

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6198752号
(P6198752)

(45) 発行日 平成29年9月20日(2017.9.20)

(24) 登録日 平成29年9月1日(2017.9.1)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68 A

請求項の数 11 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2014-552446 (P2014-552446)
(86) (22) 出願日	平成25年1月17日 (2013.1.17)
(65) 公表番号	特表2015-505370 (P2015-505370A)
(43) 公表日	平成27年2月19日 (2015.2.19)
(86) 国際出願番号	PCT/AU2013/000030
(87) 国際公開番号	W02013/106886
(87) 国際公開日	平成25年7月25日 (2013.7.25)
審査請求日	平成28年1月15日 (2016.1.15)
(31) 優先権主張番号	2012900233
(32) 優先日	平成24年1月20日 (2012.1.20)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)

(73) 特許権者	514183190 アデレード リサーチ アンド イノベイ ション ピーティーウェイ エルティーディ — ADELAIDE RESEARCH & INNOVATION PTY LTD オーストラリア国 サウス オーストラリ ア 5000 アデレード グレンフェル ストリート 115 レベル 14
(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(74) 代理人	100181272 弁理士 神 紘一郎
(74) 代理人	100173657 弁理士 瀬沼 宗一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】胃癌のバイオマーカー及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) バイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質(VDBP)である、対象から得られる検体における前記バイオマーカーの発現レベルをインピトロで測定する工程、及び
(b) 検体におけるVDBPの発現レベルを、VDBPの基準発現レベルと比較する工程を含み、

VDBPの基準発現レベルより低い、前記検体におけるVDBPの発現レベルが、前記対象におけるGCを検出する、

対象における胃癌(GC)の検出のためにデータを収集する方法。

【請求項 2】

(a) 1つ又は複数の他のバイオマーカーが、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット(IGFALS)、及びアファミンからなる群から選択される、前記対象から得られる検体における1つ又は複数の他のバイオマーカーの発現レベルをインピトロで測定する工程、

(b) 検体における各バイオマーカーの発現レベルを、各バイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程
をさらに含み、

クラスタリンの基準発現レベルより低い、検体におけるクラスタリンの発現レベルが、前記対象におけるGCを検出する、

IGFALSの基準発現レベルより高い、検体におけるIGFALSの発現レベルが、

10

20

前記対象における G C を検出する、及び、

アファミンの基準発現レベルより低い、検体におけるアファミンの発現レベルが、前記対象における G C を検出する、請求項 1に記載の方法。

【請求項 3】

検体が血清検体または組織検体である、請求項 1 または 2に記載の方法。

【請求項 4】

検体が血清検体であり、V D B P または 1 つ又は複数の他のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程が検体中のバイオマーカータンパク質のレベルを測定する工程を含む、又は、

検体が組織検体であり、V D B P または 1 つ又は複数の他のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程が検体中のバイオマーカー-m R N A のレベルを測定する工程を含む、請求項 3に記載の方法。 10

【請求項 5】

V D B P 及びクラスタリンの発現レベルが検体において測定される、

V D B P 及び I G F A L S の発現レベルが検体において測定される、

V D B P 及びアファミンの発現レベルが検体において測定される、

V D B P 、クラスタリン及び I G F A L S の発現レベルが検体において測定される、

V D B P 、クラスタリン及びアファミンの発現レベルが検体において測定される、

V D B P 、 I G F A L S 及びアファミンの発現レベルが検体において測定される、又は

、

V D B P 、クラスタリン、 I G F A L S 及びアファミンの発現レベルが検体において測定される、

請求項 2 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

検体又は細胞においてバイオマーカーであるアポリポタンパク質 E (A p o E) 及び / 又はバイオマーカーであるハプトグロビンの発現レベルを測定する工程をさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

バイオマーカーの発現レベルを測定する手段を含む、ここで、前記バイオマーカーが、ビタミン D 結合タンパク質 (V D B P) である、対象における胃癌 (G C) を検出するためのキット。 30

【請求項 8】

V D B P の発現レベルを測定する前記手段が、抗体ベースの試験、質量分析、プロテオミクス技術、表面プラズモン共鳴 (S P R) 、多用途ファイバーベース S P R 、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学、マイクロサイトメトリー、タンパク質マイクロアレイ、顕微鏡検査、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) 、フローサイトメトリー、ノーザンブロッティング、R N A インサイチュハイブリダイゼーション、逆転写酵素 P C R (R T - P C R) 、リアルタイム (定量的) R T - P C R 、D N A または R N A マイクロアレイ、及び遺伝子発現の連続解析 (S A G E) からなる群から選択される、請求項 7に記載のキット。 40

【請求項 9】

V D B P の発現レベルを測定する前記手段が、V D B P に特異的に結合する抗体である、請求項 7 または 8に記載のキット。

【請求項 10】

1 つ又は複数の他のバイオマーカーが、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット (I G F A L S) 、及びアファミンからなる群から選択される、前記 1 つ又は複数の他のバイオマーカーの発現レベルを測定する手段をさらに含む、請求項 7 ~ 9 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 11】

クラスタリン、 I G F A L S 、及びアファミンの発現レベルを測定する手段が、抗体ベ

10

20

30

40

50

ースの試験、質量分析、プロテオミクス技術、表面プラズモン共鳴（S P R）、多用途ファイバーベースS P R、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学、マイクロサイトメトリー、タンパク質マイクロアレイ、顕微鏡検査、蛍光活性化細胞選別（F A C S）、フローサイトメトリー、ノーザンプロットティング、R N A インサイチュハイブリダイゼーション、逆転写酵素P C R（R T - P C R）、リアルタイム（定量的）R T - P C R、D N AまたはR N Aマイクロアレイ、及び遺伝子発現の連続解析（S A G E）からなる群から選択される、請求項10に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権主張

本国際特許出願は、2012年1月20日出願の豪州仮特許出願第2012900233号に基づく優先権を主張し、その内容が参考により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

本発明は、胃癌と関連する生物学的マーカーの同定に関する。具体的には、胃癌と一定数のタンパク質の差次的発現との間の関連性が同定された。生物学的マーカーは、胃癌の診断方法、胃癌感受性である個体の同定方法、及び胃癌の進行の評価方法を含む様々な目的のために利用できる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

胃癌（本明細書では「G C」ともいう）は、世界で4番目に最も一般的な癌であり、癌死亡の2番目の主因である。西洋諸国では、診断時の期待5年生存率は10～30%に過ぎない。これは、診断症状が少なく、それゆえ末期に内視鏡診断されることに帰することができる。不幸なことに、G Cの症状が現れたときには、>80%の症例で転移がすでに生じている。

【0 0 0 4】

日本はG Cの発症率が世界で最も高い国の1つである。日本における胃X線間接撮影法による無症状の個体に対するマススクリーニングプログラムの実施は、早期発見されるG C症例数を増加させ、全体の5年生存率を50%超まで向上させた。胃X線間接撮影法の感度及び特異度はそれぞれ、70～90%及び80～90%で良好である。しかしながら、費用対効果研究により、胃X線間接撮影法プログラムは、G Cの発症率が低い西洋諸国では実行可能でないことが示されている。より好適な診断アプローチは、G Cの病因と関連するG Cバイオマーカーの検出のための、正確で、非侵襲的で、費用対効果の高い試験を伴うものと考えられる。

【0 0 0 5】

G Cに使用される現存の臨床マーカーである癌胎児性抗原（carcinoembryonic antigen：C E A）、糖鎖抗原（carbohydrate antigen：C A）19-9及びC A72-4は、定期的スクリーニングのためには感度も特異度も十分でなく、主に治療後の疾患の進行をモニターするために使用される。ペプシノーゲンI / I Iの血清比に、アジア人集団における代替的G C指標として一定の見込みがあることが示されているが、西洋人集団を含む他の人種群への適用可能性に関して疑問が残る。

【0 0 0 6】

G Cのバイオマーカー発見に関連するいくつかの根本的障害がある。早期疾患のヒト検体を得ることは、その無症状性を鑑みると困難である。ヒト集団の遺伝的多様性及び制御できない環境要因の影響により、問題はさらに複雑になる。すなわち、バイオマーカー発見における高度の自然変異により潜在的バイオマーカーが特定されにくくなり得ることを意味する。

【0 0 0 7】

前述のこれら困難ゆえに、G Cを示す感度及び特異度の高いバイオマーカーは少なかつた。したがって、大集団における早期G Cの検出に好適な新しいバイオマーカーの同定が

10

20

30

40

50

緊急の課題である。

【0008】

本明細書におけるいづれの先行技術への言及も、かかる先行技術が任意の国における一般常識の一部を形成するものであると認めること、又は何らかの形で示唆することとしては理解されず、理解されるべきではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

前述の困難に対処する際に、本発明者らは、炎症関連G C の遺伝子組換えモデルマウス (g p 1 3 0 F / F) を利用した。g p 1 3 0 F / F マウスは、胃の腺部に自然発症的に再現性良く腺腫を発症し、かかる腺腫は、ピロリ菌 (H. pylori) への慢性感染により生じるヒトにおける腸型 G C と関連する進行性の組織学的特徴のすべてを示す。これは、早期 G C の新しいバイオマーカー指標の同定をもたらした。10

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって、第 1 の態様において、本発明は、対象における胃癌 (G C) の診断方法を提供し、この方法は、

(a) 1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミン D 結合タンパク質 (vitamin D binding protein : V D B P) 、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット (insulin like growth factor binding protein complex acid labile subunit : I G F A L S) 、及びアファミン (afamin) からなる群から選択される、対象における 1 つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、20

(b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、及び

(c) 前記比較に基づいて対象における G C を診断する工程を含む。

【0011】

一実施形態において、1 つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、対象から得られる検体中で測定される。一実施形態において、検体は血清検体である。この点において、1 つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することは、検体中のバイオマーカータンパク質のレベルを測定することを含む。一実施形態において、検体は組織検体である。この点において、1 つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することは、検体中のバイオマーカー m R N A のレベルを測定することを含む。30

【0012】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒト V D B P である。一実施形態において、V D B P の基準発現レベルより低い、対象における V D B P の発現レベルは、対象における G C を示す。

【0013】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトクラスタリンである。一実施形態において、クラスタリンの基準発現レベルより低い、対象におけるクラスタリンの発現レベルは、対象における G C を示す。40

【0014】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒト I G F A L S である。一実施形態において、I G F A L S の基準発現レベルより高い、対象における I G F A L S の発現レベルは、対象における G C を示す。

【0015】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトアファミンである。一実施形態において、アファミンタンパク質の基準発現レベルより低い、対象におけるアファミンタンパク質のレベルは、対象における G C を示す。

【0016】

50

第2の態様において、本発明は、対象が胃癌（G C）の発症に感受性を有するかどうかの判定方法を提供し、この方法は、

(a) 1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質（V D B P）、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット（I G F A L S）、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、

(b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、及び

(c) 前記比較に基づいて対象がG Cの発症に感受性を有するかどうかを判定する工程を含む。

10

【0017】

一実施形態において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、対象から得られる検体中で測定される。一実施形態において、検体は血清検体である。この点において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することは、検体中のバイオマーカータンパク質のレベルを測定することを含む。一実施形態において、検体は組織検体である。この点において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することは、検体中のバイオマーカーm R N Aのレベルを測定することを含む。

【0018】

本発明の第2の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトV D B Pである。一実施形態において、V D B Pの基準発現レベルより低い、対象におけるV D B Pの発現レベルは、対象におけるG Cを示す。

20

【0019】

本発明の第2の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトクラスタリンである。一実施形態において、クラスタリンの基準発現レベルより低い、対象におけるクラスタリンの発現レベルは、対象におけるG Cを示す。

【0020】

本発明の第2の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトイ G F A L Sである。一実施形態において、I G F A L Sの基準発現レベルより高い、対象におけるI G F A L Sの発現レベルは、対象におけるG Cを示す。

【0021】

30

本発明の第2の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトアファミンである。一実施形態において、アファミンタンパク質の基準発現レベルより低い、対象におけるアファミンタンパク質のレベルは、対象におけるG Cを示す。

【0022】

第3の態様において、本発明は、対象における胃癌（G C）の進行の評価方法を提供し、この方法は、

(a) 1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質（V D B P）、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット（I G F A L S）、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、

40

(b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、及び

(c) 前記比較に基づいて対象におけるG Cの進行を評価する工程を含む。

【0023】

一実施形態において、対象はG Cの治療を受けている。

【0024】

本発明の第3の態様のいくつかの実施形態において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、対象から得られる検体中で測定される。一実施形態において、検体は血清検体である。この点において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定するこ

50

とは、検体中のバイオマーカータンパク質のレベルを測定することを含む。一実施形態において、検体は組織検体である。この点において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することは、検体中のバイオマーカー mRNA のレベルを測定することを含む。

【0025】

本発明の第3の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒト V D B P である。一実施形態において、V D B P の基準発現レベルより低い、対象における V D B P の発現レベルは、対象における G C を示す。

【0026】

本発明の第3の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトクラスタリンである。一実施形態において、クラスタリンの基準発現レベルより低い、対象におけるクラスタリンの発現レベルは、対象における G C を示す。

【0027】

本発明の第3の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒト I G F A L S である。一実施形態において、I G F A L S の基準発現レベルより高い、対象における I G F A L S の発現レベルは、対象における G C を示す。

【0028】

本発明の第3の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーはヒトアファミンである。一実施形態において、アファミンタンパク質の基準発現レベルより低い、対象におけるアファミンタンパク質のレベルは、対象における G C を示す。

【0029】

第4の態様において、本発明は、対象における胃癌 (G C) の治療に有用な候補治療剤のスクリーニング方法を提供し、この方法は、ビタミンD結合タンパク質 (V D B P)、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット (I G F A L S)、及びアファミンからなる群から選択される1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルをモジュレートする活性について、候補治療剤をアッセイする工程を含む。

【0030】

本発明の第4の態様の一実施形態において、この方法は、
 (a) 候補治療剤を対象に投与する工程、
 (b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、及び
 (c) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、
 を含み、

バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルが、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一である場合、候補治療剤は対象における G C の治療に有用である。

【0031】

本発明の第4の態様の一実施形態において、この方法は、
 (a) 候補治療剤をバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーを発現する細胞に曝露する工程、
 (b) 前記細胞におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルの変化を測定する工程、及び
 (c) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、
 を含み、

バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルが、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一である場合、候補治療剤は対象における G C の治療に有用である。

【0032】

10

20

30

40

50

本発明の第4の態様のいくつかの実施形態において、候補治療剤は、対象又は細胞におけるV D B Pの発現レベルを、V D B Pの基準発現レベルと近似するか、又は同一であるレベルまで増加させる。いくつかの実施形態において、候補治療剤は、対象又は細胞におけるクラスタリンの発現レベルを、クラスタリンの基準発現レベルと近似するか、又は同一であるレベルまで増加させる。いくつかの実施形態において、候補治療剤は、対象又は細胞におけるI G F A L Sの発現レベルを、I G F A L Sの基準発現レベルと近似するか、又は同一であるレベルまで減少させる。いくつかの実施形態において、候補治療剤は、対象又は細胞におけるアファミンの発現レベルを、アファミンの基準発現レベルと近似するか、又は同一であるレベルまで増加させる。

【0033】

10

本発明の前述の態様のいくつかの実施形態において、この方法は、対象又は細胞においてバイオマーカーであるアポリポタンパク質E(apolipoprotein E: ApoE)及び/又はバイオマーカーであるハブトグロビンの発現レベルを測定する工程をさらに含む。

【0034】

第5の態様において、本発明は、対象における胃癌(GC)を診断するための、対象がGCの発症に感受性を有するかどうかを判定するための、又は対象におけるGCの進行を評価するためのキットを提供し、このキットは、1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質(V D B P)、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット(I G F A L S)、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する手段を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0035】

本発明の態様及び利点のさらなる理解のため、添付の図面とともに解釈される、以下の詳細な説明及び実施例を参照すべきである。

【図1】図示された遺伝子型の1週齢マウスに対し、実施例1に関する組織学的分析を実施した。胃の切除及び外側湾曲に沿った開口後、胃を内腔が観察者側を向くように留めた(挿入図)。点線に沿った縦断切片をH & Eで染色し、胃洞が左側に来るよう配向した。すべてのg p 1 3 0^{F/F}及びg p 1 3 0^{F/F}; I 1 6^{-/-}マウスの胃には、胃洞の腺部(a)内に4~6個の別個の腺腫様腫瘍(矢印)が見られ、これらは、炎症性浸潤と関連する細長く、多くの場合枝分かれした腺により特徴付けられる(アスタリスク)。過形成性上皮の小領域を、g p 1 3 0^{F/F}; S t a t 3^{+/-}マウスに見ることができ(矢印)、腫瘍形成の遅延及び減弱化を示唆する¹¹。胃底の扁平上皮(f)は過形成の徵候を一切示さない。バーは200 μm(挿入図)及び50 μm(H + E切片)である。

30

【図2】(A)胃癌(GC)の候補血清タンパク質バイオマーカーの発見、ベリフィケーション及びバリデーションのために実施例1で使用されたストラテジーの模式図。長方形のボックスで描かれている工程が、実験プロセスであり、一方でひし形で表されているのが分析プロセスであった。破線は、ステージ1で同定された3つのタンパク質がステージ2のベリフィケーションをとばして、ステージ3でヒト検体におけるELISAによる直接バリデーションを受けたことを示す。(B)非GC表現型を有する野生型検体の代表2Dゲルスポットマップ。(C)GC表現型を有するg p 1 3 0^{F/F}遺伝子型マウス(F/F)検体の代表2Dゲルスポットマップ。(D)512個のマッチングされたスポットから生成された階層クラスタリング樹状図。(E)512個のマッチングされたスポットから生成された主成分分析(principal component analysis: PCA)スコアプロット。それぞれの主成分に帰される分散のパーセンテージが示されている。

40

【図3】38個のマルチプルアフィニティ除去システム(multiple affinity removal system: MARS)枯渇マウス血清検体に基づく候補GCバイオマーカーの同定のために実施例1において使用された実験ワークフローを描写するフローチャート。次に、マウス遺伝子型の多重比較、受信者動作特性(receiver operating characteristics: ROC)分析、及び質量分析(mass spectrometry: MS)同定後の候補優先順位決定を伴う洗練さ

50

れたストラテジーが、バリデーション及びヒト血清におけるバリデーションのために8つの最も関連性の高いタンパク質を選択するために用いられた。

【図4】実施例1において同定され、GC表現型よりもむしろg p 1 3 0 F / F 突然変異と関連することが見出された、2次元ディファレンスゲル内電気泳動(two-dimensional difference in-gel electrophoresis: 2D-DIGE)スポットの、ボリュームとしても言及される、標準化された存在量値の箱ひげ図。

【図5】(A)実施例1において同定された8つの候補バイオマーカータンパク質に対応する38個の目的のスポットの位置を示す、GC(緑)及び非GC(赤)検体の代表的なオーバーレイ2D-DIGE画像。緑で囲まれたスポットはGCにおいてアップレギュレートされており、赤で囲まれたスポットはダウンレギュレートされていた。(B)2D-DIGEでの目的の8つのタンパク質と関連するマッチングされたスポットボリュームの箱ひげ図。38のスポットすべてについて、GC表現型群(すなわち、FF/FFIL6遺伝子型)について得られた平均スポットボリュームは、非GC表現型群(すなわち、WT/IL6/FFStat3遺伝子型)の平均と、ステュードントのT検定のP値<0.01で有意に異なっていた。

【図6】(A)GCマウス(FF遺伝子型、n=5)及び非GC(WT、n=5)マウスの血清における、実施例1において同定された4つの候補バイオマーカーのウエスタンプロット検出。デンシティメトリー分析のためのインプット対照として、免疫グロブリン軽鎖を使用した。(B)マウスapoE、フィブロネクチン、アファミン、及びクラスタリンのウエスタンプロットデンシティメトリー。P値は、マン-ホイットニーU検定を使用して計算した。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。(C)GC患者(n=11)及び対照(n=13)血清における5つの候補バイオマーカーのウエスタンプロット検出。デンシティメトリー分析のためのインプット対照として、免疫グロブリン軽鎖を使用した。(D)ヒトアファミン、apoE、クラスタリン、フィブロネクチン、及びハプトグロビンのウエスタンプロットデンシティメトリー。P値は、マン-ホイットニーU検定を使用して計算した。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。

【図7】(A)実施例1において、GC患者(n=11)及び対照(n=13)血清で実施した7つのELISAの結果を示すグラフ。P値は、マン-ホイットニーU検定を使用して計算した。中の空いたデータ点は、女性対象を示す。エラーバーは、平均及び平均の標準誤差を表す。(B)GC患者と対照との間でタンパク質濃度における統計的に有意な差異を示した4つのタンパク質、及びCA72-4について得られたROC曲線。曲線下面積(Area Under the Curve: AUC)値をそれぞれについて示す。

【図8】実施例1におけるAACT及びフィブロネクチンについてELISAの結果(標準化濃度)を示す散布図であり、GC患者と対照との間で明確な調節は示さなかった。P値は、マン-ホイットニーU検定を使用して計算した。中の空いたデータ点は、女性対象を示す。エラーバーは、平均及び平均の標準誤差を表す。

【図9】実施例2における胃癌(GC)患者(n=25)及び対照(n=10)血清で実施した5つのELISAの結果を示すグラフ。P値は、マン-ホイットニーU検定を使用して計算した。GC血清は丸印、対照血清は四角で示される。緑の記号は女性を示し、黒の記号は男性を示す。白丸は早期GCを示し、黒丸は末期GCを示す。タンパク質レベルで何倍変化したかをX軸に示し、対照からGCへのレギュレーション示す。

【図10】感度(有病正診率(true positive rate)-TPR)、特異度(無病誤診率(false positive rate)、FPR)及び曲線下面積(AUC)を示す、実施例2において分析された5つのタンパク質それぞれについて得られたROC曲線。

【図11】実施例2において分析された5つのタンパク質(アファミン-A、クラスタリン-C、ハプトグロビン-H、IGFALS-I、VDBP-V)の二次的組合せについて得られたROC曲線。

【図12】実施例2において分析された5つのタンパク質(アファミン-A、クラスタリン-C、ハプトグロビン-H、IGFALS-I、VDBP-V)の三次的組合せについて得られたROC曲線。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】**【0036】****発明の詳細な説明**

本発明は部分的には、一定数のバイオマーカーの同定に基づき、かかるバイオマーカーの発現レベルは、胃癌（G C）に罹患した対象から得られる検体において改変される。これらバイオマーカーの差次の発現は、それらが、G Cのための診断及び予後試験の基礎を形成し得る好適なマーカーであることを示す。

【0037】

バイオマーカーは事実上、ある表現型状態（例えば、疾患に罹患している）の対象から採取される検体において、他の表現型状態（例えば、疾患に罹患していない）と比較して、差次的に存在する有機生体分子である。異なる表現型状態群間でバイオマーカーが差次的に存在するのは、バイオマーカーの発現レベルの平均又は中央値が群間で異なって（すなわち、より高く又は低く）計算される場合である。したがって、バイオマーカーは、単独で又は組み合わせて、対象がある表現型状態に属するか、又は他の表現型状態に属するかの指標を提供する。

【0038】

したがって、第1の態様において、本発明は、対象における胃癌（G C）の診断方法を提供し、この方法は、

(a) 1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質（V D B P）、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット（I G F A L S）、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、

(b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、及び

(c) 前記比較に基づいて対象におけるG Cを診断する工程を含む。

【0039】

炎症関連G Cの遺伝子組換えモデルマウス（g p 1 3 0^{F/F}）の使用により、本発明者らは、前述のバイオマーカーが胃腺腫の発症早期に差次的に発現することを特定した。

【0040】

したがって、第2の態様において、本発明は、対象が胃癌（G C）の発症に感受性を有するかどうかの判定方法を提供し、この方法は、

(a) 1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質（V D B P）、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット（I G F A L S）、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、

(b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、及び

(c) 前記比較に基づいて対象がG Cの発症に感受性を有するかどうかを判定する工程を含む。

【0041】

本明細書を通じて使用される「胃癌」又は「G C」なる用語は、胃の腺癌を含む胃の癌を意味するものと解釈される。当業者には理解されるだろうが、胃は以下の4つの区画を含む。すなわち、噴門（噴門切痕を含む）、胃底、胃体又はコーパス（胃角又は角切痕を含む）、及び幽門（幽門括約筋、幽門洞及び幽門管を含む）である。「胃癌」又は「G C」なる用語はまた、消化管の他の領域の癌を包含する。

【0042】

上で言及した本発明の態様の方法は、バイオマーカーであるV D B P、クラスタリン、I G F A L S及びアファミンのうちの1つ又は複数の発現レベルを測定する工程を要する。これらのマーカーを下で詳細に論じる。

10

20

30

40

50

【0043】

本明細書において使用される、バイオマーカーの「発現レベルを測定する工程」なる用語は、(1)対応する遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)分子への転写のレベルを測定する工程、及び/又は(2)mRNAのタンパク質への翻訳のレベルを測定する工程(すなわち、タンパク質それ自体のレベルを測定する工程)、及び/又は(3)翻訳されたタンパク質の活性のレベルを測定する工程を含む。実質的には、バイオマーカーの発現レベルは、RNA及び/又はタンパク質の発現段階で測定され得る。

【0044】

したがって、本明細書において使用される「バイオマーカー」なる用語は、タンパク質(ポリペプチド)、ポリヌクレオチド(例えばmRNA)及び/又は代謝産物を含むが、これに限定されるものではなく、胃癌に罹患した対象又は胃癌に罹患した対象から採取される検体におけるその発現レベル(例えば、転写のレベル、翻訳のレベル、及び/又は活性のレベル)は、正常検体における同じバイオマーカーの発現レベル(すなわち基準発現レベル)と比較して増加又は減少している。本明細書において言及される任意のバイオマーカーはまた、当業者が容易に同定できるそれら遺伝子及びタンパク質のシノニムを含む。

10

【0045】

「遺伝子」なる用語は、タンパク質に転写されて翻訳されるコード領域を含む、(核又はミトコンドリア)ゲノムヌクレオチド配列の領域を意味するものと理解されるべきである。したがって、本発明の文脈における「遺伝子」は、その遺伝子と関連する調節領域(例えば、プロモーター領域)、転写領域、エクソン、イントロン、非翻訳領域並びに他の機能性及び/又は非機能性配列領域を含み得る。したがって、一実施形態において、対象又は検体におけるバイオマーカーの「発現レベル」は、対象又は検体における対応する遺伝子のmRNAへの転写の程度を反映したものであってもよい。

20

【0046】

当業者には理解されるだろうが、タンパク質は、主にアミノ酸からなる機能性生体分子であり、そのアミノ酸配列は対応する遺伝子により決定される。したがって、一実施形態において、対象又は検体におけるバイオマーカーの「発現レベル」は、対象又は検体における対応する遺伝子のmRNAのタンパク質への翻訳の程度を反映したものであってもよい。

30

【0047】

mRNAのタンパク質への翻訳のレベルの測定方法は、当技術分野において知られている。例えば、タンパク質のレベルは、抗体ベースの試験(ウエスタンブロッティング、イムノブロッティング、酵素結合免疫吸着アッセイ(enzyme-linked immunosorbant assay:ELISA)、ラジオイムノアッセイ(radioimmunoassay:RIA)、免疫沈降及び解離増強ランタニド蛍光イムノアッセイ(dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay:DELFIA)を含む)、プロテオミクス技術、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance:SPR)、多用途ファイバーベースSPR(versatile fibre-based SPR)、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学、免疫蛍光、WO2009/004576に記載のマトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry:MALDI-MS)、(表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析(surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry:SELDI-MS)、特に表面増強親和性捕捉(surface-enhanced affinity capture:SEAC)、タンパク質マイクロアレイ、表面増強ニード脱離(surface-enhanced need desorption:SEND)又は表面増強光標識結合及び放出(surface-enhanced photo label attachment and release:SEPAR)を含む)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析、マイクロサイトメトリー(microcytometry)、マイクロアレイ、顕微鏡検査、蛍光活性化細胞選別(fluorescence activated cell sorting:FACS)、及びフローサイトメトリーを含む手法により測定されてもよいが、これに限られるものではない。

40

50

【0048】

抗体ベースの試験法、例えば免疫組織化学及びイムノプロッティングに関して、研究対象のそれぞれのタンパク質に特異的な抗体又は抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、最も好ましくはモノクローナル抗体が、タンパク質存在量を検出するために使用される。抗体は、例えば放射性標識、蛍光標識、ハプテン標識、例えばビオチン、又は酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで、抗体自身を直接標識することにより検出され得る。或いは、非標識一次抗体を、一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清又はモノクローナル抗体を含む、標識二次抗体と併せて使用してもよい。免疫組織化学プロトコル及びキットは、当技術分野においてよく知られており、市販されている。当技術分野においてよく知られている方法により、例えば研究対象のタンパク質で動物を免疫化することにより、抗体を製造できる。

10

【0049】

例えばELISAを含むサンドイッチイムノアッセイを含む従来のイムノアッセイ又は蛍光ベースのイムノアッセイや、他の酵素イムノアッセイもまた考えられる。比濁分析は、液相において実施されるアッセイであり、抗体は溶液中にある。研究対象のタンパク質の抗体への結合は、吸光度の変化をもたらし、これを測定する。 SELDIベースのイムノアッセイでは、目的のタンパク質のための生体分子特異的捕捉試薬が、MSプローブ、例えばプレ活性化された Protein chip アレイの表面に付着している（下を参照のこと）。次に、この試薬によりバイオチップ上で、タンパク質を特異的に捕捉し、捕捉したタンパク質を質量分析により検出する（下を参照のこと）。

20

【0050】

抗体ベースプラットフォームを使用したタンパク質レベルを評価するさらなる手法には、PCT国際公開番号WO 2011/113085に記載の多用途ファイバーベース表面プラズモン共鳴（versatile fibre-based surface plasmon resonance : VeSPR）バイオセンサーが含まれる。従来のSPRは、誘電体基板と薄い金属コーティングとの間の界面での自由電子の励起に依拠する非標識バイオセンシングのための十分確立された方法である。入射光がプラズモン波とカップリングする条件は、入射光の入射角及び波長とともに、センサー自体の物理的性質（比誘電率／屈折率）及び周囲環境に依存する。こうした理由から、SPRは、センサー近傍における密度（屈折率）の小さな変動に対してさえ感度が高く、蛍光標識の使用を要しない。センサー表面への結合生体分子、例えばタンパク質により誘発される屈折率の小さな変動は、入射光の入射角又は波長のいずれかを介してカップリング条件をモニターすることにより測定できる。現存のSPR系は、かさ高く高価なクレッチマンプリズム配置を使用し、プリズムの一方の側が、プラズモン波を支持できる金属、例えば金又は銀で被覆される。ファイバーの短い区間の周囲に金属コーティングを沈着させた光ファイバーベースの、代替的なSPR構造が開発してきた。このアプローチは、かかるセンサーの複雑さ及び費用を減少させ、別の用途、例えばディップセンシング（dip sensing）への道を開く。センサー表面の物質を、表面プラズモンへのカップリングにより吸収される広域スペクトル内の波長をモニターすることによりプローブする。これらの手法には、慎重な温度校正の必要性と関連する実際的な制約があり、多数の検体を整合的に分析することを困難にしている。VeSPRとして知られる、光ファイバーベースのSPRセンサーの新規で強力な改良型が近年開発してきた。VeSPRは、現存のSPR手法と比較して一定数の実証された利点を有し、これら利点には、（i）より高い信号対雑音比と、そのことによるより高い感度、（ii）変換信号の自己参照と、そのことによる高価な／かさ高い温度調節の回避、及び（iii）単一のファイバーを使用して異なる分析物の多重検出を実行する能力が含まれる。

30

【0051】

ある時点で検体に存在する目的のタンパク質の発現レベルを分析するために、プロテオミクスもまた使用できる。特に、検体中のタンパク質発現の全体的变化を評価するために、プロテオミクス技術を使用できる（発現プロテオミクスとも呼ばれる）。プロテオミクス分析は、典型的には、（i）2-Dゲル電気泳動（2-D PAGE）による検体中の

40

50

個々のタンパク質の分離、(i i) 例えは質量分析又はN末端シーケンシングによる、ゲルから回収された個々のポリペプチドの同定、及び(i i i) バイオインフォマティクスを使用したデータの分析を含む。

【0052】

検体中の目的のタンパク質の発現のレベルを判定するために、タンパク質マイクロアレイ(バイオチップとも呼ばれる)もまた使用してもよい。多くのタンパク質バイオチップが当技術分野において記述されており、例えは、Ciphergen Biosystems, Inc. (フレモント、CA)、Zyomyx (ヘイワード、CA)、Invitrogen (カールスバッド、CA)、Biacore (ウプサラ、スウェーデン) 及び Procognia (バークシャー、英国) 製造のタンパク質バイオチップを含む。かかるタンパク質バイオチップの例は、以下の特許又は公開特許出願に記載されている。すなわち、米国特許番号第6,225,047号、第6,537,749号、第6,329,209号及び第5,242,828号、並びにPCT国際公開番号WO00/56934及びWO03/048768である。10

【0053】

目的のタンパク質の発現レベルはまた、気相イオンを検出するために質量分析計を用いる方法である質量分析により測定できる。質量分析計の例には、飛行時間型、磁場セクター型、四重極フィルター型、イオントラップ型、イオンサイクロトロン共鳴型、静電セクター分析器 (electrostatic sector analyzer) 型及びこれらの混成がある。質量分析計は、レーザー脱離 / イオン化質量分析計であってもよい。レーザー脱離 / イオン化質量分析において、検出されるべき1つ又は複数のタンパク質は、イオン化及び質量分析計内への導入のため、質量分析計のプローブインターフェースに連結して、1つ又は複数のタンパク質をイオン化エネルギーにさらすよう適合させた装置である、質量分析プローブの表面上に置かれる。分析物を表面から脱離し、揮発させイオン化させ、質量分析計のイオン光学に供するために、レーザー脱離質量分析計は、レーザーエネルギーを用い、それは典型的には紫外レーザーからのものであるが、赤外レーザーからのものもある。LDIによるタンパク質の分析は、下で述べるように、MALDI又はSELDIの形態をとることができる。20

【0054】

SELDI法は、例えは、米国特許番号第5,719,060号及び第6,225,047号に記載されており、脱離 / イオン化気相イオン分光分析(例えは、質量分析)の方法と関係し、そこでは分析物(この場合、1つ又は複数の検出されるべきタンパク質)がSELDI質量分析プローブの表面上で捕捉される。SELDIはまた、親和性捕捉質量分析、表面増強親和性捕捉(SEAAC)及びPennon Malaria, 2012年(Res. Vet. Sci., 93: 611~617頁)に記載のイムノキャプチャー質量分析(immuno-capture mass spectrometry: i c M S)を包含する。これらのプラットフォームは、物質とタンパク質との間の非共有結合性親和性相互作用(吸着)によりタンパク質を捕捉するプローブ表面上の物質を有するプローブの使用を伴う。この物質は、「吸着剤」、「捕捉試薬」、「親和性試薬」又は「結合成分」と様々に呼ばれる。かかるプローブは、「親和性捕捉プローブ」と呼ぶことができ、「吸着表面」を有するものと呼ぶことができる。捕捉試薬は、タンパク質に結合可能な任意の物質であり得る。捕捉試薬は、物理吸着又は化学吸着によりプローブ表面に付着させる。機能性バイオチップ又は電磁ビーズの形態をとっていてもよいプローブは、表面にすでに付着されている捕捉試薬を有していてもよく、又はプローブはプレ活性化され、例えは共有又は配位共有結合を形成する反応を介して捕捉試薬に結合可能な反応成分を含む。エポキシド及びアシリル-イミジゾール(acyl-imidazole)が、タンパク質捕捉試薬、例えは抗体又は細胞受容体に共有結合するために有用な反応成分である。ニトリロ三酢酸及びイミノ二酢酸は、ヒスチジン含有タンパク質と非共有相互作用する金属イオンに結合するために、キレート化剤として機能する有用な反応成分である。吸着剤は一般に、クロマトグラフィー吸着剤及び生体分子特異的吸着剤に分類される。304050

【0055】

クロマトグラフィー吸着剤とは、クロマトグラフィーにおいて典型的に使用される吸着物質を指す。クロマトグラフィー吸着剤は、例えば、イオン交換物質、金属キレート剤（例えばニトリロ三酢酸又はイミノ二酢酸）、固定化金属キレート剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、色素、単純生体分子（例えばヌクレオチド、アミノ酸、单糖及び脂肪酸）及び混合モード吸着剤（例えば疎水性引力／静電反発力吸着剤）を含む。

【0056】

生体分子特異的吸着剤とは、生体分子、例えば核酸分子（例えばアプタマー）、ポリペプチド、多糖、脂質、ステロイド又はこれらのコンジュゲート（例えば糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質、核酸（例えばDNA - タンパク質コンジュゲート）を含む吸着剤を指す。ある例において、生体分子特異的吸着剤は、巨大分子構造、例えば多タンパク質複合体、生体膜又はウイルスであり得る。生体分子特異的吸着剤の例は、抗体、受容体タンパク質及び核酸である。生体分子特異的吸着剤は、典型的には、標的タンパク質に対してクロマトグラフィー吸着剤よりも高い特異性を有する。

10

【0057】

一般に、吸着表面を有するプローブは試験される検体と、研究対象のタンパク質が吸着剤に結合することを可能とするのに十分な期間接触させる。インキュベーション期間後、基質を洗浄し、結合していない物質を除去する。任意の好適な洗浄溶液を使用することができ、好ましくは、水溶液が用いられる。分子が結合され続ける範囲は、洗浄の厳密さを調整することにより操作できる。洗浄溶液の溶出特性は、例えば、pH、イオン強度、疎水性、カオトロピズムの程度、洗剤強度、及び温度に依存し得る。プローブがSEC及びSEND特性（本明細書に記載）の両方を有しないのであれば、エネルギー吸収分子が結合されたバイオマーカーとの基質に適用される。

20

【0058】

さらなるアプローチにおいて、研究対象のタンパク質は、タンパク質に特異的に結合する抗体を有する固相結合免疫吸着剤で捕捉できる。吸着剤を洗浄して結合していない物質を除去した後、タンパク質を固相から溶出し、タンパク質に結合するバイオチップに適用することにより検出する。

【0059】

基質に結合する研究対象のタンパク質は、気相イオン分光計、例えば飛行時間型質量分析計において検出される。タンパク質は、イオン化源、例えばレーザーによりイオン化され、生成されたイオンはイオン光学アセンブリにより収集され、次に質量分析器が通過イオンを分散させ分析する。次に、検出器が検出されたイオンの情報を質量対電荷比へと翻訳する。タンパク質の検出は、典型的には、信号強度の検出を伴う。このようにして、タンパク質の量及び質量の両方を判定できる。

30

【0060】

レーザー脱離質量分析の別 の方法は、表面増強ニート脱離（surface-enhanced neat desorption : SEND）と呼ばれる。SENDは、プローブ表面と化学結合するエネルギー吸収分子を含むプローブ（「SENDプローブ」）の使用を伴う。「エネルギー吸収分子（energy absorbing molecules : EAM）」なる文言は、レーザー脱離 / イオン化源からのエネルギーを吸收可能であり、かかる後に、分析物分子と接触してその脱離及びイオン化に寄与する分子を意味する。EAMのカテゴリーには、MALDIにおいて使用され、多くの場合「マトリックス」と呼ばれる分子が含まれ、桂皮酸誘導体、シナピン酸（sinapinic acid : SPA）、シアノ - ヒドロキシ - 桂皮酸（cyano-hydroxy-cinnamic acid : CHCA）及びジヒドロキシ安息香酸、フェルラ酸、及びヒドロキシアセト - フェノン誘導体が例として挙げられる。エネルギー吸収分子は、線状又は架橋ポリマー、例えばポリメタクリレート内に組み込まれてもよい。例えば、組成物は、 - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシ桂皮酸及びアクリレートのコポリマーであり得る。或いは、組成物は、 - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシ桂皮酸、アクリレート及び3 - (トリ - エトキシ)シリルプロピルメタクリレートのコポリマーであってもよく、又は、 - シアノ - 4 - メタ

40

50

クリロイルオキシ桂皮酸及びオクタデシルメタクリレートのコポリマーであってもよい(「C1 8 SEND」)。SENDは、米国特許番号第6,124,137号及びPCT国際公開番号WO03/64594にさらに記載されている。

【0061】

SEAC/SENDは、レーザー脱離質量分析の一種であり、捕捉試薬及びエネルギー吸収分子の両方が、検体提示表面に付着される。したがって、SEAC/SENDプローブは、親和性捕捉及びイオン化/脱離により、外部マトリックスを適用する必要性なしに、研究対象のタンパク質の捕捉を可能にする。C1 8 SENDバイオチップは、SEAC/SENDの一種であり、捕捉試薬として機能するC1 8成分、及びエネルギー吸収成分として機能するCHCA成分を含む。

10

【0062】

別の種類のLDIは、表面増強感光性結合及び放出(surface-enhanced photolabile attachment and Release: SEPAR)と呼ばれる。SEPARは、表面に付着した成分を有するプローブの使用を伴い、このプローブは、タンパク質と共有結合し、光、例えばレーザー光への曝露後に、この成分中の感光性結合を切断することによりタンパク質を放出できる。SEPAR及び他の形態のSELDIが、本発明の方法に必要なタンパク質又はタンパク質プロファイルの検出へと容易に適合させられる。

【0063】

MALDIは、レーザー脱離/イオン化の従来の方法である。あるMALDI法では、試験される検体を、マトリックスと混合し、MALDIチップ上に直接置く。試験される検体に応じて、試験されるタンパク質は、好ましくはまず、固体支持体、例えば樹脂と組み合わされた(例えばスピンドラム内の)生体分子特異的(例えば抗体)又はクロマトグラフィー物質で捕捉される。検出されるタンパク質と結合し得る特異的親和性物質は上で述べた。親和性物質上の精製後、研究対象のタンパク質を溶出し、次にMALDIにより検出する。

20

【0064】

飛行時間型質量分析によるタンパク質の分析は、飛行時間スペクトルを生成する。最終的に分析された飛行時間スペクトルは、典型的には、検体に対するイオン化エネルギーの単一パルスからの信号を示さず、むしろ複数のパルスからの信号の和を示す。これは、雑音を減らし、ダイナミックレンジを増加させる。次に、この飛行時間データを、専用ソフトウェアを使用したデータ処理にかける。データ処理は典型的には、質量スペクトルを生成するためのTOF対M/Z変換、機器のオフセットを除去するためのベースライン減算、及び高周波ノイズを減少させるための高周波ノイズフィルタリングを含む。

30

【0065】

タンパク質の脱離及び検出により生成されたデータを、プログラム可能なデジタルコンピュータを使用して分析できる。検出されたタンパク質の数、並びに任意選択でそれぞれの検出されたタンパク質の信号の強度及び判定分子量を示すために、コンピュータプログラムはデータを分析する。データ分析は、タンパク質の信号強度を判定する工程及び所定の統計的分布から逸脱するデータを除去する工程を含み得る。例えば、観察されたピークは、何らかの基準に対するそれぞれのピークの高さを計算することにより正規化され得る。コンピュータは、結果として得られるデータを表示用の様々なフォーマットに変換できる。標準スペクトルを表示できるが、ある有用なフォーマットでは、ピークの高さ及び質量の情報のみがスペクトルビューから維持され、より明確な画像を生み出して、ほぼ同一の分子量を有するタンパク質をより見えやすくすることを可能にする。別の有用なフォーマットでは、2つ以上のスペクトルが比較され、便利なことに、検体間で異なる発現レベルを有するタンパク質が強調表示される。これらフォーマットのいずれかを使用して、検体中に特定のタンパク質が存在するかどうか、及びどのレベルで存在するのかを容易に判定できる。

40

【0066】

分析は一般に、タンパク質からの信号を示す、スペクトルにおけるピークの同定を伴う

50

。ピークの選択は、視覚的に行えるが、ピークの検出を自動化するために市販のソフトウェアを使用できる。一般に、このソフトウェアは、選択された閾値を超える信号対雑音比を有する信号を同定し、ピーク信号のセントロイドでピークの質量を標識化することにより機能する。ある有用な使用法では、質量スペクトルのある選択されたパーセンテージで存在する同一のピークを同定するために多くのスペクトルが比較される。このソフトウェアの一種は、一定の質量範囲内の様々なスペクトルに現れるすべてのピークをクラスタリングし、質量 (M/Z) クラスターの中点に近いすべてのピークに質量 (M/Z) を割り当てる。

【0067】

信号が研究対象のタンパク質に対応する信号のピークを表すかどうかを判定するために、データを分析するために使用されるソフトウェアは、アルゴリズムを信号の分析に適用するコードを含み得る。検査対象の特定の臨床パラメータのステータスを示すタンパク質ピーク又はタンパク質ピークの組合せが存在するかどうかを判定するために、ソフトウェアはまた、観察されたタンパク質ピークに関するデータを、分類ツリー又はANN分析にかけることができる。データの分析は、検体の質量分析から直接又は間接に得られる様々なパラメータに「適合され (keyed)」ていてもよい。これらパラメータは、1つ又は複数のピークの存在又は非存在、ピークの形又はピークの群、1つ又は複数のピークの高さ、1つ又は複数のピークの高さの対数、及びピークの高さのデータについての他の算術的操作を含むが、これに限られるものではない。

【0068】

タンパク質の活性を測定することに関して、使用されるアッセイのタイプは、研究対象のタンパク質の機能により決定されると考えられる。例えば、VDBPはビタミンD₃及びその代謝産物の主要な血漿担体であり、ビタミンDが肝臓に、25(OH)₂D₃が腎臓に、1,25(OH)₂D₃が標的細胞及び臓器に輸送されることを保証する。VDBPはまた、マクロファージ活性化において重要な役割を果たし、これはそのビタミンD結合能力とは切り離された役割である。例えば、VDBPは、マクロファージ活性化因子の前駆体である活性化された補体ペプチドの白血球遊走能を増強することが示してきた。かかる作用は、VDBPタンパク質の活性をアッセイする基礎を形成し得る。クラスタリンに関しては、このタンパク質は、プログラム細胞死、補体媒介性細胞溶解の調節、膜再利用、細胞間接着及びSRC誘導形質転換を含む様々な作用と関連していた。クラスタリンはまた、補体の攻撃複合体の一部として、補体阻害剤としても作用する。これらの作用を果たす際に、クラスタリンは、数多くのパートナー、例えば免疫グロブリン、脂質、ヘパリン、細菌、補体成分、パラオキソナーゼ、ベータアミロイド、レプチン等と結合する。かかる作用及び結合パートナーは、クラスタリンタンパク質の活性をアッセイする基礎を形成し得る。IGFALSに関しては、このタンパク質は、インスリン様成長因子に結合し、その半減期及び血管局在を増加させることが知られている。例えば、IGFALSは、インスリン様成長因子結合タンパク質-3 (insulin-like growth factor binding protein-3: IGFBP-3) と結合し、それゆえ2つのタンパク質間の結合の程度を測定するアッセイを利用できる。さらに、アファミンは、ビタミンE結合活性を有することが知られており、それゆえ2つの間の結合の量又はレベルを測定するアッセイは、特定の検体中のアファミンタンパク質のレベルを反映したものと考えられる。このレベルは、正常対照検体における結合レベルと比較できる。

【0069】

遺伝子のmRNAへの転写のレベルの測定方法もまた、当技術分野において知られている。例えば、mRNAのレベルは、ノーザンプロットティング、RNAインサイチューハイブリダイゼーション、逆転写酵素PCR (RT-PCR)、リアルタイム(定量的)RT-PCR、マイクロアレイ又は「タグベースの」技術、例えばSAGE (遺伝子発現の連続分析)を含む手法により測定してもよいが、これに限られるものではない。マイクロアレイ及びSAGEを、複数の遺伝子の発現を同時定量するために使用してもよい。プライマー又はプローブを、遺伝子又はその転写物のヌクレオチド配列に基づいて設計してもよ

10

20

30

40

50

い。Paikら、2004年(NEJM、351(27):2817~2826頁)、又はAndersonら、2010年(Journal of Molecular Diagnostics、12(5):566~575頁)に開示のものと類似する方法論を、1つ又は複数の目的の遺伝子の発現を測定するために使用してもよい。多くの方法がまた、標準的な分子生物学の教科書、例えばSambrookら(Molecular Cloning - A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2000年)に開示されている。

【0070】

RT-PCRに関しては、第1の工程は典型的には、研究対象から得られる検体からの全RNAの単離である。この例における典型的な検体は、組織検体、例えば胃腫瘍検体(及び、可能なら対応する正常胃組織)であると考えられるが、下に述べるように他の検体供給源も考えられる。RNAの供給源が腫瘍である場合、例えば、以前に対象から得られた、冷凍又は保管されたパラフィン包埋及び固定(例えば、ホルマリン固定)組織検体から、RNAを抽出することもできる。続いてメッセンジャーRNA(mRNA)を全RNA検体から精製してもよい。次に、好適な逆転写酵素を使用して、全RNA検体(又は精製mRNA)をcDNAへと逆転写する。逆転写工程は、典型的には、RNAテンプレートに応じて、オリゴ-dTプライマー、ランダムヘキサマー、又は関係する遺伝子に特異的なプライマーを使用してプライムする。次に、逆転写反応に由来するcDNAを、典型的なPCR反応のテンプレートとして供する。この点に関して、関係する遺伝子に特異的な2つのオリゴヌクレオチドPCRプライマーを使用してPCR産物を生成する。他の2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するために設計された第3のオリゴヌクレオチド、又はプローブもまた、PCR反応において使用する。このプローブは、PCR反応において使用されるTaq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長可能ではなく、レポーター蛍光色素及び消光蛍光色素で標識する。レポーター色素からのいかなるレーザー誘導発光も、プローブ上で2つの色素が近接して位置する際に、消光色素によって消光する。PCR增幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、テンプレート依存的にプローブを切断する。この結果生じるプローブ断片は、溶液中で分離し、放出されたレポーター色素からの信号は、第2の蛍光体の消光効果から解放される。レポーター色素の1分子が、それぞれの合成される新しい分子のために遊離し、非消光レポーター色素の検出は、データの定量的解釈のための基礎を提供する。

【0071】

リアルタイムRT-PCRにおいて、PCR反応において形成される産物の量、及び産物が形成されるタイミングは、開始テンプレートの量と相關する。RT-PCR産物は、標準又は「正常」検体と比較して、高いmRNAレベルを有する検体中により速く蓄積すると考えられる。リアルタイムRT-PCRは、色素、例えばSybr Greenを合成PCR産物内へとインターラートしたDNAの蛍光を測定するか、又は二重標識化蛍光発生プローブ(すなわち、TaqManプローブ)によりPCR産物蓄積を測定できる。RT-PCR反応の進行は、産物蓄積をリアルタイムで測定するPCR機器、例えばApplied Biosystems社製Prism 7000又はRoche LightCyclerを使用してモニターできる。リアルタイムRT-PCRは、定量的競合PCR及び定量的比較PCRの両方に適合する。前者は正規化のため、それぞれの標的配列の内部競合者を使用し、一方で後者は検体中に含有される正規化遺伝子、又はRT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用する。

【0072】

転写レベルでの遺伝子の発現のレベルを測定するためのマイクロアレイの作製及び適用は、当技術分野においてよく知られている。一般に、マイクロアレイにおいて、1つ又は複数の関係する遺伝子の一部又は全体を表すヌクレオチド配列(例えばオリゴヌクレオチド、cDNA、又はゲノムDNA)は、基質上の既知の位置を占める。典型的には、基質は、1つ又は複数の関係する遺伝子を同時にアッセイできるように、多数のヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列を含む。次に、目的の対象から得られた核酸標的検体（例えば全RNA又はmRNA）を、マイクロアレイとハイブリダイズし、アレイ上でそれぞれのプローブにハイブリダイズした標的核酸の量を定量し、標準又は「正常」検体で生じたハイブリダイゼーションと比較する。1つの典型的な定量方法は、共焦点顕微鏡及び蛍光標識を使用することである。Affymetrix GeneChip（商標）アレイシステム（Affymetrix、サンタクララ、カリフォルニア）及びAtlas（商標）ヒトcDNA発現アレイシステムが、ハイブリダイゼーションの定量のために特に好適である。しかしながら、任意の同様のシステム又は他の事実上同等の検出方法も使用できることは当業者にとって明らかであると考えられる。蛍光標識化cDNAプローブはまた、核酸標的検体を表していてもよい。かかるプローブは、試験される対象の検体から抽出された全RNA又はmRNAの逆転写中に蛍光ヌクレオチドを組み込むことにより生成できる。マイクロアレイに適用される標識化cDNAプローブは、アレイ上のDNAに相当するスポットに特異的にハイブリダイズすると考えられる。それぞれのアレイされた要素のハイブリダイゼーションの定量化は、標準又は「正常」検体中で観察される存在量と比較した、検体中の対応するmRNA存在量の評価を可能にする。二色蛍光を用いて、RNAの2つの供給源から生成される別々に標識化されたcDNAプローブを、アレイに対してハイブリダイズする。こうして、それぞれの特定された遺伝子に対応する2つの供給源からの転写物の相対存在量を同時に判定する。マイクロアレイ分析を使用したハイブリダイゼーションの小型化スケール(miniaturized scale)は、多数の遺伝子の発現パターンの簡便で迅速な評価を提供する。かかる方法は、1細胞当たり数コピーで発現する希有な転写物を検出するのに必要な感度を有し、発現レベルの少なくとも約2倍の差を再現可能な形で検出することが示してきた。

【0073】

対象において、1つ又は複数のタンパク質の発現レベルが直接測定されてもよく、又は代替的な実施形態において、1つ又は複数のタンパク質の発現レベルが対象から得られる検体中で測定されてもよい。本発明の方法により分析される対象から得られる検体が、以前に対象から得られていてもよく、例えば、適切な保管所で貯蔵されていてもよいことが明確にされるべきである。この例において、検体は対象から、本発明の方法とは隔離されて、そしてそれゆえ本発明の方法とは別個に得られたものと考えられる。

【0074】

対象から得られる検体は、血液検体、又は血液に由来する検体（例えば血清検体又は血漿検体又は血液、血清若しくは血漿検体の画分、血液細胞）、唾液、頬側スワップ、胃液、糞便検体、膀胱洗浄、精液、尿、及び消化管組織検体（例えば胃又は食道組織検体）を含んでいてもよいが、これに限られるものではない。一定の状況において、検体は獲得後に任意の方法、例えば試薬での処置、可溶化、又は研究対象である関係するタンパク質若しくはポリヌクレオチド等の一定の成分の濃縮により操作されてもよい。

【0075】

一実施形態において、検体は対象から得られる血清検体である。血清は、血液の黄色い液体成分である血漿に由来し、その中で全血中の血液細胞が通常懸濁されている。それは全血液量の約55%を占める。それはほとんど水（容積で90%）であり、溶解されたタンパク質、ブドウ糖、凝固因子、無機イオン、ホルモン及び二酸化炭素を含有する。血漿は、遠心分離機で新鮮血液の試験管を、試験管の底に血液細胞が落ちるまで回転させることで調製される。次に、血漿を注ぎ出すか、又は取り出す。血漿は、好ましくは凝固抑制剤、例えばヘパリン又はEDTAを添加され、約1.025kg/1の密度を有する。血清は、フィブリノーゲン又は他の凝固因子を有さない血漿（すなわち、全血から細胞及び凝固因子の両方を除いたもの）である。

【0076】

一実施形態において、検体は対象から得られる組織検体である。例えば、組織検体は、腫瘍から採取された生検材料であってもよい。組織検体は、固定されて無期限に又は分析が行われるまで貯蔵されてもよい。検体から採取された組織切片は、組織学的分析のため

10

20

30

40

50

及び上述のアッセイを行い、検体中に存在するバイオマーカータンパク質のレベルを判定するために染色され得る。或いは、RNAを対象から得られる組織検体から抽出してもよく、このRNAを上述のアッセイにかけて、検体中に存在するバイオマーカー-mRNAのレベルを判定する。検体が組織検体である例において、理想的には、隣接する正常胃組織の検体が比較のために得られるものと考えられる。

【0077】

1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを対象において、又は対象から得られる検体において測定したならば、その発現レベルをそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する。特定のバイオマーカーの基準発現レベルは、既知の胃癌(GC)状態と関連するバイオマーカーの発現のレベル、すなわち、GCに罹患していない対象(本発明の文脈においては「正常」対象)において見出されることが知られている発現のレベルである。それぞれのバイオマーカーの基準発現レベルは、少なくとも1体の正常対象に由来してもよく、好ましくは正常対象の平均(例えばn=2から100以上)に由来し、この1体又は複数の対象にGCの既往歴はない。それぞれのバイオマーカーの基準発現レベルは、GC罹患が疑われる対象からの1つ又は複数の正常検体からも得られ得る。例えば、それぞれのバイオマーカーの基準発現レベルは、少なくとも1つの正常検体から得られてもよく、好ましくは正常検体の平均(例えばn=2から100以上)から得られ、対象はGC罹患が疑われる。

【0078】

いくつかの実施形態において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、1つ又は複数の正常検体に由来する基準発現レベルと比較して、試験される検体において増加してもよい。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、1つ又は複数の正常検体に由来する基準発現レベルと比較する際に、試験される検体において減少してもよい。これは、下でさらに詳細に記述する。

【0079】

上述のとおり、本発明の方法は、ビタミンD結合タンパク質(VDBP)、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット(IGFALS)、及びアファミンからなる群から選択される1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程を伴う。これらバイオマーカーの関連遺伝子及びコードされるタンパク質に関する詳細については、国立バイオテクノロジー情報センターのGenBankデータベースからアクセスしてもよい(www.ncbi.nlm.nih.gov)。例えば、ヒトVDBPの遺伝子ID番号は2638、ヒトクラスタリンは1191、ヒトイGFLSは3483、及びヒトアファミンは173である。これらGenBank登録の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0080】

翻訳段階で1つ又は複数の前述のバイオマーカーの発現のレベルを測定すること、例えばタンパク質それ自体のレベルを測定することを要する本発明の実施形態において、それぞれのバイオマーカーによりコードされるアミノ酸配列の詳細についてもまた、GenBankデータベースからアクセスできる。例えば、ヒトVDBP遺伝子は、GenBank受託番号NP_000574.2(変異体1)、NP_001191235.1(変異体2)及びNP_001191236.1(変異体3)により表される3つのタンパク質変異体をコードする。ヒトクラスタリン遺伝子は、GenBank受託番号NP_001822.3により表されるタンパク質をコードする。ヒトイGFLS遺伝子は、GenBank受託番号NP_001139478.1(変異体1)及びNP_004961.1(変異体2)により表される2つのタンパク質変異体をコードする。最後に、ヒトアファミン遺伝子は、GenBank受託番号NP_001124.1により表されるタンパク質をコードする。或いは、それぞれのバイオマーカーによりコードされるアミノ酸配列の詳細については、UniProtデータベース(www.uniprot.org)からアクセスでき、ヒトVDBPタンパク質(それぞれの変異体を含む)のUniProt IDはP02774、ヒトクラスタリンタンパク質はP10909、ヒトイGFLS

10

20

30

40

50

はQ 8 T A Y 0 (変異体1及び2)及びP 3 5 8 5 8 (変異体2)、及びヒトアファミンタンパク質はP 4 3 6 5 2である。

【0081】

転写段階で1つ又は複数の前述のバイオマーカーの発現のレベルを測定すること、例えば対応する遺伝子のmRNAレベルを測定することを要する本発明の実施形態において、転写ヌクレオチド配列(複数可)の詳細についてもまた、GenBankデータベースからアクセスできる。例えば、ヒトVDP遺伝子は、GenBank受託番号NM_000583.3(変異体1)、NM_001204306.1(変異体2)及びNM_001204307.1(変異体3)により表される3つの変異体へと転写される。ヒトクラスタリン遺伝子もまた、GenBank受託番号NM_001831.3(変異体1)、NR_038335.1(変異体2)及びNR_045494.1(変異体3)により表される3つの変異体へと転写される。しかしながら、転写物変異体1のみが、機能性タンパク質をコードする。ヒトIGFALS遺伝子もまた、GenBank受託番号NM_001146006.1(変異体1)、NM_004970.2(変異体2)及びNR_027389.1(変異体3)により表される3つの変異体へと転写される。しかしながら、第3の変異体は、機能性タンパク質をコードしない。最後に、ヒトアファミン遺伝子は、GenBank受託番号NM_001133.2により表されるヌクレオチド配列へと転写される。

【0082】

2つ上の段落について、VDP、クラスタリン、IGFALS及びアファミンへの言及が、これらバイオマーカーの天然に存在する変異体への言及を含むことが明確にされるべきである。この点に関して、バイオマーカーの「変異体」は、ネイティブのバイオマーカーと少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、又は少なくとも99.9%同一のアミノ酸又は核酸配列を示してもよい。いくつかの実施形態において、ネイティブのバイオマーカーの変異体は、ネイティブの生物学的活性又はそれとの実質的な等価性を維持していくてもよい。いくつかの実施形態において、変異体は実質的な生物学的活性を有さなくてもよく、例えば生物学的に活性なバイオマーカーの前駆体である変異体であってもよい。VDP、クラスタリン、IGFALS及びアファミンの天然に存在する変異体の例は、上で述べた。

【0083】

本明細書において使用される「対象」なる用語は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、シカ、ブタ、げっ歯類動物、及びGCに罹患することが知られている任意の他の動物を含む、任意の動物(例えば哺乳類)を指し、これらに限られるものではない。したがって、ヒトアミノ酸及びmRNA配列について上で言及した一方で、本発明の方法がヒトに限られるものではないことが認められるべきである。様々な種についての具体的なタンパク質及びそれと関連するアミノ酸及びmRNA配列の詳細については、GenBank及びUniProtデータベースから容易にアクセスし得る(例えば、ハツカネズミ(Mus musculus)VDPの遺伝子IDは14473、クラスタリンは12759、IGFALSは16005、アファミンは280662である)のであり、又は配列はBLAST検索により同定されてもよい。いくつかの例において、1つの種においてタンパク質/遺伝子発現を測定するために使用してもよいプライマー、プローブ又は抗体はまた、無関係の種について使用してもよい。

【0084】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはVDPであってもよく、例えばヒトVDPを含む。いくつかの実施形態において、VDPの発現レベルを測定することは、例えば上で詳細に述べた方法を使用することにより、対象におけるVDPタンパク質又はmRNAのレベルを測定することを含む。

【0085】

本発明者らは、VDPの基準発現レベルより低い、対象におけるVDPの発現レベルは、対象におけるGC示すか、又は対象がGCの発症に感受性を有することを示すこと

10

20

30

40

50

を見出した。V D B P を含む本明細書において言及されるバイオマーカーの発現レベルに関する、本明細書における「より低い」への言及は、翻訳（タンパク質）段階であるか転写（m R N A）段階であるかにかかわらず、例えば、基準発現レベルと比較してバイオマーカーの発現レベルの少なくとも 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4倍、5倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、6.0倍、10倍、20倍、50倍、又は100倍の減少を意味することを意図している。10

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはクラスタリンであってもよく、例えばヒトクラスタリンを含む。いくつかの実施形態において、クラスタリンの発現レベルを測定することは、例えば上で詳細に述べた方法を使用することにより、対象におけるクラスタリンタンパク質又はm R N A のレベルを測定することを含む。

【 0 0 8 7 】

本発明者らは、クラスタリンの基準発現レベルより低い、クラスタリンの発現レベルは、対象におけるG C を示すか、又は対象がG C の発症に感受性を有することを示すことを見出した。20

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはI G F A L S であってもよく、例えばヒトI G F A L S を含む。いくつかの実施形態において、I G F A L S の発現レベルを測定することは、例えば上で詳細に述べた方法を使用することにより、対象におけるI G F A L S タンパク質又はm R N A のレベルを測定することを含む。

【 0 0 8 9 】

本発明者らは、I G F A L S の基準発現レベルより高い、対象におけるI G F A L S の発現レベルは、対象におけるG C を示すか、又は対象がG C の発症に感受性を有することを示すことを見出した。I G F A L S を含む本明細書において言及されるバイオマーカーの発現レベルに関する、本明細書における「より高い」への言及は、翻訳（タンパク質）段階であるか転写（m R N A）段階であるかにかかわらず、例えば、基準発現レベルと比較してバイオマーカーの発現レベルの少なくとも 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4倍、5倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、6.0倍、10倍、20倍、50倍、又は100倍の増加を意味することを意図している。30

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーはアファミンであってもよく、例えばヒトアファミンを含む。いくつかの実施形態において、アファミンの発現レベルを測定することは、例えば上で詳細に述べた方法を使用することにより、対象におけるアファミンタンパク質又はm R N A のレベルを測定することを含む。40

【 0 0 9 1 】

本発明者らは、アファミンの基準発現レベルより低い、アファミンの発現レベルは、対象におけるG C を示すか、又は対象がG C の発症に感受性を有することを示すことを見出した。

【 0 0 9 2 】

G C における前述のバイオマーカーの差次の発現の同定はまた、G C の治療の対象における治療効率の評価方法を可能にする。50

【0093】

したがって、第3の態様において、本発明は、対象における胃癌（G C）の進行の評価方法を提供し、この方法は、

(a) 1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質（V D B P）、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット（I G F A L S）、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程、

(b) 対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、及び

(c) 前記比較に基づいて対象におけるG Cの進行を評価する工程
10
を含む。

【0094】

本発明のいくつかの実施形態において、1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、複数の時点で測定される。かかる「逐次」サンプリングは、例えば、胃癌の進行のモニタリングによく適している。逐次サンプリングは、任意の所望のタイムラインで、例えば月毎、四半期毎（すなわち3カ月毎）、半年毎、1年毎、2年毎、又はより少ない頻度で実施できる。対象において測定される発現レベルと基準発現レベルとの間の比較を、新たな検体が測定される度に実施してもよく、又はレベルに関するデータはより頻度の少ない分析のために取っておかれてもよい。

【0095】

本発明の第3の態様の一実施形態において、対象はG Cの治療を受けている。治療は従来の治療法、例えば化学療法又は放射線療法であってもよく、又は治療は代替的治療法であってもよい。代替的な実施形態において、対象は治療を一切受けていなくてもよい。

【0096】

本発明の第3の態様のいくつかの実施形態において、バイオマーカーであるV D B P、クラスタリン、I G F A L S、及び／又はアファミンの発現レベルを測定することは、対象における、又は対象から採取される検体における、V D B P、クラスタリン、I G F A L S、及び／又はアファミンタンパク質又はm R N Aのレベルを測定することを含む。いくつかの実施形態において、V D B P、クラスタリン、及び／又はアファミンの基準発現レベルより低い、それぞれのバイオマーカーの発現レベルは、対象におけるG Cの進行を示す。いくつかの実施形態において、I G F A L Sの基準発現レベルより高い、I G F A L Sの発現レベルは、対象におけるG Cの進行を示す。
30

【0097】

いくつかの実施形態において、本発明の第3の態様による方法を、新薬の臨床試験を実施するために使用してもよく、この薬剤を投与された対象の進行をモニターするために使用してもよい。治療法又は臨床試験は、試験される薬剤を特定の投与計画で投与することを伴う。投与計画は、薬剤の単回投与又は経時的な薬剤の複数回投与を伴っていてもよい。医師又は臨床研究者は、投与期間中、対象に対する薬剤の効果をモニターする。薬剤がG Cに対して薬理学的影響を及ぼしている場合には、前述のバイオマーカーの発現レベルが、そのタンパク質の基準発現レベルと近似するか、又は同一であると考えられる。したがって、バイオマーカーの発現レベルの傾向を、治療期間中、対象においてモニターできる。1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、上で詳細に述べた方法を使用して判定できる。この方法の一実施形態は、薬剤治療期間中、少なくとも2つの異なる時点について、例えば、第1時点と第2時点について、前述のバイオマーカーの発現レベルを判定し、バイオマーカーの発現レベルの変化があれば、それを比較することを伴う。例えば、バイオマーカーの発現レベルは、薬剤投与の前後又は薬剤投与中の2つの異なる時点で測定できる。治療法の効果を、これら比較に基づいて判定する。治療が有効である場合、前述のバイオマーカーの発現レベルが、そのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一であると考えられる一方で、治療が有効でない場合には、前述のバイオマーカーの発現レベルは、そのバイオマーカーの基準発現レベルより高い又は低いままであると
40
50

考えられる。

【0098】

第4の態様において、本発明は、胃癌の治療に有用な候補治療剤のスクリーニング方法を提供し、この方法は、ビタミンD結合タンパク質（V D B P）、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット（I G F A L S）、及びアファミンからなる群から選択される1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルをモジュレートする活性について、候補治療剤をアッセイする工程を含む。

【0099】

スクリーニングアッセイは、インピトロ及び／又はインピボで実施してもよい。例えは、有望な物質を、細胞ベースのアッセイにおいて、胃癌の治療のための候補治療剤を同定するためにスクリーニングしてもよい。この点に関して、それぞれの有望な物質を、培養細胞（例えば正常対象の消化管から又は胃癌に罹患した対象から得られる細胞、又は正常又は罹患対象に由来する細胞株）とともにインキュベートし、バイオマーカーの発現レベルのモジュレーションを測定する。したがって、本発明の第4の態様の一実施形態において、この方法は、

10

（a）候補治療剤をバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーを発現する細胞に曝露する工程、

（b）前記細胞におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルの変化を測定する工程、及び

（c）対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する工程、
を含み、

20

バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルが、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一である場合、候補治療剤は対象におけるG Cの治療に有用である。

【0100】

別の一例において、候補治療剤は、培養臓器ベースのアッセイにおいてスクリーニングしてもよい。この点に関して、それぞれの有望な物質を、非ヒト動物に由来する臓器全体又は臓器の一部（例えば正常又は罹患対象の消化管の一部）のいずれかとともにインキュベートし、標的バイオマーカーの発現レベルのモジュレーションを測定する。

30

【0101】

スクリーニング方法はまた、有望な治療剤を胃癌に罹患した対象に投与する工程を用いてよい。したがって、本発明の第4の態様の一実施形態において、この方法は、対象においてバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを測定する工程を含み、発現レベルは、候補治療剤の対象への投与後に測定される。次に、対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルを、バイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと比較する。対象におけるバイオマーカー又はそれぞれのバイオマーカーの発現レベルが、それぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一である場合、候補治療剤はG Cの治療に有用であると言ふことができる。1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルは、上で詳細に述べた方法により測定してもよい。

40

【0102】

本発明の第4の態様のいくつかの実施形態において、候補治療剤は、対象又は細胞におけるV D B P、クラスタリン又はアファミンの発現レベルを、それぞれのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一であるレベルまで増加させるか、又は、I G F A L Sの発現レベルを、そのバイオマーカーの基準発現レベルと近似するか、又は同一であるレベルまで減少させると考えられる。

【0103】

本発明の前述の態様の方法は、バイオマーカーであるV D B P、クラスタリン、I G F A L S又はアファミンのうちの1つ又は複数の発現レベルが測定されることを要する。し

50

かしながら、V D B P、クラスタリン、I G F A L S 及び / 又はアファミンに加えて、又はそれらと同時に、他のバイオマーカーの発現レベルが測定されてもよいことは、当業者によく理解されると考えられる。例えば、G Cにおいて差次的に発現することが知られているバイオマーカーもまた、本発明の方法に組み込まれ得る。

【0104】

例えば、本発明者らはまた、アポリポタンパク質E (A p o E) 及びハプトグロビンがG C検体において差次的に発現することを示した。具体的には、G C検体におけるA p o E及びハプトグロビンの発現レベルは、「正常」検体における発現レベルよりも高い。したがって、本発明の方法は、V D B P、クラスタリン、I G F A L S 又はアファミンのうちの1つ又は複数の発現レベルを測定する工程を、A p o E及びハプトグロビンのうちの1つ又は両方の発現レベルを測定する工程と組み合わせて包含していてもよい。A p o E及びハプトグロビンの発現レベルは、上で詳細に述べた方法を使用して測定できる。10

【0105】

バイオマーカーであるA p o E及びハプトグロビンに関する詳細については、国立バイオテクノロジー情報センターのG e n B a n k データベースからアクセスしてもよい(www.ncbi.nlm.nih.gov)。例えば、ヒトA p o Eの遺伝子ID番号は348、ヒトハプトグロビンは3240である。これらG e n B a n k 登録の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0106】

翻訳段階でバイオマーカーであるA p o E及びハプトグロビンの発現のレベルを測定すること、例えばタンパク質それ自体のレベルを測定することを要する本発明の実施形態において、それぞれの遺伝子によりコードされるアミノ酸配列の詳細についてもまた、G e n B a n k データベースからアクセスできる。例えば、ヒトA p o E遺伝子は、G e n B a n k 受託番号N P _ 0 0 0 0 3 2 . 1により表されるタンパク質をコードし、ヒトハプトグロビン遺伝子は、G e n B a n k 受託番号N P _ 0 0 5 1 3 4 . 1 (変異体1) 及びN P _ 0 0 1 1 1 9 5 7 4 1 . 1 (変異体2) により表される2つのタンパク質変異体をコードする。或いは、これらバイオマーカーのそれぞれによりコードされるアミノ酸配列の詳細については、U n i P r o t データベース(www.uniprot.org)からアクセスでき、ヒトA p o Eタンパク質のU n i P r o t IDはP 0 2 6 4 9、ヒトハプトグロビンタンパク質はP 0 0 7 3 8である。2030

【0107】

転写段階でバイオマーカーであるA p o E及びハプトグロビンの発現のレベルを測定すること、例えば対応する遺伝子のm R N A レベルを測定することを要する本発明の実施形態において、転写ヌクレオチド配列(複数可)の詳細についてもまた、G e n B a n k データベースからアクセスできる。例えば、ヒトA p o E遺伝子は、G e n B a n k 受託番号N M _ 0 0 0 0 4 1 . 2により表されるヌクレオチド配列へと転写される。ヒトハプトグロビン遺伝子は、G e n B a n k 受託番号N M _ 0 0 5 1 4 3 . 3 (変異体1) 及びN M _ 0 0 1 1 2 6 1 0 2 . 1 (変異体2) により表される2つの変異体へと転写される。

【0108】

第5の態様において、本発明は、対象における胃癌(G C)を診断するための、対象がG Cの発症に感受性を有するかどうかを判定するための、又は対象におけるG Cの進行を評価するためのキットを提供する。キットは、1つ又は複数のバイオマーカーが、ビタミンD結合タンパク質(V D B P)、クラスタリン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット(I G F A L S)、及びアファミンからなる群から選択される、対象における1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを測定する手段を含む。40

【0109】

一実施形態において、キットは、固体支持体、例えばチップ、センサー、マイクロタイマー・プレート又は捕捉試薬が付着されたビーズ若しくは樹脂を含み、捕捉試薬は、本発明のバイオマーカーのうちの1つに対応するタンパク質に結合する。したがって、例えばキットは、S E L D I のための質量分析プローブ、例えばP r o t e i n C h i p (登録商50

標)アレイ、又は多用途ファイバーベースS P R検出装置を含み得る。生体分子特異的捕捉試薬の場合、キットは、反応表面を有する固体支持体、及び生体分子特異的捕捉試薬を含む容器を含み得る。

【0110】

一実施形態において、キットはまた、洗浄溶液又は洗浄溶液作製のための指示書を含み得るのであり、捕捉試薬及び洗浄溶液の組合せは、続いて例えば質量分析により検出するための、固体支持体上での1つ又は複数のバイオマーカータンパク質の捕捉を可能にする。キットは、複数のタイプの吸着剤を含んでいてもよく、それぞれが異なる固体支持体上に存在する。

【0111】

10

いくつかの実施形態において、かかるキットは、ラベル又は別個の挿入物の形態で、好適な操作パラメータのための指示書を含み得る。例えば指示書は、消費者に検体の収集方法、プローブの洗浄方法又は検出される1つ又は複数の特定のバイオマーカータンパク質について伝えてよい。

【0112】

いくつかの実施形態において、キットは、それぞれのバイオマーカーについて基準発現レベルを示し、したがって校正の基準として使用されるべき検体を伴う、1つ又は複数の容器を含み得る。

【0113】

20

明瞭さと理解を目的として本発明がある程度詳細に述べられた一方で、本明細書に記載の実施形態及び方法に対する様々な修正及び変更が、この明細書に開示された本発明の概念の範囲を逸脱することなくなされることは、当業者にとって明らかであると考えられる。

【0114】

最後に、本発明に包含される基本的手法を実施する方法を含む分子生物学の標準的教科書に言及する。例えば、Sambrook及びRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第3版)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001年を参照のこと。

【0115】

本発明を、以下の実施例においてさらに例証する。実施例は、特定の実施形態のみを記述することを目的とし、上の記述に関して限定することを意図してはいない。

30

【実施例1】

【0116】

胃癌のバイオマーカーの同定

本発明者らは、g p 1 3 0 ^F / ^F 遺伝子組換えマウス (genetically engineered mouse : G E M) をバイオマーカー発見のための炎症関連胃癌 (G C) モデルとして利用し、ヒト検体でこれをバリデートした。上で示したように、g p 1 3 0 ^F / ^F マウスは、胃の腺部に自然発症的に再現性良く腺腫を発症し、かかる腺腫は、ピロリ菌への慢性感染により生じるヒトにおける腸型G Cと関連する進行性の組織学的特徴のすべてを示す。g p 1 3 0 ^F / ^F マウスは、サイトカイン受容体g p 1 3 0 に調節性チロシン残基のフェニルアラニン (F) 置換突然変異を有するので、インターロイキン-6 (I L - 6) 及びインターロイキン-11 (I L - 11) を含む同族g p 1 3 0 受容体リガンドに対し、過剰なS t a t 3 シグナリングで応答する。したがって、g p 1 3 0 ^F / ^F マウスにおける胃腫瘍形成の開始及び進行は、複合g p 1 3 0 ^F / ^F ; S t a t 3 ⁺ / ⁻ (F F S t a t 3) マウスにおいてS t a t 3 の発現に遺伝的制約を課すことにより抑制される。驚くべきことに、I L 6 の遺伝子除去は、対応するg p 1 3 0 ^F / ^F ; I L 6 ⁻ / ⁻ (F F I L 6) マウスにおける胃腫瘍形成に影響することなく、g p 1 3 0 ^F / ^F マウスの汎炎症性表現型特性を選択的に正常化する。こうしたものとして、様々なg p 1 3 0 ^F / ^F 複合突然変異体は、炎症関連胃腫瘍形成の遺伝的解剖を可能にし、I L 6 により誘発される全身性の炎症急性期反応は、様々な病変と同時発生する。

40

50

【0117】

材料と方法

G E M モデル

動物を伴うすべての実験が、ラドウェイグ癌研究所倫理委員会により承認された。g p 1 3 0 F / F (FF)、g p 1 3 0 F / F ; I 1 6 - / - (F F I L 6)、g p 1 3 0 F / F ; S t a t 3 + / - (F F S t a t 3)、I 1 6 - / - (I L 6)、及びg p 1 3 0 F / F ; I 1 1 1 r - / - (F F I L 1 1 R a) G E M の作製が、以前に記述されている (Jenkins BJら、2005年、Nat. Med. 11: 845~852頁; Tebbutt NCら、2002年、Nat. Med. 8: 1089~1097頁; Judd LMら、2009年、J. Pathol. 217: 552~562頁; Ernst Mら、2008年、J. Clin. Invest. 118: 1727~38頁を参照のこと)。突然変異を欠く年齢適合同腹仔を野生型 (WT) として示す。12~14週齢の頸下放血により、Microvette 500 血清ゲルチューブ (Sarstedt、ニュンブリヒト、ドイツ) へと直接血液を収集した。検体を室温で30分間静置した後に6,600×gで5分間の遠心分離にかけ、血清を得た。血清上清を約100 μLの容積へと分注し、すぐに-80°で貯蔵した(一次アリコート)。ある時、検体を氷上で解凍し、20 μLの容積へと再分注し、-80°で再凍結した(二次アリコート)。ウエスタンプロッティングに適用するため、二次アリコートを氷上で解凍し、超純水で1/70に希釈し、約7 μgの総血清タンパク質を含有する6.5 μLの容積に分注し、-80°で再凍結した(三次アリコート)。

10

20

【0118】

ヒト研究集団

ヒトを伴うすべての実験が、ピーターマッカラム癌研究所及びアデレード大学の倫理委員会により承認された。腸型胃腺癌(ローレン分類)に罹患した11人の手術前GC患者からの血清を、ピーターマッカラム癌研究所組織バンクをとおして入手し、100 μLの一次アリコートに-80°で貯蔵した。Vacutte Z Serum Sep C10t Activator チューブ(Greiner Bio-One、フリッケンハウゼン、ドイツ)を使用して、消化管疾患が報告されていない13人の健常ボランティアから対照血清を収集した。血清を室温で20~40分間凝固させた後に、1,800×gで10分間の遠心分離にかけた。血清上清を400 μLの容積に分注し(一次アリコート)、-80°で貯蔵した。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びウエスタンプロッティングによるベリフィケーションを目的として、マウス血清と同様に、ヒト血清の二次及び三次調製物を作製した。24人のヒト対象の個体群統計学的情報を表1に提供する。

30

【0119】

【表1】

表1

個体群統計学的 変数	特徴	胃癌 (n=11)	健常対照 (n=13)
年齢, y	平均±SD 範囲	66.3±10.7 51-79	57.8±7.3 50-72
性別, n	男性 女性	8 3	10 3

40

【0120】

高存在量血清タンパク質の枯渇及び2D D I G E

製造者の推奨に軽微な修正を加えてマルチプルアフィニティ除去システム(MARS、Agilent Technologies、サンタクララ、CA)を使用して、アルブミン、トランスフェリン及びIgGをマウス血清から枯渇させた。簡潔に述べると、この研究で利用されたGEMマウスが比較的多数(n=38)であったため、血清検体を、実

50

験1(3×WT、4×IL6、4×FFFstat3、4×FF及び4×FFIL6)及び実験2(4×WT、3×IL6、4×FFFstat3、4×FF及び4×FFIL6)と示す2群に分けた。マルチプルアフィニティ除去クロマトグラフィー(MARS)枯渇及びDIGEを、実験1及び実験2について別々に実施した。

【0121】

血清の二次アリコート(20μL)をMARS緩衝液A(90μL)で希釈し、0.22μm遠心装置(Agilent Technologies)を使用して濾過した。Hewlett Packard 1090 HPLCシステムを使用して、MARS-Mカラム(4.6×100mm)に注入された100μLの希釈血清で、0.5mL/minでクロマトグラフィーを実施した。器具方法は以下のとおりであった。すなわち、0~10分、0.5mL/minで100%緩衝液A；10.01~17分、1mL/minで100%緩衝液B；17.01~28分、1mL/minで100%緩衝液A。フロースルーのピーク(2mL)を氷上で収集し、冷たい100%アセトン(8mL)をすぐに添加した。アセトン中の画分を、-20で5日間まで維持し、その後タンパク質を遠心分離(5,000×g、10分間、10)で回収した。タンパク質ペレットを、冷たい80%アセトン(10mL)で一度洗浄し、TUC4%緩衝液(7M尿素、2Mチオ尿素、30mMトリス、4%CHAPS；500μL)で再可溶化し、-20で1週間まで貯蔵した。検体をさらに脱塩し、等電点電気泳動(isoelectric focusing:IEF)との適合性を保証するため、枯渇血清検体を解凍し、10kDaMWCO Vivaspin 500遠心装置(GE Healthcare、ウプサラ、スウェーデン)を使用して、TUC4%中で2ラウンドの緩衝液交換にかけた。最終検体はTUC4%で約200μLまでとし、Horiba Twin Cond伝導率計(モデルB-173、Horiba、京都、日本)を使用して伝導性を評価し、レベルが300μS未満であることを確認した。製造者の推奨に従い、EZQアッセイ(Invitrogen、カールスバッド、CA)により、検体のタンパク質濃度を判定した。

【0122】

凍結乾燥された25nmol DIGE FluorミニマルCy2、Cy3及びCy5 Dye(GE Healthcare)を、125μL 無水N,N-ジメチルホルムアミド(Sigma-Aldrich、セントルイス、MO)中に再懸濁し、200pmol/μLストック溶液を作製した。ストックをねじ口チューブに分注し(1μL)、アルゴン下、-80で、>12ヶ月間、感知できるほどの感度の損失なしに貯蔵した。標識化が必要な際には、70μgのタンパク質を含有する適切な容積の個々の枯渇血清検体を、Cy3及びCy5アリコートに直接添加した(200pmol/70μgの色素/タンパク質比)。潜在的な色素関連バイアスを制御するため、生物学的複製物の色素スワップを実施した。特定の実験に含まれる検体からの35μgのタンパク質をプールする(軽微な例外あり)ことにより、2つの実験のそれぞれについて別々の内部標準を調製した(結果セクションを参照のこと)。内部標準を、200pmol色素/70μgタンパク質の比でCy2で標識化した。標識化反応を氷上で30分間暗い中で実施し、200pmolの色素当たり1μLの10mMリシンを添加して消光した。適切なCy3及びCy5検体を、70μgの内部標準及び十分な量のTUC4%と混合し、検体を等容積とした(補足表1及び2を参照のこと)。ジチオトレイトール(DTT、Sigma-Aldrich)及びpH4~7の担体両性電解質(IPG緩衝液、GE Healthcare)もまた添加し、最終検体が210μgタンパク質、7M尿素、2Mチオ尿素、30mMトリス、4%w/v CHAPS、10mM DTT、0.5%v/v両性電解質を含有するようにし、微量のプロモフェノールブルーを着色のため加えた。10kDa分子量カットオフVivaspin 500遠心装置(5~10分、8,200×g；GE Healthcare)を使用して、検体容積を約150μLまで減らし、その後、450μLの再水和緩衝液(0.5%v/v両性電解質、1.2%v/v Destreak試薬[GE Healthcare]及び微量のプロモフェノールブルーを含有するTUC4%)中で一晩再水和させた24cm 4~7 Immobiline DryStri 50

p(GE Health care)にカップローディングした。必要なCy3、Cy5及びCy2検体を、電気泳動分離のため混合した。IPGphor II(GE Health care)を使用して、一次元でのIEFを全70,000ボルトアワー実施した。

【0123】

IEF後にストリップを還元緩衝液(50 mMトリス-HCl pH 8.8、6 M尿素、30%v/vグリセロール、2%w/v SDS、1%w/v DTT)中で15分間、次にアルキル化緩衝液(上のものにDTTの代わりに2.5%w/vのヨードアセトアミド(IAA)を伴う)中で平衡化した。市販のカソード緩衝液(Servaelectrophoresis)中の1%w/v低融点アガロースの融解溶液を使用して、ストリップを2DGel DALT NF 12.5%プレキャストゲル(Servaelectrophoresis、ハイデルベルク、ドイツ)の上部にシールした。蛍光標識化ECL Plex Rainbowマーカー(GE Health care)を選択した少数のゲル上に含めた。EttanDALT 12ユニット(GE Health care)を使用して、アノード及びカソード緩衝液(Servaelectrophoresis)の存在下、25°で、以下の3段階プログラムを使用して、二次元でのタンパク質分離を実施した。すなわち、(1)50V; 5mA/ゲル、1時間、(2)100V; 10mA/ゲル、1時間、(3)250V; 30mA/ゲル、14時間。Ettan DIGE Imager(GE Health care)を使用して、100μmの解像度で、以下の露光を使用して、ゲルをスキャンした。すなわち、Cy2チャンネル、0.4秒；Cy3チャンネル、0.07秒；Cy5チャンネル、0.1秒。スキャンされたゲルを、固定せずに-80°で、スポットピッキングで必要とされるまで貯蔵した。

【0124】

比較画像分析

DeCyder 2Dソフトウェア(バージョン6.5及び7.0、GE Health care)を使用して、画像分析を行った。DeCyderのゲル内変動解析(Differential In-gel Analysis: DIA)モジュールでそれぞれのゲル画像を別々に処理し、その後生物学的変動解析(Biological Variation Analysis: BVA)へとエクスポートした。ボリューム<30,000のスポットを排除する除外フィルターを用いて、推定10,000スポットに基づくDIAスポット検出を実施した。バックグラウンド減算及びゲル内正規化をソフトウェアで自動的に実行した。DIAワークスペースを、マスターゲルに対するマニュアルでのスポットマッチングのためBVAへとインポートした。タスクをソフトウェアで実施した際に効果的にマッチングされない多数のスポット列ゆえに、マニュアルでのスポットマッチングが必要であった。スポット同一性の一貫性を保証するため、実験1及び2に同じユーザー定義のマスターゲルを使用した。実験1においては、マスターゲルもまた分析用ゲルを構成した。実験2においては、マスターゲルをBVAへとの目的のためだけにエクスポートし、統計分析には含めなかった。

【0125】

DeCyderの拡張データ解析(Extended Data Analysis: EDA)モジュール(バージョン7.0)を使用して、>70%のゲルで検出されたスポットに基づき、階層クラスタリング及び主成分分析(principal component analysis: PCA)による多変量統計的検定を実施した。一変量統計的検定のため、マッチングされたスポットの正規化されたボリュームを、DeCyderからExcel(Microsoft、レッドmond、WA)へとエクスポートした。標準化された存在量値(本明細書において「スポットボリューム」と呼ぶ)を、それぞれのゲルについてCy3及びCy5チャンネルのスポットボリュームをCy2チャンネルで割ることにより算出した。次に、所定の比較内でそれぞれの群についてスポットボリュームを \log_{10} 変換し、データを正規分布させ、それぞれのスポットの標準偏差(standard deviation: SD)を計算した。 \log_{10} 変換スポットボリュームに基づき、Excelでステュードントの独立両側T検定も実施し、P値をDeCyderにより得られたものと相互参照し、それらが等価であることを確認した。Piface(バージョン1.64、<http://www.cs.uiowa.edu/>)

～r length / Power /で入手可能)を使用して、それぞれの比較について事後検定力計算(post-hoc power calculation)(Length RV、2007年、J. Anim. Sci. 85: E24～29頁)を、以前に記述されたように実施した(Pennو MAら、2009年、J. Proteome Res. 8: 2812～2826頁)。簡潔に述べると、検討されたそれぞれの群について、マッチングされたスポットボリュームのすべての標準偏差の75%パーセンタイル値を、の尺度として使用し(Karp NA及びLilleley KS、2005年、Proteomics、5: 3105～3115頁)、有意水準を0.01に設定し()、必要な検定力は80%であり、生物学的複製物の数はそれぞれの群に固有であった(n)。結果として得られるエフェクトサイズを累乗してlog₁₀変換を元に戻し、そのことで、比較された群の平均スポットボリュームが有意に異なるとみなされ得る最小倍変化(fold-change)を提供した。
多重仮説検定の問題を考慮し(Karp NAら、2007年、Mol. Cell Proteomics、6: 1354～1364頁)、スコットランド生物数学・統計学研究所(Biomathematics and Statistics Scotland)のGraham Horngan博士が開発したExcelスプレッドシート(<http://www.rowett.ac.uk/~gwh/qval.xls>よりダウンロード)を使用して、それぞれのマッチングされたスポットについてq値を決定した。所定の比較についてP値をスプレッドシートにエクスポートし、Storey JD及びTibshirani R、2003年(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、100: 9440～9445頁)の式に基づいてq値を計算した。

【0126】

差次的に発現したスポットであると認められるには、4つの基準を満たす必要があった。すなわち、

1. スpotは、spotマップの>70%上に存在することを要した(すなわち 27/38)。512個のspotがこの基準を満たし、続く分析において検討された。
2. スpotは、所定の比較についてlog₁₀変換spotボリュームに基づき、ステューデントの独立両側T検定P値<0.01を有することを要した。

3. スpotボリュームにおける判定された倍変化が、事後検定力計算による判定で、比較1について>2.1のマグニチュード、比較2についても>2.1、比較3については>1.8であることを要した。倍変化は、log₁₀変換ボリュームではなく、平均spotボリュームに基づいて計算した。1未満の発現値(すなわち、比較において他の群に対してある群でspotがダウンレギュレートされている)を割って-1とし、その変化を反映させた。

4. スpotは、多重仮説検定に関連する高い偽発見率を制御するため、q値<0.01を有することを要した。

【0127】

2D DIGEデータの受信者動作特性(ROC)分析によるさらなる統計的検定をExcelで実施した。

【0128】

タンパク質同定

De Cyderで生成されたピックリストに基づき、Etta n Spot Cutt ing Robot(GE Healthcare)を使用して、目的のspotを分析用ゲルから切除した。一晩トリプシン(20 μLの5 mM重炭酸アンモニウム、10%アセトニトリル[ACN]中の100 ngのシーケンシンググレード修飾トリプシン[Promega、フィッチバーグ、WI])で消化するために、2～6個のゲルからプラグをプールした。HPLC-Chip Cubeに格納されたProtein ID Chipカラムアセンブリ(0.075 × 43 mm C-18分析カラムを伴う40 nLトラップカラム)を備えた1100 HPLCシステム(すべてAgilent Technologies)を使用して、抽出したトリプシンペプチドを分離した。これは、正イオンモードで動作するHCT Ultra 3D-Ion-Trap質量分析計(Bruker 50

er Daltonics、ビルリカ、MA)に直接接続された。0.1%FA、3%ACN、0.5µL/minでカラムを平衡化し、ACN勾配で検体を溶出した(32分にわたり3%~31%)。イオン化種(ionizable species)(300< m/z < 1,200)をトラップし、その時点で溶出した最も強度の高いイオンの1つ又は2つを、衝突誘起解離により断片化した。前駆イオンを除外するため、2つのスペクトルを得た後30秒間、積極的除外(active exclusion)を使用した。Data Analysis(バージョン3.4、Bruker Daltonics)を使用して、MS及びMS/MSスペクトルをピーク検出及びデコンポリューションにかけた。MS及びMS/MS質量リストをBioTools(バージョン3.1、Bruker Daltonics)にエクスポートし、次にMascot(バージョン2.2)に提示した。検索諸元は次のとおりだった。すなわち、データベース=SwissProt 56.4、分類=哺乳類(63826配列)、酵素=トリプシン、固定修飾=システインのカルバミドメチル化、可変修飾=メチオニンの酸化、ペプチド質量許容誤差=±0.3Da、断片質量許容誤差=±0.4Da、切れ残り(missed cleavages)=1、及びペプチド電荷=1+、2+及び3+。指定の閾値を超えるイオンスコアを有する少なくとも2つのマッチングペプチドを有するかどうかに基づき、タンパク質同定を行った。トリプシンとのマッチ及び混入ヒトケラチンは無視した。タンパク質同定において重複性が観察された際、例えば、異なるタンパク質アイソフォームが同一質量のリストとマッチした際には、全長配列に対応する最も好適なデータベースエントリー及び/又は付加質量がタンパク質のアイソフォーム特異的領域にマッチしたエントリーのみが検討された。スポット内に複数のタンパク質が同定された際には、最大emPAIスコアを有するエントリーのみが、スポットの主要成分として、それゆえその差次的調節に寄与する可能性が高いものとして検討された(Ishihama Yら、2005年、Mol. Cell. Proteomics、4:1265~1272頁)。UniProtのBLAST機能(<http://www.uniprot.org/blast/>)を使用して、マウスタンパク質のヒトホモログを同定した(UniProt Consortium、2011年、Nucl. Acids Res. 39:D214~219頁)。

【0129】

ウエスタンブロッティング

6.5µLの希釈血清を含有する三次アリコートを、2.5µLのNuPAGE LD Sample Buffer(4X)(Invitrogen)及び1µLの0.5M DTTと混合した。検体を95℃で5分間加熱し、次に1レーン当たり10µLの容積をNuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel(Invitrogen)上にロードした。さらなるバリデーションのために選ばれた10個のマウス検体を単一ゲル上に流し、1回の実験で分析されたクラスタリンを除いて、結果を2回のテクニカル反復によりバリデートした。24個のヒト検体を、3つの別々のゲル上に同時に流し、それぞれのゲルが、同数のGC患者検体及び年齢(可能な場合)/性別適合対照を含んでいた。ゲルは、200Vで50分間、NuPAGE MOPS SDS Running Buffer(Invitrogen)で流し、Immobilion-P PVDF膜(Millipore、ビルリカ、MA)に15Vで50分間、Towbin緩衝液(0.025Mトリス、0.192Mグリシン、20%メタノール)でトランスファーした。トランスファー後、Amidoblack染色溶液(10%(v/v)酢酸中の0.1%(w/v)アミドブラック[ナフトールブルーブラック、Sigma-Alpha chemicals])で膜を染色し、メタノール中で脱染する前にデジタルスキャンした。次に、膜を5%脱脂乳で1時間、室温でブロッキングし、一晩4℃で標的タンパク質に対する一次抗体とともにインキュベートした。この研究で使用された6つの一次抗体は次のとおりだった。すなわち、

1. ウサギ抗ヒトアファミン(Abcam、ケンブリッジ、英国)

2. ウサギ抗マウスマトリポタンパク質E(apoE)(Thermo、ロックフォード、IL)

10

20

30

40

50

3. マウス抗ヒトapoE (Abcam)
4. ウサギ抗ヒトアポリポタンパク質J (クラスタリン) (Abcam)
5. ウサギ抗ヒトイブロネクチン (Abcam)
6. ウサギ抗ヒトハプトグロビン (Sigma-Aldrich)

【0130】

一次抗体中での一晩のインキュベーション後に、膜をTBS-T (50 mMトリス、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.6)で3回洗浄し、次に1時間、室温で西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート二次抗体とともにインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート二次抗体は次のとおりだった。すなわち、(1)ウサギ抗マウスIgG-HRP (Rockland、ギルバーツビル、PA)、(2)ヤギ抗ウサギIgG-HRP (Thermo)、及び(3)ヤギ抗マウスIgG-HRP (Thermo)。膜をさらに3回、TBS-Tで洗浄し、次にSigma Enhanced Chemiluminescent Peroxidase Substrate (Sigma-Aldrich又はMillipore) 及び自動記録フィルム (Agfa、モルツエル、ベルギー)で検出した。Image J (国立衛生研究所; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 又はImageQuant TL (バージョン7.0、GE Healthcare)を使用して、ウエスタンプロットデンシティメトリーを実施した。ゲルローディングにおける電位差を制御するため、目的のバンドの強度を、Amidoblack染色膜上に約25 kDaで現れる免疫グロブリン軽鎖バンドの強度に正規化した。それぞれのタンパク質について、GC及び非GC群の正規化強度値の分布をGraphPad Prism (バージョン5; GraphPad Software、ラホーヤ、CA)にエクスポートし、ノンパラメトリックマン-ホイットニー検定をP < 0.05の有意性閾値で使用して比較した。

【0131】

酵素結合免疫吸着アッセイ

製造者の推奨に従い、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を実施した。この研究で使用された9つのELISAキットは次のとおりだった。すなわち、

1. アファミンELISAキット (Uscnk、ウーハン、中国)
2. ヒトアポリポタンパク質E ELISA (Mabtech、スウェーデン)
3. QuantikineヒトクラスタリンELISAキット (R&D System、ミネアポリス、MN)
4. Quantimatrix ELISAフィブロネクチンキット (Millipore、ビルリカ、MA)
5. ハプトグロビンヒトELISAキット (Abcam)
6. ヒトアルファ1-抗キモトリプシンELISA (Kamiya、シアトル、WA)
7. ビタミンD結合タンパク質ELISA (Kamiya)
8. インスリン様成長因子結合タンパク質酸不安定性サブユニットELISAキット (Uscn、中国)
9. 糖鎖抗原 (CA) 72-4 ELISA、ヒト (Kamiya)

【0132】

血清タンパク質濃度を、GraphPad Prism (GraphPad Software) で生成したキット特異的標準曲線から内挿した。結果として得られる血清タンパク質濃度を、対照群においてそれぞれ測定されたタンパク質について得られる平均濃度に対し標準化した。これは、等価な尺度上でのマーカーの候補間比較を容易にした (Facet VMら、2008年、PLoS Med. 5:e123頁)。GraphPad Prismでマン-ホイットニーユー検定 (両側、有意性閾値 P < 0.05) 及びROCを実施した。

【0133】

結果

10

20

30

40

50

FF 突然変異体マウスの生物学的特性

木毛接合 gp 130^{F/F} 突然変異体マウスは、胃の腺部に自然発症的に再現性良く明確な腺腫を発症し、かかる腺腫は、3~5個の個別の病変として、約4~6週齢までに組織学的に視覚可能となる。それらは、その後2~3ヶ月にわたり継続的に成長し、約250mgの最大腫瘍組織量をもたらし、それゆえこれらマウスの全体重の0.8~1%を占める。これら腫瘍は100%の浸透率で、マウスの遺伝的背景と無関係に生じる。これら病変が、ピロリ菌への慢性的感染から生じるヒトにおける腸型GCと関連する多くの進行性の組織学的特徴を再現することが以前に示されてきた (Jenkins BJら、2005年、Nat. Med. 11: 845~852頁; Tebbutt NCら、2002年Nat. Med. 8: 1089~1097頁; Ernst M、Jenkins BJ. 2004年、Trends Genet. 20: 23~32頁。及びCorrea Pら、1975年、Lancet 2: 58~60頁)。したがって、これら病変は同時に、萎縮性胃炎、腸上皮化生及び上皮性形成異常の特徴を示すが、これらが腺癌へと進行するのは稀である。腫瘍形成は、抗菌治療又はToll受容体介在性シグナリングの遺伝的欠失後に減弱化するので、これらgp 130^{F/F} GEMは、ヒトにおける早期炎症関連腸型GCの前臨床的にバリデートされたモデルとなる。

【0134】

gp 130^{F/F} GEMは、サイトカイン受容体gp 130に調節性チロシン残基のフェニルアラニン置換突然変異を有するので、これらマウスは、IL-6及びIL-11を含む同族gp 130受容体リガンドに対し、過剰なStat3シグナリングで応答する。したがって、FFマウスにおける胃腫瘍形成の開始及び進行は、複合FFStat3マウスにおいて潜在的転写因子であるStat3の発現に遺伝的制約を課すことにより抑制され、遅延させられる (Jenkins BJら、2005年、Nat. Med. 11: 845~852頁) (図1)。驚くべきことに、IL6の遺伝子除去は、対応するFF IL6マウスにおける胃腫瘍形成に影響することなく、FFマウスの汎炎症性表現型特性を選択的に正常化する。同様に、FF IL6の全生存率は、FFマウスのそれと比較して向上し、その腫瘍組織量よりもむしろその汎炎症性反応が生存率を制限するものとなることを示唆する。対照的に、FF IL11Rマウスは、IL11-特異的IL11R受容体サブユニットの発現を欠損しており、それゆえIL11に応答することができないが、このマウスは胃腫瘍を発症せず、FF IL11Rマウスの生存率は、対応する能力を有するIL11Rの生存率と同等のままである。gp 130^{F/F}; IL11R^{-/-}においてただ1つのIL11R対立遺伝子の除去が腫瘍形成を遅延させ、減弱化させたので、IL11依存性gp 130/Stat3活性化への薬理学的干渉は、確立した疾患に罹患したFFマウスにおける全腫瘍組織量を減少させた [Ernst 2008年、データは示さず]。したがって、FF IL6マウスとFF IL11Rマウスの間の表現型の分離は、全身性のIL6介在性炎症性反応とIL11依存性胃腺腫形成促進との間の遺伝的分離を可能にする。一方で、複合FFStat3マウスにおけるStat3発現の包括的な遺伝的制約は、IL11依存性腫瘍形成と、IL6依存性全身性炎症とを障害する (Jenkins BJら、2005年、Nat. Med. 11: 845~852頁)。

【0135】

GEMモデルにおけるGCの血清バイオマーカーの同定

この研究において用いられるバイオマーカー同定ワークフローは、3つの段階に広くカテゴライズされ得る。発見段階は、胃癌(GC)モデルである遺伝子組換えマウス(GEM)から収集した血清を検査し、差次的に発現するタンパク質を候補血清バイオマーカーとして同定した。第2段階は、ウエスタンプロッティングの半定量的手法を適用し、GEMモデルにおける候補バイオマーカーのサブセットの差次的発現をベリファイした。第3段階は、ウエスタンプロッティング及び臨床的に関係する診断プラットフォームである定量的ELISAも使用して、マウスにおいてベリファイされたバイオマーカーをGC患者及び健常対照のヒト血清中で試験した(図2A)。

【0136】

発見段階で、FF / FFI L 6 遺伝子型を示す16匹のGC表現型マウス、及びFFStatt3 / WT / IL 6 遺伝子型を示す22匹の非GC表現型マウスからのMARS枯渴血清を2D DIGEにより分析し、38個のスポットマップが生成された。GC及び非GC表現型血清の代表的なスポットマップを図2Bに示す。DeCyderソフトウェアを使用して、全部で512個のスポットを、スポットマップの>70%にマッチングさせ（すなわち38個のうち27個）、続く統計分析に含めた。512個のマッチングされたスポットボリュームに基づく教師なし階層クラスタリングは、階層の最下位レベルでマウス遺伝子型に基づくクラスターを、より高いレベルでGC対非GC表現型に基づくクラスターを明らかにした（図2C）。主成分分析はまた、GCマウスと非GCマウスとの間で明確に二分される、遺伝子型に基づく別のグルーピングを明らかにし（図2D）、複数のマッチングされたスポットの発現が、GC表現型と関連付けられることを示唆した。さらに、第1主成分に基づくGC及び非GC群の顕著な分離は、この表現型が実験内の変異の主要な供給源であることを強調した。

【0137】

512個のマッチングされたゲルスポットのうち、IL 6介在性急性期反応との関連において調節されたものと、GCに関連するもの（すなわち候補バイオマーカー）とを区別をするためのフィルタリングストラテジーを開発した。このプロセスを、図3に図表で要約する。最初に、複数の突然変異体遺伝子型を研究に含めることにより、512個のマッチングされたスポットのボリュームの3つの比較を容易なものとした。第1の比較において、T検定（ $P < 0.01$ ）、偽発見率の計算（ $q < 0.01$ ）及び事後検定力計算（倍変化>マグニチュード2.1；補足情報1.4節を参照のこと）を使用して、7匹のWTマウスのスポットを7匹のIL 6マウスと比較した。第2の比較において、比較1について述べたのと同じパラメータを使用して、8匹のFFマウスの512個のスポットボリュームを8匹のFFIL 6マウスと比較した。第3の比較において、やはりT検定（ $P < 0.01$ ）、偽発見率の計算（ $q < 0.01$ ）及びマグニチュード1.8の最小倍変化で事後検定力計算を使用して、16匹のGC表現型マウス（FF / FFI L 6 遺伝子型）を22匹の非GC表現型（WT / IL 6 / FFStatt3 遺伝子型）マウスと比較した。ベン図で要約された結果（図3に示す）は、3つのスポットがGC非存在下のIL 6ノックアウトとの関連において差次的に豊富であり（C₁）、51個のスポットがGC存在下のIL 6ノックアウトと関連し（C₂）、一方で10個のスポットがGCと独立にIL 6ノックアウトと関連する（C₁ / C₂共通部分）ことを示した。17個のスポットが、GCにおいて調節されるIL 6介在性急性期反応タンパク質である可能性が高く（C₂ / C₃共通部分）、132個のスポットがGCにおいて差次的に豊富だった（C₃）。

【0138】

ROC分析を使用して、132個のGC関連スポットボリュームをGC表現型と非GC表現型との間で区別することができるかがさらに探究された。それぞれのスポットのボリュームについて2つのROC計算を行った。ROC₁において、GC表現型（FF / FFI L 6 遺伝子型）は陽性であり、非GC（WT / IL 6 / FFStatt3 遺伝子型）は陰性とみなされた。9つのスポットが、曲線下面積₁（AUC₁）値<0.85を返し、データセットから除外された。ROC₂において、FF突然変異は陽性とみなされ（FF / FFI L 6 / FFStatt3 遺伝子型）、野生型gp130は陰性とみなされた（WT / IL 6 遺伝子型）。11個のスポットがAUC₂>AUC₁値を返し、GC対非GC表現型よりも、FF突然変異体遺伝子型を有するマウスにおいて類似して有意に調節されていることを意味した。これらスポットと関連する箱ひげ図の視覚的検査は、それらのFF突然変異との明らかな関連を確認した（図4）。要約すると、最初の132個のGC関連スポットのうち、9つがGC対非GC表現型の識別因子として不十分とみなされ、11個がgp130変異と関連するようであった。興味深いことに、11個のFF突然変異関連スポットのうち8つが、顕著なタンパク質成分として肝臓カルボキシルエステラーゼNを含むことが見出された（Uniprotアイデンティファイア－ESTN_MOUSE、S

W i s s P r o t 受託番号 P 2 3 9 5 3 、データは示さず）。g p 1 3 0 突然変異との関連におけるこのタンパク質の有意性は不明である。これにより、I L - 6 シグナリングとは独立したG C 対非G C 表現型マウスにおける、特異的に調節され、差次的に豊富な目的の1 1 2 個のスポットがもたらされた。

【 0 1 3 9 】

液体クラマトグラフィーM S により1 1 2 個のG C 関連スポットを分析し（「タンパク質同定」で上述のとおり）、2 8 個のヒトタンパク質モログに対応する3 1 個の異なるマウスタンパク質の同定をもたらした。この比較的多数のタンパク質に鑑み、候補ベリフィケーション及びバリデーションのプロセスを促進するため、優先順位決定ストラテジーを使用した（C i m a I ら、2 0 1 1 年、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、1 0 8 : 3 3 4 2 ~ 3 3 4 7 頁；及びS u r i n o v a S ら、2 0 1 1 年、J . P r o t e o m e R e s . 1 0 : 5 ~ 1 6 頁）。

【 0 1 4 0 】

第1に、包括的な調節を示すタンパク質のみ（すなわち、これらタンパク質を含むすべての同定されたスポットがアップレギュレート又はダウンレギュレートされている - 表2 を参照のこと）が検討された。なぜなら、かかる候補の発現は、よく特徴付けられた技術、例えばウエスタンプロッティング及びE L I S A を使用して、より容易に探究できるからである。

【 0 1 4 1 】

第2に、オンラインバイオインフォマティクスリソースであるD A V I D （アノテーション、視覚化、及び総合的発見のためのデータベース；国立アレルギー感染病研究所、国立衛生研究所；[h t t p : / / d a v i d . a b c c . n c i f c r f . g o v / h o m e . j s p](http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp) ）（Huang da W ら、2 0 0 9 年、N a t . P r o t o c . 4 : 4 4 ~ 5 7 頁；及びHuang da W ら、2 0 0 9 年、N u c l . A c i d s R e s . 3 7 : 1 ~ 1 3 頁）を、候補と生物学的経路との間の既知の関連性、発現の組織特異的パターン、及び疾患クラスを探究し、要約するために使用した。

【 0 1 4 2 】

第3に、以前の文献における候補とG C との関連性について検討した。最後に、2 D D I G E 実験で観察された倍変化のマグニチュードもまた検討した。

【 0 1 4 3 】

【表2-1】

表2

タンパク質 Uniprot ID 受託番号	スコ ット ^a	スコッ ト倍変 化 ^b	平均 倍変 化 ^b	ヒトホモログ Uniprot ID 受託番号	%配列同 一性 ^c	発現の方向と関連 する病変 ^c
アファミン AFAM_マウス O89020	628	-1.9	↓ -2.4	アファミン AFAM_ヒト P43652	67%	卵巣癌、肝細胞癌
	631	-2.1				
	634	-2.5				
	637	-2.8				
	667	-1.8				
	668	-2.3				
	689	-3.2				
アポリポタ ンパク質E APOE_マウス P08226	1330	2.1	↑ 2.1	アポリポタン パク質E APOE_ヒト P02649	71%	胃癌、肝細胞癌、結 腸直腸癌、頭頸部癌 、前立腺癌、乳癌
	1332	2.2				
クラスタリ ン CLUS_マウス Q06890	1233	-2.0	↓ -2.0	クラスタリン CLUS_ヒト P10909	76%	前立腺腫瘍、退行性 脊柱側弯症、関節リ ウマチ
フィブロネ クチン FINC_マウス P11276	121	2.4	↑ 2.5	フィブロネク チン FINC_ヒト P02751-7	90%	慢性肝炎、関節リウ マチ、様々な癌、甲 状腺機能亢進症、子 瘤前症、全身性エリ テマトーデス、冠動 脈疾患、妊娠、加齢
	123	2.6				
	126	2.4				
	127	2.1				
	196	3.3				
	116	2.1				
	117	2.2				
	122	2.7				

10

20

30

40

【表2-2】

タンパク質 Uniprot ID 受託番号	スポート a	スポット倍変化b	平均倍変化 b	ヒトホモログ Uniprot ID 受託番号	%配列同一性 c	発現の方向と関連する病変c	
ハプトグロビン HPT_マウス Q61646	1191 1196 1204 1207 1208 1209	10.1 3.2 2.3 3.1 2.6 3.5	↑ 4.1	ハプトグロビン HPT_ヒト P00738	80%	胃癌、急性期反応、 関節リウマチ、胆道閉塞、腎炎、潰瘍性大腸炎、無形成性貧血、大巣、コルチコステロイド治療、アンドロゲン使用、GCのXMモデル	10
インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性鎖 ALS_マウス P70389	660	3.2	↑ 3.2	インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット ALS_ヒト P35858	77%	過剰成長ホルモン療法、子癇前症	20
セリンプロテアーゼ阻害剤A3K SPA3K_マウス P07759	119 120 150 412 423 425 430 437 438 966 967	-3.6 -3.6 -3.7 -2.7 -4.3 -4.9 -5.4 -5.2 -3.6 -3.7 -4.8	↓ -4.1	アルファ-1-抗キモトリプシン AACT_ヒト P01011	57%	ネフローゼ症候群、 喘息発作重積状態、 寒冷じんま疹、新生児/乳幼児	30
ビタミンD結合タンパク質 VTDB_マウス P21614	988 1018	-3.5 -2.6	↓ -3.1	ビタミンD結合タンパク質 VTDB_ヒト P02774	77%	I型糖尿病、肝線維症	40

^a DeCyderで割り当てられた2D DIGEゲル上のマスタースポット番号を指す;^b 2D DIGE実験で観察されたGCマウス(FF/FIL6遺伝子型)と非GCマウス(WT/IL6/FFStat3遺伝子型)との間のスポットボリュームにおける倍変化を指す;^c BLASTを使用して判定したマウスタンパク質とヒトホモログとの間の配列同一性を指す。

これら 4 つの検討に基づいて、2 D ゲル上の 38 個のスポットを示す 8 つのタンパク質のサブセットをその後の分析の候補バイオマーカーとして同定し、それらはすなわち、アファミン、アルファ - 1 - 抗キモトリプシン (A A C T、マウスセリンプロテアーゼ阻害剤 A 3 K のヒトホモログ)、アポリポタンパク質 E (a p o E)、クラスタリン、フィブロネクチン、ハプトグロビン、インスリン様成長因子結合タンパク質複合体酸不安定性サブユニット (I G F A L S) 及びビタミン D 結合タンパク質 (V D B P) であった (表 2 を参照のこと)。38 個のスポットの MS 要約統計を表 3 に提供する。

【 0 1 4 5 】

代表 2 D D I G E オーバレイゲル上の 8 つのタンパク質の位置を図 5 A に示す。関連スポットボリュームの箱ひげ図の視覚的検査は、G C 対非 G C 表現型 (F F / F F I L 6 10
対 W T / I L 6 / F F S t a t 3) において、それぞれが特異的に調節されていることを示した (図 5 B)。

【 0 1 4 6 】

マウス血清における候補 G C バイオマーカーのベリフィケーション

非 G C マウス血清に対する G C マウス血清におけるアファミン、a p o E、クラスタリン及びフィブロネクチンの全タンパク質レベルの調節を、5 匹の W T 及び 5 匹の F F 遺伝子型マウスからの血清を使用してウエスタンプロッティングによりベリファイした。免疫グロブリン軽鎖に対し、すべての 4 つのタンパク質を検出し (図 6 A)、定量する (図 6 B) ことに成功した。F F 対 W T マウスにおいて、a p o E ($P < 0 . 0 1$) 及びフィブロネクチン ($P = 0 . 0 1 6$) の両方の血清レベルが、有意に上昇していることが見出された一方で、アファミン ($P < 0 . 0 1$) 及びクラスタリン ($P < 0 . 0 1$) は有意にダウンレギュレートされていた。ウエスタンプロッティングにより得られた結果は、非 G C 表現型に対する G C 表現型における調節の方向の観点において、2 D D I G E データを裏付けた。
20

【 0 1 4 7 】

ヒト血清における候補 G C バイオマーカーのバリデーション

アファミン、a p o E、クラスタリン、フィブロネクチン及びハプトグロビンの全タンパク質レベルの調節を、11 人の手術前 G C 患者及び 13 人の健常対照からの検体を使用してヒト血清において研究した。ウエスタンプロッティングによりすべての 5 つのタンパク質を検出し、定量することに成功した (図 6 C)。
30

【 0 1 4 8 】

G C 患者対対照のデンシトメトリー解析 (図 6 D) は、それぞれのタンパク質が、a p o E、フィブロネクチン及びハプトグロビンが発現レベルの増加を示し、アファミン及びクラスタリンが発現レベルの減少を示すという、G E M モデルにおいて観察された、予測された変化の方向を示したことを明らかにした。G C 患者血清と対照血清との間で、アファミン ($P = 0 . 0 0 4$) 及びハプトグロビン ($P = 0 . 0 2 4$) の発現レベルが有意に異なっていた (図 6 D)。

【 0 1 4 9 】

【表3】

表3

タンパク質 Uniprot ID 受託番号	スパート ^a	MS パラメータ				観察された PI	観察された MW	予測された PI ^b	予測された MW ^b	ヒトホモロ グ Uniprot ID 受託番号
		マウス スコア (カットオ フ)	マッ チングさ れた クエ リー	emP AI スコ ア	%配 列力 バー					
アファミン AFAM_マ ウス O89020	628	668(34)	24	1.46	38%	4.68	94,100	5.54	69,379	アファミン AFAM_ヒト P43652
	631	911(34)	22	1.35	38%	4.72	93,700			
	634	719(35)	21	1.15	29%	4.76	93,600			
	637	394(35)	17	0.97	26%	4.83	93,600			
	667	878(34)	23	1.46	38%	4.87	90,500			
	668	841(34)	20	1.25	38%	4.93	90,500			
	689	380(34)	10	0.43	19%	4.74	88,500			
アポリポタ ンパク質E APOE_マ ウス P08226	1330	588(35)	16	2.16	39%	5.37	31,000	5.56	35,867	アポリポタ ンパク質E APOE_ヒト P02649
	1332	787 (35)	25	4.37	41%	5.51	31,000			
クラスタリ ン CLUS_マ ウス Q06890	1233	279 (34)	5	0.36	12%	4.12	39,100	5.46	51,656	クラスタリ ン CLUS_ヒト P10909
フィブロネ クチン FINC_マウ ス P11276	121	2364(34)	53	0.74	28%	5.31	174,600	5.39	272,489	フィブロネ クチン FINC_ヒト P02751-7
	123	1875(33)	66	1.02	32%	5.37	174,500			
	126	1895(34)	64	1.00	34%	5.39	174,400			
	127	3017(33)	72	1.20	35%	5.41	174,300			
	196	1258(34)	25	0.31	14%	5.04	153,100			
	116	1846(33)	43	0.56	23%	5.25	174,600			
	117	2244(33)	53	0.74	27%	5.29	174,600			
	122	2505(33)	52	0.74	26%	5.33	174,600			

【0150】

臨床的に関係する分析プラットフォームを使用してより多くの定量的データを得るために、アファミン、apoE、ハプトグロビン、フィブロネクチン、及びクラスタリンの血清レベルを、VDBP、IGFALS 及び AACT とともに ELISA により測定した。この研究において同定された候補バイオマーカータンパク質の相対感度及び特異度を、現在実施されている臨床マーカーと比較するため、血清 C A 7 2 - 4 の ELISA もまた実施した。より高い C A 7 2 - 4 レベルが、GC による死亡のリスクの増加と関連付けられてきたのであり、そのことを示唆する証拠は、CEA 及び CA 19 - 9 よりも GC についてより予後診断的で具体的である (Ucar Eら、2008年、Adv. Ther. 25:1075~1084頁)。9つのタンパク質の濃度を、それぞれの個別の結果を対照群におけるタンパク質の平均濃度で割ることにより標準化した。したがって、対照群におけるすべてのタンパク質の平均濃度は 1 であった。これは、等価な尺度上でのマーカーの候補間比較を容易にした (Facch VMら、2008年、PLoS Med. 5:e123 頁)。

【0151】

アファミン、apoE、クラスタリン及びハプトグロビンの血清濃度が、GC 患者と対照との間で有意に異なることが見出された ($P < 0.05$) (図 7A)。IGFALS 及

10

20

30

40

50

びV D B Pもまた、倍変化のマグニチュードに基づき、これらの群間で差次的発現を示した($P > 0.05$)。C A 7 2 - 4は、G C群においてわずかに、有意でない1.3倍の発現増加で上昇した(図7A)。G C患者と対照との間で明確な調節は示されなかった($P > 0.5$)、A A C T及びフィプロネクチンについてE L I S Aの結果を示す散布図を図8に提供する。重要なことに、すべての候補についてウエスタンプロットティング及び/又はE L I S Aにより測定され、G C患者対対照血清において観察された調節の方向は(統計的有意性を示さなかつものでさえも)、G E Mモデルにおいて2 D D I G E及びウエスタンプロット分析を使用して得られたデータと一致する。

【0152】

調節されたタンパク質であるアファミン、a p o E、クラスタリン、及びハプトグロビンの診断能力が、C A 7 2 - 4とともにR O C分析によりさらに探究された(図7B)。アファミン及びクラスタリンの感度及び特異度は、共にそれぞれ91%及び92%であった(共に10/11真陽性、12/13真陰性)。a p o Eの感度及び特異度は、それぞれ91%及び85%であった(10/11真陽性、11/13真陰性)一方で、ハプトグロビンについては感度が64%で100%の特異度であった(7/11真陽性、13/13真陰性)。対照的に、C A 7 2 - 4の感度及び特異度は、それぞれ36%及び77%に過ぎなかつた(4/11真陽性、10/13真陰性)。

【0153】

考察

現在のところ、目標を絞った内視鏡診断前のG C検出について感度及び特異度の高いバイオマーカーを欠いている。この実施例において、以下に基づくバイオマーカー発見ストラテジーを開発した。すなわち、(i)高度に予測可能で臨床的に関係するヒト疾患のモデルマウスの使用、(ii)候補バイオマーカー同定に関する最先端のプロテオミクスアプローチ、及び(iii)よく特徴付けられた診断プラットフォームであるE L I S Aを使用した、ヒト検体における同定された候補バイオマーカーの翻訳に基づく。

【0154】

ヒト癌の多くの重要な特徴を再現する遺伝的に同系交配されたマウスは、それが事実上環境的及び遺伝的な変異性を消去していることに鑑みると、バイオマーカーの魅力的な供給源である。均質なG E Mモデルを利用する近年の試みは、候補バイオマーカーを生み出し、それらバイオマーカーは続いて、肺臓癌、結腸癌、乳癌、卵巣癌、肝細胞癌、前立腺癌及び肺癌に関し、ヒト組織における直交したバリデーションを受けることに成功してきた(F a c a V Mら、上記；Hung K Eら、2009年、Cancer Prev. Res. (Phila.)、2:224~233頁；Pitteri S Jら、2008年、J. Proteome Res. 7:1481~1489頁；Pitteri S Jら、2009年、P L o S One、4:e7916頁；R i t o r t o M Sら、2011年、J. Proteome Res. 10:3012~3030頁；C i m a I ら、2011年、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、108:3342~3347頁；及びTaguchi Aら、2011年、Cancer Cell. 20:289~299頁)。

【0155】

マウスにおいてG Cバイオマーカーを同定する努力は、概して、ヒトG C細胞株を注射されたヌード異種移植マウス(X M)をモデルとして使用して行われてきた。a p o A 1及びインター-アルファ-トリプシン阻害剤重鎖H 3(inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3: I T I H 3)を含む、こうして同定されたいくつかのタンパク質の発現レベルが、ヒト血漿において確認されてきた(Chong P Kら、2010年、J. Proteome Res. 9:3671~3679頁；及びJuan H Fら、2004年、Proteomics、4:2766~2775頁)。しかしながら、かかるモデルにおける対照群の適切な処置及びいかにしてG C特異的タンパク質変化が偏在する急性期反応から外挿され得るのかに関して疑問は残る。かかる懸念については、本明細書では、全身性炎症の非存在下で胃腫瘍を発症する、F F I L 6マウスを含む複数の突然変異

10

20

30

40

50

体遺伝子型を表すマウスを含めることで対処してきた。したがって、これらマウスは、胃腫瘍形成及びIL-6及びIL-11の両方により励起される全身性急性期反応と関連するプロテオミクス的变化を同定し、ベリファイするための遺伝的手段を提供する。加えて、本研究は、癌研究におけるGEMモデルの継続的使用のためのさらなる証拠を提供するのであり、マウスにおいて本明細書で同定されたすべてのタンパク質が、2つの異なるプラットフォーム（ウエスタンプロッティング及びELISA）を使用して、ヒト血清において倍変化の予測された方向でバリデートされた。

【0156】

2D-DIGEによるMARS枯渇GEM血清のプロテオミクス分析は、28個のヒトホモログに対応する、31個の差次的に発現するマウスタンパク質の同定をもたらした。
8つのタンパク質のサブセットが、ベリフィケーション及びバリデーション実験においてさらに調査された。一般に、8つのマウスタンパク質について2D-DIGEゲル上で観察された分子量及び等電点はそれぞれ、表3に示すように、アミノ酸配列に基づき予測された値よりもより大きく、より酸性であった。これは、これらのタンパク質が翻訳後修飾を受けた可能性を示した。マウスタンパク質のUniProtエントリーは、8つのうち7つが、グリコシル化することが知られている多くの部位で、潜在的なN-結合グリコシル化配列を含むことを明らかにした。マウスにおける唯一の例外はapoEであったが、ヒトapoEのUniProtエントリーは、それがN-結合及びO-結合グリカンにより修飾されることを示す。

【0157】

循環血清糖タンパク質は、癌バイオマーカーの有望な供給源である。タンパク質発現及び糖構造の両方における変化が、早期の癌の特徴として認識されてきたのであり、糖タンパク質が腫瘍浸潤及び転移において重要な役割を果たしている。実際に、現在の臨床マーカーであるCA72-4は糖タンパク質である。本明細書でのROC分析によりCA72-4について得られた感度及び特異度の値（36%の感度、77%の特異度）は、文献に記載されているものよりもわずかに低かった（40%の感度、>95%の特異度）。しかしながら、これは、本明細書におけるデータセットの小さなサイズ及び/又は用いられた特定のELISAを反映したものであり得る。にもかかわらず、同じ患者及び対照の検体を使用して、アファミン、IGFALS、VDBP、クラスタリン、及びハプトグロビンについて得られた結果は、CA72-4と比較して、GC患者の対照からのより正確な分離を示した。さらに、アファミン及びクラスタリンの個別の感度及び特異度は、日本で使用されている代表的なスクリーニング試験である、胃X線間接撮影法について報告されていた値よりも高かった。したがって、この実施例において同定されたバイオマーカーのうちの6つ（すなわち、アファミン、IGFALS、VDBP、クラスタリン、apoE及びハプトグロビン）は、GC患者及び健常人を区別する有効な手段を提供する。さらに、これらバイオマーカーの診断上の有用性を、多重分析アッセイにおけるそれらの組合せにより向上させてもよい。

【実施例2】

【0158】

追加胃癌患者におけるバリデーション

上の実施例1において言及された結果は、胃癌患者の第2コホートにおいてさらにバリデートされる（全25人）。この実験において、男性及び女性患者の両方から手術時に血液が収集され、その血清を-80で、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）で必要とされるまで貯蔵した。患者の癌は5の早期（T1）及び20の末期（T4）組織学的サブタイプの組合せを含んでいた。この実験のために全部で10の対照検体が含まれており、血液は健常なボランティアから経験豊かな瀉血専門医により収集された。対照血液からの血清もまた、ELISAで必要とされるまで-80で貯蔵された。実施例1と同様に、すべての実験が、ピーターマッカラム癌研究所及びアデレード大学の倫理委員会により承認された。

【0159】

10

20

30

40

50

アファミン、クラスタリン、ハプトグロビン、IGFALS 及び VDBP タンパク質のためのサンドイッチ E L I S A キットを、一貫性を保証するために単一の供給業者 (U s c n L i f e S c i e n c e I n c . 、ウーハン、中国) から入手し、製造業者の指示に従いアッセイを実施した。要約すると、収集した血清を解凍し、PBS で希釈し、標準を調製し、すべての検体を、特定の目的のタンパク質のための適切な抗体でコートされた 96 ウェルマイクロタイタープレートに二重に添加した。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) にコンジュゲートされたアビジンを、それぞれのウェルに添加してインキュベートした。この後、 T M B 基質を添加し、結果として、特定のタンパク質、バイオコンジュゲートされた抗体、及びアビジンにコンジュゲートされた酵素を含有するウェルのみが変色を示した。続いて、硫酸を添加して反応を停止させ、変色を分光光度的に 450 nm で測定した。次に、検体の光学密度を標準曲線と比較することにより、特定のタンパク質の濃度を判定した。標準の光学密度を、両対数グラフ上に、標準の既知の濃度に対して、 G r a p h p a d P r i s m 及びこれから内挿された未知の濃度を使用してプロットした。実施例 1 に記載したように、 5 つのタンパク質の濃度を、それぞれの試験検体の結果を対照群におけるタンパク質の平均濃度で割ることにより標準化 / 正規化した。したがって、対照群におけるすべてのタンパク質の平均濃度は 1 であった。これは、等価な尺度上でのマーカーの候補間比較を容易にした。

【 0 1 6 0 】

内挿された結果から、それぞれのタンパク質について個別のグラフを作成し (\pm S E) 、胃癌 (G C) 血清検体及び対照血清検体からの結果を比較した。結果を図 9 に示し、表 4 に要約する。続いて、図 10 に示すようにそれぞれのタンパク質について R O C 曲線を作成したのであり、タンパク質の組合せについての R O C 曲線を図 11 (二次的組合せ) 及び図 12 (三次的組合せ) に示す。

【 0 1 6 1 】

【表 4 】

表4

タンパク質	倍変化	有意性
アファミン	-1.4*	0.021
クラスタリン	-1.9***	<0.0001
IGFALS	+2.5	0.087
VDBP	+5.3***	<0.0001
ハプトグロビン	+1.3	0.373

【 0 1 6 2 】

この研究の目的は、アファミン、クラスタリン、ハプトグロビン、IGFALS 及び VDBP が (実施例 1 に示すように) 胃癌の検出のための一連のバイオマーカーを表すのに好適であることを確認するものであった。実施例 1 の E L I S A の結果に基づいて、 1 つの製造業者からの E L I S A キットを使用して患者の新しいコホートの分析を行い、タンパク質の分析をとおして一貫性を提供した。

【 0 1 6 3 】

5 つのタンパク質のそれぞれの差次的調節は、実施例 1 の結果と一貫しており、胃癌患者からの血清は、アファミン ($p = 0.021$) 、クラスタリン ($p < 0.0001$) 及び VDBP ($p < 0.0001$) のより低い濃度、並びにハプトグロビン ($p = 0.373$) 及び IGFALS ($p = 0.087$) のより高い濃度を、健常対照からの血清におけるこれらタンパク質の濃度と比較して有していた (図 9) 。

【 0 1 6 4 】

この研究の第 2 の目的はまた、これら 5 つのバイオマーカーを、早期 G C を同定するために使用できるかどうかを判定することだった。疾患の病理ゆえに、早期 (T 1) 胃癌患者からの血清を得ることは困難であったが、これら検体 ($n = 5$) は、末期 (T 4) 胃癌

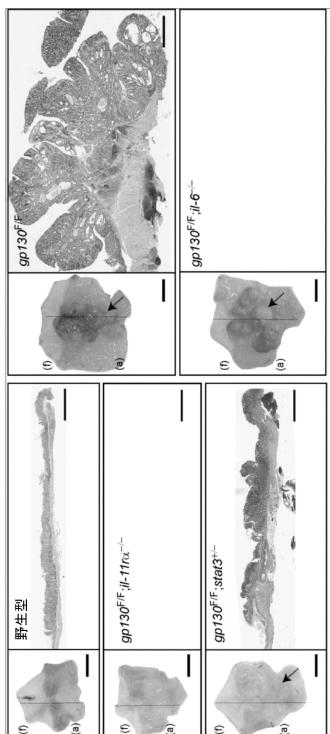
検体 ($n = 20$) からの分離を示さなかった。早期の腫瘍の検出が早期治療を可能にし、患者により良い結果をもたらすことを鑑みると、これは特に興味深い。

【0165】

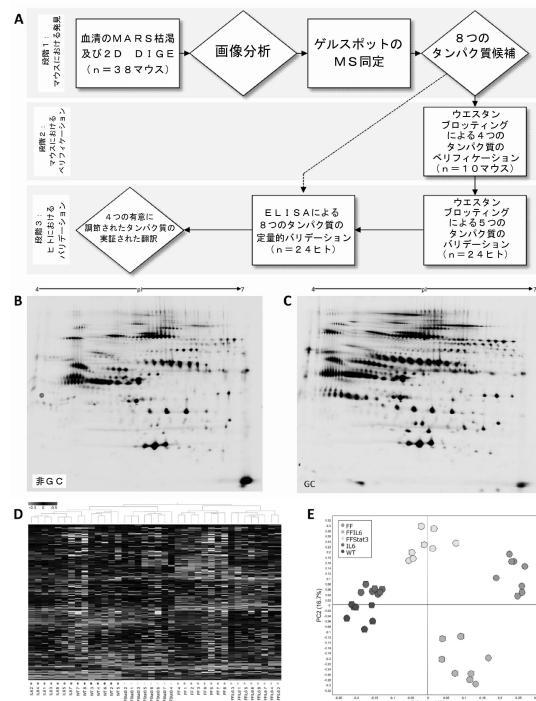
それぞれのタンパク質の感度及び特異度が有病正診測定値を無病誤診測定値と区別することを示す受信者動作条件 (Receiver Operating Condition: ROC) 曲線 (図10) は、V D B P、クラスタリン及びI G F A L S が個別に特に興味深いことを示す。図11は、ハプトグロビン及びV D B P、I G F A L S 及びV D B P、I G F A L S 及びアファミン、クラスタリン及びアファミン、並びにV D B P 及びアファミンについてのROC曲線の二次的組合せを示す。これらのペアリングは、展開される任意の診断について、この一連のタンパク質を使用して、有病正診率を増加させ、無病誤診率を減少させるその潜在性ゆえに特に注目される。図12のROC曲線に示される三次的組合せもまた、展開される任意の診断について、これらタンパク質の組合せが、有病正診率を増加させ、無病誤診率を減少させる能力を有する証拠を提供する。

10

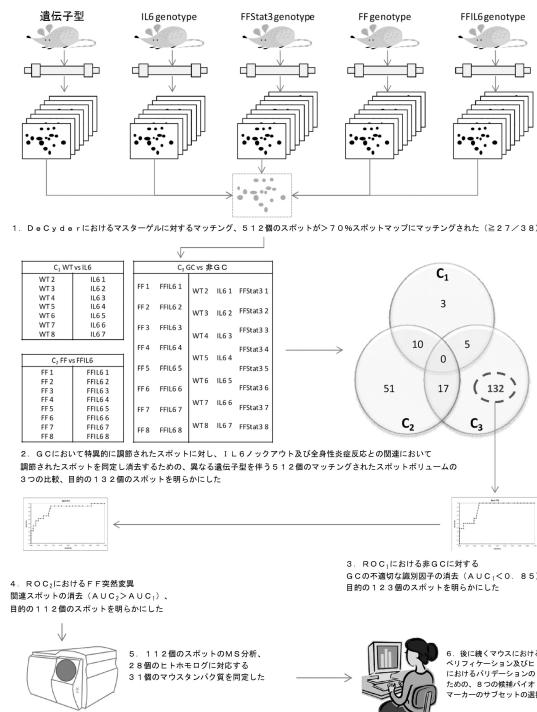
【図1】



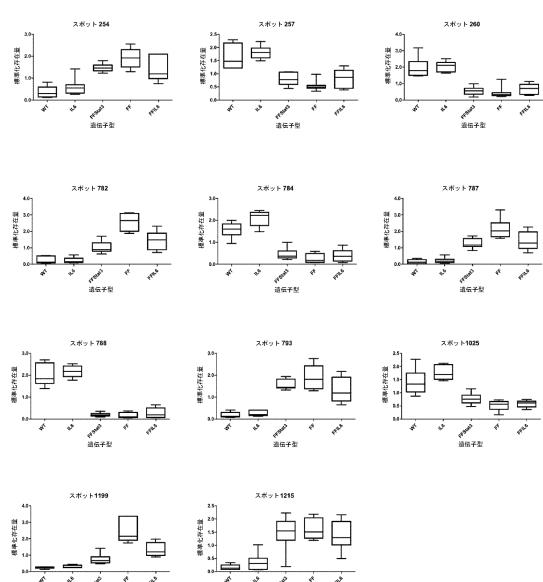
【図2】



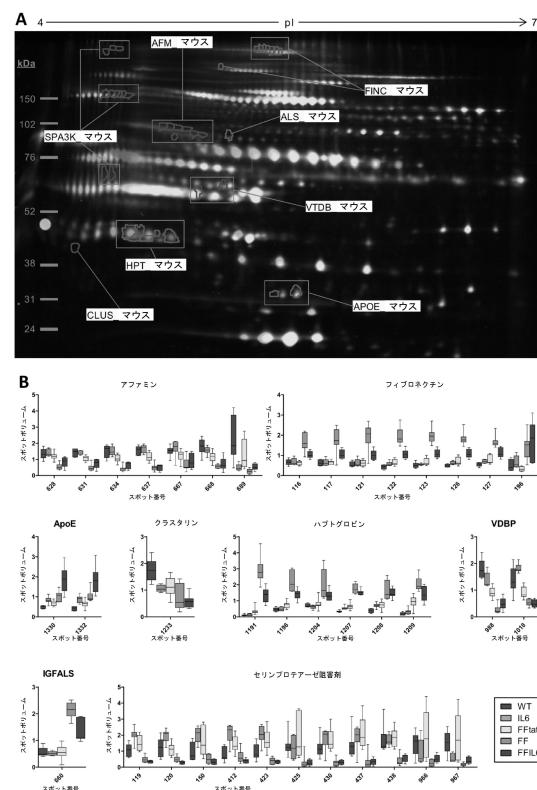
【図3】



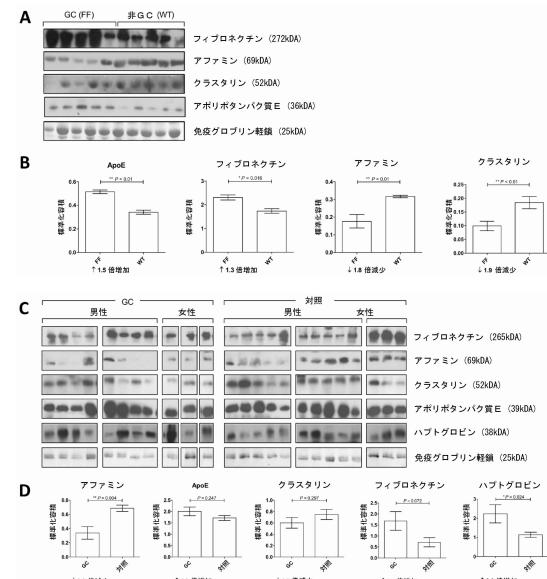
【図4】



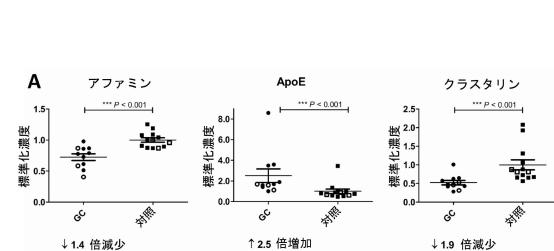
【図5】



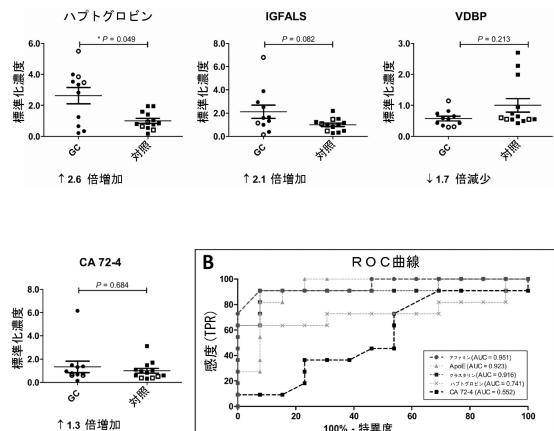
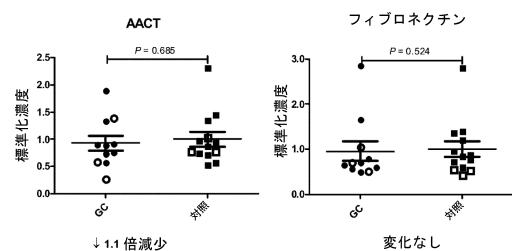
【図6】



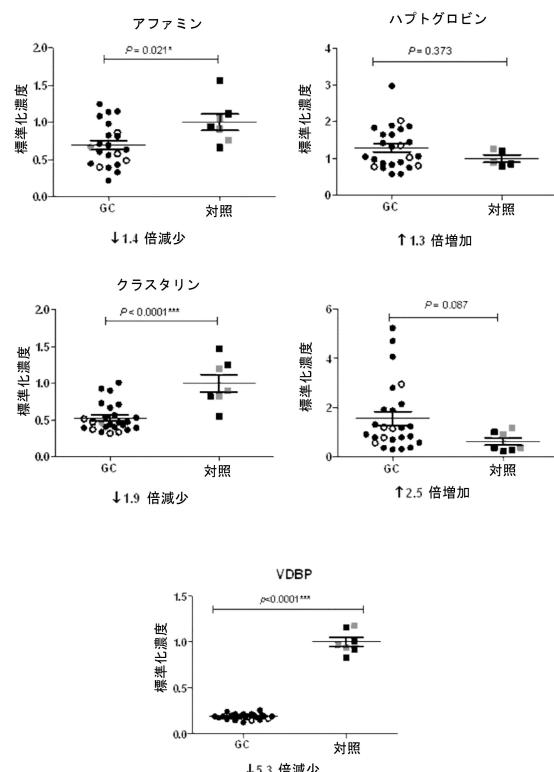
【図7】



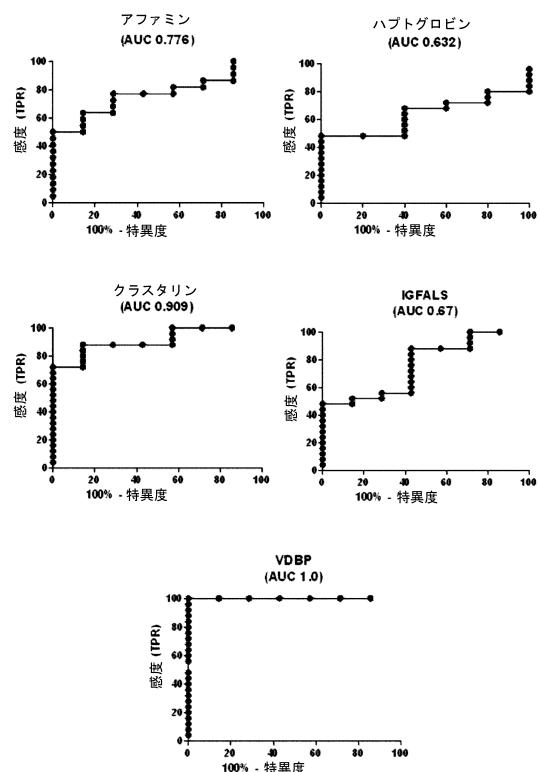
【図8】



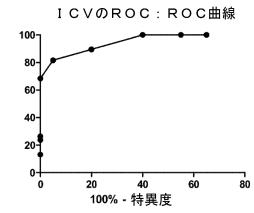
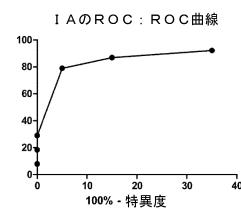
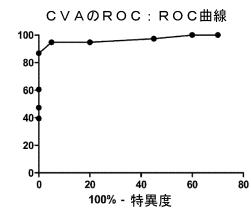
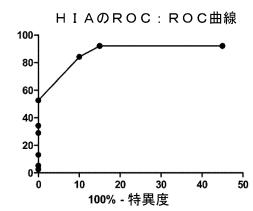
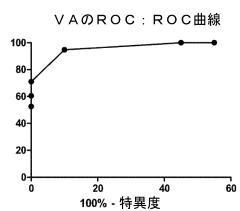
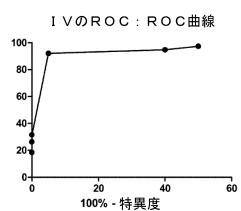
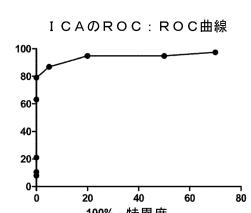
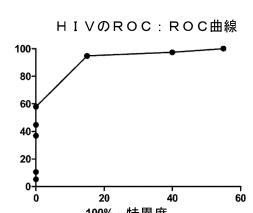
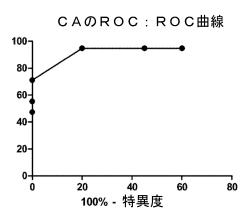
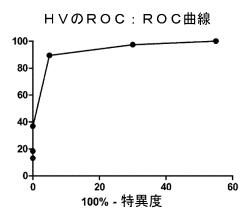
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 ピーター ホフマン
オーストラリア国 サウス オーストラリア 5016 ラーグス ノース ニコラ ロード 5
(72)発明者 メガン ペンノ
オーストラリア国 サウス オーストラリア 5031 マイル エンド デアピン ストリート
52
(72)発明者 マティアス ロバート ウォルター アーンスト
オーストラリア国 ピクトリア 3055 ブランズウィック イースト ウィットビー ストリート 36

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2008-263840 (JP, A)
国際公開第2007/100183 (WO, A1)
国際公開第2011/097960 (WO, A1)
米国特許出願公開第2009/0018026 (US, A1)
AHN HS, Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric adenocarcinoma, Br J Cancer, 2012年 2月14日, Vol.106 No.4, Page.733-739, published online 12 January 2012
BONES Jonathan, Glycomic and Glycoproteomic Analysis of Serum from Patients with Stomach Cancer Reveals Potential Markers Arising from Host Defense Response Mechanisms, J Proteome Res, 2011年 3月, Vol.10 No.3, Page.1246-1265
WINTERS Stephen J, Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women, Metabolism, 2009年, Vol.58 No.4, Page.438-442
M. Li, Over-Expression of Ephb4 Is Associated with Carcinogenesis of Gastric Cancer, Dig Dis Sci, 2011年, Vol.56, Page.698-706
Poh Kuan Chong, ITIH3 Is a Potential Biomarker for Early Detection of Gastric Cancer, J Proteome Res, 2010年 7月, Vol.9 No.7, Page.3671-3679
Ken-ichi Teramoto, Prediction of Lymphatic Invasion/Lymph Node Metastasis, Recurrence, and Survival in Patients with Gastric Cancer by cDNA Array-Based Expression Profiling, Journal of Surgical Research, 2005年, Vol.124, Page.225-236
J. BI, Overexpression of clusterin correlates with tumor progression, metastasis in g astric cancer: a study on tissue microarrays, Neoplasia, 2010年, Vol.57 No.3, Page .191-197
津金昌一郎, 多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究, 国立がん研究センターがん研究開発費総括研究報告書, 2011年, Vol.2010 N o.68, Page.1-6
KIM Dae-Yong, Vitamin D3 up-regulated protein 1 in Gastric Cancer Development, 日本癌学会学術総会記事, 2009年, Vol.68th, Page.236
Megan A. S., 2D-DIGE analysis of sera from transgenic mouse models reveals novel candidate protein biomarkers for human gastric cancer, Journal of Proteomics, 2012年, Vol.1.77, Page.40-58

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33 / 68
C 12 Q 1 / 68
G 01 N 33 / 15
G 01 N 33 / 50

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)