

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 12 月 31 日(31.12.2014)



(10) 国際公開番号

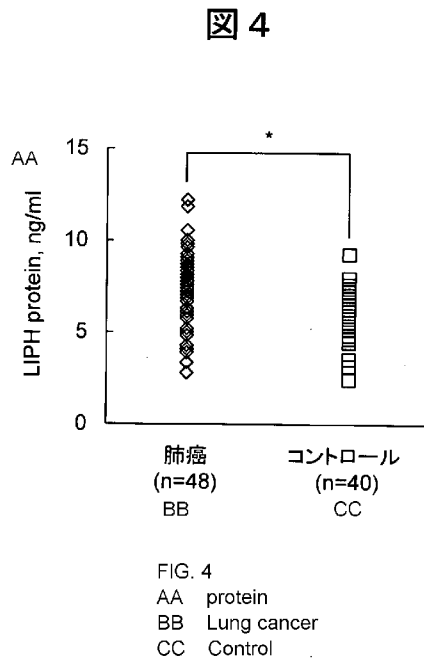
WO 2014/208156 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058147
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 18 日(18.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-136820 2013 年 6 月 28 日(28.06.2013) JP
- (71) 出願人: 栄研化学株式会社(EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1108408 東京都台東区台東 4 丁目 1 9 番 9 号 Tokyo (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 関 泰宏(SEKI, Yasuhiro); 〒3290114 栃木県下都賀郡野木町野木 1 4 3 栄研化学株式会社 野木事業所内 Tochigi (JP). 柴田 典緒(SHIBATA, Norio); 〒3290114 栃木県下都賀郡野木町野木 1 4 3 栄研化学株式会社 野木事業所内 Tochigi (JP). 浅島 誠(ASASHIMA, Makoto); 〒3058562 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 4 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 栗崎 晃(KURISAKI, Akira); 〒3058562 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 4 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL LUNG-CANCER MARKER (LIPH)

(54) 発明の名称: 新規肺癌マーカー (LIPH)



(57) Abstract: The first problem addressed by this invention is the provision of a novel lung-cancer marker. The second problem addressed by this invention is the provision of a lung-cancer marker that exhibits a high detection efficiency. The third problem addressed by this invention is the provision of a lung-cancer marker that is capable of identifying lung-cancer type (histological type). This invention resulted from the discovery that LIPH (lipase member H) is expressed more in multiple lung-cancer-derived cell lines than in normal lung-derived epithelial cells, indicating a high probability that lung cancer results in LIPH hyperexpression.

(57) 要約: 本願発明は、新規な肺癌マーカーを提供することを第1の課題とする。また、本願発明は、検出効率が高い肺癌マーカーを提供することを第2の課題とする。更に、本願発明は、肺癌の種類(組織型)を特定することができる肺癌マーカーを提供することを第3の課題とする。本願発明者らは、LIPH (lipase, member H) は複数の肺癌由来細胞株で正常肺由来上皮細胞と比較して発現が亢進し、肺癌において高発現している可能性が高いことを見出し、本願発明を完成させた。



LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称

新規肺癌マーカー（LIPH）

技術分野

本願発明は、癌の診断を補助する臨床検査薬の技術分野に関する。更に、本願発明は、癌マーカー、特に肺癌検出用の肺癌マーカー、及び食道癌検出用の食道癌マーカーに関する。

背景技術

人口の高齢化などにより、癌が増加しており、2012年に世界では癌患者は3200万に達し、1年で1420万人が新たに癌であると診断されたといわれている。我が国においても癌は、年間34万人が死亡する、死因第1位の疾患である。癌は、早期発見すれば、治療も可能な病気となっており、癌の早期発見が重要となっている。癌の早期発見には、内視鏡検査や、PET、CT等の開発もされているが、大量の被験者を効率的に検査するには、癌マーカーの開発が欠かせなくなっている。

すでに、種々の癌マーカーが開発されているが、肺癌及び食道癌では、更なる癌マーカーの開発が望まれている。

肺癌は早期発見が困難でその5年生存率は20%に満たない予後不良な疾患の一つである。しかし、Stage IA、IBの早期肺癌に限ればその5年生存率は70%程度と大幅に上昇する。肺癌の種類（組織型）は病理学的にはその形態から小細胞性肺癌及び非小細胞性肺癌に分類され、後者はさらに扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌に分類されている。肺癌マーカーとして現在良く使用されているものには、CYFRA21-1、CEA、SLX、SCC、ProGRP、NSEなどがある。CEAはもっとも一般的な腫瘍マーカーであり、SLXは腺癌に特異性が高い。CYFRA21-1やSCCは扁平上皮癌に特異性が高いとされ、ProGRPやNSEは小細胞癌に特異性が高いといわれている。

また、例えば、特許文献1には、従来からのCYFRA 21-1、CEA、NSE、SCC等の

マーカーと組み合わせて NNMT を用いると感度が向上することを報告している。非特許文献 1 には、糖鎖を利用した肺癌マーカーが報告されている。

また、食道癌は、消化器での一番の致死性の悪性腫瘍の一つであり、検査で食道癌が発見されたときには、すでに病状が相当に進行していることが多い。ステージ 1 で根治的治療をしても 5 年後生存率は、依然、40-60%と低いのが現状である。しかしながら、食道癌マーカーについては、診断、治療効果判定、予後評価のいずれかにでも有用であるものは残念ながら少ない現状である。扁平上皮癌では、SCC と CEA が、腺癌では CEA が使われ、他に食道癌マーカーとしては p53 抗体、及び CYFRA21-1 がある。

なお、肺癌、食道癌のバイオマーカーとして、Opa interacting protein 5 が報告されている(非特許文献 2)。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 特表 2009-545731 号

非特許文献

非特許文献 1 実験医学増刊 Vol. 25 No. 17 「肺癌における糖鎖標的腫瘍マーカーの探索」植田幸嗣，醍醐 弥太郎，中村祐輔

非特許文献 2 Cancer Sci 103:577-586, 2012

発明の概要

CEA 等、臨床で使用されている癌マーカーは検出率が依然低く、例えば、早期肺癌の検出率は 30%程度であり、より高感度な新規マーカーが望まれている。そこで本願発明は、新規な癌マーカーを提供することを第 1 の課題とする。また、本願発明は、検出効率が高い癌マーカーを提供することを第 2 の課題とする。更に、本願発明は、新規な肺癌マーカーを提供することを第 3 の課題とする。また、本願発明は、検出効率が高い肺癌マーカーを提供することを第 4 の課題とする。また、本願発明は、肺癌の種類（組織型）を特定することができる肺癌マーカーを提供することを第 5 の課題とする。その上、他の肺癌マーカーと組み合わせることにより、検出効率及び／又は検出特異性を向上させることができる肺癌マ-

カーを提供することを第6の課題とする。

更に、本願発明は、新規な食道癌マーカーを提供することを第7の課題とする。

また、本願発明は、検出効率が高い食道癌マーカーを提供することを第8の課題とする。その上、他の食道癌マーカーと組み合わせることにより、検出効率及び／又は検出特異性を向上させることができる食道癌マーカーを提供することを第9の課題とする。

本願発明者らは、LIPH (lipase, member H) は複数の肺腺癌由来細胞株で正常肺由来上皮細胞と比較して発現が亢進し、肺癌及び食道癌において高発現している可能性が高いことを見出し、本願発明を完成させた。

さらに本願発明者らは、肺癌組織マイクロアレイを用いた免疫組織染色の結果、LIPH は肺腫瘍組織で染色が見られたが間質組織では染色が見られず、臨床サンプルのタンパク質レベルにおいても肺腫瘍組織での発現が亢進することを明らかにした。LIPH タンパク質の発現を肺癌の組織型別に見てみると、肺腺癌で70%、細気管支肺胞上皮癌で70%と高い陽性率を示した一方で、肺扁平上皮癌で30%、大細胞癌で20%とやや低く、小細胞癌では10検体中1検体のみでその発現が確認され、LIPH タンパク質が肺腺癌に特異的に発現するタンパク質であることを見出した。これらの知見に基づき、本願発明者らは、肺癌の組織型を特定するマーカーを提供する。

本願発明は、新規な、高い信頼性の肺癌マーカーを提供するという優れたものである。特に LIPH は、肺腺癌を特異的に検出できる点で優れたマーカーである。

また本願発明者らは、食道癌の組織マイクロアレイを用いた免疫組織染色の結果、LIPH は食道癌組織で染色が見られたが間質組織では染色が見られなかった。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2013-136820 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、肺癌マーカーの肺癌細胞株における発現を示す。

図2は、肺癌マーカーLIPH の肺癌組織における発現を示す。

図 3 は、LIPH の発現を肺癌組織型別に観察した結果を示す。

図 4 は、健常人とがん患者における LIPH の血清中の検出量を示す。

図 5 は、CEA との相関プロットを示す。

図 6 は、LIPH の発現を食道癌組織型別に観察した結果を示す。

発明を実施するための形態

1. はじめに

本願発明者らは、癌マーカーを開発するために、肺癌で発現が有意に高いと予想される候補遺伝子をまず選抜した。その候補遺伝子の中から、複数の肺癌由来細胞株で正常肺由来上皮細胞と比較して発現量が高いものを更に選抜し、癌マーカーを完成させた。

2. 癌マーカー遺伝子、肺癌マーカー遺伝子、食道癌マーカー遺伝子

本願発明者らは、癌マーカーとして、LIPH (lipase, member H) 遺伝子を同定した。

さらに、本願発明者らは、LIPH (lipase, member H) 遺伝子を肺癌マーカー及び食道癌マーカーとして同定した。

以下の実施例に示されるとおり、上記遺伝子は、複数の種類の肺癌由来細胞株で、正常肺由来細胞と比較して発現が亢進していたことが確認されている。さらに、免疫染色により、肺癌組織及び食道癌組織から上記遺伝子産物である LIPH が検出されている。また、本マーカーは、肺癌及び食道癌への特異性に加え、肺癌切除後の予後との相関性が高く、肺癌の予後予測に使える可能性が非常に高いマーカーである。

3. 癌マーカー遺伝子、肺癌マーカー遺伝子、及び／又は食道癌マーカー遺伝子の発現の確認

遺伝子発現の確認には、当該遺伝子の mRNA 又は当該遺伝子がコードする蛋白質を検出する周知の方法を用いることができる。mRNA の存在を確認する方法としては、例えば、LAMP 法、PCR 法、マイクロアレイ法などを用いることができる。蛋白質の確認方法としては、免疫染色法、ELISA 法などの抗体を用いる方法などを用いることができる。

4. 癌マーカーを用いた、癌細胞の存在を確認する方法及び癌診断を補助する方法、肺癌マーカーを用いた、肺癌細胞の存在を確認する方法及び肺癌診断を補助する方法、食道癌マーカーを用いた、食道癌細胞の存在を確認する方法及び食道癌診断を補助する方法

4-1. サンプル

癌細胞、肺癌細胞又は食道癌細胞の存在を確認する方法に使用するためのサンプル（試料）としては、任意の試料を用いることができるが、好適には被験者からの採取物、具体的には、任意の採取された体液、生検された試料を挙げることができる。特に好適には、被験者の肺疾患部又は食道疾患部の生検試料または喀痰試料を挙げることができる。

4-2. サンプル中の mRNA の検出法並びにそのための試薬及びキット

例えば、生検試料は、細胞を、例えば、界面活性剤、ホモジナイザー、又はフリーズソーイングなどの定法により、破碎し、全 RNA を抽出することができる。目的の mRNA の定量には、LAMP 法、ディファレンシャルディスプレイ法や DNA アレイ（DNA チップ）を用いる方法、定量 PCR 法、リアルタイム PCR 法、コンペティティブ PCR 法を利用することができる。

例えば、リアルタイム PCR 法では、マーカー遺伝子の増幅産物の生成をリアルタイムでモニタリングし、解析する方法があげられる。前記リアルタイムモニタリング試薬としては、例えば、SYBR Green I、TaqMan プローブ等が挙げられる。

また、コンペティティブ PCR 法としては、例えば、細胞内の全 RNA や mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を調製し、当該 cDNA 及び DNA コンペティターを同一チューブ内で反応させる方法や、さらに前記逆転写反応時に mRNA とともに RNA コンペティターを加えて反応させる方法等があげられる。またコンペティターのプライマー配列以外の内部配列としては、例えば、増幅目的 mRNA の配列と相同配列でもよく、非相同な配列でもよい。

また、リアルタイム PCR 法を利用する場合について、より具体的に例示すると、全抽出 RNA から Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応で、cDNA を調製し、これをリアルタイム PCR で計測することができる。RNA 抽出には、例えば、ISOGEN

法（ニッポンジーン）を用いることができる。また、逆転写法には、例えば、PrimeScript(R) II 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いることができる。リアルタイム PCR には、例えば、THUNDERBIRD (商標) SYBR Mix (TOYOBO 社) や TaqMan プローブなどを用いて増幅産物を測定することができる。

また、LIPH 遺伝子の配列又は同配列に 1 から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列に相補的な配列の標識したプローブによるハイブリダイゼーション方法も含まれる。

なお、プライマーとしては、癌マーカー遺伝子、肺癌マーカー遺伝子及び／又は食道癌マーカー遺伝子である LIPH 遺伝子を PCR 法などの遺伝子増幅方法で増幅できるプライマーであれば、いずれのプライマーでもよい。LIPH 遺伝子、例えば、配列番号 1 で示される配列又は同配列に 1 から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列について、その配列の任意の連続する 15 塩基長以上の塩基、好ましくは 16-30 塩基長、より好ましくは、18-28 塩基長からなるプライマーを使用することができる。具体的には、以下の表 1 に記載のものを用いることができる。

表 1

LIPH	forward	TCTGGGTTTGTGGAGAGATG
	reverse	TCAGTGTCGGAATGGATGAC

また、ディファレンシャルディスプレイ法や DNA アレイ（DNA チップ）を用いることもできる。

更にハイブリダイゼーション法には、配列番号 1 で示される配列又は同配列に 1 から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列に相補的な配列の標識したプローブを用いることができる。

プローブの標識としては、例えば、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、酵素などを挙げることができる。放射性同位元素としては、例えば、[3 2 P]、[3 3 P]、[1 2 5 I]、[1 3 1 I] などを用いることができる。蛍光物質としては、例えば、Cy 2、Cy 3、Cy 5、Cy 5. 5、Cy 7、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレスカミン、ローダミンなどを用いることができる。酵素

としては、例えば、標識として常用される、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが挙げられる。

4-2-1.

上記 mRNA 検出方法を実施するためのキットとしては、例えば、(1) LIPH (lipase, member H) 肺癌又は食道癌マーカー遺伝子を LAMP 法などの遺伝子増幅方法で増幅できるプライマー又は 1 組のプライマー(プライマーセット)を含むキット、(2) 一例を挙げれば、表 1 に掲げた 1 組のプライマー(プライマーセット)を含むキットが挙げられる。

4-3. サンプル中のタンパク質の検出方法

本願発明では、マーカー蛋白質の検出法として、例えば、抗体を用いて検出する方法や質量分析法などマーカー蛋白質を特異的に検出できる方法であればいかなる方法を用いても良い。抗体を用いる方法では、上記 LIPH 遺伝子によりコードされるタンパク質に対する抗体は、既に市販されているものを利用しても良いが、定法により調製してもよい。抗体を用いるマーカー蛋白質の検出法としては、免疫染色法、免疫蛍光法、各種のエンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA)・酵素結合免疫測定法 (ELISA)、二重モノクローナル抗体サンドイッチイムノアッセイ法、モノクローナルポリクローナル抗体サンドイッチアッセイ法、ウェスタンブロッティング法、ビオチン-アビジン法、免疫沈降法などを挙げることができる。

4-3-1.

例えば、上記 4. 3 のタンパク質検出方法を実施するためのキットとしては次のようなものが挙げられる。

(1) (i) 酵素標識化モノクローナル抗体及び (i i) 基質溶液

サンドイッチ ELISA 法を実施するためのキットとしては下記の試薬を含むものがある。

(2) (i) モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、(i i) 酵素標識化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、及び (i i i) 基質溶液

ビオチン-アビジン法を実施するためのキットは下記の試薬を含むものである。

(3) (i) ビオチン化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、(ii) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン、及び (iii) 基質溶液

サンドイッチ ELISA 法及びビオチン-アビジン法を実施するためのキットは下記の試薬を含むものである。

(4) (i) モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、(ii) ビオチン化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、(iii) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン及び (iv) 基質溶液

なお上記の基質溶液とは、抗体に標識した酵素の基質であって、酵素反応により検出可能な変化を生じる基質を含有する溶液のことである。例えば、基質溶液としては、アルカリフォスファターゼ (AP) で標識した場合は p-ニトロフェニルリン酸含有緩衝液が、ホースラディッシュパーオキシダーゼ (HRPO) で標識した場合は o-フェニレンジアミン含有緩衝液が、 β -ガラクトシダーゼで標識した場合は、4-メチルウンベリルフェリル- β -ガラクトシドを含有する緩衝液を用いることができる。

ビオチン化抗体を用いる方法としては公知の方法を用いることができるが、好ましくはストレプトアビジンとパーオキシダーゼとのコンジュゲートをビオチンに結合させる方法を用いる。このようなパーオキシダーゼとしては、ホースラディッシュパーオキシダーゼが挙げられる。さらに、パーオキシダーゼの検出には、そのパーオキシダーゼの作用によって発色する物質を用いることが好ましい。

以下に本願発明を、実施例を用いてより具体的に説明する。但し、本願は以下の実施例により限定されるものではない。

[実施例 1]

本願発明者らは、肺癌で発現が有意に高いと予想される候補遺伝子をまず選抜する予備的研究により、8 種の新規肺癌マーカー候補因子を得た。これら因子の肺癌における発現を検証するため肺癌由来細胞株を用いて qPCR を行い、mRNA レベルでの各候補因子の発現を検証した。表 2 記載の細胞を同表記載の培地を用いて、16 種類の肺癌由来細胞株および 2 種類の正常肺由来細胞を 6-well プレートでコンフルエントまで培養した。次に、ISOGEN (ニッポンジーン社) あるいは RNA easy mini kit (QIAGEN 社) を用いて RNA の抽出を行った。抽出した 500ng の全

RNAを鋳型としPrimeScriptII 1st strand synthesis kit (タカラバイオ社) を用いてcDNAの合成を行った。そして合成したcDNAを鋳型としTHUNDERBIRD SYBR Mix (TOYOBO 社) を用いてqPCRを行った。

LIPH (lipase, member H) についての結果を図1に示す。正常肺由来上皮細胞 (SAEC : 小気道上皮細胞、NHBE : 肺胞上皮細胞) と比較し、複数の肺腺癌細胞株で2倍以上の発現が確認された。また、肺扁平上皮癌細胞株で発現が上昇していた。図中グラフの縦軸は遺伝子の発現量を内部標準遺伝子 GAPDH の発現量で除した値を、PC-3 細胞の発現量との相対値で示している。

表 2

表2. 肺癌マーカー候補因子の発現検討に用いた細胞及び培地

細胞名	培養条件	由来	提供元
正常ヒト小気道上皮細胞 (SAEC)	小気道上皮細胞培地キット(無血清) (SAGM™ BulletKit™)	-	タカラバイオ (Lonza)
正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE)	気管支上皮細胞培地キット(無血清) (BEGM™ BulletKit™)	-	タカラバイオ (Lonza)
PC-3	EMEM+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
PC-14	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	IBL
RERF-LC-KJ	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	BRC
RERF-LC-MS	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
ABC-1	EMEM+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
RERF-LC-Ad1	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
RERF-LC-Ad2	RPMI1640+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
VMRC-LCD	EMEM+10% FCS	肺腺癌	HSRRB
LC-2 Ad	(HamF12:RPMI1640=1:1)+ 15%FBS+25mM HEPES(pH7.2)	肺腺癌	BRC
PC-1	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	IBL
LC-1 sq	(HamF12:RPMI1640=1:1)+ 10%FBS+25mM HEPES(pH7.2)	肺扁平上皮癌	BRC
RERF-LC-AI	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	BRC
RERF-LC-sq1	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB
EBC-1	EMEM+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB
HARA	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB
LK-2	RPMI1640+10% FCS	肺扁平上皮癌	HSRRB

提供元略称

IBL

免疫生物学研究所

HSRRB

ヒューマンサイエンス研究資源バンク

BRC

理研バイオリソースセンター

[実施例 2]

タンパク質レベルでの発現を検証するため、Proteintech 社の抗 LIPH ウサギポリクローナル抗体を用いて、市販の組織マイクロアレイ（上海 Outdo 社）に対する免疫染色を行った。用いた組織マイクロアレイには肺癌組織 60 検体および癌検体と同一ドナー由来の周辺正常組織 60 検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片がスポットされている。肺癌のタイプは、肺扁平上皮癌、肺腺癌、肺腺扁平上皮癌、細気管支肺胞上皮癌、大細胞癌および小細胞肺癌各 10 検体である。

まず、キシレン処理を 10 分間、2 回、100% EtOH（エタノール）で 10 分間処理を 2 回、した後、90% EtOH で 10 分間処理し、最後に、70% EtOH エタノールで 10 分間処理して、脱パラフィンし、親水化した。

次に、10mM クエン酸緩衝液中で 110°C 10 分間オートクレーブを行うことで抗原の賦活化を行った。0.3% H_2O_2 /MeOH で 30 分処理して、内在性ペルオキシダーゼを失活させた。その後、Vectastain ABC キット（Vector 社）を用いて免疫染色を行い、DAB Peroxidase Substrate Kit（Vector 社）を用いて発色を行った。また、免疫染色後にヘマトキシリン（Sigma 社）で対比染色を行った。

顕微鏡（BX50（OLYMPUS 社）、EOS kiss X6i で観察し、撮影した結果を図 2 に示す。肺腺癌組織において、腫瘍細胞の細胞質で強く発現していることが明らかとなった。

[実施例 3]

実施例 1 及び 2 の結果より、LIPH は、新規肺癌マーカー候補として有力であると判断した。そこで、以下に肺癌組織型別に LIPH が高発現している割合を検討し、その結果を示す（図 3）。図中の数値は組織マイクロアレイにスポットされている 10 検体中どのくらいの割合で LIPH が高発現しているかを示している。結果、肺腺癌では 70% と高い割合でその発現が確認でき、腺癌と類似した乳頭状所見を示す細気管支肺胞上皮癌（BAC）でも同じく 70% と高い割合で発現が確認できた。一方、扁平上皮癌で 30%、大細胞癌で 20% とやや低く、小細胞肺癌では 10 検体中 1 検体でのみその発現が確認され、非小細胞肺癌に特異的であることが示唆された。また、腫瘍細胞において、肺腺癌では細胞質、気管支上皮癌では細胞表面、扁平上皮癌では膜や核、小細胞肺癌では主に核が陽性であった。

[実施例 4]

肺癌患者血清はビジコムジャパン社から購入し、健常者血清検体は栄研社内より調達した。Maxisoap(nunc 社)に $100\mu\text{g}/\text{well}$ の抗 LIPH ウサギポリクローナル抗体(Proteintech 社)を 4°C 一晩インキュベートすることで固相化し、25%ブロックエースを用いて 4°C 一晩ブロッキングを行った。ブロッキング液を除いた後、10%ブロックエースにより 10 倍希釈した血清検体を $100\mu\text{g}/\text{well}$ 加え、室温で 1 時間反応を行った。10mM PBS (pH7.2) で 3 回洗浄後、1:500 に希釈した抗 LIPH マウスポリクローナル抗体(Sigma 社)を加え室温で 1 時間反応を行った。3 回洗浄後、HRP 標識抗マウス IgG を加え 1 時間反応を行った後、 $100\mu\text{l}$ の OPD 基質を加え発色反応を行った。492nm の吸光度を測定することで LIPH の定量を行った。標準は cusabio biotech 社の Human Lipase member H ELISA Kit に添付された標準物質を使用した。結果を図 4 に示す。

[実施例 5]

実施例 4 で用いた血清検体の CEA 値を測定した。測定試薬は E テスト「TOSOH」II CEA 免疫反応試薬 (東ソー) を用い、測定装置には AIA-800 (東ソー) を用いた。X 軸に実施例 4 で測定した血清 LIPH 値、Y 軸に血清 CEA 値をプロットした散布図を描画し、相関係数を求めた。結果を図 5 に示す。

[実施例 6]

食道癌組織における LIPH のタンパク質レベルでの発現を検証するため、Proteintech 社の抗 LIPH ウサギポリクローナル抗体を用い、市販の組織マイクロアレイ (上海 Outdo 社) に対する免疫染色を行った。用いた組織マイクロアレイには食道癌組織 6 検体および癌検体と同一ドナー由来の周辺正常組織 6 検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片がスポットされている。食道癌検体の組織型はいずれも扁平上皮癌であった。

まず、キシレン処理を 10 分間、2 回、100% EtOH (エタノール) で 10 分間処理を 2 回、した後、90% EtOH で 10 分間処理し、最後に、70% EtOH エタノールで 10 分間処理して、脱パラフィンし、親水化した。

抗原の賦活化は 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 100℃、20 分間加熱処理することで行い、内在性ペルオキシダーゼを失活させるため、0.3%過酸化水素／メタノールで 30 分間スライドを処理した。染色にはタイラマイドを利用したビオチンフリー免疫染色増感システム CASII (Dako 社) を使用し、製造者のプロトコールに従って行った。DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector 社) を用いて発色を行った後、ヘマトキシリン (Sigma 社) で対比染色を行った。観察は IX59 顕微鏡 (オリンパス) を用い、EOS Kiss X6i (Canon) を用いて画像を取得した。

結果を図 6 に示す。図 6 より、LIPH は、食道癌のマーカーとしても用いることができることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本願発明は、診断剤及び診断キット製造を製造する産業で利用することができる。より具体的には、腫瘍診断剤及び診断キットを製造業で利用することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. LIPH 遺伝子によりコードされるポリペプチドである癌マーカー。
2. 癌が肺癌又は食道癌である請求の範囲第 1 項記載の癌マーカー。
3. LIPH をコードする mRNA である癌マーカー。
4. 癌が肺癌又は食道癌である請求の範囲第 3 項記載の癌マーカー。
5. 配列番号 1 で示される配列又は同配列に 1 から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列に相補的な配列の標識した癌検出用プローブ。
6. 癌が肺癌又は食道癌である請求の範囲第 5 項記載の癌検出用プローブ。
7. LIPH 遺伝子を検出するための LIPH 遺伝子配列中の連続する 15 塩基以上の塩基を含む癌検出用プライマー。
8. 癌が肺癌又は食道癌である請求の範囲第 7 項記載の癌検出用プライマー。
9. 配列番号 1 で示される配列又は同配列に 1 から数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された配列について、その配列の任意の連続する 15 塩基長以上の塩基を含む癌検出用プライマー。
10. 癌が肺癌又は食道癌である請求の範囲第 9 項記載の癌検出用プライマー。
11. LIPH に対する抗体を含む癌検出剤。
12. 癌が肺癌又は食道癌である請求の範囲第 11 項記載の癌検出剤。
13. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第 11 又は 12 項記載の肺癌検出剤。
14. 請求の範囲第 7 ～ 10 項いずれか 1 項記載のプライマーを含む肺癌検出キット。
15. 請求の範囲第 11 ～ 13 項いずれか 1 項記載の肺癌検出剤を含む肺癌検出キット。

図 1

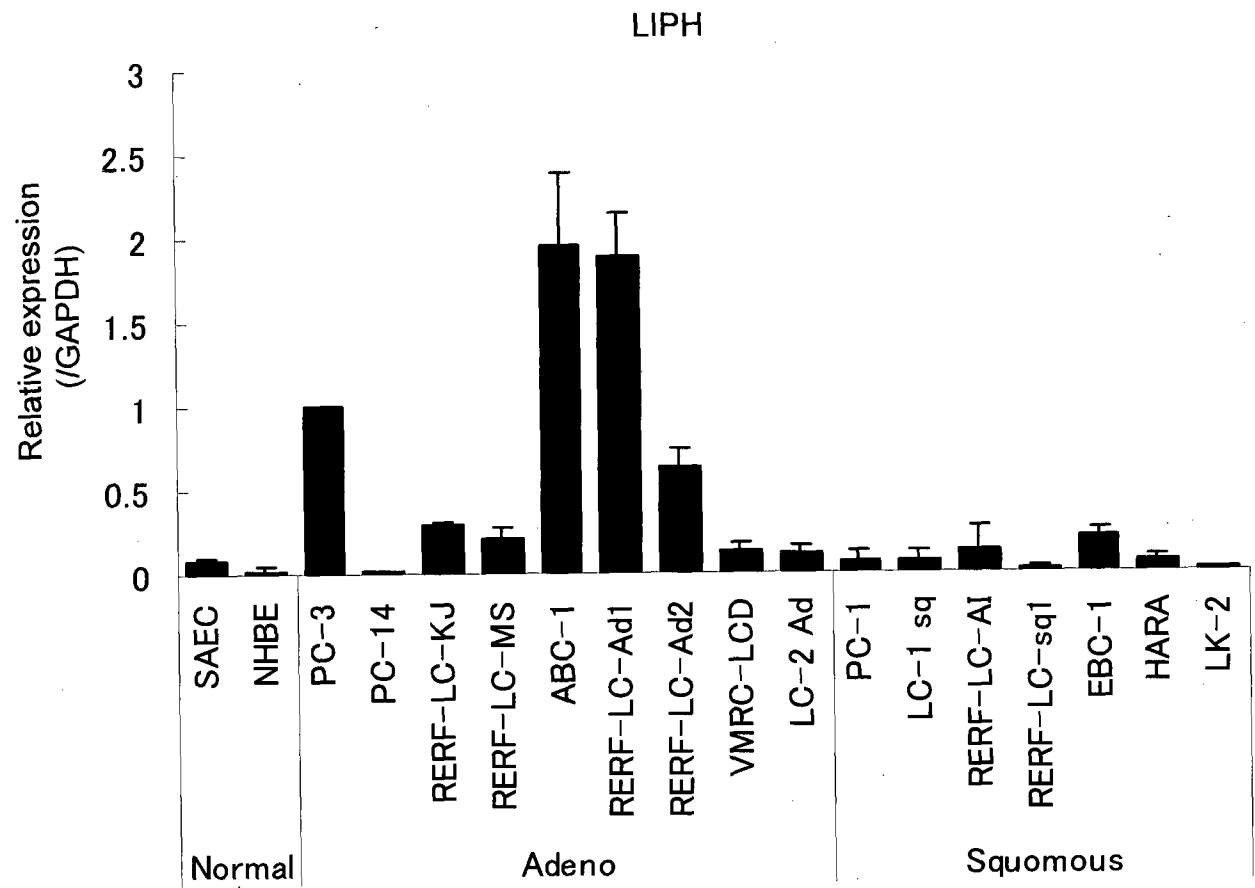
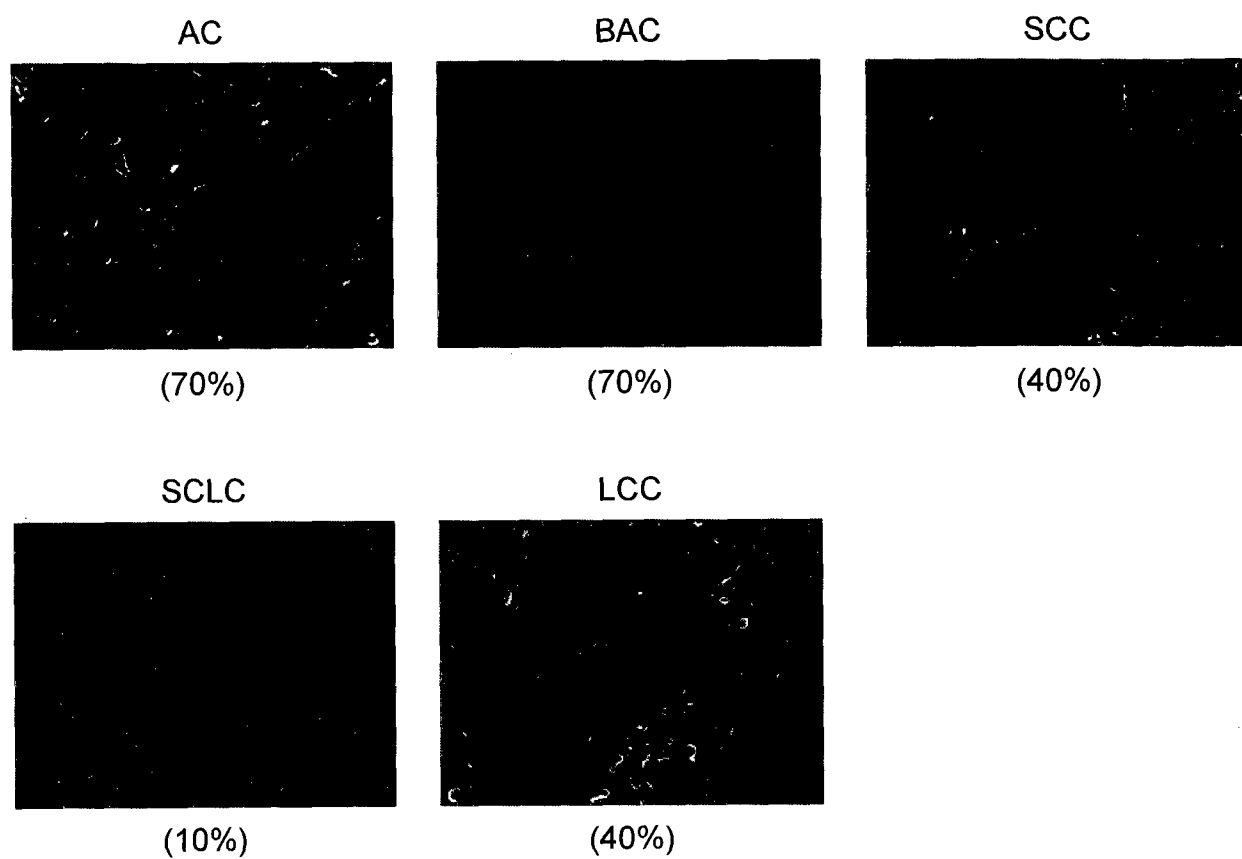


図 2

LIPH



図 3



AC:肺腺癌、BAC:気管支上皮癌、SCC:肺扁平上皮癌、
SCLC:小細胞肺癌、LCC:大細胞癌

図 4

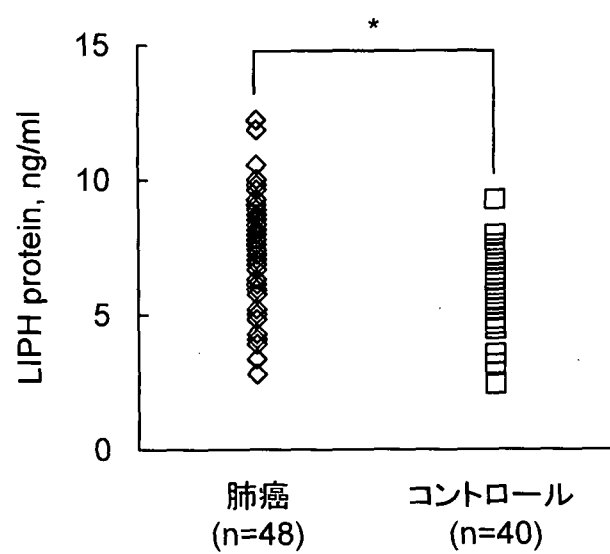


図 5

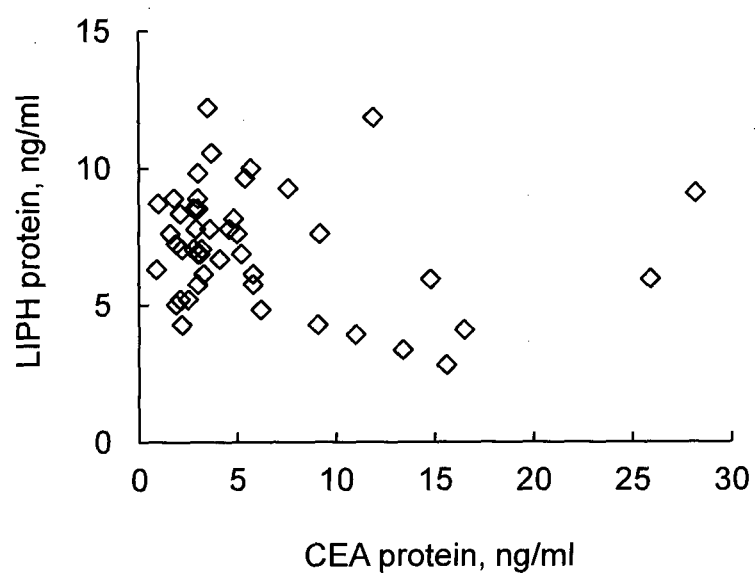
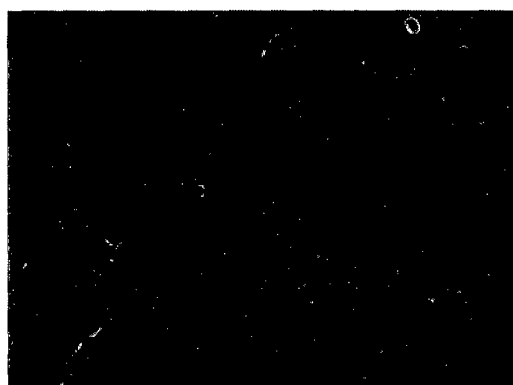


図 6

cancer



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/574, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/577, C07K14/705

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/079833 A1 (International Institute of Cancer Immunology, Inc.), 15 July 2010 (15.07.2010), & US 2012/0021994 A1 & EP 2386633 A1 & CN 102348796 A	1-15
A	Junkichi Koinuma et al., Characterization of an Opa interacting protein 5 involved in lung and esophageal carcinogenesis, cancer science, 2012.03, Vol.103, No.3, P.577-586	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 June, 2014 (13.06.14)

Date of mailing of the international search report
24 June, 2014 (24.06.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-545731 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 24 December 2009 (24.12.2009), claims & US 2009/0263841 A1 & EP 2049905 A & WO 2008/014951 A1 & DE 602007006671 D & CA 2655851 A & CN 101495870 A & AT 468535 T & ES 2345167 T	1-15
A	JP 2009-502116 A (Oncotherapy Science, Inc.), 29 January 2009 (29.01.2009), claims & US 2009/0208514 A1 & EP 1907582 A & WO 2007/013671 A2 & CN 101273144 A & AT 540117 T & ES 2379805 T	1-15
P,X	Yasuhiro SEKI et al., Lipase member H is a novel secreted protein selectively upregulated in human lung adenocarcinomas and bronchioloalveolar carcinomas, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014.01, Vol.443, No.4, P.1141-1147	1-15
A	WeiJun Jin et al., Lipase H, a New Member of the Triglyceride Lipase Family Synthesized by the Intestine, Genomics, 2002.09, Vol.80, Issue3, P.268-273	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/574, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/577, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2010/079833 A1（株式会社癌免疫研究所）2010.07.15, & US 2012/0021994 A1 & EP 2386633 A1 & CN 102348796 A	1-15
A	Junkichi Koinuma et al., Characterization of an Opa interacting protein 5 involved in lung and esophageal carcinogenesis, cancer science, 2012.03, Vol.103, No. 3, P.577-586	1-15

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 3 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

海野 佳子

2 J

3 9 0 6

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-545731 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 2009.12.24, 特許請求の範囲 & US 2009/0263841 A1 & EP 2049905 A & WO 2008/014951 A1 & DE 602007006671 D & CA 2655851 A & CN 101495870 A & AT 468535 T & ES 2345167 T	1-15
A	JP 2009-502116 A (オンコセラピー・サイエンス株式会社) 2009.01.29, 特許請求の範囲 & US 2009/0208514 A1 & EP 1907582 A & WO 2007/013671 A2 & CN 101273144 A & AT 540117 T & ES 2379805 T	1-15
P, X	Yasuhiro SEKI et al., Lipase member H is a novel secreted protein selectively upregulated in human lung adenocarcinomas and bronchioloalveolar carcinomas, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014.01, Vol. 443, No. 4, P. 1141-1147	1-15
A	Weijun Jin et al., Lipase H, a New Member of the Triglyceride Lipase Family Synthesized by the Intestine, Genomics, 2002.09, Vol. 80, Issue3, P. 268-273	1-15