

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 29 日(29.09.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/152352 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054968
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 20 日(20.02.2016)
- (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 2015-058692 2015 年 3 月 20 日(20.03.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 Aichi (JP). 学校法人中部大学(CHUBU UNIVERSITY EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒4878501 愛知県春日井市松本町 1 2 0 O Aichi (JP).
- (72) 発明者: 加藤 昌志(KATO Masashi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 矢嶋 伊知朗(YAJIMA Ichiro); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 武田 湖州恵(TAKEDA Kozue); 〒4878501 愛知県春日井市松本町 1 2 0 0 学校法人中部大学内 Aichi (JP). 後藤 友二(GOTO Yuji); 〒2750011 千葉

県習志野市大久保 2 - 6 - 1 - 3 0 1 Chiba (JP).

- (74) 代理人: 萩野 幹治(HAGINO Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ 1 丁目 1 番地 Gifu (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MELANOMA-SPECIFIC BIOMARKER AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: メラノーマ特異的バイオマーカー及びその利用

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a marker molecule which enables the highly efficient diagnosis of melanoma; and a novel therapy target molecule which can be utilized in an effective therapy method. As melanoma-specific markers, PDZRN3, DTX3L, CSS3 and BRP44L are provided. Also provided are a test method, a therapy method and others each using these biological molecules.

(57) 要約: メラノーマを効率よく診断するマーカー分子や、効果的な治療法に利用できる新たな治療標的分子を提供することを課題とする。メラノーマ特異的なマーカーとして、PDZRN3、DTX3L、CSS3 及び BRP44L が提供される。また、これらの生体分子を利用した検査法、治療法などが提供される。



WO 2016/152352 A1

明 細 書

発明の名称：メラノーマ特異的バイオマーカー及びその利用

技術分野

[0001] 本発明はメラノーマ特異的バイオマーカーに関する。詳しくは、メラノーマ特異的な新規バイオマーカー及びそれを利用した検査法等に関する。本出願は、2015年3月20日に出願された日本国特許出願第2015-058692号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

背景技術

[0002] 従来、メラノーマの診断には腫瘍マーカーとしてS100、melanoma inhibiting activity (MIA)、5-S-cysteinyldopa (5-S-CD)、6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid (6-H-5-MI-2CA) 等が使用されている(非特許文献1)。一方、メラノーマの分子標的治療薬は長い間ダカルバジン(Dacarbazine)が利用されてきたが、近年MAPキナーゼ経路関連分子(BRAF、MEK)を標的とした新たな分子標的薬が開発され、臨床の現場に登場している(非特許文献2)。

[0003] メラノーマは全ての癌腫の中で増加率が第1位である(世界統計)。また、ステージの進行したメラノーマは予後不良であり、早期発見が重要である。一方、メラノーマに対する従来のバイオマーカーは進行期メラノーマにのみ有効であり、早期診断には有用性が低い。メラノーマの悪性化との関連性が高い遺伝子やタンパク質等を新たな診断マーカーとして利用できれば、より早期に、信頼性の高い診断が可能となる。また、メラノーマの病理診断は容易ではなく、メラノーマに特異性の高いバイオマーカーを提供できれば、病理診断精度の向上にも貢献できる。

[0004] メラノーマ治療において多用されているダカルバジンの効果は限られており、また、BRAFを標的とした分子標的薬は一時的には大変高い効果を示すが、数ヶ月後には薬剤耐性メラノーマが再発する。また、これらの分子標的薬

は細胞内シグナルの特定経路をターゲットとしており、この経路を介さずにメラノーマとしての機能を発現している場合には適用できない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Br J Dermatol. 2000 Aug;143(2):256-68

非特許文献2 : Dermatol Surg. 2014 Sep;40(9):948-63.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上記の背景から、メラノーマを効率よく診断するマーカー分子や、効果的な治療法に利用できる新たな治療標的分子の登場が期待されている。本発明は当該要望に応え、メラノーマに対する医療（診断法、治療法）の発展・向上に貢献することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らの研究グループはメラノーマ特異的なマーカー分子の同定を目標として研究を進めてきた。その成果として、メラノーマに対する効果的な診断や治療に利用できる4種類の新規メラノーマ関連分子（遺伝子）、即ちPDZ domain containing ring finger 3 (PDZRN3)、Deltex-3-like (DTX3L)、Chondroitin sulfate synthase 3 (CSS3)、brain protein 44-like (BRP44L)の同定に成功した。これら4種類の遺伝子及びその発現産物（タンパク質）のレベルは、良性腫瘍と悪性腫瘍の間で大きな差が認められた。また、詳細な検討の結果、これらの分子がメラノーマの発症又は進展（悪性化）や、抗がん剤や抗腫瘍作用を持つ薬剤に対する感受性や耐性に深く関与していることが判明した。特筆すべきことに、PDZRN3、DTX3L、CSS3及びBRP44Lは、Braf変異のないマウスメラノーマ（RET-マウスやB16系）や、BRAF変異のあるヒトメラノーマの両方において有意な発現量の増加（PDZRN3、DTX3L、CSS3）又は減少（BRP44L）を認めたことから、BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマの治療においても有効な標的となることが期待できる。即ち、同定に成功したこ

これらの分子は、現在のメラノーマ治療で使用する分子標的薬の抱える問題にも解決策を提供し得る。

以下の発明は、主として上記の成果及び考察に基づく。

[1] PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子、CSS3タンパク質、BRP44L遺伝子及びBRP44Lタンパク質からなる群より選択される生体分子からなる、メラノーマ特異的バイオマーカー。

[2] PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子、CSS3タンパク質、BRP44L遺伝子及びBRP44Lタンパク質からなる群より選択される一又は二以上の生体分子の検体中レベルを指標として用いることを特徴とする、メラノサイト系腫瘍検査法。

[3] 以下のステップ(1)～(3)を含む、[2]に記載のメラノサイト系腫瘍検査法：

(1) 被検者由来の検体を用意するステップ；

(2) 前記検体中の一又は二以上の前記生体分子を検出するステップ；及び

(3) 検出結果に基づいて、メラノサイト系腫瘍の悪性度を判定するステップ。

[4] PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子及びCSS3タンパク質については、検出値が高いと悪性度が高いとの基準、又は検出できると発症可能性が高いとの基準に従い、

BRP44L遺伝子及びBRP44Lタンパク質については、検出値が低いと悪性度が高いとの基準、又は検出できないと悪性度が高いとの基準に従い、ステップ(3)の判定を行う、[3]に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。

[5] ステップ(2)で得られた検出値と対照検体の検出値との比較に基づきステップ(3)の判定を行う、[3]又は[4]に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。

[6] ステップ(2)で得られた検出値と、同一の被検者から過去に採取された検体中の検出値との比較に基づきステップ(3)の判定を行う、[3]

〕又は〔４〕に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。

〔７〕前記検体が皮膚組織、血液、血漿、血清、尿、唾液、汗又は腫瘍組織である、〔２〕～〔６〕のいずれか一項に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。

〔８〕〔１〕に記載のメラノーマ特異的バイオマーカーに特異的結合性を示す物質からなる、メラノサイト系腫瘍検査試薬。

〔９〕前記物質が抗体である、〔８〕に記載のメラノサイト系腫瘍検査試薬。

〔１０〕〔８〕又は〔９〕に記載のメラノサイト系腫瘍検査試薬を含む、メラノサイト系腫瘍検査用キット。

〔１１〕PDZRN3遺伝子、DTX3L遺伝子及びCSS3遺伝子からなる群より選択される標的遺伝子の発現を抑制する化合物を有効成分とする、メラノーマ治療薬。

〔１２〕前記化合物が以下の(a)～(e)からなる群より選択される化合物である、〔１１〕に記載のメラノーマ治療薬：

(a)標的遺伝子を標的とするsiRNA；

(b)標的遺伝子を標的とするsiRNAを細胞内で生成する核酸コンストラクト；

(c)標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列と該配列にアニーリングする相補配列を有する一本鎖RNA；

(d)標的遺伝子の転写産物を標的とするアンチセンス核酸；

(e)標的遺伝子の転写産物を標的とするリボザイム。

〔１３〕以下の(A)又は(B)を有効成分として含み、抗がん剤又は抗腫瘍作用を持つ薬物と併用される、メラノーマ治療薬：

(A)BRP44Lタンパク質又はその一部（但し、メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用を有する）；

(B)BRP44L遺伝子又はその一部（但し、メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用を有するタンパク質をコードする）を保持する発現ベクタ

一。

[14] BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマに適用される、[11]～[13]のいずれか一項に記載のメラノーマ治療薬。

[15] [11]～[14]のいずれか一項に記載のメラノーマ治療薬を、メラノーマの患者に投与するステップ、を含むメラノーマ治療法。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]メラノーマモデルマウス腫瘍におけるPDZRN3遺伝子の発現量。メラノーマモデルマウス(RET-Tg)に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、PDZRN3遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRを用いて測定した。PDZRN3遺伝子の発現量は、良性腫瘍と比べて悪性メラノーマで大きく上昇する。

[図2]ヒト及びマウスメラノーマ細胞株におけるPDZRN3遺伝子の発現量。a)ヒト正常皮膚メラノサイト(NHEM)と、ヒトメラノーマ細胞株(6種)におけるPDZRN3タンパク質の発現。全てのメラノーマ細胞株において、PDZRN3タンパク質の発現量がNHEMと比べて上昇している。b)マウスメラノーマ細胞株(4種)におけるPdzn3タンパク質の発現量。B16細胞株は他の細胞株と比べて、浸潤能(転移活性)が低いことが知られている。浸潤能の低いB16と比べて、浸潤能の高い他の細胞株での発現量が大きく上昇している。Pdzn3が浸潤能と関連している可能性を示唆している。

[図3]ヒトメラノーマ組織(良性腫瘍: Benign、原発性メラノーマ: Malignant、転移性メラノーマ: Metastasis)におけるPDZRN3タンパク質の発現量。抗PDZRN3抗体による免疫染色後、染色レベルを数値化することで発現量を測定した。発現レベルを3つにカテゴライズ(陰性/低い、中程度、高い)し、各発現レベルの割合を帯グラフで表示した(下)。原発性メラノーマ及び転移性メラノーマでの発現レベルは良性腫瘍と比較して有意に高い。

[図4]メラノーマモデルマウス腫瘍におけるDTX3L遺伝子の発現量。メラノーマモデルマウス(RET-Tg)に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、DTX3L遺伝子(A)及びタンパク質(B、C)発現レベルをリアルタイムPCR(A)、ウェスタンブロッティング(B)及び免疫組織染色(C)を用いて測定した。DTX

3L遺伝子及びタンパク質の発現量は、良性腫瘍と比べて悪性メラノーマで大きく上昇する。

[図5]マウス及びヒトメラノーマ細胞株におけるDTX3Lタンパク質の発現量。A)マウスメラノーマ細胞株（4種）におけるDtx3lタンパク質の発現量。B16細胞株は他の細胞株と比べて、浸潤能（転移活性）が低いことが知られている。B)ヒト正常皮膚メラノサイト(NHEM)と、ヒトメラノーマ細胞株（5種）におけるDTX3Lタンパク質の発現。全てのメラノーマ細胞株において、DTX3Lタンパク質の発現量がNHEMと比べて上昇している。

[図6]ヒトメラノーマ組織（良性腫瘍：Benign、原発性メラノーマ：primary melanoma、転移性メラノーマ：Metastatic melanoma）におけるDTX3Lタンパク質の発現量。抗DTX3L抗体による免疫染色後、染色レベルを数値化することで発現量を測定した。発現レベルを3つ（陰性／低い、中程度、高い）にカテゴライズし、各発現レベルの割合を帯グラフで表示した（下）。原発性メラノーマ及び転移性メラノーマでの発現レベルは良性腫瘍と比較して有意に高い。

[図7]メラノーマモデルマウス腫瘍におけるCSS3遺伝子の発現量。CSS3にはCSS1、CSS2という同じファミリー遺伝子が存在する。メラノーマモデルマウス（RET-Tg）に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、これら3つの遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRを用いて測定した。CSS1、CSS2遺伝子は良性・悪性の両方で発現量は低いが、CSS3遺伝子は悪性メラノーマで発現量が大きく上昇する。

[図8]ヒトメラノーマ組織（良性腫瘍：Benign、原発性メラノーマ：Malignant、転移性メラノーマ：Metastatic melanoma）におけるCSS3タンパク質の発現量。抗CSS3抗体による免疫染色後、染色レベルを数値化することで発現量を測定した。発現レベルを3つ（陰性／低い、中程度、高い）にカテゴライズし、各発現レベルの割合を帯グラフで表示した（下）。原発性メラノーマ及び転移性メラノーマでの発現レベルは良性腫瘍と比較して有意に高い。

[図9]メラノーマモデルマウス腫瘍におけるBRP44L遺伝子及びタンパク質の発

現量。メラノーマモデルマウス (RET-Tg) に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、BRP44L遺伝子(A)及びタンパク質(B)発現レベルをリアルタイムPCR(A)、ウェスタンブロッティング(B)を用いて測定した。BRP44L mRNA及びタンパク質は、良性腫瘍と比較してメラノーマで発現が減少する。

[図10]ヒトメラノーマ組織におけるBRP44L遺伝子の発現量。ヒトメラノーマ組織（良性腫瘍: nevus、メラノーマ: melanoma）におけるBRP44L mRNAの発現量をリアルタイムPCRを用いて測定した。ヒトメラノーマ組織における発現量は良性腫瘍と比較して大きく減少している。

[図11]PDZRN3発現抑制による *in vitro* 浸潤能（転移能）の変化。shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてPDZRN3の発現が低下した安定株を樹立し(a)、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイ (invasion assay) によって測定した(b)。PDZRN3の発現量低下は、メラノーマ細胞が本来有する浸潤能を大きく阻害する。

[図12]PDZRN3発現抑制による *in vivo* 浸潤能（転移能）の変化。shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてPDZRN3の発現が低下した安定株を樹立した。各安定株の浸潤能を調べるために、安定株をヌードマウス尾部静脈へ注入し、その後の肺への転移活性を調査した(a)。PDZRN3の発現量低下は、メラノーマ細胞の肺への浸潤（転移）を大きく阻害する。一方、各安定株における浸潤能関連シグナル分子(FAK)の活性化（リン酸化）レベルを調査した。全てのPDZRN3発現抑制クローンでFAKのリン酸化（活性）レベルが低下した (b)

[図13]DTX3L発現抑制による *in vitro* 浸潤能（転移能）の変化（マウスメラノーマ細胞株）。shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてDTX3Lの発現が低下した安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定すると共に(A)、浸潤に関与する細胞内シグナル分子の活性を測定した(B)。DTX3Lの発現量低下は、Fak、Pi3k、Aktシグナルの活性を抑制し、マウスメラノーマ細胞が本来有する浸潤能を大きく阻害する。

[図14]DTX3L発現抑制による *in vitro* 浸潤能（転移能）の変化（ヒトメラノーマ

マ細胞株)。shRNA強制発現ベクターを用い、ヒトメラノーマ細胞株(G361)においてDTX3Lの発現が低下した安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定すると共に(A)、浸潤に関与する細胞内シグナル分子の活性を測定した(B)。DTX3Lの発現量低下は、Fak、Pi3k、Aktシグナルの活性を抑制し、ヒトメラノーマ細胞が本来有する浸潤能を大きく阻害する。

[図15]DTX3L発現抑制によるin vivo浸潤能(転移能)の変化。shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてDTX3Lの発現が低下した安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を調べるために、安定株をヌードマウス尾部静脈へ注入し、その後の肺への転移活性を調査した。A)注入した細胞はGFPを発現するため、肺転移した細胞を可視化できる。B)肺転移した細胞株由来腫瘍の組織切片。C)肺転移した腫瘍数の比較。DTX3Lの発現量低下は、メラノーマ細胞の肺への浸潤(転移)を大きく阻害する。

[図16]薬剤耐性メラノーマ細胞に対するDTX3L機能阻害の効果。ヒトメラノーマ細胞株(A375P)に既存のメラノーマ分子標的薬PLX4720を長期暴露し耐性株を作製した。siRNA導入によりDTX3Lの発現を低下させた場合(A)の浸潤能への効果を浸潤アッセイによって測定した(B)。PLX耐性メラノーマ細胞に対してもDTX3Lの発現抑制は効果的であり、既存の分子標的薬がもつ問題を解決できる。

[図17]CSS3強制発現によるin vivo浸潤能(転移能)の変化。マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてCSS3を強制発現させた安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定した。CSS3の強制発現は、メラノーマ細胞が本来有する浸潤能を大きく活性化する。 $*P<0.05$

[図18]CSS3発現抑制による浸潤能(転移能)の変化。a) shRNA強制発現ベクターを用い、CSS3を強制発現させたマウスメラノーマ細胞株(B16F10 FLAG-CSS3)においてCSS3の発現を低下させた安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定した。CSS3の発現量低下は、メラノーマ細胞が本来有する浸潤能を阻害する。b) CSS3強制発現株(+CSS3)、発現抑制安定株(CSS3 sh)をヌードマウス尾部静脈へ細胞注入し、その後の肺への転移活性を調査

した。CCS3強制発現によって肺への転移数は増加し、発現抑制によって転移数は減少した。

[図19]BRP44L強制発現による、抗癌剤に対する反応の変化。ヒトメラノーマ細胞株SK-Mel28 (SK-GFP#6)と、BRP44Lを強制発現させた安定株(SK-B#7、SK-B#8)に対し、抗癌剤の1種エトポシド処理を行うことで細胞死を誘導し、細胞生存率を測定した。BRP44L高発現下ではエトポシドによる細胞死誘導がより強く誘導されたことから、BRP44Lの強制発現は、抗癌剤に対する感受性を高める可能性がある。

発明を実施するための形態

[0009] 1. メラノーマ特異的バイオマーカー

本発明の第1の局面はメラノーマ特異的バイオマーカーに関する。本明細書において「メラノーマ特異的バイオマーカー」とは、メラノーマの指標となる生体分子のことをいう。メラノーマ特異的バイオマーカーは、後述の通り、メラノーマであるか否かの判定、及びメラノーマの悪性度の判定に有用である。本発明のバイオマーカーは、例えば、メラノーマに罹患している又は罹患している可能性のある患者、或いは当該患者に由来する試料／検体に対して適用される。

[0010] 本明細書において「生体分子」とは、生体中に見出される分子（化合物）をいう。本発明では特定の生体分子をバイオマーカーとして用いるが、その利用（典型的にはメラノサイト系腫瘍検査法への適用）に際しては、生体から分離された試料／検体中の生体分子が用いられることになる。

[0011] 本発明のバイオマーカーは、メラノサイト系腫瘍の悪性度との相関（言い換えれば、メラノーマ特異的な発現レベルの上昇又は低下）を認めた生体分子からなり、メラノサイト系腫瘍の悪性度を評価する上で有用な指標である。本発明のバイオマーカーは、PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子、CSS3タンパク質、BRP44L遺伝子又はBRP44Lタンパク質からなる。説明の便宜上、特に言及しない場合には、遺伝子シンボルを用いて遺伝子とタンパク質を包括的に表現する（例えば「PDZRN3」

はPDZRN3遺伝子とPDZRN3タンパク質の両者を一括して表す)。本発明のバイオマーカーを構成する分子の特定のために、公共のデータベースに登録された各分子の配列(遺伝子配列、アミノ酸配列)を以下に示す。

PDZRN3: 配列番号1(遺伝子配列、NCBI nucleotide database Accession No.: NM_015009)、配列番号2(アミノ酸配列、NCBI protein database Accession No.: NP_055824)

DTX3L: 配列番号3(遺伝子配列、NCBI nucleotide database Accession No.: NM_138287)、配列番号4(アミノ酸配列、NCBI protein database Accession No.: NP_612144)

CSS3: 配列番号5(遺伝子配列、NCBI nucleotide database Accession No.: NM_175856)、配列番号6(アミノ酸配列、NCBI protein database Accession No.: NP_787052)

BRP44L: 配列番号7(遺伝子配列、NCBI nucleotide database Accession No.: NM_016098)、配列番号8(アミノ酸配列、NCBI protein database Accession No.: NP_057182)

[0012] 2. メラノーマ系腫瘍検査法

本発明の第2の局面は本発明のバイオマーカーの用途に関し、メラノサイト系腫瘍の検査法(以下、「本発明の検査法」とも呼ぶ)を提供する。本発明の検査法は、メラノサイト系腫瘍の悪性度を判定するための手段として有用である。悪性のメラノサイト系腫瘍、即ちメラノーマの占める割合は皮膚癌の5%程度でしかないが、転移性が高く、皮膚癌の死者数の80%をも占める。このことから、メラノーマは皮膚癌の中でも最も悪性度の高い癌の一つといわれている。本発明の検査法はメラノサイト系腫瘍を診断するために有用な情報を与え、メラノーマの予防及び治療に貢献する。本発明の検査法によればメラノサイト系腫瘍の悪性度を簡便且つ客観的に判定することが可能となる。

[0013] 本発明の検査法では、被検者由来の検体中における、本発明のバイオマーカーのレベルが指標として用いられる。ここでの「レベル」は、典型的には

「量」ないし「濃度」を意味する。但し、慣例及び技術常識に従い、検出対象の分子を検出できるか否か（即ち見かけ上の存在の有無）を表す場合にも用語「レベル」が用いられる。

[0014] 本発明では、大別して4種類のバイオマーカー（PDZRN3、DTX3L、CSS3、BRP44L）を単独又は任意に組み合わせて用いることができる。バイオマーカーを使い分けることで様々なタイプのメラノサイト系腫瘍に対応可能となる。即ち、本発明は幅広い症例に対処することができるという利点も有する。

[0015] 基本的には、併用するバイオマーカーの種類が多い程、検査精度や信頼性等が向上する。そこで、好ましくは2種類以上（例えば、PDZRN3とDTX3Lの組合せ、DTX3LとCSS3の組合せ、CSS3とBRP44Lの組合せ）、更に好ましくは3種類以上を併用する。特に好ましい態様では、上記4種類の全部を併用する。後述の実施例に示す通り、BRP44Lは他の分子（PDZRN3、DTX3L、CSS3）とは対照的に、メラノーマ細胞で発現量が低下するという特徴的な傾向を示した。この事実を考慮すると、他のバイオマーカー（PDZRN3、DTX3L、CSS3の中の一又は二以上）とBRP44Lを併用すれば、腫瘍の病理標本における病理診断精度の向上等の効果を期待できる。尚、求められる精度や検査の簡便性等を考慮し、採用するバイオマーカーの数、種類を決定すればよい。

[0016] 典型的には、本発明の検査法では以下のステップを行う。

（1）被検者由来の検体を用意するステップ

（2）前記検体中の一又は二以上の前記生体分子（即ち、指標として採用した一又は二以上のバイオマーカー）を検出するステップ

（3）検出結果に基づいて、メラノサイト系腫瘍の悪性度を判定するステップ

[0017] ステップ（1）では被検者由来の検体を用意する。検体としては被検者の皮膚組織、血液、血漿、血清、尿、唾液、汗又は腫瘍組織等を用いることができる。被検者は特に限定されない。即ち、メラノサイト系腫瘍の悪性度の判定が必要な者に対して広く本発明を適用することができる。「メラノサイト系腫瘍の悪性度の判定が必要な者」は典型的にはメラノサイト系腫瘍を発

症している者であるが、メラノサイト系腫瘍の発症が疑われるもの（潜在的患者）を被検者としてもよい。本発明の検査法によれば、バイオマーカー（生体分子）のレベルという客観的な指標に基づいて、メラノサイト系腫瘍の悪性度を判定できる。判定結果は、メラノサイト系腫瘍の診断に有用な情報となり、より適切な治療方針の決定（効果的な治療法の選択など）に役立つ。従って、本発明は、治療効果の向上や患者のQOL（Quality of Life、生活の質）の向上に貢献する。メラノサイト系腫瘍の病理診断においては、熟練した検査技師や医師であっても判断に迷うことがある。本発明がもたらす客観性の高いデータは、特にこのような場合において、補助的でありながらも有用性の高い情報を提供する。

[0018] ステップ（２）では検体中におけるバイオマーカーを検出する。バイオマーカーのレベルを厳密に定量することは必須でない。即ち、後続のステップ（３）においてメラノサイト系腫瘍の悪性度が判定可能となる程度にバイオマーカーのレベルを検出すればよい。例えば、検体中のバイオマーカーのレベルが所定の基準値を超えるか否かが判別可能なように検出を行うこともできる。

[0019] バイオマーカーの検出方法は特に限定されない。採用するバイオマーカーが特定の遺伝子である場合には、当該遺伝子のmRNAを、RT-PCR等の核酸増幅反応を利用した方法で定量することによって検出可能である。核酸増幅反応としては、PCR（Polymerase chain reaction）法若しくはその変法その他、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法（Tsugunori Notomi et al. Nucleic Acids Research, Vol.28, No.12, e63, 2000; Kentaro Nagamine, Keiko Watanabe et al. Clinical Chemistry, Vol.47, No.9, 1742-1743, 2001）、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）法（特許第3433929号、特許第3883476号）、NASBA（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification）法、LCR（Ligase Chain Reaction）法、3SR（Self-sustained Sequence Replication）法、SDA（Standard Displacement Amplification）法、TMA（Transcription Mediated Ampli

fication) 法、RCA (Rolling Circle Amplification) 等を採用することができる。

[0020] 一方、採用するバイオマーカーが特定のタンパク質である場合には、好ましくは免疫学的手法を利用してバイオマーカーを検出する。免疫学的手法によれば迅速且つ感度のよい検出が可能である。また、操作も簡便である。免疫学的手法による測定では、採用するバイオマーカーに特異的結合性を有する物質を使用する。当該物質としては通常は抗体が用いられるが、当該バイオマーカーに特異的結合性を有し、その結合量を測定可能な物質であれば抗体に限らず採用できる。尚、市販の抗体に限らず、免疫学的手法、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法などを利用して新たに調製した抗体を使用してもよい。

[0021] 測定法として、免疫組織化学、蛍光免疫測定法 (FIA法)、酵素免疫測定法 (EIA法)、放射免疫測定法 (RIA法)、ウエスタンブロット法を例示することができる。免疫組織化学的染色法によれば、迅速に且つ感度よく検出対象を検出できる。また、操作も簡便である。従って、検出に伴う被検者 (患者) への負担も小さくなる。生体組織の免疫組織化学的染色では、一般に、(1) 固定・パラフィン包埋 (又は凍結包埋)、(2) 脱パラフィン (凍結包埋の場合は不要)、(3) 一次抗体反応、(4) 標識試薬の添加、(5) 発色反応、及び (6) 脱水・透徹・封入の操作を順に行う。必要に応じて、一次抗体反応の前に、抗原賦活処理、内因性ペルオキシダーゼ除去処理 (標識物質としてペルオキシダーゼを使用する場合)、非特異的反応の阻害 (ウシ血清アルブミン溶液などによる処理) 等が行われる。また、必要に応じて、脱水・透徹・封入の前に核染色 (例えばマイヤーのヘマトキシリンを使用できる) が行われる。尚、生体組織の免疫組織化学的染色法については様々な文献及び成書を参照することができる (例えば、「酵素抗体法、改訂第3版」、渡辺慶一、中根一穂編集、学際企画)。

[0022] ステップ (3) では、検出結果に基づいてメラノサイト系腫瘍の悪性度を判定する。精度のよい判定を可能にするため、ステップ (2) で得られた検

出値を対照検体（コントロール）の検出値と比較した上で判定を行うとよい。コントロールには例えば、健常者の皮膚組織のバイオマーカーレベル、又は母斑（良性）のバイオマーカーレベルを用いることができる。

[0023] 悪性度の判定は定性的、定量的のいずれであってもよい。尚、ここでの判定は、その判定基準から明らかな通り、医師や検査技師など専門知識を有する者の判断によらずとも自動的／機械的に行うことができる。

[0024] 本発明のバイオマーカーは、発現レベルの上昇がメラノサイト系腫瘍の悪性度と相関するバイオマーカー（PDZRN3、DTX3L及びCSS3）と、発現レベルの低下がメラノサイト系腫瘍の悪性度と相関するバイオマーカー（BRP44L）の二種類に分類することができる。以下、説明の便宜上、前者を第1グループのバイオマーカー、後者を第2グループのバイオマーカーと呼ぶ。典型的には、各バイオマーカーについて以下の基準が採用される。言うまでもないが、「検出値が高いと悪性度が高い」との基準は「検出値が低いと悪性度が低い」との基準と同義である（その他の基準についても同様）。

[0025] 「検出値が高いと悪性度が高い」との基準、又は「検出できると悪性度が高い」との基準を採用するバイオマーカー：第1グループのバイオマーカー（PDZRN3、DTX3L、CSS3）

[0026] 「検出値が低いと悪性度が高い」との基準、又は「検出できないと悪性度が高い」との基準を採用するバイオマーカー：第2グループのバイオマーカー（BRP44L）

[0027] バイオマーカー毎に基準値を設定することにより、より具体的な判定が可能になる。基準値を設定する場合の判定手法の具体例を以下に示す。

[0028] （第1グループのバイオマーカーの判定例1）

基準値よりもバイオマーカーの検出値（検体中レベル）が高いときに「悪性である」又は「悪性の可能性が高い」と判定し、基準値よりもバイオマーカーの検出値（検体中レベル）が低いときに「良性である」又は「良性の可能性が高い」と判定する。

[0029] （第1グループのバイオマーカーの判定例2）

良性と原発性メラノーマを区別する基準値 1 と、原発性メラノーマと転移性メラノーマを区別する基準値 2（基準値 1 < 基準値 2）を設定し、以下の様に判定する。尚、「可能性が高い」との評価に代えて、具体的な確率（例えば、「80%以上の確率」と判定）を示すことにしてもよい。

バイオマーカーの検出値 < 基準値 1 の場合： 「良性である」又は「良性の可能性が高い」

基準値 1 ≤ バイオマーカーの検出値 < 基準値 2 の場合： 「原発性メラノーマである」又は「原発性メラノーマの可能性が高い」

基準値 2 < バイオマーカーの検出値の場合： 「転移性メラノーマである」又は「転移性メラノーマの可能性が高い」

[0030]（第 1 グループのバイオマーカーの判定例 3）

悪性度のレベルを分ける複数の基準値を設定し、以下の様に判定する。この例では、4 つの基準値（ $a < b < c < d$ ）を設定することになっているが、基準値の数及びそれに伴う悪性度のレベルの数はこれに限られるものではない。

バイオマーカーの検出値 < a の場合： 悪性度 1

$a \leq$ バイオマーカーの検出値 < b の場合： 悪性度 2

$b \leq$ バイオマーカーの検出値 < c の場合： 悪性度 3

$c \leq$ バイオマーカーの検出値 < d の場合： 悪性度 4

$d \leq$ バイオマーカーの検出値の場合： 悪性度 5

[0031]（第 2 グループのバイオマーカーの判定例 1）

基準値よりもバイオマーカーの検出値（検体中レベル）が低いときに「悪性である」又は「悪性の可能性が高い」と判定し、基準値よりもバイオマーカーの検出値（検体中レベル）が高いときに「良性である」又は「良性の可能性が高い」と判定する。

[0032]（第 2 グループのバイオマーカーの判定例 2）

良性と原発性メラノーマを区別する基準値 1 と、原発性メラノーマと転移性メラノーマを区別する基準値 2（基準値 1 < 基準値 2）を設定し、以下の

様に判定する。尚、「可能性が高い」との評価に代えて、具体的な確率（例えば、「80%以上の確率」と判定）を示すことにしてもよい。

バイオマーカーの検出値<基準値1の場合： 「転移性メラノーマである」又は「転移性メラノーマの可能性が高い」

基準値1 ≤ バイオマーカーの検出値<基準値2の場合： 「原発性メラノーマである」又は「原発性メラノーマの可能性が高い」

基準値2 < バイオマーカーの検出値の場合： 「良性である」又は「良性の可能性が高い」

[0033] （第2グループのバイオマーカーの判定例3）

悪性度のレベルを分ける複数の基準値を設定し、以下の様に判定する。この例では、4つの基準値（ $a < b < c < d$ ）を設定することになっているが、基準値の数及びそれに伴う悪性度のレベルの数はこれに限られるものではない。

バイオマーカーの検出値< a の場合： 悪性度5

$a \leq$ バイオマーカーの検出値< b の場合： 悪性度4

$b \leq$ バイオマーカーの検出値< c の場合： 悪性度3

$c \leq$ バイオマーカーの検出値< d の場合： 悪性度2

$d \leq$ バイオマーカーの検出値の場合： 悪性度1

[0034] 二種類以上のバイオマーカーを組み合わせる場合には、例えば、バイオマーカー毎に判定結果を得た後、全ての判定結果を総合評価して最終的な判定結果を得ることにする。或いは、以下の例（この例ではバイオマーカー1、2はいずれも第1グループ）のように、バイオマーカーの検出値の組合せと判定結果を関連付けておくことにより、各バイオマーカーの検出値から直接判定結果を得ることにしてもよい。尚、三種類以上のバイオマーカーを組み合わせた場合も、以下の例に準じて判定結果を得ることができる。

バイオマーカー1の検出値< a、バイオマーカー2の検出値< a' の場合：
：悪性度1

$a \leq$ バイオマーカー1の検出値< b、 $a' \leq$ バイオマーカー2の検出値<

b'、の場合 悪性度 2

$b \leq \text{バイオマーカー 1 の検出値} < c$ 、 $b' \leq \text{バイオマーカー 2 の検出値} <$

c' の場合 悪性度 3

$c \leq \text{バイオマーカー 1 の検出値} < d$ 、 $c' \leq \text{バイオマーカー 2 の検出値} <$

d' の場合 悪性度 4

$d \leq \text{バイオマーカー 1 の検出値}$ 、 $d' \leq \text{バイオマーカー 2 の検出値}$ の場合

悪性度 5

[0035] 二種類以上のバイオマーカーを組み合わせる用いる場合には、以下の（１）又は（２）の如く判定してもよい。

（１）組合せに含まれるバイオマーカーの全てに関して陽性（第１グループのバイオマーカーの場合はカットオフ値以上、第２グループのバイオマーカーの場合はカットオフ値以下）である場合を「悪性」又は「悪性の可能性が高い」と判定し、それ以外の場合を「良性」又は「良性の可能性が高い」と判定する。

（２）組合せに含まれるバイオマーカーの一つでも陽性（第１グループのバイオマーカーの場合はカットオフ値以上、第２グループのバイオマーカーの場合はカットオフ値以下）の場合を「悪性」又は「悪性の可能性が高い」と判定し、それ以外の場合を「良性」又は「良性の可能性が高い」と判定する。

[0036] 通常、組み合わせるバイオマーカーの種類及び数によって診断（検出）感度及び診断（検出）特異度が異なる。従って、目的に合わせて最適なバイオマーカーの組合せを選択するとよい。例えば、診断感度の高い組合せはスクリーニング的な検査に適する。対照的に、診断特異度の高い組み合わせは、より信頼性の高い判定が必要な検査（例えば２次検査や３次検査）に適する。診断感度及び診断特異度のバランスの異なる判定法を組み合わせることによって、効率化や確度ないし信頼性の向上を図ることが可能である。例えば、高い診断感度を与えるバイオマーカーの組合せを用いて絞り込んだ後（一次検査、スクリーニング検査）、高い診断特異度を与えるバイオマーカーの

組合せを用いて最終的な判定を行う（２次検査）。このような２段階の判定に限らず、３段階以上の判定を行うことも可能である。

[0037] 判定区分の数、及び各判定区分に関連付けられるバイオマーカーのレベル及び判定結果はいずれも上記の例に何らとらわれることなく、予備実験等を通して任意に設定することができる。例えば、所定の基準値（閾値）を境界として悪性度の高低を判定する場合の「基準値」や、悪性度の高低に係る区分に関連づける「バイオマーカーのレベル範囲」は、多数の検体を用いた統計的解析によって決定することができる。

[0038] 本発明の一態様では判定結果をメラノーマの予後推定に用いる。この態様では、ステップ（３）の判定の結果に基づきメラノーマの予後を推定する。典型的には、悪性度が高いとの判定結果の場合に予後は悪い（予後不良）と推定し、悪性度が低いとの判定結果の場合に予後は良い（予後良好）と推定する。予め悪性度のレベルに対応させて予後のレベルを設定しておき（例えば、１：非常によい、２：よい、３：比較的よい、４：比較的悪い、５：悪い、６：非常によい、のように複数のレベルを設定する）、いずれのレベルに該当するかを決定することにしてもよい。

[0039] 本発明の一態様では、同一の被検者について、ある時点で測定されたバイオマーカーのレベルと、過去に測定されたバイオマーカーのレベルとを比較し、バイオマーカーのレベルの増減の有無及び／又は増減の程度を調べる。その結果得られる、バイオマーカーの発現レベル変化に関するデータは、悪性度をモニターするため、治療効果を把握するため、或いは予後推定に有用な情報となる。具体的には例えば、バイオマーカーレベルの変動を根拠として、前回の検査から今回の検査までの間に悪性度が高くなった又は低くなった或いは変化がないとの判定を行うことができる。このような評価をメラノーマの治療と並行して行えば、治療効果の確認が行えることはもとより、メラノーマの再発の兆候を事前に把握することができる。これによって、より適切な治療方針の決定が可能となる。このように本発明は、治療効果の最大化及び患者のＱＯＬ（生活の質）向上に多大な貢献をし得る。

[0040] 3. 検査試薬・キット

本発明はさらに、メラノサイト系腫瘍の悪性度を検査するための試薬及びキットも提供する。本発明の試薬は本発明のバイオマーカーに特異的結合性を示す物質（以下、「結合分子」と呼ぶ）からなる。結合分子の例として、バイオマーカーを特異的に認識する抗体、核酸アプタマー及びペプチドアプタマーを挙げることができる。結合分子は、採用するバイオマーカーに対する特異的結合性を有する限り、その種類や由来などは特に限定されない。また、抗体の場合、ポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体（数種～数十種の抗体の混合物）、及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。ポリクローナル抗体又はオリゴクローナル抗体としては、動物免疫して得た抗血清由来のIgG画分のほか、抗原によるアフィニティー精製抗体を使用できる。Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv抗体などの抗体断片であってもよい。

[0041] 結合分子は常法で調製すればよい。市販品が入手可能であれば、当該市販品を用いても良い。例えば、抗体であれば免疫学的手法、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法などを利用して調製することができる。免疫学的手法によるポリクローナル抗体の調製は次の手順で行うことができる。抗原（バイオマーカー又はその一部）を調製し、これを用いてマウスやラット或いはウサギ等の動物に免疫を施す。生体試料を精製することにより抗原を得ることができる。また、組換え型抗原を用いることもできる。組換え型抗原は、例えば、バイオマーカーをコードする遺伝子（遺伝子の一部であってもよい）を、ベクターを用いて適当な宿主に導入し、得られた組換え細胞内で発現させることにより調製することができる。

[0042] 免疫惹起作用を増強するために、キャリアタンパク質を結合させた抗原を用いてもよい。キャリアタンパク質としてはKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)、BSA (Bovine Serum Albumin)、OVA (Ovalbumin) などが使用される。キャリアタンパク質の結合にはカルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ縮合法、MBS (マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド) 法などを使用できる。一方、バイオマーカー（又はその一部）を、GST、 β ガラクトシ

ダーゼ、マルトース結合タンパク、又はヒスチジン (His) タグ等との融合タンパク質として発現させた抗原を用いることもできる。このような融合タンパク質は、汎用的な方法により簡便に精製することができる。

[0043] 必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で採血し、遠心処理などによって血清を得る。得られた抗血清をアフィニティー精製し、ポリクローナル抗体とする。

[0044] 一方、モノクローナル抗体については次の手順で調製することができる。まず、上記と同様の手順で免疫操作を実施する。必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で免疫動物から抗体産生細胞を摘出する。次に、得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合してハイブリドーマを得る。続いて、このハイブリドーマをモノクローナル化した後、目的タンパク質に対して高い特異性を有する抗体を産生するクローンを選択する。選択されたクローンの培養液を精製することによって目的の抗体が得られる。一方、ハイブリドーマを所望数以上に増殖させた後、これを動物（例えばマウス）の腹腔内に移植し、腹水内で増殖させて腹水を精製することにより目的の抗体を取得することもできる。上記培養液の精製又は腹水の精製には、プロテインG、プロテインA等を用いたアフィニティークロマトグラフィーが好適に用いられる。また、抗原を固相化したアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。更には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、硫酸分画、及び遠心分離等の方法を用いることもできる。これらの方法は単独ないし任意に組み合わせられて用いられる。

[0045] バイオマーカーへの特異的結合性を保持することを条件として、得られた抗体に種々の改変を施すことができる。このような改変抗体を本発明の試薬としてもよい。

[0046] 特異的結合分子として標識化抗体を使用すれば、標識量を指標に結合抗体量を直接検出することが可能である。従って、より簡便な検査法を構築できる。その反面、標識物質を結合させた抗体を用意する必要があることに加えて、検出感度が一般に低くなるという問題点がある。そこで、標識物質を結

合させた二次抗体を利用する方法、二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用する方法など、間接的検出方法を利用することが好ましい。ここでの二次抗体とは、採用するバイオマーカーに特異的な抗体に対して特異的結合性を有する抗体である。例えば、バイオマーカーに特異的な抗体をウサギ抗体として調製した場合には抗ウサギIgG抗体を二次抗体として使用することができる。ウサギやヤギ、マウスなど様々な種の抗体に対して使用可能な標識二次抗体が市販されており（例えばフナコシ株式会社やコスモ・バイオ株式会社など）、本発明の試薬に応じて適切なものを適宜選択して使用することができる。

[0047] 標識物質の例は、ペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素などの酵素、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）及びユーロピウムなどの蛍光物質、ルミノール、イソルミノール及びアクリジニウム誘導体などの化学発光物質、NADなどの補酵素、ビオチン、並びに ^{131}I 及び ^{125}I などの放射性物質である。

[0048] 一態様では、本発明の試薬はその用途に合わせて固相化されている。固相化に用いる不溶性支持体は特に限定されない。例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂や、ガラス等の水に不溶性の物質からなる不溶性支持体を用いることができる。不溶性支持体への抗体の担持は物理吸着又は化学吸着によって行うことができる。

[0049] 本発明のキットは主要構成要素として本発明の試薬を含む。検査法を実施する際に使用するその他の試薬（緩衝液、ブロッキング用試薬、酵素の基質、発色試薬など）及び／又は装置ないし器具（容器、反応装置、蛍光リーダーなど）をキットに含めてもよい。また、標準試料として本発明のバイオマーカー分子又はその断片をキットに含めることが好ましい。尚、通常、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

[0050] 4. メラノーマ治療薬

＜標的遺伝子の発現抑制＞

本発明は更なる局面として、メラノーマ治療薬（以下、本発明の医薬と呼ぶ）を提供する。一態様では、本発明の医薬は標的遺伝子の発現を抑制する化合物を有効成分とする。ここでの標的遺伝子は、PDZRN3遺伝子、DTX3L遺伝子又はCSS3遺伝子である。標的遺伝子の発現を抑制する化合物とは、標的遺伝子の発現過程（転写、転写後調節、翻訳、翻訳後調節を含む）を抑制する化合物である。当該化合物の例は次の通りである。尚、本発明における「発現の抑制」は一過的抑制及び恒常的抑制のいずれでもよい。

(a)標的遺伝子を標的とするsiRNA

(b)標的遺伝子を標的とするsiRNAを細胞内で生成する核酸コンストラクト

(c)標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列と該配列にアニーリングする相補配列を有する一本鎖RNA

(d)標的遺伝子の転写産物を標的とするアンチセンス核酸

(e)標的遺伝子の転写産物を標的とするリボザイム

[0051] 上記(a)及び(b)は、いわゆるRNAi (RNA interference ; RNA干渉) による発現抑制に利用される化合物である。換言すれば、上記(a)又は(b)の化合物を有効成分とする本発明の医薬によればRNAiにより標的遺伝子の発現を抑制することができる。RNAiは真核細胞内で引き起こすことが可能な、配列特異的な転写後遺伝子抑制のプロセスである。哺乳動物細胞に対するRNAiでは、標的mRNAの配列に対応する配列の短い二本鎖RNA (siRNA) が使用される。通常、siRNAは21～23塩基対である。哺乳動物細胞は二本鎖RNA (dsRNA) の影響を受ける2つの経路（配列特異的経路及び配列非特異的経路）を有することが知られている。配列特異的経路においては、比較的長いdsRNAが短い干渉性のRNA（即ちsiRNA）に分割される。他方、配列非特異的経路は、所定の長さ以上であれば配列に関係なく、任意のdsRNAによって惹起されと考えられている。この経路ではdsRNAが二つの酵素、即ち活性型となり翻訳開始因子eIF2をリン酸化することでタンパク質合成のすべてを停止させるPKRと、RNAase L活

性化分子の合成に関与する2',5'オリゴアデニル酸シターゼが活性化される。この非特異的経路の進行を最小限に留めるためには約30塩基対より短い二本鎖RNA (siRNA) を使用することが好ましい(Hunter et al. (1975) J Biol Chem 250: 409-17; Manche et al. (1992) Mol Cell Biol 12: 5239-48; Minks et al. (1979) J Biol Chem 254: 10180-3; 及び Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-8を参照されたい)。

[0052] 標的的特異的なRNAiを生じさせるためには標的遺伝子のmRNA配列の一部と相同なセンスRNA及びこれに相補的なアンチセンスRNAからなるsiRNAを細胞内に導入するか、又は細胞内で発現させればよい。上記(a)は前者の方法に対応する化合物であり、同様に上記(b)は後者の方法に対応する化合物である。

[0053] 標的遺伝子（本発明の場合は標的遺伝子）を標的とするsiRNAは、通常、当該遺伝子のmRNAの配列における連続する領域と相同な配列からなるセンスRNAとその相補配列からなるアンチセンスRNAがハイブリダイズした二本鎖RNAである。ここでの「連続する領域」の長さは通常15～30塩基長、好ましくは18～23塩基長、より好ましくは19～21塩基長である。

[0054] 末端に数塩基のオーバーハングを有する二本鎖RNAが高いRNAi効果を発揮することが知られている。そこで本発明においても、そのような構造のsiRNAを採用することが好ましい。オーバーハングを形成する塩基の長さは特に限定されないが、好ましくは2塩基長（例えばTT、UU）である。

[0055] 修飾したRNAからなるsiRNAを用いることにしてもよい。ここでの修飾の例としてホスホロチオエート化、修飾塩基（例えば蛍光標識塩基）の使用が挙げられる。

[0056] siRNAの設計及び調製は常法で行うことができる。siRNAの設計には通常、標的配列に固有の配列（連続配列）が利用される。尚、適当な標的配列を選択するためのプログラム及びアルゴリズムが開発されている。

[0057] 上記(b)の「siRNAを細胞内で生成する核酸コンストラクト」とは、それを細胞に導入すると細胞内でのプロセスによって所望のsiRNA（標的遺伝子に対するRNAiを引き起こすsiRNA）が生ずる核酸性分子をいう。当該核酸コンスト

ラクトの一つの例はshRNA (short hairpin RNA) である。shRNAは、センスRNAとアンチセンスRNAがループ構造部を介して連結された構造（ヘアピン構造）を有し、細胞内でループ構造部が切断されて二本鎖siRNAとなり、RNAi効果をもたらす。ループ構造部の長さは特に限定されないが、通常は3～23塩基である。

[0058] 核酸コンストラクトの別の例は、所望のsiRNAを発現し得るベクターである。このようなベクターとしては、後のプロセスによってsiRNAに変換されるshRNAを発現する（shRNAをコードする配列がインサートされた）ベクター（ステムループタイプ又はショートヘアピンタイプと呼ばれる）、センスRNAとアンチセンスRNAを別々に発現するベクター（タンデムタイプと呼ばれる）が挙げられる。これらのベクターは当業者であれば常法に従い作製することができる（Brummelkamp TR et al. (2002) Science 296:550-553; Lee NS et al. (2001) Nature Biotechnology 19:500-505; Miyagishi M & Taira K (2002) Nature Biotechnology 19:497-500; Paddison PJ et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:1443-1448; Paul CP et al. (2002) Nature Biotechnology 19:505-508; Sui G et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99(8):5515-5520; Paddison PJ et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958等が参考になる）。現在、種々のRNAi用ベクターが利用可能である。このような公知のベクターを利用して本発明のベクターを構築することにしてもよい。この場合、所望のRNA（例えばshRNA）をコードするインサートDNAを用意した後、ベクターのクローニングサイトに挿入し、RNAi発現ベクターとする。

[0059] 尚、標的遺伝子に対するRNAi作用を発揮するsiRNAを細胞内で生じさせるという機能を有する限り、ベクターの由来や構造は限定されるものではない。従って、各種ウイルスベクター（アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター等）、非ウイルスベクター（リポソーム、正電荷型リポソーム等）等を用いることができる。ベクターに利用可能なプロモーターの例を示すと、U6プロモーター、H1プロモーター

、tRNAプロモーターである。これらのプロモーターはRNAポリメラーゼIII系のプロモーターであり、高い発現効率を期待できる。

[0060] 所定の構造の一本鎖RNAが標的遺伝子の発現抑制に有用であることが報告されている（例えばWO2012/005368、特開2013-55913号公報、特開2013-138681号公報、特開2013-153736号公報）。そこで本発明の一態様では、一本鎖RNA（上記(c)）を利用し、siRNAによる発現抑制（即ちRNA干渉）と同様のメカニズムで標的遺伝子の発現を抑制する。本発明の一本鎖RNAは、標的遺伝子に対応した発現抑制配列と当該配列にアニーリング可能な相補配列を有する。発現抑制配列と相補配列の連結順序は特に限定されない。また、発現抑制配列と相補配列は直接連結されていても、或いはリンカー領域を介して連結されていても良い。リンカー領域はヌクレオチド残基又は非ヌクレオチド残基（例えばポリアルキレングリコール、ピロリジン骨格、ピペリジン骨格などの構造からなる）で構成することができる。本発明の一本鎖RNAの形態の例として、5'側領域と3'側領域がアニーリングして二本鎖構造（ステム構造）を形成する分子（例1）、5'側領域及び3'側領域がそれぞれ別個に分子内アニーリングすることで二つの二本鎖構造（ステム構造）を形成する分子（例2）を挙げることができる。

[0061] 発現抑制配列は、本発明の一本鎖RNAが細胞内に導入されたときに標的遺伝子の発現を抑制する活性を示す配列である。典型的には、siRNAによる発現抑制（即ちRNA干渉）を生じさせる配列を発現抑制配列として用いる。例えば、上述のsiRNA（上記(a)）を構成するRNAの配列を発現抑制配列として用いることができる。発現抑制配列の長さは特に限定されないが、例えば18～32塩基長、好ましくは19～30塩基長、より好ましくは19～21塩基長である。

[0062] 本発明の一本鎖RNAの長さは特に限定されない。一本鎖RNAを構成する塩基の数の合計（全長の塩基数）は、下限が例えば38塩基、好ましくは42塩基、より好ましくは50塩基、さらに好ましくは51塩基、特に好ましくは52塩基であり、上限が例えば300塩基、好ましくは200塩基、より好ましくは150塩基、さらに好ましくは100塩基、特に好ましくは80塩基である。本発明の一本鎖RNA

Aがリンカー領域を含む場合において、リンカー領域を除く塩基数の合計は、下限が例えば38塩基、好ましくは42塩基、より好ましくは50塩基、さらに好ましくは51塩基、特に好ましくは52塩基であり、上限が例えば300塩基、好ましくは200塩基、より好ましくは150塩基、さらに好ましくは100塩基、特に好ましくは80塩基である。

[0063] 尚、本発明の一本鎖RNAを設計ないし調製する際には、上掲の特許公報など、過去の報告を参考にすることができる。

[0064] 上記(d)はアンチセンス法による発現抑制に利用される化合物である。換言すれば、上記(d)の化合物を有効成分とする本発明の医薬によれば、アンチセンス法により標的遺伝子の発現を抑制することができる。アンチセンス法による発現阻害を行う場合には例えば、標的細胞内で転写されたときに、標的遺伝子をコードするmRNAの固有の部分に相補的なRNAを生成するアンチセンス・コンストラクトが使用される。このようなアンチセンス・コンストラクトは例えば、発現プラスミドの形態で標的細胞に導入される。一方、アンチセンス・コンストラクトとして、標的細胞内に導入されたときに、標的遺伝子をコードするmRNA／又はゲノムDNA配列とハイブリダイズしてその発現を阻害するオリゴヌクレオチド・プローブを採用することもできる。このようなオリゴヌクレオチド・プローブとしては、好ましくは、エキソヌクレアーゼ及び／又はエンドヌクレアーゼなどの内因性ヌクレアーゼに対して抵抗性であるものが用いられる。

[0065] アンチセンス核酸としてDNA分子を使用する場合、標的遺伝子をコードするmRNAの翻訳開始部位（例えば-10～+10の領域）を含む領域に由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

[0066] アンチセンス核酸と、標的核酸との間の相補性は厳密であることが好ましいが、多少のミスマッチが存在していてもよい。標的核酸に対するアンチセンス核酸のハイブリダイズ能は一般に両核酸の相補性の程度及び長さの両方に依存する。通常、使用するアンチセンス核酸が長いほど、ミスマッチの数が多くても、標的核酸との間に安定な二重鎖（又は三重鎖）を形成すること

ができる。当業者であれば、標準的な手法を用いて、許容可能なミスマッチの程度を確認することができる。

[0067] アンチセンス核酸はDNA、RNA、若しくはこれらのキメラ混合物、又はこれらの誘導体や改変型であってもよい。また、一本鎖でも二本鎖でもよい。塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格部分を修飾することで、アンチセンス核酸の安定性、ハイブリダイゼーション能等を向上させることなどができる。また、アンチセンス核酸に、細胞膜輸送を促す物質（例えば Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. W088/098 10, published December 15, 1988を参照されたい）や、特定の細胞に対する親和性を高める物質などを付加してもよい。

[0068] アンチセンス核酸は例えば市販の自動DNA合成装置（例えばアプライド・バイオシステムズ社等）を使用するなど、常法で合成することができる。核酸修飾体や誘導体の作製には例えば、Stein et al. (1988), Nucl. Acids Res. 16:3209やSarin et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451等を参照することができる。

[0069] 標的細胞内におけるアンチセンス核酸の作用を高めるために、pol IIやpol IIIといった強力なプロモーターを利用することができる。即ち、このようなプロモーターの制御下に配置されたアンチセンス核酸を含むコンストラクトを標的細胞に導入すれば、当該プロモーターの作用によって十分な量のアンチセンス核酸の転写を確保できる。

[0070] アンチセンス核酸の発現は、哺乳動物細胞（好ましくはヒト細胞）で機能することが知られている任意のプロモーター（誘導性プロモーター又は構成的プロモーター）によって行うことができる。例えば、SV40初期プロモーター領域 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端領域由来のプロモーター (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797)、疱疹チミジン・キナーゼ・プロモーター (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)等のプロモーターを使用するこ

とができる。

[0071] 本発明の一態様では、リボザイムによる発現抑制を利用する（上記(e)の化合物の場合）。部位特異的認識配列でmRNAを開裂させるリボザイムを用いて標的mRNAを破壊することもできるが、好ましくはハンマーヘッド・リボザイムを使用する。ハンマーヘッド・リボザイムの構築方法については例えばHaseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591を参考にすることができる。

[0072] アンチセンス法を利用する場合と同様に、例えば安定性やターゲット能を向上させることを目的として、修飾されたオリゴヌクレオチドを用いてリボザイムを構築してもよい。効果的な量のリボザイムを標的細胞内で生成させるために、例えば、強力なプロモーター（例えばpol IIやpol III）の制御下に、当該リボザイムをコードするDNAを配置した核酸コンストラクトを使用することが好ましい。

[0073] <抗がん剤との併用>

本発明者らの検討の結果、BRP44Lが抗がん剤に対する耐性に関与しているとの事実が明らかになった（後述の実施例）。この知見に基づき、本発明の医薬の別の態様では、標的細胞におけるBRP44L発現量を高めることで抗がん剤に対する感受性を高め、抗がん剤の治療効果の増大を図る。この態様の医薬で治療すれば、抗がん剤単独で治療した場合に比較して治療成績が向上する。ここでの「治療成績の向上」には、治療効果の増大、奏効率ないし有効率の向上、及び副作用の低減ないし回避が含まれる（本発明によれば、この中の少なくとも一つが達成される）。また、この態様の医薬によれば、抗がん剤の効果が高められることから、抗がん剤の使用量や抗がん剤の種類（2種類以上の抗がん剤を併用する場合）の低減も図ることが可能である。

[0074] この態様の医薬は、以下の(A)（BRP44Lタンパク質）、又は(B)（BRP44L遺伝子を保持する発現ベクター）を有効成分とし、抗がん剤又は抗腫瘍作用を持つ薬物と併用される。

[0075] (A)BRP44Lタンパク質

本発明の一態様では、BRP44Lタンパク質を有効成分とする。メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用を示す限り、BPP44Lタンパク質の一部（断片）を有効成分として用いることもできる。ヒトBRP44Lタンパク質のアミノ酸配列は公共のデータベースに登録されている（配列番号8：NCBI protein database Accession No.：NP_057182）。当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列を含むポリペプチドをBRP44Lタンパク質として用いることもできる。ここでの「等価なアミノ酸配列」とは、基準となるアミノ酸配列（例えば配列番号8のアミノ酸配列）と一部で相違するが、当該相違がタンパク質の機能（メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用）に実質的な影響を与えていないアミノ酸配列のことをいう。従って、基準となるアミノ酸配列と、それに等価なアミノ酸配列との間には機能上の実質的な同一性が認められる。機能上の実質的な同一性の有無を判定するためには、例えば、後述の実施例に記載した実験系（動物モデル又は細胞による評価）を用い、メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に関する作用・効果の点において二つのアミノ酸配列の間に実質的な差がないことを確認すればよい。

[0076] 「アミノ酸配列の一部で相違する」とは、典型的には、アミノ酸配列を構成する1～数个（上限は例えば3個、5個、7個、10個）のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1～数个（上限は例えば3個、5個、7個、10個）のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることをいう。ここでのアミノ酸配列の相違は上記機能の大幅な低下がない限り許容される。この条件を満たす限りアミノ酸配列が相違する位置は特に限定されず、また複数の位置で相違が生じていてもよい。ここでの複数とは例えば全アミノ酸の約30%未満に相当する数であり、好ましくは約20%未満に相当する数であり、さらに好ましくは約10%未満に相当する数であり、より一層好ましくは約5%未満に相当する数であり、最も好ましくは約1%未満に相当する数である。即ち等価アミノ酸配列は、基準となるアミノ酸配列と例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、より一層好ましくは約95%以上、最も好ましくは約99%以上の配列同

一性を有する。

[0077] 基準となるアミノ酸配列と等価アミノ酸配列との間の相違が保存的アミノ酸置換基によって生じていることが好ましい。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0078] ところで、二つのアミノ酸配列又は二つの核酸配列（以下、これらを含む用語として「二つの配列」を使用する）の配列同一性（％）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基又はヌクレオチド）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるといえる。配列同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（すなわち、配列同一性（％）＝同一位置の数／位置の総数 × 100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数及びサイズも考慮に入れる。

[0079] 二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、Karlin及びAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、Karlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77

において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。このようなアルゴリズムは、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 に記載のNBLASTプログラム及びXBLASTプログラム (バージョン2.0) に組み込まれている。本発明の核酸分子に等価なヌクレオチド配列を得るには例えば、NBLASTプログラムでscore = 100、wordlength = 12としてBLASTヌクレオチド検索を行えばよい。基準となるアミノ酸配列に等価なアミノ酸配列を得るには例えば、XBLASTプログラムでscore = 50、wordlength = 3としてBLASTポリペプチド検索を行えばよい。比較のためのギャップアライメントを得るためには、Altschulら (1997) Amino Acids Research 25(17):3389-3402に記載のGapped BLASTが利用可能である。BLAST及びGapped BLASTを利用する場合は、対応するプログラム (例えばXBLAST及びNBLAST) のデフォルトパラメータを使用することができる。詳しくは例えばNCBIのウェブページを参照されたい。配列の比較に利用可能な他の数学的アルゴリズムの例としては、Myers及びMiller (1988) Comput Appl Biosci. 4:11-17に記載のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、例えばGENESTREAMネットワークサーバー (IGH Montpellier、フランス) またはISRECサーバーで利用可能なALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合は例えば、PAM120残基質量表を使用し、ギャップ長ペナルティ=12、ギャップペナルティ=4とすることができる。

[0080] 二つのアミノ酸配列の同一性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスを使用し、ギャップ加重=12、10、8、6、又は4、ギャップ長加重=2、3、又は4として決定することができる。また、二つの核酸配列の同一性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて、ギャップ加重=50、ギャップ長加重=3として決定することができる。

[0081] BRP44Lは、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にして、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって容易に調製することができる。例えば、BRP44LをコードするDNA

で適当な宿主細胞（例えば大腸菌、酵母）を形質転換し、形質転換体内で発現されたタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜精製される。このように組換えタンパク質としてBRP44Lを得ることにすれば種々の修飾が可能である。例えば、BRP44LをコードするDNAと他の適当なDNAとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなるBRP44Lを得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはN末端若しくはC末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0082] 質的均一性及び純度の面などから、BRP44Lを遺伝子工学的手法によって調製することが好ましい。しかしながら、BRP44Lの調製法は遺伝子工学的手法によるものに限られない。例えば、天然材料から標準的な手法（破碎、抽出、精製など）によってBRP44Lを調製することもできる。

[0083] (B)BRP44L遺伝子を保持する発現ベクター

本発明の一態様では、BRP44L遺伝子を保持する発現ベクターを有効成分とする。メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用を示すタンパク質をコードする限り、BRP44L遺伝子に代えて、その一部を用いることにしてもよい。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。本発明に係る発現ベクターでは、BRP44L遺伝子が発現可能に保持されることになる。BRP44L遺伝子を標的細胞に導入し、標的細胞内で発現させることが可能である限り、ベクターの種類は特に限定されない。ここでの「ベクター」にはウイルスベクター及び非ウイルスベクターが含まれる。ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ウイルスが細胞へと感染する現象を巧みに利用するものであり、高い遺伝子導入効率が得られる。ウイルスベクターとしてアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベ

クター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が開発されている。

[0084] 非ウイルスベクターとしてリポソーム、正電荷型リポソーム (Felgner, P. L., Gadek, T.R., Holm, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7413-7417, 1987)、HVJ(Hemagglutinating virus of Japan)-リポソーム (Dzau, V.J., Mann, M., Morishita, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:11421-11425, 1996、Kaneda, Y., Saeki, Y. & Morishita, R., Molecular Med. Today, 5:298-303, 1999) 等が開発されている。本発明における発現ベクターをこのような非ウイルス性ベクターとして構築してもよい。また、YACベクター、BACベクター等を利用することにしてもよい。

[0085] アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターではベクターに組み込んだ外来遺伝子が宿主染色体へと組み込まれ、安定かつ長期的な発現が期待できる。レトロウイルスベクターの場合はウイルスゲノムの宿主染色体への組み込みには細胞の分裂が必要であることから非分裂細胞への遺伝子導入には適さない。一方、レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターは非分裂細胞においても感染後に外来遺伝子の宿主染色体への組み込みが生ずる。従って、これらのベクターは非分裂細胞において安定かつ長期的に外来遺伝子を発現させるために有効である。

[0086] 各ウイルスベクターは既報の方法に従い又は市販される専用のキットを用いて作製することができる。例えば、アデノウイルスベクターの作製はCOS-TPC法や完全長DNA導入法などで行うことができる。COS-TPC法は、目的のcDNA又は発現カセットを組み込んだ組換えコスミドと、親ウイルスDNA-末端タンパク質複合体 (DNA-TPC) を293細胞に同時トランスフェクションし、293細胞内でおこる相同組換えを利用して組換えアデノウイルスを作製する方法である (Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Takamori, K., Tokuda, C., and Saito, I. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320.)。一方、完全長DNA導入法は、目的の遺伝子を挿入した組換えコスミドを制限消化処理した後、293細胞にトランスフェクションすることによって組換えアデノ

ウイルスを作製する方法である（寺島美保、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、斎藤泉（2003）実験医学 21（7）931.）。COS-TPC法はAdenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)（タカラバイオ株式会社）、Adenovirus genome DNA-TPC（タカラバイオ株式会社）を利用して行うことができる。また、完全長DNA導入法は、Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)（タカラバイオ株式会社）を利用して行うことができる。

[0087] 一方、レトロウイルスベクターは以下の手順で作製することができる。まず、ウイルスゲノムの両端に存在するLTR (Long Terminal Repeat) の間のパッケージングシグナル配列以外のウイルスゲノム (gag、pol、env遺伝子) を取り除き、そこへ目的の遺伝子を挿入する。このようにして構築したウイルスDNAを、gag、pol、env遺伝子を構成的に発現するパッケージング細胞に導入する。これによって、パッケージングシグナル配列をもつベクターRNAのみがウイルス粒子に組み込まれ、レトロウイルスベクターが産生される。

[0088] アデノベクターを応用ないし改良したベクターとして、ファイバータンパク質の改変により特異性を向上させたもの（特異的感染ベクター）や目的遺伝子の発現効率向上が期待できるguttedベクター（ヘルパー依存性型ベクター）などが開発されている。本発明の発現ベクターをこのようなウイルスベクターとして構築してもよい。

[0089] 発現ベクターに挿入されるBRP44L遺伝子は好ましくは配列番号7（NCBI nucleotide database Accession No.: NM_016098に記載の塩基配列からなる。但し、当該塩基配列に等価な塩基配列かならなるDNA（以下、「等価DNA」と呼ぶ）をBRP44L遺伝子として用いることもできる。ここでの「等価な塩基配列」とは、基準の塩基配列（配列番号7）と一部で相違するが、当該相違によってそれがコードするタンパク質の機能（メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用）が実質的な影響を受けていない塩基配列のことをいう。等価DNAの具体例は、基準の塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAである。ここでの「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的

なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジェントな条件は当業者に公知であって例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)やCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)を参照して設定することができる。ストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5))を用いて約42℃～約50℃でインキュベーションし、その後0.1×SSC、0.1% SDSを用いて約65℃～約70℃で洗浄する条件を挙げることができる。更に好ましいストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアミド、5×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5))を用いる条件を挙げることができる。

[0090] 等価DNAの他の具体例として、基準の塩基配列に対して1若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用を示すタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。塩基の置換や欠失などは複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは、当該DNAがコードするタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが例えば2～40塩基、好ましくは2～20塩基、より好ましくは2～10塩基である。以上のような等価DNAは例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法 (Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) やランダム突然変異導入法 (Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) による変異の導入などを利用して、塩基の置換、欠失、挿入、付加、及び／又は逆位を含むように基準の塩基配列を有するDNAを改変することによって得ることができる。また、紫外

線照射など他の方法によっても等価DNAを得ることができる。

[0091] 等価DNAの更に他の例として、SNP（一塩基多型）に代表される多型に起因して上記のごとき塩基の相違が認められるDNAを挙げることができる。

[0092] BRP44L遺伝子は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって調製することができる。例えば、BRP44L遺伝子に対して特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドプローブ・プライマーを適宜利用することによってヒトcDNAライブラリーよりBRP44L遺伝子を単離（及び増幅）することができる。オリゴヌクレオチドプローブ・プライマーとしては、例えば、配列番号7に示す塩基配列に相補的なDNA又はその連続した一部が用いられる。オリゴヌクレオチドプローブ・プライマーは市販の自動化DNA合成装置などを用いて容易に合成することができる。尚、BRP44L遺伝子を調製するために用いるライブラリーの作製方法については、例えばMolecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkが参考になる。

[0093] ヒトcDNAライブラリーに代えてヒト以外の哺乳動物細胞（例えば、サル、マウス、ラット、ブタ、ウシ）由来のcDNAライブラリーを用いれば等価DNAを調製可能である。尚、ヒト以外の哺乳動物由来のBRP44L遺伝子の例として、マウス由来のBrp44l遺伝子の配列を配列番号15に示す。

[0094] 本発明の治療薬と併用される「抗がん剤」又は「抗腫瘍作用を持つ薬剤」の例は、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン等のプラチナ製剤、サイクロフォスファミド、フルオロウラシル（5-FU）、エトポシド、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、スタウロスポリンである。

[0095] <BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマへの適用>

本発明者らの検討の結果、PDZRN3、DTX3L、CSS3及びBRP44Lは、Braf変異のないマウスメラノーマとBRAF変異のあるヒトメラノーマの両方において、有意な発現量の増加（PDZRN3、DTX3L、CSS3）又は減少（BRP44L）を認めた（後

述の実施例)。従って、PDZRN3、DTX3L、CSS3及びBRP44Lは、BRAF変異の有無にかかわらず、メラノーマの治療における標的分子として有用であるといえる。実際、DTX3Lは、BRAF阻害剤であるPLXに耐性を獲得したメラノーマ細胞（BRAF変異を有する）において有効な標的となった（後述の実施例）。そこで、好ましい一態様では、本発明の医薬は、BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマに適用される。典型的には、この態様の医薬は、BRAF阻害剤を使用した治療の結果としてBRAF阻害剤に耐性を獲得したメラノーマの患者を治療対象とする。しかしながら、その本来の特性として、或いはBRAF阻害剤の使用とは別の原因（例えば、症状の進展に付随する変異や他の薬剤の影響による変異）によって、BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマの患者を治療対象にすることもできる。尚、BRAF阻害剤の例はPLX4032、PLX4720である。

[0096] BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマに適用される医薬では、好ましくは、DTX3Lを標的分子とする。従って、好ましい態様として、DTX3L遺伝子の発現を抑制する化合物を有効成分とした医薬が提供される。

[0097] <医薬の製剤化、投与、治療対象>

本発明の医薬の製剤化は常法に従って行うことができる。製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることができる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリ

ン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

[0098] 製剤化する場合の剤型も特に限定されない。剤型の例は錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、外用剤、及び座剤である。本発明の医薬には、期待される治療効果（又は予防効果）を得るために必要な量（即ち治療上有効量）の有効成分が含有される。本発明の医薬中の有効成分量は一般に剤型によって異なるが、所望の投与量を達成できるように有効成分量を例えば約0.1重量%～約95重量%の範囲内で設定する。本発明の医薬はその剤型に応じて経口投与又は非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、皮内、筋肉内、又は腹腔内注射、経皮、経鼻、経粘膜など）によって対象に適用される。これらの投与経路は互いに排他的なものではなく、任意に選択される二つ以上を併用することもできる（例えば、経口投与と同時に又は所定時間経過後に静脈注射等を行う等）。核酸コンストラクトを有効成分とした場合（例えばRNAiを利用する態様）、*in vivo*投与に限らず、*ex vivo*投与を採用することもできる。

[0099] 本発明の医薬を投与する「対象」は特に限定されず、ヒト及びヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウズラ等である）を含む。好ましい一態様では本発明の医薬はヒトに対して適用される。投与量は患者の症状、年齢、性別、及び体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を設定することが可能である。投与スケジュールの設定においては、患者の症状や医薬の効果持続時間などを考慮することができる。

[0100] 以上の記述から明らかな通り本出願は、メラノーマの患者に対して本発明の医薬を治療上有効量投与することを特徴とする、メラノーマの治療法も提供する。

実施例

[0101] メラノーマ特異的な生体分子（バイオマーカーや治療標的）を見出すべく、以下の検討を行った。

[0102] 1. 材料と方法

（1）細胞及びマウス

正常ヒト皮膚メラノサイト(NHEM)は倉敷紡績株式会社 (KURABO, Japan) より購入した。ヒトメラノーマ細胞株SK-Mel28及びG361は理研バイオリソースセンターから、ヒトメラノーマ細胞株MNT1はVJ Hearing博士 (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD)から、ヒトメラノーマ細胞株A375P及びA375MはDorothy C Bennett博士(St George's, UK)より提供された。マウスメラノーマ細胞株 (B16, B16F1, B16F10, B16BL6) は東北大学細胞バンクより提供された。304/B6マウス(RET-mice) (Kato, M. et al., J Invest Dermatol. 111:640-4.; Iwamoto, T. et al., EMBO J. 10:3167-75.; Kato, M. et al., Oncogene. 17:1885-8.等を参照) は、メラノサイト系良性腫瘍及びメラノーマの採取に利用した。

[0103] （2）リアルタイムPCR

全RNAをHigh Pure RNA Kit (Roche Diagnostics)を用いて培養細胞及び組織から抽出し、Super-cryptTMIII reverse transcriptase (Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。リアルタイムRT-PCRはpower SYBR1 Green PCR master mix (Applied Biosystems)の試薬を使用し、ABI Prism7500 sequence detection system (Applied Biosystems)を用いて行った。

[0104] （3）遺伝子強制発現細胞株及びノックダウン細胞株の樹立

遺伝子強制発現細胞株の作製にはpCMV-c-Fa-Puro3ベクター(Invitrogen)を使用した。タンパク質コード領域のcDNAをpCMV-c-Fa-Puro3ベクターに導入後、培養細胞にトランスフェクションし、1 mg/ml ピューロマイシン(和光純薬工業株式会社)による細胞の選別を行った。ノックダウン細胞株の樹立には、pRNAT-U6-1-Neoベクター(Invitrogen)を使用した。shRNA配列をpRNAT-U6-1-Neoベクターに導入後、培養細胞にトランスフェクションし、1 mg/ml ネオマ

イシン(和光純薬工業株式会社)による細胞の選別を行った。

[0105] (4) メラノーマ浸潤能活性のin vitro及びin vivo解析

In vitro解析では、セルカルチャーインサート(FALCON)をマトリゲル(Corning)コートし、1% FBS条件下で培養した細胞を播種、10% FBS入り培養液を24穴ディッシュに加えた後、セルカルチャーインサートをセットした。24~48時間後、セルカルチャーインサートをホルマリン固定し、クリスタルバイオレットによる細胞染色を行った。In vivo解析では、1% FBS条件下で培養した細胞をヌードマウスの尾静脈から注入し、14日間飼育後に解剖し、肺への転移を調査した。

[0106] (5) 認可

本研究は名古屋大学及び中部大学に設置されている動物実験委員会（名古屋大学認可番号26317、中部大学認可番号2410062）、組換えDNA実験委員会（名古屋大学認可番号13-76、中部大学認可番号12-03）及び倫理委員会（名古屋大学認可番号2013-0070、中部大学認可番号250007）によって認可されている。

[0107] (6) 遺伝子配列及びタンパク質配列

以下、公共のデータベースに登録されている、各遺伝子及びタンパク質の配列を記載する。

ヒトPDZRN3遺伝子：配列番号1（NCBI nucleotide database Accession No.: NM_015009）

ヒトPDZRN3タンパク質：配列番号2（NCBI protein database Accession No.: NP_055824）

ヒトDTX3L遺伝子：配列番号3（NCBI nucleotide database Accession No.: NM_138287）

ヒトDTX3Lタンパク質：配列番号4（NCBI protein database Accession No.: NP_612144）

ヒトCSS3遺伝子：配列番号5（NCBI nucleotide database Accession No.: NM_175856）

ヒトCSS3タンパク質：配列番号 6 (NCBI protein database Accession No. : NP_787052)

ヒトBRP44L遺伝子：配列番号 7 (NCBI nucleotide database Accession No. : NM_016098)

ヒトBRP44Lタンパク質：配列番号 8 (NCBI protein database Accession No. : NP_057182)

[0108] マウスPdzn3遺伝子：配列番号 9 (NCBI nucleotide database Accession No. : NM_018884)

マウスPdzn3タンパク質：配列番号 10 (NCBI protein database Accession No. : NP_061372)

マウスDtx3l遺伝子：配列番号 11 (NCBI nucleotide database Accession No. : NM_001013371)

マウスDtx3lタンパク質：配列番号 12 (NCBI protein database Accession No. : NP_001013389)

マウスCsn3遺伝子：配列番号 13 (NCBI nucleotide database Accession No. : NM_001081328)

マウスCsn3タンパク質：配列番号 14 (NCBI protein database Accession No. : NP_001074797)

マウスBrp44l遺伝子：配列番号 15 (NCBI nucleotide database Accession No. : NM_018819)

マウスBrp44lタンパク質：配列番号 16 (NCBI protein database Accession No. : NP_061289)

[0109] 2. 結果

メラノーマモデルマウス (RET-Tg) の自然発症したメラノサイト系良性腫瘍とメラノーマから mRNA を精製し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、良性腫瘍と比較してメラノーマでの発現が強い、或いは弱い遺伝子を選定することで、PDZ domain containing ring finger 3 (PDZRN3)、Deltex-3-like (DTX3L)、Chondroitin sulfate synthase 3 (CSS3)、BRP44L 遺伝子

メラノーマ関連遺伝子として同定した。

[0110] (1) 遺伝子・タンパク質発現解析

(a) PDZRN3

メラノーマモデルマウス (RET-Tg) に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、PDZRN3遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRを用いて測定したところ、PDZRN3遺伝子は良性腫瘍での発現量と比べて、悪性メラノーマでの発現量が大きく上昇していた (図1)。ヒト正常皮膚メラノサイト (NHEM) と、ヒトメラノーマ細胞株 (6種) におけるPDZRN3タンパク質の発現を調査したところ、全てのメラノーマ細胞株において、PDZRN3タンパク質の発現量がNHEMと比べて上昇していた (図2 a)。また、マウスメラノーマ細胞株 (4種) におけるPdzrn3タンパク質の発現量を調査した。B16細胞株は他の細胞株と比べて、浸潤能 (転移活性) が低いことが知られている。浸潤能の低いB16と比べて、浸潤能の高い他の細胞株での発現量が大きく上昇しており (図2 b)、Pdzrn3が浸潤能と関連している可能性を示唆している。

[0111] ヒトメラノーマ組織 (良性腫瘍: Benign、原発性メラノーマ: Malignant、転移性メラノーマ: Metastasis) におけるPDZRN3タンパク質の発現量を抗PDZRN3抗体による免疫染色後、染色レベルを数値化することで発現量を測定した。発現レベルを3つ (陰性/低い、中程度、高い) にカテゴライズし、各発現レベルの割合を比較したところ、原発性メラノーマ及び転移性メラノーマでの発現レベルは良性腫瘍と比較して有意に高いことが明らかとなった (図3)。

[0112] (b) DTX3L

RET-Tgマウスに自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、DTX3L遺伝子及びタンパク質発現レベルをリアルタイムPCR (図4 A)、ウェスタンブロットティング (図4 B) 及び免疫組織染色 (図4 C) を用いて測定した。DTX3L遺伝子及びタンパク質は良性腫瘍での発現量と比べて、悪性メラノーマでの発現量が大きく上昇することが明らかとなった。マウスメラノーマ細胞株 (4種) におけるDtx3lタンパク質の発現量をウェスタンブロットティングを用いて測

定した（図5 A）。B16細胞株は他の細胞株と比べて、浸潤能（転移活性）が低いことが知られている。浸潤能の低いB16と比べて、浸潤能の高い他の細胞株での発現量が大きく上昇しており、Dtx3lが浸潤能に関連している可能性を示唆している。また、ヒト正常皮膚メラノサイト(NHEM)と、ヒトメラノーマ細胞株（5種）におけるDTX3Lタンパク質の発現量をウェスタンブロッティングを用いて測定した（図5 B）。全てのヒトメラノーマ細胞株において、DTX3Lタンパク質の発現量がNHEMと比べて上昇していた。ヒトメラノーマ組織（良性腫瘍：Benign、原発性メラノーマ：primary melanoma、転移性メラノーマ：Metastatic melanoma）におけるDTX3Lタンパク質の発現量を、抗DTX3L抗体による免疫染色後、染色レベルを数値化することで測定した。発現レベルを3つ（陰性／低い、中程度、高い）にカテゴライズし、各発現レベルの割合を比較した結果、原発性メラノーマ及び転移性メラノーマでの発現レベルは良性腫瘍と比較して有意に高いことが明らかとなった（図6 A, B）。

[0113] (c) CSS3

CSS3にはCSS1、CSS2という同じファミリー遺伝子が存在する。メラノーマモデルマウス(RET-Tg)に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、これら3つの遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRを用いて測定した結果、CSS1、CSS2遺伝子は良性・悪性の両方で発現量は低いが、CSS3遺伝子は悪性メラノーマでの発現量が大きく上昇していた（図7）。ヒトメラノーマ組織（良性腫瘍：Benign、原発性メラノーマ：Malignant、転移性メラノーマ：Meta）におけるCSS3タンパク質の発現量を、抗CSS3抗体による免疫染色後、染色レベルを数値化することで測定した（図8）。発現レベルを3つ（陰性／低い、中程度、高い）にカテゴライズし、各発現レベルの割合を比較した結果、原発性メラノーマ及び転移性メラノーマでの発現レベルは良性腫瘍と比較して有意に高いことが明らかとなった。

[0114] (d) BRP44L

メラノーマモデルマウス(RET-Tg)に自然発症した良性腫瘍及び悪性メラノーマにおける、BRP44L遺伝子及びタンパク質発現レベルをリアルタイムPCR(

図 9 A)、ウェスタンブロッティング(図 9 B)を用いて測定した。BRP44L mRNA及びタンパク質は、良性腫瘍と比較してメラノーマでの発現が減少していた。ヒトメラノーマ組織(良性腫瘍: nevus、メラノーマ: melanoma)におけるBRP44L mRNAの発現量をリアルタイムPCRを用いて測定した結果、ヒトメラノーマ組織における発現量は良性腫瘍と比較して大きく減少していることが明らかとなった(図 10)。

[0115] (2) 各遺伝子の機能解析

(a) PDZRN3

shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてPDZRN3の発現を低下させた安定株を樹立し(図 11 a)、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定した(図 11 b)。PDZRN3の発現量が低下した細胞は、浸潤細胞数(図 11 bの原図では紫色に染色された細胞)が大きく低下しており(図 11 bのP1、P2)、メラノーマ細胞が本来有する浸潤能を大きく阻害していた。PDZRN3の発現を低下させた安定株をヌードマウス尾部静脈へ注入し、その後の肺への転移活性を調査した(図 12 a)。PDZRN3の発現量が低下した細胞株(shPdzn3)は、コントロール株(shControl)と比較して肺への浸潤(転移)が大きく阻害された。各安定株における浸潤能関連シグナル分子(FAK)の活性化(リン酸化)レベルを調査したところ、全てのPDZRN3発現抑制クローン(P1~P3)でFAKのリン酸化(活性)レベルが低下しており(図 12 b)、PDZRN3は浸潤能関連シグナル分子(FAK)の活性を制御している可能性が示唆された。

[0116] (b) DTX3L

shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてDtx3lの発現を低下させた安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定すると共に(図 13 A)、浸潤に関与する細胞内シグナル分子の活性を測定した(図 13 B)。Dtx3lの発現量低下は、Fak、Pi3k、Aktシグナルの活性を抑制し、マウスメラノーマ細胞が本来有する浸潤能を大きく阻害することが明らかとなった。一方、shRNA強制発現ベクターを用い、ヒトメラノ

ーマ細胞株(G361)においてDTX3Lの発現を低下させた安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定すると共に(図14A)、浸潤に関与する細胞内シグナル分子の活性を測定した(図14B)。細胞の浸潤能、浸潤に関与する細胞内シグナル分子の両方が抑制されており、DTX3Lによる、メラノーマ浸潤能(転移能)活性の制御は、マウスだけでなく、ヒトでも同様に機能していることが明らかとなった。次に、shRNA強制発現ベクターを用い、マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてDTX3Lの発現を低下させた安定株を樹立した。各安定株の浸潤能を調べるため、安定株をヌードマウス尾部静脈へ注入し、その後の肺への転移活性を調査した。注入した細胞はGFPを発現するため、肺転移した細胞を可視化できる(図15A)。DTX3Lの発現量低下は、メラノーマ細胞の肺への浸潤(転移)を大きく阻害した(図15)。近年開発されたBRAFに対する分子治療薬であるPLX4032やPLX4720は新たな治療薬候補の一つであるが、メラノーマへの長期処理によって耐性細胞を生み出し、高頻度で再発する。本実験では、ヒトメラノーマ細胞株(A375P)にメラノーマ分子標的薬PLX4720を長期暴露して耐性株を作製し、siRNA導入によってDTX3Lの発現を低下させた場合(図16A)の浸潤能への効果を浸潤アッセイによって測定した(図16B)。PLX耐性メラノーマ細胞に対してもDTX3Lの発現抑制は効果的であり、既存の分子標的試薬によって生み出された薬剤耐性メラノーマに対する治療効果が期待できる。

[0117] (c) CSS3

マウスメラノーマ細胞株(B16F10)においてCSS3を強制発現させた安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定した(図17)。CSS3の強制発現は、メラノーマ細胞が本来有する浸潤能をさらに活性化することが明らかとなった。shRNA強制発現ベクターを用い、CSS3を強制発現させたマウスメラノーマ細胞株(B16F10 FLAG-CSS3)においてCSS3の発現を低下させた安定株を樹立し、各安定株の浸潤能を浸潤アッセイによって測定した(図18a)。CSS3の発現量低下は、メラノーマ細胞が有する浸潤能を阻害した。B16F10コントロール細胞、CSS3強制発現株(+CSS3)、及び発現抑制安定株(CSS3 sh

)をヌードマウス尾部静脈へ細胞注入し、その後の肺への転移活性を調査した結果、CCS3強制発現によって肺への転移数は増加し、発現抑制によって転移数は減少することが明らかとなった(図18b)。

[0118] (d) BRP44L

ヒトメラノーマ細胞株SK-Mel28 (SK-GFP#6)と、BRP44Lを強制発現させた安定株(SK-B#7, SK-B#8)に対し、抗癌剤の1種エトポシド処理を行うことで細胞死を誘導し、細胞生存率を測定した(図19)。BRP44L高発現下ではエトポシドによる細胞死誘導がより強く誘導されたことから、BRP44Lの強制発現は、抗癌剤に対する感受性を高める可能性を示唆している。

[0119] 3. 考察

今回解析した4種類の遺伝子及び遺伝子産物(タンパク質)はいずれも良性腫瘍と悪性腫瘍の間でその発現量に大きな差があり(図1~10参照)、その機能についても、実際のメラノーマ発症、或いは抗癌剤に対する感受性に深く関連していた(図11~19参照)。これらの分子をバイオマーカー(診断マーカー)として使用すれば、しばしば診断に苦慮するメラノサイト系腫瘍の病理診断精度をあげることができるだけでなく、悪性化レベルをも考慮した検査・診断が可能となる。これらのバイオマーカーを併用することは、メラノーマの早期診断と病理診断の両方において、詳細且つ有用な情報を提供する。BRP44Lは他の3遺伝子とは対照的にメラノーマで発現が減少していたことから、BRP44Lを他のバイオマーカー(PDZRN3、DTX3L、CSS3の一つ以上)に組み合わせて使用した場合に得られる情報は特に有用である。

[0120] 今回解析した4つの遺伝子・タンパク質は、その発現を抑制又は増強することで極めて鋭敏にメラノーマの活性を阻害できる(図11~19参照)。PDZRN3、DTX3L、CSS3は浸潤・転移に主に関与し、BRP44Lは抗癌剤誘導性の細胞死感受性に関与している。これらの分子を各患者のメラノーマの性格によって使い分けることで、様々なタイプのメラノーマに対応できる可能性がある。近年開発されたBRAFに対する分子治療薬であるPLX4032やPLX4720はメラノーマ治療薬の候補の一つであるが、メラノーマへの長期処理によって耐性細

胞を生み出し、高頻度でメラノーマが再発する。今回の実験において、DTX3L 遺伝子の発現を抑制することにより、PLX4720耐性細胞の転移を大幅に抑制することに成功した（図16）。つまり、新たに同定されたメラノーマ関連分子（メラノーマに対する分子標的療法の候補分子）は、PLX4032やPLX4720等のメラノーマ治療薬の抱える問題に対しても有効であるといえる。

[0121] 新たなメラノーマ関連分子はメラノーマの転移や抗癌剤に対する感受性に深く関与している。当該メラノーマ関連分子には、様々な癌腫の中でも特に予後が悪く、有効な治療のためには早期発見が必須のメラノーマの診断や治療に対する大きな貢献を期待できる。

産業上の利用可能性

[0122] 本発明のバイオマーカーはメラノーマの早期検出、メラノーマの悪性度の判定などに有用である。また、バイオマーカーを構成する生体分子は、メラノーマの浸潤、転移、抗癌剤に対する感受性などに深く関与しており、治療の標的としても有用である。従って、メラノーマの診断はもとより、メラノーマの治療への本発明の適用ないし応用も期待される。

[0123] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

- [請求項1] PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子、CSS3タンパク質、BRP44L遺伝子及びBRP44Lタンパク質からなる群より選択される生体分子からなる、メラノーマ特異的バイオマーカー。
- [請求項2] PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子、CSS3タンパク質、BRP44L遺伝子及びBRP44Lタンパク質からなる群より選択される一又は二以上の生体分子の検体中レベルを指標として用いることを特徴とする、メラノサイト系腫瘍検査法。
- [請求項3] 以下のステップ（１）～（３）を含む、請求項２に記載のメラノサイト系腫瘍検査法：
- （１）被検者由来の検体を用意するステップ；
 - （２）前記検体中の一又は二以上の前記生体分子を検出するステップ；及び
 - （３）検出結果に基づいて、メラノサイト系腫瘍の悪性度を判定するステップ。
- [請求項4] PDZRN3遺伝子、PDZRN3タンパク質、DTX3L遺伝子、DTX3Lタンパク質、CSS3遺伝子及びCSS3タンパク質については、検出値が高いと悪性度が高いとの基準、又は検出できると発症可能性が高いとの基準に従い、
- BRP44L遺伝子及びBRP44Lタンパク質については、検出値が低いと悪性度が高いとの基準、又は検出できないと悪性度が高いとの基準に従い、ステップ（３）の判定を行う、請求項３に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。
- [請求項5] ステップ（２）で得られた検出値と対照検体の検出値との比較に基づきステップ（３）の判定を行う、請求項３又は４に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。
- [請求項6] ステップ（２）で得られた検出値と、同一の被検者から過去に採取

された検体中の検出値との比較に基づきステップ（３）の判定を行う、請求項３又は４に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。

[請求項7] 前記検体が皮膚組織、血液、血漿、血清、尿、唾液、汗又は腫瘍組織である、請求項２～６のいずれか一項に記載のメラノサイト系腫瘍検査法。

[請求項8] 請求項１に記載のメラノーマ特異的バイオマーカーに特異的結合性を示す物質からなる、メラノサイト系腫瘍検査試薬。

[請求項9] 前記物質が抗体である、請求項８に記載のメラノサイト系腫瘍検査試薬。

[請求項10] 請求項８又は９に記載のメラノサイト系腫瘍検査試薬を含む、メラノサイト系腫瘍検査用キット。

[請求項11] PDZRN3遺伝子、DTX3L遺伝子及びCSS3遺伝子からなる群より選択される標的遺伝子の発現を抑制する化合物を有効成分とする、メラノーマ治療薬。

[請求項12] 前記化合物が以下の(a)～(e)からなる群より選択される化合物である、請求項１１に記載のメラノーマ治療薬：

(a)標的遺伝子を標的とするsiRNA；

(b)標的遺伝子を標的とするsiRNAを細胞内で生成する核酸コンストラクト；

(c)標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列と該配列にアニーリングする相補配列を有する一本鎖RNA；

(d)標的遺伝子の転写産物を標的とするアンチセンス核酸；

(e)標的遺伝子の転写産物を標的とするリボザイム。

[請求項13] 以下の(A)又は(B)を有効成分として含み、抗がん剤又は抗腫瘍作用を持つ薬物と併用される、メラノーマ治療薬：

(A)BRP44Lタンパク質又はその一部（但し、メラノーマ細胞の抗がん剤感受性に対して有効な作用を有する）；

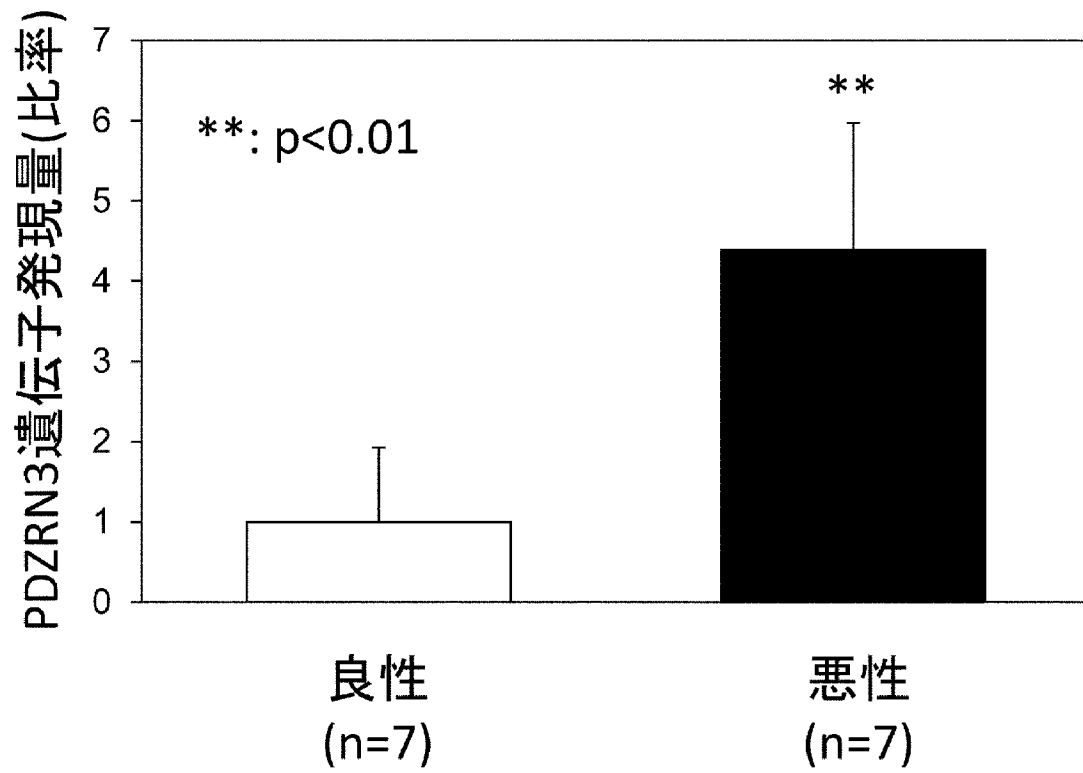
(B)BRP44L遺伝子又はその一部（但し、メラノーマ細胞の抗がん剤

感受性に対して有効な作用を有するタンパク質をコードする)を保持する発現ベクター。

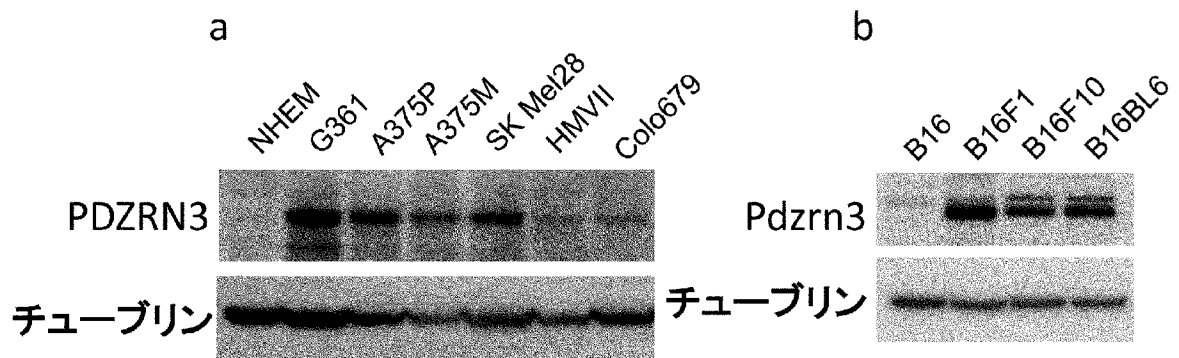
[請求項14] BRAF阻害剤に耐性を示すメラノーマに適用される、請求項11～13のいずれか一項に記載のメラノーマ治療薬。

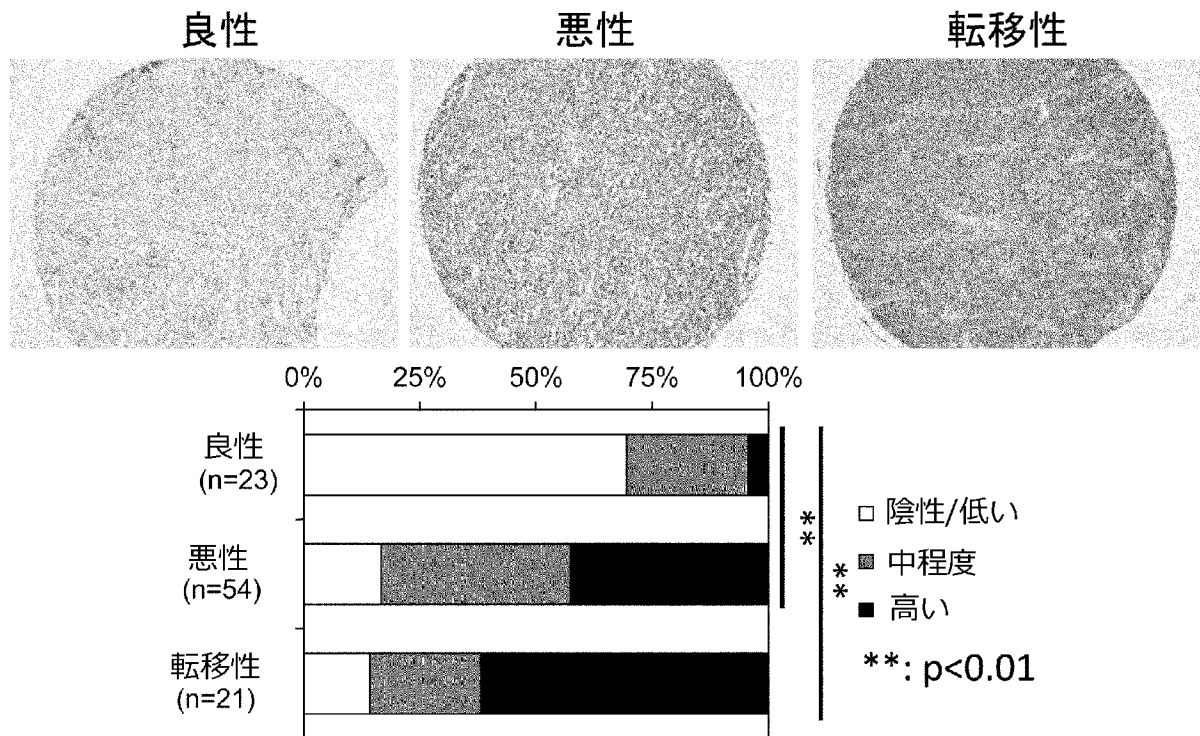
[請求項15] 請求項11～14のいずれか一項に記載のメラノーマ治療薬を、メラノーマの患者に投与するステップ、を含むメラノーマ治療法。

[図1]

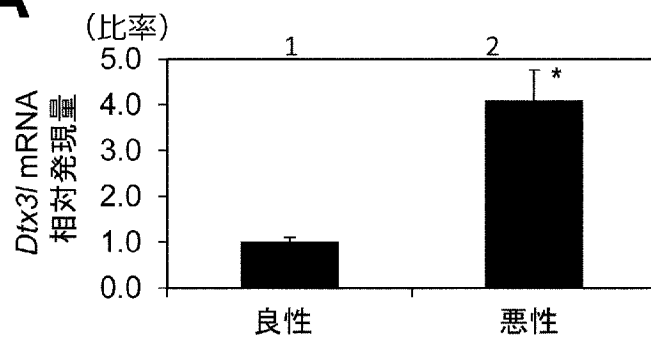
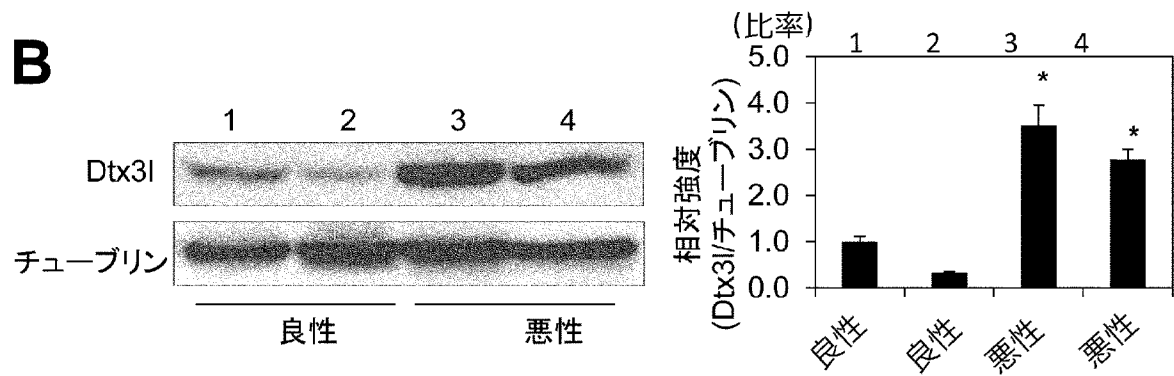
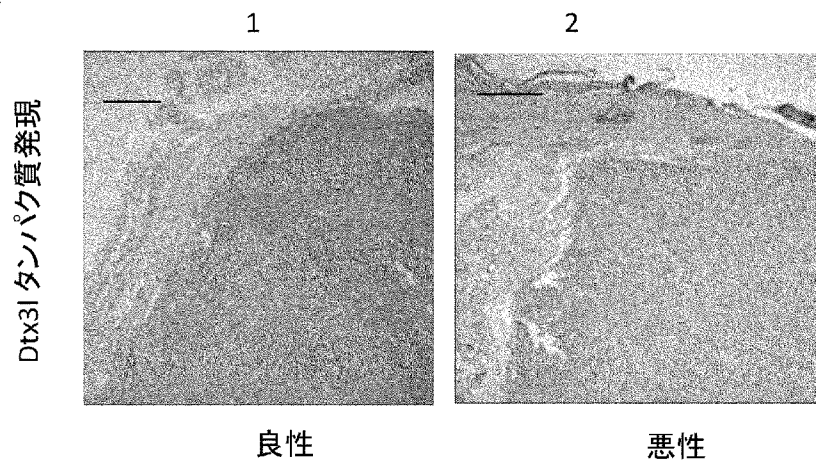


[図2]

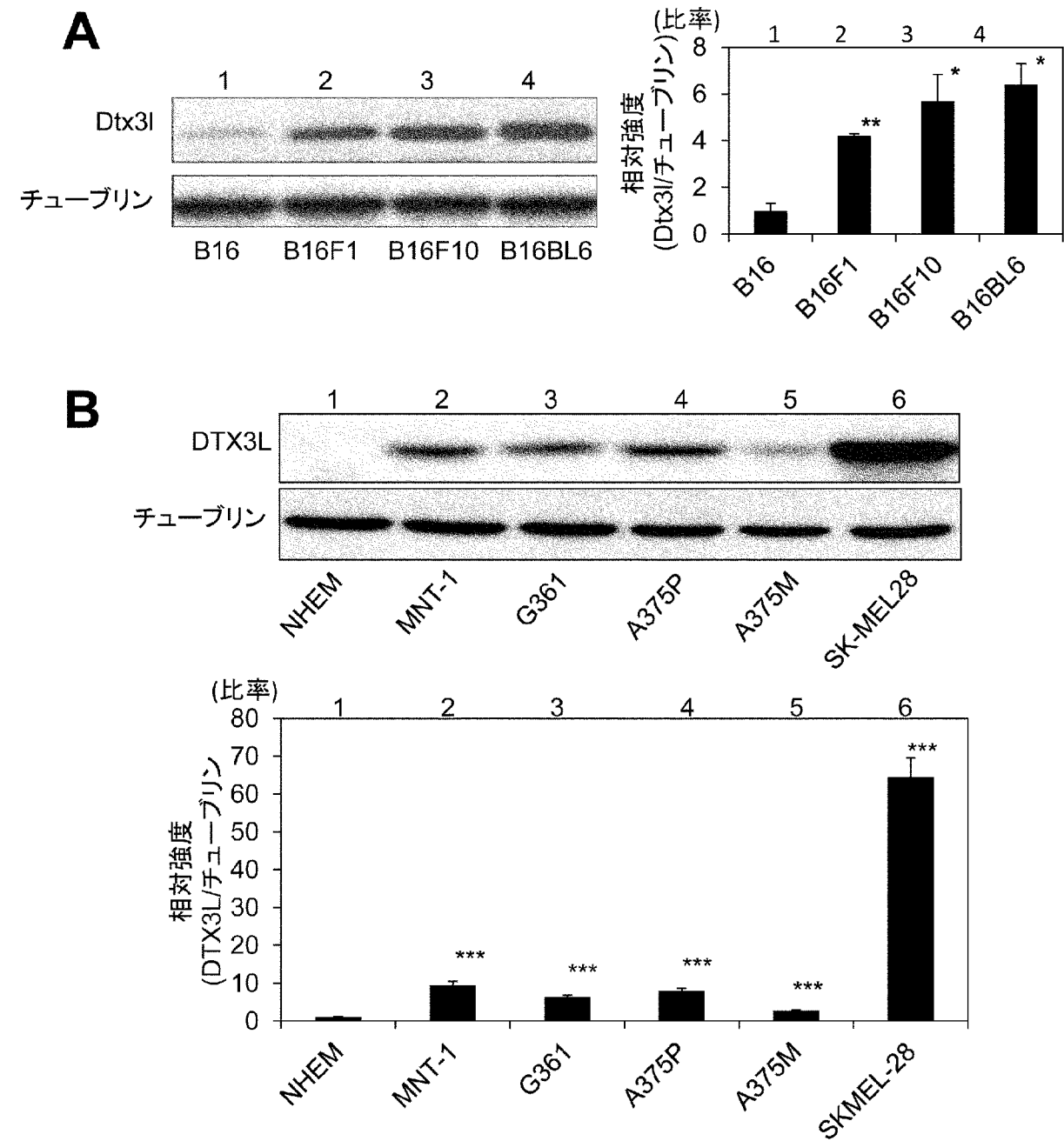




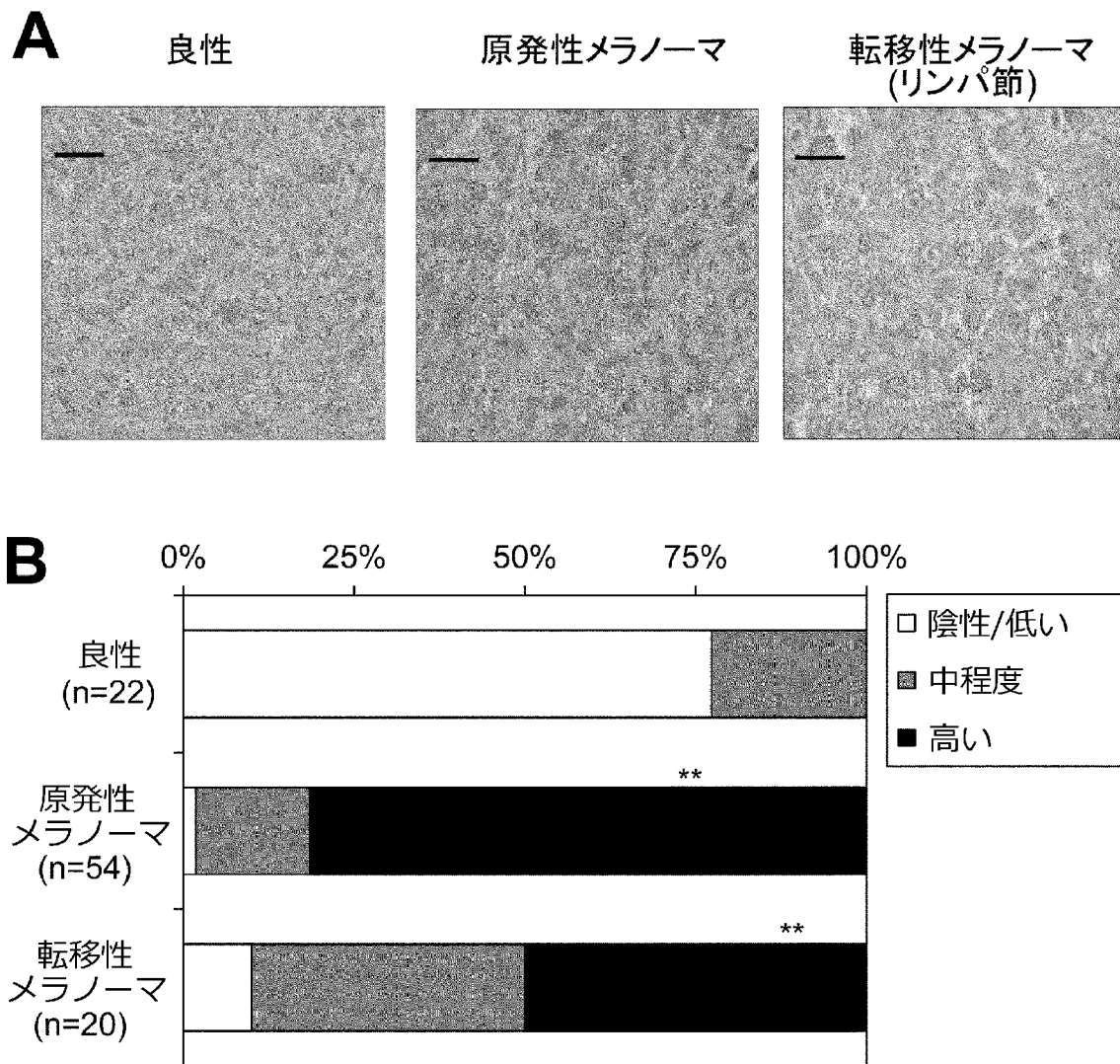
[図4]

A**B****C**

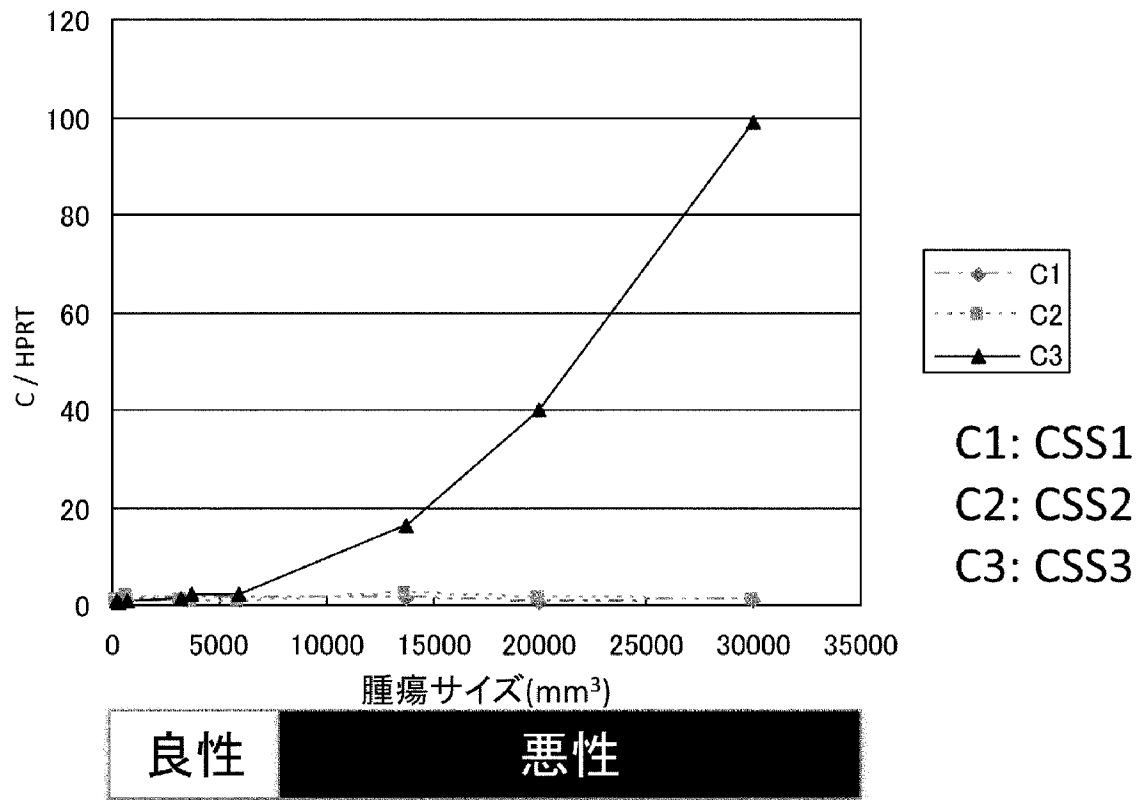
[図5]



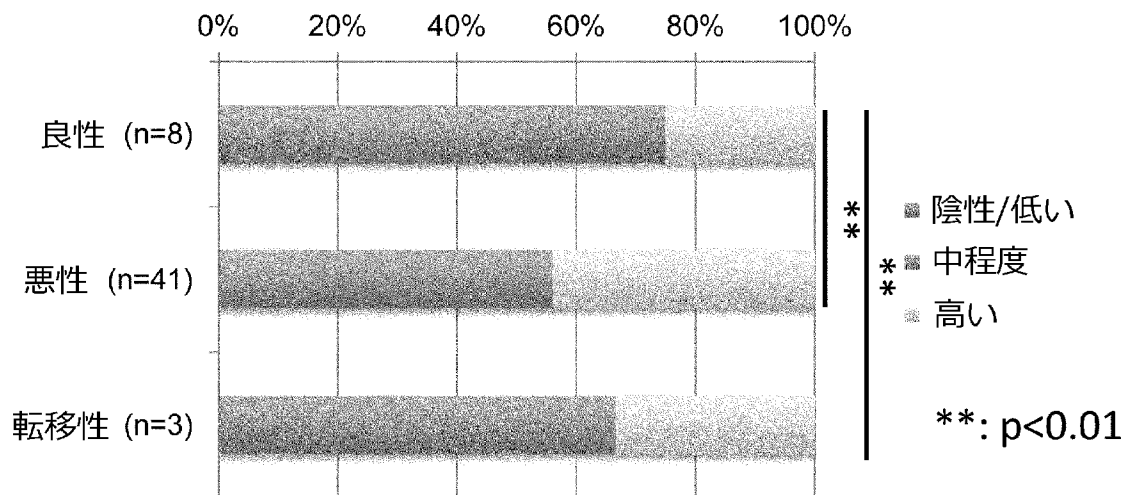
[図6]



[図7]

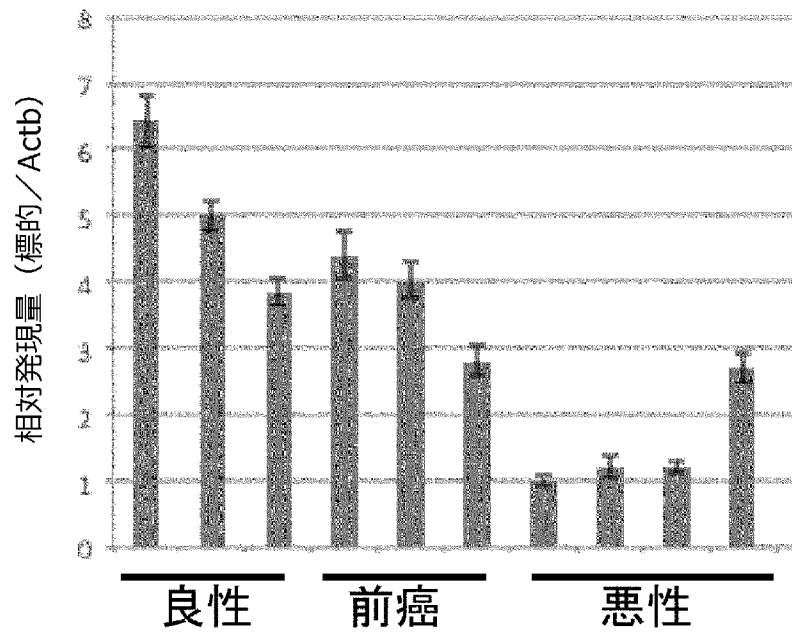


[図8]

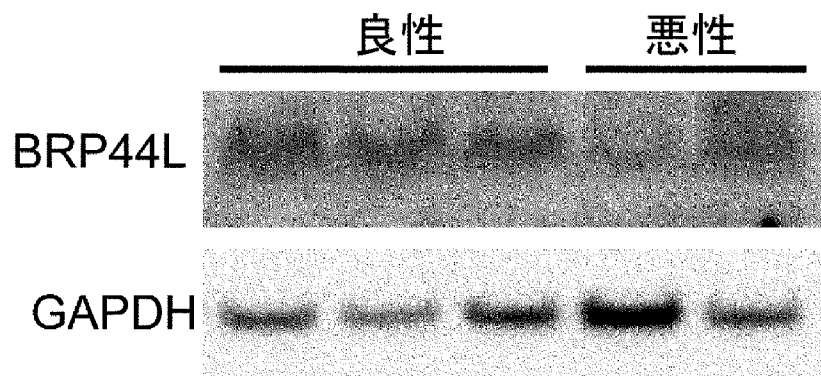


[図9]

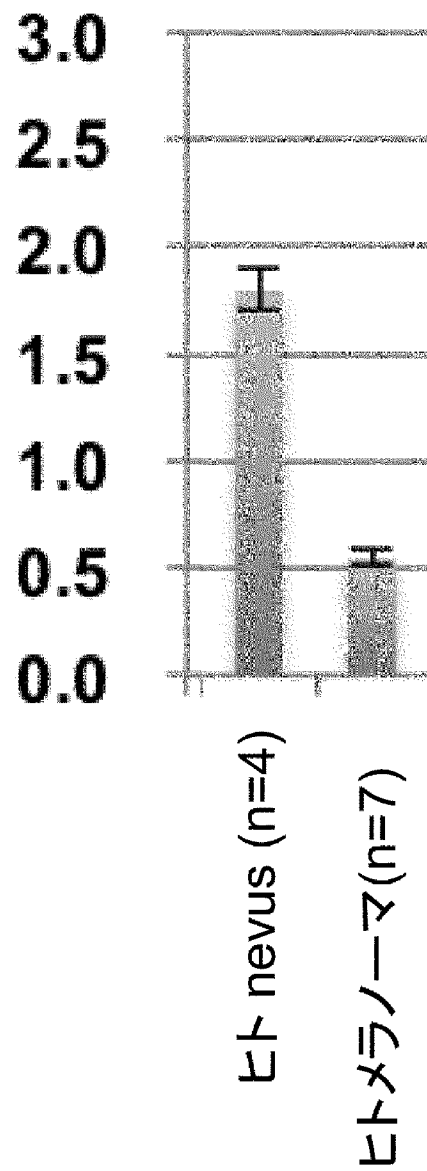
A



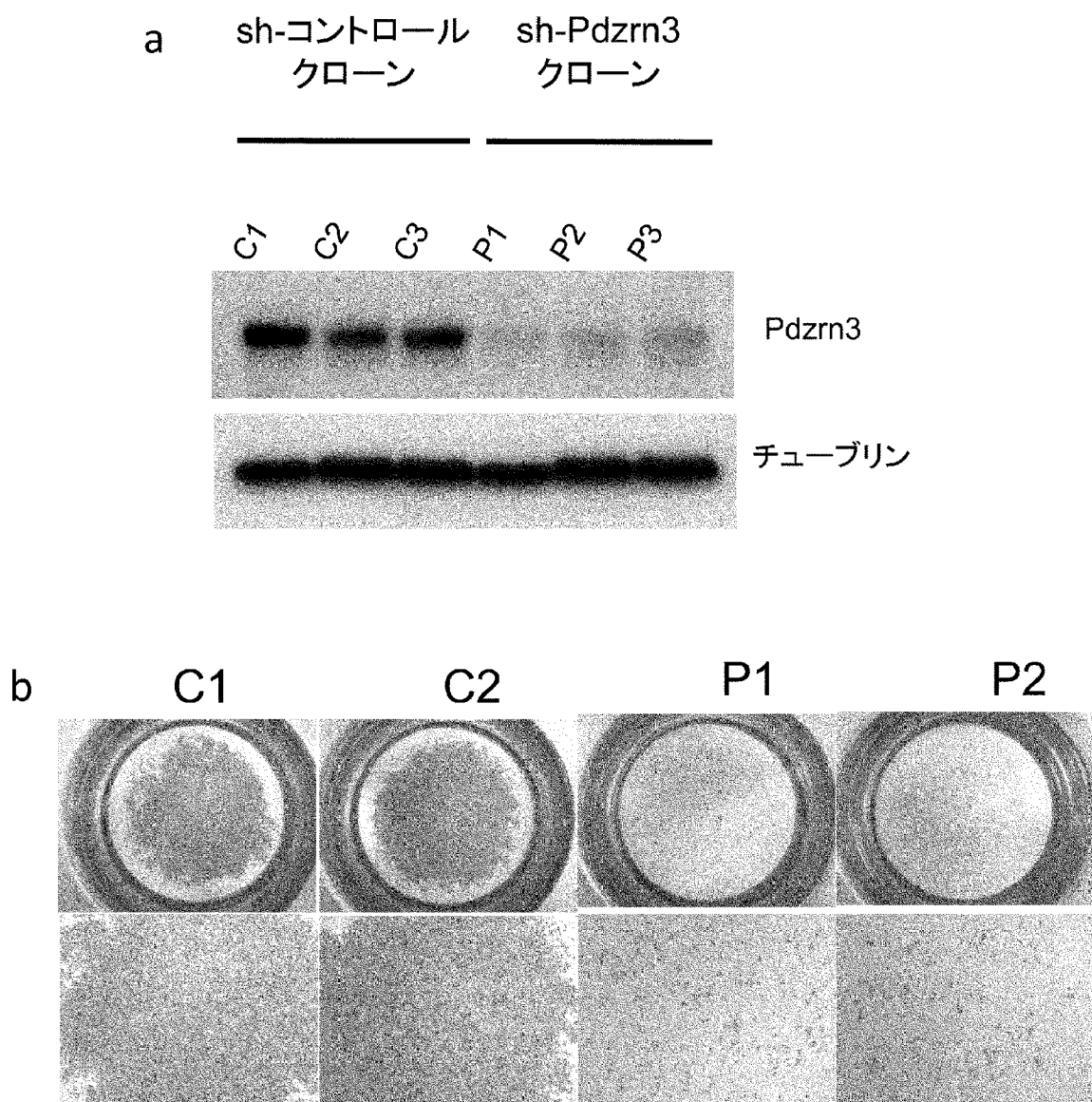
B



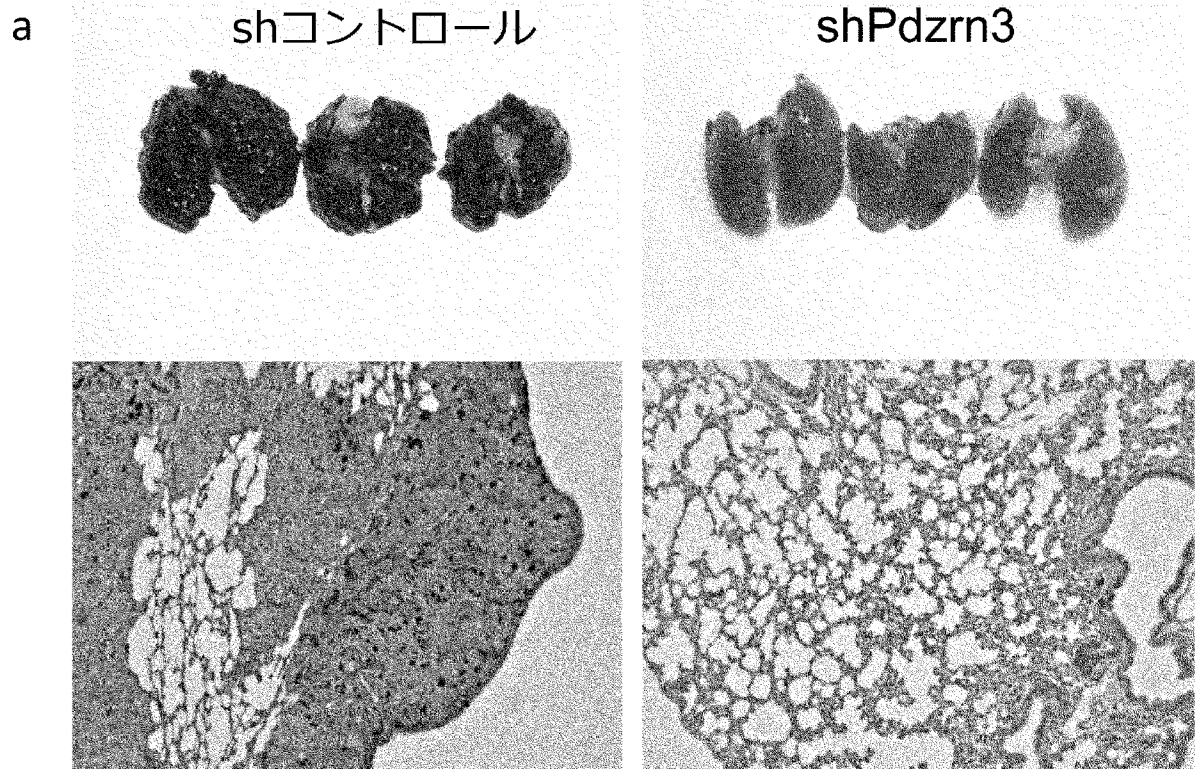
[図10]



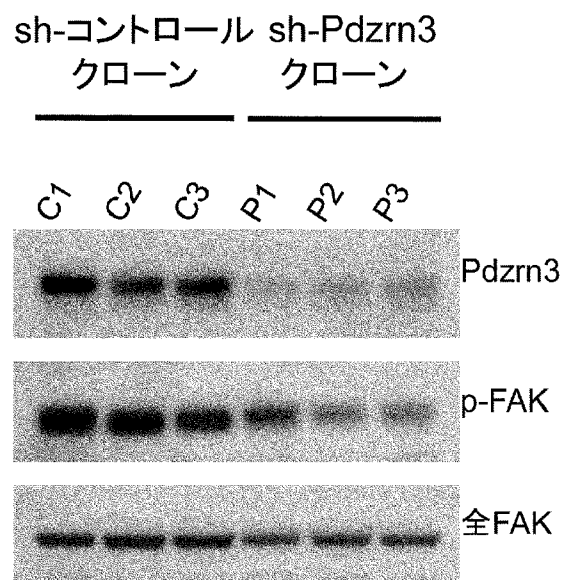
[図11]



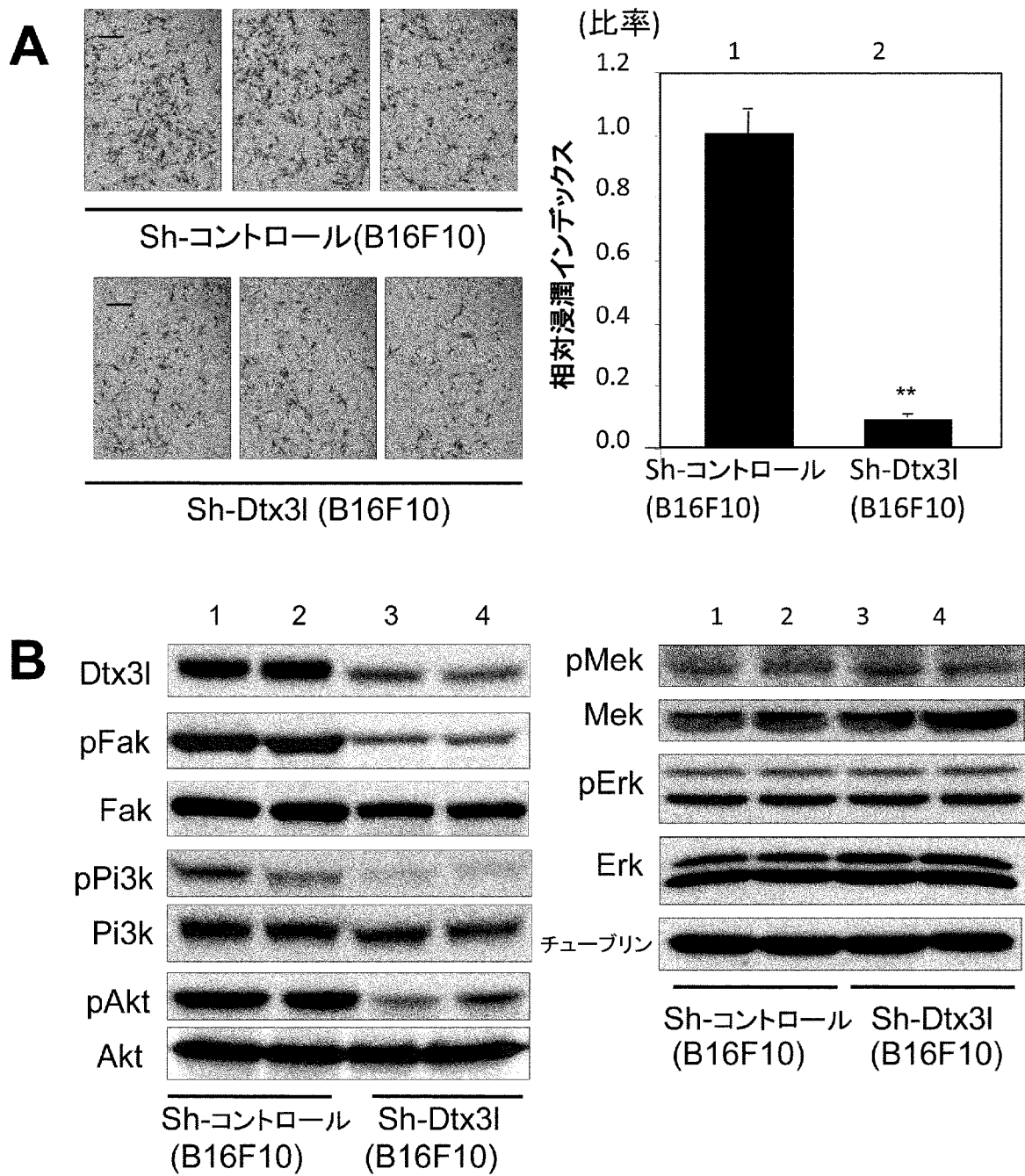
[図12]



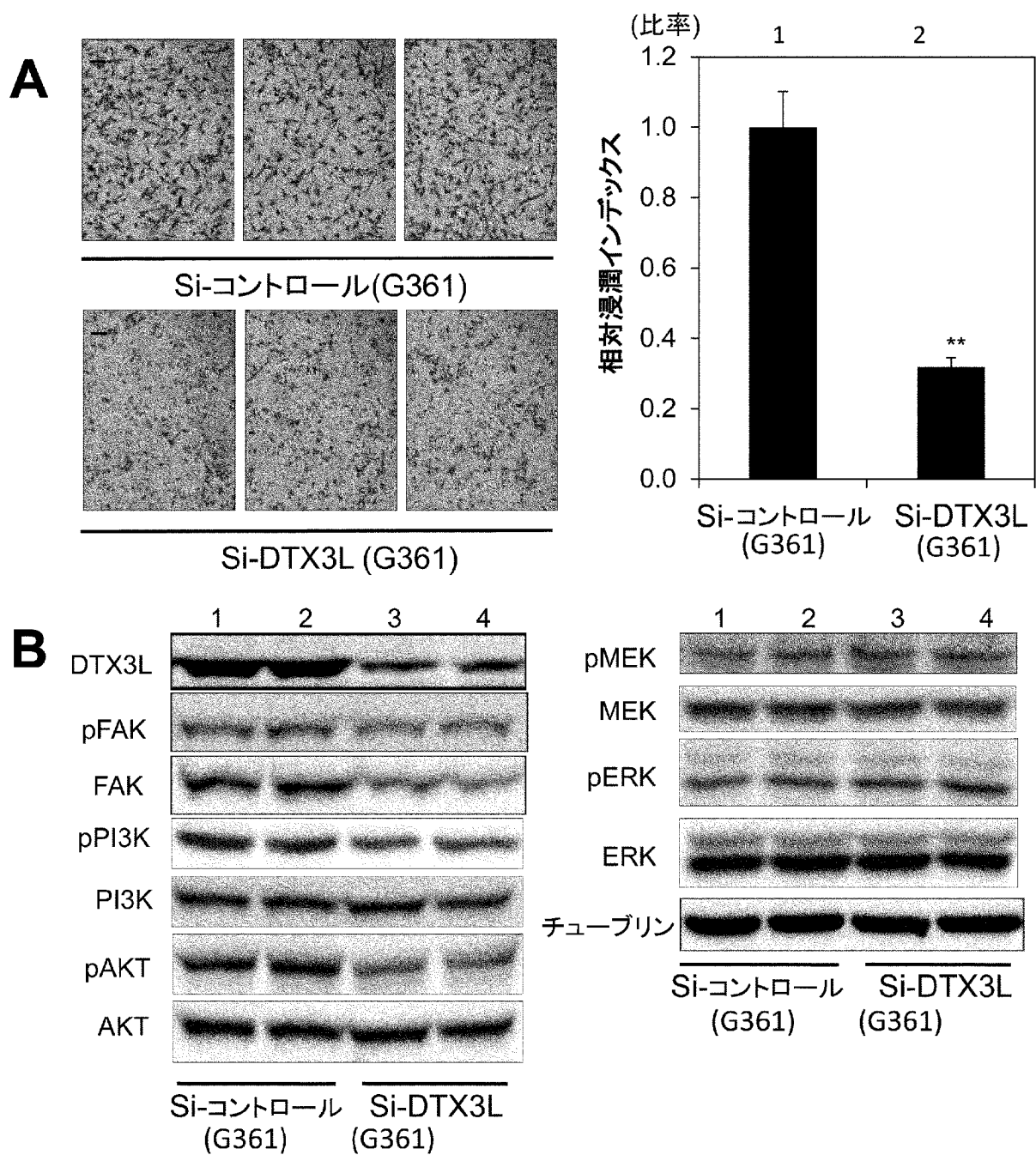
b



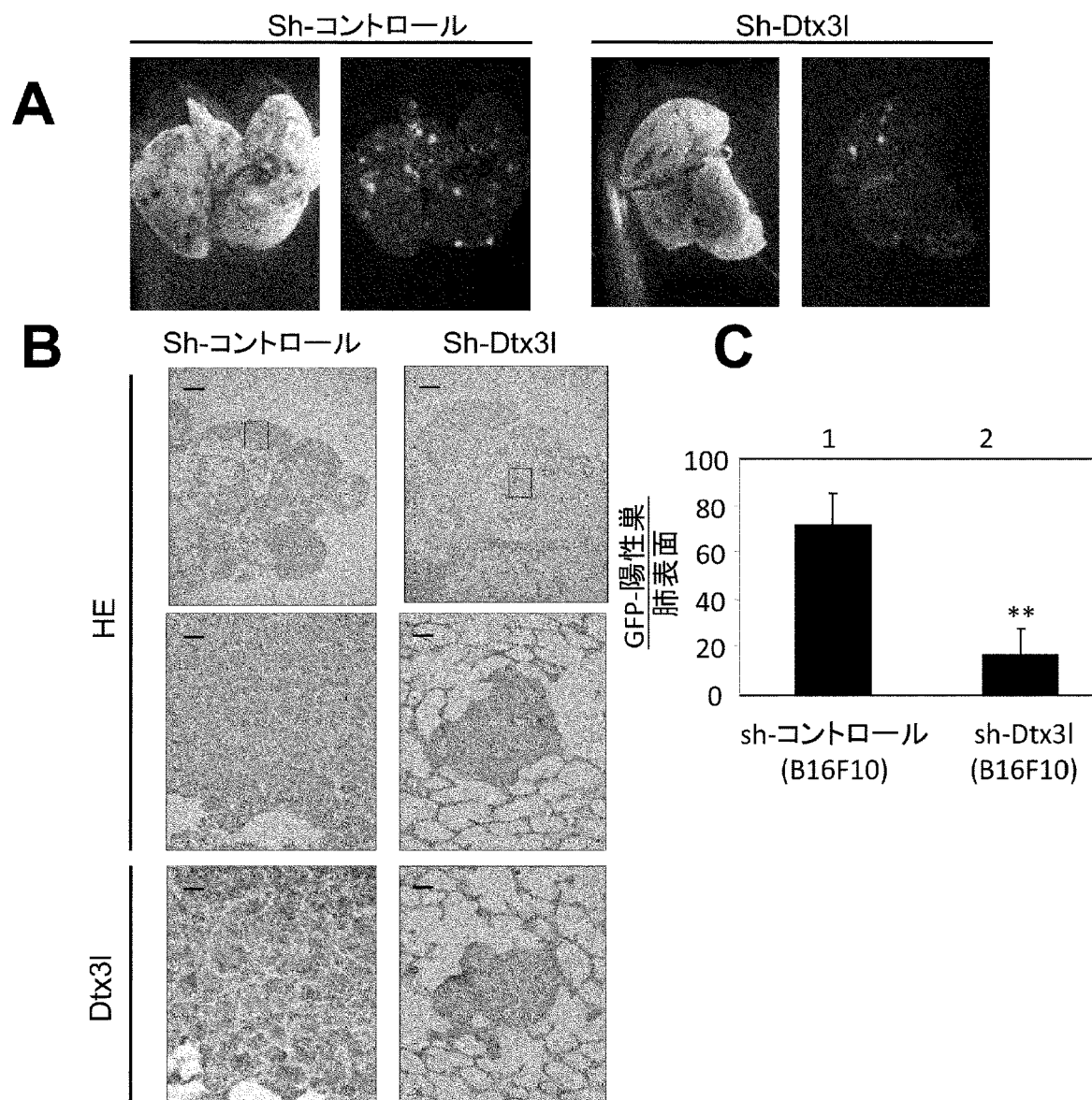
[図13]



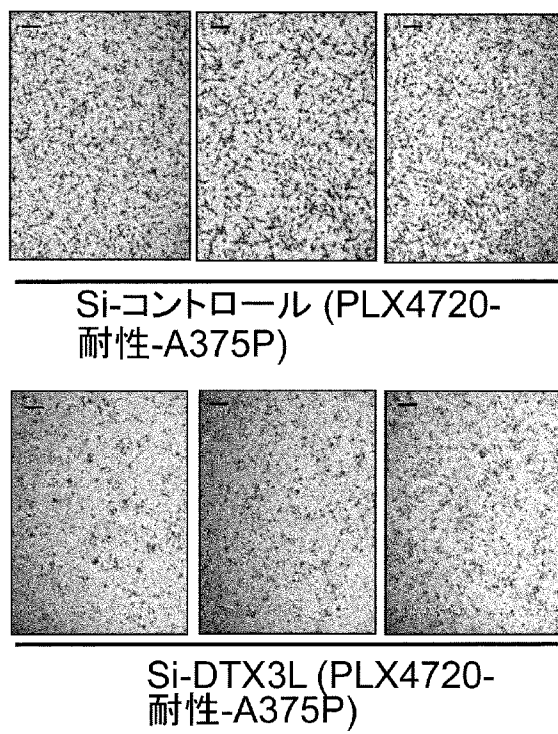
[図14]



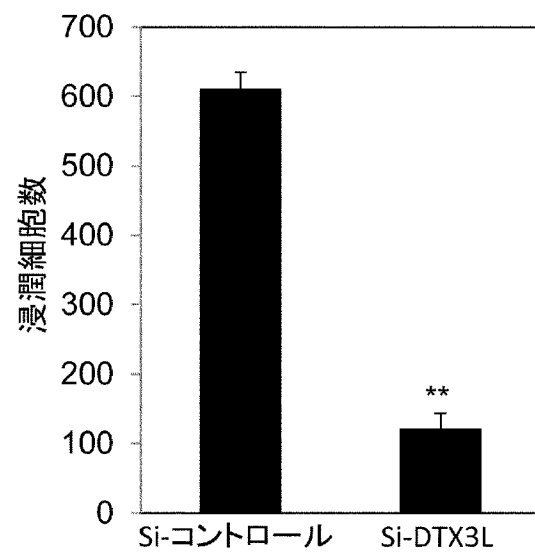
[図15]



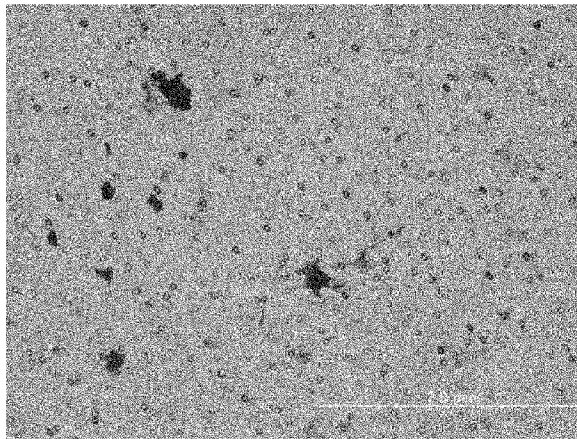
[図16]

**B**

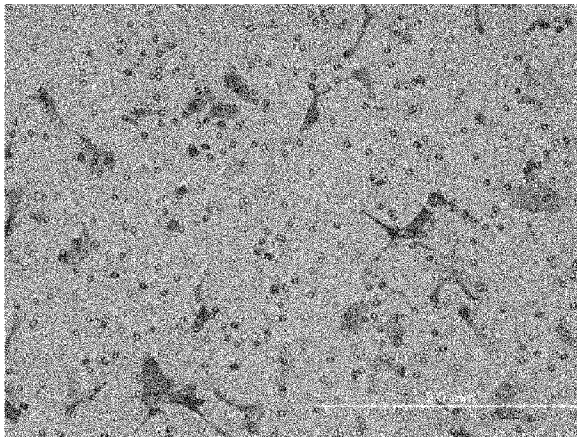
浸潤アッセイ



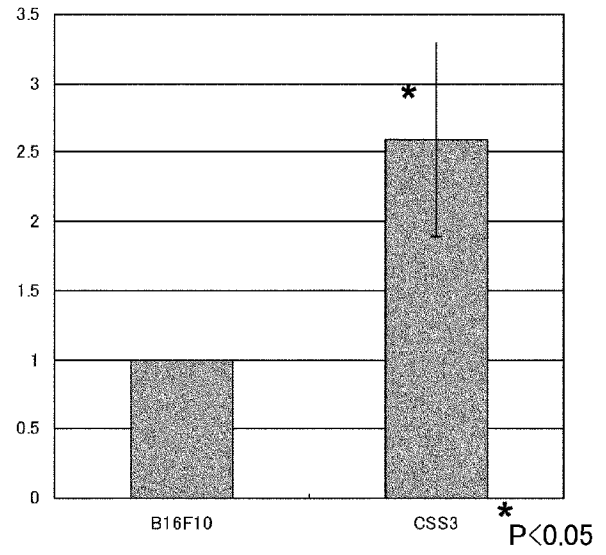
[図17]



B16 F10

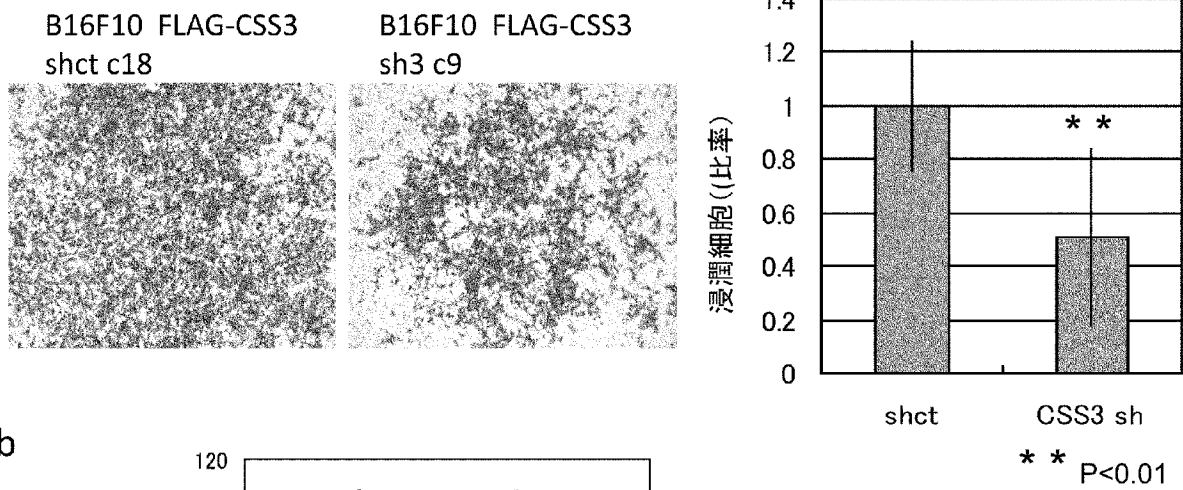


B16 F10 +C3

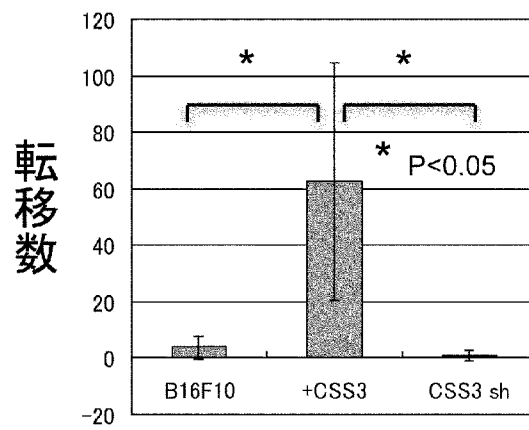


[図18]

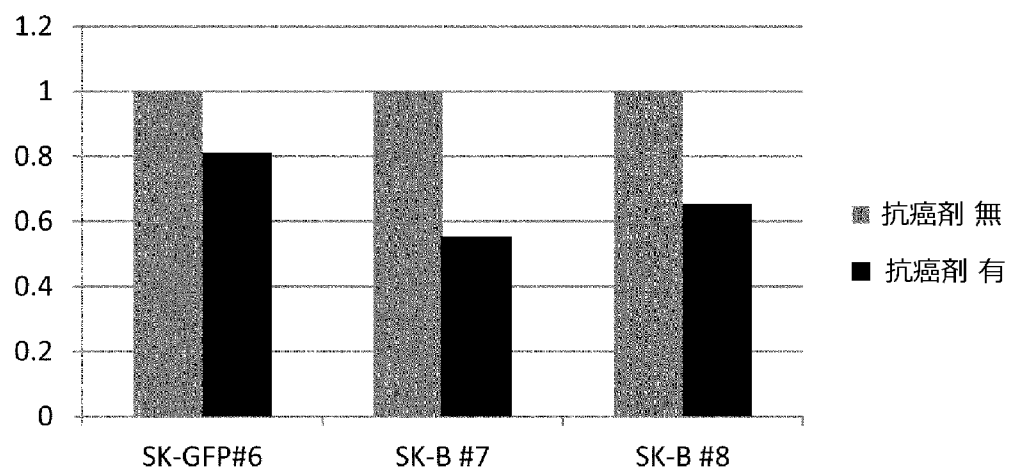
a



b



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
 A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
 A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/47(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, A61K31/7105, A61K31/713, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00,
 A61P17/00, A61P43/00, C07K14/47, C12N15/09, G01N33/50, G01N33/574

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 1996-2016
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN),
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	DANTE L. et al., Cloning and developmental expression of zebrafish pdzrn3., Int J Dev Biol., 2011, Vol.55, No.10-12, pp.989-993, particularly, abstract	1 2-12, 14, 15
Y A	YAJIMA I. et al., Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines., Am J Cancer Res., 2012, Vol.2, No.3, pp.322-329, particularly, abstract	1-10 11-15

☒ 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

"I" 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
 28 April 2016 (28.04.16)

Date of mailing of the international search report
 17 May 2016 (17.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
 Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054968

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2011-520451 A (Dermtech International), 21 July 2011 (21.07.2011), examples & US 2011/0160080 A1 examples & US 2014/0154684 A1 & US 2014/0256584 A1 & US 2015/0361509 A1 & WO 2009/140550 A2 & EP 2626437 A2 & AU 2009246180 A & CA 2724322 A & CN 102089444 A	1-10 11-15
Y A	WO 2013/192616 A1 (HTG MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.), 27 December 2013 (27.12.2013), examples & JP 2015-521483 A examples & US 2015/0176072 A1 & EP 2864500 A1 & CA 2875710 A & AU 2013277971 A & CN 104603291 A	1-10 11-15
X A	JP 2010-537629 A (Academisch Ziekenhuis bij de Universiteit van Amsterdam), 09 December 2010 (09.12.2010), paragraph [0183]; SEQ ID NO:41, 82 & US 2011/0002940 A1 & WO 2009/028945 A2 page 79; SEQ ID NO:41, 82 & EP 2191018 A	1 2-12, 14, 15
X A	YADA T. et al., Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization., J Biol Chem., 2003, Vol.278, No.41, pp.39711-39725, particularly, page 39712, right column, FIG. 1	1 2-12, 14, 15
X A	ISOGAI T et al., Accession No. AK312201, Definition: Homo sapiens cDNA, FLJ92489, Homo sapiens brain protein 44-like (BRP44L), mRNA., Database EMBL [online], 2008.05.24, < http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/sva/sva.pl?session=%2Ftmp%2FSESSION17092-1460710932-1&index=0&view=3109627573 > [retrieved on 2016-04-15]	1 2-10, 13-15
X A	WO 2013/148845 A1 (THE PROCTER & GAMBLE CO.), 03 October 2013 (03.10.2013), page 25, lines 26 to 29; page 41, line 13; example 1; fig. 2C & JP 2015-519880 A paragraphs [0082], [0129]; example 1; fig. 2C & US 2013/0259816 A1 & EP 2831271 A	1-10 13-15
P,X	THANG ND. et al., Deltex-3-like (DTX3L) stimulates metastasis of melanoma through FAK/PI3K/AKT but not MEK/ERK pathway., Oncotarget, 2015.06.10, Vol.6, No.16, pp.14290- 14299	1-12, 14, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054968

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAJIMA I et al., Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells., J Dermatol Sci., 2012, Vol.68, No.3, pp.172-178	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054968

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054968

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Document 1: YAJIMA I et al., Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells., J Dermatol Sci., 2012, Vol.68, No.3, pp.172-178

Claim 1 describes inventions respectively relating to melanoma-specific biomarkers respectively comprising four types of genes or proteins, and a special technical feature is found in an invention relating to "PDZRN3" which is the first-mentioned choice among the genes or proteins.

On the other hand, a melanoma-specific biomarker which shows a different expression pattern from that of a benign tumor and can become a target for a therapy is known before the priority date of the present application (see the section "abstract" in document 1). Therefore, it cannot be regarded that, among the inventions described in claim 1, a part relating to "PDZRN3" that is the first-mentioned choice and a part relating to the other three types of choices share a common special technical feature that makes a contribution over the prior art with each other.

Likewise, with regard to claims 2-15, it cannot be regarded that an invention relating to "PDZRN3" and inventions respectively relating to choices other than "PDZRN3" share a common technical feature that makes a contribution over the prior art with each other.

Among the inventions described in claims 1-15, inventions relating to choices other than "PDZRN3" do not belong to the same category as a category that includes all of features of the invention relating to "PDZRN3" that is the first-mentioned choice in claim 1.

Further, as a result of the search which has been carried out with respect to inventions to be searched on the basis of special technical features, the above-said inventions are not relevant to inventions on which it is substantially possible to carry out a search without an additional prior-art search and judgment, and there is no other reason for that it can be considered that it is efficient to carry out a search on said inventions together with the inventions to be searched.

Consequently, it is considered that the present application includes four inventions in total which respectively relate to four types of genes or proteins recited in claims 1-15.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(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 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, A61K31/7105, A61K31/713, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P17/00, A61P43/00, C07K14/47, C12N15/09, G01N33/50, G01N33/574

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

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 請求項の番号
X A	DANTE L. et al., Cloning and developmental expression of zebrafish pdzrn3., Int J Dev Biol., 2011, Vol.55, No.10-12, pp.989-993、特にアブストラクト部分	1 2-12, 14, 15
Y A	YAJIMA I. et al., Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines., Am J Cancer Res., 2012, Vol.2, No.3, pp.322-329、特にアブストラクト部分	1-10 11-15

☑ 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 | 「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 |
| 「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 | 「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 |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

28.04.2016

国際調査報告の発送日

17.05.2016

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)

長谷川 茜

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3228

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 請求項の番号
Y A	JP 2011-520451 A (ダームテック インターナショナル) 2011.07.21, 実施例 & US 2011/0160080 A1 実施例 & US 2014/0154684 A1 & US 2014/0256584 A1 & US 2015/0361509 A1 & WO 2009/140550 A2 & EP 2626437 A2 & AU 2009246180 A & CA 2724322 A & CN 102089444 A	1-10 11-15
Y A	WO 2013/192616 A1 (HTG MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 2013.12.27, 実施例 & JP 2015-521483 A 実施例 & US 2015/0176072 A1 & EP 2864500 A1 & CA 2875710 A & AU 2013277971 A & CN 104603291 A	1-10 11-15
X A	JP 2010-537629 A (アカデミシュ ジーケンハウス ビイ デ ユ ニヴェアズィテート ファン アムステルダム) 2010.12.09, 段落 [0183]、配列番号 41, 82 & US 2011/0002940 A1 & WO 2009/028945 A2 第 79 頁、配列番号 41, 82 & EP 2191018 A	1 2-12, 14, 15
X A	YADA T. et al., Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization., J Biol Chem., 2003, Vol. 278, No. 41, pp. 39711-39725、特に第 39712 頁右欄、FIG. 1	1 2-12, 14, 15
X A	ISOGAI T et al., Accession No. AK312201, Definition: Homo sapiens cDNA, FLJ92489, Homo sapiens brain protein 44-like (BRP44L), mRNA., Database EMBL [online], 2008.05.24, < http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/sva/sva.pl?session=%2Ftmp%2FSESSSION17092-1460710932-1&index=0&view=3109627573 > [retrieved on 2016-04-15]	1 2-10, 13-15
X A	WO 2013/148845 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY) 2013.10.03, 第 25 頁第 26-29 行、第 41 頁第 13 行、実施例 1、図 2C & JP 2015-519880 A 段落[0082], [0129]、実施例 1、図 2C & US 2013/0259816 A1 & EP 2831271 A	1-10 13-15
P X	THANG ND. et al., Deltex-3-like (DTX3L) stimulates metastasis of melanoma through FAK/PI3K/AKT but not MEK/ERK pathway., Oncotarget, 2015.06.10, Vol. 6, No. 16, pp. 14290-14299	1-12, 14, 15
A	YAJIMA I et al., Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells., J Dermatol Sci., 2012, Vol. 68, No. 3, pp. 172-178	1-15

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第 III 欄の続き)

文献 1: YAJIMA I et al., Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells., J Dermatol Sci., 2012, Vol.68, No.3, pp.172-178

請求項 1 には 4 種の遺伝子あるいはタンパク質からなるメラノーマ特異的バイオマーカーに関する発明が記載され、それらのうち最初の選択肢である「PDZRN3」に関する発明に特別な技術的特徴が発見された。

一方、良性腫瘍とは異なる発現パターンを示し、治療の標的にもなりうるメラノーマ特異的バイオマーカーは、本願優先日前に公知であるから（文献 1 のアブストラクト部分参照）、請求項 1 に記載された発明のうち、最初の選択肢である「PDZRN3」に関する部分と、残り 3 種の各遺伝子あるいはタンパク質に関する部分との間に、先行技術に対して貢献する共通の特別な技術的特徴が存在するとは認められない。

請求項 2-15 のうち、「PDZRN3」以外に関する発明についても同様に、「PDZRN3」との間に、先行技術に対し貢献する技術的特徴を共有するものとは認められない。

請求項 1-15 のうち、「PDZRN3」以外に関する発明は、請求項 1 の最初の選択肢である「PDZRN3」に関する発明の発明特定事項をすべて含む同一カテゴリーの発明ではない。そして、特別な技術的特徴に基づいて審査対象とされた発明を審査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなく審査を行うことが可能である発明でなく、当該発明とまとめて審査を行うことが効率的であるといえる他の事情もない。

よって、この出願には、請求項 1-15 に記載された 4 種の遺伝子あるいはタンパク質に係る計 4 の発明が包含されているといえる。