

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年2月15日 (15.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/018257 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/315793
- (22) 国際出願日: 2006年8月10日 (10.08.2006)
- (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2005-231972 2005年8月10日 (10.08.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人浜松科学技術研究振興会 (HAMAMATSU FOUNDATION FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY PROMOTION) [JP/JP]; 〒4328561 静岡県浜松市城北3-5-1 静岡大学浜松キャンパス内 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金岡 繁 (KANAOKA, Shigeru).
- (74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒1050001 東京都港区虎ノ門1丁目2番12号 SVAX TSB ル 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, 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。

(54) Title: METHOD OF DETECTING LARGE BOWEL CANCER MARKER

(54) 発明の名称: 大腸癌マーカー検出方法

(57) Abstract: A method of detecting a tumor marker for the diagnosis of large bowel cancer and adenomatous polyposis coli comprising the steps of a) collecting and freezing feces, b) homogenizing the frozen feces in the presence of an RNAase inhibitor and preparing a suspension, c) extracting RNA from the obtained sample from which RNA is extracted, d) obtaining cDNA by reverse transcribing the extracted RNA, e) amplifying the obtained cDNA, and f) detecting the amplified cDNA, characterized in that the tumor marker is one or more tumor markers selected from the group consisting of COX-2, SNAIL and MMP-7 (with the proviso that a case where only COX-2 or MMP-7 is selected is excluded).

(57) 要約: a) 糞便を採取し、凍結する工程、b) 凍結した糞便をRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する工程、c) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する工程、d) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る工程、e) 得られたcDNAを増幅する工程、及びf) 増幅されたcDNAを検出する工程を含む大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出方法であって、上記腫瘍マーカーが、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー (ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く) であることを特徴とする、腫瘍マーカーの検出方法。

WO 2007/018257 A1

明 細 書

大腸癌マーカー検出方法

技術分野

- [0001] 本発明は、大腸癌及び大腸腺腫診断のためのCOX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー（ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く）の検出方法、及びこれらの腫瘍マーカーを含む大腸癌及び大腸腺腫診断用キットに関する。

背景技術

- [0002] 大腸癌による死亡者が、増加している。大腸癌による死亡者は、全ての癌による死亡者のうち男性においては第4番目、女性においては第2番目に多い癌である（1999年度癌死統計）。また、2015年の癌患者推計では、男女とも似に第一位になると推計されており、二次的な予防を含めた総合的な大腸癌対策が求められており、癌の集団検診は、最も効果的な方法の一つである。
- [0003] 癌の集団検診（mass screening）のためには、簡便かつ非侵襲性の検出方法であることが重要である。現在利用することができる唯一の非侵襲性の方法は、潜血の有無を調べる糞便検査、すなわち便潜血検査であり、大腸癌の集団検診の標準方法として広く用いられている。
- [0004] しかし、便潜血検査は、糞便中にヘモグロビンが現れることが腫瘍に特異的なものではないことから、感度及び特異度が低く（感度30～90%、特異度70～98%）、そのため偽陰性や偽陽性が少なからず存在するという欠点がある。
- [0005] また、大腸癌の診断には、免疫学的便潜血法によるスクリーニングの後か、又は同時に、全大腸内視鏡検査又は注腸検査とS状結腸内視鏡検査とが組み合わせて用いられており、多大な時間と労力がかかるという欠点がある。
- [0006] 便潜血検査の代替法としては、糞便中のK-ras、p-53、APC遺伝子変異やマイクロサテライト不安定性を検出する等のDNAを用いた方法が報告されている（非特許文献1～4）。
- [0007] これらのDNAを用いる方法は、非侵襲的で癌細胞の直接的変化を捉えることがで

きる方法であり、特異度が高いという特徴を有し、将来性豊かな方法と考えられるが、従来技術である便潜血検査と比べると感度が低く、また、時間と労力もかなりかかるという欠点がある。

- [0008] また、さらなる便潜血検査の代替法として、遺伝子発現をより直接的に検出するために、糞便中のタンパク質キナーゼC (PKC) 等のmRNAを検出する方法も開発されている(非特許文献5～7)。
- [0009] しかし、上記のRNAを用いる方法によっても、少量の糞便から簡便かつ効率的にRNAを抽出することができず、便潜血法を超える感度を得ることができなかった。
- [010] PCR法を逆転写酵素反応(RT)と組み合わせることによって、RNAを定性的に、また定量的に検出する方法が知られている。このRT-PCR法は、微量分子を検出することができる感度の高さと、ノーザンブロット法に優り、また、手技の速さや容易さでin situハイブリダイゼーション法に優るものである。
- [011] しかし、RNAは、DNAに比べて不安定であり、かつ、全ての生物学的試料中に普遍的に存在し、極めて安定であるRNA分解酵素(RNase)による分解の危険性に常にさらされていることから、RT-PCR法においても、RNAの精製過程及び精製後においても、RNaseが混入しないように厳密な管理が要求される。
- [012] したがって、糞便という生物学的に極めて粗製の試料からRNAを抽出する際には、RNaseの影響を排除するために、予め細胞画分を分離する工程が必要とされていた。
- [013] したがって、極めて多量の微生物に由来する膨大な量のRNaseが存在する糞便から直接RNAを検出することは、不可能であり、少なくとも微生物等に由来する外因性RNase除去のために細胞画分の分離は、必須であると考えられていた。
- [014] 本発明者は、すでに、場合により凍結した生物学的試料をRNA分解酵素阻害剤の存在下に均質化することによって、大腸癌の診断に有用な腫瘍マーカーを糞便から検出する方法を開発している(特許文献1)。
- [015] 最近、便潜血法代替大腸癌スクリーニング法として、便の細胞画分のCD44バリエーションの発現を調べる方法が開発されたが、その感度は約68%にすぎず、便潜血法の感度(約75%)に及ばないものであった(非特許文献8)。

[0016] 本発明者は、驚くべきことに、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー(ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く)を採用することによって、大腸癌及び大腸腺腫診断の感度、特異度及び臨床的有用度を改善することができることを発見し、本発明を完成させた。

特許文献1:WO2004/083856A1

非特許文献1:シドランスキー等著(D. Sidransky, et al.)、サイエンス(Science)、第256巻、1992年4月3日、第102頁～第105頁

非特許文献2:ドン等著(S.M.Dong, et al.)、ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(Journal of the National Cancer Institute)、第93巻、第11号、2001年6月11日、第858頁～第865頁

非特許文献3:トラベルソ等著(G.Traverso, et al.)、ザ・ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(The New England Journal of Medicine)、第346巻、第5号、2002年1月31日、第311頁～第320頁

非特許文献4:トラベルソ等著(G.Traverso, et al.)、ザ・ランセット(The Lancet)、第359巻、2002年2月2日、第403頁～第404頁

非特許文献5:デビッドソン等著(L.A.Davidson, et al.)、カーシノジェネシス(Carcinogenesis)、第19巻、第2号、1998年、第253頁～第257頁

非特許文献6:アレキサンダー及びライハット等著(R.J.Alexander and R.F.Raicht)、ダイジェスティブ・デジージス・アンド・サイエンス(Digestive Diseases and Sciences)、第43巻、第12号、1998年、第2652頁～第2658頁

非特許文献7:ヤマオ等著(T.Yamao et al.)、ガストロエンテロロジー(Gastroenterology)、第114巻、第6号、1998年、第1198頁～第1205頁

非特許文献8:サイトウ著(Hiroshi Saito)、ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・キャンサー・リサーチ(Japanese Journal of Cancer Research)、第87巻、第10号、1996年、第1011頁～1024頁

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0017] したがって、本発明の目的は、大腸癌及び大腸腺腫診断のためのCOX-2、SN

AIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー（ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く）の検出方法、及びこれらの腫瘍マーカーを含む大腸癌及び大腸腺腫診断用キットを提供することにある。

[0018] より具体的には、本発明は、下記に関する。

1. 下記工程：

- a) 糞便を採取し、凍結する工程、
- b) 凍結した糞便をRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する工程、
- c) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する工程、
- d) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る工程、
- e) 得られたcDNAを増幅する工程、及び
- f) 増幅されたcDNAを検出する工程

を含む大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出方法であって、上記腫瘍マーカーが、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー（ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く）であることを特徴とする、
腫瘍マーカーの検出方法。

2. 上記腫瘍マーカーが、COX-2とMMP-7との組合せ、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せ、又はCOX-2とSNAILとの組合せである、上記1記載の方法。

3. 上記腫瘍マーカーが、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せであり、大腸癌が早期大腸癌である、大腸癌診断のための上記1記載の方法。

4. 下記手段：

- a) 糞便を採取し、凍結する手段、
- b) 凍結した糞便をRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する手段、
- c) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する手段、
- d) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る手段、

e)得られたcDNAを増幅する手段、及び

f)増幅されたcDNAを検出する手段

を含む、大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キットであって、上記腫瘍マーカーが、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー(ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く)であることを特徴とする、大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

5. 上記腫瘍マーカーが、COX-2とMMP-7との組合せ、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せ、又はCOX-2とSNAILとの組合せである、上記4記載の大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

6. 上記腫瘍マーカーが、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せであり、大腸癌が早期大腸癌である、上記4記載の大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

発明を実施するための最良の形態

[0019] 本発明のRNA分解酵素阻害剤としては、チオシアン酸グアニジン、アイソジェン(Isogene)、ウルトラスペックII(登録商標)(Ultraspec II)等が挙げられる。

[0020] 凍結方法は、任意の従来技術を用いることができ、好ましくは、液体窒素を用いる方法である。凍結温度は、保存温度は、 $-1\sim-196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $-20\sim-196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $-75\sim-196^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは、 $-110\sim-196^{\circ}\text{C}$ 、最も好ましくは -196°C である。

[0021] 凍結されたサンプルは、冷凍保存してもよい。保存温度は、 $-75\sim-196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $-110\sim-196^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは -196°C である。保存期間は、1日～10年、好ましくは、1日～3年、より好ましくは、1日～1年である。

[0022] 本発明で用いられる腫瘍マーカーは、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー(ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く)である。

[0023] 好ましくは、上記腫瘍マーカーは、COX-2とMMP-7との組合せ、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せ、又はCOX-2とSNAILとの組合せである。

[0024] また、早期大腸癌及び大腸腺腫診断のためには、上記腫瘍マーカーは、COX-2

とSNAILとMMP-7との組合せである。

- [0025] COX-2は、アラキドン酸をプロスタグランジンH₂に変換する誘導酵素であり、COX-2の発現が高まると、アポトーシスが阻害され、血管新生因子や浸潤時に必要とされる基質分解酵素が誘導される。SNAILは、細胞間接着因子であるE-カドヘリンの負の転写調節因子であり、SNAILの発現が高まるとE-カドヘリンの発現が低下し、細胞間の接着が低下し深部浸潤や転移に影響することが知られている。MMP-7は、マトリックスメタロプロテアーゼの一種であり、癌の浸潤・転移に必要と考えられている。
- [0026] 上記工程d)～f)は、RT-PCR法と呼ばれるものであり、例えば、関谷剛男等編、PCR法最前線、1997年、共立出版、第187頁～第196頁の記載にしたがって行うことができる。
- [0027] 懸濁物からのRNAの抽出は、従来公知の方法を用いることができ、例えば、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)やRNA Extraction Kit (Pharmacia Biotech)のような市販のキットを用いることができる。
- [0028] 本発明で逆転写とは、逆転写酵素 (Reverse Transcriptase)を用いてRNAを相補的なDNA (cDNA)に転換することをいう。逆転写反応は、通常、バッファー、MgCl₂やKCl等の塩類、ジチオスレイトール (DTT)、プライマー、デオキシリボヌクレオチド類、RNase阻害剤及び逆転写酵素を含む溶液を用いて行われる。上記塩類は、適宜、他の塩類に変更して試用することができる。また、ゼラチン、アルブミン等のタンパク質や界面活性剤等を添加することもできる。
- [0029] 逆転写に続いて行われるcDNAの増幅は、通常、PCRが用いられる。PCRの反応液は、通常、バッファー、MgCl₂やKCl等の塩類、プライマー、デオキシリボヌクレオチド類、及び耐熱性ポリメラーゼを含む。上記塩類は、適宜、他の塩類に変更して試用することができる。また、ゼラチン、アルブミン等のタンパク質、ジメチルスルホキシドや界面活性剤等を添加することもできる。
- [0030] cDNAの増幅は、LAMP法 (特許第3313358号公報)やICAN法 (特開2001-136965)を用いることもできる。
- [0031] 本発明でプライマーとは、cDNA合成や核酸増幅の際の合成開始点として働くオリ

ゴヌクレオチドをいう。プライマーは一本鎖であることが望ましいが、二本鎖も使用することができる。プライマーが二本鎖である場合には、増幅反応に先立ち、一本鎖にすることが望ましい。プライマーは、公知の方法にしたがって合成することができ、また、生物から単離することもできる。

[0032] 逆転写反応に使用する逆転写酵素は、RNAをcDNAに逆転写することができる酵素を意味する。逆転写酵素としては、RAV (Rous associated virus) やAMV (Avian myeloblastosis virus) 等のレトロウイルス由来の逆転写酵素や、MMLV (Moloney murine leukemia virus) 等のマウスのレトロウイルス由来の逆転写酵素があるが、これらに限定されるものではない。

[0033] PCRに用いる耐熱性ポリメラーゼとしては、Taqポリメラーゼが挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0034] 増幅されたDNAの検出方法としては、アガロースゲルを用いる電気泳動を用いることができるが、これに限定されるものではない。

[0035] 本発明のキットには、本発明の方法を記載した指示書を含むこともできる。また、キットに含まれるものとして、逆転写酵素、RNase阻害剤、DNA合成酵素、各種デオキシヌクレオチド3リン酸(dNTPs)、各腫瘍マーカーに対する特異的プライマー、各腫瘍マーカーに対する陽性コントロール、RNase・DNaseを含まない蒸留水、蛍光・目視検出用試薬などを挙げることができる。

実施例 1

[0036] 以下の実施例は、本発明を説明するものであるが、本発明を限定するものではない。

[0037] 浜松医科大学第1内科に精査・治療目的のために入院し、全大腸内視鏡によって大腸癌の存在が確認された患者、及び大腸に腫瘍又は炎症性変化のない(非大腸疾患)患者を対象とした。なお、すべての患者からインフォームドコンセントが得られている。

[0038] 糞便は、採便後可及的速やかに5mlチューブに約0.5～1gずつ分取し、液体窒素を用いて凍結させ、－80℃で保存した。また、比較対照のため、それぞれの試料について免疫学的便潜血検査法により便中のヒトヘモグロビン(Hb)を測定した。組織

は、治療前に受けた内視鏡検査時に癌部と正常部の生検材料を液体窒素で凍結してから -80°C で保存した。その後、ホモジナイザーとグアニジン塩とフェノールを用いてホモジナイズし、クロロホルムとエタノールで全RNAを抽出した。

[0039] 得られたRNAの $1\mu\text{g}$ をリバーسكريプトII(登録商標)(反応液量 $20\mu\text{l}$ 、和光純薬)を用いて逆転写しcDNAを得、その一部をGene Taq(和光純薬)を用いて、ネステイドPCRによって増幅させた。得られたPCR増幅産物を、4%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

[0040] なお、用いたプライマーは、逆転写では、ランダムプライマーであり、PCRでは、COX-2、SNAIL、MMP-7ともに独自に設計したものを使用した。PCRは、3つの分子とも第1ラウンドを20サイクルで行い、第2ラウンドではCOX-2は20サイクル、SNAIL、MMP-7の両者は35サイクルで行った。

使用したプライマーを下記に示す。

<COX-2>

フォワード1:5'-CTGAAACTCCAAACACAG-3'

フォワード2:5'-GCACTACATACTTACCCACTTCAA-3'

リバーズ:5'-ATAGGAGAGGTTAGAGAAGGCT-3'

<SNAIL>

フォワード1:5'-AGATGAGGACAGTGGGAAAGGCT-3'

フォワード2:5'-CCTTCGTCCTTCTCCTCTACTTCA-3'

リバーズ1 :5'-AGGTATGGAGAGGAAGAGGGAG-3'

リバーズ2 :5'-GCACTGGTACTTCTTGACATCTGAG-3'

<MMP-7>

フォワード1:5'-ATGAGTGAGCTACAGTGGGAA-3'

フォワード2:5'-TTAAACTCCCGCGTCATAGAA-3'

リバーズ1 :5'-AAATGCAGGGGGATCTCTTTG-3'

リバーズ2 :5'-TCGATCCACTGTAATATGCGG-3'

[0041] 結果

大腸癌65例(早期癌13例、進行癌52例)と対照群32例における糞便からのRT-

PCRによるCOX-2、SNAIL及びMMP-7の検出結果を比較対照として行った免疫学的便潜血検査の検出結果と比較した(表1)。

[0042]

COX-2、SNAIL及びMMP-7アッセイと便潜血法との比較

腫瘍マーカー	COX-2	SNAIL	MMP-7	COX-2又はSNAIL	COX-2又はMMP-7	COX-2、SNAIL又はMMP-7	免疫学的便潜血法
感度	87.7% (57 / 65)	49.2% (32 / 65)	65.6% (42 / 64)	87.7% (57 / 65)	90.8% (59 / 65)	90.8% (59 / 65)	73.0% (46 / 63)
95% CI	77.2 - 94.5%	36.6 - 61.9%	52.7 - 77.1%	77.2 - 94.5%	81.0-96.5% <i>P</i> = 0.02	81.0-96.5% <i>P</i> = 0.02	60.3 - 83.4%
特異度	100% (32 / 32)	100% (32 / 32)	100% (31 / 31)	100% (32 / 32)	100% (31 / 31)	100% (31 / 31)	87.5% (28 / 32)
95% CI	91.1 - 100%	91.1 - 100%	90.8 - 100%	91.1 - 100%	90.8 - 100%	90.8 - 100%	71.0 - 96.5%
臨床的有用度	91.7% (89 / 97)	66.0% (64 / 97)	76.8% (73 / 95)	91.7% (89 / 97)	93.8% (90 / 96)	93.8% (90 / 96)	77.9% (74 / 95)
95% CI	84.4 - 96.4% <i>P</i> = 0.01	55.7 - 75.3%	67.1 - 84.9%	84.4 - 96.4% <i>P</i> = 0.01	86.9-97.7% <i>P</i> = 0.003	86.9-97.7% <i>P</i> = 0.003	68.2 - 85.8%
腺腫	61.5% (8/13)	61.5% (8/13)	53.8% (7 / 13)	76.9% (10/13)	69.2% (9/13)	84.6% (11/13)	30.8% (4/13)
	31.6-86.1%	31.6-86.1%	25.1-74.1%	46.2-95.0% <i>P</i> = 0.049	38.6-90.9%	54.6-98.1% <i>P</i> = 0.017	9.1-61.4%
腺腫 ~ 0 期癌	66.7% (10/15)	53.3% (8/15)	46.7% (7 / 15)	80.0% (12/15)	73.3% (11/15)	86.7% (13/15)	26.7% (4/15)
	38.4-88.2%	26.6-78.7%	21.3-73.4%	51.9-95.7% <i>P</i> = 0.010	44.9-92.2% <i>P</i> = 0.028	59.5-98.3% <i>P</i> = 0.0032	7.8-55.1%
腺腫 ~ I 期癌	73.1% (19/26)	50.0% (13/26)	50.0% (13 / 26)	80.8% (21/26)	76.9% (20/26)	84.6% (22/26)	36.0% (9/25)
	52.2-88.4% <i>P</i> = 0.017	29.9-70.1%	29.9-70.1%	60.6-93.4% <i>P</i> = 0.0030	56.4-91.0% <i>P</i> = 0.0076	65.1-95.6% <i>P</i> = 0.0010	18.0-57.5%
腺腫 ~ II期癌	83.6% (46/55)	47.3% (26/55)	64.8% (35 / 54)	87.3% (48/55)	87.3% (48/55)	90.9% (50/55)	60.4% (32/53)
	71.2-92.2% <i>P</i> = 0.013	33.7-61.2%	50.6-77.3%	75.5-94.7% <i>P</i> = 0.0029	75.5-94.7% <i>P</i> = 0.0029	80.0-97.0% <i>P</i> = 0.00049	46.0-73.5%
腺腫と癌全体	83.3% (65/78)	48.7% (38/78)	63.6% (49 / 77)	85.9% (67/78)	87.2% (68/78)	89.7% (70/78)	65.8 (50/76)
	73.1-90.8% <i>P</i> = 0.020	37.2-60.3%	51.9-74.3%	76.2-92.7% <i>P</i> = 0.0063	77.7-93.7% <i>P</i> = 0.0032	80.8-95.4% <i>P</i> = 0.00070	54.0-76.3%
腺腫、癌全体と正常者の臨床的有用度	88.2% (97/110)	70.9% (78/110)	80.6% (87 / 108)	90.0% (99/110)	90.8% (99/109)	92.7% (101/109)	72.2 (78/108)
	80.6-93.6% <i>P</i> = 0.0053	61.5-79.2%	71.8-87.5%	82.8-94.9% <i>P</i> = 0.0014	83.8-95.5% <i>P</i> = 0.00078	86.0-96.8% <i>P</i> = 0.00016	62.8-80.4%

- [0043] 大腸癌65例における感度(sensitivity)、特異度(specificity)、臨床的有用度(Accuracy; 癌を癌、正常を正常と診断したことを意味する)は、COX-2では各々87.7%(57/65)、100%(32/32)、91.7%(89/97)であり、SNAILでは各々49.2%(32/65)、100%(32/32)、66.0%(64/97)であり、MMP-7では各々65.6%(42/64)、100%(31/31)、76.8%(73/95)であった。
- [0044] 一方、比較対照として行った免疫学的便潜血検査では、感度73.0%(46/63)、特異度87.5%(28/32)、臨床的有用度77.9%(74/95)であった。
- [0045] SNAIL及びMMP-7のいずれか単独では、免疫学的便潜血検査と比べて感度、臨床的有用度において低い値であったが、COX-2は感度、特異度、臨床的有用度のいずれのパラメーターにおいても免疫学的便潜血検査より高い値を得た。しかし、表1でも示したように統計学的に有意な差はなく、COX-2のいずれのパラメーターの95%信頼区間(95%CI)も、COX-2と免疫学的便潜血検査の間で重複していた。
- [0046] ところが、COX-2が陰性であった8例中2例でMMP-7が陽性であることからCOX-2とMMP-7の二つのマーカーの組合せについて検討すると、COX-2またはMMP-7の一方が陽性である群(COX-2又はMMP-7)では、感度が90.8%(59/65)、臨床的有用度が93.8%(90/96)であった。この結果、COX-2又はMMP-7群の感度、臨床的有用度は免疫学的便潜血検査に比し統計学的に有意差を認めた。また臨床的有用度においては95%信頼区間が、86.9%－97.7%となり免疫学的便潜血検査の95%信頼区間である68.2%－85.8%と重複を認めなくなった。同様に、COX-2、SNAIL又はMMP-7のいずれかが陽性である群(COX-2、SNAIL又はMMP-7)と免疫学的便潜血検査群との間でも、感度に明らかな有意差があることを示した。さらに、臨床的有用度においても、COX-2、COX-2又はSNAIL、COX-2又はMMP-7、及び、COX-2、SNAIL又はMMP-7について、免疫学的便潜血検査に比べて統計学的に有意な差があることを示した。
- [0047] 次に、癌を臨床病期0期からIV期に分類し、各症例を腺腫、腺腫から0期の癌、腺腫からI期の癌(腺腫、0期及びI期の癌)、腺腫からII期の癌(腺腫及び0期～II期の

癌)、腺腫から癌全体(腺腫及び癌を含めた大腸腫瘍(advanced neoplasia))の4つの群に分けて、各群ごとに感度の検討を行った。

[0048] その結果、COX-2単独であっても、腺腫からI期の癌、腺腫からII期の癌、腺腫から癌全体では感度が各々73.1%、83.6%、83.3%であり、免疫学的便潜血検査は同一の各群で36.0%、60.4%、65.8%であった。また、臨床的有用度が88.2%(97/110)、その95%信頼区間は80.6%–93.6%であるのに対し、免疫学的便潜血検査の臨床的有用度は72.2%(78/108)であり、その95%信頼区間62.8%–80.4%であった。

[0049] すなわち、COX-2単独であっても、腺腫からI期の癌、腺腫からII期の癌、腺腫から癌全体の各群で、免疫学的便潜血検査の感度と臨床的有用度を上回り、統計的に有意差を認め、また、統計的に両者の95%信頼区間は重複しないことを示した。

[0050] また、COX-2が陰性の腺腫5例のうち1例でMMP-7が陽性、腺腫5例のうち2例がSNAIL陽性であることから、COX-2又はMMP-7、COX-2又はSNAILとCOX-2、SNAIL、MMP-7のいずれかを陽性とした場合についても検討した。

[0051] その結果、腺腫のみで、COX-2又はSNAILの感度が76.9%(10/13、95%信頼区間46.2%–95.0%)、COX-2、SNAIL、MMP-7のいずれかを陽性した場合の感度が84.6%(11/13、95%信頼区間54.6%–98.1%)と免疫学的便潜血検査の感度である30.8%(4/13、95%信頼区間9.1%–61.4%)を共に大幅に上回った。また、腺腫から0期、腺腫からI期、腺腫からII期の癌、及び腺腫と癌全体においてもCOX-2又はSNAIL、COX-2又はMMP-7、そしてCOX-2、SNAIL、MMP-7のいずれか陽性群で免疫学的便潜血検査と比し統計的に有意な差を認めた。さらにCOX-2又はMMP-7において腺腫からII期の癌で、COX-2又はSNAILでは腺腫からI期で、そしてCOX-2、SNAIL、MMP-7のいずれか陽性群では腺腫から0期において95%信頼区間で重複しない有意に高い感度を得ることができた。

[0052] つまりCOX-2、SNAIL、MMP-7の組合せは、内視鏡や手術などで根治可能である比較的早期の大腸腫瘍のスクリーニングに優れ、しかも特異度の高い非常に

有用な検査法である。

産業上の利用可能性

[0053] 本発明の方法は、特異度、感度及び臨床的有用性の高い新規大腸癌の非侵襲的スクリーニング方法として従来の便鮮血法の代替となりうるものであり、臨床的に極めて有用なものである。

請求の範囲

[1] 下記工程：

- a) 糞便を採取し、凍結する工程、
- b) 凍結した糞便をRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する工程、
- c) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する工程、
- d) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る工程、
- e) 得られたcDNAを増幅する工程、及び
- f) 増幅されたcDNAを検出する工程

を含む大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出方法であって、上記腫瘍マーカーが、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー（ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く）であることを特徴とする、腫瘍マーカーの検出方法。

[2] 上記腫瘍マーカーが、COX-2とMMP-7との組合せ、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せ、又はCOX-2とSNAILとの組合せである、請求項1記載の方法。

[3] 上記腫瘍マーカーが、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せであり、大腸癌が早期大腸癌である、請求項1記載の方法。

[4] 下記手段：

- a) 糞便を採取し、凍結する手段、
- b) 凍結した糞便をRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する手段、
- c) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する手段、
- d) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る手段、
- e) 得られたcDNAを増幅する手段、及び
- f) 増幅されたcDNAを検出する手段

を含む、大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キットであって、

上記腫瘍マーカーが、COX-2、SNAIL及びMMP-7からなる群より選択される1以上の腫瘍マーカー(ただし、COX-2又はMMP-7のいずれかのみを除く)であることを特徴とする、大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

[5] 上記腫瘍マーカーが、COX-2とMMP-7との組合せ、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せ、又はCOX-2とSNAILとの組合せである、請求項4記載の大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

[6] 上記腫瘍マーカーが、COX-2とSNAILとMMP-7との組合せであり、大腸癌が早期大腸癌である、請求項4記載の大腸癌及び大腸腺腫診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), PubMed, JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/083856 A1 (Hamamatsu Foundation for Science and Technology Promotion), 30 September, 2004 (30.09.04), All pages (particularly, Claims 1 to 6; examples 1, 2) & EP 1605261 A1	1-6
Y	KANAOKA, S., et al., Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening, Gastroenterology, Vol.127, No.2, 2004.08, p.422-427 (particularly, page 422, right column, 2nd line from the bottom to page 423, left column, line 3)	1-6

☒ 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
07 September, 2006 (07.09.06)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2006 (19.09.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315793

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/019827 A1 (Japan Science and Technology Agency), 03 March, 2005 (03.03.05), All pages & JP 2005-062125 A	1-6
Y	JP 2002-142767 A (Fujirebio Inc.), 21 May, 2002 (21.05.02), All pages (Family: none)	1-6
Y	NOSHO, K., et al., Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis, Carcinogenesis, 2005.05, Vol.26, No.5, p.892-899 (particularly, table I, II; Fig. 2)	1-6
Y	BOEDEFEELD, W.M., et al., Increased expression of E1A-F, MMP-7, and COX-2 in human colorectal cancer, Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vol. 43, 2002.03, p.730	1-6
Y	Li, X., et al., Co-expression of matrix metalloproteinase-7 and cyclooxygenase-2 in human colorectal carcinoma, Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vol.42, 2001.03, p.614	1-6
Y	DE CRAENE, B., et al., The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program, Cancer Res., Vol.65, No.14, 2005.07.15, p.6237-6244	1-6
Y	ROY, H.K., et al., The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer, Dig. Dis. Sci., Vol.50, No.1, 2005.01, p.42-46	1-6
A	WO 2000/063358 A1 (NAIR PADMANABHAN, P.), 26 October, 2000 (26.10.00), All pages & JP 2004-519202 A & EP 1169437 A1 & US 6335193 B1	1-6
A	DUTTA, S.K., et al., Noninvasive detection of colorectal cancer by molecular tools: coming of age, Gastroenterology, Vol.114, No.6, 1998.06, p.1333-1335	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315793

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shigeru KANEMOTO et al., "Funbenchu no COX-2 mRNA o Hyoteki ni shita Daichogan Shindan. Kenshin no Kanosei ni Tsuite", Nippon Shokaki Shudan Kenshin Gakkai Zasshi, Vol.42, No.2, 2004.03, page 58 (S3-3)	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 年

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), PubMed, JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)

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	WO 2004/083856 A1 (財団法人浜松科学技術研究振興会) 2004.09.30 全 頁（特に、請求の範囲 1-6、および実施例 1、2 参照） & EP 1605261 A1	1-6
Y	KANAOKA, S., et al., Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening, Gastroenterology, Vol.127, No.2, 2004.08, p.422-427 （特に、第 422 頁右 欄の下から第 2 行－第 423 頁左欄第 3 行参照）	1-6

☒ 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

0 7 . 0 9 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 9 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

西 剛志

4 B

3 5 3 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2005/019827 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2005.03.03, 全頁 & JP 2005-062125 A	1-6
Y	JP 2002-142767 A (富士レビオ株式会社) 2002.05.21, 全頁 (ファミリー なし)	1-6
Y	NOSHO, K., et al., Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis, Carcinogenesis, 2005.05, Vol.26, No.5, p.892-899 (特に、Table I, II およ び Fig.2 参照)	1-6
Y	BOEDEFELD, W.M., et al., Increased expression of E1A-F, MMP-7, and COX-2 in human colorectal cancer, Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vol. 43, 2002.03, p.730	1-6
Y	Li, X., et al., Co-expression of matrix metalloproteinase-7 and cyclooxygenase-2 in human colorectal carcinoma, Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vol.42, 2001.03, p.614	1-6
Y	DE CRAENE, B., et al., The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program, Cancer Res., Vol.65, No.14, 2005.07.15, p.6237-6244	1-6
Y	ROY, H.K., et al., The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer, Dig. Dis. Sci., Vol.50, No.1, 2005.01, p.42-46	1-6
A	WO 2000/063358 A1 (NAIR PADMANABHAN, P.) 2000.10.26, 全頁 & JP 2004-519202 A & EP 1169437 A1 & US 6335193 B1	1-6
A	DUTTA, S.K., et al., Noninvasive detection of colorectal cancer by molecular tools: coming of age, Gastroenterology, Vol.114, No.6, 1998.06, p.1333-1335	1-6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	金本繁、他、糞便中の COX-2 mRNA を標的にした大腸がん診断・検診の可能性について、日本消化器集団検診学会雑誌, Vol.42, No.2, 2004.03, p.58 (S3-3)	1-6