

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-503826**(P2007-503826A)**

(43) 公表日 平成19年3月1日(2007.3.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
C O 7 K 14/82 (2006.01)	C O 7 K 14/82	4 C O 8 4
C O 7 K 16/32 (2006.01)	C O 7 K 16/32	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-525182 (P2006-525182)	(71) 出願人	598053215
(86) (22) 出願日	平成16年9月2日 (2004.9.2)		ランドックス・ラボラトリーズ・リミテッ ド
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月28日 (2006.4.28)		RAN DOX L A B O R A T O R I E S L T D.
(86) 国際出願番号	PCT/GB2004/003773		イギリス、ノーザン・アイルランド、ビー ティ29・4キューワイ、カウンティ・ア ントリム、クラムリン、ダイヤモンド・ロ ード、アードモア
(87) 国際公開番号	W02005/024060	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開日	平成17年3月17日 (2005.3.17)		弁護士 大野 聖二
(31) 優先権主張番号	0320648.9	(74) 代理人	100106840
(32) 優先日	平成15年9月3日 (2003.9.3)		弁理士 森田 耕司
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 乳癌のリスクの診断

(57) 【要約】

癌、特に乳癌のリスクを予測するために用いることができる診断方法が開示される。この方法は、(i) 患者のゲノムのサンプルを単離し；そして(ii) 本明細書において配列番号1として識別される配列中に含まれる遺伝子の存在または発現を検出することを含み、ここで、遺伝子の存在または発現は、癌の存在またはリスクを示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者において癌の存在またはリスクを検出する方法であって、

(i) 患者のゲノムのサンプルを単離し；そして

(i i) 本明細書において配列番号 1 として識別される配列中に含まれる遺伝子の存在または発現を検出する

の各工程を含み、ここで、遺伝子の存在または発現は癌の存在またはリスクを示す、ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

遺伝子が配列番号 2 として識別されるものである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

ゲノムサンプルが乳組織、子宮または精巣から得られたものである、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

癌が乳癌である、請求項 1 - 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

検出がポリメラーゼ酵素を用いて遺伝子を増幅することにより行われる、請求項 1 - 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

本明細書において配列番号 1 として識別されるヌクレオチド配列、またはその相補体、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で該配列（またはその相補体）にハイブリダイズする少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドのポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 7】

配列が本明細書において配列番号 2 として識別される配列である、請求項 6 記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

患者において癌のリスクを試験するためのインビトロ診断アッセイにおける、請求項 6 または 7 記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項 9】

癌が乳癌である、請求項 8 記載の使用。

30

【請求項 10】

本明細書において配列番号 3 として識別される配列、またはその少なくとも 10 個の連続するアミノ酸残基のフラグメントを含むペプチド。

【請求項 11】

請求項 10 記載のペプチドに対して少なくとも 10^{-6} M の親和性を有する抗体。

【請求項 12】

請求項 6 または 7 に記載のポリヌクレオチドを含む内因性遺伝子にハイブリダイズするかまたはその発現を阻害する第 2 のポリヌクレオチドの、癌、特に乳癌の治療用の医薬品の製造における使用。

40

【請求項 13】

遺伝子が請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含む、請求項 12 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌、特に乳癌のリスクの存在の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

世界で 1 年に 100 万件以上の乳癌の症例があり、そのうち米国はおよそ 50 万人、英

50

国は4万人、およびアイルランドはほぼ2,000人である。女性ではこれは癌による死亡の第1位である。西洋では、疾病の全体的な発症率は増加しているが、より広いスクリーニングおよび改良された治療により、致死率は1991年から1年に約1%で徐々に低下している。初期の乳癌と診断された患者は、90%を越える5年生存率を有するが、これに対し遠位転移乳癌と診断された患者の場合は20%である。いずれにしても、乳癌に対する確実な初期スクリーニング試験は存在せず、現在、診断はマンモグラフィーおよび細針生検の結果により行われている。マンモグラフィーには限界があり、疑わしい結果の80%以上は擬陽性であることが後にわかり、乳癌を有する女性の10-15%は擬陰性の結果を与える。しばしば、腫瘍は検出の前に後期の発達段階に達しており、患者の生存の確率は低下し、治療およびヘルスケアシステムの管理のコストが増加する。患者の死亡率を低下させるために、乳の小さい（直径2cm未満）の初期のインシトゥー癌腫を検出するより感度の高い方法が求められている。初期の検出に加え、既知の癌の分類および腫瘍タイプの区別において、疾病を良性であるか悪性であるかに分類する上で深刻な問題が存在する。さらに、現在進行中の治療の効果をモニターし、特定の治療法に耐性となりつつある患者を識別することが求められている。乳腺は成人期の間、特に妊娠、授乳および退縮の間に形態学および機能的に著しく変化するいくつかの臓器の1つであり、この変化は同じ乳腺の分子シグニチャーが経時的に変化することにつながる可能性があるため、そのような検出プロセスはさらに複雑である。

10

【0003】

疾病の診断は、しばしば、小数の生物学的マーカーの相対的レベルの注意深い検査により行われる。最近の進歩にもかかわらず、患者のケアおよび臨床的帰結に対する現在のバイオマーカーの貢献は限られている。これは、現存するマーカーは診断の感度および疾病特異性が低いためである。しかし、分子バイオマーカーのいくつかは、疾病診断において日常的に用いられており、例えば、前立腺癌スクリーニングには前立腺特異的抗原が用いられており、新たな候補マーカーが発見される速度は増加している（Pritzker, 2002）。よく検証されたバイオマーカーのパネルの使用が、試験の陽性予測価値を高め、擬陽性または擬陰性を最小にするであろうことが認められつつある（Srinivas et al., 2002）。さらに、現在ニューラルネットワークに対する興味が増加しており、これは、種々のバイオマーカーからの弱いが独立した情報を組み合わせて、各バイオマーカー単独より有益な予後／予測指標を与えることの有望性を示す（Yousef et al., 2002）。

20

30

【0004】

より多くの分子情報を照合すると、患者の帰結につながる遺伝的シグニチャーにしたがって乳癌等の疾病をさらに分類することができ、医師にとって価値のある情報を与えることができる。分子医薬において新たに生じた技術は、伝統的な病理学的基準では認識できない疾病のサブタイプ間を区別するのに（Sorlie et al., 2001）、および癌の進行に関与する特異的な遺伝的事象を同定するのに（Srinivas et al., 2002）、有力であることが示されている。平行して考慮する必要がある別の問題は、性別および人種の間バイオマーカーの有効性に関するものであり、したがって、異なる集団の大規模なスクリーニングが必要である。

40

【0005】

通常は乳においてのみ発現しているが、疾病の結果身体のあるあらゆる場所で見いだされる新規マーカーを用いることにより、乳癌の管理を改良することができる。疾病の活性を予測する物、特に本来の位置の腺管癌が発達して侵襲性の腺管癌となるか否かを予測する物は、疾病の管理においても利用価値がある。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

本発明の第1の観点にしたがえば、以下の各工程を含む、患者における癌の存在または

50

リスクを検出する方法が提供される：

(i) 患者のゲノムのサンプルを単離し；そして

(i i) 本明細書において配列番号 1 として識別される配列中に含まれる遺伝子またはその相補体の存在または発現を検出し、
ここで、該遺伝子の存在または発現は、癌の存在またはリスクを示す。

【0007】

本発明の第 2 の観点にしたがえば、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書において配列番号 1 または配列番号 2 として識別されるヌクレオチド配列、またはその相補体、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で該配列（またはその相補体）にハイブリダイズする少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドのポリヌクレオチドを含む 10

【0008】

本発明の第 3 の観点においては、単離されたペプチドは、本明細書において配列番号 3 として識別される配列または少なくとも 10 個の連続するアミノ酸残基のそのフラグメントを含む。

【0009】

本発明の第 4 の観点においては、抗体は、上で定義したペプチドに対して少なくとも 10^{-6} M の親和性を有する。

【0010】

本発明の第 5 の観点においては、配列番号 1 として識別される配列中に含まれる内因性 20
遺伝子にハイブリダイズするか、またはさもなくばその発現を阻害するポリヌクレオチドを、癌、特に乳癌の治療用の医薬品の製造において使用する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

発明の説明

本発明は、癌、特に乳、子宮または精巣癌に罹患している患者において発現されている遺伝子の同定に基づく。患者から取得したサンプルにおける遺伝子（またはその発現産物）の同定は、患者における癌の存在またはリスクを示す。

【0012】

本発明はさらに、癌の素因を検出、診断、モニタリング、予後予測、予防、イメージン 30
グ、治療または判定するのに有用な試薬、例えばポリペプチド配列に関する。

【0013】

本発明は、子宮、精巣または乳の癌、特に ER α 陽性腫瘍の検出に特に適している。

【0014】

診断を実施する方法は、試験サンプル中の mRNA から cDNA を合成し、遺伝子またはそのフラグメントに対応する cDNA の適当な部分を増幅し、産物をその組織における疾病の存在の指標として検出する、または遺伝子配列を含む mRNA の翻訳産物を疾病の存在の指標として検出することを含むことができる。

【0015】

有用な試薬には、診断方法、例えば、生検組織、血液または他の試験サンプルから抽出 40
された mRNA の RT-PCR、PCR またはハイブリダイゼーションアッセイにおいて有用なポリペプチドまたはそのフラグメント、またはそのような mRNA の翻訳産物である蛋白質、またはこれらの蛋白質に対する抗体が含まれる。これらのアッセイはまた、体内で生じうる可能な翻訳後修飾、例えば、サブユニット複合体の形成における、補因子、阻害剤、アクチベータおよび他の蛋白質等の分子との相互作用を考慮して、遺伝子産物（蛋白質）を検出する方法を含む。

【0016】

癌に関連する遺伝子は、配列番号 1 で示されるポリヌクレオチド配列中に含まれる。推定コーディング領域は配列番号 2 に示される。遺伝子の発現産物は、本明細書において配列番号 3 で示される。遺伝子またはその発現産物の同定は、ポリヌクレオチドまたはポリ 50

ペプチドの検出または特性決定について知られる手法を用いて行うことができる。例えば、患者から単離された遺伝子材料を、標的遺伝子に特異的にハイブリダイズする短いオリゴヌクレオチドを用いて探索することができる。オリゴヌクレオチドプローブは、標的遺伝子とハイブリダイゼーションしたときにプローブを検出しうるように、例えば蛍光団等で検出可能なように標識してもよい。あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて遺伝子またはその一部を増幅し、この産物を標識オリゴヌクレオチドを用いて同定してもよい。

【0017】

この遺伝子、または関連する蛋白質または抗体を利用した診断アッセイとしては、限定されないが、

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

逆転写PCR (RT-PCR)

リアルタイムPCR

インシトゥーハイブリダイゼーション

サザンドットプロット

免疫組織化学

リボヌクレアーゼ保護アッセイ

cDNAアレイ手法

ELISA

結合実験において有用な、ガラスまたはセラミクス等の固体支持体上の蛋白質、抗原または抗体アレイ

小干渉RNA機能アッセイ

が挙げられる。上述の手法はすべて当業者にはよく知られている。

【0018】

別の検出方法は、当該技術分野において"分子ビーコン"と称されるものを使用する。分子ビーコンは、標的核酸の検出および定量のために設計されたオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、通常は、標的核酸がない場合にステムループ構造を形成する自己ハイブリダイズ部分を含む。蛍光成分およびクエンチャー成分が、オリゴヌクレオチドの各末端に結合しており、これらは、オリゴヌクレオチドがステムループの幾何学的配置をとる場合には隣接して位置する。この幾何学的配置では、蛍光はクエンチャー成分により有効に妨害される。オリゴヌクレオチドのループ部分は特定の標的核酸に相補的であり、標的の存在下では、標的へのハイブリダイゼーションが生じてステムループの幾何学的配置が乱れ、蛍光団とクエンチャーとが離れて、検出可能な蛍光が増加する。分子ビーコン法を遺伝子配列の検出に使用することは米国特許6548254に開示されている。

【0019】

本発明はまた、配列番号1または配列番号2として識別される配列、またはその相補体を含む単離されたポリヌクレオチド、または少なくとも15個の連続するヌクレオチド、好ましくは30個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも50個のヌクレオチドを含むそのフラグメントに関する。上述のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明の範囲内である。ハイブリダイゼーションは、通常、ストリンジェントな条件下で行う。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は当業者に知られており、非相補的ハイブリダイゼーションの可能性を低下させるように選択される。適当な条件の例は、"Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach" (B. D. Hames and S. J. Higgins, editors IRL Press, 1985)に開示されている。より詳細には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5xSSC (150mM NaCl, 15mMクエン酸三ナトリウム), 50mMリン酸ナトリウム (pH 7.6), 5xデンハルト溶液, 10%硫酸デキストランおよび20pg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含む溶液中で42℃で一晩インキュベーションし、次に0.1xSSC中で約65℃で洗浄することを含む。

10

20

30

40

50

【0020】

また、遺伝子の同定により、その遺伝子が治療用分子の標的である治療法を開発することが可能となる。例えば、遺伝子治療用に開発された、特定の遺伝子を標的としその発現を防止する多くの既知の分子が存在する。1つの特定の分子は、小干渉RNA (siRNA) であり、これは、標的mRNAの分解を促進することにより、特定の標的蛋白質の発現を抑制する。目的とする遺伝子に結合して発現を改変することができる他の合成オリゴヌクレオチド（またはその制御要素）も知られている。DNAと結合させたペプチド核酸 (PNAs) (PNA-DNAキメラ) もまた、強いデコイ活性を有しており、目的とする遺伝子の発現を変更することが示されている。これらの分子を用いて、遺伝子またはその制御上流要素に結合させて、発現を防止する。

10

【0021】

本発明はまた、目的とする遺伝子の単離されたポリペプチド産物に関する。本発明の単離されたポリペプチドは、本明細書において配列番号3として識別される配列、または少なくとも10個の連続するアミノ酸、好ましくは少なくとも15個の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも20アミノ酸を有するそのフラグメントを含む。ポリペプチドは、抗体の作成、またはインビボで蛋白質に結合してその活性を阻害しうる蛋白質結合分子の開発に有用であろう。

【0022】

本発明はまた、本発明のポリペプチドに対して生成された抗体を含む。抗体は、通常、ポリペプチドに対して少なくとも 10^{-6} M、より好ましくは、 10^{-9} M、最も好ましくは少なくとも 10^{-11} Mの親和性を有する。抗体は適当ないずれのタイプのものであってもよく、例えば、モノクローナルであってもポリクローナルであってもよい。試験サンプルにおけるポリペプチド抗原の存在を判定するためのアッセイキットもまた含まれる。1つの態様においては、アッセイキットは、抗原に特異的に結合する抗体の入った容器を含み、ここで、抗原は、本発明の遺伝子によりコードされる少なくとも1つのエピトープを含む。これらのキットはさらに、試験サンプル、例えば、血液、唾液、尿または糞を回収するのに有用な道具の入った容器を含むことができる。そのような道具としては、血液を採取し安定化させるためのランセットおよび吸収紙または布、唾液を採取し安定化させるための綿棒、尿および糞サンプルを採取し安定化させるためのカップが挙げられる。抗体は、固相、例えば、ガラスまたはセラミック表面に結合させることができる。

20

30

【0023】

これらの抗体を含むと疑われる試験サンプル中で、抗原と特異的に結合する抗体の検出を行うこともできる。この検出方法は、試験サンプルを遺伝子の少なくとも1つのエピトープを含むポリペプチドと接触させることを含む。接触は、抗原/抗体複合体が形成するのに十分な時間および条件で行う。この方法はさらにポリペプチドを含む複合体を検出することも意味する。ポリペプチド複合体は、組換え的にまたは合成により製造することができ、あるいは天然起源から精製してもよい。

【0024】

本発明の別の態様においては、その抗原に対する抗体またはそのフラグメントを用いて、疾病または状態を検出または診断する目的で、患者における抗原の局在の画像を検出することができる。そのような抗体は、モノクローナルであってもポリクローナルであってもよく、または分子生物学手法で作成してもよく、種々の検出可能な試薬、例えば、限定されないが、放射性同位体で標識することができる。

40

【0025】

さらに別の態様においては、抗体またはそのフラグメント（モノクローナルであってもポリクローナルであってもよく、分子生物学手法により作成してもよい）は、本発明の遺伝子の発現により特徴づけられる疾病の治療のための治療薬として用いることができる。抗体は誘導化せずに使用してもよく、細胞傷害剤、例えば、放射性同位体、酵素、トキシン、薬剤、プロドラッグ等で誘導化してもよい。

【0026】

50

"抗体"との用語は、広くすべての免疫学的結合剤、例えば I g G, I g M, I g A, I g D および I g E を表す。抗体はまた、抗原結合領域を有するすべての抗体様分子を表し、例えば、限定されないが、シングルドメイン抗体 (D A B S), F v, s c F v 等の抗体フラグメントが含まれる。抗体に基づく種々のコンストラクトおよびフラグメントを製造し使用する手法は、当該技術分野においてよく知られている。

【0027】

所望の場合には、診断または予後のさらに信頼性の高い指標を与えるために、本発明の癌スクリーニング方法を他の方法と容易に組み合わせて、マルチマーカー試験とすることができる。

【0028】

以下の実施例では、添付の図面を参照して本発明を説明する。

【実施例】

【0029】

乳癌患者のマッチした臨床サンプルに由来する c D N A 集団から、非同位体ディファレンシャルディスプレイ (D D R T - P C R) を用いて、多数の異なるように発現されている遺伝子フラグメントを単離した。これらのフラグメントの 1 つ (本明細書において D D 1 1 と称する) は、多数のドナーからの乳腫瘍組織サンプルにおいて、有意にアップレギュレートされていることが明らかとなった。この新規の分子マーカーの発現プロファイル、その全長および対応する推定蛋白質配列を以下に詳細に説明する。

【0030】

材料および方法

同じドナーからの正常な乳組織と腫瘍組織とのマッチした対の間のディファレンシャル遺伝子発現を実施した。組織サンプルは、P a t h l o r e (P e t e r b o r o u g h, U K) から、完全な倫理的認可および患者のインフォームド Consent をもって入手した。腫瘍を外科的に除去した後、腫瘍組織の 1 つのサンプルを採取し、共に切り出された隣接する正常な組織からのサンプルも採取した。それぞれ、D y n a l d T 1 s タグ付きダイナビーズ (D y n a b e a d s) および S u p e r s c r i p t I I 逆転写プロトコルを用いて、メッセンジャー R N A を抽出し、次に c D N A を合成した。ディファレンシャルディスプレイ逆転写 P C R (D D R T - P C R) を用いて、これらのマッチしたサンプルの遺伝子発現プロファイルの間の相違を観察し、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを示す個々の遺伝子転写産物を単離し、さらに調べた。

【0031】

L i a n g & P a r d e e (1992) により最初に記載されているように、ディファレンシャルディスプレイ逆転写 P C R (D D R T - P C R) は、2 またはそれ以上の生物学的サンプルからの m R N A を、3 つの可能なアンカープライマーの 1 つを用いて、逆転写による代表的 c D N A 合成のテンプレートとして用いる。そのそれぞれのアンカープライマーを 80 個の任意配列 13-mer プライマーの 1 つと組み合わせて、3 つの亜集団のそれぞれを P C R 増幅した。このプライマーの組み合わせの数は、m R N A 集団中で発現された遺伝子の 96% を表すことを容易にすると見積もられている (S t u r t e v a n t, 2000)。この集団をさらに分割して、各プライマーセットについて、第 2 鎖 c D N A 合成の終了後には、真核生物細胞で発現しているとは見積もられる 12,000-15,000 個の m R N A を 100-150 の転写産物に減少させた。これは、マッチしたプライマーセットをポリアクリルアミドゲル上で平行に電気泳動分離し、正確に可視化することを容易にし、一方の組織サンプルで発現しているが他方では発現していない遺伝子フラグメントの同定につながる。

【0032】

目的とするフラグメントを切り出して再増幅した後、逆サザンドットプロットにより擬陽性を除いた。これを用いて各再増幅フラグメントを 2 枚のナイロン膜 (H y b o n d N +, A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) にスポットし、フラグメントが由来するドナーの腫瘍または正常な組織 c D N A 集団のいずれかを用いてハイブリ

10

20

30

40

50

ダイズさせた。次に、異なるように発現されていることが確認されたフラグメントを、クローニングせずに直接配列決定し、ウェブに基づくデータベース検索を行って、各遺伝子が新規であるかどうかを判定した。既知の遺伝子とマッチしなかったフラグメントは、それが由来する乳癌の新規マーカーを表す可能性があると考えた。多数の乳腫瘍ドナーからの一連のマッチしたcDNA集団を用いて、半定量的RT-PCRまたはリアルタイムPCRのいずれかにより、各転写産物のさらなるスクリーニングを行った。すべての場合において、cDNAテンプレートを検定するために、およびPCRの間の内部陽性対照として、 β -アクチンを構成的参照遺伝子として用いた。各推定新規マーカー遺伝子の発現は、検定したテンプレートについて、遺伝子特異的プライマーセットを用いて行った。次に、オープンリーディングフレーム（遺伝子の蛋白質をコードする部分）を含む新規遺伝子フラグメントの全長転写産物を、5' RACE（cDNA末端の迅速増幅）として知られる複雑なプロセスを用いて合成した。これは、遺伝子特異的伸長および増幅を組み込んでおり、配列決定により確認可能である。

【0033】

組織特異性の決定は、非乳組織、例えば、脳、心臓、リンパ球、脾臓、腎臓、精巣および筋肉からのcDNA集団（Origeneから入手）に対して、各新規マーカーからの遺伝子特異的プライマーを用いてアッセイした。DD11分子マーカーは、22のヒト組織タイプのより包括的なパネルに由来するcDNA集団を用いてさらに試験した。これらは以下のとおりである。

【0034】

【表1】

副腎	62ドナーからプール
骨髄	7ドナーからプール
脳, 小脳	24ドナーからプール
脳, 全体	1ドナーからプール
結腸	1ドナーからプール
胎児脳	59ドナーからプール
胎児肝臓	63ドナーからプール
心臓	1ドナーからプール
腎臓	1ドナーからプール
肝臓	1ドナーからプール
肺	1ドナーからプール
胎盤	7ドナーからプール
前立腺	47ドナーからプール
唾液腺	24ドナーからプール
骨格筋	2ドナーからプール
小腸	1ドナーからプール
脾臓	14ドナーからプール
精巣	19ドナーからプール
甲状腺	9ドナーからプール
甲状腺	65ドナーからプール
気管	1ドナーからプール
子宮	10ドナーからプール

【0035】

なお、これらのサンプルの大部分は、Human Total RNA panel I I（Clontech）の一部であるが、アスタリスクで印を付けた2つのサンプルは

Pathlore (Peterborough Hospital Tissue Bank) から組織塊として入手し, Randox Laboratories Ltd. で加工したものである。

【0036】

さらに, Pathloreを通して入手したある範囲の倫理的に認定されたヒト腫瘍サンプルについてアッセイを行った。卵巣, 精巣, 胃, 肝臓, 肺, 膀胱, 結腸および膵臓からの腫瘍を代表するcDNAを, β -アクチンおよびDD11の両方に対してリアルタイムPCRにより調べた。

【0037】

新規のマーカーの発現分析と組み合わせて, 乳組織のそれぞれのマッチした対について分子シグニチャー分析を行った。これは各組織cDNAに対する半定量的RT-PCRにおいて, 先に公表されている多数の乳癌分子マーカーに特異的な1組のプライマーを用いて行う。各分子マーカー間の関係を判定し, 各サンプルについて一覧表にして, 参照として用いる。これに対して新たなマーカーを比較することができる。これは, 腫瘍タイプを副分類し, 新規マーカーをそのようなサブタイプと関連づけることができるようにして, 診断マーカーの力を著しく増加させることを目的として行った。

【0038】

結果および考察

ディファレンシャルディスプレイを用いると, 乳癌ドナーからのマッチした組織のcDNA集団に由来する, DD11と名付けられた遺伝子フラグメントは, 対応する正常な組織cDNAと比較して, 腫瘍cDNA集団中で有意にアップレギュレートされていることが認められた。この産物は, リバースサザンドットプロットにより, 異なるように発現されていることが確認された。配列分析および続くデータベース検索により, DD11はそれぞれEMBLおよびSWISSPROTデータベースにおいて既知の遺伝子または蛋白質と相同ではないことが決定され, したがって, 新規である可能性が高いと考えられた。しかし, これは, ポリAテールを除去した後に, ヒトゲノムの染色体8からのクローン(RP11-875011) (受託番号AC107959) と100%相同であった。

【0039】

このフラグメントを, 他の患者から供与された多数のマッチした乳腫瘍組織に由来するcDNA集団を用いてさらにスクリーニングした。スクリーニングしたドナーサンプルのうち, 9サンプル中6サンプルが顕著な発現の増加を示し, DD11が乳腫瘍の存在の推定分子マーカーであることが確認された(図1)。この分析は, 現在利用可能なマッチした乳組織サンプルのすべての分子シグニチャー分析により実証された。結果は以下のとおりである。

【0040】

【表2】

腫瘍で増加	10	52.6%
正常組織で増加	1	5.3%
認識しうる相違なし	7	36.8%
発現が不明	1	5.3%
合計	19	100%

【0041】

さらなる分析を容易にするために, 5'-RACEを用いて, 遺伝子の全オープンリーディングフレーム(ORF)および5'非コーディング配列を含むよう, フラグメントを伸長した。この手法を用いて, 513ヌクレオチドの推定全長産物が導かれた(配列番号1)。これは, 続くデータベース調査により, 先のヒト染色体8に対するホモロジーが確認され, 配列の全長にわたり100%相同である(513/513)ことが確認された。この配列から, 6つすべてのアミノ酸リーディングフレームを生成して, +2フレームで

10

20

30

40

50

、47アミノ酸を含み停止コドンを含む（配列番号3）小さい推定ORF（配列番号2）が見いだされた。この小さい蛋白質は、SWALLデータベースにおいていずれの既知の蛋白質とも高いホモロジーを示さず、したがって新規であると考えられる。

【0042】

臓器特異性を判定するために、乳癌ドナーからのマッチした対のcDNAに加えて、8個のヒト非乳組織からのcDNA集団をDD11プライマーに対して試験した。また、同じサンプルを構成的なハウスキーピング遺伝子である β -アクチンからのプライマーを陽性対照として用いて試験して、半定量的PCR分析用のテンプレートを検定した。 β -アクチン産物は、試験したすべてのcDNA集団において強く増幅されたが、DD11産物は乳腫瘍サンプルにおいてのみ検出された（図2）。このことは、この新規遺伝子が乳腫瘍の存在の非常に強力な分子マーカーでありうることのさらなる証拠を与える。

10

【0043】

この分子マーカーを、22種のヒト組織タイプのパネルに由来するcDNA集団を用いて、慣用のおよびリアルタイムPCR分析の両方により、さらに試験した。Opticon IIリアルタイムサーマルサイクラー（MJ Research）を用いて試験した組織のうち、DD11は胎盤および精巣からのサンプルにおいてのみ検出された。さらに、マーカーが乳腫瘍特異的であるか、またはより特異性の低い腫瘍マーカーであるかを確認するために、Pathloreを通して入手した倫理的に認定されたある範囲のヒト腫瘍サンプルをアッセイした。卵巣、精巣、結腸、胃、肝臓、肺、膀胱および脾臓からの腫瘍のcDNA代表物を、 β -アクチンおよびDD11の両方について試験した。これらのうち、DD11は、精巣腫瘍に由来するcDNAにおいてのみ有意なレベルで検出された。直接配列決定により、これらのPCR増幅からの産物がDD11であることを確認した。

20

【0044】

22種の正常なヒト組織cDNAおよび8種の腫瘍cDNA集団を組み合わせたパネルを用いて、標準的なサーマルサイクラーでの慣用のPCR増幅を行って、DD11が非常に限定された数の組織タイプに特異的であることを確認した。リアルタイムPCR分析におけるように、精巣cDNA集団はDD11を発現し、精巣腫瘍も発現した。このマーカーの有意な発現を示した唯一の他の集団は子宮サンプルからのものであった。胎盤サンプルは低いレベルの発現を示したが、これは精巣および子宮サンプルと同程度まではなかった。低いレベルの産物は幾つかの他の組織サンプルにおいても見いだされたが、これらは無視しようと考えられた。このことは、DD11は試験したサンプルの全てのうち、生殖ホルモンの影響下にある組織、詳細には、乳および関連する腫瘍、精巣および関連する腫瘍、および子宮に由来する組織においてのみ強く発現されていることを示す。胎盤組織もまた、より低い程度でこのマーカーを発現する。

30

【0045】

DD11はまた、"標準的な"乳癌マーカーであると最も広く考えられているマーカー、例えば、エストロゲンレセプター（ER α ）およびヒト表皮成長因子レセプター（c-erbB-2）のいくつかと比較して好ましいものであった。これは、すべてのマッチした乳癌組織サンプルの分子シグネチャー分析においても、明らかである。すなわち、ヒト正常組織および腫瘍組織からの30のcDNA集団の社内パネルに対する標的特異的プライマーを用いて、多くの場合と同じ患者からの両方のサンプルにおいて発現が類似している。

40

【0046】

参考文献

- DeRisi, J. L., lyer, V. R. and Brown, P. O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science. 278: 680- 686.
Liang, P. and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase reaction. Science. 257: 967-971.
Pritzker, K. P. 2002 Cancer biomarkers: easier said than done. Clin. Chem. 2002

50

Aug; 48 (8): 1147-50.

Salodof MacNeil. 2001. From genes to proteins: The FLEXgene consortium. HMS Beagle. 112: on-line journal.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen M B, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 11 ; 98 (19): 10869-74.

Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. 2002. Proteomics for cancer biomarker discovery. Clin Chem. Aug; 48 (8): 1160-9.

Sturtevant, J. Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. Clin Microbiol Rev. 2000 Jul ; 13 (3): 408-27.

Yousef et al., 2002 Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, Rendl L, Diamandis M, Ponzzone R, Biglia N, Gai M, Roagna R, Sismondi P, Diamandis EP. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR : an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. Clin Chem. 2002 Aug; 48 (8): 1241-50.

Zong, Q. , Schummer, M. , Hood, L. and Morris, D. R. 1999. Messenger RNA translation state: the second dimension of high-throughput expression screening. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 10632-10636.

10

20

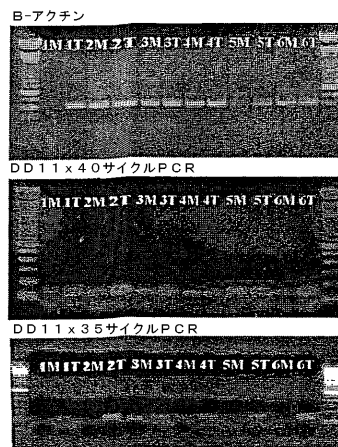
【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 7 】

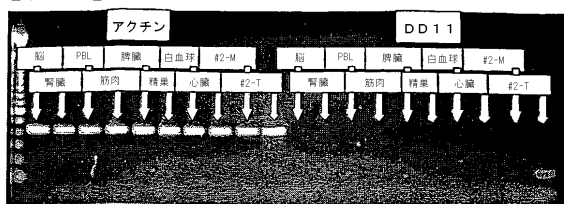
【図 1】図 1 は、種々の組織における、目的とする遺伝子の存在を判定するためのスクリーニングアッセイの結果を示す。T は腫瘍組織の cDNA を表し、M は同じドナーから共に切除した乳組織の cDNA を表す。

【図 2】図 2 は、種々の組織サンプルにおける、目的とする遺伝子の発現を判定するために行った発現分析の結果を示す。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2007503826000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/GB2004/003773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/92581 A (HARLOCKER SUSAN L ; ALGATE PAUL A (US); CORIXA CORP (US); JONES ROBERT) 6 December 2001 (2001-12-06) SEQ ID NO: 10564 = SEQ ID NO: 1 of the present application page 385, line 27 - page 392, line 27; claims 1,4-7	1-3,5,6, 8,12,13
A	WO 03/061386 A (ZAPATA-BENAVIDES PABLO ; LOPEZ BERESTEIN GABRIEL (US); TARI ANA MARIA) 31 July 2003 (2003-07-31) claim 1	12,13
A	WO 02/092854 A (NOVARTIS AG ; DRESSMAN MARLENE MICHELLE (US); LAVEDAN CHRISTIAN NICOLA) 21 November 2002 (2002-11-21) claims 1-18	1-13



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 November 2004

Date of mailing of the international search report

12/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabrieels, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB2004/003773

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0192581	A	06-12-2001	AU 6529601 A	11-12-2001
			CA 2411404 A1	06-12-2001
			EP 1356092 A2	29-10-2003
			JP 2004511212 T	15-04-2004
			WO 0192581 A2	06-12-2001
			US 2002132237 A1	19-09-2002
WO 03061386	A	31-07-2003	CA 2471967 A1	31-07-2003
			EP 1460898 A1	29-09-2004
			WO 03061386 A1	31-07-2003
			US 2004043950 A1	04-03-2004
WO 02092854	A	21-11-2002	CA 2443627 A1	21-11-2002
			EP 1399593 A2	24-03-2004
			WO 02092854 A2	21-11-2002
			US 2003064385 A1	03-04-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100114465

弁理士 北野 健

(72)発明者 クロッカード, マーティン, アンドリュー

イギリス国 ビーティー２９ ４キューワイ アントリム州 クラムリン, ダイヤモンド ロード, アードモア, ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内

(72)発明者 ベイリー, ジャニス, ロベルタ

イギリス国 ビーティー２９ ４キューワイ アントリム州 クラムリン, ダイヤモンド ロード, アードモア, ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内

(72)発明者 ラモン, ジョン, ビクター

イギリス国 ビーティー２９ ４キューワイ アントリム州 クラムリン, ダイヤモンド ロード, アードモア, ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内

(72)発明者 フィッツジェラルド, スティーブン, ピーター

イギリス国 ビーティー２９ ４キューワイ アントリム州 クラムリン, ダイヤモンド ロード, アードモア, ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 GA18 HA08

HA09 HA12 HA14

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42

QR55 QR62 QR66 QR77 QR82 QS10 QS12 QS16 QS25 QS34

QS36 QX02 QX07

4C084 AA13 AA17 MA01 NA14 ZB262

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15 BA16 BA17 CA41 DA75 DA86

EA20 EA28 EA50 EA51 FA71