

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年12月8日(08.12.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/195051 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/066514
- (22) 国際出願日: 2016年5月27日(27.05.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-109454 2015年5月29日(29.05.2015) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 本田 一文(HONDA, Kazufumi); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 山田 哲司(YAMADA, Tesshi); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP).

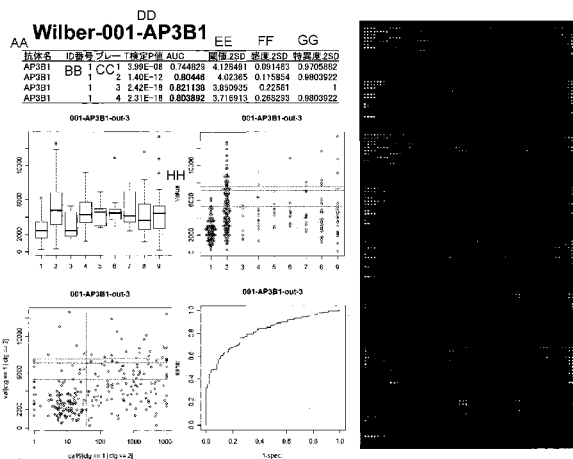
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (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),

[続葉有]

(54) Title: PLASMA BIOMARKER PANEL FOR DIAGNOSING PANCREATIC CANCER

(54) 発明の名称: 膵がんを診断するための血漿バイオマーカーパネル

図1



AA Antibody name
BB ID No.
CC Plate T
DD Calibration P-value
EE Threshold 2SD
FF Sensitivity 2SD
GG Specificity 2SD
HH Value

(57) Abstract: Provided is a method for detecting pancreatic cancer, said method comprising detecting and/or assaying a protein or a fragment thereof existing in a body fluid sample of a subject. Also provided is a diagnostic agent for pancreatic cancer or a kit for detecting pancreatic cancer, each comprising an antibody against the aforesaid protein or a fragment thereof.

(57) 要約: 本発明は、被験体の体液試料中に存在するタンパク質またはその断片を検出および/または測定することにより、膵がんを検出する方法を提供する。また、これらタンパク質またはその断片に対する抗体を含む、膵がん診断剤または膵がん検出用のキットを提供する。

WO 2016/195051 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称

膵がんを診断するための血漿バイオマーカーパネル

5

技術分野

[0 0 0 1]

本発明は、膵がんを診断するための血漿バイオマーカーパネルおよび血漿バイオマーカーを用いる膵がんの検出方法に関する。

10

背景技術

[0 0 0 2]

膵がんは難治がんであり、5 年生存率は他の固形がんに比べて非常に低い。それは、早期膵がんの検出は困難であり、進行がんとして発見されることが多いことから、根治手術をできる場合が少ないためである。根治手術可能な早期膵がんを効率よく発見する血液診断マーカーの開発は、早期膵がんの発見率を高め、膵がん死亡率を改善する可能性が高い。

15

[0 0 0 3]

これまでに膵がんに対する血液バイオマーカーとして実用化されているものは、CA19-9 や DUPAN2 などの血液糖鎖マーカーである。しかしながら、CA19-9 は、早期膵がん患者には反応しない。また、ルイス抗原陰性患者は CA19-9 を産生しないために、ルイス抗原陰性患者は進行膵がん患者であっても CA19-9 の上昇が検出されることはない。よって、ASCO においても、早期膵がんに対する診断バイオマーカーとしての CA19-9 の意義は否定されている。

20

25

[0 0 0 4]

また、正常膵管細胞には発現しないが、浸潤性膵管がん細胞に発現する mRNA の候補に関する報告もある（非特許文献 1 : Nakamura et. al, table 1）。非特許文献 1 では、手術標本由来の正常膵管と浸潤性膵管がん部分をマイクロダイゼクションした細胞から mRNA を抽出し、genome
5 wide cDNA microarray にハイブリダイゼーションを行い、mRNA を見出している。これらの mRNA は、がんが生じている組織での発現変化に基づいて見出されたものであるため、膵がんの診断バイオマーカーとして使用するには、被験体より採取した組織を用いる必要がある。

[0 0 0 5]

10 したがって、依然として、膵がんを安全に、高い感受性で、特異的に、経済的に検出できるバイオマーカーの開発が望まれている。

[0 0 0 6]

[非 特 許 文 献 1] Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, Ishikawa O, Ohgaki K,
15 Kashimura N, Miyamoto M, Hirano S, Kondo S, Katoh H, Nakamura Y, Ktagiri T. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection.
20 Oncogene. 2004 Mar 25;23(13):2385-400.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0 0 0 7]

25 本発明は、体液を利用する膵がんの検出方法を提供することを目的とする。また、膵がんを非侵襲的に検出可能なバイオマーカーを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008]

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、
5 がん患者血漿と健常者血漿を抗体基盤プロテオミクスで分析したところ、
膵がん患者と健常者を Receiver Operating Characteristic
analysis (ROC 解析) の area of under curve (AUC) で、0.8 を超え
る抗体を 23 個見出した。これは、それぞれの抗体の結合量が、膵がん患
10 者と健常者間で高度な統計学的な有意差を有していることを意味する。す
なわち、これらの 23 個の抗体およびそれぞれの抗体の認識する 23 個の
タンパク質またはその断片は、膵がんを非侵襲的に検出可能なバイオマ
ーカーであることを見出し、本発明を完成した。

[0009]

すなわち、本発明は以下に関する。

15 [1] 被験体由来の体液試料中の少なくとも 1 つのバイオマーカーを検出
および／または定量する工程を含み、

前記バイオマーカーが、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS,
CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9,
MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1, および
20 HYOU1 からなる群から選択されるタンパク質またはその断片である、膵
がんを検出する方法。

[2] 前記体液試料が、全血、血清、血漿または尿である、[1] に記
載の方法。

[3] 免疫学的アッセイ法を用いて、前記バイオマーカーを検出および
25 /または定量する、[1] または [2] に記載の方法。

[4] 前記免疫学的アッセイ法が、ウェスタンブロット法、ドットプロ
ット分析、スロットブロット分析、ラジオ免疫学的アッセイ (RIA)、

ペプチドマイクロアレイ、酵素免疫測定法（E I A）および酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）からなる群から選択される、[3] に記載の方法。

[5] 前記バイオマーカーに対する抗体を用いて、前記バイオマーカー
5 を検出および／または定量する、[1] ～ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] 前記体液試料と前記抗体とを接触させる工程、および
前記体液試料中の少なくとも 1 つのバイオマーカーと前記抗体との結合
を検出および／または定量する工程を含む、[5] に記載の方法。

[7] 質量分析装置を用いて、前記バイオマーカーを検出および／また
10 は定量する、[1] または [2] に記載の方法。

[8] 膵がんの診断に用いるための、[1] ～ [7] のいずれかに記載
の方法。

[9] 前記被験体が膵がんを有する、[1] ～ [8] のいずれかに記載
の方法。

15 [1 0] 体液試料中のバイオマーカーのレベルを、前記バイオマーカー
の対照レベルと比較する工程をさらに含み、

(i) 前記被験体試料中の AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS,
CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9,
MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1 から選択
20 される少なくとも 1 つのバイオマーカーレベルが対照レベルよりも高い
場合、および／または

(ii) 前記被験体試料中の HYOU1 レベルが対照レベルよりも低い場合、
に、膵がんが存在することの指標とする、[1] ～ [8] のいずれかに記
載の方法。

25 [1 1] バイオマーカーに対する抗体を含有する、膵がん診断剤であっ
て、

前記バイオマーカーが、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1, および HYOU1 からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質またはその断片である、膵がん診断剤。

[12] 前記体液試料が、全血、血清、血漿または尿である、[11]に記載の診断剤。

[13] バイオマーカーに対する抗体を含有する、膵がん検出用のキットであって、

10 前記バイオマーカーが、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1, および HYOU1 からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質またはその断片である、キット。

15 [14] ウエスタンブロット法、ドットブロット分析、スロットブロット分析、ラジオ免疫学的アッセイ (RIA)、ペプチドマイクロアレイ、酵素免疫測定法 (EIA) および酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) からなる群から選択される免疫学的アッセイに従って前記検出および／または定量を行うための、[13]に記載のキット。

20 [15] 前記体液試料が、全血、血清、血漿または尿である、[13]または[14]に記載のキット。

[16] 膵がんの診断に用いるための、[13]～[15]のいずれかに記載のキット。

[17] AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1, および HYOU1 からなる群

から選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその断片を含む、膵がん検出用のバイオマーカー。

発明の効果

5 [0 0 1 0]

本発明により、膵がん検出用のバイオマーカー、前記バイオマーカーを用いる膵がんの検出方法、前記バイオマーカーに対する抗体を含む膵がんの検出用キットまたは診断剤が提供される。本発明のバイオマーカーは、膵がんを効率的に判別するために利用することが可能であり、これらのバイオマーカーを用いる膵がんの検出方法または診断方法は臨床的にきわめて有効である。

本発明は被験体由来の体液試料を用いてバイオマーカーを検出および／または定量して膵がんを検出する。このような非侵襲性のバイオマーカーの発明は、膵がんスクリーニングへの新しい医療戦略を提供し、ひいては膵がんの死亡率の低減に貢献できる可能性を有する。

また、本発明の一態様において、バイオマーカーは ELISA 等の免疫学的アッセイ法や、質量分析等を用いた臨床検査方法により検出することができる。

また、本発明の一態様において、本発明のバイオマーカーを組み合わせることによって、あるいは既知のバイオマーカーと組み合わせることによって、膵がん診断用のバイオマーカーパネルを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0 0 1 1]

25 [図 1] 図 1 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 AP3B1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 2〕 図 2 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 C2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 3〕 図 3 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 CKS1B 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

5 〔図 4〕 図 4 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 CKS2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 5〕 図 5 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 CSPG2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

10 〔図 6〕 図 6 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 CYCS 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 7〕 図 7 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 CD82 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 8〕 図 8 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 PI3 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

15 〔図 9〕 図 9 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 RNASE1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 10〕 図 10 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 RNASET2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

20 〔図 11〕 図 11 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 VRK2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 12〕 図 12 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 EV1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 13〕 図 13 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 HMGB2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

25 〔図 14〕 図 14 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 MST4 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 1 5〕 図 1 5 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 MMP9 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 1 6〕 図 1 6 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 MYBL2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

5 〔図 1 7〕 図 1 7 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 HYOU1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 1 8〕 図 1 8 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 PPM1B 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

10 〔図 1 9〕 図 1 9 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 AK3L1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 2 0〕 図 2 0 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 IGFBP2 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 2 1〕 図 2 1 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 STMN1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

15 〔図 2 2〕 図 2 2 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 ANXA6 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

〔図 2 3〕 図 2 3 は、消化器がん血漿マイクロアレイに抗 ATP6AP1 抗体をハイブリダイズさせた結果を示す。

20 発明を実施するための形態

〔 0 0 1 2 〕

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に限定されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で当業者であれば適宜変更して実施することができる。なお、本明細書に記載した全ての文献及び刊行物は、その目的にかかわらず参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。また、2015 年 5 月 29 日に
25 出願し、本願優先権主張の基礎となる特願 JP2015-109454 号の特許請求

の範囲、明細書、図面及び要約書の開示内容は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

[0 0 1 3]

1. 本発明の概要

5 本発明は、膵がんを検出する方法に関する。本発明において、抗体ライブラリーと血漿マイクロアレイとを用いたプロテオミクス解析により同定された 23 種類のタンパク質またはその断片は、膵がんを健常者体液から判別するための Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析において、0.8 を超える area under curve (AUC) 値を有する。0.8 以上の AUC 値は、臨床的に有用な診断マーカーであることを意味する。したがって、これらのタンパク質またはその断片は、膵がんの発症リスク、検出、診断およびモニタリングのためのバイオマーカーとなり得る。例えば、本発明のバイオマーカーは、膵がんだけでなく、膵臓に発生する悪性腫瘍を検出するために使用してもよい。また、本発明のバイオマーカーは、膵がんの前がん病変やリスク疾患を診断するために使用してもよい。本発明のバイオマーカーと結合する物質を用いて、膵がんを検出することができる。

[0 0 1 4]

20 また、本発明は、被験体の体液中のバイオマーカーの存在を検出および／または測定することにより、膵がんを検出することが可能である。また、本発明は、免疫学的アッセイ法または質量分析装置により、タンパク質レベルでバイオマーカーを検出および／または測定することが可能である。このように、本発明の方法は、非侵襲的に膵がんを検出することが可能である。また、早期膵がんを検出し得る。本発明のバイオマーカーは単独で使用してもよいし、既知のバイオマーカーと組み合わせたパネルあるいは本発明のバイオマーカーを組み合わせたパネルとして使用してもよい。本発明のバイオマーカーはタンパク質またはその断片であり、ELISA 法等

の免疫学的アッセイ法や質量分析の手法で検出することができるため、臨床医学、体外診断や臨床検査を行う分野で有用性を発揮することが期待されるものである。

[0 0 1 5]

- 5 したがって、より詳しくは、本発明は、尿、血液（例えば、全血、血清または血漿）などの体液試料中の上昇または下降したバイオマーカの検出および／または定量による膵がんの検出方法に関する。本発明のバイオマーカはタンパク質またはその断片である。

[0 0 1 6]

- 10 本発明はまた、膵がん検出用のキットまたは診断剤に関する。本発明のキットまたは診断剤は、本発明の方法を実施するために使用することができる。

[0 0 1 7]

- 15 本発明の一実施形態では、本発明の方法は、抗体等を用いた免疫学的アッセイ法によって実施される。例えば、一実施形態では、本発明の方法は、
（a）被験体由来の体液試料と前記抗体とを接触させる工程、（b）前記体液試料中の少なくとも1つのバイオマーカと前記抗体との結合を検出
および／または定量する工程、および場合により（c）（b）で得られた
20 体液試料中のバイオマーカのレベルを、前記バイオマーカの対照レベルと比較する工程を含む、膵がんを検出する方法である。被験体における
バイオマーカのレベルと対照レベルとの差が膵がんが存在することの指標になり得る。

[0 0 1 8]

2. 本発明のバイオマーカ

- 25 本発明において、バイオマーカは、がんに関連しており、その検出または測定ががんの検出、患者の診断またはモニタリングにおいて有用な物質である。本発明におけるバイオマーカはタンパク質またはその断片で

ある。本発明のバイオマーカーは、がんの検出を行うこと、早期診断を含む膵がんの診断を行うこと、前がん病変の診断を行うこと、膵臓における悪性腫瘍の発生の診断を行うこと、膵がんの存在についての健常な集団またはハイリスク集団のスクリーニング、被験体の予後を決めること、および手術、放射線照射、化学療法もしくはその他のがん治療を受けている間の被験体の経過をモニターすることなどの種々の目的で使用する事ができる。

[0 0 1 9]

膵がんを検出するバイオマーカーを同定するために、本発明者らによって開発された血漿マイクロアレイと抗体ライブラリーを用いて、膵がん患者の血漿中に循環するタンパク質を測定した。同定された本発明のバイオマーカーを表 1 に記す。同定された 2 3 種のタンパク質はすべて AUC 値で 0.8 を超える（表 2）。

[0 0 2 0]

[表 1]

タンパク質名	Ensembl Number	名称	Ensembl Webpage URL
AK3L1	ENSG00000147853	Adenylate kinase 4, mitochondrial	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147853;r=9:4709559-4742043
ANXA6	ENSG00000197043	Annexin A6	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000197043;r=5:151100712-151157882
AP3B1	ENSG00000132842	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000132842;r=5:78000525-78294755
ATP6AP1	ENSG00000071553	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000071553;r=X:154428632-154436516
C2	ENSG00000166278	complement component 2	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000166278;r=6:31897785-31945672;redirect=no
CD82	ENSG00000085117	CD82	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000085117;r=11:44564427-44620363
CKS1B	ENSG00000173207	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000173207;r=1:154974653-154979249
CKS2	ENSG00000123975	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000123975;r=9:89311198-89316703;t=ENST00000314355
CSPG2	ENSG00000038427	versican	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000038427;r=5:83471465-83582303
CYCS	ENSG00000172115	cytochrome c, somatic	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000172115;r=7:25120091-25125361
EV1	ENSG00000085276	EV1	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000085276;r=3:169083499-169663618
HMG2	ENSG00000164104	high mobility group box 2	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000164104;r=4:173331695-173335125
HYOU1	ENSG00000149428	hypoxia up-regulated 1	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000149428;r=11:119044189-119057202
IGFBP2	ENSG00000115457	Insulin-like growth factor binding protein 2	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000115457;r=2:216632828-216664436
MMP9	ENSG00000100985	Matrix metalloproteinase 9	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000100985;r=20:46008908-46016561;t=ENST00000372330
MST4	ENSG00000134602	serine/threonine protein kinase 26	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000134602;r=X:132023265-132075943
PI3	ENSG00000124102	Peptidase inhibitor 3	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000124102;r=20:45174876-45176544;t=ENST00000243924
PPM1B	ENSG00000138032		http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000138032;r=2:44167969-44244384
RNASE1	ENSG00000129538	Ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000129538;r=14:20801228-20803278
RNASET2	ENSG00000026297	Ribonuclease T2	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000026297;r=6:166929504-166957191
VRK2	ENSG00000028116	Vaccinia related kinase 2	http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000028116;r=2:57907651-58159920

[0 0 2 1]

[表 2]

抗原名	ID番号	プレート番	T検定P値	AUC	閾値.2SD	感度.2SD	特異度.2SD
AP3B1	1	3	2.42E-18	0.821138	3.850935	0.22561	1
C2	2	3	1.04E-29	0.88328	3.64682	0.414634	0.9901961
CKS1B	3	2	2.17E-23	0.876913	3.901408	0.213415	1
CKS2	4	4	2.07E-25	0.864	3.821374	0.347561	1
CSPG2	5	4	3.35E-19	0.834768	3.832573	0.182927	0.9901961
CYCS	6	3	5.14E-19	0.826339	3.887536	0.237805	1
CD82	7	4	2.83E-20	0.821078	3.892285	0.262195	1
PI3	8	4	1.38E-22	0.832496	3.723319	0.310976	0.9901961
RNASE1	9	2	1.06E-15	0.805326	4.031564	0.103659	1
RNASET2	10	2	2.69E-17	0.858202	4.1212	0.097561	1
VRK2	11	2	8.43E-21	0.860414	3.980399	0.085366	1
EVI1	20	3	6.33E-15	0.845827	3.974804	0.140244	1
HMGB2	26	4	9.22E-20	0.866511	3.891996	0.030488	1
MST4	33	2	1.05E-07	0.802487	4.254386	0.109756	1
MMP9	34	3	4.36E-13	0.855691	4.143968	0	1
MYBL2	35	4	2.11E-08	0.81534	4.504063	0	1
HYOU1	36	2	4.43E-18	0.813038	3.849192	0.006098	0.9901961
PPM1B	39	3	2.75E-13	0.852941	4.448287	0	1
AK3L1	74	2	7.29E-14	0.800514	3.610316	0	1
IGFBP2	95	2	1.46E-22	0.849534	3.443565	0.018293	1
STMN1	99	3	2.68E-19	0.802547	3.125581	0.189024	1
ANXA6	100	4	4.13E-14	0.84505	4.123383	0.006098	1
ATP6AP1	127	3	2.36E-24	0.814264	2.707848	0.536585	0.9313725

[0 0 2 2]

- 5 より詳しくは、被験体由来の体液試料を用いて、膵がんを検出できるかどうかを評価するために、消化器癌血漿マイクロアレイを準備し、抗体ライブラリー中の抗体をハイブリダイズさせ、その蛍光強度を測定し数値化した。その結果、膵がん患者と健常者とを AUC 値 0.8 以上で判別する抗体が 2 3 種同定された。健常者試料と比較して膵がん患者の血液中で
- 10 有意に高いレベルを示すタンパク質は、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1 であった。一方、健常者試料と比較して膵がん患者の血液中で有意に低いレベルを示すタンパク質は HYOU1 であった (図 1 ~ 2 3)。

15 [0 0 2 3]

したがって、これらのデータは、タンパク質レベルの検出アッセイによる本発明のバイオマーカーの定量化は、膵がんの検出のための新規で、安全な、感度の高い、特異的な、経済的な方法を提供し得ることを示す。

さらに、本発明のバイオマーカーの体液試料中のレベルを用いて、早期発見だけでなく疾患の過程を通じて膵がんの存在をモニターでき、治療結果および予後結果を予測できる。

[0 0 2 4]

用語「本発明のバイオマーカー」とは、表 1 に示されるタンパク質またはその断片の少なくとも 1 つを指す。本用語は、ヒトにおけるバイオマーカーのすべての相同体、天然に存在する対立遺伝子変異体産物、アイソフォームおよび前駆体を含む。対立遺伝子変異体は、本発明のバイオマーカーのアミノ酸配列からの保存的アミノ酸の置換を含む場合もあり、本発明のバイオマーカー相同体中の対応する位置に由来するアミノ酸置換を含む。また、選択的スプライシングによって生じる各転写変異体も本発明のバイオマーカーに含まれる。さらに、このようなタンパク質の断片も本発明のバイオマーカーに含まれる。断片は、例えば 3、4、5、6、7、8、9 または 10 アミノ酸以上のペプチドである。また、本発明のバイオマーカーは、ヒトにおけるバイオマーカーに対応するヒト以外の種におけるタンパク質またはその断片も含む。本発明のバイオマーカーは、膵がんの検出に利用できるため、膵がんマーカー、癌バイオマーカーともいう。また、本発明のバイオマーカーに結合する抗体が認識するペプチド配列や糖鎖構造も、本発明のバイオマーカーに含まれる。したがって、当該ペプチド配列、糖鎖を検出または定量することによる、膵がんの検出方法も本発明に含まれる。

[0 0 2 5]

本発明の方法、診断剤およびキットを用いて検出される癌は膵がんである。本発明の膵がんは、すべての腫瘍性細胞成長および増殖ならびにすべ

ての前癌状態および癌性の細胞および組織を指す。本発明において、膵がんは、限定される訳ではないが、漿液性嚢胞腺癌、粘液性嚢胞腺癌、膵管内乳糖粘液性腺癌、膵管内管状腺癌、(膵の)異型過形成および上皮内癌、浸潤性膵管癌、腺房細胞癌、高分子型内分泌癌、低分子型内分泌癌（小細胞癌）、併存腫瘍（外分泌・内分泌）、膵管癌と島細胞混合癌、膵管癌と島細胞と腺房細胞混合癌、充実性偽乳頭状腫瘍、膵芽腫、未分化癌、平滑筋肉腫、悪性繊維組織球腫、悪性リンパ腫および傍神経節腫を含む。浸潤性膵肝がんには、乳糖腺癌、管状腺癌、腺扁平上皮癌、粘液癌、退形成癌、浸潤性粘液性嚢胞腺癌、及び膵管内腫瘍由来の浸潤癌が含まれる。管状腺癌には、高分化型管状腺癌、中分化型管状腺癌及び低分子型管状腺癌が含まれる。また、本発明の方法、診断剤およびキットを用いて検出される癌は、非原発性の悪性腫瘍であってもよい。そのような悪性腫瘍は、限定されるわけではないが、例えば、乳癌（例えば、浸潤性（侵襲性）、前浸潤性、炎症性、パジェット病、転移性または再発性）；胃腸癌／消化器癌（例えば、虫垂、胆管、結腸、食道、胆嚢、胃(gastric)、腸、肝臓、膵臓、腎臓および胃(stomach)）；泌尿生殖器癌(genitourinary cancer)／泌尿生殖器癌(urinal cancer)癌（例えば、副腎、膀胱、腎臓癌、陰茎、前立腺、睾丸および泌尿器）；婦人科癌（例えば、子宮頸部、子宮内膜、卵管、卵巣、子宮、膣および外陰部）；頭頸部癌（例えば、眼、頭頸部、下顎、咽頭、鼻腔、口腔癌、咽頭、唾液腺、副鼻腔、咽喉、甲状腺、舌および扁桃）；血液癌(hematological cancer)／血液癌(blood cancer)（例えば、ホジキン病、白血病（急性リンパ性白血病、急性顆粒球白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病）、多発性骨髄腫、リンパ腫およびリンパ節）；筋骨格の癌／軟部組織癌（例えば、骨、骨肉腫、メラノーマ、皮膚（基底細胞、扁平細胞）、肉腫（ユーイング肉腫、カポジ肉腫））；神経系の癌（例えば、脳（星状細胞腫、神経膠芽腫、グリオーマ）、下垂体、脊髄））；および呼吸器の癌／肺癌

(例えば、肺、(腺癌、燕麦細胞、非小細胞、小細胞、扁平細胞) および中皮腫) が挙げられる。一実施形態では、癌は、卵巣癌である。もう1つの実施形態では、癌は、乳癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌、メラノーマ、神経膠芽腫、肉腫、膀胱癌および頭頸部癌からなる群から選択される癌であり得る。また、本発明の方法、診断剤およびキットを用いて検出される癌は、膵がんの前がん病変や糖尿病、慢性膵炎、遺伝性膵炎、膵管内乳頭粘液性腫瘍、膵のう胞があり得る。

[0 0 2 6]

用語「被験体」は、温血動物、例えば、哺乳類である。本発明において、被験体はヒトが好ましい。

[0 0 2 7]

本発明のバイオマーカーの存在は、種々の体液試料、例えば、全血、血漿、血清、尿、汗などにおいて検出することができる。体液とは、限定されるわけではないが、尿、全血、血漿、血清、涙、精液、唾液、痰、呼気、鼻汁、咽頭浸出液、気管支肺胞洗浄、気管吸引、間質液、リンパ液、髄膜液、羊水、腺液、糞便、汗、粘液性の、膿または尿道分泌物、脳脊髄液および経皮性浸出液が挙げられる、好ましくは、全血、血漿、血清、尿、汗であり、より好ましくは血漿である。本発明のバイオマーカーは、ヒト血漿において *in vitro* で検出されることが好ましい。本発明の方法に使用される試料は、供給源から得られたものを直接用いてもよいし、当業者に公知の方法で前処理した後に用いてもよい。試料は、任意の方法で前処理し、かつ/またはアッセイを妨げない任意の便宜な媒体中に調製してもよい。試料は、濾過、蒸留、抽出、濃縮、干渉成分の不活化、試薬の添加などの試料処理をした後に使用してもよい。本発明のバイオマーカーはエクソソームに含まれることがある。したがって、本発明において体液から単離したエクソソームや、体液中のエクソソームを試料として使用してもよい。また、本発明のバイオマーカーは、体液中を循環する腫瘍細胞

(circulating tumor cell, CTC) に結合または含有されることがある。したがって、本発明において、体液中の CTC や体液から単離した CTC を試料として使用することができる。また、CTC からタンパク質や代謝物を検出し、血液中を循環する DNA 断片を検出することで、5 検出することができる。

[0 0 2 8]

用語「検出」または「検出する」とは、標的本発明のバイオマーカータンパク質またはその断片の有無をアッセイすること、アッセイ系を確立すること、または決定することを含む。用語「検出」または「検出する」は、10 定量的、半定量的および定性的検出方法を包含する。本発明のバイオマーカータンパク質またはその断片の検出を含む本発明の実施形態では、検出方法は、E L I S A 等の免疫学的方法または質量分析装置を用いる方法であることが好ましい。本発明の種々の実施形態では、検出方法は、被験体から得た試料中の本発明のバイオマーカーの存在、不存在または量に関する15 情報を含むアウトプット（すなわち、読み出しまたはシグナル）を提供することが好ましい。例えば、アウトプットは、定性的（例えば、「陽性」もしくは「陰性」）または定量的（例えば、1 ミリリットルあたりのナノグラムなどの濃度）であり得る。

[0 0 2 9]

20 本発明は、被験体から得た体液試料中の本発明のバイオマーカーの存在を検出および／または定量することを含む、膀胱がんを検出する方法を含む。場合により、本発明の方法は、体液試料中の本発明のバイオマーカーのレベルを、正常対照試料中に存在する本発明のバイオマーカーのレベルと比較することをさらに含み、正常対照試料中のレベルと比較して、体液試料25 中の高レベルまたは低レベルの本発明のバイオマーカーが膀胱がんが存在することの指標となる。

[0 0 3 0]

したがって、本発明の一実施態様では、本発明は、尿、血液などの被験体から得た体液試料中の本発明のバイオマーカーの存在を検出および／または測定することを含み、本発明のバイオマーカーのレベルが所定の対照レベルよりも高い／または低い場合に被験体中に癌が存在することの指標とする、被験体において癌を検出する方法を含む。検出は、免疫学的方法または質量分析によって行われることが好ましい。

[0 0 3 1]

本発明において、被験体から得られた体液試料において検出された本発明のバイオマーカーレベルが、対照試料における対応するバイオマーカーのレベルより高いとは、(i) 被験体から得られた試料中の AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1 から選択される少なくとも1つのバイオマーカーレベルが対照試料の対応するバイオマーカーのレベルよりも高いこと、をいう。

また、本発明において、被験体から得られた体液試料において検出された本発明のバイオマーカーレベルが、対照試料における対応するバイオマーカーのレベルより低いとは、(ii) 前記被験体試料中の HYOU1 レベルが対照レベルよりも低いこと、をいう。

[0 0 3 2]

本発明のバイオマーカーは単独で使用してもよいし、既知のバイオマーカーと組み合わせたパネルあるいは本発明のバイオマーカーを組み合わせたパネルとして使用してもよい。複数のバイオマーカーを用いることにより、すい癌の検出感度の向上が期待できる。バイオマーカーの組合せは特に限定されず、当業者であれば検出の容易さ、確実さ、検出感度の高さ等を考慮して適宜選択することができる。

[0 0 3 3]

本発明の方法に用いられる標準または対照は、健常な対照被験体から得た本発明のバイオマーカーレベル、良性の疾患（良性腫瘍）の被験体から得た試料について得られた、またはその他の被験体の試料から得た本発明のバイオマーカーレベルに対応し得る。標準と比較した本発明のバイオマーカーレベルの上昇または下降は、早期から後期ステージの膵がんの存在を示し得る。

[0 0 3 4]

別の実施形態では、本発明は、a) 被験体から得られた尿、血液などの体液試料中の本発明のバイオマーカーのレベルを測定することと、b) 工程 (a) で測定したレベルを、癌を有していない正常な被験体から得られた体液試料中に存在するとわかっている本発明のバイオマーカーの範囲と比較することと、c) 工程 (b) の比較に基づいて被験体の膵がんへの罹患しやすさを決めることとを含み、工程 (a) における高レベルまたは低レベルの本発明のバイオマーカーが、前がん病変あるいはリスク疾患への罹患しやすさを評価する方法を含む。

[0 0 3 5]

本発明のある実施形態において、本発明の方法は、被験体から得た体液試料中の本発明のバイオマーカーを定量することによって、膵がんを診断およびモニタリングするのに適している。試験されている被験体から得た試料において定量された本発明のバイオマーカーの量を、別の試料または被験体から得た以前の試料について定量されたレベル、または対照試料について定量されたレベルと比較することが好ましい。統計的研究のために、臨床上明らかな疾患または異常のない健常な被験体を対照として選択できる。診断は、対照試料または同一被験体について定量された以前のレベルと比較して統計上異なるレベルの本発明のバイオマーカーを見出すことによって行うことができる。

[0 0 3 6]

上記のように、本発明は、被験体から得た体液試料中の本発明のバイオマーカーを検出することによる、被験体における膵がんの診断やモニタリングのための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されている本発明のバイオマーカーに特異的な抗体と接触させることと、検出可能な物質を検出することを含む。別の実施形態では、本方法は、試料を、質量分析装置を用いて本発明のバイオマーカーのレベルを検出することを含む。

[0 0 3 7]

本発明の方法は、初期の膵がん（例えば、被験体が無症候である時）の診断において、また、膵がんの進行および死亡の予後診断にとって有用である。本明細書に示されるように、標準（例えば、正常なまたは良性疾患のレベル）に対する、体液試料（例えば、尿、血清、血漿、全血）において検出された本発明のバイオマーカーレベルの上昇または下降は、進行した疾患ステージ、疾患進行または死亡の危険の増大を示す。

15 [0 0 3 8]

いくつかの実施形態では、被験体は膵がんを患っており、検出を癌の治療の前、間または後に、被験体のモニタリングの一環として、間隔を置いていくつかの時点で実施する。

[0 0 3 9]

20 いくつかの実施形態では、本発明のバイオマーカーの検出が実施される時点で、被験体は癌の症状を示さない。その他の実施形態では、本発明のバイオマーカーの検出が実施される時点で、被験体は1以上の癌の症状を示す。

[0 0 4 0]

25 場合により、本発明の方法は、前記の本発明のバイオマーカーの検出の前に、間に、または後に、被験体から得られた同一体液試料または異なる体液試料において、癌のバイオマーカーを検出することをさらに含む。一

実施形態では、すい癌のバイオマーカーは、C A 1 9 - 9 である。被験体は、本発明のバイオマーカーの検出が実施される時点で、血中 C A 1 9 - 9 でレベルが上がっている場合もあるし、本発明のバイオマーカーの検出が実施される時点で、血中 C A 1 9 - 9 でレベルが上がっていない場合もある。

[0 0 4 1]

3. 本発明のバイオマーカーに結合する抗体とバイオマーカーの検出

[0 0 4 2]

被験体の体液試料中の本発明のバイオマーカーは、本発明のバイオマーカータンパク質またはその断片と相互作用または結合する薬剤により検出することができる。このような薬剤には、本発明のバイオマーカーと結合する本発明のバイオマーカー抗体またはその断片が挙げられる。すなわち、本発明はまた、本発明のバイオマーカーに対する抗体を検出する方法を含む。本発明のバイオマーカーは膵がんのマーカーである。したがって、被験体の体液における本発明のバイオマーカー抗体の検出は、膵がんの診断を可能にし得る。本発明のバイオマーカーに結合する抗体は、膵がんのマーカーとして使用できる。

[0 0 4 3]

本明細書において、「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分（断片）、すなわち、抗体結合部位またはパラトープを含む分子を指す。抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびそれらの抗原結合断片が含まれる。本発明の抗体は、検出可能な物質（例えば、検出可能な部分）で標識されていてもよい。

[0 0 4 4]

本発明の方法において用いられる本発明のバイオマーカーに特異的な抗体は、市販されているものを使用することができる。あるいは、単離さ

れた天然の本発明のバイオマーカーまたは組換えた本発明のバイオマーカーを利用して、抗体、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、および免疫学的に活性な断片（例えば、F a bまたは（F a b）₂断片）、抗体重鎖、抗体軽鎖、ヒト化抗体、遺伝子操作された一本鎖F_v分子またはキメラ抗体を調製できる。抗体、例えば、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、断片およびキメラは、当業者に公知の方法を用いて調製できる。

[0 0 4 5]

本発明の方法の一実施形態では、検出は、被験体由来の体液試料を、本発明のバイオマーカータンパク質と結合する抗体と接触させることと、
10 前記体液試料中の少なくとも1つのバイオマーカーと前記抗体との結合を検出および／または定量することとを含む。また、本発明の一実施形態では、検出された結合を、試料中の本発明のバイオマーカータンパク質の量と関連付けることを含む。さらに、本発明の一実施形態では、体液試料中のバイオマーカーのレベルを、前記バイオマーカーの対照レベルと比較する工程をさらに含み、被験体試料中のバイオマーカーレベルが対照レベルよりも高いまたは低い場合に、すい癌が存在することの指標となる。

[0 0 4 6]

一実施形態では、本発明は、（a）被験体由来の体液試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されている本発明のバイオマーカーに特異的な抗体と接触させること（反応させること）と、（b）検出可能な物質を検出することとを含む、前記体液試料中の本発明のバイオマーカーを定量することを含む、被験体において膵がんを検出する方法に関する。

[0 0 4 7]

一実施形態では、本発明は、（a）被験体由来の体液試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されている本発明のバイオマーカーに特異的な抗体と接触させること（反応させること）と、（b）検出可能な物質を検出することとを含む、前記体液試料中の本発明のバイオマーカーを

定量することを含む、被験体における腫瘍を診断および／またはモニタリングする方法に関する。

[0 0 4 8]

本発明の方法の実施形態は、（a）被験体由来の体液試料を、酵素で直接または間接的に標識されている本発明のバイオマーカーに特異的な抗体と接触させることと、（b）酵素の基質を加えることとを含み、ここで、基質は、基質または酵素と基質の反応生成物が蛍光複合体を形成するように選択され、（c）蛍光複合体の蛍光を測定することによって試料中の本発明のバイオマーカーを定量することと、（d）定量されたレベルを、標準のものと比較することとを含む。

[0 0 4 9]

本発明の好ましい実施形態は、以下の工程を含む：

（a）体液試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されている本発明のバイオマーカーに特異的な一次抗体および固定されている本発明のバイオマーカーに特異的な二次抗体とともにインキュベートすることと、

（b）一次抗体を二次抗体と分離して、一次抗体相および二次抗体相を提供することと、

（c）一次または二次抗体相中の検出可能な物質を検出し、それによって体液試料中の本発明のバイオマーカーを定量することと、

（d）定量された本発明のバイオマーカーを標準と比較すること。

[0 0 5 0]

本発明のバイオマーカーに対する抗体を用いる免疫学的アッセイにおいて、

（i）被験体から得られた試料中の AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1 か

ら選択される少なくとも 1 つのバイオマーカーレベルが対照試料の対応するバイオマーカーのレベルよりも高い場合、および／または

(ii) 被験体試料中の HY0U1 レベルが対照レベルよりも低い場合に、被験体試料中に腓がんが存在することの指標となる。

5 [0 0 5 1]

本発明は、実施形態にしたがい、免疫学的アッセイによって本発明のバイオマーカーを測定することによって、体液試料中の本発明のバイオマーカーを測定するための方法を提供する。種々の免疫学的アッセイ法を用いて本発明のバイオマーカーを測定できることは当業者には明らかであろう。

10 一般に、本発明で使用される免疫学的アッセイ法は、競合的である場合も、非競合的である場合もある。競合法は、通常、本発明のバイオマーカーの固定化された抗体または固定化可能な抗体（抗本発明のバイオマーカー）と、本発明のバイオマーカーの標識された形を用いる。試料中の本発明のバイオマーカーと標識された本発明のバイオマーカーとは、抗体との結合
15 について競合する。抗体と結合して、標識された本発明のバイオマーカー（結合画分）を、結合していないもの（非結合画分）から分離した後、結合画分または非結合画分のいずれかにおける標識の量を測定し、任意の従来法で、例えば、標準曲線と比較することによって、体液試料中の本発明のバイオマーカーの量と相関させることができる。

20 [0 0 5 2]

このように、本発明のバイオマーカーと特異的に反応する抗体、または誘導体、例えば、酵素コンジュゲートまたは標識誘導体を用いて、体液試料中の本発明のバイオマーカーを検出することができる。例えば、タンパク質の抗原決定基間と抗体の間の結合相互作用に頼る任意の公知の免疫学
25 的アッセイにおいてそれらを用いることができる。

[0 0 5 3]

本発明において使用される免疫学的アッセイ法は、当業者が実施できる方法であればいずれでもよく、上記の説明はアッセイ法の例示であり、本発明の範囲を制限するものではない。免疫学的アッセイの例として、ウエスタンブロット法、ドットブロット分析、スロットブロット分析、ラジオ免疫学的アッセイ（R I A）、ペプチドマイクロアレイ、酵素免疫測定法（E I A）および酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、免疫蛍光、免疫沈降、ラテックス凝集、血球凝集および組織化学的検査がある。

[0 0 5 4]

本明細書において、「E L I S A」とは、試料中に存在する抗原（例えば、本発明のバイオマーカー）または抗体を検出および／またはその量を定量するために、固相と結合している抗体または抗原と、酵素－抗原または酵素－抗体コンジュゲートを用いる酵素結合免疫吸着測定法を含む。E L I S Aは、固体支持体（例えば、ポリ塩化ビニル）上に、注目する抗原またはタンパク質に特異的な抗体を結合させることによって実施できる。抗体－抗原複合体を形成するために、注目する細胞抽出物またはその他の試料、例えば、尿を加えることができ、余分な結合していない試料を洗い流す。抗原上の異なる部位に特異的な、酵素が結合している抗体を加える。支持体を洗浄して、結合していない酵素が結合している二次抗体を除去する。酵素が結合している抗体として、例えば、アルカリホスファターゼが挙げられる。二次抗体上の酵素は、加えられた無色の基質を有色の生成物に変換できるか、または非蛍光基質を蛍光生成物に変換できる。

[0 0 5 5]

本発明のバイオマーカーに特異的な抗体は、検出可能な物質で標識し、検出可能な物質の存在に基づいて体液試料中の位置を特定できる。本明細書において、用語「標識」および「タグ」とは、検出可能なシグナルを付与し得る物質を指し、限定されるわけではないが、酵素、例えば、アルカリホスファターゼ、グルコース－6－リン酸脱水素酵素およびホースラデ

イッシュペルオキシダーゼ、リボザイム、Q B レプリカーゼなどのレプリカーゼの基質、プロモーター、色素、蛍光物質、例えば、フルオレセイン、イソチオシネート、ローダミン化合物、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルデヒドおよびフルオレサミン、化学発光物質、例えば、イソルミノール、増感剤、補酵素、酵素基質、放射性標識、ラテックスまたは炭素粒子などの粒子、リポソーム、細胞などが挙げられ、これらは色素、触媒またはその他の検出可能な基を用いてさらに標識できる。本発明のバイオマーカーに対して反応性の抗体に対して特異性を有する二次抗体の導入によって、一次抗原-抗体反応が増幅される間接法も用いることができる。例えば、本発明のバイオマーカーに対して特異性を有する抗体がウサギ Ig G 抗体である場合、二次抗体は、本明細書に記載される検出可能な物質で標識されたヤギ抗ウサギ γ グロブリンであり得る。

[0 0 5 6]

癌の検出および／またはモニタリングにおいて使用するために、抗体は、本発明のバイオマーカーの存在の検出を可能にするためのレポーター基として働く化合物と直接的にまたはリンカーを介してのいずれかで共有結合させることができる。限定されるわけではないが、酵素、色素、放射性金属および非金属同位元素、蛍光性化合物、蛍光化合物などをはじめとする種々の異なる種類の物質がレポーター基として働き得る。検出、モニタリングに有用な、本発明の抗体（またはその断片）の抗体コンジュゲートを調製する方法は、米国特許第 4, 6 7 1, 9 5 8 号、同 4, 7 4 1, 9 0 0 号および同 4, 8 6 7, 9 7 3 号に記載されている。

[0 0 5 7]

抗体をコンジュゲートまたは標識する方法は、当業者であれば容易に達成できる。

[0 0 5 8]

したがって、本発明の実施形態にしたがい、本発明のバイオマーカー抗体が酵素で標識されており、基質または酵素と基質の反応生成物がランタニド金属と蛍光複合体を形成するよう選択された酵素基質が加えられる方法を提供する。ランタニド金属を加え、蛍光複合体の蛍光を測定することによって試料中の本発明のバイオマーカーを定量する。本発明のバイオマーカーに特異的な抗体は、酵素を用いて直接または間接的に標識できる。酵素は、酵素の基質または酵素と基質の反応生成物の、ユウロピウムおよびテルビウムなどのランタニド金属と複合体を形成する能力に基づいて選択する。適した酵素の例として、アルカリホスファターゼおよび β -ガラクトシダーゼが挙げられる。酵素はアルカリホスファターゼであることが好ましい。本発明のバイオマーカー抗体はまた、酵素を用いて間接的に標識できる。例えば、抗体は、リガンド結合対の一方のパートナーとコンジュゲートでき、酵素をリガンド結合対のもう一方のパートナーとカップリングできる。代表的な例として、アビジン-ビオチンおよびリボフラビン-リボフラビン結合タンパク質が挙げられる。抗体をビオチン化し、酵素をストレプトアビジンとカップリングさせることが好ましい。

[0059]

本方法の一実施形態では、酵素の基質を添加することによって試料中の本発明のバイオマーカーと結合している抗体を検出する。基質は、ランタニド金属（例えば、ユウロピウム、テルビウム、サマリウムおよびジスプロシウム、好ましくは、ユウロピウムおよびテルビウム）の存在下で、基質または酵素と基質の反応生成物が、ランタニド金属と蛍光複合体を形成するよう選択する。このような蛍光複合体を提供する酵素および酵素の基質の例は、ディアマンディス (Diamandis) の米国特許第 5, 311 2, 922 号に記載されている。例として、抗体がアルカリホスファターゼで直接または間接的に標識されている場合には、本方法に用いられる基質は、4-メチルウンベリフェリルホスフェートまたは 5-フルオロサリチルホ

スフエートであり得る。複合体の蛍光強度は、通常、時間分解蛍光光度計、例えば、CyberFluor615Immoanalyzer (Nordion International, Ontario, Canada) を用いて測定する。

[0 0 6 0]

- 5 試料、本発明のバイオマーカーに特異的な抗体または本発明のバイオマーカーは、担体上に固定化してもよい。適した担体の例として、アガロース、セルロース、デキストラン、セファデックス、セファロース、リポソーム、カルボキシメチルセルロースポリスチレン、濾紙、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ガラスビーズ、ポリアミ
- 10 ン-メチルビニルエーテル-マレイン酸共重合体、アミノ酸共重合体、エチレン-マレイン酸共重合体、ナイロン、シルクなどがある。担体は、例えば、チューブ、試験プレート、ウェル、ビーズ、ディスク、球などの形であってよい。固定化された抗体は、公知の化学的方法または物理的方法、例えば、臭化シアンカップリングを用いて、材料に適した不溶性担体と反
- 15 応させることによって調製できる。

[0 0 6 1]

- 本発明のバイオマーカーの測定には、「サンドイッチ」法などの非競合法を用いることが好ましい。このアッセイでは、2種の本発明のバイオマーカー抗体を用いる。本発明のバイオマーカー抗体の一方を直接または間
- 20 接的に標識し（「検出抗体」とも呼ばれる）、もう一方は固定化されるか、または固定化可能である（「捕獲抗体」とも呼ばれる）。捕獲および検出抗体を、体液試料と同時にまたは逐次接触させることができる。逐次法は、捕獲抗体を試料とともにインキュベートし、その後、所定の時間で検出抗体を加えることによって達成でき（「フォワード法」と呼ばれることもある）、または、まず、検出抗体を試料とインキュベートし、次いで、捕獲
- 25 抗体を加えることもできる（「リバーズ」法と呼ばれることもある）。アッセイを完了するのに必要なインキュベーション等を行った後、捕獲抗体

を、液体試験混合物から分離し、分離された捕獲抗体相または液体試験混合物の残部の少なくとも一部中の標識を測定する。通常、捕獲抗体相において測定するが、これは捕獲抗体および検出抗体によって結合され、その間に「サンドイッチされている」本発明のバイオマーカーを含むためである。

[0 0 6 2]

本発明のバイオマーカーのための通常の２部位免疫測定 (immunometric) アッセイでは、捕獲抗体および検出抗体のうち一方または両方が、ポリクローナル抗体である。検出抗体に用いられる標識は、当技術分野において従来公知のもののいずれかから選択することができる。タンパク質検出アッセイのその他の実施形態と同様に、標識は、例えば、酵素または化学発光部分または放射性同位元素、蛍光体、検出可能なリガンド（例えば、リガンドの標識された結合パートナーによる二次結合によって検出可能）などであり得る。抗体は、酵素と基質の反応生成物が蛍光複合体を形成するよう選択されている基質を加えることによって検出される酵素で標識されていることが好ましい。捕獲抗体は、試験混合物の残部から分離される方法を提供するよう選択される。したがって、捕獲抗体は、すでに固定化されているか、不溶性の形でアッセイに導入してもよいし、固定化可能な形、すなわち、捕獲抗体をアッセイに導入するためにその後達成される固定化を可能にする形であってもよい。固定化された捕獲抗体は、共有結合によってまたは非共有結合によって、磁性粒子、ラテックス粒子、マイクロタイターマルチウェルプレート、ビーズ、キュベットまたはその他の反応容器などの固相と結合している抗体を含み得る。固定化可能な捕獲抗体の例として、リガンド部分、例えば、ハプテン、ビオチンなどで化学的に修飾されており、続いて、固定化された形のリガンドの結合パートナー、例えば、抗体、アビジンなどとの接触によって固定化され

得る抗体がある。一実施形態では、捕獲抗体は、固相と結合している捕獲抗体の種特異的抗体を用いて固定化できる。

[0 0 6 3]

本発明の特定のサンドイッチ免疫学的アッセイ法は、本発明のバイオ
5 マーカーに対して反応性である2種の抗体、酵素標識で標識された本発明
のバイオマーカーに対して反応性である抗体に対して特異性を有する二次
抗体および酵素の蛍光性基質を用いる。一実施形態では、酵素はアルカリ
ホスファターゼ (ALP) であり、基質は5-フルオロサリチルホスフェ
ートである。ALPは、蛍光性基質、5-フルオロサリチルホスフェート
10 からリン酸を切断して、5-フルオロサリチル酸 (FSA) を生成する。
次いで、5-フルオロサリチル酸は、FSA-Tb (3+) -EDTAの
形の高度に蛍光性の三重複合体を形成し、これは時間分解様式でTb³⁺
蛍光を測定することによって定量可能である。蛍光強度は、通常、本明細
書に記載される時間分解蛍光光度計を用いて測定する。

15 [0 0 6 4]

本発明の方法は、固体支持体で実施できる。用いられる固体支持体は、
体液試料中の分析物をアッセイすることを目的とした従来のものであり得、
通常、セルロース、多糖、例えば、セファデックスなどといった材料から
構成され、固体支持体の保護および／または取り扱いのための覆いによ
20 って部分的に取り囲まれていてもよい。固体支持体は、所望の適用に応じて、
剛性であっても、半剛性であっても屈曲性であっても、弾性（形状記憶を
有する）などであってもよい。本発明のバイオマーカーは、試料において
in vivo でまたは *in vitro* (*ex vivo*) で検出できる。本発明の実施形
態に従って、試料中の本発明のバイオマーカーの量が試料を身体から採取
25 することなく（すなわち、*in vivo* で）測定される場合には、支持体は
被験体にとって無害なものでなくてはならず、身体の適当な部分に挿入す
るのに便宜な任意の形であり得る。例えば、支持体は、ポリテトラフルオ

ロエチレン、ポリスチレンまたはその他の剛性の有害でないプラスチック材料製で、被験体に導入されるのを可能にする大きさおよび形状を有するプローブであり得る。適当な不活性な支持体の選択は、意図される目的のための寸法のように、当業者の能力の範囲内である。

5 [0065]

本発明の方法における接触工程は、体液試料と固体支持体、例えば、反応容器、微小容器、試験管、微小試験管、ウェル、マルチウェルプレートまたはその他の固体支持体を接触させること、組合せること、または混合することを含み得る。

10 [0066]

マルチプレックス検出または分析のため、試料および／または本発明のバイオマーカー特異的結合剤を固体支持体上に配置してもよいし、複数の支持体を利用してもよい。「配列させること」とは、ライブラリーのメンバー（例えば、種々の試料のアレイまたは同一の標的分子または異なる標的分子を標的とする装置のアレイ）またはその他の収集物を、論理的アレイまたは物理的アレイに組織するまたは並べるという行為を指す。

[0067]

4. 質量分析装置を使用するバイオマーカーの検出

本発明において、被験体由来の体液試料中のバイオマーカーは、質量分析装置を用いて検出および／または測定することができる。質量分析装置では、HPLCから溶出されるペプチドの質量のみならず、そのペプチドをイオン化する際に当該ペプチドに過剰なエネルギーを与えることによってそのペプチドが開裂して生じる様々な長さの断片化ペプチド（開裂ペプチド）の質量も測定することができる。そして、これらの開裂ペプチドの質量の差を解析することによって、ペプチドを構成するアミノ酸配列を決定することができる。

[0068]

一方、この原理を利用すれば、多数の異なる質量を有するペプチドの混合物の中から、アミノ酸配列の分かっている特定のペプチドを、そのアミノ酸配列の質量および当該ペプチドから生じ得る開裂ペプチドの質量とを用いて検出することが可能である。すなわち、少なくとも1つのバイオマ

5 ーカーのトリプシン分解ペプチド断片のアミノ酸配列から予測される質量と、当該ペプチドから予測される開裂ペプチドの質量とを用いて、膵がん患者からの血液サンプル中に少なくとも1つのバイオマーカーに特有の配列を有する分子が存在するか否かを確認することができる。

[0 0 6 9]

- 10 質量分析装置は、市販の装置を使用することが可能であり、当業者であれば公知の手法を用いて本発明の方法を質量分析装置を用いて適宜実施することが可能である。

[0 0 7 0]

- 本発明のバイオマーカーを質量分析装置を用いて検出および／または定
- 15 量した場合、

- (i) 被験体から得られた試料中の AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1 から選択される少なくとも1つのバイオマーカーレベルが対照試料の対応するバイオマーカーのレベルよりも高い場合、および／または
- 20 (ii) 被験体試料中の HYOU1 レベルが対照レベルよりも低い場合に、被験体試料中に膵がんが存在することの指標となる。

[0 0 7 1]

5. 癌を診断またはモニタリングするためのキットおよび診断剤

- 25 本発明は、本発明は、膵がんを検出、診断またはモニタリングするために必要な要素を含むキットを含む。本キットは、患者由来の体液中の本発明のバイオマーカーの存在を検出するための薬剤（例えば、抗体）を含む。

また、本発明のバイオマーカーに対する抗体は、患者から体液を採取するための容器を含んでいても好い。キットに含まれる抗体は、水性媒体中または凍結乾燥物のいずれの形態であってもよい。

[0 0 7 2]

- 5 本発明の方法は、血液または尿などの試料において本発明のバイオマーカーを定性的にまたは定量的に検出するための診断キットまたは診断剤を用いて実施できる。一例として、キットまたは診断剤は、本発明のバイオマーカーに特異的な結合剤（例えば、抗体）、酵素で標識された抗体に対する抗体および酵素の基質を含み得る。また、本キットまたは診断剤は、
- 10 マイクロタイターマルチウェルプレートなどの固体支持体、標準、アッセイ希釈液、洗浄バッファー、粘着性のプレートカバーおよび／またはキットを用いて本発明の方法を実施するための使用説明書を含み得る。一実施形態では、本キットまたは診断剤は、アッセイされる体液試料（例えば、血液または尿）に適用される、1種以上のプロテアーゼ阻害剤（例えば、
- 15 プロテアーゼ阻害剤カクテル）を含んでもよい。

[0 0 7 3]

- 本発明のキットまたは診断剤には、その他、例えば体液試料を採取するための手段、検出剤（結合剤）を標識する手段、体液試料中の本発明のバイオマーカータンパク質または本発明のバイオマーカー核酸を固定化す
- 20 るためのメンブラン、体液試料をメンブランに適用するための手段、薬剤を被験体の体液試料中の本発明のバイオマーカーと結合させるための手段、二次抗体などを含み得る。

[0 0 7 4]

- 本発明の実施は、特に断りのない限り、当業者の範囲内である、分子
- 25 生物学、微生物学、組換えDNA技術、電気生理学および薬理学の従来技術を用いることができる。このような技術は、文献に十分に説明されており（例えば、サμβロック（Sambrook）、フレッチ&マニアティス

(Fritsch&Maniatis)、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版 (1989) ; ディーエヌエー・クローニング (DNA Cloning)、第IおよびII巻 (D. N. グローバー (Glover) 編、1985) ; パーバル (Perbal), B., ア・プラティカル・ガイド・トゥー・モレキュラー・クローニング (A Practical Guide to Molecular Cloning) (1984) ; ザ・シリーズ、メソッズ・イン・エンジモロジー (the series, Methods In Enzymology) (S. コロウィック (Colowick) および N. カプラン (Kaplan) 編、Academic Press, Inc.) ; トランスクリプション・アンド・トランスレーション (Transcription and Translation) (ハメス (Hames) ら編1984年) ; ジーン・トランスファー・ベクター・フォー・マンマリアン・セルズ (Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells) (J. H. ミラー (Miller) ら編 (1987年) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) ; スコープス、プロテイン・プリフィケーション：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Scopes, Protein Purification: Principles and practice) (第2版、Springer-Verlag) ; およびピーシーアール：ア・プラクティカル・アプローチ (PCR: A Practical Approach) (マクファーソン (McPherson) ら編 (1991) IRL Press) 参照のこと)、これらの各々は参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

[0075]

以下は、本発明を実施するための材料、方法および手順を示す実施例である。実施例は例示的なものであって、本発明を限定するために解釈されるものではない。

実施例

[0 0 7 6]

<方法>

正常膵管と浸潤性膵管がん組織から取得された遺伝子発現プロファイルから (Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, Ishikawa O, Ohgaki K, Kashimura N, Miyamoto M, Hirano S, Kondo S, Katoh H, Nakamura Y, Ktagiri T. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. Oncogene. 2004 Mar 25;23(13):2385-400.) 、当該遺伝子から転写され翻訳されたタンパク質を特異的に認識する 130 抗体を用意した。

[0 0 7 7]

続いて、国立がん研究センターで独自に開発された血漿マイクロアレイ (Murakoshi Y, Honda K, Sasazuki S, Ono M, Negishi A, Matsubara J, Sakuma T, Kuwabara H, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Shimahara M, Yasunami Y, Ino Y, Tsuchida A, Aoki T, Tsugane S, Yamada T. Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. Cancer Sci. 2011 Mar;102(3):630-8. 「Murakoshi et al」 という) を 130 抗体パネルでハイブリダイゼーションを行い、各抗原の血漿中のタンパク質発現を測定した。

[0 0 7 8]

本実施例に係る各抗原量測定に使用された血漿マイクロアレイは、Murakoshi et al と同様な方法で作成されたものである。抗体のハイブリダイゼーション、蛍光強度の測定等も、Murakoshi et al と同様の方

法で実施された。血漿マイクロアレイの作成には、DNA／抗体／蛋白質マイクロアレイヤー（カケンジェネクス）、蛍光強度の測定にはイノスキャン 700AL（イノプシス）を利用した。

[0 0 7 9]

- 5 本実施例で使用した血漿マイクロアレイには、健常者 106 例、浸潤性膵管がん 164 例、浸潤性膵管がん以外の膵臓悪性腫瘍 7 例、良性膵腫瘍・のう胞 15 例、慢性膵炎 10 例、肝細胞がん 11 例、胆道がん 13 例、胃がん 30 例。大腸がん 28 例が搭載された。

[0 0 8 0]

- 10 使用した抗体は全てアブノバ社の製品であり、そのリストをカタログ番号と共に表 3 に示す。

[0 0 8 1]

[表 3]

No	カタログ番号 (2009 年 1 月 8 日 時点)	製品名	由来*	M/P**	交 差 性 ***
74	H00000205-B02P	Anti-AK3L1 Purified pAb	Mu	P	Hu
100	PAB14863	Anti-ANXA6 pAb	Ra	P	Hu
1	H00008546-B01	Anti-AP3B1 pAb	Mu	P	Hu
127	H00000537-M01	Anti-ATP6AP1(51-150) mpAb	Mu	M	Hu
2	H00000717-B02	Anti-C2 pAb	Mu	P	Hu
7	H00003732-B01	Anti-CD82 pAb	Mu	P	Hu
3	H00001163-B01	Anti-CKS1B pAb	Mu	P	Hu
4	H00001164-B01	Anti-CKS2 pAb	Mu	P	Hu
5	H00001462-B01	Anti-CSPG2 pAb	Mu	P	Hu
6	H00054205-B01	Anti-CYCS pAb	Mu	P	Hu
20	H00002122-M01	Anti-EVI1(952-1051) mAb	Mu	M	Hu
26	H00003148-M03	Anti-HMGB2 mAb	Mu	M	Hu
36	H00010525-M01	Anti-HYOU1(901-999) mAb	Mu	M	Hu
95	H00003485-B01P	Anti-IGFBP2 Purified pAb	Mu	P	Hu
34	H00004318-M03	Anti-MMP9 mAb	Mu	M	Hu
33	H00051765-M03	Anti-MST4 mAb(RP6-213H19.1)	Mu	M	Hu
35	H00004605-M02	Anti-MYBL2(601-700) mAb	Mu	M	Hu
8	H00005266-B01	Anti-PI3 pAb	Mu	P	Hu
39	H00005495-M01	Anti-PPM1B mAb	Mu	M	Hu
9	H00006035-B01	Anti-RNASE1 pAb	Mu	P	Hu
10	H00008635-B01	Anti-RNASET2 pAb	Mu	P	Hu
99	PAB13272	Anti-STMN1 pAb	Ra	P	Hu
11	H00007444-B01	Anti-VRK2 pAb	Mu	P	Hu

*: Mu はマウス、Ra はラットを表す。

**: M はモノクローナル抗体、P はポリクローナル抗体を表す。

***: Hu はヒトに対する交差性を有することを示す。

[0 0 8 2]

- 5 2 種のバイオマーカーを組み合わせて場合の AUC の計算は、ロジスティック解析で行った。

[0 0 8 3]

[結果]バイオマーカーの同定

タンパク質の発現を蛍光強度として数値化し、膵がん患者と健常者を AUC 値 0.8 以上で判別する抗体を 23 種類選別した。

[0084]

5 23 種類の抗体の蛍光強度は、膵がん患者と健常者間で統計学的な有意差をもって増減した（表 4）。23 種類の抗原タンパク質のうち、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1 は健常者に比較して浸潤性膵管がん患者血清中
10 で統計学的に有意に増加した。一方、HYOU1 抗原は、健常者に比較して浸潤性膵管がん患者で有意に低下した（図 1～23）。

[0085]

図 1～23 に記載の格データについて説明する。図の左上の表は、左から順に抗体名、ID 番号、プレート T（血漿の希釈割合）、検定 P 値（各
15 濃度で計算したときの健常者と浸潤性膵管がん患者間での p-value (Student's t-test))、AUC (ROC 解析を行ったときの曲線下面積)、閾値.2SD（健常者の平均値に標準偏差の 2 倍の数値を加えてときの値、Cut-off 値に相当する）、感度 SD.2SD（閾値.2SD を cut-off としたときの感度）、特異度.2SD（閾値.2SD を cut-off としたときの感度）を示
20 す。

[0086]

中段の最左の図は、健常者と各疾患毎の血漿マイクロアレイの蛍光値の箱ひげ図を示す。1：健常者 106 例、2：浸潤性膵管がん 164 例、3：浸潤性膵管がん以外の膵臓悪性腫瘍 7 例、4：良性膵腫瘍・のう胞 15 例、
25 5：慢性膵炎 10 例、6：肝細胞がん 11 例、7：胆道がん 13 例、8：胃がん 30 例、9：大腸がん 28 例の結果である。

[0087]

中段の中の図は、健常者と各疾患毎の血漿マイクロアレイの蛍光値の散布図を示す。1：健常者 106 例、2：浸潤性膵管がん 164 例、3：浸潤性膵管がん以外の膵臓悪性腫瘍 7 例、4：良性膵腫瘍・のう胞 15 例、5：慢性膵炎 10 例、6：肝細胞がん 11 例、7：胆道がん 13 例、8：胃がん 30 例、9：大腸がん 28 例の結果である。

[0 0 8 8]

下段の最左の図は、CA19-9 とマーカーとを組み合わせで評価した場合の散布図である。X 軸は CA19-9 の測定値 (Unit) を示し、Y 軸はマーカーの蛍光値 (Unit) を示す。

10 [0 0 8 9]

下段の中の図は、健常者と浸潤性膵管がんを判別するためのマーカーの ROC 曲線を示す。X 軸は 1-特異度を示し、Y 軸は感度を示す。

[0 0 9 0]

右図は、血漿マイクロアレイをマーカー抗体でハイブリダイズしたとき
15 の蛍光スキャナー画像を示す。

[0 0 9 1]

[表 4]

抗原名	ID番号	プレート番	T検定P値	AUC	閾値.2SD	感度.2SD	特異度.2SD
AP3B1	1	3	2.42E-18	0.821138	3.850935	0.22561	1
C2	2	3	1.04E-29	0.88328	3.64682	0.414634	0.9901961
CKS1B	3	2	2.17E-23	0.876913	3.901408	0.213415	1
CKS2	4	4	2.07E-25	0.864	3.821374	0.347561	1
CSPG2	5	4	3.35E-19	0.834768	3.832573	0.182927	0.9901961
CYCS	6	3	5.14E-19	0.826339	3.887536	0.237805	1
CD82	7	4	2.83E-20	0.821078	3.892285	0.262195	1
PI3	8	4	1.38E-22	0.832496	3.723319	0.310976	0.9901961
RNASE1	9	2	1.06E-15	0.805326	4.031564	0.103659	1
RNASET2	10	2	2.69E-17	0.858202	4.1212	0.097561	1
VRK2	11	2	8.43E-21	0.860414	3.980399	0.085366	1
EVI1	20	3	6.33E-15	0.845827	3.974804	0.140244	1
HMGB2	26	4	9.22E-20	0.866511	3.891996	0.030488	1
MST4	33	2	1.05E-07	0.802487	4.254386	0.109756	1
MMP9	34	3	4.36E-13	0.855691	4.143968	0	1
MYBL2	35	4	2.11E-08	0.81534	4.504063	0	1
HYOU1	36	2	4.43E-18	0.813038	3.849192	0.006098	0.9901961
PPM1B	39	3	2.75E-13	0.852941	4.448287	0	1
AK3L1	74	2	7.29E-14	0.800514	3.610316	0	1
IGFBP2	95	2	1.46E-22	0.849534	3.443565	0.018293	1
STMN1	99	3	2.68E-19	0.802547	3.125581	0.189024	1
ANXA6	100	4	4.13E-14	0.84505	4.123383	0.006098	1
ATP6AP1	127	3	2.36E-24	0.814264	2.707848	0.536585	0.9313725

[結果] バイオマーカーパネル

- 5 (1) CA19-9 と本発明のバイオマーカーとを組み合わせた場合の AUC の値、相関係数を以下に表 5 に示す。

[0 0 9 2]

[表 5]

抗原	相関係数	AUC	AUC の差の 95%信頼区間	
抗原	correlation	auc	auc.boot.ci.lo	auc.boot.ci.hi
AK3L1	0.272301613	0.861126299	-0.016517365	0.067921627
ANXA6	0.197319025	0.870785493	-0.007779147	0.054803689
AP3B1	0.110781736	0.866593767	-0.010376696	0.030746763
ATP6AP1	0.255497553	0.865696389	-0.014521506	0.059748608
C2	0.12884358	0.868051759	-0.007927119	0.043249163
CD82	0.114924341	0.869874248	-0.004965015	0.066186819
CKS1B	0.135186314	0.866249079	-0.018801193	0.039478875
CKS2	0.11884262	0.87297248	-0.010810582	0.057707293
CSPG2	0.129410588	0.861855294	-0.016844624	0.021630608
CYCS	0.162664189	0.867140514	-0.010320877	0.042340709
EVI1	0.110350246	0.864953527	-0.011272149	0.050569024
HMGB2	0.245215115	0.865682522	-0.013011729	0.040538109
HYOU1	0.206921576	0.864220525	-0.016729937	0.066704865
IGFBP2	-0.06943558	0.880663857	-0.019627655	0.060662192
MMP9	0.292960479	0.859668307	-0.012011176	0.02081231
MST4	0.285016692	0.866411518	-0.00833576	0.04786376
PI3	0.134389712	0.864224531	-0.016257153	0.027187213
PPM1B	0.226833839	0.868275608	-0.006891035	0.047976953
RNASE1	0.037319143	0.865500273	-0.010196525	0.026643105
RNASET2	0.107135189	0.863313286	-0.019864133	0.024582617
VRK2	0.130424178	0.872425734	-0.004705795	0.058998366
CA19	1	0.858574813	0	0

[0 0 9 3]

(2) 本発明のバイオマーカー同士を組み合わせた場合の AUC の値および相関係数を表 6 に示す。

[0 0 9 4]

5 [表 6]

combination	max.cor	auc
AK3L1 + CYCS + CD82+ EVI1	0.678145	0.872521
AK3L1 + CYCS + RNASE1+ VRK2	0.656187	0.872521
AK3L1 + PPM1B+ CKS1B + MST4	0.699958	0.870056

[0 0 9 5]

本発明のバイオマーカーを複数、例えば 2 個組み合わせることによって、単独の場合と比較して高い AUC の値が得られた（表 4 および表 5）。また、本発明のバイオマーカーと既知のバイオマーカーの組合せ、および本発明のバイオマーカー同士の組合せのいずれも、有意な AUC の値が得られた。これらの結果から、本発明のバイオマーカーは、複数使用することにより、すい癌の検出感度をより向上し得ることが示された。

15 産業上の利用可能性

[0 0 9 6]

本発明により、膵がん検出用のバイオマーカー、前記バイオマーカーを用いる膵がんの検出方法、前記バイオマーカーに対する抗体を含む膵がんの検出用キットまたは診断剤が提供される。本発明のバイオマーカーは、膵がんを効率的に判別するために利用することが可能であり、これらのバイオマーカーを用いる膵がんの検出方法または診断方法は臨床的にきわめて有効である。

請求の範囲

1. 被験体由来の体液試料中の少なくとも1つのバイオマーカーを検出
および／または定量する工程を含み、
5 前記バイオマーカーが、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2,
CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2,
MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6,
ATP6AP1, およびHYOU1 からなる群から選択されるタンパク質ま
たはその断片である、腫瘍を検出する方法。
- 10 2. 前記体液試料が、全血、血清、血漿または尿である、請求項1に記
載の方法。
3. 免疫学的アッセイ法を用いて、前記バイオマーカーを検出および／
または定量する、請求項1または2に記載の方法。
- 15 4. 前記免疫学的アッセイ法が、ウェスタンブロット法、ドットブロッ
ト分析、スロットブロット分析、ラジオ免疫学的アッセイ（R I
A）、ペプチドマイクロアレイ、酵素免疫測定法（E I A）および
酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）からなる群から選択される、
請求項3に記載の方法。
- 20 5. 前記バイオマーカーに対する抗体を用いて、前記バイオマーカーを
検出および／または定量する、請求項1～4のいずれかに記載の方
法。
- 25 6. 前記体液試料と前記抗体とを接触させる工程、および
前記体液試料中の少なくとも1つのバイオマーカーと前記抗体との
結合を検出および／または定量する工程を含む、請求項5に記載の
方法。
7. 質量分析装置を用いて、前記バイオマーカーを検出および／または
定量する、請求項1または2に記載の方法。

8. 膵がんの診断に用いるための、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の方法。
9. 前記被験体が膵がんを有する、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の方法。
- 5 10. 体液試料中のバイオマーカーのレベルを、前記バイオマーカーの対照レベルと比較する工程をさらに含み、
- (i) 前記被験体試料中の AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6,
- 10 ATP6AP1 から選択される少なくとも 1 つのバイオマーカーレベルが対照レベルよりも高い場合、および／または
- (ii) 前記被験体試料中の HYOU1 レベルが対照レベルよりも低い場合、
- 15 に、膵がんが存在することの指標とする、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。
11. バイオマーカーに対する抗体を含有する、膵がん診断剤であって、前記バイオマーカーが、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6,
- 20 ATP6AP1, および HYOU1 からなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその断片である、膵がん診断剤。
12. 前記体液試料が、全血、血清、血漿または尿である、請求項 11 に記載の診断剤。
13. バイオマーカーに対する抗体を含有する、膵がん検出用のキットであって、
- 25 前記バイオマーカーが、AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2,

MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1, および HYOU1 からなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその断片である、キット。

1 4. ウェスタンブロット法、ドットブロット分析、スロットブロット分析、ラジオ免疫学的アッセイ (R I A)、ペプチドマイクロアレイ、
5 酵素免疫測定法 (E I A) および酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) からなる群から選択される免疫学的アッセイに従って前記検出および／または定量を行うための、請求項 1 3 に記載のキット。

1 5. 前記体液試料が、全血、血清、血漿または尿である、請求項 1 3 または 1 4 に記載のキット。
10

1 6. 膵がんの診断に用いるための、請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれかに記載のキット。

1 7. AP3B1, C2, CKS1B, CKS2, CSPG2, CYCS, CD82, PI3, RNASE1, RNASET2, VRK2, EV1, HMGB2, MST4, MMP9, MYBL2, PPM1B, AK3L1, IGFBP2, STMN1, ANXA6, ATP6AP1, および
15 HYOU1 からなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその断片を含む、膵がん検出用のバイオマーカー。

図1

Wilber-001-AP3B1

抗体名	ID番号	ブレード	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
AP3B1	1	1	3.99E-06	0.744829	4.128491	0.091463	0.9705882			
AP3B1	1	2	1.40E-12	0.80446	4.02365	0.115854	0.9803922			
AP3B1	1	3	2.42E-18	0.821138	3.850935	0.22561	1			
AP3B1	1	4	2.31E-18	0.803892	3.716913	0.268293	0.9803922			

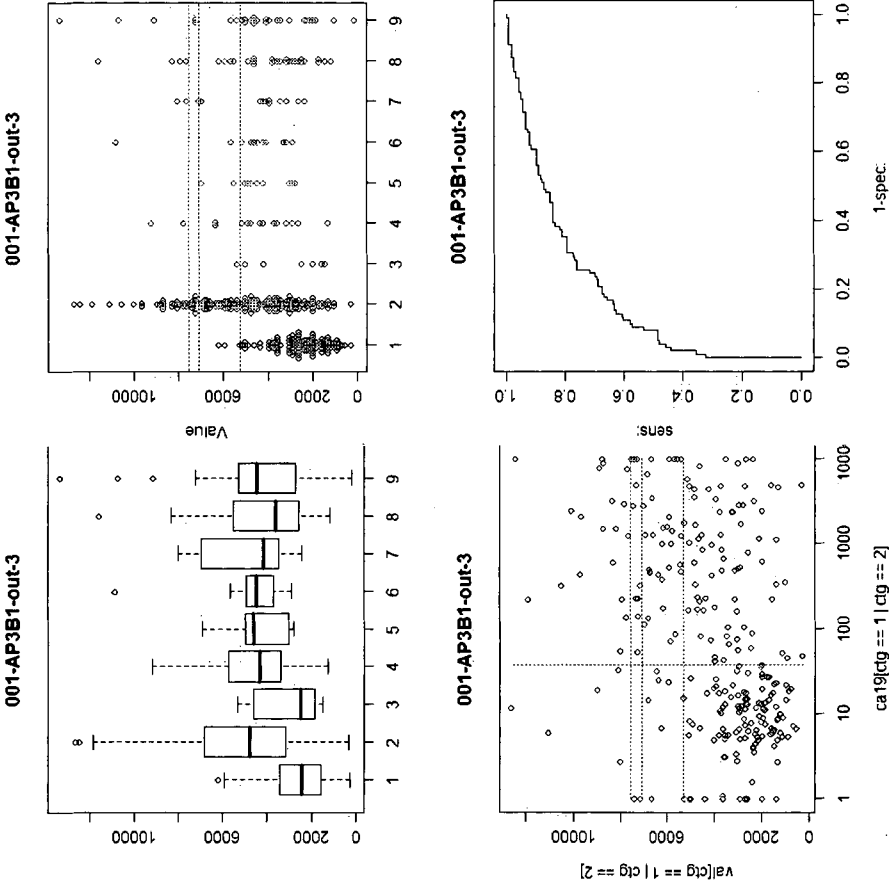


図2

Wilber-002-C2

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
C2	2	1	3.96E-12	0.753437	3.913954	0.115854	0.9705882			
C2	2	2	1.33E-25	0.862117	3.771303	0.29878	1			
C2	2	3	1.04E-29	0.88328	3.64682	0.414634	0.9901961			
C2	2	4	3.24E-30	0.877421	3.62054	0.47561	0.9705882			

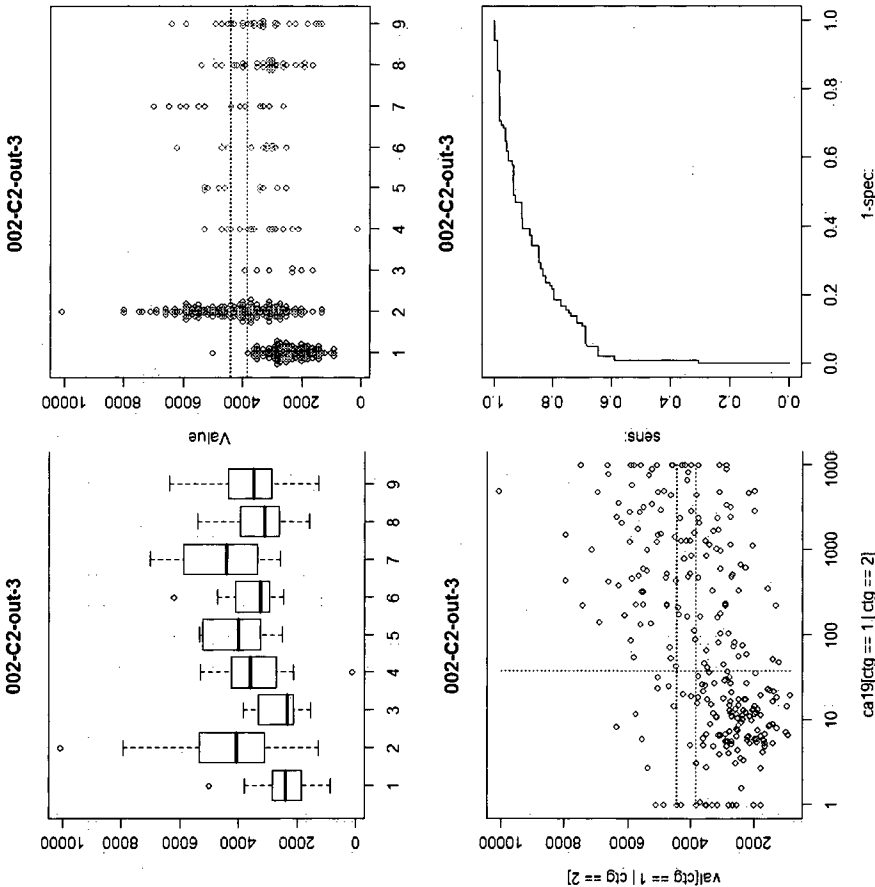
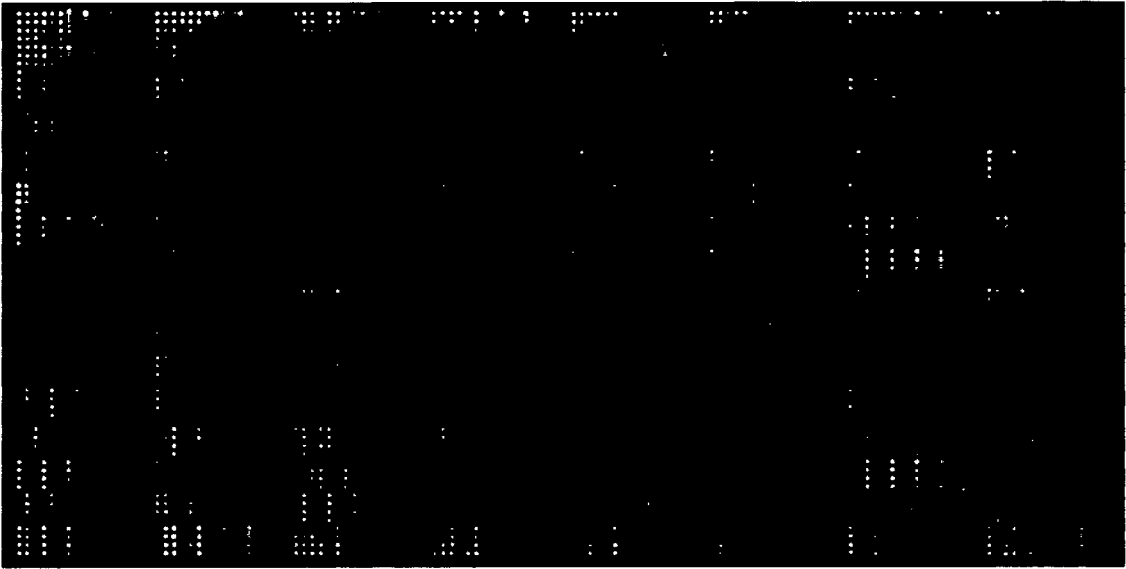


図3



Wilber-003-CKS1B

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
CKS1B	3	1	1.77E-20	0.859846	4.009906	0.158537	1			
CKS1B	3	2	2.17E-23	0.876913	3.901408	0.213415	1			
CKS1B	3	3	5.64E-23	0.851237	3.727928	0.29878	1			
CKS1B	3	4	1.65E-20	0.815848	3.597911	0.310976	0.9901961			

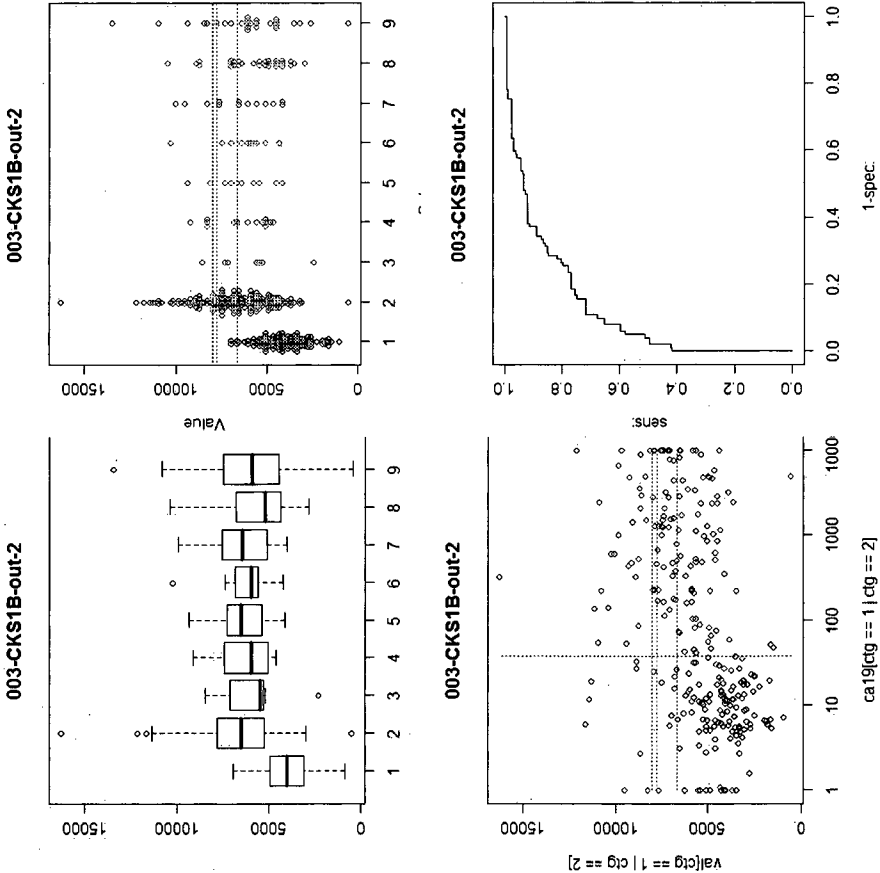
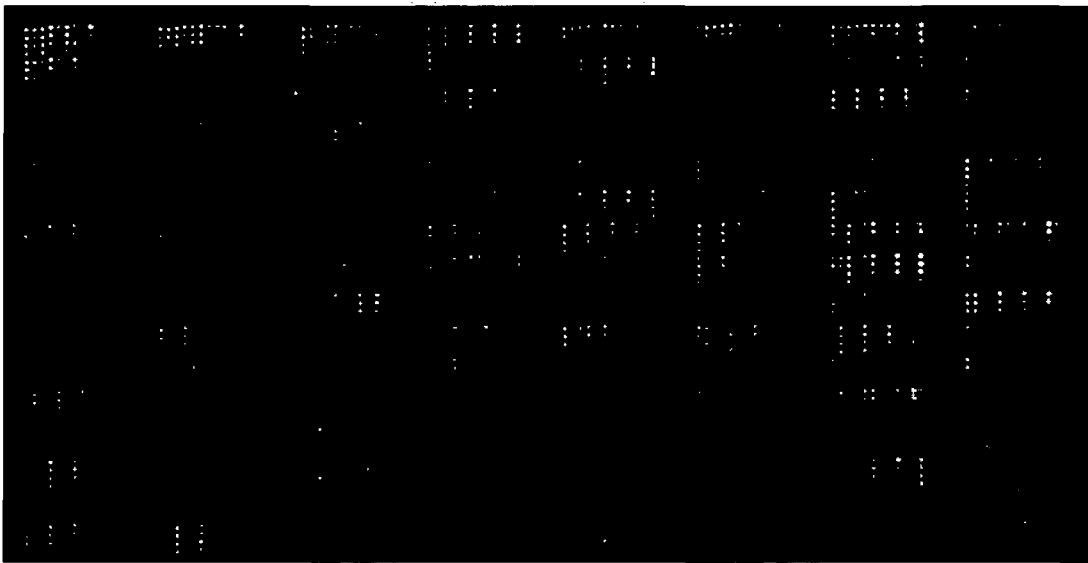


図4



Wilber-004-CKS2

抗体名	ID番号	プレートT検定P値	AUC	閾値2SD	感度2SD	特異度2SD
CKS2	4	1	1.13E-06	0.80446	4.285196	0
CKS2	4	2	6.09E-17	0.858232	4.006548	0.036585
CKS2	4	3	5.47E-23	0.856169	3.85987	0.27439
CKS2	4	4	2.07E-25	0.864	3.821374	0.347561

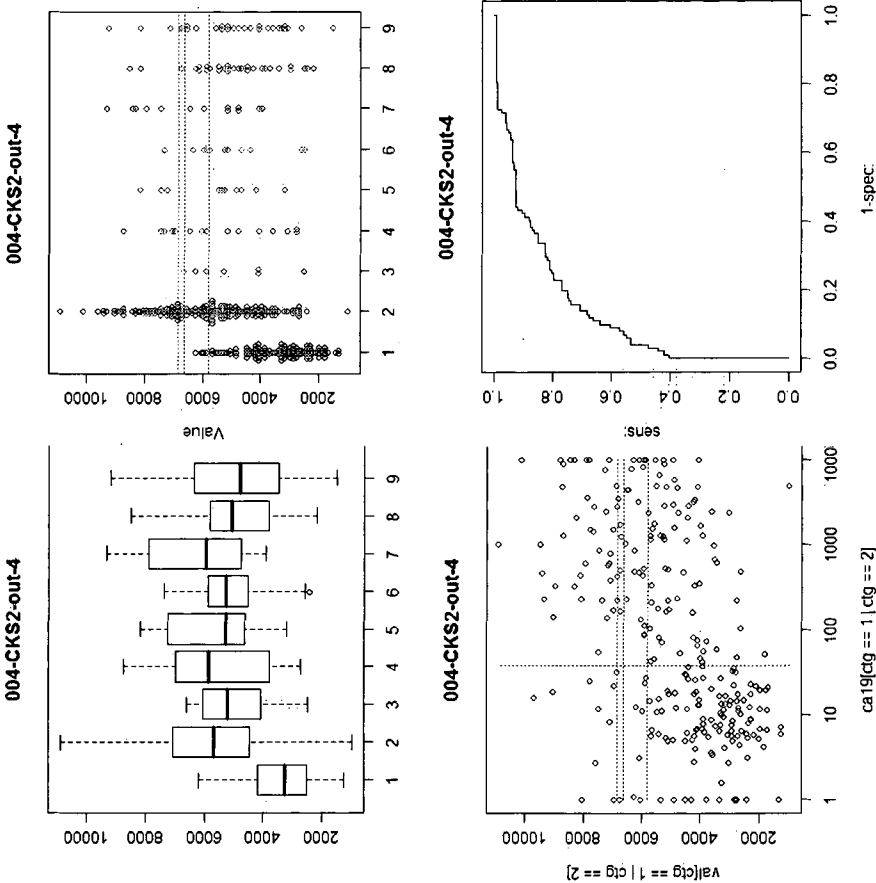
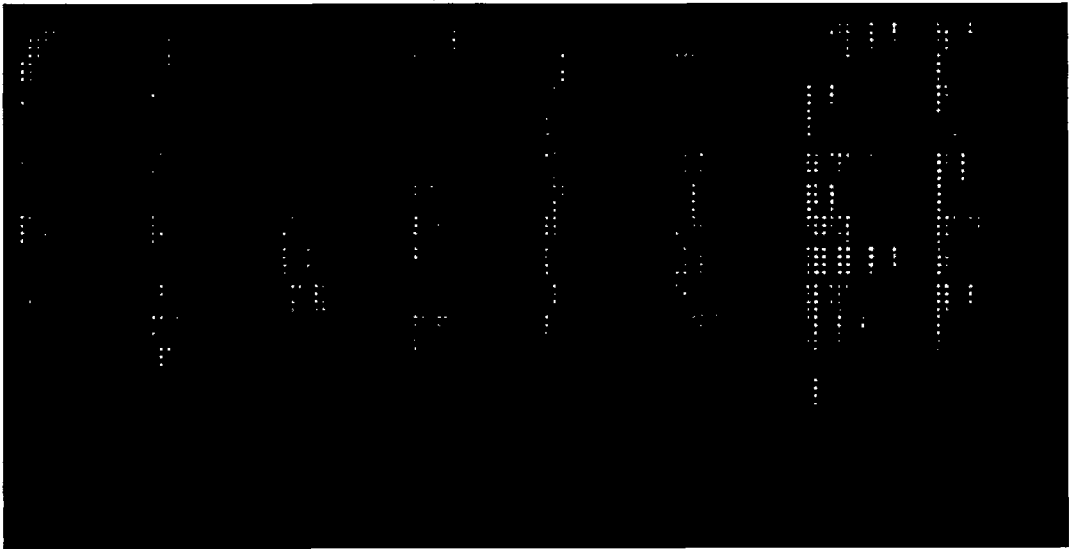


図5



Wilber-005-CSPG2

抗体名ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
CSPG2	5	1	6.70E-06	0.76094	4.121535	0.04878	0.9901961		
CSPG2	5	2	1.17E-09	0.819016	4.06236	0.04878		1	
CSPG2	5	3	4.49E-14	0.818209	3.958982	0.054878			1
CSPG2	5	4	3.35E-19	0.834768	3.832573	0.182927	0.9901961		

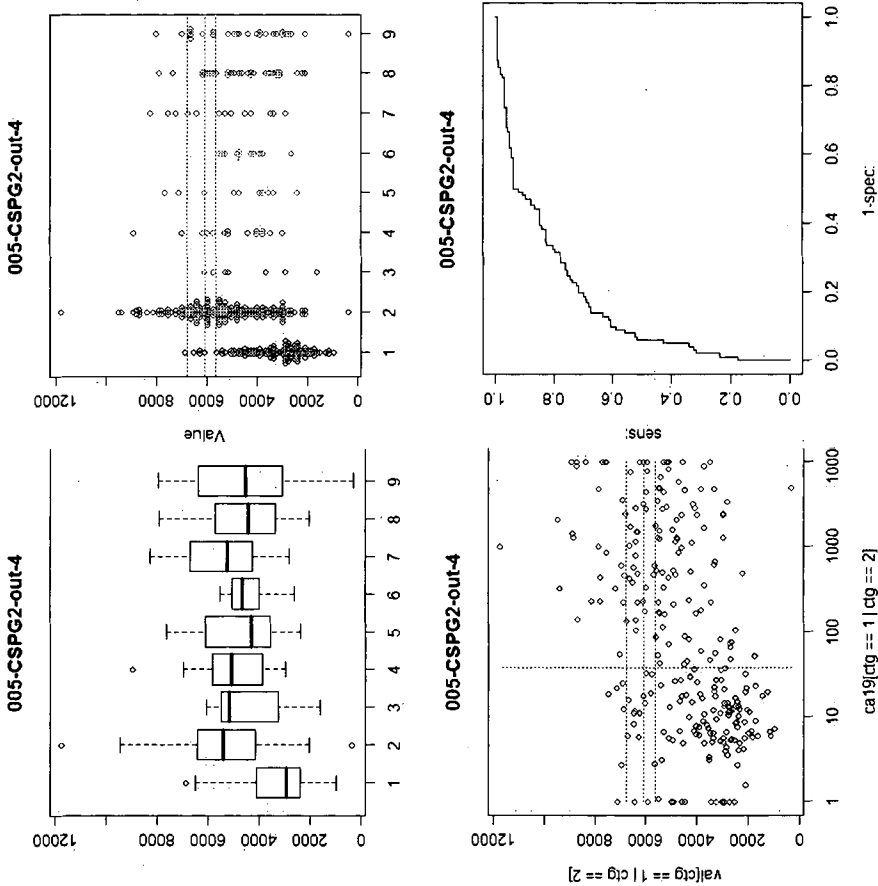
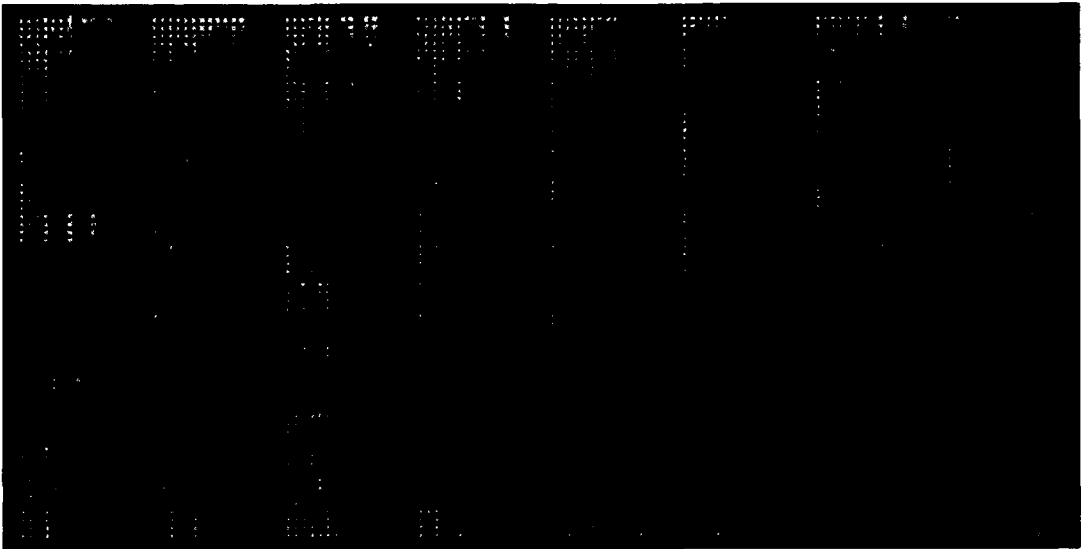


図6



Wilber-006-CYCS

抗体名	ID番号	プレート	検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
CYCS	6	1	1.93E-09	0.734816	4.194329	0.085366	0.9803922		0.9803922	
CYCS	6	2	7.80E-17	0.813247	4.064666	0.146341	0.9803922		0.9803922	
CYCS	6	3	5.14E-19	0.826339	3.887536	0.237805	1		1	
CYCS	6	4	3.25E-17	0.811424	3.751253	0.280488	0.9901961		0.9901961	

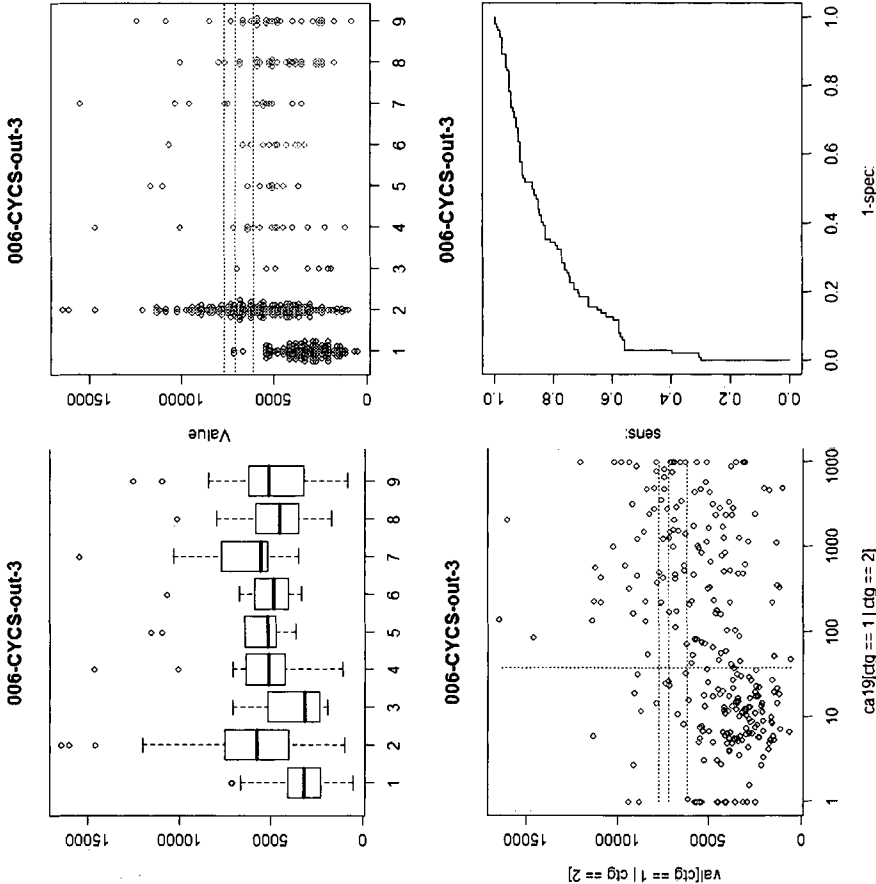
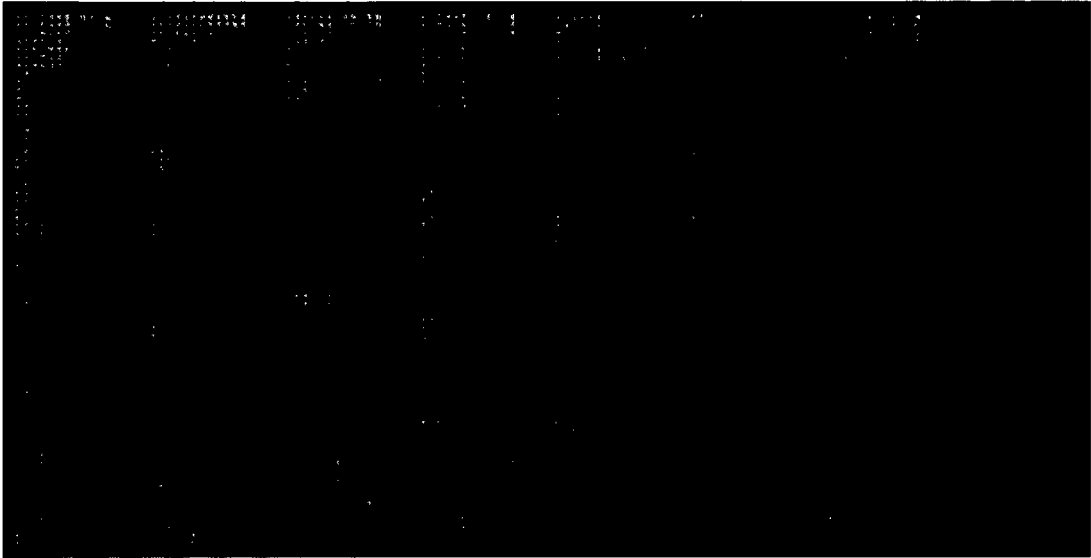


図7



Wilber-007-CD82

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
CD82	7	1	1.61E-08	0.722292	4.290747	0.036585				1
CD82	7	2	1.88E-14	0.794237	4.140058	0.079268				1
CD82	7	3	4.81E-17	0.810796	3.984783	0.182927				1
CD82	7	4	2.83E-20	0.821078	3.892285	0.262195				1

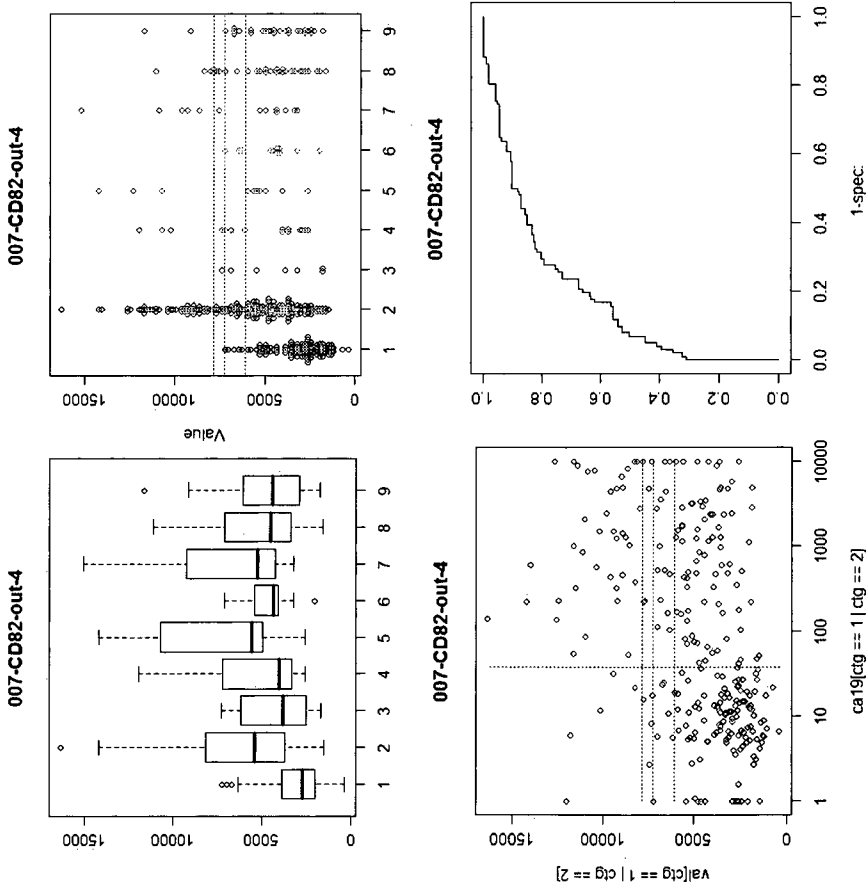
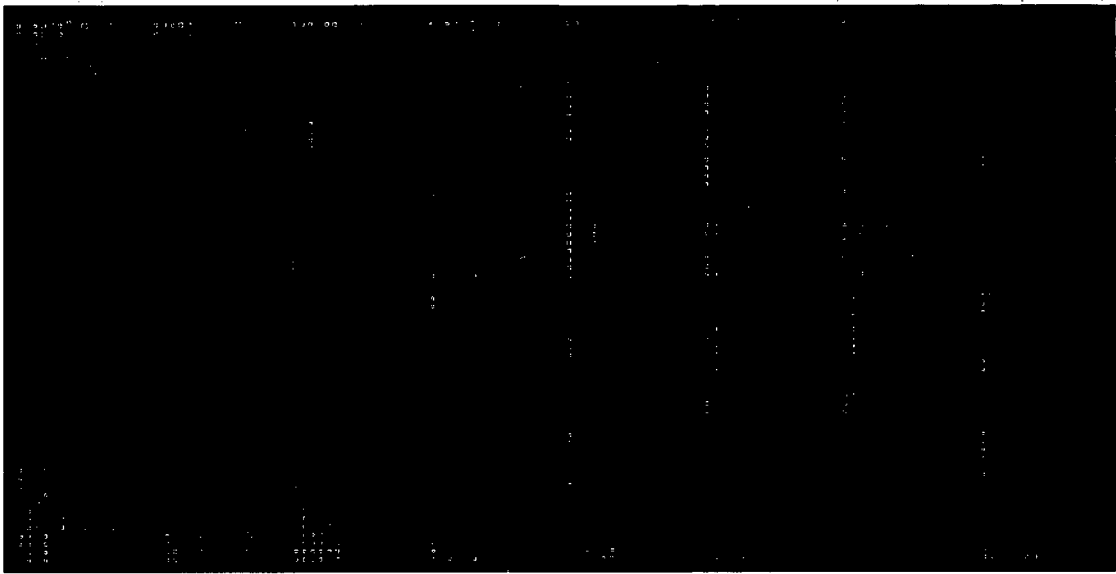
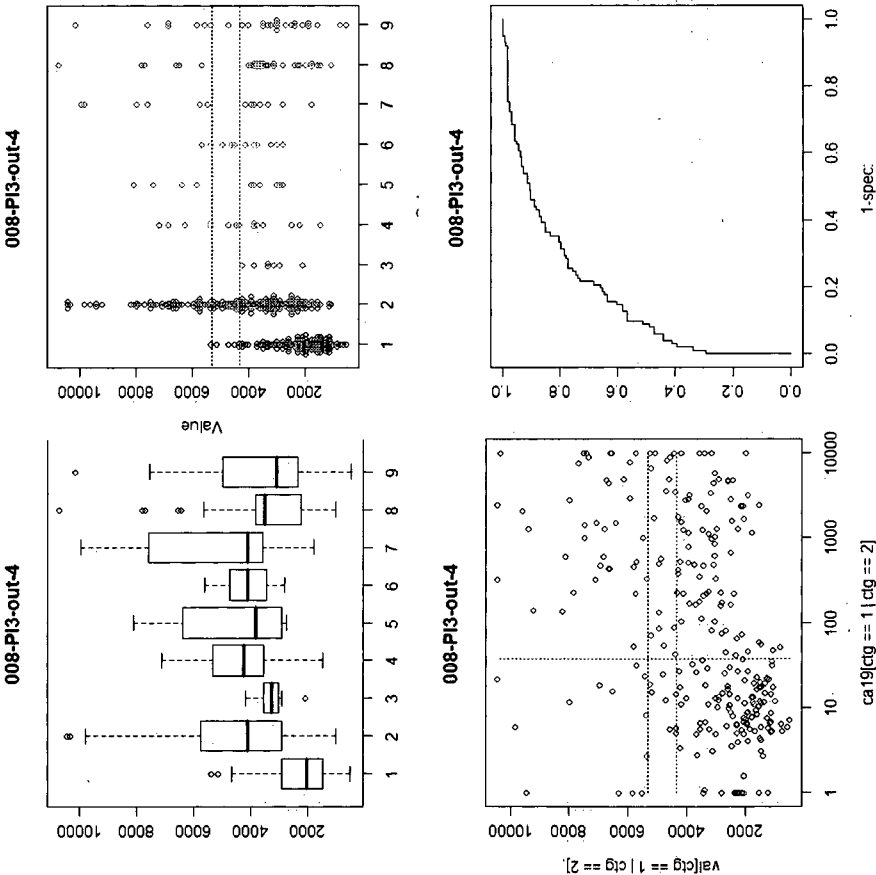


図8



Wilber-008-PI3

抗体名ID番号	プレートT検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
PI3	8	1	0.000536	0.613313	4.200219	0.02439	0.9901961	
PI3	8	2	5.79E-13	0.769967	4.048924	0.030488	0.9901961	
PI3	8	3	1.54E-17	0.822125	3.901628	0.121951	1	
PI3	8	4	1.38E-22	0.832496	3.723319	0.310976	0.9901961	



Wilber-009-RNASE1

抗体名	ID番号	プレート検定P値	AUC	閾値2SD	感度2SD	特異度2SD
RNASE1	9	1	1.60E-07	0.69563	4.186535	0.042683
RNASE1	9	2	1.06E-15	0.905326	4.031564	0.103659
RNASE1	9	3	8.13E-14	0.783297	3.875951	0.176829
RNASE1	9	4	3.09E-08	0.773494	3.904061	0.079268

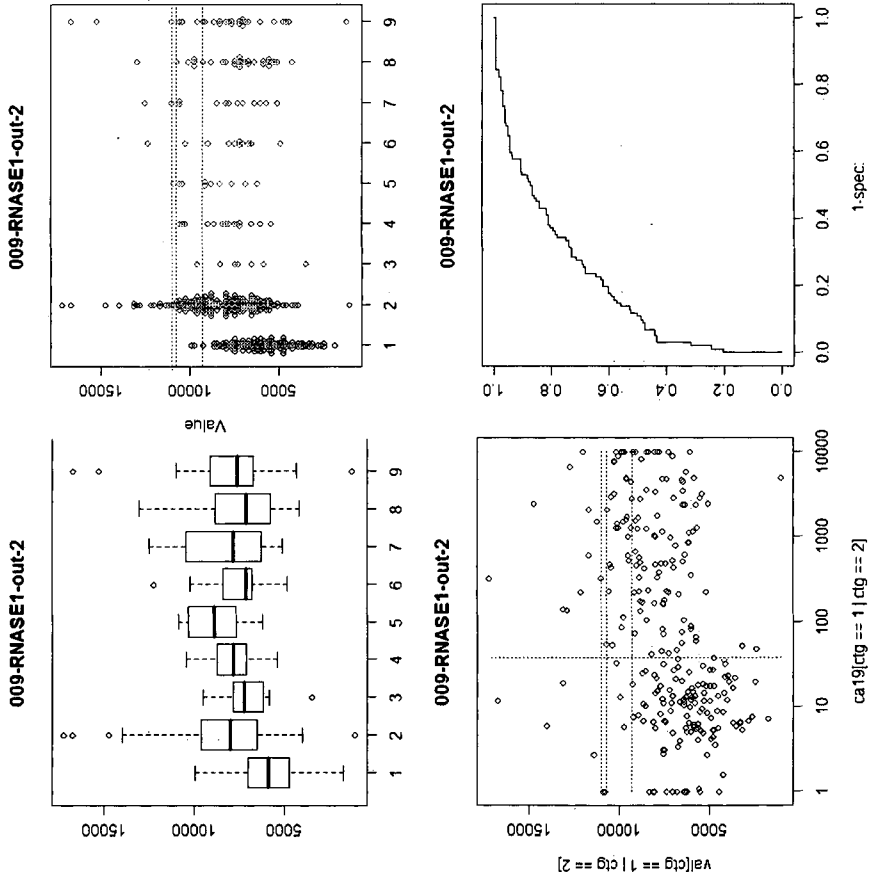


図9

図10

Wilber-010-RNASET2

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
RNASET2	10	1	1.80E-07	0.731857	4.311622	0.012195	1			
RNASET2	10	2	2.69E-17	0.858202	4.1212	0.097561	1			
RNASET2	10	3	1.19E-17	0.829268	3.964071	0.134146	1			
RNASET2	10	4	9.47E-21	0.829747	3.780737	0.292683	0.9803922			

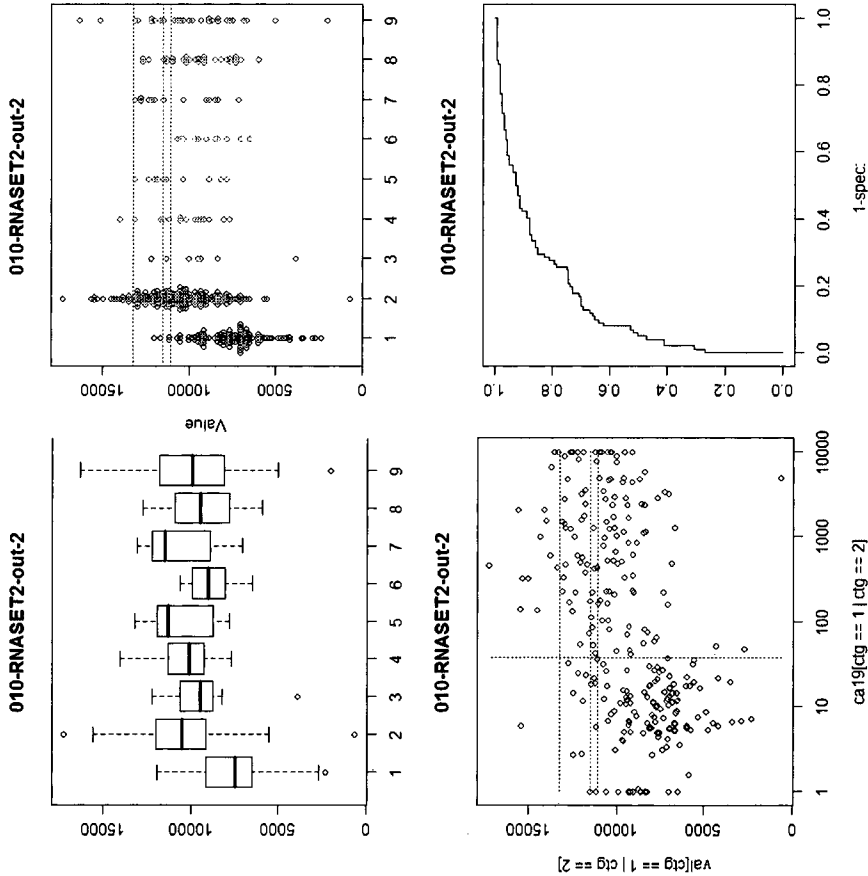
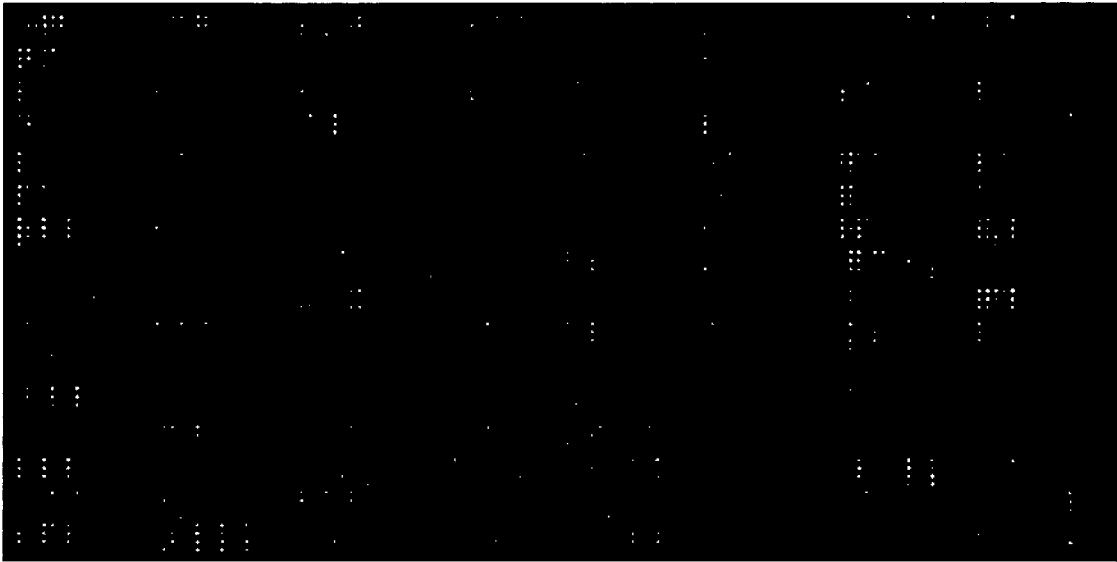


図11



Wilber-011-VRK2

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
VRK2	11	1	4.19E-17	0.8207795	4.04087	0.073171				1
VRK2	11	2	8.43E-21	0.8604137	3.980399	0.085366				1
VRK2	11	3	1.18E-17	0.8266978	3.925446	0.109756				1
VRK2	11	4	5.36E-18	0.8049976	3.839312	0.207317				0.9901961

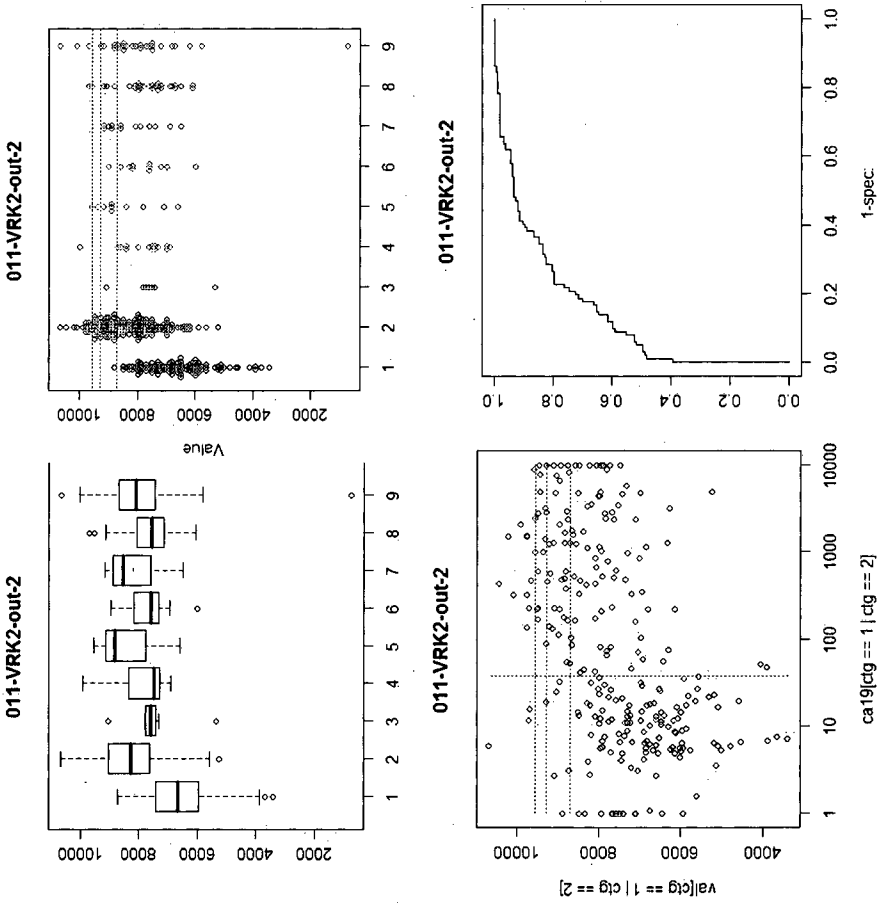
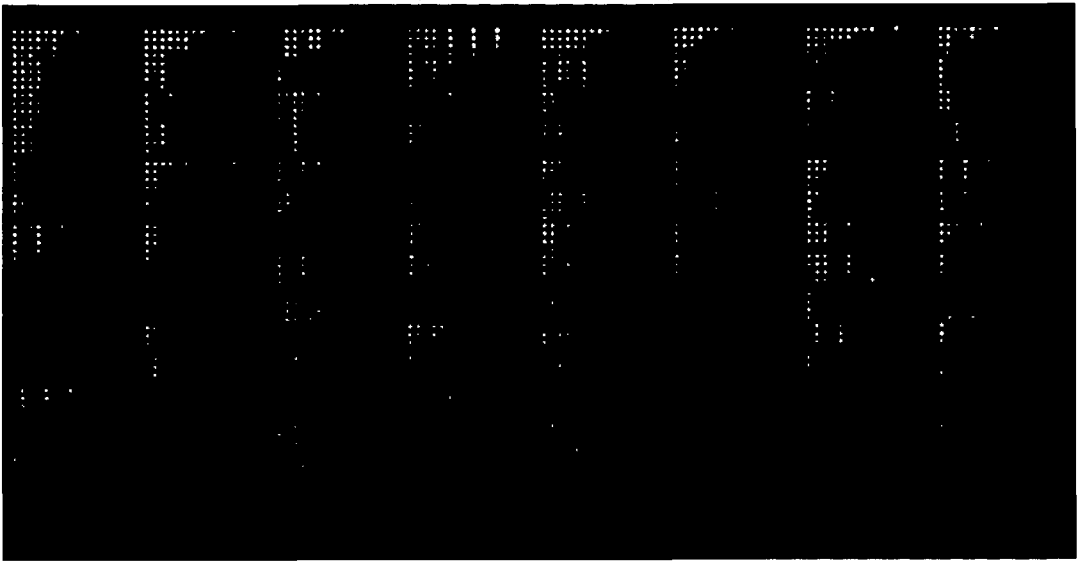


図12



Wilber-020-EV11

抗体名	ID番号	プレートT検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
EV11	20	1	0.00471	0.7611789	4.310959	0.006098	0.9901961	0.9901961	
EV11	20	2	1.63E-08	0.8351267	4.154084	0.073171	0.9901961		
EV11	20	3	6.33E-15	0.8458274	3.974804	0.140244	1		
EV11	20	4	1.80E-16	0.8319285	3.85236	0.207317	1		

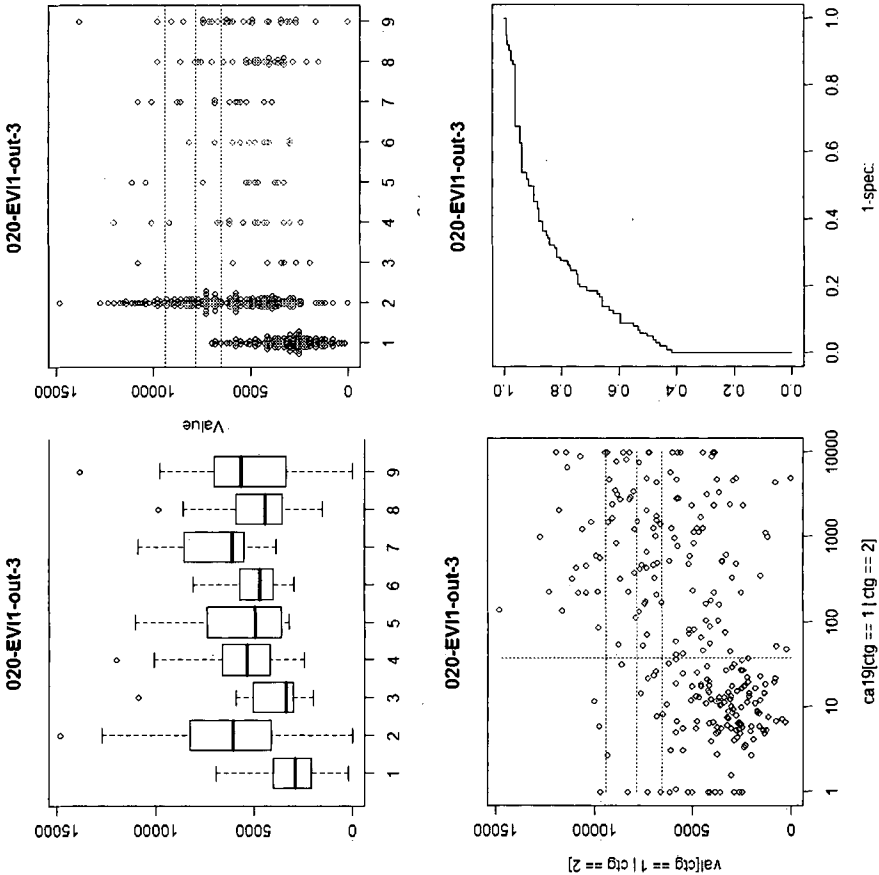
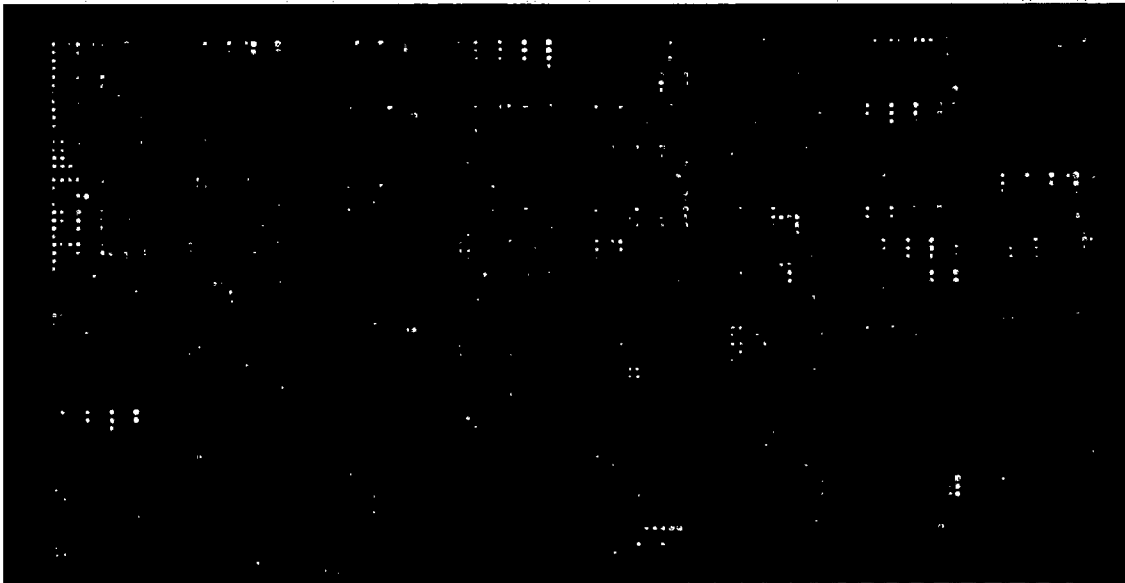


図13



Wilber-026-HMGB2

抗体名	ID番号	プレート番号	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
HMGB2	26	1	8.80E-09	0.72555	4.415981	0.006098	1			
HMGB2	26	2	4.26E-12	0.7839849	4.203507	0.006098	1			
HMGB2	26	3	1.53E-16	0.8424797	4.169322	0.006098	1			
HMGB2	26	4	9.22E-20	0.8665112	3.891996	0.030488	1			

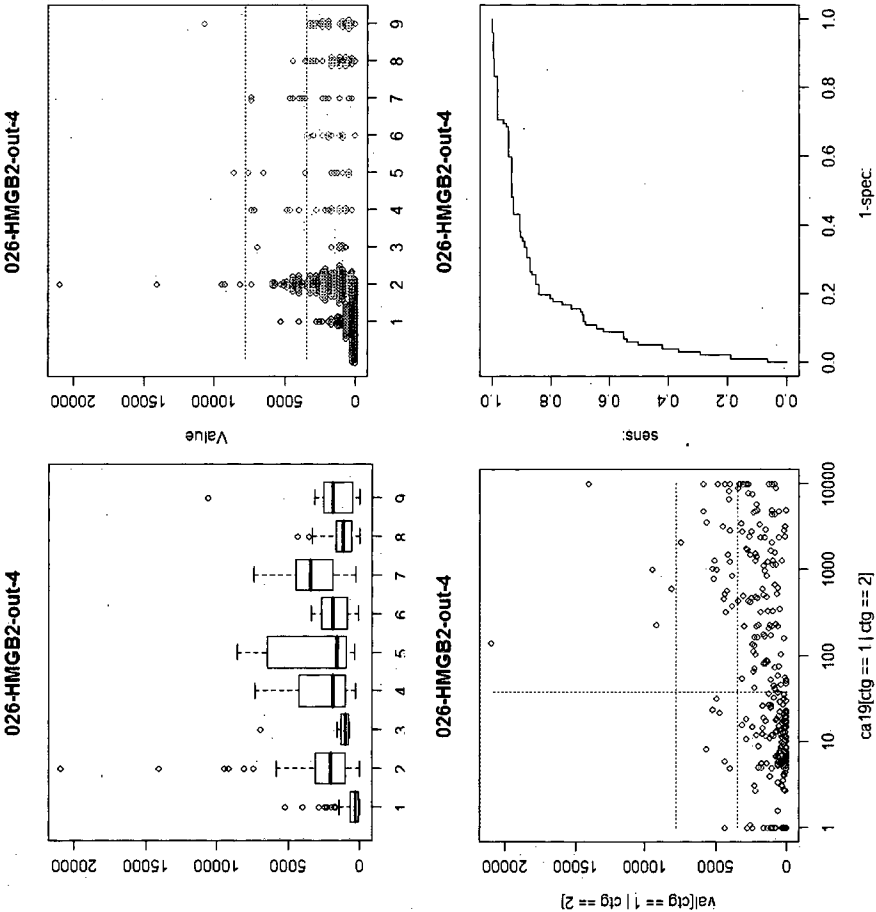
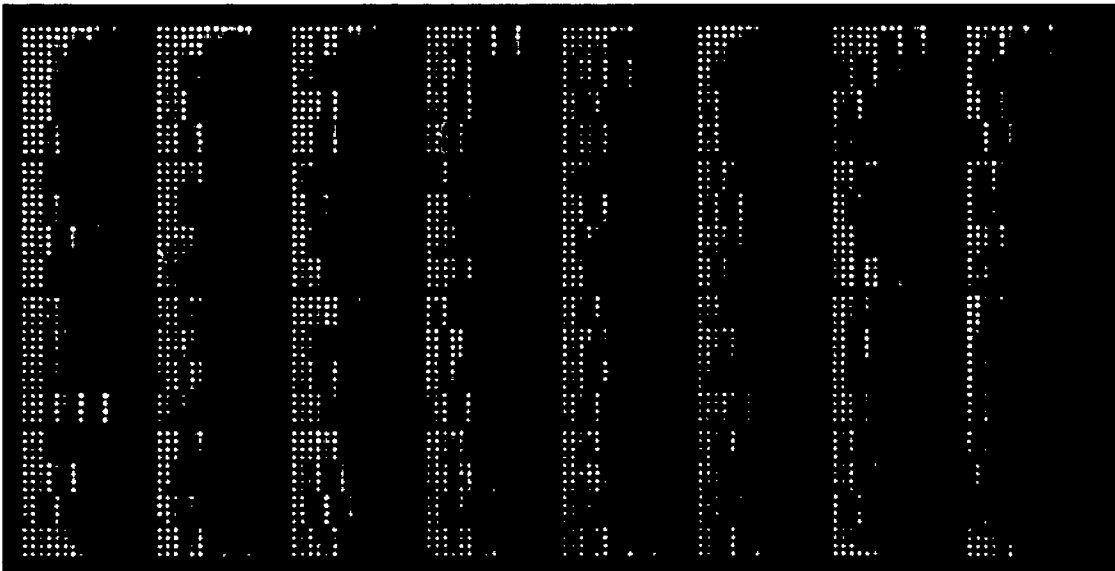


図14



Wilber-033-MST4

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
MST4	33	1	0.026791	0.7406743	4.410966	0	1			
MST4	33	2	1.05E-07	0.8024868	4.254386	0.109756	1			
MST4	33	3	3.55E-09	0.7748087	4.127698	0.054878	1			
MST4	33	4	0.0005	0.6866332	4.182638	0.006098	1			

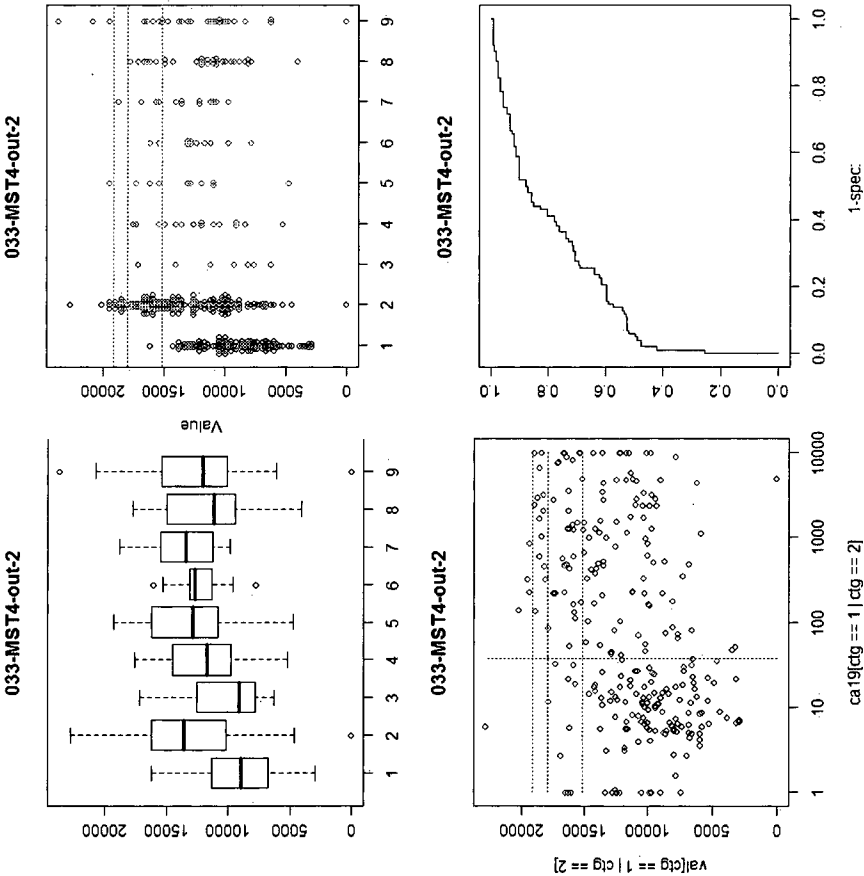
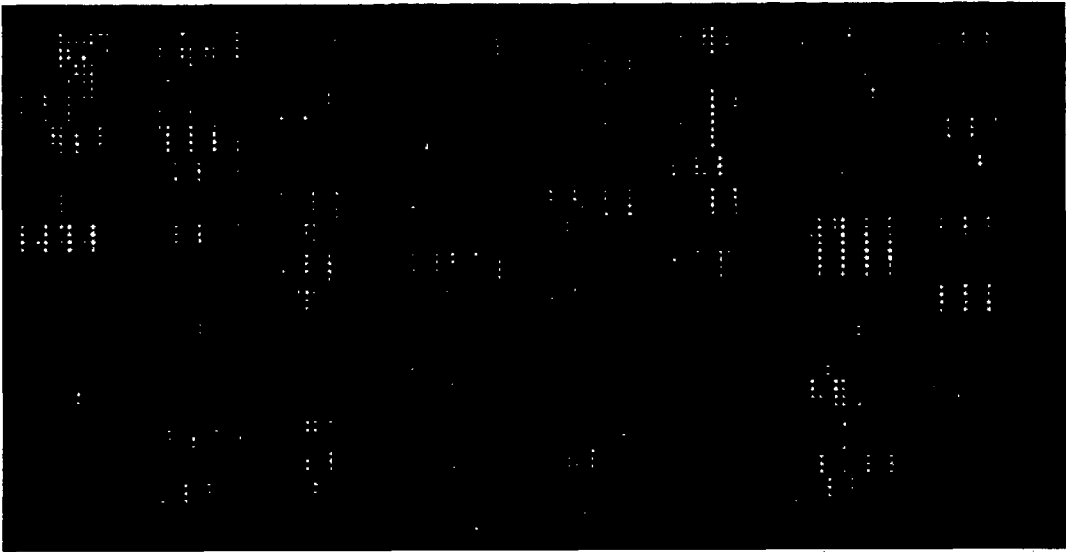


図15



Wilber-034-MMP9

抗体名	ID番号	プレートT検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
MMP9	34	1	1.18E-05	0.7728957	4.201532	0	0	1	1
MMP9	34	2	8.81E-08	0.8020684	4.190317	0	0	1	1
MMP9	34	3	4.36E-13	0.8556911	4.143968	0	0	1	1
MMP9	34	4	8.43E-17	0.8529412	4.010352	0.176829	0.176829	1	1

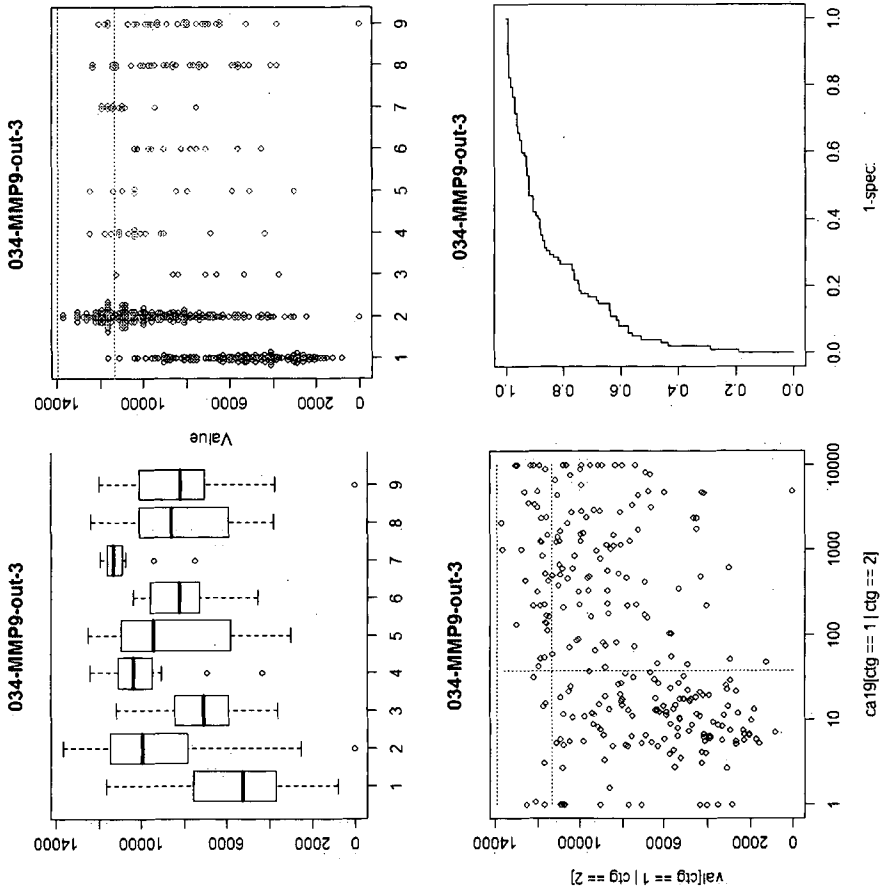
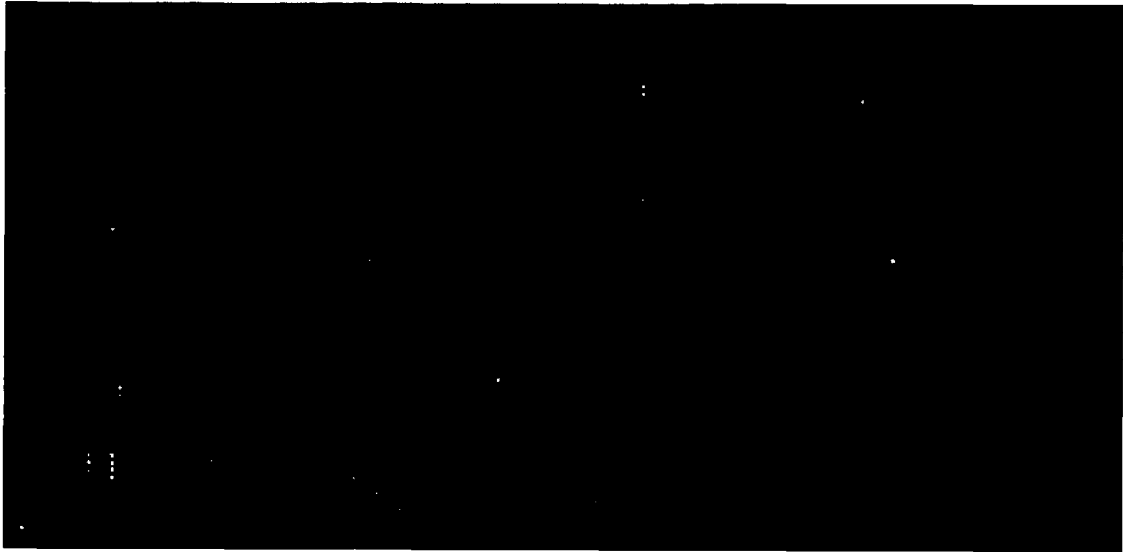


図16



Wilber-035-MYBL2

抗体名	ID番号	プレート番号	T検定P値	AUC	閾値.2SD	感度.2SD	特異度.2SD
MYBL2	35	1	0.840923	0.50272	4.524818	0	1
MYBL2	35	2	0.410269	0.5512315	4.445196	0	1
MYBL2	35	3	4.17E-05	0.7202296	4.418062	0	1
MYBL2	35	4	2.11E-08	0.8153396	4.504063	0	1

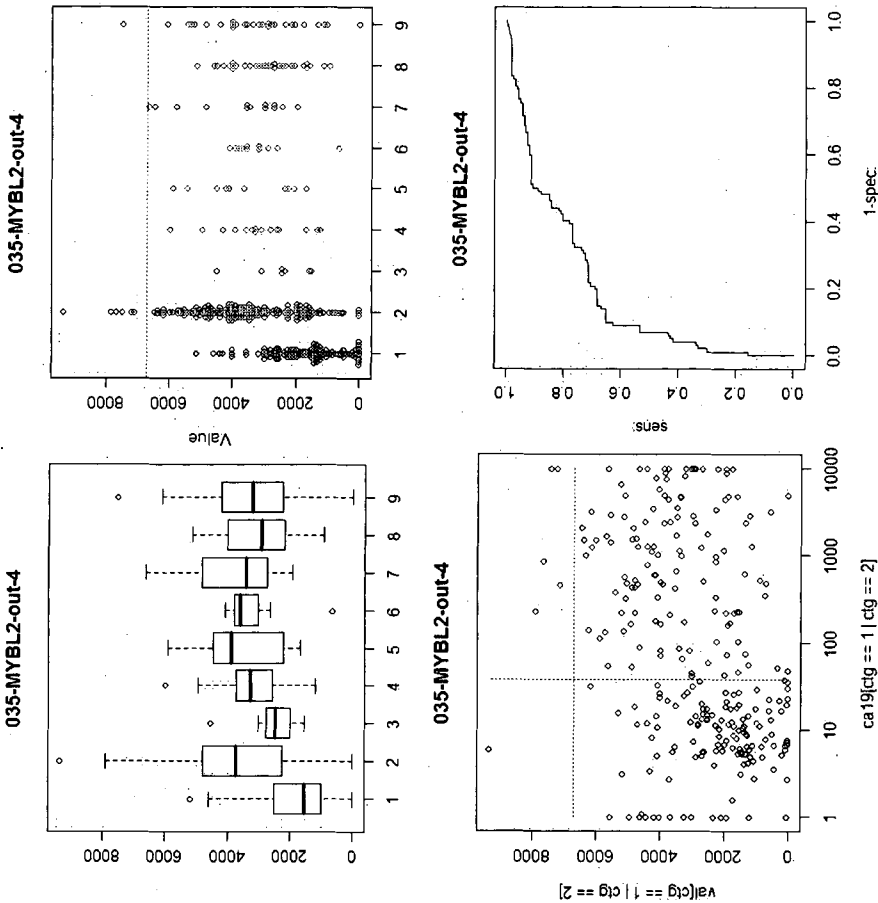
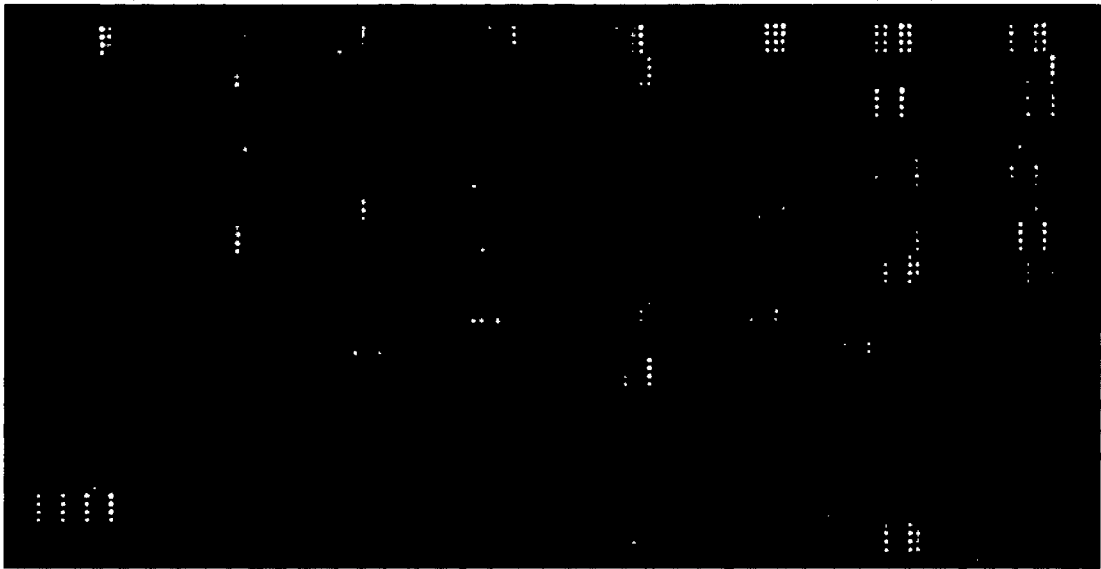


図17



Wilber-036-HYOU1

抗体名	ID番号	プレート	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
HYOU1	36	1	3.29E-09	0.7523912	3.715569	0.006098				1
HYOU1	36	2	4.43E-18	0.813038	3.849192	0.006098				0.9901961
HYOU1	36	3	1.46E-06	0.666308	4.138276	0.030488				0.9901961
HYOU1	36	4	0.004861	0.6037183	4.159307	0.018293				1

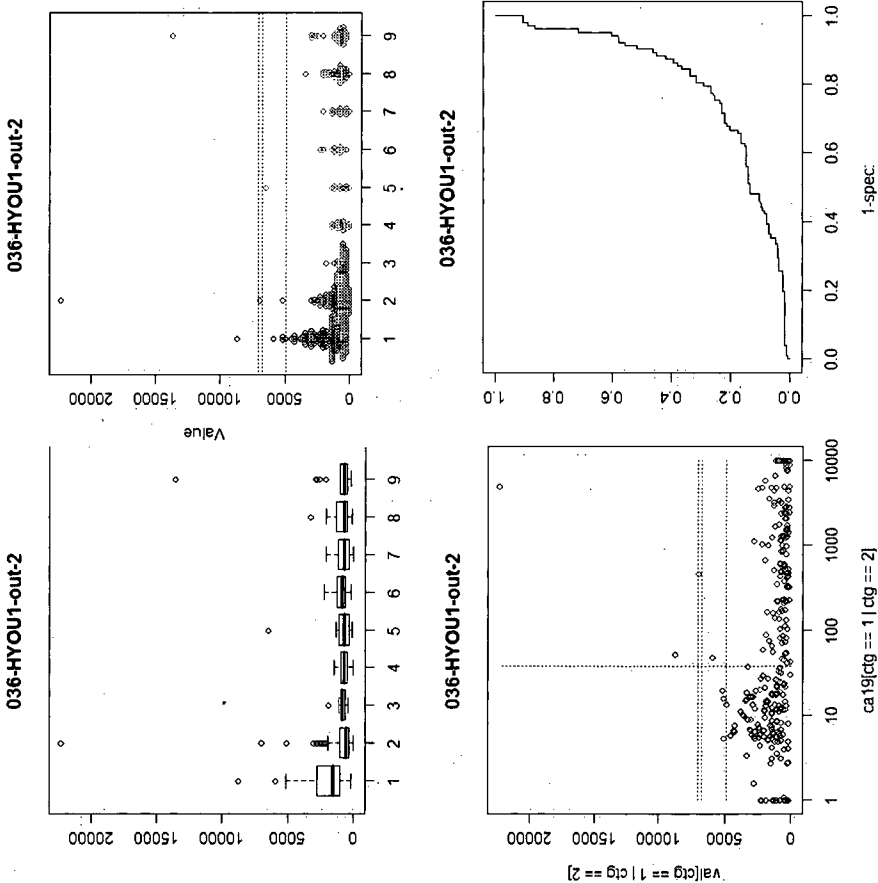


図18



Wilber-039-PPM1B

抗体名	ID番号	プレート検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
PPM1B	39	1	5.14E-07	0.7783357	4.420696	0			1
PPM1B	39	2	8.55E-12	0.8129484	4.301348	0.030488			1
PPM1B	39	3	2.75E-13	0.8529412	4.448287	0			1
PPM1B	39	4	2.13E-15	0.8359039	4.198397	0.006098			1

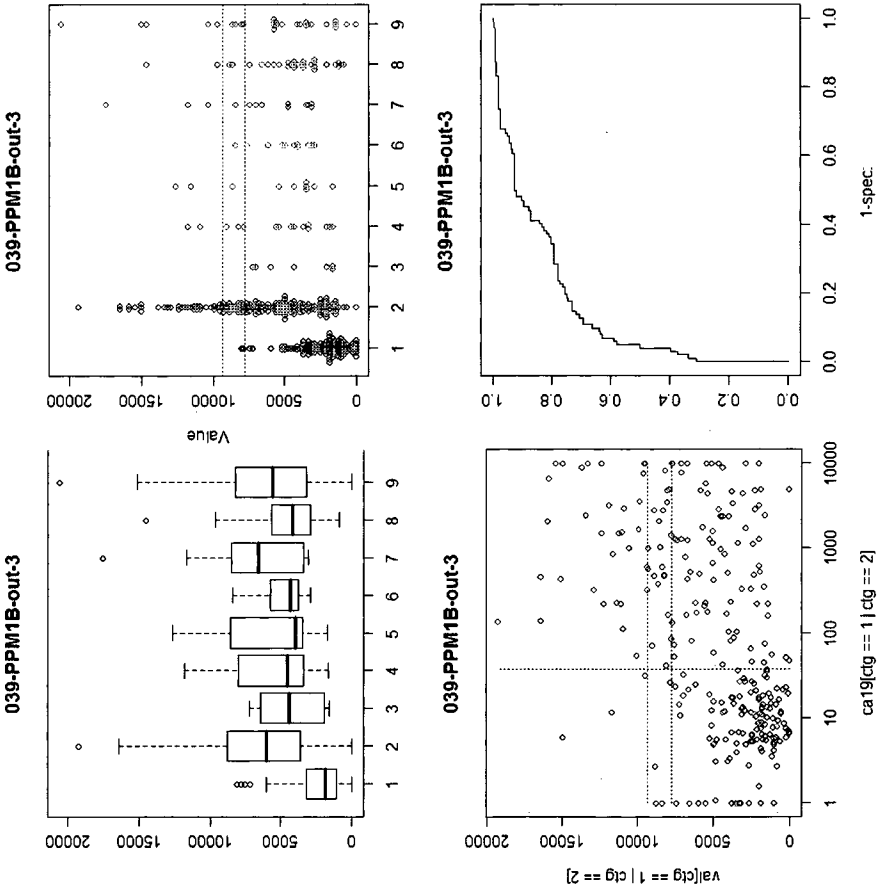
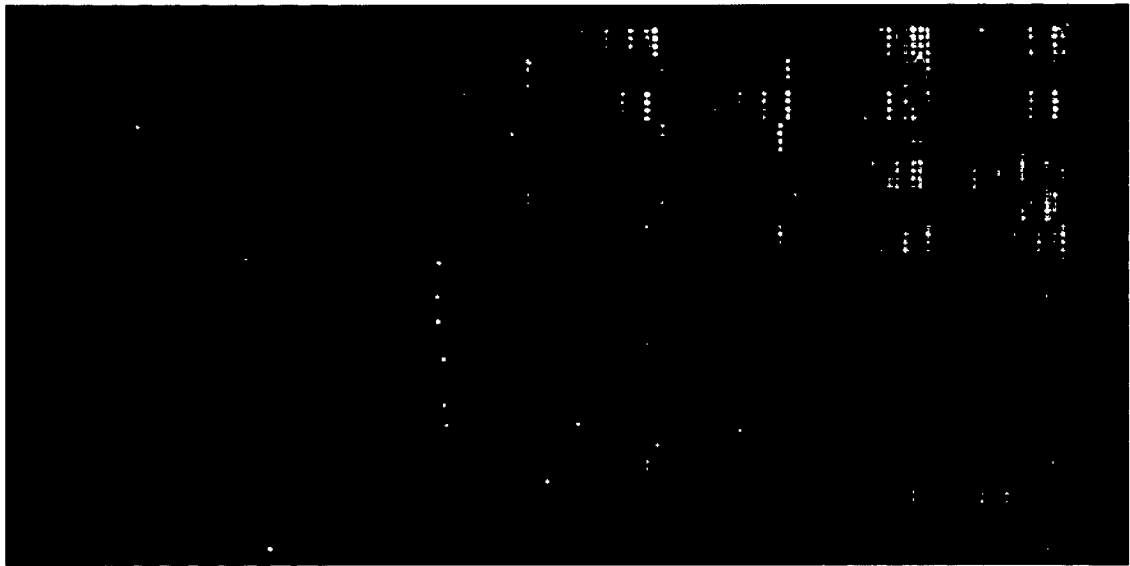


図19



Wilber-074-AK3L1

抗体名	ID番号	プレート番号	検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
AK3L1	74	1	8.95E-10	0.773374	3.734034	0	1			
AK3L1	74	2	7.29E-14	0.8005141	3.610316	0	1			
AK3L1	74	3	9.11E-19	0.7785748	2.876625	0.268293	0.9411765			
AK3L1	74	4	1.56E-14	0.7655428	3.272876	0.109756	0.9705882			

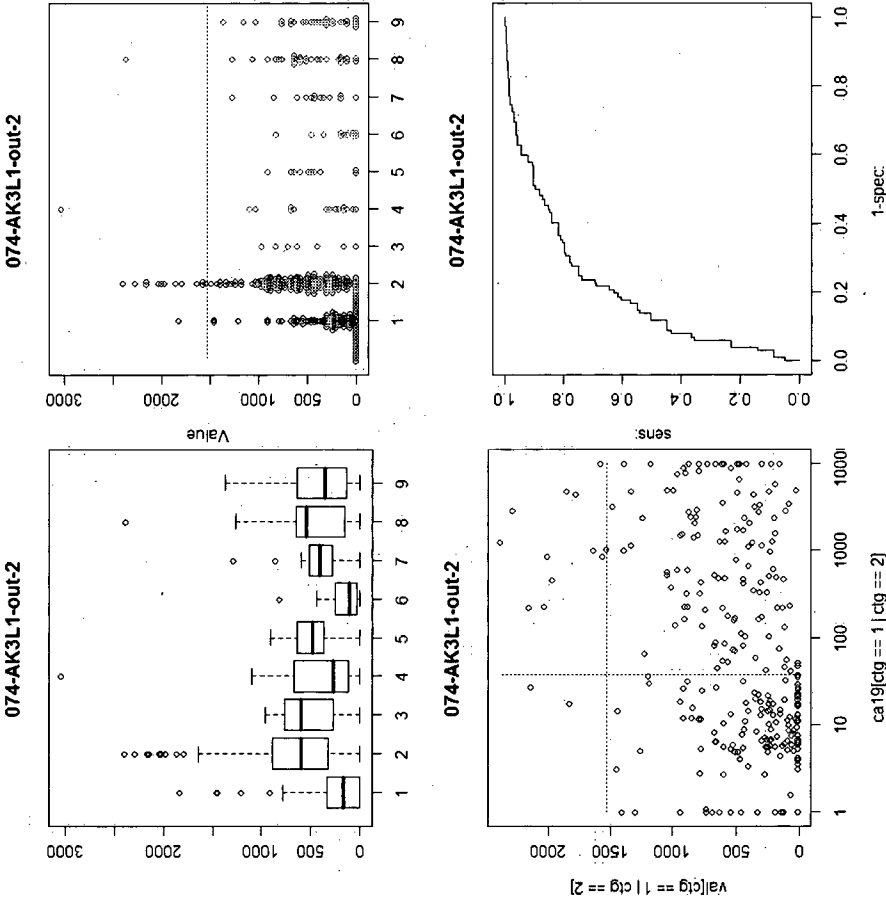


図20



Wilber-095-IGFBP2

抗体名	ID番号	プレート番号	T検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
IGFBP2	95	1	1.29E-08	0.8379663	4.136137	0				1
IGFBP2	95	2	1.46E-22	0.8495337	3.443565	0.018293				1
IGFBP2	95	3	6.85E-11	0.6365375	0.688239	0.280488				0.9901961
IGFBP2	95	4	0.023007	0.5196676	0.749959	0.04878				0.9901961

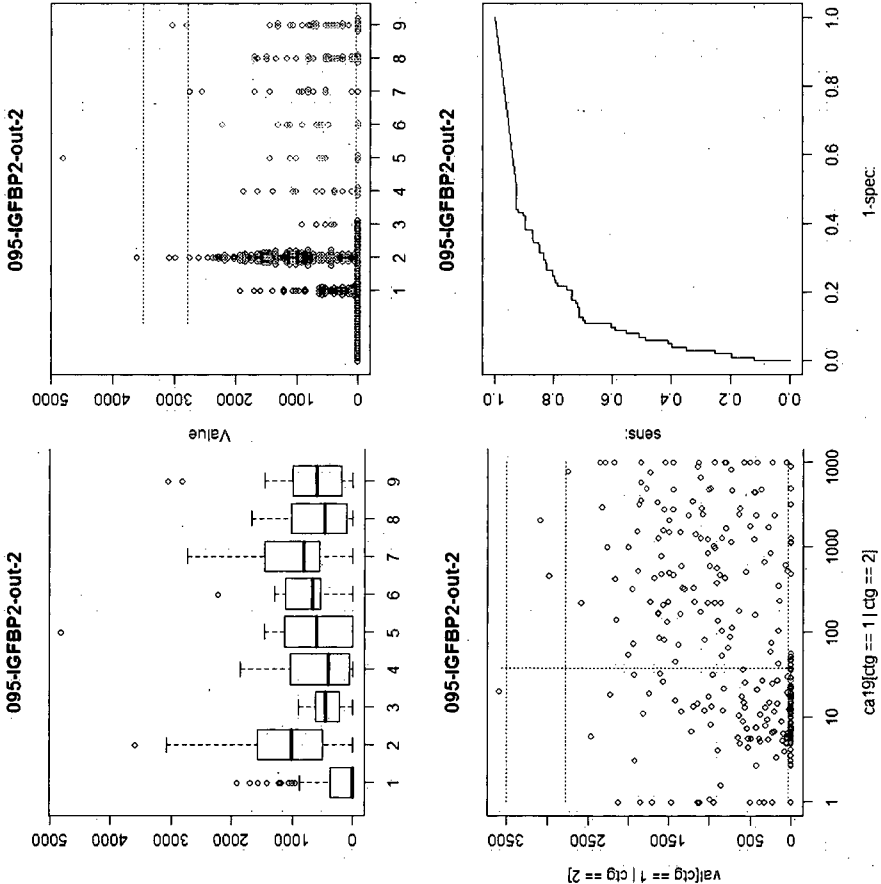
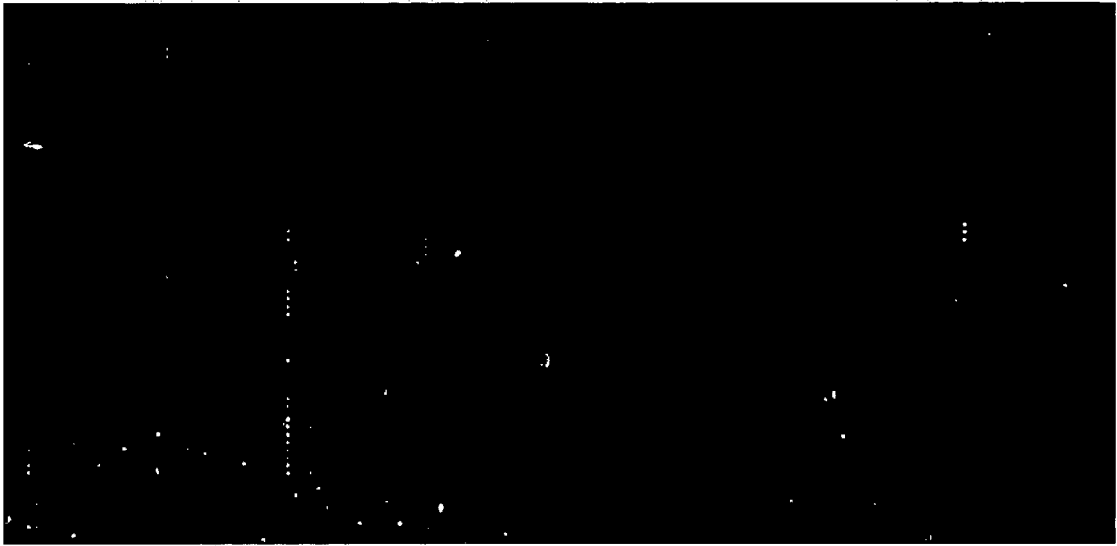


図21



Wilber-099-STMN1

抗体名	ID番号	プレート番号	T検定P値	AUC	閾値2SD	感度2SD	特異度2SD
STMN1	99	1	2.43E-06	0.6731528	3.777643	0.012195	0.9901961
STMN1	99	2	1.18E-08	0.7590866	3.980145	0.006098	1
STMN1	99	3	2.68E-19	0.8025466	3.125581	0.189024	1
STMN1	99	4	3.64E-24	0.7762434	1.939434	0.597561	0.9313725

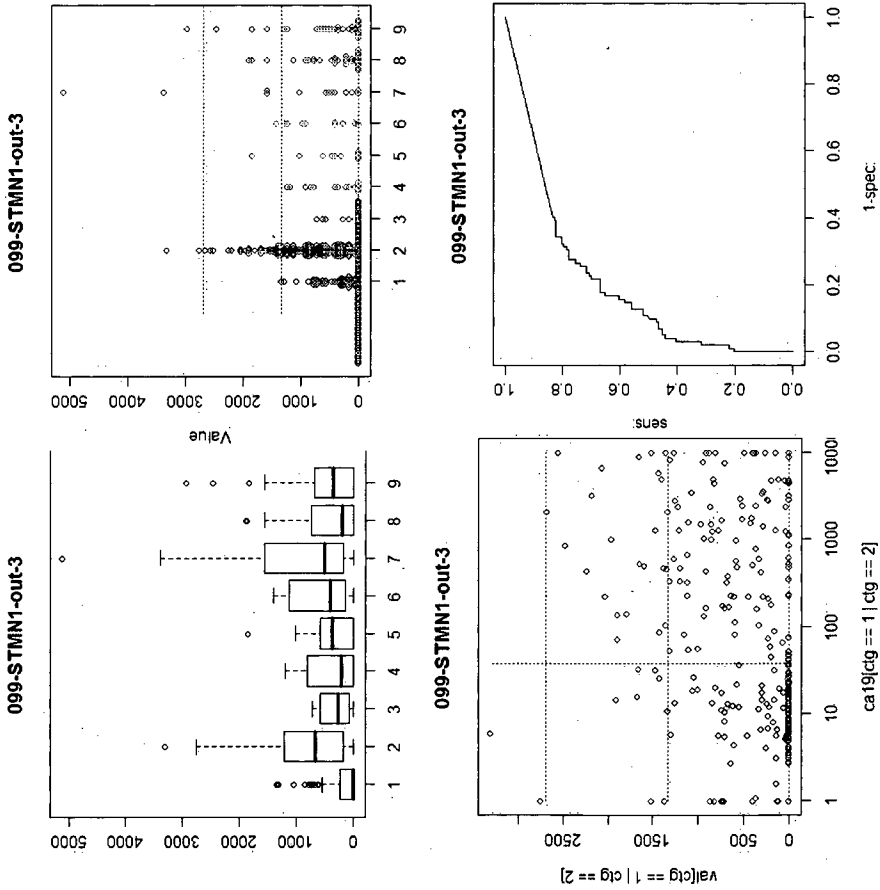
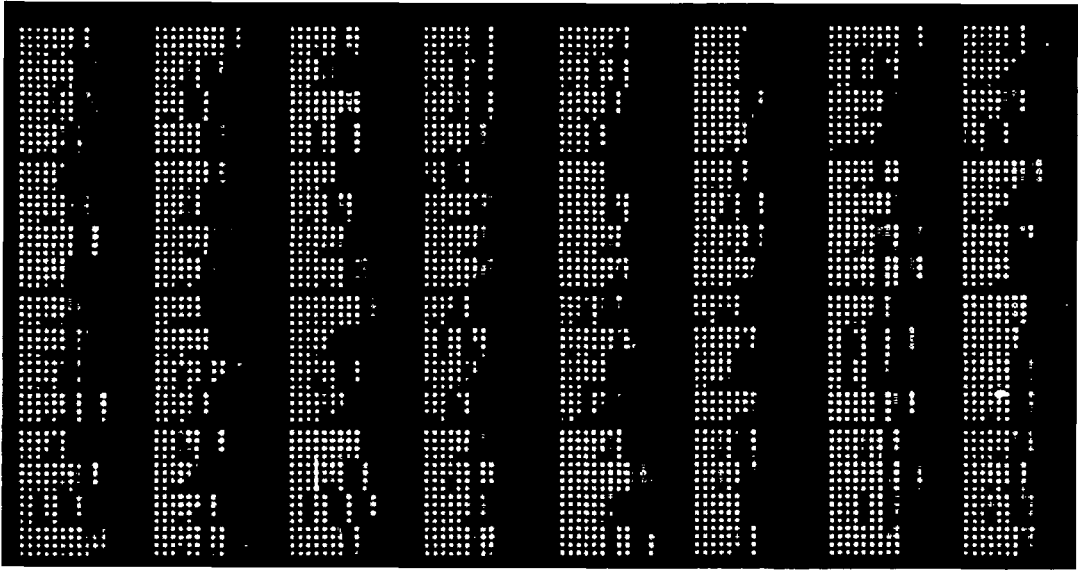
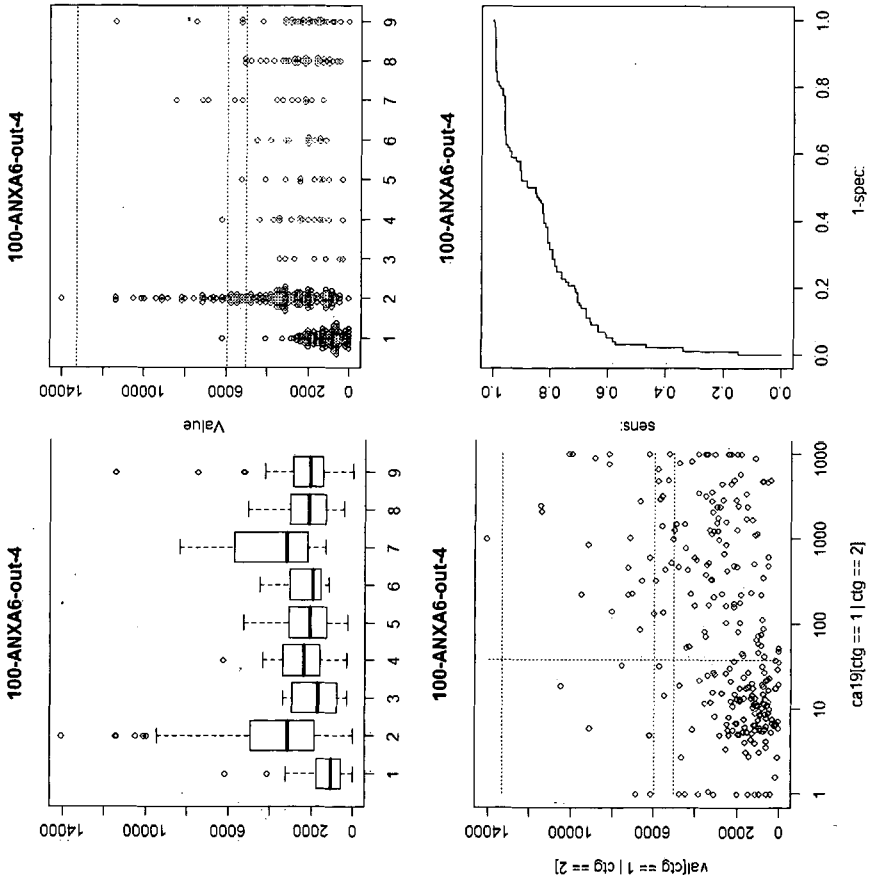


図22



Wilber-100-ANXA6

抗体名	ID番号	プレートT検定P値	AUC	閾値	2SD	感度	2SD	特異度	2SD
ANXA6	100	1	6.67E-08	0.756814921	4.663812	0	0	1	1
ANXA6	100	2	1.36E-15	0.81886657	4.530391	0.060976	0.060976	1	1
ANXA6	100	3	4.18E-20	0.84445242	4.15898	0.189024	0.189024	0.9901961	0.9901961
ANXA6	100	4	4.13E-14	0.84505022	4.123383	0.006098	0.006098	1	1



Wilber-127-ATP6AP1

抗体名	プレート検定P値	AUC	閾値 2SD	感度 2SD	特異度 2SD
127_ATP6AP1	1	1.20E-12	0.774032	4.511776	0.134146
127_ATP6AP1	2	4.33E-12	0.784254	4.131996	0.012195
127_ATP6AP1	3	2.36E-24	0.814264	2.707848	0.536585
127_ATP6AP1	4	1.23E-26	0.803354	1.697136	0.585366

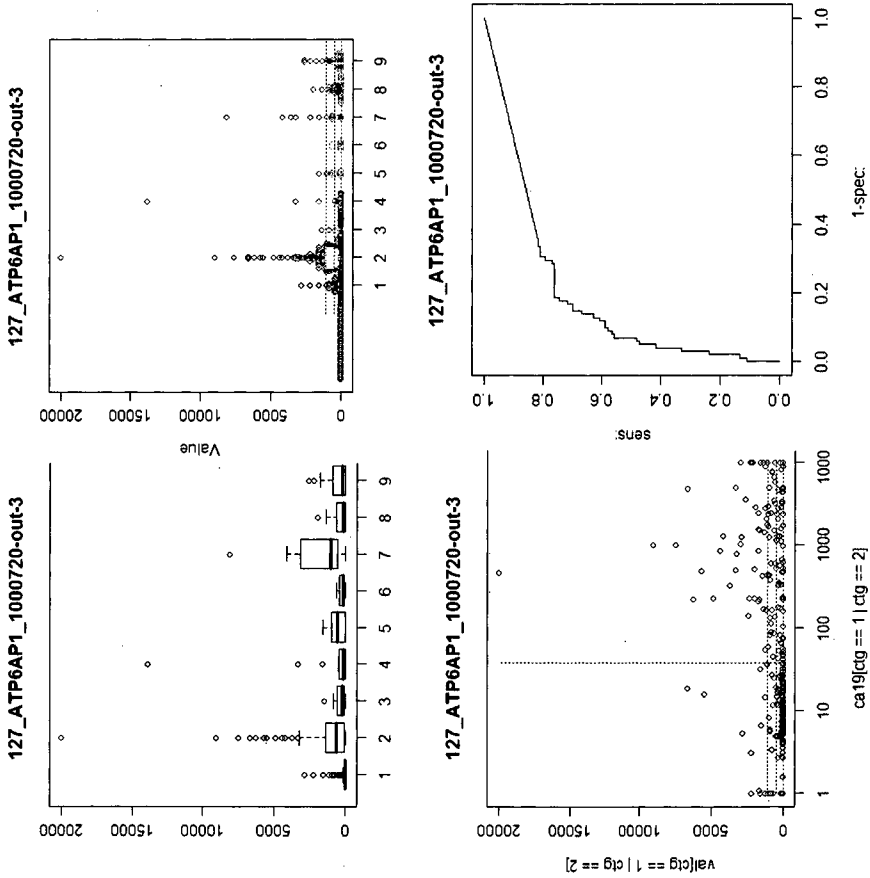


図23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/574, G01N27/62, G01N33/53, G01N33/68, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-500948 A (Oncotherapy Science, Inc.), 12 January 2006 (12.01.2006), claims 1, 2, 7; paragraphs [0041], [0042], [0169]; examples & WO 2004/031412 A2 page 11, lines 16 to 31; table 3; examples; claims 1, 2, 7 & US 2005/0260639 A1 & EP 2009117 A2 & CA 2500482 A1	1-17
A	JP 2010-175452 A (Japan Health Sciences Foundation), 12 August 2010 (12.08.2010), claims & WO 2010/087434 A1	1-17



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

04 August 2016 (04.08.16)

Date of mailing of the international search report

16 August 2016 (16.08.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066514

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-27387 A (Tohoku University), 07 February 2013 (07.02.2013), claims (Family: none)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066514

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:

Claims 1-17 have a common technical feature of "a biomarker for detecting pancreatic cancer".

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 or 2.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

(Continued to 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.:
The parts in claims 1-17 relating to (the inventions relating to the parts wherein AP3B1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer).

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/JP2016/066514

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

Accordingly, claims are classified into twenty three inventions each of which has a special technical feature indicated below.

(Invention 1) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein AP3B1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 2) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein C2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 3) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein CKS1B is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 4) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein CKS2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 5) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein CSPG2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 6) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein CYCS is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 7) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein CD82 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 8) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein PI3 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 9) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein RNASE1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 10) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein RNASET2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 11) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein VRK2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 12) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein EV1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 13) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein HMGB2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 14) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein MST4 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 15) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein MMP9 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 16) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein MYBL2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 17) claims 1-17 (partial)

The inventions relating to the parts wherein PPM1B is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066514

(Invention 18) claims 1-17 (partial)
The inventions relating to the parts wherein AK3L1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 19) claims 1-17 (partial)
The inventions relating to the parts wherein IGFBP2 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 20) claims 1-17 (partial)
The inventions relating to the parts wherein STMN1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 21) claims 1-17 (partial)
The inventions relating to the parts wherein ANXA6 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 22) claims 1-17 (partial)
The inventions relating to the parts wherein ATP6AP1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

(Invention 23) claims 1-17 (partial)
The inventions relating to the parts wherein HYOU1 is used as a biomarker for detecting pancreatic cancer.

Document 1: JP 2010-175452 A (Japan Health Sciences Foundation), 12 August 2010 (12.08.2010), claims & WO 2010/087434 A1

Document 2: JP 2013-27387 A (Tohoku University) 07 February 2013 (07.02.2013), claims (Family: none)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i,
G01N37/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/574, G01N27/62, G01N33/53, G01N33/68, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

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	JP 2006-500948 A (オンコセラピー・サイエンス株式会社) 2006.01.12, 請求項 1, 2, 7, 段落[0041],[0042], [0169], 実施例 & WO 2004/031412 A2, P. 11, L. 16-31, table3, examples, claims1, 2, 7 & US 2005/0260639 A1 & EP 2009117 A2 & CA 2500482 A1	1-17
A	JP 2010-175452 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2010.08.12, 特許請求の範囲 & WO 2010/087434 A1	1-17

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 4 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 6 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

海野 佳子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

2 J

3 9 0 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 2013-27387 A (国立大学法人東北大学) 2013.02.07, 特許請求の 範囲 (ファミリーなし)	1-17

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項1－17は、[膵がん検出用のバイオマーカー]という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1又は2の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する23の発明に区分される。

（続きは、特別頁を参照。）

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ので、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ので、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1－17（膵がん検出用のバイオマーカーとしてAP3B1を用いる部分に係る発明。）に係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

第Ⅲ欄の続き。

(発明 1) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして AP3B1 を用いる部分に係る発明。
(発明 2) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして C2 を用いる部分に係る発明。
(発明 3) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして CKS1B を用いる部分に係る発明。
(発明 4) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして CKS2 を用いる部分に係る発明。
(発明 5) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして CSPG2 を用いる部分に係る発明。
(発明 6) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして CYCS を用いる部分に係る発明。
(発明 7) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして CD82 を用いる部分に係る発明。
(発明 8) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして PI3 を用いる部分に係る発明。
(発明 9) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして RNASE1 を用いる部分に係る発明。
(発明 10) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして RNASET2 を用いる部分に係る発明。
(発明 11) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして VRK2 を用いる部分に係る発明。
(発明 12) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして EV1 を用いる部分に係る発明。
(発明 13) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして HMGB2 を用いる部分に係る発明。
(発明 14) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして MST4 を用いる部分に係る発明。
(発明 15) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして MMP9 を用いる部分に係る発明。
(発明 16) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして MYBL2 を用いる部分に係る発明。
(発明 17) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして PPM1B を用いる部分に係る発明。
(発明 18) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして AK3L1 を用いる部分に係る発明。
(発明 19) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして IGFBP2 を用いる部分に係る発明。
(発明 20) 請求項 1-17 (部分的)
膵がん検出用のバイオマーカーとして STMN1 を用いる部分に係る発明。

(続葉あり)

第Ⅲ欄の続き。

（発明 2 1）請求項 1－1 7（部分的）

膵がん検出用のバイオマーカーとして ANXA6 を用いる部分に係る発明。

（発明 2 2）請求項 1－1 7（部分的）

膵がん検出用のバイオマーカーとして ATP6AP1 を用いる部分に係る発明。

（発明 2 3）請求項 1－1 7（部分的）

膵がん検出用のバイオマーカーとして HYOU1 を用いる部分に係る発明。

文献 1：JP 2010-175452 A（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団）2010.08.12，特許請求の範囲 & WO 2010/087434 A1

文献 2：JP 2013-27387 A（国立大学法人東北大学）2013.02.07，特許請求の範囲（ファミリーなし）

（続葉なし）