

(43) 国際公開日
2006 年 4 月 27 日 (27.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/043362 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 33/574
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/014567
 (22) 国際出願日: 2005 年 8 月 9 日 (09.08.2005)
 (25) 国際出願の言語: 日本語
 (26) 国際公開の言語: 日本語
 (30) 優先権データ:
 特願 2004-303688
 2004 年 10 月 19 日 (19.10.2004) JP
 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学
 法人熊本大学 (KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目 3 9 番 1 号 Ku-
 mamoto (JP).
 (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西村 泰治
 (NISHIMURA, Yasuharu) [JP/JP]; 〒8620937 熊本県
 熊本市長嶺西 2 丁目 9 - 5 2 Kumamoto (JP). 中面

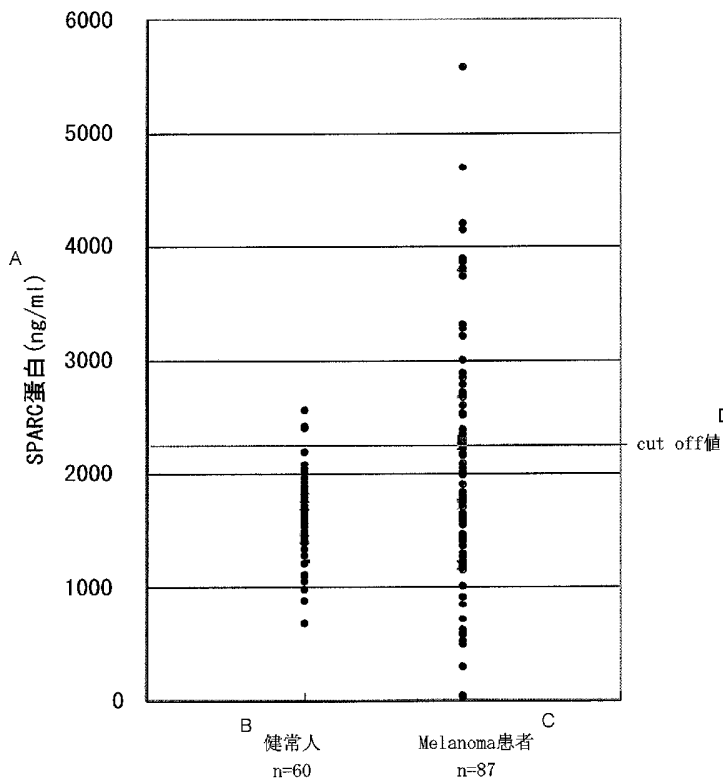
哲也 (NAKATSURA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒8611115 熊
 本県菊池郡合志町豊岡 2 5 2 7 - 4 6 4 Kumamoto
 (JP). 生田 義明 (IKUTA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒8618034
 熊本県熊本市八反田 3 - 1 6 - 4 6 Kumamoto (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &
 CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号
 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護
 が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
 BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
 DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
 HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK,
 LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
 MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
 SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
 TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
 能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL DIAGNOSTIC KIT FOR MALIGNANT MELANOMA

(54) 発明の名称: 悪性黒色腫 (メラノーマ) の新規な診断キット



A... SPARC PROTEIN (ng/ml)
 B... HEALTHY SUBJECT n=60
 C... MELANOMA PATIENT n=87
 D... CUT OFF VALUE

(57) Abstract: It is intended to find another tumor marker useful for the early diagnosis of melanoma and to provide, utilizing the same, a diagnostic kit for malignant melanoma and method of diagnosis therefor. There is provided a diagnostic kit for malignant melanoma, comprising an antibody against SPARC and an antibody against GPC3.

(57) 要約: 本発明の目的は、メラノーマの早期診断に有用な他の腫瘍マーカーを見出し、これを利用した悪性黒色腫 (メラノーマ) の診断キット、及び診断方法を提供することである。本発明によれば、SPARCに対する抗体、及びGPC3に対する抗体を含む、悪性黒色腫 (メラノーマ) の診断キットが提供される。



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

悪性黒色腫(メラノーマ)の新規な診断キット

技術分野

[0001] 本発明は、悪性黒色腫(メラノーマ)の新規な診断キット、及び診断方法に関する。

背景技術

[0002] メラノーマは、悪性黒色腫と呼ばれる皮膚癌の一種である。皮膚癌にもいろいろ種類があるが、メラノーマは、悪性度が最も高い皮膚癌で、非常に恐れられている。皮膚を構成している細胞のなかに、メラニン色素を産生する細胞があり、これを色素細胞(メラノサイト)と呼ぶが、この細胞が癌化したものがメラノーマである。

[0003] 日本におけるメラノーマの発生数は人口10万人あたり1.5～2人くらいと言われ、年間1500人～2000人くらい発生していると推測されている。欧米では人口10万人あたり10数人以上の発生と言われ、オーストラリアでは人口10万人あたり20数人以上の発生で世界一発生数が高いと言われている。それだけに欧米やオーストラリアの人々はメラノーマに関心を持ち、メラノーマの発生に注意をしている。また、驚くことに外国でも日本でもメラノーマの発生は年々増加傾向が認められている。最近の調査では、日本におけるこの病気による年間死亡者数は450人前後もいる。メラノーマは何歳の人でも発生しているが、特に40歳以上になると発生が多くなり、60歳～70歳台が最も多くなっている。小児の発生は非常に少ないが、発生しないということはなく、最近20～30歳台の若年者の発生が多くなっている傾向がある。性別では特にどちらかに多いという傾向はなく、男女どちらにも発生する。日本人のメラノーマが発生しやすい部位は、足底(足のうら)が最も多く、約3割ぐらゐを占めている。足や指の爪の部分にも多くできることが、日本人の特徴である。そのほか、欧米人と同様に体、手、足、顔、頭など、どここの皮膚にも発生する。

[0004] 一方、血清腫瘍マーカーの測定は、メラノーマの診断のみならず、術後症例における再発の早期発見と、進行期例の治療効果の判定に重要である。メラノーマの腫瘍マーカーとしては、これまでに血清のLDHや5-S-cysteinyl dopa (5-S-CD)の有用性が知られていたが、さらに近年、S-100 β 蛋白およびmelanoma inhibitory activity (MI

A)がより鋭敏なマーカーとして報告されている。本邦では、5-S-CDが広く用いられている。しかし、いずれの腫瘍マーカーも、Stage IVといったかなり進行したものでないと陽性にならず、メラノーマの診断や、術後再発の早期発見という面では、有用性は限られているといわざるを得ない。

- [0005] 本発明者等は先に、グリピカン3 (glypican-3; GPC3) が、分泌蛋白であり、ELISA法を用いて40%の肝細胞癌患者および40%のメラノーマ患者の血清中にグリピカン3 (glypican-3; GPC3)を検出することができ、これが、肝細胞癌の新しい腫瘍マーカーとして有用であることを報告した (Nakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 306, 16-25, 2003; 及び Nakatsura, T.ら, Clin. Cancer Res. 10, 6612-6621, 2004)。
- [0006] SPARC (Secreted protein, acidic rich in cysteine) (別名 osteonectin または BM-40) は骨の構成蛋白として、1981年に Termine らによって報告され、また基底膜の腫瘍の間質の構成成分として1987年に Mann らによって報告された (Termine JD ら, Cell, 26:99-105, 1981; 及び Mann K ら, FASEB J 218:167-172, 1987)。
- [0007] SPARC は様々な機能をもつ細胞間質糖蛋白である。その主な機能としては、細胞の癒着阻止、細胞の増殖阻止、細胞間質の調節などがある。(Bradshaw and Sage, J. Clin. Invest, 107:1049-1054, 2001; 及び Brekken and Sage, Matrix Biol., 2001; 19:816-827) コラーゲンなどの間質の構造蛋白を結合することで細胞間質と細胞との相互作用を調節している。
- [0008] 成人における SPARC は、骨、血小板、創傷部位あるいは腫瘍などの組織が改築をくり返している部位で高発現している。SPARC と腫瘍の関係については様々な癌腫で、多くの報告が行われており、腫瘍細胞あるいは腫瘍組織におけるホストの間質細胞、炎症細胞が SPARC を発現する。
- [0009] Ledda らは、免疫組織学的検査にて、ヒトメラノーマにおける SPARC の発現が、腫瘍の進行に相関することを報告した。(Ledda ら, J. Invest. Dermatol., 108, 210-214, 1997)。また Ledda らは、SPARC のアンチセンス発現ベクターを用いてヒトのメラノーマ細胞の SPARC の発現を抑えると、in vitro で接着性や浸潤性が失われ、in vivo での発癌性がなくなったことを報告した (Ledda ら, Nature Med., 3, 171-176, 1997)。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0010] メラノーマの腫瘍マーカーとしては、血清のLDHや本邦で広く用いられている5-S-cysteinyl dopa (5-S-CD)、さらに近年、より鋭敏なマーカーとして報告されている、S-100 β 蛋白およびmelanoma inhibitory activity (MIA)があるが、いずれの腫瘍マーカーも、Stage IVといったかなり進行したものでないと陽性にならず、メラノーマの早期診断や、術後再発の早期発見という面では、有用性は限られているといわざるを得ない。本発明は、メラノーマの早期診断に有用な他の腫瘍マーカーを見出し、これを利用した悪性黒色腫(メラノーマ)の診断キット、及び診断方法を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者等は、先に、肝細胞癌およびメラノーマの患者血清中に可溶性GPC3タンパク質を検出し、肝細胞癌およびメラノーマの新たな腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにした。本発明者等は今回、GPC3と同様にメラノーマ患者血清および血漿中に可溶性SPARCタンパク質を検出し、メラノーマに対する新規腫瘍マーカーになりうることを発見した。SPARCタンパク質はGPC3と同様に早期のメラノーマも検出でき、GPC3の測定を併用することでメラノーマの診断率を60%にまであげることができた。
- [0012] すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。
- (1) SPARCに対する抗体、及びGPC3に対する抗体を含む、悪性黒色腫(メラノーマ)の診断キット。
 - (2) サンプル中のSPARC及びGPC3を測定することを特徴とする、悪性黒色腫(メラノーマ)の診断方法。
- [0013] (3) サンプルとSPARCに対する抗体を接触させる工程、及びサンプルとGPC3に対する抗体を接触させることを含む、(2)に記載の診断方法。
- (4) サンプル中のSPARC及びGPC3を定量することを含む、(2)又は(3)に記載の診断方法。
 - (5) サンプルが血清あるいは血漿である、(2)から(4)の何れかに記載の診断方法。

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明者等は、Nakatsura, T.ら, Clin. Cancer Res. 10,6612-6621,2004に記載の方法を用い、SPARC及びGPC3の組み合わせがメラノーマの早期診断に有用な血清腫瘍マーカーであることを見いだした。
- [0015] ヒトSPARCタンパク質のアミノ酸配列は公知であり、例えばGenBankのタンパク質データベースにAccession No. NM 003118として登録されており、当業者であれば容易に入手することができる。
- [0016] ヒトGPC3タンパク質のアミノ酸配列は公知であり、当業者であれば容易に入手することができる。
- [0017] 本発明は、SPARCに対する抗体、及びGPC3に対する抗体を含む、悪性黒色腫（メラノーマ）の診断キットを提供する。本発明で用いるSPARCに対する抗体及びGPC3に対する抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、それらは当業者に公知の方法（例えば、「新生化学実験講座1,タンパク質1,389-406,東京化学同人」参照）により調製することが可能である。SPARCタンパク質及びGPC3タンパク質はアミノ酸配列が前記のように公知であり、該アミノ酸配列に基づいて通常のタンパク質発現技術を用いて製造することができ、また市販のもの（Zymed Laboratories, CA）を利用することも可能である。市販のSPARCまたはGPC3を用いる場合は、必要に応じてSDS-OutTM（Sodium Dodecyl Sulfate Precipitation Reagent; PIERCE, Rockford, ILより購入）を用いてSDSを除いて使用することが好ましい。またSPARCまたはGPC3の部分ペプチドは、SPARCまたはGPC3のアミノ酸配列から適当な部分配列を選択し、通常のペプチド合成技術を用いて製造できる。
- [0018] SPARCまたはGPC3に対するポリクローナル抗体の調製は、例えば、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの動物に適量のSPARCタンパク質またはGPC3タンパク質またはその部分ペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント（FIAやFCA）と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニ

ティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。

- [0019] 一方、SPARCまたはGPC3に対するモノクローナル抗体の調製は、例えば、SPARCタンパク質またはGPC3タンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。尚、本発明の目的のためには、抗体はSPARCまたはGPC3のいかなるエピトープを認識するものであってもよい。
- [0020] また、本発明では、上記した抗体の断片を使用してもよい。抗体の断片としては、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント等が挙げられる。
- [0021] 診断剤としての正確性のためには、SPARCに対する抗体またはGPC3に対する抗体はヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラ抗体であれば、SPARCタンパク質またはGPC3タンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトIgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞に導入することにより調製できる。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスにSPARCタンパク質またはGPC3タンパク質を免疫することにより調製することが可能である。
- [0022] 本発明の診断キットにおいて、限定するものではないが、SPARCに対する抗体、及びGPC3に対する抗体は、それぞれ例えば0.5 μ g/mlの濃度で用いることができる。本発明の診断キットには、上記したSPARCに対する抗体およびGPC3に対する抗体の他に、必要に応じて薬学的に許容される担体等を適宜含有させることができる。
- [0023] 本発明はさらに、サンプル中のSPARC及びGPC3を測定することを特徴とする、悪性黒色腫(メラノーマ)の診断方法を提供する。具体的には、サンプルとSPARCに対する抗体を接触させる工程、及びサンプルとGPC3に対する抗体を接触させる工程によって、サンプル中のSPARC及びGPC3を測定することができる。本発明にお

いて、サンプルは、メラノーマに罹患しているおそれのある被験者から得られる血清、唾液、尿等が挙げられるが、特に好ましくは血清である。サンプルと上記抗体との接触は、当分野において通常行われている方法に基づいて行えばよく、特に限定するものではない。診断は、例えばサンプルと上記抗体との接触の後、サンプル中に存在し得るSPARCと抗体との特異的結合、及びサンプル中に存在し得るGPC3と抗体との特異的結合を、蛍光物質や発光物質、酵素等で標識した二次抗体等を使用して定量的に検出することにより行うことができる。また、診断のための反応をウェル等の液相中で行ってもよく、あるいはSPARCに対する抗体、又はGPC3に対する抗体を固定した固相支持体上で行ってもよい。この場合、メラノーマに罹患していない正常なサンプル、あるいはメラノーマであることが判明しているサンプルを用いて予め作製した標準値と比較することによって、測定された値がメラノーマ陽性であるか否かを判定することができる。また、診断の際には、多数のメラノーマ患者と健常人の血清中SPARC量及びGPC3量を測定して、カットオフ値を設定することが好ましい。

[0024] SPARCに対する抗体及びGPC3に対する抗体を用いて、サンプル中のSPARC及びGPC3を免疫学的に検出する方法の具体例としては、サンドイッチELISA等の酵素免疫測定法(EIA)、又は放射性免疫測定法(RIA)などがあり、これらの技術は当業者に周知である。例えば、サンドイッチELISAでは、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を用意し、一方の抗体はプレートに吸着させておく。サンプルをプレートに接触させて反応を行い、さらに抗原認識部位の異なる他方の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素で標識した抗イムノグロブリン抗体を反応させる。酵素により発色する基質を添加して発色反応させた後、分光光度計により発色強度を測定することにより、サンプル中のSPARCおよびGPC3の検出または測定を行うことができる。また、放射性免疫測定法では、酵素でなく¹²⁵I等の放射性物質で標識した抗体を用いて、酵素免疫測定法と同様の操作を行い、シンチレーションカウンターで放射線を測定する。

[0025] 本発明の診断方法は、メラノーマに罹患しているか否かの診断に用いることができる他、メラノーマに対する治療の効果を確認するために経時的に行うこともできる。

[0026] 本発明のキットには、上記したSPARCに対する抗体およびGPC3に対する抗体が

少なくとも含まれ、その他に、サンプル中のSPARC及びGPC3を検出するのに必要な試薬(例えば、二次抗体、発色試薬、緩衝液など)を適宜含めることができる。

以下、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0027] [実施例1] マウス細胞株におけるSPARC mRNAの発現

逆転写-PCR(RT-PCR)を用いたSPARC mRNA発現を検討した。マウス細胞系であるB16, B16F1, B16F10, EL4 MCA,及びLLCは東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。

[0028] RT-PCRは公知の方法(例えばNakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944, 2001))に従って行った。533bpの断片を増幅するマウスSPARC遺伝子特異的PCRプライマーを設計し、これを用いて94℃、5分の初期変性、及び58℃のアニーリング温度での30増幅サイクルからなるRT-PCR反応を行った。用いたSPARC PCRプライマー配列は、

センス:5'-GTCCCACACTGAGCTGGC-3'(配列番号1)

アンチセンス:5'-AAGCACAGAGTCTGGGTGAGTG-3'(配列番号2)である。

[0029] マウス細胞系におけるSPARC mRNAの発現を比較した。結果を図1Aに示す。図1Aにおいて、レーン 1: B16, レーン2:B16-F1,レーン 3:B16-F10, レーン4:MCA, レーン5:NIH-3T3,レーン6:LLC, 及びレーン7: EL4を示す。

[0030] 図1Aの結果から分かるように、B16 ,B16F1 及びB16F10 メラノーマ細胞系においてSPARC mRNAの強い発現が示された。MCA, LLC,NIH/3T3においても発現を認めたが、EL4においてはそのような発現は見られなかった(図1A)。

[0031] [実施例2] ヒトメラノーマ細胞株におけるSPARC mRNAの発現

逆転写-PCR(RT-PCR)を用いて、SPARC mRNA発現を検討した。メラノーマ細胞系であるG361, CRL1579, SK-MEL-28及びHMV-Iは東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。526mel, 888melは慶応大学のY. Kawakami博士よりご供与頂いた。また164, SK-MEL-19, HM3KO, MEWO, colo38は熊本大学のT. Kageshita博士よりご供与頂いた。さらに、正常ヒト表皮メラニン細胞NHEMは、ク

ラボウ(倉敷紡績株式会社)より購入した。

[0032] RT-PCRは公知の方法(例えばNakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun . 281, 936-944 (2001))に従って行った。343bpの断片を増幅するヒトSPARC遺伝子特異的PCRプライマーを設計し、これを用いて94℃、5分の初期変性、及び58℃のアニーリング温度での26増幅サイクルからなるRT-PCR反応を行った。用いたSPARC PCRプライマー配列は、

センス:5'-CGAAGAGGAGGTGGTGGCGGAAAA-3'(配列番号3)

アンチセンス:5'-GGTTGTTGTCCTCATCCCTCTCATAC-3'(配列番号4)であり、
対照実験のための β -アクチン PCRプライマー配列は、

センス:5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'(配列番号5)

アンチセンス:5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'(配列番号6)である。

[0033] 対照である β -アクチンmRNAによる標準化の後、メラノーマ細胞系におけるSPARC mRNAの発現を比較した。結果を図1Bに示す。図1Bにおいて、レーン1:164, レーン2:888, レーン3:HM3KO, レーン4:CRL1579, レーン5: 526mel, レーン6:G361, レーン7:MEWO, レーン8:SK-MEL-28, レーン9: SK-MEL-19, レーン10:Colo38, レーン11:HMV-I,及びレーン12: NHEM (melanocyte)を示す。

[0034] 図1Bの結果から分かるように、164, 888mel, HM3KO, CRL1579, 526mel, G361, MEWO, SK-MEL-28, SK-MEL-19, colo38, NHEMは発現の上昇を認めたが、HMV-Iではそのような発現は見られなかった。尚、正常メラノサイトにも発現がみられた。

[0035] [実施例3]ヒトメラノーマ組織におけるSPARC蛋白の発現

Western blotting法を用いて、ヒト正常皮膚、ヒト色素性母斑、ヒトメラノーマ組織におけるSPARC蛋白の発現を調べた。検体は、熊本大学医学部皮膚科学講座において治療されたインフォームドコンセントの得られたものを、T.Kageshita博士より御供与頂いた。

[0036] Western blottingは公知の方法で行った。サンプルを7%アクリルアミドゲルにて電気泳動ののち、ニトロセルロースメンブレン(Bio Rad)へtransferし、5%スキムミルク、1%BSAを加えた0.2%Tween20-TBS溶液にてブロッキング(4℃、一晚)した。HSP105マウスモノクローナル抗体(Haematologic Technologies, USA)および、対照としてマウ

スモノクローナル β -アクチン抗体(Sigma)を1次抗体として1時間室温でインキュベーションし、洗浄の後HRP 標識抗マウス抗体、HRP標識抗マウス抗体(Amersham Bioscience)にて30分インキュベーションし、洗浄の後、ECL Western Blotting detection Reagents (Amersham Bioscience)にて検出した。

[0037] 結果を図2に示す。図2において、レーン1:母斑, レーン2:患者1(末端黒子型)正常皮膚, レーン3:患者1斑, レーン4:患者1メラノーマ, レーン5:患者2(末端黒子型)正常皮膚, レーン6:患者2斑, レーン7:患者2メラノーマ, レーン8:患者3(表在拡大型)メラノーマ, レーン9:患者4(表在拡大型)正常皮膚, レーン10: 患者4(表在拡大型)斑, レーン11: 患者4(表在拡大型)メラノーマ, レーン12:患者5(表在拡大型)メラノーマ転移を示す。

[0038] 図2の結果から分かるように、母斑、正常皮膚、斑ではSPARC蛋白の発現はわずかであったが、すべてのメラノーマ組織でSPARC蛋白は高発現していた。

[0039] [実施例4]メラノーマ細胞系の培養上清及びメラノーマ患者血清中の可溶性SPARC蛋白質の存在

96ウェルのELISAプレート(Nunc, Denmark)を室温で一晩、PBS、pH7.4中0.05 μ g/ウェルの抗-ヒトSPARCモノクローナル抗体(Zymed laboratories, San Francisco)でコートした。次いで、100%ブロックエース(大日本製薬株式会社)を用い、室温で1時間、プレートをブロッキングした。陽性対照の標準サンプル及び培養上清、10%ブロックエースで200倍希釈した患者血清をビオチン化抗-ヒトSPARCポリクローナル抗体(R&D system, minneapolis)と共に添加し、室温で2時間インキュベーションした。PBSで3回洗浄した後、各ウェルにHRP-コンジュゲートストレプトアビジン(ENDOGEN, Woburn)を添加した。30分のインキュベーションの後、プレートをPBSで3回洗浄し、TMB基質溶液(ENDOGEN)を添加した。解析のためにELISAリーダー(モデル550、Bio-Rad)を450nmで用いた。

[0040] インフォームドコンセントを得た後、熊本大学医学部皮膚科学講座において治療を受けたメラノーマ患者から血清サンプルを得た。SPARCはその名の通り、分泌蛋白であり、メラノーマにおいてSPARCタンパク質が分泌されるかどうかの検出を試みた。

- [0041] 抗-ヒトSPARC抗体及びビオチン化抗-ヒトSPARCポリクローナル抗体を用いて酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)による検出を行った。市販のSPARCタンパク質(Haematologic Technologies, USA)を用い、ELISA系におけるSPARCの定量の精度を確認した。SPARCタンパク質の連続希釈を用い、ODデータに基づいてSPARCタンパク質を定量する標準曲線の評価した。11種類のメラノーマ細胞株のうち、10種類の培養上清中にSPARCタンパク質が検出された(図3)。
- [0042] 次に、メラノーマ患者血清中の可溶性SPARCタンパク質の検出を行った。87名の術前メラノーマ患者から血液サンプルを採取し、医療記録から患者のプロファイルを集めてTNM分類に基づいて臨床段階を決定した。87名のメラノーマ患者及び60名の健康なドナー(HD)の血清中のSPARCタンパク質の量をELISAによって評価した(図4、図5)。HD血清中にも血小板由来と思われるSPARCタンパク質が検出されたが、メラノーマ患者の一部では、より高値のSPARCタンパク質が検出された。HDの平均値+2SD(2337ng/ml)をカットオフ値とした場合、メラノーマ患者87人中29人(33.3%)が陽性となるが、健常人は60人中3人が陽性となり、特異度は95%であった。さらに、メラノーマ患者で術前陽性値を示し、術後の経過をおうことができた10例中7例において、摘出手術後には血清中にSPARCタンパク質が検出されなくなった。健常人の血清中にも、血小板由来と思われるSPARCタンパク質が検出されたため、血小板由来のSPARCタンパク質の影響を排除する為に、11名のメラノーマ患者及び21名の健康なドナー(HD)の血漿中のSPARCタンパク質の量をELISAによって評価した(図6)。SPARCタンパク質500ng/mlをカットオフ値とした場合、メラノーマ患者の平均値は606ng/mlで、11人中4人(36.4%)が陽性となるが、健常人の平均値は140ng/mlとなり、21人中1人が陽性となり、特異度は95%であった。
- [0043] さらに、メラノーマ患者血清中の可溶性MIA,5-S-CD, GPC3, SPARC, およびSPARCもしくはGPC3を検出した。結果を表1に示す。SPARCはGPC3と同様にStage I, IIの早期でもメラノーマの診断に有効であった。また、SPARCおよびGPC3を用いることによって、6割以上のメラノーマ患者をスクリーニングできた。また、上記と同一の血清におけるSPARC陽性及びGPC3陽性の内訳を以下の表2に示す。

[0044] [表1]

表 1 :

stage	MIA	5-S-CD	GPC3	SPARC	GPC3+SPARC
0	1/ 9 (11.1%)	0/ 9 (0.0%)	<u>4/ 9 (44.4%)</u>	<u>5/ 9 (55.5%)</u>	<u>8/ 9 (88.9%)</u>
I	5/25 (20.0%)	2/25 (8.0%)	<u>10/25 (40.0%)</u>	3/23 (13.0%)	<u>11/24 (48.0%)</u>
II	1/21 (4.8%)	2/20 (10.0%)	<u>10/21 (47.6%)</u>	<u>5/ 19 (26.3%)</u>	<u>15/ 21 (71.4%)</u>
III	3/18 (16.7%)	5/18 (27.8%)	7/18 (38.9%)	<u>8/18 (44.4%)</u>	<u>12/18 (66.7%)</u>
IV	<u>9/18 (50.0%)</u>	<u>15/18 (83.3%)</u>	5/18 (27.8%)	<u>8/18 (44.4%)</u>	11/18 (61.1%)
Total	19/91 (20.9%)	24/90 (26.7%)	<u>36/91 (39.6%)</u>	29/87 (33.3%)	57/90 (63.3%)

[0045] [表2]

表 2 :

Stage	GPC のみ陽性	SPARC のみ陽性	GPC/SPARC 重陽性	GPC 又は SPARC の 何れか陽性
0	3 / 9	4 / 9	1 / 9	8 / 9
I	9 / 25	2 / 23	1 / 23	12 / 23
II	10 / 21	5 / 19	0 / 19	15 / 19
III	4 / 18	5 / 18	3 / 18	12 / 18
IV	3 / 18	6 / 18	2 / 18	11 / 18
合計	29 / 91	22 / 87	7 / 87	58 / 87

[0046] 表1及び表2、図5の結果から明らかなように、従来のメラノーマの腫瘍マーカー、5-S-CD、最近注目されているMIAはいずれもStage III, IVの進行したメラノーマでしか有用でないが、SPARCはGPC3と同様にStage I, IIの早期でもメラノーマの診断に有効であった。しかしながら、SPARCはGPC3の重陽性の例は少なく、別個の機序で、血清中に分泌されていると考えられ、SPARCとGPC3を併用することにより、診断率を上昇させることができる。即ち、SPARCおよびGPC3を用いることによって、6割以上のメラノーマ患者をスクリーニングでき、メラノーマの新規な腫瘍マーカーとして有用であることが明らかとなった。なおMIAの測定には、ドイツ Roche社のMIA ELISAキットを用いた。

[0047] また、メラノーマ肉眼分類別のメラノーマ患者血清中の可溶性SPARC蛋白を検出した。結果を表3に示す。SPARCはメラノーマの組織型の違いによらず、様々な組織型で蛋白の増加を認めた。

[0048] [表3]

表 3 :

Type	GPC のみ陽性	SPARC のみ陽性	GPC/SPARC 重陽性	GPC 又は SPARC の 何れか陽性
ALM	11 / 44	9 / 41	4 / 41	24 / 41
SSM	7 / 16	5 / 16	1 / 16	13 / 16
LMM / LM	4 / 9	4 / 8	0 / 8	8 / 8
NM	1 / 5	0 / 5	1 / 5	2 / 5
Mucosa	4 / 12	4 / 12	0 / 12	8 / 12
合計	27 / 86	22 / 82	6 / 82	55 / 82

[0049] 表3の結果は、日本人に多い足の裏にできる末端黒子型や、欧米人に多くみられる表在拡大型や悪性黒子型などの組織型の違いによらず、様々な組織型の診断に寄与すると考えられた。

[0050] さらに16名のメラノーマ患者の術前及び術後における血清SPARC値(単位はng/ml)の変化を以下の表4に示す。16例中のうち13例において、術後に、血清SPARC値はカットオフ値(2340ng/ml)以下に低下した。

[0051] [表4]

表 4 :

Stage 0

患者 No. 1	手術前 (4699)	手術後 566 日 (1555)
No. 2	手術前 (3183)	手術後 7 日 (2303)
No. 3	手術前 (3011)	手術後 15 日 (3441)
No. 4	手術前 (2530)	手術後 1484 日 (513)
No. 5	手術前 (3046)	手術後 37 日 (3246)

Stage IA

患者 No. 6	手術前 (3278)	手術後 274 日 (858)
----------	------------	-----------------

Stage IB

患者 No. 7	手術前 (2847)	手術後 1581 日 (1366)
No. 8	手術前 (3356)	手術後 140 日 (1969) 手術後 217 日 (2330)

Stage IIA

患者 No. 9	手術前 (2884)	手術後 1472 日 (1555)
No. 10	手術前 (3896)	手術後 1008 日 (3348) 手術後 1358 日 (2624)

Stage IIB

患者 No. 11	手術前 (3812)	手術後 1567 日 (2275)
No. 12	手術前 (2570)	手術後 154 日 (1331)

Stage IIC

患者 No. 13	手術前 (4152)	手術後 329 日 (2027)	手術後 437 日 (1052)
		手術後 462 日 (1574)	手術後 632 日 (801)

Stage IIIA

患者 No. 14	手術前 (2391)	手術後 571 日 (1760)
-----------	------------	------------------

Stage IIIB

患者 No. 15	手術前 (3245)	手術後 82 日 (2414)	手術後 345 日 (1426)
		手術後 713 日 (3509)	

Stage IIIC

患者 No. 16	手術前 (3864)	手術後 465 日 (340)	手術後 678 日 (2380)
		手術後 762 日 (2184)	

産業上の利用可能性

[0052] 本発明による診断キット、及び診断方法は、メラノーマに罹患しているか否かを診断するのに非常に有用である。SPARC及びGPC3の組み合わせは、世界中の多くのメラノーマ患者に対する癌診断における用途に対して非常に有用であることが明らかとなった。

図面の簡単な説明

[0053] [図1]図1はSPARC mRNAの発現を示す。

[図2]図2は、Western blotting法によるヒトメラノーマ組織におけるSPARC蛋白の発現を示す。

[図3]図3は、メラノーマ細胞系の培養上清中に分泌されるGPC3タンパク質のELISAによる定量の結果を示す。

[図4]図4は、メラノーマ患者血清中の可溶性SPARC蛋白質の存在を示す。

[図5]図5は、Stage別メラノーマ患者血清中の可溶性SPARC蛋白質の存在を示す。

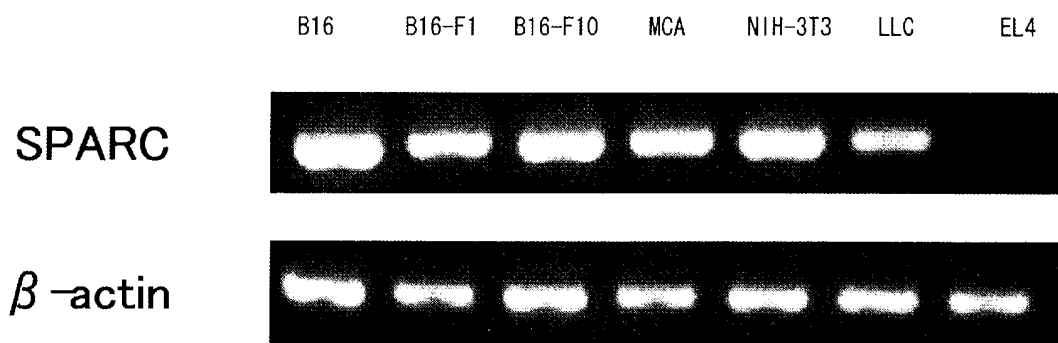
[図6]図5は、メラノーマ患者血漿中の可溶性SPARC蛋白質の存在を示す。

請求の範囲

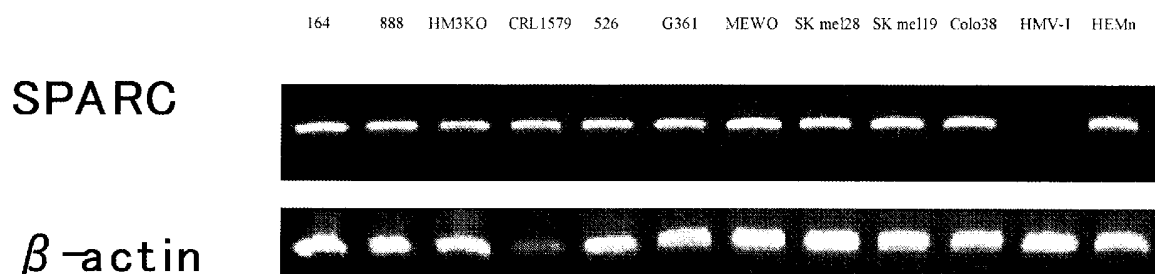
- [1] SPARCに対する抗体、及びGPC3に対する抗体を含む、悪性黒色腫(メラノーマ)の診断キット。
- [2] サンプル中のSPARC及びGPC3を測定することを特徴とする、悪性黒色腫(メラノーマ)の診断方法。
- [3] サンプルとSPARCに対する抗体を接触させる工程、及びサンプルとGPC3に対する抗体を接触させることを含む、請求項2に記載の診断方法。
- [4] サンプル中のSPARC及びGPC3を定量することを含む、請求項2又は3に記載の診断方法。
- [5] サンプルが血清あるいは血漿である、請求項2から4の何れかに記載の診断方法。

[図1]

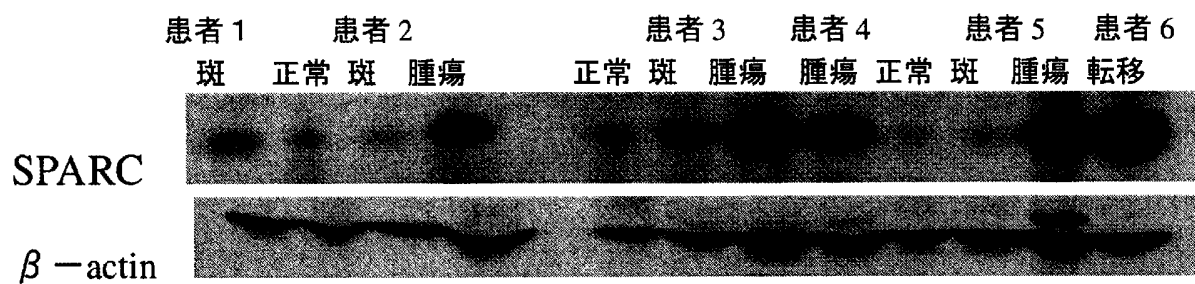
a.



b.



[図2]

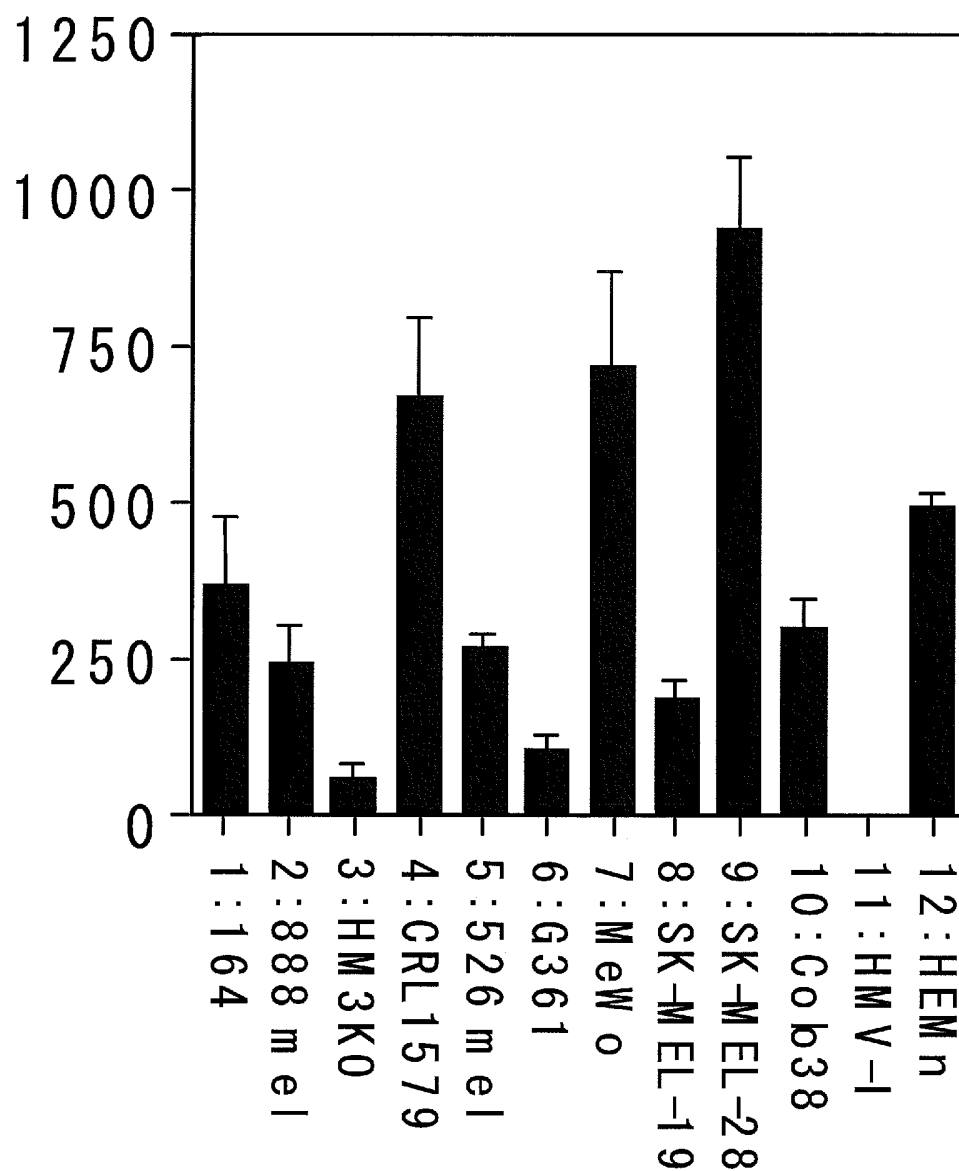


斑 正常 斑 腫瘍 正常 斑 腫瘍 腫瘍 正常 斑 腫瘍 轉移

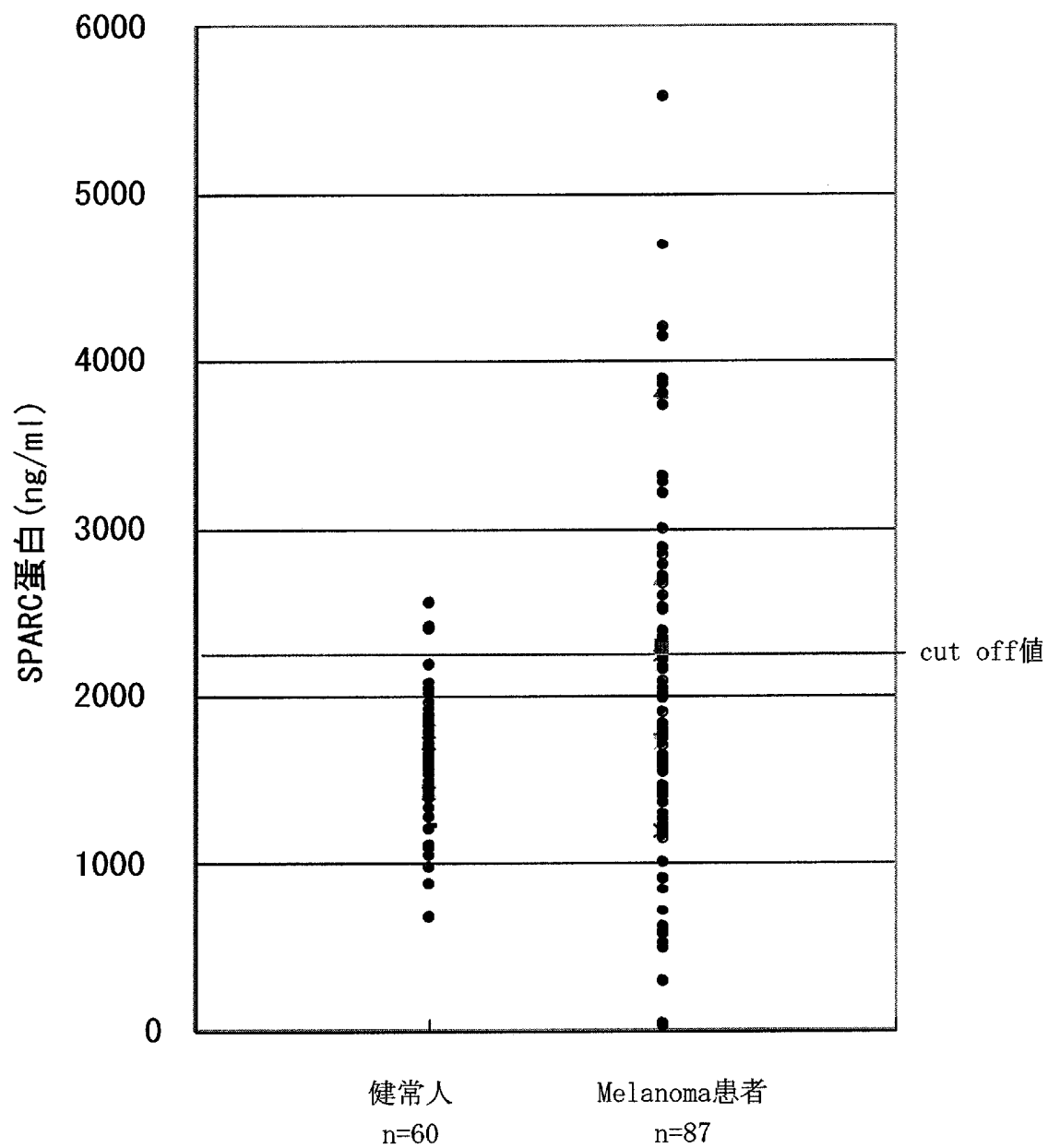
SPARC

 β -actin

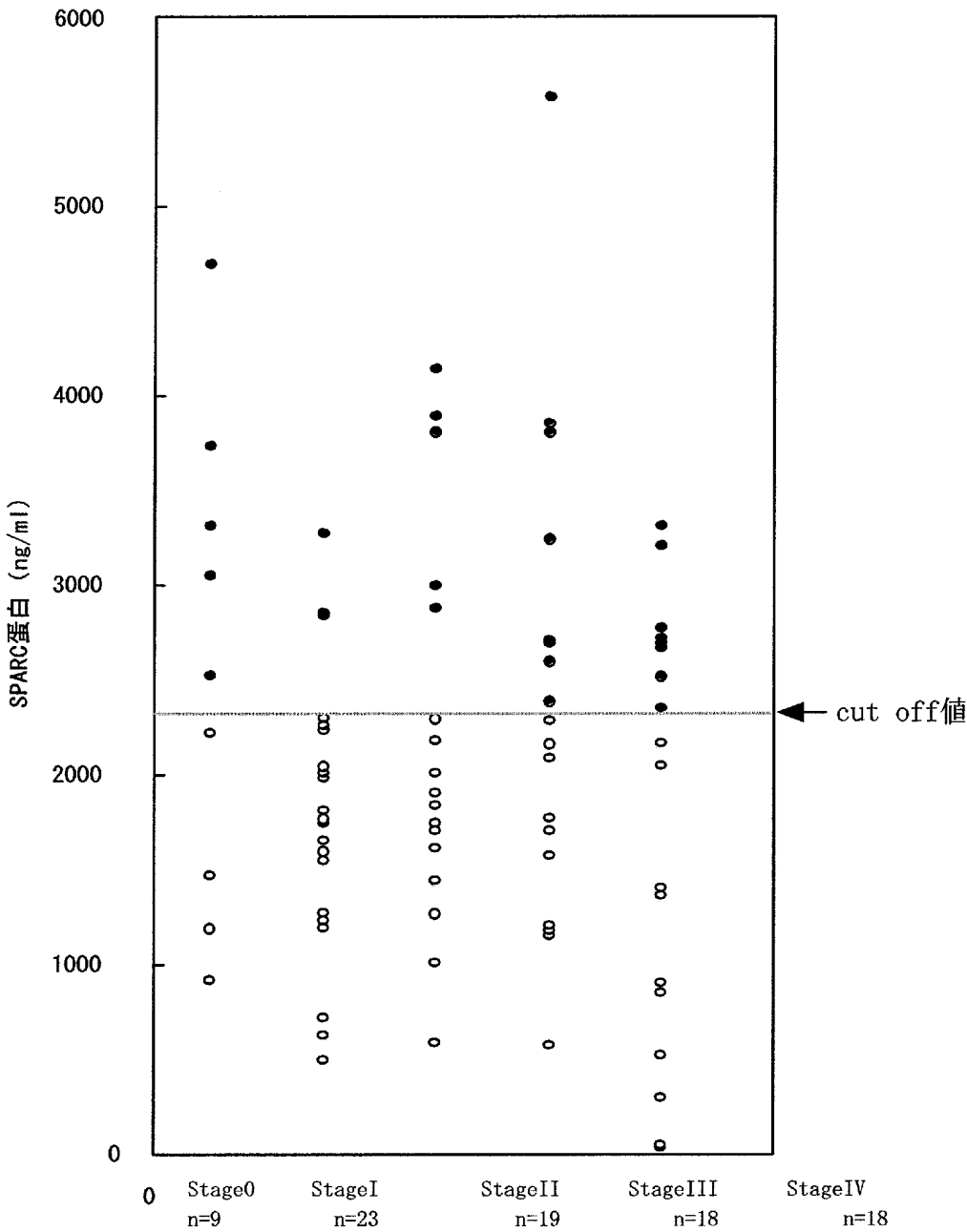
[図3]



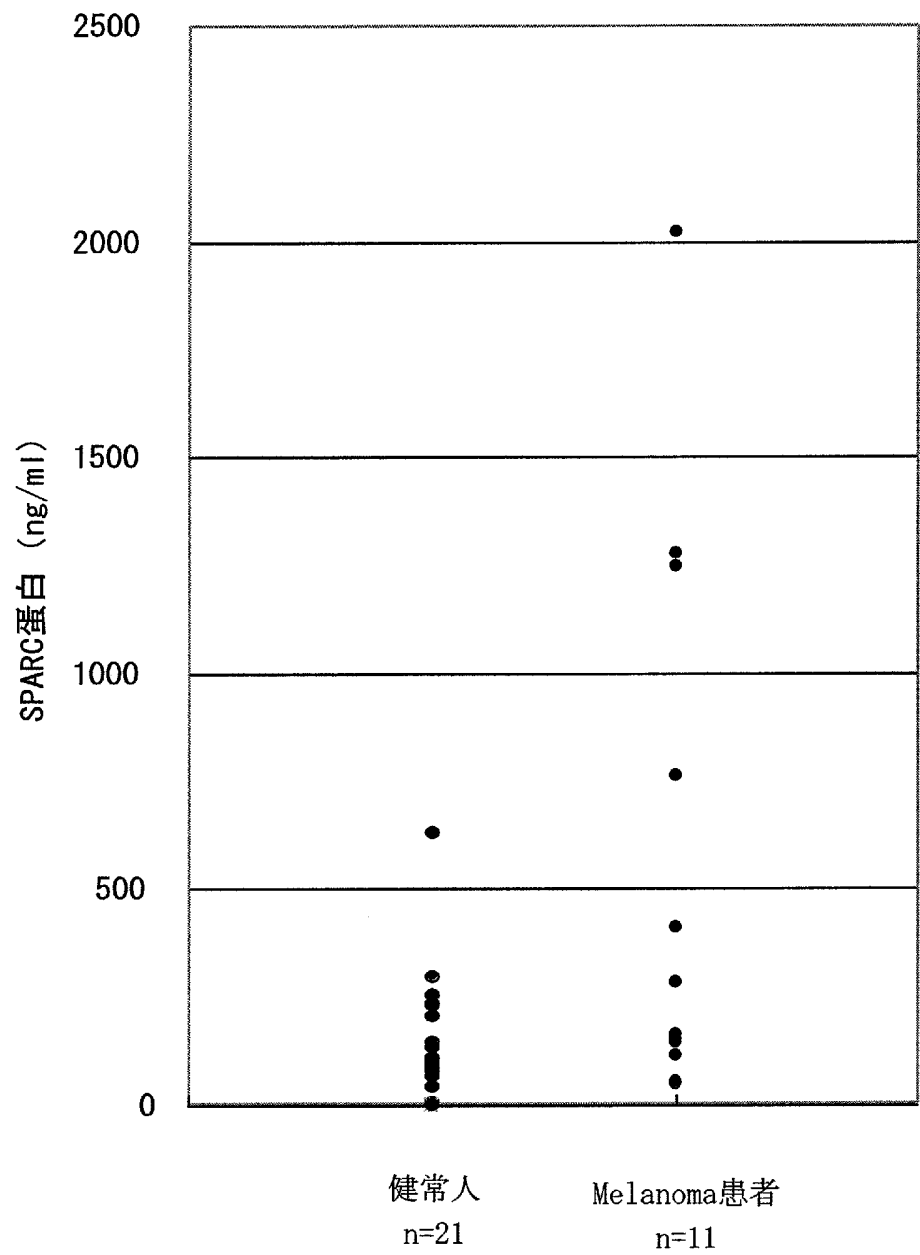
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, 33/574

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/ A	LEDDA, The Expression of the SPARC Is Associated with the Neoplastic Progression of Human Melanoma, The Journal of Investigative Dermatology, Vol.108, No.2, 1997, p210-214, (see Abstract)	1-4/ 5
Y/ A	NAKATSURA, Identification of Glypican-3 as a Novel Tumor Marker for Melanoma, Clinical Cancer Research, Vol.10, No.19, 01 October, 2004 (01.10.04), p6612-6621, (see Abstract)	1-4/ 5

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August, 2005 (25.08.05)

Date of mailing of the international search report

20 September, 2005 (20.09.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/53, 33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/53, 33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

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

BIOSIS (STN) Cplus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/ A	LEDDA, The Expression of the SPARC Is Associated with the Neoplastic Progression of Human Melanoma, The Journal of Investigative Dermatology, Vol.108, No.2, 1997, p210-214 (see Abstract)	1-4/ 5
Y/ A	NAKATSURA, Identification of Glypican-3 as a Novel Tumor Marker for Melanoma, Clinical Cancer Research, Vol.10, No19, 2004.10.01, p6612-6621 (see Abstract)	1-4/ 5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.08.2005

国際調査報告の発送日

20.9.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

9408