

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6677655号  
(P6677655)

(45) 発行日 令和2年4月8日(2020.4.8)

(24) 登録日 令和2年3月17日(2020.3.17)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 Z N A B

請求項の数 8 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2016-572021 (P2016-572021)	(73) 特許権者	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(86) (22) 出願日	平成28年1月25日(2016.1.25)	(73) 特許権者	510097747 国立研究開発法人国立がん研究センター 東京都中央区築地五丁目1番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/052023	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02016/121695	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開日	平成28年8月4日(2016.8.4)	(74) 代理人	100180954 弁理士 漆山 誠一
審査請求日	平成31年1月23日(2019.1.23)	(72) 発明者	真田 光彰 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2015-12667 (P2015-12667)		
(32) 優先日	平成27年1月26日(2015.1.26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】胆道癌の検出方法及び胆道癌検出用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体の体液試料中におけるAPOA2タンパク質のパリアントの量を測定して胆道癌を検出する方法であって、

(A) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるAPOA2-ATQタンパク質のC末端領域と特異的に結合する抗APOA2-ATQ末端抗体と、該C末端領域以外のアミノ酸配列と結合する抗APOA2-ATQ非末端抗体とを用いて、試料中のAPOA2-ATQタンパク質の量を測定する第1の工程、

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるAPOA2-ATタンパク質のC末端領域と特異的に結合する抗APOA2-AT末端抗体と、該C末端領域以外のアミノ酸配列と結合する抗APOA2-AT非末端抗体とを用いて、試料中のAPOA2-ATタンパク質の量を測定する第2の工程、

(C) 第1の工程で得たAPOA2-ATQタンパク質の量と第2の工程で得たAPOA2-ATタンパク質の量とを予め設定した判別式に入力して得た被験体の判別値が、健常体の判別値と比較して統計学的に有意に差があるときに被験体が胆道癌に罹患していると決定する第3の工程を含む胆道癌の検出方法。

【請求項2】

APOA2-ATQタンパク質及びAPOA2-ATタンパク質の前記C末端領域が、それぞれC末端を含む6以上の連続したアミノ酸を含む配列からなる、請求項1に記載の検出方法。

## 【請求項 3】

前記判別式が、ロジスティック回帰式、サポートベクターマシンの解析で作成された式、ニューラルネットワークの解析で作成された式、及び判別分析の解析で作成された式からなる群から選択されるいずれか 1 つである、請求項 1 又は 2 に記載の検出方法。

## 【請求項 4】

前記ロジスティック回帰式で作成された判別式が

数式 1 :  $a (A P O A 2 - A T Q) + b (A P O A 2 - A T) + d$

数式 2 :  $a (A P O A 2 - A T Q) + b (A P O A 2 - A T) + c [(A P O A 2 - A T Q) \times (A P O A 2 - A T)] + d$

数式 3 :  $c [(A P O A 2 - A T Q) \times (A P O A 2 - A T)] + d$

10

のいずれかである請求項 3 に記載の検出方法。

(式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$  はゼロでない任意の実数、 $A P O A 2 - A T Q$  は、 $A P O A 2 - A T Q$  タンパク質の前記測定値、 $A P O A 2 - A T$  は、 $A P O A 2 - A T$  タンパク質の前記測定値を表す。)

## 【請求項 5】

前記判別式から得た被験体の判別値が、健常体の判別値の 3 分の 2 以下である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記体液試料が、血液である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の検出方法。

## 【請求項 7】

20

前記胆道癌が早期胆道癌である請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の検出方法。

## 【請求項 8】

重鎖の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、それぞれ配列番号 4、5 及び 6、又は 10、11 及び 12、で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、軽鎖の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、それぞれ配列番号 7、8 及び 9、又は 13、14 及び 15、で示されるアミノ酸配列からなる抗 A P O A 2 - A T Q 末端モノクローナル抗体又はその断片と、重鎖の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、それぞれ配列番号 16、17 及び 18、又は 22、23 及び 24、で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、軽鎖の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、それぞれ配列番号 19、20 及び 21、又は 25、26 及び 27、で示されるアミノ酸配列からなる抗 A P O A 2 タンパク質非末端モノクローナル抗体又はその断片の中から、1 種類以上のモノクローナル抗体又はその断片を含む、胆道癌の検出用キット。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、A P O A 2 タンパク質に特異的に結合する抗体（抗 A P O A 2 抗体）を用いて被験体試料中の A P O A 2 タンパク質のバリエーションの量を測定することを含む胆道癌を検出する方法及び抗 A P O A 2 抗体を含む胆道癌検出用キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

40

2012 年の統計によると、日本における主要な死亡原因の第 1 位は癌である。癌は、正常な組織から発生し、癌細胞の異常増殖に起因する腫瘍塊の形成、腫瘍塊形成癌細胞による隣接組織への浸潤、及び血管やリンパ管を介しての多種臓器への遠隔転移を特徴とする。このような癌の発症と進展の際には、血液や尿等の患者の体液中で様々なタンパク質の濃度が変動することが知られている。そのようなタンパク質は腫瘍マーカー（癌検出用マーカー）と呼ばれ、癌の早期発見や治療後の経過観察等の各種診断用途への応用が期待されている（例えば、特許文献 1 ~ 3）。しかし、臨床診断に用いられている従来の腫瘍マーカーの多くは陽性率が低く、特に早期癌においては、ほとんどの腫瘍マーカーが偽陰性を示すという問題があった。また、腫瘍マーカーの中には、「C A 19 - 9」（C a r b o h y d r a t e A n t i g e n 19 - 9）のように、診断対象がシアリル L e w

50

i s A 抗原陽性の患者のような特定の患者に限られるという問題もあった（非特許文献 1）。

【 0 0 0 3 】

隣接組織への浸潤や遠隔転移を特徴とする進行癌や末期癌では予後が不良となることから、癌の効果的な治療には早期発見が重要である。それ故に早期癌の検出が可能で、感度に優れ、かつ診断対象の患者を限定しない腫瘍マーカーの発見が期待されている。

【 0 0 0 4 】

胆道癌は、胆道において形成される全ての腫瘍を指す。胆道癌は、数ある癌の中でも難治性癌の一種として知られており、外科的手術以外の有効な治療法は確立されていないため、早期発見や未然にその発症を防ぐ事が特に重要となる。胆道癌の診断方法としては、血液生化学検査、CT、磁気共鳴装置（MRI）、内視鏡的超音波検査法（EUS）等が用いられている（非特許文献 1）。しかしながら、胆道癌は、早期の段階において症状に乏しく、多くの場合、既に進行癌となってから発見されるため、一般的に治療は困難である。したがって、胆道癌を的確かつ簡易に発見することが可能な新たな診断技術の開発が望まれている。

【 0 0 0 5 】

APOA2（Apolipoprotein A2、又はApolipoprotein A-II）タンパク質（GenBankアクセッションNo. NP\_001634.1）は、血漿リポタンパク質を構成するアポリポタンパク質ファミリーの一種である。アポリポタンパク質は、これまでに10種以上が知られており、それらの主な機能は、リポタンパク質の構造の安定化、リポタンパク質代謝に関与する酵素の活性化、細胞表面に存在するリポタンパク質受容体に対するリガンドとしての作用等である。APOA2タンパク質は、肝臓組織において、シグナルペプチドを含む100アミノ酸からなる前駆体として合成される。血液中に存在するプロセッシングをされた成熟型は、77アミノ酸からなる。成熟型APOA2タンパク質は、そのアミノ末端（N末端）にグルタミン残基（Q）、N末端から76番目にスレオニン残基（T）、77番目のカルボキシル末端（C末端）にグルタミン残基（Q）を有している、高比重リポタンパク質（HDL）を構成するアポリポタンパク質の一つである。また、APOA2タンパク質には、完全長APOA2タンパク質であるAPOA2-ATQタンパク質、C末端のグルタミン残基（Q）を欠失したAPOA2タンパク質であるAPOA2-ATタンパク質、C末端のスレオニン及びグルタミン残基（TQ）を欠失したAPOA2タンパク質であるAPOA2-Aタンパク質等の質量の異なる3種のバリエーションが存在することが報告されている（非特許文献 2）。

【 0 0 0 6 】

タンパク質構造データベース（PDB；Protein Data Bank；http://www.rcsb.org/pdb/home.do）に登録されているAPOA2タンパク質の立体構造データ（PDB ID：1L6L）に基づく解析によれば、APOA2タンパク質は、N末端側に存在するシステイン残基を介したジスルフィド結合（SS結合）により二量体を形成するとされている。したがって、APOA2タンパク質は、血液中で、前記3種のバリエーションの組み合わせから生じる様々な分子量の二量体として存在することが分かっている。具体的には、完全長のAPOA2-ATQタンパク質からなる二量体（APOA2-ATQ/ATQタンパク質二量体）、APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の二量体（APOA2-ATQ/ATタンパク質二量体）、APOA2-ATタンパク質からなる二量体（APOA2-AT/ATタンパク質二量体）、APOA2-ATタンパク質とAPOA2-Aタンパク質の二量体（APOA2-AT/Aタンパク質二量体）、APOA2-Aタンパク質からなる二量体（APOA2-A/Aタンパク質二量体）等が知られている。また、この他にも、APOA2タンパク質は、ジスルフィド結合によりAPODタンパク質、APOETタンパク質、APOA1-Mタンパク質といった他のタンパク質と二量体を形成することや、単量体として存在することが知られている（非特許文献 3、4）。

【 0 0 0 7 】

APOA2を癌検出マーカーとして、質量分析法により胆道癌を検出する試みがあるが、他の癌検出マーカーであるAPOCIIIと組み合わせた検出方法においても、胆道癌と健常者の判別性能は低く、感度は57%（特異度97%）にとどまることが明らかとなっている（非特許文献5）。したがって、当該分野では単にAPOA2タンパク質二量体のみを胆道癌マーカーとして用いたとしても、胆道癌の検出精度はさらに低下し、健常者と胆道癌患者の判別がより困難になると予想されていた。また、前記感度を得るためには、質量分析器による測定を含む、3つの煩雑な工程が必要となる。例えば、最初の工程では、9M尿素、及び2%CHAPS等を用いて質量分析で用いる血液試料を前処理しなければならない。しかし、尿素は分解しやすく長期間の保存には向かないことから、前処理条件を揃えるために測定毎に尿素を含む溶液を調製する必要がある。また、次の工程では、前処理した試料をプロテインチップ（サイファージェンバイオシステム社製）の表面に捕捉させなければならない。この捕捉工程では、プロテインチップ表面の荷電状態や疎水性等の特性を利用した吸着を行うため、洗浄条件や試薬の調製条件が、捕捉効率に大きな影響を与えることが知られている。最後の工程では、質量分析器による捕捉試料の測定を行うが、質量分析器は、レーザー強度の調整等の操作に熟練性が求められ、また検体を取り扱う上でのスループットが低い。さらに、試料中に多くの異なるタンパク質が含まれる場合、各タンパク質から得られるシグナルどうしが干渉し合うため、シグナルの帰属が困難となる。加えて、定量性にも課題が残るため、高精度な測定を必要とする診断用途には不向きである。それゆえに、実用化への障壁が高いという問題があった。

10

【0008】

20

ELISA法は、質量分析法と比較して、多数の試料を評価する上でスループットが高く、安価で実用的な方法として知られている。また、ELISA法は、汎用的手法であるために操作に熟練を必要とせず、その上、2種の抗体を用いるため特異性が極めて高く、標準物質を用いた再現性の良い定量が可能である。そのため、試料中に様々な分子量で存在するAPOA2タンパク質のバリエーションの網羅的かつ定量性の高い解析が可能となる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2001-289861号公報

【特許文献2】特開2002-323499号公報

【特許文献3】特開2009-034071号公報

30

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン 第1版、2013年、日本肝胆膵外科学会、日本癌治療学会、医学図書出版株式会社

【非特許文献2】Pankhurst G.ら、2003年、J. Lipid Res., 第44巻、p. 349 - 355

【非特許文献3】Blanco-Vaca F.ら、2001年、J. Lipid Res., 第42巻、p. 1727 - 1739

【非特許文献4】Rocco AG.ら、2006年、Biophys. J., 第91巻、p. 3043 - 3049

40

【非特許文献5】Honda K.ら、2012年、PLoS One, 第7巻、p. e46908

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

一般的に、腫瘍の検出には腫瘍マーカーが用いられるが、胆道癌は、腫瘍マーカーによる検出が困難であり、腫瘍マーカーを用いた胆道癌の早期検出は非常に難しいという問題があった。

【0012】

50

本発明の課題は、胆道癌マーカー A P O A 2 タンパク質のバリエーションを利用して、胆道癌の高い検出性能を有し、かつ非特許文献 5 に記載の検出方法よりも簡便で、スループットが高い胆道癌の検出方法、及び胆道癌検出用キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

上記の課題を解決するために、本発明者らは、A P O A 2 - A T Q タンパク質及び A P O A 2 - A T タンパク質のそれぞれの C 末端領域と特異的に結合する抗 A P O A 2 タンパク質末端抗体と、A P O A 2 タンパク質の C 末端領域以外と特異的に結合する抗体（抗 A P O A 2 タンパク質非末端抗体）とを組み合わせたサンドイッチ E L I S A 法を適用することにより、A P O A 2 - A T Q タンパク質の総量と、A P O A 2 - A T タンパク質の総量を別々に測定する方法を確立した。さらに、それぞれのタンパク質の総量を測定し、その結果を組み合わせる解析法を用いることで、胆道癌患者と健常体を高精度で判別する方法を開発した。この技術に基づいて、胆道癌を極めて高感度に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

【 0 0 1 4 】

本発明は、以下の発明を包含する。

( 1 ) 被験体の体液試料中における A P O A 2 タンパク質のバリエーションの量を測定して胆道癌を検出する方法であって、( A ) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる A P O A 2 - A T Q タンパク質の C 末端領域と特異的に結合する抗 A P O A 2 - A T Q 末端抗体と、該 C 末端領域以外のアミノ酸配列と結合する抗 A P O A 2 - A T Q 非末端抗体とを用いて、試料中の A P O A 2 - A T Q タンパク質の量を測定する第 1 の工程、( B ) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなる A P O A 2 - A T タンパク質の C 末端領域と特異的に結合する抗 A P O A 2 - A T 末端抗体と、該 C 末端領域以外のアミノ酸配列と結合する抗 A P O A 2 - A T 非末端抗体とを用いて、試料中の A P O A 2 - A T タンパク質の量を測定する第 2 の工程、( C ) 第 1 の工程で得た A P O A 2 - A T Q タンパク質の量の測定値と第 2 の工程で得た A P O A 2 - A T タンパク質の量の測定値とを予め設定した判別式に入力して得た被験体の判別値が、健常体の判別値と比較して統計学的に有意に差があるときに被験体が胆道癌に罹患していると決定する第 3 の工程、を含む胆道癌の検出方法。

20

( 2 ) A P O A 2 - A T Q タンパク質及び A P O A 2 - A T タンパク質の前記 C 末端領域が、それぞれ C 末端を含む 6 以上の連続したアミノ酸を含む配列からなる、( 1 ) に記載の検出方法。

30

( 3 ) 前記判別式が、ロジスティック回帰式、サポートベクターマシンの解析で作成された式、ニューラルネットワークの解析で作成された式、及び判別分析の解析で作成された式からなる群から選択されるいずれか 1 つである、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の検出方法。

( 4 ) 前記ロジスティック回帰式で作成された判別式が

$$\text{数式 1 : } a ( A P O A 2 - A T Q ) + b ( A P O A 2 - A T ) + d$$

$$\text{数式 2 : } a ( A P O A 2 - A T Q ) + b ( A P O A 2 - A T ) + c [ ( A P O A 2 - A T Q ) \times ( A P O A 2 - A T ) ] + d$$

$$\text{数式 3 : } c [ ( A P O A 2 - A T Q ) \times ( A P O A 2 - A T ) ] + d$$

40

のいずれかである ( 3 ) に記載の検出方法。

( 式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$  はゼロでない任意の実数、A P O A 2 - A T Q は、A P O A 2 - A T Q タンパク質の量の前記測定値、A P O A 2 - A T は、A P O A 2 - A T タンパク質の量の前記測定値を表す。)

( 5 ) 前記判別式から得た被験体の判別値が、健常体の判別値の 3 分の 2 以下である、( 4 ) に記載の方法。

( 6 ) 前記体液試料が、血液である、( 1 ) ~ ( 5 ) のいずれかに記載の検出方法。

( 7 ) 前記胆道癌が早期胆道癌である ( 1 ) ~ ( 6 ) のいずれかに記載の検出方法。

( 8 ) 重鎖の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、それぞれ配列番号 4、5 及び 6、又は 10、11 及び 12、で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、軽鎖の C D R 1、C D R

50

2及びCDR3が、それぞれ配列番号7、8及び9、又は13、14及び15、で示されるアミノ酸配列からなる抗APOA2-ATQ末端モノクローナル抗体又はその断片と、重鎖のCDR1、CDR2及びCDR3が、それぞれ配列番号16、17及び18、又は22、23及び24、で示されるアミノ酸配列からなり、かつ、軽鎖のCDR1、CDR2及びCDR3が、それぞれ配列番号19、20及び21、又は25、26及び27、で示されるアミノ酸配列からなる抗APOA2タンパク質非末端モノクローナル抗体又はその断片の中から、1種類以上のモノクローナル抗体又はその断片を含む、胆道癌の検出用キット。

【0015】

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-012667号の開示内容を包含する。

10

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、患者から採取された血中の胆道癌マーカーAPOA2タンパク質のバリエーションを測定することで、胆道癌の簡便かつハイスループットで高感度な検出が可能となる。例えば、任意の患者から採取された血液等の体液試料中に含まれる特定のAPOA2タンパク質のバリエーションの量を測定するだけで、その患者が胆道癌に罹患しているか否かを決定し、又は罹患の可能性を評価することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

20

【図1】この図は、APOA2-ATQタンパク質のC末端領域のアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体（抗APOA2-ATQ末端モノクローナル抗体）とC末端領域以外のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体（抗APOA2-ATQ非末端抗体）を用いたサンドイッチELISA法により、胆道癌患者44名と健常者109名の血漿中に含まれるAPOA2-ATQタンパク質の濃度を測定したものである。

【図2】この図は、APOA2-ATタンパク質のC末端領域のアミノ酸配列を特異的に認識するポリクローナル抗体（抗APOA2-AT末端ポリクローナル抗体）とC末端領域以外のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体（抗APOA2-AT非末端抗体）を用いたサンドイッチELISA法により、胆道癌患者44名と健常者109名の血漿中に含まれるAPOA2-ATタンパク質の濃度を測定したものである。

30

【図3】この図は、胆道癌患者44名と健常者109名の血漿中に含まれる2種のAPOA2タンパク質のバリエーション（APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質）の濃度を散布図として示したものである。

【図4】この図は、胆道癌患者44名と健常者109名の血漿中に含まれる2種のAPOA2タンパク質のバリエーション（APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質）の濃度の積をプロットしたものである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の測定対象は胆道癌である。本明細書において「胆道癌」とは、胆汁を通し、また貯蔵する胆道において形成される全ての悪性腫瘍を指し、肝外胆管癌、肝内胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌に分類される（「エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン」、第1版、2013年、日本肝胆膵外科学会、日本癌治療学会、医学図書出版株式会社、p62）。対象とする胆道癌の進行度は問わない。早期癌、進行癌、及び末期癌のいずれも包含する。

40

【0019】

本明細書において「早期癌」とは、腫瘍が発生した局所に限局していて粘膜や筋層にとどまっているもの、又は筋層を超えるが壁内にとどまっているもの、若しくは筋層までにとどまるが近傍のリンパ節に転移があるものである。具体的には、UICC（Union Internationalis Contra Cancrum）のステージ分類において、0、IA、IB、IIA、IIBであるものを指す（「TNM悪性腫瘍の分類」、

50

第7版 日本語版、2012年、UICC日本委員会 TNM委員会、金原出版)。前述のように胆道癌は、極めて予後が悪い難治性癌であるが、胆道癌の早期発見が可能になると5年生存率を著しく向上させることができる。

【0020】

1. 抗APOA2抗体及びその断片

本発明の第一の態様は、抗APOA2抗体(抗APOA2タンパク質末端抗体及び抗APOA2タンパク質非末端抗体を含む)、及びその断片である。

【0021】

1-1. 抗APOA2抗体

本明細書において「APOA2タンパク質」とは、各生物種のAPOA2タンパク質が該当するが、好ましくはヒト由来のAPOA2タンパク質(GenBankアクセッションNo. NP\_001634.1)である。具体的には、配列番号1、2又は3に示されるヒト由来の野生型APOA2タンパク質のバリエーションが含まれ、さらに、それらの天然変異体、及びそれらの断片も含む。

10

【0022】

本明細書において前記「バリエーション」とは、ヒト又は動物の血漿、血清、又は他の体液中に存在し得る、APOA2タンパク質の異なる分子形態を意味する。例えば、APOA2タンパク質においてC末端領域の構造が異なるAPOA2タンパク質又はそれらの天然変異体が該当する。具体的には、例えば、配列番号1で示され、C末端領域のアミノ酸配列がATQで終わるAPOA2-ATQタンパク質、配列番号2で示され、C末端領域のアミノ酸配列がATで終わるAPOA2-ATタンパク質、又は配列番号3で示され、C末端領域のアミノ酸配列がAで終わるAPOA2-Aタンパク質がAPOA2タンパク質のバリエーションに該当する。

20

【0023】

本明細書において「C末端領域(カルボキシル末端領域)」とは、アミノ酸配列においてC末端のアミノ酸及びその周辺の連続する数アミノ酸を含む、6~25アミノ酸、好ましくは8~20アミノ酸又は10~17アミノ酸からなる領域をいう。

【0024】

本明細書において「天然変異体」とは、自然界に存在する変異体であって、例えば、前記配列番号1、2又は3に示されるアミノ酸配列において1個若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたもの、前記アミノ酸配列と90%以上、92%以上又は94%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、一層好ましくは98%以上又は99%以上のアミノ酸同一性を有するものをいう。「アミノ酸同一性」とは、二つのアミノ酸配列を最大的一致度となるようにギャップを導入して、又は導入しないで整列(アラインメント)させたときに、一方のアミノ酸配列の全アミノ酸残基数(ギャップ数も含む)に対する他方のアミノ酸配列の同一アミノ酸残基数の割合(%)をいう。「複数個」とは、2~10の整数、例えば、2~7、2~5、2~4、2~3の整数をいう。天然変異体の具体例としては、SNPs(一塩基多型)等の多型に基づく変異体やスプライス変異体(スプライスバリエーション)等が挙げられる。また、前記置換は、保存的アミノ酸置換であることが好ましい。保存的アミノ酸置換であれば、前記アミノ酸配列を有するAPOA2タンパク質と実質的に同等な構造又は性質を有し得るからである。保存的アミノ酸とは、同じアミノ酸群に分類されたアミノ酸どうしの関係をいう。前記アミノ酸群には、非極性アミノ酸群(グリシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、トリプトファン)、極性アミノ酸群(非極性アミノ酸以外のアミノ酸)、荷電アミノ酸群(酸性アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)及び塩基性アミノ酸群(アルギニン、ヒスチジン、リジン)、非荷電アミノ酸群(荷電アミノ酸以外のアミノ酸)、芳香族アミノ酸群(フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン)、分岐鎖アミノ酸群(ロイシン、イソロイシン、バリン)、ならびに脂肪族アミノ酸群(グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン)等が知られている。

30

40

【0025】

50

前記「それらの断片」とは、APOA2タンパク質の各種バリエーション、及びそれらの天然変異体のC末端領域を含むAPOA2タンパク質のバリエーション及びその変異体の断片をいう。具体的には、APOA2タンパク質の各種バリエーション及びその変異体のプロテアーゼ消化物等がこれに該当する。

【0026】

本発明は、抗APOA2-ATQ末端抗体及び抗APOA2-AT末端抗体を含む、抗APOA2タンパク質末端抗体を提供する。

【0027】

「抗APOA2-ATQ末端抗体」は、APOA2-ATQタンパク質のC末端領域に存在するエピトープを特異的に認識し、かつ結合することができる抗体、又はその断片をいう。「特異的に認識し、かつ結合する」とは、他のAPOA2タンパク質のバリエーションとの交差反応性が無いか又は極めて弱いことをいう。そのため、他のAPOA2タンパク質のバリエーションに対して認識も結合もできないか、又はほとんど結合しない。具体的には、APOA2-ATQタンパク質のC末端領域に特異的には結合するが、APOA2-ATタンパク質のC末端領域及びAPOA2-Aタンパク質等のC末端領域には結合を示さない抗体をいう。このような末端抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、又はその断片のいずれであってもよい。大量生産を可能にするため、及び均質の効果を得るためには、モノクローナル抗体が好ましい。

10

【0028】

一方、「抗APOA2-AT末端抗体」は、APOA2-Aタンパク質のC末端領域に存在するエピトープを特異的に認識し、かつ結合することができる抗体、又はその断片をいう。具体的には、APOA2-Aタンパク質のC末端領域に特異的に結合するが、APOA2-ATQタンパク質のC末端領域、及びAPOA2-Aタンパク質等のC末端領域には結合を示さない抗体をいう。このような末端抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体又はその断片のいずれであってもよい。大量生産を可能にするため、及び均質の効果を得るためには、モノクローナル抗体が好ましい。

20

【0029】

本発明は、さらに、APOA2タンパク質のC末端領域以外のアミノ酸配列を認識する、「抗APOA2タンパク質非末端抗体」を提供する。

【0030】

「抗APOA2タンパク質非末端抗体」とは、APOA2タンパク質のバリエーションにおける全長アミノ酸配列において、前記C末端領域以外の領域に存在するエピトープを認識し、結合する抗APOA2抗体をいう。つまり、抗APOA2タンパク質非末端抗体と抗APOA2タンパク質末端抗体は、それぞれが認識するエピトープが完全に異なる。抗APOA2タンパク質非末端抗体は、「非末端」抗体と称するが、これは抗APOA2タンパク質末端抗体に対する便宜的な名称である。したがって、C末端領域以外に存在するエピトープであれば特に限定はなく、N末端に存在するエピトープを認識し、結合する抗体も含まれ得る。

30

【0031】

本発明で用いる抗APOA2タンパク質非末端抗体は、ある特定のC末端配列を持つAPOA2タンパク質に対する結合活性と、それとは異なるC末端配列を持つAPOA2タンパク質に対する結合活性がほぼ同等であり、かつ、前記抗APOA2タンパク質末端抗体のC末端領域への結合を阻害しないものが好ましい。具体的には、例えば、配列番号1で示されるAPOA2-ATQタンパク質のC末端領域以外のアミノ酸配列と結合する「抗APOA2-ATQ非末端抗体」と、配列番号2で示されるAPOA2-ATタンパク質のC末端領域以外のアミノ酸配列と結合する「抗APOA2-AT非末端抗体」がAPOA2タンパク質に対して同等の結合活性を有し、またいずれの抗体も抗APOA2-ATQ末端抗体や抗APOA2-AT末端抗体がAPOA2タンパク質のC末端領域に結合することを阻害しないものが挙げられる。抗APOA2タンパク質非末端抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体又はその断片のいずれであってもよい。大量生産を

40

50

可能にするため、及び均質な効果を得るためには、モノクローナル抗体が好ましい。

【0032】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」とは、単一の免疫グロブリンからなる抗体、又はそのフレームワーク領域（Frame work region：以下、「FR」とする）及び相補性決定領域（Complementarity determining region：以下、「CDR」とする）を含み、特定の抗原（エピトープ）を特異的に認識し、かつ結合することのできる抗体をいう。

【0033】

典型的な免疫グロブリン分子は、重鎖及び軽鎖と呼ばれる2本のポリペプチド鎖一組がジスルフィド結合によって2組相互接続された四量体として構成される。重鎖は、N末端側の重鎖可変領域（H鎖V領域：以下、「VH」とする）とC末端側の重鎖定常領域（H鎖C領域：以下、「CH」とする）からなり、軽鎖は、N末端側の軽鎖可変領域（L鎖V領域：以下、「VL」とする）とC末端側の軽鎖定常領域（L鎖C領域：以下、「CL」とする）からなる。このうち、VH及びVLは、抗体の結合特異性に関与する点で特に重要である。このVH及びVLは、いずれも約110個のアミノ酸残基からなり、その内部に抗原との結合特異性に直接関与する3つのCDR（CDR1、CDR2、CDR3）と、可変領域の骨格構造として機能する4つのFR（FR1、FR2、FR3、FR4）を有している。CDRは、抗原分子と相補的な立体構造を形成し、抗体の特異性を決定することで知られている（E. A. Kabat et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Vol. 1, eds. 5, NIH publication）。定常領域のアミノ酸配列が種内抗体間ではほとんど一定なのに対して、CDRのアミノ酸配列は各抗体間において変異性が高く、それ故、超可変領域（Hyper variable region）とも呼ばれている。可変領域において、前記CDRとFRは、N末端からC末端方向にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配列されている。免疫グロブリン分子内においてVL及びVHは、相対して二量体を形成することによって抗原結合部位を形成している。免疫グロブリンには、IgG、IgM、IgA、IgE、及びIgDの各クラスが知られているが、本発明の抗体は、いずれのクラスであってもよい。好ましくはIgGである。

【0034】

本発明の抗APOA2-ATQ末端モノクローナル抗体は、配列番号1で示されるAPOA2-ATQタンパク質のC末端領域には特異的に結合するが、配列番号2で示されるAPOA2-ATタンパク質、及び配列番号3で示されるAPOA2-Aタンパク質には結合性を示さない。このような抗体の具体的な例としては、例えば、後述する比較例1に記載の、抗体クローン名7F2及び6G2で表される抗APOA2-ATQ末端モノクローナル抗体クローン等が挙げられる。7F2クローンは、重鎖におけるCDR1が配列番号4で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号5で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号6で示されるアミノ酸配列からなり、かつ軽鎖におけるCDR1が配列番号7で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号8で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号9で示されるアミノ酸配列からなる。また、6G2クローンは、重鎖におけるCDR1が配列番号10で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号11で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号12で示されるアミノ酸配列からなり、かつ軽鎖におけるCDR1が配列番号13で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号14で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号15で示されるアミノ酸配列からなる。

【0035】

本発明の抗APOA2タンパク質非末端抗体は、配列番号1～3のいずれかで示されるAPOA2タンパク質のバリエーションに対する結合活性を比較した場合、結合活性が同等であるものが好ましい。具体的な例としては、例えば、抗体クローン名MAB1及びMAB2で表される抗APOA2抗体クローン等が挙げられる。MAB1クローンは、重鎖にお

10

20

30

40

50

けるCDR1が配列番号16で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号17で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号18で示されるアミノ酸配列からなり、かつ軽鎖におけるCDR1が配列番号19で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号20で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号21で示されるアミノ酸配列からなる。また、MAB2クローンは、重鎖におけるCDR1が配列番号22で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号23で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号24で示されるアミノ酸配列からなり、かつ軽鎖におけるCDR1が配列番号25で示されるアミノ酸配列、CDR2が配列番号26で示されるアミノ酸配列、そしてCDR3が配列番号27で示されるアミノ酸配列からなる。また、抗APOA2タンパク質非末端抗体としては、前記抗APOA2-ATQ非末端抗体や、前記抗APOA2-AT非末端抗体を使用することができる。

10

#### 【0036】

前記「ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体又はその断片」における「その断片」とは、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の部分断片であって、該抗体が有する抗原特異的結合活性と実質的に同等の活性を有するポリペプチド鎖又はその複合体をいう。例えば、前述の抗原結合部位を少なくとも1つ包含する抗体部分、すなわち、少なくとも1組のVLとVHを有するポリペプチド鎖、又はその複合体が該当する。具体例としては、免疫グロブリンを様々なペプチダーゼで切断することによって生じる多数の十分に特徴付けられた抗体断片等が挙げられる。より具体的な例としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'等が挙げられる。Fabは、パインによりIgG分子がヒンジ部のジスルフィド結合よりもN末端側で切断されることによって生じる断片であって、VH及びCHを構成する3つのドメイン(CH1、CH2、CH3)のうちVHに隣接するCH1からなるポリペプチドと、軽鎖から構成される。F(ab')<sub>2</sub>は、ペプシンによりIgG分子がヒンジ部のジスルフィド結合よりもC末端側で切断されることによって生じるFab'の二量体である。Fab'は、Fabよりもヒンジ部を含む分だけH鎖が若干長い実質的にはFabと同等の構造を有する(Fundamental Immunology、Paul ed.、3rd ed.、1993)。Fab'は、F(ab')<sub>2</sub>をマイルドな条件下で還元し、ヒンジ領域のジスルフィド連結を切断することによって得ることができる。これらの抗体断片は、いずれも抗原結合部位を包含しており、抗原(すなわち本発明においてはAPOA2タンパク質の特定のバリエーション)と特異的に結合する能力を有している。

20

30

#### 【0037】

本発明のモノクローナル抗体の断片は、化学的に、又は組換えDNA法を用いることによって、合成したものであってもよい。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体断片が挙げられる。具体的には、限定はしないが、本発明のモノクローナル抗体の一以上のVL及び一以上のVHを適当な長さで配列を有するリンカーペプチド等を介して人工的に連結させた一量体ポリペプチド分子、又はその多量体ポリペプチドが該当する。このようなポリペプチドの例としては、一本鎖Fv(single chain fragment of variable region)(Pierce catalog and Handbook、1994-1995、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL参照)、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)又はテトラボディ(tetrabody)等の合成抗体等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、VL及びVHは、通常別々のポリペプチド鎖(L鎖とH鎖)上に位置するが、一本鎖Fvは、これらの可変領域を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖にVL及びVHを包含した構造を有する合成抗体断片である。一本鎖Fv内において両可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。一本鎖Fvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてファージゲノムに組み込み、発現させることによって得ることができる。ダイアボディは、一本鎖Fvの二量体構造を基礎とした構造を有する分子である(Holliger et al.、1993、Proc. Natl. Acad. Sci.

40

50

USA、90:6444-6448)。例えば、前記リンカーの長さが約12アミノ酸残基よりも短い場合、一本鎖Fv内の2つの可変部位は自己集合できないが、ダイアボディを形成させることにより、すなわち、2つの一本鎖Fvを相互作用させることにより、一方のFv鎖のVLが他方のFv鎖のVHと集合可能となり、2つの機能的な抗原結合部位を形成することができる(Marvin et al、2005、Acta Pharmacol.Sin.、26:649-658)。さらに、一本鎖FvのC末端にシステイン残基を付加させることにより、2本のFv鎖同士のジスルフィド結合が可能となり、安定的なダイアボディを形成させることもできる(Alafsen et al、2004、Prot.Engr.Des.Sel.、17:21-27)。このようにダイアボディは二価の抗体断片であるが、それぞれの抗原結合部位が同一エピトープと結合する必要はなく、それぞれが異なるエピトープを認識し、特異的に結合する二重特異性を有していても構わない。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様に一本鎖Fv構造を基本としたその三量体構造及び四量体構造を有する。それぞれ、三価、及び四価の抗体断片であり、多重特異性抗体であってもよい。さらに、本発明の抗体断片は、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体断片(例えば、McCafferty et al.、1990、Nature、Vol.348、552-554参照)であって、かつ抗原結合能力を有しているものが含まれる。この他、例えば、Kuby、J.、Immunology、3rd Ed.、1998、W.H.Freeman&Co.、New Yorkも参照されたい。

10

#### 【0038】

20

本発明において、抗APOA2抗体又はその断片は、修飾することができる。ここでいう修飾は、抗APOA2抗体又はその断片がAPOA2タンパク質と特異的結合活性を有する上で必要な機能上の修飾(例えば、グリコシル化)、及び本発明の抗体又はその断片を検出する上で必要な標識のいずれをも含む。前記抗体標識には、例えば、蛍光色素(FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5)、蛍光タンパク質(例えば、PE、APC、GFP)、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ)、又はビオチン若しくは(ストレプト)アビジンによる標識が挙げられる。また、前記抗体のグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を調整するために改変されていてもよい。このような改変は、例えば、抗体配列内の一以上のグリコシル化部位を変更することで達成できる。より具体的に説明すると、例えば、FR内の一以上のグリコシル化部位を構成するアミノ酸配列に一以上のアミノ酸置換を導入して該グリコシル化部位を除去することにより、その部位のグリコシル化を喪失させることができる。このような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させる上で有効である(米国特許第5714350号、及び同第6350861号)。

30

#### 【0039】

##### 1-2. 免疫原の調製

本発明において、抗APOA2タンパク質末端抗体を作製する場合には、まず免疫原(抗原)としてのAPOA2タンパク質のバリエーションを調製する。本発明において免疫原として使用可能なAPOA2タンパク質のバリエーションは、例えば、配列番号1~3のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するAPOA2タンパク質若しくはその変異体又はそれらのポリペプチド断片、あるいはそれらと他のペプチド(例えば、シグナルペプチド、標識ペプチド等)との融合ポリペプチドが挙げられる。免疫原としてのAPOA2タンパク質のバリエーションは、例えば、配列番号1~3のいずれかのアミノ酸配列情報を利用して、当技術分野で公知の手法、例えば固相ペプチド合成法等により合成することができる。例えば、以下の方法によって調製することができる。

40

#### 【0040】

APOA2タンパク質のバリエーションは、天然型APOA2タンパク質、組換え型APOA2タンパク質、及びその全部又は一部が化学的に合成された合成APOA2タンパク質のいずれかを利用してよい。例えば、APOA2タンパク質のC末端に結合する抗体(抗APOA2タンパク質末端抗体)を取得するために調製する抗原用APOA2タンパク質

50

のバリエーションは、C末端領域の連続した6アミノ酸以上のアミノ酸配列を含む限り、天然型APOA2タンパク質、組換え型APOA2タンパク質、又は合成APOA2タンパク質のいずれのAPOA2タンパク質由来のバリエーションを用いることができる。

【0041】

天然型APOA2タンパク質は、血液（血清、及び血漿を含む）のような体液をはじめとする試料、又は培養細胞の培養上清から公知のタンパク質分離・精製技術、例えば、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーを用いて回収することができる。

【0042】

組換え型APOA2タンパク質は、該タンパク質をコードするDNAを導入した微生物、昆虫細胞、又は動物細胞で発現させた後、当該細胞から公知のタンパク質分離・精製技術を用いて回収することができる。

10

【0043】

合成APOA2タンパク質は、例えば、公開されたAPOA2タンパク質のアミノ酸配列情報を利用して、当技術分野で公知の手法、例えば、固相ペプチド合成法等により合成することができる。この合成APOA2タンパク質には、KLH（スカシ貝ヘモシアニン）、OVA（卵白アルブミン）、BSA（ウシ血清アルブミン）等のキャリアータンパク質に連結させてもよい。

【0044】

抗APOA2タンパク質末端抗体の作製において、APOA2タンパク質バリエーションの断片を免疫原とする場合も、天然型APOA2タンパク質断片、組換え型APOA2タンパク質断片、又は合成APOA2タンパク質断片のいずれを使用してもよい。例えば、APOA2タンパク質断片としては、配列番号1～3のいずれかで示されるアミノ酸配列において、C末端を含む6以上、好ましくは10アミノ酸以上、好ましくは18アミノ酸以上、より好ましくは30アミノ酸以上の連続したアミノ酸残基を含むオリゴペプチド又はポリペプチドを抗原として使用することができる。例えば、配列番号28又は29で示されるアミノ酸配列を含むペプチドが使用できる。

20

【0045】

天然型APOA2タンパク質の断片を免疫原として用いる場合は、例えば、抗APOA2タンパク質末端抗体を作製するのであれば、まず精製したAPOA2タンパク質をトリプシン等の適切なプロテアーゼで処理した後、逆相カラムでピークを分離分取する。続いて、各ピークに含まれるペプチドのアミノ酸配列を質量分析器により決定し、配列番号1～3のいずれかで示されるAPOA2タンパク質のC末端領域の連続した6アミノ酸以上の配列を部分配列として含んでいる場合、そのペプチドを免疫原として用いることができる。

30

【0046】

組換え型APOA2タンパク質のアミノ酸部分配列を免疫原として用いる場合は、例えば、抗APOA2タンパク質末端抗体を作製するのであれば、まず、配列番号1～3のいずれかで示されるAPOA2タンパク質においてC末端アミノ酸残基を含む連続した6アミノ酸以上の部分配列からなるペプチド（C末端断片）をコードするDNA配列を発現用ベクターに挿入する。次に、その発現用ベクターを各種細胞に導入し、コードされたC末端断片を発現させる。最後に、発現後の細胞からC末端断片を常法に従い抽出する。得られたC末端断片を免疫原として用いればよい。

40

【0047】

また、本発明において、抗APOA2タンパク質非末端抗体を作製する場合も、基本的な調製方法は、前記抗APOA2タンパク質末端抗体の作製方法と同じでよい。ただし、APOA2タンパク質の免疫原として使用可能な領域は、抗APOA2タンパク質末端抗体の作製で使用する免疫原としての領域と異なる領域を用いる。すなわち、APOA2タンパク質のC末端領域以外の領域の全部又は一部を免疫原として使用すればよい。抗APOA2タンパク質末端抗体を作製する場合と同様に、抗APOA2タンパク質非末端抗体

50

を作製する場合にも、A P O A 2 タンパク質の C 末端領域以外の領域のアミノ酸残基を含むオリゴペプチド又はポリペプチドを抗原として使用することができる。

( 組み換え型 A P O A 2 タンパク質の調製 )

以下で、配列番号 1 ~ 3 のいずれかで示される組み換え型 A P O A 2 タンパク質 ( 組み換え型 A P O A 2 タンパク質のバリエーション ) の調製について詳述する。

【 0 0 4 8 】

( a ) 組み換え型 A P O A 2 タンパク質のバリエーションをコードするポリヌクレオチドの調製

A P O A 2 タンパク質の各種バリエーションの発現に用いるベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドを使用することができる。例えば、プラスミド  
10  
であれば、大腸菌由来のプラスミド ( p E T 3 0 a 、 p G E X 6 p 、 p U C 1 1 8 、 p U C 1 1 9 、 p U C 1 8 、 p U C 1 9 等 ) 、枯草菌由来のプラスミド ( p U B 1 1 0 、 p T P 5 等 ) 、酵母由来のプラスミド ( Y E p 1 3 、 Y E p 2 4 、 Y C p 5 0 等 ) が挙げられる。また、ファージであれば、ファージ ( g t 1 1 、 Z A P 等 ) が挙げられる。さらに、ワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターも用いることができる。

【 0 0 4 9 】

上記ベクターに A P O A 2 タンパク質のバリエーションをコードするポリヌクレオチドを挿入するには、例えば、精製した該ポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切断し、対応する  
20  
適当な制限酵素で切断したベクター内部に D N A リガーゼ等を用いて連結する方法がある。

【 0 0 5 0 】

( b ) A P O A 2 タンパク質のバリエーション発現ベクターの宿主内への導入

得られた A P O A 2 タンパク質のバリエーション発現ベクターを、その発現ベクターを発現し得る宿主中に導入して、A P O A 2 タンパク質のバリエーションを発現し得る形質転換体 ( バリエーション発現形質転換体 ) を得る。使用する宿主については、使用したベクターに適する宿主であって、A P O A 2 タンパク質のバリエーションを発現できるものであれば特に限定されない。例えば、細菌 ( 大腸菌 ( 例えば、エシェリキア・コリ : E s c h e r i c h i a c o l i ) 、枯草菌 ( 例えば、バチルス・サブチリス : B a c i l l u s s u b t i l l i s ) 等 ) 、酵母、昆虫細胞、動物細胞 ( C O S 細胞、C H O 細胞 ( J o u r n a l  
30  
o f i m m u n o l o g y 、 1 9 9 8 、 V o l . 1 6 0 、 3 3 9 3 - 3 4 0 2 ) ) 等が好適に用いられる。細菌への前記ベクターの導入方法は、細菌に該ベクターを導入する公知の方法であれば特に限定されない。例えば、ヒートショック法、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。これらの技術は、いずれも当該分野で公知であり、様々な文献に記載されている。例えば、Green & Sambrook、2012、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York を参照されたい。また、動物細胞の形質転換には、リポフェクチン法 ( P N A S 、 1 9 8 9 、 V o l .  
40  
8 6 、 6 0 7 7 ; P N A S 、 1 9 8 7 、 V o l . 8 4 、 7 4 1 3 ) 、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法 ( V i r o l o g y 、 1 9 7 3 、 V o l . 5 2 、 4 5 6 - 4 6 7 ) 、D E A E - D e x t r a n 法等が好適に用いられる。

【 0 0 5 1 】

細菌を宿主とする場合は、A P O A 2 タンパク質のバリエーション発現ベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター配列、リボゾーム結合配列、A P O A 2 タンパク質のバリエーションをコードする D N A 配列、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する調節因子をコードする遺伝子が含まれていてもよい。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で機能できるものであればいずれを用いてもよい。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

酵母、動物細胞、昆虫細胞等の真核細胞を宿主とする場合にも、同様に当技術分野で公知の手法に従ってA P O A 2タンパク質のバリエーション発現形質転換体を得ることができる。真核細胞で用いられるA P O A 2タンパク質のバリエーション発現ベクターには、プロモーター配列、A P O A 2タンパク質のバリエーションをコードするD N A配列のほか、所望によりエンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル(ドナー部位、アクセプター部位、ランチポイント等)、ポリA付加シグナル、選択マーカー配列、リボソーム結合配列(S D配列)等が連結されていてもよい。

【0053】

(c) バリエーション発現形質転換体の培養、及び組換え型A P O A 2タンパク質バリエーションの発現

続いて、上記作製したバリエーション発現形質転換体を培養する。バリエーション発現形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。例えば、細菌を宿主とする場合、培地は、細菌が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、かつ生育、増殖可能なものであれば、特に限定はしない。天然培地、合成培地のいずれを用いることもできる。より具体的な例としては、L B培地が挙げられるが、もちろんこれに限定はされない。また、バリエーション発現形質転換体の培養を選択的に行うために、必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。培養は、通常、通気攪拌培養等の好氣的条件下、37℃で6~24時間行う。培養期間中、p Hは中性付近に保持することが好ましい。p Hの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。バリエーション発現形質転換体がC H O細胞等の動物細胞である場合には、Life Technologies社(現Thermo Fisher Scientific社)製D M E M培地に $1 \times 10^5$ 細胞/mLとなるように宿主細胞を接種し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養すればよい。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0054】

前記A P O A 2タンパク質のバリエーション発現ベクターがタンパク質発現制御システム(例えば、宿主が細菌の場合、リプレッサー遺伝子及びオペレーター等が該当する)を含むタンパク質発現誘導型ベクターである場合には、前記バリエーション発現形質転換体に所定の処理を行い、A P O A 2タンパク質のバリエーションの発現を誘導させる必要がある。発現誘導の方法は、ベクターに含まれるタンパク質発現制御システムによって異なるため、そのシステムに適した誘導処理を行えばよい。例えば、細菌を宿主とするタンパク質発現誘導型ベクターにおいて最も一般的に利用されているタンパク質発現制御システムは、lacリプレッサー遺伝子及びlacオペレーターからなるシステムである。本システムは、IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-Galactoside)処理により発現を誘導することが可能である。このシステムを含むA P O A 2タンパク質発現ベクターを有する形質転換体において、目的とするA P O A 2タンパク質のバリエーションを発現させるためには、培地中に適量(例えば、終濃度1 mM)のIPTGを添加すればよい。

【0055】

(d) 組換え型A P O A 2タンパク質のバリエーションの抽出及び/又は回収

培養後、A P O A 2タンパク質のバリエーションが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を回収して破碎することにより目的のタンパク質を抽出することができる。また、A P O A 2タンパク質のバリエーションが菌体外又は細胞外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去し、上清を使用すればよい。その後、一般的なタンパク質の精製方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で、又は適宜組合せて用いることにより、前記培養物中からA P O A 2タンパク質のバリエーションを単離精製することができる。A P O A 2タンパク質のバリエーションが得られたか否かは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により確認すればよい。

【0056】

### 1 - 3 . 抗 A P O A 2 モノクローナル抗体の作製

#### 1 - 3 - 1 . 抗 A P O A 2 モノクローナル抗体及びハイブリドーマ作製方法

本発明の抗 A P O A 2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下に記載する方法によって作製することができる。ただし、本方法に限定されるものではなく、当該分野で公知の他のあらゆる方法で作製することもできる。

##### ( 1 ) 抗 A P O A 2 モノクローナル抗体作製方法

A P O A 2 タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号 1、2 又は 3 で示される A P O A 2 タンパク質のいずれかの C 末端領域と特異的に結合する抗 A P O A 2 タンパク質末端モノクローナル抗体を作製するには、A P O A 2 タンパク質のバリエーション若しくは A P O A 2 タンパク質のバリエーションの C 末端領域を含むペプチドを免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、その後、配列番号 1 ~ 3 のいずれかで示される A P O A 2 タンパク質自体若しくは A P O A 2 タンパク質のバリエーションの C 末端領域を含むペプチドを用いて A P O A 2 タンパク質の特定のバリエーションにのみ結合する抗体をスクリーニングすればよい。例えば、抗 A P O A 2 - A T Q 末端モノクローナル抗体については、配列番号 1 で示される A P O A 2 - A T Q タンパク質の C 末端領域と特異的に結合し、配列番号 2 又は 3 で示される A P O A 2 タンパク質のバリエーションとは結合しないか、又はほとんどしないことを指標にスクリーニングできる。また、抗 A P O A 2 - A T 末端モノクローナル抗体については、配列番号 2 で示される A P O A 2 - A T タンパク質の C 末端領域と特異的に結合し、配列番号 1 又は 3 で示される A P O A 2 タンパク質のバリエーションとは結合しないか、又はほとんどしないことを指標にスクリーニングできる。

##### 【 0 0 5 7 】

また、A P O A 2 タンパク質の C 末端領域以外のアミノ酸を認識する抗 A P O A 2 タンパク質非末端抗体を作製するには、A P O A 2 タンパク質のバリエーション若しくは部分配列を含むペプチドを免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、その後、配列番号 1 ~ 3 のいずれかで示される A P O A 2 タンパク質のバリエーション若しくは C 末端の異なるペプチドに対する結合活性を比較した場合に結合活性が同程度であることを指標に、抗体をスクリーニングすることにより得ることができる。

##### ( 2 ) 抗 A P O A 2 抗体の産生細胞の作製

前記 1 - 2 で得られた免疫原である組換え型 A P O A 2 タンパク質を、緩衝液に溶解して免疫原溶液を調製する。この際、免疫を効果的に行うために、必要であればアジュバントを添加してもよい。アジュバントの例としては、市販の完全フロイントアジュバント ( F C A )、不完全フロイントアジュバント ( F I A ) 等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いてもよい。

##### 【 0 0 5 8 】

次に、前記調製した免疫原溶液を哺乳動物、例えばラット、マウス (例えば近交系マウスの B A L B / c )、ウサギ等に投与し、免疫する。免疫原の投与方法としては、例えば、F I A 又は F C A を用いた皮下注射、F I A を用いた腹腔内注射、又は 0 . 1 5 m o l 塩化ナトリウムを用いた静脈注射が挙げられるが、この限りでない。免疫原の 1 回の投与量は、免疫動物の種類、投与経路等により適宜決定されるものであるが、動物 1 匹当たり約 5 0 ~ 2 0 0 μ g である。また、免疫の間隔は特に限定されず、初回免疫後、数日から数週間間隔で、好ましくは 1 ~ 4 週間間隔で、2 ~ 6 回、好ましくは 3 ~ 4 回追加免疫を行う。初回免疫より後に、免疫動物の血清中の抗体価の測定を E L I S A ( E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y ) 法等により行い、抗体価が十分な上昇を示せば、免疫原を静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。そして、最終免疫の日から 2 ~ 5 日後、好ましくは 3 日後に、抗体産生細胞を採取する。

##### 【 0 0 5 9 】

#### 1 - 3 - 2 . 抗 A P O A 2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ作製方法

##### ( 1 ) 免疫動物からの抗体産生細胞の回収と細胞融合

免疫動物から得た抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行うことで、A P O A 2 タンパク質の特定の領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリド

ーマを作製することができる。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、一般に入手可能なマウス等由来の株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生育できる性質を有するものが好ましい。また、株化細胞は、免疫動物と同種系の動物に由来するものが好ましい。ミエローマ細胞の具体例としては、BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPR T）欠損細胞株である、P3X62-Ag.8株（ATCCTIB9）、P3X63-Ag.8.U1株（JCRB9085）、P3/NSI/1-Ag4-1株（JCRB0009）、P3x63Ag8.653株（JCRB0028）又はSP2/0-Ag14株（JCRB0029）等が挙げられる。

10

#### 【0060】

上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させるには、血清を含まないDMEM、RPMI1640培地等の動物細胞培養用培地中で、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを約1:1~20:1の割合で混合し、細胞融合促進剤の存在下にて融合反応を行う。細胞融合促進剤としては、平均分子量1,500~4,000Daのポリエチレングリコール等を約10~80%の濃度で使用することができる。また、場合によっては、融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を併用してもよい。さらに、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞と

20

#### (2) 目的とするハイブリドーマの選抜

細胞融合処理後の細胞から目的とする抗APOA2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別方法としては、例えば、以下の方法が挙げられる。細胞懸濁液を、例えば、ウシ胎児血清含有RPMI1640培地等で適当に希釈後、96ウェルマイクロタイタープレート上に $2 \times 10^6$ 個/ウェル程度播種し、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。培養温度は20~40℃、好ましくは約37℃とする。ミエローマ細胞がHGPR T欠損株又はチミジンキナーゼ（TK）欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む選択培地（HAT培地）を用いることにより、抗体産生細胞とミエローマ細胞のハイブリドーマのみを選択的に生育、増殖させることができるため、選択培地で培養開始後約10日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして選択すればよい。

30

#### 【0061】

HAT培地で選択されたハイブリドーマについては、まず、配列番号1~3のいずれかで示されるAPOA2タンパク質の各種バリエーションに対する結合活性を指標として、産生される抗体のスクリーニングを行う。次いで結合活性を持つ抗体について交差反応性の試験を行い、許容できるものを選択する。「許容できるもの（交差反応性）」とは、目的とする抗体の用途において、無視しうる程度の交差反応性を意味する。例えば、免疫学的な測定に用いるためのモノクローナル抗体であれば、最終的な測定系において交差反応によるシグナル強度がバックグラウンドレベルから特異的反応によるシグナル強度の1%未満に抑えられれば、事実上交差反応しないと解することができる。

40

#### 【0062】

APOA2タンパク質の特定のバリエーションへの反応特異性を確認するには、例えば、ELISA法を利用することができる。ELISA法では、抗原となるAPOA2タンパク質の各種バリエーション又はその断片を、それぞれ異なるウェルに固相化したマイクロプレートを用意し、これに前記ハイブリドーマの培養上清を適当に希釈した試料を加えて反応させる。十分に反応させた後にウェルを洗浄し、免疫グロブリンに対する2次抗体の標識体を加えてさらに反応させる。再度ウェルを洗浄し、最終的にウェルに結合した2次抗体の標識体を利用して測定すれば、培養上清中に存在する抗体の、抗原に対する結合活性を定量

50

的に知ることができる。例えば、抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体を作製するには、特定のAPOA2タンパク質のバリエーションにおけるC末端領域にのみ結合活性を示し、APOA2タンパク質の他のバリエーションに交差反応性を示さないことを指標にして、特異性の判断を行えばよい。また、抗APOA2タンパク質非末端モノクローナル抗体を作製するには、APOA2タンパク質のC末端が異なるいずれのバリエーションに対しても同程度の結合性を示し、かつ、作製した抗体によって、抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体のC末端領域への結合を阻害しないことを指標に、抗体の選抜を行う。

#### 【0063】

ハイブリドーマは組換えDNA技術を用いて選抜することもできる。まず、前述の方法に従って取得したハイブリドーマ群からmRNAを抽出する。mRNAの抽出は、当該技術分野で公知の方法を用いればよい。続いて、Oligo dTプライマーやランダムプライマーを用いて前記mRNAのcDNAを取得する。このcDNAを鋳型に、可変領域をコードする遺伝子の5'上流にあるシグナル配列の塩基配列と、定常領域側の塩基配列を含むプライマーセットを利用してPCRを行う。得られた増幅産物を適当なクローニングベクターに挿入してクローン化し、そのハイブリドーマが生産する抗体の可変領域遺伝子のライブラリーを得ることができる。より具体的な例として、限定はしないが、Merck Millipore社の提供するMouse Ig Primerを用いてPCRを行い、増幅産物(マウス免疫グロブリン可変領域cDNA)をLife Technologies社(現Thermo Fisher Scientific社)の提供するZEROB LUNT PCR TOPO VectorのEcoRI部位に挿入してクローン化し、得られたベクター群を、可変領域アミノ酸配列をコードする遺伝子ライブラリーとすることができる。次に、前記本発明で開示された可変領域又は各CDRのアミノ酸配列を元にプローブを設計し、前記ライブラリーからポジティブクローンをスクリーニングすることで、本発明の抗体を生産するハイブリドーマを選抜することができる。

#### (3) ハイブリドーマを用いた抗体産生

本発明におけるハイブリドーマは、マウスを用いて腹水化することにより抗体生産に用いることができる。具体的には、ハイブリドーマを作製する際の融合パートナーに用いた細胞の由来のマウスや、ヌードマウスの腹腔内にハイブリドーマを接種し、腹水を適宜採取することにより、抗体を含む腹水液を回収することができる。より具体的には、SP2/0細胞を融合パートナーとしたハイブリドーマを、プリスタン接種後10日間を経たBALB/cマウスの腹腔中に接種することにより、抗体を含む腹水液を回収できる。

#### 【0064】

また、本発明におけるハイブリドーマは、適した培地を用いて培養を行うことにより抗体生産に用いることができる。具体的には、Life Technologies社(現Thermo Fisher Scientific社)製のハイブリドーマSFM培地中に $1 \times 10^5$ 細胞/mLとなるようにハイブリドーマを接種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベータにてハイブリドーマが死滅するまで培養することにより抗体を含む培養上清を得ることができるが、この限りではない。

(4) 組換え抗APOA2モノクローナル抗体又はその断片の組換えDNA操作による作製方法

本発明の抗体又はその断片は、当該抗体のアミノ酸配列をコードするcDNA配列を利用して、組換えDNA操作によって得ることもできる。

#### 【0065】

抗APOA2モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来、例えば、上記「1-3-2(2)」の手法で取得した抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来の抗体における可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を用いて、VH及びVLの塩基配列を任意のヒトCH<sub>1</sub>、及びヒトCLをコードする塩基配列にそれぞれ連結し、それぞれのポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させることもできる。また、CDRグラフト抗体技術を用いて、上記「1-3-2(2)」の手法で取得した抗APOA2タンパク質末端

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来の抗体における可変領域のアミノ酸配列のうち、各CDR配列のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをヒトFR配列のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを所定の順序で連結し、適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させてもよい。このとき重鎖と軽鎖とが同一宿主細胞内で発現し、重鎖/軽鎖からなる二量体として産生できるようにすると便利である。具体的には、例えば、軽鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターにより細胞を共形質転換し、この形質転換細胞から本発明による抗体を得ることもできる。又は、上記可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをそのまま適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、免疫グロブリン分子の断片として発現させることもできる。あるいは、上述したように、前記アミノ酸配列を含むVL及びVH、又は軽鎖及び重鎖をそれぞれコードするポリヌクレオチドを適当なリンカーで連結してファージに組み込んだ一本鎖Fvとして、又はダイアボディ等の合成抗体断片として発現させてもよい。その他、近年開発された、遺伝子工学技術を活用して組換え抗体をファージ表面に発現させるファージディスプレイ抗体技術(Brinkmann et al., 1995、J. Immunol. Methods、182、41-50、国際公開WO97/13844号、同90-02809号)により、人工的に重鎖、軽鎖をコードする遺伝子をシャッフリングさせ多様化した一本鎖Fv抗体をファージ融合タンパクとして発現させ、特異抗体を得ることもできる。

10

## 【0066】

組換え抗APOA2抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドの調製、該ポリヌクレオチドを組み込んだベクター、該ベクターの宿主導入法については、当該分野で公知の組換えDNA技術を用いて行えばよい。目的とする組換え抗APOA2タンパク質抗体又はその断片は、形質転換細胞の培養液中又は当該細胞内から得ることができる。

20

## 【0067】

免疫グロブリン発現ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター(例えば、SV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV basedベクター)等を用いることができるが、これらに限定されない。例えば、BPV basedベクターの1種であるBCMG S Neoベクターは、COS7細胞等に形質転換することによって外来遺伝子を効率良く発現する望ましいベクターである(烏山「ウシパピローマウイルスベクター」、村松正実及び岡山博人編、実験医学別冊：遺伝子工学ハンドブック、1991、羊土社、297-299)。

30

## 【0068】

前記ベクターは、抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドの他に、前記抗体又はその断片を発現する上で必要な制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、ポリアデニル化部位、スプライシング部位)、又は、必要であれば選択マーカーを含むことができる。

## 【0069】

形質転換の宿主としては、上記「1-2.免疫原の調製」に記載した宿主の他、SP2/0(マウスミエローマ)細胞(European Journal of Cancer Prevention(1996) Vol. 5、512-519; Cancer Research(1990) Vol. 50、1495-1502)が好適に用いられる。

40

## 【0070】

本発明における、抗体又はその断片を発現するベクターを含有する宿主細胞は、常法に従って培養を行うことにより、その培養上清又は宿主細胞内に抗体を産生させることができる。具体的には、CHO細胞を宿主とした場合にはLife Technologies社(現Thermo Fisher Scientific社)製DMEM培地に $1 \times 10^5$ 細胞/mLとなるように宿主細胞を接種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養することにより抗体を含む培養上清を得ることができる。また、例えば、宿主細胞を大腸菌とした場合には、LB培地等大腸菌の培養に用いられる一般的な培地に接種して

50

培養し、タンパク質の発現を誘導することにより、培養上清又は宿主細胞内に抗体を産生することができる。

【0071】

発現産物である抗体又はその断片が定常領域を含む場合には、プロテインAカラム、プロテインGカラム、抗イムノグロブリン抗体アフィニティークラム等を用いて培養上清や、細胞破碎液から精製・回収することができる。一方、可変領域のみで構成され、定常領域を含まない状態で発現させた場合には、前記精製方法は適用できないので、他の適当な精製方法を応用する。例えば、そのC末端にヒスチジンタグ等の精製に有利なタグ配列を融合させた構造として発現させれば、対応するリガンドを利用したアフィニティークロマトグラフィーによって精製することが可能である。タグとの融合タンパク質ではない場合は、硫安沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーといったタンパク質精製の常法に従って精製することができる。

10

【0072】

なお、本発明で使用されるモノクローナル抗体又はその断片は、APOA2タンパク質の特定のバリエーション又はその断片に対する特異性を確認するため、前述のように使用前に予め他のバリエーションとの交差反応性を検証しておくことが好ましい。例えば、本発明の抗APOA2-ATQタンパク質末端モノクローナル抗体又はその断片において、交差反応性を確認すべき抗原は、APOA2-ATタンパク質とAPOA2-Aタンパク質である。

20

【0073】

また、前記タンパク質以外にも、部分構造がAPOA2タンパク質のバリエーションと共通する他のタンパク質についても本発明で使用される抗体又はその断片の交差反応性を確認しておくことがより好ましい。交差反応の確認には、例えば、APOA2-ATQタンパク質を抗原としたELISA法を使うことが可能である。反応特異性を試験すべき抗体、すなわち、抗APOA2タンパク質末端抗体、及びその断片とAPOA2タンパク質のバリエーションとの反応の場に、交差反応性を確認すべき他の抗原タンパク質を共存させれば、両者の競合状態を観察することによって交差反応性の確認を行うことができる。競合阻害の原理を利用したこのような交差反応性の確認方法は、すべての抗原について反応系を調製する必要がないのでスクリーニングを迅速に行うことができる。

30

【0074】

1-3-3. 得られた抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体が認識するAPOA2タンパク質の領域構造の確認

得られた抗APOA2モノクローナル抗体が特異的に認識するAPOA2タンパク質のバリエーションの種類については、該タンパク質の遺伝子を基にPCR反応等を用いて各種のAPOA2タンパク質のバリエーション遺伝子を作製し、該遺伝子から得られるAPOA2タンパク質の各種バリエーションとモノクローナル抗体の結合性を解析することにより決定できる。

【0075】

抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体の場合は、具体的には、次のような方法により行われる。まずAPOA2遺伝子全長、又はAPOA2遺伝子の終始コドンから、5'末端側に終始コドンを含む6塩基、若しくは9塩基が欠失した種々の長さの断片を調製し、これら断片を挿入した発現ベクターを作製する。このような欠失変異を伴う遺伝子断片の調製法は「続生化学実験講座、第1巻、遺伝子研究法II、289-305頁、日本生化学会編」に記載されている。次に、それぞれのAPOA2タンパク質のバリエーション発現ベクターを導入した宿主細胞から、前述の方法によりAPOA2タンパク質の各種バリエーションを調製する。続いて、これらのタンパク質を抗原としてELISA法により、抗APOA2タンパク質モノクローナル抗体の各種APOA2タンパク質のバリエーションへの結合性の評価を行う。特定のバリエーションに対してのみ結合性が見られ、その他のバリエーションへの結合性は見られないか、若しくはほとんど見られない場合、該モノクローナル抗

40

50

体は特定のA P O A 2タンパク質のバリエーションにのみ特異的に結合する末端モノクローナル抗体であると判断できる。

【0076】

得られた抗A P O A 2タンパク質末端モノクローナル抗体が認識するA P O A 2タンパク質のバリエーションは、次のような方法によって確認することもできる。

【0077】

まず、公知の方法で、各種A P O A 2タンパク質のバリエーションのC末端領域の配列ペプチドをそれぞれ固相合成する。続いて、これらペプチドを抗原としてE L I S A法により、抗A P O A 2タンパク質末端モノクローナル抗体の各種ペプチドへの結合性の評価を行う。特定のC末端領域の配列ペプチドにのみ、抗A P O A 2タンパク質モノクローナル抗体の結合性が見出された場合、該モノクローナル抗体は特定のA P O A 2タンパク質のバリエーションにのみ特異的に結合する、抗A P O A 2タンパク質末端モノクローナル抗体であると判断できる。

【0078】

1-4. 抗A P O A 2ポリクローナル抗体の作製

抗A P O A 2ポリクローナル抗体は、当該技術分野で公知の方法によって作製することができる。以下に、例として、A P O A 2タンパク質の特定のバリエーションのみと特異的に結合する抗A P O A 2タンパク質末端抗体の取得法を具体的に示す。

【0079】

1-4-1. 抗血清の取得

抗A P O A 2タンパク質末端ポリクローナル抗体の作製は、1-3-1(2)に記載の抗A P O A 2抗体の産生細胞の作製方法と同様に行えばよい。抗原には特定のA P O A 2タンパク質のバリエーション配列上の少なくとも6アミノ酸以上の長さを持つC末端断片、例えば配列番号28又は29で示されるペプチドを用いればよい。最終免疫の日から2~5日後、好ましくは3日後に免疫動物の血液からA P O A 2タンパク質を認識するポリクローナル抗体を含む抗血清が回収できる。

【0080】

1-4-2. 抗A P O A 2抗体の精製

(1) ペプチド固定化カラムの作製

A P O A 2タンパク質のC末端領域ペプチド、及びA P O A 2タンパク質のC末端領域ペプチドのC末端にアミド基を付加したペプチドをそれぞれ固定化したアフィニティーカラムを作製する。詳しい方法は「抗ペプチド抗体実験プロトコール」、第2版、秀潤社に記載されている。アフィニティーカラムに使用する担体は、ホルミルセルロースやC N B r アガロースのように、担体上の官能基をペプチドのアミノ基へ結合可能なもの、若しくは担体に共有結合させたマレイミド基を介して、ペプチド配列上のシステイン残基へ結合可能なものなどが利用可能である。また、固定化するペプチドの長さは、A P O A 2タンパク質のC末端を含む限り、6アミノ酸以上、好ましくは10アミノ酸以上、好ましくは18アミノ酸以上、より好ましくは30アミノ酸以上である。

(2) 抗体精製

抗A P O A 2タンパク質末端ポリクローナル抗体は、前記抗血清からペプチド固定化アフィニティーカラムを用いて精製することができる。例えば、前記抗血清を適切な緩衝液で希釈し、抗血清に含まれるI g G抗体を、A P O A 2タンパク質のC末端領域ペプチドを固定化したアフィニティーカラムに吸着させ、この吸着画分を回収する。続いて、C末端をアミド化したA P O A 2タンパク質ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて、ペプチドのC末端領域以外への結合性を示すイムノグロブリンを吸着除去する。最終的に、この非吸着画分を特定のA P O A 2タンパク質のバリエーションを特異的に認識する抗A P O A 2タンパク質末端ポリクローナル抗体として取得する。

【0081】

2. 胆道癌の検出方法

本発明の第二の態様は、胆道癌をインビトロで検出する診断補助方法に関する。本発明

10

20

30

40

50

は、2種のAPOA2タンパク質バリエーション、すなわちAPOA2-ATQタンパク質及びAPOA2-ATタンパク質のそれぞれのC末端領域を特異的に認識する末端抗体（抗APOA2タンパク質末端抗体）又はその断片と、C末端領域以外の領域のアミノ酸配列を認識する抗APOA2タンパク質抗体（抗APOA2タンパク質非末端抗体）又はその断片を使用して、前記2種のAPOA2タンパク質バリエーションを測定することを特徴とする。さらに、測定した2種のAPOA2タンパク質バリエーションの測定値を用いた多変量解析により、胆道癌を検出する方法を特徴とする。

#### 【0082】

本発明の方法は、胆道癌検出用マーカー測定工程、及び罹患決定工程を含む。以下、それぞれの工程について詳細に説明をする。

#### 【0083】

##### 2-1. 胆道癌検出用マーカー測定工程

「胆道癌検出用マーカー測定工程」とは、被験体由来の体液中に存在する胆道癌検出用マーカーの量、すなわち、APOA2-ATQタンパク質及びAPOA2-ATタンパク質からなる、2種のAPOA2タンパク質バリエーションの量をインビトロで測定する工程である。

#### 【0084】

本明細書において、「被験体」とは、胆道癌の検出対象となる個体、好ましくは胆道癌に罹患している疑いのある個体を指す。ここでいう個体の例として、脊椎動物が挙げられる。好ましくは哺乳動物、例えば霊長類（ヒト、サル、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ等）、げっ歯類（マウス、ラット、モルモット等）、有蹄類（ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ等）等、より好ましくはヒトである。本明細書において、被験体がヒトの場合には、被験体を、以降、特に「被験者」と称する。

#### 【0085】

本明細書において「体液」とは、胆道癌の検出のために供される試料であって、生物学的流動体を意味する。体液は、本発明の胆道癌検出用マーカーが含まれる可能性のある生物学的流動体であればよく、特に限定はされない。例えば、血液、尿、リンパ球培養上清、髄液、消化液（例えば、膵液、大腸液、食道腺分泌液、唾液を含む）、汗、腹水、鼻水、涙、腔液、精液等が含まれる。好ましくは、血液又は尿である。本明細書中、「血液」は、血漿及び血清を含み、全血も好ましく用いることができる。全血は、静脈血、動脈血又は臍帯血等の種類を問わない。体液は、同一個体から得られる異なる二以上の組合せであってもよい。本発明の胆道癌の検出方法は、侵襲性の低い血液や尿からも検出可能であることから、簡便な検出法として非常に有用である。

#### 【0086】

「被験体由来の体液」とは、被験体から既に採取された体液をいい、体液を採取する行為自体は、本発明の態様には包含されない。被験体由来の体液は、被験体から採取されたものを直ちに本発明の方法に供してもよいし、採取後、直接、又は適当な処理を施した後に、冷蔵又は凍結したものを本発明の方法に供する前に、室温に戻して使用してもよい。冷蔵又は凍結前の適当な処理としては、体液が血液の場合であれば、採取した全血にヘパリン等を添加して抗凝固処理を施した後に血漿若しくは血清として分離すること等が含まれる。これらの処理は、当該分野で公知の技術に基づいて行なえばよい。

#### 【0087】

本明細書において「APOA2タンパク質バリエーションの量」とは、被験体由来の体液中に存在する前記2種のAPOA2タンパク質バリエーションにおけるそれぞれの分量をいう。この分量は、絶対量又は相対量のいずれであってもよい。絶対量の場合、所定の体液量中に含まれる前記2種のAPOA2タンパク質バリエーションにおける質量又は容量が該当する。相対量の場合、例えば、標準物質を使用し、その標準物質の測定値に対する被験体由来の2種のAPOA2タンパク質バリエーションの測定値の相対的な値をいう。例えば、濃度、蛍光強度、吸光度等が挙げられる。

#### 【0088】

APOA2タンパク質バリエーションの量は、インビトロで公知の方法を用いて測定することができる。例えば、2種のAPOA2タンパク質バリエーションのそれぞれと特異的に結合可能な物質を用いて測定する方法が挙げられる。

【0089】

本明細書において「特異的に結合可能」とは、ある物質が、本発明の標的であるAPOA2タンパク質の特定のバリエーションのみと実質的に結合し得ることを意味する。この場合、特定のAPOA2タンパク質バリエーションの検出に影響を与えない程度の非特異的な結合が存在してもよい。

【0090】

「特異的に結合可能な物質」としては、例えば、APOA2結合タンパク質が挙げられる。より具体的には、例えば、APOA2タンパク質バリエーションを抗原とし、C末端領域の構造の違いを認識して結合する「抗APOA2タンパク質末端抗体」、好ましくは配列番号1、2又は3のアミノ酸配列を含むヒトAPOA2タンパク質バリエーションを抗原とした時、APOA2タンパク質バリエーションのいずれか1種のみを認識して結合する「抗ヒトAPOA2タンパク質末端抗体」又はそれらの抗体断片である。あるいは、それらの化学修飾誘導体であってもよい。ここで、「化学修飾誘導体」とは、例えば、前記抗APOA2タンパク質末端抗体又はその抗体断片において、APOA2タンパク質の特定のバリエーションと特異的な結合活性を獲得又は保持する上で必要な機能上の修飾、又は前記抗APOA2タンパク質末端抗体又はその抗体断片を検出する上で必要な標識のための修飾のいずれをも含む。機能上の修飾は、前述した通りである。

【0091】

APOA2タンパク質バリエーションの測定に用いる抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれであってもよい。特異的検出を可能にするため、好ましくはモノクローナル抗体である。例えば、APOA2タンパク質末端と特異的に結合する抗APOA2タンパク質末端ポリクローナル抗体等は、前述の方法によって作製することができる。

【0092】

2種のAPOA2タンパク質バリエーションは、APOA2タンパク質の特定のバリエーションにのみ結合する抗APOA2抗体を用いた免疫学的方法により測定可能である。免疫学的方法は、抗APOA2抗体を用いる限り、いずれの方法でも良いが、好ましくは、抗APOA2タンパク質末端抗体を固相化抗体又は標識抗体として用い、APOA2タンパク質のC末端以外の領域と結合するもう一つの抗体（抗APOA2タンパク質非末端抗体）と組み合わせて行うELISA法である。例えば、APOA2-ATQタンパク質の量は、抗APOA2-ATQ末端抗体を標識抗体として用い、抗APOA2-ATQ非末端抗体を固相化抗体として用いたサンドイッチELISA法により測定できる。また、APOA2-ATタンパク質の量は、抗APOA2-AT末端抗体を固相化抗体として用い、抗APOA2-AT非末端抗体を標識抗体として用いたサンドイッチELISA法により測定可能である。抗APOA2タンパク質非末端抗体は、Abcam社、Fitzgerald社等より市販されており、それらを利用することもできる。

【0093】

2-2. 罹患決定工程

「罹患決定工程」とは、前記胆道癌検出用マーカー測定工程で測定されたタンパク質の量に基づいてインビトロで胆道癌の罹患を決定（又は評価）する工程である。測定された胆道癌検出用マーカー、すなわち、被験体の体液試料中におけるAPOA2タンパク質バリエーションの量（APOA2-ATQタンパク質及びAPOA2-ATタンパク質の量）を測定して、胆道癌の検出を行い、胆道癌の罹患の有無を決定し、又は罹患の可能性を評価する。本工程は、さらに第1工程～第3工程の3つの工程で構成される。以下、それぞれの工程について詳細に説明する。

（第1の工程）

第1の工程では、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるAPOA2-ATQタン

10

20

30

40

50

パク質のC末端領域と特異的に結合する抗APOA2-ATQ末端抗体と、該C末端領域以外のアミノ酸配列と結合する抗APOA2-ATQ非末端抗体を用いて、被験体の体液試料中におけるAPOA2-ATQタンパク質の量を測定する。

(第2の工程)

次に、第2の工程では、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるAPOA2-ATタンパク質のC末端領域と特異的に結合する抗APOA2-AT末端抗体と、該C末端領域以外のアミノ酸配列と結合する抗APOA2-AT非末端抗体を用いて、APOA2-ATタンパク質の量を測定する。ここで、APOA2-ATQタンパク質及びAPOA2-ATタンパク質の前記C末端領域は、それぞれC末端を含む6以上の連続したアミノ酸を含む配列であることが望ましい。APOA2タンパク質バリエーションの量は、例えばELISA法により測定することができるが、この方法に限定されない。さらに、第1の工程において抗APOA2-ATQ末端抗体と共に用いる抗APOA2-ATQ非末端抗体と、第2の工程において抗APOA2-AT末端抗体と共に用いる抗APOA2-AT非末端抗体は、抗APOA2タンパク質非末端抗体として同一であってもよい。例えば、第1の工程において抗APOA2-AT非末端抗体を、また第2の工程において抗APOA2-ATQ非末端抗体を用いることができる。

10

(第3の工程)

第3の工程では、第1の工程で得たAPOA2-ATQタンパク質の量の測定値と第2の工程で得たAPOA2-ATタンパク質の量の測定値を、予め設定した判別式に入力して被験体における判別値を求め、健常体における判別値と比較して統計学的に有意に差があるときに胆道癌に罹患していると決定する。ここで用いる判別式は、後述する方法にて設定することができる。

20

【0094】

また、判別値を求めなくても、被験体から採取された試料中のAPOA2-ATQタンパク質又はAPOA2-ATタンパク質のどちらか一方の量が、健常体から採取された検体中の量と比べて統計学的に有意に差がある場合、具体的には測定された量が有意に少ない場合にも、被験体が胆道癌に罹患していると簡便に決定できる場合がある。

【0095】

本発明による胆道癌の検出方法は、該被験体の体液試料中における既知の胆道癌マーカーや、その他の判別方法と組み合わせて判別することもできる。既知の胆道癌マーカーとしては、例えば、シアリルLewis A抗原である「CA19-9」(Carbohydrate Antigen 19-9)や、ムチン様糖蛋白である「DU-PAN-2」(Pancreatic cancer-associated antigen-2)を用いることができる(臨床検査データブック 2013-2014、高久史磨監修、医学書院、p.636-638)。胆道癌判別を行う際の基準値は、CA19-9では37(U/mL)以下であり、DU-PAN-2では150(U/mL)以下である。CA19-9、DU-PAN-2の量は、例えばELISA法によって測定することができるが、この方法に限られない。

30

【0096】

本発明による胆道癌の検出方法は、APOA2-Aタンパク質等、APOA2タンパク質のその他のバリエーション、又はAPOA2タンパク質の総量と組み合わせて利用することもでき、本発明にはかかる態様も包含される。

40

【0097】

「健常体」とは、少なくとも胆道癌に罹患していない個体、好ましくは健康な個体をいう。さらに、健常体は、被験体と同一の生物種であることを要する。例えば、検出に供する被験体がヒト(被験者)の場合には、健常体もヒト(本明細書では、以降「健常者」とする)でなければならぬ。健常体の身体的条件は、被験体と同一又は近似することが好ましい。身体的条件とは、例えば、ヒトの場合であれば、人種、性別、年齢、身長、体重等が該当する。

【0098】

50

健常体の体液中における胆道癌検出用マーカーの量は、前記胆道癌検出用マーカー測定工程に記載の測定方法と同様の方法で測定することが好ましい。健常体の体液中における胆道癌検出用マーカーの量は、被験体の体液中における胆道癌検出用マーカーの量を測定する都度、測定することもできるが、予め測定しておいた胆道癌検出用マーカーの量を利用することもできる。特に、健常体の様々な身体的条件における胆道癌検出用マーカー量の量を予め測定しておき、その値をコンピューターに入力してデータベース化しておけば、被験体の身体的条件を当該コンピューターに入力することで、その被験体との比較に最適な身体的条件を有する健常体の胆道癌検出用マーカーの量を即座に利用できるのも便利である。

#### 【0099】

本明細書において、「統計学的に有意」とは、例えば、得られた値の危険率（有意水準）が小さい場合、具体的には、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 又は $p < 0.001$ の場合が挙げられる。ここで、「 $p$ 」又は「 $p$ 値」とは、統計学的検定において、統計量が仮定した分布の中で、仮定が偶然正しくなる確率を示す。したがって「 $p$ 」又は「 $p$ 値」が小さいほど、仮定が真に近いことを意味する。「統計学的に有意に差がある」とは、被験体と健常体のそれぞれから得られた胆道癌検出用マーカーの量、又は判別式に入力して得た判別値の差異を比較したときに両者間に有意に差があることをいう。健常体との比較において、統計学的に有意に差がある場合、その被験体は胆道癌に罹患していると評価する。統計学的処理の検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定しない。例えば、スチューデント $t$ 検定法、多重比較検定法を用いることができる。

#### 【0100】

本明細書において、「判別式」は、多変量解析によって構築される式であって、1つ以上の値セットによって特徴づけられ、最終的に判別値を算出する。「多変量解析」とは、本明細書では胆道癌検出用マーカーの測定値を使用して判別式を構築するために使用される数学的手法である。また、明細書において、「値セット」とは、胆道癌検出用マーカーの特徴についての値の組み合わせ又は値域である。この値セット及びその中の値の性質は、胆道癌検出用マーカーに存在する特徴のタイプ及び値セットを指示する判別式を構築するために使用される多変量解析に依存的である。

#### 【0101】

本明細書において、「判別値」は、判別式から算出される値であって、被験体が胆道癌に罹患しているであろう予測の指標として利用できる。一つの具体例において、判別値により被験体が胆道癌に罹患していると予測できる。もう一つの例において、判別値により被験体が胆道癌に罹患していないと予測できる。

#### 【0102】

判別式は、データ解析アルゴリズムを用いた多変量解析によって構築することができる。判別式の構築に使用できるデータ解析アルゴリズムとしては、ロジスティック回帰分析を含む一般化線形モデル、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン（SVM）、判別分析、ノンパラメトリック手法、PLS（Partial Least Squares）、決定木、主成分分析、一般化加法モデル、ファジィ論理、SOM（Self-organizing maps）、又は遺伝的アルゴリズムが挙げられる。中でもロジスティック回帰分析、ニューラルネットワーク、SVM、又は判別分析が好適である。ただし、これらのデータ解析アルゴリズムに限定されない。これらの統計的方法に関する詳細は、以下の参考文献：Ruczinski, I.ら、2003年、Journal of Computational and Graphical Statistics, 第12巻、p. 475 - 511; Friedman, J., Journal of the American Statistical Association, 1989年、第84巻、p. 165 - 175; Hastie, T.ら著、2001年、The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics; Breiman, L.著、1984

10

20

30

40

50

年、Classification and regression trees, Chapman and Hall: Breiman, L., 2001年、Machine Learning, 第45巻、p. 5 - 32; Pepe, M. 著、2003年、The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series; ならびに Duda, R. 著、2000年、Pattern Classification, Wiley Interscience, 第2版中に見られる。

#### 【0103】

本発明において、前記判別式を用いた解析は、以下に示す工程で行われる。まず、判別を行いたい事象を目的変数として設定する。「目的変数」とは、判別式において判別を行いたい事象である。本発明においては、被験体の胆道癌に関する罹患の有無が該当する。例えば、ロジスティック回帰分析であれば、目的変数は、被験体が胆道癌患者である場合に「1」、健常者である場合に「0」、と設定することができる。次に、目的変数を予測するための説明変数を設定する。「説明変数」とは、判別式において、前記目的変数の予測のために使用する変数である。例えば、ロジスティック回帰分析であれば、説明変数として、胆道癌検出用マーカー、すなわち、APOA2 - ATQタンパク質及びAPOA2 - ATタンパク質の測定値を設定することができる。次に、前述したいずれかのデータ解析アルゴリズムを使用して、説明変数を組み合わせた判別式を構築し、判別値を算出する。得られた判別値に基づいて、判別を行いたい事象の予測を行う。例えば、ロジスティック回帰分析であれば、判別値により、被験体が胆道癌患者(すなわち「1」)、又は健常体(すなわち「0」)であると予測できる。最終的に、事象の予測結果と、目的変数の値を比較し、判別式の判別性能を評価する。ここで、「判別性能」とは、判別を行いたい事象をどの程度正確に予測できたかという指標のことを指す。判別性能としては、症例データの判別成績(感度、特異度)、又はAUC値を利用することができる。胆道癌の罹患の有無を決定し、又は罹患の可能性を評価するためには、判別式から得られた判別値を基準に行うと良い。

#### 【0104】

本明細書において、「AUC (area under the curve: 曲線下面積) 値」とは、受信者動作特性曲線(ROC曲線)下の面積を意味し、患者を陽性群と陰性群に分けるための予測、判定、検出又は診断の方法の精度を測る指標となる。これらの曲線では、評価対象となる方法が示す結果に関して、陽性患者において陽性の結果が得る確率(感度)と、陰性患者において陰性の結果が得る確率(特異性)を1から減算した値(偽陽性率)がプロットされる。

#### 【0105】

本明細書において、「感度」とは、(真陽性の数)/(真陽性の数+偽陰性の数)の値を意味する。感度が高ければ胆道癌の早期発見が可能となり、完全な患部の切除や再発率の低下に繋がる。

#### 【0106】

本明細書において、「特異度」とは、(真陰性の数)/(真陰性の数+偽陽性の数)を意味する。特異度が高ければ健常体を胆道癌患者と誤判別することによる無駄な追加検査の実施を防ぎ、患者の負担の軽減や医療費の削減につながる。

#### 【0107】

以下に、APOA2タンパク質のバリエーションの測定値を用いて、ロジスティック回帰分析を使用した判別式によって、被験体の胆道癌への罹患の有無を解析する方法を具体的に示す。

#### 【0108】

##### 2-2-1. ロジスティック回帰分析を用いた判別法

胆道癌への罹患の有無を決定し又は罹患の可能性を評価するための分析法としては、ロジスティック回帰分析を用いて判別式を得る方法を使用できる。

10

20

30

40

50

## 【0109】

まず、臨床情報から、全被験体を胆道癌患者と、健常体の2群に群分けし、目的変数として胆道癌患者を「1」、健常体を「0」と設定する。次に、それらの臨床情報を持つ生体試料から得たAPOA2タンパク質の2種のパリアントの測定値から判別式を設定する。判別式は、説明変数としてAPOA2-ATQタンパク質の測定値とAPOA2-ATタンパク質の測定値、及び/又はAPOA2-ATタンパク質の測定値とAPOA2-ATQタンパク質の測定値の積を変数として含むロジスティック回帰式として、予め設定することができる。ロジスティック回帰式の判別式としての妥当性は、最尤法(maximum likelihood method)の範疇に属するAIC値(赤池情報量規準)、又はSchwarzのBIC値等の指標を用いて評価できる。

10

## 【0110】

ロジスティック回帰式としては、数式1、数式2、数式3のように、説明変数としてAPOA2-ATQタンパク質の測定値、APOA2-ATタンパク質の測定値、APOA2-ATタンパク質の測定値とAPOA2-ATQタンパク質の測定値の積が含まれる式が利用できる。

## 【0111】

・数式1:  $a \times (\text{APOA2} - \text{ATQ}) + b \times (\text{APOA2} - \text{AT}) + d$

・数式2:  $a \times (\text{APOA2} - \text{ATQ}) + b \times (\text{APOA2} - \text{AT}) + c \times (\text{APOA2} - \text{ATQ}) \times (\text{APOA2} - \text{AT}) + d$

・数式3:  $c \times (\text{APOA2} - \text{ATQ}) \times (\text{APOA2} - \text{AT}) + d$

20

(数式1~3において、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ はゼロでない任意の実数、 $(\text{APOA2} - \text{ATQ})$ はAPOA2-ATQタンパク質の測定値、 $(\text{APOA2} - \text{AT})$ はAPOA2-ATタンパク質の測定値である。)

ロジスティック回帰式として判別式を得た場合には、被験体と健常体から得られたAPOA2-ATQタンパク質又はAPOA2-ATタンパク質の測定値を前記ロジスティック回帰式に入力して得た判別値を比較し、被験体が胆道癌に罹患していると決定することができる。例えば、前記統計学的に有意に差のあるときの被験体の判別値が、健常体の判別値の3分の2以下である場合に、より好ましくは2分の1以下、さらに好ましくは4分の1以下である場合に、被験体が胆道癌に罹患していると決定することができる。

## 【0112】

## 3. 胆道癌検出用キット

本発明の第三の態様は、胆道癌検出用キットである。

30

## 【0113】

本明細書において「胆道癌検出用キット」とは、胆道癌への罹患の有無、罹患の程度若しくは改善の有無や改善の程度を評価するために、また胆道癌の予防、改善又は治療に有用な候補物質をスクリーニングするために、直接又は間接的に利用されるものをいう。

## 【0114】

本態様のキットは、その構成物として、胆道癌への罹患に関連して体液試料中、特に血液、血清、血漿において発現が変動するAPOA2タンパク質のパリアント、好ましくは配列番号1及び2で示されるAPOA2タンパク質の2種のパリアントを特異的に認識し、また結合可能な物質が包含される。具体的には、例えば、抗APOA2タンパク質末端抗体等若しくはその断片又はそれらの化学修飾誘導体が含まれる。これらの抗体は、上記のような固相担体に結合されていてもよく、この場合、好ましくは上記のような検査用ストリップに結合されていてもよい。その他、例えば、標識二次抗体、さらには標識の検出に必要な基質、担体、洗浄バッファー、試料希釈液、酵素基質、反応停止液、精製された標準物質としてのAPOA2タンパク質、使用説明書等を含んでいてもよい。

40

## 【実施例】

## 【0115】

本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明する。ただし、以下の実施例は、本発明の一例示であって、本発明はこの実施例によって制限されないものとする。

50

(比較例1) 血中APOA2-ATQタンパク質の量による胆道癌の判別

国立がんセンター中央病院において、インフォームドコンセントを得た胆道癌患者44名と健常者109名から採取した血漿を対象に、ELISA法により血中APOA2-ATQタンパク質の検出を行った。

【0116】

血中APOA2-ATQタンパク質の量の測定は、抗APOA2-ATQ末端モノクローナル抗体7F2のPOD標識体と、APOA2タンパク質のC末端領域以外の部位を認識する抗APOA2タンパク質非末端ポリクローナル抗体(Fitzgerald社)を用いたサンドイッチELISA法により行った。抗体7F2のPOD標識化はPEROXIDASE LABELING KIT-SH(同仁化学社)を用いて行い、詳細は付属の10  
 プロトコールに従った。抗APOA2タンパク質非末端ポリクローナル抗体をPBS溶液で2µg/mLに調製した後、Nuncイムノプレートマキシソープ(Thermo Fisher Scientific社製)のウェルに100µLずつ入れ、一晚固相化した。翌日、前記溶液を廃棄し、PBS-T(0.05%TWEEN20、PBS)を400µL添加して洗浄し、ブロッキングバッファー(1%BSA、0.05%TWEEN20、PBS)溶液400µLを添加して1時間室温で静置した。その後、前記溶液を廃棄し、抗体固相化プレートとした。次に、希釈液を用いて希釈した血漿を、各ウェルに100µLずつ添加し1時間室温で反応させた。この際、血漿の希釈倍率は10000倍とした。ウェル内の抗原溶液を廃棄後、PBS-Tによる洗浄を行い、希釈液で0.2µg/mLに希釈した抗体7F2のPOD標識体100µLを添加し、1時間室温で反応させた。PBS-T(ピラス社製)による洗浄を行った後、TMB溶液100µLを添加して酵素反応を行い、0.5N硫酸溶液100µLを添加して反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。得られた測定値に対して、組換え型ヒト由来タンパク質APOA2-ATQタンパク質の抗原溶液を標品として、血中のタンパク質濃度を算出した。図1に、健常者と胆道癌患者について、血中のタンパク質濃度をプロットした結果を示す。健常者と胆道癌患者の分布は重なっており、判別が困難であることが明らかとなった。次に、APOA2-ATQタンパク質の測定値を用いて、以下の統計処理により、健常者と胆道癌患者の判別を行った。目的変数として、胆道癌患者を「1」、健常者を「0」と定義し、APOA2-ATQタンパク質の測定値を説明変数として、ロジスティック回帰分析を行い、判別式とAUC値を算出した。本手法はAUC値=0.782を示し、胆道癌判別性能が高いとは言えないことが明らかとなった。30

(比較例2) 血中APOA2-ATタンパク質の量による胆道癌の判別

血中APOA2-ATタンパク質の量の測定は、比較例1と同様の血漿を対象に、前記抗APOA2-AT末端ポリクローナル抗体と前記抗APOA2タンパク質非末端ポリクローナル抗体のPOD標識体を用いたサンドイッチELISA法により行った。抗APOA2タンパク質非末端ポリクローナル抗体のPOD標識化、及びサンドイッチELISAについても、比較例1と同様に行った。得られた測定値に対して、組換え型ヒト由来タンパク質APOA2-ATタンパク質の抗原溶液を標品として、血中のタンパク質濃度を算出した。また、血漿の希釈倍率は6000倍とした。図2に、健常者と胆道癌患者について、血中のタンパク質濃度をプロットした結果を示す。健常者と胆道癌患者の分布は重なっており、判別が困難であることが明らかとなった。次に、APOA2-ATタンパク質の測定値を用いて、以下の統計処理により、健常者と胆道癌患者の判別を行った。目的変数として、胆道癌患者を「1」、健常者を「0」と定義し、APOA2-ATタンパク質の測定値を説明変数として、ロジスティック回帰分析を行い、判別式とAUC値を算出した。本手法はAUC値=0.770を示し、胆道癌判別性能が高いとは言えないことが明らかとなった。40

(実施例1) 血中APOA2-ATQタンパク質と血中APOA2-ATタンパク質の量の積による胆道癌の判別

比較例1及び2の結果、APOA2タンパク質バリエーション(APOA2-ATQとAPOA2-AT)のそれぞれの量の測定値を用いて胆道癌患者と健常者の判別を行ったとこ50

る、判別性能は低いことが示された。そのため、次に、前記2種のAPOA2タンパク質バリエーションの量を組み合わせることにより、胆道癌の判別を試みた。図3に、比較例1と2で得られたAPOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の血中濃度をプロットした散布図を示す。その結果、健常者と胆道癌患者は散布図上で異なる分布を示すことが明らかとなった。図4に、健常者と胆道癌患者について、APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の濃度の積をプロットした結果を示す。図1及び2と比較して、健常者と胆道癌患者の分布が分かれ、判別しやすくなっている。

【0117】

次に、前記2種のAPOA2タンパク質バリエーションの量の測定値の積を用いて、以下の統計処理により、健常者と胆道癌患者の判別を行った。目的変数として、胆道癌患者を「1」、健常者を「0」と定義し、比較例1及び比較例2で得られた前記2種のAPOA2タンパク質バリエーションの測定値の積を説明変数としてロジスティック回帰分析を行い、判別式とAUC値を算出した。作成した判別式は以下に示す通りとなった。

【0118】

$$\cdot \text{数式3} : c [(APOA2 - ATQ) \times (APOA2 - AT)] + d$$

(式中、c, dはゼロでない任意の実数、APOA2-ATQは、APOA2-ATQタンパク質の前記測定値、APOA2-ATは、APOA2-ATタンパク質の量の前記測定値を表す。)

本手法はAUC値 = 0.937を示し、比較例1及び2と比べて、非常に高い胆道癌判別精度を示すことが確かめられた。

(実施例2) 血中APOA2-ATQタンパク質と血中APOA2-ATタンパク質の量を組み合わせた胆道癌の判別

APOA2タンパク質バリエーションであるAPOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の量の測定値を用いて、以下の統計処理により、健常者と胆道癌患者の判別を行った。目的変数として、胆道癌患者を「1」、健常者を「0」と定義し、比較例1及び比較例2で得られた2種のAPOA2タンパク質バリエーション(APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質)の測定値を説明変数として、ロジスティック回帰分析を行い、判別式とAUC値を算出した。作成した判別式は以下に示す通りとなった。

【0119】

$$\cdot \text{数式1} : a (APOA2 - ATQ) + b (APOA2 - AT) + d$$

(式中、a, b, dはゼロでない任意の実数、APOA2-ATQは、APOA2-ATQタンパク質の前記測定値、APOA2-ATは、APOA2-ATタンパク質の量の前記測定値を表す。)

本手法はAUC値 = 0.943を示し、比較例1及び2と比べて、非常に高い胆道癌判別精度を示すことが確かめられた。

(実施例3) 血中APOA2-ATQタンパク質量と血中APOA2-ATタンパク質量、及び血中APOA2-ATQタンパク質量と血中APOA2-ATタンパク質量の積を組み合わせた胆道癌の判別

APOA2タンパク質バリエーションであるAPOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の量の測定値と、その積を用いて、以下の統計処理により、健常者と胆道癌患者の判別を行った。目的変数として、胆道癌患者を「1」、健常者を「0」と定義し、比較例1及び比較例2で得られた2種のAPOA2タンパク質バリエーション(APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質)の測定値とその積を説明変数としてロジスティック回帰分析を行い、判別式とAUC値を算出した。作成した判別式は以下に示す通りとなった。

【0120】

$$\cdot \text{数式2} : a (APOA2 - ATQ) + b (APOA2 - AT) + c [(APOA2 - ATQ) \times (APOA2 - AT)] + d$$

(式中、a, b, c, dはゼロでない任意の実数、APOA2-ATQは、APOA2-ATQタンパク質の前記測定値、APOA2-ATは、APOA2-ATタンパク質の量の前記測定値を表す。)

表1に、得られた判別式における、AUC値、症例データの判別成績(感度、特異度)の算出結果と、前記比較例1及び2と実施例1及び2で得られた結果を示す。APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の測定値のいずれか一方を説明変数とした場合、特異度97%の条件下において、感度は22%となった。一方、APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の測定値の積を説明変数とした場合、感度は65%となった。APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の測定値を説明変数とした場合、感度は70%となった。さらに、APOA2-ATQタンパク質、APOA2-ATタンパク質の測定値とその積を説明変数とした場合、AUC値=0.946へと向上するとともに感度も72%へと向上した。その結果、比較例1及び2と比べて、高感度な胆道癌検出が可能となることが確認された。

10

【0121】

【表1】

説明変数	AUC	感度:%(人)	特異度:%(人)
ATQ	0.782	22(10)	97(106)
AT	0.770	22(10)	97(106)
AT×ATQ	0.937	65(29)	97(106)
AT, ATQ	0.943	70(31)	97(106)
ATQ, AT, AT×ATQ	0.946	72(32)	97(106)

20

胆道癌患者44人と健常者109人を対象として判別を行った結果を示す。ATQ、ATはELISA法におけるAPOA2-ATQタンパク質、APOA2-ATタンパク質の量を、AT×ATQはその積を示す。

【0122】

(比較例3) CA19-9を用いた早期胆道癌の判別

CA19-9を用いて早期胆道癌の判別を行った。早期胆道癌患者は、前記実施例1で用いた胆道癌患者のうち、UICC(Unio Internationalis Contra Cancrum)のステージ分類において、0、IA、IB、IIA、IIB、である12名を対象とし、健常者109名との判別を行った。CA19-9を用いた判別は、次に示す通りに行った。被験者から採集した血漿を対象にCA19-9の量を、免疫学的方法により測定した。通常、CA19-9により健常者と胆道癌患者の判別を行う際、37(U/mL)以下を基準値とし、CA19-9の量が基準値内である場合を健常者、基準値を上回る場合は胆道癌患者であると判別される(臨床検査データブック2013-2014、高久史磨監修、医学書院、p.636-637)。本比較例では、前記基準値をもとに、CA19-9を用いて胆道癌と健常者を判別した。その結果、胆道癌の判別性能は、感度は41%(特異度95%)となり、胆道癌の検出性能は低いことが確認された。

30

(実施例4) APOA2を用いた早期胆道癌の判別

40

APOA2タンパク質バリエーションであるAPOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の量の測定値を用いて早期胆道癌の判別を行った。早期胆道癌患者は、前記比較例3と同様の検体を対象とした。本手法では、前記実施例3において健常者と胆道癌患者の判別に用いた際と同様の判別式(APOA2-ATQタンパク質、APOA2-ATタンパク質、APOA2-ATQタンパク質とAPOA2-ATタンパク質の測定値の積、の組み合わせ)を用いて判別を行った。その結果、判別性能は、感度58%(特異度97%)となり、前記CA19-9を用いた判別法と比較して、高精度な胆道癌検出が可能となることが確認された。

【0123】

以上、実施例1~4の結果から、本発明は、APOA2タンパク質のバリエーションの量の

50

測定値について判別式を用いた解析を行うことで、これまで困難とされてきた早期胆道癌（ステージⅠ、Ⅱ）を含む胆道癌の高感度検出において有用であることが判明した。

【産業上の利用可能性】

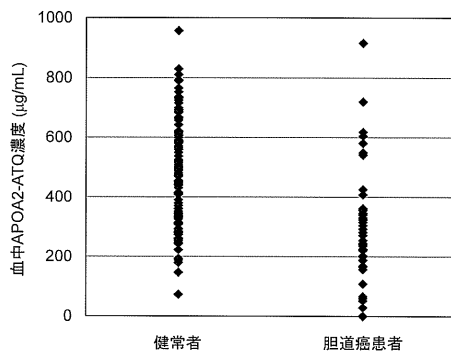
【0124】

本発明により、簡易かつ非侵襲的な方法で、胆道癌をハイスループットに検出することができ、胆道癌の早期発見が可能になる。

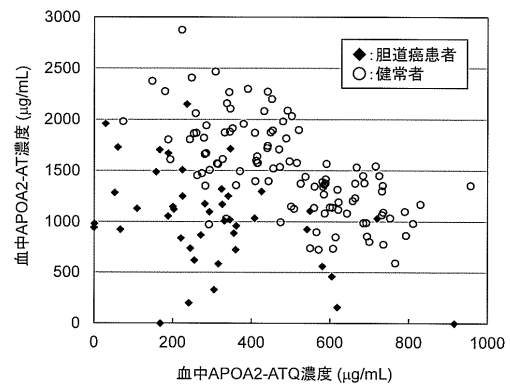
【0125】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

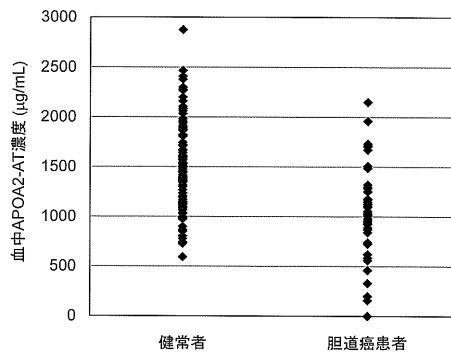
【図1】



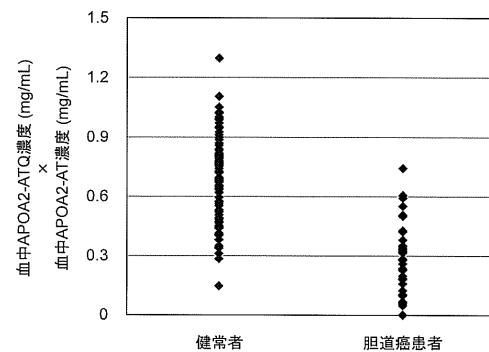
【図3】



【図2】



【図4】



**【配列表】**

0006677655000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 小林 道元  
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内
- (72)発明者 高山 愛子  
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内
- (72)発明者 笹島 義志  
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内
- (72)発明者 鄭 基晩  
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内
- (72)発明者 山田 哲司  
東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内
- (72)発明者 本田 一文  
東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 特開2010-175452(JP,A)  
特表2010-533855(JP,A)  
特表2008-527351(JP,A)  
国際公開第2015/050107(WO,A1)  
HONDA Kazufumi et al., Altered Plasma Apolipoprotein Modifications in Patients with Pancreatic Cancer: Protein Characterization and Multi-Institutional Validation, PLOS ONE, 2012年10月8日, Vol.7, No.10, e46908

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
Caplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)