

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6654432号  
(P6654432)

(45) 発行日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(24) 登録日 令和2年2月3日(2020.2.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/18 (2006.01)  
C12P 21/08 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18  
C12P 21/08  
G01N 33/53

Z N A  
D

請求項の数 7 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2015-517672 (P2015-517672)  
 (86) (22) 出願日 平成25年6月11日 (2013.6.11)  
 (65) 公表番号 特表2015-529633 (P2015-529633A)  
 (43) 公表日 平成27年10月8日 (2015.10.8)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2013/061976  
 (87) 國際公開番号 WO2013/189778  
 (87) 國際公開日 平成25年12月27日 (2013.12.27)  
 審査請求日 平成28年6月8日 (2016.6.8)  
 審判番号 不服2018-6974 (P2018-6974/J1)  
 審判請求日 平成30年5月22日 (2018.5.22)  
 (31) 優先権主張番号 12172531.1  
 (32) 優先日 平成24年6月19日 (2012.6.19)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
　　欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者 514324829  
　　ビオユニヴェルサ ソシエタ ア レスピ  
　　ンサビリタ リミータ  
　　イタリア アイ-8 3025 (アヴェッリ  
　　ーノ) モントーロ ヴィア アントニオ  
　　グランシ 85  
 (74) 代理人 110001243  
　　特許業務法人 谷・阿部特許事務所  
 (72) 発明者 マリア カテリナ タルコ  
　　イタリア アイ-8 3100 (アヴェリ  
　　ーノ) アペリノ ヴィア ブリガータ  
　　アヴェリーノ 33

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生化学的血清マーカーおよび組織マーカーとしてのBAG3

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

病理学的状態の診断のために、生物学的試料において、抗BAG3抗体または可溶性BAG3と結合して免疫複合体を形成した抗BAG3抗体の存在を検出する方法であって、

b. 血清、血漿、尿、または唾液からなる生物学的試料における抗BAG3抗体または可溶性BAG3と結合して免疫複合体を形成した抗BAG3抗体の存在を決定するステップを含み、

前記病理学的状態は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠疾患、虚血、急性心不全、慢性心不全、または医原性心疾患から選択される心臓疾患、および、肺癌から選択され、および、

前記診断は、インビトロまたはエキソビオである、  
ことを特徴とする方法。

## 【請求項2】

c. 生物学的試料から得た値を、基準値または健康な提供者から得た値と比較するステップ、

をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記決定ステップbは、ELISA検査により実施されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

## 【請求項4】

10

20

前記血清、血漿、尿、または唾液は、哺乳類、好ましくはヒト由来であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

E L I S A キットの使用であって、

前記 E L I S A キットは、B A G 3 組換えタンパク質または可溶性 B A G 3 を捕捉する B A G 3 特異的マウスモノクローナル抗体 A C - 1 、ならびに、ヒト免疫グロブリンを認識することができる抗体を含み、

前記キットは、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、急性冠疾患、虚血、急性心不全、慢性心不全、または医原性心疾患から選択される心臓疾患、および、肺癌、から選択される病理学的状態の診断のために、生物学的試料において可溶性 B A G 3 と結合して免疫複合体を形成した抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体の検出をするために用いられるものであることを特徴とする E L I S A キットの使用。10

【請求項 6】

前記生物学的試料は、血清、血漿、尿、または唾液試料であることを特徴とする請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記血清、血漿、尿、または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来であることを特徴とする請求項 6 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、病理学的状態の診断における生化学的マーカーとしての使用のための抗 B A G 3 抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

B A G 3 (基準配列 : N P \_ 0 0 4 2 7 2 ; 遺伝子 I D 9 5 3 1 ) は、粗面小胞体に特に集中している 7 4 kDa の細胞質タンパク質である。 B A G 3 タンパク質は、 B A G ドメイン ( 1 1 0 ~ 1 2 4 アミノ酸 ) として知られている構造ドメインを介して熱ショックタンパク質 H S P 7 0 の A T P アーゼドメインと相互作用する、コシャペロンのファミリーに属する。 B A G ドメインに加えて、 B A G 3 は、 WW ドメインおよびプロリン豊富反復 ( P X X P ) を含有し、これらは他のタンパク質への結合を仲介することができる。さらに、 2 つの保存 I P V ( I l e - P r o - V a l ) モチーフが、 WW 領域と P X X P 領域の間に配置されており、分子シャペロンの H s p B ファミリーのメンバーである、 H s p B 8 への B A G 3 の結合を仲介する。したがって、 B A G 3 は、そのマルチドメイン構造のアダプター性質に起因して、異なるパートナータンパク質と相互作用することができる。 b a g 3 遺伝子発現は、筋細胞を含む少数の正常な細胞型および幾つかの原発性腫瘍または腫瘍細胞系から構成される。さらに、 b a g 3 遺伝子発現は、多様なストレッサーにより誘発されうる。事実、ストレス性の刺激は、 b a g 3 を含むストレス活性化遺伝子の発現の原因である、熱ショック転写因子 ( H S F ) 1 を活性化する ( 非特許文献 1 参照 ) 。証拠は、 B A G 3 が、細胞状況に応じて I K K 、 B a x または B R A F などのアボトーシス調節タンパク質のレベルまたは局在化を、 H s p 7 0 依存または非依存様式のいずれかにより調節することによって、細胞生存の維持において役割を有することを示している。30

【0003】

B A G 3 タンパク質は、心筋芽細胞 ( c a r d i o m y o b l a s t ) 分化の際に発現し、ミオゲニン発現を維持すると思われる。これらの知見は、後期心臓発生における B A G 3 の関与を示している ( 非特許文献 2 参照 ) 。さらに、心筋細胞における B A G 3 は、 Z 板に局在化して、アクチンキャッピングタンパク質 C a p Z 1 と相互作用すること、筋原線維構造を安定化すること、および機械的ストレスの間、筋原線維の完全性をおそらく保存することを示している。 B A G 3 突然変異は、 Z 板会合を損ない、ストレス誘発性40

50

アポトーシスに対する感受性を増加する可能性がある。心筋細胞における、一般には筋肉細胞における生存および筋原線維完全性についての B A G 3 の役割を踏まえると、 b a g 3 遺伝子の突然変異は、筋原線維性ミオパチーおよび拡張型心筋症の幾つかの形態と関連している。現在まで、細胞質 B A G 3 および B A G 3 の可溶性セリカル( s e r i c a l ) 形態の両方が、検出されており、異なる病状はもとより、より一般的には細胞生存に関連することが見出されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 4】

【非特許文献 1】 Rosati A , Graziano V , De Laurenzi V , Pascale M , Turco MC . B A G 3 : a multifaceted protein that regulates major cell pathways . Cell Death Dis . 2011 ; 2 : e141 10

【非特許文献 2】 De Marco M , Turco MC , Rosati A . B A G 3 protein is induced during cardiomyoblast differentiation and modulates myogenin expression . Cell Cycle . 2011 ; 10 : 850 - 852

【非特許文献 3】 Menon et al . , BMJ , 337 : a2079 , 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0 0 0 5】

驚くほど特異的であり繊細な方法による侵襲的な診断に関連する欠点を有することなく、そのような病状の迅速な同定を可能にする、および / または病状の早期検出、療法の効果のモニター、合併症の危険性の予測、情報提供性追跡の実施を可能にすることができる、生物学的マーカーの同定についての必要性および重要性が、ますます感じられている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

本発明は、病理学的状態の診断における生化学的マーカーとしての使用のための抗 B A G 3 抗体に関する。

【0 0 0 7】

30

好ましくは、前記抗 B A G 3 抗体は、可溶性 B A G 3 に結合して、免疫複合体を形成する。

【0 0 0 8】

本発明の好ましい実施形態によると、前記診断は、インピトロまたはエキソビオである。

【0 0 0 9】

本発明のさらなる態様は、前記診断の受容個体が、哺乳類、好ましくはヒトであるということである。

【0 0 1 0】

発明を実施するための形態においてさらに記載されているように、本発明の抗 B A G 3 抗体の使用は、心臓疾患、癌、糖尿病、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患からなる群から選択される病理学的状態に特異的であるという利点を有する。

40

【0 0 1 1】

本発明の実施形態によると、前記心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、虚血、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全および医原性心疾患から選択される。

【0 0 1 2】

本発明の別の実施形態によると、前記癌は、肺癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

【0 0 1 3】

50

本発明のさらなる実施形態は、生物学的試料における、抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって、

- a . 血清、血漿、尿または唾液からなる生物学的試料を得るステップと、
  - b . 生物学的試料における抗BAG3またはBAG3関連抗体の存在を決定するステップと
- を含む方法である。

**【0014】**

好ましい実施形態によると、本発明の方法は、

- c . 生物学的試料から得た値を、基準値または健康な提供者から得た値と比較する追加のステップをさらに含む。

10

**【0015】**

好ましい実施形態において、前記決定ステップbは、ELISA検査により実施される。

**【0016】**

本発明の好ましい実施形態によると、前記血清、血漿、尿または唾液は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

**【0017】**

本発明の方法における好ましい実施形態によると、前記抗BAG3抗体または前記免疫複合体の存在は、病態に関連する。

20

**【0018】**

好ましくは、前記病態は、心臓疾患、癌、糖尿病、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患からなる群から選択される。

**【0019】**

好ましくは、前記心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、心不全、虚血、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全および医原性心疾患から選択される。

**【0020】**

本発明の好ましい実施形態によると、前記癌は、肺癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

**【0021】**

30

本発明のさらなる実施形態は、BAG3組換えタンパク質または可溶性BAG3を捕捉するBAG3特異的マウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2、AC-3、AC-4、AC-5、AC-rb1a、AC-rb1b、AC-rb2a、AC-rb2b、AC-rb3a、AC-rb3b、AC-rb4aおよびAC-rb4bと、ヒト免疫グロブリンを認識することができる抗体とを含むELISAキット、ならびに生物学的試料における抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体の検出のためのその使用である。

**【0022】**

好ましくは、前記生物学的試料は、血清、血漿、尿または唾液試料である。

**【0023】**

40

本発明の好ましい実施形態において、前記血清、血漿、尿または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

**【0024】**

本発明は、生物学的試料中のBAG3タンパク質の検出のための免疫組織化学(IHC)キットになおさらに関し、ここで前記生物学的試料は、好ましくは、BAG3特異的抗体および染色に必要なプローブを含む試薬を含む組織試料である。

**【図面の簡単な説明】**

**【0025】**

本発明の特徴および利点は、下記に報告されている発明を実施するための形態、例示および非限定目的のために提示されている実施例、ならびに添付した図1～10によって明

50

らかとなる。

【図1A】培養した心筋細胞の上清におけるBAG3タンパク質の検出を示す図である。80%集密度のヒト(HCMa)およびラット(H9c2)心筋細胞を、10%のFABと共に、または伴わず、5%のCO<sub>2</sub>分霧圏気により37℃で16時間インキュベートした。上清を、50mMのNaClおよび0.05%のIGEPALを含有する緩衝液で透析し、凍結乾燥し、1mlのRIPA緩衝液(50mLのTrisHCl pH7.6、150mMの塩化ナトリウム、2mMのオルトバナジン酸ナトリウム、4mMのEDTA、10mMのピロリン酸ナトリウム、1%のNP-40、0.1%のデオキシオコール酸ナトリウム)に再懸濁し、ウエスタンプロットにより抗BAG3または抗GAPDH抗体を用いて分析した。10

【図1B】開口放出小胞におけるBAG3タンパク質の検出を示す図である。H9c2細胞から得た上清を、連続遠心分離：(i)細胞除去のために2,000×gで15分間、(ii)細胞片の除去のために10,000×gで30分間、(iii)開口放出小胞のペレット化のために150,000×gで90分間、に付した。ペレットをPBS中に150,000×gにより90分間で1回洗浄し、ウエスタンプロットにより、抗BAG3 TOS-2ポリクローナル抗体を用いて総細胞溶解産物と比較して分析した。Rab-4を開口放出小胞のマーカーとして分析した。細胞質タンパク質であるGAPDHを、対照として分析した。

【図1C】2人の健康な提供者および2人の慢性心不全を罹患している患者由来の血清を、ウエスタンプロットにより抗BAG3抗体TOS-2ポリクローナル抗体を用いて分析したことを示す図である。20

【図1D】2人の慢性心不全を罹患している患者から得たバンドをゲルから切り取り、その同一性を、プログラムMASCOTを使用して質量分析により分析したことを示す図である。

【図2A】CHF患者の血清におけるBAG3タンパク質の検出を示す図である。HCMa細胞のBAG3組換えタンパク質および総細胞溶解産物を、心不全の患者から得た血清(1:40)を用いて、ウエスタンプロットにより分析した。健康な提供者由来の血清での分析は、陰性対照として実施した。

【図2B】ELISA検査による抗BAG3抗体の検出を示す図である。50人のCHF患者(駆出率<60%)の血清を、特異的ELISA検査により抗BAG3抗体の存在について50人の健康な提供者由来の血清と比較した。結果を任意単位としてプロットする。30

【図2C】ELISA検査結果のROC分析を示す図である。任意単位0.083でのカットオフは、74%の感受性および68%の特異性をもたらす。

【図3A】HCMa細胞(a、b、c)およびJ774A1細胞(d、e、f、g、h、i)へのrBAG3-FITC結合の検出のために実施された直接蛍光の共焦点顕微鏡法分析を示す図である。BAG3組換えタンパク質および精製BSA(SIGMAから購入したウシ血清のアルブミン)を、製造会社の説明書に従って、SIGMAから購入したFluoroTag FITC Conjugation Kitを使用してFITCにコンジュゲートした。製造会社の説明書に従って計算した等量のrBAG3-FITC(b、e)およびBSA-FITC(h)タンパク質を、0.1%のNaN<sub>3</sub>を有するHCMおよびJ774A1培養培地に1時間加えた。-インテグリンを対照として分析した(a、d、g)。細胞をZeiss LSM共焦点顕微鏡により分析した。統合画像をc、fおよびiに示す。40

【図3B】BAG3はマクロファージに結合することを示す図である。J774A1マクロファージ(1×10<sup>6</sup>個の細胞/ml)を、異なる濃度のFITC-BAG3タンパク質(7、14および70nM)と共にインキュベートした。FITC-BSA(70nM)を陰性対照(灰色)として使用した。細胞の蛍光を、フローサイトメトリーにより分析した。

【図3Ca】BAG3と共にインキュベートしたJ774A1マクロファージのCo-50

2およびiNOSレベルの分析を示す図である。集密度80%のJ774A1細胞を、対照培地、BSA、LPSまたはrBAG3と共に20時間インキュベートした。ポリミキシンを、示された場所に添加して、大腸菌(E. coli)に由来するrBAG3の効果が、汚染内毒素の存在と無関係であることを確認した。Cox-2およびiNOS発現を、ウエスタンプロットにより細胞溶解産物において分析した。

【図3Cb】BAG3と共にインキュベートしたJ774A1マクロファージの亜硝酸塩放出の分析を示す図である。集密度80%のJ774A1細胞を、対照培地、BSA、LPSまたはrBAG3と共に24時間インキュベートした。各試料の100μlの上清を、100μlのグリース試薬と共にインキュベートし、550nmでの光学密度(OD550)をBeckman DU62分光光度計により測定した。亜硝酸塩濃度は、試料のOD550を亜硝酸ナトリウムの標準曲線と比較することによって評価した。  
10

【図3Cc】BAG3と共にインキュベートしたJ774A1マクロファージのIL-6放出の分析を示す図である。集密度80%のJ774A1細胞のマクロファージを、対照培地、BSA、LPSまたは組換えBAG3と共に5時間インキュベートした。BAG3ペプチド(ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3、ペプチド4またはスクランブルペプチド(scrambled peptide))の625nMを、示された場所に加えて、BAG3活性を遮断するこれらの能力を確認した。IL-6産生は、ELISA検査を使用して細胞培養培地において測定した。IL-6濃度は、試料のODを組換えIL-6の標準曲線と比較することによって評価した。

【図4A】正常な臍臓組織におけるモノクローナル抗BAG3抗体AC-1の使用によるBAG3染色の代表的な画像である。切片をヘマトキシリンで対比染色した。染色は、ランゲルハンス島の中程度の陽性を明らかにしたが、正常な臍管および臍腺房細胞は、BAG3発現を有さなかった。  
20

【図4B】ビオチン化二次抗体により現れたモノクローナル抗BAG3抗体の使用により染色した、BAG3低陽性およびBAG3高陽性腫瘍試料の代表的な画像である。切片をヘマトキシリンで対比染色した。2つの異なる倍率が示されている。100×(左側パネル)および400×(右側パネル)。本発明者らは、400×倍率を使用して、10個の非重複視野において総癌細胞に対する陽性細胞の数を計数することにより、試料中の陽性癌細胞の割合に基づいてスコアを指定した。記載されたように計算したBAG3陽性細胞の割合の中央値は、40%であり、この値を、低および高陽性試料を分けるカットオフとして使用した。  
30

【図4C】低BAG3染色(陽性細胞40%)を有する39人の患者および高BAG染色(陽性細胞>40%)を有する27人の患者を比較して作製した生存曲線を示す図である。分析した全ての患者は、臍臓腺癌のRO切除を受けた。生存中央値は、高陽性群の12か月から低陽性群の23か月に増加した。ログランク検定p値=0.0013。

【図5】数人の関節リウマチ由来の滑膜組織におけるBAG3染色の代表的な画像である。BAG3陽性は、滑膜線維芽細胞および炎症性浸潤において観察される。切片をヘマトキシリンで対比染色した。

【図6】腫瘍細胞の細胞質におけるBAG3に陰性をもたらした正常な膀胱および高い陽性をもたらした移行細胞膀胱癌によるBAG3染色の代表的な画像である。切片をヘマトキシリンで対比染色した。  
40

【図7A】qRT-PCRにより評価されるbag3 mRNA相対的発現を示すグラフであり、値は、平均±SDで報告されている。青色線は、計算された中央値を表す。

【図7B】qRT-PCRにより分析された全ての患者において行った生存分析を示す図である。高いbag3発現を有する13人の患者は、低いbag3発現を有する12人の患者(生存中央値=32.0か月)と比較して、短い生存(生存中央値=19.0か月)を有した。ログランク検定p値=0.0198。

【図8A】臍癌細胞系(PSN1、Capan-1、AsPC-1、PANC-1およびMIA PaCa-2)を、グラフにより示されているように異なる濃度のゲムシタピンで処理したことを示す図である。48時間後、アポトーシス細胞死を分析した。グラフは  
50

、サブG0/G1細胞(±S.D.)の割合の平均値を描いている。データは、3つの独立した実験の代表値である。

【図8B】膵癌細胞系におけるBAG3のウエスタンプロット分析を示す図であり、GAPDHハウスキーピングタンパク質含有量を、等しい負荷状態をモニターするために使用した。

【図8C】MIA PaCa-2およびPANC-1細胞系を、2μMのゲムシタビン(GEM)により指定された時間にわたって処理したことを示す図である。BAG3タンパク質発現レベルを、ウエスタンプロットによりモニターした。

【図8D】bag3 mRNAレベルをRT-PCRにより分析したことを示す図であり、グラフは、相対的なbag3 mRNAレベル(±S.D.)を描き、データは、3つの独立した実験の代表値である。  
10

【図8E】MIA PaCa-2およびPANC-1細胞系を、BAG3 siRNAまたは非標的化siRNA(NT siRNA)により72時間かけて形質移入し、次に2μMのゲムシタビン(GEM)により24時間処理したことを示す図である。BAG3レベルをウエスタンプロットにより分析し、GAPDHレベルを、等しい負荷状態をモニターするために検出した。

【図8F】MIA PaCa-2およびPANC-1細胞を上記に記載されたように形質移入し、2μMのゲムシタビン(GEM)により24時間または48時間処理したことを示す図である。アポトーシス細胞死を記載されたように分析した。グラフは、サブG0/G1細胞(±S.D.)の割合の平均値を描いている。データは、3つの独立した実験の代表値である。  
20

【図9A】ELISA検査によるBAG3特異的免疫複合体の検出である。55人の膵臓腺癌患者由来の血清を、特異的ELISA検査によりBAG3特異的免疫複合体の存在について、51人の健康な提供者由来の血清と比較したことを示す図である。結果を任意単位±S.E.としてプロットする。

【図9B】ELISA検査結果のROC分析を示す図である。任意単位0.183でのカットオフは、65%の感受性および78%の特異性をもたらす。

【図10】膵臓腺癌の0~1年の前診断を有する49人の女性対象由来の患者血清におけるBAG3特異的抗体の検出を、特異的ELISA検査により、BAG3特異的抗体の存在について235人の女性対照対象由来の血清と比較した図である。対照血清は、各症例対象に対して約5つあり、年齢を対応する症例と適合させた。他の時点には、251人の対照と比較した、PDACの1~2年の前診断を有する53人の対象、212人の対照と比較した、PDACの2~3年の前診断を有する44人の対象、187人の対照と比較した、PDACの3~4年の前診断を有する42人の対象が含まれた。  
30

#### 【0026】

結果を任意単位としてプロットする。±S.P.値は、スチュードントt検定により計算した。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0027】

本発明は、病理学的状態の診断における生化学的マーカーとしての使用のための抗BAG3抗体に関する。  
40

#### 【0028】

本発明における用語「診断」では、本発明者らは、ありうる疾患または障害を決定または同定することを試みる過程を意味する医療診断(多くの場合に単に診断と呼ばれる)を意味する。本発明の診断は、早期診断も包含する。

#### 【0029】

用語「早期診断」では、本発明者らは、特異的または非特異的症状の前に病理学的状態を決定する検査能力を意味する。

#### 【0030】

抗BAG3抗体は、現在、好都合なことに血清、血漿、尿または唾液において検出され  
50

ている。現在まで、そのような抗体は、生理学的状態または病態のいずれにおいても血清中に見出されていない。血清における抗BAG3抗体の検出は、診断、早期診断および予後の目的で利用される迅速な非侵襲的技術、危険性層別化、同定のため、および療法のモニタリングのためのツールとしての利点を有する。

【0031】

抗体の検出のさらなる利点は、検出のために非常に少量の血清が必要であることである。事実、可溶性BAG3タンパク質も、幾つかの病状に罹患している患者の血清において検出されうるが、可溶性タンパク質の検出に必要な血清の量は、抗体の検出に必要な量よりもはるかに多い。さらに、可溶性BAG3タンパク質レベルは、抗体のレベルよりもはるかに低いことがありうる、ならびに／または可溶性BAG3タンパク質に関して、抗体は、特異的病状の初期相において検出可能でありうる、および／もしくは合併症の危険性をより効率的に予測しうる、もしくは療法の効果をモニターしうることが可能である。10

【0032】

本発明のさらなる実施形態は、抗BAG3抗体が、血清、血漿、尿または唾液から選択される異なる生物学的試料において都合よく検出されうることである。

【0033】

本発明において、血清とは、血球でもなく凝固因子でもない血液の成分が意図され、線維素原が除去された血漿である。血清は、凝血（凝固）に使用されない全てのタンパク質、全ての電解質、抗体、抗原、ホルモンおよび任意の外来性物質を含む。

【0034】

本発明において、血漿とは、通常は全血中に血球を懸濁して保持する血液のわら色／淡黄色液体成分が意図される。線維素原などの凝固因子を含有する。20

【0035】

さらなる実施形態において、本発明は、生化学的マーカーとしての抗BAG3抗体の使用を提供し、抗BAG3抗体は、可溶性BAG3と結合して、免疫複合体を形成する。

【0036】

遊離している、または可溶性BAG3と結合して免疫複合体を形成する抗BAG3抗体は、現在、生物学的条件下で都合よく検出されており、病態の診断にマーカーとして使用することができる。生物学的試料におけるそのような抗体および／または免疫複合体の検出も、診断および／または予後の目的の迅速な非侵襲的技術としての利点を有する。30

【0037】

本発明の好ましい実施形態によると、診断は、インビボまたはエキソビボである。

【0038】

本発明のさらなる実施形態は、診断の受容個体が、哺乳類、好ましくはヒトであるということである。

【0039】

本発明において、免疫複合体またはタンパク質／抗体複合体は、可溶性抗原への抗体の一体型結合が意図され、結合した抗原は、特異的エピトープとして作用し、抗体と結合したもののは、単一免疫複合体と呼ばれる。

【0040】

そのような免疫複合体は、同様に非常に少量の血清が免疫複合体の検出のために必要であるので、抗体の検出において見られる同じ利点を有する。可溶性BAG3の検出に必要な血清の量も、タンパク質／抗体（免疫）複合体の検出に必要な量よりもはるかに多い。免疫複合体、ならびに遊離抗体は、特異的病状の初期相において検出可能であり、合併症の危険性をより効率的に予測する、または療法の効果をモニターすることができる。40

【0041】

本発明のなおさらなる実施形態は、病理学的状態の生物学的マーカーとしての抗BAG3抗体または免疫複合体（可溶性BAG3と結合した抗BAG3抗体により形成される）の使用であり、病理学的状態は、心臓疾患、癌、糖尿病、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患である。50

**【 0 0 4 2 】**

好ましくは、心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、虚血、心筋梗塞、心不全、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全および医原性心疾患からなる群から選択される。

**【 0 0 4 3 】**

本発明の好ましい実施形態によると、癌は、肺癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

**【 0 0 4 4 】**

本発明のさらなる実施形態は、生物学的試料における、抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体が可溶性 B A G 3 に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって、

- a . 血清、血漿、尿または唾液からなる生物学的試料を得るステップと、  
b . 生物学的試料における抗 B A G 3 または B A G 3 関連抗体の存在を決定するステップと  
を含む方法である。

**【 0 0 4 5 】**

本発明による方法は、健康な個人と B A G 3 関連病状に罹患している患者との間の抗 B A G 3 抗体および / または B A G 3 / 抗体複合体の有意な差を検出できるという利点を有する。提案されたアッセイ方法は、心臓病患者の群と健康な人の群との統計的に有意な分離を可能にする。危険性が増加した患者の下位集団において、心臓疾患有するような患者（心不全、H F ）を層別化することもできる。

**【 0 0 4 6 】**

なおさらなる態様において、本発明は、生物学的試料における抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体が可溶性 B A G 3 に結合して形成された免疫複合体の存在を検出する方法であって、

c . 生物学的試料から得た値を、基準値または健康な提供者から得た値と比較するステップ  
をさらに含む。

**【 0 0 4 7 】**

好ましい態様において、本発明による方法は、決定ステップ b が E L I S A 検査により実施される方法である。

**【 0 0 4 8 】**

本発明の方法の好ましい実施形態によると、血清、血漿、尿または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

**【 0 0 4 9 】**

本発明による方法は、病状、疾患および / またはこれらの合併症の危険性、ならびに療法のモニタリングの評価を可能にする生物学的マーカーの、迅速な非侵襲的検出を可能にする利点を有する。

**【 0 0 5 0 】**

さらなる態様によると、本発明は、抗 B A G 3 抗体または抗 B A G 3 抗体が可溶性 B A G 3 に結合して形成された免疫複合体の存在が病態と関連する、検出方法に関する。

**【 0 0 5 1 】**

好ましい実施形態において、病態は、心臓疾患、癌、糖尿病、ならびに、炎症および炎症性関連疾患であって、皮膚、神経、骨、血管および結合組織の炎症および炎症性関連疾患からなる群から選択される。特に、心臓疾患は、狭心症、梗塞前狭心症、心筋梗塞、虚血、心不全、急性冠疾患、急性心不全、慢性心不全または医原性心疾患からなる群から選択される。

**【 0 0 5 2 】**

本発明の好ましい実施形態によると、癌は、肺癌、膀胱癌および前立腺癌から選択される。

**【 0 0 5 3 】**

10

20

30

40

50

本発明は、さらに、生物学的試料における、抗BAG3抗体または抗BAG3抗体が可溶性BAG3に結合して形成された免疫複合体を検出するELISAキットに関する。

【0054】

本発明によるELISAキットは、抗BAG3抗体を捕捉するBAG3組換えタンパク質または可溶性BAG3を捕捉するBAG3特異的マウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2、AC-3、AC-4、AC-5、AC-rb1a、AC-rb1b、AC-rb2a、AC-rb2b、AC-rb3a、AC-rb3b、AC-rb4aおよびAC-rb4bならびにヒト免疫グロブリンを認識することができる抗体を含む。

【0055】

そのような抗体は、ヒト免疫グロブリンを認識することができる酵素結合抗体である。

【0056】

本発明は、また、生物学的試料におけるBAG3関連抗体を検出するためのキットに関し、可溶性BAG3を捕捉するBAG3特異的マウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2、AC-3、AC-4、AC-5、AC-rb1a、AC-rb1b、AC-rb2a、AC-rb2b、AC-rb3a、AC-rb3b、AC-rb4およびAC-rb4bならびにヒト免疫グロブリンを認識することができる検出用の酵素結合抗体を用いるELISAにより実施される。

【0057】

好ましくは、生物学的試料は、血清、血漿、尿または唾液試料である。

【0058】

本発明の好ましい実施形態において、血清、血漿、尿または唾液試料は、哺乳類、好ましくはヒト由来である。

【0059】

本発明は、さらに生物学的試料中のBAG3タンパク質の検出のための免疫組織化学(IHC)キットに関連し、前記生物学的試料は、好ましくは組織試料である。組織試料は、生検、凍結組織、パラフィン埋め込み組織でありうる。

【0060】

本発明によるIHCキットは、BAG3特異的抗体および染色に必要なプローブを含む試薬を含む。

【0061】

BAG3特異的抗体は、マウス免疫グロブリンを認識することができる検出用のマウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2およびAC-3、ならびに／または酵素結合抗体でありうる。

【0062】

特に、IHCキットは、有利には、脾臓切除を受けた患者の脾癌組織試料の100%にあり、かつ大部分の膀胱癌試料に発現しているBAG3タンパク質を明らかにすることができます。さらに、BAG3タンパク質を、ラングルハンス島の正常な脾臓組織におけるIHCによるBAG3検出用キットによっても明らかにすることができます。一方、他の正常組織は、陰性である(例えば、正常な膀胱)。BAG3陽性は、関節リウマチ組織試料の滑膜線維芽細胞および炎症性浸潤においても観察されうる。

【0063】

PDACにより影響を受ける患者の長期生存は、非常に不十分であり、約4%の患者のみが、診断の5年後に生存している。事実、外科的切除が、現在、治癒の唯一の機会であるが、およそ20%の患者のみが切除可能な疾患を診断され、さらに、そのような患者の下位集団の大きな割合(約80%)において、転移過程がすでに診断時に生じており、事実、遠位転移が外科的切除後に現れる。したがって、本発明者らは、脾癌の発生の初期段階をより良く理解し、これらの検出を可能にしうる分子を同定する必要性がある。また、より良好な予後を可能にすること、および療法の選択を助けることができるマーカーが、大いに求められている。

10

20

30

40

50

## 【0064】

有利なことに、BAG3 IHCキットは、PDAC患者の予後の同定を可能にする。IHCにより同定されたBAG3発現の強度は、患者の生存と相関することが分かった。したがって、これを予後のため、および療法の選択を行うことのための両方に使用することができる。

## 【0065】

本発明のさらなる態様は、増幅プライマーのセットを含む、生物学的試料におけるBAG3遺伝子発現を検出するためのキットである。好ましくは、増幅プライマーは、定量的リアルタイムRT-PCRによる検出に適している。

## 【0066】

下記に記載され、配列番号1から配列番号10により同定されているプライマーセット1から5の特異的プライマー<sub>b a g 3</sub>プライマーは、定量的リアルタイムPCRによるBAG3発現の検出および定量化を可能にする。

10

## 【0067】

## プライマーセット1

順方向：配列番号1：AACGGTGACCGGCGACCCCTTT

逆方向：配列番号2：CCTTCCCTAGCAGGGCGGCAG

## プライマーセット2

順方向：配列番号3：CCGGCTGGCCCCCTTCTTCGTG

逆方向：配列番号4：CAGCCTAGAGCCCCCTCCCGGG

20

## プライマーセット3

順方向：配列番号5：GTCACCTCTGCGGGGCATGC

逆方向：配列番号6：GGTGACTGCCAGGCTGCTC

## プライマーセット4

順方向：配列番号7：CCAGCCTCCCCACGGACCTGA

逆方向：配列番号8：CTGGTGACTGCCAGGCTGCG

## プライマーセット5

順方向：配列番号9：CAGGAGCAGCACGCCACTCC

逆方向：配列番号10：TGGTCCAAC TG GGCCTGGCT

生物学的試料における<sub>b a g 3</sub>mRNA検出用のRT-PCRキットは、<sub>b a g 3</sub>遺伝子発現のレベルを、患者の生存と相関させることができ、予後および療法の選択に使用することができる。好ましくは、生物学的試料は、組織試料である。

30

## 【0068】

本発明のさらなる態様は、マクロファージ活性を遮断することができ、したがってマクロファージ活性化を伴う炎症性、腫瘍学的または他の疾患の療法に使用されうる、BAG3タンパク質に特異的なアミノ酸配列に対応する抗BAG3モノクローナル抗体、これらのフラグメントおよびペプチドによって表される。特に図3および表1を参照されたい。本発明は、BAG3特異的マウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2およびAC-3、もしくはF(ab)、F(ab')2、F(ab)として修飾されたもの、もしくはヒト化されたもの、または可溶性BAG3の作用に結合することができる、および/もしくは可溶性BAG3の作用を遮断することができる分子としての、以下の配列を含むペプチド：

40

ペプチド1：DRDPLPPGWEIKIDPQ（配列番号11）

ペプチド2：SSPKSVATEERAAPS（配列番号12）

ペプチド3：DKGKKNAGNAEDPHT（配列番号13）

ペプチド4：NPSSMTDTPGNPAAAP（配列番号14）

の使用に関する。

## 【0069】

## [実施例]

## (実施例1)

50

培養ヒト一次心筋細胞およびラット心筋細胞細胞系 H 9 c 2 における血清枯渇誘発性ストレス

心筋細胞は、ストレス性作用物質に対する応答を開始する保護因子を放出することが知られている。H s p 7 0 、 H p 2 7 、 H s p 9 0 および他などのストレス誘発性タンパク質は、細胞内活性を発揮するが、ストレスに応答して分泌もされうるので、心筋細胞による B A G 3 放出を、ストレス条件下で分析した。この目的のため、培養ヒト一次心筋細胞またはラット心筋細胞細胞系 H 9 c 2 における血清枯渇誘発性ストレスの作用を分析した。図 1 に示されているように、本発明者らは、血清枯渇に 16 時間曝露された心筋細胞の上清に B A G 3 タンパク質を検出することができた（図 1 A ）。この時点で、細胞生存は、血清枯渇により影響を受けなかったので（結果は示されず）、B A G 3 放出が細胞壊死に起因するという仮説を放棄した。したがって本発明者らは、B A G 3 が開口放出小胞に存在するかを確認した。事実、分画遠心分離手順（ 16 ）を介して細胞外小胞を単離することによって、これらが B A G 3 タンパク質を含有することを見出した（図 1 B ）。

#### 【 0 0 7 0 】

B A G 3 の可溶形態の存在をさらに確認するため、慢性心疾患（ C H F ）に罹患している患者由来の 2 つの血清におけるその存在を調査した。ウエスタンプロット分析を介して、抗 B A G 3 抗体により認識されたバンドを同定することができた。バンドを切り取り、質量分析に付し、その同一性を確認した（図 1 C ）。この証拠は、タンパク質が細胞外形態で検出されうることを確認した。健康な提供者由来の血清では、タンパク質を検出することができなかった（図 1 C ）。

#### 【 0 0 7 1 】

全 B A G タンパク質配列に対する質量分析により認識され、適合されたペプチドを太字で示す。

#### 【 0 0 7 2 】

```

MSAATHSPMM QVASGNGDRD PLPPGWEIKI DPQTGWPFFV
DHNSRTTTWN DPRVPSEGPK ETPSSANGPS REGSRLPPAR
EGHPVYPQLR PGYIPIPVLH EGAENRQVHP FHVYPQPQGMQ
RFRTEAAAAA PQRSQSPLRG MPETTQPDKQ CGQVAAAAAA
QPPASHGPER SQSPAASDCS SSSSSASLPS SGRSSLGSHQ
LPRGYISIPV IHEQNVTTRPA AQPSFHQAQK THYPAQQGEY
QTHQPVYHKI QGDDWEPRPL RAASPFRSSV QGASSREGSP
ARSSTPLHSP SPIRVHTVVD RPQQPMTHRE TAPVSQOPENK
PESKPGPVGP ELPPGHIPIQ VIRKEVDSKP VSQKPPPPSE
KVEVKVPPAP VPCPPPSPGP SAVPSSPKSV ATEERAAPST
APAEATPPKP GEAEAPPKHP GVLKVEAILE KVQGLEQAVD
NFEGKKTDKK YLMIEEYLTQ ELLALDSVDP EGRADVRQAR
RDGVRKVQTI LEKLEQKAID VPGQVQVYEL QPSNLEADQP
LQAIMEMGAV AADKGKKNAG NAEDPHTETO QPEATAAATS
NPSSMTDTPG NPAAP

```

#### 【 0 0 7 3 】

(配列番号 15 )。

#### 【 0 0 7 4 】

ヒト B A G 3 タンパク質は、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する。

#### 【 0 0 7 5 】

( 実施例 2 )

C H F 患者の血清における抗 B A G 3 抗体

10

20

30

40

50

本発明者らは、C H F 患者の血清が、二次抗体として抗ヒト g G を使用したウエスタンプロットにより B A G 3 タンパク質を認識したことを見出した（3つの異なる患者由来の血清を用いた実験の代表的な結果を図 2 A に示す）。この結果は、C H F 患者の血清に抗 B A G 3 抗体の存在を示した。この知見を確認するため、特異的 E L I S A 検査により抗 B A G 3 抗体の存在について 50 人の健康な提供者由来の血清と比較した、50 人の C H F 患者（駆出率 < 60 %）由来の血清を分析した。図 2 B に示されているように、対照血清と比較して有意に高い値の抗 B A G 3 抗体を患者のものにおいて検出した。E L I S A 検査の R O C 分析は、任意単位 0.083 のカットオフを使用して、74 % の感受性および 68 % の特異性をもたらす（図 2 C）。

【0076】

10

（実施例 3）

## マクロファージへの B A G 3 結合

本発明者らは、心筋細胞による B A G 3 放出の機能的有意性について検討した。タンパク質がオートクリン経路に関与しうることを除外し、それは、イソチオシアン酸フルオレセイン（F I T C）コンジュゲート B A G 3 を使用した実験で評価したように、心筋細胞表面に結合しないと思われたからである（図 3 A）。したがって、本発明者らは、B A G 3 が血球と相互作用しうるか調査した。事実、F I T C - B A S G 3 が細胞系 J 774 のマクロファージに結合したことを見出した（図 3 B）。マクロファージへの B A G 3 結合は、競合性 B A G 3 ペプチドにより、または抗 B A G 3 モノクローナル抗体の B A G 3 配列決定 F (a b') 2 フラグメントにより特異的に損なわれた（表 I）。特に、J 774 細胞を、14 nM の F I T C - B A G 3 タンパク質および 625 nM の B A G 3 ペプチド（ペプチド 1、ペプチド 2、ペプチド 3、ペプチド 4 もしくはスクランブルペプチド）と共に、または抗 B A G 3 モノクローナルおよびポリクローナル抗体（マウスモノクローナル A C 1、A C 2 およびウサギポリクローナル T O S 2）の 420 nM の F (a b') 2 フラグメントと共にインキュベートした。マウス I g G の F (a b') 2 フラグメントまたはウサギ I g G の F (a b') 2 フラグメントを陰性対照として使用した。

20

【0077】

【表 1】

表 I

30

	FITC-rBAG3	FITC-BSA	競合アッセイ	
	陽性細胞% (±S. D.)	陽性細胞% (±S. D.)	陽性細胞% (±S. D.)	阻害%
FITC-rBAG3	15.7 (±0.45)			
FITC-BSA		4.04 (±0.06)		
(FITC-rBAG3) - (FITC-BSA)	11.06 (±0.45)			
FITC-rBAG3 + Pep1			0.18 (±0.05)	98.4
FITC-rBAG3 + Pep2			1.21 (±0.63)	89.1
FITC-rBAG3 + Pep3			5.86 (±0.43)	47.2
FITC-rBAG3 + Pep4			0.68 (±0.20)	93.8
FITC-rBAG3 + Pep Scr			12.1 (±0.21)	0.0
FITC-rBAG3 + マウス IgG F(ab')2			12.3 (±0.40)	0.0
FITC-rBAG3 + ウサギ IgG F(ab')2			14.7 (±0.20)	0.0
FITC-rBAG3 + AC1 IgG F(ab')2			4.11 (±0.26)	62.8
FITC-rBAG3 + AC2 IgG F(ab')2			3.76 (±0.43)	66.0
FITC-rBAG3 + TOS2 IgG F(ab')2			3.19 (±0.21)	71.1

40

50

## 【0078】

マクロファージへのBAG3結合の機能的意義を探求するため、細胞における誘発性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)およびシクロオキシゲナーゼ(Cox)-2に発現に対する組換えBAG3の効果を試験した。図3C aに示されているように、これらの酵素のレベルは、BAG3処理マクロファージにおいて増強された。さらに、BAG3は、亜硝酸塩およびインターロイキン(IL)-6の放出を誘発し(図3C bおよびc)、マクロファージが、タンパク質へのこれらの結合に応答して活性化されたことが確認された。

## 【0079】

CHF患者の血清において、有意な量の抗BAG3抗体を検出することができた(図2A、B)自己抗体産生は、例えば、抗トロボニン自己抗体を産生する慢性虚血患者において生じるよう、正常な細胞内タンパク質の細胞外放出に関係する可能性がある。CHF患者の血清における抗BAG3抗体のELISA値は、健康な対照の血清において検出されるものより有意に高い。

10

## 【0080】

したがって、ELISAにより検出される抗BAG3抗体の産生は、慢性心不全のバイオマーカーであると思われる。危険性層別化および療法のモニタリングにおける有用性は、調査する価値がある。ストレスを受けた心筋細胞によるBAG3放出、続くマクロファージの活性化は、NOの局所放出をもたらし、心臓虚血の保護回路を構成しうる。事実、血管拡張、血管新生および再構築が標的になりうる。BAG3放出およびその一過性または慢性の効果は調査に値し、虚血および他の心臓ストレス状態の理解に寄与しうる。

20

## 【0081】

さらに、BAG3特異的マウスモノクローナル抗体AC-1、AC-2およびAC-3、および/もしくは他、またはF(ab)、F(ab')2、F(ab)として修飾されたもの、またはヒト化されたもの、または配列ペプチド1から4および/もしくは他を含むペプチドは、マクロファージ活性化を伴う炎症性、腫瘍学的または他の疾患の療法に使用される可溶性BAG3の作用に結合することができる、および/または可溶性BAGの作用を遮断することができる分子である。

## 【0082】

## (実施例4)

## 免疫組織化学によるPDAcにおけるBAG3発現

30

本発明者らは、抗BAG3モノクローナル抗体を含み、かつ免疫組織化学(IHC)によりBAG3タンパク質を検出することができる、免疫組織化学キット(IHC)を開発した。このキットは、分析した346全て(100%)のPDAc生検において、BAG3発現を明らかにした。BAG3染色は、ランゲルハンス島の中程度の陽性を明らかにしたが、正常な臍管および臍腺房細胞は、BAG3発現を有さなかった。このことは、正常な臍臓および腫瘍塊に隣接した非新生物臍臓組織のどちらにもあてはまった。BAG3染色は、腫瘍細胞の細胞質において主に観察された。BAG3染色の強度は、陽性癌細胞の数と同様に様々であった。さらに、ランゲルハンス島は、陽性であり、IHCの良好な内部対照を構成した(図4A)。したがって、キットはIHCによるPDAcにおけるBAG3タンパク質の検出を可能にする。さらに、他の腫瘍または正常な組織においても、IHCによるBAG3タンパク質の検出を可能にする。

40

## 【0083】

本発明者らは、患者の生存および療法への応答と相關するBAG3の発現についても調査した。免疫組織化学により分析された全ての腫瘍試料のデータおよび生存データにより分析されたR0患者の下位集団のデータを記載する、同じ数の患者由来の346のPDAc試料のコホートを分析した(表II)；本発明者らは、400×倍率を使用して、10個の非重複視野において総癌細胞に対する陽性細胞の数を計数することにより、試料中の陽性癌細胞の割合に基づいてスコアを指定した。

## 【0084】

## 【表2】

表II

合 計 数	平均 年齢 ± S. D.	性別		局所腫瘍病期T(%)				Nodal期N (%)		腫瘍悪性度G (%)		
		男 性	女 性	T1	T2	T3	T4	N0	N1	G1	G2	G3
PDAC患者デ ータ	346	63.0± 10.5	181 165	5 (1.4)	59 (17.1 )	264 (76.3 )	18 (5.2 )	130 (37.6 )	216 (62.4 )	16 (4.6 )	177 (51.2 )	153 (44.2 )
生存データ を有するPD AC患者	66	61.9± 11.3	36 30	0 (0.0)	1 (1.5)	65 (98.5 )	0 (0.0 )	13 (19.7 )	53 (80.3 )	3 (4.5 )	37 (56.1 )	26 (39.4 )

## 【0085】

記載されたように計算したBAG3陽性細胞の割合の中央値は、40%であり、この値を、低および高陽性試料を分けるカットオフとして使用した。この分類に基づいて、190の患者試料（55%）を低陽性（陽性細胞 40%）と分類し、156（45%）を高陽性（陽性細胞 > 40%）と分類した（図4パネルB）。生存分析は、検査した全ての病変が腫瘍細胞のない切除周縁部を有し（R0）、3.7%のみが遠位臓器に転移の存在を示した、66人の患者のコホートで実施した（表III）。得られたデータは、高BAG3発現を有する患者が、低BAG3発現を有する患者（生存中央値 = 23.0か月）よりも有意に短い生存（生存中央値 = 12.0か月）を有したことを見た（p = 0.0013）（図4、パネルC）。Cox割合分析に基づくと、高BAG3発現は、2倍を越える高さの死亡危険性と関連した（表III）。

## 【0086】

表3】

表III

パラメーター	HR	95% CI	p値
年齢(年齢)	0.99	0.97~1.02	0.601
性別(男性対女性)	0.86	0.48~1.55	0.617
腫瘍悪性度(G2対G1)	0.84	0.24~2.98	0.789
腫瘍悪性度(G3対G1)	1.55	0.45~5.37	0.486
局所腫瘍状態(T3対T2)	2.5	0.30~21.17	0.400
Nodal期(N1対N0)	1.17	0.58~2.37	0.668
BAG3陽性(高対低)	2.7	1.53~4.78	<0.001
事象=66 n=66			

## 【0087】

## (実施例5)

療法に応答するBAG3タンパク質

膵癌の治療のための第一次化学療法は、ゲムシタビンである。療法への応答におけるB

10

20

30

40

50

A G 3 タンパク質の役割を調査するため、本発明者らは、ヒト P D A C 細胞における B A G 3 の下方調節の効果を分析した。細胞に、特異的 s i R N A 標的 b a g 3 m R N A または非特異的 ( N T ) s i R N A を形質移入し、細胞をゲムシタビンにより、指示された時間にわたって処理した。B A G 3 のサイレンシングは、薬剤に応答した細胞アポトーシスを増強した（図 8）。

#### 【 0 0 8 8 】

これらの結果は、膵臓腺癌における B A G 3 タンパク質およびm R N A の過剰発現、ならびに高い発現レベルと、高い死亡の危険性との関係性を実証し、予後および療法の選択に有用なマーカーの役割が B A G 3 に与えられる。さらに、B A G 3 の下方調節が P D A C 細胞のアポトーシスを増強することを示している。試験された全ての病変における広範囲の発現および膵癌細胞生存の維持における関与に起因して、B A G 3 は、P D A C における革新的な療法のための重要な標的を表す。10

#### 【 0 0 8 9 】

##### ( 実施例 6 )

##### 膵癌患者の血清における B A G 3 タンパク質

膵癌患者における広範囲の発現のため、B A G 3 が膵癌患者の血清に存在するかを調査した。事実、B A G 3 は検出可能であることが見出された。抗 B A G 3 抗体も検出可能であったが、B A G 3 と複合して広がっていた。したがって、B A G 3 / 抗体複合体を検出する E L I S A 検査を開発した。51人の健康な提供者および55人のP D A C に罹患している患者の血清を分析した（表 IV）。20

#### 【 0 0 9 0 】

##### 【 表 4 】

表IV

	合計数(TOT)	年齢 (中央値+ s.e.)	男性	女性
健康な提供者	51	58.7 + 1.6	35	16
PDAC患者	55	64.0 + 1.3	30	25

#### 【 0 0 9 1 】

図 9 A に示されているように、免疫複合体（任意単位で測定）は、健康な提供者よりも患者の血清において有意に高かった。さらに、E L I S A 検査のR O C 分析は、任意単位 0 . 1 8 3 のカットオフを使用して 6 5 % の感受性および 7 8 % の特異性をもたらす（図 9 B）。30

#### 【 0 0 9 2 】

##### ( 実施例 7 )

##### 定量的リアルタイム P C R による B A G 3 発現

B A G 3 発現の免疫組織化学データも、25個のP D A C 細胞試料における b a g 3 m R N A レベルの測定を確認した（表 V）。

#### 【 0 0 9 3 】

##### 【 表 5 】

表V

性別	局所腫瘍病期T (%)	Nodal期N (%)		腫瘍悪性度G (%)								
		男性	女性	T1	T2	T3	T4	N0	N1	G1	G2	G3
合計数	平均年齢 + S. D.											
25*	65.4 ± 11.9	21	4	2 (8.0)	3 (12.0)	20 (80.0)	-	6 (24.0)	19 (76.0)	3 (12.5)	13 (54.2)	8 (33.3)

#### 【 0 0 9 4 】

特に、分析時には、25人の患者のうち16人が生存し、一方、9人の患者が膵癌進行のために死亡した。分析した腫瘍における $\text{bag}_3$  mRNAの発現の中央値を、0.0068 ( $Q_1 = 0.004$ ,  $Q_3 = 0.010$ ) に設定した(図7パネルA)。PDAC患者の考慮された人口統計学および臨床的特徴は、全て、 $\text{bag}_3$  mRNAレベルと無関係であった。したがって、生存との相関関係を評価し、PDAC試料における $\text{bag}_3$  発現レベルの中央値を、高 $\text{bag}_3$  発現を有する患者から低い患者を分けるカットオフとして使用した。このようにして、13個の試料(52%)を高 $\text{bag}_3$ 陽性と分類し、12個の試料(48%)を低 $\text{bag}_3$ 陽性と分類した。高BAG3発現を有する患者が、低 $\text{bag}_3$  発現を有する患者(生存中央値 = 32.0か月)よりも短い生存(生存中央値 = 19.0か月)を有した。 $p$ 値 = 0.0198(図7パネルB)。Cox割合分析に基づくと、高 $\text{bag}_3$  発現は、6倍を越える高さの死亡危険性と関連した(単変量: HR = 6.094, 95%CI = 1.105 ~ 33.597,  $p$  = 0.038)。

#### 【0095】

定量的リアルタイムRT-PCRによりBAG3発現を検出する $\text{bag}_3$ プライマー。本発明者らは、 $\text{bag}_3$  mRNA検出および定量化のために特異的プライマーを含有するRT-PCRキットを開発した。

#### 【0096】

##### (実施例8)

本発明者らは、UKCTOCSから派生したプロスペクティブバイオバンク内の症例対照研究セットによるPDACの診断の前に、BAG3抗体レベルを評価した(非特許文献3)。試験コホートの202,000人の閉経後の女性が募集時に一回血清を提供し、50,000人の女性が毎年継続的に血清試料を提供した。任意化後に膵癌を診断された女性を、癌登録データおよび郵送追跡質問表により同定した。

#### 【0097】

PDACが診断された女性では、PDACの診断前の異なる時点での血清試料を得た。対照血清を健康な対象から得て、BAG3抗体力値を、各PDAC症例に対して約5人の対照対象で測定する。さらに対照血清を、対応するPDAC症例と年齢を適合させた対象から得た。この対照血清適合を、各時点を使用した。

#### 【0098】

膵臓腺癌の0~1年の前診断を有する49人の女性対象由来の患者血清におけるBAG3特異的抗体の検出を、特異的ELISA検査により、BAG3特異的抗体の存在について235人の女性対照対象由来の血清と比較した。

#### 【0099】

BAG3抗体濃度を、特異的ELISAアッセイにより検出した。

#### 【0100】

図10に示されているように、BAG3抗体は、対照対象と比べて3~4年の前診断の症例において有意に高かった。

#### 【0101】

他の時点には、251人の対照と比較した、PDACの1~2年の前診断を有する53人の対象、212人の対照と比較した、PDACの2~3年の前診断を有する44人の対象、187人の対照と比較した、PDACの3~4年の前診断を有する42人の対象が含まれた。

#### 【0102】

図10に示されているように、BAG3抗体は、対照対象に関して少なくとも3~4年の前診断の症例において有意に高かった。

#### 【0103】

##### 方法

##### 細胞培養

HCMa(ヒト心筋細胞-成人)を、Science Cell Research Laboratories(San Diego, CA)から購入し、Cardiac Myo

10

20

30

40

50

cyte Medium (CMM、FBS 5%、Cardiac Myocyte Growth Supplement 1%、ペニシリン／ストレプトマイシン溶液1%) (Science Cell Research Laboratories, San Diego, CA) で増殖させた。全ての実験は、低継代細胞培養物により実施した。胎児ラット心筋芽細胞(H9c2系)をAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、10%のウシ胎仔血清(FBS)、100U/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンを補充したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で増殖させた。ネズミ単球マクロファージ細胞系のJ774A.1(ATCC, Manassas, VA, USA)を、10%のウシ胎仔血清(FBS)、25mMのHEPES、2mMのグルタミン、100u/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンを補充したDMEMで増殖させた。  
10

#### 【0104】

膀胱細胞系(MIA PaCa-2、AsPC-1、PSNI、Capan-1およびPANC-1)を、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA,) 細胞バンクから受け取った。MIA PaCa-2細胞を、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)において、10%FBSおよび2.5%のウマ血清を補充して、培養した。AsPC-1およびPSNI細胞を、10%のFBSを補充したRPMI-1640培地で増殖させた。Capan-1を、20%のFBSを含有するRPMI-1640で培養し、一方、PANC-1を、10%のFBSを補充したDMEMで培養した。上記の細胞系のための全ての培地は、Biowhittaker-Lonza(Bergamo, Italy)MediaTech(Manassas, VA)から購入し、100単位のペニシリン/mLおよび2μgのストレプトマイシン/mL(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を補充した。細胞を、5%CO<sub>2</sub>の雰囲気において37℃でインキュベートした。細胞を、Eli Lilly(Sesto Fiorentino, Italy)から提供されたゲムシタビン(2',2'-ジフルオロデオキシシチジン、GEM、Gemzar(登録商標))により示された濃度で処理した。  
20

#### 【0105】

ヒト血清におけるBAG3抗体の解離  
30

血清を、解離緩衝液(1.5%のBSAおよび0.2Mのグリシンアセテートを有するPBS、pH2.5)により1:40に希釈して、500μlの最終容量にし、室温で20分間インキュベートした。次に血清をMicrocon遠心分離フィルター装置YM-100(100,000MWカットオフ; Millipore, Billerica, MA, USA)の試料レザバーにピペットで移し、14,100rpmにより室温で20分間遠心分離した。次に試料レザバーをフロースルーから取り外し、第2の管に逆向きで配置し、5,000rpmにより室温で3分間遠心分離した。解離した抗体を含有する収集溶液を、1MTris緩衝液、pH9.0によりpH7.0に調整した。濃縮水量を、希釈緩衝液(1.5%のBSAおよび0.1%のTween20を有するPBS)により初期量(500u1)に再構築した。14免疫プロットによるBAG3タンパク質の検出では、解離抗体を、5%のウシ血清アルブミンを含有するTBS-Tにおいて、4℃で一晩かけて1:200に希釈した。  
40

#### 【0106】

ウエスタンプロット分析  
50

細胞を採取し、プロテアーゼインヒビターカクテル(1mMのフッ化フェニルメチルスルホニル、1mg/mlのペプスタチンA、2mg/mlのアプロチニン)を補充した、20mMのHEPES(pH7.5)、150mMのNaCl、0.1%のTriton(TNN緩衝液)を含有する緩衝液において、3サイクルの凍結解凍により溶解した。可溶性タンパク質を10,000gにより15分間遠心分離した後に収集し、これらの量をBradfordアッセイ(Bio-Rad, Hercules, CA)により決定した

。25 µgの総タンパク質および血清試料(PBS-T 0.05%中1:2)を、8%または10%のSDS-PAGEゲルに流し、電気泳動的にニトロセルロース膜に移動させた。ニトロセルロースプロットを、TBS-T緩衝液(20 mMのTris-HCl、pH 7.4、500 mMのNaClおよび0.1%のTween 20)中10%の脱脂粉乳によりブロッキングし、5%のウシ血清アルブミンまたは5%の脱脂粉乳を含有するTBS-T中の一次抗体と共に、4で一晩かけてインキュベートした。免疫反応性を、Pierce(Rockford, IL)から購入したホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体およびAmersham Life Sciences Inc.(Arlington Heights, IL USA)から購入したECL検出試薬を伴う連続インキュベーションにより検出した。

10

#### 【0107】

バンドの走査濃度測定を、Image Scan(SnapScan 1212; Agfa-Gevaert NV)により実施した。各バンドに関連する曲線下の面積を、Gimp 2ソフトウェアの使用により決定した。バックグラウンドを、計算した値から差し引いた。

#### 【0108】

##### 質量分析

タンパク質バンドを切り取り、続いてゲル片をMilli Q水およびアセトニトリルで洗浄し、タンパク質をShevchenkoプロトコールに記載されているようにin situで消化した。簡潔には、ゲル片を1,4-ジチオトレイトール(10 mM)で還元し、ヨードアセトアミド(50 mM)でアルキル化し、次に洗浄し、トリプシン溶液(12 ng / µL)により氷上で1時間かけて再水和した。30 µLの重炭酸アンモニウム(10 mM、pH 7.5)を加えた後、試料を25で一晩かけて消化した。5 µLの得られたペプチド混合物を、Nano Acuity LC system(Waters Corp. Manchester, United Kingdom)に注入した。ペプチドを1.7 µmのBEH C-18カラム(Waters Corp. Manchester, United Kingdom)により200 nL/分の流速で分離した。勾配(溶液A: 0.1%のギ酸、溶液B: 0.1%のギ酸、100%のACN)は、5%で出発し、55分後に50%のBで終了した。MSおよびMS/MSデータは、Q-TOF Premier質量分析計(Waters Corp., Micromass, Manchester, United Kingdom)を使用して得た。二重および三重に投入したペプチドイオンを、Mass Lynxソフトウェアにより自動的に選択し、フラグメント化した。MSデータを自動的に処理し、データベース検索によるタンパク質同定のピークリストを、Protein Lynxソフトウェアにより作製した。データベース検索は、Swiss Protタンパク質データベースを使用するMASCOTサーバーにより実施した。Swiss Protヒトデータベース(405506配列；146166984残基)を検索し、固定修飾として1つの欠損切断、カルバミドメチル(C)が許容された。ペプチド耐性を60 ppmに設定し、MS/MS耐性を0.8 Daに設定した。

20

#### 【0109】

##### 分画超遠心分離による開口放出小胞の精製

30

H9c2の無血清培地から、4での連続遠心分離(2000 × gで15分間、10,000 × gで30分間)により細胞および大型の壊死組織片を排除した。最初の2つの遠心分離のそれぞれの終了時に、ペレットを廃棄し、上清を次のステップのために保持する。次に最終上清を150,000 × gにより4で90分間超遠心分離して(SW50.1ローターおよびOptima L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulterにより)、エキソソームをペレット化する。ペレットをPBSで洗浄して、汚染タンパク質を排除し、最後に150,000 × gにより4で90分間遠心分離した。16洗浄した後、ペレット(エキソソーム)を20 µLのPBSに再懸濁し、ウエスタンプロットにより、抗BAG3 TOS-2ポリクローナル抗体を用いて総細胞溶解産物と比較して分析した。Rab-4を開口放出小胞のマーカーとして分析した

40

50

。

## 【0110】

## F A C S 分析

r B A G 3 結合 - J 7 7 4 A . 1 細胞を、 P B S 中の 2 % の F B S + 0 . 1 % の N a N 3 により氷上で 15 分間ブロッキングし、異なる濃度の F I T C - r B A G 3 タンパク質 (7、14および70 nM) または 2 % の F B S + 0 . 1 % の N a N 3 を含有する P B S 中の F I T C - B S A (70 nM) と共に、暗黒中において 4 度で 30 分間インキュベートした (2.5%、 $10^5 / 100 \mu\text{l}$ )。P B S により洗浄した後、細胞を P B S + 2 % の F B S + 0 . 1 % の N a N 3 に再懸濁し、 F A C S c a n ( B D B i o s c i e n c e s ) フローサイトメーターにより分析した。

10

## 【0111】

競合 - J 7 7 4 A . 1 細胞 ( $2.5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ ) を、 2 % の F B S + 0 . 1 % の N a N 3 を含有する P B S 中、 625 nM の B A G 3 ペプチド (ペプチド 1、ペプチド 2、ペプチド 3、ペプチド 4 またはスクランブルペプチド) と共に、または 420 nM の抗 B A G 3 モノクローナルおよびポリクローナル抗体 (マウスモノクローナル A C 1、A C 2 およびウサギポリクローナル T O S 2) の F (a b') 2 フラグメントもしくはマウス I g G の F (a b') 2 フラグメントもしくはウサギ I g G の F (a b') 2 フラグメントと共に氷上で 30 分間インキュベートした。インキュベートした後、細胞を P B S で洗浄し、次に 2 % の F B S + 0 . 1 % の N a N 3 を含有する P B S 中、 F I T C - r B A G 3 タンパク質 (14 nM) と共に暗黒中において 4 度で 30 分間インキュベートした。P B S により洗浄した後、細胞を P B S + 2 % の F B S + 0 . 1 % の N a N 3 に再懸濁し、フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s ) により分析した。

20

## 【0112】

## E L I S A による I L 6 検出

ポリミキシン B スルフェート ( $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) の不在下または存在下で L P S (10 ng / ml) により、または r B A G 3 (14 nM) もしくは B S A (14 nM) により 10 または 20 時間処理した J 7 7 4 A . 1 細胞 ( $5 \times 10^4 / 96$  ウエルマイクロプレート中) の上清において、 I L 6 を測定した。処理した後、  $50 \mu\text{L}$  の細胞培養培地を収集し、マウス I L 6 Kit (e B i o s c i e n c e ) により三重に分析した。

## 【0113】

30

## 蛍光

細胞を 6 ウエルプレートにおいてカバーガラス上で 60 ~ 70 % の集密度に培養し、等量の r B A G 3 - F I T C および B S A - F I T C タンパク質を H C M a に加え、 0 . 1 % の N a N 3 を有する J 7 7 4 A 1 培養培地に 1 時間加えた。カバーガラスを  $1 \times$  P B S で洗浄し、  $1 \times$  P B S 中 3 . 7 % のホルムアルデヒドにより室温で 30 分間固定し、次に  $1 \times$  P B S 0 . 1 M グリシンと共に 5 分間インキュベートした。1 : 100 希釈の抗 - インテグリンモノクローナル抗体と共に 4 度でインキュベートした後、カバーガラスを  $1 \times$  P B S により 3 回洗浄した。1 : 500 希釈のヤギ抗マウス I g G D y L i g h t 594 コンジュゲート抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e , P A , U S A ) と共に室温で 45 分間インキュベートした後、カバーガラスを再び  $1 \times$  P B S により 3 回洗浄した。H o e c h s t 33342 (S i g m a A 1 d r i c h、 $2 \text{g} / \text{ml}$ ) と共に室温で 10 分間インキュベートした後、カバーガラスを再び P B S により 3 回、次に蒸留水で洗浄した。次にカバーガラスを、間に 47 % (v / v) のグリセロールを含有するスライドに載せた。試料を共焦点レーザー走査顕微鏡 (Z e i s s L S M 共焦点顕微鏡、G e r m a n y) の使用により分析した。画像は、実験および対照材料を比較するとき、同じ取得パラメーター (レーザー強度、光電子倍増管、ピンホール口径、対物レンズ 63 ×、ズーム 2) を使用して連続走査モードにより取得した。図の生成では、最低蛍光強度の特徴の視感のために明るい細胞蛍光バックグラウンドを残すこと、および異なる実験群間の比較を助けることに注意しながら、画像の明度およびコントラストを調整した。最終的な図は、A d o b e P h o t o s h o p 7 およ

40

50

び Adobe Illustrator 10 を使用して組み立てた。Leica Q9 Confocal Software および ImageJ をデータ分析に使用した。

#### 【0114】

##### E L I S A による抗体力価の測定

NUNC Maxisorp 96 ウエル E L I S A プレートを、組換え B A G 3 タンパク質の、PBS、pH 7 中の  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $50 \mu\text{l}$  / ウエル) により被覆し、4 で一晩インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液 (PBS + 0.05% の Tween 20) により 2 回洗浄し、次に PBS 中 0.5% の魚肉ゼラチンにより室温で 1 時間プロッキング ( $150 \mu\text{l}$  / ウエル) した。プロッキングした後、プレートを洗浄緩衝液により 2 回洗浄し、血清を洗浄緩衝液中 0.5% の魚肉ゼラチンにより 1 : 70 に希釈し、次に三重に適用し ( $50 \mu\text{l}$  / ウエル)、室温で 2 時間インキュベートした。次にプレートを洗浄緩衝液により 6 回洗浄した。抗ヒト IgG (H + L) 抗体 (Sigma Aldrich) を、洗浄緩衝液中 0.5% の魚肉ゼラチンにより 1 : 20,000 に希釈し、 $50 \mu\text{l}$  / ウエルで加え、4 で 30 分間インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 6 回洗浄し、TMB ( $50 \mu\text{l}$  / ウエル) (eBioscience) により現像し、反応を 4.5 M の硫酸 ( $25 \mu\text{l}$  / ウエル) により停止させ、プレートを 450 nm で分光光度的に分析した。  
10

#### 【0115】

##### NO<sub>2</sub><sup>-</sup> アッセイ

培養上清中の細胞から放出された NO の安定した代謝産物である亜硝酸塩含有量 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) を、ポリミキシン B スルフェート (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の不在下または存在下で LPS ( $10 \text{ng}/\text{ml}$ ) により、または r BAG 3 (7、14 および 28 nM) もしくは BSA (25 nM) により 24 時間処理した、J774A.1 細胞 ( $5 \times 10^4$  / 96 ウエルマイクロプレート) において測定した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の量をグリース反応により測定した。簡潔には、 $100 \mu\text{l}$  の細胞培養培地を、 $100 \mu\text{l}$  のグリース試薬、等量の、5% (v : v) のリン酸中 1% (w : v) のスルファニルアミドおよび 0.1% (w : v) のナフチルエチレンジアミン - HC 1 と混合し、室温で 10 分間インキュベートし、次に吸光度をマイクロプレート読み取り機 Titertek (Dasit, Cornaredo, Milan, Italy) により 550 nm で測定した。試料中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の量 ( $\mu\text{M}$ ) を、亜硝酸ナトリウム標準曲線から計算した。  
20  
30

#### 【0116】

##### E L I S A による B A G 3 / 抗体免疫複合体の測定

NUNC Maxisorp 96 ウエル E L I S A プレートを、PBS、pH 7 中の抗 BAG 3 モノクローナル抗体 AC-1、AC-2 または AC-3 により被覆し、4 で一晩インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液 (PBS + 0.05% の Tween 20) により 2 回洗浄し、次に PBS 中 0.5% の魚肉ゼラチンにより室温で 1 時間プロッキング ( $150 \mu\text{l}$  / ウエル) した。プロッキングした後、プレートを洗浄緩衝液により 2 回洗浄し、血清を洗浄緩衝液中 0.5% の魚肉ゼラチンにより 1 : 70 に希釈し、次に三重に適用し ( $50 \mu\text{l}$  / ウエル)、室温で 2 時間インキュベートした。次にプレートを洗浄緩衝液により 6 回洗浄した。抗ヒト IgG (H + L) 抗体 (Sigma Aldrich) を、洗浄緩衝液中 0.5% の魚肉ゼラチンにより 1 : 20,000 に希釈し、 $50 \mu\text{l}$  / ウエルで加え、4 で 30 分間インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 6 回洗浄し、TMB ( $50 \mu\text{l}$  / ウエル) (eBioscience) により現像し、反応を 4.5 M の硫酸 ( $25 \mu\text{l}$  / ウエル) により停止させ、プレートを 450 nm で分光光度的に分析した。  
40

#### 【0117】

##### 免疫組織化学

免疫組織化学プロトコールには、キシレンによる脱パラフィン化 (deparaffination)、純水までアルコールの濃度を下降させることによる再水和、クエン酸緩  
50

衝液、pH 6.0 による 95° での 30 分間の非酵素的抗原回復およびメタノール中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による 20 分間の内在性ペルオキシダーゼ消光が含まれる。PBS によりすすいだ後、試料を、0.1% の PBS / BSA 中 5% の正常なウマ血清によりブロッキングした。BAG3 を検出するため、試料を、3 マイクログラム / ml の濃度の BAG3 モノクローナル抗体 AC-1、AC-2 または AC-3 と共に室温で 1 時間インキュベートした。PBS により十分に洗浄した後、切片をビオチン化二次抗マウス IgG と共に 20 分間インキュベートし、次にすぎ、アビジン - ビオチン複合体ペルオキシダーゼ (Novocastra - Leica Microsystems, Milano, IT から購入した) と共にインキュベートし、ジアミノベンジジン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) により現像した。最後に、切片をヘマトキシリンで対比染色し、アルコールで脱水し、キシレンで清浄化し、Permount (Fisher Scientific, Milan, IT) により装填した。  
10

#### 【0118】

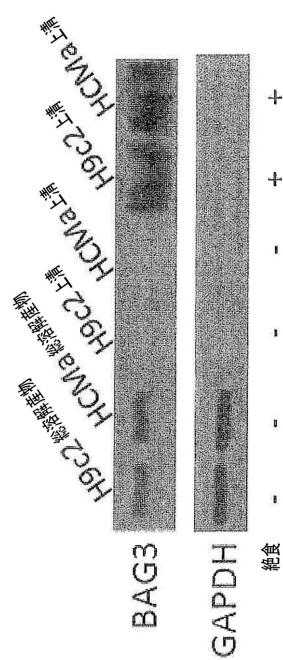
##### 定量的リアルタイム RT - PCR

切除臍癌の組織試験片を取り出し、直ぐに液体窒素により凍結し、RNA 抽出まで -80° で保存した。全 RNA をフェノール抽出により凍結組織および臍癌細胞系から単離した (TRIzol Reagent, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)。組織試料において、癌細胞充実性は、大部分の細胞領域のクリオスタッフ切片作製および切開により濃縮された。RNA 濃度および純度 (A<sub>260</sub> : A<sub>280</sub> > 2.0、A<sub>260</sub> / A<sub>230</sub> > 1.8) は、NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) により確認した。1.0 μg の全 RNA を、製造会社 (Applied Biosystems, Applera, Foster City, CA, USA) の説明書に従って、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit の使用により逆転写した。定量的リアルタイム PCR アッセイを使用して、腫瘍組織試料における BAG3 の発現差異を評価した。ヒト bag3 遺伝子のプライマーを、Primm srl (Milano, Italy) (順方向プライマー : (配列番号 16) CCTGTTAGCTGTGGTTG、逆方向プライマー : (配列番号 17) AACATACAGATATTCCCTATGGC) により合成した。全ての qPCR は、25 μl の最終容量において、以下の条件：95° で 5 分間、40 サイクルの 95° で 10 秒間および 60° で 30 秒間に従って、QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Hamburg, Germany) を使用し、ABI PRISM (登録商標) 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Applera, Foster City, CA, USA) を稼働して、試料あたり 3 回繰り返して実施した。データは、S. D. S ソフトウェア v2.1 を使用して、閾サイクル (C<sub>t</sub>) 値として取得した。それぞれの試料において、bag3 mRNA の相対的発現レベルを、内在性 GAPDH の発現に正規化した後、比較法の使用により得た。  
20  
30  
30

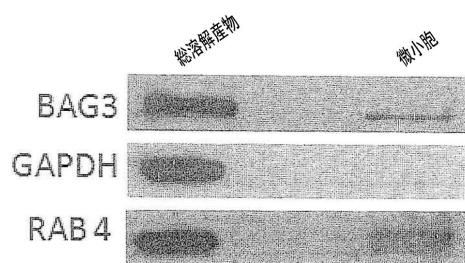
#### 【0119】

上記の記載および上記に示された実施例から、本発明により記載され、得られる生物学的マーカーによって得られる利点が、明らかである。  
40

【図1A】



【図1B】



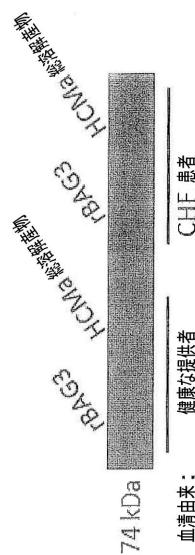
【図1C】



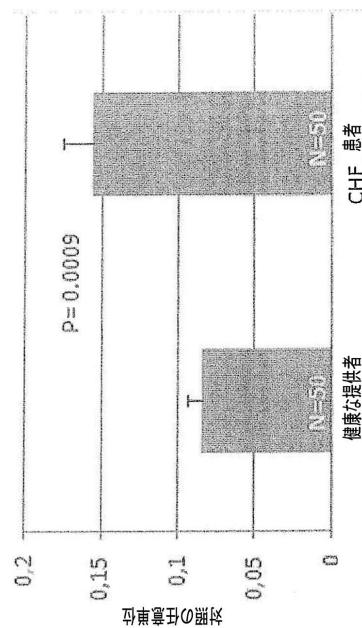
【図1D】

Pept:BAG3 aa	MW
81-106	2937.56
107-121	1819.92
140-149	1102.51
231-249	2311.12
494-536	4621.39
538-575	3747.66

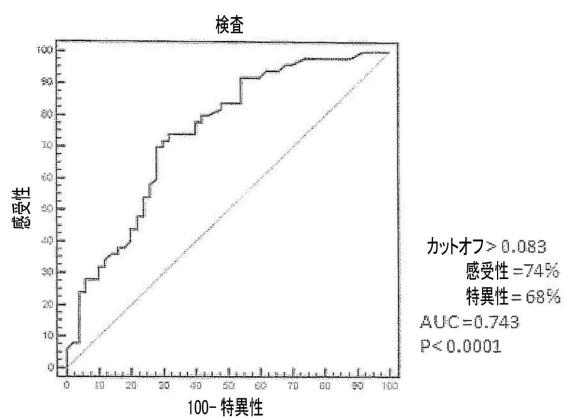
【図2A】



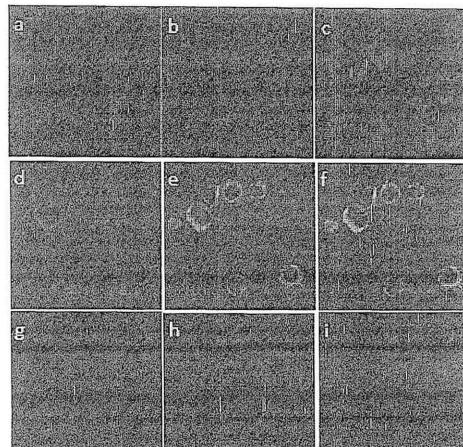
【図2B】



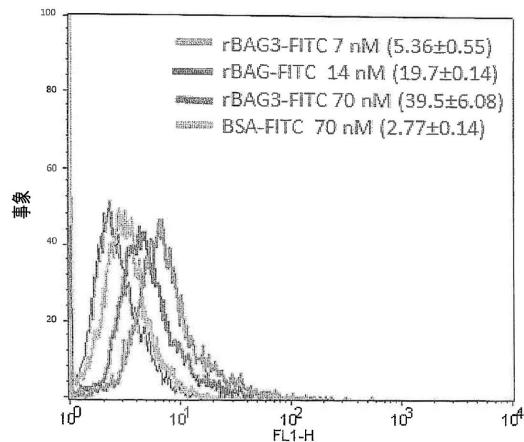
【図2C】



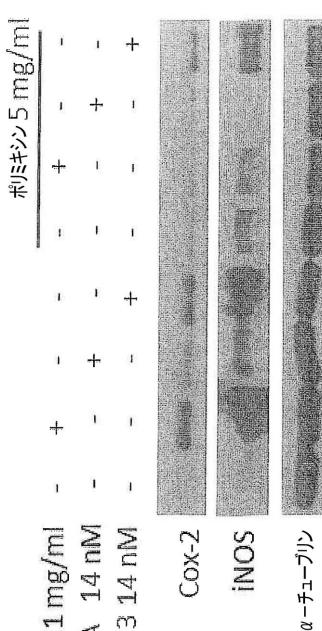
【図3A】



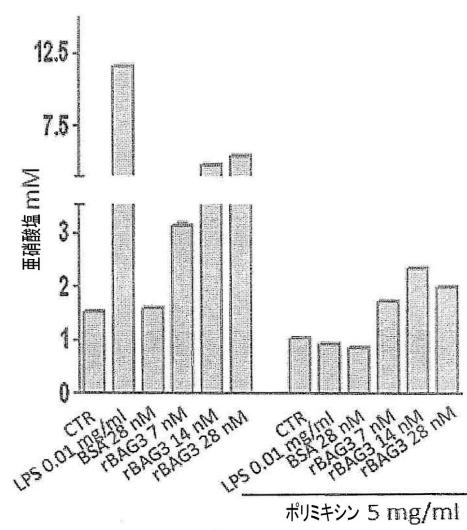
【図3B】



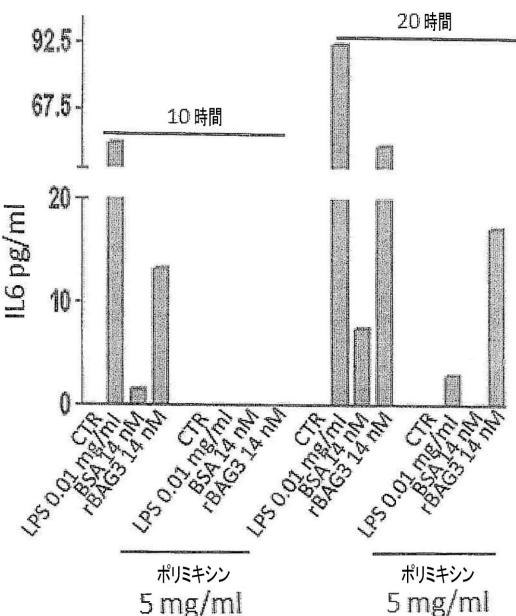
【図3C a】



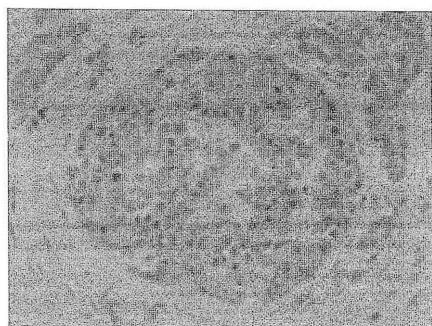
【図3C b】



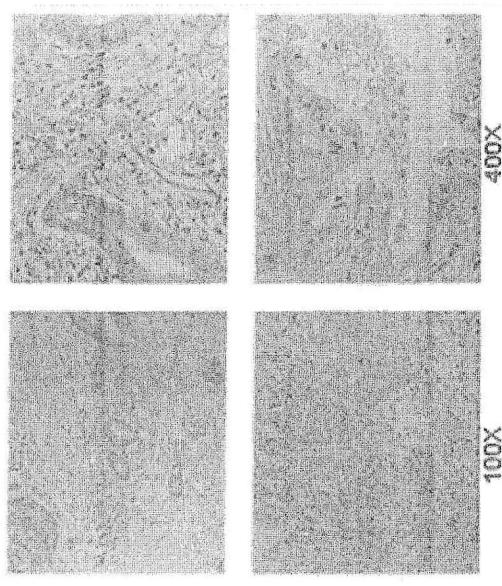
【図3C c】



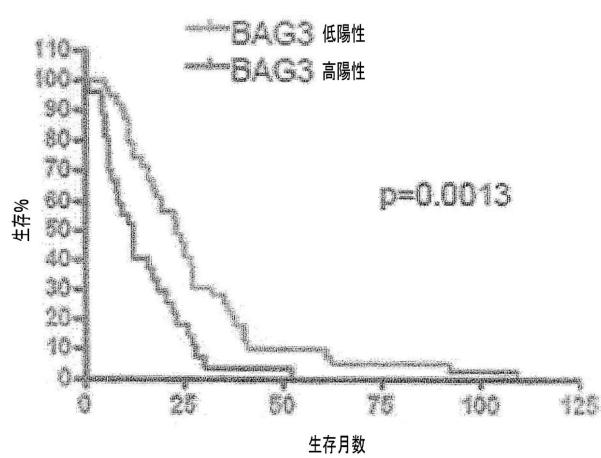
【図4 A】



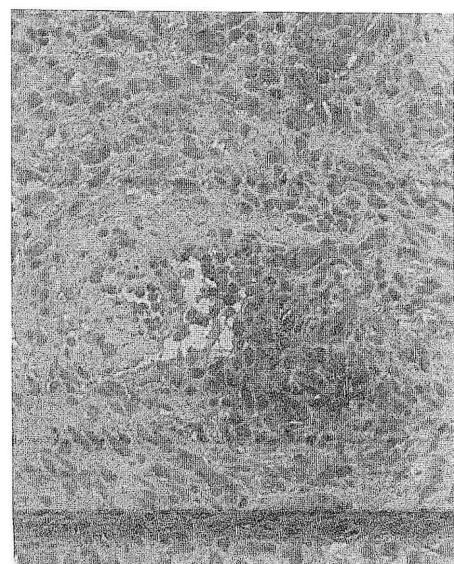
【図4 B】



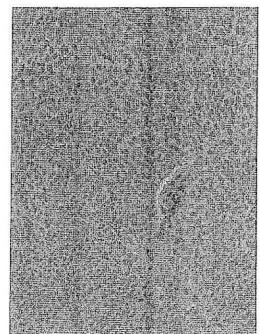
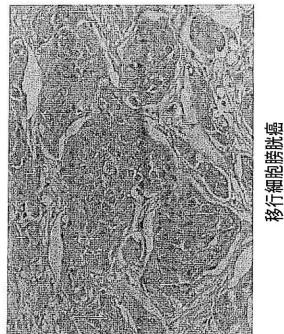
【図4 C】



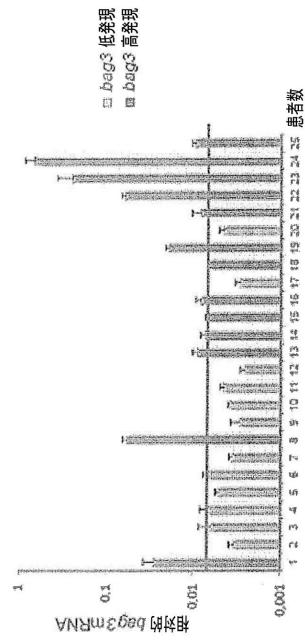
【図5】



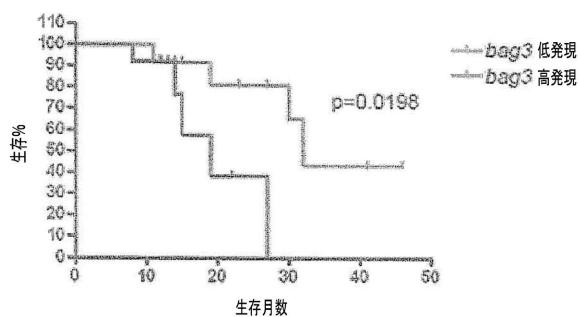
【図6】



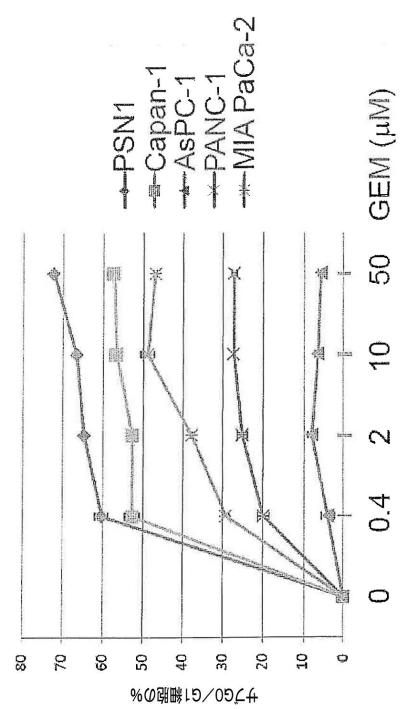
【図7 A】



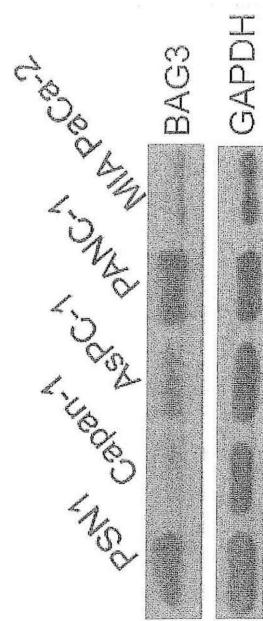
【図7 B】



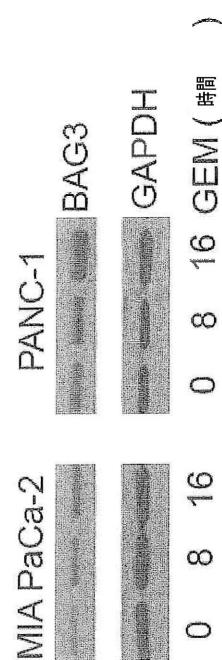
【図8 A】



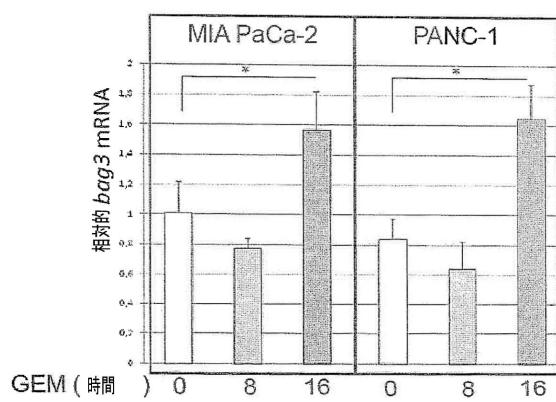
【図 8 B】



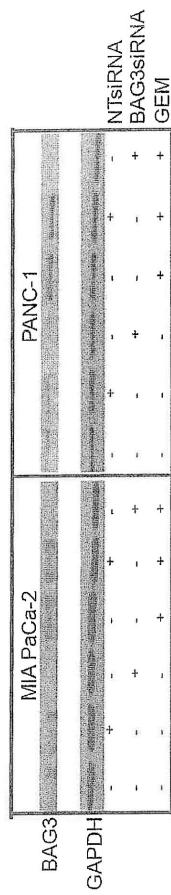
【図 8 C】



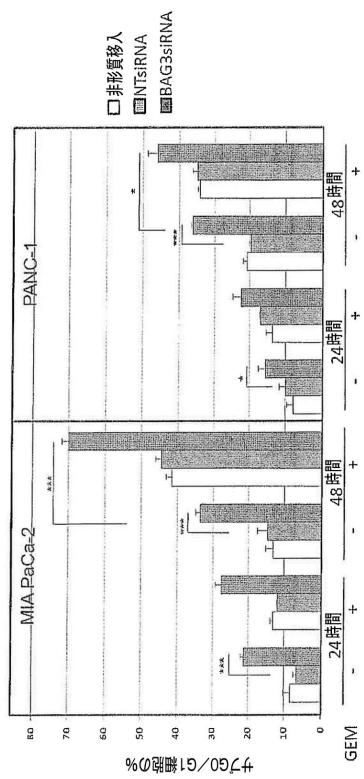
【図 8 D】



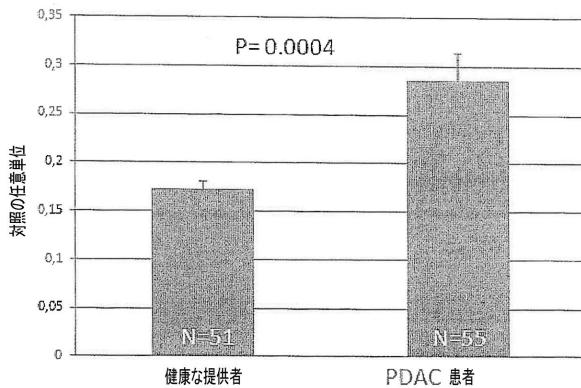
【図 8 E】



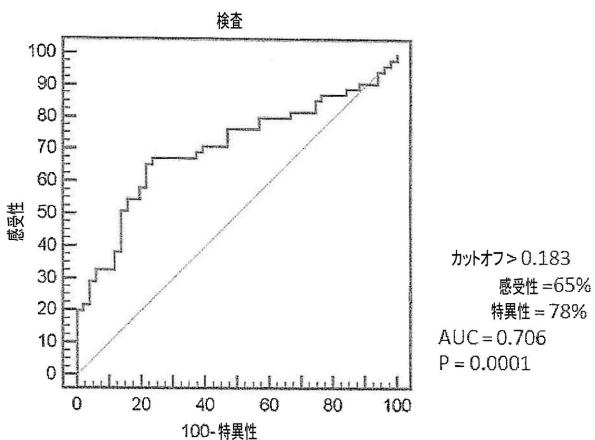
【図 8 F】



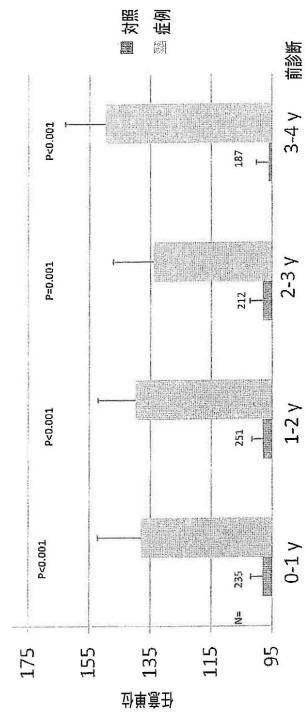
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 10】



【配列表】

0006654432000001.app

---

フロントページの続き

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 常見 優

審判官 田村 聖子

(56)参考文献 国際公開第2012/049664号  
国際公開第2011/067377号

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K1/00-19/00

C12N15/00-15/90

C12P21/00-21/08

G01N33/00-33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)