(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105074468 A
(43)申请公布日 2015.11.18

(21)申请号 201480019268.8
(22)申请日 2014.03.19
(30)优先权数据
2013-080303 2013.04.08 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/057588 2014.03.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/167969 JA 2014.10.16
(83)生物保藏信息
FERM BP-11519 2011.11.08
FERM BP-11520 2011.11.08
FERM BP-11521 2011.11.08
(71)申请人 盐野义制药株式会社
地址 日本大阪府大阪市
申请人 理论科学公司
(72)发明人 太田英树 冈本博之 园田光 落谷孝广
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 杜艳玲 刘力
(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

大肠癌的检测方法

(57)摘要

大肠癌的检测方法，包含应用抗CD147单克隆抗体或其片段测定得自被测试者的体液样品中表达CD147的外来体量的步骤、以及比较前述步骤中外来体的信号强度与对照者中的信号强度的步骤，其中，发现前述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。根据本发明的方法，能够判断样品提供者发生大肠癌的可能性是否高。由此，样品提供者能够采取阻止癌的进展的手段，因此该方法是有用的。

CN 105074468 A

1. 大肠癌的检测方法，其包括下列步骤：

应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段，测定得自被测试者的体液样品中表达 CD147 的外来体量，和

比较前述步骤中外来体的信号强度与对照者中的信号强度，

其中，发现所述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。

2. 大肠癌的检测方法，其包括下列步骤：

应用选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段，测定得自被测试者的体液样品中表达 CD9 和 / 或 CD63 以及 CD147 的外来体量，和

比较前述步骤中外来体的信号强度与对照者中的信号强度，

其中，发现所述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。

3. 大肠癌治疗的评价方法，其包括下列步骤：

应用选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段，测定得自治疗后的被测试者的体液样品中表达 CD9 和 / 或 CD63 以及 CD147 的外来体量，和

比较前述步骤中外来体的信号强度与治疗前的被测试者中的信号强度，

所述方法包括，在发现治疗后的信号强度比治疗前的信号强度弱的情况下，将所述治疗评价为具有大肠癌的治疗效果的步骤。

4. 权利要求 1 ～ 3 中任一项记载的方法，其中测定体液样品中的外来体量的步骤使用 ExoScreen 法或夹心 ELISA 法。

5. 权利要求 2 ～ 4 中任一项记载的方法，其中抗 CD9 单克隆抗体或其片段是以保藏编号 FERM BP-11519 保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体。

6. 权利要求 2 ～ 4 中任一项记载的方法，其中抗 CD63 单克隆抗体或其片段是以保藏编号 FERM BP-11520 保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体或以保藏编号 FERM BP-11521 保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体。

7. 用于在权利要求 1 ～ 6 中任一项记载的方法中使用的试剂盒，其含有抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

8. 用于在权利要求 2 ～ 6 中任一项记载的方法中使用的试剂盒，其含有抗 CD9 单克隆抗体和 / 或抗 CD63 单克隆抗体或者它们的片段、以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

9. 外来体作为大肠癌的标志物的应用，所述外来体通过下列识别：选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

10. 提供大肠癌或怀疑大肠癌的信息的方法，其特征在于，从得自被测试者的体液样品中检测外来体，所述外来体通过下列识别：选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

大肠癌的检测方法

技术领域

[0001]

本发明涉及大肠癌的检测方法。更详细地，本发明涉及应用针对样品中的外来体（Exosome）表面的特定抗原（CD9、CD63、CD147）的单克隆抗体或它们的抗体片段的用于检测大肠癌的存在的方法、评价大肠癌的治疗效果的方法、和这些方法中应用的试剂盒。

背景技术

[0002]

外来体是生物体内的体液中存在的囊泡颗粒。已知外来体表面与一般细胞表面同样地存在各种膜蛋白质。另外，据报告外来体从各种细胞例如免疫系统的细胞和各种癌细胞分泌，并且注意到其作为生物体内的细胞间通讯的媒介发挥作用并与生理现象相关、与癌症等疾病相关。

[0003] 例如，非专利文献 1 报告，从卵巢癌患者的腹水和血中分离外来体，外来体在免疫系统细胞中摄取抑制免疫，从而肿瘤增大。外来体的检测中，应用 CD24、ADAM10、CD9 的抗体。

[0004] 另外，专利文献 1 公开，应用 CD9、CD31、CD63、CD81、CD82、CD37、CD53 等作为生物体中存在的囊泡的表面标志物进行各种癌的诊断。非专利文献 2 公开，HAb18G/CD147 在 28 种癌细胞中比正常细胞表达多，因此该蛋白质的单克隆抗体可用作肿瘤生物标志物。非专利文献 3 报告，胃癌患者的血浆中存在的微囊泡中，MAGE-1 和 HER-2/neu 的表达增加。非专利文献 4 公开了测定血清中的 CA19-9 的用于癌抗原诊断的试剂盒。

[0005] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1 :WO2012/115885 号小册子

非专利文献

非专利文献 1 :Sascha Keller,et al., Cancer Letters, 2009, 278, p73-81

非专利文献 2 :Yu Li, et al., Histopathology, 2009, 54, p677-687

非专利文献 3 :Jaroslaw Baran,et al., Cancer Immunol Immunother, 2010, 59, p841-850

非专利文献 4 :AxSYM（注册商标）CA 19-9 Dynapack（注册商标）插页，ABBOTT JAPAN 公司。

[0006] 发明概述

发明要解决的课题

将外来体等囊泡颗粒中存在的膜蛋白质作为生物标志物来检测癌是可能的。但是，由于取决于样品的种类和应用的抗体、灵敏度和特异性的变化大等理由，难以获得满意的结果，在此之前的癌的诊断中，有时为假阳性，在诊断准确性方面存在问题。因此，为了通过检测外来体准确性好地检测癌，进一步技术开发是需要的。

[0007] 本发明的课题是，提供通过测定外来体检测大肠癌的方法、和在该方法中应用的试剂盒。

[0008] 解决课题的手段

本发明涉及以下 [1] ～ [7]。

[0009] [1] 大肠癌的检测方法，其包括下列步骤：

应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段，测定得自被测试者的体液样品中表达 CD147 的外来体量，和

比较前述步骤中外来体的信号强度与对照者中的信号强度，

其中，发现前述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。

[0010] [2] 大肠癌的检测方法，其包括下列步骤：

应用选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段，测定得自被测试者的体液样品中表达 CD9 和 / 或 CD63 以及 CD147 的外来体量，和

比较前述步骤中外来体的信号强度与对照者中的信号强度，

其中，发现前述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。

[0011] [3] 大肠癌治疗的评价方法，其包括下列步骤：

应用选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段，测定得自治疗后的被测试者的体液样品中表达 CD9 和 / 或 CD63 以及 CD147 的外来体量，和

比较前述步骤中外来体的信号强度与治疗前的被测试者中的信号强度，

所述方法包括，在发现治疗后的信号强度比治疗前的信号强度弱的情况下，将前述治疗评价为具有大肠癌的治疗效果的步骤。

[0012] [4] 用于在前述 [1] ～ [3] 中任一项记载的方法中使用的试剂盒，其含有抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

[0013] [5] 用于在前述 [2] 或 [3] 记载的方法中使用的试剂盒，其含有抗 CD9 单克隆抗体和 / 或抗 CD63 单克隆抗体或者它们的片段、以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

[0014] [6] 外来体作为大肠癌的标志物的应用，所述外来体通过下列识别：选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

[0015] [7] 提供大肠癌或怀疑大肠癌的信息的方法，其特征在于，从得自被测试者的体液样品中检测外来体，所述外来体通过下列识别：选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

[0016] 发明的效果

根据本发明的方法，能够通过测定外来体检测大肠癌而不存在假阳性的担心，由此能够判断大肠癌发生的有无或进展程度。

[0017] 附图简述

【图 1】图 1 显示应用得自人大肠癌细胞系 HCT116 的外来体的蛋白质组分析结果。

[0018] 【图 2】图 2 显示通过蛋白质印迹法检测 CD147 的结果。各泳道泳动 500ng 的外来体提取液，应用抗 CD147 小鼠单克隆抗体检测。

[0019] 【图 3】图 3 显示应用 ExoScreen 法，在得自大肠癌细胞系的外来体中 CD147 的检测结果。生物素化抗体 ;CD147，受体珠缀合抗体 ;CD9。

[0020] 【图 4】图 4 显示应用 ExoScreen 法，在得自大肠癌患者血清的外来体中 CD147 的检测结果。生物素化抗体 ;CD147，受体珠缀合抗体 ;CD63（左图）、CD9（右图）。

[0021] 【图 5】图 5 显示应用 ExoScreen 法，在得自大肠癌患者血清的外来体中 CD147 的检测结果。生物素化抗体 ;CD147，受体珠缀合抗体 ;CD9。

[0022] 【图 6】图 6 比较大肠癌患者血清中，得自外来体的 CD147、CEA、和 CA19-9 各自的检测结果。

[0023] 【图 7A】图 7A 显示以得自外来体的 CD147 为指标诊断大肠癌的情况下（图 5）的 ROC 分析结果。

[0024] 【图 7B】图 7B 显示以 CEA 为指标诊断大肠癌的情况下的 ROC 分析结果。

[0025] 【图 7C】图 7C 显示以 CA19-9 为指标诊断大肠癌的情况下的 ROC 分析结果。

[0026] 【图 8】图 8 显示应用 ExoScreen 法，得自术前和术后大肠癌患者血清的外来体中 CD147 的检测结果。各数据中央的线显示检测结果的中值。生物素化抗体 ;CD147，受体珠缀合抗体 ;CD9。

[0027] 实施本发明的方式

本发明是用于检测被测试者中大肠癌的方法，其大的特征在于，应用特定的单克隆抗体测定得自体液样品中的外来体的信号，在其值比正常人的值大的情况下，判断为具有患大肠癌的可能性。具体地，所述方法包含 :应用针对特定抗原的单克隆抗体或其片段测定得自被测试者的体液样品中的表达该抗原的外来体量的步骤（下文也称为步骤 A）、以及比较前述步骤中外来体的信号强度与对照者中信号强度的步骤（下文也称为步骤 B），此处，发现前述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。另外，本说明书中，检测大肠癌包含检测大肠癌发生的有无、病态的进展程度。

[0028] 本发明人已发现，通过由抗 CD9 抗体和抗 CD63 抗体的组合构成的测定系统，在大肠癌患者血液中得到比正常人血液强的信号强度，但是，存在在正常人中也检测到一定程度的强信号等问题，其作为大肠癌的诊断方法是存在问题的。但是，本发明中，根据大肠癌细胞系的蛋白质组分析，成功地将 CD147 鉴定为对从恶性度高的大肠癌细胞分泌的外来体具有特异性的抗原。进一步地，本发明人进行深入研究，结果发现，通过组合针对该 CD147 抗原的抗体和抗 CD9 抗体或者抗 CD63 抗体，正常人的测定值偏差少没有检测到假阳性，得到仅从大肠癌患者检测到信号的良好结果，从而完成本发明。

[0029] 以下说明本发明中的各步骤。

[0030] 步骤 A 是，应用针对特定抗原的单克隆抗体或其片段，测定得自被测试者的体液样品中表达该抗原的外来体量的步骤。

[0031] 步骤 A 中应用的单克隆抗体或其片段可列举 3 种单克隆抗体或其片段。具体地，应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段、抗 CD9 单克隆抗体或其片段、抗 CD63 单克隆抗体或其片段，至少应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段。

[0032] 本发明中应用的单克隆抗体或其片段各自识别特定抗原即可，可按照公知的方法

制备。即，抗 CD147 单克隆抗体或其片段识别 CD147，抗 CD9 单克隆抗体或其片段识别 CD9，抗 CD63 单克隆抗体或其片段识别 CD63，其可通过哺乳動物的免疫应答制备，也可基于各抗原的序列信息制备。

[0033] 另外，本发明中，作为抗 CD9 单克隆抗体和抗 CD63 单克隆抗体，可应用从作为产生前述单克隆抗体的杂交瘤的、在独立行政法人制品评价技术基础机构专利微生物保藏中心（茨城县筑波市东 1-1-1 中央第 6 号）以下述保藏编号保藏的细胞得到的抗体。

[0034] FERM BP-11519（产生的单克隆抗体是 CD9-12A12 抗体，名称 CD9 :12A12，保藏日 2011 年 11 月 8 日）

FERM BP-11520（产生的单克隆抗体是 CD63-8A12 抗体，名称 CD63 :8A12，保藏日 2011 年 11 月 8 日）

FERM BP-11521（产生的单克隆抗体是 CD63-13C8 抗体，名称 CD63 :13C8，保藏日 2011 年 11 月 8 日）。

[0035] 本发明中，“单克隆抗体片段”意味着前述单克隆抗体的一部分，与该单克隆抗体同样地具有与 CD9、CD63 或 CD147 的特异结合性的片段。具体地，具有对 CD9、CD63 或 CD147 的特异结合性的片段可列举 Fab、F（ab’）$_2$、Fab’、单链抗体（scFv）、二硫键抗体（dsFv）、2 聚体 V 区片段（双抗体）、含有 CDR 的肽等（Expert opinion on therapeutic patents, 6(5), 441-456, 1996）。

[0036] 这些单克隆抗体或其片段以例如下列 2 种方式应用。

[0037] 方式 1 :应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段的方式，

方式 2 :应用选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体或其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段的组合的方式。

[0038] 方式 1 中，通过标记的抗 CD147 单克隆抗体或其片段识别外来体上的 CD147，可定量表达 CD147 的外来体。抗 CD147 单克隆抗体或其片段的标记化没有特别限定，可通过公知方法进行。方式 1 的单克隆抗体或其片段适用于后述蛋白质印迹法。

[0039] 方式 2 中，通过这些单克隆抗体或其片段识别外来体上的 CD9 和 / 或 CD63 与 CD147，可定量表达 CD9 和 / 或 CD63 与 CD147 的外来体。方式 2 中，也可应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段作为固定抗体，抗 CD9 单克隆抗体或其片段作为标记抗体。或者，也可应用抗 CD9 单克隆抗体或其片段作为固定抗体，抗 CD147 单克隆抗体或其片段作为标记抗体。另外，也可应用抗 CD63 单克隆抗体或其片段作为固定抗体，抗 CD147 单克隆抗体或其片段作为标记抗体。或者，也可应用抗 CD63 单克隆抗体或其片段作为标记抗体，抗 CD147 单克隆抗体或其片段作为固定抗体。另外，也可应用抗 CD9 单克隆抗体或其片段与抗 CD63 单克隆抗体或其片段作为固定抗体，抗 CD147 单克隆抗体或其片段作为标记抗体。或者，也可应用抗 CD9 单克隆抗体或其片段与抗 CD63 单克隆抗体或其片段作为标记抗体，抗 CD147 单克隆抗体或其片段作为固定抗体。固定抗体和标记抗体的制备没有特别限定，可按照公知方法进行。方式 2 的单克隆抗体或其片段适用于后述的夹心 ELISA 法、ExoScreen 法。

[0040] 本发明中，提供用于测定外来体量的样品是体液样品即可，没有限定，例如，可示例选自血液、血清、血浆、尿、唾液、乳汁、鼻涕、脑脊液的体液样品。

[0041] 外来体量的测定应用前述单克隆抗体或其片段的方法即可，例如，可按照蛋白质印迹法、夹心 ELISA 法、ExoScreen 法进行。

[0042] 蛋白质印迹法中，例如，可应用方式 1 的单克隆抗体或其片段。具体地，通过应用抗 CD147 单克隆抗体或其片段通过蛋白质印迹法分析大肠癌患者的血液，可检测得自大肠癌细胞的外来体上存在的 CD147。

[0043] 夹心 ELISA 法中，例如，可应用方式 2 的单克隆抗体或其片段。具体地，首先，一种单克隆抗体或其片段作为固定抗体，与含有外来体的样品接触形成复合体。其后，将另一单克隆抗体或其片段标记后加入其中，形成进一步的复合体，通过检测标记，能够测定表达两种抗体识别的抗原的外来体量。

[0044] ExoScreen 法是应用 PerkinElmer 公司开发的 AlphaLISA 的方法。本方法应用表位不同的 2 种抗体，一种抗体生物素化，另一种应用缀合了 AlphaLISA 受体珠的抗体与分析样品反应。其后，通过添加链霉抗生物素缀合的供体珠，生物素化抗体与供体珠通过链霉抗生物素缀合，受体珠与供体珠邻接。在邻接的状态 (200nm 以内)，通过 680nm 激发，从供体珠产生单线态氧，单线态氧到达受体珠则发出 615nm 的光，其可作为信号检测。通过对方式 2 的单克隆抗体或其片段应用该方法，作为分析样品可测定 100nm 左右大小的外来体。

[0045] 因此，可测定体液样品中含有目的蛋白质的外来体量。应用得到的外来体量，进行随后的步骤 B。

[0046] 步骤 B 是比较步骤 A 中得到的外来体的信号强度与对照者中的信号强度的步骤，发现前述被测试者中的信号强度比对照者中的信号强度强的情况作为大肠癌存在的指标。另外，本说明书中，对照者是不发生大肠癌的个体即可，可列举正常人。

[0047] 对照者中的信号强度是得自对照者的体液样品中的外来体量，其可在步骤 A 中测定被测试者的外来体量时共同测定，也可单独测定。另外，也可测定多个对照者的外来体量，根据其统计设定对照者的外来体量。

[0048] 得自对照者的体液样品优选与得自被测试者的体液样品同种的样品，例如，在得自被测试者的体液样品是血液的情况下，得自对照者的体液样品也是血液。

[0049] 为了比较被测试者的信号强度与对照者的信号强度，将被测试者的外来体量与对照者的外来体量比较分析即可，其方法没有特别限定，可应用公知的方法 (Steel 法，t 检验，Wilcoxon 检验等)。根据前述分析被测试者的外来体量相对于对照者的外来体量显示显著增加时，判断被测试者中存在大肠癌的可能性高。

[0050] 另外，通过应用前述抗体检测体液样品中存在的外来体，能够判断大肠癌的存在可能性的有无，因此，作为本发明的一个方式，可列举提供大肠癌或怀疑大肠癌的信息的方法，其特征在于，从得自被测试者的体液样品中检测外来体，所述外来体由选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体和其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段识别。

[0051] 另外，在前述分析中，将对照者的外来体量设定为被测试者术前的外来体量，术后的外来体量作为被测试者的外来体量，进行比较，术后的外来体量显示减少的情况可判断为，大肠癌缩小或减轻的可能性高。

[0052] 另外进一步地，在前述分析中，例如，被测试者诊断为大肠癌的情况下，将对照者的外来体量设定为被测试者治疗前的外来体量，治疗后的外来体量作为被测试者的外来体量，进行比较，治疗后的外来体量显示减少的情况可判断为，该治疗对于大肠癌的治疗有效的可能性高。因此，本发明可另外提供评价方法，其特征在于，在大肠癌治疗接受之前与接

受之后，应用前述单克隆抗体或其片段测定得自外来体的信号，治疗后的值比治疗前的值小的情况判断为该治疗有效。

[0053] 另外，本发明的另一方式中，提供了用于检测大肠癌的试剂盒。

[0054] 本发明的试剂盒中包含所有物质，只要其能够检测体液样品中的外来体。具体地，可列举包含能够识别前述外来体表面存在的抗原的抗体即抗 CD147 单克隆抗体或其片段、抗 CD9 单克隆抗体或其片段、抗 CD63 单克隆抗体或其片段的试剂盒。其中，从应用这些抗体或其片段的方式中可列举：

方式 1：含有抗 CD147 单克隆抗体或其片段的方式

方式 2：含有选自抗 CD9 单克隆抗体和其片段、抗 CD63 单克隆抗体或其片段的至少 1 种，以及抗 CD147 单克隆抗体或其片段的组合的方式。

[0055] 只要是在检测体液样品中的外来体时应用抗体的检测方法（例如，蛋白质印迹法、ELISA 法、ExoScreen 法等），这些试剂盒都可应用。另外，只要外来体被检测，外来体以外的蛋白质也可利用前述抗体同时检测。

[0056] 应用本发明的试剂盒，例如在测定正常人与被测试者的血液样品中存在的外来体量、二者的表达量产生显著差异的情况下，可确定和 / 或诊断被测试者中大肠癌的发生。

[0057] 实施例

以下，根据实施例说明本发明，但实施例是为了更好理解本发明而示例的，本发明的范围不意图限于这些实施例。

[0058] 试验例 1（应用 CD147 抗体检测得自大肠癌细胞系的外来体）

应用得自人大肠癌细胞系 HCT116（美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)）的外来体的蛋白质组分析的结果示于图 1。对于从该结果提取的抗原 CD147，通过小鼠抗人 CD147 单克隆抗体（Novus Biologicals 公司制，克隆 MEM-M6/1）利用蛋白质印迹法评价其在得自大肠癌细胞系的外来体中的表达。应用恶性度非常高的 HCT116 细胞和恶性度低的 Caco2 细胞（美国典型培养物保藏中心）作为人大肠癌细胞系进行比较。结果，得自恶性度高的 HCT116 细胞系的外来体可确认 CD147 的存在，得自恶性度低的 Caco2 细胞的外来体检测不到（图 2）。

[0059] 随后，应用生物素化的抗 CD147 单克隆抗体（Novus Biologicals 公司制，克隆 MEM-M6/1）和受体珠结合的抗 CD9 单克隆抗体（以保藏编号 FERM BP-11519 保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体），通过 ExoScreen 法，测定来自得自各大肠癌细胞系的表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号。其结果是，与利用蛋白质印迹法的结果同样，确认到得自恶性度高的 HCT116 细胞系的外来体中 CD147 的表达（图 3）。通过这些结果推断，一部分大肠癌细胞中表达 CD147 的外来体大量分泌。

[0060] 试验例 2（应用 CD147 抗体检测得自大肠癌患者血清的外来体 -1）

通过 ExoScreen 法检测得自 5 μ L 大肠癌患者血清中表达 CD9 或 CD63、并且表达 CD147 的外来体的信号强度。ExoScreen 法中，应用试验例 1 中应用的生物素化抗 CD147 单克隆抗体与受体珠缀合的抗 CD63 单克隆抗体（以保藏编号 FERM BP-11520 保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体）或受体珠缀合的前述抗 CD9 单克隆抗体。分析 10 例得自大肠癌患者的血清和 10 例得自正常人的血清，从得自 10 例中 5 例患者的血清中检测到高信号。这些分析中，假阴性率是 50％，正常人的测定值偏差小，也完全没有见到假阳性，判断其作为大肠癌检查是

优异的(图 4)。

[0061] 试验例 3（应用 CD147 抗体检测得自大肠癌患者血清的外来体 -2）

以与试验例 2 同样的方法，应用得自更多大肠癌患者的血清与得自正常人的血清，测定得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号(图 5)。具体地，应用 194 例得自大肠癌患者的血清和 191 例得自正常人的血清。

[0062] 随后，对于与前述测定得自外来体的信号的、得自大肠癌患者的血清相同的 194 例血清，测定 CEA 和 CA19-9。CEA 和 CA19-9 的测定结果、以及用 ExoScreen 法测定得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的结果共同在图 6 中示出。

[0063] 根据图 6，比较 CEA 和 CA19-9 的测定结果时，在 62 例 CEA 阳性例、36 例 CA19-9 阳性例中，33 例是共同的，判断这 2 种方法中能够以高相关性检测相同的大肠癌患者。另一方面，在用 ExoScreen 法测定得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的结果、以及 CEA 和 CA19-9 的测定结果之间，没有见到相关性。也即，这暗示了，通过将应用得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的检查、与 CEA 或者 CA19-9 等公知的在大肠癌检查中广泛应用的项目组合，见到不同阳性例是可能的，可诊断更多的大肠癌患者。

[0064] 另外，图 7A、图 7B 和图 7C 进行 ROC 分析，比较各测定方法的大肠癌的检测能力，AUC 越接近 1 越显示检测能力高。在应用得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的情况下，AUC 是 0.820，判断其远大于 CEA、CA19-9 的值(各自为 0.669 和 0.622)。应用得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的大肠癌检查显示比 CEA、CA19-9 优异。

[0065] 试验例 4（手术前和手术后的信号强度的变化的分析）

应用得自接受 I 期和 II 期大肠癌切除术的 15 名患者的血清，研究手术前和手术后得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的变化(图 8)。得知应用得自表达 CD9 和 CD147 的外来体的信号的检查作为手术后、药物施用后的跟踪检查也是优异的。

[0066] 产业实用性

根据本发明的方法，能够判断样品提供者发生大肠癌的可能性是否高。由此，样品提供者能够采取阻止癌的进展的手段，因此该方法是有用的。

1	网格蛋白重链1
2	组蛋白H4
3	膜联蛋白A2
4	程序性细胞死亡6-相互作用蛋白
5	膜联蛋白A5
6	组蛋白H2B型1-B
7	埃兹蛋白
8	半乳凝素-3-结合蛋白
9	基膜特异性硫酸乙酰肝素 蛋白聚糖核心蛋白
10	前列腺素F2受体负调节物
11	肌动蛋白，胞浆1
12	膜联蛋白A1
13	整联蛋白β-4
14	膜突蛋白
15	中性氨基酸转运蛋白B(0)
16	肌动蛋白，主动脉平滑肌
17	钠/钾-转运ATP酶亚基α-1
18	连接斑珠蛋白
19	上皮细胞粘附分子
20	CD9抗原
21	4F2细胞表面抗原重链
22	联蛋白β-1
23	钠偶联中性氨基酸转运蛋白2
24	整联蛋白β-1
25	14-3-3蛋白ζ/δ
26	泛素-40S核糖体蛋白S27a
27	热激关联71kDa蛋白
28	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G(I)/G(S)/G(T)亚基β-1
29	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G(I)/G(S)/G(T)亚基β-2
30	血清白蛋白
31	程序性细胞死亡蛋白6
32	乳黏着蛋白
33	延伸因子2
34	热激蛋白HSP 90-α
35	胶原蛋白α-1(XVIII)链
36	Ras相关蛋白Rap-1A
37	组蛋白H3.2
38	联蛋白α-1
39	内居蛋白-1
40	脂肪酸合酶
41	Ras相关蛋白Rap-2b
42	微管蛋白α-1B链
43	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
44	热激70kDa蛋白1A/1B
45	含CUB结构域蛋白1
46	组蛋白H3.1
47	延伸因子1-α1
48	整联蛋白α-3
49	组蛋白H2A型1-B/E
50	热激蛋白HSP 90-β

51	整联蛋白α-6
52	足蛋白
53	肽基脯氨酸顺反异构酶A
54	多泡体亚基12A
55	L-乳酸脱氢酶B链
56	丙酮酸激酶同工酶M1/M2
57	组蛋白H1.3
58	Ras相关蛋白Rab-10
59	14-3-3蛋白θ
60	单羧酸转运蛋白4
61	DnaJ同系物亚家族A成员1
62	肝配蛋白A型受体2
63	14-3-3蛋白ε
64	联蛋白δ-1
65	CD63抗原
66	CD44抗原
67	CD81抗原
68	X线修复交叉互补蛋白6
69	巨噬细胞移动抑制因子
70	40S核糖体蛋白S2
71	丝束蛋白-1
72	CD151抗原
73	Basigin(CD147)
74	铁蛋白重链
75	抑制蛋白-1
76	Tetraspanin-6
77	Tetraspanin-14
78	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(s)亚基 α同种型XLas
79	α-烯醇化酶
80	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(I)/G(S)/G(0) 亚基γ-12
81	A-激酶锚蛋白12
82	胆碱转运蛋白样蛋白1
83	非常规肌球蛋白-1c
84	层粘连蛋白亚基α-5
85	肌动蛋白丝切蛋白-1
86	二磷酸核苷激酶B
87	溶质载体家族2，易化葡萄糖 转运蛋白成员1
88	过氧化物氧还蛋白-1
89	胞质FMR1-相互作用蛋白1
90	谷胱甘肽S-转移酶P
91	ADP-核糖基化因子6
92	含解联蛋白和金属蛋白酶 结构域蛋白10
93	ADP-核糖基化因子1
94	α-辅肌动蛋白-1
95	膜联蛋白A11
96	平衡型核苷转运蛋白1
97	转铁蛋白受体蛋白1
98	Ras相关C3肉毒杆菌毒素底物1
99	Ras相关蛋白Rab-7a
100	果糖二磷酸醛缩酶A

图 1

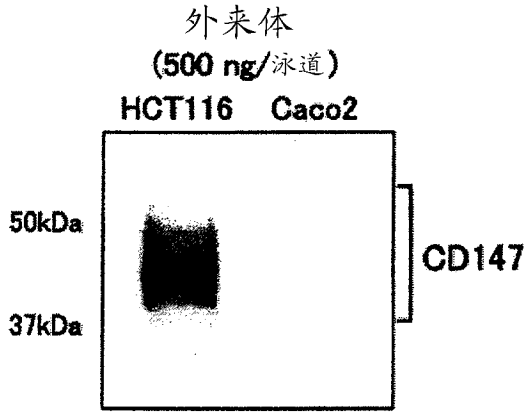

外来体
(500 ng/泳道)
HCT116 Caco2
50kDa
37kDa
CD147

图 2

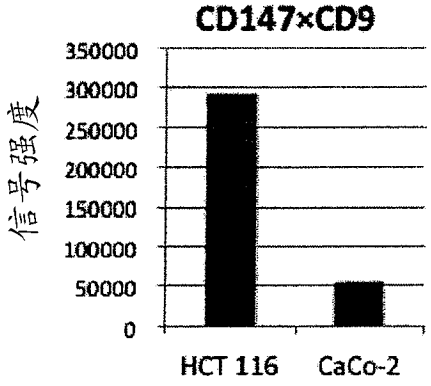

CD147×CD9
信号强度
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
HCT 116
CaCo-2

图 3

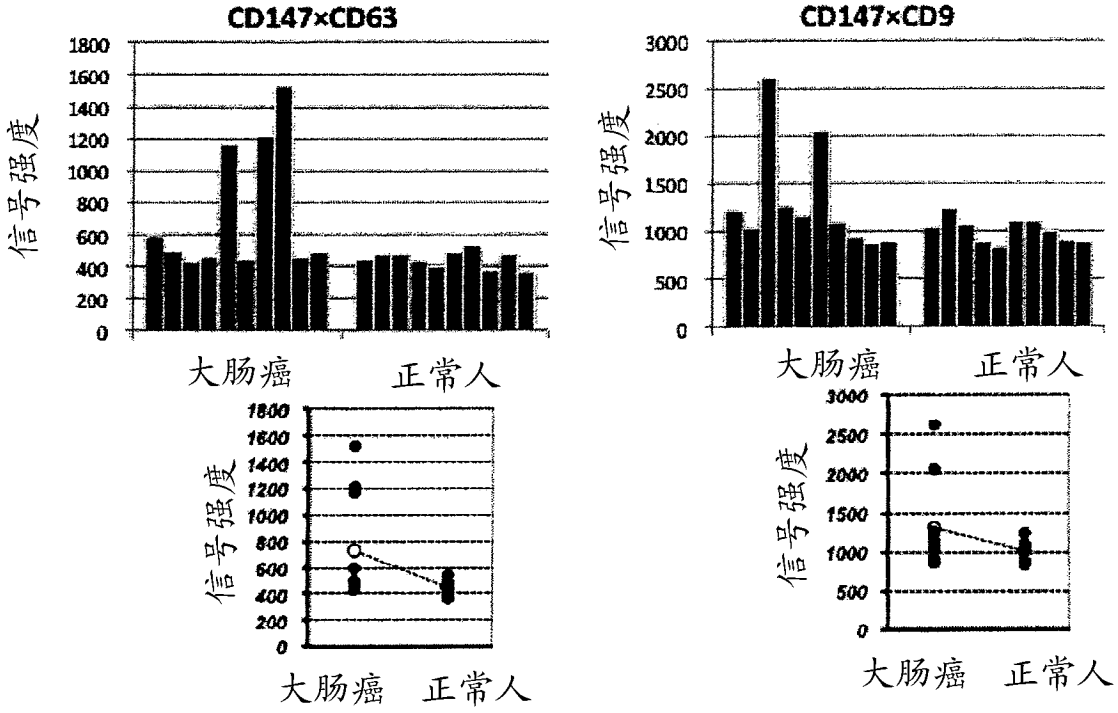

CD147×CD63
信号强度
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
大肠癌
正常人
CD147×CD9
信号强度
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
大肠癌
正常人

图 4

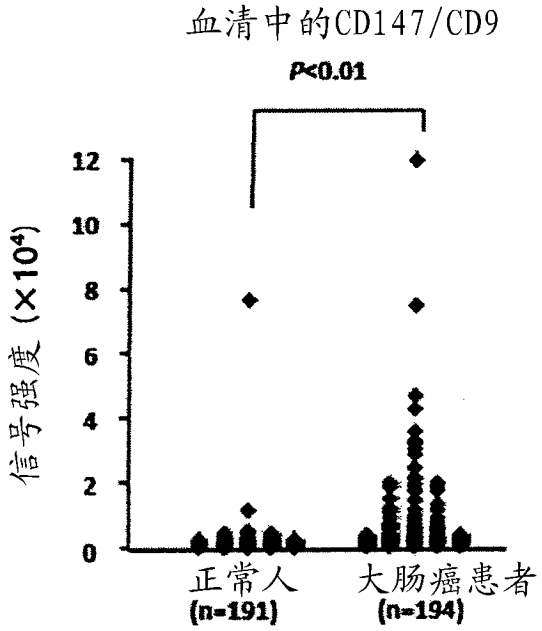


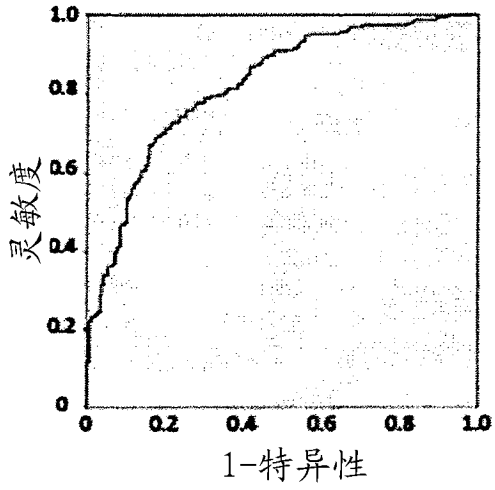
图 5

患者#	信号强度 CD147/CD9	CEA (ng / ml)	CA19-9 (U / ml)
1	839	2	5
2	723	5	13
3	780	898	1010
4	804	2	14
5	812	3	13
6	981	3	13
7	1009	2	5
8	1017	11	130
9	1022	4	10
10	1085	2	8
11	1101	1	9
12	1102	2	19
13	1108	2	8
14	1125	2	5
15	1131	15	12
16	1145	1	7
17	1182	2	11
18	1216	2	28
19	1268	78	46
20	1274	3	5
21	1306	11	766
22	1313	5	10
23	1316	1	16
24	1328	3	16
25	1357	1	8
26	1364	44	88
27	1375	6	40
28	1393	44	740
29	1395	1	8
30	1401	5	13
31	1410	9	29
32	1415	36	64
33	1429	3	11
34	1432	2	9
35	1443	13	42
36	1445	2	5
37	1465	4	24
38	1483	2	5
39	1505	1	6
40	1515	63	14780
41	1546	6	5
42	1570	34	92
43	1572	1	14
44	1594	3	20
45	1597	55	56
46	1614	2	5
47	1614	3	11
48	1670	3	22
49	1704	1	5
50	1711	4	95
51	1721	31	75
52	1732	1	8
53	1741	5	8
54	1761	34	19
55	1768	3	20
56	1769	2	6
57	1783	1	5
58	1796	1	5
59	1824	4	5
60	1836	21	653
61	1851	2	8
62	1859	1	10
63	1860	3	52
64	1866	3	6
65	1879	2	9
66	1879	2	6
67	1891	9	46
68	1892	4	6
69	1896	13	37
70	1897	6	64
71	1912	1	14
72	1919	1	11
73	1928	9	5
74	1964	2	12
75	1974	1	6
76	1977	25	29
77	1999	1	14
78	2005	27	24
79	2015	2	5
80	2016	8	12
81	2045	5	19
82	2054	2	13
83	2067	46	12
84	2074	7	11
85	2074	3	16
86	2082	1	5
87	2158	4	9
88	2164	90	131
89	2191	4	14
90	2198	2	8
91	2208	1	5
92	2220	2	6
93	2225	3	5
94	2280	2	9
95	2295	1	6
96	2297	50	64
97	2308	1	22
98	2321	4	36
99	2328	64	78
100	2327	3	13
101	2347	1	5
102	2353	9	15
103	2376	3	19
104	2399	1	6
105	2409	3	7
106	2419	12	233
107	2420	1	5
108	2420	11	10
109	2423	8	66
110	2427	2	9
111	2461	2	7
112	2487	1	7
113	2490	7	28
114	2500	1	6
115	2516	4	30
116	2540	8	19
117	2551	46	12
118	2586	10	10
119	2597	1	23
120	2613	4	37
121	2641	3	6
122	2658	13	17
123	2675	4	5
124	2768	9	41
125	2907	2	34
126	2921	4	32
127	2947	2	7
128	2964	2	5
129	3015	5	9
130	3015	1	5
131	3018	1	9
132	3048	2	9
133	3074	6	99
134	3134	1	117
135	3139	999	1329
136	3242	6	18
137	3302	1	10
138	3332	2	19
139	3354	1	5
140	3370	2	26
141	3419	2	5
142	3454	6	25
143	3479	2	11
144	3483	3	17
145	3677	2	16
146	3679	2	11
147	3940	15	23
148	4138	1	5
149	4258	6	45
150	4407	1	7
151	4487	3	9
152	4955	2	21
153	5004	1	5
154	5487	1	6
155	5798	5	6
156	5934	2	16
157	6142	7	25
158	6487	3	5
159	6521	6	88
160	6903	5	9
161	6996	1	17
162	7798	1	13
163	7854	2	13
164	8272	2	11
165	8854	4	26
166	9212	6	18
167	9379	328	269
168	10010	141	79
169	10935	1	25
170	11430	2	21
171	11726	3	184
172	12388	5	24
173	13804	3	8
174	14806	450	970
175	15412	32	5
176	17139	3	20
177	17502	2	18
178	18476	81	1258
179	18502	1	10
180	19104	4	18
181	19672	1	11
182	20121	1	5
183	20943	29	90
184	21420	10	68
185	24641	16	68
186	28622	6	9
187	30618	2	5
188	32269	1	5
189	33081	3	9
190	35710	1	26
191	42813	2	17
192	47096	7	15
193	74784	366	295
194	119708	3	12

CEA的正常者的基准值是5 ng/ml以下。

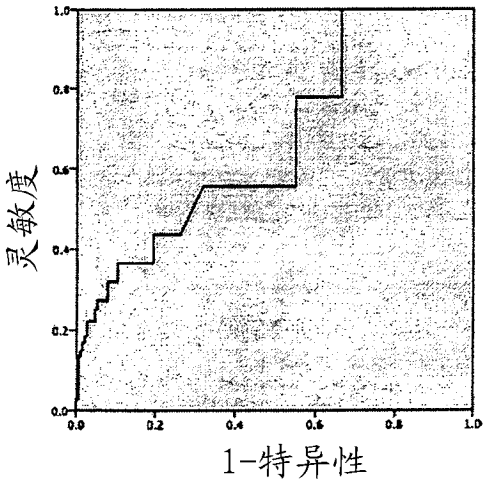
CA19-9的正常者的基准值是37 U/ml以下。

图 6



AUC:0.820

图 7A



AUC:0.669

图 7B

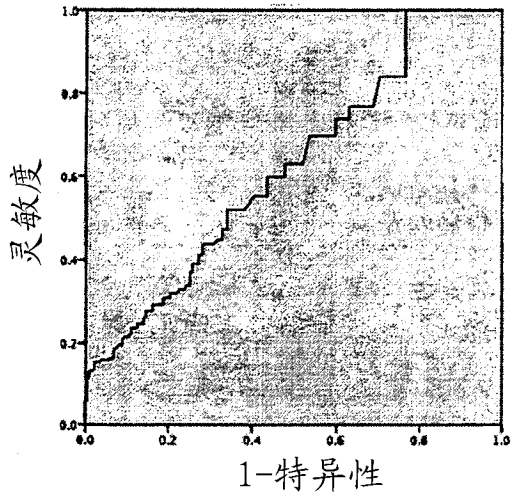
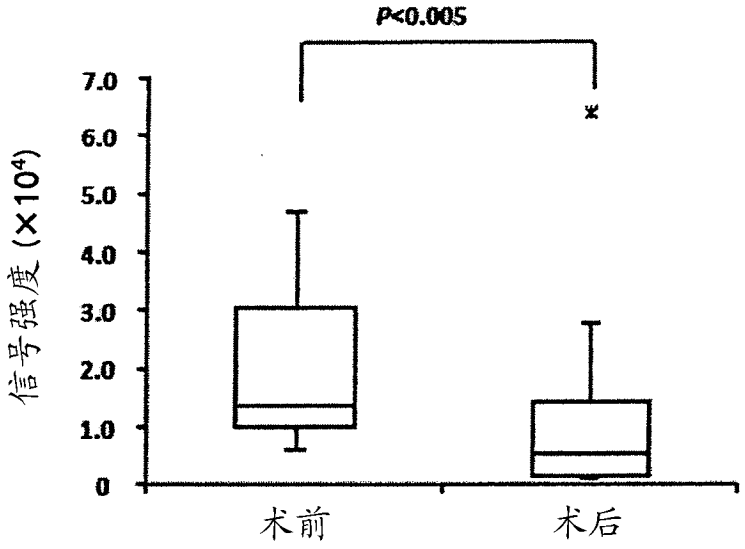


图 7C



* 各数据的中央部的线表示检测结果的中值。

图 8