

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6786499号  
(P6786499)

(45) 発行日 令和2年11月18日(2020.11.18)

(24) 登録日 令和2年10月30日(2020.10.30)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 521 GO 1 N 37/00 102

請求項の数 24 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2017-541693 (P2017-541693)
(86) (22) 出願日	平成28年2月5日(2016.2.5)
(65) 公表番号	特表2018-504609 (P2018-504609A)
(43) 公表日	平成30年2月15日(2018.2.15)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2016/050277
(87) 国際公開番号	W02016/124947
(87) 国際公開日	平成28年8月11日(2016.8.11)
審査請求日	平成31年1月31日(2019.1.31)
(31) 優先権主張番号	1501930.0
(32) 優先日	平成27年2月5日(2015.2.5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)

(73) 特許権者	515200272 クイーン メアリー ユニバーシティ オ ブ ロンドン イギリス国 イー1 4エヌエス ロンド ン, マイル エンド ロード
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腺癌のバイオマーカー

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腺管腺癌 (PDAC) を有することが疑われる対象から採取された生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の発現レベルまたは濃度を決定する段階、および決定されたタンパク質の各々の発現レベルまたは濃度を、参照値としての、健常対象から採取された生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の発現レベルまたは濃度と比較する段階を含み、決定されたタンパク質の各々の発現レベルまたは濃度が、参照値よりも高い場合には、該対象が、腺管腺癌 (PDAC) を有する可能性があることが示されることを特徴とする、対象が腺管腺癌 (PDAC) を有する可能性を検査する方法。

## 【請求項 2】

REG1タンパク質が、REG1Aおよび/またはREG1Bである、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

決定する段階が、発現レベルまたは濃度が決定される1つまたは複数のタンパク質に特異的な1つまたは複数の結合分子を用いて行われる、請求項1または2記載の方法。

## 【請求項 4】

結合分子が、抗体もしくは抗体断片、タンパク質、またはアブタマーである、請求項3記載の方法。

## 【請求項 5】

生物学的試料が、尿、全血、血清、または臓臓組織試料である、請求項1乃至4のいずれ

か一項記載の方法。

【請求項 6】

試料が、ヒトに由来する、請求項1乃至5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

膵管腺癌が、Ⅰ期またはⅡ期膵管腺癌である、請求項1乃至6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

決定されたタンパク質の各々の発現レベルまたは濃度を、参照値としての、慢性膵炎 (CP)を呈する患者から採取された生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の発現レベルまたは濃度と比較する段階をさらに含む、請求項1乃至7のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項 9】

1つまたは複数のmiRNAの発現レベルまたは濃度を参照と比較する段階をさらに含む、請求項1乃至8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

CA19.9タンパク質の発現レベルまたは濃度を決定する段階をさらに含む、請求項1乃至9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

膵管腺癌 (PDAC) の診断の方法のためのLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の組み合わせの使用。 20

【請求項 12】

REG1タンパク質が、REG1Aおよび/またはREG1Bである、請求項11記載の使用。

【請求項 13】

前記タンパク質が、尿タンパク質である、請求項11または12記載の使用。

【請求項 14】

解析される1つまたは複数のタンパク質に特異的な1つまたは複数の結合分子を用いて、発現レベルまたは濃度が測定される、請求項11乃至13のいずれか一項記載の使用。

【請求項 15】

結合分子が、抗体もしくは抗体断片、タンパク質、またはアプタマーである、請求項14記載の使用。 30

【請求項 16】

膵管腺癌がⅠ期またはⅡ期膵管腺癌である、請求項11乃至15のいずれか一項記載の使用。

【請求項 17】

生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の発現または濃度を測定する手段を含む、膵管腺癌を検査するためのキット。

【請求項 18】

REG1タンパク質が、REG1Aおよび/またはREG1Bである、請求項17記載のキット。

【請求項 19】

測定する手段が、バイオセンサーである、請求項17または18記載のキット。 40

【請求項 20】

バイオセンサーが、電気化学バイオセンサー、電子バイオセンサー、圧電バイオセンサー、重量測定バイオセンサー、焦電バイオセンサー、イオンチャネルスイッチバイオセンサー、エバネッセント波バイオセンサー、表面プラズモン共鳴バイオセンサー、または生物学的バイオセンサーである、請求項19記載のキット。

【請求項 21】

検出する手段が、膜で被覆されたディップスティックを含み、該ディップスティックが、

(a) 発現または濃度が測定されるタンパク質に対して特異的親和性を有する非標識結合分子が結合している第1セクション； 50

- (b) 非反応性タンパク質でブロッキングされている第2セクション；および
- (c) 発現または濃度が測定される該タンパク質が結合している第3セクションを含む、請求項19記載のキット。

**【請求項 2 2】**

生物学的試料を収容するための1つまたは複数の容器をさらに含む、請求項17乃至21のいずれか一項記載のキット。

**【請求項 2 3】**

生物学的試料からLYVE1、REG1、および/またはTFF1タンパク質を抽出するための1つまたは複数の溶媒をさらに含む、請求項17乃至22のいずれか一項記載のキット。

**【請求項 2 4】**

1つまたは複数のバイオマーカーの発現の量または濃度を検出する手段がマイクロアレイである、請求項17乃至23のいずれか一項記載のキット。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

本発明は、膵癌に関し、およびそのような状態、特に膵管腺癌を診断するための生物学的試料中のバイオマーカーの使用に関する。

**【背景技術】**

**【0 0 0 2】**

膵管腺癌 (PDAC) は、膵臓で生じる悪性新生物の80%超を占める、最も一般的な膵外分泌悪性腫瘍である。それは、西欧諸国における癌関連死の原因の第4位である。診断された時点で、患者の大部分は局所進行疾患を呈するか、または確立された転移を有し、したがって患者の10~20%でしか手術が可能でない (Sener et al. (1999) J Am Coll Surg, 189:1-7 (非特許文献1))。全5年生存率は5%未満であるものの、外科的切除および補助化学療法後の患者における5年生存は、30%に達し得る。

**【0 0 0 3】**

膵管腺癌 (PDAC) は、この10年間で診断および治療アプローチの顕著な改善がなされていない稀な癌の1つである。分子レベルでの本疾患の理解がかなり進歩しているにもかかわらず、新規な知見はいまだ診療所に届いておらず、患者の大部分は5~6ヶ月という厳しい平均生存期間に今なお直面する。2013年には米国でPADC関連死は38,000件を超え、およびヨーロッパでは40,000件を超え、この悪性腫瘍は現在のところ癌関連死の主要原因の第4位であるが、2030年までには第2位になると予測されている。

**【0 0 0 4】**

PDACは、発見するのが最も難しい癌の1つである。膵臓が後腹膜に位置し、複雑な根本的分子異常が多数存在し、および特定の臨床症状が欠如していることで、患者の大部分は進行期で来院することになる。したがって患者の20%未満が、治癒の可能性のある手術を受けることができる一方、残りの患者は対症療法が提供され得るにすぎない。

**【0 0 0 5】**

大きさ<2 cmでまだ膵臓に限局しているI期PDAC腫瘍の偶発的診断後では、5年生存が70%に近づくことが報告されているため、早期発見のためのツールが改善されれば、これらの憂慮すべき図式は顕著に変化することになる。重要なことには、早期診断には、およそ10年というかなりの「絶好の」機会が存在する (Yachida S, et al. (2010) Nature 467(7319):1114-1117 (非特許文献2))。治癒の可能性のある手術がもはや実行可能ではない転移性疾患の現在の治療法は有効性が不十分であることを考慮すると、早期での発見はやはり重要である。

**【0 0 0 6】**

しかしながら、PDACの適時発見は、いくつかの要因：本疾患の早期において特定の臨床症状が欠如していること、現在の画像化手法の感度が不十分であること、および集中的な取り組みにもかかわらず、早期疾患の体液ベースの正確なバイオマーカーが欠如していることによって妨げられる（総説に関しては、Kaur et al. (2012) Biomark Med 6(5):597-

10

20

30

40

50

612（非特許文献3）を参照されたい）。早期PDMCはまた、膵臓の良性炎症性疾患であり、かつPDACのリスク因子の1つである、慢性膵炎（CP）と区別することも難しい。目下のところ臨床で広く使用されている唯一のPDACバイオマーカーである血清糖鎖抗原19.9（CA19.9）は、ルイス陰性遺伝子型を有する患者における偽陰性結果、無症候性集団における不十分な陽性的中率、および症候性患者における低感度（79%～81%）を被る。早期疾患（腫瘍<2cm）を伴う症例の50%未満が、上昇したCA19-9レベルを有し、さらに様々な他の良性および悪性の膵臓疾患および肝胆道疾患（慢性膵炎を含む）、ならびに非関連の囊胞性疾患および炎症性疾患において、CA19.9レベルは上昇し得る（総説に関しては、Ballehaninna UK, Chamberlain RS, "Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer-A Comprehensive Review", Indian J Surg Oncol, 2011;2:88-100（非特許文献4）を参照されたい）。加えて、ルイスa/b抗原（Ca19.9が認識する）は、集団のおよそ10%において発現されない。10

#### 【0007】

膵癌組織、膵液、および血清／血漿標本中のタンパク質発現を調べるために、プロテオミクス技法が近年使用されているが（例えば、Koomen et al. (2005) Clin Cancer Res, 11:1110-1118（非特許文献5）を参照されたい）、これらのいずれもが、今のところ臨床診療に適したバイオマーカーの発見をもたらしていない。

#### 【0008】

尿は、容易にかつ非侵襲的に得られる生体液であるため、近年、バイオマーカーの潜在的供給源として尿が研究された（Pieper et al. (2004) Proteomics, 4:1159-1174（非特許文献6））。血漿と比較して、尿タンパク質は、複雑度がより低く、かつ熱安定性がより優れている。さらに、最も多く見られるタンパク質（アルブミン、ウロモジュリン）が構成する尿プロテオームの割合はより低く、そのため試料処理が必要とする前洗浄／分画は少ない。尿タンパク質のおよそ49%は、血漿の糸球体濾過の可溶性産物であり（Barrat et al. (2007) Cmaj, 177:361-368（非特許文献7））、したがって尿中のタンパク質の相当数は、腎外供給源から生じる（Thongboonkerd et al. (2005) Curr Opin Nephrol Hypertens, 14:133-139（非特許文献8））。

#### 【0009】

泌尿器癌に加えて、いくつかの癌関連タンパク質が、肺癌、卵巣癌、および乳癌患者の尿中で同定されている。30

#### 【0010】

WO2004/102189（特許文献1）は、膵癌を診断するためのバイオマーカーを記載している。膵癌患者由来の血清試料を、健常ドナー由来の血清試料と比較し、結果として得られたバイオマーカーをそれらの重量によって特徴づけた。同様のアプローチはWO2004/099432（特許文献2）でも行われ、それにより膵癌を発見するためのさらなるバイオマーカーが提供された。WO2000/34787（特許文献3）は、尿中のバイオマーカーのレベルの測定を含む、上皮癌を診断する方法を記載している。

#### 【0011】

膵臓腺癌を早期診断するための特異的かつ高感度バイオマーカーは、現在のところ存在しない。膵臓腺癌が早期（例えば、I期）に発見され得るのであれば、そのような患者の生存期間は大幅に改善され得るため（現在、大部分の患者は、III/IV期で診断され、5年生存率は<5%である）、このことは極めて重要である。早期発見のための非常に正確なバイオマーカーはこのように、患者の予後に顕著に影響を及ぼすと予測される。40

#### 【0012】

したがって、PDACの早期診断を可能にするのみならず、PDACと他の腫瘍、およびPDACと慢性膵炎（CP）を区別するのにも役立つ、マーカーの高感度でかつ特異的なパネルの必要性が存在する。好ましくは、マーカーは、採取するのが容易でかつ非侵襲的である試料中で検出可能であり、その早期中に疾患を発見するのに十分に高感度である。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

10

20

30

40

50

## 【0013】

【特許文献1】WO2004/102189

【特許文献2】WO2004/099432

【特許文献3】WO2000/34787

## 【非特許文献】

## 【0014】

【非特許文献1】Sener et al. (1999) J Am Coll Surg, 189:1-7

【非特許文献2】Yachida S, et al. (2010) Nature 467(7319):1114-1117

【非特許文献3】Kaur et al. (2012) Biomark Med 6(5):597-612

【非特許文献4】Ballehaninna UK, Chamberlain RS, "Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer-A Comprehensive Review", Indian J Surg Oncol, 2011;2:88-100

【非特許文献5】Koomen et al. (2005) Clin Cancer Res, 11:1110-1118

【非特許文献6】Pieper et al. (2004) Proteomics, 4:1159-1174

【非特許文献7】Barrat et al. (2007) Cmaj, 177:361-368

【非特許文献8】Thongboonkerd et al. (2005) Curr Opin Nephrol Hypertens, 14:133-139

## 【発明の概要】

## 【0015】

本発明の第1の局面において、LYVE1、REG1、およびTFF1を含む、膵管腺癌 (PDAC) の診断に有用なバイオマーカーパネルが提供される。本明細書におけるREG1への言及は、REG1AおよびREG1Bを含む。いくつかの態様において、パネルはCA19.9をさらに含み得る。

## 【0016】

本発明の第2の局面において、生物学的試料中のLYVE1、REG1 ( 例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B ) 、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質の発現レベルまたは濃度を検出する段階を含む、膵管腺癌 (PDAC) をスクリーニングまたは検査する方法が提供される。いくつかの態様において、生物学的試料は尿試料である。

## 【0017】

本発明の第3の局面において、膵管腺癌の診断における使用のためのLYVE1、REG1 ( 例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B ) 、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質が提供される。PDACを発見または診断する方法における、LYVE1、REG1 ( 例えば、REG1Aおよび / またはREG1B ) 、ならびにTFF1からなる群より選択されるタンパク質の使用もまた提供される。

## 【0018】

本発明の第4の局面において、生物学的試料中のLYVE1、REG1 ( 例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B ) 、もしくはTFF1、またはこれらの組み合わせの発現レベルまたは濃度を検出する手段を含む、膵管腺癌を検査するためのキットが提供される。

## 【0019】

本発明のさらなる局面において、尿試料中のLYVE1、REG1 ( 例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B ) 、ならびに / またはTFF1の発現レベルを検出する段階を含む、PDACと慢性膵炎を区別する方法が提供される。本方法は、該タンパク質の各々の発現レベルを参照と比較する段階を含み得る。

## 【0020】

本発明のさらなる局面において、生物学的試料中のバイオマーカーパネルタンパク質LYVE1、REG1 ( REG1Aおよび / もしくはREG1B ) 、ならびに / またはTFF1の発現レベルまたは濃度を検出する段階を含む、早期PDAC、例えばI期またはII期PDACを発見または診断する方法が提供される。本方法は、定量化されたタンパク質の各々の発現レベルまたは濃度を参照と比較する段階をさらに含み得る。

## 【0021】

本発明のなおさらなる局面において、生物学的試料中のLYVE1、REG1 ( 例えば、REG1Aお

より / もしくはREG1B)、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質の発現レベルまたは濃度を検出する段階、任意にその発現レベルを対照 / 参照と比較する段階、ならびにPDACが診断されるかまたは疑われる場合に、PDACの処置を進める段階を含む、患者におけるPDACを処置する方法が提供される。生物学的試料中のLYVE1、REG1(例えば、REG1Aおよび / またはREG1B)、ならびにTFF1からなる群より選択される1つまたは複数のタンパク質の発現レベルまたは濃度を決定する段階、任意にその発現レベルを対照 / 参照と比較する段階、ならびに患者の予後を判定する段階を含む、予後診断の方法もまた本発明に含まれる。

#### 【0022】

本発明の態様において、本発明において用いられるバイオマーカーは、別々に使用することができ(すなわち、LYVE1、REG1(例えば、REG1Aおよび / またはREG1B)、ならびにTFF1のうちの1つのみ)、それらは対で使用することができ(例えば、LYVE1ならびにREG1(例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B)、LYVE1ならびにTFF1、またはREG1(例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B)ならびにTFF1)、3つのバイオマーカーを共に使用してもよく(LYVE1およびTFF1の各々、ならびにREG1AまたはREG1Bのうちの1つ)、または4つすべてを使用してもよい(LYVE1、TFF1、REG1A、およびREG1B)。5つめのバイオマーカー、CA19.9もまた使用することができる。本発明の態様において、LYVE1、REG1(例えば、REG1Aおよび / もしくはREG1B)、ならび / またはTFF1の発現レベルは、遺伝子発現を定量化する(例えば、生物学的試料中のmRNAを定量化する)ことにより、またはタンパク質発現を定量化する(例えば、生物学的試料中のタンパク質濃度を定量化する)により、決定することができる。

#### [本発明1001]

生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質の発現レベルまたは濃度を決定する段階を含む、膵管腺癌を検査する方法。

#### [本発明1002]

生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1からなる群より選択される2つのタンパク質の発現レベルまたは濃度を決定する段階を含む、本発明1001の方法。

#### [本発明1003]

生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1の各々の発現レベルまたは濃度を決定する段階を含む、本発明1001の方法。

#### [本発明1004]

REG1タンパク質がREG1Aおよび / またはREG1Bである、前記本発明のいずれかの方法。

#### [本発明1005]

決定する段階が、発現レベルまたは濃度が決定される1つまたは複数のタンパク質に特異的な1つまたは複数の結合分子を用いて行われる、前記本発明のいずれかの方法。

#### [本発明1006]

結合分子が、抗体もしくは抗体断片、タンパク質、またはアブタマーである、本発明1005の方法。

#### [本発明1007]

生物学的試料が、尿、全血、血清、または膵臓組織試料である、前記本発明のいずれかの方法。

#### [本発明1008]

試料がヒトに由来する、前記本発明のいずれかの方法。

#### [本発明1009]

膵管腺癌がI期またはII期膵管腺癌である、前記本発明のいずれかの方法。

#### [本発明1010]

I期PDACと健常患者、I期PDACと慢性膵炎(CP)、またはI期PDACとより後期のPDACを区別する鑑別診断を提供する、前記本発明のいずれかの方法。

#### [本発明1011]

10

20

30

40

50

1つまたは複数のmiRNAの発現レベルまたは濃度を参照と比較する段階をさらに含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]

参照が健常患者由来の生物学的試料である、本発明1011の方法。

[本発明1013]

生物学的試料が、PDACを有するかまたは有する疑いのある患者に由来する、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1014]

CA19.9タンパク質の発現レベルまたは濃度を決定する段階をさらに含む、前記本発明のいずれかの方法。

10

[本発明1015]

膵管腺癌の診断における使用のためのLYVE1、REG1、およびTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質。

[本発明1016]

膵管腺癌の診断における使用のためのLYVE1、REG1、およびTFF1からなる群より選択される2つのタンパク質の組み合わせ。

[本発明1017]

膵管腺癌の診断における使用のためのLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の組み合わせ。

20

[本発明1018]

REG1タンパク質がREG1Aおよび/またはREG1Bである、本発明1015～1017のいずれかの使用のためのタンパク質またはタンパク質の組み合わせ。

[本発明1019]

前記タンパク質が尿タンパク質である、本発明1015～1018のいずれかの使用のためのタンパク質またはタンパク質の組み合わせ。

[本発明1020]

解析される1つまたは複数のタンパク質に特異的な1つまたは複数の結合分子を用いて、発現レベルまたは濃度が測定される、本発明1015～1019のいずれかの使用のためのタンパク質またはタンパク質の組み合わせ。

30

[本発明1021]

結合分子が、抗体もしくは抗体断片、タンパク質、またはアプタマーである、本発明10～20の使用のためのタンパク質またはタンパク質の組み合わせ。

[本発明1022]

膵管腺癌がI期またはII期膵管腺癌である、本発明1015～1021のいずれかのタンパク質またはタンパク質の組み合わせ。

[本発明1023]

生物学的試料中のLYVE1、REG1、もしくはTFF1、またはこれらの組み合わせの発現または濃度を測定する手段を含む、膵管腺癌を検査するためのキット。

[本発明1024]

LYVE1、REG1、またはTFF1のうちの2つの発現または濃度を測定する手段を含む、本発明1023の膵管腺癌を検査するためのキット。

40

[本発明1025]

LYVE1、REG1、またはTFF1の各々の発現または濃度を測定する手段を含む、本発明1023の膵管腺癌を検査するためのキット。

[本発明1026]

REG1タンパク質がREG1Aおよび/またはREG1Bである、本発明1023～1025のいずれかの膵管腺癌を検査するためのキット。

[本発明1027]

測定する手段がバイオセンサーである、本発明1023～1026のいずれかのキット。

[本発明1028]

50

バイオセンサーが、電気化学バイオセンサー、電子バイオセンサー、圧電バイオセンサー、重量測定バイオセンサー、焦電バイオセンサー、イオンチャネルスイッチバイオセンサー、エバネッセント波バイオセンサー、表面プラズモン共鳴バイオセンサー、または生物学的バイオセンサーである、本発明1027のキット。

[本発明1029]

検出する手段が、膜で被覆されたディップスティックを含み、該ディップスティックが

(a) 発現または濃度が測定されるタンパク質に対して特異的親和性を有する非標識結合分子が結合している第1セクション；

(b) 非反応性タンパク質でプロッキングされている第2セクション；および

(c) 発現または濃度が測定される該タンパク質が結合している第3セクション  
を含む、本発明1027のキット。

10

[本発明1030]

生物学的試料を収容するための1つまたは複数の容器をさらに含む、本発明1023～1029のいずれかのキット。

[本発明1031]

生物学的試料からLYVE1、REG1、および/またはTFF1タンパク質を抽出するための1つまたは複数の溶媒をさらに含む、本発明1023～1030のいずれかのキット。

[本発明1032]

1つまたは複数のバイオマーカーの発現の量または濃度を検出する手段がマイクロアレイである、本発明1023～1031のいずれかのキット。

20

【図面の簡単な説明】

【0023】

以下のように、いくつかの図面について言及する。

【図1】候補タンパク質バイオマーカーの尿中濃度。A、健常、慢性膀胱炎(CP)、および膀胱腺癌(PDAC)患者の尿中の、ELISAによって解析されたLYVE1、REG1A、REG1B、およびTFF1タンパク質濃度(クレアチニン標準化)の散布ドットプロット。上部のバー：Kruskal-Wallis / Dunnの事後検定、\*\*\* : P<0.001；B、統計的概要、バイオマーカーの生/クレアチニン標準化データの中央値および四分位範囲(IQR)、尿中クレアチニン(mmol/L)の中央値およびIQR、ならびに試料群による血漿CA19.9を示す。

30

【図2】膀胱腺癌患者を健常対照と識別する際の尿中バイオマーカーの診断能。A、訓練セット(データの70%)における、個々のクレアチニン標準化尿中バイオマーカーに関するPDAC(n=143)対健常(n=59)対象のROC曲線；B、訓練セットおよび独立した検証セット(データの30%:PDAC n=49、健常 n=28)における、パネルに関するPDAC対健常のROC曲線；C、要約表。AUC:曲線下面積、SN:感度、SP:特異度、これらは対応する95%信頼区間(CI)を伴う。検証セットにおけるSNおよびSPは、訓練データセットにおいて決定された最適カットポイントについて導き出される。cnorm:クレアチニン標準化、creat:クレアチニン。

【図3】膀胱腺癌の異なる病期における3つのバイオマーカーの尿中濃度。健常患者(n=87)および疾患発症の異なる病期における膀胱腺癌患者(I～IIA n=16、I～II n=71、III～IV n=77)の尿中の、尿中LYVE1、REG1A、TFF1タンパク質濃度(クレアチニン標準化)の散布ドットプロット。バーは、中央値およびIQR値を示す。上部のバー：Kruskal-Wallis / Dunnの事後検定、\*: P<0.05、\*\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001。

40

【図4】早期膀胱腺癌患者を健常個体と識別する際の尿中バイオマーカーの診断能。A、訓練セット(データの70%)における、個々の尿中バイオマーカーに関するI～II期PDAC(n=56)対健常(n=61)対象のROC曲線；B、訓練セットおよび独立した検証セット(データの30%:PDAC n=15、健常 n=26)における、パネルに関するI～II期PDAC対健常のROC曲線；C、要約表。AUC:曲線下面積、SN:感度、SP:特異度、これらは対応する95%信頼区間(CI)を伴う。検証セットにおけるSNおよびSPは、訓練データセットにおいて決定された最適カットポイントについて導き出される。cnorm:クレアチニン標準化、creat:ク

50

レアチニン。

【図5】早期膵臓腺癌患者を健常個体と識別する際の尿中バイオマーカーパネルおよびCA19.9の診断能。A、健常尿 (n=28) とPDAC I～II期、n=71およびPDAC I～IIA期、n=16 (B) 由来の尿を比較する、バイオマーカーパネルと対応血漿CA19.9の単独および組み合わせのROC曲線。C、要約表。95%信頼区間 (CI) を伴うAUC：曲線下面積、SN：感度、SP：特異度。検証セットにおけるSNおよびSPは、訓練データセットにおいて決定された最適カットポイントについて導き出された。

図5Cの説明文

は37U/mlである

^ CA19.9の最適カットポイント  
+ 尿中パネルが、二分バイオマーカーとして使用された単独の血漿CA19.9と比較して、有意により大きなAUCを与えるかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.973対0.880) 、p=0.05  
\$ 二分バイオマーカーとして使用された血漿CA19.9を加えることにより、AUCが単独の尿中パネルよりも有意に増加するかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.991対0.973) 、p=0.04

++ 尿中パネルが、二分バイオマーカーとして使用された単独の血漿CA19.9と比較して、有意により大きなAUCを与えるかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.971対0.839) 、p=0.006

## 二分バイオマーカーとして使用された血漿CA19.9を加えることにより、AUCが単独の尿中パネルよりも有意に増加するかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.969対0.971) 、p=0.7

【図6】尿プロテオーム解析。A、研究の模式的概要；B、細胞内局在による、同定された全タンパク質の分類；およびC、Ingenuity Pathway Analysisによって決定された機能活性。H：健常、CP：慢性膵炎、PDAC：膵管腺癌、GeLC/MS/MS：SDS-PAGE 液体クロマトグラフィー タンデム質量分析。

【図7】3つの尿中バイオマーカーおよび血漿CA19.9 (CA19.9p) の相関関係。A、相関プロット (濃紺色 / 最も濃い：健常；青緑色 / 最も明るい：慢性膵炎 (CP)；紫色 / 中間：膵臓腺癌 (PDAC))。B、ピアソン相関係数および対応する有意性 (NS：有意でない、\*：P<0.05、\*\*：P<0.01、\*\*\*：P<0.001)。

【図8-1】膵臓腺癌全病期 (A～C) の患者を慢性膵炎患者と識別する際の尿中バイオマーカーの診断能。A、訓練セット (データの70%) における、個々の尿中バイオマーカーに関するPDAC (n=143) 対 CP (n=62) 患者のROC曲線。B、訓練セットおよび独立した検証セット (データの30%：PDAC n=49、CP n=30) における、パネルに関するPDAC 対 CP患者のROC曲線。C、要約表。cnorm：クレアチニン標準化、creat：クレアチニン、95%信頼区間 (CI) を伴うAUC：曲線下面積、SN：感度、SP：特異度。検証セットにおけるSNおよびSPは、訓練データセットにおいて決定された最適カットポイントについて導き出された。

【図8-2】膵臓腺癌I～II期 (D～F) の患者を慢性膵炎患者と識別する際の尿中バイオマーカーの診断能。D、訓練セット (70%、PDAC n=56、CP=66) における個々の尿中バイオマーカーのROC曲線。E、訓練および検証 (PDAC n=15、CP n=26) データセットにおけるパネルのROC曲線。F、要約表。cnorm：クレアチニン標準化、creat：クレアチニン、95%信頼区間 (CI) を伴うAUC：曲線下面積、SN：感度、SP：特異度。検証セットにおけるSNおよびSPは、訓練データセットにおいて決定された最適カットポイントについて導き出された。

【図9】早期膵臓腺癌患者を慢性膵炎患者と識別する際の血漿CA19.9と尿中バイオマーカーパネルの探索的比較。A、CP尿 (n=50) とPDAC I～II期 (n=71) およびI～IIA期 (n=16) (B) 由来の尿を比較する、バイオマーカーパネルと対応血漿CA19.9の単独および組み合わせのROC曲線。C、要約表。95%信頼区間 (CI) を伴うAUC：曲線下面積、SN：感度、SP：特異度。検証セットにおけるSNおよびSPは、訓練データセットにおいて決定された最適カットポイントについて導き出された。

図9Cの説明文：

は37U/mlである

^ CA19.9の最適カットポイント  
+ 尿中パネルが、二分バイオマーカー

10

20

30

40

50

ーとして使用された単独の血漿CA19.9と比較して、有意により大きなAUCを与えるかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.830対0.775) 、p=0.1

\$ 二分バイオマーカーとして使用された血漿CA19.9を加えることにより、AUCが単独の尿中パネルよりも有意に増加するかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.885対0.830) 、p=0.01

++ 尿中パネルが、二分バイオマーカーとして使用された単独の血漿CA19.9と比較して、有意により大きなAUCを与えるかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.871対0.735) 、p=0.004

\$\$ 二分バイオマーカーとして使用された血漿CA19.9を加えることにより、AUCが単独の尿中パネルよりも有意に増加するかどうかを評価するための、関連／対応AUCに対するDeLongの片側検定 (0.866対0.871) 、p=0.6

【図10A】異なる腫瘍における尿中バイオマーカー濃度。人口統計の詳細。この解析の時点では供給源会社によって元のELISAアッセイに実質的修正が加えられていたため、TFF1タンパク質のレベルはこれらの試料において測定されなかった。IPMN (n=33)：膵管内乳頭粘液性腫瘍、AMP (n=26)：膨大部癌、NET (n=18)：神経内分泌腫瘍、CHL (n=24)：胆管癌、DuCA (n=16)：十二指腸癌。

【図10B】異なる腫瘍における尿中バイオマーカー濃度。異なる肝胆道病態ならびに早期の膵臓腺癌 (I~IIA, n=16) およびI~II (n=71) における、尿中LYVE1、REG1A、および血漿CA19.9の散布ドットプロット。この解析の時点では供給源会社によって元のELISAアッセイに実質的修正が加えられていたため、TFF1タンパク質のレベルはこれらの試料において測定されなかった。IPMN (n=33)：膵管内乳頭粘液性腫瘍、AMP (n=26)：膨大部癌、NET (n=18)：神経内分泌腫瘍、CHL (n=24)：胆管癌、DuCA (n=16)：十二指腸癌。バーは、中央値およびIQR値を示す。上部のバー：Kruskal-Wallis / Dunnの事後検定、\* : P<0.5、\* : P<0.01、\*\*\* : P<0.001；示されていない場合、差は統計的に有意でない。

【図11】膵癌組織におけるバイオマーカーパネルタンパク質の発現。A、REG1Aの免疫組織化学的解析：i) 低分化PDACにおけるREG1A、ii) 悪性腺における管腔REG1A。B、TFF1：i) 癌における不均一な発現、ii) 悪性腺における管腔TFF1。C、i) 筋層およびii) 悪性腺周囲の間質中に散在するリンパ管におけるLYVE1発現。D、膵臓腺癌患者のモニタリング中のバイオマーカーレベル：LYVE1、REG1A、およびTFF1は、術前および患者の経過観察中に採取された尿試料で、ELISAを用いて測定された。各点は、特定の時点 (x軸) における対数変換ELISA値を表す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

#### 発明の詳細な説明

##### バイオマーカーパネル

本発明は、LYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1を含む、膵管腺癌 (PDAC) の診断に有用なバイオマーカーパネルを提供する。特に、本発明は、生物学的試料中のLYVE1、REG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される遺伝子またはタンパク質の発現レベルを検出する段階を含む、膵管腺癌 (PDAC) を診断、スクリーニング、または検査する方法を提供する。好みの態様では、LYVE1、REG1、およびTFF1のうちの少なくとも2つが用いられる。より好みの態様では、3つすべてが用いられる。

【0025】

LYVE1は、リンパ管内皮ヒアルロナン受容体および細胞外リンクドメイン含有1 (XLKD1) としても知られており、I型膜内在性糖タンパク質である。コードされるタンパク質は受容体として働き、可溶性および固定化ヒアルロナンの両方に結合する。LYVEに関する参考資料には、NCBI (GenBank) 参照配列転写物NM\_006691.3 (GI:15130120)、NCBIタンパク質ID NP\_006682.2 (GI:40549451)、GeneID:10894、およびHGNC (HUGO (ヒト遺伝子解析機構) 遺伝子命名法委員会遺伝子ID) :14687が含まれる。この遺伝子は4つのスプライス変種を有する；2つはタンパク質をコードしている (全長タンパク質は322アミノ酸を有し、2

10

20

30

40

50

つ目のタンパク質は218アミノ酸を有する）。このタンパク質の完全な配列は以下の通りである。

MARCFSLVLLTSIWTRLLVQGSLRAEELSIQVSCRIMGITLVSKKANQQLNFTEAKEACRLLGLSLAGKDQ  
VETALKASFETCSYGVGDGFVVISRISPNNPKCGKNGVGVLIWKVPVSRQFAAYCYNSSDTWTNSCIPEIITT  
KDPFNTQTATQTTEFIVSDSTYSVASPYSTIPAPTTPPAPASTSIPIRRKKLICVTEVFMETSTMSTETPF  
VENKAASFNEAAGFGGVPTALLVALLFFGAAAGLGFCYVKRYVKAFPFTNKNQQKEMIETKVVKEEKANDSN  
PNEESKKTDKNPEESKSPSKTTVRCLAEV

(SEQ ID NO: 1)

【 0 0 2 6 】

REG1Aは、REG（再生）糖タンパク質のファミリーに属する再生膵島由来タンパク質1を指し、これは膵腺房細胞において発現され、自己分泌および傍分泌増殖因子の両方として働く。Reg遺伝子ファミリーは、4つのサブクラス、I型、II型、III型、およびIV型に分類される多重遺伝子ファミリーである；REG1A遺伝子は、I型サブクラスメンバーである。他のファミリーメンバー：REG1B、REGL、PAP、およびこの遺伝子は、染色体2p12上にタンデムにクラスター化しており、遺伝子重複によって同じ先祖遺伝子から生じた可能性がある。REG1Aは、膵外分泌部により分泌されるタンパク質をコードする。本明細書におけるREG 1への言及は、一般的に記載される2つの遺伝子、すなわちREG1AおよびREG1Bを含み、これらの産物はタンパク質レベルで80%超同一であり、区別することが難しい。したがって本発明において、本方法は、REG1AおよびREG1Bのうちの1つのみの発現または濃度を定量化することができる。本発明の代替の態様においては、REG1AおよびREG1Bの両方の発現または濃度を別々に定量化することができる。本発明のさらなる態様においては、REG1AとREG 1Bが区別され得ず、したがってそれらが共に定量され得る定量化方法を使用することができる。

【 0 0 2 7 】

REG1Aに関する参考資料には、NCBI (GenBank) 参照配列転写物NM\_002909.4 (GI:189491780)、NCBIタンパク質ID NP\_002900.2 (GI:29725633)、GeneID:5967、およびHGNC:9951が含まれる。この遺伝子は4つのスプライス変種（保持イントロン）を有するが、1つのみがタンパク質をコードしている（166アミノ酸）。

MAQTSSYFMLISCLMFLSQSQGQEAQTELPQARISCPEGTNAYRSYCYFNEDRETWVDADLYCQNMNSGNLV  
SVLTQAEAGAFVASLIKESGTDDFNWIGLHDPPKKNRWHWSSGSLVSYKSWGIGAPSSVNPYCVSLTSSTGF  
QWKDVPCEDKFSFVCKFKN

(SEQ ID NO:2)

【 0 0 2 8 】

REG1Bに関する参考資料には、NCBI (GenBank) 参照配列転写物NM\_006507.3 (GI:189491779)、NCBIタンパク質ID NP\_006498.1、GeneID:5968、およびHGNC:9952 NCBIが含まれる。この遺伝子には5つのスプライス変種（保持イントロン）が存在するが、2つのみが166アミノ酸および149アミノ酸のタンパク質をコードする。

MAQTNSFFMLISSLMLSLSQGQESQTELPNPRISCPEGTNAYRSYCYFNEDPETWVDADLYCQNMNSGNLV  
SVLTQAEAGAFVASLIKESSTDDSNWIGLHDPPKKNRWHWSSGSLVSYKSWDTGSPSSANAGYCASLTCSGF  
KKWKDESCCEKKFSFVCKFKN

(SEQ ID NO: 3)

【 0 0 2 9 】

本明細書における「REG1」への言及は、一般にどちらを使用することもできるため、REG1AおよびREG1Bの両方を指すことに留意されたい。しかしながら、いくつかの態様においては、REG1AおよびREG1Bの両方を使用することができる。

【 0 0 3 0 】

TFF1はトレフォイル因子1を指す。TFF1は胃腸管分泌ペプチドのファミリーに属し、これはムチンと相互作用し、粘膜傷害の再構成および修復中に上昇したレベルで発現される。これは上皮細胞をアポトーシス死から保護し、その運動性を高めるが、癌細胞においても同様の中心的役割を果たし、したがって様々な癌種の発生および進行に関与している。TFF1に関する参考資料には、NCBI (GenBank) 参照配列転写物NM\_003225.2 (GI:48928023)、NCBIタンパク質NP\_003216.1 (GI:4507451)、GeneID:7031、およびHGNC:11755が含まれ

10

20

30

40

50

る。

MATMENKVICALVLVSMMLALGT LAEAQTE TCTVAPRERQNC GFGVTPSQC ANKGCCFDDTVRGVPWC FYPNT  
IDVPPEEECEF  
(SEQ ID NO: 4)

【 0 0 3 1 】

本発明の方法は、試料中の癌マーカータンパク質の有無を判定する定的形式で行うことができるが、好ましくは、加えて試料中に存在する癌マーカータンパク質の量の測定値を提供する定量的形式で行うことができる。試料中に存在するマーカータンパク質の量は、上記技法のいずれかを用いて算出することができる。この場合は、アッセイを行う前に、公知の濃度の癌マーカータンパク質を含有する一連の標準試料から、アッセイに用いられるのと同じ検出反応を用いて得られたシグナルを測定することにより、検量線を描く必要があり得る。次いでスクリーニングすべき試料中に存在する癌マーカータンパク質の量を、検量線から推定することができる。

【 0 0 3 2 】

一般に、健常患者由来の対照試料と比較して、被験試料中のバイオマーカーの1つまたは複数が増加していることにより、慢性膵炎および／またはPDACの存在が示される。バイオマーカーの各々の閾値濃度は、患者ごとまたは集団ごとに異なり得る。未処理（「未加工」または「粗製」）尿試料からの標示タンパク質濃度を以下に示す。

	健常	CP	PDAC
LYVE1	≤ 2ng/ml	2-10 ng/ml	≥ 10ng/ml
REG1A	≤ 120 ng/ml	120-500 ng/ml	≥ 500ng/ml
REG1B	≤ 40 ng/ml	40-100 ng/ml	≥ 100ng/ml
TFF1	≤ 2.5ng/ml	2.5-4 ng/ml	≥ 4ng/ml

【 0 0 3 3 】

例えば、試料が2～10ng/ml LYVE1、120～500 ng/ml REG1A、40～100 ng/ml REG1B、および／または2.5～5 ng/ml TFF1を含有する場合に、慢性膵炎が疑われ得る。しかしながら、これらの範囲は標示的であり、当業者は、各タンパク質の濃度が、状況に照らして、例えば試料の起源および行われた可能性のあるその試料の任意の前処理に応じて考慮される必要があることを理解するであろう。関連濃度閾値の範囲に入るバイオマーカーが多ければ多いほど、患者が健常であるか、CPを有するか、またはPDACを有する可能性は高くなる。

【 0 0 3 4 】

例えば、未処理尿試料が、以下の基準の少なくとも1つ（任意に、以下の基準の少なくとも2つ、3つ、または4つ）を満たす場合に、慢性膵炎が疑われ得る：

- a) 2～10ng/ml LYVE1
- b) 120～500 ng/ml REG1A
- c) 40～100 ng/ml REG1B、および／または
- d) 2.5～5 ng/ml TFF1。

【 0 0 3 5 】

未処理尿試料が、以下の基準の少なくとも1つ（任意に、以下の基準の少なくとも2つ、3つ、または4つ）を満たす場合に、PDACが疑われ得る：

- a) 10ng/ml超のLYVE1
- b) 500 ng/ml超のREG1A
- c) 100 ng/ml超のREG1B、および／または
- d) 5 ng/ml超のTFF1。

【 0 0 3 6 】

当然のことながら、本発明のバイオマーカーパネルを用いる診断方法は、例えば、PDACの存在に関して生検標本を試験すること、および／または付加的なバイオマーカー（CA19

10

20

30

40

50

.9など)の使用により、さらに確認することができる。

【0037】

本発明の1つの態様において、本方法は、尿試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質の発現レベルまたは濃度を検出する段階を含み得る。本発明のいくつかの態様において、本方法は、尿試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1のうちの1つのみの発現レベルまたは濃度を定量化する段階を含み得る。本発明の他の態様において、本方法は、LYVE1、REG1、およびTFF1のうちの任意の2つ、例えば、LYVE1ならびにREG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)、LYVE1ならびにTFF1、またはREG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)ならびにTFF1の発現レベルまたは濃度を定量化する段階を含み得る。本発明のいくつかの態様において、本方法は、LYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1のすべての発現レベルを検出する段階を含み得る。本発明のいくつかの態様においては、CA19.9を定量化することもできる。 10

【0038】

膵癌の種類

本発明はPDACの診断に有用である。PDACは、早期PDAC、例えばI期もしくはII期PDACであってよく、または後期PDAC、例えばIII期もしくはIV期PDACであってもよい。しかしながら、本発明は、早期PDAC、特にI期～IIA期PDACを発見する上で特に有用である。

【0039】

本発明の1つの態様において、したがって、尿試料中のLYVE1、REG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)、ならびに/またはTFF1の発現レベルまたは濃度を検出する段階、ならびに検出された発現レベルの各々を1つまたは複数の参照と比較する段階を含む、I期またはII期PDACを診断または発見する方法が提供される。本方法は特に、I期および/またはII期PDACの存在を判定すること、ならびにこれらを健常試料、CP患者、およびIPMN患者と区別することができる。 20

【0040】

PDACの分類は、対がん米国合同委員会 (AJCC) 腫瘍 リンパ節 転移 (TNM) 病期分類システムに従って行われ得る。Tスコアは、主要(原発)腫瘍の大きさ、ならびにそれが膵臓の外側および隣接臓器中に増殖しているかどうかを表す。Nスコアは、隣接(所属)リンパ節への広がりを表す。Mスコアは、癌が身体の他の臓器に転移しているか(広がっているか)どうかを示す。 30

Tx、T0、Tis : TNMシステムを参照されたい

T1 : 腫瘍が膵臓に限局しており、最大径が<2 cm

T2 : 腫瘍が膵臓に限局しており、最大径が>2 cm

T3 : 膵臓外に進展しているが、SMAにも腹腔動脈にも浸潤していない

T4 : SMAまたは腹腔動脈に浸潤している

所属リンパ節 (N)

Nx : リンパ節が評価不可能

N0 : リンパ節転移の所見なし

N1 : 所属リンパ節転移あり 40

転移 (M)

Mx : 転移の存在が評価不可能

M0 : 転移の所見なし

M1 : 遠隔転移あり

【0041】

I期PDACは最も早期であり、この場合、癌は膵臓に限局しており、リンパ節に癌は存在しない。II期では、癌は局所浸潤性である。これらの両段階の癌は、まだ切除可能である; 現在、膵臓癌5件に1件未満 (<20%) が、I/II期で診断されている。本明細書におけるII期PDACへの言及は、IIA期およびIIB期を含む。III期では、癌は膵臓外に広がっており、 50

大血管中にも存在し、そのため切除不可能である。IV期癌は遠隔部位に転移している（この場合も手術による処置は不可能である）。PDACの発見または診断への本発明における言及は、一般に、各期PDAC、特にI期またはII期PDACの発見または診断を指す。癌はこの段階で切除によりまだ処置可能であり、生存率がはるかに改善されることを考慮すると、このような方法は特に有用である。

#### 【0042】

TNMスコアを参照すると、病期分類は以下の通りである。

- 0期 : Tis N0 M0
- Ia期 : T1 N0 M0
- Ib期 : T2 N0 M0
- IIa期 : T3 N0 M0
- IIb期 : T1、T2、またはT3で、N1 M0
- III期 : T4およびM0 (Nは任意)
- IV期 : M1 (Tは任意、Nは任意)

#### 【0043】

##### 生物学的試料

生物学的試料は、尿試料、全血試料、血清試料、または生検標本（臍臍組織試料など）であってよいが、尿試料が特に有用である。本方法は、生物学的試料を採取または提供する段階を含み得るか、または代わりに、試料は、例えばエクスピリ方法で患者から既に採取されたものであってもよい。

20

#### 【0044】

患者から採取された生物学的試料は、必要時まで貯蔵することができる。適切な貯蔵方法には、採取2時間以内の凍結が含まれる。長期貯蔵には、-80°での維持を使用することができる。

#### 【0045】

遺伝子／タンパク質の発現レベルを決定する前に、試料を処理することができる。試料は、濃縮（例えば、定量化するバイオマーカーの濃度を上昇させるため）、遠心分離、または希釈に供することができる。他の態様において、試料はいかなる前処理もされず、未処理で用いられる。

30

#### 【0046】

本発明のいくつかの態様においては、検出および定量化（すなわち、測定）の前に、生物学的試料をタンパク質バイオマーカーについて濃縮することができる。濃縮の段階は、試料中のタンパク質の濃度を上昇させるための任意の適切な前処理法段階であってよい。例えば、濃縮の段階は、試料から細胞または不要な分析物を除去するための遠心分離および／または濾過を含み得る。

#### 【0047】

本発明の方法は、患者由来の1つの被験試料で行うことができる。あるいは、複数の被験試料、例えば2つ、3つ、4つ、または5つの試料を患者から採取することもできる。各試料を、バイオマーカーパネルメンバーの1つを定量化するための単一のアッセイに供することができ、または代わりに、試料を、定量化するバイオマーカーのすべてについて試験することもできる。

40

#### 【0048】

##### 本発明の方法および使用

本発明は、PDACの発見において、ならびに特に早期PDACを後期PDAC、CP、および臍炎と鑑別診断する上で有用なバイオマーカーのパネルを提供する。

#### 【0049】

本発明の1つの態様において、本方法は、

a) 患者から採取された生物学的試料中の関心対象のバイオマーカー、特にタンパク質を検出する段階；および

b) バイオマーカーの各々の発現レベルまたは濃度を定量化する段階

50

を含む。

【0050】

バイオマーカーは、本発明のバイオマーカーパネルに属する。したがって、検出／定量化は、以下のバイオマーカー：

- 1) LYVE1
- 2) REG1 ( REG1A および / または REG1B )
- 3) TFF1
- 4) CA19.9

のうちの1つまたは複数の検出／定量化を含む。

【0051】

10

1つの好ましい態様において、本発明は、バイオマーカーCA19.9と組み合わせた、LYVE1、REG1、およびTFF1からなる群より選択される少なくとも1つのバイオマーカーの解析を含む。

【0052】

遺伝子またはタンパク質の発現レベルは、いくつかの方法で決定することができる。発現レベルは、例えば、試料（尿試料など）中のタンパク質の濃度を決定することによってバイオマーカーを定量化することにより、決定することができる。あるいは、試料（組織試料など）中のmRNAの量を決定することもできる。ひとたび発現レベルまたは濃度が決定されたならば、そのレベルを（同じ対象に由来するが異なる時点で採取された試料、または異なる対象、例えば健常対象由来の試料のいずれか、すなわち対照または参照試料中の）以前に測定された発現レベルまたは濃度と比較して、解析される試料中の発現レベルまたはタンパク質濃度がより高いかまたはより低いかを判定することができる。

20

【0053】

本発明において、LYVE1、REG1、および / または TFF1 のうちの1つまたはすべてにおける、健常患者と比較した発現（およびしたがってタンパク質濃度）の増加は、PDACまたはCPを示す。このパネルは、早期PDACを正確に診断する上で特に有用である。すべてのパネルメンバーと共に利用することによって、偽陰性および偽陽性を最小限にすることもできる。偽陽性および偽陰性の発生率をさらに低下させるために、CA19.9をバイオマーカーパネル中に含めることもできる。

【0054】

30

タンパク質発現のレベルを検出する方法には、当技術分野で公知の任意の方法が含まれる。例えば、タンパク質レベルは、DNAまたはmRNAアレイを用いて間接的に測定することができる。あるいは、タンパク質レベルは、タンパク質合成のレベルを測定するかまたはタンパク質濃度を測定することにより、直接測定することもできる。

【0055】

DNAおよびmRNAアレイ（マイクロアレイ）は、DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドの一連の微細なスポットを含み、各スポットは相補的核酸分子と結合し得るヌクレオチドの特有の配列を有する。このような方法でオリゴヌクレオチドはプローブとして用いられ、正確な標的配列のみが高ストリンジエンシー条件下でプローブにハイブリダイズする。本発明において、標的配列は、発現が検出されるタンパク質に相当するコードDNA配列もしくはその特有の部分であるか、または標的配列は、発現が検出されるタンパク質に相当する転写mRNA配列もしくはその特有の部分のいずれかである。

40

【0056】

タンパク質発現を直接測定すること、および所与の試料中に発現されているタンパク質を同定することは、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれか1つによって行うことができる。例えば、2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D-PAGE）は伝統的に、複雑なタンパク質混合物を分離するため、および正常組織と罹患組織のタンパク質発現パターンの違いを検出するための最適なツールである。正常試料と腫瘍試料との間で観察される差次的発現タンパク質は、2D-PAGEによって分離され、タンパク質染色および差次的パターン解析によって検出される。あるいは、2次元ディファレンスゲル電気泳動（2D-DIGE）

50

を使用することもでき、この場合には2D電気泳動の前に、異なるタンパク質試料を蛍光色素で標識する。電気泳動が行われた後、ゲルを各色素の励起波長で次々にスキャンする。この技法は、例えば健常対象由来の試料と罹患対象由来の試料を比較する場合など、タンパク質存在量の変化を検出する上で特に有用である。

#### 【0057】

一般的に、電気泳動に供されたタンパク質はまた、質量分析法によってさらに特徴づけられる。そのような質量分析法には、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) が含まれ得る。

#### 【0058】

MALDI-TOFは、より慣習的なイオン化法によってイオン化された場合に脆弱で分解する傾向のある生体分子（タンパク質、ペプチド、および糖など）の解析を可能にするイオン化技法である。イオン化はレーザー光（例えば、窒素レーザー）によって誘発され、生体分子を直接的なレーザー光曝露による破壊から保護し、気化およびイオン化を促進するために、マトリックスが用いられる。溶液中で試料をマトリックス分子と混合し、少量の混合物を表面上に置き、乾燥させる。溶媒が蒸発するにつれて、試料とマトリックスは共結晶化する。

#### 【0059】

タンパク質マイクロアレイを用いて、タンパク質発現を直接検出することもできる。タンパク質マイクロアレイは、固体表面に固定された捕捉分子を含むという点で、DNAおよびmRNAマイクロアレイと似ている。捕捉分子は最も一般的には、検出するタンパク質に特異的な抗体であるが、血清中の抗体が検出される場合には抗原が使用され得る。さらなる捕捉分子には、タンパク質、アプタマー、核酸、受容体、および酵素が含まれ、検出するタンパク質に対する市販抗体が入手できない場合には、これらが好ましいと考えられる。タンパク質アレイ上で使用するための捕捉分子は、外部で合成し、精製し、アレイに付着させることができる。あるいは、捕捉分子はインサイチューで合成し、アレイに直接付着させることもできる。捕捉分子は、生合成、無細胞DNA発現、または化学合成を通して合成することができる。インサイチュー合成は、後者の2つで可能である。したがって、固体支持体上に固体化された、定量化するバイオマーカーの各々に特異的な補足分子（抗体など）を含むタンパク質マイクロアレイが提供される。本発明の1つの態様において、マイクロアレイは、LYVE1、REG1 ( REG1Aおよび / またはREG1B ) 、ならびにTFF1タンパク質の各々に特異的な捕捉分子を含む。

#### 【0060】

ひとたびマイクロアレイ上に捕捉されたならば、検出方法は、当技術分野で公知のもののいずれかであってよい。例えば、蛍光検出を用いることができる。蛍光検出は、安全で、高感度であり、かつ高分解能を有し得る。他の検出方法には、他の光学的方法（例えば、比色解析、化学発光、無標識表面プラズモン共鳴解析、顕微鏡法、反射率等）、質量分析法、電気化学的方法（例えば、ボルタメトリーおよび電流測定法）、ならびに高周波法（例えば、多極共鳴分光法）が含まれる。

#### 【0061】

タンパク質濃度を決定するさらなる方法には、LC-MS、UPLC、またはタンデムUPLC-MS/MSシステムなどの、質量分析法および / または液体クロマトグラフィーが含まれる。

#### 【0062】

ひとたび発現レベルまたは濃度が決定されたならば、そのレベルを（同じ対象に由来するが異なる時点で採取された試料、または異なる対象、例えば健常対象由来の試料のいずれか、すなわち対照または参照試料中の）以前に測定された発現レベルまたは濃度と比較して、解析される試料中の発現レベルまたは濃度がより高いかまたはより低いかを判定することができる。本発明の方法は、該検出または定量化を対照または参照と相関させて、PDACが存在するか否かを判定する段階をさらに含み得る。該相関段階はまた、特定の種類のPDACの存在を検出して、これらの患者を、PDACも膵癌も存在しない健常患者と、またはCPもしくは膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) に罹患している患者と区別し得る。例えば、本

10

20

30

40

50

方法は、早期PDAC、特にⅠ期および／またはⅡ期PDACを発見し得る。該相関段階は、パネルバイオマーカーのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の量を、参照試料中の、例えば健常患者から採取された生物学的試料中の対応するバイオマーカーの量と比較する段階を含み得る。一般に、本方法は、参照試料中の対応するバイオマーカーの量を決定する段階を含まず、代わりにそのような値は前もって決定されている。しかしながら、いくつかの態様において、本発明の方法は、対照として用いられる健常患者から本方法の段階を実行する段階を含み得る。あるいは、本方法は、以前の時点における同じ患者由来の試料から得られた参照データを使用し得る。このようにして、任意の処置の有効性を評価することができ、患者の予後を判定することができる。

## 【0063】

10

内部対照、例えばバイオマーカーパネルの一部ではない1つまたは複数の異なるバイオマーカーの定量化を使用することもできる。これにより、試料中のバイオマーカーの相対量に関する有用な情報が提供され得、異なる集団による任意の変動、または試料の採取、処理、もしくは貯蔵の方法によって導入された変化に関して、結果を調整することが可能となり得る。

## 【0064】

当業者には明らかなように、分析物の濃度または発現の任意の測定値は、使用する被験試料の種類および／または解析の前に行われた被験試料の処理を考慮に入れて、標準化することが必要とされ得る。データ標準化はまた、生物学的に関連性のある結果を同定するのにも役立つ。不变のバイオマーカーを用いて、試料の適切な処理を決定することができる。異なる試料間で差次の発現算出を行い、統計的有意性を決定することもできる。

20

## 【0065】

一般に、本発明の方法は、  
 a) 尿試料などの生物学的試料を提供する段階；  
 b) 例えばmiRNA用の試料を濃縮するために、任意に試料を処理する段階；および  
 c) バイオマーカーを定量する段階  
 を含み得る。

## 【0066】

30

本方法は、  
 d) 段階d) からのタンパク質発現のレベルを対照または参照試料と比較する段階  
 をさらに含み得る。

## 【0067】

本発明のいくつかの態様において、定量段階は、以下の段階：  
 a) 試料を、関心対象のバイオマーカーに特異的に結合する結合パートナーと接触させる段階  
 b) バイオマーカー 結合パートナーの量を定量化して、元の試料中に存在するバイオマーカーの量を決定する段階  
 を含み得る。

## 【0068】

40

したがって本発明は、関心対象のタンパク質バイオマーカー、または関心対象のタンパク質バイオマーカーを含有する生物学的試料（尿試料など）のいずれかを含む反応混合物を提供し、ここで関心対象のタンパク質バイオマーカーは、タンパク質バイオマーカーに特異的な各結合パートナーに結合している。結合パートナーは、例えば、関心対象のタンパク質バイオマーカーに特異的に結合する抗体であつてよい。1つの態様において、反応混合物は、抗体などの各選択的結合分子に結合しているLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質を含む。選択的結合分子は外因性である。

## 【0069】

本発明のいくつかの態様において、本方法は、測定されたバイオマーカーをPDAC、特にⅠ期またはⅡ期PDACと相関させる段階を含む。したがって本発明は、患者における膵臓疾患を認定するか、または膵臓疾患の有無を判定する方法を提供し、本方法は、生物学的試

50

料（尿試料など）中の1つまたは複数の関連バイオマーカーの量を測定する段階、および測定されたバイオマーカーを病期と相関させる段階を含む。病期は、慢性膵炎、I期PDAC、またはより後期のPDACであってよい。あるいは、患者が健常であること、すなわち膵臓疾患が存在しないことが決定され得る。

【0070】

上記のように、本発明の方法は、検出する1つまたは複数のタンパク質に特異的な外因性の結合分子または試薬を用いて行うことができる。「外因性の」とは、結合分子または試薬が、解析を受ける試料に添加されているという事実を指す。結合分子および試薬とは、検出する1つまたは複数のタンパク質に対して親和性を有する分子であり、その結果、それらは当技術分野で公知の任意の方法を用いて検出され得る結合分子／試薬 タンパク質複合体を形成することができる。本発明の結合分子は、抗体、抗体断片、タンパク質、またはアプタマー、もしくは分子的に刷り込まれた重合体構造であってよい。本発明の方法は、生物学的試料を適切な1つまたは複数の結合分子と接触させる段階を含み得る。該結合分子は本発明のキットの一部を形成してよく、特にそれらは本発明のバイオセンサーの一部を形成してよい。

【0071】

抗体にはモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方が含まれ得、当技術分野で公知の任意の手段によって生成することができる。特定のタンパク質に結合するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を生成する技法は、当技術分野において今日、十分に開発されている。それらは、標準的な免疫学教科書、例えば、Roitt et al., *Immunology*, second edition (1989), Churchill Livingstone, Londonにおいて考察されている。ポリクローナル抗体は、適切な動物宿主（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ニワトリ、ヤギ、またはサル）において、抗原を動物に注射してその產生を刺激することによって生成させることができる。必要ならば、抗原と共にアジュバントを投与してもよい。抗体はその後、抗原への結合によって、またはさらに下記にて説明されるように精製することができる。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから產生され得る。これらは、不死細胞株を形成するために、骨髄腫細胞と、所望の抗体を產生するBリンパ球細胞を融合することによって形成することができる。これは、周知のKohlerおよびMilstein技法 (Kohler & Milstein (1975) *Nature*, 256:52-55) である。抗体はヒトもしくはヒト化であってよく、または他の種に由来してもよい。

【0072】

適切な抗体の調製後、抗体は、一般的に利用可能ないくつかの技法（例えば、Harlow & Lane eds., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Pressにおいて記載されているようなもの）の1つによって、単離または精製することができる。一般に、適切な技法には、ペプチドもしくはタンパク質アフィニティーカラム、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) もしくは逆相HPLC (RP-HPLC)、プロテインAもしくはプロテインGカラムでの精製、またはこれらの技法の組み合わせが含まれる。組換えまたはキメラ抗体は、標準法に従って調製し、ELISA、ABC、ドットプロットアッセイを含む一般に利用可能な手順を用いて、特異性についてアッセイすることができる。

【0073】

本発明は、抗原に結合し得る抗体誘導体を含む。したがって、本発明は抗体断片および合成構築物を含む。抗体断片および合成構築物の例は、Dougall et al. (1994) *Trends Biotechnol*, 12:372-379に示されている。

【0074】

Fab、 $F(ab')_2$ 、またはFvなどの抗体断片または誘導体を使用することができ、Huston et al. (1993) *Int Rev Immunol*, 10:195-217によって記載されているような一本鎖抗体 (scAb)、ドメイン抗体 (dAb)、例えば単一ドメイン抗体、または抗体様の単一ドメイン抗原結合性受容体を使用することもできる。抗体断片および免疫グロブリン様分子に加えて、ペプチド模倣物または非ペプチド模倣物を、抗体の結合活性を模倣するように設計することもできる。Fv断片を修飾して、一本鎖Fv (scFv) 分子として公知の合成構築物を生成す

10

20

30

40

50

ることができる。これは、分子の安定性に寄与する、VH領域およびVL領域を共有結合するペプチドリンカーを含む。したがって本発明はまた、一本鎖抗体またはscAbにまで及ぶ。

#### 【0075】

他の合成構築物にはCDRペプチドが含まれる。これらは、抗原結合決定基を含む合成ペプチドである。これらの分子は通常、CDRループ構造を模倣し、抗原相互作用性側鎖を含む、高次構造的に制限された有機環である。合成構築物にはキメラ分子も含まれる。したがって、例えば、ヒト化（もしくは靈長類化）抗体またはその誘導体も本発明の範囲内にある。ヒト化抗体の一例は、ヒトフレームワーク領域を有するが、齧歯類の超可変領域を有する抗体である。合成構築物には、抗原結合に加えて何らかの望ましい特性を分子に提供する、共有結合された部分を含む分子もまた含まれる。例えば、その部分は、標識（例えば、蛍光標識もしくは放射性標識などの検出可能な標識）または薬学的に活性のある薬剤であってよい。

#### 【0076】

結合分子が抗体または抗体断片である本発明の態様において、本発明の方法は、当技術分野で公知の任意の免疫学的技法を用いて行うことができる。例えば、ELISA、放射免疫測定法、または類似の技法を使用することができる。一般に、適切な自己抗体を固体表面上に固定化し、試験すべき試料を自己抗体と接触させる。自己抗体によって認識される癌マーカータンパク質が試料中に存在すると、抗体マーカー複合体が形成される。次いで複合体を管理するか、または例えばマーカータンパク質のエピトープを特異的に認識する標識2次抗体を用いて定量的に測定することができる。2次抗体は、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP）などの生化学的マーカーで標識することができ、複合体の検出は、発色、化学発光、または蛍光産物を生じる酵素の基質を添加することによって達成することができる。あるいは、複合体の存在は、検出可能な標識、例えば適切な酵素で標識されたマーカータンパク質を添加することによって決定することもできる。この場合、測定された酵素活性の量は、形成された複合体の量に反比例し、試料中の抗原の存在を決定するには参考として陰性対照が必要である。複合体を検出する別の方法では、放射性同位元素で標識された抗体または抗原を使用し、その後放射活性を測定することができる。抗原に対する放射性標識の例には、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、および<sup>125</sup>Iが含まれる。

#### 【0077】

アプタマーとは、特定の標的分子と結合するオリゴヌクレオチドまたはペプチド分子である。オリゴヌクレオチドアプタマーには、DNAアプタマーおよびRNAアプタマーが含まれる。アプタマーは、ランダム配列オリゴヌクレオチドまたはペプチドのプールからのインビトロ選択過程によって作出することができる。アプタマーは任意に、それらの標的分子の存在下で自己切断するように、リボザイムと組み合わせることができる。

#### 【0078】

アプタマーは、当技術分野で公知の任意の過程によって作製され得る。例えば、アプタマーが同定され得る過程は、指數関数的濃縮によるリガンドの系統的進化（SELEX）である。これは、標的分子への選択的結合に基づいた分割と、続く再増幅により、分子のライブラリーの複雑性を繰り返し減少させることを含む。潜在的アプタマーのライブラリーを標的タンパク質と共にインキュベートした後、非結合メンバーを結合メンバーから分割する。複雑度の減少したライブラリー（濃縮プール）を生成するために、結合メンバーを回収し、（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法によって）増幅させる。濃縮プールを用いて、2サイクル目のSELEXを開始する。標的タンパク質に対する後続の濃縮プールの結合を、サイクルごとにモニターする。結合分子の割合が適切なレベルまで上昇していると判断された時点で、濃縮プールをクローニングする。次いで、結合分子を個々に解析する。SELEXは、Fitzwater & Polisky (1996) Methods Enzymol, 267:275-301に概説されている。

#### 【0079】

したがって、本発明の1つの態様において、患者由来の生物学的試料（尿試料など）を、定量化するバイオマーカータンパク質に特異的な試薬または結合分子と接触させる段階

10

20

30

40

50

、およびタンパク質 試薬複合体またはタンパク質 結合分子複合体の量を測定する段階、およびタンパク質 試薬複合体またはタンパク質 結合分子複合体の量を、生物学的試料中の関連タンパク質の濃度と相関させる段階を含む、PDACまたはCPを診断する方法が提供される。例えば、本発明の1つの態様において、本方法は、

a) 生物学的試料(尿試料など)を、LYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1のうちの1つまたは複数に特異的な試薬または結合分子と接触させる段階；

b) LYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1のうちの1つまたは複数について、タンパク質 試薬複合体またはタンパク質 結合分子複合体の量を定量化する段階；ならびに

c) タンパク質 試薬複合体またはタンパク質 結合分子複合体の量を、生物学的試料中のタンパク質LYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1のうちの1つまたは複数の濃度と相関させる段階

を含む。

#### 【0080】

本方法は、d)段階c)におけるタンパク質の濃度を参照と比較して、PDACまたはCPの有無を判定する段階をさらに含み得る。次いで、それに応じて患者を処置することができる。本発明のいくつかの態様において、本方法は、生物学的試料を、LYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1のうちの1つ、2つ、または3つ、およびいくつかの態様においてはパネルバイオマーカーのすべてに特異的な試薬または結合分子と接触させる段階を含む。さらなる態様において、生物学的試料を、CA19.9に特異的な試薬または結合分子と付加的に接触させることにより、CA19.9を含めることもできる。適切な試薬または結合分子には、抗体もしくは抗体断片、酵素、核酸、細胞小器官、細胞、生物学的組織、刷り込み分子、または小分子が含まれ得る。そのような方法は、本発明のキットまたはバイオセンサーを用いて行うことができる。

#### 【0081】

本発明はまた、生物学的試料中、特に尿試料中のLYVE1、REG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質の発現レベルまたは濃度を検出する段階を含む、膵管腺癌の診断方法を提供する。本発明の1つの態様において、本方法は、生物学的試料中、特に尿試料中のLYVE1、REG1 (REG1Aおよび/またはREG1B)、ならびにTFF1からなる群より選択される2つのタンパク質の発現レベルを検出する段階を含み得る。本発明のいくつかの態様において、本方法は、生物学的試料中、特に尿中の、LYVE1、TFF1、ならびにREG1AおよびREG1Bのいずれかまたは両方の発現レベルを検出する段階を含み得る。本発明のバイオマーカーパネルはまた慢性膵炎も検出し得るため、CPを診断する類似の方法もまた提供される。

#### 【0082】

膵管腺癌の存在は、健常対照対象から採取された試料中の対応する遺伝子またはタンパク質の発現レベルまたはタンパク質濃度と比較して、遺伝子発現またはタンパク質濃度が増加していることを検出することによって、判定することができる。加えて、発現レベルまたは濃度を用いて、PDACとCPを区別することもできる。これは、被験試料中に見出される発現レベルまたは濃度を、CPを呈する患者において見られるものと(または参照と)比較することによって達成され得る。さらに、バイオマーカーを用いて、PDACと膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)を区別することもできる。これは、被験試料中に見出される発現レベルまたは濃度を、IPMNを呈する患者において見られるものと(または参照と)比較することによって行われ得る。

#### 【0083】

本発明のさらなる態様において、膵管腺癌(PDAC)またはCPの診断における使用のためのLYVE1、REG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質が提供される。本発明の1つの態様において、PDACまたはCPの診断における使用のためのLYVE1、REG1、およびTFF1のうちの2つの組み合わせ(例えば、LYVE1ならびにREG1 (REG1Aおよび/もしくはREG1B)、LYVE1ならびにTFF1、

10

20

30

40

50

またはREG1 ( REG1Aおよび / もしくはREG1B ) ならびにTFF1 ) が提供される。本発明の別の態様において、PDACまたはCPの診断における使用のためのLYVE1、REG1 ( REG1Aおよび / またはREG1B ) 、ならびにTFF1のうちの3つの組み合わせが提供される。PDACまたはCPの診断における使用のためのLYVE1、REG1A、REG1B、およびTFF1の4つすべての組み合わせもまた提供される。本発明のいくつかの態様においては、これらのバイオマーカーパネルをさらにCA19.9と組み合わせることもできる。

#### 【 0 0 8 4 】

本発明の別の態様において、患者から採取された生物学的試料（特に尿試料）中の、LYVE1、REG1 ( REG1Aおよび / またはREG1B ) 、ならびにTFF1からなる群より選択される1つまたは複数のバイオマーカーを定量化する段階、その値を、定量化されたバイオマーカーの各々に対する参照と比較する段階、ならびに検出された値が参照よりも高い場合に（またはPDACが診断されるかもしくは疑われる場合に）、PDACの処置を施す段階を含む、患者におけるPDACを処置または予防する方法が提供される。PDACを処置する方法は、膵腫瘍を切除する段階、ならびに / または化学療法および / もしくは放射線療法を患者に施す段階を含み得る。バイオマーカーは、遺伝子発現のレベルを決定すること（例えば、mRNA濃度を決定すること）によって、またはタンパク質濃度を決定することによって、定量化することができる。いくつかの態様においては、LYVE1、REG1 ( REG1Aおよび / またはREG1B ) 、ならびにTFF1の各々を定量化する。CA19.9もまた、そのような方法で定量化することができる。

#### 【 0 0 8 5 】

本発明のPDACを処置する方法は、早期PDACの処置に特に有用である。PDACを予防する方法は、後期PDACの予防に特に有用である。いくつかの態様において、この処置方法は、生物学的試料中に特定濃度のバイオマーカータンパク質を有すると同定された患者において行われる。該濃度は、PDACを示す濃度である。したがって、本発明の方法を用いてPDACまたはCPが診断された患者において、任意の膵腫瘍を切除する段階、ならびに / または化学療法および / もしくは放射線療法を施す段階を含む、PDACまたはCPを処置する方法が提供される。

#### 【 0 0 8 6 】

本発明のなさらなる態様において、尿試料中のLYVE1、REG1 ( REG1Aおよび / もしくはREG1B ) 、ならびにTFF1、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるタンパク質の発現レベルを検出する段階、その発現レベルを対照と比較する段階、ならびにPDACまたはCPが診断されるかまたは疑われる場合に、PDACまたはCPの処置を進めるか否かを決断する段階を含む、PDACまたはCPの処置に対する患者の適合性を判断する方法が提供される。

#### 【 0 0 8 7 】

本発明のいくつかの態様において、本方法は、PDACまたはCPが発見されるかまたは疑われる場合に、患者をPDACまたはCPについて処置する段階をさらに含み得る。PDACまたはCPが、尿、血液、または血清試料の解析に基づいて発見されるかまたは疑われる場合、PDACまたはCPの存在は、例えば膵臓組織の試料中のバイオマーカーの存在および / または量を検出することによって確認することができる。したがって本発明の方法は、膵臓組織試料中のバイオマーカーの量を検出または決定する段階をさらに含み得る。膵臓組織試料は患者から以前に採取されたものであってよく、または本方法は該膵臓組織試料を採取もしくは提供する段階を含み得る。膵臓組織試料の解析はまた、組織学的解析を含み得る。

#### 【 0 0 8 8 】

可能であれば、PDAC（特にI期およびII期PDAC）の処置は腫瘍の切除を含む。処置は、あるいはまたは加えて、化学療法および / または放射線療法による処置を含み得る。化学療法による処置は、ゲムシタビンおよび / またはFolfirinoxの投与を含み得る。Folfirinoxは、フルオロウラシル (5-FU)、イリノテカン、オキサリプラチニン、およびフォリン酸（ロイコボリン）の組み合わせである。Folfirinoxを含む処置計画は、オキサリプラチニン、続いてフォリン酸、続いてイリノテカン（あるいはイリノテカンはフォリン酸と同時に投与され得る）、続いて5-FUの投与を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0089】

PDACの治療（例えば、化学療法および／または放射線療法）を以前に受けた患者から採取された生物学的試料中の関心対象のバイオマーカーの少なくとも1つの発現レベルを決定する段階を含む、治療に対する患者の反応性をモニターする方法もまた提供される。いくつかの態様においては、発現レベルを、治療を受ける前の患者から採取された試料中の1つまたは複数の同じバイオマーカーの発現レベルと比較する。次いで、発現レベルの比較に基づいて、その治療を継続するか、または代替治療を試みるかについて決断を下すことができる。

## 【0090】

1つの態様において、したがって、

10

- a) 膵癌またはPDACの治療を以前に受けた患者から採取された生物学的試料中の関心対象の少なくとも1つのバイオマーカーまたはそれらの組み合わせの発現レベルを決定する段階；
- b) 段階a)において決定された1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルを、1つまたは複数の同じバイオマーカーの以前に決定された（すなわち、膵癌またはPDACの処置の前に決定された）発現レベルと比較する段階；および
- c) 膵癌またはPDACの治療を維持する、変更する、または中止する段階を含む方法が提供される。

## 【0091】

本方法は、膵癌またはPDACの治療を患者に施す前段階を含み得る。別の態様において、本方法はまた、治療の施行前に同じ患者から採取された生物学的試料中の関心対象の少なくとも1つのバイオマーカーまたはそれらの組み合わせの発現レベルを決定する前段階を含み得る。段階c)では、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルの適切な調整が判定される場合に、膵癌またはPDACの治療を維持することができる。例えば、膵癌またはPDACにおいて上方制御されることが見出されているバイオマーカーの1つまたは複数の発現が減少している場合に、処置を維持することができる。発現レベルが十分に変化して、例えば健常または低リスクレベルと見なされ得る発現レベルに戻っている場合に、膵癌またはPDACの処置を中止することができる。発現レベルが変化していないか、または悪化している（例えば、膵癌またはPDACにおいて上方制御されることが見出されているバイオマーカーの1つまたは複数の発現が増加している）場合、これは患者の状態の悪化を示している可能性があり、したがって膵癌またはPDACの代替治療を試みることができる。このようにして、膵癌またはPDAC（特に早期PDAC）の処置に有用な薬物候補をスクリーニングすることができる。

20

## 【0092】

本発明の別の態様において、

- (a) 患者から採取された生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1からなる群より選択される1つまたは複数のタンパク質の発現または濃度を定量化する段階；
- (b) 候補薬物を患者に投与する段階；
- (c) 候補薬物の投与後のある時点で、同じ患者から採取された生物学的試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1からなる群より選択される1つまたは複数のタンパク質の発現または濃度を定量化する段階；ならびに
- (d) 段階 (a)において決定された値を、段階 (c)において決定された値と比較する段階を含む、PDACの処置に有用な薬物を同定する方法が提供され、2つの試料間でタンパク質の1つまたは複数の発現レベルまたは濃度が低下していることにより、薬物候補がPDACの可能な処置として見なされる。いくつかの態様において、本方法は、パネルバイオマーカータンパク質のすべてを使用し、すなわち段階 (a) および段階 (c) において、LYVE1、REG1、およびTFF1のすべてを定量化しなくてはならない。いくつかの態様において、生物学的試料は尿試料である。いくつかの態様において、薬物は化合物、抗体、または抗体断片である。

30

## 【0093】

40

50

### キットおよびバイオセンサー

本発明のなおさらなる態様において、LYVE1、REG1 ( REG1A および / もしくは REG1B ) 、もしくはTFF1、またはこれらの組み合わせの発現または濃度を定量化する手段を含む、臍管腺癌を検査するための部品のキットが提供される。手段は、任意の適切な検出手段であつてよい。

#### 【 0 0 9 4 】

例えば、手段はバイオセンサーであつてよい。いくつかの態様において、手段は、膜で被覆されたディップスティックを含んでよく、この膜には、第1セクション上で、検出されるタンパク質に対して特異的親和性を有する非標識結合分子（抗体または抗体断片など）が結合している。この膜はまた、任意の分子が膜のその部分に結合するのを防ぐために非反応性タンパク質でブロッキングされているセクションを含み得る。この膜はまた、試料中で検出されるタンパク質が結合しているセクションを含み得る。検出すべきさらなる各タンパク質が、ディップスティックの1つのセクション上に結合している、そのさらなるタンパク質と特異的に結合し得る対応する抗体、および任意に、ディップスティックの別のセクション上に結合している、検出すべきそのさらなるタンパク質を有するように、本発明の異なるタンパク質の検出用に設けられた異なるセクションを持たせることによって、ディップスティックを、單一アッセイにおいて2つ以上のタンパク質を検出するよう 10 に装備することができる。キットはまた、1つもしくは複数の試料用の容器、および / または生物学的試料からバイオマーカーを抽出するための溶媒を含み得る。キットはまた使用説明書を含み得る。

#### 【 0 0 9 5 】

本発明のいくつかの態様において、LYVE1、REG1、およびTFF1のうちの少なくとも2つの発現または濃度を検出する手段を含む、臍管腺癌またはCPを診断するための部品のキットが提供される。本発明のさらなる態様において、LYVE1、REG1、およびTFF1の3つすべての発現または濃度を検出する手段を含む、臍管腺癌またはCPを診断するための部品のキットが提供される。バイオマーカーを検出する手段は、定量化するバイオマーカーと特異的に結合するかまたは反応する試薬であつてよい。

#### 【 0 0 9 6 】

本発明の部品のキットは、バイオセンサーであつてよい。バイオセンサーは、生物学的感知要素を組み入れ、生物学的試料についての情報、例えば分析物の存在（もしくは非存在）または濃度を提供する。具体的には、それらは、分析物（タンパク質など）の検出および / または定量化のために、生体認識成分（生体受容体）と生理化学的検出器を組み合わせる。

#### 【 0 0 9 7 】

生体受容体は、関心対象の分析物と特異的に相互作用するかまたは結合し、例えば、抗体もしくは抗体断片、酵素、核酸、細胞小器官、細胞、生物学的組織、刷り込み分子、または小分子であつてよい。生体受容体は、支持体、例えば、金属、ガラス、もしくはポリマー支持体、またはヒドロゲル支持体などの三次元格子支持体上に固定化され得る。

#### 【 0 0 9 8 】

バイオセンサーは、存在するバイオトランスデューサーの種類に従って分類される場合が多い。例えば、バイオセンサーは、電気化学バイオセンサー（電位差測定バイオセンサーなど）、電子バイオセンサー、圧電バイオセンサー、重量測定バイオセンサー、焦電バイオセンサー、またはイオンチャネルスイッチバイオセンサーであつてよい。トランスデューサーは、存在する分析物の量が正確に決定され得るように、関心対象の分析物と生体受容体との相互作用を定量化可能なシグナルに変換する。光学バイオセンサーは、生体受容体と関心対象の分析物との相互作用によって生じる表面プラズモン共鳴に依存し得る。したがってSPRを用いて、被験試料中の分析物の量を定量化することができる。他の種類のバイオセンサーには、エバネッセント波バイオセンサー、ナノバイオセンサー、および生物学的バイオセンサー（例えば、酵素、核酸（DNAなど）、抗体、エピジェネティック、細胞小器官、細胞、組織、または微生物バイオセンサー）が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0099】

ディップスティックは、バイオセンサーの別の例である。本発明のディップスティックは膜を含み得る。ディップスティックは、発現が検出されるタンパク質に対して特異的親和性を有する非標識抗体が結合している第1セクション、非反応性タンパク質でブロッキングされている第2セクション、および発現が検出される該タンパク質が結合している第3セクションをさらに含み得る。

## 【0100】

当技術分野で公知のディップスティック技法を用いて、本発明の方法を迅速にかつ効率的に行うことができる。ディップスティック技法は以下を含む。検出されるタンパク質（抗原）に対して特異的親和性を有する、例えばホルマザンで標識された標識抗体を、被験液体の試料中に溶解する。ニトロセルロース膜が載せられたディップスティックを、反応混合液中に浸漬する。この膜は、その抗原に対して特異的親和性を有する非標識抗体が結合している1つのセクションを有する。第2セクションには抗体がなく、標識抗体が膜に結合するのを防ぐために、非反応性タンパク質でブロッキングされている。抗原が結合している、ディップスティックの第3セクションが提供される。被験液体中の遊離抗原と、膜に結合している非標識抗体との間で反応が起こり、遊離抗原と、試料に添加された標識抗体との間でも反応が起こる。これにより、膜の第1セクション上で非標識結合抗体／抗原／標識抗体のサンドイッチが生じる。反応はまた、第3セクション上で標識抗体と結合抗原との間でも起こる。膜の第2セクション上では反応は起こらない。

## 【0101】

反応は、一定時間または完了が視覚的に判定されるまで進行させる。ホルマザンは高度に着色された色素であるため、反応したホルマザン標識抗体は第3セクションに色を付与し、および抗原が被験液体中に存在するのであれば、第1セクションにも色を付与する。第2セクション上では反応は起こらないため、そのセクション上では発色しない。したがって第2セクションは、陰性対照として働く。未反応のホルマザン粒子およびわずかな程度に未反応のホルマザン標識抗体の吸収により、第2セクションを含む膜全体にわたって色が付与される場合には、抗原の存在は、膜の第1セクションと第2セクションの色の違いによって示される。第3セクションは、適切な反応が実際に起こっていることを実証することにより、陽性対照として提供される。

## 【0102】

ディップスティックを混合液中に浸漬する時間の長さは、抗原が存在する場合に膜の第1セクションと第2セクションとの間で色強度の違いが生じ得る長さである。大部分の抗体抗原反応については、発色は本質的に30～60分以内に完了する。必要であれば、単にディップスティックを取り出し、膜の第1セクションにわたる色強度を視覚的に検査し、次いで必要に応じてディップスティックを再度浸漬することにより、ディップスティックの発色をモニターすることができる。色強度のさらなる変化が見られない場合に、反応は完了したと見なすことができる。

## 【0103】

ディップスティックは、当技術分野において公知の任意の従来法によって調製することができる。例えば、ニトロセルロース膜をディップスティックの下端に載せる。非標識一次抗体を含有する溶液を膜の1つのセクションに加えて、一次抗体を膜に結合させる。ブロッキング剤（例えば、1%血清アルブミン）を含有する溶液を膜の別のセクションに加えて、後に一次タンパク質が膜に結合するのを防ぐ。

## 【0104】

検出する1つまたは複数のさらなるタンパク質に対して特異的親和性を有する標識抗体が結合しているさらなるセクション、および任意に、検出されるタンパク質が結合しているセクションを含めることによって、ディップスティックを、一度に2つ以上のタンパク質を検出するように装備することができる。そのような場合、検出されるタンパク質に対して特異的親和性を有する標識抗体を試料に添加することができ、その結果、ディップスティックのそのさらなるセクションへのそれらの結合、およびひいては試料中のそれらの

10

20

30

40

50

存在が検出される。抗体は、同じ色素または異なる色素で標識することができる。ホルマザン以外の適切な色素には、酸性色素（例えば、アントラキノンもしくはトリフェニルメタン）、アゾ色素（例えば、メチルオレンジもしくはディスパースオレンジ1）、蛍光色素（例えば、フルオレセインもしくはローダミン）、またはクマシーブルー、アミドブラック、トルイジンブルー、ファストグリーン、墨汁、硝酸銀、および乳酸銀などの当技術分野で公知の任意の他の適切な色素が含まれる。予め標識された一次タンパク質反応物は抗体に限定されず、これには、試料中の検出されるべき二次タンパク質に対して特異的親和性を有する任意のタンパク質または他の分子が含まれ得ることもまた明白である。

#### 【0105】

本発明はまた、定量化するバイオマーカーの各々に対して特異的な捕獲分子（抗体など）を含むタンパク質マイクロアレイ（プロテインチップとしても公知である）を提供し、この場合に捕獲分子は固体支持体上に固定化されている。固体支持体は、スライド、膜、ビーズ、またはマイクロタイタープレートであってよい。スライドはスライドガラスであってよい。膜はニトロセルロース膜であってよい。アレイは定量的多重ELISAアレイであってよい。マイクロアレイは、本発明の方法において有用である。

10

#### 【0106】

特に、本発明は結合分子の組み合わせを提供し、ここで各結合分子は異なる標的分析物と特異的に結合し、分析物の結合分子の組み合わせは、LYVE1、REG1、もしくはTFF1、またはこれらの組み合わせ、および任意にCA19.9に特異的に結合する。

#### 【0107】

20

結合分子は、アレイなどの固体基板上に存在し得る。結合分子は、すべてが同じ固体基板上に存在し得る。あるいは、結合分子は異なる基板上に存在し得る。本発明のいくつかの態様において、結合分子は溶液中に存在する。

#### 【0108】

これらのキットは、緩衝溶液などの付加的な成分をさらに含み得る。他の成分には、結合したタンパク質を検出するためのプローブまたは標識分子、およびしたがって標識を行うために必要な試薬（すなわち、酵素、緩衝液等）；結合緩衝液；非結合のまたは非特異的に結合したmiRNAをすべて除去するための洗浄溶液が含まれ得る。標的分析物への結合分子の結合は、標準的なまたは実験的に決定された条件下で起こり得る。当業者は、測定するバイオマーカーに応じて、どのようなストリンジエント条件が必要であるかを認識するであろう。ストリンジエント条件は、非特異的結合を減少させるのに十分高い温度を含み得る。

30

#### 【0109】

使用されるタンパク質アレイは、解析されるバイオマーカーの存在および／または濃度を決定するために蛍光標識を使用し得るが、他の標識を使用することもできる（親和性、光化学的、または放射性同位元素タグ）を使用することもできる。表面プラズモン共鳴（SPR）、カーボンナノチューブ、カーボンナノワイヤーセンサー、および微小電気機械システム（MEMS）カンチレバーなどの無標識検出方法を使用することもできる。近赤外蛍光検出は、特にニトロセルロース被覆スライドガラスを用いる定量的検出に特に有用であり得る。

40

#### 【0110】

抗体アレイを用いる定量的タンパク質解析は、シグナル増幅、多色検出、および競合置換技法を含み得る。他の技法にはプロテインチップを解析するための走査型電子顕微鏡法（SEMP）が含まれ、これは、後方散乱電子検出を利用することによる、スライドガラス上に整列されたリガンドまたはタンパク質と特異的に相互作用する標的被覆金粒子の計数を含む。したがって、本発明の方法は、被験試料の定量的解析を達成するために、バイオマーカータンパク質とそれら各々の特異的結合分子との相互作用を計数する段階を含み得る。定量的タンパク質検出および解析は、例えば、Barry & Solovier, "Quantitative protein profiling using antibody arrays", Proteomics, 2004, 4(12):3717-3726において考察されている。

50

## 【0111】

本発明の1つの態様において、尿試料中のLYVE1、REG1、およびTFF1タンパク質の各々の濃度を決定する段階、およびそのように決定された値を参照と比較する段階を含む、早期膵管腺癌 (PDAC) を診断する方法が提供される。タンパク質の各々の濃度が参照値よりも高い場合に、早期PDACが存在する可能性があり、それに応じて患者を処置することができる。

## 【0112】

本発明の第2の局面およびそれに続く局面の特徴は、変更すべきところは変更して、本発明の第1の局面と同様である。

## 【0113】

10

以下の実施例を参照して本発明をこれからさらに説明するが、実施例は例証の目的のためだけに存在し、本発明を限定するものと解釈されるべきでない。

## 【実施例】

## 【0114】

## 臨床標本

健常、CP、およびPDAC尿標本を、発見段階に関してRoyal London Hospital (RLH) から (n=18)、ならびに検証目的のためにRLHおよびUniversity College London (後に併せて「LON」と称する)、the Department of Surgery, Liverpool University (「LIV」)、およびthe CNIO Madrid, Spain (「SPA」) から (合計で尿371件) 入手した。他の良性および悪性の肝胆道病態を有する患者の尿試料 (n=117) は、LIVから入手した。試料はすべて、関連センターから倫理審査の全面的な承認を得て、および尿試料を供与した全個人からインフォームドコンセントを得て採取した。いずれの参加センターにおける標本も、同一の標準操作手順を用いて採取した：クリーンキャッチ中間尿を採取し、採取の2時間以内に凍結し、使用時まで-80°で貯蔵した。重要なことには、試料はすべて、腎疾患の病歴のない患者に由来した；潜在的ビリルビン血症、タンパク尿、細菌汚染、および血尿を排除するために、ディップスティック検査解析 (Bayer multistix SG 08935414) もまた行った。試料は、手術または化学療法処置の前に採取した。CA19.9を測定するための対応する血漿試料は、RLHおよびLIVから入手可能であった。

20

## 【0115】

## 尿プロテオームのGeLC-MS/MS解析

30

各群 (H、CP、およびPDAC) につき尿試料6件 (男性3件および女性3件；合計で試料18件) を使用した：H 男性 / 女性の年齢45、50、60歳 / 44、45、54歳；CP男性 / 女性の年齢46、48、51歳 / 47、69、74歳；PDAC 男性 / 女性の年齢44、74、84歳 / 71、73、77歳；男性のPDAC病期は全員がIIB / 女性は2名がIB、1名がIIA。尿試料はすべて、以前に記載されているように (Weeks ME et al. "Analysis of the urine proteome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma", Proteomics Clinical Applications 2008; 2:1047-57) 脱塩し、濃縮した。1群当たり試料3件の各前処理済みプール20 μgを、4~12%ミニゲル (Invitrogen) にて2つ組で分離した；女性と男性の尿を別々に解析した。ゲルをColloidal Coomassieで染色し、各試料レーンを、グリッドを用いて40個の同じ大きさのスライスに切断した。ゲルスライスをトリプシンでロボット制御により消化し、結果として得られたペプチドを、LTQ Orbitrap XLタンデム質量分析計 (ThermoFisher) に接続されたnanoAcquity (Waters) を用いてナノLC/MS/MSにより解析した。Mascotを用いて産物イオンデータをヒトIPIタンパク質データベースに対して検索し、続いて非重複タンパク質リストへの照合のためにScaffold ソフトウェア (Proteome Software) で解析した。逆データベース検索を用いて偽発見率を評価し、標的タンパク質FDRは試料当たり<0.5%とした。PDAC、CP、および健常試料間の相対タンパク質存在量の半定量的評価は、スペクトル計数アプローチ (Liu H et al., "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics", Analytical Chemistry, 2004; 76:4193-201) を用いることにより得た。

40

## 【0116】

50

### 尿中バイオマーカーおよびCA19.9の測定

尿中の総タンパク質濃度は、Bradfordアッセイ (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce) により決定した。ヒトLYVE-1 (Cat# SEB049Hu, Uscn Life Science Inc.) およびヒトTFF1 (Cat# ELH-LYVE1-001, RayBiotech, Inc.) の定量的決定は、製造業者の説明書に従って行った：ヒトReG1Aレベルは、最初は本発明者らの研究室で、その後BioVendor Analytical Testing Service (BioVendor - Laboratori medicina a.s) により評価した。評価する各タンパク質について、精製標準物質を用いて検量線を作成した。製造業者の説明書に従って、4パラメータロジスティック回帰により曲線の当てはめを達成した。ELISAアッセイの各々の検出限界および変動係数 (CV) は、以下の通りであった：LYVE-1 - 8.19 pg/ml、アッセイ内CV - 9%、アッセイ間CV - 12%、TFF1 - 0.037 ng/ml、アッセイ内CV - 9%、アッセイ間CV - 12%。REG1A - 0.094 ng/ml、アッセイ内CV - 9%、アッセイ間CV - 20%；REG1B - 3.13 pg/ml、アッセイ内CV - 3.9%、アッセイ間CV - 2.7%。尿中クレアチニンは、Clinical Biochemistry Laboratory, RLH (London, UK) において、Roche Cobas 8000システム ((Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてJaffe法により測定された。血漿中のCa19.9のレベルは、通例の手順に従ってRoche Modular E170装置を用いて、Clinical Biochemistry Laboratory, RLHにおいて測定された。

### 【0117】

#### 組織マイクロアレイおよび免疫組織化学検査 (IHC)

バイオマーカーの発現を評価する際に使用した組織マイクロアレイおよびスコアリング手順の詳細は、以前に記載されている (Ene-Obong A et al., "Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtaglomerular compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma", Gastroenterology, 2013; 145:1121-32)。IHCは、標準プロトコール (sCC1、1Hインキュベーション) に従って、Ventana Discoveryシステムを使用して抗REG1A抗体 (Abcam、ウサギポリクローナル、ab47099、1:100希釈)、抗TFF1抗体 (Abcam、ウサギポリクローナル、ab50806、1:100希釈)、および抗LYVE1抗体 (Acris、ウサギポリクローナル、DP3500PS、1:100希釈) を用いて行った。

### 【0118】

#### 統計解析

MSデータから潜在的尿中バイオマーカーを同定するため、Arraytrackソフトウェア (<http://edkb.fda.gov/webstart/arraytrack>) およびt検定を用いて、標準化データ (スペクトルカウント / 試料の和に基づく) に対して統計解析を行った。任意の2つの試料群間のp値および変化倍率の両方に従って、データにさらにフィルターをかけた。

### 【0119】

続いて、選択されたタンパク質 (LYVE1、REG1A、およびTFF1) の濃度をELISAアッセイを用いて調べ、得られた結果を、GrafPadPrismでノンパラメトリックKruskal-Wallis検定を用いて、その後Dunnの事後検定を用いて解析した。3つのバイオマーカー間の相関関係を、ピアソン相関係数を用いて評価した。

### 【0120】

ROC解析およびホールドアウトアプローチを用いて、それぞれ個々のバイオマーカーおよびパネルを、それらがPDAC患者 (全病期または早期I~II) と対照試料 (健常およびCP) を識別する能力について調べた。各比較について、患者および対照データセット中の対象の70%を、訓練データセットに組み入れるために無作為に選択した。次いで、ロジスティック回帰を適用した。タンパク質濃度データはすべて、回帰分析の前に、自然対数変換し平均中心化した。個々のバイオマーカー解析においては、クレアチニン標準化データを用いて、尿希釈係数を補正した；パネル解析については、モデルに3つのバイオマーカーを含め (クレアチニン標準化の前に)、クレアチニンおよび年齢について調整した (PDAC患者の年齢中央値が、健常およびCP個体のものよりも高かったため、表1)、すなわち5パラメータモデル。PDAC全病期 対 健常、PDAC I~II期 対 健常、PDAC全病期 対 CP、およびPDAC I~II期 対 CPの比較のために、別々のモデルを訓練データセットに適用した。上

記の回帰モデルの各々について、ROC曲線を作成した；曲線下面積（AUC）、ならびに群間を識別するための「最適」カットポイントにおける感度（SN）および特異度（SP）を得た。最適カットポイントは、ROC平面中のプロットの左上部分に最も近い点に一致し（座標0,1）、最適なSNおよびSPは、以下の基準に従った：

R「pROC」パッケージ (Robin X et al., "pROC: an open-source package for R and S+ to analyse and compare ROC curves", *BMC Bioinformatics*, 2011; 12:77) の「ci.閾値」手順により算出して、

最少 $((1 - \text{感度})^2 + (1 - \text{特異度})^2)$ 。

このアプローチは、バイオマーカーの最適カットポイントの推定において良好な性能を有することが示されている。

10

#### 【0121】

対象の残り（30%）は、モデル検証のために用いられる独立したデータセットを形成した。一次解析（全PDAC 対 健常）については、49件のPDAC試料および28件の健常試料が、片側検定を用いて、1.0という標準化差（すなわち、標準偏差が少なくとも1のPDAC試料と健常試料との間の差）を検出する、90%超の検出力を付与する。

#### 【0122】

訓練データセットに基づいて開発されたロジスティック回帰モデルに従って、検証データセットにおいて各試料を分類し、この分類を実際の診断と比較し、後に新たなROC曲線を導き出すことにより、検証を実施した。訓練セットに関して計算された最適カットポイントを用いて、検証データセットのSNおよびSPを導き出した。DeLongの漸近厳密法に基づいてAUCの信頼区間（CI、95%）を導き出して、AUCの不確実性を評価した (DeLong ER et al., "Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach", *Biometrics*, 1988; 44:837-45). ; SNおよびSP、95% CIは、Carpenter J & Bithell J., "Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians", *Stat Med*, 2000; 19:1141-64.) に記載されているように、パーセンタイル法と共にノンパラメトリック層化再抽出（2,000のブートストラップ複製物）を用いて導き出した。関連 / 対応AUCに対して DeLongの片側検定を用いて、AUCを比較した。

20

#### 【0123】

探索的解析に関して、ROC曲線は、利用可能な全試料を用いたロジスティック回帰モデリングに基づいて、PDAC I～IIA期 対 健常またはCPの比較について導き出した。

30

#### 【0124】

ROC曲線解析は、Epi、pROC <http://CRAN.R-project.org/package=Epi>、およびROCR (Sing T et al., "ROCR: visualizing classifier performance in R.", *Bioinformatics*, 2005; 21:3940-1) パッケージからの手順を用いて、Rバージョン2.13.0 (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/foundation>) で行った。

#### 【0125】

##### 尿プロテオーム

PDAC、CP、および健常（H）個体に由来する18件の尿標本（1群当たり6件、男性3件、女性3件）のGeLC/MS/MSによる徹底的なプロテオミクス解析（図6A）を行った。この解析により、およそ1,500個（男性尿において1,198個および女性尿において1,061個）の非重複タンパク質が同定された。これらのタンパク質はすべての細胞区画に由来し、IPA (Ingenuity pathway analysis, <http://www.ingenuity.com/>) を用いていくつかの細胞機能および疾患に対してマッピングされ、このことから、尿がそれらの起源および機能的役割に関して多様なタンパク質の豊富な供給源を提供することが確認された。

40

#### 【0126】

男性および女性対象由来の尿試料において、MS解析を別々に行った。かなりの性別特異的な差が認められた：健常尿試料において同定された997個のタンパク質のうち、398個（40%）は男性尿に特有であり、118個（12%）は女性尿に特有であり、481個（48%）は両方に共通であった。

50

## 【 0 1 2 7 】

3つの実験群（PDAC、CP、H）の間で差次的に発現されるおよそ200個の中で、男性および女性の両方で共通して調節解除される3つのタンパク質：LYVE1、REG1A、およびTFF1が、統計（p値、変化倍率）、潜在的候補に関する予備知識についての膵臓発現データベース（PED）（<http://www.pancreasexpression.org/>）およびさらなる文献検索の両方の問い合わせ、ならびにまた市販のELISAアッセイの利用可能性に基づいて、さらなる評価のために選択された。プロテオミクスデータにおけるREG1Bは、わずかにより優れた候補であると考えられたが、その時点ではREG1A ELISAアッセイしか市販されていなかった。しかしながら、REG1B ELISAが利用可能となった時点で、尿試料のサブセットを試験し、同様の結果が得られた（後述）。尿標本中の、フルサイズタンパク質としての3つの選択されたバイオマーカー：LYVE1では35kDa、REG1Aでは19kDa、およびTFF1では9kDaの存在が、ウェスタンプロット実験によって確認された（データは示さず）。

10

## 【 0 1 2 8 】

PDACを発見する際のバイオマーカーパネル

続いて、3つのセンター：LondonおよびLiverpool, UK、ならびにMadrid, Spainから収集された371件の尿試料に対してELISAアッセイを用いて、選択されたバイオマーカーを評価した。研究に含めた患者および健常参加者の人口統計および臨床的特徴を、表1（次ページ）に示す。

## 【 0 1 2 9 】

（表1）健常および患者コホートの人口統計および臨床的特徴

20

正常			CP			PDAC			病期／n 血漿	
症例 (n)	性別	年齢範囲 (中央値)	症例 (n)	性別	年齢範囲 (中央値)	症例 (n)	性別	年齢範囲 (中央値)		
<b>ION</b>	87	M=46 F=41	28 - 87 (55)	45	M=32 F=13	29 - 82 (53)	60	M=38 F=22	29 - 82 (64)	I=4/4 IIA=1/1 IIB=13/13 III=33/30 IV=6/5 U=3/3
血漿 (CA19.9)	28	M=16 F=12	28-67 (46)	19	M=14 F=5	29-74 (54)	56	M=34 F=22	29-82 (64)	10
<b>LIV</b>	0	N/A	N/A	41	M=25 F=16	29 - 82 (51)	91	M=53 F=38	39 - 83 (68)	I=3/3 IIA=8/8 IIB=42/42 III=38/38 IV=0/0 U=0/0
血漿 (CA19.9)	0	N/A	N/A	31	M=17 F=14	37-73 (51)	91	M=53 F=38	39-83 (68)	20
<b>SPA</b>	0	N/A	N/A	6	M=4 F=2	54 - 68 (57)	41	M=23 F=18	43 - 94 (72)	I=0/NA II=0/NA III=0/NA IV=0/NA U=41/NA
血漿 (CA19.9)	0	N/A	N/A	0	N/A	N/A	0	N/A	N/A	
<b>合計</b>	<b>87</b>	M=46 F=41	28 - 87 (55)	<b>92</b>	M=61 F=31	29 - 82 (54)	<b>192</b>	M=114 F=78	29 - 94 (68)	I=7/7 IIA=9/9 IIB=55/55 III=71/68 IV=6/5 U=44/3
血漿 (CA19.9)	<b>28</b>	M=16 F=12	28-67 (46)	<b>50</b>	M=31 F=19	29-74 (53)	<b>147</b>	M=87 F=60	29-83 (67)	30

## 【0130】

PDAC I ~ IV期 対 健常

ELISA解析から、健常試料 (n=87) と比較した場合に、PDAC患者 (n=192) の尿中の各候補バイオマーカーの尿中濃度が有意により高いことが示された（いずれもp<0.0001、図1）。留意すべきは、REG1BとREG1AのELISAアッセイが、同様の結果をもたらしたことである（図1）。

## 【0131】

PDACでは、LYVE1、REG1A、およびTFF1が相互に正に相関していたのに対して、健常試料では、LYVE1とREG1Aしか相関していなかった（図7）。受信者動作特性 (ROC) 曲線解析を用いて、LYVE1、REG1A、およびTFF1の診断能を確認した（図2）。最初に、訓練データセット（試料の70%、それぞれn=143およびn=59）において、PDAC I ~ IV期尿と健常尿を識別する際のそれら個々の性能を評価した。個々の（クレアチニン標準化）尿中バイオマーカーは2つの群を識別することができ、AUC値はLYVE1に関して0.851 (95%CI 0.801 ~ 0.902)

、REG1に関して0.823 ( 95%CI 0.766 ~ 0.879 ) 、およびTFF1に関して0.686 ( 95%CI 0.606 ~ 0.765 ) であり、各SNは76.9% ( 95%CI 69.3 ~ 83.2 ) 、62.2% ( 95%CI 53.8 ~ 69.9 ) 、および72.7% ( 95%CI 65.0 ~ 79.7 ) であり、各SPは88.1% ( 95%CI 79.6 ~ 96.6 ) 、94.9% ( 95%CI 88.1 ~ 100.0 ) 、および59.3% ( 95%CI 47.5 ~ 71.2 ) であった ( 図2A、C ) 。次いで3つのバイオマーカーを組み合わせて、クレアチニンおよび年齢について調整したパネルにした ( 図2B ) 。訓練データセットおよび検証データセット ( 試料の30%、PDAC n=49、健常 n=28 ) における、ROC解析の根底にあるロジスティック回帰モデルの結果を、図2BおよびCに示す。パネルは、訓練および検証データセットのそれぞれにおいて、AUCが0.891 ( 95%CI 0.847 ~ 0.935 ) および0.921 ( 95% CI 0.863 ~ 0.978 ) でSN >75%およびSP >85%を達成し、したがって個々のバイオマーカーのどれよりも優れた性能を示す。 10

### 【 0 1 3 2 】

#### PDAC早期 対 健常

次に、早期癌を健常個体と識別する際のバイオマーカーの能力を評価した。腫瘍病期の情報は、148名 ( 77% ) のPDAC患者について入手可能であった。各バイオマーカーの濃度は、健常者 ( n=87 ) と比較して、より後期 ( III ~ IV期、n=77、いずれもp<0.001 ) 、I ~ II期 ( n=71、いずれもp<0.001 ) 、およびI ~ IIA期 ( リンパ節転移のない局所浸潤性疾患、n=16、p<0.05 ) で有意に上昇していた ( 図3 ) 。LYVE1およびTFF1の濃度は、I期癌においてもより高かった ( それぞれp<0.001およびp<0.05 ; データは示さず ) 。限られた数のI期尿試料しか入手できなかつたため ( n=7 ) 、組み合わせPDAC I ~ II期データについての尿中マーカーの診断精度を評価した。最初に、新たな訓練データセット ( 試料の70% ; それぞれPDAC I ~ II期 n=56および健常 n=61 ) において、PDAC I ~ II期尿と健常尿を識別する際の個々のマーカーおよびパネルの性能を評価した。この訓練データセットを用いて新たな5パラメータモデルを構築し、データの残り ( 試料の30% ; PDAC I ~ II期 n=15、健常 n=26 ) を用いて検証した ( 図4A、B ) 。パネルは、訓練および検証データセットのそれぞれにおいて、AUC 0.900 ( 95% CI 0.843 ~ 0.957 ) および0.926 ( 95% CI 0.843 ~ 1.000 ) を達成した ( 図4C ) 。したがって、尿中バイオマーカーパネルは、高精度で早期PDAC試料を健常試料とで区別し得る。 20

### 【 0 1 3 3 】

探索的解析として、CA19.9値が得られ得るように、対応する血漿試料が入手可能である個体からの尿試料を選択した。血漿CA19.9 ( 37 U/mLという臨床的に確立された閾値のカットオフを有するカテゴリー変数として ) 、パネル、およびパネルとCA19.9の組み合わせについて、ROC曲線を導き出した。PDAC I ~ II期 ( n=71 ) 対 健常 ( n=28 ) 試料の比較について、AUCはCA19.9では0.880 ( 95%CI 0.947 ~ 0.999 ) であり、パネルでは0.973 ( 95%CI 0.947 ~ 0.999 ) が得られ、これは単独の血漿CA19.9よりも有意に大きかった ( p=0.005 ) 。パネルに血漿CA19.9を加えることで、AUCは0.991 ( 95%CI 0.979 ~ 1.000 ) まで有意に増加した ( p=0.04、図5A/C ) 。PDAC I ~ IIA期 ( n=16 ) を健常試料と比較した場合、AUCはCA19.9では0.839 ( 95%CI 0.719 ~ 0.959 ) であり、パネルでは0.971 ( 95%CI 0.929 ~ 1.000 ) であった ( p=0.006 ) 。血漿CA19.9をパネルに加えても、何の改善も認められなかった ( AUC=0.969、95%CI 0.924 ~ 1.000、p=0.7、図5B/C ) 。 30

### 【 0 1 3 4 】

#### PDACをCPと区別する際のバイオマーカーパネル

PDACをCPと区別する際のバイオマーカーパネルの能力を評価した。 40

### 【 0 1 3 5 】

#### PDAC I ~ IV期 対 CP

全3つのバイオマーカーの尿中濃度は、CP試料 ( N=92 ) と比較してPDAC試料 ( n=192 ) において、いずれもp<0.001を有してより高く ( 図1 ) 、PDACと同様に、CPデータにおいてもバイオマーカー濃度は相互に正に相関していた ( 図7 ) 。訓練データセット ( PDAC n=143 、CP n=62 ) において、LYVE1およびREG1は、SN 77 ~ 78%およびSP 66 ~ 69% ( それぞれのAUC値は0.775 ( 95%CI 0.704 ~ 0.846 ) および0.722 ( 95%CI 0.643 ~ 0.801 ) ) を有して2つの群を識別することができたのに対して ( 図8 ) 、TFF1のSPは、同様のSNに対して50%に届く 50

にすぎなかった。3つのバイオマーカーを組み合わせてパネルにすると、訓練データセット (AUC= 0.815、95%CI 0.752 ~ 0.878) および検証データセット (PDAC n=49、CP n =30、AUC= 0.839、95%CI 0.751 ~ 0.928) において評価した場合に、単独のLYVE1およびREG1の性能がわずかに改善されただけであった。

#### 【 0 1 3 6 】

PDAC早期 対 CP

バイオマーカー尿中濃度は、CP (n=87) と比較してI ~ II期 PDAC (n=71) において、3つのバイオマーカーのそれぞれについてp<0.001を有して有意に上昇していた (データは示さず)。パネルは、訓練データセット (PDAC I ~ II期 n=56、CP n=66) および検証データセット (PDAC I ~ II期 n=15、CP n=26) の両方において高いSN (>85%) を達成したが、個々のバイオマーカーについて認められたSPと同様に、SPは比較的低く (66.7%および50%)、それぞれのAUCは0.831 (95%CI 0.762 ~ 0.901) および0.846 (95%CI 0.730 ~ 0.963) であった (図8D ~ F)。

#### 【 0 1 3 7 】

以前と同様に、パネルを血漿CA19.9と組み合わせて調べた。PDAC I ~ II期 (n=71) 対 CP (n=50) 試料の比較では、ROC曲線は、CA19.9に関して0.775 (95%CI 0.699 ~ 0.852)、パネルに関して0.830 (95%CI 0.759 ~ 0.902) (p=0.1)、およびCA19.9と組み合わせたパネルに関して0.885 (95%CI 0.825 ~ 0.945) (単独のパネルに対する優位性についてp=0.01) のAUCを示した (図9A/C)。PDAC I ~ II期 (n=16) 対 CPの比較では、ROC曲線は、CA19.9に関して0.735 (95%CI 0.609 ~ 0.861)、パネルに関して0.871 (95%CI 0.770 ~ 0.972) (血漿CA19.9に対する優位性についてp=0.004)、および組み合わせに関して0.866 (95%CI 0.749 ~ 0.984) (p=0.6) のAUCを示した (図9B/C)。したがって、パネルは、I ~ II期をCPと区別する上でCA19.9よりも良好に働いた。

#### 【 0 1 3 8 】

他の肝胆道病態の尿中のバイオマーカー発現

最後に、いくつかの他の良性または悪性肝胆道病態を有する患者から採取された尿標本中のバイオマーカーの発現を調べ、早期PDAC患者における発現と比較した (図10)。PDAC I ~ II期試料におけるLYVE1の尿中レベルは、IPMN、AMP、および膵臓NET標本よりも高かった；REG1Aレベルは唯一、IPMNと比較して早期PDACにおいて有意により高かった。血漿CA19.9レベルは、膵臓NETおよびDuCA試料と比較してPDAC I ~ II期において有意により高かった。このことから、他の良性または悪性肝胆道病態を早期PDACと区別する際のLYVE1およびREG1Aの潜在的有用性が示唆され得る。

#### 【 0 1 3 9 】

3つのバイオマーカーの組織起源

早期癌患者を健常個体と区別する際のパネルの良好な性能が実証され、次に膵臓組織におけるバイオマーカーの発現を確認しようと努めた。自家構築のPDAC組織マイクロアレイを用いて、免疫組織化学検査 (IHC) を行った。REG1Aの強力な発現は、組織学的に正常な隣接腺房細胞において認められたが、染色はまた44/60の腫瘍 (73%) においても認められた (図11A)。TFF1は正常膵臓には存在しなかったが、PDACの43/60 (72%) において発現されていた (図11B)。LYVE1発現は癌細胞のいずれにおいても認められなかっが、PDAC組織8件のリンパ管において稀に認められた (図11C)。次に、全3つのバイオマーカーのレベルを、手術の前後に試料が採取された7名のPDAC患者由来の尿で測定した (図11D)。おそらくは術後に腫瘍量が実質的に減少したために、すべての患者において、LYVE1およびREG1Aのレベルが術後に低下し、これはTFF1に関しても患者7名のうち6名において認められた (患者1以外、この場合、最初の術後尿試料は手術の4ヶ月後に採取された)。

#### 【 0 1 4 0 】

最後に、いくつかの報告により、CA19.9もまた尿中に存在し、癌診断に使用することができ、場合によっては血中CA19.9よりもさらに優れていることが示されたため、尿試料中のCA19.9レベルを測定し、それらを対応する血漿CA19.9と比較した。尿中CA19.9は、この場合にPDAC尿をCPおよび健常尿と区別する上で有用ではないことが判明した (データは示

さす)。

【0141】

PDACは、発見するのが最も難しい癌の1つである；したがって患者の大部分は疾患の進行期で来院する。それ故に、PDAC患者の20%未満が治癒の可能性のある手術を受ける一方、残りの患者は対症療法が提供され得るにすぎない。ここで、高精度で早期PDAC患者を健常対象と識別する3バイオマーカー尿中パネルが記載される。尿標本に基づく診断検査が開発されたが、それは、この体液が、複雑度がはるかに低く、解析のための「不活性」でかつ安定した基質を提供し、十分な量を繰り返しかつ非侵襲的に採取することができるという、血液に勝るいくつかの利点を有するためである。これまで、尿中で2,300を超えるタンパク質が検出されており、その中の少なくとも1/3が全身性起源のものである。血液の限外濾過液だということで、バイオマーカーの少なくともいくつかは、血液中よりも尿中においてより高濃度で見出されることが予測され得る。

【0142】

組み合わせた場合、REG1AおよびTFF1、LYVE1は、90%を上回る精度でI～II期PDAC患者を発見し得る効果的な尿中パネルを形成する。探索的解析により、CA19.9と組み合わせた場合に、精度が向上し得ることが示唆される。加えて、パネルは、I～IIA期の患者を健常者と識別する上で有用であると判明し得る。

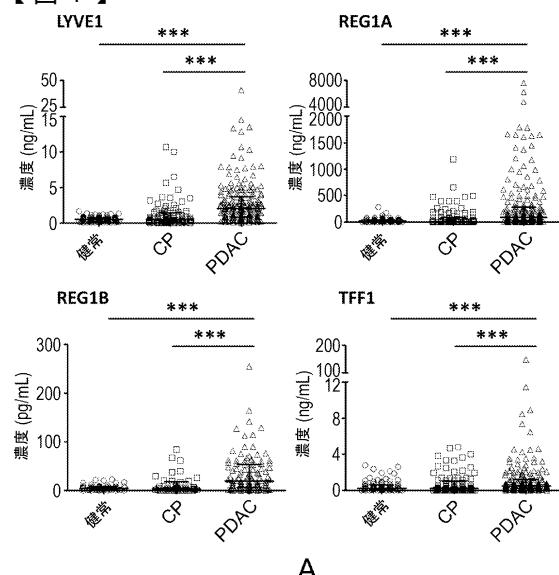
【0143】

この尿スクリーニング検査は、完全に非侵襲的でかつ安価であり、時宜を得た外科的介入と結びつけた場合に、膵臓腺癌を発症するリスクの高い患者の転帰を大幅に改善し得る。

10

20

【図1】

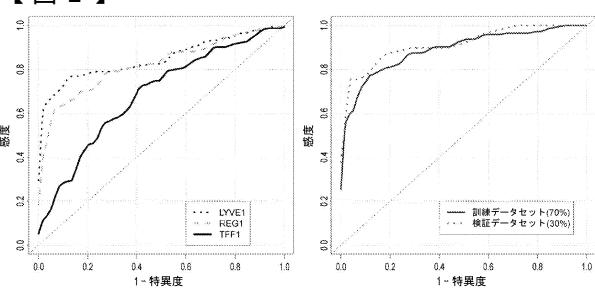


A

尿	健常 (n=87)	CP (n=92)	PDAC (n=192)
LYVE1	3.2 (5.3) / 0.51 (0.52)	4.5 (9.6) / 0.49 (1.19)	11.9 (16.5) / 2.04 (2.84)
REG1A	113.8 (261.8) / 16.3 (27.7)	127.8 (349.9) / 14.8 (85.4)	546.4 (1648.5) / 92.9 (242.7)
REG1B	31.1 (62.6) / 4.4 (6.2) (n=51)	45.3 (104.4) / 4.2 (14.9) (n=42)	124.2 (217.1) / 19.7 (46.0) (n=107)
TFF1	2.2 (3.3) / 0.23 (0.46)	2.8 (5.6) / 0.25 (0.80)	3.7 (4.9) / 0.51 (0.91)
クレアチニン	8.4 (6.3) / na	7.7 (8.2) / na	6.5 (6.8) / na
血清	健常 (n=28)	CP (n=50)	PDAC (n=147)
CA19.9	8.7 (7.6) / na	21.5 (38.1) / na	399.0 (1281.2) / na

B

【図2】



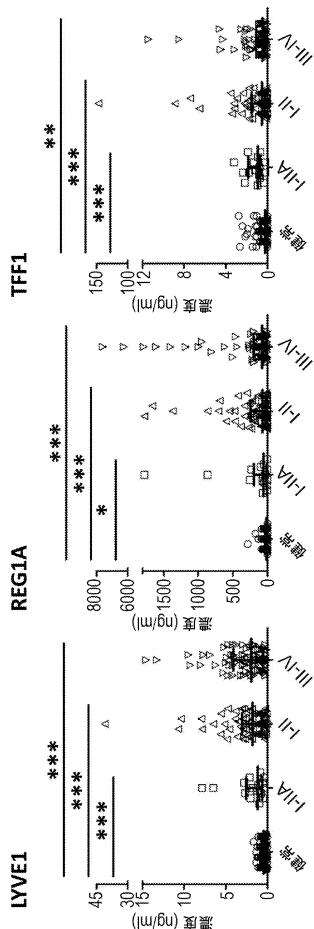
A

B

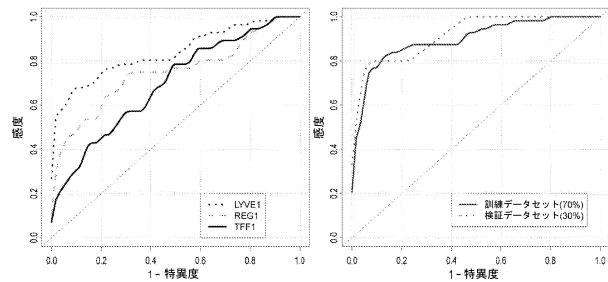
試料	バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
訓練セット (70%)	LYVE1 (cnorm)	0.851 (0.801 - 0.902)	76.9 (69.3 - 83.2)	88.1 (79.6 - 96.6)
	REG1A (cnorm)	0.823 (0.766 - 0.879)	62.2 (53.8 - 69.9)	94.9 (88.1 - 100.0)
	TFF1 (cnorm)	0.686 (0.606 - 0.765)	72.7 (65.0 - 79.7)	59.3 (47.5 - 71.2)
	パネル (+creat+年齢)	0.891 (0.847 - 0.935)	76.9 (69.9 - 83.2)	89.8 (81.3 - 96.6)
検証セット (30%)	パネル (+creat+年齢)	0.921 (0.863 - 0.978)	75.5 (63.3 - 87.8)	100 (100.0 - 100.0)

C

【図3】



【図4】



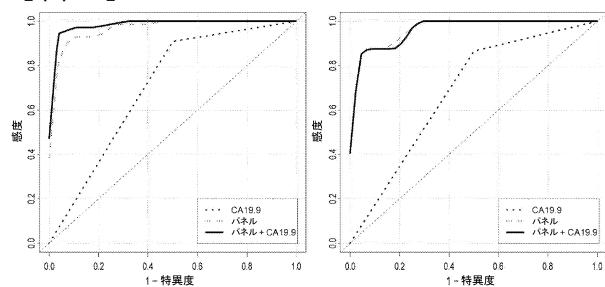
A

B

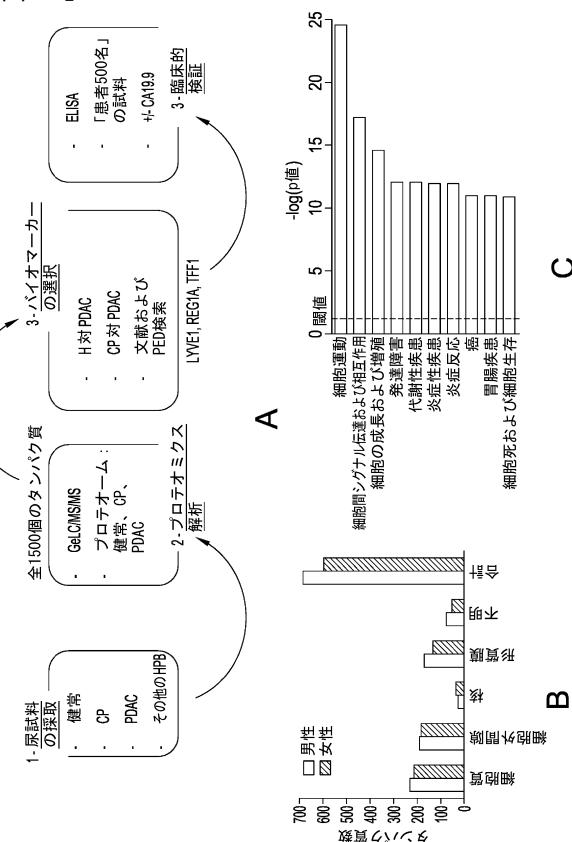
C

試料	バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
訓練セット(70%)	LYVE1 (norm)	0.840 (0.767-0.914)	67.9 (55.3-78.6)	91.8 (83.6-98.4)
	REG1A (norm)	0.748 (0.656-0.839)	75.0 (64.3-85.7)	68.9 (57.4-80.3)
	TFF1 (norm)	0.696 (0.601-0.790)	78.6 (67.8-89.3)	52.5 (41.0-63.9)
	パネル(+creat+年齢)	0.900 (0.843-0.957)	82.1 (71.4-91.1)	88.5 (80.3-95.1)
検証セット(30%)	パネル(+creat+年齢)	0.926 (0.843-1.000)	80.0 (60.0-100.0)	76.9 (61.5-92.3)

【図5】



【図6】



PDAC H 対 健常

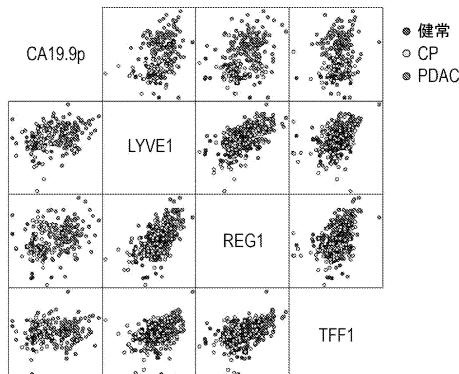
バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
血漿 CA19.9 (37U/ml)	0.880 (0.814-0.945)	83.1 (74.6-91.6) ^	92.9 (82.1-100.0) ^
パネル	0.973 (0.947-0.999) +	93.0 (85.9-98.6)	92.9 (82.1-100.0)
パネル+血漿 CA19.9 (37U/ml)	0.991 (0.979-1.000) \$	94.4 (88.7-98.6)	100.0 (100.0-100.0)

PDAC HIA 対 健常

バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
血漿 CA19.9 (37U/ml)	0.839 (0.719-0.959)	75.0 (56.3-93.8)	92.9 (82.1-100.0)
パネル	0.971 (0.929-1.000) +	87.5 (68.8-100.0)	96.4 (89.3-100.0)
パネル+血漿 CA19.9 (37U/ml)	0.969 (0.924-1.000) \$	87.5 (68.8-100.0)	96.4 (89.3-100.0)

C

【図7】

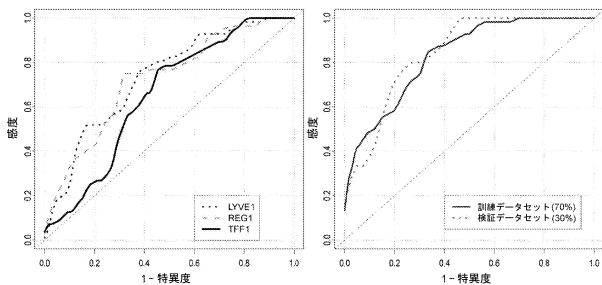


A

	CA19.9p	LYVE1	REG1A
<b>健常</b>			
LYVE1	-0.15 (NS)		
REG1A	-0.38*	0.35***	
TFF1	-0.12 (NS)	0.0004 (NS)	0.07 (NS)
<b>CP</b>			
LYVE1	0.17 (NS)		
REG1A	0.12 (NS)	0.61***	
TFF1	-0.13 (NS)	0.25*	0.35***
<b>PDAC</b>			
LYVE1	0.13 (NS)		
REG1A	0.18*	0.53***	
TFF1	0.03 (NS)	0.51***	0.51***

B

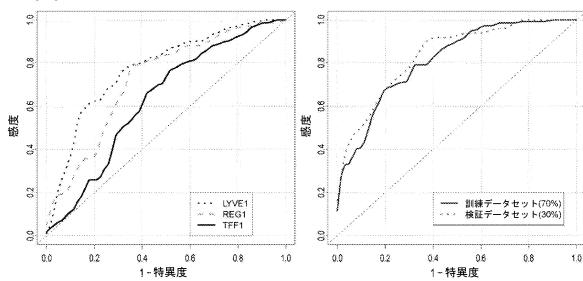
【図8-2】



D

E

【図8-1】



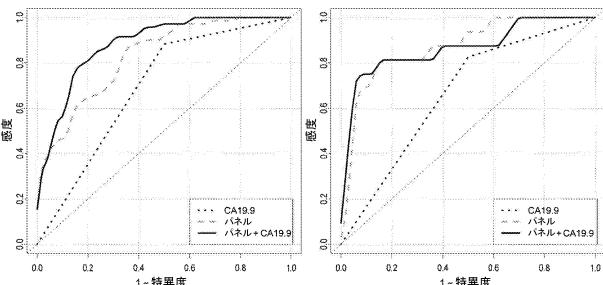
A

B

試料	バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
訓練セット(70%)	LYVE1 (cnorm)	0.775 (0.704 - 0.846)	76.9 (69.9 - 83.2)	69.4 (58.1 - 80.7)
	REG1A (cnorm)	0.722 (0.643 - 0.801)	78.3 (71.3 - 84.6)	66.1 (54.8 - 77.4)
	TFF1 (cnorm)	0.629 (0.540 - 0.717)	76.2 (68.5 - 83.2)	50.0 (37.1 - 61.3)
	パネル(+creat+年齢)	0.815 (0.752 - 0.878)	68.5 (60.1 - 76.2)	80.6 (71.0 - 90.3)
検証セット(30%)	パネル(+creat+年齢)	0.839 (0.751 - 0.928)	67.4 (53.1 - 79.6)	80.0 (63.3 - 93.3)

C

【図9】



A

B

試料	バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
<b>CP 対 PDAC</b>				
訓練セット(70%)	LYVE1 (cnorm)	0.732 (0.644 - 0.821)	76.8 (66.1 - 87.5)	62.1 (50.0 - 74.3)
	REG1A (cnorm)	0.723 (0.633 - 0.813)	75.0 (62.5 - 85.7)	69.7 (57.6 - 80.3)
	TFF1 (cnorm)	0.650 (0.553 - 0.748)	76.8 (64.3 - 87.5)	56.1 (43.9 - 68.2)
	パネル(+creat+年齢)	0.831 (0.762 - 0.901)	85.7 (75.0 - 94.6)	66.7 (56.1 - 78.8)
検証セット(30%)	パネル(+creat+年齢)	0.846 (0.730 - 0.963)	100.0 (100.0 - 100.0)	50.0 (30.8 - 69.2)

F

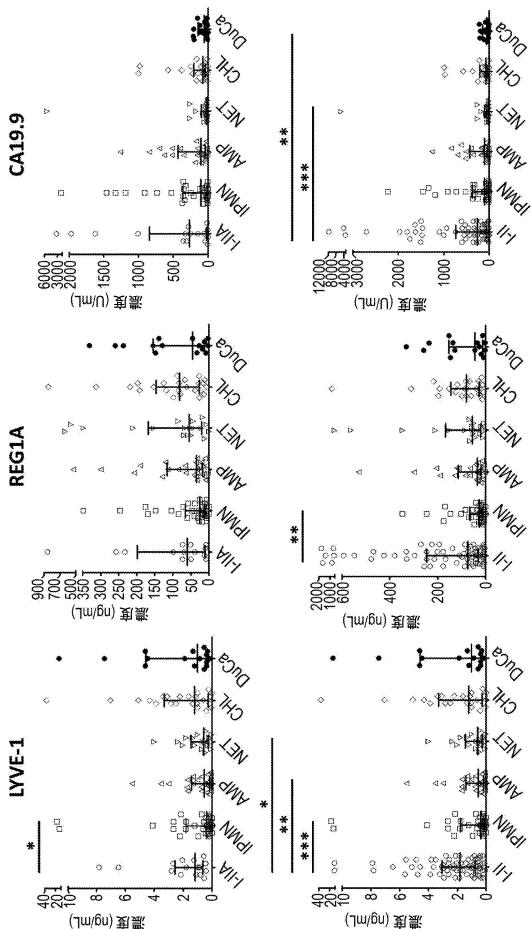
バイオマーカー	AUC (95% CI)	最適カットポイントにおける% SN (95% CI)	最適カットポイントにおける% SP (95% CI)
<b>CP 対 PDAC</b>			
血漿CA19.9 (37U/mL)	0.775 (0.699 - 0.852)	83.1 (74.5 - 91.6) <sup>A</sup>	72.0 (60.0 - 84.0) <sup>A</sup>
パネル	0.830 (0.759 - 0.902)+	87.3 (78.8 - 94.4)	66.0 (52.0 - 78.0)
パネル+血漿CA19.9 (37U/mL)	0.885 (0.825 - 0.945) <sup>\$</sup>	77.5 (67.6 - 87.3)	86.0 (76.0 - 94.0)
<b>CP 対 PDAC HIA</b>			
血漿CA19.9 (37U/mL)	0.735 (0.609 - 0.861)	75.0 (56.3 - 93.8)	72.0 (60.0 - 84.0)
パネル	0.871 (0.770 - 0.972)++	81.2 (62.5 - 100.0)	86.0 (76.0 - 94.0)
パネル+血漿CA19.9 (37U/mL)	0.866 (0.749 - 0.984) <sup>\$\$</sup>	75.0 (56.3 - 93.8)	94.0 (88.0 - 100.0)

C

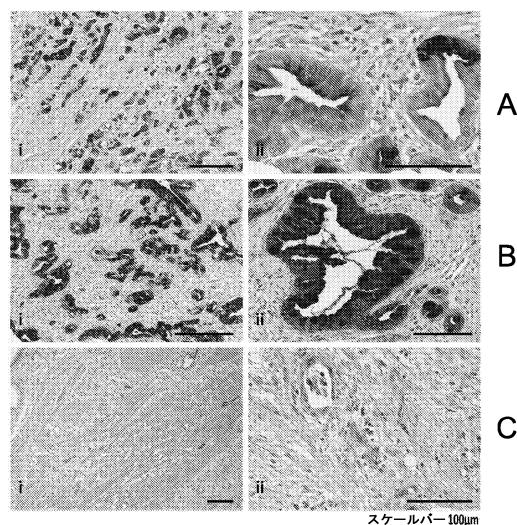
【図 10 A】

	IPMN	AMP	NET	CHL	DuCa
症例[n]	33	26	18	24	16
性別	M=21	M=13	M=9	M=17	M=4
	F=12	F=13	F=9	F=7	F=12
年齢範囲 (中央値)	27-83(66)	41-78(68)	42-78(63)	20-79(64)	46-77(65)

【図 10 B】



【図 11】

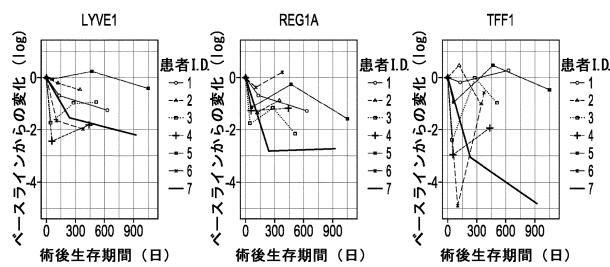


A

B

C

D



【配列表】

0006786499000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ツルノゴラツツ ジャスピック タジャーナ  
英国 イーシー1エム 6ビークュー ロンドン チャーターハウス スクエア ジョン ヴェイ  
ン サインエンス センター ファースト フロア クイーン メアリー ユニバーシティ オブ  
ロンドン パーツ キャンサー インティテュート モレキュラー オンコロジー

(72)発明者 ラドン トマシュ  
英国 イーシー1エム 6ビークュー ロンドン チャーターハウス スクエア ジョン ヴェイ  
ン サインエンス センター ファースト フロア クイーン メアリー ユニバーシティ オブ  
ロンドン パーツ キャンサー インティテュート モレキュラー オンコロジー

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 特表2006-500948 (JP, A)  
国際公開第2010/100899 (WO, A1)  
特表2013-516996 (JP, A)  
国際公開第2012/100339 (WO, A1)  
MARSCHALL, Z.V. et al., Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis  
and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer, INTERNATIONAL JOURNAL  
OF ONCOLOGY, 2005年 9月 1日, Vol.27, pp.669-679

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33/48 - 33/98  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )