

(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
2012年3月22日(22.03.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/036094 A1

- (51) 国際特許分類:

<i>C07K 7/06</i> (2006.01)	<i>C07K 16/32</i> (2006.01)
<i>C07K 7/08</i> (2006.01)	<i>C07K 16/40</i> (2006.01)
<i>C07K 14/47</i> (2006.01)	<i>C12N 9/14</i> (2006.01)
<i>C07K 14/705</i> (2006.01)	<i>C12N 9/16</i> (2006.01)
<i>C07K 14/78</i> (2006.01)	<i>C12N 9/26</i> (2006.01)
<i>C07K 14/82</i> (2006.01)	<i>C12N 9/64</i> (2006.01)
<i>C07K 16/18</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/02</i> (2006.01)
<i>C07K 16/28</i> (2006.01)	<i>G01N 33/574</i> (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/070635
- (22) 国際出願日: 2011年9月9日(09.09.2011)
- (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 2010-209932 2010年9月17日(17.09.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 学校法人東京医科大学(TOKYO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1608402 東京都新宿区新宿6丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 成松 久 (NARIMATSU Hisashi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 梶谷内晶(TOGAYACHI Akira) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 池原譲(IKEHARA Yuzuru) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 梶裕之(KAJI Hiroyuki) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 久野敦(KUNO Atsushi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 大倉 隆司(OKURA Takashi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば

市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 松崎 英樹(MATSUZAKI Hideki) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 平尾嘉利(HIRAO Yoshitoshi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 岩城隼(IWAKI Jun) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 安部 美奈子(ABE Minako) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 野村 将春(NOMURA Masaharu) [JP/JP]; 〒1608402 東京都新宿区新宿6丁目1番1号 学校法人東京医科大学内 Tokyo (JP). 野口 雅之(NOGUCHI Masayuki) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台1-1-1 国立大学法人筑波大学大学院人間総合科学研究科内 Ibaraki (JP).

- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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 (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: LUNG CANCER IDENTIFICATION MARKER

(54) 発明の名称: 肺癌鑑別マーカー

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of developing and providing a lung cancer identification marker capable of simply determining the presence of lung cancer at a high sensitivity without relying only on the protein expression amount in a cancer patient and a healthy person. Moreover, the present invention addresses the problem of developing and providing a sugar chain marker capable of determining the histological type of lung cancer. Among the serum glycoproteins, a group of glycopeptides and glycoproteins in which the sugar chain structure is specifically changed in a culture supernatant of lung cancer cells is identified and is provided as the lung cancer identification marker.

(57) 要約: 癌患者と健常者におけるタンパク質の発現量の多寡にのみ依存することなく、簡便で高感度に肺癌の罹患を判定できる肺癌鑑別マーカーの開発とその提供を課題とする。さらに、本願発明は、肺癌の組織型を区別できる糖鎖マーカーの開発とその提供を課題とする。血清糖タンパク質のうち、肺癌培養細胞上清において糖鎖構造が特異的に変化した糖ペプチド及び糖タンパク質群を同定し、それを肺癌鑑別マーカーとして提供する。



WO 2012/036094 A1

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))

明 細 書

発明の名称：肺癌鑑別マーカー

技術分野

[0001] 本願発明は、糖鎖を有する肺癌鑑別マーカー糖タンパク質又はその糖タンパク質断片、及びそれを用いた肺癌の罹患又は肺癌の組織型を判定する方法に関する。

背景技術

[0002] 肺癌は、難治性癌の代表例であり、2009年の日本における男性癌死の第一位、また女性癌死の第二位を占めている。肺癌は、約10%を占める小細胞癌（肺小細胞癌）と約90%を占める非小細胞癌に大別され、非小細胞癌は、さらに腺癌（肺腺癌）（60%）、扁平上皮癌（肺扁平上皮癌）（25%）及び大細胞癌（肺大細胞癌）（5%）に分類される。

[0003] 肺小細胞癌は、非常に悪性度の高い癌であるため、早期においても転移傾向が強く、これまでの症例から発見時には既に全身へと転移している可能性が高い。したがって、通常はリンパや他の組織への転移が確認できなくても、非手術療法が選択されることが多い。一方でこの癌は、化学療法や放射線に対する感受性が高いことから、非手術療法のうち化学療法が治療の中心となる。

[0004] これに対して、肺癌の大部分を占める肺非小細胞癌は、化学療法や放射線に対する感受性が低いため、治療には比較的早期に発見し、手術療法によって病巣を取り除くことが重要となる。

[0005] 肺癌の検査は、その検査目的によって、（1）肺癌に罹患している可能性があるか否かを検査する肺癌罹患判定、（2）罹患の可能性がある場合、それが肺癌であることを確認し、結論付ける肺癌罹患確定、（3）肺癌が確定した場合、その癌組織型及び進行度がどの程度であるかを検査する肺癌進行度決定の3つに大別することができる。

[0006] これらの検査では、胸部X線検査やCT検査による肺野異常影の確認を行い、

続いて、気管支鏡検査やバイオプシー等を用いた生検サンプルの病理診断によって癌種の確定及び進行度を総合的に判定していく方法が、一般的には採用されている。しかし、小細胞癌と非小細胞癌が混在する症例や境界領域の癌においては、病理医の間でも鑑別結果が分かれるケースもあり、未だに正確な確定診断を行うには至っていない。

[0007] また、近年では、腫瘍マーカーが癌の予後診断等に用いられている。腫瘍マーカーとは、癌細胞が産生する物質又は癌細胞に反応して細胞が産生する物質である。血清中に包含される当該腫瘍マーカーの量は、腫瘍量や組織型を反映することから、腫瘍マーカーは、癌判定等の鑑別子となり得、診断の補助、組織型や進行度の推測、治療の効果判定や再発予測、予後の推定等に利用することができる。肺癌においても、現在、CEA、CYFRA、NSE、ProGRP、SCC及びSLX等のいくつかの腫瘍マーカーが知られている（非特許文献1～3）。しかし、いずれの腫瘍マーカーも、健常者と肺癌患者における血液中又は組織中のタンパク質の発現量の差異、すなわち、発現の多寡に基づくものであり、通常、正常細胞でも発現しているため、肺癌特異性は低い。それ故、得られた結果の信頼性や検出感度も低いという問題を包含していた。さらに、肺癌がいずれの組織型に属するのかを判定する有用な肺癌マーカーは、これまで知られていなかった。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Molina R, et al., (2005) Anticancer Res 25: 1773-1778.
非特許文献2：Mizuguchi S, et al., (2007) Ann Thorac Surg 83: 216-221.
非特許文献3：Holdenrieder S, et al., (2008) Clin Cancer Res 14: 7813-7821.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本願発明は、癌患者と健常者におけるタンパク質の発現量の多寡にのみ依

存することなく、簡便で高感度に肺癌の罹患を判定できる肺癌鑑別マーカ-の開発を課題とする。より具体的には、肺癌罹患時の指標となる肺癌特異的な鑑別マーカ-糖タンパク質及びその糖タンパク質断片の開発を課題とする。

[0010] また、本願発明は、肺癌における組織型を鑑別できる肺癌鑑別マーカ-の開発も課題とする。

[0011] さらに、本願発明は、組織染色において肺癌、さらにはその組織型を鑑別する肺癌鑑別用糖鎖プローブの開発も課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 細胞から分泌されるタンパク質上の糖鎖の組成及び構造多様性は、数百もの糖鎖関連遺伝子の発現バランスに基づき制御され、細胞の分化、癌の進展の程度に応じて変動する。この糖鎖構造が変化する糖タンパク質は、腫瘍マーカ-を含む疾患病態指標マーカ-として利用できる。近年、このようなプロテオミクスを基盤とした糖鎖関連腫瘍マーカ-の探索が盛んに進められている。前記マーカ-探索のパイプラインでは、まず、フェーズ1として、大規模解析により候補分子が同定される。続いて、フェーズ2として、定量的解析により候補分子が検証され、その候補が絞り込まれる。さらに、フェーズ3として、バリデーション試験がなされる。

[0013] 本発明者らは、前記課題を解決するために、上記マーカ-探索パイプラインをベースにしたグライコプロテオミクスを利用して、肺癌鑑別マーカ-の探索を行った。その結果、血清糖タンパク質のうち、肺癌培養細胞上清において検出された肺癌特異的な構造を有する新規の糖タンパク質群又は糖ペプチド群を同定することができた。また、これらの糖タンパク質群又は糖ペプチド群を用いて、肺癌の罹患及び肺癌の組織型を鑑別できることが明らかとなった。本発明は、これらの知見に基づくものであって、以下を提供する。

[0014] (1) 表1又は表2に記載の肺癌鑑別マーカ-糖タンパク質であって、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された前記糖タンパク質。

[表1]

タンパク質 #	タンパク質名	g(I/D)	小細胞糖		膜糖		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
1	acid alpha-glucosidase	g 119393891, g 119393893	O	X	X	X	390	QVVENMTR	1
							470	GVFITNETGQPLIGK	2
							882	GAYTQVIFLARNTIVNELVR	3
2	biotinidase	g 4557373	X	X	O	X	119	DVQIVFPEDGIIHGFNFR	4
							150	FNDTEVLQR	5
							349	SHLIQVAKNPYGLIGAEVATGETDFSHSK	6
3	cathepsin D	g 4503143	X	X	O	X	349	NPVGLGAENATGETDPSHKKFLK	7
							263	YYKGSLSYLVNTR	8
4	cathepsin L1	g 22202819, g 4503155	O	X	X	X	221	YNPKYSVANDTGFVDIPKQEK	9
							221	YSVANDTGFVDIPK	10
5	cathepsin L2	g 23110960	O	X	X	X	221	YRPENSVANDTGFVAPGKEK	11
							292	NLDHGVLVVGYGFEGANSNSK	12
6	cell adhesion molecule 4	g 21686977	O	X	X	X	67	QTLFFNGTR	13
							86	SNISQILAFLLYNDQPPQPSK	14
7	deoxyribonuclease II, lysosomal	g 47132557 g 47132551 g 16933542 g 47132555 g 47132553 g 47132549 g 47132547	O	X	X	X	430	GGNSGALCHFPFLYNNHNYDCTSEGR	15
							628	DCCIVDDITYNVNDTFHK	16
							542	RHEEGHMLNCTCFGGGR	17
							542	HEEGHMLNCTCFGGGR	18
							1007	ESKPLTAQQTTKLDAPTNLQFVNETDSTVLVR	19
							1007	LDAPTNLQFVNETDSTVLVR	20
							1291	WTPLNSSIIIGYR	21
8	fibronectin 1	g 47132557 g 47132551 g 16933542 g 47132555 g 47132553 g 47132549 g 47132547	X	X	O	X	44	ADVGEEAAGTSINHSQAVLQR	22
							61	QGMASDVVLR	23
							307	FFDVNGSAFLPPR	24
9	galectin-3-binding protein-like	g 122937327	O	X	X	X	44	ADVGEEAAGTSINHSQAVLQR	22
							61	QGMASDVVLR	23

[0015]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(D)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
10	insulin-like growth factor 2 receptor	gi 119964726	O	X	X	X	112	SLLEFNTTVSCDQGGTNRH	25
							435	MSVINFECKNTAGNDGK	26
							582	TNITLVCKPGDLESAPVLR	27
							2085	GYPCGGNKTAASSVIELTCTK	28
11	insulin-like growth factor binding protein 3	gi 62243248 (isoform a), gi 62243068 (isoform b)	X	X	O	X	116	GLCVNASAVSR	29
							205	YKVDYESQSDTQNFSSSKR	30
12	insulin-like growth factor binding protein-like 1	gi 56090548	X	O	X	X	166	DGPFCEFAPVVVPPRRSVHNTGAGVGLSCEVR	31
							166	SVHNTVGAQVGLSCEVR	32
13	integral membrane protein 1	gi 22749415	X	O	X	X	548	TILVDNNTWNTHTISR	33
							433	ILTADNQTVMVQGSTAYLLCK	34
14	L1 cell adhesion molecule	gi 4557707 (isoform 1), gi 13436353 (isoform 2)	X	X	O	O	671	WYSLGKVPQAGQTSTLTK	35
							777	VQWRPQGTIRGPWQEQIVSDPFLVSNSTSTFVPEIK	36
							979	THNLTDLSPHLR	37
15	lysosomal acid phosphatase 2	gi 4557010	O	X	X	X	133	FNPNIWQPIPVHTVPITEDR	38
							167	YEQLQNETRQTPEYQNESSR	39
							177	QTPEYQNESSR	40
16	melanoma cell adhesion molecule	gi 71274107	O	X	X	X	56	CGLSQSQGNLSHVDWFSVHK	41
							418	CVASYPSPGLNR	42
17	melanoma-associated antigen p97	gi 134244281 (isoform 1), gi 16163666 (isoform 2)	O	O	X	X	38	WCATSDPEQHKCGNMSEAFR	43
							515	DCDVLTAVSEFFNASCVPVNNPK	44
18	neogenin homolog 1	gi 4505375	X	O	X	X	73	GSSVILNCSAYSEPSPK	45
							210	VIKLPSGMLVISNATEGDGGLYR	46
19	neural cell adhesion molecule 1	gi 94420689 (isoform 1), gi 115529482 (isoform 2), gi 115529478 (isoform 3)	O	X	X	X	470	TPASDPHGDNLTVSVFYTK	47
							347	TSTRNLSSEEK	48
							449	DGQLLPSSNYSNIK	49
							478	IYNTPSASYLEVTPDSENDGNYNCTAVNR	50

[0016]

タンパク質 #	タンパク質名	g(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
20	neuronal pentraxin II	gi 28195384	0	X	X	X	148 ANVSNAGLPGDFR	51	
21	neuronal pentraxin receptor	gi 17402888	X	0	X	X	189 VAELEDEKSLLNHETSAGR	52	
22	ribonuclease T2	gi 5231228	X	X	0	X	42 ALPGGADNASVAGAAASPGPQR	53	
23	secretogranin III	gi 19557645	0	0	X	X	106 AYWPDVIHSFPNR	54	
24	sel-1 suppressor of lin-12-like	gi 19923669	X	0	X	X	212 QDQLQNCTEPGEQPSPK	55	
25	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2	gi 7662036	0	0	X	X	68 KTYPPENKPGQSNYSFVDNLLIK	56	
26	Thy-1 cell surface antigen	gi 19923362	0	0	X	X	346 MKLEKNATDNISK	57	
27	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	gi 11545918	X	X	0	X	608 EASVGENETYPR	58	
28	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	gi 4557695 (isoform 1), gi 148005039 (isoform 2)	0	0	X	X	225 LRDWFQLLHENSISKQNGSASSVAGPAGLDK	59	
							225 QNGSASSVAGPAGLDK	60	
27	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	gi 11545918	X	X	0	X	42 LDCRHE ^{NT} SSSPIQYEFSLTR	61	
							78 GRADDCALPYLGAICYCDLFCNR	62	
							161 AINQGN ^Y GWAGNHSFAFWGMTLDEGIR	63	
							130 SLYGKEDNDTLVLR	64	
28	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	gi 4557695 (isoform 1), gi 148005039 (isoform 2)	0	0	X	X	367 TFDK ^W EDYPKSE ^N ESNIR	65	
							463 CSASVLPVDVQTLN ^{SS} GGPPFGK	66	
							486 LYVQSSIDSSAFK ^H NGTVECK	67	

[0017]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.		
			AAL	ConA	AAL	ConA					
29	laminin alpha 5	gi 21264602					95	LVGGPVAGDPNQITIR	68		
							921	LNLTPDLFWLFR	69		
							1330	VWQGHANASFCPHGYGCR	70		
							1529	TIPDCLLCQPTFGCHPLVGGEECNCSGPGIQELDPTCDTDSGQCK	71		
							2019	CEICAPGFYGNALLPGNCTR	72		
							2196	GINASSMAWAR	73		
							2209	LHRLNASIADLOSQR	74		
						X	O	O	2303	TLSELMSTGHLGLANASAPSGEQLLR	75
									2423	DNATLQATLHAAR	76
									2501	LVEAAEAHAQQLGQLALNLSHILDVNDRLTOR	77
30	laminin, beta 1	gi 4504951					2568	QGLVDRQQLLANSTALEEAMLEQQIR	78		
							2707	GVHINASLALSISGR	79		
							3107	LNTTGVSACTADLLVGR	80		
							3287	VFDLQQNLGSMVNVSTGCAPALQAQIPGLGPR	81		
							1041	KVCNLYLGTVQEHCHNGSDCCQDK	82		
							1279	LSDTTSQSNSTAK	83		
						X	O	O	1487	QSAEDILLKTNATK	84
						X			1643	AIKQADEDIQGTQNLTSIESETAASEETLFNASQR	85
									64	GKEGHFYNISEVK	86
									143	MKSNVSCQASVSR	87
31	phospholipid transfer protein	gi 5453914 gi 33355541					143	VSNVSCQASVSR	88		
							245	GAFFPLTERNWSLPNR	89		
							398	FRIYSNHSALESALIPLOAPLK	90		
							193	GAFFPLTERNWSLPNR	91		

[表2]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(D)	小細胞癌		肺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
1	activated leukocyte cell adhesion molecule	gi168163411					167	KLGDCESDSYPDGNITWYR	92
			X	O	X	X	265	NAIKEGDNITLK	93
							265	EGDNITLK	94
							361	NATVVMKDNIR	95
2	alpha 2 type V collagen preproprotein	gi189363017	X	X	X	O	480	YYSKIISPEENVTLTCTAENQLER	96
							1400	FASQNTIYICK	97
3	amilonide binding protein 1	gi173486661	X	X	O	O	538	LENITNPWSPR	98
4	aspartate beta-hydroxylase	gi14589866 (isoform a)	X	X	X	O	452	LIVQLFPNDTSLKNDLGVGYLLIGDNDNAKK	99
			O	O	X	X	54	DFRYNLSEVLQGG	100
6	beta-1,3-galactosyl-C-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	gi148277029, gi148277031, gi148277033, gi148277035, gi121614523					58	HLELAGENPSSDINCTK	101
			X	X	O	X	95	WTPDDYINMTSDCSSFIK	102
							142	AATSRPERVWPDGVPPVGGNFTGSQR	103
			X	X	O	O	363	ISYTPGEKILNFTSLDLYR	104
7	bone morphogenetic protein 1	gi14502421					699	LNGSITSPGWPK	105
							98	IHGQELPFEAVVLNKTSGEGR	106
							374	NLTDQFTTMMWK	107
			O	X	X	X	716	QECLELNHSELHQR	108
8	calsyntenin 2	gi11545861					729	HLDATNSTAGYSYGVGMSR	109
							172	LINTDVYLLPSINPDGFERAR	110
							522	RFANEYPNITR	111
			X	O	X	X	978	HIWSLEISNKPNSVEPEPKIR	112
9	carboxypeptidase D	gi122202611					1070	GKDLDTFTNIVASQFETK	113

[0018]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
10	CD47 antigen	gi 4502673 (isoform 1), gi 38683836 (isoform 2), gi 68223315 (isoform 3)	X	O	X	X	73	GRDIYFDGALNK	114
							73	DIYTFDGA ^N LK ^N STVPTDFSSAK	115
							111	MDKSDAVSHTG ^N YTCVETL ^R	116
11	CD63 antigen	gi 4502679 (isoform A), gi 91199546 (isoform B)	X	O	X	X	130	QQMENYPK ^N NHTASIL ^R	117
							130	N ^N HTASIL ^R	118
							172	NRVPSDCI ^N TVGCGINF ^{EK}	119
12	CD97 antigen	gi 17978491 (isoform 1), gi 17978489 (isoform 2), gi 68508955 (isoform 3)					108	TFK ^N ESENTCQDVDECQQN ^{PR}	120
							463	RLSAVNSIFLSH ^N NTK	121
			X	X	O	X	360	RLSAVNSIFLSH ^N NTK	122
							108	TFK ^N ESENTCQDVDECQQN ^{PR}	123
13	complement factor I	gi 119392081					404	RLSAVNSIFLSH ^N NTK	124
							103	FLN ^N GTCTAEGK	125
							177	FKLS ^D LSIN ^S TECL ^H VH ^{CR}	126
			X	X	O	X	177	LS ^D L ^S IN ^S TECL ^H VH ^{CR}	127
							464	SIPACVPWSPYLFQ ^N DT ^C IVSGW ^{GR}	128
							494	LIS ^N CSK ^F YGN ^R	129
							84	YSVEKFN ^N CTND ^M FL ^{FK}	130
			X	X	O	O	84	F ^N NCTND ^M FL ^E K ^{ESR}	131
							137	LDDCDFQ ^T N ^H TL ^K	132
			15	desmocollin 2	gi 13436364	X	X	X	O
							629	AIND ^T AA ^R	134
16	epithelial V-like antigen 1	gi 21536337	X	X	X	O	39	VLEAVNGTDAR	135
							118	LQFD ^N NGTYTCQ ^{VK}	136
17	FAT tumor suppressor 1	gi 66346693	X	X			333	AIGGIDWDSHPFG ^N LT ^{LQAK}	137
							998	QVY ^N LT ^{VR}	138
							1551	IVNVSDTNDHAPW ^F TASSY ^K	139
						3716	QLLHK ^N SSVTDIEEIG ^{VR}	140	

[0019]

タンパク質 #	タンパク質名	g(I/D)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
18	fibrinogen-like 2	gi 5730075	X	X	O	O	263	LDGSTNFR	141
							336	LHVGNYGTAGDALR	142
19	Fraser syndrome 1	gi 108773804	X	X	O	O	1107	IHTPSLHVNGSILPIGSIKPLDFSLLNVDQDEGR	143
							1503	IVYNTLPLHPNGGIEHR	144
							1776	ISGSEVEELSEVSNFTMEDINNKK	145
							2562	YTSYVNSEK	146
147							2667	VINDTEDEPTLEFDKK	147
20	growth differentiation factor 15	gi 4758936	X	X	X	O	70	LRANQSWEDSNTDLVPAPAVR	148
							70	ANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPVPR	149
21	immunoglobulin superfamily, member 4D isoform 1	gi 148664190 (isoform 1), gi 148664211 (isoform 2)	O	X	X	X	101	FQLLNFSSSELK	150
							113	VSLTNVISDEGR	151
22	integrin, alpha 1	gi 31657142	X	X	X	O	418	NITFNVESTK	152
							883	DSCESNHNITCK	153
23	intercellular adhesion molecule 1	gi 4557878	X	X	O	X	1113	SENASLVSSNQK	154
							202	TELDLRPQGLELFENITSAFYQLQTFVLPATPPQLVSPR	155
24	interleukin 6 receptor	gi 4504673	X	X	X	O	267	LNPTVYGNDSFSK	156
							93	SVQLHDSGNYCYR	157
25	latent transforming growth factor beta binding protein 3	gi 18497288	X	X	O	X	89	DSCQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFR	158
							349	RLNSTHCQDINECAMPGVCR	159
							845	DRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYR	160
26	mucin 16	gi 83367077	X	X	O	X	12586	NTSVGLLYSGCR	161
							13193	KFNITESVLQGLKPLFK	162
							14363	NIEDALNQLFRNSSIK	163
							14417	NGTCLQNFILDR	164
27	netrin 4	gi 93204871	X	X	O	X	56	KLWADTTGGQNAATELYCFYSENTDLTCRQPK	165
							163	YFATNCSATFGLGDDVKK	166

[0020]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
28	neuronal cell adhesion molecule isoform A	gi 1158226					223	FNHTQTIQQK	167
			X	O	X	X	245, 251	VISVDELNDTIAANLSDTEFYGAK	168
							276	ERPPTFLTPEGVNASNKEELR	169
							314	EDGMLPKNR	170
29	olfactomedin related ER localized protein	gi 17136143 gi 5453547					507	GSALHEDIYVLHENGLEIPVAKQKSTGYTCVAR	171
							858	VNVVNSTLAEVHWDPVPLK	172
							85	QLLEKVVQNMSSQIEVLDR	173
							85	VQNMSSQIEVLDRR	174
						X	270	SMVDFMNTDNFTSHR	175
30	osteoprotegerin	gi 148743793					376	LDPVSLQLTQTWNTSYPKR	176
							85	QLLEKVVQNMSSQIEVLDR	177
							98	ELQYVVKQEQNR	178
31	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)	gi 4506031	X	X	O	O	152	CPDGFSSNETSSKAPCR	179
							178	GNATHDNICSGNSESTQK	180
							289	HIGHANLTFEQLR	181
32	peptidylprolyl isomerase B	gi 4758950	X	X	X	X	212	GINESYKK	182
							232	FLNDSIVDPVDSEWFGFYR	183
			X	X	X	X	148	HYGFGWVSMANAGKOTNGSQFFITTVK	184
33	plasminogen activator, tissue type I	gi 4505861					152	GTWSTAESGAECTWVNSALAQKPYSGR	185
			X	X	O	O	219	AGKYSSEFCSTPACSEGNSDCYFGNGSAYR	186
							219	YSSEFCSTPACSEGNSDCYFGNGSAYR	187
							483	CTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTR	188
34	prion protein	gi 122056623, gi 122056625, gi 122056628, gi 34335270, gi 4506113					197	QHTVTTTTKGENFTETDVK	189
			X	X	X	O			
							197	GENFTETDVK	190

[0021]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		精練付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
35	prostaglandin H2 D-isomerase	gi 32171249	X	X	X	O	51	WFSAGLASNSSWLR	191
							78	SWAPATDGGNLITSTFLR	192
36	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	gi 109633041 gi 109633039	O	X	X	X	721	KVEVEPLNSTAVHYVWK	193
							966	DINSQQELQNIITDTRFTLTGLKPDITYDIK	194
							721	KVEVEPLNSTAVHYVWK	195
37	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	gi 110735404 gi 110735406 gi 110735402	X	X	O	X	957	DINSQQELQNIITDTRFTLTGLKPDITYDIK	196
							410	QLTLQWEPLGYIVTR	197
38	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	gi 6912612 gi 42491358	O	O	X	X	177	LLANSSMLGEGQVLR	198
							303	IVSPEPGGAVGPNLTCR	199
							247	LLANSSMLGEGQVLR	200
							373	IVSPEPGGAVGPNLTCR	201
39	seizure related 6 homolog (mouse)-like	gi 32261332	O	X	X	328	SWNLSDGELLSIR	202	
40	seizure related 6 homolog	gi 148839280 gi 148839346	X	O	X	X	399,422	HLTCLNATQPFWDSKEPVCIAACGGVIRNATTGR	203
							436,440	IVSPFGPNYSNLI T CHWLLLEAPEGQR	204
41	serine carboxypeptidase vitellogenic-like	gi 83641874, gi 83641876	O	O	X	X	346	QAIHVGNQTFNDGTIVEK	205
							191,198	LHHLDHIN T HHFINDSITPSEK	206
42	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	gi 55741750	X	X	O	X	218	GEPSNEPSTETNK T QEQSDVKLPK	207
							339	KDLNEDDHHHECL I NV T QLLK	208

- [0023] (2) 前記糖鎖がフコース修飾を伴う糖鎖、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型二本鎖糖鎖、キチン、ポリラクトサミン及び β 1-3ガラクトースエピトープからなる群より選択される一以上の糖鎖である、(1)に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [0024] (3) 肺小細胞癌又は肺腺癌の鑑別用である、(2)に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [0025] (4) 肺小細胞癌鑑別用であって、前記糖タンパク質が神経細胞接着分子(NCAM1)、セクレトグラニンIII及びインスリン様成長因子結合タンパク質-L1(IGFBP-L1)からなる群より選択される一以上の糖タンパク質である、(3)に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [0026] (5) 肺腺癌鑑別用であって、前記糖タンパク質がフィブロネクチン1である、(3)に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [0027] (6) 糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む(1)～(5)のいずれかに記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の断片。
- [0028] (7) 被験者より採取された試料から、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された表1又は表2に記載の一以上の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質、及び/又は糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む一以上の前記糖タンパク質の断片を検出することによって、該被験者が肺癌に罹患していると判定する、肺癌罹患判定方法。
- [0029] (8) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び/又はその糖タンパク質の断片を、前記糖鎖に結合する一以上の糖鎖プローブを用いて検出する、(7)に記載の方法。
- [0030] (9) 前記糖鎖プローブがフコース修飾を伴う糖鎖、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型二本鎖糖鎖、キチン、ポリラクトサミン又は β 1-3ガラクトースエピトープに結合する、(8)に記載の方法。
- [0031] (10) 前記糖鎖プローブがレクチン、抗体又はファージ抗体である、(

- 8) 又は (9) に記載の方法。
- [0032] (11) 前記レクチンがAAL、ConA、PWM又はPNAである、(10) に記載の方法。
- [0033] (12) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質が神経細胞接着分子 (NCAM1) であり、AALとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定する、(11) に記載の方法。
- [0034] (13) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がセクレトグラニンIIIであり、AAL及び／又はConAとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定する、(11) に記載の方法。
- [0035] (14) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がインスリン様成長因子結合タンパク質-L1 (IGFBP-L1) であり、ConA及び／又はPWMとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定する、(11) に記載の方法。
- [0036] (15) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がフィブロネクチン1であり、AAL及び／又はPNAとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が腺癌であることを判定する、(11) に記載の方法。
- [0037] (16) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び／又はその糖タンパク質の断片の糖鎖に対する前記糖鎖プローブの結合結果及び表1又は表2に記載の前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び／又はその糖タンパク質の断片の前記糖鎖プローブに対する結合態様に基づいて、肺癌の組織型が小細胞癌又は腺癌であることを判定する、(8) ~ (11) のいずれかに記載の方法。
- [0038] (17) 前記試料が体液、細胞又は肺洗浄液である、(7) ~ (16) のいずれかに記載の方法。
- [0039] (18) 前記体液が、血液 (血清、血漿及び間質液を含む)、リンパ液、細胞の抽出液、痰又は胸水である、(17) に記載の方法。
- [0040] (19) 表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された表1又は表2に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質、及び／又は糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少な

くとも一つ含む前記糖タンパク質断片に結合して、肺癌を鑑別する組織染色用肺癌細胞鑑別抗体。

[0041] (20) 肺癌細胞の組織型を鑑別可能な、(19)に記載の抗体。

[0042] (21) 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質が神経ペントラキシン受容体 (neuronal pentraxin receptor; NPR) であり、かつ肺癌細胞の組織型が小細胞癌由来の細胞であることを鑑別する、(20)に記載の抗体。

[0043] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-209932号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0044] 本願発明の肺癌鑑別マーカーによれば、体液、細胞又は肺洗浄液を検査することにより簡便に、高い信頼性で肺癌の罹患の有無を判定することができる。さらに、本願の肺癌鑑別マーカーによれば、肺癌の組織型を鑑別することができる。

[0045] また、本願発明の方法によれば、体液、細胞又は肺洗浄液から既存の腫瘍マーカーよりも高い正診率で、かつ低侵襲性で、肺癌罹患及び肺癌組織型を判定することができる。

[0046] さらに、本願発明の肺癌鑑別用糖鎖プローブによれば、組織染色において肺癌、さらにはその組織型を鑑別することができる。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]肺小細胞癌培養細胞 (Sc) と肺腺癌培養細胞 (Ad) の培養上清中における肺小細胞癌鑑別マーカー糖タンパク質の発現を示すウェスタンブロッティング図

[図2]肺小細胞癌培養細胞 (Sc) と肺腺癌培養細胞 (Ad) の培養上清中における肺腺癌鑑別マーカー糖タンパク質の発現を示すウェスタンブロッティング図

[図3]各レクチンによって分画した肺小細胞癌培養細胞 (Sc) と肺腺癌培養細胞 (Ad) の培養上清中の各々の抗肺癌鑑別マーカータンパク質抗体で検出したウェスタンブロッティング図

[図4]抗体（抗フィブロネクチン1抗体）によって分画した肺小細胞癌培養細胞（Sc）と肺腺癌培養細胞（Ad）の培養上清中の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（フィブロネクチン1）をAALレクチンで検出したブロットング図

[図5]AALレクチンによって分画した肺小細胞癌患者（Sc）と肺腺癌患者（Ad）の血清中の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（NCAM、フィブロネクチン1）を各々の抗肺癌鑑別マーカー糖タンパク質抗体で検出したウェスタンブロットング図

[図6]連続クロマトグラフィー処理血清によって分画した肺小細胞癌患者（Sc）と肺腺癌患者（Ad）の血清中の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（セクレトグラニンIII）を抗体（抗セクレトグラニンIII抗体）で検出したウェスタンブロットング図

[図7]抗神経ペントラキシン受容体（NPR）抗体を用いた肺癌の各組織型における組織染色図

[図8]連続クロマトグラフィー処理多検体血清によって分画した肺小細胞癌患者（Sc）と肺腺癌患者（Ad）の血清中の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（セクレトグラニンIII）を抗体（抗セクレトグラニンIII抗体）で検出したウェスタンブロットング図

[図9]肺小細胞癌培養細胞（Sc）と肺腺癌培養細胞（Ad）の培養上清より抗体（抗インスリン様成長因子結合タンパク質-L1抗体）によって精製した溶出液を用いた抗体オーバーレイ・レクチンアレイでの肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（インスリン様成長因子結合タンパク質-L1）によるPWMレクチンスポット上の蛍光シグナル強度の比較図

[図10]肺小細胞癌培養細胞（Sc）と肺腺癌培養細胞（Ad）の培養上清より抗体（抗フィブロネクチン1抗体）によって精製した溶出液を用いた抗体オーバーレイ・レクチンアレイでの肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（フィブロネクチン1）によるPNAレクチンスポット上の蛍光シグナル強度の比較図

発明を実施するための形態

[0048] 1. 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及びその糖タンパク質断片

本発明の第1の実施形態は、前記表1又は表2に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及びその糖タンパク質の断片である。

[0049] 1-1. 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質

本実施形態の「肺癌鑑別マーカー糖タンパク質」は、表1においてタンパク質番号#1~31で、及び表2においてタンパク質#1~48で、それぞれ示されるタンパク質が該当する。これらのタンパク質は、いずれもそのアミノ酸配列において、少なくとも表中の「糖鎖付加位置」で示される位置（開始アミノ酸残基の位置を1とする）のアスパラギン残基に糖鎖が付加された肺癌特異的な糖タンパク質である。例えば、表1のタンパク質#1のacid alpha-glucosidase（酸性 α グルコシダーゼ）であれば、そのタンパク質のアミノ酸配列上の少なくとも390位、470位及び882位のアスパラギン残基に糖鎖が付加されている。以降本明細書では、糖鎖が付加されたタンパク質を「糖タンパク質」として表す。

[0050] 表中の「gi(ID)」は、本実施形態の糖タンパク質におけるID番号を示す。一つのタンパク質に複数のgi(ID)が登録されている場合には、それらを全て表中に記載している。また、一つのタンパク質に複数のアイソフォームが存在する場合にも、それらのgi(ID)をそのアイソフォーム番号と共に記載している。

[0051] 上記アスパラギン残基に付加された糖鎖は、肺癌特異的に付加された糖鎖であれば特に制限はしない。例えば、フコース修飾（フコシル化）を伴う糖鎖、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型二本鎖糖鎖、キチン、ポリラクタミン又は β 1-3ガラクトースエピトープ等が挙げられる。ここで、「肺癌特異的に付加された糖鎖」とは、前記表中の「糖鎖付加位置」で示されるアスパラギン残基において、肺癌細胞由来のタンパク質にのみ付加される糖鎖をいう。それ故、原則として、本実施形態の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質とは、肺癌細胞から産生される糖タンパク質である。したがって、これらの糖タンパク質を認識する糖鎖プローブを用いて、例えば、被験者の血清中におけるその糖タンパク質の有無を検出することで、その糖タンパク質を有

する個体は、肺癌に罹患していると判定することができる。

[0052] 本明細書において「糖鎖プローブ」とは、特定の糖鎖及び／又は糖タンパク質等の複合糖質を特異的に認識し、それに結合する判定子をいう。例えば、レクチン、抗体又はファージ抗体が挙げられる。

[0053] 「肺癌」には、前述のように、小細胞癌と、非小細胞癌である腺癌、扁平上皮癌及び大細胞癌からなる組織型が知られている。また、肺において神経内分泌型の癌も知られており、その多くは小細胞癌に分類されるが、その他の組織型の癌でも同様に見られる場合が知られている。本実施形態の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質は、前記所定のアスパラギン残基に付加された糖鎖の種類によって、いずれの組織型に該当するかを鑑別することができる。例えば、表1においてタンパク質#1で示されるacid alpha-glucosidase（酸性 α グルコシダーゼ）では、肺小細胞癌由来の糖タンパク質のみに前記所定のアスパラギン残基にフコース修飾を伴う糖鎖が付加されている。したがって、フコース修飾を伴う糖鎖に結合し、それを認識できるレクチン又は抗体を用いれば、acid alpha-glucosidaseは、肺癌鑑別マーカー糖タンパク質として肺癌を鑑別できると共に、その肺癌が小細胞癌であることを鑑別するマーカーにもなり得る。また、表1においてタンパク質#2で示されるbiotinidase（ビオチニダーゼ）では、肺腺癌由来の糖タンパク質でのみ前記所定のアスパラギン残基にフコース修飾を伴う糖鎖が付加されている。したがって、フコース修飾を伴う糖鎖に結合し、それを認識できるレクチン又は抗体を用いれば、biotinidaseは、肺癌鑑別マーカー糖タンパク質として肺癌を鑑別できると共に、その肺癌が腺癌であることを鑑別するマーカーにもなり得る。

[0054] フコース修飾を伴う糖鎖は、AALレクチンによって検出することができ、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖及び複合型二本鎖糖鎖は、ConAレクチンによって検出することができ、キチン及びポリラクトサミンは、PWMレクチンによって検出することができ、そして β 1-3ガラクトースエピトープは、PNAレクチンによって検出することができる。表1では、肺癌鑑別マーカー糖タンパ

ク質がAALレクチン又はConAレクチンと結合する場合には「○」で、結合しない場合には「×」で、それぞれ示している。タンパク質# 1で示されるacid alpha-glucosidaseを例に挙げれば、肺小細胞癌由来の糖タンパク質のみがフコース修飾を伴う糖鎖を所定のアスパラギン残基に有することから、「小細胞癌」の「AAL」のみが「○」で示され、他は「×」となっている。表1及び表2における他の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質についても同様である。したがって、表1及び表2で示した各肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（その肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片を含む）は、表1及び表2の「小細胞癌」と「腺癌」に対するAALレクチンとConAレクチンとの結合態様に基づいて、肺小細胞癌又は肺腺癌の鑑別用マーカーとなり得る。

[0055] 1-2. 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の断片

本実施形態の「肺癌鑑別マーカー糖タンパク質（の）断片」とは、前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の一部からなるオリゴペプチド又はポリペプチドの断片であって、そのアミノ酸配列中に表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含み、かつそのアスパラギン残基に前記「1-1. 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質」で説明した肺癌特異的な糖鎖が付加されていることを特徴とする。

[0056] 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片のアミノ酸の長さは、特に限定はしないが、好ましくは、5~100アミノ酸、8~80アミノ酸又は8~50アミノ酸である。本明細書では、肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片を、以降しばしば「糖タンパク質断片」又は「糖ペプチド」として表す。また、前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質とその糖タンパク質断片をまとめて表す場合、以降「肺癌鑑別マーカー」とする。

[0057] 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片の具体的な例としては、表1及び表2に記載の配列番号1~223で示されるアミノ酸配列からなる糖ペプチドが挙げられる。これらは、本実施形態の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を同定する際に、後述するIGOT法で得られた糖タンパク質断片であって、いずれも前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質と同様に、肺癌鑑別マーカーとして、肺

癌に罹患しているか否かを、また、前記所定のアスパラギン残基に付加された糖鎖の種類によって、いずれの組織型に該当するかを、鑑別することができる。表1及び表2に示したアミノ酸配列中、下線を引いたアスパラギン残基(N)は、糖鎖が付加されているアスパラギン残基であることを示す。

[0058] 1-3. 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の取得

本実施形態の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片及び肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を取得及び同定した方法について、以下で説明をする。

[0059] 1-3-1. 肺癌特異的候補糖タンパク質の大規模同定

肺癌特異的糖タンパク質の大規模な選択的捕集、濃縮は、大きく分けて、糖鎖との親和性を有するプローブを用いる方法、糖鎖との化学反応を利用する方法(Zhang H. et al. Nat Biotechnol 21, 660-666 (2003))、糖鎖への親和性タグを導入する方法等、いずれの方法も利用することができるが、ここでは、表1及び表2の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の取得に用いたプローブを用いる方法について説明する。

[0060] まず、癌細胞が特徴的に産生する糖鎖に反応するレクチン又は糖鎖抗体をプローブとして選択する。

[0061] プローブレクチンは、レクチンマイクロアレイを用いた糖鎖プロファイルの統計解析により選出することができる。その他に、文献情報(癌化に伴うフコシル化の亢進等、使うべきプローブレクチンを予想できるものもある)や、組織型鑑別性を加味して選択することもできる。基本的にはプロファイルの統計解析から選択し、選択されたレクチンの結合特異性から選択の妥当性を判断する。肺癌を標的とする場合には、例えば、フコシル化を検出できるヒイロチャワンタケ(*Aleuria aurantia*)由来のAALレクチン、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖又は複合型二本鎖糖鎖を検出できるタチナタマメ(*Canavalia ensiformis*)由来のConAレクチン、キチン又はポリラクトサミンを検出できるヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)由来のPWMレクチン、及び/又は β 1-3ガラクトースエピトープを検出できるラッカセイ(*Arachis hypogaea*)由来のPNAレクチン等を用いることができる。

[0062] 抗体プローブ又はファージ抗体プローブは、抗原（糖鎖）の構造を明白にしてから作製することもできるが、必要条件ではなく、抗原糖鎖又は糖ペプチドの構造が未知のままでも作製することもできる。

[0063] 候補糖タンパク質の大規模同定は、具体的には、まず、前記糖鎖プローブ（プローブレクチン及び／又は抗体プローブ、ファージ抗体プローブ）を用いて肺癌由来の培養細胞株の培地上清から候補糖タンパク質を捕集する。肺癌由来の培養細胞上清を用いることで、癌細胞由来の糖タンパク質を特定することが出来るため、健常者の血清由来の糖タンパク質上に存在する糖鎖との違いを容易に検出することができ、これは血清から候補分子の選択的取得を行うために有用な情報となり得る。肺癌は、小細胞癌又は非小細胞癌（腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌）のいずれの肺癌の組織型を用いてもよい。それぞれの組織型から候補糖タンパク質を捕集し、その結果を対比し、分析することで、組織型非特異的肺癌鑑別マーカーや組織型特異的肺癌鑑別マーカーを取得することもできる。

[0064] 1-3-2. IGOT法による糖ペプチドの同定

捕集された肺癌鑑別マーカー候補糖タンパクは、次に、IGOT法（isotope-coded glycosylation site-specific tagging：糖鎖付加位置安定同位体標識法）と質量分析法に基づく方法で処理され、その候補糖タンパクのコア糖ペプチドが同定される。例えば、特開2004-233303号公報（特許第4220257号）やKaji H,ほかMass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. Nature Protocols 1, 3019-3027 (2006)に記載のLec-IGOT-LC/MS法により前記糖ペプチドを分析することができる。具体的な方法について、一例を挙げて、以下で説明をする。

[0065] (1) 糖鎖切除とIGOT法

プローブレクチン又はプローブ抗体で捕集された前記候補糖タンパク質群をプロテアーゼで消化して、得られたペプチド群から試料となる候補糖ペプチド群を、同じプローブを用いて再捕集する。又は、試料粗タンパク質混合

物から候補糖タンパク質群を分離することなく、粗タンパク質混合物をプロテアーゼ消化して、得られた粗ペプチド群より、直接プローブレクチン又はプローブ抗体で捕集することもできる。続いて、得られた候補糖ペプチドをIGOT法により標識する。IGOT法では、同位体酸素でラベルされた水の中でグリコペプチダーゼ等の酵素で処理して糖鎖を解離させ、この処理によって、糖鎖結合部位のアスパラギンがアスパラギン酸となり、このときに水中の同位体酸素 (^{18}O) が候補糖ペプチドに取り込まれる。

[0066] (2) 標識ペプチドのLC/MSショットガン分析

IGOT法で標識された候補糖ペプチドを液体カラムクロマトグラフィー (LC) で分離し、質量分析 (MS) に導入し、タンデム質量分析法により、そのアミノ酸配列を網羅的に同定する。

[0067] (3) 候補糖ペプチドの同定

例えば、標準技術集 (特許庁編)、質量分析の3-6-2-2アミノ酸配列解析に示されるMS/MSイオンサーチ法により、得られた各候補糖ペプチドのMS/MSペプチド測定結果に対して、データベースに登録された全タンパク質のアミノ酸配列から、実際に使用したプロテアーゼの特異性にしたがって予測される全ペプチドの仮想的MS/MSスペクトルと比較して、検索することができる。検索においては、アミノ酸の修飾、すなわち、メチオニン残基側鎖の酸化、アミノ末端グルタミンのピロ化 (脱アミド化、環化)、アミノ末端の脱アミノ化 (カルバミドメチルシステイン) アスパラギン残基側鎖の脱アミド化 (ただし、安定同位体酸素の取り込みが生じたもの) を勘案する。その候補糖ペプチドを含む候補糖タンパク質の同定は、検索ソフトMascotにより行う。

[0068] (4) 糖鎖結合位置の同定

MS/MSイオンサーチ法によって同定された候補糖ペプチドのうち、アスパラギン残基側鎖に脱アミド化 (安定同位体取り込み) が生じ、かつN結合型糖鎖付加のコンセンサス配列 (Asn-Xaa-[Ser/Thr]、ただしXaaはProでない) を含む候補糖ペプチドを本実施形態の糖タンパク質断片とする。また、得られた

糖タンパク質断片のコンセンサス配列中のアスパラギン残基を糖鎖結合部位とする。なお、XaaがLys/Argであり、同定されたペプチド配列がこの位置で切除されている場合には、そのタンパク質全体のアミノ酸配列を参照し、Xaaの次の残基が[Ser/Thr]であれば、その候補糖ペプチドも糖タンパク質断片に含めるものとする。原則的にはコンセンサス配列が糖鎖結合位置であるが、これに則らない部位も報告されている。本願ではペプチド-N-グリカナーゼ（グリコペプチダーゼF、PNGase）処理で切除される糖鎖結合位置を同定することができる。

[0069] 上記方法によって選択された肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片群及びそのアミノ酸配列に基づいて同定されたその断片を含む肺癌鑑別マーカー糖タンパク質が、表1及び表2に示した糖タンパク質断片群及び糖タンパク質である。

[0070] 上記糖タンパク質断片群及び糖タンパク質は、それを認識するレクチン又は抗体を用いて、例えば、被験者の血清中の有無を検証することで、その被験者の肺癌の罹患を判定する肺癌鑑別マーカーとなり得る。

[0071] 1-3-3. 肺癌鑑別マーカーの検証

前記1-3-2の項で絞り込まれた肺癌鑑別マーカーについては、その有意性をさらに検証することができる。例えば、肺癌培養細胞上清中からプローブレクチンで捕集した糖タンパク質及び／又は糖タンパク質断片を、前記分離・同定された肺癌鑑別マーカーを特異的に認識する抗体を用いて、ウェスタンブロットティング又は免疫沈降によって検出し、確認することができる。本明細書においては、表1に示した31種の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及びその糖タンパク質断片が、上記抗体検出によって、さらに選択された肺癌鑑別マーカーに該当する。

[0072] また、前記抗体検出によって選択された肺癌鑑別マーカーをさらに検証してもよい。例えば、肺癌患者の血清中からプローブレクチンを用いて捕集し、前記特異的抗体を用いて検出することもできる。一例として、図5で示す表1に記載の神経細胞接着分子（NCAM1）（表1におけるタンパク質#19）

及びフィブロネクチン1（表1におけるタンパク質#8）、並びに図6及び8で示すセクレトグラニンIII（表1におけるタンパク質#23）は、このさらなる検証によってその有用性が確認された肺癌鑑別マーカー糖タンパク質である。ここで、神経細胞接着分子は、表1より肺小細胞癌でのみAALレクチンと結合することから、肺小細胞癌を鑑別可能な肺癌鑑別マーカーとなり得る。また、セクレトグラニンIIIは、表1より肺小細胞癌でのみAALレクチン及びConAレクチンと結合することから、肺小細胞癌を鑑別可能な肺癌鑑別マーカーとなり得る。一方、フィブロネクチン1は、表1より肺腺癌でのみAALレクチンと結合することから、肺腺癌を鑑別可能な肺癌鑑別マーカーとなり得る。あるいは、例えば、肺癌細胞株の培養上清中から前記特異的抗体を用いて捕集し、レクチンアレイを用いて検出してもよい。一例として、図9で示す表1に記載のインスリン様成長因子結合タンパク質-L1（IGFBP-L1）（表1におけるタンパク質#12）、図10で示す表1に記載のフィブロネクチン1（表1におけるタンパク質#8）は、当該さらなる検証によってその有用性が確認された肺癌鑑別マーカー糖タンパク質である。ここで、インスリン様成長因子結合タンパク質-L1（IGFBP-L1）は、図9より肺小細胞癌で強いPWMレクチンスポット上の蛍光シグナルを検出できることから、肺小細胞癌を鑑別可能な肺癌鑑別マーカーとなり得る。一方、フィブロネクチン1は、図10より肺腺癌でのみPNAレクチンスポット上の蛍光シグナルを検出できることから、肺腺癌を鑑別可能な肺癌鑑別マーカーとなり得る。

[0073] 1-4. 肺癌鑑別マーカー糖ペプチド及び糖タンパク質の検出

1-4-1. 質量分析法

肺癌鑑別マーカー糖ペプチド及び糖タンパク質は、糖鎖に結合するプローブレクチン等で捕集した試料について、質量分析計を検出器として検出することができる。

[0074] 肺癌鑑別マーカー糖ペプチドの検出は、好適には捕集した糖ペプチドの糖鎖を切除処理した後、液体クロマトグラフィー（LC）で分離し、溶出したペプチドを順次、直接オンラインで質量分析計（MS）に導入し、検出すること

ができる。質量スペクトルの収集は、単に質量スペクトルを取得することに加え、衝突誘起解離（CID）等の破断法を利用したMS/MSスペクトルの取得、さらには、予め選択したイオンが検出された場合のみCID等で破断し、生じた複数のフラグメントイオンを検出すること（シングルリアクションモニタリング、あるいはマルチリアクションモニタリングと呼ばれる手法）もできる。さらに分析試料に、肺癌鑑別マーカー糖ペプチドのコアペプチド部分を合成し、その一部に安定同位体を取り込ませて質量差を生じさせた対象ペプチドを加え、それぞれのシグナル強度を比較することで相対的あるいは絶対的定量分析を行うこともできる。簡易的には検出されたイオンのシグナル強度を複数の試料間あるいは標準試料と比較し、簡易定量することもできる。

[0075] 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の検出には、様々な公知のプロテオミクス的手法を用いることができる。例えば、捕集したタンパク質を一次元あるいは二次元のゲル電気泳動を用いて分離し、標的スポットの検出強度（染色、蛍光等）を標準試料と比較し、定量することができる。質量分析計を利用した検出法としては、捕集したタンパク質群をプロテアーゼで消化し、生じたペプチドをLC/MS法で分析検出することができる。定量するには安定同位体標識を利用した各種方法（ICAT、MCAT、iTRAQ、SILAC法等）や非標識の簡易定量法（ペプチドカウント法、エリア積算法等）を併用することができる。さらに後述するように、ELISA法によって定量することも可能である。

[0076] 1-4-2. レクチンマイクロアレイ

(1) レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリング

(a) レクチンマイクロアレイ（単にレクチンアレイとも呼ぶ）

レクチンアレイは、糖鎖プローブとして、複数種の特異性の異なるレクチンを1つの基板上に並列に固定（アレイ化）したもので、分析対象となる複合糖質にどのレクチンがどれだけ相互作用したかを一斉に解析できるものである。レクチンアレイを用いることで、糖鎖構造推定に必要な情報が一度の分析で取得でき、かつ、サンプル調製からスキャンまでの操作工程は迅速かつ簡便にできる。質量分析等の糖鎖プロファイリングシステムでは、糖タンパ

ク質をそのまま分析することはできず、あらかじめ糖ペプチドや遊離糖鎖の状態にまで処理をしなければならない。一方、レクチンマイクロアレイでは、例えば、コアタンパク質部分へ直接蛍光体を導入するだけで、そのまま分析できるという利点がある。レクチンマイクロアレイ技術は、本発明者等が開発したもので、その原理・基礎は、例えば、Kuno A., et al. *Nat. Methods* 2, 851-856(2005). に記載されている。

[0077] レクチンアレイに用いる代表的なレクチンとしては、例えば、次の表3に記載のものが挙げられる。

[表3]

	Lectins	Origin	Binding specificity (糖結合特異性)
1	LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc α 1-3GlcNAc, Sia-Le ^x and Le ^x
2	PSA	<i>Pisum sativum</i>	Fuc α 1-6GlcNAc and α -Man
3	LCA	<i>Lens culinaris</i>	Fuc α 1-6GlcNAc and α -Man, α -Glc
4	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc α 1-2LacNAc
5	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i>	Terminal α Fuc and \pm Sia-Le ^x
6	AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Terminal α Fuc and \pm Sia-Le ^x
7	MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal
8	SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
9	SSA	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
10	TJA-I	<i>Trichosanthes japonica</i>	Sia α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -R
11	PHA(L)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tri- and tetra-antennary complex oligosaccharides
12	ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	Lac/LacNAc
13	RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Lac/LacNAc
14	PHA(E)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	NA2 and bisecting GlcNAc
15	DSA	<i>Datura stramonium</i>	(GlcNAc) _n , polyLacNAc and LacNAc (NA3, NA4)
16	GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Agalactosylated N-glycan
17	NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	non-substituted α 1-6Man
18	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -Man (inhibited by presence of bisecting GlcNAc)
19	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	non-substituted α 1-6Man
20	HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	non-substituted α 1-6Man
21	BPL	<i>Bauhinia purpurea alba</i>	Gal β 1-3GalNAc and NA3, NA4
22	TJA-II	<i>Trichosanthes japonica</i>	Fuc α 1-2Gal, β -GalNAc > NA3, NA4
23	EEL	<i>Euonymus europaeus</i>	Gal α 1-3[Fuc α 1-2Gal] > Gal α 1-3Gal
24	ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Gal β 1-3GalNAc α -Thr/Ser (T) and sialyl-T
25	LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	(GlcNAc) _n and polyLacNAc
26	STL	<i>Solanum tuberosum</i>	(GlcNAc) _n and polyLacNAc
27	UDA	<i>Urtica dioica</i>	(GlcNAc) _n and polyLacNAc
28	PWM	<i>Phytolacca americana</i>	(GlcNAc) _n and polyLacNAc
29	Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Gal β 1-3GalNAc α -Thr/Ser (T) and GalNAc α -Thr/Ser (Tn)
30	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal β 1-3GalNAc α -Thr/Ser (T)
31	WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	Terminal GalNAc (e.g., GalNAc β 1-4GlcNAc)
32	ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Gal β 1-3GalNAc α -Thr/Ser (T)
33	MPA	<i>Maclura pomifera</i>	Gal β 1-3GalNAc α -Thr/Ser (T) and GalNAc α -Thr/Ser (Tn)
34	HPA	<i>Helix pomatia</i>	Terminal GalNAc
35	VVA	<i>Vicia villosa</i>	α -, β -linked terminal GalNAc and GalNAc α -Thr/Ser (Tn)
36	DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc α -Thr/Ser (Tn) and GalNAc α 1-3Gal
37	SBA	<i>Glycine max</i>	Terminal GalNAc (especially GalNAc α 1-3Gal)
38	GSL-I mixture	<i>Griffonia simplicifolia</i>	α -GalNAc, GalNAc α -Thr/Ser (Tn), α -Gal
39	PTL-I	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	α -GalNAc and Gal
40	MAH	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-3[Sia α 2-6GalNAc] α -R
41	WGA	<i>Triticum vulgare</i>	(GlcNAc) _n and multivalent Sia
42	GSL-IA ₄	<i>Griffonia simplicifolia</i>	α -GalNAc, GalNAc α -Thr/Ser (Tn)
43	GSL-IB ₄	<i>Griffonia simplicifolia</i>	α -Gal

[0078] 例えば、上記43種類のレクチンを含む45種類のレクチンを基盤に固定化したレクチンアレイ（GPバイオサイエンス社製のLecChip）が既に商用上入手可能である。

[0079] （2）レクチンアレイによる糖鎖プロファイルの統計解析

レクチンアレイは、現在では、精製標品だけでなく、血清や細胞ライセート等の混合試料の定量比較糖鎖プロファイリングができる実用化技術にまで発展してきている。特に細胞表層糖鎖の比較糖鎖プロファイリングはその発展がめざましい（Ebe, Y. et al. *J. Biochem.* 139, 323-327(2006)、Pilobello, K.T. et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 11534-11539(2007)、Tateno, H. et al. *Glycobiology* 17, 1138-1146(2007)）。

[0080] また、糖鎖プロファイルの統計解析によるデータマイニングについては、例えば、「Kuno A, et al. *J Proteomics Bioinform.* 1, 68-72(2008).」、あるいは、「日本糖質学会2008/8/18レクチンマイクロアレイ応用技術開発～生体試料の比較糖鎖プロファイリングと統計解析～久野敦、松田厚志、板倉陽子、松崎英樹、成松久、平林淳」及び「Matsuda A, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 370, 259-263(2008).」に示される方法で行うことができる。

[0081] （3）抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法

レクチンマイクロアレイのプラットフォームは基本的に上記の通りとし、検出に際しては上記被験者の試料を直接蛍光等で標識するのではなく、抗体を介して間接的に蛍光基等を被験者の試料に導入することで、一斉に多検体に対する分析を簡便、高速化することができる応用法である（「Kuno A, Kato Y, Matsuda A, Kaneko MK, Ito H, Amano K, Chiba Y, Narimatsu H, Hirabayashi J. *Mol Cell Proteomics.* 8, 99-108(2009)」、「平林淳、久野敦、内山昇「レクチンマイクロアレイを用いた糖鎖プロファイリング応用技術の開発」、実験医学増刊「分子レベルから迫る癌診断研究～臨床応用への挑戦～」、羊土社、Vol25(17)164-171(2007)」、久野敦、平林淳「レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングシステムの糖鎖バイオマーカー探索

への活用」、遺伝子医学M00K11号「臨床糖鎖バイオマーカーの開発と糖鎖機能の解明」、pp. 34-39、メディカルドゥ（2008）参照）。

[0082] 例えば、糖タンパク質が被験者の試料であれば糖鎖部分はレクチンマイクロアレイ上のレクチンによって認識されるため、コアタンパク質部分に対する抗体をその上から被せる（オーバーレイ）ことによって、被検糖タンパク質を標識したり、あるいは高度に精製したりすることなく、特定の感度高く検出することができる。

[0083] （4）レクチンオーバーレイ・抗体マイクロアレイ法

レクチンマイクロアレイの代わりにコアタンパク質に対する抗体をガラス基板等の基板上に並列に固定（アレイ化）した抗体マイクロアレイを用いる方法である。調べるマーカーに対するだけの数の抗体が必要である。糖鎖変化を検出するレクチンをあらかじめ確定することが必要である。

[0084] 1-4-3 レクチン-抗体サンドイッチ免疫学的検出

レクチンアレイの結果をもとに簡易で安価なサンドイッチ検出法をデザインできる。基本的には2種の抗体を用いたサンドイッチ検出法に用いられるプロトコルのうち、一方の抗体をレクチンに置き換えるだけで適用できる。したがって、この手法は既存の自動免疫検出装置を用いた自動化にも適用可能である。唯一考慮しなければならない点は、サンドイッチに用いる抗体とレクチン間の反応である。抗体は、少なくとも2本のN結合型糖鎖を有する。したがって、使用するレクチンが抗体上の糖鎖を認識する場合は、サンドイッチ検出時にその結合反応に起因するバックグラウンドノイズを生じてしまう。このノイズシグナルの発生を抑制するのに抗体上の糖鎖部分に修飾を導入する方法や、糖鎖部分を含まないFabのみを用いる方法が考えられるが、これらは公知の手法を用いればよい。糖鎖部分への修飾方法としては、例えばChen SらNat Methods. 4, 437-44 (2007)やComunale MAらJ Proteome Res. 8, 595-602 (2009)等があり、Fabを用いる方法としては例えばMatsumoto HらClin Chem Lab Med 48, 505-512 (2010)等がある。

[0085] 1-4-4. 連続クロマトグラフィーを用いる方法

抗体オーバーレイ・レクチンアレイは、肺癌鑑別マーカー糖タンパク質上の疾患特異的糖鎖変化を最も反映するレクチンを、統計学的に見出す最善の手法である。一方で、免疫沈降及びオーバーレイ検出が可能な抗体が必須である。しかしながら、そのような抗体が必ずしも入手できるとは限らない。したがって、より多くの候補分子を肺癌検出に利用するための手段として、プローブレクチンで捕集した糖タンパク質に対する、標的糖タンパク質の免疫学的定量検出を行うのが一般的である。具体的にはSDS-PAGEを行い、膜転写後にウェスタンブロットにより免疫学的な検出をする。得られたバンドのシグナル強度の比較より、各試料間での変動を定量的に見積もることができる。癌性糖鎖を持つタンパク質の量的変動から各マーカー候補の有意性を確認した絞り込みができる。本実施形態では、候補分子の同定工程において使用したAALレクチンを、検証時においてもプローブタンパク質として用いるのが一般的である。例えば、その様な戦略で実施している例として、Liu YらJ Proteome Res. 9, 798-805 (2010)の報告等が挙げられる。血清中のタンパク質は、その種類によってN結合型糖鎖の構造（分岐の度合い等）、フコース修飾（コアフコース、血液型抗原等）は異なることが知られている。それ故、同一分子であっても異なるフコース修飾を受ける場合があることも報じられている。例えば、Nakagawa TらJ. Biol. Chem. 281, 29797-29806 (2006)では、 α 1アンチトリプシンが異なるフコース修飾を受けていることが開示されている。これらは、疾患の種類、進展度合いによる増加の有無、タイミングを異にするため、ほぼすべてのフコース修飾を認識し、捕集できるAALをプローブとして用い、フコース含有糖タンパク質全体を捕集し、量的比較するのは理想的とはいえない。そこでわれわれは2つの異なるフコース認識レクチンを用いて連続クロマトグラフィーにより分離分画し、それぞれの画分を定量比較解析することを考えた。このときに使用するレクチンはLCAとAALである。これまでのレクチン特異性解析によりLCAはN結合型糖鎖のうち低分岐型のコアフコース修飾を受けたものを認識するレクチンであることが知られている。AALはN結合型糖鎖のどのような分岐のコアフコースでも認識するこ

とができ、かつABOやルイス抗原等に代表される非還元末端側のフコース修飾をも認識することができることも知られている。つまり、LCAは特異性が高く、AALは低い。そこで第一段階としてLCAカラムクロマトグラフィーを行い、LCAに結合するフコース含有糖タンパク質を捕獲する。これをLCA結合性フコース含有糖タンパク質とする。クロマトグラフィー時において、コアフコース修飾を受けている低分岐型N結合型糖鎖を有さないフコース含有糖タンパク質はLCAカラムには結合せず、非結合画分に分画される。このようなフコース含有糖タンパク質群をLCA非結合画分から捕獲するために、LCA非結合画分に対しAALカラムクロマトグラフィーを行う。この時にAALに捕獲された糖タンパク質群をLCA非結合/AAL結合性フコース含有糖タンパク質とする。この操作により、疾患に伴う同一タンパク質上のフコシル化の増減を修飾の種類ごとに評価することができると推測される。

[0086] 2. 肺癌罹患判定方法

本発明の第2の実施形態は、肺癌罹患判定方法である。本実施形態の方法は、被験者より採取された試料から、前記実施形態1に記載の肺癌鑑別マーカーを検出することによって、該被験者が肺癌に罹患していると判定することを特徴とする。

[0087] 2-1. 定義及び概要

本明細書において「被験者」とは、検査に供される者、すなわち後述する試料を提供する者を指す。被験者は、何らかの疾患を有する患者又は健常者のいずれであってもよい。好ましくは、肺癌に罹患している可能性がある者又は肺癌患者である。

[0088] 「試料」とは、前記被験者から採取され、本実施形態の判定方法に供されるものであって、例えば、体液、癌組織等の細胞又は手術中に採取された肺洗浄液が該当する。

[0089] 「体液」とは、被験者から採取された液体状の生体試料をいう。例えば、血液（血清、血漿及び間質液を含む）、リンパ液、各組織若しくは細胞の抽出液、胸水、痰、髄液、涙液、鼻汁、唾液、尿、膿液、精液等が挙げられる

。好ましくは、血液、リンパ液、胸水又は痰である。体液は、被験者から採取したものを必要に応じて希釈若しくは濃縮、又はヘパリンのような血液凝固阻止剤を添加する等の処理を行なった後に使用してもよいし、そのような前処理を行なうことなく、そのまま使用してもよい。体液の採取は、当該分野の公知の方法に基づいて行なえばよい。例えば、血液やリンパ液であれば、公知の採血方法に従えばよい。具体的には、末梢血であれば、末梢部の静脈等に注射をして採取することができる。体液は、採取後直ちに利用してもよいし、冷凍又は冷蔵により一定期間保存した後、必要に応じて解凍等の処理を行ない利用することもできる。本実施形態において、血清を用いる場合には、 $10\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 、 $20\mu\text{L}\sim 80\mu\text{L}$ 、 $30\mu\text{L}\sim 70\mu\text{L}$ 、 $40\mu\text{L}\sim 60\mu\text{L}$ 又は $45\mu\text{L}\sim 55\mu\text{L}$ の容量を用いれば、十分量の肺癌鑑別マーカ-を検出することができる。

[0090] 本実施形態の判定方法において検出に使用する肺癌鑑別マーカ-は、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された表1又は表2に記載の肺癌マーカ-糖タンパク質又は糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む糖タンパク質断片であれば、いずれの肺癌鑑別マーカ-も用いることができる。これらの肺癌鑑別マーカ-は、本実施形態の判定方法で単独で用いてもよいし、二以上を組合せて用いてもよい。例えば、二以上の異なる肺癌鑑別マーカ-糖タンパク質を用いてもよいし、同一肺癌鑑別マーカ-糖タンパク質における二以上の異なるその肺癌鑑別マーカ-糖タンパク質断片を用いてもよい。好ましくは、表1における肺癌鑑別マーカ-を用いることであり、より好ましくは、肺小細胞癌と肺腺癌に対して同一の又は異なる鑑別特性を有する肺癌鑑別マーカ-を用いることである。例えば、肺小細胞癌鑑別用の表1に記載の神経細胞接着分子(NCAM1)、セクレトグラニンIII及び/又はインスリン様成長因子結合タンパク質-L1(IGFBP-L1)と、肺腺癌鑑別用の表1に記載のフィブロネクチン1を本実施形態の肺癌鑑別マーカ-として組み合わせる方法が挙げられる。これにより、被験者の肺癌罹患を判定すると同時に、その肺

癌が小細胞癌であるか腺癌であるかを同時に判定することができるので便利である。被験者の試料から、フコース修飾を伴う糖鎖又は高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型2本鎖糖鎖、キチン、ポリラクトサミン及び／又は β 1-3ガラクトースエピトープに結合するレクチン又は抗体を単独で又は組合せて用いて、いずれかの方法により表1又は表2に記載の肺癌鑑別マーカーが検出された場合には、その被験者は肺癌に罹患しているか、その可能性が非常に高いと判定することができる。例えば、フコース修飾を伴う糖鎖の検出には、それに特異的に結合するAALレクチンを、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型2本鎖糖鎖の検出には、それに特異的に結合するConAレクチンを、キチン及びポリラクトサミンの検出には、それに特異的に結合するPWMレクチンを、又は β 1-3ガラクトースエピトープの検出には、それに特異的に結合するPNAレクチンを用いることができる。

[0091] 一方、被験者より採取された試料から、前記肺癌鑑別マーカーの糖鎖に対する前記レクチンの結合結果及び表1又は表2に記載の前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び／又はその糖タンパク質断片の前記レクチンに対する結合態様に基づいて、該被験者における肺癌の組織型が小細胞癌又は腺癌であることを判定することもできる。例えば、表1のレクチン結合態様によれば、タンパク質#1で示されるacid alpha-glucosidaseの糖鎖は、肺小細胞癌においてのみAALレクチンと結合する。したがって、被験者より採取された試料から、AALレクチンに結合するacid alpha-glucosidaseが検出された場合には、その被験者は、肺癌に罹患しており、しかもその組織型は小細胞癌であると判定することができる。また、肺癌鑑別マーカー糖タンパク質が神経細胞接着分子(NCAM1)又はその糖タンパク質断片で、AALレクチンとの結合が検出された場合には、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定することができる。さらに、肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がフィブロネクチン1又はその糖タンパク質断片で、AALレクチン又は抗体との結合を検出することによって、肺癌の組織型が腺癌であることを判定することができる。

[0092] 2-2. 肺癌鑑別マーカーの検出方法

肺癌鑑別マーカーの検出方法としては、例えば、2つの方法、すなわち、肺癌鑑別マーカーの糖鎖と特異的に結合するレクチン（本明細書では、便宜的に、以下、レクチンAとする）を用いて当該糖鎖を有する肺癌鑑別マーカーを選択する方法と肺癌鑑別マーカーの糖鎖以外の部分(コアタンパク質)を検出することによって当該肺癌鑑別マーカーを検出する方法の組合せ、又はレクチンAと特異的に結合する糖鎖を有する肺癌鑑別マーカーに対する特異的な抗体であって、糖鎖結合部分近傍をエピトープとする抗体を用いて目的の肺癌鑑別マーカーを検出する方法を挙げることができる。

[0093] ここで、前記レクチンAと特異的に結合する糖鎖を検出する方法及びコアタンパク質を検出する方法は、それぞれ、レクチンAと特異的に結合する糖鎖を測定する方法、及びコアタンパク質を測定する方法であってもよい。例えば、コアタンパク質に対する抗体及びレクチンAを用いて、肺癌鑑別マーカーを検出することにより、肺癌患者を健常者と区別して検出することができる。好適には、レクチンアレイを用いる抗体オーバーレイ法(Kuno A, Kato Y, Matsuda A, Kaneko MK, Ito H, Amano K, Chiba Y, Narimatsu H, Hirabayashi J. *Mol Cell Proteomics*. 8, 99-108(2009))を用いることができる。より簡易に検出するための方法としては、レクチン-抗体サンドイッチ免疫学的検出法を用いることができる。

[0094] レクチンAと特異的に結合する糖鎖を有する肺癌鑑別マーカーを用いて肺癌の罹患を判定する具体的な方法として、例えば、以下の方法が挙げられる。

[0095] (1) 被験者から得られた血清中の肺癌鑑別マーカーを、レクチンAを用いて分離する。これによって、レクチンAと特異的に結合する糖鎖を有するタンパク質群が選択される。

[0096] (2) 続いて、前記肺癌鑑別マーカーにおいて、レクチンAと特異的に結合する糖鎖以外の部分を特異的に認識する抗肺癌鑑別マーカー糖タンパク質抗体を用いて検出する。これによって、目的とするレクチンAと特異的に結合する糖鎖を有する肺癌鑑別マーカーを検出することができ、このマーカーが検出された場合には、その被験者は肺癌に罹患していると判定する。

[0097] レクチンAと特異的に反応する糖鎖を有する肺癌鑑別マーカーの選択には、例えば、レクチンAに特異的に結合する糖鎖を測定する方法、具体的には、レクチンAを固定したカラムやアレイ、及び肺癌鑑別マーカーを測定する手段、具体的には、新規肺癌鑑別マーカー糖タンパク質又はその断片に対する抗体を用いて行なうことができる。好適には、レクチン-抗体サンドイッチELISAや抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法を用いることができる。

[0098] また、レクチンAと特異的に反応する糖鎖を有する肺癌鑑別マーカーの濃度を計測することもでき、これには、レクチンアレイを用いた抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法、LC-MS、免疫学的測定法、酵素活性測定法、キャピラリー電気泳動法等が挙げられる。好適には、LC-MS、レクチンAと特異的に反応する糖鎖を有する新規肺癌鑑別マーカー糖タンパク質又はその断片に特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた、酵素免疫測定法、二抗体サンドイッチELISA法、金コロイド法、放射免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、蛍光免疫測定法、ウェスタンブロットティング法、免疫組織化学法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）又は水晶振動子マイクロバランス（QCM）法等による定性的又は定量的手法を用いることができる。

[0099] 2-3. 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質又はその糖ペプチドを用いた特異的ポリクローナル抗体及び／又はモノクローナル抗体の調製

新規肺癌鑑別マーカー糖タンパク質又はその断片である糖ペプチドを利用する肺癌の検出方法において、前記鑑別マーカー糖タンパク質又はその糖ペプチドに特異的なポリクローナル抗体及び／又はモノクローナル抗体用いてもよい。例えば、市販の抗体のように、前記糖タンパク質等に対する特異的抗体を容易に入手することができる場合には、それらを用いることができる。しかし、容易に入手できない場合は、例えば、以下の方法で調製できる。

[0100] 例えば、抗肺癌鑑別マーカー糖ペプチドポリクローナル抗体は、周知の方法を用いて調製することができる。具体的には、得られた抗原用の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質又は糖ペプチドにアジュバントを添加する。抗原は、糖鎖結合部位（アスパラギン）を含む肺癌鑑別マーカー糖ペプチドを合成し

、それを用いてもよい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、それらを混合して用いることもできる。前記抗原と共にアジュバントを抗体産生動物に同時接種して抗体の生成をブーストすることもできる。また、このペプチドを市販キーホール・リンペット（スカシ貝）ヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin、KLH）に共有結合させ、抗体産生動物に接種してもよい。なお、このとき顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF）を同時に投与して抗体産生をブーストすることもできる。抗原を接種する抗体産生動物は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジ等を利用することができる。免疫は、既存の方法であれば、何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射等により行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは4～21日間隔で免疫する。

[0101] 最終の免疫日から2～3日後に免疫動物から全血を採取し、血清を分離後、ポリクローナル抗体を調製することができる。

[0102] また、例えば、抗肺癌マーカー糖ペプチドモノクローナル抗体は、ケラーとミルシュタインの方法で調製することができる（Nature Vol. 256, pp495-497 (1975)）。例えば、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマから抗肺癌鑑別マーカー糖ペプチドモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することにより調製することができる。

[0103] 具体的には、前記ポリクローナル抗体の作製で、最終の免疫日から2～3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられる。

[0104] 抗体産生細胞と融合させるミエローマ（骨髓腫）細胞として、マウス、ラット、ヒト等種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地（例えばHAT培地）で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質

を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼを欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）培地に生育できないものである。

[0105] ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3(P3x63Ag8.653)(*J. Immunol.* 123, 1548-1550 1979)、P3x63Ag8U.1(*Current Topics in Microbiology and Immunology* 81, 1-7 (1978))、NS-1(Kohler, G. and Milstein, C., *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519(1976))、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., *Cell* 8, 405-415(1976))、SP2/0(Shulman, M. et al., *Nature* 276, 269-270(1978))、F0(de St.Groth, S.F. et al., *J. Immunol. Methods* 35, 1-21(1980))、S194(Trowbridge, I.S., *J. Exp. Med.* 148, 313-323(1978))、R210(Galfre, G. et al., *Nature* 277, 131-133(1979))等が好適に使用される。

[0106] 次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、MEM、DMEM、RPMI-1640培地等の動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1~1:10で融合促進剤の存在下、30~37°Cで1~15分間接触させることによって行われる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,000~6,000のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール又はセンダイウイルス等の融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

[0107] 細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地（HAT培地等）を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

[0108] ハイブリドーマのスクリーニングは、限界希釈法、蛍光励起セルソーター

法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。

[0109] 3. 組織染色用肺癌細胞鑑別抗体

本発明の第3の実施形態は、組織染色用肺癌細胞鑑別抗体である。本実施形態の抗体は、前記実施形態1に記載の肺癌鑑別マーカー、すなわち表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された表1又は表2に記載の一以上の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質、及び／又は糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む一以上の前記糖タンパク質断片を特異的に認識して、それに結合することで、組織染色において肺癌細胞を特異的に鑑別することのできる抗体である。

[0110] 本実施形態の抗体が認識する前記実施形態1に記載の肺癌鑑別マーカーのエピトープは、特に限定はしない。好ましくはコアタンパク質又はそのコアタンパク質断片である。より好ましくは糖鎖および糖鎖付加周辺のペプチド配列のいずれも包含する部分である。この場合、ペプチド配列の長さは5～15アミノ酸、5～10アミノ酸又は5～8アミノ酸である。プローブとしては上記抗体プローブの他に、ファージを用いたファージ抗体プローブ等も肺癌細胞識別用糖鎖プローブとなり得る。

[0111] 本実施形態の抗体は、肺癌細胞の組織型を鑑別することができる。例えば、表1においてタンパク質#21で示す神経ペントラキシン受容体(NPR)に対する抗体(R&D SYSTEMS Anti-human Neuronal Pentraxin Receptor Antibody)が挙げられる。この抗神経ペントラキシン受容体抗体は、図7で示すように、小細胞癌由来の細胞を特異的に鑑別できることから、小細胞癌細胞鑑別用抗体となり得る。このように、癌性糖鎖プローブレクチンで捕集、同定されたタンパク質は、通常、他の組織や正常部位での発現が極めて少ないことから、レクチン等による由来細胞の区別を要することなく、抗体又はファージ抗体のみで組織マーカーとなり得るものも含まれる。

実施例

[0112] <実施例1>

グライコプロテオミクス (IGOT-LC/MS法) による糖ペプチドマーカの選択

1. ヒト肺癌培養細胞上清の調製法

肺腺癌3種 (H358、H1975、LX-1) 及び肺小細胞癌3種 (H2171、H524、H526) を、それぞれ高グルコース含有90%DMEM、10%FBS (PS+) の培地を用いて、直径14cmのディッシュで3日間培養し、80~90%コンフルエントとした。前記FBS血清含有培地を吸引して廃棄し、無血清培地10mL/ディッシュ (100% DMEM-高グルコース、添加物無し) で洗浄した。無血清培地を30mL/ディッシュで添加して、48時間培養した。培養後、1000rpm×30分で遠心し、さらに上清を回収し3000rpm×30分で上清 (培養上清) を回収し、-80℃で凍結保存した。前記温度下で保存した培養上清は、使用前に融解し、0.45μmフィルターろ過後、以下の実施例に用いた。なお、終濃度0.1%となるようにNaN₃を添加した。

[0113] 2. 糖タンパク質の大規模同定法

(1) ペプチド試料の調製

前記調製した培養上清に、終濃度10%となるようトリクロロ酢酸 (TCA、10%飽和水溶液) を加え、氷上で10~60分間冷却し、タンパク質を沈殿させた。4℃で高速遠心分離して前記沈殿物を回収した。沈殿物は、氷冷したアセトンに懸濁し、2回の洗浄によってTCAを除去した。沈殿物に可溶化緩衝液 (0.5Mトリス-塩酸緩衝液、pH8-8.5、7Mグアニジン塩酸、10mM EDTAを含む) を、タンパク質濃度がおよそ5~10mg/mLとなるように加え、溶解した。別法として、培養上清を4℃、分子量1万カットの限外濾過膜により、タンパク質を濃縮し、これに可溶化緩衝液を加え、再度濾過することにより、試料タンパク質溶液とした。

[0114] 高速遠心分離により、上清の抽出液を回収した。抽出液に窒素ガスを通すか又は吹きつけて、溶存酸素を除いた後、タンパク質重量と等量のジチオスレイトール (DTT) を粉末又は少量の可溶化緩衝液に溶かして加えた。窒素ガ

スを通しながら又は窒素ガス雰囲気下で、ジスルフィド結合を還元させるため室温で1～2時間反応させた。次いで、S-アルキル化のため、タンパク質重量の2.5倍のヨード酢酸アミドを加え、遮光下、室温で1～2時間反応させた。反応後、50～100倍量の緩衝液（一般的には10mM 重炭酸アンモニウム緩衝液pH8.6）を外液として、4℃（冷室）で透析した。外液を適当な時間において3-5回交換し、変性剤（グアニジン塩酸）や過剰の試薬を除いた。タンパク質が部分的に沈殿することがあったが、懸濁液のままタンパク質定量した。タンパク質量の1/100～1/50重量のトリプシン（シークエンスグレード以上）を加え、37℃、終夜（約16時間）消化した。消化の進行はSDS-ゲル電気泳動法により確認し、十分に消化されていると判断されたときに、終濃度5mM のフッ化フェニルメタンサルフォニル（PMSF）を加え、反応を停止した。

[0115] (2) 候補糖ペプチドの捕集・精製

前記工程で調製された試料ペプチドを、プロブレクチン（AALレクチン又はConAレクチン）を固定化したカラムに供し、洗浄後、レクチンの特異性に応じた方法、すなわち、AALレクチンについては、5mMフコースを含有する緩衝液により、ConAレクチンについては、0.2Mメチルマンノシドを含む緩衝液により、候補糖ペプチドを溶出した。得られた候補糖ペプチド溶液に等容量のエタノール及び4倍容量の1-ブタノールを加え、水：エタノール：1-ブタノール（1：1：4（v/v））で予め平衡化したSepharoseカラムに供した。カラムを同平衡化溶媒で洗浄後、50%エタノール（v/v）で候補糖ペプチドを溶出した。候補糖ペプチド画分を、2 μ Lのグリセロールの入ったマイクロチューブに少量ずつ移し、減圧遠心濃縮、すなわち、減圧遠心によって水を除去し、その操作を繰り返すことによって、全ての候補糖ペプチド画分を濃縮した。

[0116] (3) 糖鎖切除と糖鎖付加位置安定同位体標識法（IGOT法）

精製した候補糖ペプチド（グリセロール溶液）に必要な量の緩衝液を加え、再度減圧遠心濃縮した後、安定同位体酸素-18（¹⁸O）で標識した水（H₂¹⁸O）を

加え、溶解した（グリセロール濃度は、10%以下とする）。これに標識水で調製したペプチド-N-グリカナーゼ（グリコペプチダーゼF、PNGase）を加え、37°Cで終夜反応させた。この反応により、糖鎖結合部位のアスパラギンがアスパラギン酸となり、このときに水中の同位体酸素（¹⁸O）が候補糖ペプチドに取り込まれることで、候補糖ペプチドが標識される。

[0117] （4）標識ペプチドのLC/MSショットガン分析

IGOT反応液を0.1%ギ酸で希釈し、LC/MSショットガン分析した。このとき高分離能、高再現性、高感度に検出するため、ダイレクトナノフローポンプを基礎とするナノLCシステムを利用した。インジェクトした候補糖ペプチドは脱塩を目的としたトラップカラム（逆相C18シリカゲル系の担体）上に一旦捕集し、洗浄後、同じ樹脂を詰めたスプレーチップの形状をしたフリットレス微小カラム（内径150 μm×50mL）を用い、アセトニトリルの濃度グラジエント法により分離した。溶出液は、エレクトロスプレーインターフェースを介してイオン化し、直接質量分析機に導入した。質量分析はデータ依存モードで最大2つのイオンを選択しながら、衝突誘起解離（CID）によるタンデム質量分析を行った。

[0118] （5）MS/MS-イオンサーチ法による候補糖ペプチドの検索

得られた数千のMS/MSスペクトルについて、個々にスムージング、中心化処理を行ってピークリストを作成し、このデータを元にタンパク質アミノ酸配列データベースを用いてMS/MSイオンサーチ法で、候補糖ペプチドを同定した。検索エンジンにはマトリックスサイエンス社のMascotを用いた。検索条件のパラメータとして、使用した断片化法（トリプシン消化）、ミスクリーページ許容数：2、固定する修飾：システインのカルバミドメチル化、変動的な修飾：N末端アミノ基の脱アミノ化（末端グルタミン）、酸化（メチオニン）、¹⁸Oを取り込んだ脱アミド化（アスパラギン：糖鎖付加部位）、MSスペクトルの許容誤差：500ppm、MS/MSスペクトルの許容誤差：0.5Daを用いた。

[0119] （6）候補糖ペプチドの同定

上述の条件で検索し、得られた結果より、下記の同定確認処理を行った。

得られた候補糖ペプチドを肺癌鑑別マーカー糖ペプチド（肺癌鑑別マーカー糖タンパク質断片）とした。

[0120] (i) 同定の確からしさのスコア（偶然の一致の確率：Expect値）が0.05以下であること。

[0121] (ii) 同定に寄与したフラグメントイオンの数が4つ以上であること。

[0122] (iii) 誤差（ppm）が系統的誤差より大きくずれていないこと（質量誤差が0.5Da以下であること）。

[0123] (iv) 同定されたペプチドにコンセンサス配列があり、その数以下のAsn修飾（Aspへの変換、及び¹⁸Oの取り込み）があること。

[0124] (7) 肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の同定

選別された肺癌鑑別マーカー糖ペプチドの配列から、この配列を含む糖タンパク質を規定することができる。より具体的には、表1及び表2において配列番号1～223で示す肺癌鑑別マーカー糖ペプチドの「ペプチド配列」に基づいてアミノ酸配列データベースNCBI-Refseqより対応する肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の全アミノ酸配列を同定した。

[0125] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を表2に示す。

[0126] 3. 培養上清由来のタンパク質のイムノブロットによる検証

無血清培地で24時間培養した肺癌細胞株（肺腺癌3種：H358、H1975、LX-1；肺小細胞癌3種：H2171、H524、H526）の培養上清をAmicon Ultra-154 centrifugal filter units（10kDaカットオフ、ミリポア社）で10倍濃縮し、そのサンプル10 μ LをXV PANTERA SYSTEMの10%、12.5%若しくは17%アクリルアミドゲル（丸幸商会社）を用いてSDS-PAGEで展開した後、200 mA、40minでPVDF膜（Amersham社）に転写した。ブロッキング剤は、PBS（ダルベッコ社）に1% Triton X-100を加えたPBSTxに溶解した5%スキムミルク又は5% BSAを使用し、室温で1時間ブロッキングした。PBSTxで10分間の洗浄を3回行った後、予めBiotin Labeling Kit-NH₂（同仁化学研究所）でビオチン化した一次抗体（表4）とメンブレンを1時間反応させた。再びPBSTxで10分間の洗

浄を3回行った後、二次抗体HRP-conjugated streptavidin (1 : 3000希釈、GEヘルスケア社) で1時間反応させた。PBSTxで10分間の洗浄を3回行った後、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (パーキンエルマー社) によってHRPの酵素反応を行い、得られたシグナルをAmersham Hyperfilm ECL (GEヘルスケア社) に現像し、肺腺癌と肺小細胞癌の細胞株由来の培養上清に存在しているタンパク量について比較解析を行った。

[表4]

抗体#	抗体名 [製造元 : カタログNo. / 取り扱い店]
01	neural cell adhesion molecule 1 (NCAM-1/CD56) [LSP: MAB24081/ フナコシ]
02	neuronal pentraxin II (NPTX2) [LSP: LS-C53292-50/フナコシ]
03	Thy-1 cell surface antigen [ABV: H00007070-M01/コスモバイオ]
04	insulin-like growth factor 2 receptor (IGF-IIR) [RSD: AF2447/コスモバイオ]
05	insulin-like growth factor 2 receptor (IGF-IIR) [RSD: MAB2447/フナコシ]
06	acid alpha-glucosidase preproprotein (GAA) [LSP: LS-C80648-50/コスモバイオ]
07	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 (testican2/SPOCK2) [RSD: MAB2328/フナコシ]
08	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2 (testican2/SPOCK2) [ABV: H00009806-B01P/フナコシ]
09	cell adhesion molecule 4 (CADM4) [LSP: LS-C36881/コスモバイオ]
10	secretogranin III (SgIII) [SCB: SC-1492/コスモバイオ]
11	melanoma-associated antigen p97 (MFI2) [ABV: H00004241-B01P/コスモバイオ]
12	cathepsin L2 preproprotein (CTSL2) [ABV: PAB8639/コスモバイオ]
13	cathepsin L2 preproprotein (CTSL2) [DFK: F-106/コスモバイオ]
14	lysosomal acid phosphatase 2 precursor (ACP2) [ABV: PAB7218/コスモバイオ]
15	lysosomal acid phosphatase 2 precursor (ACP2) [ABV: H00000053-M01/コスモバイオ]
16	cathepsin L1 (CTSL1) [ABV: PAB8638/コスモバイオ]

[0127]

抗体#	抗体名 [製造元 : カタログNo. / 取り扱い店]
17	cathepsin L1 (CTSL1) [ABV: MAB1432/コスモバイオ]
18	deoxyribonuclease II, lysosomal precursor (DNASE2) [ABV: H00001777-B01P/コスモバイオ]
19	integral membrane protein 1 (ITM1) [SCB: SC-100796/フナコシ]
20	integral membrane protein 1 (ITM1) [ABV: H00003703-M02/コスモバイオ]
21	neuronal pentraxin receptor (NPTXR/NPR) [RSD: AF4414/フナコシ]
22	neuronal pentraxin receptor (NPTXR/NPR) [LSP: LS-C73727-100/フナコシ]
23	neuronal pentraxin receptor (NPTXR/NPR) [SCB: SC-12483/コスモバイオ]
24	sushi domain containing 2 (SUSD2) [ABV: H00056241-B01/コスモバイオ]
25	sel-1 suppressor of lin-12 like (SEL1L) [LSP: LS-B2253-50/フナコシ]
26	sel-1 suppressor of lin-12 like (SEL1L) [LSP: LS-C55443-100/フナコシ]
27	sel-1 suppressor of lin-12 like (SEL1L) [ABV: PAB7473/コスモバイオ]
28	source of immunodominant MHC-associated peptides (STT3B) [PG: 15323-1-AP/コスモバイオ]
29	IGFBP-L1 [RSD: AF3877/コスモバイオ]
30	neural cell adhesion molecule 1 (NCAM-1/CD56) [SCB: sc-71647/ コスモバイオ]
31	Fibronectin (H-300) [SCB: sc-9068/ コスモバイオ]
32	Galectin-3BP/MAC-2BP (MAC2BP) [RSD: AF2226/ コスモバイオ]
33	Cathepsin D [RSD: AF1014/ コスモバイオ]

[0128]

抗体#	抗体名 [製造元 : カタログNo. / 取り扱い店]
34	Fibronectin (C-20) [SCB: sc-6952/ コスモバイオ]
35	neogenin homolog 1 (NGN) [SCB: SC-15337]/コスモバイオ
36	laminin alpha 5 [SCB: SC-20145/コスモバイオ]
37	laminin, beta 1 precursor [SCB: sc-17763/コスモバイオ]
38	phospholipid transfer protein isoform b precursor (PLTP) [RSD: AF5109/コスモバイオ]
39	melanoma cell adhesion molecule (MCAM) [Millipore: MAB16985]
40	L1 cell adhesion molecule isoform 2 precursor (L1CAM) [LSP: LS-C49042/コスモバイオ]
41	biotinidase precursor (BTD) [ABV: H00000686-M01/フナコシ]
42	ribonuclease T2 precursor (RNASET2) [ABV: H00008635-B01/コスモバイオ]
43	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 (TINAGL1) [ABV: H00064129-B02P/コスモバイオ]
44	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog isoform 2 precursor (KIT) [LSP: LS-C40873-100/コスモバイオ]
45	secretogranin III (SgIII) [SCB: SC-50289]
46	secretogranin III (SgIII) [SIGMA: HPA-006880]
47	IGFBP-L1 [RSD: BAF3877/コスモバイオ]

[0129] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を表1、図1、
図2に示す。

[0130] 4. AALレクチンによる培養上清のバッチフラクショネーション

AALレクチンを用いて培養上清を分画した。具体的にはAALレジンは3倍量のPBSで5回洗浄を行った後、50%スラリー溶液に調製した。調製したAALレジンは30 μ Lに対し培養上清30 μ Lを加え4 $^{\circ}$ Cで5時間震盪させた。遠心後(2,000rpm、2分間)上清を除去した後、Wash Buffer(0.1% SDS in PBST, 0.1% Triton X-100) 50 μ Lを加え遠心(2,000rpm、2分間)を2回繰り返した後Wash Bufferを500 μ L加え、遠心(2,000rpm、2分間)し、上清を除去洗浄した。洗浄後の溶出には0.02% SDSを含む0.2 M Fucose in PBSを15 μ L加え4 $^{\circ}$ Cで5時間震盪させた。遠心後(2,000rpm、2分間)上清を回収しさらにElution Bufferを15 μ L加え遠心(2,000rpm、2分間)を行いAAL結合画分として溶出した。溶出した画分10 μ LをそれぞれSDS-PAGEに展開してウェスタンブロットで検出した。ConAレクチンを用いる場合も同様な操作を行った。ただし、溶出には0.5M メチルマンノシドを用いた。

[0131] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図3に示す。

[0132] 5. 免疫沈降による分画

表1に記載の全ての候補糖タンパク質抗体についてビオチン化されていないものについてはBiotin Labeling Kit-NH₂(同仁化学研究所)を用いて、マニュアルに従いビオチン化した。培養上清100 μ Lに対してビオチン化抗体を1 μ g加え、20 $^{\circ}$ Cで2時間1,400rpmで振盪した。磁気ビーズ(invitrogen社)の洗浄は、20 μ Lの磁気ビーズに対して100 μ LのTBSTx(50mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1% Triton X-100)を加えて、攪拌後遠心(10,000 rpm、3秒)し、上清の除去を3回行った。反応させた培養上清と抗体を磁気ビーズに移し、20 $^{\circ}$ Cで1時間1,400 rpmで振盪した。磁気スタンドを用いて磁気ビーズと結合した抗体を回収した。回収した磁気ビーズは1mLのTBSTxで3回洗浄した。溶出バッファー(0.2% SDS in TBS)20 μ Lを加え攪拌後98 $^{\circ}$ Cまたは60 $^{\circ}$ Cで5分加熱を2回行い、溶出した。溶出したサンプルの抗体を除去するために同様に洗浄した40 μ Lの磁気ビーズを溶出サンプルに加えて20 $^{\circ}$ Cで2時間1,400rpmで振盪した。磁気スタンドで抗体-磁気ビーズを取り除いたものをサンプル

として用いた。調製したサンプルをSDS-PAGEで展開した後レクチンブロットを行った。

[0133] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図4に示す。

[0134] 6. レクチンブロットによる評価

免疫沈降したサンプル10 μ Lを10% SDS-PAGEに展開した。SDS-PAGE後タンパク質をPVDF膜(Amersham)に転写した。PVDF膜を5% BSAで1時間室温にてブロッキングした後、すでにビオチン化されたAALレクチン(生化学工業)で1時間室温にて反応させた。その後二次抗体HRP-conjugated streptavidinで1時間室温にて反応させた。Western Lightningを用い検出した。レクチンの希釈にはPBS-Tを用いた。

[0135] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図4に示す。

[0136] 7. AALレクチンによる血清のカラムフラクショネーション

AALレクチンを用いて血清を分画した。具体的には市販のカラムにAALレジンを1mL充填し、レジンの10倍量のTBSで洗浄、レジンの2倍量の0.5MのNaClで洗浄、レジンの10倍量のTBSで洗浄を行い、AALカラムを調製した。血清をAALカラムに加えた後、レジン中で1時間反応させた後、レジンの5倍量のTBSで洗浄を行った。溶出には20 mM Fucoseを1mL加えレジン中で1時間反応させた後さらに20mM Fucoseを4mL加え全量5mLで溶出した。

[0137] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図5に示す。

[0138] 8. 連続クロマトグラフィー方法による血清のフラクショネーション

連続クロマトグラフィーを用いた血清の分画は、LCAアガロース(J-オイルミルズ社)とAALアガロース(J-オイルミルズ社)を用いて低温下で行った。100 μ Lの血清をPBSで4倍希釈して、まず、カラムに充填した5mLのLCAアガロース(0.7 \times 13cm)に血清サンプルを興じた。次に、得られた非結合血清画分をカラムに充填した2.5mLのAALアガロース(0.7 \times 5.5cm)に興じ、PBSで十分

に洗浄を行った後0.2M フコースを含むPBSで溶出を行った。溶出画分をウルトラフリー遠心濃縮デバイス（カットオフ：30kDa、ミリポア社）で濃縮し、得られたサンプルを上記と同様にイムノブロットにより候補分子の比較解析を行った。

[0139] （結果）

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図6に示す。

[0140] 9. 連続クロマトグラフィー方法による多検体血清のフラクショネーション

多検体血清の比較解析を行う際に、少量の血清サンプルを短時間でフラクショネーションする必要があるため、高スループットな連続クロマトグラフィー方法を確立した。連続クロマトグラフィーを用いた血清の分画は、LCAアガロース（J-オイルミルズ社）とAALアガロース（Vector社）を用いて行った。チップカラムに充填した300 μ LのLCAアガロース（0.37 \times 2.3cm）に50 μ Lの血清サンプルを興じた。次に、得られた非結合血清画分をオープンカラムに充填した250 μ LのAALアガロース（0.8 \times 0.5cm）に興じ、PBSで十分に洗浄を行った後0.02M フコースを含むPBSで溶出を行った。溶出画分をウルトラフリー遠心濃縮デバイス（カットオフ：10kDa、ミリポア社）で濃縮し、得られたサンプルのうち血清10 μ L相当を上記と同様にイムノブロットにより候補分子の比較解析を行った。

[0141] （結果）

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図8に示す。

[0142] 10. 抗体オーバーレイ・レクチンアレイ

上記「5. 免疫沈降による分画」で得られた糖タンパク質溶液を適量とり、レクチンアレイ反応バッファーである1% Triton X-100含有Phosphate-buffered saline (PBSTx)で60 μ Lに調製した。この溶液をガラス1枚当たり8つの反応槽が形成されているレクチンアレイの各反応槽へ添加し、20 $^{\circ}$ Cで10時間以上反応した。この8つの反応槽からなるレクチンアレイ基盤の作製は、内山ら(Proteomics 8, 3042-3050 (2008))の手法に従った。これにより糖タンパク質上の糖鎖とアレイ基板上に固定されている43種のレクチンとの

結合反応が平衡状態に達する。未反応の基板上のレクチンに検出用抗体の糖鎖が結合して、ノイズを発生することを防止するため、その後、ヒト血清由来IgG溶液（シグマ社製）を2 μ L加えて、30分反応させた。60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した後、再度ヒト血清由来IgG溶液を2 μ L加え、若干攪拌した。続いて、検出用の該糖タンパク質に対する抗体（ビオチン化物）を100 ng相当加え、20 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。抗原抗体反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した後、モリテックス社製アレイスキャナーGlycoStationによりアレイスキャンを行い、肺癌組織特異的に反応するレクチンスポット上の蛍光強度について比較を行った。

[0143] （結果）

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図9及び図10に示す。

[0144] 今回の実験により、AAL又はConA及びこれらのリガンドに関連する特異性をもつレクチン以外においても、PNAやPWMのように肺癌鑑別に有効なレクチンが存在することが明らかになった。これは、糖タンパク質上の複数のレクチンシグナルを組み合わせ、その組み合わせ方にバリエーションを持たせることにより、肺癌組織型の鑑別をより精度高く検出できる可能性を意味している。

[0145] <実施例2>肺癌鑑別マーカーを用いた肺癌細胞の組織染色

肺癌鑑別マーカーを用いて抗体による組織染色について検証した。

[0146] まず、ホルマリン固定肺癌組織切片（5 μ m厚）を定法に従い組織切片上に被覆しているパラフィンを脱パラフィン化した。脱パラフィン化した組織切片はPBSにて洗浄し、風乾後、10mMクエン酸バッファー中に浸し、121 $^{\circ}$ C、15分間オートクレーブすることで、ホルマリンによる分子間（分子内）架橋を解離した。処理後の切片は室温でしばらく放置した後、PBSに5分間3回繰り返し浸し、組織表面を洗浄した。次いで0.3% H₂O₂-MeOHにて10分間、室温で処理することで、内在性ペルオキシダーゼのブロッキング反応を行った。PBSにて洗浄（5分、3回）後、一次抗体溶液（R&D社製。抗NPR 3 μ g/mLになる

ようPBSで懸濁)を組織切片上へ添加し、保湿箱中にて20℃で2時間結合反応した。PBSにて洗浄(5分、3回)した後、次いで二次抗体として抗ヒツジFITC conjugate(SantaCruz社)と、酵素標識抗体としてanti-FITC HRP conjugate(タカラバイオ株式会社)を用いて発色反応した。反応を停止するため、ミリQ水に5分間3回浸した。最後にヘマトキシリンで、室温、1分間処理し、核酸を染色後、流水にて洗浄した。

[0147] (結果)

上記工程によって得られた肺癌鑑別マーカー糖タンパク質を図7に示す。小細胞癌にのみ特異的に染色されているのがわかる。

[0148] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 表1又は表2に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質であって、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された前記糖タンパク質。

[表1]

タンパク質 #	タンパク質名	g(I/D)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
1	acid alpha-glucosidase	g 119393891, g 119393893	0	X	X	X	390	QVVENMTR	1
							470	GVFITNETGQPLICK	2
							882	GAYTQVF L AR N TVNELVR	3
2	biotinidase	g 4557373	X	X	0	X	119	DVQIVFFEDGIIHGFNFR	4
							150	FNDTEVLGR	5
							349	SHLIAQVAKNPVGLIGAENATGETDFSHSK	6
							349	NPVGLIGAENATGETDPSHSHKFK	7
							263	YYKGSLSYLVTR	8
							221	YNPKYSVANDTGFVDIPKQEK	9
4	cathepsin L1	g 22202619, g 4503155	0	X	X	X	221	YSVANDTGFVDIPK	10
							221	YRPENSVANDTGFVYVPGKEK	11
5	cathepsin L2	g 23110960	0	X	X	X	292	NLDHGVLYVGYGFE G ANS N SK	12
							67	QTLFFNGTR	13
7	cell adhesion molecule 4 ceoxrybonuclease II, lysosomal	g 21686877 g 4503349	0	X	X	X	86	SNI S CLAFLLYNDQPPQPSK	14
							430	GGNSNGALCHFFPFLYNNHNYTDC T SEGR	15
8	fibronectin 1	g 47132557 (isoform 1), g 47132551 (isoform 2), g 16933542 (isoform 3), g 47132555 (isoform 4), g 47132553 (isoform 5), g 47132549 (isoform 6), g 47132547 (isoform 7)	X	X	0	X	528	DCIVDDITYVNDTHK	16
							542	RHEEGHMLNCTCFGGGR	17
							542	HEEGHMLNCTCFGGGR	18
							1007	ESKPLTAGQTTKLDAPTNLQFVNETDSTLVR	19
							1007	LDAPTNLQFVNETDSTLVR	20
9	galectin-3-binding protein-like	g 122937327	0	X	X	X	1291	WTPLN S STINGYR	21
							44	ADVGGEMAGTSINHSQAVLQR	22
							61	QGNASD V LR	23
							307	FFDYNGSAFLPR	24

タンパク質 #	タンパク質名	g(ID)	小細胞症		線症		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
10	insulin-like growth factor 2 receptor	gi 119964726	O	X	X	X	112	SLLEFNTTVSCDQQGTNHR	25
							435	MSVINFECKTAGNDGK	26
							582	TNITLVCKPGDLESAPVLR	27
							2085	GYPGGGKTKASSVIELTCTK	28
11	insulin-like growth factor binding protein 3	gi 62243248 gi 62243068	X	X	O	X	116	GLCVNASAYSR	29
							205	YKYDYESQSTDTQNFSSSKR	30
12	insulin-like growth factor binding protein-like 1	gi 66090548	X	O	X	X	166	DGPFCEFAPVWVPPRSVHNTGAQVGLSCEVR	31
							166	SVHNVGTGACVGLSCEVR	32
13	integral membrane protein 1	gi 22749415	X	O	X	X	548	TILVDNNTWNNTHISR	33
							433	ILTADNQTYMAVQGGSTAYLLCK	34
14	L1 cell adhesion molecule	gi 4557707 gi 13435353	X	X	O	O	671	WYSLGKVPNGTSTLLK	35
							777	VQWRPQGTGRGWQEQVSDPFLVVSNTSTFVPEIK	36
							979	THQLTDLSPHLR	37
15	lysosomal acid phosphatase 2	gi 4557010	O	X	X	X	133	FNFNISWQPIPVHTVPTEDR	38
							167	YEQLQNETRGTPEYQNESSR	39
							177	QTPEYQNESSR	40
16	melanoma cell adhesion molecule	gi 17274107	O	X	X	X	56	CGLSQSQGNLSHVDWFSVHK	41
							418	CYASVPSIPGLNR	42
17	melanoma-associated antigen p97	gi 13424281 gi 16163666	O	O	X	X	38	WCATSDPEQHKCCGIMSEAFR	43
							515	DCDVLTAVERSEFFMASCVPVNNPK	44
18	neogenin homolog 1	gi 4505375	X	O	X	X	73	GSSVILNCSAYSEPSPK	45
							210	VIKLPFGMLVISNATEGDGGLYR	46
							470	TPASDPHGDNLTVSVFYTK	47
19	neural cell adhesion molecule 1	gi 94420689 gi 115529482 gi 115529478	O	X	X	X	347	TSTRNLSSEEEK	48
							449	DGQLLPSSNYSNIK	49
							478	IVNTPSASYLEIVTDPDENDFGNVNTAVNRR	50

タンパク質 #	タンパク質名	gi(D)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
20	neuronal pentraxin II	gi 28195384	0	X	X	X	148	ANVSNAGLPGDFR	51
21	neuronal pentraxin receptor	gi 17402888	X	0	X	X	189	VAELEDEKSLLNHNETSAHR	52
22	ribonuclease T2	gi 5231228	X	X	0	X	42	ALPGGADNASVAGAAAAPGPQR	53
23	secretogranin III	gi 19557045	0	0	X	X	106	AYWPDVHSPNRR	54
24	sel-1 suppressor of lin-12-like	gi 19923669	X	0	X	X	212	QDQLQNCTEPGEQPSPK	55
25	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (lesfican) 2	gi 7662036	0	0	X	X	68	KTYPPENKPGQSNYSFYDNLNLLK	56
26	Thy-1 cell surface antigen	gi 19923362	0	0	X	X	346	NKLEKNAIDNISK	57
27	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	gi 11545918	X	X	0	X	608	EASIVGENETYPR	58
28	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	gi 4557695 (isoform 1), gi 148005039 (isoform 2)	0	0	X	X	225	LRDWFQLLHENSKEQNGSASSVAGPASGLDK	59
			0	0	X	X	225	QNGSASSVAGPASGLDK	60
			0	0	X	X	42	LDORHENTSSSPIQYEFSLTR	61
			X	X	0	X	78	GRAPDICALPYLGAICYCDLFCNRR	62
			0	0	X	X	161	AINQGNVYGWQAGNHSFAFWGMTLDEGIR	63
			0	0	X	X	130	SLYGKEDNDTLVRR	64
			0	0	X	X	367	TFIDKWEDYPKSENEISNRR	65
			0	0	X	X	463	CSASVLPVDVQTLNSSGPPFFGK	66
			0	0	X	X	486	LVVQSSIDSSAFKHNIGTVECK	67

タンパク質 #	タンパク質名	g(iD)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.		
			AAL	ConA	AAL	ConA					
29	laminin alpha 5	gij21264602					95	LVGGPVAGGDPNQITIR	88		
							921	LNLTSDFLWLVFR	89		
							1330	VWQGHANASFCPHGYGCR	70		
							1529	TIPDCLLCQPTFGCHPLVGCCEECNSGPGIQELTPTCDTDSGQCK	71		
							2019	CEICAPGFYGNALLPQNC ^{TR}	72		
							2196	GINASSMAWAR	73		
							2209	LHRLMASIADLOSQRLR	74		
						X	O	O	2303	TLSELSMQTGHGLANASAPSGEQLLR	75
									2423	DNATLQATLHAAR	76
									2501	LVEAAEAHAQQLGQLALNLSIILDVNDRLTQR	77
30	laminin, beta 1	gij4504951					2568	QGLVDRAQQILLANSTALEEAMLQEQQR	78		
							2707	GVHNASLALSASIGR	79		
							3107	LNTTGSAGCTADLLVGR	80		
							3287	VFDLQQNLG ^{SV} VSTGCAPALQAQTPGLGPR	81		
							1041	KVCVNYLGTVQEHQNGSDCCQDK	82		
							1279	LSDTTSQSNSTAK	83		
						X	O	O	1487	QSAEDILLKTNATK	84
									1643	AIKQADEDIQGTQNLTSIESETAASEETLFINASQR	85
									64	GKEGHFYNISEVK	86
									143	MKVS ^{NY} SCQASVSR	87
31	phospholipid transfer protein	gij5453914 gij33356541					143	VSNVSCQASVSR	88		
							245	GAFFPLTER ^{NW} SLPNR	89		
							398	FRYS ^{NH} SALES ^{LAI} PILOAPLK	90		
						193	GAFFPLTER ^{NW} SLPNR	91			

[表2]

タンパク質 #	タンパク質名	gi(D)	小細胞癌				糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
1	activated leukocyte cell adhesion molecule	g 68163411					167	KLDCISEDSYFDGNIWYR	92
			X	O	X	X	265	NAIKEDNIITLK	93
							265	EGDNITLK	94
							361	NATVWMMKDNIR	95
							480	YYSKIISPEENVLTCTAENQLER	96
2	alpha 2 type V collagen preproprotein	g 69363017	X	X	X	O	1400	EASQNIYICK	97
3	amilonite binding protein 1	g 73486661	X	X	O	O	538	LENITNPWSEFR	98
4	asparilate beta-hydroxylase	g 14589866 (isoform a)	X	X	X	O	452	LVQLFPNDTSLKNDLGYGLIGDNDNAKK	99
5	aspartate beta-hydroxylase	g 14589864 (isoform b)	O	O	X	X	64	DFRYNLSEVLQGG	100
6	beta-1,3-galactosyl-C-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	g 14827029, g 14827031, g 14827033, g 14827035, g 21614523					58	HLELAGENPFSSDINCTK	101
			X	X	O	X	95	WTPDDYINMTSDCSSFIK	102
							142	AATSRPERVWPDGVVFFVGGNFTGSQR	103
			X	X	O	O	363	ISVTPGEKIILNFTSLDLR	104
							699	LNGSITSPGWPK	105
7	bone morphogenetic protein 1	g H502421					98	IHQQLPFEAVVINKTSGEGR	106
			O	X	X	X	374	NLTDGFTIMWIK	107
							716	QECLLNHSELHQR	108
							729	HLDATNSTAGYSYGYGSMR	109
							172	LLNITDVLVLLPSLNPDGFERAR	110
8	calsynterin 2	g 11545861					522	RFANEYPNITR	111
			X	O	X	X	978	HWSLEISNKPVSEPEPKIR	112
							1070	GKDLDTDFTNVNASQFETK	113
9	carboxypeptidase D	g 22202611	X	O	X	X			

タンパク質 #	タンパク質名	g(I/D)	小細胞癌		腺癌		精練 付加 位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
18	fibrinogen-like 2	g 5730075	X	X	O	O	263	LDGSTNFR	141
							336	LHVGNYNGTAGDALR	142
19	Fraser syndrome 1	g 108773804	X	X	O	O	1107	IHTPSLHVNGSLIPIGSIKPLDFSLNIVQDQEGR	143
							1503	IVYNITLPLHPNQGIIEHR	144
							1776	ISGSEVEELSEVSNFTMEDINIKK	145
							2562	YTSYNYVSEK	146
							2667	VIINDTEDEPTLEFDKK	147
20	growth differentiation factor 15	g 4758836	X	X	X	O	70	LRAQSWEDSNITLVPAPAVR	148
							70	ANQSWEDSNITLVPAPAVRILTPEVR	149
21	immunoglobulin superfamily, member 4D isoform 1	g 148684190 (isoform 1), g 148684211 (isoform 2)	O	X	X	X	101	FQLLNFSSSELK	150
							113	VSLTNVVISDEGR	151
22	Integrin, alpha 1	g 31667142	X	X	X	O	418	NITFNVESTK	152
							883	DSCESNHITCK	153
							1113	SENASLVSSSNQK	154
23	intercellular adhesion molecule 1	g 4557878	X	X	O	X	202	TELDLRPQGLELFENTSPYQLQTFVLPATPPQLVSPR	155
							267	LNFTVTYGNDSESAK	156
24	Interleukin 6 receptor	g 4504673	X	X	X	O	93	SVQLHDSGNYSCYR	157
25	latent transforming growth factor beta binding protein 3	g 18497288	X	X	O	X	89	DSQQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFR	158
							349	RLNSTHCQDINECAMPGVCR	159
							845	DRSHCEDIDCEDFPAACIGGDCINTNGSYR	160
26	mucin 16	g 83367077	X	X	O	X	12586	NTSVGLLYSGCR	161
							13193	KFNITESVLOGLLKPLFK	162
							14363	NIEDALNQLFRNSSIK	163
27	nelrin 4	g 93204871	X	X	O	X	14417	NGTQLQNFILDR	164
							56	KLWADITCGQMATELYCFYSENTDLTCRQPK	165
			X	X	O	X	163	YFAINCSTATFGLLEDDVKK	166

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖 付加 位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
28	neuronal cell adhesion molecule isoform A	gi 81158225	X	O	X	X	223	FNHTQTQQK	167
							245, 251	VISYDELNDTIAANLSDTEFYGAK	168
							276	ERPPTFLTPEGNASNKEELR	169
							314	EDGMLPKNR	170
							507	GSALHEDIYVLHENGTLPIPAQKQDSTGYTCVAR	171
							858	VNVVNSTLAEVHWDPVPLK	172
							85	QLLEKVVQMSQSIEVLDLDR	173
29	olfactomedin related ER localized protein	gi 17136143 gi 5453547	O	O	X	X	85	VQNMSSQIEVLDLDR	174
							270	SMVDFMNTDIFTSHR	175
							376	LDPVSLQLQTWNTSYPKR	176
							85	QLLEKVVQMSQSIEVLDLDR	177
							98	ELQYVKQECNR	178
30	osteoprotegerin	gi 146743793	X	X	O	O	152	CPDGFSSNETSSKAPQR	179
							178	GNATHDNICSGNSESTQK	180
							289	HIGHANLTFEQLR	181
							212	GINESYKK	182
31	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)	gi 4506031	X	X	X	O	232	FLNDSIVDPVDFSEWFGFYR	183
							148	HYGPGVWVSMANAGKDTNGSQFFITVYK	184
32	peptidylprolyl isomerase B	gi 4758850	X	X	X	O	152	GTWSTAESGAECTNWNSSALAQPKPYSGR	185
							219	AGKYSEFCSTPACSEGNSDCYFGNGSAYR	186
							219	YSSEFCSTPACSEGNSDCYFGNGSAYR	187
33	plasminogen activator, tissue type I	gi 4505861	X	X	O	O	483	CTSQHLLNRTVTDMMLCAGDTR	188
							197	QHTVTTTKGENFTETDVK	189
34	prion protein	gi 122056623, gi 122056625, gi 122056628, gi 34335270, gi 4506113	X	X	X	O		GENFTETDVK	190

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
35	prostaglandin H2 D-isomerase	gi 32171249	X	X	X	O	51	WFSAGLASNSSWLR	191
							78	SWAPATDGGGLNSTFLR	192
36	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	gi 109833041 gi 109633039	O	X	X	X	721	KVEVEPLNSTAVHYWVK	193
							966	DINSQQEIQNITDTRFTLTGLKPDITYDIK	194
							721	KVEVEPLNSTAVHYWVK	195
37	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	gi 110735404 gi 110735406 gi 110735402	X	X	O	X	957	DINSQQEIQNITDTRFTLTGLKPDITYDIK	196
							410	QLTLQWEPLGYNVTR	197
38	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	gi 6912612 gi 42491358	O	O	X	X	177	LLANSSMLGEGQVLR	198
							303	IVSPEPGGAVGPNLTCR	199
							247	LLANSSMLGEGQVLR	200
39	seizure related 6 homolog (mouse)-like	gi 32261332	O	X	X	X	373	IVSPEPGGAVGPNLTCR	201
							328	SVNLSDGELLSIR	202
40	seizure related 6 homolog	gi 148839280 gi 148838346	X	O	X	X	399,422	HLTCLINATQPFWDSKEPVCAACGGVIRNATTGR	203
							436,440	IVSPFGNGYSNNLTCHWLLEAPEGQR	204
41	serine carboxypeptidase vitellogenic-like	gi 83641874, gi 83641876	O	O	X	X	346	QAIHVGNIQTFNDGIVEK	205
							191,198	LHHLDHNNTHHFHNDSTPSER	206
42	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	gi 55741750	X	X	O	X	218	GEPSNEPSTEINIKTQEQSDVKLPK	207
							339	KDLNEDDHHHECLNVTQLLK	208

タンパク質 #	タンパク質名	gi(ID)	小細胞癌		腺癌		糖鎖付加位置	ペプチド配列	SEQ NO.
			AAL	ConA	AAL	ConA			
43	tenascin C (hexabrachion)	gj4504549					38	QSGV <u>N</u> ATLPEENQPVFNHVN <u>N</u> IK	209
							327	C <u>I</u> NGTCYCEEGFTGEDCGKPTCPHACHTQGR	210
							788	QTGLAPGQEQEYEISLHVKNNTRG <u>P</u> GLK	211
			X		O	X	1018	LN <u>Y</u> SLPTGQWVG <u>V</u> QLPR	212
							1034	N <u>T</u> TSYVLRG <u>L</u> EPGQEQEYN <u>V</u> LLTAEK	213
44	tissue factor pathway inhibitor	gj5454114					1079	VKAS <u>T</u> EQAPELE <u>N</u> LT <u>V</u> TEY <u>G</u> WD <u>G</u> LR	214
			X				1093	LN <u>W</u> TAADQAYEH <u>F</u> HIQVQEANKVEAAR	215
			X	X	O	X	145	LE <u>T</u> VEY <u>N</u> ISGAER	216
45	transforming growth factor, beta 1	gj63025222	X	X	O	O	82	LRLASPPSQGEVPPG <u>P</u> LP <u>E</u> AVL <u>A</u> LY <u>N</u> STR	218
46	tumor-associated calcium signal transducer 1	gj4505059, gj4505057	X	X	O	X	111	QC <u>N</u> GTSTCWCW <u>T</u> AGVR	219
			X	X	O	X	188	HRPTAGAF <u>N</u> HSD <u>L</u> DAELR	220
47	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	gj9845238	X	X	O	X	89	LS <u>N</u> ISHLNYCE <u>P</u> DLR	221
			X	X	O	X	173	ESW <u>G</u> QESNAG <u>N</u> QTVVR	222
48	von Willebrand factor A domain containing 2	gj38348304	X	X	O	O	147	N <u>A</u> SV <u>P</u> Q <u>L</u> I <u>V</u> TD <u>G</u> K	223

- [請求項2] 前記糖鎖がフコース修飾を伴う糖鎖、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型二本鎖糖鎖、キチン、ポリラクトサミン及び β 1-3ガラクトースエピトープからなる群より選択される一以上の糖鎖である、請求項1に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [請求項3] 肺小細胞癌又は肺腺癌の鑑別用である、請求項2に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [請求項4] 肺小細胞癌鑑別用であって、前記糖タンパク質が神経細胞接着分子(NCAM1)、セクレトグラニンIII及びインスリン様成長因子結合タンパク質-L1(IGFBP-L1)からなる群より選択される一以上の糖タンパク質である、請求項3に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [請求項5] 肺腺癌鑑別用であって、前記糖タンパク質がフィブロネクチン1である、請求項3に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質。
- [請求項6] 糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む請求項1～5のいずれか一項に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質の断片。
- [請求項7] 被験者より採取された試料から、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された表1又は表2に記載の一以上の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質、及び／又は糖鎖が付加された、表1又は表2に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む一以上の前記糖タンパク質の断片を検出することによって、該被験者が肺癌に罹患していると判定する、肺癌罹患判定方法。
- [請求項8] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び／又はその糖タンパク質の断片を、前記糖鎖に結合する一以上の糖鎖プローブを用いて検出する、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記糖鎖プローブがフコース修飾を伴う糖鎖、高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型二本鎖糖鎖、キチン、ポリラクトサミン又は β 1-3ガラクトースエピトープに結合する、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記糖鎖プローブがレクチン、抗体又はファージ抗体である、請求

項 8 又は 9 に記載の方法。

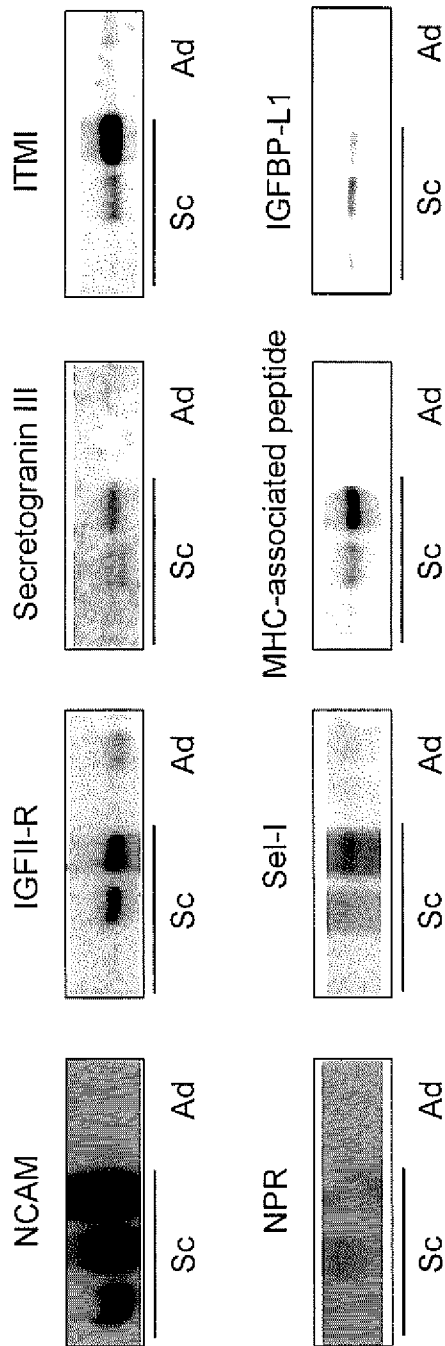
- [請求項11] 前記レクチンがAAL、ConA、PWM又はPNAである、請求項 10 に記載の方法。
- [請求項12] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質が神経細胞接着分子（NCAM1）であり、AALとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定する、請求項 11 に記載の方法。
- [請求項13] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がセクレトグラニンIIIであり、AAL及び／又はConAとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定する、請求項 11 に記載の方法。
- [請求項14] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がインスリン様成長因子結合タンパク質-L1（IGFBP-L1）であり、ConA及び／又はPWMとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が小細胞癌であることを判定する、請求項 11 に記載の方法。
- [請求項15] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質がフィブロネクチン1であり、AAL及び／又はPNAとの結合を検出することによって、肺癌の組織型が腺癌であることを判定する、請求項 11 に記載の方法。
- [請求項16] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び／又はその糖タンパク質の断片の糖鎖に対する前記糖鎖プローブの結合結果及び表 1 又は表 2 に記載の前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質及び／又はその糖タンパク質の断片の前記糖鎖プローブに対する結合態様に基づいて、肺癌の組織型が小細胞癌又は腺癌であることを判定する、請求項 8～11 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項17] 前記試料が体液、細胞又は肺洗浄液である、請求項 7～16 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項18] 前記体液が、血液（血清、血漿及び間質液を含む）、リンパ液、細胞の抽出液、痰又は胸水である、請求項 17 に記載の方法。
- [請求項19] 表 1 又は表 2 に示す糖付加位置のアスパラギン残基に糖鎖が付加された表 1 又は表 2 に記載の肺癌鑑別マーカー糖タンパク質、及び／又

は糖鎖が付加された、表 1 又は表 2 に示す糖付加位置のアスパラギン残基を少なくとも一つ含む前記糖タンパク質断片に結合して、肺癌を鑑別する組織染色用肺癌細胞鑑別抗体。

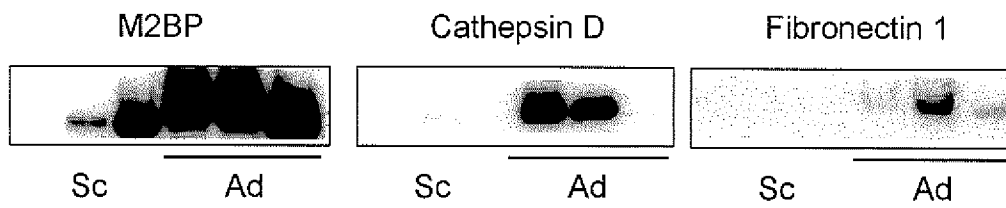
[請求項20] 肺癌細胞の組織型を鑑別可能な、請求項 19 に記載の抗体。

[請求項21] 前記肺癌鑑別マーカー糖タンパク質が神経ペントラキシン受容体であり、かつ肺癌細胞の組織型が小細胞癌由来の細胞であることを鑑別する、請求項 20 に記載の抗体。

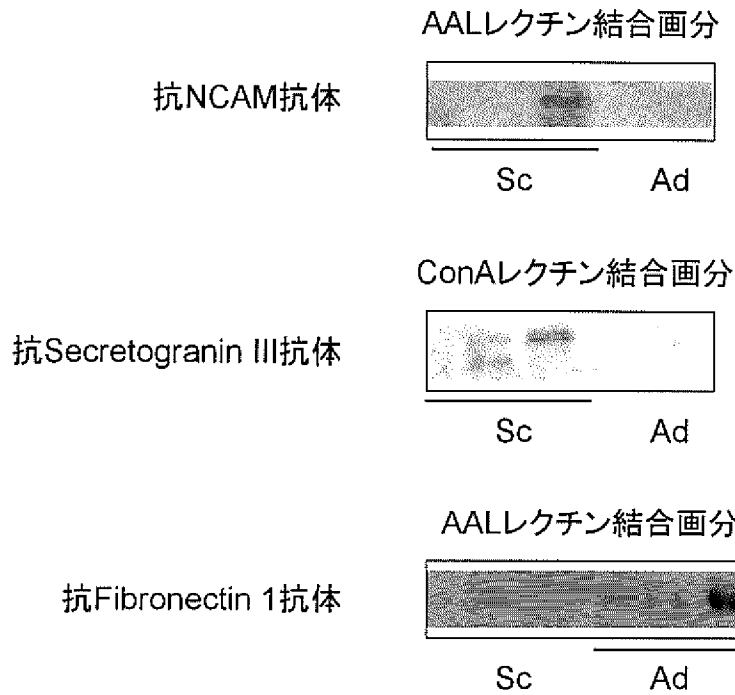
[図1]



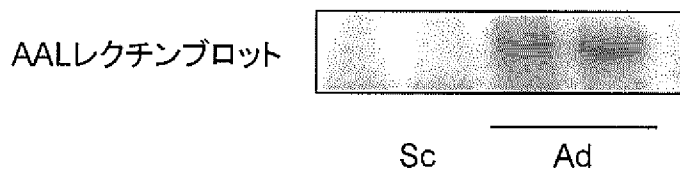
[図2]



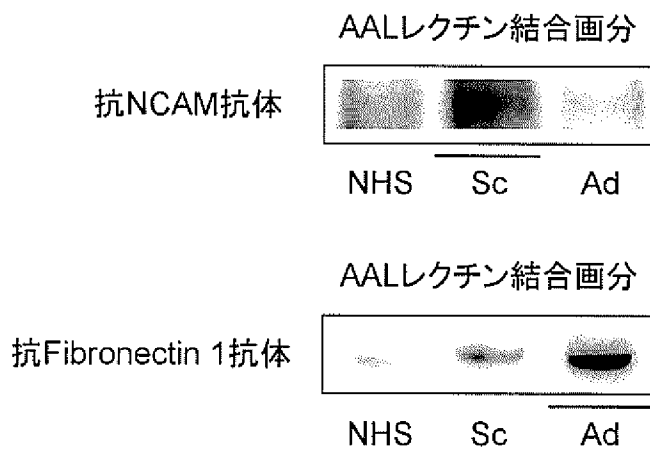
[図3]



[図4]

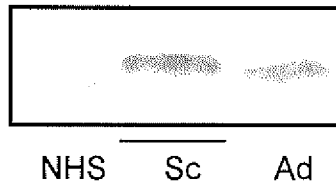


[図5]

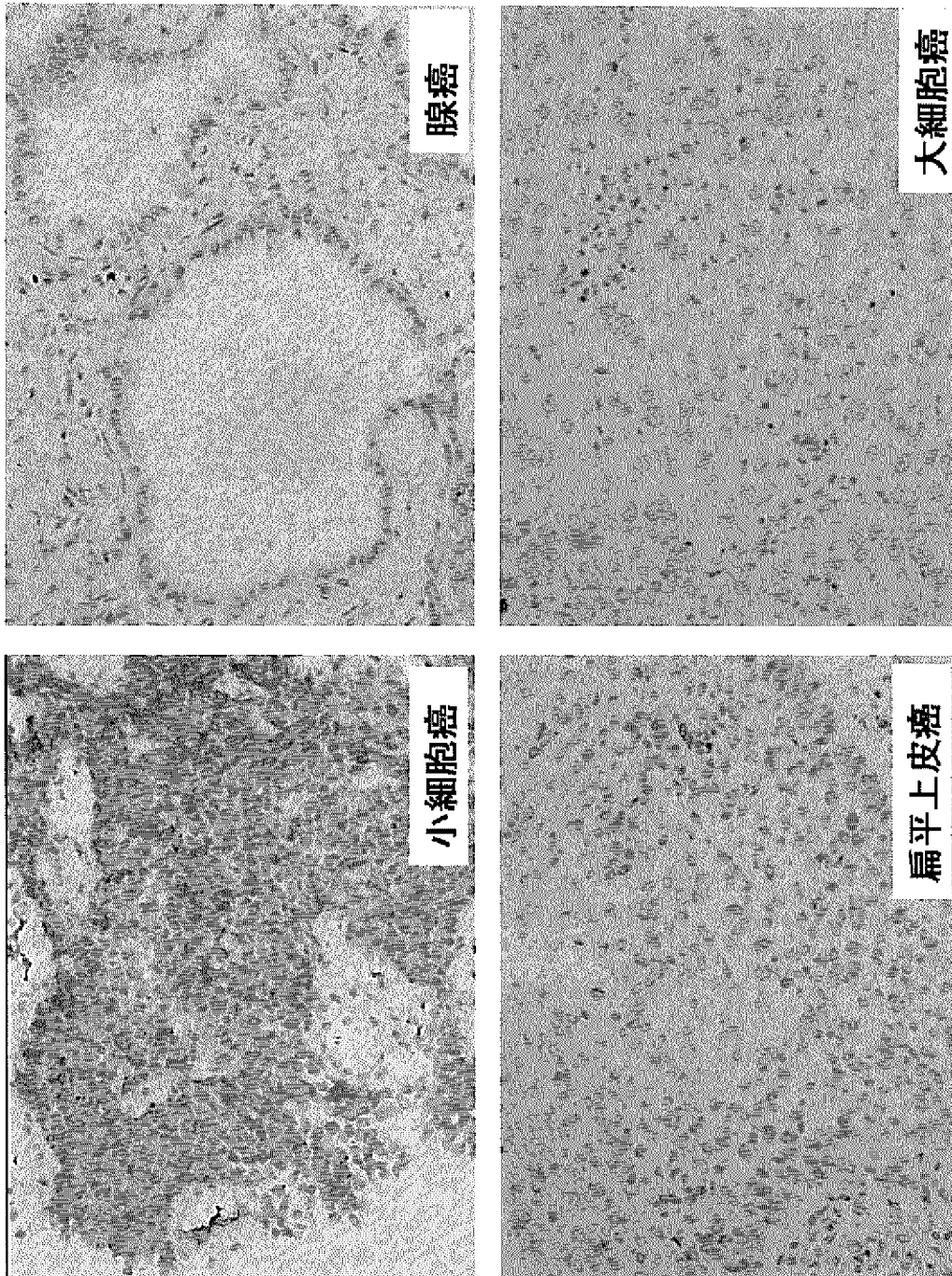


[圖6]

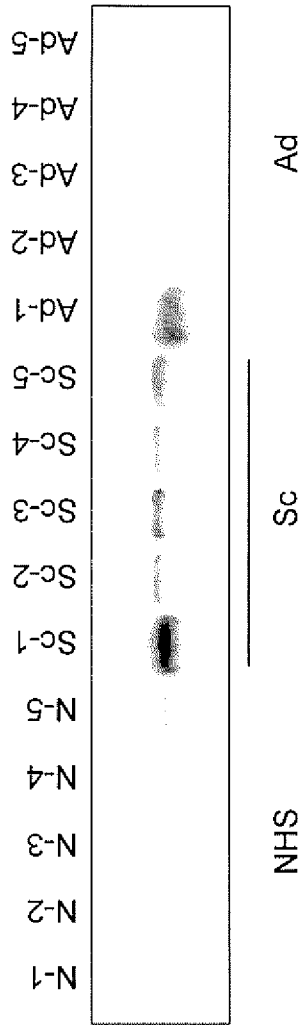
抗Secretogranin III抗体



[圖7]

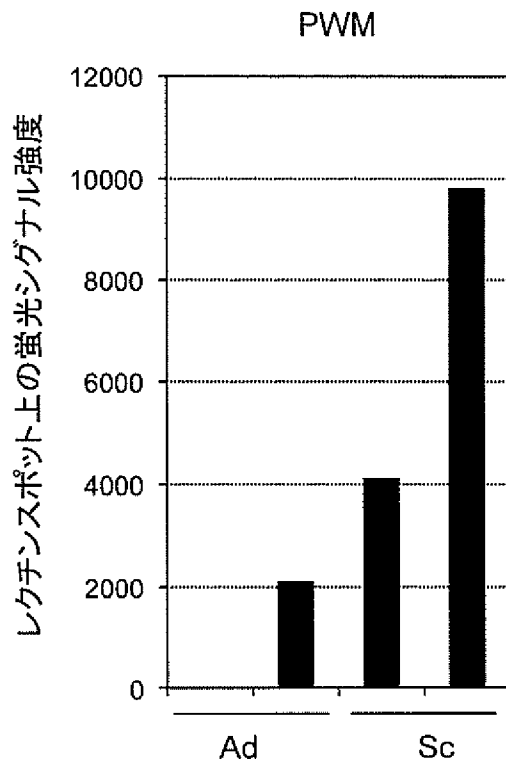


[8]

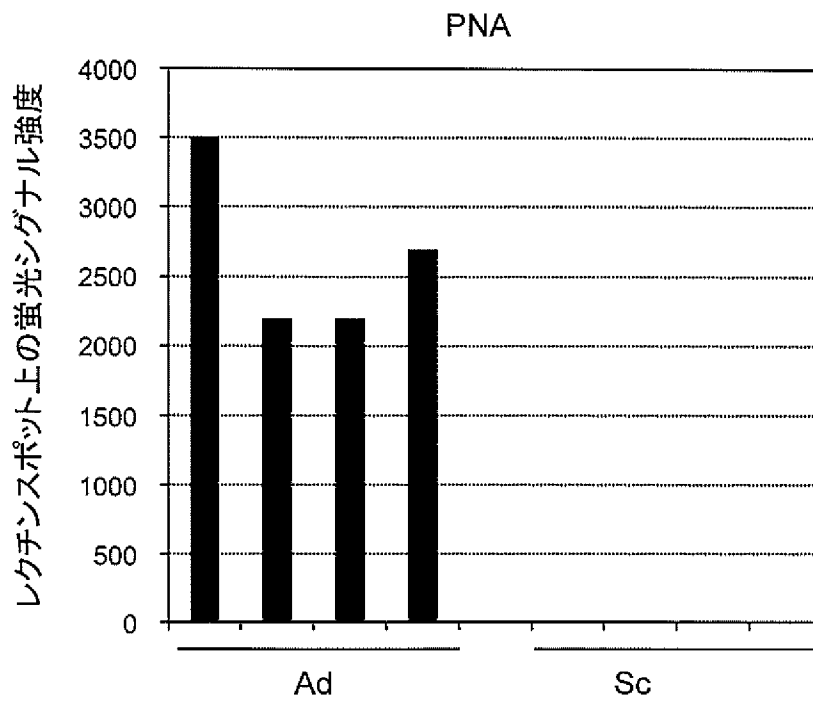


抗Secretogranin III抗体

[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

C07K7/06, C07K7/08, C07K14/47, C07K14/705, C07K14/78, C07K14/82, C07K16/18, C07K16/28, C07K16/32, C07K16/40, C12N9/14, C12N9/16, C12N9/26, C12N9/64, C12Q1/02, 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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HERMANS M.M. et al., Human lysosomal alpha-glucosidase: functional characterization of the glycosylation sites., Biochem. J., 1993, Vol.289, Pt.3, p.681-686	1-3, 6, 19, 20
Y	Koji UEDA et al., "Haigan ni Okeru Tosa Hyoteki Shuyo Marker no Tansaku", Experimental Medicine, 2007, vol.25, no.17, pages 2747 to 2753	1-3, 6-11, 16-20
Y	NARIMATSU H. et al., A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics., FEBS J., 2010.01, Vol.277, No.1, p.95-105	1-3, 6-11, 16-20

 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
18 November, 2011 (18.11.11)Date of mailing of the international search report
29 November, 2011 (29.11.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070635

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KISHNANI P.S. et al., Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease., J. Pediatr., 2006, Vol.149, No.1, p.89-97	19,20
P,X	Jun IWAKI et al., "Haigan Tosa Biomaker Kaihatsu ni Muketa Koho Bunshi no Dotei Oyobi Hatsugen no Hikaku Kaiseki", Dai 83 Kai Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society · Dai 33 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Godo Taikai Shoroku CD, 2010.12 (received date), 3P-0018	1-3,6-11, 16-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070635

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

*C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i,
C07K14/705(2006.01)i, C07K14/78(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i,
C07K16/18(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i,
C07K16/40(2006.01)i, C12N9/14(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i,
C12N9/26(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12Q1/02(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/JP2011/070635

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.:
Claims 1-3, 6-11 and 16-20.

- 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070635

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

"Biochem. J., 1993, Vol. 289, Pt. 3, p.681-686" discloses human lysosomal α -glucosidase wherein Asn-140, -223, -470, -652, -882 and -952 are all glycosylated (see, for example, Abstract)

The aforesaid "human lysosomal α -glucosidase" is "acid alpha-glucosidase", i.e., protein #1 that is shown in [Table 1] in claim 1 of the present application.

The sugar addition sites of the aforesaid "human lysosomal α -glucosidase" involve the sugar addition sites shown in the row of protein #1 in [Table 1].

Thus, one of the glycoproteins relating to claim 1 of the present application is disclosed in "Biochem. J., 1993, Vol. 289, Pt. 3, p.681-686".

Therefore, the invention of claim 1 does not have "a special technical feature".

Accordingly, claims of the present application have the following 79 invention groups.

(Invention group 1)

Inventions relating to protein #1 (acid alpha-glucosidase) in [Table 1] (claims 1-3, 6-11 and 16-20).

(Invention groups 2-31)

Inventions relating respectively to proteins #2-31 in [Table 1].

(Invention groups 32-79)

Inventions relating respectively to proteins #1-48 in [Table 2].

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

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. C07K7/06, C07K7/08, C07K14/47, C07K14/705, C07K14/78, C07K14/82, C07K16/18, C07K16/28, C07K16/32, C07K16/40, C12N9/14, C12N9/16, C12N9/26, C12N9/64, C12Q1/02, 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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

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	HERMANS M.M. et al., Human lysosomal alpha-glucosidase: functional characterization of the glycosylation sites., Biochem. J., 1993, Vol.289, Pt. 3, p.681-686	1-3, 6, 19, 20
Y	植田幸嗣 他, 肺癌における糖鎖標的腫瘍マーカーの探索, 実験医学, 2007, Vol.25, No.17, p.2747-2753	1-3, 6-11, 16-20

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、一般的な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

18.11.2011

国際調査報告の発送日

29.11.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)

吉森 晃

4B

3633

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	NARIMATSU H. et al., A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics., FEBS J., 2010.01, Vol.277, No.1, p.95-105	1-3,6-11, 16-20
X	KISHNANI P.S. et al., Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease., J. Pediatr., 2006, Vol.149, No.1, p.89-97	19,20
P X	岩城隼 他, 肺癌糖鎖バイオマーカー開発に向けた候補分子の同定および発現の比較解析, 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会 合同大会 抄録CD, 2010.12 (受入日), 3P-0018	1-3,6-11, 16-20

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（PCT17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PCT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。

請求項 1-3, 6-11, 16-20

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。

発明の属する分野の分類

C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i,
C07K14/78(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i,
C07K16/32(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12N9/14(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i,
C12N9/26(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i

「Biochem. J., 1993, Vol.289, Pt.3, p.681-686」には、Asn-140, -223, -470, -652, -882, -952の全てがグリコシル化されたヒトリソソーマル α グルコシダーゼが開示されている(例えば、Abstractを参照)。

該「ヒトリソソーマル α グルコシダーゼ」は本願請求項1の[表1]のタンパク質#1の「acid alpha-glucosidase」である。

また、該「ヒトリソソーマル α グルコシダーゼ」の糖付加位置は、[表1]のタンパク質#1の行に記載された糖付加位置を含んでいる。

つまり、本願請求項1に係る糖タンパク質の1つが、「Biochem. J., 1993, Vol.289, Pt.3, p.681-686」に記載されている。

そうすると、該請求項1に係る発明は、「特別な技術的特徴」を有していない。

したがって、本願特許請求の範囲には、以下に示す79の発明群が含まれる。

(発明1)

[表1]のタンパク質#1 (acid alpha-glucosidase) に関する発明

(請求項1-3, 6-11, 16-20)

(発明2~31)

[表1]のタンパク質#2~31のそれぞれに関する発明

(発明32~79)

[表2]のタンパク質#1~48のそれぞれに関する発明