise Subtraction において、 $RT = 2$ scans および $m/z = 6$ points で、Structure Removal を順次行った。続いて、第 3 の Chemical Noise Subtraction において、 RT Window = 500 scans および Quantile = 90% で Structure Removal を行った。第 4 の Chemical Noise Subtraction において、 $RT = 2$ scans で Structure Removal を行った。その後、2000 未満の強度のシグナルを、Intensity Thresholding を用いて排除した。最後に、第 5 および第 6 の Chemical Noise Subtraction において、それぞれ $RT = 2$ scans および $m/z = 5$ points で Structure Removal を行った。

[0079] 次いで、Chromatogram Gridをノイズ減算データ上の10スキャン毎にセットし、次のパラメーターを用いてChromatogram RT Alignmentを行った：m/z Window = 11 points、RT Window = 11 scans、Gap Penalty = 1、RT Search Interval = 2 minutes、Alignment Scheme = pairwise alignment based tree。

[0080] 続いて、一時的平均化クロマトグラムにおけるピークを、次のパラメーターを用いて、Summed Peak Detection Activityによって検出した：Summation Window = 20 scans、Overlap = 10、Minimum Peak Size = 6 scans、Maximum Merge Distance = 1 data points、Gap/Peak Ratio = 5、Method = curvature-based peak detection、Peak Refinement Threshold = 5、Consistency Filter Threshold = 1。最後に、Summed Isotope Clustering Activityを用いて、1つの分子に由来する同位体ピークを同位体クラスターにグループ化した。このときのパラメーターは次のとおりである：Minimum Charge = 1、Maximum Charge = 6、Maximum Missing Peaks = 0、First Allowed Gap Position = 10、Ionization = protonation、RT Tolerance = 0.1 minute、m/z Tolerance = 0.01 Da、Minimum Cluster Size Ratio = 0.5。

[0081] (Expressionist Analystにおける統計学的解析)

バイオマーカーの効率的な同定のために、2段階の統計学的セレクションを行った。第1の段階において、3群の分散分析(ANOVA)を行い、3つの臨床群($p < 0.001$)間で有意に離れた発現レベルを示す候補を大まかに抽出した。次に、バイオマーカー候補の最小の組合せを、Expressionist Analyst module (Genedata AG)におけるSupport Vector Machine-Recursive Feature Elimination (SVM-RFE) アルゴリズムまたはSVM-SVMアルゴリズムによって、取扱説明書に従い、見積もった。

[0082] (エクソソームサンドイッチELISAアッセイ1)

エクソソーム捕捉抗体溶液(PBS中の $5 \mu\text{g/mL}$ の抗CD9抗体、 $50 \mu\text{L}$ /ウェル)をNunc MaxiSorp flat-bottom 96 well plate (Thermo Fischer Scientific社製)にロードし、 4°C で一晩インキュベートした。ブロッ

キング溶液（PBS中の5%BSA、150 μ L／ウェル）を添加し、周囲温度で、60分間、プレート振盪器でインキュベートした。PBSで3回洗浄した後、（5 μ Lの血清＋95 μ LのPBS）を上側の48ウェルにロードし、（30 μ Lの血清＋70 μ LのPBS）を下側の48ウェルにそれぞれロードした。5時間インキュベーション後、プレートをPBSで3回洗浄した。1%BSA中のビオチン化抗CD9抗体（125ng／mL）を上側の48ウェルにロードし、1%BSA中のビオチン化抗CD91抗体（500ng／mL）を下側の48ウェルにロードした（100 μ L／ウェル）。60分間インキュベーションした後、プレートをPBSで3回洗浄し、続いて1%BSA中の1 $\times$ HRP－streptavidin（Abcam）で覆った（100 μ L／ウェル）。30分間インキュベーションした後、プレートをPBSで3回洗浄し、続いてOne-step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution（Thermo Fischer Scientific社製）をウェルにロードした（100 μ L／ウェル）。2NのHCl（100 μ L／ウェル）を用いて、10分間インキュベーション後に反応を停止させた。450nmにおけるODを直ちに測定した。CD9－CD9およびCD9－CD91ELISAアッセイを、一般的な胸水サンプルから得た勾配曲線（5、10、15、20および25 μ L）を用いて標準化した。最後に、上述のCD9－CD9ELISAを用いて算出したエクソソームの濃度を用いて、CD91の濃度を標準化した。

[0083] （エクソソームサンドイッチELISAアッセイ2）

エクソソーム捕捉抗体溶液（PBS中の5 μ g／mLの抗CD9抗体、50 μ L／ウェル）をNunc MaxiSorp flat-bottom 96 well plate（Thermo Fischer Scientific社製）にロードし、周囲温度で60分間インキュベートした。ブロッキング溶液（PBS中の5%BSA、150 μ L／ウェル）を添加し、周囲温度で、30分間、プレート振盪器でインキュベートした。PBSで3回洗浄した後、（10 μ Lの血清＋90 μ LのPBS）をウェルにロードした。3時間インキュベーション後、プレートをPBSで3回洗浄した。1%BSA中のHRP標識抗CD317抗体（250ng／mL）をウェル

にロードした（100 μ L／ウェル）。60分間インキュベーションした後、プレートをPBSで3回洗浄し、続いてOne-step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fischer Scientific社製) をウェルにロードした（100 μ L／ウェル）。15分間インキュベーション後に2NのHCl（100 μ L／ウェル）を用いて反応を停止させた。450nmにおけるODを直ちに測定した。

[0084] （ボックスプロット解析およびROC曲線解析）

バイオマーカーペプチドの候補に対応する質量スペクトルピークの強度を、Rアルゴリズムを用いたボックスプロットによって表示した。それぞれの調査について、当該ボックスは、第一四分位点～第三四分位点に含まれるデータポイントの分布を示している。ボックスを縦断している線は中央値を示している。ボックスの上および下の線の長さは、それぞれ最大データ値および最小データ値によって規定される。当該データ値は、ボックスの1.5倍の広がり範囲内に存在している。また、ROC曲線を、Rで示した。カットオフ値を、（感度、特異度）＝（1、1）からの距離が最小値に到達したポイントに設定した。感度（S e n s）、特異度（S p e c）、陽性的中率（P V +）、陰性的中率（P V -）および曲線下面積（A U C）をそれぞれのグラフ上に示した。

[0085] [結果]

（抗CD9-MS1Aチップによる血清のエクソソームの単離）

血清由来のエクソソームを再現可能かつ高純度で分離することはバイオマーカーの効率的な同定において不可欠である。そのため、自動化された12チャンネルのピペットシステムにおいて、抗体を固定化した低背圧モノリスチップを用いた（図3の（a））。これは、同時に12個の血清サンプルからエクソソームの単離を45分間で行うことが可能である。ここで、エクソソーム捕捉抗体のターゲットとして、テトラスパニン分子であるCD9を選択した。CD9は、さまざまな種類の細胞から分泌されたエクソソームの表面において強く発現しているからである（参考文献：Keller S, Sanderson MP,

Stoeck A, Altevogt P (2006) Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 107: 102-108.)。

[0086] この新規なデバイスの使用について、46人からの血清サンプル（NCが10人、IPが10人、進行した段階のADCが14人、進行した段階のSCCが12人）を、LC/MS/MSによって包括的に解析し、統計学的なバイオマーカーのスクリーニングに供した（図1、表1）。重要なことに、抗CD9-MS1Aチップを用いれば、ヒトの血清からエクソソームを再現性高く収集できることが確認されている（図3の（b））。6個の独立したチップを用いて、共通の血清サンプルからエクソソーム画分を精製して、LC/MS/MSで分析する測定を、3回行った。CD9₁₅₅₋₁₇₀ペプチド（GLAGGVEQFISDICPK, $m/z = 845.9266$ ；配列番号1）およびCD81₁₄₉₋₁₇₁ペプチド（TFHETLDCCGSSTLTALTTSVLK, $m/z = 848.0733$ ；配列番号2）に対応するピーク領域の変動係数（CV）は、それぞれ2.49%および2.87%であった。このことは、抗CD9-MS1Aチップに基づく相対的な定量分析におけるエラーは、十分小さく、信頼度の高いバイオマーカーの同定に十分であることを示している。

[0087] （ヒト血清のエクソソームのプロテオームの概要）

抗CD9-MS1Aチップの単離効率を評価するために、バイオマーカー探索段階における46個の血清サンプルのLC/MS/MS分析から同定された1601個のタンパク質を、細胞内局在に基づき分類した（図4）。DAVID GO解析による細胞成分分布では、非常に富んだ826個の細胞内タンパク質（51.6%）および333個の原形質膜タンパク質（20.8%）を示したが、一方で、146個の細胞外タンパク質（9.1%）しか、抗CD9-MS1Aチップの溶出液から同定されなかった。これらの数値は、オリジナルの細胞由来の細胞成分に関連するエクソソームの高収率の濃縮を明確に示すものであった。重要なことに、少数のエクソソームタンパク質の、高感度な検出の著しい妨げとなる血清タンパク質の大部分は、MS1A精製の段階で効果的に除去されていた。さらに、血清のエクソソームの生

理学的機能を包括的に解明するために、1601個の同定されたタンパク質が持つ機能的特徴を、Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) スコアに基づいて評価した(図4の(b))。この機能の推定によって、エクソソームが、小胞輸送に加えて、免疫制御、細胞間相互作用および刺激応答と関連している可能性が示唆された。これらのデータは、腫瘍由来のエクソソームの生物学的機能についてのみでなく、正常なエクソソームの生物学的な機能についても新規な発見に貢献するものであろう。

[0088] (肺癌に対するエクソソームのバイオマーカーの統計学的な同定)

Expressionist RefinerMS moduleにおけるラベルフリーな定量分析(図1および図2)により、46個の血清サンプルからの113,582個の重複していないペプチドを定量した。第1の統計学的なセクションにおいて、ANOVAを用いて、ADC患者(230個のペプチド、 $p < 0.001$)またはSCC患者(316個のペプチド、 $p < 0.001$)に特異的な特性ペプチドを大まかに抽出した。それぞれ、図5の(a)および図5の(b)に示している。第2の段階として、クロス確認に基づく特徴排除法を用いて、最小の誤分類率を示す最小のバイオマーカーセットを算出した。ここで、support vector machine recursive feature elimination (SVM-RFE)法またはSVM-SVM法によって、ADC患者群における真の予測率が90.9%である181個のペプチドおよびSCC患者群における真の予測率が100%である32個のペプチドを、最終的な候補バイオマーカーとして決定した(それぞれ、図5の(c)および図5の(d))。

[0089] 1601個のタンパク質同定データを参照することによって、19個のタンパク質由来の20個のペプチドを同定した(図6および表2)。これらのうち、CD91、ITAB(Integrin alpha-IIb)およびCD317は、エクソソームの表面に発現しており、エクソソームサンドイッチELISAによる測定が容易であるため、続く大規模検証試験において好ましいエクソソームのバイオマーカー候補であった。

[0090] (エクソソームサンドイッチELISAを用いたCD91についての大規

模検証試験)

上述のシングルランスクリーニング解析および候補マーカーCD91の臨床的有用性における、ラベルフリー定量の結果の定量的再現性を評価するために、212個のさらなる血清サンプル(表1)を用いて、エクソソームサンドイッチELISAによって、検証試験を行った。このアッセイにおいて、エクソソーム捕捉抗体として抗CD9抗体を用い、検出抗体としてビオチン化抗CD9抗体または抗CD91抗体を用いた(図7の(a))。CD9-CD9サンドイッチELISAによって測定した血清エクソソームの濃度は、個々のばらつきが大きかったため(図7の(b))、CD9-CD91サンドイッチELISAの測定結果を、エクソソームの濃度によって標準化した(図7の(d)において、U/エクソソームで示している)。また、同一のサンプルセットについて、既存の臨床バイオマーカーであるCEAを試験し(図7の(c))、診断上の有効性について、エクソソームのCD91のものと比較した。

[0091] エクソソームのCD91については2.04 U/エクソソームにおいて、またCEAについては5.0 ng/mLにおいて、カットオフ値を設定した場合、ステージIIIおよびIVのADC患者における感度は、CEAでは66.3%、CD91では61.4%であり、CEAがわずかに高かった。しかしながら、ステージIおよびIIのADC患者における検出力は、CEAでは22.7%、CD91では54.5%であり、CD91はCEAと比較して著しく高かった。コントロール群(NCおよびIP、n=73)におけるエクソソームのCD91偽陽性率は11.0%であり、CEAの偽陽性率は8.2%であった。これらの結果は、エクソソームのCD91は、CEAと比較して、肺ADCの早期検出に対する、より良好な潜在能力を有していることを示すものであった。

[0092] さらに、全てのコントロールのサンプル(n=73)およびすべてのADCのサンプル(n=105)を用いて、エクソソームのCD91とCEAとを組み合わせるによる、効果の向上を評価した。図8の(a)~(c)にお

けるROC曲線解析によって、組み合せたバイオマーカーは、それぞれ単独の場合と比較して、感度（71.4%）、特異度（91.8%）および曲線下面積（0.882）の全てにおいて、効果的に向上させることが明らかとなった。

[0093] （エクソソームサンドイッチELISAを用いたCD317についての大規模検証試験）

上述のシングルランスクリーニング解析および候補マーカーCD317の臨床的有用性における、ラベルフリー定量の結果の定量的再現性を評価するために、89個のさらなる血清サンプル（表3）を用いて、エクソソームサンドイッチELISAによって、検証試験を行った。このアッセイにおいて、エクソソーム捕捉抗体として抗CD9抗体を用い、検出抗体としてHRP標識抗CD317抗体を用いた（図9）。

[0094] その結果、特にADC患者における検出力が高かった。さらに、肺腺癌のステージ依存的に血中エクソソームCD317の量が増加することが判明した。

[0095] [表1]

<血清サンプルの臨床的情報>

	Screening set (n = 46)				Validation set (n = 212) for CD91			
	NC	IP	ADC	SCC	NC	IP	ADC	SCC
人数	10	10	14	12	54	19	105	34
平均年齢	44.7	71.6	61.5	65.3	40.2	65.7	64.4	68.8
性別 (女性/男性)	4/6	3/7	6/8	2/10	29/25	5/14	35/70	7/27
TNM stage								
I			0	0			12	5
II			0	0			10	0
III			4	5			27	18
IV			10	7			56	11

※ NC: 健常なコントロール群 ; IP: 間質肺炎 ; ADC: 肺腺癌 ; SCC: 肺扁平上皮癌

[0096]

[表2]

m/z	Charge	RT	Protein Descriptions	UniProtKB entry	Protein Group Accessions	Sequence
466.8749	2	71.7	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	BAIP2	Q9UQB8	TIMEQFNPSLR (配列番号 3)
579.2845	2	97.8	Copine-1	CPNE1	Q99829	SDPFLEFFR (配列番号 4)
603.9211	2	79.8	Fibrinogen alpha chain	FIBA	P02671	GLIDEVNQDFTNR (配列番号 5)
607.9609	3	97.9	Complement C5	CO5	P01031	LNLVATPLFLKPGIPYPIK (配列番号 6)
616.3505	3	102.3	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	CD91/LRP1	Q07954	DGIHNVEGVAVDWMGDNLVWTDGPK (配列番号 7)
675.3625	3	101.7	Mannan-binding lectin serine protease 1	MASP1	P48740	ETTDTEQTPGQEVVLSFGSFMSTFR (配列番号 8)
710.8192	2	102.1	Apolipoprotein B-100	APOB	P04114	ILGEELGFASLHDLQLLGK (配列番号 9)
735.9835	2	82.6	Coagulation factor X	FA10	P00742	ETYDFDIIVLR (配列番号 10)
789.4126	2	93.8	Complement component C8 alpha chain	CO8A	P07357	YNPVVIDFEMQPIHEVLR (配列番号 11)
883.0977	2	89.3	Plasminogen	PLMN	P00747	FVTWIEGVMR (配列番号 12)
893.8883	2	80.9	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	PGBM	P98160	YELGSLAVLR (配列番号 13)
988.3852	2	90.7	Myeloperoxidase	PERM	P05164	IGLDLPALNMQR (配列番号 14)
1064.4989	3	98.3	IgG Fc-binding protein	FCGBP	Q9Y6R7	VPSSYAEALCGLCGNFNGDPADDLALR (配列番号 15)
1066.5223	2	77.2	Integrin alpha-IIb	ITA2B	P08514	IVLLDVPVR (配列番号 16)
1077.9546	3	99.7	Ig kappa chain V-JII region HIC	KV313	P18136	LEPEDFAVYVCQQYGGSSPWTFGQGTK (配列番号 17)
1080.9724	2	75.2	Plasma protease C1 inhibitor	IC1	P05155	VTTSQDMLSIMEK (配列番号 18)
1210.4659	2	63.2	Alpha-2-macroglobulin	A2MG	P01023	GHFSISIPVK (配列番号 19)
457.2725	3	29.6	Bone marrow stromal antigen 2	CD317/BST2	Q10589	LRRENQVLSVR (配列番号 20)
1327.8315	2	35.1	Hyaluronan-binding protein 2	HABP2	Q14520	LKPVVDGHCALESK (配列番号 21)

[0097]

[表3]

<血清サンプルの臨床的情報>			
	Validation set (n = 89) for CD317		
	NC	ADC	SCC
人数	13	51	25
平均年齢	60.7	65.4	63.1
性別 (女性/男性)	4/9	19/32	8/17
TNM stage			
I		11	5
II		3	1
III		13	8
IV		24	11

※ NC: 健常なコントロール群 ; ADC: 肺腺癌 ; SCC: 肺扁平上皮癌

産業上の利用可能性

[0098] 本発明は、肺癌の検出に利用することができる。そのため、本発明は、診断医療分野および保健医学分野に広く利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 肺癌を検出する方法であって、
生体から採取された試料において、CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定する工程を含む、検出方法。
- [請求項2] 測定された上記CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量が肺癌を有していない対照被験体と比較して増加している場合に、肺癌を有しているか、または肺癌を有している可能性が高いと判定する工程をさらに含む、請求項1に記載の検出方法。
- [請求項3] 上記CD91の量は、エクソソーム表面に存在するCD91の量であり、上記CD317の量は、エクソソーム表面に存在するCD317の量である、請求項1または2に記載の検出方法。
- [請求項4] 生体から採取された試料において、CEAの量を測定する工程をさらに含む、請求項1～3の何れか1項に記載の検出方法。
- [請求項5] 上記肺癌は、ステージⅠまたはⅡである、請求項1～4の何れか1項に記載の検出方法。
- [請求項6] 上記肺癌は、ステージⅢまたはⅣである、請求項1～4の何れか1項に記載の検出方法。
- [請求項7] ELISA法によって上記CD91およびCD317のうちの少なくとも一方の量を測定する、請求項1～6の何れか1項に記載の検出方法。
- [請求項8] 上記試料は、全血液、血清または血漿である、請求項1～7の何れか1項に記載の検出方法。
- [請求項9] 肺癌を検出するための検出キットであって、
生体から採取された試料におけるCD91を認識する抗体またはペプチドプローブ、および、生体から採取された試料におけるCD317を認識する抗体またはペプチドプローブのうちの少なくとも一方を含む、検出キット。
- [請求項10] 上記試料中のエクソソームを捕捉するための抗体が結合した基材を

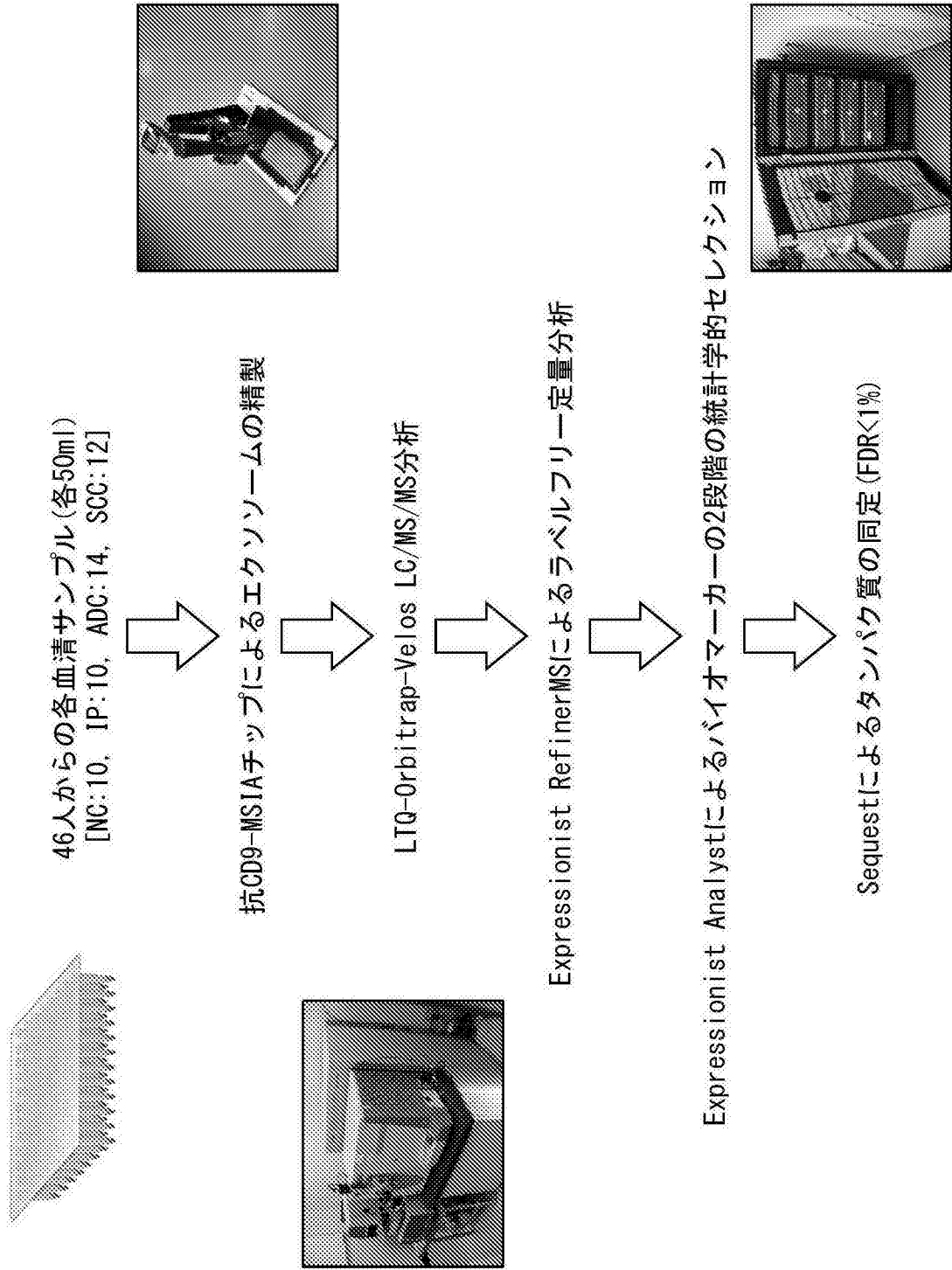
さらに含む、請求項 9 に記載の検出キット。

[請求項11] 上記エクソソームを捕捉するための抗体は、抗 C D 9 抗体である、請求項 1 0 に記載の検出キット。

[請求項12] 生体から採取された試料における C E A を認識する抗体またはペプチドプローブをさらに含む、請求項 9 ～ 1 1 の何れか 1 項に記載の検出キット。

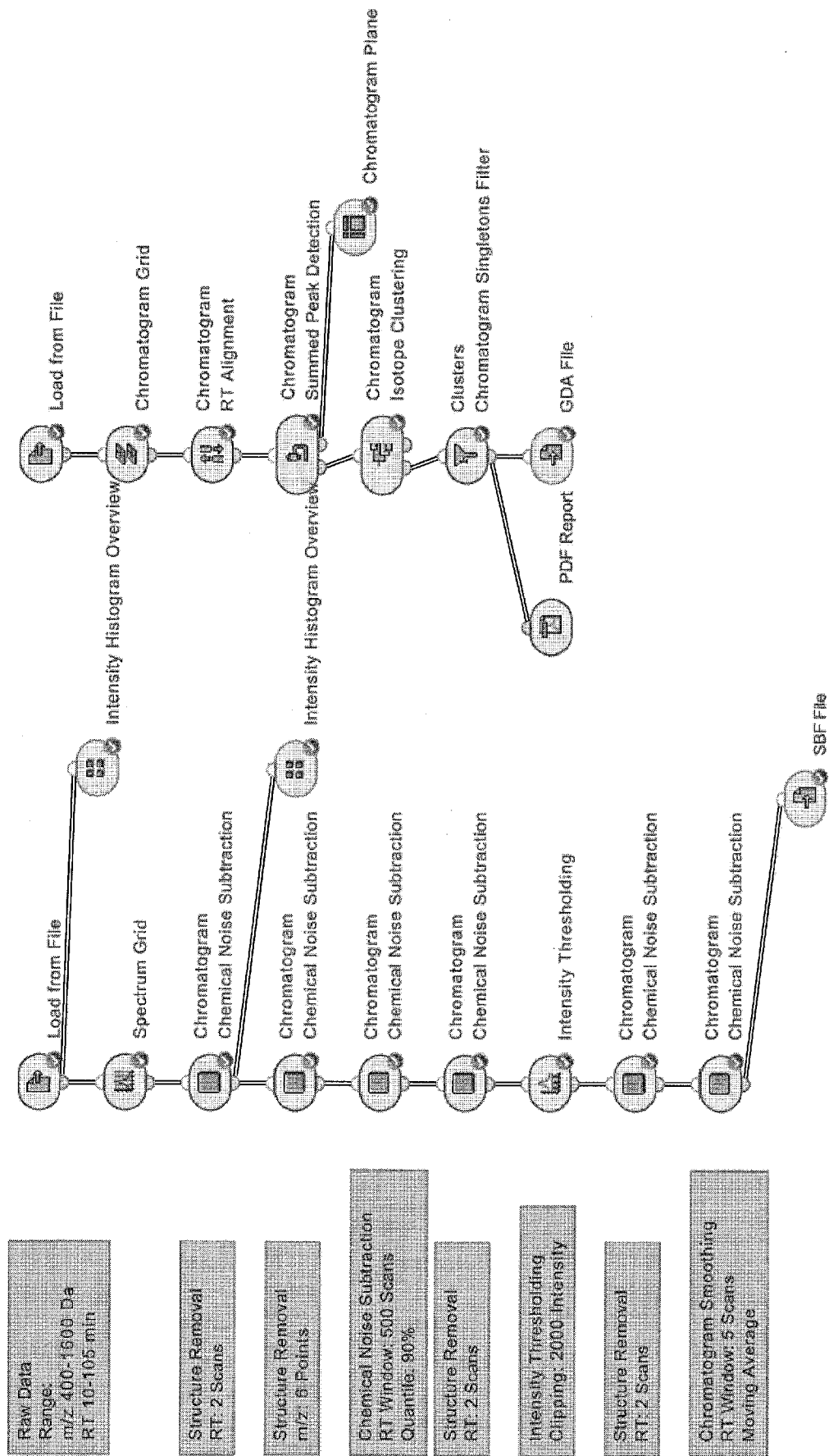
[図1]

図 1



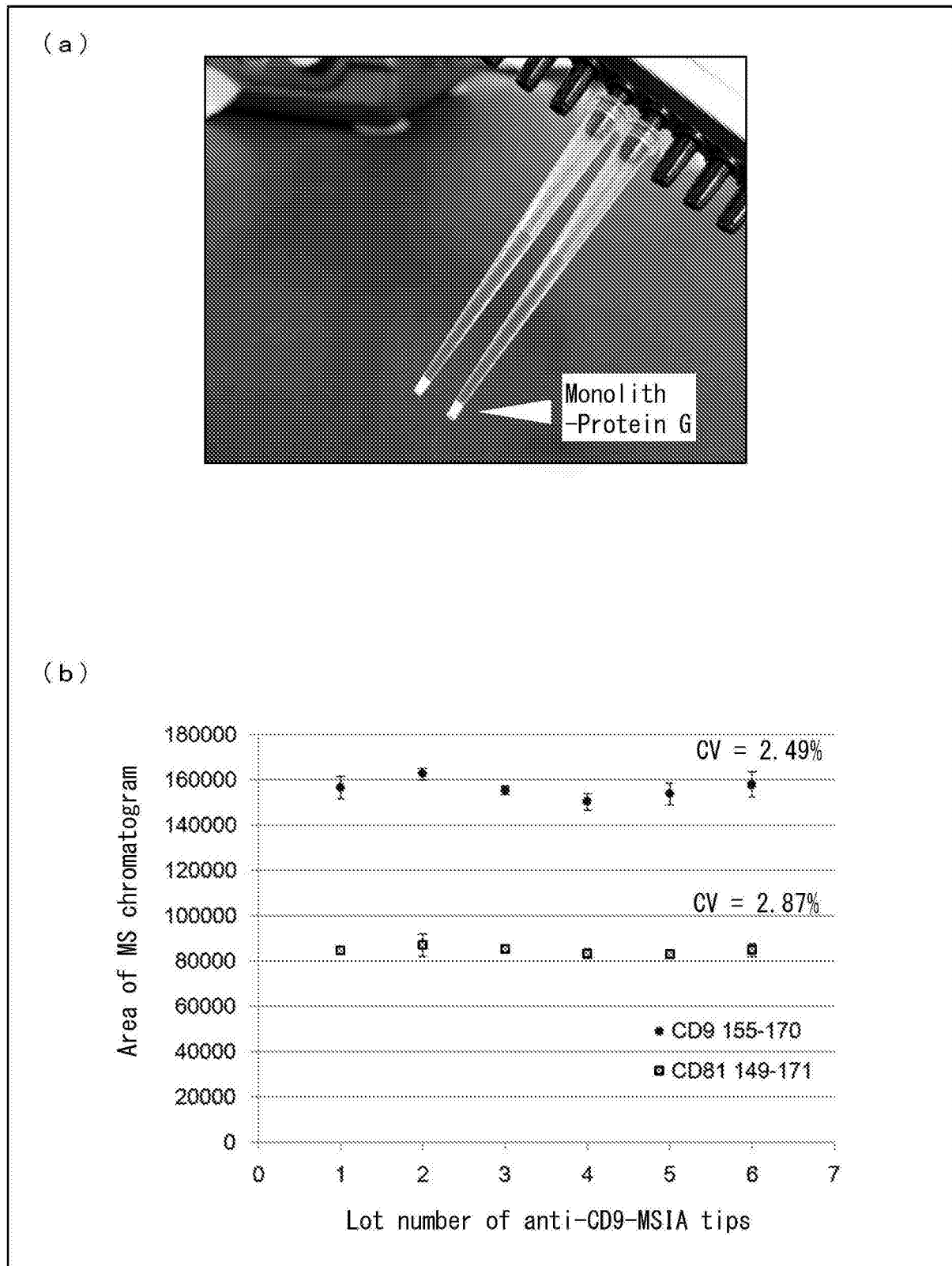
[2]

[2]



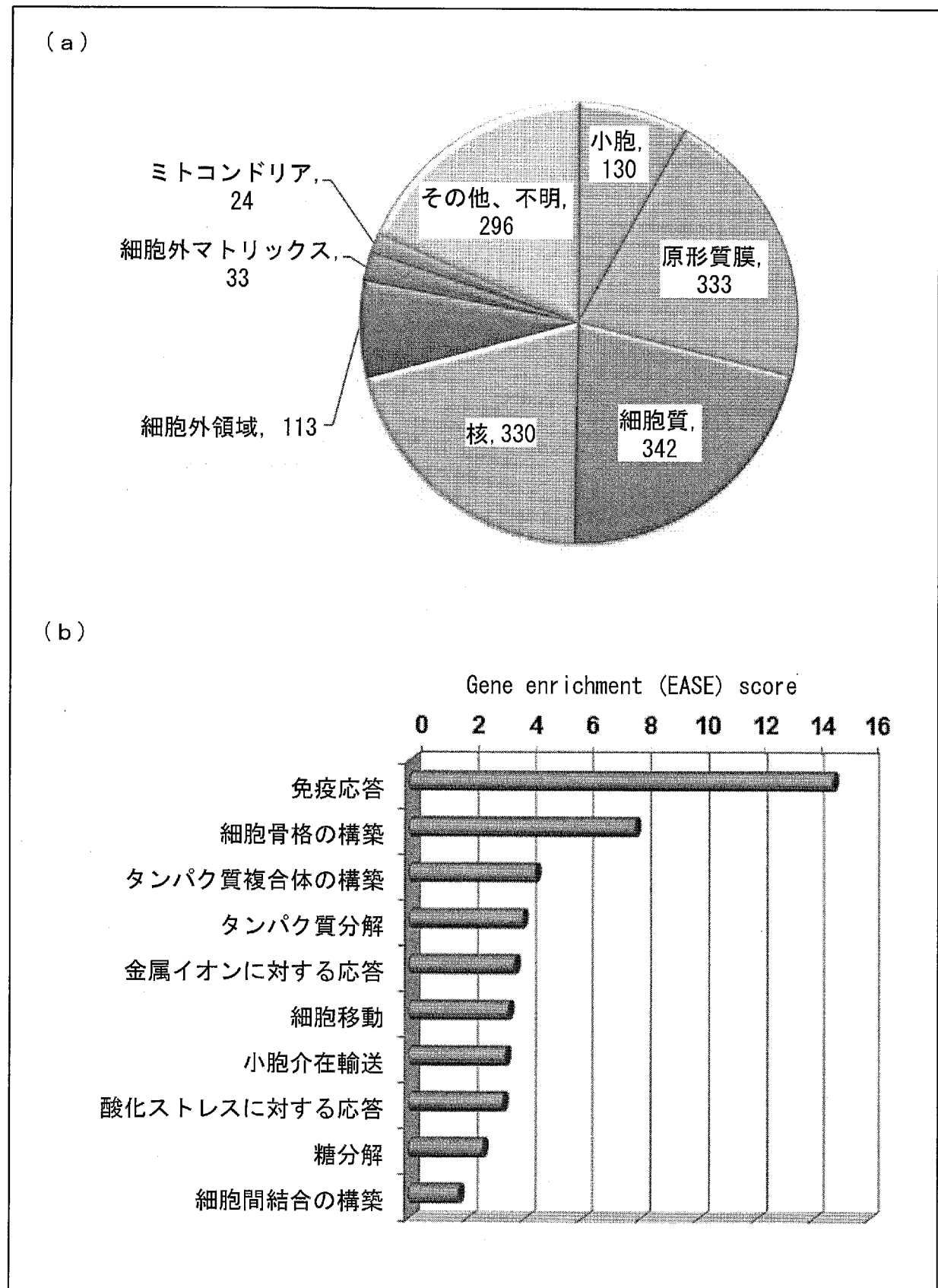
[図3]

図 3



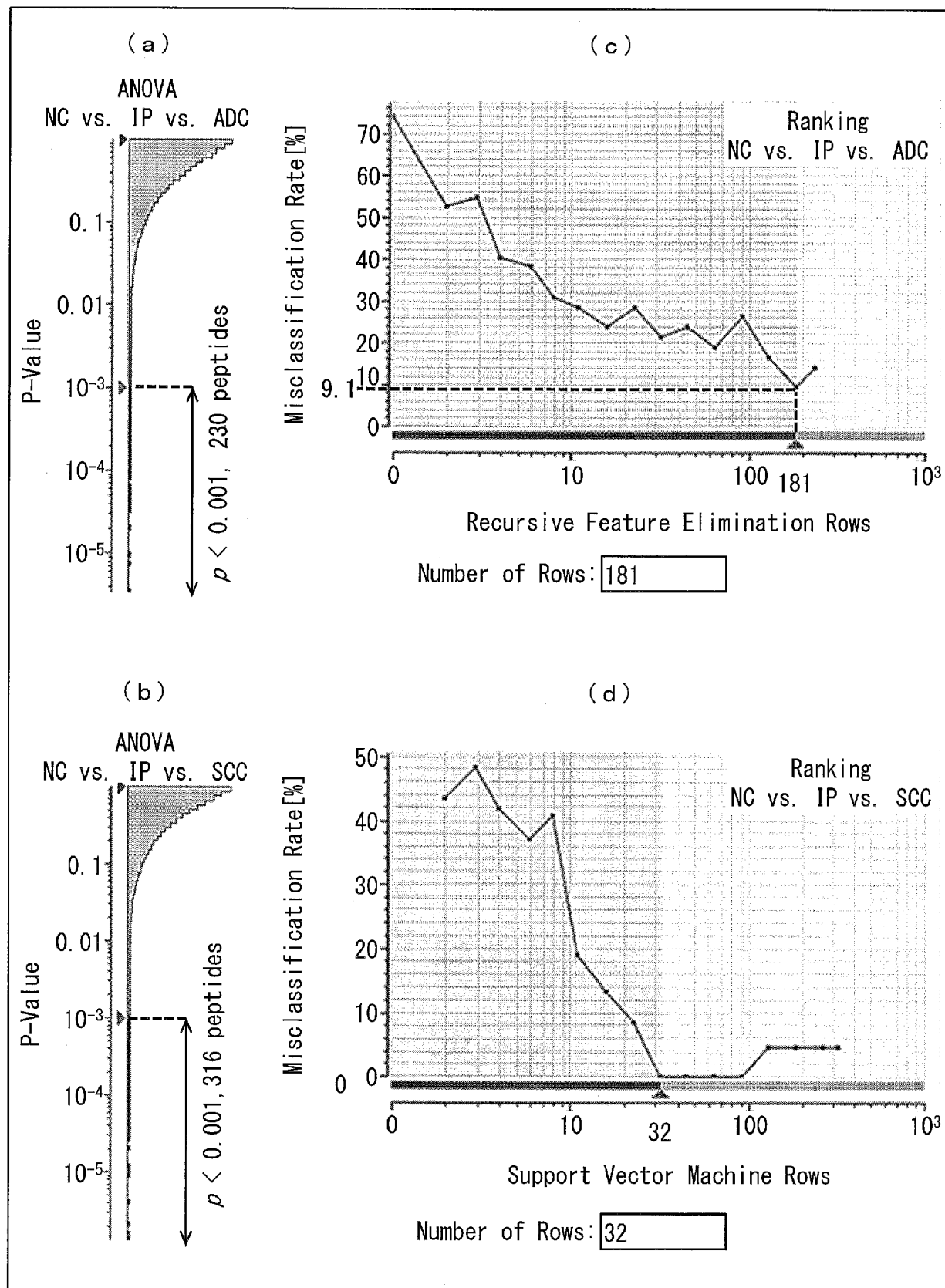
[図4]

図 4



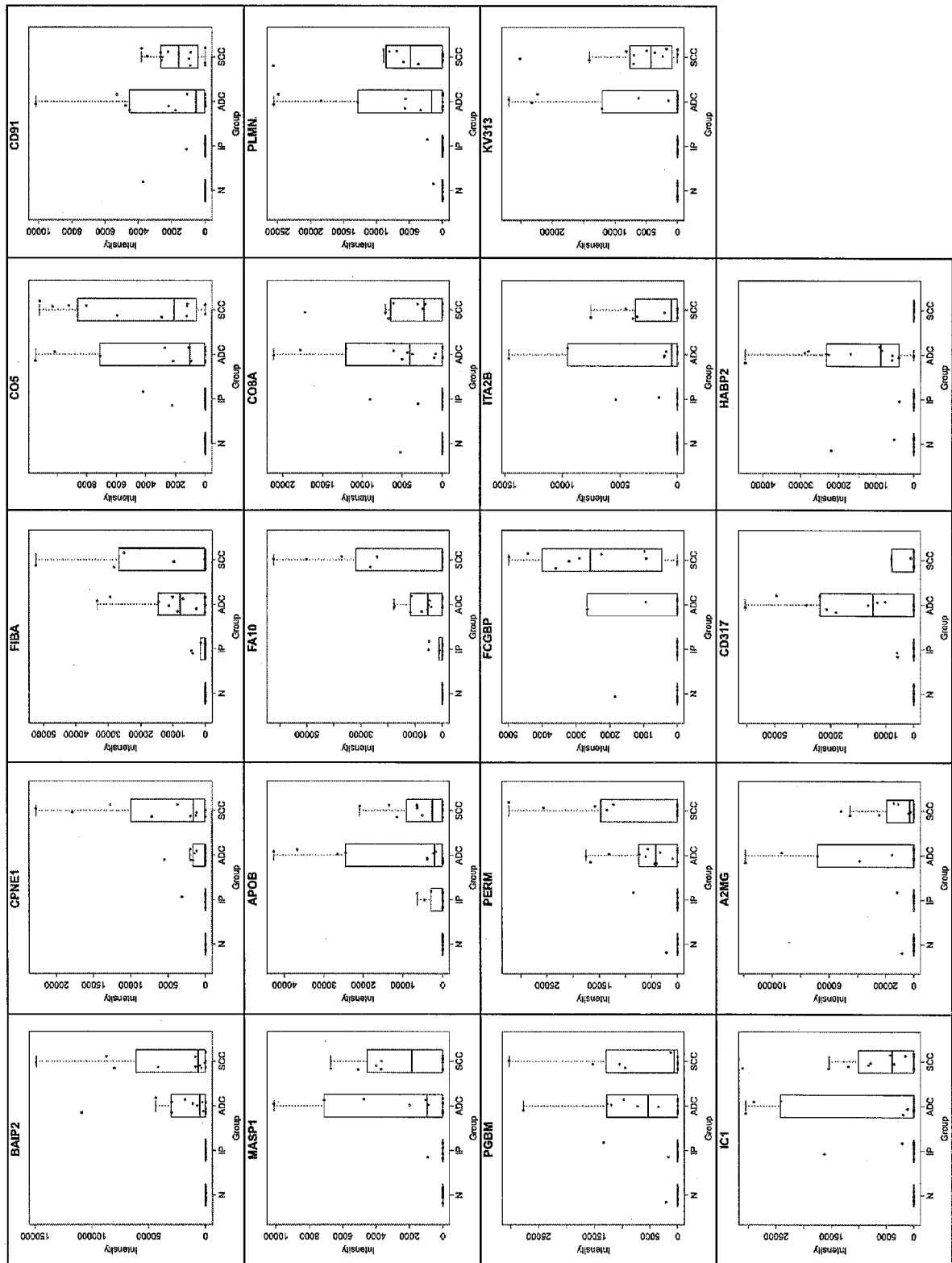
[図5]

図 5



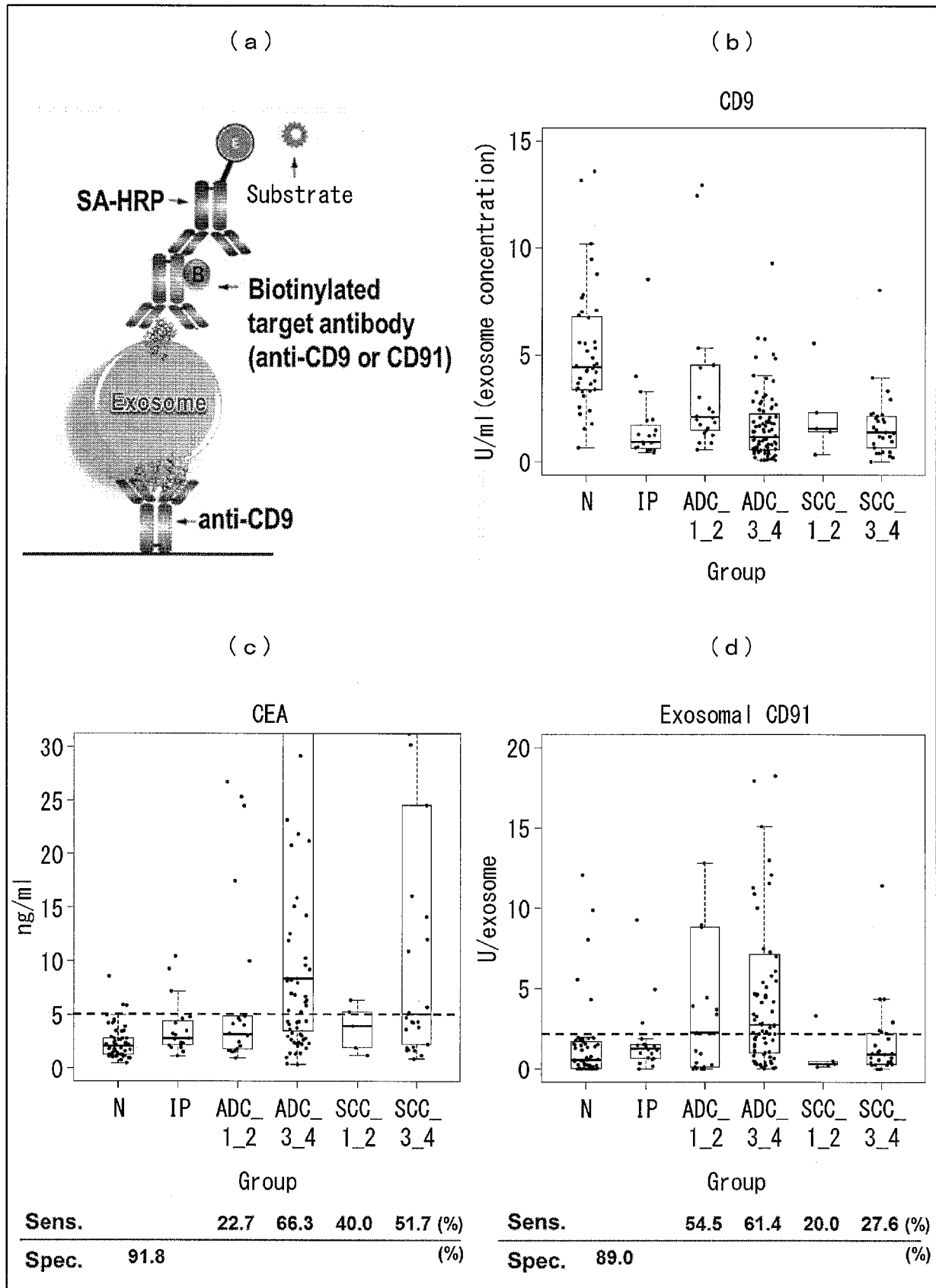
[図6]

6



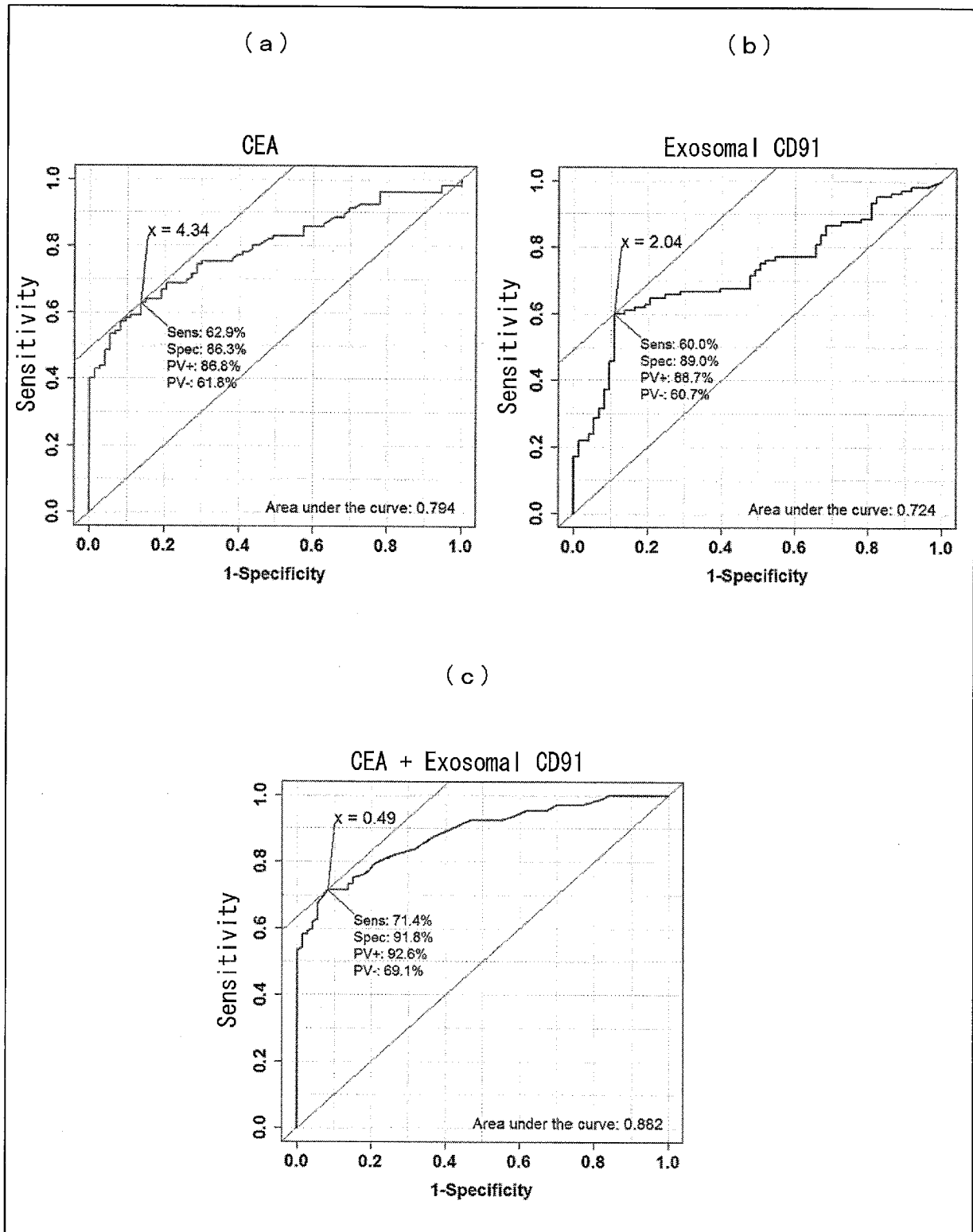
[図7]

図 7



[図8]

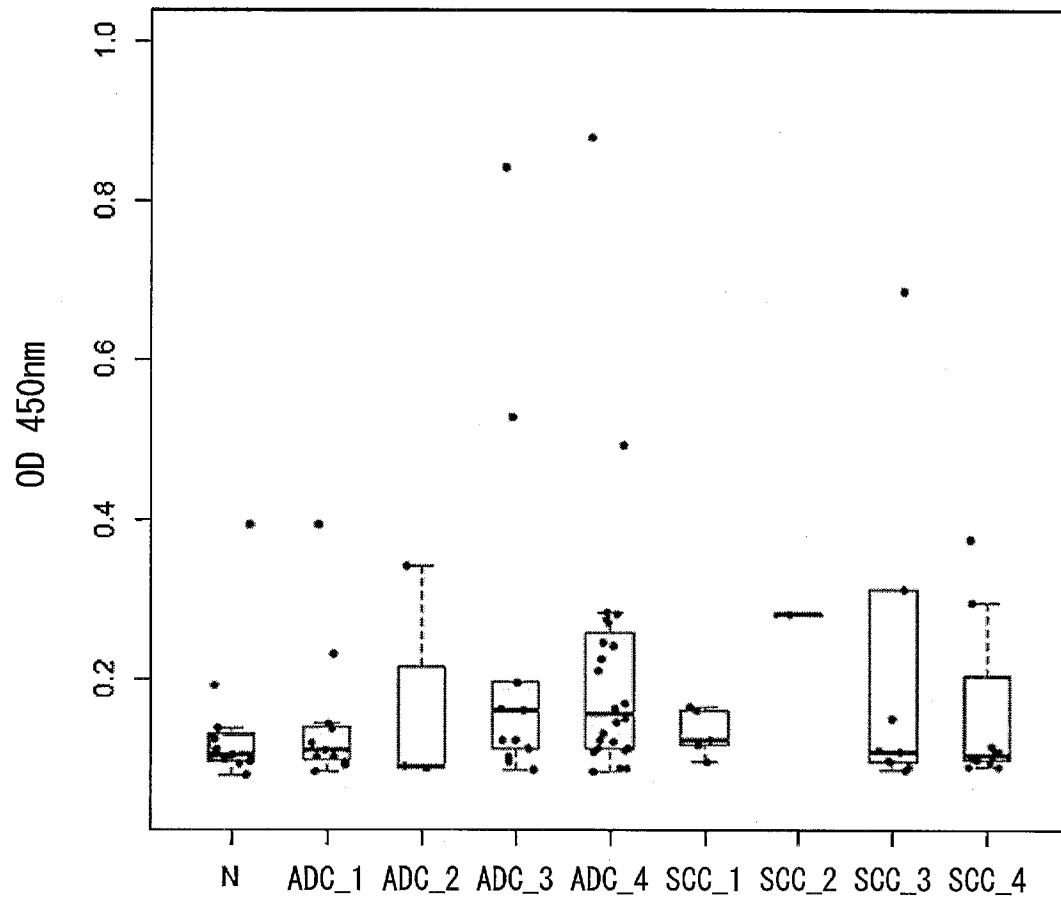
図 8



[図9]

図 9

CD317



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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, C12M1/34, G01N33/53

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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 Y	JP 2006-182661 A (The University of Tokushima), 13 July 2006 (13.07.2006), paragraphs [0002], [0004] (Family: none)	1, 2, 5, 6, 7, 9 3, 4, 8, 10-12
A	TAVANO Barbara et al., Ig-like Transcript 7, but Not Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2 (Also Known as HM1.24, Tetherin, or CD317), Modulates Plasmacytoid Dendritic Cell Function in Primary Human Blood Leukocytes, J Immunol, 2013.03.15, Vol.190, No.6, Page.2622-2630, Abstract	1-12
Y	Takuya YAMASHITA et al., "Search for novel lung cancer biomarkers by proteomic analysis of exosomal membrane", JSBMS Lett, 2012, vol.37, no.Supplement, page 51	3, 8, 10, 11

☒ 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
12 February 2015 (12.02.15)

Date of mailing of the international search report
03 March 2015 (03.03.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082122

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-185921 A (National Institute of Biomedical Innovation), 19 September 2013 (19.09.2013), paragraph [0005] (Family: none)	4, 12
Y	WO 2013/099925 A1 (Shionogi & Co., Ltd.), 04 July 2013 (04.07.2013), abstract & CA 2860163 A & KR 10-2014-0107615 A	10, 11
A	Takuya YAMASHITA et al., "Exosome Yurai Maku Tanpakushitsu no Proteome Kaiseki ni yoru Shinki Haigan Ketsueki Shindan Marker no Tansaku", Abstracts of Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 2012, vol.132nd, no.4, page 187	1-12
P, A	Koji Ueda, et al., Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes, Scientific reports, 2014, Vol. 4, pp. Article No.: 6232, Electronic Publication Date: 29 Aug 2014	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082122

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1 (Takuya YAMASHITA et al., "Search for novel lung cancer biomarkers by proteomic analysis of exosomal membrane", JSBMS Lett, 2012, vol.37, no.Supplement, page 51) describes that an exosome surface protein in blood is used as a lung cancer biomarker. Thus, detection of lung cancer using CD91 and detection of lung cancer using CD317 set forth in claims 1 to 12 of the present application are different inventions respectively having, as a special technical feature of the invention, detection of lung cancer using CD91 and detection of lung cancer using CD317.

(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082122

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Consequently, the following two inventions are involved in claims 1-12 of the present applicaiton.

Invention 1: Detection of lung cancer using CD91 in claims 1 to 12.

Invention 2: Detection of lung cancer using CD317 in claims 1 to 12.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. G01N33/574, C12M1/34, G01N33/53

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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 Y	JP 2006-182661 A（国立大学法人徳島大学）2006.07.13, 【0002】【0004】（ファミリーなし）	1, 2, 5, 6, 7, 9 3, 4, 8, 10-12
A	TAVANO Barbara et al., Ig-like Transcript 7, but Not Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2 (Also Known as HM1.24, Tetherin, or CD317), Modulates Plasmacytoid Dendritic Cell Function in Primary Human Blood Leukocytes, J Immunol, 2013.03.15, Vol.190, No.6, Page.2622-2630, Abstract	1-12

☒ 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

1 2 . 0 2 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

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）

三木 隆

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

3 3 1 2

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
Y	山下琢矢等, Exosome 由来膜タンパク質のプロテオーム解析による新規肺がんバイオマーカーの探索, JSBMS Lett, 2012, Vol. 37 No. Supplement Page. 51	3, 8, 10, 11
Y	JP 2013-185921 A (独立行政法人医薬基盤研究所) 2013. 09. 19, 【0005】 (ファミリーなし)	4, 12
Y	WO 2013/099925 A1 (塩野義製薬株式会社) 2013. 07. 04, 要約 & CA 2860163 A & KR 10-2014-0107615 A	10, 11
A	山下琢矢等, Exosome 由来膜たん白質のプロテオーム解析による新規肺がん血液診断マーカーの探索, 日本薬学会年会要旨集, 2012, Vol. 132nd No. 4 Page. 187	1-12
PA	Koji Ueda, et al., Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes, Scientific reports, 2014, Vol. 4, pp. Article No.: 6232, Electronic Publication Date: 29 Aug 2014	1-12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1（山下琢矢等，Exosome由来膜タンパク質のプロテオーム解析による新規肺がんバイオマーカーの探索，JSBMS Lett, 2012, Vol. 37 No. Supplement Page. 51）に血中エクソソーム表面のタンパク質を肺癌のバイオマーカーとすることが記載されていることから、本願請求項1～12の肺癌をCD91、CD317で検出することは、それぞれ、CD91、CD317で肺癌を検出することを発明の特別な技術的特徴とする異なる発明である。よって、本願の請求項1～12には、下記の2つの発明が含まれている。

発明1：請求項1～12のCD91で肺癌を検出すること

発明2：請求項1～12のCD317で肺癌を検出すること

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。