

(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
2022年7月21日(21.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/154037 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/000848
- (22) 国際出願日: 2022年1月13日(13.01.2022)
- (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 2021-004066 2021年1月14日(14.01.2021) JP
- (71) 出願人: 公立大学法人福島県立医科大学 (FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 Fukushima (JP).
- (72) 発明者: 千葉 英樹 (CHIBA Hideki); 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 公立大学法人福島県立医科大学内 Fukushima (JP). 小林 信 (KOBAYASHI Makoto); 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 公立大学法人福島県立医科大学内 Fukushima (JP). 杉本 幸太郎 (SUGIMOTO Kotaro); 〒9601295 福島県福島市光が丘一番地 公立大学法人福島県立医科大学内 Fukushima (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー3 2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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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: PROGNOSTIC BIOMARKER FOR CANCER

(54) 発明の名称: がんの予後バイオマーカー

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a biomarker for predicting the prognosis of a cancer patient and an antibody for detecting the biomarker. Provided is a biomarker for predicting the prognosis of a cancer patient, said biomarker comprising liver receptor homolog 1 in which the serine residue at the position 510 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 is phosphorylated (pSer510-LRH1).

(57) 要約: がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー、及び当該バイオマーカーを検出するための抗体を提供することである。配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) からなる、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカーを提供する。



WO 2022/154037 A1

明 細 書

発明の名称： がんの予後バイオマーカー

技術分野

[0001] 本発明は、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー、がん患者の予後を予測するための抗体、がん患者の予後を予測するための方法、及びがんの抑制剤又は治療剤をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002] わが国において、がんは死亡原因全体の中で最も多く、約3割を占めている。

部位別では、膵がん、肝がん、及び肺がんは、日本国内及び世界において死亡数の上位を占めている（非特許文献1～5）。これらのがんは、いずれも転移率及び再発率が高く、予後不良な症例が多いことから、代表的な難治性がんとされている。特に膵がんは、早期発見が困難な上に進行が早いため、その5年生存率は約10%と極めて低い。また、肝がんでは生活習慣病を背景とする非アルコール性脂肪性肝疾患を原因とする症例が増加しており、2030年における死亡数は年間約100万人に達すると試算されている。しかし、肝がんに対する既存の分子標的薬の効果は、全生存期間の1～3か月の延長にとどまり、その効果は限定的である。したがって、難治性がんの診断及び治療を可能とする新たな方法の開発が必要とされている（非特許文献1～2）。

[0003] 一方、大腸がん、前立腺がん、及び乳がんは、比較的予後良好な悪性腫瘍である。しかしながら、これらのがんは患者の総数が多く、予後不良な症例が少なからず存在する。したがって、がん患者の中から、悪性度が高く、浸潤、転移、及び再発能の高い、予後不良ながんを選別する方法が必要とされている（非特許文献6～8）。

[0004] よって、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー、及びがん治療のための創薬標的の同定が囑望されている。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1 : Mizrahi, JD, et al., Lancet, 2020, 395:2008-2020.
非特許文献2 : Ryan, DP, et al., N Engl J Med, 2014, 371:1301-1314.
非特許文献3 : Forner, A, et al., Lancet, 2018, 391:2008-2020.
非特許文献4 : Villanueva, A, N Engl J Med, 2019, 380:1450-1462.
非特許文献5 : Hirsch, FR, et al., Lancet, 2017, 389:299-311.
非特許文献6 : Gazder, AF, Nat Rev Cancer, 2017, 37:725-737.
非特許文献7 : Attard, G, et al., Lancet, 2016, 387:70-82
非特許文献8 : Harbeck, N, and Grant, M, Lancet, 2017, 389:1134-1150.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の目的は、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー、及び当該バイオマーカーを検出するための抗体を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0007] 肝臓受容体ホモログ1 (Liver receptor homolog-1 ; LRH-1 ; LRH1)は、核内受容体サブファミリー5グループAメンバー2 (Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 2 ; NR5A2) と呼ばれ、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子である。LRH1/NR5A2の発現異常や遺伝子変異は、膵がん、肝がん、肺がん、大腸がん、前立腺がん、乳がん等、様々ながん腫の増悪と関連することが知られている (Benod, C, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108:16926-16931. ; Bianco, S, et al., Cancer Res, 2014, 74:2015-2025. ; Bayrer, JR, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112:2467-2472. ; Xu, P, et al., Genes Dev, 2016, 30:1450-1462. ; Bailey, P, et al., Nature, 2016, 531:47-52. ; Coho, I, et al., Nature, 2018, 554:533-537.)。しかしながら、LRH1/NR5A2がその発現異常や遺伝子変異以外でがんと関連する機序は知られていない。
- [0008] 本発明者らは、がんの予後を予測するための新たなバイオマーカーを求め

て鋭意研究を行った。その結果、LRH1における510位のセリン残基 (Ser510) のリン酸化が、がんの悪性度を判定し、予後を予測するための有効なバイオマーカーとなり得ることを見出した。特に、Ser510のリン酸化は、悪性度の高いがんの浸潤先進部において強く検出された。さらに、Ser510がリン酸化されたLRH1 (pSer510-LRH1) を特異的に検出することができる抗体 (抗pSer510-LRH1抗体) を開発し、本発明を完成させるに至った。本発明は、当該知見に基づくものであって以下を提供する。

- [0009] (1) 配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) からなる、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー。
- (2) 前記がんが肝臓がん、膵臓がん、肺がん、食道がん、腎臓がん、卵巣がん、胃がん、大腸がん、前立腺がん、又は乳がんである、(1)に記載のバイオマーカー。
- (3) がん患者の予後を予測するための抗pSer510-LRH1抗体又はその断片。
- (4) 前記抗pSer510-LRH1抗体又はその断片が、配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号7で示すアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、(3)に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片。
- (5) 前記抗pSer510-LRH1抗体又はその断片が配列番号8で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号9で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、(4)に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片。
- (6) (1) 又は (2) に記載のバイオマーカーを検出するための、(3) ~ (5) のいずれかに記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片を含む、がん患者の予後を予測するためのキット。
- (7) 配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) の、がん患者の予後を予測

するためのバイオマーカーとしての使用。

(8) がん患者の予後を予測するための方法であって、がん患者に由来する試料において、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の配列番号1で示すアミノ酸配列における510位のセリン残基のリン酸化を検出する検出工程を含み、ここで、前記試料が前記リン酸化について陽性である場合、がん患者の予後が悪いことを示す、方法。

(9) 前記リン酸化は(3)～(5)のいずれかに記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片を用いて検出される、(8)に記載の方法。

(10) がんの抑制剤又は治療剤をスクリーニングする方法であって、配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列における510位のセリン残基がリン酸化される肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) を発現する細胞を被験物質で処置する工程、前記リン酸化を測定する工程、及び被験物質で処置しない場合と比較して前記リン酸化が減少する場合に被験物質をがんの抑制剤又は治療剤として同定する工程を含む方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-004066号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー、及び当該バイオマーカーを検出するための抗体を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) の抗原特異性を示す図である。(A)LRH1S510Eを導入したHEK293T細胞に対する、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) を用いた免疫染色の結果を示す。(B)Ser510がリン酸化されている抗原ペプチドによる吸着後の免疫染色の結果を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図2]抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) と抗原ペプチドとの濃度依存性反応を示す図である。Ser510がリン酸化されている抗原ペプチド (リン酸化LRH1ペプチド)、Ser510がリン酸化されていない抗原

ペプチド（非リン酸化LRH1ペプチド）、及び抗原ペプチド無しの陰性対照（トリス塩酸緩衝液）の結果（平均値、n=3）を示す。

[図3]抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）による抗体反応における抗原ペプチドの脱リン酸化処理の影響を示す図である。Ser510がリン酸化されている抗原ペプチド（リン酸化LRH1ペプチド）、及びSer510がリン酸化されていない抗原ペプチド（非リン酸化LRH1ペプチド）の各々について、脱リン酸化処理有り（+）／無し（-）の2条件における結果（平均値、n=3）を示す。

[図4]抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。

[図5]膵がん組織及び肝がん組織における免疫組織化学染色の結果を示す図である。(A)膵がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。(B)肝がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図6]膵がん組織及び肝がん組織におけるpSer510-LRH1染色性の半定量化の結果を示す図である。図の左側は、膵がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色について、染色性をAllredスコアにより半定量化した結果を示す。図の右側は、肝がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色について、染色性をAllredスコアにより半定量化した結果を示す。

[図7]肺がん組織における免疫組織化学染色の結果を示す図である。(A)肺腺癌組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。(B)肺扁平上皮癌組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。いずれも左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例を示す。(C)肺腺癌組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の別の例を示す。図7C-a及び図7C-bは、それぞれ浸潤先進部及び腫瘍実質内部の拡大図を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図8]抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）による免疫染色における脱リン酸化処理の影響を示す図である。代表的なヒト膵癌細

胞株 (AsPC1、HPAFII、及びPANC1) のセルブロックをホルマリン固定パラフィン包埋した切片について、脱リン酸化処理有り (+) / 無し (-) の2条件で免疫染色した結果を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図9]膵がん組織における免疫組織化学染色の結果を示す図である。(A)膵がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例を示す。(B)膵がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の別の例を示す。図9B-a及び図9B-bは、それぞれ浸潤先進部及び腫瘍実質内部の拡大図を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図10]肝がん組織における免疫組織化学染色の結果を示す図である。(A)肝がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例 (図5B再掲) を示す。(B)肝がん組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の別の例を示す。図7B-a及び図7B-bは、それぞれ浸潤先進部及び腫瘍実質内部の拡大図を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図11]肺扁平上皮癌組織における免疫組織化学染色の結果を示す図である。(A)肺扁平上皮癌における抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例を示す。(B)肺扁平上皮癌における抗pSer510-LRH1免疫染色の別の例を示す。図11B-a及び図11B-bは、それぞれ浸潤先進部及び腫瘍実質内部の拡大図を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図12]正常組織 (非がん部正常組織) においてpSer510-LRH1が検出されなかった結果を示す図である。(A)肺の正常組織 (肺がんの周囲正常組織) におけるHE (Hematoxylin-Eosin)染色と抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。(B)肝臓の正常組織 (肝がんの周囲正常組織) におけるHE染色と抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。(C)膵臓及び十二指腸の正常組織 (膵がんの周囲正常組織) におけるHE染色と抗pSer510-LRH1免疫染色の結果を示す。スケールバーは100 μm を示す。

[図13]低pSer510-LRH1群の肝がん患者（96症例）及び高pSer510-LRH1群（31症例）の肝がん患者における無再発生存率のカプランマイヤー曲線を示すグラフである。

[図14]臨床病理学的解析による肝がん患者の予後（DFS）に関する単変量解析及び多変量解析の結果を示す図である。表中の最終行に示されるpSer510-LRH1は、独立した予後不良因子であることが示された。

発明を実施するための形態

[0012] 1. がん患者の予後予測用バイオマーカー

1-1. 概要

本発明の第1の態様は、がん患者の予後予測用バイオマーカーである。本発明のバイオマーカーは、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基（本明細書において「Ser510」と表記する）がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1（本明細書において「pSer510-LRH1」等と表記する）である。悪性度の高いがんにおいてリン酸化され得るSer510のリン酸化をバイオマーカーとして使用することで、がんの悪性度の判定や予後の予測を行うことが可能となる。

[0013] 1-2. 定義

本明細書において、「がん」の種類は限定しないが、例えば、腺がん、扁平上皮がん、小細胞がん及び大細胞がん等が挙げられる。具体的ながんの種類としては、例えば、悪性黒色腫、口腔がん、喉頭がん、咽頭がん、甲状腺がん、肺がん、乳がん、食道がん、胃がん、大腸がん（結腸がん及び直腸がんを含む）、小腸がん、膀胱がん、前立腺がん、精巣がん、子宮体がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、胃がん、腎がん、肝がん、膵がん、胆道がん（胆嚢がん及び胆管がんを含む）、脳腫瘍、頭頸部がん、中皮腫、骨肉腫、神経膠腫、神経芽腫を始めとする小児腫瘍、白血病、リンパ腫等が挙げられる。がんは、好ましくは肝臓がん、膵臓がん、肺がん、食道がん、腎臓がん、卵巣がん、胃がん、大腸がん、前立腺がん、又は乳がんである。

[0014] 本明細書において、「予後」は、がん治療（例えば、手術、化学療法（薬

物療法)、又は放射線治療等)後の、腫瘍量の低減、腫瘍増殖の抑制、又は疾患の経過(例えば、再発の有無、転移の有無、治療後の生存期間の長さ、生死等)をいう。「予後の予測」は、再発リスク(例えば無再発生存率)、転移リスク、生存期間、手術から一定期間後(例えば、1年、2年、3年、4年、5年、10年、15年若しくは20年後又はそれ以上の時点)の生存率、無再発生存率(Relapse-free survival、RFS)、又は疾患特異的生存率(Disease-free survival、DFS)の予測であってもよい。一実施形態において、予後の予測は、再発リスク(例えば無再発生存率)の予測又は転移リスクの予測を含む。なお、本明細書において無再発生存率は、初発がんに関連付けられるがん等の再発がん発症のない患者の割合であり、疾患特異的生存率は、初発がんに関連する死亡のない患者の割合を意味する。予後の予測は、予後の判定、評価、診断、又はこれらの補助ということもできる。

[0015] 本明細書において「判定」とは、がんの悪性度を判定することをいう。特にがんに罹患している被検体(がん患者)において、がんの悪性度を判定することをいう。

[0016] 本明細書において、「がん患者」は、例えば哺乳動物、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。

[0017] 本明細書において「悪性度」とは、がんの周囲組織への浸潤、他臓器への転移、及び/又は再発能の程度等をいう。より具体的には、がん細胞の増殖能及び/又は遊走能を意味する。がんの悪性度を判定することによって、予後を予測し、浸潤、転移、及び再発能の高い予後不良例を選別することが可能となる。本明細書において、悪性度の判定には予後の予測も含まれる。

[0018] 本明細書において「がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー(がん患者の予後予測用バイオマーカー)」とは、がんの予後を予測する、又はがんの予後を示すことができるバイオマーカーをいう。具体的には、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基(Ser510)がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1(pSer510-LRH1)である。

[0019] 「肝臓受容体ホモログ1(Liver receptor homolog-1;LRH-1;LRH1)」は、

核内受容体サブファミリー5グループAメンバー2 (Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 2 ; NR5A2) と呼ばれ、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子である。LRH1の内因性リガンドは同定されていない。LRH1の発現異常や遺伝子変異は、膵がん、肝がん、肺がん、大腸がん、前立腺がん、乳がん等、様々ながん腫の増悪と関連することが知られている。LRH1の具体例として、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるヒトLRH1が挙げられる。本明細書においては、LRH1は、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基 (Ser510) を含む限り、アイソフォーム等は特に限定しない。本明細書においてLRH1は原則としてヒト由来のLRH1タンパク質を示すが、配列番号1で示すアミノ酸配列に対して80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、若しくは99%以上の同一性を有するか、又は配列番号1で示すアミノ酸配列に対して1又は複数個のアミノ酸が付加、欠失、若しくは置換された変異型LRH1タンパク質を含むものとする。また、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるヒトLRH1と同等の活性を有する他生物種のLRH1オルソログも包含される。

[0020] 本明細書において「配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基」(本明細書において「Ser510」又は「S510」等と表記する)とは、配列番号1で示すアミノ酸配列の全長における510位のセリン残基だけでなく、任意のLRH1若しくはその任意のペプチド断片においてそれに対応するセリン残基(例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列の部分配列からなるペプチド断片においてそれに対応するセリン残基等)を包含する。配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基は、好ましくはAKT/SGKリン酸化コンセンサス配列中でリン酸化されるセリン残基である。また、リン酸化されているSer510(リン酸化Ser510)を「pSer510」又は「pS510」等と表記する。なお、リン酸化されていないSer510を特にリン酸化Ser510と区別する場合には、「non-pSer510」又は「non-pS510」等と表記する。

[0021] 本明細書において「配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1」(本明細書において「pSer

510-LRH1」、「pS510-LRH1」、若しくは「リン酸化LRH1(Ser510)」、又は「pSer510-NR5A2」、「pS510-NR5A2」、若しくは「リン酸化NR5A2(Ser510)」等と表記する)とは、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化された、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるLRH1だけでなく、それに対応するセリン残基がリン酸化された任意のLRH1(当該セリン残基がリン酸化された、配列番号1以外のアミノ酸配列からなるLRH1)若しくはその任意のペプチド断片を包含する。なお、LRH1の上記Ser510以外のリン酸化の有無等については特に問わない。

[0022] 本明細書において「被検体」とは、試料を提供し、検査に供されるヒト個体をいう。原則として個体であるが、本明細書では、時としてヒト由来の組織や細胞も包含し得る。また、個体は、健常体のみならず、何らかの疾患(例えば悪性腫瘍)を有する患者、又は疾患(例えば悪性腫瘍)の罹患可能性のある個体のいずれであってもよい。

[0023] 本明細書において「健常体」とは、特定のがんに罹患していないヒト個体、好ましくはいかなるがんにも罹患していないヒト個体、より好ましくはいずれの疾患にも罹患していない健常状態にあるヒト個体をいう。ただし、本明細書では健常ヒト細胞も広義の健常体を含むものとする。したがって、個体レベルのみならず、例えば、がん患者から採取した組織のうちの正常部分のように、細胞レベルで健常状態であれば健常体と称することとする。

[0024] 本明細書において「浸潤先進部」とは、浸潤するがんの一部であって、正常組織との境界に接する部分を意味する。

[0025] 本明細書において「複数個」とは、例えば、2~50個、2~40個、2~30個、2~20個、2~18個、2~16個、2~14個、2~12個、2~10個、2~8個、2~7個、2~6個、2~5個、2~4個又は2~3個をいう。また、本明細書において「アミノ酸同一性」とは、比較する2つのアミノ酸配列の全アミノ酸残基数における一致したアミノ酸残基数の割合(%)をいう。具体的には、2つのアミノ酸配列を整列(アラインメント)し、必要に応じ、一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このとき、1ギャップは、1アミノ酸残基として全アミノ酸残

基数にカウントする。アミノ酸配列の整列化は、例えば、Blast、FASTA、ClustalW等の既知プログラムを用いて行うことができる (Karlin, S. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 ; Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410 ; Pearson, W. R. et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448) 。比較する2つのアミノ酸配列間で全アミノ酸残基数が異なる場合には、長い方を全アミノ酸残基数とする。比較する2つのアミノ酸配列においてアミノ酸一致度が最も高くなるようにしたときの同一アミノ酸残基数を全アミノ酸残基数で除して算出される。

[0026] 本明細書において「(アミノ酸の)置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群 (Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr) 、分枝鎖アミノ酸群 (Leu, Val, Ile) 、中性アミノ酸群 (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro) 、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群 (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys) 、酸性アミノ酸群 (Asp, Glu) 、塩基性アミノ酸群 (Arg, Lys, His) 、芳香族アミノ酸群 (Phe, Tyr, Trp) 内での置換が挙げられる。これらの群内でのアミノ酸置換であれば、ペプチドの性質に変化を生じにくいことが知られているため好ましい。

[0027] 1-3. 構成

本発明のがん患者の予後予測用バイオマーカーは、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基のリン酸化、又は配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) からなる。

[0028] 本発明のがん患者の予後予測用バイオマーカーは、任意のがんに罹患したがん患者の予後予測に使用することができる。

[0029] 一実施形態において、本発明のがん患者の予後予測用バイオマーカーは、肝臓がん、膵臓がん、肺がん、食道がん、腎臓がん、卵巣がん、胃がん、大腸がん、前立腺がん、又は乳がんの予後予測に使用される。

[0030] 1-4. 効果

本発明のがん患者の予後予測用バイオマーカを使用することで、がん患者の予後を高い精度で予測することができる。例えば、がん患者の再発リスク、及び／又は転移リスクを判定することができる。このことによって、がんの中から浸潤、転移、及び／又は再発能の高い予後不良例を選別することが可能となる。

[0031] 本発明のがん患者の予後予測用バイオマーカによれば、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基のリン酸化、又は配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) の、がん患者の予後予測用バイオマーカとしての使用が提供される。

[0032] 2. がん患者の予後を予測するための抗pSer510-LRH1抗体又はその断片

2-1. 概要

本発明の第2の態様は、がん患者の予後を予測するための抗pSer510-LRH1抗体又はその断片である。本発明の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片は、悪性度の高いがんにおいてリン酸化され得るSer510のリン酸化を検出することによって、被検体におけるがんの予後を予測することができる。

[0033] 2-2. 構成

(抗pSer510-LRH1抗体)

「抗pSer510-LRH1抗体」(以下、「抗リン酸化LRH1(Ser510)抗体」、「抗pSer510-NR5A2抗体」、「抗リン酸化NR5A2(Ser510)抗体」等と表記する)とは、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) 又は当該リン酸化セリン残基を含むその断片(以下、「pSer510-LRH1又はその断片」と表記する)に対して免疫応答性を示す抗体をいう。本発明の抗pSer510-LRH1抗体は、好ましくは配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されていない肝臓受容体ホモログ1(以下、「Ser510非リン酸化LRH1」、「non-pSer510-LRH1」、「non-pS510-LRH1」等と表記する)又は当該非リン酸化セリン

残基を含むその断片（以下、「non-pSer510-LRH1又はその断片」等と表記する）と比較してpSer510-LRH1又はその断片に対して優先的に結合する抗体であり、より好ましくは、non-pSer510-LRH1又はその断片と比較してpSer510-LRH1又はその断片に対して特異的に結合する抗体である。

- [0034] 本発明の抗pSer510-LRH1抗体の由来生物種は、特に限定しない。好ましくは鳥類及び哺乳動物由来の抗体である。例えば、ニワトリ、ダチョウ、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、又はヒト等が挙げられる。
- [0035] 本発明の抗pSer510-LRH1抗体は、pSer510-LRH1を認識し、免疫応答性を示す抗体である限り、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよい。好ましくは抗体価が安定しているモノクローナル抗体である。
- [0036] 本明細書において「ポリクローナル抗体」とは、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することのできる異なる複数種の免疫グロブリン群をいう。
- [0037] また、本明細書において「モノクローナル抗体」とは、フレームワーク領域（Framework region：以下、「FR」と表記する）及び相補性決定領域（Complementarity determining region：以下、「CDR」と表記する）を含み、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することのできる単一種の免疫グロブリン、又は免疫グロブリンに含まれる少なくとも1組の軽鎖可変領域（ V_L 領域）及び重鎖可変領域（ V_H 領域）を包含する組換え抗体又は合成抗体をいう。
- [0038] 抗pSer510-LRH1抗体が免疫グロブリン分子で構成される場合、免疫グロブリンは任意のクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD、及びIgY）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）とすることができる。
- [0039] 本発明の抗pSer510-LRH1抗体が認識するpSer510-LRH1のエピトープは、pSer510-LRH1又はその断片に特有なエピトープである。そのようなエピトープは、non-pSer510-LRH1又はその断片と比較してpSer510-LRH1又はその断片に優先的に（好ましくは特異的に）存在するエピトープ（例えば、non-pSer510-L

RH1又はその断片に含まれていないエピトープ) である限り、そのエピトープの位置は特に限定しない。本発明の抗pSer510-LRH1抗体が認識するエピトープは、pSer510のリン酸基を含むエピトープ、又はpSer510のリン酸基を含まないエピトープ(例えば、リン酸化に伴うタンパク質のコンホメーション変化の結果として生じるエピトープであってリン酸基を含まない構造からなるもの) のいずれであってもよいが、pSer510のリン酸基を含むエピトープであることが好ましい。

[0040] 上記エピトープを認識する抗pSer510-LRH1抗体の具体例として、後述する実施例のラット抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55(FMU-P2-C2)が挙げられる。このFMU-P2-C2抗体は、重鎖可変領域が配列番号8で示すアミノ酸配列からなり、また軽鎖可変領域が配列番号9で示すアミノ酸配列からなる。Kabatのルール (Kabat E.A., et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Vol.1, eds. 5, NIH publication) によれば、FMU-P2-C2抗体の重鎖可変領域において、CDR1は配列番号2で示すアミノ酸配列からなり、CDR2は配列番号3で示すアミノ酸配列からなり、CDR3は配列番号4で示すアミノ酸配列からなる。また、FMU-P2-C2抗体の軽鎖可変領域において、CDR1は配列番号5で示すアミノ酸配列からなり、CDR2は配列番号6で示すアミノ酸配列からなり、CDR3は配列番号7で示すアミノ酸配列からなる。配列番号2~9のアミノ酸配列を以下の表1に示す。

[0041]

[表1]

表 1.ラット抗 pSer510-LRH1 モノクローナル抗体クローン 55(FMU-P2-C2)における可変領域のアミノ酸配列

配列名	配列番号	配列
重鎖 CDR1	配列番号 2	AASGFTFADFYMS
重鎖 CDR2	配列番号 3	FIRNKAKSYTTE
重鎖 CDR3	配列番号 4	AKHERGGAGDY
軽鎖 CDR1	配列番号 5	QASQDIGNWLT
軽鎖 CDR2	配列番号 6	YSATSLAD
軽鎖 CDR3	配列番号 7	LQRYSNPLT
重鎖可変領域	配列番号 8	EVKLVESSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADFYMSWIRQSPG KAPWLSFIRNKAKSYTTEYNPSVKGRFTISRDDTQNVLYLQ MNTLRAEDTAIYYCAKHERGGAGDYWGQGVMTVSL
軽鎖可変領域	配列番号 9	DIQMTQSPASLSASPEEIVTITCQASQDIGNWLTWYQQKPGK SPQLLIYSATSLADGIPSRFSGRSRGTQYSLKISRLQVEDTG IYYCLQRYSNPLTFGSGTKLEIK

[0042] なお、FMU-P2-C2抗体の重鎖可変領域に相当する前記配列番号8で示すアミノ酸配列をコードする核酸（ヌクレオチド）として、例えば、配列番号10で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。また、FMU-P2-C2抗体の軽鎖可変領域に相当する前記配列番号9で示すアミノ酸配列をコードする核酸として、例えば、配列番号11で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。さらに、上記FMU-P2-C2抗体における重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3をコードする塩基配列として、例えば、それぞれ配列番号12、13、及び14で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。また、上記FMU-P2-C2抗体における軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3をコードする塩基配列として、例えば、それぞれ配列番号15、16、及び17で示す塩基配列からなる核酸が挙げられる。

[0043] 「組換え抗体」とは、キメラ抗体、又はヒト化抗体をいう。「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の抗体のアミノ酸配列を組み合わせることで作製される抗体で、ある抗体の定常領域（C領域）を他の抗体のC領域で置換した抗体である。例えば、ラットモノクローナル抗体のC領域をヒト抗体のC領域と置き換えた抗体が該当する。具体的な例を挙げると、任意の抗原に対するヒト抗体の重鎖可変領域を前述のFMU-P2-C2抗体における配列番号8で示すアミノ酸配

列からなる重鎖可変領域と置換し、またヒト抗体の軽鎖可変領域を配列番号9で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域と置換してなる抗体が挙げられる。これによりヒト体内における当該抗体に対する免疫反応を軽減し得る。「ヒト化抗体」とは、ヒト抗体におけるCDRをヒト以外の哺乳動物由来の抗体におけるCDRと置換したモザイク抗体である。免疫グロブリン分子の可変領域（V領域）は、4つのFR（FR1、FR2、FR3及びFR4）と3つのCDR（CDR1、CDR2及びCDR3）がN末端側からFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で連結されて構成されている。このうちFRは可変領域の骨格を構成する相対的に保存された領域であり、CDRが抗体の抗原結合特異性に直接寄与する。ヒト化抗体は、例えば、ラット由来の抗pSer510-LRH1抗体の軽鎖又は重鎖における一組のCDR1、CDR2及びCDR3を任意の抗原に対するヒト抗体の軽鎖又は重鎖における一組のCDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換することによって、ラット抗pSer510-LRH1抗体の抗原結合特異性を受け継いだヒト抗体として構築することができる。具体的な例を挙げると、前述のFMU-P2-C2抗体における重鎖由来の配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR3をヒト抗体の重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換し、また前述のFMU-P2-C2抗体における軽鎖由来の配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号7で示すアミノ酸配列からなるCDR3をヒト抗体の軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換してなる抗体が挙げられる。このようなヒト化抗体は、CDR以外はヒト抗体由来であることからヒト体内における当該抗体に対する免疫反応をキメラ抗体以上に軽減し得る。

[0044] 「合成抗体」とは、化学的に又は組換えDNA法を用いることによって合成した抗体をいう。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体が挙げられる。具体的には、例えば、scFv（single chain Fragment of variable region：単鎖抗体）、ダイアボディ（diabody）、トリアボディ（triabody）又はテトラボディ（tetrabody）等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、機能的な抗原結合部位を形成する一組の可変領域（軽鎖可変領域 V_L 及び重鎖

可変領域 V_H)は、軽鎖と重鎖という別々のポリペプチド鎖上に位置する。scFvは、免疫グロブリン分子において、 V_L 及び V_H を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖に包含した構造を有する分子量約35 kDa以下の合成抗体である。scFv内において1組の可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。scFvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてベクターに組み込み、発現させることで得ることができる。ダイアボディは、scFvの二量体構造を基礎とした構造を有する分子である(Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。例えば、上記リンカーの長さが約12アミノ酸残基よりも短い場合、scFv内の2つの可変領域は自己集合できないが、2つのscFvを相互作用させてダイアボディを形成させることにより、一方のscFvの V_L が他方のscFvの V_H と集合可能となり、2つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。さらに、scFvのC末端にシステイン残基を付加させることにより、2本のscFvどうしのジスルフィド結合が可能となり、安定的なダイアボディを形成させることもできる。このようにダイアボディは二価の抗体断片である。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様にscFv構造を基本とした、その三量体、及び四量体構造を有する、それぞれ、三価、及び四価の抗体である。ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディは、多重特異性抗体であってもよい。「多重特異性抗体」とは、多価抗体、すなわち抗原結合部位を一分子内に複数有する抗体において、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する抗体をいう。例えば、ダイアボディにおいて、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する二重特異性抗体(Bispecific抗体)が挙げられる。具体的には、例えば、本発明の抗pSer510-LRH1抗体であれば、一方の抗原結合部位がpSer510と結合し、他方の抗原結合部位がpSer510以外のpSer510-LRH1上のエピトープと結合するダイアボディが該当する。

[0045] 本発明の抗pSer510-LRH1抗体は、修飾することもできる。ここでいう「修飾」とは、グリコシル化のような抗原特異的結合活性に必要な機能上の修飾

や抗体検出に必要な標識上の修飾を含む。

[0046] 抗pSer510-LRH1抗体上のグリコシル化修飾は、標的であるpSer510-LRH1に対する抗pSer510-LRH1抗体の親和性を調整するために行われる。具体的には、例えば、抗pSer510-LRH1抗体のFRにおいて、グリコシル化を構成するアミノ酸残基に置換を導入してグリコシル化部位を除去することで、その部位のグリコシル化を喪失させる改変等が挙げられる。

[0047] 抗pSer510-LRH1抗体の標識には、例えば、蛍光色素（FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、放射性同位元素（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S ）又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンによる標識が挙げられる。

[0048] 本発明の抗pSer510-LRH1抗体は、pSer510-LRH1タンパク質との解離定数が、 10^{-7} M以下であることが好ましく、例えば 10^{-8}M 以下の高い親和性を有することが好ましく、より好ましくは 10^{-9}M 以下、特に好ましくは 10^{-10} M以下である。上記解離定数は、当該分野で公知の技術を用いて測定することができる。例えば、Biacoreシステム（GE Healthcare社）により速度評価キットソフトウェアを用いて測定してもよい。

[0049] （その断片）

本明細書において「その断片」とは、抗pSer510-LRH1抗体の一部からなり、かつ抗pSer510-LRH1抗体と同様にpSer510-LRH1に対して免疫応答性を示す抗体断片をいう。例えば、Fab、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 Fab' 等が該当する。

[0050] Fabは、IgG分子がパパインによってヒンジ部のジスルフィド結合よりもN末端側で切断されて生じる抗体断片であって、H鎖定常領域（重鎖定常領域：以下 C_H と表記する）を構成する3つのドメイン（ $\text{C}_\text{H}1$ 、 $\text{C}_\text{H}2$ 、 $\text{C}_\text{H}3$ ）のうち V_H に隣接する $\text{C}_\text{H}1$ と V_H 、及び完全長のL鎖から構成される。

[0051] $\text{F}(\text{ab}')_2$ は、IgG分子がペプシンによってヒンジ部のジスルフィド結合よりもC末端側で切断されて生じる Fab' の二量体である。 Fab' は、Fabよりもヒンジ部を含む分だけH鎖が若干長いが実質的にはFabと同等の構造を有する。 Fab'

は、 $F(ab')_2$ をマイルドな条件下で還元し、ヒンジ領域のジスルフィド連結を切断することによって得ることができる。これらの抗体断片は、いずれも抗原結合部位を包含していることから、抗原エピトープと特異的に結合する能力を有している。

[0052] 2-3. 抗pSer510-LRH1抗体の作製

本発明の抗pSer510-LRH1抗体は、当該分野の常法によって得ることができる。また、モノクローナル抗体のアミノ酸配列が明らかであれば、そのアミノ酸配列に基づいて、化学的合成法やDNA組換え技術を用いることによって調製することもできる。さらに、モノクローナル抗体は、その抗体を産生するハイブリドーマから得ることもできる。

[0053] 本発明の抗pSer510-LRH1抗体の免疫原として使用可能な抗原ペプチドは、pSer510-LRH1の中の、pSer510を含む任意の一部（以下、「pSer510-LRH1抗原ペプチド」と表記する）である。例えば、本発明の抗pSer510-LRH1抗体の免疫原として使用可能な抗原ペプチドは、配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基（Ser510）に対応するセリン残基を含むペプチドで、当該セリン残基がリン酸化されているペプチド、例えば、配列番号1で示すヒトLRH1タンパク質の502～515位（開始メチオニンを1位とする）に相当するアミノ酸配列（RLPEIRAISMQAEE、配列番号18）において、510位のセリンをリン酸化修飾し、N末端にシトシン（C）を付加したペプチドが挙げられる。pSer510-LRH1抗原ペプチドは、例えば、化学的合成法又はDNA組換え技術を用いて調製することができる。

[0054] 3. がん患者の予後予測用キット

3-1. 概要

本発明の第3の態様は、がん患者の予後予測用キットである。本発明のがん患者の予後予測用キットは、第2態様の抗pSer510-LRH1抗体又は免疫応答性を有するその断片を必須の構成要素として含み、pSer510-LRH1以外のがん患者の予後予測用バイオマーカー（以下、「他の予後予測用バイオマーカー」と称する）に対する抗体（以下、「他の予後予測用抗体」と称する）又は免疫

応答性を有するその断片を選択構成物として含む。

[0055] 3-2. 構成

(必須構成物)

本態様のがん患者の予後予測用キットは、第2態様の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片を必須の構成要素として含む。本発明のがん患者の予後予測用キットに含まれる抗pSer510-LRH1抗体は単一種であってもよいし、複数種であってもよい。

[0056] (選択構成物)

本態様のがん患者の予後予測用キットは、選択構成物として、1種類又は複数種類の他の予後予測用抗体又は免疫応答性を有するその断片をさらに含んでもよい。ここで、他の予後予測用抗体は、上記の抗pSer510-LRH1抗体と組み合わせて用いた場合にがんの予後予測の精度を向上し得るものであれば任意の抗体でよく、がんの任意の予後予測用バイオマーカーに対する抗体を使用することができる。

[0057] 本発明のがん患者の予後予測用キットは、がん患者の予後予測用バイオマーカーに対する抗体の他に、がんの予後予測に必要な他の試薬、例えば、バッファーや二次抗体、検出及び結果の判定に用いる説明書を含んでもよい。

[0058] 4. がん患者の予後予測方法

4-1. 概要

本発明の第4の態様は、がん患者の予後予測方法である。本発明のがん患者の予後予測方法は、がん患者由来の試料中のpSer510-LRH1を検出することによって、がん患者の予後を予測することができる。

[0059] 4-2. 方法

本発明のがん患者の予後予測方法は、必須工程として検出工程を含み、バイオマーカーの陽性/陰性の決定結果に基づいてがん患者の予後が示される。

[0060] (検出工程)

「検出工程」とは、がん罹患している被検体に由来する試料において、がん患者の予後予測用バイオマーカの量を測定し、その測定値に基づいて、当該バイオマーカが陽性であるか又は陰性であるかを決定（以下、「陽性／陰性の決定」と表記する）する工程である。

[0061] 本明細書において、「検出」という用語には、測定、定性、定量、及び半定量のいずれもが包含される。

[0062] 本明細書において「試料」とは、被検又は健常体若しくは健常体群から採取され、本態様のがん患者の予後予測方法に供されるものであって、例えば、組織又は細胞が該当する。ここでいう「組織」及び「細胞」は被検体のがん罹患している組織及び細胞（例えば、浸潤先進部の細胞）、並びに健常体における対応する組織及び細胞が該当する。例えば、肝臓、膵臓、肺、食道、腎臓、卵巣、胃、大腸、前立腺、又は乳房に由来する組織又は細胞が挙げられる。

[0063] 本態様の予後予測方法に供される試料は、がん罹患している被検体から生検により採取された、又は手術により切除された検体である。好ましくは、生検により採取された、又は手術により切除されたがんの一部（例えば、組織又は細胞）、より好ましくは浸潤先進部である。なお、これらの組織又は細胞は、ホルマリン固定後パラフィンに包埋されたもの（FFPE : Formalin-Fixed Paraffin Embedded)でもよい。本発明の方法の対象となる患者が患うがんのステージは限定しない。

[0064] 試料の採取は、生検又は手術による外科的摘出により組織又は細胞を入手すればよい。本態様の予後予測方法において必要となる試料の量は、特に限定するものではない。組織又は細胞であれば少なくとも10 μ g、好ましくは少なくとも0.1 mgあれば望ましいが、生検材料でも構わない。試料は、がん患者の予後予測用バイオマーカを検出可能なように、必要に応じて調製、処理することができる。例えば、試料が組織又は細胞であれば、ホモジナイズ処理や細胞溶解処理、遠心や濾過による夾雑物除去、プロテアーゼインヒビターの添加等が挙げられる。これらの処理の詳細についてはGreen & Sambr

ook, Molecular Cloning, 2012, Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pressに詳しく記載されており、参考にすればよい。

[0065] 本明細書において「がん患者の予後予測用バイオマーカの測定値」とは、具体的には、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) のSer510のリン酸化（以下、「Ser510リン酸化」と表記する）の測定値、又はpSer510-LRH1の測定値である。

[0066] 本明細書において「測定値」とは、バイオマーカの測定によって得られた測定値である。測定値は、試料中のタンパク質量をng（ナノグラム）や μg （マイクログラム）等の単位で表した絶対値であってもよいし、又は対照値に対する吸光度や標識分子による蛍光強度等で表した相対値であってもよく、或いは、試料中におけるバイオマーカの空間分布（例えば、染色パターン）から一定の計算式により算出されるスコア（点数）であってもよい。ここで対照値は、LRH1以外の任意のバイオマーカの測定値、non-pS510-LRH1の測定値、又はpSer510-LRH1とnon-pS510-LRH1を合わせたLRH1全体の測定値であってもよい。

[0067] 以下、本検出工程を構成する、（1）Ser510リン酸化の測定、及び（2）Ser510リン酸化の陽性／陰性の決定について説明する。

[0068] （1）Ser510リン酸化の測定

Ser510リン酸化を測定する方法は、Ser510のリン酸化レベルを測定する方法、又はpSer510-LRH1のタンパク質量を測定する方法である。Ser510リン酸化を測定する方法は、特に限定はしない。例えば、免疫学的検出法、アプタマー解析法、又は質量分析法等の公知の定量方法を利用できる。以下、各定量法について説明をする。

[0069] （a）免疫学的検出法

「免疫学的検出法」とは、標的分子と特異的に結合する抗体又はその結合断片を用いて、その標的分子を定量する方法である。免疫学的検出法には、例えば、酵素免疫測定法（ELISA法、EIA法を含む）、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、水

晶振動子マイクロバランス（QCM）法、免疫比濁法、ラテックス凝集免疫測定法、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応法、金コロイド法、キャピラリー電気泳動法、ウエスタンブロット法又は免疫組織化学法（免疫染色法）等が知られているが、本方法ではいずれの検出法を用いてもよい。限定はしないが、免疫組織化学法が好適である。

[0070] 免疫組織化学法を用いる場合には、Ser510のリン酸化レベルの定量方法、又はpSer510-LRH1のタンパク質定量方法は、限定しない。例えば、組織切片の染色パターンの観察に基づいて、一定の計算式を用いて算出されるスコアとして定量してもよい。限定しないが、一般にLRH1は核内で機能するため核内での染色量を定量してもよい。

[0071] 本工程の免疫学的検出に使用する抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよく、抗体を構成する免疫グロブリンは任意のクラス又は任意のサブクラスであってもよく、哺乳動物及び鳥を含めたいずれの動物由来でもよく、人為的に作製した抗体、例えば、組換え抗体、合成抗体、又は抗体断片であってもよい。これらの抗体の形態については、第2態様で説明されており、ここでの詳細な説明は省略する。

一実施形態において、本工程の免疫学的検出に使用する抗体は、第2態様に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片である。

[0072] (b) アプタマー解析法

「アプタマー解析法」は、立体構造によって標的物質と強固、かつ特異的に結合するアプタマーを用いて、標的分子であるがん患者の予後予測用バイオマーカータンパク質を定量する方法である。アプタマーは、その分子の種類により、核酸アプタマーとペプチドアプタマーに大別することができるが、いずれのアプタマーであってもよい。

[0073] 「核酸アプタマー」とは、核酸で構成されるアプタマーをいう。核酸アプタマーを構成する核酸は、DNA、RNA又はそれらの組合せのいずれであってもよい。必要に応じて、PNA、LNA/BNA、メチルホスホネート型DNA、ホスホリチオエート型DNA、2'-O-メチル型RNA等の化学修飾核酸を含むこともできる。

本発明であれば、抗pSer510-LRH1 RNAアプタマー又は抗pSer510-LRH1 DNAアプタマー等が挙げられる。

[0074] 核酸アプタマーは、pSer510-LRH1又はその一部を標的分子として、当該分野で公知の方法、例えば、SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)法を用いて作製することができる。SELEX法は、公知の方法であり、具体的な方法は、例えば、Panら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995, 92: 11509-11513) に準じて行えばよい。

[0075] ペプチドアプタマーとは、アミノ酸で構成されるアプタマーで、抗体と同様に、特定の標的分子の表面構造を認識して、特異的に結合する1~6 kDaのペプチド分子である。本発明であれば、抗pSer510-LRH1ペプチドアプタマー等が挙げられる。ペプチドアプタマーは、当該分野で公知製造の方法に基づいて作製すればよい。例えば、Whaley, S. R., et al., Nature, 2000, 405, 665-668を参照することができる。通常は、ファージディスプレイ法や細胞表面ディスプレイ法を用いて作製することができる。

[0076] 上記抗体又はアプタマーは、必要に応じて標識されていてもよい。標識は、当該分野で公知の標識物質を利用すればよい。抗体及びペプチドアプタマーの場合、例えば、蛍光色素（フルオレセイン、FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、放射性同位元素（例えば、³H、¹⁴C、³⁵S）又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンにより標識することができる。また、核酸アプタマーの場合、例えば、放射性同位元素（例えば、³²P、³H、¹⁴C）、DIG、ビオチン、蛍光色素（例えば、FITC、Texas、cy3、cy5、cy7、FAM、HEX、VIC、JOE、Rox、TET、Bodipy493、NBD、TAMRA）、又は発光物質（例えば、アクリジニウムエステル）が挙げられる。標識物質で標識された抗体やアプタマーは、標的タンパク質と結合したアプタマーを検出する際に有用なツールとなり得る。

[0077] (c) 質量分析法

「質量分析法」には、高速液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS)、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法 (LC-MS/MS)、ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS)、ガスクロマトグラフタンデム質量分析法 (GC-MS/MS)、キャピラリー電気泳動質量分析法 (CE-MS) 及びICP質量分析法 (ICP-MS) が挙げられる。

[0078] 上記免疫学的検出法、アプタマー解析法、及び質量分析法は、いずれも当該分野に公知の技術であって、それらの方法に準じて行えばよい。例えば、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Christopher J., et al., 2005, *Chemical Review*, 105:1103-1169; Iijima Y. et al., 2008, *The Plant Journal*, 54, 949-962; Hirai M. et al., 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(27) 10205-10210; Sato S, et al., 2004, *The Plant Journal*, 40(1)151-163; Shimizu M. et al., 2005, *Proteomics*, 5, 3919-3931に記載の方法に準じて行うことができる。また、各メーカーからペプチド定量キットが市販されており、それらを利用することもできる。

[0079] (2) Ser510リン酸化の陽性／陰性の決定

次に、(1) で得られた測定値に基づいて、試料中におけるSer510リン酸化の陽性／陰性を決定する。

測定値に基づいた陽性／陰性の決定方法は、限定はしない。例えば、Ser510リン酸化の測定値に対するカットオフ値を定め、そのカットオフ値に基づいて陽性／陰性を決定する方法が挙げられる。すなわち、所定の値をカットオフ値と定め、測定値がその値以上であれば、Ser510リン酸化は陽性であり、逆にカットオフ値未満であれば陰性と決定することができる。

[0080] カットオフ値は、測定値を陽性、陰性に分類するための境界値をいう。カットオフ値は、通常、疾患の罹患率とROC曲線(receiver operating characteristic curve)より算出された感度及び特異度に基づき算出することができる。カットオフ値の設定法は特に限定しない。

[0081] 例えば、がん罹患していない健常体に由来する試料の測定値、若しくは健常体群に由来する試料の測定値の平均値をカットオフ値として、被検体の測定値がカットオフ値よりも高いときに、陽性と決定することができる。

[0082] 或いは、がん罹患していない健常体に由来する試料の測定値、又は健常体群に由来する試料の測定値の平均値の1.5倍以上、2.0倍以上、3.0倍以上、4倍以上、5倍以上、又は6倍以上をカットオフ値として、被検体の測定値がカットオフ値よりも高いときに、陽性と決定することもできる。

[0083] また、対照群から得られた測定値をパーセンタイルで分類し、その分類に用いたパーセンタイル値をカットオフ値とすることもできる。例えば、対照者から得られた測定値の95パーセンタイルをカットオフ値とし、その値以上を陽性、値未満を陰性とした場合、被検体の測定値が95パーセンタイル以上であれば、陽性と決定することができる。

[0084] なお、対照とする健常体の測定値は、被検体の測定値と異なり、必ずしもその都度測定する必要はない。例えば、測定に用いる試料の量、がん患者の予後予測用バイオマーカーの測定方法、測定条件を一定にしておけば、以前に測定した対照健常体の測定値を再利用することができる。

[0085] (がん患者の予後)

本態様の予後予測方法では、上記検出工程で得られたSer510リン酸化の検出結果に基づいて、がん患者の予後を予測する（予後が示される）。具体的には、がん患者に由来する試料が前記リン酸化について陽性である場合、がん患者の予後が悪い、又はがん患者の予後が悪い可能性が高いことが示される。反対に、がん患者に由来する試料が前記リン酸化について陰性である場合、がん患者の予後が良好である、又はがん患者の予後が良好である可能性が高いことが示される。

[0086] 本明細書において、「予後が悪い」とは、（例えば外科的手術による切除後の）臨床転帰が不良である（例えば、がんの再発リスク又は再発率が高い、がんの転移リスク又は転移率が高い、無再発生存率が低い、疾患(がん)特異的生存率が低い、又は全生存率が低い）ことをいう。予後が悪い場合、5年後の

無再発生存率又は疾患特異的生存率は95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、又は70%以下であってよい。本発明では生存率は、累積生存率を意味する。

[0087] 本明細書において、「予後が良い」とは、臨床転帰が良好であることをいう。予後が良い場合、がんの切除手術後の5年後の無再発生存率又は生存率は60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、又は100%であってよい。

[0088] 一実施形態において、がん患者に由来する試料において、Ser510リン酸化以外の他のがん患者の予後予測用バイオマーカーを検出し、その検出結果とSer510リン酸化の検出結果に基づいて、がん患者の予後を予測してもよい。ここでSer510リン酸化以外の他のがん患者の予後予測用バイオマーカーは、第3態様の記載に準じる。

[0089] また、本発明の予後予測方法では、がん患者に由来する試料において、細胞異型、構造異型、浸潤、及び転移のうちいずれか1つ以上を検出し、その検出結果とSer510リン酸化の検出結果とに基づいて、がん患者の予後を予測してもよい。ここで、「細胞異型」とは、正常の細胞構造からの隔たりであり、具体的には核胞体比の増大、細胞や核の大小不同、核形の不整、核クロマチンの増量、核小体の増大や増加、核分裂像の増加、及び／又は異常核分裂像の出現を指す。また、「構造異型」とは、正常の組織構造からの隔たり、即ち組織構造の不規則化である。本態様において細胞異型又は構造異型の検出方法は限定しない。例えば、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて可視化することができる。「浸潤」とは、悪性腫瘍が周囲の正常組織や臓器を破壊しながら連続性に進展することであり、周囲組織との境界が不明瞭になることで判定できる。「転移」とは、悪性腫瘍が原発巣から離れた臓器に非連続性に進展することである。

[0090] 4-3. 効果

本態様のがん患者の予後予測方法によれば、生検や手術により摘出した生体試料を調べることで、その検体を提供した被検体の予後を正確に予測する

ことができる。正診率の高い本態様の予後予測方法によって、再発リスクや転移リスクを判定し、その結果に基づき、治療方針(例えば、抗がん剤の種類、投与量、投与間隔など)を決定し、又はがんの再発及び転移の検査の間隔を決定することができる。本発明により、がん患者の予後が悪いことが示された場合、がんの再発を防止し、予後を改善し、又は生存率を改善するために、患者に薬物療法及び／又は放射線療法を行っても良い。したがって、本発明の方法により予後が悪いことが示されたがん患者に薬物療法及び放射線療法の少なくとも一つを行うことを含む、がんの再発を防止し、予後を改善し、又は生存率を改善する方法もまた提供される。また、がん患者の予後が悪いと予測された場合、がんの再発を早期発見するために、検査頻度を上げることもできる。

[0091] 本発明のがん患者の予後予測方法によれば、がんの予後予測を補助する方法も提供される。また、被検体のがんの悪性度を判定する方法や、被検体のがんの悪性度判定を補助する方法もまた提供される。

[0092] 本発明の方法は、他の方法(例えば、レントゲン撮影;超音波検査;内視鏡検査;マンモグラフィー;内診;直腸診;CT検査やMRI検査等の画像検査;血液検査;細胞診や組織診等の病理検査;及び／又は遺伝子診断)や他の因子(例えば、ステージによる分類、腫瘍径、リンパ節転移の有無、組織学的グレード等)と組み合わせて用いることができる。他の方法と組み合わせることで、本発明の予後予測方法の精度を高めることができる。

[0093] さらに、本発明の方法でがん患者の予後を予測する工程を含む、がんを治療する方法や、がん患者の予後を改善する方法も提供される。

[0094] 5. がんの抑制剤又は治療剤をスクリーニングする方法

5-1. 概要

本発明の第5の態様は、がんの抑制剤又は治療剤をスクリーニングする方法である。本態様のスクリーニング方法によれば、肝臓受容体ホモログ1(LRH1)におけるSer510リン酸化を減少し得る抑制剤又は治療剤を同定することができる。

[0095] 5-2. 方法

本発明のスクリーニング方法は、被験物質処置工程、リン酸化測定工程、及び抑制剤／治療剤の同定工程を含む。

[0096] (被験物質処置工程)

「被験物質処置工程」とは、配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列における510位のセリン残基がリン酸化される肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) を発現する細胞を被験物質で処置する工程である。

[0097] 本スクリーニング方法の対象となる被験物質の種類は特に限定されない。被験物質は、任意の物質、具体的には、天然分子（例えば、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物（糖等）、ステロイド、グリコペプチド、糖タンパク質、プロテオグリカン等）、天然分子の合成アナログ又は誘導體（例えば、ペプチド擬態物、核酸分子（アプタマー、アンチセンス核酸、二本鎖RNA (RNAi) 等））、及び低分子化合物等の非天然分子（例えば低分子無機化合物及び低分子有機化合物）等；並びにそれらの混合物を挙げることができる。

[0098] また、被験物質としては単一の被験物質を独立に試験しても、いくつかの候補となる被験物質の混合物（例えばライブラリ等）について試験をしてもよい。複数の被験物質を含むライブラリとしては、合成化合物ライブラリやペプチドライブラリ（コンビナトリアルライブラリ等）等が挙げられる。

[0099] 細胞を被験物質と接触させる場合、その接触の条件は、その物質の種類により異なるが、当業者であれば容易に決定することができる。例えば、接触は、細胞を被験物質を添加した培地中で培養することにより、細胞を被験物質を含む溶液中に浸漬することにより、細胞上に被験物質を積層することにより、又は細胞を被験物質の存在下で培養することにより行うことができる。

[0100] また、被験物質の効果及び有効性は、いくつかの条件で検討することも可能である。そのような条件としては、被験物質で処置する時間又は期間、量（大小）、回数などが挙げられる。例えば、被験物質の希釈系列を調製する

などして複数の用量を設定することができる。被験物質の処置期間も適宜設定することができるが、例えば、1日から数週間、数ヶ月、数年の期間にわたって処置を行うことができる。

[0101] 本発明のスクリーニング方法で使用する細胞は、配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列における510位のセリン残基がリン酸化される肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) を発現する細胞である。「配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列における510位のセリン残基がリン酸化される肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) を発現する細胞」とは、配列番号1で示すアミノ酸配列からなる肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) を発現し、かつ肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基がリン酸化される細胞である。「肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基がリン酸化される細胞」は、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基がリン酸化され得る細胞であれば限定しない。当該細胞は、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基がリン酸化される天然由来の細胞、又は肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基のリン酸化が誘導される細胞のいずれであってもよい。天然由来の細胞であれば、例えば肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基がリン酸化されるがん由来の細胞であってもよい。リン酸化が誘導される細胞であれば、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基のリン酸化を誘導するキナーゼやその上流因子を発現する細胞；又は、当該キナーゼや上流因子を活性化する薬剤が添加される細胞であってもよい。細胞の種類は、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の510位のセリン残基のリン酸化が誘導され得る動物細胞であれば特に限定しない。動物細胞の由来となる生物種は、例えば、哺乳動物（例えばヒト等の霊長類、ラット及びマウス等の実験動物）が挙げられ、初代培養細胞、継代培養細胞、及び凍結細胞のいずれであってもよい。また、正常細胞又はがん細胞（例えば肝がん又は膵がん由来するがん細胞株）であってもよい。

[0102] (リン酸化測定工程)

「リン酸化測定工程」とは、被験物質処置工程により被験物質で処置され

た細胞におけるSer510リン酸化を測定する工程である。

[0103] Ser510リン酸化を測定する方法は、Ser510のリン酸化レベルを測定する方法、又はpSer510-LRH1のタンパク質量を測定する方法である。Ser510リン酸化を測定する方法は、特に限定せず、公知の測定方法を使用することができる。例えば、第4態様で述べた(a)免疫学的検出法、(b)アプタマー解析法、又は(c)質量分析法を用いることができる。好ましくは免疫学的検出法（例えば免疫組織化学）を用いることができる。

[0104] リン酸化測定工程は、被験物質処置工程に続いて、適当な時期に行う。例えば、被験物質処置工程の直後、30分後、1時間後、3時間後、5時間後、10時間後、15時間後、20時間後、24時間（1日）後、2～10日後、10～20日後、20～30日後、1ヶ月～6ヶ月後に測定を行う。

[0105] （抑制剤／治療剤の同定工程）

「抑制剤／治療剤の同定工程」とは、Ser510のリン酸化が減少する場合に被験物質をがんの抑制剤又は治療剤として同定する工程である。

[0106] 本工程において「Ser510のリン酸化が減少する」とは、所定のカットオフ値や被験物質で処置しない場合の値と比較してSer510のリン酸化が減少することを意味する。例えば、Ser510のリン酸化が、被験物質で処置しない場合の値と比較して、100%以下、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、1%以下、又は0.1%以下である場合に、被験物質をがんの抑制剤又は治療剤として同定することができる。

[0107] 以上のように、本スクリーニング方法により、がんの抑制剤又は治療剤（又はその候補物質）を同定し、さらにその有効性を確認することができる。

実施例

[0108] 以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、この実施例は単なる一例示に過ぎず、本発明は実施例に記載の範囲に限定されるものではない。

[0109] <実施例1：抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体の作製>

（目的）

510位のセリン（Ser510）がリン酸化されているLRH1（pSer510-LRH1）を検

出できるモノクローナル抗体（抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体）を開発する。

（方法と結果）

モノクローナル抗体の作製は、Kishiro Y, et al., 1995, Cell Struct Funct, 20(2):151-6に記載の方法に基づき、以下の手順で行った。

[0110] （１）抗原ペプチドの調製

抗原ペプチドとして、配列番号1で示すヒトLRH1タンパク質の502～515位（開始メチオニンを1位とする）に相当するアミノ酸配列（RLPEIRAISMQAEE、配列番号18）において、510位のセリンをリン酸化修飾し、N末端にシトシン（C）を付加したペプチドを使用した。Imject Maleimide Activated mcKLH (Thermo Fisher Scientific) 2 mgを200 μ Lの超純水に溶解して10 mg/mLのKLH溶液を調製した。抗原ペプチドを超純水で溶解して、5 mg/mLの抗原ペプチド溶液とした。各々200 μ LのKLH溶液と抗原ペプチド溶液を混合し、室温で2時間静置した。混合液からKLH溶液由来のEDTAを除去するため、煮沸した透析膜に移して、PBSを外液として透析を行った。得られた溶液を抗原溶液とした。2 mLルアーロック式ガラス注射器を用いて、400 μ Lの抗原溶液と1 mLのフロイント完全アジュバント（Sigma-Aldrich）を混和して乳化し、抗原エマルジョンを調製した。

[0111] （２）免疫

麻酔した8週齢の雌ラット（Wistar系）の両後肢に100 μ Lの抗原エマルジョンを注射し、免疫した。

[0112] （３）ポリエチレングリコール（PEG）溶液の調製

5 gのPEG4000 (81240, Sigma-Aldrich) をオートクレーブにより滅菌した。8 mLのダルベッコ改変イーグル培地（高グルコース；DMEM；D5796, Sigma-Aldrich）に0.4 mLのジメチルスルホキシド（D2650, Sigma-Aldrich）を加え、50°Cに加温した。これに滅菌後のPEG4000を加え、素早く混和してPEG溶液を調製した。

[0113] （４）細胞融合と細胞培養

免疫14日後のラットより腸骨リンパ節を摘出し、1 mLのDMEMと共に滅菌シャーレに置いた。リンパ節を鉗で細断した後、100 μm のセルストレーナー (BD Falcon) で濾過した。前記シャーレに約 10^7 個のマウス多発性骨髄腫細胞株 SP2を加えて、ピペットでよく混和した後、1200 rpm/minで5分間遠心分離し、上清を吸引除去した。37°CのPEG溶液を約1分間かけて緩徐に滴下した後、2分間放置して、その後、5分間かけて9 mLのDMEM培地を緩徐に滴下した。900 rpm/minで5分間遠心分離し、上清を吸引除去した。ハイブリドーマ培地 (78% GIT培地[和光富士フィルム工業株式会社], 2% HAT Supplement [Thermo Fisher Scientific], 10% BM Condimed H1 Hybridoma Cloning Supplement [Roche], 10%ウシ胎児血清) を40 mL加えて、100 μL ずつ96穴培養皿4枚に播種した後、37°CのCO₂インキュベーターで培養した。

[0114] (5) スクリーニング

培養7日後に100 μL のハイブリドーマ培地で培地交換を行った。交換2日後の培養上清50 μL を用いてELISA法により陽性のクローンをスクリーニングした。スクリーニングは以下の手順で行った。

[0115] まず、前述の抗原ペプチド溶液及び陰性対照として510位セリンの非リン酸化体を含むペプチド溶液を3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、96穴ELISAプレートのウェルに50 μL ずつ加えて、4°Cで一晩静置した。その後、各ウェルから抗原ペプチド溶液を除去して、200 μL の0.1% Tween20加トリス塩酸緩衝液 (TBS-T) で1回洗浄した後、ブロッキング液 (1%ウシ血清アルブミン/TBS) 200 μL を加えて37°Cで1時間静置した。その後、各ウェルからブロッキング液を除去して、200 μL のTBS-Tで1回洗浄した後、50 μL の培養上清を加えて、37°Cで1時間反応させた。各ウェルから培養上清を除去した後、200 μL のTBS-Tで3回洗浄した。続いて、各ウェルにブロッキング液で2,000倍希釈したECL (商標) R at IgG, HRP-linked whole antibody (Cytiva) を二次抗体として50 μL 加え、37°Cで1時間反応をさせた。その後、各ウェルから二次抗体液を除去して、TBS-Tで3回洗浄した後、TMB Substrate Set (BioLegend) によりメーカーが推奨する方法で発色させて、その490 nmの波長における吸光度 (OD₄₉₀) を測定

した。

[0116] 陽性クローンは12穴培養皿で継代培養した後、コンフルエンスが概ね50%に達した時点で10 cm培養皿に移して、さらに増殖させた。

[0117] スクリーニングの結果から陽性候補として選択された35個のクローンのうち、以下で解析の対象とした抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体であるクローン55 (FMU-P2-C2) のELISAの結果を以下の表2に示す。表2では、Ser510がリン酸化されている抗原ペプチドをpS510-LRH1 peptideとして、Ser510がリン酸化されていない抗原ペプチドをnon-pS510-LRH1 peptideとして示す。

[0118] [表2]

表 2. ラット抗 pSer510-LRH1 モノクローナル抗体クローン 55(FMU-P2-C2)の ELISA の結果

Clone	ELISA (O.D. 490 nm)	
	pS510-LRH1 peptide	non-pS510-LRH1 peptide
55	1.121	0.022

[0119] <実施例 2 : 抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) の抗原特異性の検証>

(目的)

実施例 1 で得られた抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) について、抗原特異性を検証する。

[0120] (方法と結果)

(1) セルブロックの免疫組織化学染色

配列番号1で示すヒト野生型LRH1タンパク質のアミノ酸配列において510位のセリンをグルタミン酸置換 (S510E) した変異型LRH1 (LRH1S510E ; 恒常的リン酸化体) を発現するベクターをHEK293T細胞にポリエチレンイミン “MAX” (24765-1, コスモバイオ) で一過性導入し、2日後に擦過により細胞を回収した。10%中性ホルマリンで4℃、16時間固定し、1 mLのPBSで1回洗浄した。1%アルギン酸ナトリウム溶液1 mLを加え細胞塊を1 mL用チップの先端を切った先太チップでゆるやかに懸濁後、2000 rpmで5分間遠心して細胞をペレット化した。その後、上清を除去し、1 Mの塩化カルシウム水溶液を1 mL加え、細胞のペレットをゲル化した。その後ゲル化したペレットのみをカセットに

入れ、自動固定包埋装置 (Tissue-Tek VIP (登録商標) 5 Jr, サクラファインテックジャパン) とパラフィン包埋ブロック作製装置 (Tissue-Tek (登録商標) TEC (商標), サクラファインテックジャパン) を用いてホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作製した。ブロックは滑走型マイクロトームを用いて3 μm の厚さに薄切し、剥離防止コートスライドガラス (CRE-12, 松波硝子工業株式会社) に乗せ、室温にて乾燥させた。

[0121] 標本はキシレン中で10分間脱パラフィンを行い、続いて100%エタノール中で脱キシレンを行った。0.3%過酸化水素/メタノールで10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、トリス塩酸緩衝液で5分間洗浄した。0.1%セミカルバジド塩酸 (和光富士フィルム工業株式会社) 水溶液中で1時間標本を処理し、トリス塩酸緩衝液 (TBS) で5分間洗浄した。超純水で200倍に希釈したイムノセイバー (日新EM) を用いて70°Cのハイブリオーブンで1昼夜インキュベートし、抗原賦活化を行った。標本を室温に戻したのちにTBSで5分間標本を洗浄し、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体を一次抗体として4°Cで一昼夜反応させた。TBSで5分間3回洗浄し、Signal Booster Immunostain F 溶液 (Beacle Inc.) にて100倍に希釈したビオチン標識抗ラットIgG二次抗体を室温で30分間反応させた。TBSで5分間3回洗浄し、同緩衝液で50倍に希釈したアビジン・西洋わさびペルオキシダーゼ溶液を室温で30分間反応させた。TBSで5分間3回洗浄後、発色溶液[0.13 mg/mL 3,3'-ジアミノベンジジン (同人化学研究所), 0.011%過酸化水素水溶液]中で適当な染色像が得られるまで反応させた。なおビオチン標識抗ラットIgG二次抗体、アビジン・西洋わさびペルオキシダーゼ溶液はVECTASTAIN (登録商標) Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase (Rat IgG) キット (Vector laboratories) を用いた。核染色はティシュー・テック (登録商標) ヘマトキシリン3G (サクラファインテックジャパン株式会社) 溶液中で5秒間振り洗いを行い、流水で10分間洗浄した。次に0.5%塩酸/70%エタノール溶液中で5秒間振り洗いを行い、余分なヘマトキシリンを除いた。100%エタノールを用いて標本の脱水、キシレンにより透徹処理を行い、プレパラート自動封入機 (白井松器械株式会社) を用いてプレ

パラートを作製した。

[0122] 抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) による免疫染色の結果を図1に示す。HEK293T:LRH1S510E細胞では、核及び核小体に陽性シグナルが認められた (図1A)。一方、Ser510がリン酸化されている抗原ペプチドによる吸着を行った後では、陽性シグナルは検出されなかった (図1B)。

[0123] (2) 抗原ペプチドとの濃度依存性反応

精製抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体と抗原ペプチドとの反応について、濃度依存性を検討した結果を図2に示す。

pSer510-LRH1モノクローナル抗体は、Ser510がリン酸化されている抗原ペプチド (リン酸化LRH1ペプチド) と濃度依存的に反応した (図2)。一方、Ser510がリン酸化されていない抗原ペプチド (非リン酸化LRH1ペプチド) を用いた場合や、ペプチドの希釈に使用したトリス塩酸緩衝液のみを用いた場合には、抗体反応は全く検出されなかった。

[0124] (3) 脱リン酸化処理の影響

Ser510がリン酸化されている抗原ペプチド (リン酸化LRH1ペプチド) について、脱リン酸化処理有り (+) /無し (-) の2条件でELISAを行った。その結果、精製抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体とpSer510-LRH1 peptideとの反応性は、抗原ペプチドの脱リン酸化処理によって著しく減弱した (図3)。

一方、Ser510がリン酸化されていない抗原ペプチド (非リン酸化LRH1ペプチド) については、脱リン酸化処理の有無にかかわらず、抗体反応が検出されなかった。

以上の結果から、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) が、リン酸化LRH1ペプチド (pSer510-LRH1) を特異的に検出できることが示された。

[0125] <実施例3：抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) のCDR配列決定>

(目的)

抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) のCDR配列を決定する。

(方法と結果)

抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) の重鎖及び軽鎖の各可変領域及び各CDRの配列を決定した。同クローンをBio-Peak社に送り、縮重プライマーPCR法により配列決定を行った。CDRの同定はNorth/AHoの抗体ナンバリングシステムに従った。抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) の重鎖及び軽鎖の各可変領域及び各CDRの配列を決定した結果を図4に示す。重鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3はそれぞれ配列番号2、3、及び4で示すアミノ酸配列からなり、軽鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3はそれぞれ配列番号5、6、及び7で示すアミノ酸配列からなる。また、重鎖可変領域は配列番号8で示すアミノ酸配列からなり、軽鎖可変領域は配列番号9で示すアミノ酸配列からなる。

[0126] <実施例4：膵がん組織及び肝がん組織における免疫組織化学>

(目的)

抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) を用いて、膵がん及び肝がん組織におけるpSer510-LRH1タンパク質を検出し、その悪性度を判定する。

[0127] (方法)

(1) 組織標本の収集

福島県立医科大学附属病院肝胆膵・移植外科にて、2012年から2017年までの間に膵がん及び肝がんの診断で手術を受けた患者39人（膵がん19例、肝がん20例）を対象として組織標本を収集し、pSer510-LRH1発現を評価した。対象症例は診断から3～5年間の生存情報が判明している患者に限り、原疾患に依らない死亡症例については対象から除外した。組織材料の収集にあたっては、福島県立医科大学倫理委員会の承認（承認番号2020-058）を受け、臨床研究に関わる倫理指針を遵守して実施した。

(2) 免疫組織化学染色

採取された膵がん及び肝がん組織は全て10%ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン (Hematoxylin eosin : HE) 染色と免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は実施例2の(1)と同様に実施した。

(3) 組織学的評価

転帰等の患者背景をマスキングした上で、2名の病理医及び1名の外科医がAllredスコアに従って染色性を半定量評価した。Allredスコアの算出は、文献 (Allred DC et al., Mod Pathol., 1998, 11(2):155-168.) に記載の方法に従った。まず、陽性細胞の割合 (%) に基づいて、Proportion Score (PS)=0 (0%)、PS=1 (1%未満)、PS=2 (1%~10%)、PS=3 (11%~33%)、PS=4 (34%~66%)、及びPS=5 (67%以上) に分類した。次に、染色強度に基づいて、Intensity Score (IS)=0 (なし)、IS=1 (弱)、IS=2 (中程度)、及びIS=3 (強) に分類した。PS及びISの和をAllredスコアとした。さらにAllredスコアに基づいて、スコア0をpSer510-LRH1陰性、スコア1~5をpSer510-LRH1弱陽性、スコア6以上をpSer510-LRH1強陽性として評価した。

[0128] (結果)

膵がん (膵管腺癌又は浸潤性膵管癌) 組織及び肝がん (肝細胞癌) 組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の一例を図5A及び図5Bに示す。

免疫組織化学染色結果に対して半定量評価を行った結果、膵がん19例の全症例がpSer510-LRH1強陽性であった (図6、膵がん)。

また、肝がん20例のうち14例がpSer510-LRH1強陽性であった (図6、肝がん)。一方、肝がん20例中2例はpSer510-LRH1陰性、4例がpSer510-LRH1弱陽性であり (図6)、これら6例中4例は5年無再発生存症例であり、予後が良好であることが判明した。

以上の結果から、悪性度の高いがん組織においてLRH1のSer510がリン酸化され得ること、さらに、がん組織におけるpSer510-LRH1タンパク質が抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) によって検出できることが示された。なお、膵がんでは19例の全症例がpSer510-LRH1強陽性であっ

たが、膵がんは早期発見が難しく、ほとんどの場合で診断されたときにはかなり進行しているという事実を反映するものと考えられ、上記の肝がん症例の結果と符号している。

[0129] また、がん組織におけるpSer510-LRH1検出によって、がんの悪性度を判定し、再発や患者予後を予測することが可能であり、それに基づいて薬物療法及び／又は放射線療法等の術後治療の必要性を判定できることが示された。また、pSer510-LRH1ががん治療のための有望な創薬標的となり得ることが示された。

[0130] <実施例5：肺がん組織における免疫組織化学>

(目的)

さらなる肺がん症例を対象として、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) を用いて、肺がん組織におけるpSer510-LRH1タンパク質を検出し、その悪性度を判定する。

[0131] (方法)

(1) 組織標本の収集

福島県立医科大学附属病院呼吸器外科にて、2013年から2015年までの間に肺腺癌及び肺扁平上皮癌の診断で手術を受けた患者34人（肺腺癌18例、肺扁平上皮癌16例）を対象として組織標本を収集し、pSer510-LRH1発現を評価した。対象症例は診断から5年間以上の生存情報が判明している患者に限り、原疾患に依らない死亡症例については対象から除外した。組織材料の収集にあたっては、福島県立医科大学倫理委員会の承認（承認番号2020-058）を受け、臨床研究に関わる倫理指針を遵守して実施した。

(2) 免疫組織化学染色

採取された肺がん組織は全て10%ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン (Hematoxylin eosin: HE) 染色と免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は実施例2の(1)と同様に実施した。

(3) 組織学的評価

組織学的評価は、実施例4と同様に行った。pSer510-LRH1陰性及びpSer510

-LRH1弱陽性を低pSer510-LRH1群、pSer510-LRH1強陽性を高pSer510-LRH1群に分類した。

[0132] (結果)

肺腺癌組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の例を図7A及び図7Cに示す。また、肺扁平上皮癌組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の例を図7Bに示す。図7A及び図7Bでは、いずれも左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例を示す。肺腺癌組織では浸潤先進部（図7C-a）にて腫瘍実質内部（図7C-b）に比して強いpSer510-LRH1シグナルを認めた（図7C）。

免疫組織化学染色結果に対して半定量評価を行った結果、肺腺癌18例のうち15例がpSer510-LRH1強陽性であった（表3）。また、肺扁平上皮癌16例のうち10例がpSer510-LRH1強陽性であった（表4）。

一方、肺腺癌18例中3例はpSer510-LRH1陰性で、いずれも5年無再発生存症例であった（表3）。また肺扁平上皮癌16例中6例はpSer510-LRH1陰性で、このうち4例が5年無再発生存症例であった。

[0133] [表3]

表 3. 肺腺癌 18 例の結果

	5 年以上生存例		5 年未満死亡例	
	再発 (-)	再発 (+)	再発 (-)	再発 (+)
高 pS510-LRH1 群	6	5	0	4
低 pS510-LRH1 群	3	0	0	0

[0134] [表4]

表 4. 肺扁平上皮癌 16 例の結果

	5 年以上生存例		5 年未満死亡例	
	再発 (-)	再発 (+)	再発 (-)	再発 (+)
高 pS510-LRH1 群	6	0	1	3
低 pS510-LRH1 群	4	0	1	1

[0135] 以上の結果から、がん組織におけるpSer510-LRH1検出によって、がんの悪性度を判定し、再発や患者予後を予測することが可能であることが示された。また、pSer510-LRH1シグナルが浸潤先進部において顕著に増強していた結

果から、pSer510-LRH1を治療標的とすることで、がんの浸潤（ひいては転移）を阻止できる可能性が示された。

[0136] <実施例6：抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）の抗原特異性のさらなる検証>

（目的）

実施例1で得られた抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）について、膵癌細胞株の切片に対する脱リン酸化処理の影響を検討し、抗原特異性を検証する。

[0137] （方法と結果）

代表的なヒト膵癌細胞株であるAsPC1細胞株、HPAFII細胞株、及びPANC1細胞株のセルブロックをホルマリン固定パラフィン包埋した切片について、脱リン酸化処理有り（+）／無し（-）の2条件で抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）による免疫染色を行った。免疫組織化学染色は実施例2に記載の方法に準じて実施した。ただし、脱キシレン後の0.3%過酸化水素/メタノール処理は20分間行い、抗原賦活化は10 mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）中で電子レンジ（RE-T1, シャープ）にて10分間マイクロ波を照射することにより行った。

[0138] 結果を図8に示す。脱リン酸化処理無しの切片では、いずれのヒト膵癌細胞株においても核に限局した陽性シグナルが認められた（図8、脱リン酸化(-)）。一方、脱リン酸化処理後の切片では、いずれのヒト膵癌細胞株においても陽性シグナルは消失した（図8、脱リン酸化(+)）。

[0139] 以上の結果から、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）が、膵癌細胞株においてリン酸化LRH1を脱リン酸化LRH1と区別して特異的に検出できることが示された。

[0140] <実施例7：膵がん組織及び肝がん組織におけるさらなる免疫組織化学>

（目的）

実施例4の組織標本数を増やし、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55（FMU-P2-C2）による膵がん及び肝がん組織におけるpSer510-LRH1タン

パク質の検出、並びに悪性度判定を追加で行う。なお、本実施例で使用した組織標本は、実施例4で使用した組織標本の全部を包含する。

[0141] (方法)

福島県立医科大学附属病院肝胆膵・移植外科及び協力病院にて、2008年から2018年までの間に膵がんの診断で手術を受けた患者72例、2006年から2016年までの間に肝がんの診断で手術を受けた患者127例を対象として組織標本を収集し、pSer510-LRH1発現を評価した。対象症例は診断から少なくとも3~5年間の生存情報が判明している患者に限り、原疾患に依らない死亡症例については対象から除外した。組織材料の収集にあたっては、福島県立医科大学倫理委員会の承認（承認番号2020-058）を受け、臨床研究に関わる倫理指針を遵守して実施した。

[0142] 免疫組織化学染色及び組織学的評価は、実施例4に記載の方法に準じて行った。ただし、肝がん組織の半定量評価では、スコア0をpSer510-LRH1陰性、スコア1~6をpSer510-LRH1弱陽性、スコア7以上をpSer510-LRH1強陽性として評価した。pSer510-LRH1陰性及びpSer510-LRH1弱陽性を低pSer510-LRH1群、pSer510-LRH1強陽性を高pSer510-LRH1群に分類した。なお、膵がん組織半定量評価は、実施例4に記載のスコア評価に準じて行った。

[0143] (結果)

膵がん（膵管腺癌又は浸潤性膵管癌）組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の一例を図9A及び図9Bに示す。また、肝がん（肝細胞癌）組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の一例を図10A及び図10Bに示す。図9A及び図10Aでは、いずれも左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例を示す。膵がん組織及び肝がん組織では浸潤先進部（図9B-a、図10B-a）にて腫瘍実質内部（図9B-b、図10B-b）に比して強いpSer510-LRH1シグナルを認めた。

[0144] 免疫組織化学染色結果に対して半定量評価を行った結果、膵がん72例のうち54例が高pSer510-LRH1群であった（表5）。また、高pSer510-LRH1群の膵がんでは、3年未満死亡例35例中33例、3年以上生存例19例中12例に再発が認め

られた。一方、低pSer510-LRH1群の膵がんでは、3年以上生存例9例中5例が無再発であった。

[0145] また、肝がん127例のうち28例が高pSer510-LRH1群であった（表6）。さらに、高pSer510-LRH1群の肝がんでは、5年未満死亡例12例中9例、5年以上生存例16例中9例に再発が認められた。一方、低pSer510-LRH1群の肝がんでは、5年以上生存例57例中35例が無再発であった。

[0146] [表5]

表 5. 膵がん 72 例の結果

	3 年以上生存例		3 年未満死亡例	
	再発 (-)	再発 (+)	再発 (-)	再発 (+)
高 pSer510-LRH1 群	7	12	2	33
低 pSer510-LRH1 群	5	4	2	7

[0147] [表6]

表 6. 肝がん 127 例の結果

	5 年以上生存例		5 年未満死亡例	
	再発 (-)	再発 (+)	再発 (-)	再発 (+)
高 pSer510-LRH1 群	7	9	3	9
低 pSer510-LRH1 群	35	22	14	28

[0148] 以上の結果から、悪性度の高いがん組織においてLRH1のSer510がリン酸化され得ること、さらに、がん組織におけるpSer510-LRH1タンパク質が抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) によって検出できることが示された。

[0149] また、がん組織におけるpSer510-LRH1検出によって、がんの悪性度を判定し、再発や患者予後を予測することが可能であり、それに基づいて薬物療法及び／又は放射線療法等の術後治療の必要性を判定できることが示された。また、pSer510-LRH1シグナルが膵がん組織及び肝がん組織の浸潤先進部において顕著に増強していた結果から、pSer510-LRH1を治療標的とすることで、がんの浸潤（ひいては転移）を阻止できる可能性が示された。さらに、pSer510-LRH1ががん治療のための有望な創薬標的となり得ることが示された。

[0150] <実施例 8 : 肺がん組織におけるさらなる免疫組織化学>

(目的)

実施例5の肺扁平上皮癌組織標本に対して、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) による肺扁平上皮癌組織におけるpSer510-LRH1タンパク質の検出を追加で行う。

[0151] (方法と結果)

組織標本の収集及び免疫組織化学染色は実施例5に準じて行った。

肺扁平上皮癌組織における抗pSer510-LRH1免疫染色の追加例を図11A及び図11Bに示す。図11Aでは、左側が低pSer510-LRH1群の代表例、右側は高pSer510-LRH1群の代表例を示す。肺扁平上皮癌組織では浸潤先進部 (図11B-a) にて腫瘍実質内部 (図11B-b) に比して強いpSer510-LRH1シグナルを認めた。この結果は、実施例5で検討した肺腺癌組織 (浸潤先進部及び腫瘍実質内部はそれぞれ図7C-a及び図7C-bに示される) と同様である。

[0152] <実施例9：正常組織 (非がん部正常組織) における免疫組織化学>

(目的)

正常組織 (非がん部正常組織) においてpSer510-LRH1タンパク質が検出されないことを検証する。実施例5の肺がん組織標本、並びに実施例7の膵がん組織標本及び肝がん組織標本のうちpSer510-LRH1陰性例の非がん部正常組織を対象として、抗pSer510-LRH1モノクローナル抗体クローン55 (FMU-P2-C2) による免疫組織染色を行う。本実施例では、陽性対照として、pSer510-LRH1強陽性群の肝がん組織標本を染色し、陽性シグナルを確認した。

[0153] (方法と結果)

組織標本の収集及び免疫組織化学染色は実施例5及び実施例7に準じて行った。

肺の正常組織 (肺がんの周囲正常組織) におけるHE染色と抗pSer510-LRH1免疫染色の一例を図12Aに示す。また、肝臓の正常組織 (肝がんの周囲正常組織) におけるHE染色と抗pSer510-LRH1免疫染色の一例を図12Bに示す。さらに、膵臓及び十二指腸の正常組織 (膵がんの周囲正常組織) におけるHE染色と抗pSer510-LRH1免疫染色の一例を図12Cに示す。肺、肝臓、膵臓、及び十二指

腸のいずれの正常組織（非がん部正常組織）においても、pSer510-LRH1シグナルは全く検出されなかった。

[0154] 以上の結果から、pSer510-LRH1シグナルは各臓器の正常組織（非がん部正常組織）では検出されず、治療標的としてのpSer510-LRH1の妥当性が示された。

[0155] <実施例 10 : pSer510-LRH1シグナルに基づく肝がん患者の予後評価>

(目的)

肝がん（肝細胞癌）の切除手術を受けた患者127人の予後をpSer510-LRH1の免疫組織化学染色に基づいて評価する。さらに臨床病理学的解析を行う。

[0156] (方法と結果)

(1) 組織標本の収集

実施例 7 に記載の肝がん患者127症例を対象とした。患者の臨床情報は、医療記録を再調査することによって遡及的に得た。

[0157] (2) 組織学的評価及び予後評価

患者から切除した肝がん組織に対する免疫組織化学染色は、実施例 4 と同様に行った。

転帰等の患者背景をマスキングした上で、2名の病理医及び1名の外科医がImmunoreactive score (IRS ; Remmele et al., 1986, Virchows Arch, 409: 127-147)を一部改変した方法を用いて染色性を半定量評価した。具体的には、陽性細胞の割合 (%) に基づいて、Proportion Score (PS)=0 (1%未満)、PS=1 (1%~10%)、PS=2 (11%~30%)、PS=3 (31%~50%)、及びPS=4 (51%以上) に分類した。次に、染色強度に基づいて、Intensity Score (IS)=0 (なし)、IS=1 (弱)、IS=2 (中程度)、及びIS=3 (強) に分類した。PS及びISの乗じた値をIRSスコアとした。さらにIRSスコアに基づいて、スコア0/1/2/3/4/6を低pSer510-LRH1群、スコア8/9/12を高Ser510-LRH1群として評価した。

[0158] 低pSer510-LRH1群 (96症例) 及び高Ser510-LRH1群 (31症例) の各々について Kaplan-Meier (Kaplan-Meier) 法により術後経過年数に対する無再発生

存率 (Relapse-free survival rate) を計算した。さらに2群間の生存率をロジック検定により比較した。全ての統計分析は両側(two-sided)であり、Graphpad Prism及びSPSS Statisticsを用いて行った。全てのP値は両側であり、0.05未満のP値を統計学的に有意であるとした。

[0159] 無再発生存率の結果を図13に示す。低pSer510-LRH1群の肝がん患者と比較して、高pSer510-LRH1群は有意に低い無再発生存率を示した(図13; $P=0.034$)。

[0160] 以上の結果から、低pSer510-LRH1群の肝がん患者は、肝がん切除手術後の予後が良いのに対し、高pSer510-LRH1群の肝がん患者は、肝がん切除手術後の予後が悪い傾向があることが示された。

[0161] (3) 臨床病理学的解析

127症例の肝細胞癌患者について、臨床病理学的解析を実施した。具体的には無再発生存期間(DFS)に関する単変量解析及び多変量解析をCox比例ハザードモデルを用いて行った。pSer510-LRH1は、上記(2)と同様にIRSスコアに基づき評価を行い、解析にはStatFlex Ver.7.0.11(アーテック、大阪)を用いた。

結果を図14に示す。単変量解析より高pSer510-LRH1はDFSと有意な相関を示した($P=0.037$ 、ハザード比(HR)=1.745、95%信頼区間(CI) 1.034-2.947)。また多変量解析より、pSer510-LRH1は独立した予後不良因子であることが示された(図14、 $P=0.003$ 、HR=2.264、95%CI=1.320-3.882)。

[0162] さらに、pSer510-LRH1とアルファ・フェトプロテイン(AFP)及び血管浸潤との間の相関を解析した。解析はGraphpad Prismを用いてフィッシャーの正確確率検定法によりP値を算出し、0.05未満の数値を統計学的に有意であるとした。結果を以下の表7に示す。肝がんでは高pSer510-LRH1発現はAFPが400ng/mL以上であること($P=0.004$)、血管浸潤があること($P=0.019$)と有意な相関を示すことが判明した。

[表7]

表 7. pSer510-LRH1 シグナルと相関する臨床病理学的因子

臨床病理学的因子		低 pSer510-LRH1 群 (IRS 0-6)	高 pSer510-LRH1 群 (IRS 8/9/12)	P 値
AFP	400ng/mL 未満	82	19	0.004
	400ng/mL 以上	13	12	
	不明	1	0	
血管浸潤	無	76	19	0.019
	有	18	13	
	不明	1	0	

[0163] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) からなる、がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー。
- [請求項2] 前記がんが肝臓がん、膵臓がん、肺がん、食道がん、腎臓がん、卵巣がん、胃がん、大腸がん、前立腺がん、又は乳がんである、請求項1に記載のバイオマーカー。
- [請求項3] がん患者の予後を予測するための抗pSer510-LRH1抗体又はその断片。
- [請求項4] 前記抗pSer510-LRH1抗体又はその断片が、
配列番号2で示すアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号3で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び
配列番号4で示すアミノ酸配列からなるCDR3
を含む重鎖可変領域と
配列番号5で示すアミノ酸配列からなるCDR1、
配列番号6で示すアミノ酸配列からなるCDR2、及び
配列番号7で示すアミノ酸配列からなるCDR3
を含む軽鎖可変領域を含む、請求項3に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片。
- [請求項5] 前記抗pSer510-LRH1抗体又はその断片が
配列番号8で示すアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び
配列番号9で示すアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域
を含む、請求項4に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片。
- [請求項6] 請求項1又は2に記載のバイオマーカーを検出するための、請求項3～5のいずれか一項に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片を含む、がん患者の予後を予測するためのキット。
- [請求項7] 配列番号1で示すアミノ酸配列において510位のセリン残基がリン酸化されている肝臓受容体ホモログ1 (pSer510-LRH1) の、がん患者の

予後を予測するためのバイオマーカーとしての使用。

[請求項8]

がん患者の予後を予測するための方法であって、

がん患者に由来する試料において、肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) の配列番号1で示すアミノ酸配列における510位のセリン残基のリン酸化を検出する検出工程を含み、

ここで、前記試料が前記リン酸化について陽性である場合、がん患者の予後が悪いことを示す、方法。

[請求項9]

前記リン酸化は請求項3～5のいずれか一項に記載の抗pSer510-LRH1抗体又はその断片を用いて検出される、請求項8に記載の方法。

[請求項10]

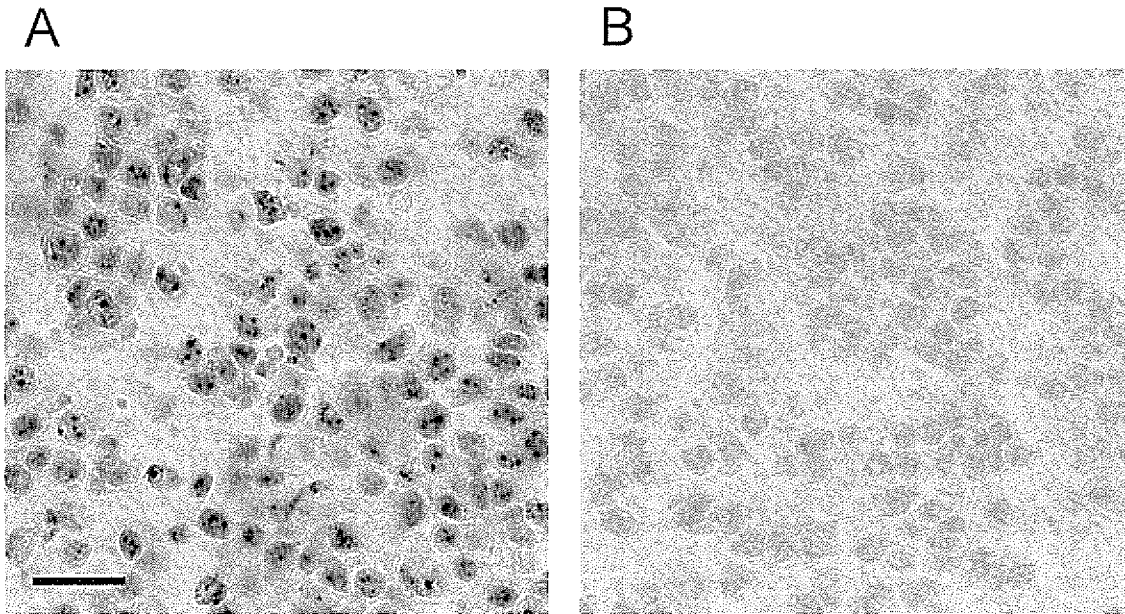
がんの抑制剤又は治療剤をスクリーニングする方法であって、

配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列における510位のセリン残基がリン酸化される肝臓受容体ホモログ1 (LRH1) を発現する細胞を被験物質で処置する工程、

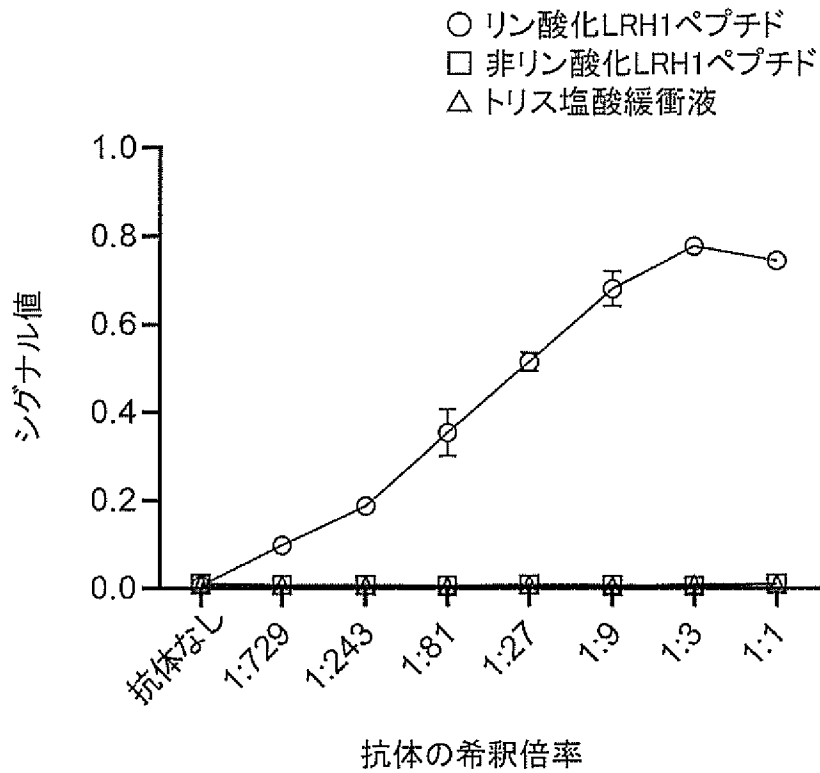
前記リン酸化を測定する工程、及び

被験物質で処置しない場合と比較して前記リン酸化が減少する場合に被験物質をがんの抑制剤又は治療剤として同定する工程を含む方法。

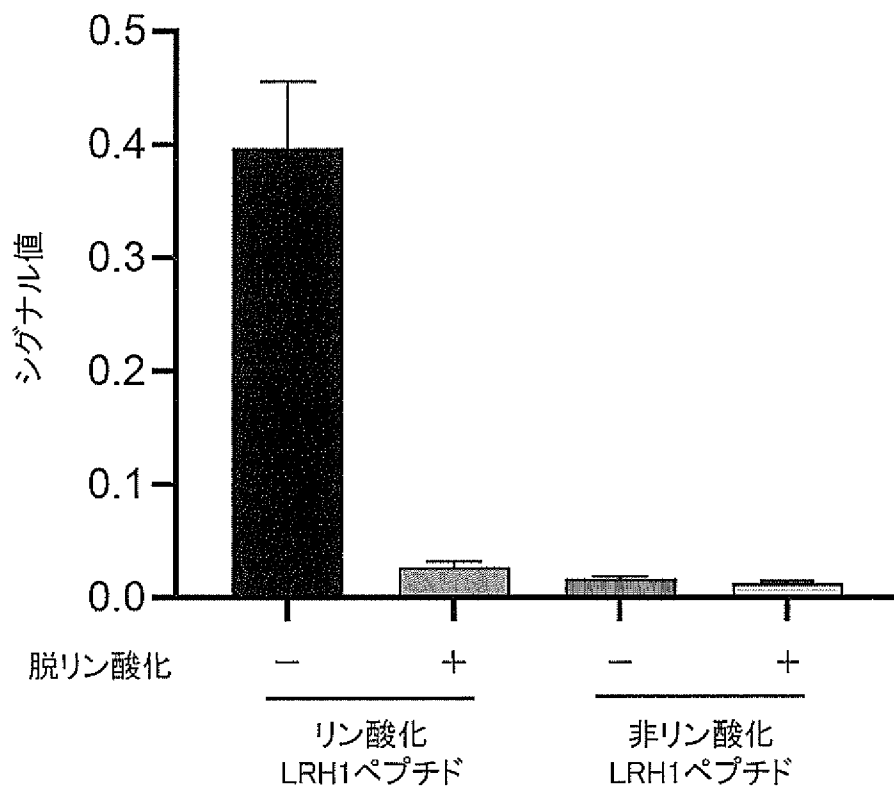
[図1]



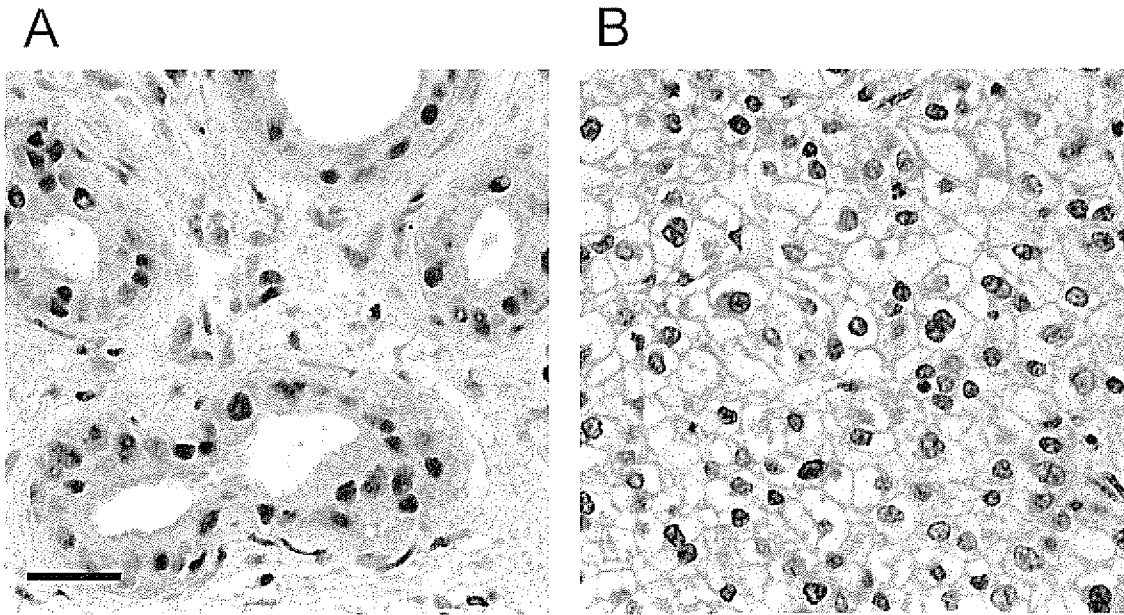
[図2]



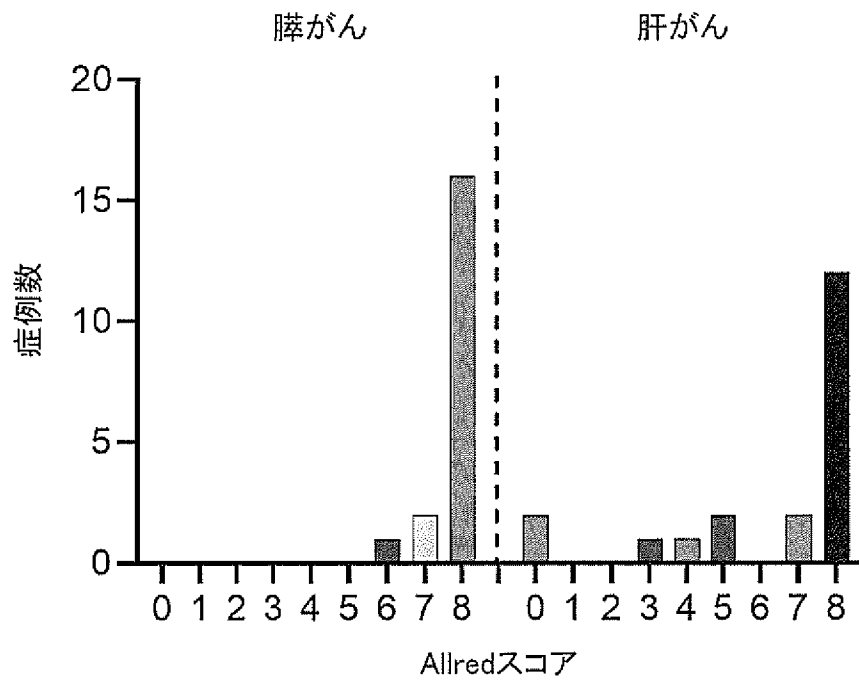
[図3]



[図5]

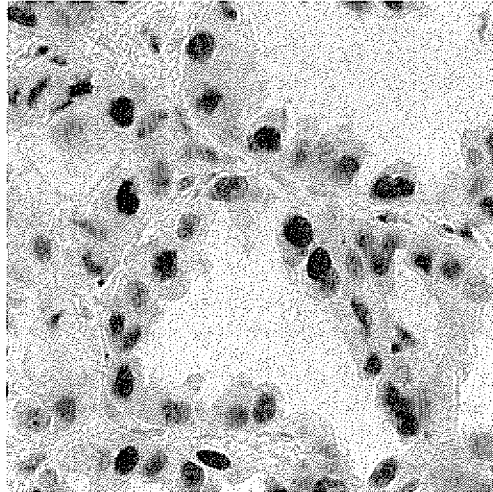
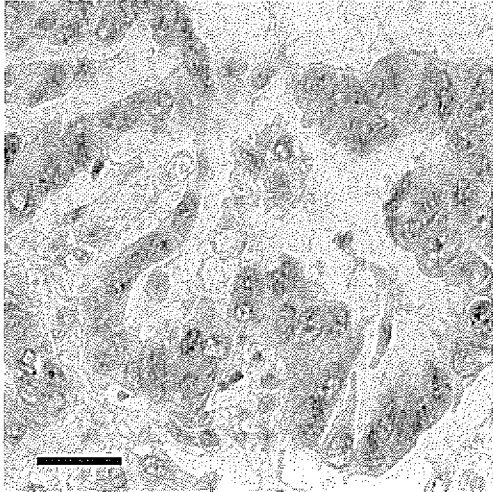


[図6]

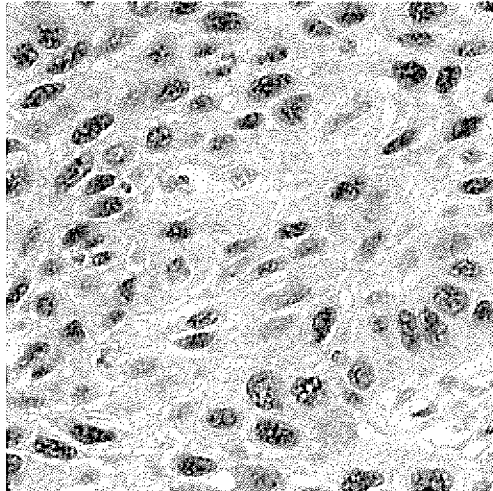
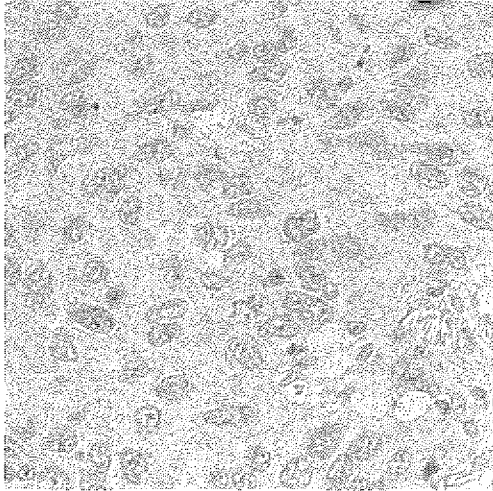


[図7]

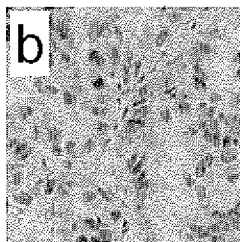
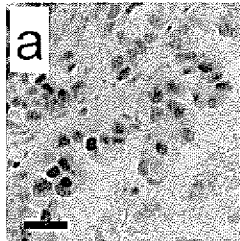
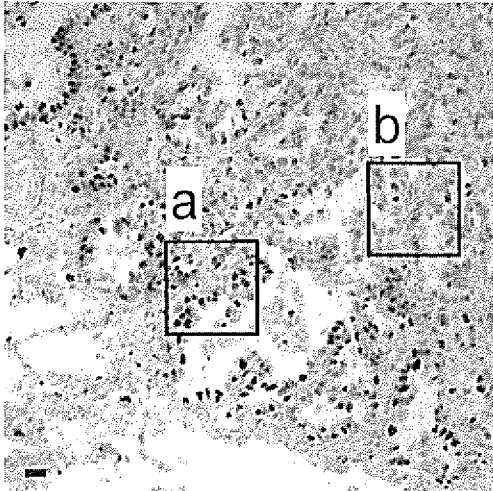
A



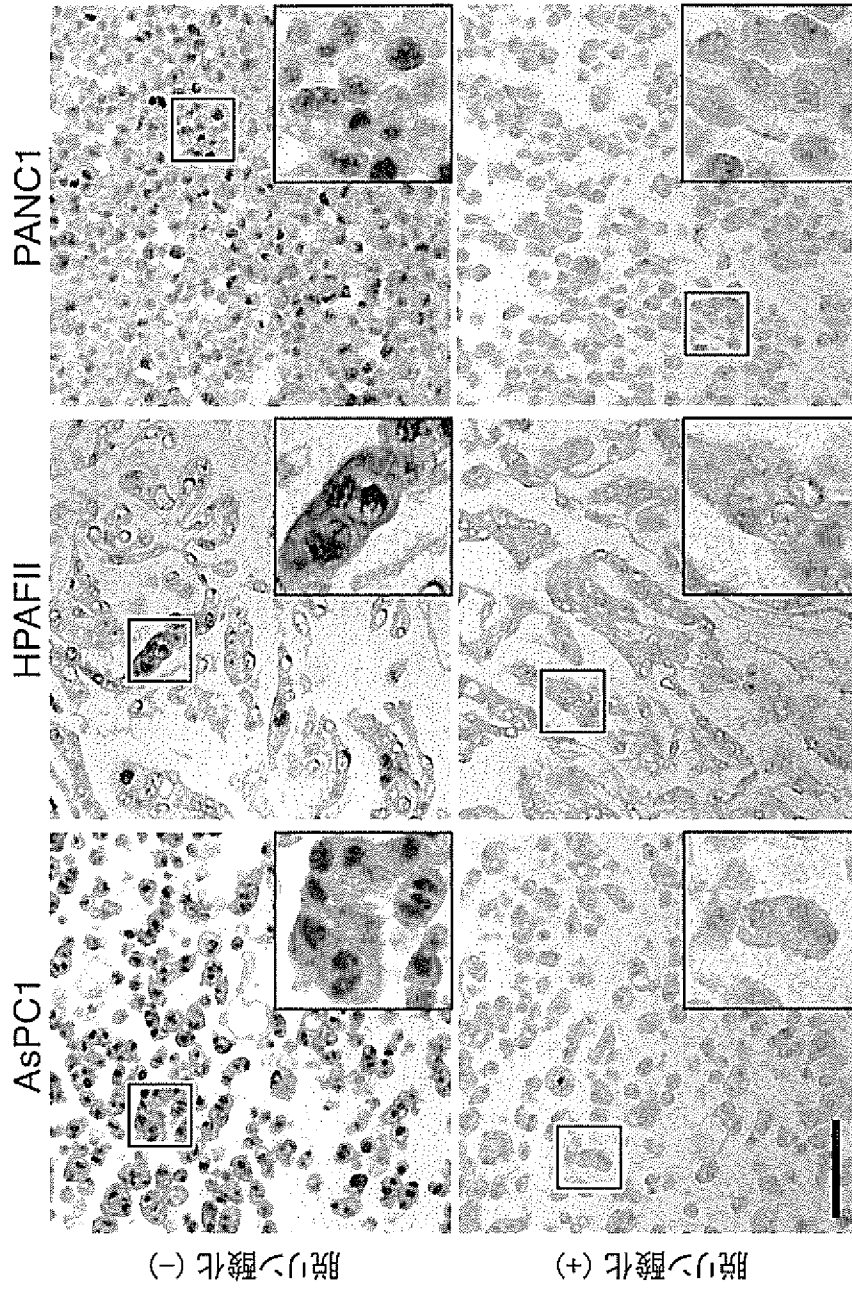
B



C

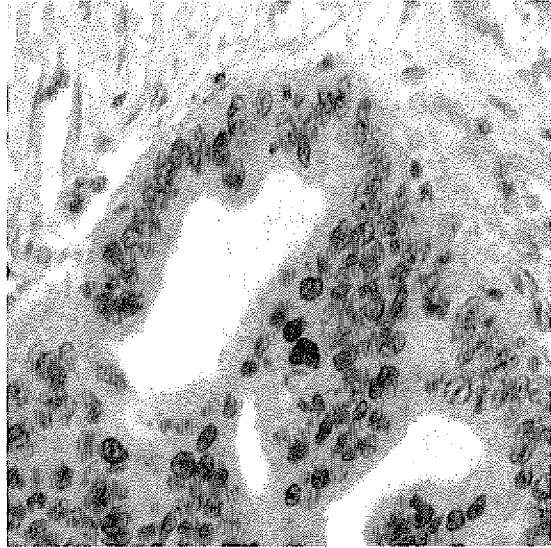
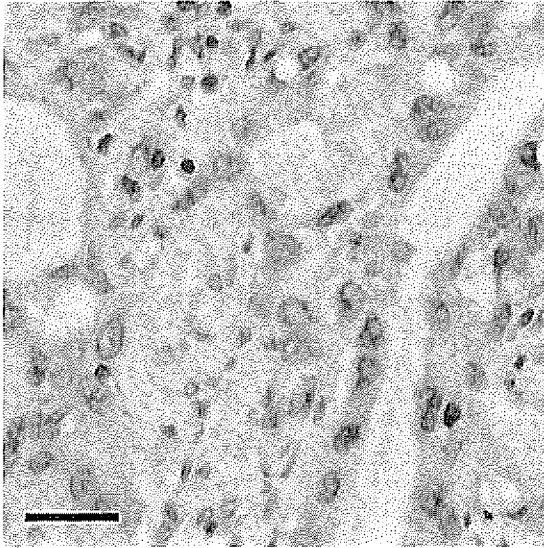


[図8]

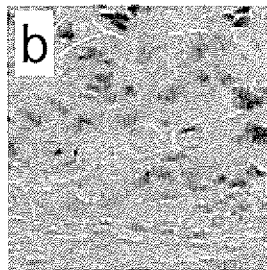
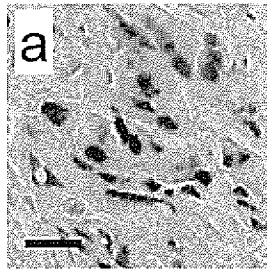
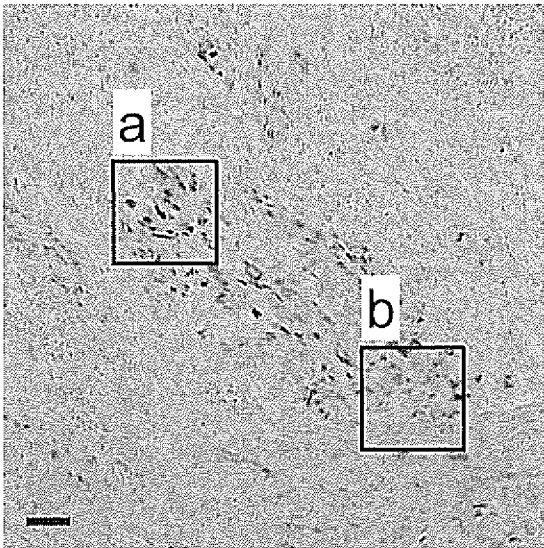


[図9]

A

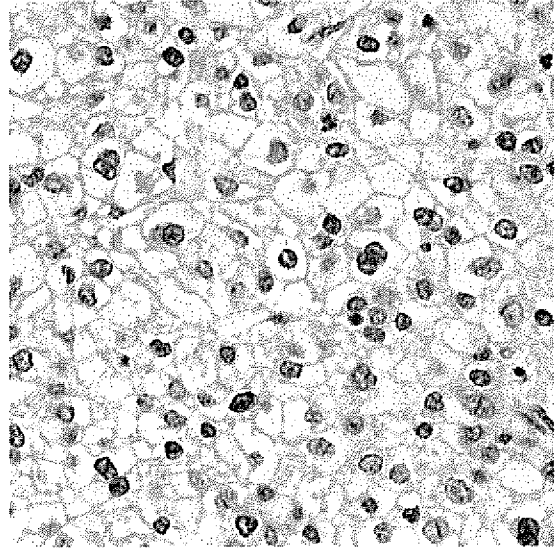
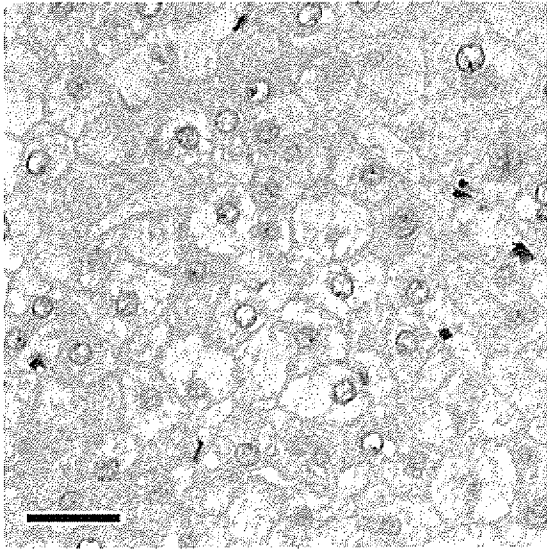


B

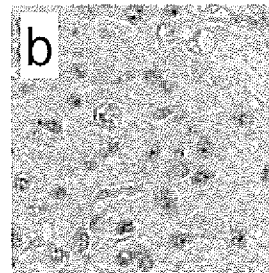
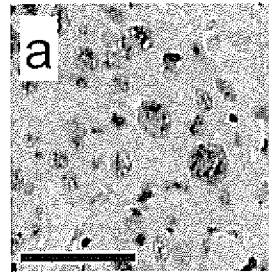
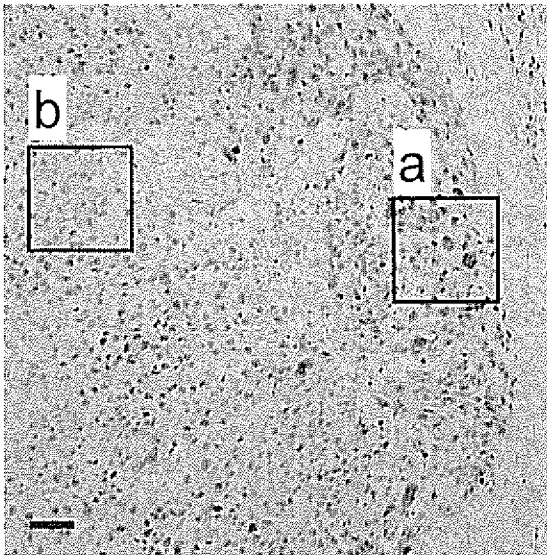


[図10]

A

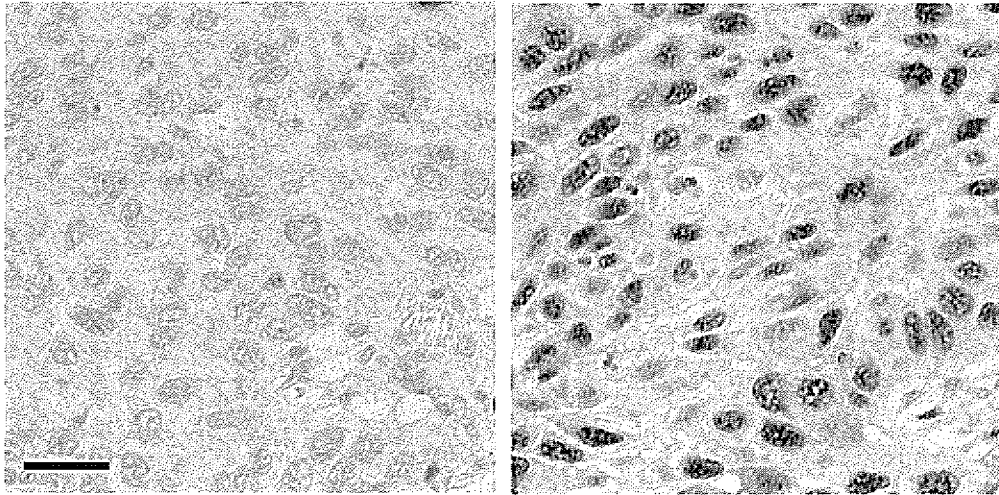


B

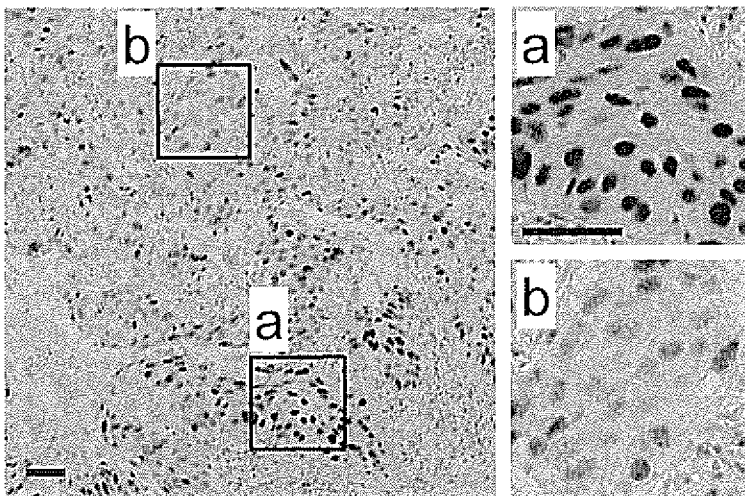


[図11]

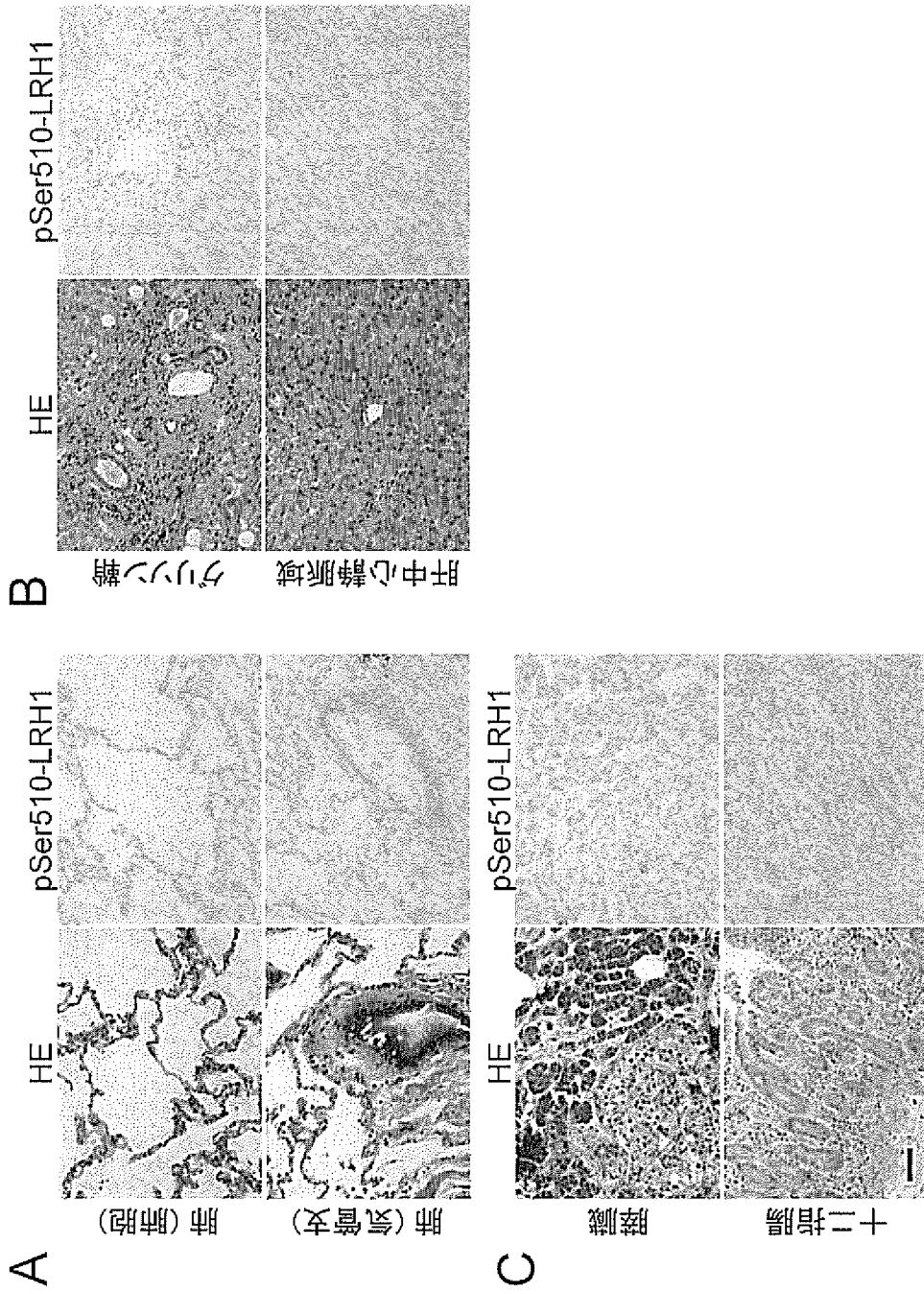
A



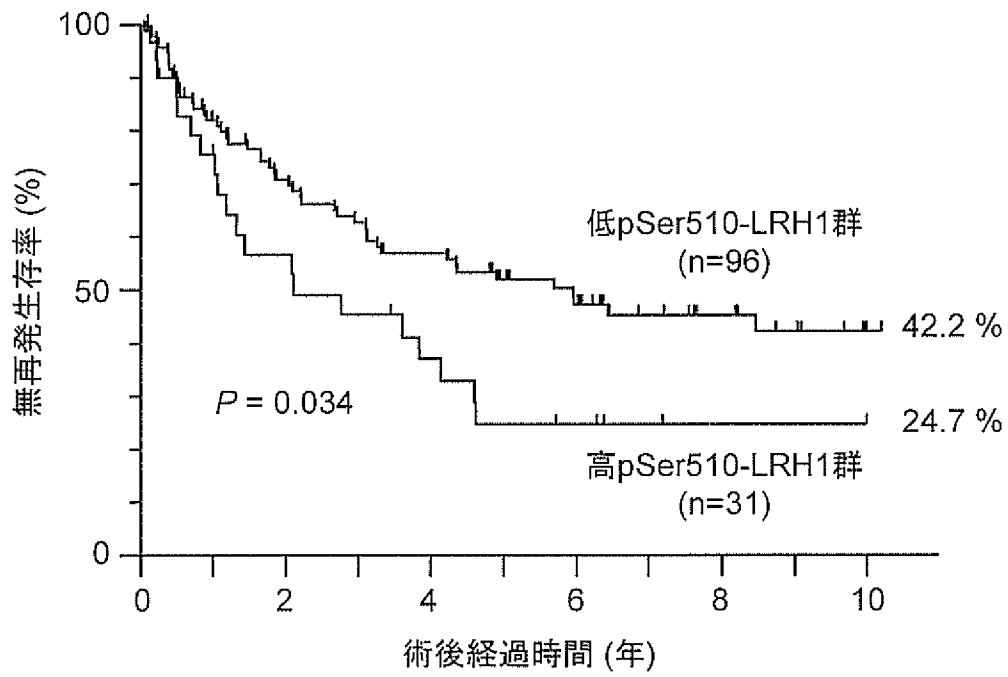
B



[図12]



[図13]



[図14]

臨床病理学的因子 DFS	単変量解析				多変量解析				
	P値	ハザード比	95%信頼区間の下限	95%信頼区間の上限	P値	ハザード比	95%信頼区間の下限	95%信頼区間の上限	
年齢	65歳以上	0.205	1.409	0.829	2.397				
性別	男性	0.256	1.354	0.803	2.283				
アルコール性肝障害	あり	0.824	1.067	0.601	1.894				
NAFLD	あり	0.484	2.029	0.280	14.720				
NASH	あり	0.386	1.497	0.601	3.728				
脂肪肝	あり								
遠隔転移	あり	0.000	5.912	3.244	10.774	0.000	5.366	2.771	10.393
血管浸潤	あり	0.014	1.912	1.139	3.209				
腫瘍径	5cm以上	0.004	2.053	1.262	3.338	0.045	1.712	1.013	2.894
腫瘍個数	2個以上	0.005	2.160	1.257	3.711				
分化度	中・低分化	0.732	1.098	0.642	1.878				
漿膜浸潤	あり	0.048	3.260	1.011	10.510				
肝内転移	あり	0.000	2.957	1.632	5.358	0.003	2.538	1.388	4.643
肝硬変	あり	0.413	1.280	0.708	2.313				
T因子	T2以上	0.001	2.443	1.460	4.089				
ステージ	II以上	0.001	2.382	1.412	4.017				
AFP	400以上	0.944	1.021	0.567	1.840				
pSer510-LRH1 (IRS)	IRS8-12	0.037	1.745	1.034	2.947	0.003	2.264	1.320	3.882

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/000848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i FI: G01N33/574 A; G01N33/15 Z; C07K16/28; G01N33/50 Z ZNA		
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) C07K16/28; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI; JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-245960 A (NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL INNOVATION) 09 December 2013 (2013-12-09) entire text, in particular, see paragraphs [0008], [0009], [0027]-[0038], etc.	1-10
A	WENZHOU, Sun et al. LRH1 Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration and Is Correlated With Poor Prognosis in Ovarian Cancer. <i>Frontiers in Oncology</i> . 2020, vol. 10, p. 583566 see entire text, etc.	1-10
A	NADOLNY, Christina et al. Liver receptor homolog-1 (LRH-1): a potential therapeutic target for cancer. <i>Cancer Biol Ther</i> . 2015, vol. 16, no. 7, pp. 997-1004, doi: 10.1080/153 see entire text, etc.	1-10
A	JP 2016-535270 A (ELECTROPHORETICS LIMITED) 10 November 2016 (2016-11-10) see entire text, etc.	1-10
A	JP 2012-515334 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 05 July 2012 (2012-07-05) see entire text, etc.	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 17 March 2022		Date of mailing of the international search report 05 April 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/000848

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2013-245960	A 09 December 2013	(Family: none)	
JP 2016-535270	A 10 November 2016	US 2016/0195536 A1 see entire text, etc. WO 2015/022530 A2 EP 3033624 A1	
JP 2012-515334	A 05 July 2012	US 2011/0306514 A1 see entire text, etc. US 2013/0210648 A1 US 2017/0115295 A1 US 2018/0074076 A1 US 2019/0113517 A1 WO 2010/083252 A2 WO 2014/151079 A2 EP 2380025 A2 EP 2667194 A2 EP 2667195 A2 EP 2972374 A2 JP 2014-41162 A JP 2016-35475 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 16/28(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i FI: G01N33/574 A; G01N33/15 Z; C07K16/28; G01N33/50 Z ZNA		
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）） C07K16/28; G01N33/15; 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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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） WPI; JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); 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
A	JP 2013-245960 A (独立行政法人医薬基盤研究所) 09.12.2013 (2013-12-09) 全文、特に、段落 [0008]、[0009]、[0027] - [0038] 等 参照	1-10
A	WENZHOU Sun、外4名、LRH1 Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration and Is Correlated With Poor Prognosis in Ovarian Cancer, Frontiers in Oncology, 2020, Vol.10, Page.583566 全文等参照	1-10
A	NADOLNY Christina 外1名、Liver receptor homolog-1 (LRH-1): a potential therapeutic target for cancer, Cancer Biol Ther, 2015, Vol.16, No.7, Page.997-1004, doi: 10.1080/153 全文等参照	1-10
A	JP 2016-535270 A (エレクトロフォレティクス リミテッド) 10.11.2016 (2016- 11-10) 全文等参照	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “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 “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の日の後に公表された文献	
国際調査を完了した日	17.03.2022	国際調査報告の発送日 05.04.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 草川 貴史 2J 4075 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2022/000848

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2013-245960 A	09.12.2013	(ファミリーなし)	
JP 2016-535270 A	10.11.2016	US 2016/0195536 A1 全文等参照 WO 2015/022530 A2 EP 3033624 A1	
JP 2012-515334 A	05.07.2012	US 2011/0306514 A1 全文等参照 US 2013/0210648 A1 US 2017/0115295 A1 US 2018/0074076 A1 US 2019/0113517 A1 WO 2010/083252 A2 WO 2014/151079 A2 EP 2380025 A2 EP 2667194 A2 EP 2667195 A2 EP 2972374 A2 JP 2014-41162 A JP 2016-35475 A	