

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5421993号
(P5421993)

(45) 発行日 平成26年2月19日 (2014. 2. 19)

(24) 登録日 平成25年11月29日 (2013. 11. 29)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Z N A D
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z

請求項の数 1 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2011-523723 (P2011-523723)	(73) 特許権者	509159333
(86) (22) 出願日	平成20年8月26日 (2008. 8. 26)		ユニヴァーシティー オブ ウルサン フ
(65) 公表番号	特表2012-500398 (P2012-500398A)		ァウンデーション フォー インダストリ
(43) 公表日	平成24年1月5日 (2012. 1. 5)		ー コーオペレーション
(86) 国際出願番号	PCT/KR2008/004996		大韓民国 ウルサン 680-749 ム
(87) 国際公開番号	W02010/021423		ゲル 2-ドン サン 29
(87) 国際公開日	平成22年2月25日 (2010. 2. 25)	(74) 代理人	100147485
審査請求日	平成23年2月17日 (2011. 2. 17)		弁理士 杉村 憲司
(31) 優先権主張番号	10-2008-0080441	(74) 代理人	100119530
(32) 優先日	平成20年8月18日 (2008. 8. 18)		弁理士 富田 和幸
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100144266
			弁理士 鈴木 一寿
特許法第30条第1項適用 掲載年月日: 2008年 2月27日 掲載アドレス: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22124/pdf		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肝細胞癌腫の手術後の再発または再発の危険性の診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

転移性腫瘍抗原 (MTA 1) タンパク質と候補薬物とを接触させる段階 (第 1 段階) と

、
前記候補薬物と接触された MTA 1 タンパク質の発現レベルを測定する段階 (第 2 段階) と、

候補薬物のない条件で測定された MTA 1 タンパク質の発現レベルを測定する段階 (第 3 段階) と、

前記第 2 段階及び第 3 段階の MTA 1 タンパク質の発現レベルを比較して、MTA 1 タンパク質の発現レベルを減少させる候補薬物を選別する段階 (第 4 段階) と、
を含んでなることを特徴とする肝細胞癌腫の手術後の再発予防及び治療用薬物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝細胞癌腫の手術後の再発または再発の危険性の診断方法及び肝細胞癌腫の手術後の再発予防及び治療用薬物のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌腫 (hepatocellular carcinoma; HCC) は、世界

で5番目に平凡な癌である。肝細胞癌腫に関する最も望ましい治療法は、手術であるが、腫瘍の切開できないサイズ及び数、悪い肝機能、多様な肝内または遠隔転移などによって、肝細胞癌腫の患者のうち、10ないし20%以下の患者のみ手術が可能である。

【0003】

さらには、手術可能な肝細胞癌腫の患者でも、手術後の頻繁な再発が長期間の生存に主な制限要素として作用している。

【0004】

癌の多様な転移関連のタンパク質が研究されて分離されている。そのうち、最近同定された転移性腫瘍抗原 (Metastatic Tumor Antigen1またはmetastasis associated1;MTA1)は、体外 (in vitro) 10

で多様な腫瘍細胞の移住及び浸潤を増加させるものと知られている。
【0005】
MTA1は、また酸素欠乏-誘導性因子1α (Hypoxia-inducible factor 1α;HIF1α)の安定化剤として血管新生の過程で役割を行うものと提案された。

【0006】

しかし、MTA1が、肝細胞癌腫の患者で浸潤、再発及び生存に如何なる役割を行うかについての報告は、全くない実情である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0007】

前記従来技術の問題点を解決するために、本発明者は、腫瘍内の血管新生を促進し、腫瘍の成長と転移過程とに関与するものと知られた転移性腫瘍抗原 (MTA1)の発現が増加するほど肝細胞癌腫の手術後の再発が珍しくなく、患者の生存期間が短いということを明らかにすることによって、本発明を完成した。

【0008】

したがって、本発明の目的は、肝細胞癌腫の手術後の再発及び不良な生存を予測することができる有用な予後因子であるMTA1の発現レベルを利用した肝細胞癌腫の手術後の再発または再発の危険性の診断方法を提供することである。

【0009】

30

また、本発明の他の目的は、肝細胞癌腫の手術後の再発予防及び治療用薬物のスクリーニング方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記目的を果たすために、本発明は、肝細胞癌腫の手術後に再発するか、再発の危険がある患者から由来した生物学的試料から転移性腫瘍抗原 (MTA1)タンパク質の発現レベルを測定する段階と、前記測定されたMTA1タンパク質の発現レベルを正常対照群の発現レベルと比較する段階と、を含んでなることを特徴とする肝細胞癌腫の手術後の再発または再発の危険性の診断方法を提供する。

【0011】

40

この際、MTA1タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号2に記載されており、GenBank (登録番号NM_004689.3、GI:115527079)から利用可能である。

【0012】

本発明によるMTA1タンパク質発現と関連して、肝細胞癌腫の手術後に再発するか、再発の危険がある患者から由来した生物学的試料の発現レベルは、正常対照群と比較して、その発現の有無によって陽性または陰性と判断し、これは、医師が診断名が分からない状態で正常対照群と比較して、相対的に判断するものである。染色時の背景誤差を除去するために、25%未満であれば陰性、25%以上であれば陽性と判断することが望ましい。
。

50

【0013】

また、本発明は、転移性腫瘍抗原（MTA1）タンパク質と候補薬物とを接触させる段階（第1段階）と、前記候補薬物と接触されたMTA1タンパク質の発現レベルを測定する段階（第2段階）と、候補薬物のない条件で測定されたMTA1タンパク質の発現レベルを測定する段階（第3段階）と、前記第2段階及び第3段階のMTA1タンパク質の発現レベルを比較して、MTA1タンパク質の発現レベルを減少させる候補薬物を選別する段階（第4段階）と、を含んでなることを特徴とする肝細胞癌腫の手術後の再発予防及び治療用薬物のスクリーニング方法を提供する。

【0014】

前記のように、薬の開発のための候補薬物をスクリーニングすることによって、選別された候補薬物を含有する組成物はMTA1発現を抑制して、肝細胞癌腫の手術後の再発の予防及び治療に適用可能である。

【発明の効果】

【0015】

本発明は、腫瘍内の血管新生を促進し、腫瘍の成長と転移過程とに関与するものと知られた転移性腫瘍抗原（MTA1）の高発現が、肝細胞癌腫の手術後の再発及び生存と密接な相関関係を有することを発見することによって、MTA1発現レベルを分析して肝細胞癌腫の手術後の再発または再発の危険性を診断し、このような再発を予防／治療することができる薬物をスクリーニングすることによって、肝細胞癌腫の手術後の再発の予防及び治療に有用に利用される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】肝細胞癌腫の患者試料でMTA1発現を免疫組織化学的染色で示す図である。

【図2】腫瘍サイズによるMTA1発現レベルを示す図である。

【図3】腫瘍の類型によるMTA1発現レベルを示す図である。

【図4】組織学的分化とMTA1発現レベルとの相関関係を示す図である。

【図5】微細血管の塞栓とMTA1発現レベルとの相関関係を示す図である。

【図6】肝細胞癌腫の原因とMTA1発現レベルとの相関関係を示す図である。

【図7】MTA1発現レベルによる肝細胞癌腫の累積再発率を示す図である。

【図8】MTA1発現レベルによる肝細胞癌腫の生存率を示す図である。

【図9】HBV患者で、MTA1発現レベルと累積再発率との相関関係を示す図である。

【図10】HBV患者で、MTA1発現レベルと累積生存率との相関関係を示す図である。

。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、下記実施例を通じて本発明をより詳細に説明する。但し、このような実施例によって、本発明が限定されるものではない。

【0018】

<実施例1>患者の特徴

1998年から2003年まで牙山病院で肝細胞癌腫の再発で苦しんでいる患者506人を対象に実験した。患者506人の臨床的特徴は、下記表1の通りである。患者は、肝切除術後、平均周期43ヶ月（1～96ヶ月）間に追跡調査された。

【0019】

【表 1】

項目	特性値
年齢（年、平均±SD）	56±10
性別（M：F）	412：94
疾患程度（CH：LC）	138：368
肝機能評価（Child-Pugh class、A/B/C）	383/73/50
HCC発病原因 （HBV/HCV/Both/NBNC）	397/29/8/72
HCCサイズ（cm）	4（0.7－21）
肝切除後、追跡調査期間（月）	43（1－96）

10

【0020】

肝癌の再発及び生存は、追跡調査の最後の日に医学記録を用いて決定した。3ヶ月以上の間に追跡調査ができない患者の場合には、患者の居住地付近まで訪問して評価した。

【0021】

20

＜実施例2＞MTA1の免疫組織化学的染色の評価

1. 組織マイクロアレイの構成

組織マイクロアレイの構成は、以前に知られた方法によって行われた（Oncol Rep. 16：929－935，2006）。組織アレイ器具（Beecher Instruments、Silver Spring、MD）を用いてホルマリン固定されたパラフィン包埋組織試料を整列した。

【0022】

すなわち、各腫瘍の代表的領域を選択し、ヘマトキシリン－エオシン（H&E）で染色されたスライド上に表示し、このような関連組織ブロックをサンプリングした。各供給者ブロックの目的領域を1mm直径の組織シリンダーでパンチし、試料を収容者ブロックに移した。組織損失を最小化するために、各試料を二重に整列した。

30

【0023】

2. 人間の肝細胞癌腫組織マイクロアレイでMTA1の免疫組織化学的染色

LSABキット（DAKO, Carpinteria, CA）と3, 3'-ジアミノベンジジン色素原として利用したアビジン－ビオチン－ペルオキシダーゼ複合法でMTA1に関する免疫組織化学的染色を行った。肝細胞癌腫を含み、非腫瘍の肝組織を取り囲んだパラフィン包埋組織マイクロアレイブロックを5µm間隔で切開した。

【0024】

キシレンでスライドからパラフィンを除去し、一連のアルコールで再脱水した。次いで、スライドを3%過酸化水素で10分間培養して内因性ペルオキシダーゼ活性を遮断した。免疫反応性を増加させるために、スチームオープンでクエン酸緩衝液（pH6.0）で10分間抗原性回復を行った。MTA1に対する1次抗体を1：200の希釈比率に希釈して使った。2次ビオチン化された抗体とアビジン－ビオチン複合体試薬とを適用し、領域をハリスヘマトキシリンでカウント染色した。

40

【0025】

陰性対照群のために、領域を1次抗体の代わりに、2%ヤギ血清及び1%牛血清アルブミンを含有したトリスパッファ生理食塩水で培養した。

【0026】

3. 免疫染色の評価

腫瘍細胞核でMTA1に関して陽性である腫瘍細胞の特性を調査した。各スパットで、

50

最も強いが、圧倒的な染色パターンの領域を記録した。このような染色強度は、一般的に陽性腫瘍細胞と正の比例関係を表わし、両極に分布する傾向を有する。

【0027】

すなわち、染色値は、弱い陽性の染色所見を示す腫瘍細胞が全体腫瘍細胞の半分以上である場合の群、または強い陽性の染色所見を示す腫瘍細胞が全体腫瘍細胞の90%以上である場合の群に密集された。

【0028】

これに基づいて、本発明者は、分類を単純化し、効果的な臨床データを分析するための標準を次のように利用した。(1) 0% (なし、-)、(2) MTA1 低発現群 (50%以下、+)、(3) MTA1 高発現群 (50%以上、++)。

10

【0029】

核染色は、拡散され、他の核タンパク質で観察される膜、核小体または斑点パターンのような他の染色パターンはなかった。2人の他の観察者がアレイを用いてMTA1発現度を決定し、2人の観察者が互いにずれる評価をする場合には、再検査して一致された点数を定めた。

【0030】

4. 統計的分析

MTA1の肝細胞癌腫の再発及び全体生存率に関する予後要因としての役割に関する分析及び焦点の混乱を避けるために、本発明者は、次のような基準に実験を行った。

【0031】

20

第一に、累積再発率に関する肝細胞癌腫の再発として映像医学所見など客観的な証拠のみを考慮し、潜行性の再発可能性は考慮しなかった。

【0032】

第二に、進行性の肝不全と関連するか、関連していない肝細胞癌腫の患者のあらゆる死は、累積生存率 (全体生存) に考慮された。本発明者は、累積生存率の決定に肝疾患と関連のない死亡は含まなかった。同じ基準にCox regression hazardモデルを用いて再発及び生存に関する多変数分析を行った。

【0033】

生存率分析は、Kaplan-Meier法を使い、単変量分析はlog rank testを、多変量分析はCox regression hazard modelを使った。

30

【0034】

5. 結果

1) 肝細胞癌腫及び周辺肝組織でのMTA1発現頻度

図1に示されたように、506人の肝細胞癌腫の患者試料のうち、88人の試料でMTA1が染色されたが(17%)、周辺の非腫瘍の肝組織では、全然染色されなかった。陽性である88個の試料のうち、62の試料は+、26個の試料は++であった($p < 0.001$)。

【0035】

2) 腫瘍サイズ及びMTA1発現レベル

40

MTA1発現レベルは、腫瘍の直径が大きい肝細胞癌腫の患者でより高かった。すなわち、図2に示されたように、150人の患者は、3cm直径より小さな肝細胞癌腫を有し、333人の患者は、3cm直径より大きい肝細胞癌腫を有した。3cmより小さな直径の肝細胞癌腫を有した患者のうち、MTA1発現は87%で陰性であり、11%で+、2%で++であった。3cmより大きい直径の肝細胞癌腫を有した患者のうち、MTA1発現は79%で陰性であり、14%で+、7%で++であった($p = 0.04$)。

【0036】

3) 腫瘍の類型及びMTA1発現レベル

腫瘍の類型を434人の患者で分析した。263人の患者で結節性の類型、74人の患者で結節周囲波及型、70人の患者で多結節融合型、6人の患者で有茎性結節、21人の

50

患者で拡散浸湿型を表わした。

【0037】

図3に示されたように、MTA1発現レベルは、他の種類の肝細胞癌腫でより結節性の肝細胞癌腫でさらに低かった。

【0038】

4) 組織学的分化及びMTA1発現レベル

469人の患者全体の試料に対する組織学的分化を分析した。図4に示されたように、38人の患者、154人の患者、213人の患者及び64人の患者でそれぞれEdmonson-Steiner (E-S) 等級1、2、3及び4で表われた。E-S等級1でのMTA1発現レベルは、92%で陰性、8%で+、0%で++を表わした。E-S等級2でのMTA1発現レベルは、85%で陰性、11%で+、4%で++を表わした。E-S等級3でのMTA1発現レベルは、80%で陰性、13%で+、7%で++を表わした。E-S等級4でのMTA1発現レベルは、72%で陰性、20%で+、7%で++を表わした。

10

【0039】

増加したMTA1発現レベルは、肝細胞癌腫のさらに悪い組織学的分化と関連すると判断された。

【0040】

5) 微細血管の侵犯（塞栓）及びMTA1発現レベル

452人の肝細胞癌腫の患者の凍結組織を用いて微細血管の侵犯（塞栓）を検討した。その結果、図5に示されたように、102人の試料で微細血管の塞栓が発見された（22.6%）。凍結組織で微細血管の塞栓を有した患者のMTA1発現レベルは、微細血管の塞栓のない患者よりはるかに高く発現された。

20

【0041】

6) 肝細胞癌腫の原因及びMTA1発現レベル

肝疾患の多様な原因が、MTA1発現レベルの変化に関与する。484人の患者のうち、380人の患者は、B型肝炎ウイルス（HBV）を有し、27人の患者は、C型肝炎ウイルス（HCV）を有し、8人の患者は、HBV及びHCV同時感染者であった。69人の患者は、非ウイルス性肝疾患の状態であった。

【0042】

面白くも、MTA1は、HBV関連肝細胞癌腫を有した380人の患者のうち80人で発現されたが（21.1%）、HCV関連肝細胞癌腫を有した患者では、単に1人の患者でのみ発現された。すなわち、図6に示されたように、HBV-関連肝細胞癌腫でのMTA1発現レベルは、79%で陰性、15%で+、6%で++であり、HCV-関連肝細胞癌腫でのMTA1発現レベルは、96%で陰性、0%で+、4%で++であった。

30

【0043】

HBV及びHCVいずれも感染された肝細胞癌腫の患者では、MTA1発現が起きなかった（0%、0/8）。非ウイルス性の原因を有した72人の肝細胞癌腫の患者のうち、69人の患者は、MTA1染色評価に有用に利用され、そのうち、7%（5/69）がMTA1のレベル1（+）発現、3%（2/69）がMTA1のレベル2（++）発現を表わした。

40

【0044】

7) 他の臨床病理的な因子とMTA1発現レベルとの相関関係

表2に表われたように、MTA1発現レベルと年齢、性別、肝疾患のChild-Pugh等級、肝機能の代償不全（decompensation）または肝細胞癌腫の被膜侵入間には、何ら相互関連性もなかった。この際、PVTは、門脈血栓症の略語である。

【0045】

【表 2】

変数	陰性	+	++	P 値
年齢 (年)	57 (4-88)	58 (34-76)	57 (29-71)	NS
男性 (%)	81	86	85	NS
皮膜浸潤 (%)	21	29	22	NS
PVT (%)	13	13	12	NS
肝硬化 (%)	70	64	67	NS
代償不全 (%)	25	26	16	NS

10

【0046】

8) MTA1 発現レベルによる再発及び生存率

図7に示されたように、MTA1 陽性肝細胞癌腫の1年、3年及び5年累積再発率は、MTA1 陰性肝細胞癌腫のそれよりはるかに高かった。1年、3年及び5年で高いMTA1 発現レベル(++)を有した患者の累積再発率は、それぞれ41%、72%及び93%であり、MTA1 発現レベルが、+である患者(39%、54%、65%)と陰性MTA1 発現患者(25%、39%、51%)よりもはるかに高いレベルであった。

20

【0047】

図8に示されたように、MTA1 陽性肝細胞癌腫を有した患者の1年、3年及び5年累積生存率(71%、54%、44%)は、MTA1 陰性肝細胞癌腫を有した患者のそれ(89%、72%、61%)より有意性のあるように短かった。

【0048】

また、図9及び図10に示されたように、HBV感染を有した患者で、MTA1 発現レベルが、累積再発率及び累積生存率と有意性のある相関関係を有するものと確認された。

【0049】

MTA1、腫瘍サイズ(>3.0cm)、組織学的分布(E-S III/IV)、非結節性腫瘍の類型、被膜浸潤、門脈血栓症及び微細血管の侵入が再発及び生存の多様な分析のために利用された。

30

【0050】

表3に表われたように、陽性MTA1 染色(特に、++)、大きい腫瘍サイズ(直径が>3cm)、門脈血栓症及び微細血管の侵入が、それぞれ独立した手術後の再発及び生存に関する予後因子であった。

【0051】

【表 3】

変数	再発		生存	
	OR, 95% CI	P値	OR, 95% CI	P値
MTA1 (+)	1.510, 1.008-2.262	0.045	1.668, 1.092-2.549	0.018
MTA1 (++)	3.248, 1.871-5.638	<0.001	2.532, 1.383-4.634	0.003
腫瘍サイズ(>3cm)	1.807, 1.230-2.655	0.003	2.336, 1.432-3.813	0.001
非結節型	—	NS	—	NS
PVT	2.220, 1.454-3.390	<0.001	1.752, 1.110-2.763	0.016
被膜浸潤	—	NS	1.421, 0.970-2.082	0.072
E-S等級(III/ IV)	—	NS	—	NS
MVI	1.719, 1.212-2.438	0.002	1.550, 1.061-2.266	0.023

【0052】

9) MTA1 発現レベルによる肝外転移

最後の検査で肝細胞癌腫に関する評価を受けた患者の総446人のうち、48% (213/446) は再発がなかった。単一及び多数の肝内転移が21% (95/446) 及び17% (77/446) でそれぞれ表われた。肝外転移は、14% (61/446) で発見された。

【0053】

面白くも、各群で陽性MTA1染色(+または++)の頻度は、それぞれ12% (26/213)、19% (18/95)、23% (18/77) 及び31% (19/61) であった。肝外転移は、陰性対照群でよりMTA1陽性群(+または++)でさらに平凡に発生した。

【0054】

配列番号1は、MTA1遺伝子の塩基配列に関するものであり、

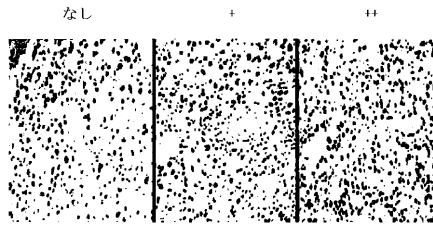
配列番号2は、MTA1タンパク質のアミノ酸配列に関するものである。

【産業上の利用可能性】

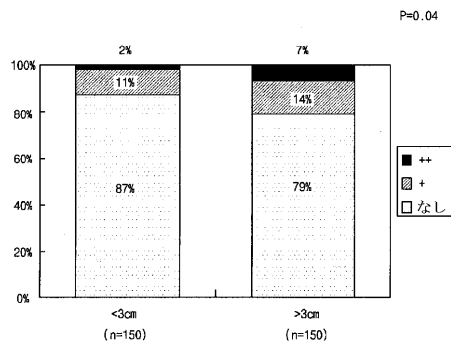
【0055】

本発明は、肝細胞癌腫の手術後の再発または再発の危険性の診断方法関連の分野に適用可能である。

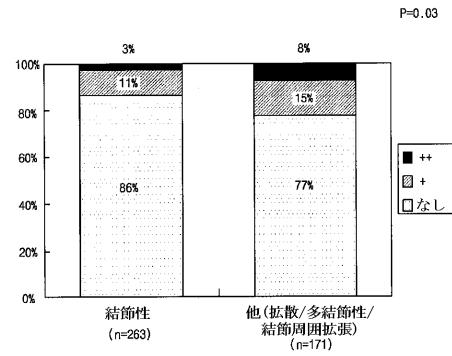
【図 1】



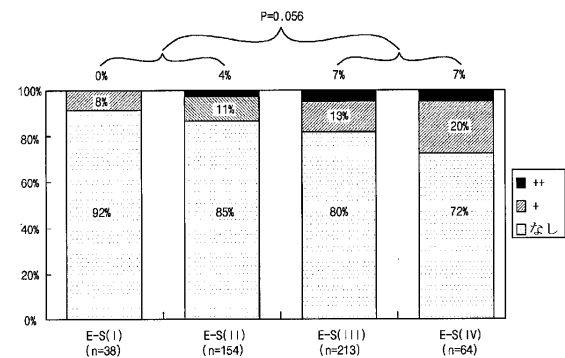
【図 2】



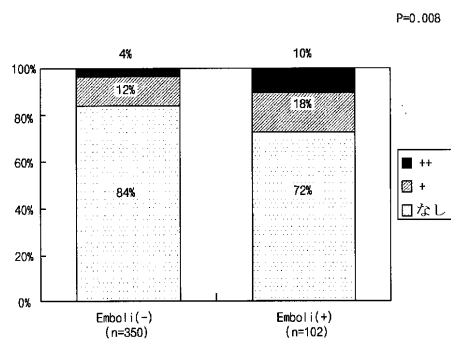
【図 3】



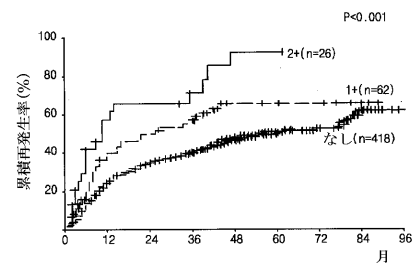
【図 4】



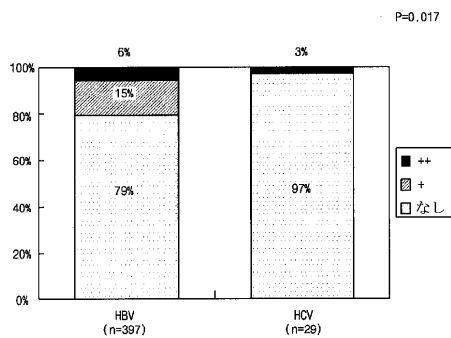
【図 5】



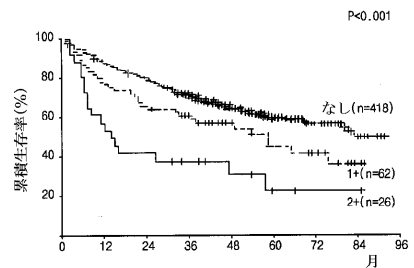
【図 7】



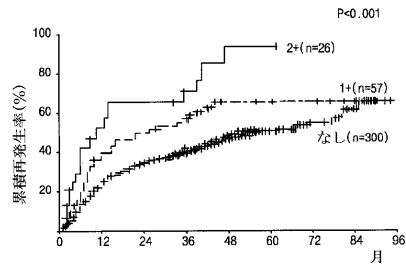
【図 6】



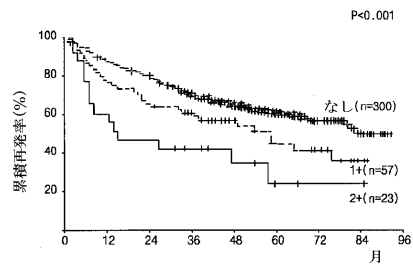
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0005421993000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ヨン ファ チャン
大韓民国 150-010 ソウル ヨンドンボーク ヨイドードン ハンヤン アパートメント
ディー206
- (72)発明者 ユン シル ウン
大韓民国 135-272 ソウル カンナムグ トゴク 2ードン サムスン タワー パレ
ス ジー3002
- (72)発明者 ス ヒョン リュ
大韓民国 150-010 ソウル ヨンドンボーク ヨイドードン サムブ アパートメント
ナンバー6-1004
- (72)発明者 キュウ ウォン キム
大韓民国 151-742 ソウル クァナクグ シリム 9ードン ザ カレッジ オブ フ
ァーマシー ソウル ナショナル ユニバーシティー ナンバー29-224
- (72)発明者 チョン エー キム
大韓民国 142-881 ソウル カンプクグ スゥユー 4ードン 280-21 ハン
シン アパートメント ビー401

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 Oncol Rep., 2003年, Vol.10, No.3, p599-604
日本消化器外科学会雑誌, 2000年, Vol.33, No.7, p1019 PP22
Tissue and Cell, 2009年, Vol.41, p390-399

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
G01N 33/15