

(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
2012年4月5日(05.04.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/043747 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/072428
- (22) 国際出願日: 2011年9月29日(29.09.2011)
- (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 2010-222832 2010年9月30日(30.09.2010) JP
特願 2011-144115 2011年6月29日(29.06.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 近藤 亨 (KONDO Toru) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031

東京都中央区京橋2-8-21 金鳳堂ビル
9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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.
- (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), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

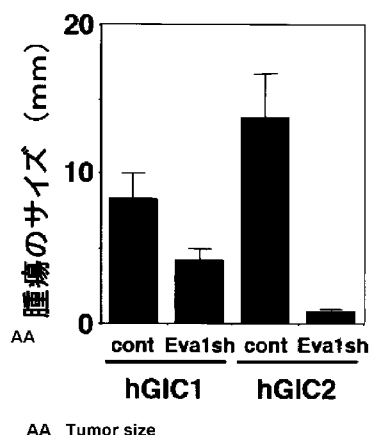
— 国際調査報告(条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: GLIOMA TREATMENT METHOD, GLIOMA EXAMINATION METHOD, METHOD OF DELIVERING A DESIRED MATERIAL TO A GLIOMA, AND DRUG USED IN SAID METHODS

(54) 発明の名称: グリオーマの治療方法、グリオーマの検査方法、所望の物質をグリオーマに送達させる方法、及びそれらの方法に用いられる薬剤

[図18]



(57) Abstract: Disclosed are a glioma treatment method that targets molecules expressed specifically in gliomas, an examination method, a method of delivering a desired substance to a glioma, and a drug used in these methods. It was discovered that by targeting EVA1 and CEACAM1, a glioma can be treated and examined and a desired substance can be delivered to the glioma.

(57) 要約: グリオーマに特異的に発現する分子を標的としたグリオーマの治療方法、検査方法及び所望の物質をグリオーマに送達させる方法、並びにそれらの方法に用いられる薬剤等を提供することを目的とし、Eva1やCeacam1を標的としてグリオーマの治療及び検査を行うことや、所望の物質をグリオーマに送達させることが可能であることを見出した。



-
- 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：

グリオーマの治療方法、グリオーマの検査方法、所望の物質をグリオーマに送達させる方法、及びそれらの方法に用いられる薬剤

技術分野

[0001] 本発明は、グリオーマの治療方法、グリオーマの検査方法、所望の物質をグリオーマに送達させる方法、及びそれらの方法に用いられる薬剤に関し、より詳しくは、E v a 1 及び／又はC e a c a m 1 を標的としたグリオーマの治療方法、検査方法及び所望の物質をグリオーマに送達させる方法に関する。また、本発明は、それらの方法に用いられる薬剤に関する。

背景技術

[0002] グリオーマは、神経幹細胞、神経系前駆細胞及び神経膠細胞（グリア細胞）から発生する腫瘍の総称であり、日本の原発性脳腫瘍の約25%を占める脳の悪性腫瘍の代表格である。また、グリオーマは各々由来する細胞に応じて、星細胞系腫瘍、乏突起膠細胞系腫瘍、乏突起星細胞系腫瘍、上衣系腫瘍などに分類され、さらに、WHOが定める臨床的悪性度によってグレード1～4に評価される。なお、グレード4が最も悪性度が高く予後の悪い腫瘍であり、特にグレード3及び4の腫瘍は悪性グリオーマと称されている。

[0003] この悪性グリオーマにおいては、この数十年間、手術を基本として放射線治療及び化学療法を補助療法とする治療がほとんど変わっておらず、特に中枢神経系組織における悪性グリオーマのうち最も悪性度の高い多形神経膠芽腫（GBM、g l i o b l a s t o m a m u l t i f o r m e）に対しては有効な治療法は未だ見出されていない。

[0004] このため、グリオーマに対する治療や診断の標的となりうる新規な分子の探索が進められており、これまでに、例えば、D B C C R 1 L 遺伝子がオリゴデンドロサイト由来のグリオーマに特異的に発現していることが報告されている（特許文献1）。

- [0005] 一方、一回膜貫通型の細胞膜タンパク質であるE v a 1 (E p i t h e l i a l V - l i k e a n t i g e n、MPZL2とも称される)は、細胞骨格系に関わる分子であり、胸腺等で発現していることが知られている。また、このタンパク質は、肺小細胞癌 (S C C)、転移性肺小細胞癌 (S C L C)、膵がん、乳頭状甲状腺癌等において発現していることが報告されている (非特許文献1～4)。
- [0006] しかしながら、E v a 1とグリオーマとの関係については、これまで何ら報告されていない。
- [0007] また、C e a c a m 1 (癌胎児性抗原関連細胞接着分子1、C A R C I N O E M B R Y O N I C A N T I G E N - R E L A T E D C E L L A D H E S I O N M O L E C U L E 1)は、癌胎児性抗原 (C E A) ファミリーのメンバーであり、他のC E Aタンパク質との同種結合及び異種結合を介して細胞接着を調節することが知られている。さらに、C e a c a m 1は、細胞増殖、免疫細胞の細胞毒性に対する阻害、V E G Fによって誘導される血管形成、アポトーシス、転移、並びに先天免疫応答及び適応免疫応答の調節にも関与していると考えられている (非特許文献5～6)。
- [0008] また、C e a c a m 1のスプライシングバリエントの一つであるC e a c a m 1 - Lは、その細胞質尾部に免疫受容抑制性チロシンモチーフ (i m m u n o r e c e p t o r t y r o s i n e - b a s e d i n h i b i t o r y m o t i f) をコードしており、このモチーフを介して腫瘍抑制活性を発揮することが示されている (非特許文献5～7)。その一方で、C e a c a m 1 - Lの発現が肺、大腸及び甲状腺の癌において亢進しているという報告もある (非特許文献8～11)。
- [0009] このように、肺癌等においてC e a c a m 1はどのような機能を発揮しているかはっきりしておらず、ことグリオーマとの関連性については十分に分析されていないのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開2009-232705号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Difilippantonioら、Eur. J. Cancer、2003年、39巻、1936～1947ページ

非特許文献2：Piyushら、Cell、2009年、138巻、645～659ページ

非特許文献3：Arumugamら、Cancer Res.、2009年、69巻、14号、5820～5828ページ

非特許文献4：Jarzabら、Cancer Res.、2005年、65巻、4号、1587～1597ページ

非特許文献5：Kuespert, K. ら、Curr. Opin. Cell Biol.、2006年、18巻、565～571ページ

非特許文献6：Gray-Owen, S. D. ら、Nat. Rev. Immunol.、2006年、6巻、433～446ページ

非特許文献7：Huber, M. ら、J. Biol. Chem.、1999年、274巻、335～344ページ

非特許文献8：Barnett, T. R. ら、J. Cell Biol.、1989年、108巻、267～276ページ

非特許文献9：Wang, L. ら、Clin. Cancer Res.、2000年、6巻、2988～2993ページ

非特許文献10：Liu, W. ら、Oncogene、2007年、26巻、2747～2758ページ

非特許文献11：Gaur, S. ら、Mol. Cancer、2008年、7巻、46

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、グリオーマに特異的に発現する分子を見出し、当該分子を標的としたグリオー

マの治療方法、検査方法及び所望の物質をグリオーマに送達させる方法、並びにそれらの方法に用いられる薬剤等を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、E v a 1 遺伝子がグリオーマに特異的に発現しており、E v a 1 遺伝子の機能を抑制する分子（抗E v a 1 タンパク質抗体、E v a 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド、E v a 1 遺伝子の転写産物に結合するRNA）によって、グリオーマ細胞の増殖能、腫瘍形成能及び組織浸潤能、並びにグリオーマ幹細胞の腫瘍塊形成能が抑制できることを見出した。また、本発明者は、抗E v a 1 タンパク質抗体を用いて、グリオーマ幹細胞に所望の物質を送達しうることも見出した。さらに、本発明者は、脳腫瘍データベースを用いた調査から、グリオーマ患者の生存率とその患者由来のグリオーマにおけるE v a 1 遺伝子の発現との間には強い相関があることも見出した。
- [0014] また、本発明者は、グリオーマ幹細胞においてE v a 1 の発現を抑制することにより、多数の遺伝子の発現パターンが変動することを見出した。さらに、E v a 1 の発現を抑制することにより顕著な発現低下が認められたC e a c a m 1 遺伝子に着目し、鋭意研究を重ねた。その結果、C e a c a m 1 は正常な脳の組織では発現していないものの、グリオーマ幹細胞やグリオーマ（主にGBM）において高発現しており、さらに、脳腫瘍データベースを用いた調査から、グリオーマ患者の生存率とその患者由来のグリオーマにおけるC e a c a m 1 遺伝子の発現との間には強い相関があることも見出した。また、C e a c a m 1 -L の発現を増強することにより、グリオーマ幹細胞の悪性度は亢進する一方で、C e a c a m 1 の発現を抑制すると、グリオーマの悪性度が低下することも本発明者は明らかにした。
- [0015] これら知見に基づき、本発明者は、E v a 1 やC e a c a m 1 を標的としてグリオーマの治療及び検査を行うことや、所望の物質をグリオーマに送達させることが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] 本発明は、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

(1) 対象における、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する、グリオーマの治療方法。

(2) E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する分子を有効成分とする、グリオーマの治療薬。

(3) E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する分子が、下記 (a) から (f) のいずれかに記載の分子である、(2)に記載の治療薬。

(a) 抗E v a 1 タンパク質抗体

(b) E v a 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド

(c) E v a 1 遺伝子の転写産物に結合するRNA

(d) 抗C e a c a m 1 タンパク質抗体

(e) C e a c a m 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド

(f) C e a c a m 1 遺伝子の転写産物に結合するRNA

(4) 対象における、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現を検出する、グリオーマの検査方法。

(5) E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現産物に結合する分子を有効成分とする、グリオーマの検査薬。

(6) 抗E v a 1 タンパク質抗体及び抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を有効成分とする、(5)に記載の検査薬。

(7) 所望の物質が結合された抗E v a 1 タンパク質抗体及び所望の物質が結合された抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を対象に投与する、所望の物質を対象におけるグリオーマに送達さ

せる方法。

(8) 抗E v a 1 タンパク質抗体及び抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を有効成分とする、所望の物質を対象におけるグリオーマに送達させるための薬剤。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、E v a 1 やC e a c a m 1 を標的としてグリオーマの治療及び検査を行うことや、所望の物質をグリオーマに送達させることが可能となった。

図面の簡単な説明

[0018] [図1] ヒトE v a 1 (h E v a 1) アミノ酸配列(配列番号2に記載のアミノ酸配列)及びマウスE v a 1 (m E v a 1) アミノ酸配列(配列番号4に記載のアミノ酸配列)のアライメントを示す図である。図中、下線が引かれているアミノ酸配列は、抗E v a 1 抗体の抗原として用いた合成ペプチドの配列(86~102アミノ酸)であることを示す。また、太字はシグナル配列(1~20アミノ酸)であることを示し、四角で囲んだ箇所は膜貫通ドメイン(152~175アミノ酸)であることを示し、矢印はシステイン残基を指し示す。

[図2] F L A G タグを融合させたh E v a 1 タンパク質を用いたウェスタンブロットティングにより、抗E v a 1 抗体を評価した結果を示す写真である。なお、抗F L A G タグ抗体を用いた分析の結果は抗E v a 1 抗体を用いた分析の結果の陽性対照であり、抗G A P D H 抗体を用いた分析の結果を内部標準(ローディングコントロール)とした。

[図3] マウスグリオーマ幹細胞及びヒトグリオーマ幹細胞におけるE v a 1 の発現を、R T - P C R により分析した結果を示す電気泳動の写真である。なお、g a p d h 遺伝子の発現を内部標準とした。

[図4] N S C L 6 1 及びh G I C におけるE v a 1 タンパク質の発現を、免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中緑色に発光している部分は抗E v a 1 抗体によって染色された部位を示し、図中青色に発

光している部分は、Hoechst 33342を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは50 μ mを示す。

[図5] NSCL61由来の腫瘍におけるEva1タンパク質の発現を、免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中赤色に発光している部分は抗Eva1抗体によって染色された部位を示し（真ん中の2パネル 参照）、図中緑色に発光している部分はGFPの発現を示し（左側の2パネル 参照）、図中青色に発光している部分は、Hoechst 33342を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは200 μ mを示す。なお、GFPはNSCL61を樹立するために導入したベクター内に組み込まれているものであるため、その発現はNSCL61又はNSCL61由来の細胞であることを示している。

[図6] hGIC由来の異種移植腫瘍におけるEva1タンパク質の発現を、免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中緑色に発光している部分は抗Eva1抗体によって染色された部位を示し、図中青色に発光している部分は、Hoechst 33342を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは50 μ mを示す。

[図7] グリオーマ組織原発性GBM (primary GBM, primary glioblastoma multiforme、原発性多形性神経膠芽腫) におけるEva1タンパク質の発現を、免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中緑色に発光している部分は抗Eva1抗体によって染色された部位を示し、図中青色に発光している部分は、Hoechst 33342を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは50 μ mを示す。

[図8] マウス脳の矢状断面（胎生18日 (E18)、生後1日 (P1)、生後100日 (P100)）におけるEva1タンパク質の発現を、免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中緑色に発光している部分はEva1の発現を示し（上から2段目の3パネル 参照）、図中赤色に発光している部分はNestinの発現を示し（一番上の3パネル 参照）、図

中青色に発光している部分は、Hoechst 33342を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また、図中「V」は脳室を示し、スケールバーは50 μ mを示す。

[図9]ヒト原発性グリオーマ組織及びヒトグリオーマ幹細胞におけるEva1の発現を、RT-PCRにより分析した結果を示す電気泳動の写真である。なお、gapdh遺伝子の発現を内部標準とした。

[図10]グリオーマ細胞株におけるEva1の発現を、RT-PCRにより分析した結果を示す電気泳動の写真である。なお、gapdh遺伝子の発現を内部標準とした。

[図11]hGIC及びグリオーマ細胞株のEva1を免疫染色し、フローサイトメトリーによって分析した結果を示す図である。図中左側は二次抗体(Alexa 568で標識されたヤギ由来の抗ウサギIgG抗体)のみを各細胞と反応させたものの結果を示し、図中真ん中はコントロール抗体(ウサギIgG)のみを各細胞と反応させたものの結果を示し、図中右側は、抗Eva1抗体と二次抗体とを各細胞に反応させたものの結果を示す。

[図12]抗Eva1抗体による腫瘍細胞塊(sphere)形成の抑制を示す顕微鏡写真である。図中スケールバーは200 μ mを示す。

[図13]抗Eva1抗体とRab-ZAPとの組み合わせによる、細胞障害アッセイの結果を示すグラフである。図中「hGIC1- α Eva1 Ab」は抗Eva1抗体とRab-ZAPとをhGIC1に添加した結果を示し、「hGIC2- α Eva1 Ab」は抗Eva1抗体とRab-ZAPとをhGIC2に添加した結果を示す。また、「hGIC1-cont Ab」はコントロール抗体(ウサギIgG)とRab-ZAPとをhGIC1に添加した結果を示し、また「hGIC2-cont Ab」はコントロール抗体(ウサギIgG)とRab-ZAPとをhGIC2に添加した結果を示す。

[図14]Eva1遺伝子に対するshRNA(Eva1sh)を発現させることにより、ヒト及びマウスグリオーマ幹細胞の増殖は低下したことを示すグ

ラフである。図中、縦軸は5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を取り込んだ細胞 (BrdU+cells) の割合 (%) を示し、コントロールshRNAが発現しているグリオーマ幹細胞 (hGIC1、hGIC2、又はNSCL61) と比較して、アスタリスクが一つ付されているのは $p < 0.05$ であることを示し、アスタリスクが二つ付されているのは $p < 0.001$ であることを示す。

[図15]生体内において、Eva1shを発現させることにより、hGICの腫瘍形成が減少したことを示すマウスの写真である。

[図16]Eva1sh又はコントロールshRNAを発現させたhGIC1由来の異種移植腫瘍の写真である。

[図17]Eva1sh又はコントロールshRNAを発現させたhGIC2由来の異種移植腫瘍の写真である。

[図18]Eva1sh又はコントロールshRNAを発現させたhGIC由来の異種移植腫瘍のサイズ (長径) の測定の結果を示すグラフである。図中「cont」はコントロールshRNAを発現させたhGIC由来の異種移植腫瘍の結果を示し、「Eva1sh」はEva1遺伝子に対するshRNAを発現させたhGIC由来の異種移植腫瘍の結果を示す。

[図19]コントロールshRNA、Eva1shRNA (Eva1遺伝子に対するshRNA)、又はEva1-IgG-Fcを発現させたNSCL61由来の腫瘍の写真である。

[図20]米国国立がん研究所の脳腫瘍データベース REMBRANT (Repository for Molecular BRAin Neoplasia Data) を用いて、患者由来のグリオーマにおけるEva1のmRNAレベルでの発現と、その患者の生存率との関連性を調べた結果を示すグラフである。縦軸は「術後のグリオーマ患者の生存率」を、横軸は「グリオーマ患者の術後の調査期間」を示す。

[図21]hGSC及びヒト初代培養GBM細胞におけるEva1及びCD31等の発現を免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図

中緑色に発光している部分は抗E v a 1抗体によって染色された部位を示し（最上段の3枚のパネル 参照）、図中赤色に発光している部分はC D 3 1の発現を示し（真ん中の段の3枚のパネル 参照）、図中青色に発光している部分は、H o e c h s t 3 3 3 4 2を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは1 0 0 μ mを示し、最下段の3枚のパネルは、抗E v a 1抗体による染色図と、抗C D 3 1抗体による染色図と、H o e c h s t 3 3 3 4 2による染色図とを重ね合わせた写真である。

[図22] N S C L 6 1由来のグリオーマ標本及びh G S C 2由来のグリオーマ標本におけるE v a 1及びC D 3 1等の発現を免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中緑色に発光している部分は抗E v a 1抗体によって染色された部位を示し、図中赤色に発光している部分はC D 3 1の発現を示し、図中青色に発光している部分は、H o e c h s t 3 3 3 4 2を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは1 0 0 μ mを示す。

[図23] 東レ3 D－ジーンマウスオリゴチップ2 4 K（T O R A Y 3 D－g e n e M o u s e O l i g o C h i p 2 4 k.）を用いて、N S C L 6 1とe v a 1 s h－発現N S C L 6 1（N S C L 6 1 + e v a 1 s h）との階層的クラスター分析を行った結果を示す写真である。

[図24] R T－P C Rにより、N S C L 6 1、e v a 1 s h－発現N S C L 6 1、h G S C 2及びe v a 1 s h－発現h G S C 2におけるC e a c a m 1遺伝子等の発現を分析した結果を示す電気泳動の写真である。なおg a p d h遺伝子の発現を内部標準とした。また、「－」はe v a 1 s hが発現していない細胞であることを示し、「＋」はe v a 1 s hが発現している細胞であることを示す。

[図25] N S C、N S C L 6 1及びh G S Cにおけるc e a c a m 1、f g f 5及びk r t 6の発現をR T－P C Rにより分析した結果を示す電気泳動の写真である。なおg a p d h遺伝子の発現を内部標準とした。

[図26] ヒトp r i m a r y g l i o m a及びh G S Cにおけるc e a c a

m 1、f g f 5及びc e a c a m 6の発現をR T - P C Rにより分析した結果を示す電気泳動の写真である。なおg a p d h遺伝子の発現を内部標準とした。

[図27]米国国立がん研究所の脳腫瘍データベース R E M B R A N Tを用いて、患者由来のグリオーマにおけるC e a c a m 1のm R N Aレベルでの発現と、その患者の生存率との関連性を調べた結果を示すグラフである。縦軸は「術後のグリオーマ患者の生存率」を、横軸は「グリオーマ患者の術後の調査期間」を示す。

[図28]N S C L 6 1 及びh G S CにおけるC e a c a m 1の発現を免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中緑色に発光している部分は抗C e a c a m 1抗体によって染色された部位を示し、図中青色に発光している部分はH o e c h s t 3 3 3 4 2を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは1 0 0 μ mを示す。

[図29]p r i m a r y G B M標本（G B M 1 及びG B M 2）におけるC e a c a m 1の発現を免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中茶色の部分は抗C e a c a m 1抗体によって染色された部位を示す。また図中のスケールバーは1 0 0 μ mを示す。

[図30]h G S Cから作製した異種移植腫瘍におけるC e a c a m 1の発現を免疫染色により分析した結果を示す顕微鏡写真である。なお、図中赤色に発光している部分は抗C e a c a m 1抗体によって染色された部位を示す（真ん中の段の4枚のパネル 参照）。図中緑色に発光している部分はG F P発現部位を示し（最上段の4枚のパネル 参照）、図中青色に発光している部分は、H o e c h s t 3 3 3 4 2を用いて対比染色された細胞内の核を示す。また図中のスケールバーは1 0 0 μ mを示し、最下段の4枚のパネルは、抗C e a c a m 1抗体による染色図と、抗G F P抗体による染色図と、H o e c h s t 3 3 3 4 2による染色図とを重ね合わせた写真である。さらに図中「I n v a s i o n」及び「T u m o r m a s s」は、異種移植腫瘍の「浸潤」部及び「腫瘍塊」を各々示す。

[図31] hGSC、NSCL61及びOPCL61におけるceacam1-l (L) 及びceacam1-s (S) の発現をRT-PCRにより分析した結果を示す電気泳動の写真である。なお、図中「M」はHyperLadder 1 (BioLine社製) を展開したレーンであることを示す。

[図32] ヒトprimary glioma及びhGSCにおけるceacam1、fgf5 及びceacam6 の発現をRT-PCRにより分析した結果を示す電気泳動の写真である。なおgapdh遺伝子の発現を内部標準とした。

[図33] FLAGタグ結合Ceacam1-L及び／又はCeacam1shRNAを強制発現させたCos7細胞を抗FLAG抗体及び抗GAPDH抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析した結果を示す写真である。ウェスタンブロッティングは、コントロールベクター (control vector)、FLAGタグ結合Ceacam1-L発現ベクター (ceacam1-2×FLAG)、ceacam1sh発現ベクター (ceacam1shRNA) をCos7細胞に導入し、その導入 (トランスフェクション) 後2日目に回収した細胞抽出物を用いて行った。なお、抗GAPDH抗体を用いた分析の結果を内部標準 (ローディングコントロール) とした。また「Mouse」はマウスCeacam1に関しての結果を示し、「Human」はヒトCeacam1に関しての結果を示す。

[図34] クリスタルバイオレット染色により、controlsh発現NSCL61、ceacam1sh発現NSCL61、controlsh発現hGSC61、ceacam1sh発現hGSCの増殖を分析した結果を示す写真である。

[図35] ソフトアガーにて、Ceacam1発現hGSCは、それらの親細胞 (cont) よりも大きいコロニーを形成したことを示す写真である。

[図36] Ceacam1発現hGSCを注入したマウスの生存曲線 (実線) 及びそれらの親細胞を注入したマウスの生存曲線 (点線) を示すグラフである。

[図37] C e a c a m 1 発現 h G S C 由来のグリオーマ標本をヘマトキシリン・エオシン染色にて分析した結果を示す顕微鏡写真である。図中のスケールバーは 1 0 0 μ m を示す。

発明を実施するための形態

[0019] <グリオーマの治療方法>

本発明は、対象における、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する、グリオーマの治療方法を提供する。

[0020] 本発明において「グリオーマ」とは、神経幹細胞、神経系前駆細胞、及び神経膠細胞から発生した腫瘍の総称であり、例えば、多形神経膠芽腫（G B M）、星細胞腫（アストロサイトーマ）、随芽腫、脳室上位腫、オリゴデンドログリオーマ、脈絡叢乳頭腫、特に退形成アストロサイトーマ、退形成オリゴデンドロアストロサイトーマ、退形成オリゴデンドログリオーマが挙げられるが、これらの疾病に限定されない。

[0021] なお、本発明にかかるグリオーマの治療とは、例えば、グリオーマ細胞の増殖能の抑制、グリオーマ細胞の腫瘍形成能の抑制、グリオーマ細胞の組織浸潤能の抑制、グリオーマ幹細胞の腫瘍塊形成能の抑制、グリオーマにおける血管形成の抑制等を介して行われるものが挙げられる。

[0022] 本発明の治療方法における「対象」は、グリオーマ患者である。ヒト以外の動物におけるグリオーマの治療を目的とする場合には、対象は、例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、鳥等が挙げられる。

[0023] 本発明の治療方法における「遺伝子の機能の抑制」は、遺伝子の発現の抑制（転写の抑制、翻訳の抑制）並びに、転写産物（m R N A）及び翻訳産物（タンパク質）の機能の抑制の双方を含む意である。

[0024] 本発明において、機能の抑制の対象となる「E v a 1 遺伝子」は、ヒト由来のものであれば典型的には配列番号1に記載のD N A 配列からなる遺伝子であり、マウス由来のものであれば典型的には配列番号3に記載のD N A 配列からなる遺伝子である。しかしながら、遺伝子のD N A 配列は、その変異

などにより、自然界において（すなわち、非人工的に）変異しうる。従って、本発明においては、このような天然の変異体も、機能の抑制の対象となりうる。

[0025] 本発明において、機能の抑制の対象となる「C e a c a m 1 遺伝子」は、BGP（胆汁糖タンパク質、B I L I A R Y G L Y C O P R O T E I N）、BGP1（B I L I A R Y G L Y C O P R O T E I N 1、）又はCD66（CD66抗原）遺伝子とも称され、ヒトにおいては19q13.2に、マウスにおいては7番染色体に座乗している遺伝子である。ヒト由来のものであれば、典型的には、配列番号13に記載のDNA配列からなる遺伝子（ヒトC e a c a m 1 - L 遺伝子）及び配列番号15に記載のDNA配列からなる遺伝子（ヒトC e a c a m 1 - S 遺伝子）である。また、マウス由来のものであれば、典型的には、配列番号17に記載のDNA配列からなる遺伝子（マウスC e a c a m 1 - L 遺伝子）及び配列番号19に記載のDNA配列からなる遺伝子（マウスC e a c a m 1 - S 遺伝子）である。しかしながら、遺伝子のDNA配列は、その変異などにより、自然界において（すなわち、非人工的に）変異しうる。従って、本発明においては、このような天然の変異体も、機能の抑制の対象となりうる。

[0026] また、後述の実施例において示す通り、ヒトグリオーマ幹細胞においてはC e a c a m 1 - L 遺伝子とC e a c a m 6 遺伝子とが発現していることが明らかになっているため、本発明の治療方法においては、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子と併せて、C e a c a m 6 遺伝子の機能を抑制してもよい。

[0027] なお、本発明において、「C e a c a m 6 遺伝子」は、NCA（非特異的交差反応性抗原、N O N S P E C I F I C C R O S S R E A C T I N G A N T I G E N）、正常交差反応性抗原（N O R M A L C R O S S R E A C T I N G A N T I G E N）、CEAL（CEA様タンパク質、C E A - L I K E P R O T E I N）遺伝子とも称され、ヒトにおいては19q13.2に座乗している遺伝子である。ヒト由来のものであれば、典型的には、

配列番号 21 に記載の DNA 配列からなる遺伝子である。しかしながら、遺伝子の DNA 配列は、その変異などにより、自然界において（すなわち、非人工的に）変異しうる。従って、本発明においては、このような天然の変異体も、機能の抑制の対象となりうる。また、Ceacam6 遺伝子の機能を抑制する場合には、後述の「Eva1 遺伝子及びCeacam1 遺伝子のうちの少なくともいずれか 1 つの遺伝子の機能の抑制」する場合と同様に、抗 Ceacam6 タンパク質抗体、Ceacam6 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド、Ceacam6 遺伝子の転写産物に結合する RNA を用いて行うことができ、これらの分子は後述の＜グリオーマの治療薬＞の項に記載の方法に沿って調製することができる。

[0028] 「Eva1 遺伝子及びCeacam1 遺伝子のうちの少なくともいずれか 1 つの遺伝子の機能の抑制」は、後述の「Eva1 遺伝子及びCeacam1 遺伝子のうちの少なくともいずれか 1 つの遺伝子の機能を抑制する分子（以下、「Eva1 遺伝子等の機能を抑制する分子」とも称する）」、例えば、抗Eva1 タンパク質抗体、Eva1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド、Eva1 遺伝子の転写産物に結合する RNA、抗Ceacam1 タンパク質抗体、Ceacam1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド、Ceacam1 遺伝子の転写産物に結合する RNA を用いて行うことができる。

[0029] 当該分子を対象に投与方法としては、例えば、脳内への直接投与や静脈注射等により行うことができる。Eva1 遺伝子等の機能を抑制する分子を脳内に直接投与方法としては、例えば、定位脳手術方法によってカニューレ等を挿入し、当該カニューレを通じてグリオーマに投与方法が挙げられる。Eva1 遺伝子等の機能を抑制する分子を脳内に直接投与しない場合には、当該分子に脳関門透過物質を結合させて投与方法を利用することができるが、これに制限されない。対象が GBM を罹患している生体である場合は、血管新生が生じた脳腫瘍内血管に正常な脳にある脳関門（BBB）が形成されていないことから、脳関門透過物質を結合させなくとも、E

v a 1 遺伝子等の機能を抑制する分子を静脈注射等によって G B M に送達することができる。

[0030] 脳関門透過物質としては、例えば、狂犬病ウィルス由来の 29 アミノ酸からなる糖タンパク質 (K u m a r ら、N a t u r e、2007 年 7 月 5 日、448 巻、39~43 ページ 参照) が挙げられるが、これに制限されない。

[0031] <グリオーマの治療薬>

本発明は、E v a 1 遺伝子及び C e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか 1 つの遺伝子の機能を抑制する分子を有効成分とするグリオーマの治療薬を提供する。

[0032] 「E v a 1 遺伝子等の機能を抑制する分子」としては、例えば、抗 E v a 1 タンパク質抗体、E v a 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド、E v a 1 遺伝子の転写産物に結合する R N A、抗 C e a c a m 1 タンパク質抗体、C e a c a m 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド、C e a c a m 1 遺伝子の転写産物に結合する R N A が挙げられる。

[0033] なお、後述の実施例において示す通り、E v a 1 遺伝子に対する s h R N A や C e a c a m 1 遺伝子に対する s h R N A によってグリオーマの増殖等が抑制されることが明らかになり、ひいては E v a 1 遺伝子又は C e a c a m 1 遺伝子の機能の抑制と、グリオーマの増殖等の抑制との間に因果関係があることも明らかになった。また、抗 E v a 1 抗体が、グリオーマ幹細胞の腫瘍細胞塊形成を阻害することが明らかとなった。従って、s h R N A や抗体を含め、これら遺伝子の機能を抑制する分子を用いることにより、グリオーマの増殖等を抑制できることは明白である。

[0034] 抗 E v a 1 タンパク質抗体又は抗 C e a c a m 1 タンパク質抗体 (以下、「抗 E v a 1 タンパク質抗体等」とも称する) としては、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、また、抗体の機能的断片であってもよい。また、「抗体」には、免疫グロブリンのすべてのクラス

及びサブクラスが含まれる。抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部（部分断片）であって、E v a 1 タンパク質又はC e a c a m 1 タンパク質を特異的に認識するものを意味する。具体的には、F a b、F a b'、F (a b')₂、可変領域断片 (F v)、ジスルフィド結合 F v、一本鎖 F v (s c F v)、s c (F v)₂、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体などが挙げられる。

[0035] また、抗E v a 1 タンパク質抗体等には、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、及び、これら抗体の機能的断片が含まれる。本発明の抗体を治療薬としてヒトに投与する場合は、副作用低減の観点から、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体が望ましい。

[0036] 本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髄由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。また、本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフティング）した抗体であり、その作製方法は、公知である（例えば、EP239400、EP125023、WO90/07861、WO96/02576参照）。本発明において、「ヒト抗体」とは、すべての領域がヒト由来の抗体である。ヒト抗体の作製においては、免疫することで、ヒト抗体のレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を利用することが可能である。ヒト抗体の作製手法は、公知である（例えば、Nature, 1993, 362, 255-258、Intern. Rev. Immunol, 1995, 13, 65-93、J. Mol. Biol 1991, 222, 581-59

7、Nature Genetics, 1997, 15, 146-156、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:722-727、特開平10-146194号公報、特開平10-155492号公報、特許2938569号公報、特開平11-206387号公報、特表平8-509612号公報、特表平11-505107号公報）。

[0037] また、抗Eva1タンパク質抗体等には、望ましい活性（Eva1タンパク質又はCeacam1タンパク質への結合活性、坑グリオーマ活性、及び／又は他の生物学的特性など）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。アミノ酸配列変異体は、抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、又はペプチド合成によって作製することができる。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖又は軽鎖の定常領域であってもよく、さらに、可変領域（フレームワーク領域及びCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102:8466-8471 (2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21:485-493 (2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280:24880-24887 (2005)、Protein Engineering, Design & Selection, 21:345-351 (2008)）。

[0038] 改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、最も好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られ

ている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。アミノ酸配列変異体は、抗原への結合活性が対象抗体（例えば、本実施例に記載の抗体）と同等であることが好ましい。抗原への結合活性は、例えば、フローサイトメーター、ELISA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法等を用いて解析することにより評価することができる。

[0039] さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

[0040] 抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数又は位置を変化させるなどの抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。これにより、例えば、抗体のADCC活性を向上させることができる。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合又はO-結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失などの公知の方法で行うことができる（特開2008-113663、米国特許第5047335号、米国特許第5510261号、米国特許第5278299号、国際公開第99/54342号）。

[0041] 本発明の治療薬に用いられる抗Eva1タンパク質抗体等は、後述の＜グリオーマへの送達方法、グリオーマへの送達のための薬剤＞の項に記載した

ように、細胞傷害剤などのグリオーマの治療のための物質が結合されていてもよい。このような抗体を用いることにより、いわゆるミサイル療法を行うことが可能である。

[0042] グリオーマの治療薬の有効成分として含有される E v a 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチドとしては、例えば、配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列の置換、欠失、付加及び／又は挿入が施されたポリペプチドが挙げられる。好ましくは後述の実施例において示す E v a 1 タンパク質の細胞外領域からなるペプチドである。

[0043] また、グリオーマの治療薬の有効成分として含有される C e a c a m 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチドとしては、例えば、配列番号 1 4、1 6、1 8 又は 2 0 に記載のアミノ酸配列の置換、欠失、付加及び／又は挿入が施されたポリペプチドが挙げられる。

[0044] グリオーマの治療薬の有効成分として含有される E v a 1 遺伝子の転写産物に結合する R N A 又は C e a c a m 1 遺伝子の転写産物に結合する R N A (以下、「E v a 1 遺伝子の転写産物に結合する R N A 等」とも称する)としては、E v a 1 タンパク質若しくは C e a c a m 1 タンパク質をコードする遺伝子の転写産物と相補的な d s R N A (二重鎖 R N A) 又は該 d s R N A をコードする D N A が挙げられる。

[0045] d s R N A をコードする D N A は、標的遺伝子の転写産物 (m R N A) のいずれかの領域に対するアンチセンス R N A をコードしたアンチセンス D N A と、該 m R N A のいずれかの領域のセンス R N A をコードしたセンス D N A を含み、該アンチセンス D N A 及び該センス D N A より、それぞれアンチセンス R N A 及びセンス R N A を発現させることができる。また、これらのアンチセンス R N A 及びセンス R N A より d s R N A を作製することができる。

[0046] d s R N A の発現システムをベクター等に保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンス R N A 及びセンス R N A を発現させる場合と、異なるベクターからそれぞれアンチセンス R N A とセンス R N A を発

現させる場合がある。同一のベクターからアンチセンスRNA及びセンスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスDNA及びセンスDNAの上流にそれぞれp o l III系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセットとセンスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入する構成である。

[0047] また、異なる鎖上に対向するように、アンチセンスDNAとセンスDNAとを逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA（s i RNAコードDNA）が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNAとセンスRNAとを発現し得るようにプロモーターを対向して備える。この場合には、センスRNAとアンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖（アンチセンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖）の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A（アデニン）塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパリンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロモーターの種類は異なっていることが好ましい。

[0048] また、異なるベクターからアンチセンスRNA及びセンスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスDNA及びセンスDNAの上流にそれぞれp o l III系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセットとセンスRNA発現カセットとをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させる構成である。なお、上記d s RNAは、当業者であればそれぞれの鎖を化学合成して調製することも可能である。

[0049] 本発明に用いるd s RNAとしては、s i RNA、s h RNA（s h o r t h a i p i n RNA）が好ましい。s i RNAは、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味する。また、s h RNAは、

センスRNAとアンチセンスRNAとがスペーサー配列を配置した1本鎖のRNAであり、細胞内等でセンスRNAとアンチセンスRNAとの間で水素結合が生じ、スペーサー配列がヘアピン構造となるもので、該ヘアピン構造が細胞内で切断されることにより、siRNAとなり得るものを意味する。

[0050] さらに、標的遺伝子の発現を抑制することができ、かつ、毒性を示さなければ、その鎖長に特に制限はない。dsRNAの鎖長は、例えば、15～49塩基対であり、好適には15～35塩基対であり、さらに好適には21～30塩基対である。

[0051] dsRNAをコードするDNAは、標的遺伝子の塩基配列と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を有する。配列の同一性は、BLASTプログラムにより決定することができる。

[0052] 本発明における「Eva1遺伝子の転写産物に結合するRNA等」の他の態様としては、Eva1遺伝子の転写産物又はCeacam1遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA（アンチセンスDNA）や、Eva1遺伝子の転写産物又はCeacam1遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNA（リボザイム）をコードするDNAも挙げられる。

[0053] 本発明のEva1遺伝子等の機能を抑制する分子には、上記の脳関門透過物質が結合されていても良い。本発明の治療薬は、Eva1遺伝子等の機能を抑制する分子に加え、他の成分を含むことができる。他の成分としては、例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩などが挙げられる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガン

ト等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としてはアジ化ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

[0054] <グリオーマの検査方法>

本発明は、対象における、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現を検出する、グリオーマの検査方法を提供する。

[0055] また、後述の実施例に示す通り、グリオーマ患者の生存率とその患者由来のグリオーマにおけるE v a 1 遺伝子又はC e a c a m 1 遺伝子の発現との間に強い相関が見出されたことから、本発明の検査方法によれば、グリオーマに罹患しているか否かの検査のみならず、グリオーマ患者の予後の検査も行うことができる。かかる検査としては特に制限はないが、例えば、図20又は27に示したグラフを指標にグリオーマ患者の予後を判定することができる。

[0056] 本発明の検査方法における「対象」としては、生体及び生体から分離された試料（例えば、細胞、組織、臓器、体液など）が挙げられる。「生体」は、グリオーマ患者に限らず、健常者（グリオーマのおそれがある者を含む）であってもよい。ヒト以外の動物におけるグリオーマの検査を目的とする場合には、「生体」としては、例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、鳥等の動物である。

[0057] 本発明において、発現を検出する「E v a 1 遺伝子」は、ヒト由来のものであれば典型的には配列番号1に記載のDNA配列からなる遺伝子であり、

マウス由来のものであれば典型的には配列番号 3 に記載の DNA 配列からなる遺伝子である。しかしながら、遺伝子の DNA 配列は、その変異などにより、自然界において（すなわち、非人工的に）変異しうる。従って、本発明においては、このような天然の変異体も、検出対象となりうる。

[0058] また、本発明において、発現を検出する「Ceacam1 遺伝子」は、ヒト由来のものであれば、典型的には、配列番号 13 に記載の DNA 配列からなる遺伝子（ヒト Ceacam1-L 遺伝子）及び配列番号 15 に記載の DNA 配列からなる遺伝子（ヒト Ceacam1-S 遺伝子）である。また、マウス由来のものであれば、典型的には、配列番号 17 に記載の DNA 配列からなる遺伝子（マウス Ceacam1-L 遺伝子）及び配列番号 19 に記載の DNA 配列からなる遺伝子（マウス Ceacam1-S 遺伝子）である。しかしながら、遺伝子の DNA 配列は、その変異などにより、自然界において（すなわち、非人工的に）変異しうる。従って、本発明においては、このような天然の変異体も、検出対象となりうる。

[0059] 本発明において「遺伝子の発現を検出する」とは、遺伝子の発現の有無の検出及び発現の程度の検出の双方を含む意である。遺伝子の発現量は、絶対量として又は相対量として把握することができる。相対量を把握する場合には、例えば、用意した標準試料の遺伝子の発現量と比較して判断することができる。「標準試料」は、標的遺伝子を発現しているか否かが事前に特定されている試料である。例えば、既にグリオーマの存在している部位が特定されている病理組織を、本発明の標準試料とすることができる。また、グリオーマに罹患していない組織（正常組織）も、本発明の標準試料とすることができる。

[0060] さらに、本発明において「遺伝子の発現」とは、遺伝子の転写及び翻訳の双方を含む意である。従って、本発明における「遺伝子の発現の検出」には、転写レベル（mRNA レベル）及び翻訳レベル（タンパク質レベル）での検出の双方が含まれる。

[0061] 本発明における遺伝子の発現の検出には、公知の手法を用いることができ

る。転写レベルで検出する方法としては、例えば、RT-PCR、DNAマイクロアレイ解析法、ノーザンブロットイング、*in situ*ハイブリダイゼーション、ドットプロット、RNaseプロテクションアッセイ法が挙げられる。また、翻訳レベルで検出する方法としては、例えば、免疫組織化学的染色法、イメージングサイトメトリー、フローサイトメトリー、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、イムノブロットイング、抗体アレイ、*in vivo* イメージング等の抗体を用いて検出する方法（免疫学的手法）が挙げられる。本発明においては、簡便性の観点から、翻訳レベルで検出する方法が好ましく、特に抗体を用いて検出する方法（免疫学的手法）が好ましい。

[0062] 本発明の検査方法においては、標識物質を結合させた抗体を使用することができる。標識物質を結合させた抗体を用いることにより、Eva1タンパク質に結合した抗体量又はCeacam1タンパク質に結合した抗体量を直接測定することができる。また、標識物質を結合させた二次抗体を利用する方法や二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用する方法などの間接的検出方法を利用することもできる。ここで「二次抗体」とは、上記本発明の抗体に特異的な結合性を示す抗体である。例えば、上記本発明の抗体をウサギ抗体として調製した場合には、二次抗体として抗ウサギIgG抗体を使用することができる。ウサギ、ヤギ、マウスなどの様々な生物種に由来する抗体に対して、使用可能な標識二次抗体が市販されており、本発明の抗体の由来する生物種に応じて、適切な二次抗体を選択し、本発明において使用することができる。二次抗体に代えて、標識物質を結合させたプロテインGやプロテインAなどを用いることも可能である。

[0063] グリオーマの患者を対象として、本発明の方法を実施して得られた情報は、当該患者の病態の評価ないし把握、治療効果の評価などに利用できる。例えば、グリオーマの治療と並行して本発明の方法を実施すれば、結果として得られる情報を基に治療効果を評価することができる。具体的には、薬剤投与後に本発明の方法を実施することで病理組織におけるEva1遺伝子及び

／又はC e a c a m 1 遺伝子の発現の変化を調べ、E v a 1 遺伝子量及び／又はC e a c a m 1 遺伝子量の増減の推移から治療効果を判定することができる。このように本発明の方法を治療効果のモニターに利用してもよい。

[0064] グリオーマの検査は、通常、医師（医師の指示を受けた者も含む。以下同じ。）によって行われるが、本発明の方法によって得られる、病理組織におけるE v a 1 遺伝子の発現量及びC e a c a m 1 遺伝子の発現量に関するデータは、医師による診断に役立つものである。よって、本発明の方法は、医師による診断に役立つデータを収集し、提示する方法とも表現しうる。

[0065] <グリオーマの検査薬>

本発明は対象におけるE v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現産物に結合する分子を有効成分とする、グリオーマの検査薬を提供する。

[0066] 本発明における「E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現産物」とはE v a 1 遺伝子及び／又はC e a c a m 1 遺伝子の転写産物（mRNA）又は翻訳産物（タンパク質）のことをいう。E v a 1 遺伝子又はC e a c a m 1 遺伝子の転写産物に結合することができる分子としては、例えばRT-PCRにおいて用いられるプライマー、DNAマイクロアレイ解析法やノーザンブロットング等に用いられるプローブが挙げられる。当該分子は、E v a 1 遺伝子又はC e a c a m 1 遺伝子の転写産物の塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドである。好ましくは、E v a 1 遺伝子又はC e a c a m 1 遺伝子の転写産物の塩基配列に相補的な連続する15塩基以上の塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0067] E v a 1 遺伝子又はC e a c a m 1 遺伝子の翻訳産物に結合することができる分子としては、例えば抗E v a 1 タンパク質抗体、抗C e a c a m 1 タンパク質抗体が挙げられる。「抗体」は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、また、抗体の機能的断片であってもよい。また、「抗体」には、免疫グロブリンのすべてのクラス及びサブクラス

が含まれる。抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部（部分断片）であって、E v a 1 タンパク質を特異的に認識するものを意味する。具体的には、F a b、F a b'、F (a b') 2、可変領域断片 (F v)、ジスルフィド結合 F v、一本鎖 F v (s c F v)、s c (F v) 2、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体などが挙げられる。

[0068] 本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であれば、抗原 (E v a 1 タンパク質又は C e a c a m 1 タンパク質、それらの部分ペプチド、又はこれらを発現する細胞など) で免疫動物を免疫し、その抗血清から、従来の手段 (例えば、塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィーなど) によって、精製して取得することができる。また、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法や組換え DNA 法によって作製することができる。ハイブリドーマ法としては、例えば、コーラー及びミルスタインの方法 (K o h l e r & M i l s t e i n , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5)) が挙げられ、組換え DNA 法としては、例えば、上記本発明の抗体又はペプチドをコードする DNA をハイブリドーマや B 細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞 (例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など) に導入し、本発明の抗体を組換え抗体として産生させる手法が挙げられる (例えば、P. J. D e l v e s , A n t i b o d y P r o d u c t i o n : E s s e n t i a l T e c h n i q u e s , 1 9 9 7 W I L E Y、P. S h e p h e r d a n d C. D e a n M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , 2 0 0 0 O X F O R D U N I V E R S I T Y P R E S S、V a n d a m m e A. M. e t a l . , E u r. J. B i o c h e m. 1 9 2 : 7 6 7 - 7 7 5 (1 9 9 0)) 。

[0069] 本発明の「E v a 1 遺伝子及び C e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか 1 つの遺伝子の発現産物に結合する分子」としては、これら分子に標識物質を結合させたものを使用することができる。当該標識を検出することにより、E v a 1 遺伝子の発現産物又は C e a c a m 1 遺伝子の発現産物

に結合したこれら分子の量を直接測定することが可能である。標識物質としては、これら分子に結合することができ、化学的又は光学的方法で検出できるものであれば特に制限されることはなく、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質などが挙げられる。

[0070] 本発明の検査方法における対象が生体の場合には、E v a 1 遺伝子の発現産物又はC e a c a m 1 遺伝子の発現産物に結合する分子の投与は、前記＜グリオーマの治療方法＞の項に記載した方法を選択することができる。

[0071] 本発明の検査薬は、E v a 1 遺伝子の発現産物又はC e a c a m 1 遺伝子の発現産物に結合する分子に加え、＜グリオーマの治療薬＞の項で記載した他の成分を含むことができる。

[0072] ＜グリオーマへの送達方法、グリオーマへの送達のための薬剤＞

本発明は、所望の物質が結合された抗E v a 1 タンパク質抗体及び所望の物質が結合された抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を対象に投与する、所望の物質を対象におけるグリオーマに送達させる方法、並びに、抗E v a 1 タンパク質抗体及び抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を有効成分とする、所望の物質を対象におけるグリオーマに送達させるための薬剤を提供する。

[0073] 本発明における「所望の物質」としては特に制限はない。グリオーマの治療目的の場合には、当該物質としては、例えば、細胞傷害剤、特にリボソーム不活化タンパク質（RIP）、すなわち、サポリン、リシン、志賀毒等が挙げられる。グリオーマの検査目的の場合には、当該物質としては、上記の標識物質が挙げられる。グリオーマを標的とした研究開発目的の場合、例えば、グリオーマへの作用を評価するための被験物質が挙げられる。

[0074] 所望の物質が結合される「抗E v a 1 タンパク質抗体」及び「抗C e a c a m 1 タンパク質抗体」としては、前記＜グリオーマの検査薬＞の項又は＜

グリオーマの治療薬>の項に記載した抗体と同様である。また、所望の物質が結合された抗E v a 1 タンパク質抗体及び／又は所望の物質が結合された抗C e a c a m 1 タンパク質抗体を対象に投与方法としては、前記<グリオーマの治療方法>の項に記載した方法を選択することができる。

- [0075] グリオーマに送達させるための薬剤は、抗E v a 1 タンパク質抗体及び／又は所望の物質が結合された抗C e a c a m 1 タンパク質抗体に加え、<グリオーマの治療薬>の項で記載した他の成分を含むことができる。

実施例

- [0076] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例は、以下に記載した実験方法に基づいて行った。

- [0077] <動物及び試薬類>

マウスは、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター（C D B）の動物資源開発室及び日本チャールズリバー株式会社から入手した。また、マウスに関する全ての実験プロトコールは理研C D B動物実験委員会の承認を受けたものである。試薬及び成長因子は、特に記載される場合を除き、シグマアルドリッチジャパン及びペプロテック社から各々購入した。

- [0078] <細胞培養>

マウス神経幹細胞（N S C）、マウスN S C L 6 1、及び、ヒトグリオーマ幹細胞（h G I C）は、下記文献に記載している通りに調製を行い、N S C培地（試薬、b F G F （1 0 n g / m l）、E G F （1 0 n g / m l）を添加したD M E M / F 1 2（G i b c o, B R L社製））中で培養した（K o n d o Tら、G e n e s D e v、2 0 0 4年、1 8巻、2 9 6 3～2 9 7 2ページ、及び、H i d e Tら、C a n c e r R e s.、2 0 0 9年、6 9巻、7 9 5 3～7 9 5 9ページ 参照）。

- [0079] また、O P C L 6 1の樹立は下記の通りに行った。すなわち、先ず、オリゴデンドロ前駆細胞（O P C）への分化誘導を、マウス由来のp 5 3欠損神経幹細胞（p 5 3 - d e f i c i e n t N S C）をO P C培地（試薬、P

DGFAA (10 ng/ml)、bFGF (2 ng/ml)、及び0.25%ウシ胎児血清(FCS))を用いて培養することによって行った後、イムノパニング(immunopanning、Kondo Tら、Genes Dev、2004年、18巻、2963~2972ページ 参照)を逐次行うことによって精製した。そして、得られたOPC 2×10^6 個を、HRasの恒常的活性型(constitutive active form)及びGFPをコードしているpCMS-EGFP-HRasL61 10 μ gを含有するマウスNSC Nucleofector溶液(LONZA社製)100 μ l中に懸濁した。そして、このプラスミドベクターを遺伝子導入装置(製品名:Nucleofector、LONZA社製)を用いてOPCに導入した。遺伝子導入されたOPCを、最適化した培地中で培養し、GFP陽性細胞をフローサイトメトリー(製品名:JSANセルソーター、ベイバイオサイエンス株式会社製)を用いて単離した。

[0080] グリオーマ(神経膠芽腫)細胞株(C6、T98G、Tp483、SF126、U87、及び、U251)は10%ウシ胎児血清(FCS)、100 units/ml ペニシリンG、及び、100 μ g/ml ストレプトマイシン(GIBCO社製)を添加したDMEM中で維持した。Eva1染色に関しては、細胞をNSC培地中で7日間培養し、フローサイトメトリーを用いて解析した。SF126はHS研究資源バンクより購入した。

[0081] <蛍光励起細胞分取(FACS)>

hGIC及びグリオーマ細胞株は、ウサギ由来の抗Eva1ポリクローナル抗体(10 μ g/ml)、及びAlexa568で標識されたヤギ由来の抗ウサギIgG抗体(Molecular Probe社製、1/400に希釈して使用)によって免疫標識した。そして免疫標識した細胞は、JSANセルソーター(ベイバイオサイエンス株式会社製)を通し、二波長の励起光(488 nm固体レーザー及び638 nm半導体レーザー)を用いて分析した。なお、ヨウ化プロピジウム(PI)陽性細胞(例えば、死細胞)は、この分析から除外した。

[0082] <免疫染色>

解剖したマウスの脳を、4%パラホルムアルデヒド中、4℃で一晩固定した。固定後、12~18%スクロース含有PBSを用いて脳を凍結保護し、OCTコンパウンド中に包埋した。そして、大脳皮質から冠状切片（厚さ10 μ m）を調製した。なお、Eva1は、HistovT One（ナカライテスク社製）を、その使用説明書に従って用いて賦活化した。次に、抗体を浸透させるために、切片は0.3% Triton X-100含有PBSをもって前処理し、次いでブロッキング溶液（2% スkimミルク、, 0.3% Triton X-100、PBS）中で1時間処理した。そして、一次抗体とともに4℃で16時間インキュベーションした。固定した細胞の免疫染色は下記文献に記載の通りに行った（Kondo T, ら、EMBO J、2000年、19巻、1998~2007ページ 参照）。また、以下の抗体は細胞内抗原を検出するのに用いた。

ウサギ由来の抗Eva1ポリクローナル抗体（5 μ g/ml）

マウス由来の抗ラットNestinモノクローナル抗体（BD Bioscience社製、1/400に希釈して使用）

ラット由来の抗GFPモノクローナル抗体（ナカライテスク社製、1/500に希釈して使用）

マウス由来の抗CD31モノクローナル抗体（Abcam社製、1/200に希釈して使用）

マウス由来の抗Ceacam1モノクローナル抗体（R&D社製、1/50に希釈して使用）

これらの抗体は、Alexa568標識ヤギ由来の抗ウサギIgG（Molecular Probe社製、1/400に希釈して使用）、Alexa488標識ヤギ由来の抗ウサギIgG若しくは抗ラットIgG（Molecular Probe社製、1/400に希釈して使用）、又はCy3標識ヤギ由来抗マウスIgG抗体（Jackson ImmunoResearch社製、1/400に希釈して使用）を用いて検出した。また、核を可視

化するために、Hoechst 33342 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) により、細胞を対比染色した。

[0083] <ヒト脳腫瘍>

ヒト由来のグリオーマ幹細胞であるhGIC (hGIC1及びhGIC2) は、「Hide Tら、Cancer Res.、2009年、69巻、7953～7959ページ」に記載のものを用了。また、ヒト由来のprimary GBM (primary Glioblastoma multiforme、原発性多形神経膠芽腫) 組織、ヒト原発性グリオーマ組織は、熊本大学医学部脳外科教室より提供を受けた。そして、これらのヒト由来の試料は、理研CDB及び熊本大学大学院医学教育部の倫理委員会での承認を得て、それぞれの研究ガイドラインに従って使用した。なお、hGIC、hGIC1及びhGIC2は各々hGSC、hGSC1及びhGSC2とも称する。

[0084] また、これらの試料から、ポリ(A)+RNAはQuickPrep mRNA Purification Kit (GEヘルスケア社製) を用いて調製し、cDNAはTranscription First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ社製) を用いて合成した。

[0085] また、パラフィン包埋したヒト脳腫瘍は厚さ $6\mu\text{m}$ の切片に調製した。そして、Eva1染色に関しては、HistovT One (ナカライテスク社製) を、その使用説明書に従って用いて、抗原を賦活化した。次に、切片は5%スキムミルク含有TPBS中にて室温下で30分間前処理し、ウサギ由来の抗Eva1ポリクローナル抗体 ($1/50$ に希釈して使用) と共に室温下で2時間インキュベーションし、次いで、Alexa488標識ヤギ由来の抗ウサギIgG (Molecular Probe社製、 $1/400$ に希釈して使用) を用いて免疫染色を行った。また、全ての核を可視化するために、Hoechst 33342 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) により、細胞を対比染色した。

[0086] <ヌードマウスの脳への頭蓋内細胞移植>

NSCL61及びhGICは5 μ lの培地中に懸濁し、そして前もって10%ペントバルビタールで麻酔をかけておいた5～8週齢の雌ヌードマウスの脳内に注入した。注入部位の定位座標は、ラムダから2mm前方、矢状縫合から2mm後方、5mmの深部とした。

[0087] <RT-PCR>

RT-PCRは下記文献に記載の通りに行った(Kondo T, ら, EMBO J, 2000年、19巻、1998～2007ページ 参照)。サイクルパラメーターは、94℃で20秒、57℃で30秒、72℃で35秒の35サイクルとした。なお、gapdhの増幅に関しては、94℃で15秒、53℃で30秒、72℃で90秒の22サイクルとした。また、各遺伝子の増幅には、表1に示すオリゴヌクレオチドDNAプライマーを合成して用いた。

[0088]

[表1]

遺伝子名	5プライマー	3プライマー	配列番号	配列番号
eva1	TTGTGACGCTTTGGCCCGT	CCGCGCATGGCTTTTTCGGG	5	6
ceacam1 for mouse	ATGCTCCGAAGAGCTCTTATG	TTGTGGTGTGTGAGATCTGG	23	24
ceacam1 for human	ACACCATGGGGACCTGTCA	CGATGCTTGAAGTGGTCTCT	25	26
human ceacam1-L	AGTCTGTGAAGCTGACCTGGT	TTACTGCTTTTACTTCTGAATA	27	28
human ceacam1-S	ACTGTGTGAAGCTGACCTGGT	GGTCTGAGCTGGCGGTCTT	29	30
mouse ceacam1-L	CAAGATCCAGTGGCTCTTCAA	CTTCTTTTAACTTGTGAATAAG	31	32
mouse ceacam1-S	CAACATCCAGTGGCTCTTCAA	TGAAGGAGCCAGATCCGG	33	34
figf5	CTCACGGGGAGAGCGTCTG	TGGCACTTGCATGGAGTTTC	36	36
krt6	AGCAGGAGATTGCTGADATG	GCACACAGAGATGTTGACT	37	38
calcitonin-related polypeptide alpha (calca) for mouse	ATGGGCTTGGTGAAGTTCTCC	GTTAGATCTGGGGCTGTCCA	39	40
calcitonin-related polypeptide alpha (calca) for human	ATGGGCTTCCAAAGTTCTCC	GTTAGATCTGGGGCTGTCCA	41	42
calcitonin-related polypeptide beta (calcb) for mouse	TTCCTTCCCTTTTCTGGGCTCTCA	TCAAGGCTGCAGGTTCCCTG	43	44
calcitonin-related polypeptide beta (calcb) for human	ATGGGCTTCCGGAAGTTCTCC	ACATTGGTGGGDDAGAAAGTTG	45	46
stanniocalcin 1 (etc1)	TTTTGCATGGCTGGAAAGTCC	GTCTGTCTGCAGGATGTGGAA	47	48
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (pdh1)	TATGTACCATGCCATCTCTATC	GACAGAGCGTTAATGTAGATAAC	49	50
aldehyde dehydrogenase 1 family member A3 (aldh1a3)	AAGAAAGGAAGGGGCCAAGCT	TGGTGACAGTTTTCAGTTCTGT	51	52
heavy enhancer of split related with YRPW motif 1 (hey1)	GGGACCGAGAAATGGAAAGTTG	AATGCTTCAATGATGCTCAGAT	53	54
plasminogen activator, urokinase (plau)	GGCCCTGGTGGCTATGTGCAG	CCAAAGCCAGTGAATGCACAG	55	56
matrix metalloproteinase 13 (mmp13)	GGCTTAGAGGTGAAGTGGCAAA	GTCCAGGTTTCATCATCATCAAAA	57	58
pyroglutaminylated RFamide peptide receptor (grpfr)	CATGCTTTTAAATGAAGTGGCA	TTCTTCTTGGTGGCTATTTTGG	59	60
DNA damage-inducible transcript 4-like (ddit4)	AACCGGCCAGCATTTGAGA	CCAAAGTTCAGGTGCATAAACAC	61	62
biglycan (bgn)	CCGATCTCAGAGGCCCAAGCT	GTTGTTGAACAGAGGCTGATGCC	63	64
nuclear factor I/X (nfix)	GGTCTCTAAAGAAAGTCAGGAAA	GACAAACCGGTTGGCAGAGG	65	66
neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1 (nbt1)	GTCCATGTGGAGATTGTGAC	TCAATGCTCAGCCCGCTCTT	67	68
protein kinase D1 (prkd1)	ATGGAAGAGGAGTGTGATGAC	GTGTCTCTGCTGGTGTAGTG	69	70

[0089] <ベクターの構築>

全長マウスeva1は、マウスNSC cDNAから、RT-PCR及びKOD plusポリメラーゼ（TOYOBO社製）を用いて、使用説明書に従って増幅し、そしてpMOSBlueベクター（ロシュ社製）にクローニングした。なお、ヌクレオチド配列はBigDye Terminator Kit version 3.1（Applied Biosystems社製）及びABIシーケンサーモデル3130xl（Applied Biosystems社製）を用いて確認した。そして、マウスeva1 cDNAをpcDNA3-2xFLAG-cベクター（Invitrogen社製）に挿入し、pcDNA3-eva1-2xFLAG-cを得た。

[0090] なお、全長マウスeva1 cDNAを増幅するために、以下のオリゴヌクレオチドDNAプライマーを合成した。

5' プライマー：5' -AGAATTTCGCCACCATGTATGGCAAGAGCCCCGC-3'（配列番号：7）

3' プライマー：5' -ACTCGAGGTCTGTATCTTCCACAAAACA-3'（配列番号：8）。

[0091] また、ヒト及びマウスceacam1-L cDNAフラグメントを各々pcDNA3-2xFLAGベクターに挿入し、pcDNA3.1-hceacam1-L-2xFLAG-c及びpcDNA3.1-mceacam1-L-2xFLAG-cを得た。

[0092] なお、全長マウスceacam1-L cDNAフラグメントを増幅するために、以下のオリゴヌクレオチドDNAプライマーを合成した。

5' プライマー：5' -AGAATTTCGCCACCATGGAGCTGGCCTCAGCACA-3'（配列番号：71）

3' プライマー：5' -ACTCGAGCTTCTTTTTTTACTTCTGAATA-3'（配列番号：72）。

[0093] また、全長ヒトceacam1-L cDNAフラグメントを増幅するために、以下のオリゴヌクレオチドDNAプライマーを合成した。

5' プライマー：5' -AGCTAGCGCCACCATGGGGGCACC
TCTCAGCCCC-3' (配列番号：73)

3' プライマー：5' -ACTCGAGCTGCTTTTTTTACTTCT
GAATA-3' (配列番号：74)。

[0094] また、マウスeva1、ヒトeva1、マウスceacam1及びヒトceacam1をノックダウンするために、これらのヘアピン配列をInvivoGen siRNA Wizard (<http://www.sirnawizard.com/>)を用いて作製し、psiRNA-h7SKhygro G1発現ベクター (InvivoGen社製) に各々挿入し、psiRNA-h7SKhygro-meva1sh、psiRNA-h7SKhygro-heva1sh、psiRNA-h7SK-mCC1sh及びpsiRNA-h7SK-hCC1shを得た。

[0095] なお、マウスeva1の標的配列は、5' -GCAGTCAACGGGACAGATGTT-3' (配列番号：9) であり、ヒトeva1の標的配列は、5' -GTGCACACTGTACGCTTCTCT-3' (配列番号：10) であり、本実施例において、これらのベクターから発現されたEva1遺伝子に対するshRNAを「Eva1shRNA」、「Eva1sh」又は「eva1sh」と称する。

[0096] マウスceacam1の標的配列は、5' -GGGAAACACTACGGCTATAGA-3' (配列番号：75) であり、ヒトceacam1の標的配列は、5' -GGATGGCAACCGTCAAATTGT-3' (配列番号：76) である。また、本実施例において、これらのベクターから発現されたCeacam1遺伝子に対するshRNAを「ceacam1shRNA」又は「ceacam1 sh」と称する。

[0097] コントロールshRNA (EGFP遺伝子に対するshRNA) の標的配列は、5' -GCAAGCTGACCCTGAAGTTCA-3' (配列番号：11) である。

[0098] また、トランスフェクションは、Hide, T. ら、Cancer Re

s.、2009年、69巻、7953～7959ページ、Hide, T. ら、Stem Cells、2011年、29巻、4号、590～599ページに記載した通り、Nucleofector (Lonza社製)を用いて、その製造会社の説明書に従って行った。

[0099] <細胞毒性アッセイ>

細胞毒性アッセイは、ウサギ由来の抗Eva1ポリクローナル抗体、及び、リボソーム不活化タンパク質 サポリンが結合している抗ウサギIgG抗体（製品名：Rab-ZAP、Advanced Targeting Systems社製）を用いて、使用説明書に従って行った。すなわち、ウサギ由来のコントロールIgG (Jackson ImmunoResearch社製)又は抗Eva1抗体を、Rab-ZAP (100ng)と共に、96ウェルプレートにおいて、各々室温下で30分間インキュベートした。5000個のhGIC1を各ウェルに播種し、CO₂インキュベーター内において、37℃で2日間培養した。細胞の生存率は下記文献に記載の通りにMTTアッセイによって測定した (Hide Tら、Cancer Res.、2009年、69巻、7953～7959ページ 参照)。

[0100] <遺伝子マイクロアレイ分析>

DNAマイクロアレイ分析は、3D-Gene Mouse Oligo chip 24k (検出遺伝子数：23,522、東レ社製)を用いて行った。分析に用いたトータルRNAは、アミノアリルメッセンジャーAMP II aRNA増幅キット (Amino Allyl Message AMP II aRNA Amplification Kit、Applied Biosystems社製)を用いてCy5標識した。そして、得られたCy5標識aRNAプールを製造会社のプロトコール (www.3d-gene.com)に従ってマイクロアレイにハイブリダイズした。また、ハイブリダイゼーションシグナルはスキャンアレイエクスプレススキャナー (ScanArray Express Scanner、Perkin Elmer社製)を用いてスキャンし、得られたデータはGenePix Pr

バージョン5.0 (Molecular Devices社製)を用いて処理した。さらに、各スポットの生データは、95%信頼区間における全ブランクスポットのシグナル強度によって決定されたバックグラウンドシグナルの平均強度に置換することによって正規化した。そして、生データの強度において、バックグラウンドシグナル強度の2標準偏差 (SD) より大きいものを有効と評価した。また、各遺伝子において検出されたシグナルはグローバルノーマライゼーション (global normalization) 法によって正規化した (検出されたシグナル強度の中央値を25になるように調整した)。

[0101] <ウェスタンブロットティング>

ウェスタンブロットティングは、下記文献に記載の通りに行った (Takana H, ら, Stem Cells, 2009年、27巻、165~74ページ 参照)。なお、ウェスタンブロットティングの分析には、pcDNA3-eval-2xFLAG-c等をCos7細胞にトランスフェクションすることにより導入し、そのトランスフェクションの2日後に細胞から抽出したタンパク質を供した。また、ブロットしたメンブレンを、ウサギ由来の抗Eval抗体 (1/500に希釈して使用)、マウス由来の抗FLAG抗体 (SIGMA社製、1/1000に希釈して使用)、又はマウス由来の抗GAPDH抗体 (Chemicon社製、1/1000に希釈して使用)を用いてプローブした。さらに、ECLシステム (Amersham社製)を検出のために用いた。

[0102] <統計解析>

GraphPad Prismバージョン4ソフトウェアを用い、カプラン・マイヤー法によって、有意性について生存データを解析した (p値はLog-rank検定を用いて算出した)。

[0103] (実施例1)

<ペプチド抗体の作製>

先ず、本発明にかかる抗体 (抗Eval抗体) を作製した。すなわち、先

ずヒト由来のE v a 1 タンパク質 (h E v a 1、配列番号2の細胞外領域 (1~150アミノ酸) から、抗原として86~102アミノ酸 (P M S G R F K D R V S W D G N P E、配列番号12、図1参照) を抗原として選択した。次に選択したアミノ酸配列からなる合成ペプチドを作製し、これを用いてウサギに免疫付与した。そして、かかるウサギから血清を採取し、ペプチドアフィニティーカラムを用いて精製して、ウサギ由来の抗E v a 1 ポリクローナル抗体を調製した。

[0104] また、得られた抗E v a 1 抗体の特異性はウェスタンブロッティングにより評価した。得られた結果は図2に示す。図2に示した結果から明らかなように、p c D N A 3 - e v a 1 - 2 x F L A G - c が導入されたC o s 7 細胞由来のタンパク質を用いたウェスタンブロッティングにおいては、本発明にかかる抗体は抗F L A G タグ抗体同様に、2 x F L A G タグが結合されたE v a 1 タンパク質 (h E v a 1 - 2 x F L A G) を検出できることが確認された。また、コントロールベクター (p c D N A 3) のみを発現させた細胞由来のタンパク質を用いたウェスタンブロッティングにおいては、本発明にかかる抗体は、E v a 1 以外のタンパク質を非特異的に検出しないことも確認された。さらに、h E v a 1 s h R N A によってh E v a 1 - 2 x F L A G の発現が抑制されている細胞由来のタンパク質を用いたウェスタンブロッティングにおいては、本発明にかかる抗体は抗F L A G タグ抗体同様に、細胞内に発現した少量のE v a 1 タンパク質を特異的に検出できることが確認された。

[0105] (実施例2)

＜グリオーマ幹細胞におけるE v a 1 の発現＞

グリオーマ幹細胞 (N S C L 6 1、O P C L 6 1、h G I C 1、h G I C 2) 及び正常細胞 (N S C、O P C、N B (n e u r o b l a s t、神経幹細胞)) におけるE v a 1 のm R N A レベルでの発現を調べるため、R T - P C R を行った。得られた結果を図3に示す。

[0106] また、これらの細胞におけるE v a 1 のタンパク質レベルでの発現を調べ

るため、抗E v a 1抗体を用いた免疫染色を行った。得られた結果を図4に示す。さらに、NSC 61又はh G I Cをヌードマウスの脳に移植することによって形成されたグリオーマにおけるE v a 1のタンパク質レベルでの発現を調べるため、抗E v a 1抗体を用いた免疫染色を行った。得られた結果を図5～6に示す。また、ヒト由来のp r i m a r y GBM組織におけるE v a 1のタンパク質レベルでの発現を調べるため、抗E v a 1抗体を用いた免疫染色を行った。得られた結果を図7に示す。

[0107] さらに、マウスの脳の発生過程におけるE v a 1のタンパク質レベルでの発現を調べるため、マウス脳の矢状断面（胎生18日（E 18）、生後1日（P 1）、生後100日（P 100））を、抗E v a 1抗体及び抗N e s t i n（神経幹細胞のマーカータンパク質）抗体を用いた免疫染色を行った。得られた結果を図8に示す。

[0108] 図3に示した結果から明らかなように、マウス由来のグリオーマ幹細胞（NSCL 61、OPCL 61）及びヒト由来のグリオーマ幹細胞（h G I C 1、h G I C 2）ではe v a 1は発現しているものの、OPC及びNBにおいては発現しておらず、NSCにおいてもごくわずかな発現しか認められなかった。また、図4に示した結果からも明らかなように、マウス由来のグリオーマ幹細胞（NSCL 61）及びヒト由来のグリオーマ幹細胞（h G I C 1、h G I C 2）ではE v a 1は発現しているものの、正常な細胞（NSC）においてはごくわずかな発現しか認められなかった。

[0109] さらに、図5～7に示した結果から明らかなように、ヌードマウス脳内に形成されたグリオーマ幹細胞由来の腫瘍組織、及びヒト由来のp r i m a r y GBM組織においても、E v a 1の発現が確認された。特に、NSCL 61由来の腫瘍組織においては、腫瘍組織全体よりも腫瘍辺縁部において、E v a 1を高発現している細胞が存在していることが確認された。

[0110] また、図8に示した結果から、E v a 1の発現は発生段階（E 18、P 1）の脳の神経幹細胞に局限して検出され、成体（P 100）の脳においてはその発現は消失していることが明らかになった。これは、図3及び図4に示

した結果と一見矛盾しているようにも思われるが、図3及び図4で使用したNSCは長期間（3カ月以上）試験管内で培養しているため、図8に示した成体（P100）の脳における神経幹細胞と同様に、Eva1の発現は、図3及び図4で使用したNSCにおいて低下したことが考えられる。

[0111] （実施例3）

＜グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるEva1の発現＞

次に、実施例2において明らかになったグリオーマ組織におけるEva1の発現を詳細に調べるために、外科手術で取り除かれたグリオーマ組織におけるEva1のmRNAレベルでの発現を調べるためRT-PCRを行った。なお、調べたグリオーマ組織は下記の通りである

GBM: glioblastoma multiforme、多形神経膠芽腫（WHO診断基準のグレード4）

AO: Anaplastic oligodendroglioma、退形成性乏突起膠腫（WHO診断基準のグレード3）

AOA: Anaplastic oligo-astrocytoma、退形成性乏突起星細胞腫（WHO診断基準のグレード3）

OLI: Oligodendroglioma、乏突起膠細胞腫（WHO診断基準のグレード2）

また、前記グリオーマ組織と併せて、正常脳組織（NB: Normal brain又はCB: Control human brain）、及び、実施例2において用いたhGICについても、RT-PCRを行った。得られた結果を図9に示す。

[0112] さらに、ヒトGBM由来のグリオーマ細胞株及びラットグリオーマ細胞株におけるEva1のmRNAレベルでの発現を調べるため、RT-PCRを行った。なお、調べたグリオーマ細胞株は下記の通りである

T98G: ヒトグリオーマ細胞（Steinら、J. Cell. Physiol.、1979年、99巻、43～54ページ 参照）

Tp483: ヒトグリオーマ細胞（Lawら、Cancer Genet

Cytogenet.、2005年、160巻、1～14ページ 参照)

SF126: ヒトグリオーマ細胞 (Rosenblumら、Pharmacol.、1981年、6巻、227～235ページ 参照)

U87: ヒトグリオーマ細胞 (Clarkら、PLoS Genetics、2010年、6巻、1号、e1000832 参照)

U251: ヒトグリオーマ細胞 (Bignerら、Exp. Neurol.、1981年、40巻、201～229ページ 参照)

C6: ラットグリオーマ細胞 (Bendaら、Science、1968年、161巻、370～371ページ 参照)

また、前記グリオーマ細胞株と併せて、実施例2において用いたNSC、NSCL61、及びhGIC2、並びにNSCL61の基となったp53-/-NSC (p53欠損神経幹細胞) についても、RT-PCRを行った。得られた結果を図10に示す。

[0113] 図9及び図10に示した結果から明らかなように、e v a 1は調べた殆どのGBM組織において発現しており、また、いくつかのGBM由来のグリオーマ細胞株においてもe v a 1の発現は確認された。

[0114] (実施例4)

＜グリオーマ幹細胞及びグリオーマ細胞株におけるE v a 1の発現＞

次に、ヒトグリオーマ幹細胞及びヒトグリオーマ細胞株におけるE v a 1のタンパク質レベルでの発現を調べるため、抗E v a 1抗体を用いたFACSによる分析を行った。なお陰性対照として、二次抗体 (Alexa568で標識されたヤギ由来の抗ウサギIgG抗体) のみを各細胞と反応させたもの、コントロール抗体 (ウサギIgG) のみを各細胞と反応させたものを用意し、FACSにて分析を行った。得られた結果を図11に示す。

[0115] 図11に示した結果から明らかなように、E v a 1はヒトグリオーマ幹細胞 (hGIC1及びhGIC2) において強く発現していることが確認された。しかしながら、グリオーマ細胞株においては、E v a 1の発現をFACSにて検出することはできなかった。

[0116] なお、一般的にグリオーマ細胞株を脳内に移植しても実際の脳腫瘍と同じ病理的所見を見つけることは出来ず、一方、グリオーマ幹細胞においては、実際の脳腫瘍と同様の病理的所見を容易に見つけられることが知られている。

[0117] 従って、実施例2～4の記載の通り、成体の脳の正常組織では発現せず、グリオーマ幹細胞及びグリオーマ組織（特にGBM）において高発現しているEva1は、グリオーマのマーカーとしての利用のみならず、これらの治療標的としても利用できることが考えられる。また、このような特異的な発現、特にGBMにおいて高発現しているということから、Eva1はグリオーマ患者の予後診断（グリオーマ患者の術後の生存率並びに生存期間を予測すること）にも利用できることが考えられる。以下の実施例において、これらの可能性について検証する。

[0118] （実施例5）

＜抗Eva1抗体による、グリオーマ幹細胞の腫瘍細胞塊形成の阻害＞

グリオーマ幹細胞の特徴として、無血清培地中で培養した際に非接着性の腫瘍細胞塊（スフィア）を形成することが知られている（Vescoviら、Nature Reviews CANCER、2006年6月、6巻、6号、425～436ページ 参照）。そこで、抗Eva1抗体によるグリオーマ幹細胞の腫瘍細胞塊形成への影響を調べた。すなわち、hGIC1又はhGIC2を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗Eva1抗体（又はコントロール抗体として、ウサギIgG）を添加したNSC培地（無血清）中にて5日間培養した。得られた細胞塊は、軽くピペッティング処理を施して、位相差倒立顕微鏡による観察に供した。得られた結果を図12に示す。図12に示した結果から明らかなように、本発明にかかる抗体によって、グリオーマ幹細胞の腫瘍細胞塊形成は阻害された。

[0119] （実施例6）

＜抗Eva1抗体を用いた細胞毒性アッセイ＞

本発明にかかる抗体がグリオーマへのデリバリー方法に用いることが可能

かどうかを検証するため、R a b-Z A Pを用いた細胞毒性アッセイを行った。得られた結果を図13に示す。なお、R a b-Z A Pはリボソーム不活化タンパク質 サポリンが結合している抗ウサギIgG抗体である。そのため、細胞に結合しているウサギIgGと、R a b-Z A Pとが結合すると、該細胞にサポリンが導入されることにより、細胞死が生じることになる。

[0120] 図13に示した結果から明らかなように、hGIC1及びhGIC2において、コントロール抗体(c o n t A b)とR a b-Z A Pとをこれら細胞の培地中に添加したものよりも、抗E v a 1抗体(α E v a 1 A b)とR a b-Z A Pとを添加したものの方が生存率は低かった。また、その生存率は添加した抗体の濃度依存的に低くなった。

[0121] 従って、本発明にかかる抗体は、所望の物質(例えば、R a b-Z A P)をグリオーマに送達させる方法に用いることができるということが実証された。

[0122] (実施例7)

<E v a 1遺伝子に対するs h R N Aの、グリオーマ幹細胞の細胞増殖並びに腫瘍形成に対する抑制効果の検証>

本発明にかかるE v a 1遺伝子の転写産物に結合するR N A (E v a 1 s h R N A)がE v a 1タンパク質の発現をノックダウンすることにより、グリオーマ幹細胞の細胞増殖を抑制することが可能かどうかを検証した。すなわち、E v a 1 s h R N A (p s i R N A-h 7 S K h y g r o-m e v a 1 s h又はp s i R N A-h 7 S K h y g r o-h e v a 1 s h)を導入したヒト由来又はマウス由来のグリオーマ幹細胞の細胞増殖を、5-b r o m o-2'-d e o x y u r i d i n e (B r d U)を取り込んだ細胞(B r d U+c e l l s)の割合(%)を指標に評価した。得られた結果を図14に示す。

[0123] また、E v a 1 s h R N A (E v a 1 s h)がグリオーマ幹細胞の腫瘍形成を抑制することが可能かどうかを検証した。すなわち、E v a 1 s h R N Aを恒常的に発現させたヒトグリオーマ幹細胞をヌードマウスの脳に移植(

頭蓋内細胞移植) し、移植してから20日間後に脳内に形成された腫瘍を観察、並びにその大きさを計測した。なお、コントロールとして、EGFP遺伝子に対するshRNAを恒常的に発現させたヒトグリオーマ幹細胞を頭蓋内に細胞移植した。得られた結果を図15～18に示す。

[0124] 図14に示した結果から明らかなように、ヒト由来のグリオーマ幹細胞(hGIC1、hGIC2)及びマウス由来のグリオーマ幹細胞(NSCL61)において、Eva1shRNAが細胞内に導入されることにより、BrdUを取り込んだ細胞の割合の低下、すなわち増殖可能な細胞の割合が低下することが示された。

[0125] さらに、図15～18に示した結果から明らかなように、ヒト由来のグリオーマ幹細胞(hGIC1及びhGIC2)において、Eva1shRNAが細胞内に導入されることにより、コントロールshRNAを導入した場合と比較して、得られた腫瘍の大きさは小さいものだった。

[0126] 従って、本発明にかかるEva1遺伝子の転写産物に結合するRNA(Eva1shRNA)はEva1タンパク質の発現をノックダウンして、その機能を抑制することにより、グリオーマ幹細胞の細胞増殖並びに腫瘍形成も抑制できることが明らかになった。

[0127] (実施例8)

＜Eva1遺伝子の機能を抑制する分子の、グリオーマの組織浸潤に対する抑制効果の検証＞

本発明にかかるEva1遺伝子の機能を抑制する分子が、グリオーマの組織浸潤を抑制することが可能かどうかを、Eva1タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチドを用いて検証した。すなわち、先ず、pEF-Fcプラスミドベクターに、Eva1タンパク質の細胞外領域(配列番号2に記載のアミノ酸配列中の1～150アミノ酸)をコードする遺伝子を挿入し、Eva1タンパク質の細胞外領域とヒトIgG-Fcとの融合タンパク質(Eva1-IgG-Fc)を細胞内にて発現させることができるプラスミドを作製した(pEF-Fcプラスミドベクターについては

「Sudaら、J Exp Med.、1994年、179巻、873～879ページ」参照）。次に、このプラスミドをマウス由来のグリオーマ幹細胞（NSCL61）に導入して、Eva1-IgG-Fcを恒常的に発現するNSCL61細胞株（NSCL61+Eva1-IgG-Fc）を樹立した。そして、樹立して得られた細胞、Eva1 shRNAを恒常的に発現させたNSCL61細胞（NSCL61+Eva1 shRNA）、又はコントロールshRNAを恒常的に発現させたNSCL61細胞（NSCL61+control shRNA）を頭蓋内に細胞移植し、移植してから3週間後に脳内に形成された腫瘍を観察した。得られた結果を図19に示す。

[0128] 図19に示した結果から明らかなように、グリオーマ幹細胞（NSCL61+control shRNA）は、移植された全マウスの脳室内において浸潤性のGBMを形成することが確認された。一方、Eva1遺伝子の機能を抑制する分子（Eva1-IgG-Fc又はEva1 shRNA）を恒常的に発現させたグリオーマ幹細胞は、脳室外に高頻度に腫瘍を形成することが明らかになった。

[0129] 従って、Eva1遺伝子の機能を抑制する分子は、グリオーマ幹細胞の細胞増殖並びに腫瘍形成の抑制のみならず、GBMの組織浸潤をも抑制できることが明らかになった。

[0130] （実施例9）

<Eva1の発現とグリオーマ患者の生存率との相関>

Eva1の発現を指標として、グリオーマ患者の予後診断ができるかどうかを検証した。すなわち、米国国立がん研究所の脳腫瘍データベース RE MBRANT (REpository for Molecular BR A in Neoplasia DaTa) を用いて、患者由来のグリオーマにおけるEva1のmRNAレベルでの発現と、その患者の生存率との相関の有無について調べた。得られた結果を図20に示す。

[0131] 図20に示した結果から明らかなように、グリオーマにおいてEva1遺伝子が高発現していた患者の生存期間は予後調査を始めてから500日以内

と短いのに対して、E v a 1 遺伝子が低発現していた患者の術後4000日における生存率は100%と高いものであった。

[0132] 従って、E v a 1 の発現とグリオーマ患者の生存期間並びに生存率との間には強い相互関係があることが明らかになり、E v a 1 遺伝子の発現を検出することはグリオーマの検査、特にグリオーマ患者の予後診断に有効であることが実証された。

[0133] (実施例10)

グリオーマ幹細胞は腫瘍形成性内皮細胞 (tumorigenic endothelial cell) に分化形質転換 (transdifferentiation) できるという知見 (「Ricci-Vitiani, L. ら、Nature、2010年、468巻、824～828ページ」、
「Wang, R. ら、Nature、2010年、468巻、829～833ページ」) を考慮し、ヒトグリオーマ幹細胞 (hGSC1及びhGSC2) 及びヒト初代培養GBM細胞における、E v a 1 と内皮細胞のマーカー：CD31との発現を免疫染色法により分析した。得られた結果を図21に示す。また、グリオーマ幹細胞 (hGSC2又はNSCL61) 由来のグリオーマにおける、E v a 1 とCD31との発現を免疫染色法により分析した。得られた結果を図22に示す。

[0134] 図21及び22に示した結果から明らかなように、E v a 1 陽性細胞において、インビトロ (図21) 及びインビボ (図22) とともに、内皮マーカーであるCD31タンパク質が発現していることが明らかになった。

[0135] 従って、E v a 1 陽性グリオーマ幹細胞 (E v a 1 + GSC) においてCD31が発現しているというこの結果と、グリオーマ幹細胞 (GSC) は腫瘍形成性内皮細胞に分化形質転換するという知見等 (「Ricci-Vitiani, L. ら、Nature、2010年、468巻、824～828ページ」、
「Wang, R. ら、Nature、2010年、468巻、829～833ページ」、
「Calabrese, C. ら、Cancer Cell、2007年、11巻、69～82ページ」) から、GBMにおい

てGSCを維持するのに役立っている腫瘍血管ニッチをEva1+/CD31+ GSCが形成していることが示唆された。

[0136] (実施例11)

次に、Eva1はどのようにしてGSC悪性腫瘍に影響を与えているかを調べるために、DNAマイクロアレイを用いて、NSCL61とeva1sh発現NSCL61 (NSCL61+eva1sh) との間の遺伝子発現の差を分析した。得られた結果を図23に示す。

[0137] その結果、eva1sh発現NSCL61において、コントロールのNSCL61と比較して、1208遺伝子の発現は亢進しており、650遺伝子の発現は低下していたことが明らかになった (図23)。そして、eva1の発現抑制に最も影響を受けている遺伝子としてceacam1を見出した。

[0138] 次に、ceacam1を含め、eva1shの発現抑制に影響を受けている遺伝子の発現パターンを、NSCL61、hGSC2、及びeva1shが発現しているこれらの細胞をRT-PCRにより分析した。得られた結果を図24に示す。

[0139] また、ceacam1のマウス神経幹細胞 (NSC) 及びグリオーマ幹細胞 (NSCL61、hGSC1及びhGSC2) におけるceacam1等の発現をRT-PCRにより分析した。得られた結果を図25に示す。

[0140] さらに、GBM (多形神経膠芽腫)、AA (anaplastic astrocytoma、退形成性星細胞腫)、AOA (退形成性乏突起星細胞腫)、AO (退形成性乏突起膠腫)、CB (正常脳組織) 及びhGSCにおけるceacam1等の発現をRT-PCRにより分析した。得られた結果を図26に示す。

[0141] 図24に示す通り、DNAマイクロアレイ分析並びにRT-PCR分析によって、Ceacam1以外にも、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼイソ酵素1 (pdk1)、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子 (plau)、マトリックスメタロプロテアーゼ13 (mmp13) 及びプロティ

ンキナーゼD1 (p r k d 1) といった沢山の癌関連遺伝子の発現に E v a 1 ノックダウンは影響を及ぼすことが明らかになった。そして、これらの因子は、転移、血管形成及び癌細胞の増殖において必須の役割を果たしていることから、G S C の悪性特性 (m a l i g n a n t p r o p e r t y) を E v a 1 が調整していることが示唆される。

[0142] また、図25及び26に示す通り、E v a 1 同様に、C e a c a m 1 は正常な脳の組織では発現しておらず、グリオーマ幹細胞や主にG B M にて発現していることが明らかになった。

[0143] (実施例12)

E v a 1 同様に、C e a c a m 1 の発現を指標としてグリオーマ患者の予後診断ができるかどうかを検証した。すなわち、米国国立がん研究所の脳腫瘍データベース R E M B R A N T を用いて、患者由来のグリオーマにおけるC e a c a m 1 のm R N A レベルでの発現と、その患者の生存率との相関の有無について調べた。得られた結果を図27に示す。

[0144] 図27に示した結果から明らかなように、グリオーマにおいてC e a c a m 1 遺伝子が高発現していた患者の生存期間は予後調査を始めてから500日以内と短く、C e a c a m 1 の発現とグリオーマ患者の予後との間に有意な相関関係が認められた。従って、C e a c a m 1 遺伝子の発現を検出することはグリオーマの検査、特にグリオーマ患者の予後診断に有効であることが実証された。なお、図には示さないが、同様の分析において、f g f 5 の発現とグリオーマ患者の予後との間に有意な相関関係が認められなかった。

[0145] (実施例13)

C e a c a m 1 の細胞内局在を免疫染色にて分析した。得られた結果を図28に示す。また、C e a c a m 1 の組織内局在を免疫染色にて分析した。得られた結果を図29及び30に示す。

[0146] 図28に示した結果から明らかなように、N S C L 6 1 及びh G S C の細胞表面において、C e a c a m 1 が発現していることが確認された。また、図29及び30に示す通り、ヒトp r i m a r y G B M 組織 (G B M 1 及

びGBM2)においてCeacam1陽性細胞が存在していることが明らかになり、さらに、Eva1の場合同様に、Ceacam1は腫瘍塊(Tumormass)の中のhGSC上よりも、浸潤(Invasion)しているhGSC上に主に存在していることも明らかになった。

[0147] (実施例14)

Ceacam1のスプライシングバリエーションには、N末端可変Ig様領域、保存された膜貫通領域及び短い細胞質ドメインから構成されているCeacam-Sと、N末端可変Ig様領域、保存された膜貫通領域及び長い細胞質ドメインから構成されているCeacam-Lが存在していることが知られている。

[0148] また、悪性腫瘍において共に発現しているCeacam1-S及びCeacam6は、Ceacam1-Lのホモダイマー形成を阻害し、その血管形成活性を増大させることによって、Ceacam1-Lの抑制シグナルをブロックすることができるということ(Muller, M. M. ら、J. Cell Biol.、2009年、187巻、569~581ページ、Singer, B. B. ら、PLoS One、2010年、5、e8747)も報告されている。

[0149] そこで、ヒト及びマウスのグリオーマ幹細胞における、Ceacam1-L及びCeacam1-Sの発現をRT-PCRにて分析した。得られた結果を図31に示す。また、悪性グリオーマ及びヒトグリオーマ幹細胞における、Ceacam1及びCeacam6の発現をRT-PCRにて分析した。得られた結果を図32に示す。

[0150] 図31に示した結果から明らかなように、ヒトグリオーマ幹細胞においては、Ceacam-Sではなく、主にCeacam1-Lが発現していた。一方、マウスグリオーマ幹細胞においては、両方のバリエーションが発現していた。また、図32に示した結果から明らかなように、hGSC及び全てのヒト悪性グリオーマにおいて、Ceacam6は発現していた。

[0151] (実施例15)

実施例 14 に示した、C e a c a m 1 - S、C e a c a m 1 - L 及び C e a c a m 6 のグリオーマにおける発現と、腫瘍の悪性度又は抗腫瘍活性との関連を調べるために、グリオーマ幹細胞において c e a c a m 1 s h を過剰発現させた。得られた結果を図 34 に示す。また、グリオーマ幹細胞に C e a c a m 1 - L を強制発現させた。得られた結果を図 35 ~ 37 に示す。

[0152] なお、本実施例において c e a c a m 1 の発現を抑制させるために用いた c e a c a m 1 s h (c e a c a m 1 s h R N A) 及び C e a c a m 1 - L の発現を亢進させるために用いた C e a c a m 1 - 2 × F L A G の有効性は、図 33 に示す通り、マウスにおいてもヒトにおいてもウェスタンブロッティングにより確認している。

[0153] 図 34 に示した結果から明らかなように、c e a c a m 1 s h の過剰発現は、N S C L 6 1 及び h G S C の増殖を阻害した。対照的に、図 35 ~ 37 に示した結果から明らかなように、C e a c a m 1 - L の強制発現によって、ソフトアガー上での h G S C のコロニー形成が増大しただけでなく（図 35 参照）、インビボにおける h G S C の悪性度の亢進も認められた（図 36 及び 37 参照）。すなわち、C e a c a m 1 - L 過剰発現 h G S C が移植されたマウスの平均生存時間（48 d p = 0.0044 及び 46 d, p = 0.0039）は、コントロール h G S C を移植したマウスのそれ（60 d 及び 62 d）と比較して減少することが明らかになった（図 36 参照）。従って、これらの結果からグリオーマ幹細胞の悪性度に C e a c a m 1 が関与していることが明らかになり、C e a c a m 1 も E v a 1 同様に、グリオーマを治療及び検査するための有効な標的となることが実証された。

産業上の利用可能性

[0154] 以上説明したように、E v a 1 及び/又は C e a c a m 1 を標的としてグリオーマの検査や治療が可能であり、また、所望の物質をグリオーマに送達させることも可能である。したがって、本発明は特に、グリオーマに対する医療の分野に大きく貢献しうるものである。

配列表フリーテキスト

[0155] 配列番号 1

< 2 2 3 > ヒト E v a 1

配列番号 3

< 2 2 3 > マウス E v a 1

配列番号 5 ~ 8

< 2 2 3 > 人工的に合成されたプライマーの配列

配列番号 9 ~ 1 1

< 2 2 3 > s h R N A 標的配列

配列番号 1 3

< 2 2 3 > ヒト C e a c a m 1 - 4 L

配列番号 1 5

< 2 2 3 > ヒト C e a c a m 1 - 4 S

配列番号 1 7

< 2 2 3 > マウス C e a c a m 1 - 2 L

配列番号 1 9

< 2 2 3 > マウス C e a c a m 1 - 2 S

配列番号 2 1

< 2 2 3 > ヒト C e a c a m 6

配列番号 2 3 ~ 7 4

< 2 2 3 > 人工的に合成されたプライマーの配列

配列番号 7 5 ~ 7 6

< 2 2 3 > s h R N A 標的配列

請求の範囲

- [請求項1] 対象における、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する、グリオーマの治療方法。
- [請求項2] E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する分子を有効成分とする、グリオーマの治療薬。
- [請求項3] E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の機能を抑制する分子が、下記（a）から（f）のいずれかに記載の分子である、請求項2に記載の治療薬。
- （a）抗E v a 1 タンパク質抗体
 - （b）E v a 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド
 - （c）E v a 1 遺伝子の転写産物に結合するRNA
 - （d）抗C e a c a m 1 タンパク質抗体
 - （e）C e a c a m 1 タンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するペプチド
 - （f）C e a c a m 1 遺伝子の転写産物に結合するRNA
- [請求項4] 対象における、E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現を検出する、グリオーマの検査方法。
- [請求項5] E v a 1 遺伝子及びC e a c a m 1 遺伝子のうちの少なくともいずれか1つの遺伝子の発現産物に結合する分子を有効成分とする、グリオーマの検査薬。
- [請求項6] 抗E v a 1 タンパク質抗体及び抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を有効成分とする、請求項5に記載の検査薬。
- [請求項7] 所望の物質が結合された抗E v a 1 タンパク質抗体及び所望の物質

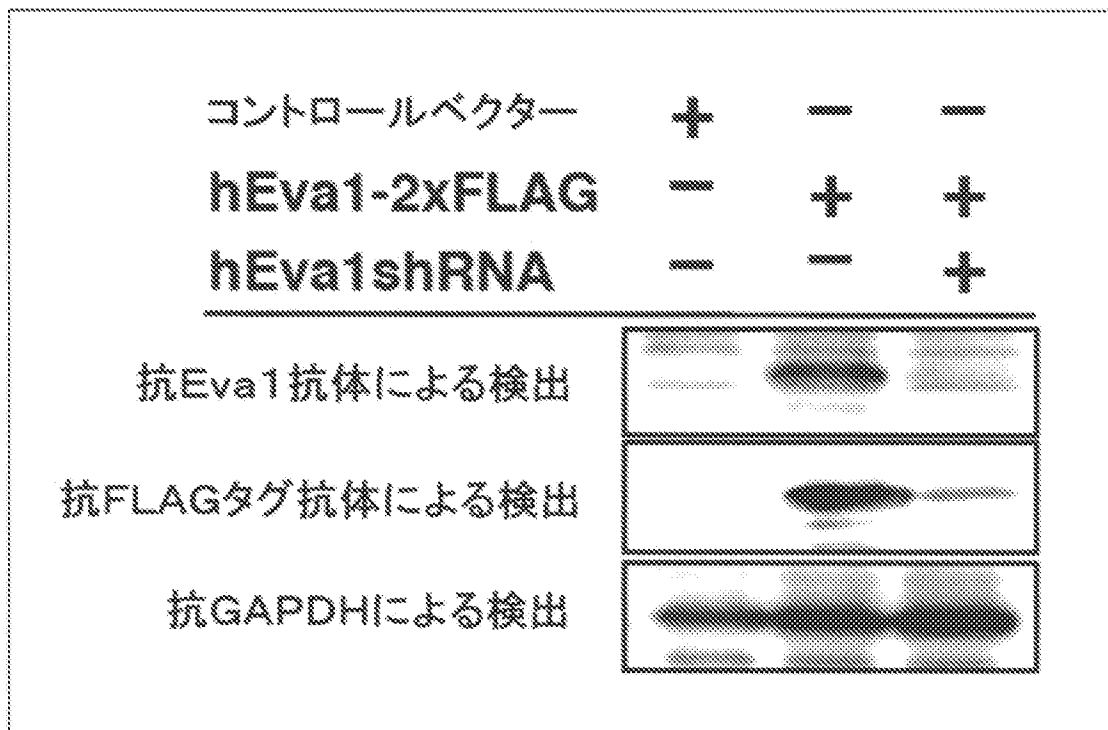
が結合された抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を対象に投与する、所望の物質を対象におけるグリオーマに送達させる方法。

[請求項8] 抗E v a 1 タンパク質抗体及び抗C e a c a m 1 タンパク質抗体のうちの少なくともいずれか1つの抗体を有効成分とする、所望の物質を対象におけるグリオーマに送達させるための薬剤。

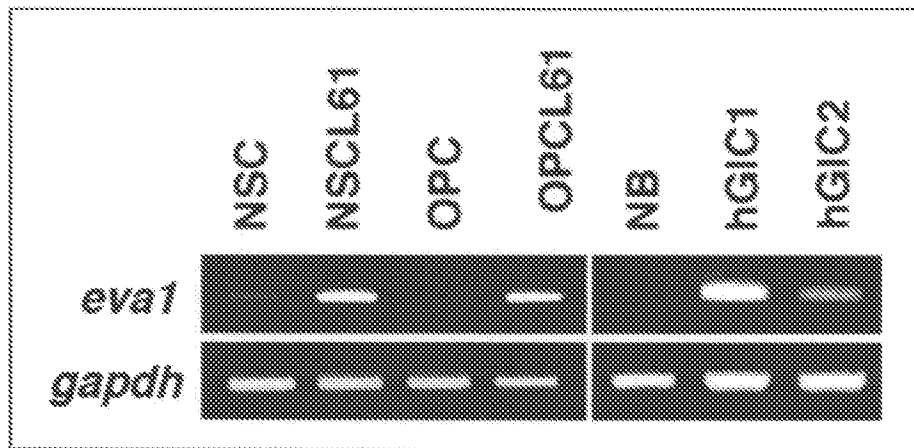
[図1]

hEval	1	MYGKSSTRAVLLLLLGIQLTALWP	IAAVEIYTSRVLEAVNGTDARLKCTFS	50
mEval	1	MYGKSPALVLP	LLLLSLQLTALCPTEAVEIYTS	GALEAVNGTDVRLKCTFS 50
hEval	51	SFAPVGDALVTWNFRPLDGGPEQFVFYYHIDPFQPM	SGRFKDRVSWDGN	100
mEval	51	SFAPVGDALVTWNFRPRDGGREQFVFYYHMDPFRP	MSGRFKDRVVWDGN	100
hEval	101	PERYDASILLWKLQFDDNGTYTCQVKNPPDVG	VICEIRLSVVHTVRFSE	150
mEval	101	PERYDVSILLWKLQFDDNGTYTCQVKNPPDVG	LVGTIRLSVVHTVPFSE	150
hEval	151	IHF	LALAIGSACALMIIIVIVVVLFDHYRKKRWAERAHKVVEIKSKEEER	200
mEval	151	IYF	LAVAIGSACALMIIIVIVVVLFDHFRKKRWADRADKAEGTKSKEEEK	200
hEval	201	LNQEK	KVSVYLEDTD	215
mEval	201	LNQGN	KVSVFVEDTD	215

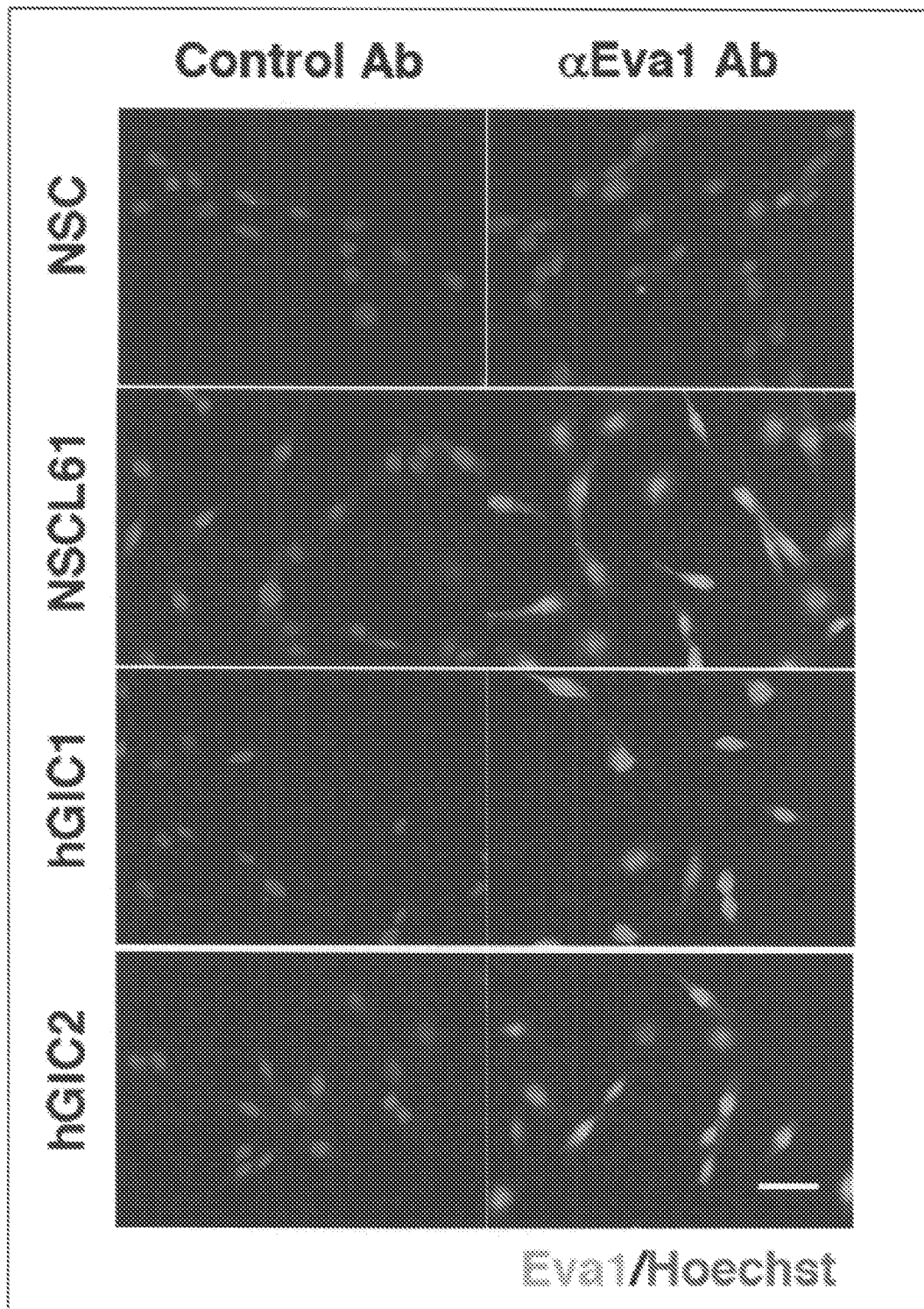
[図2]



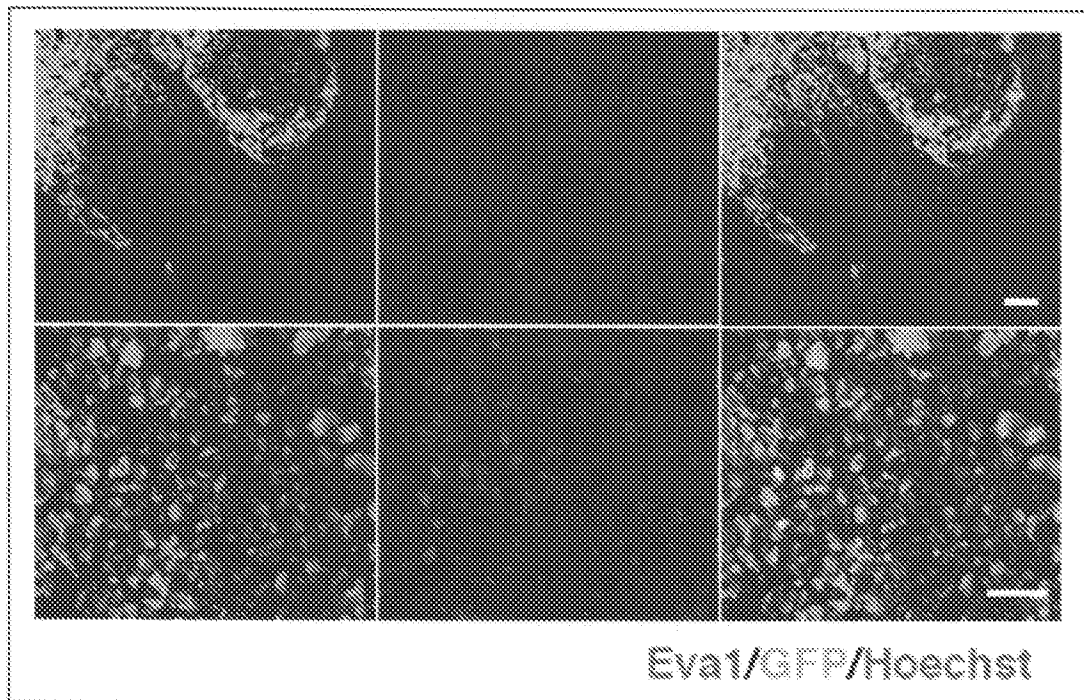
[図3]



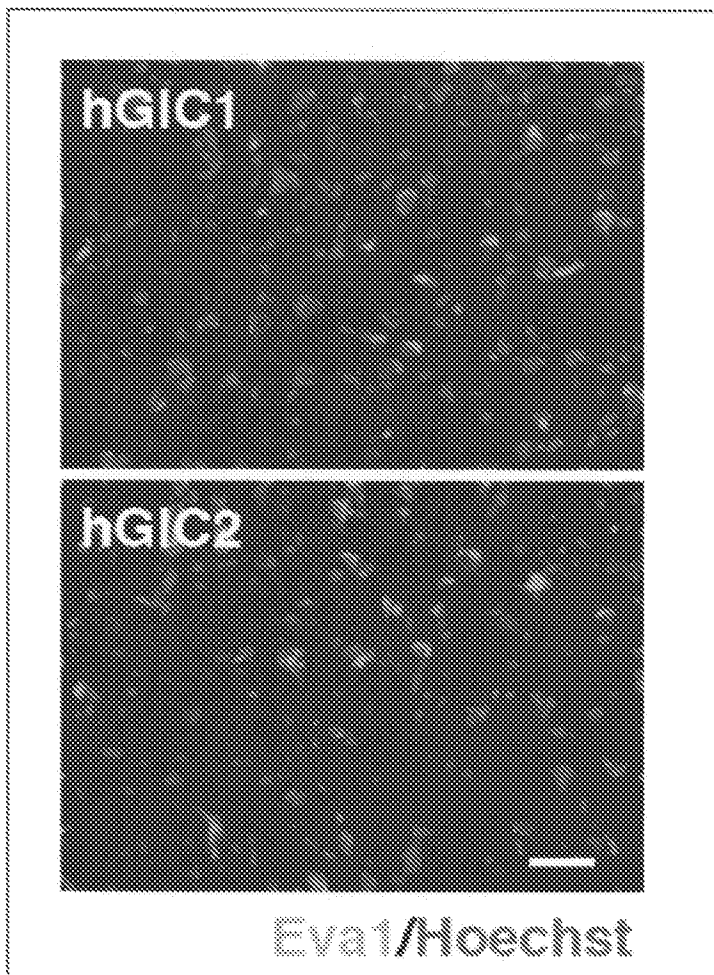
[図4]



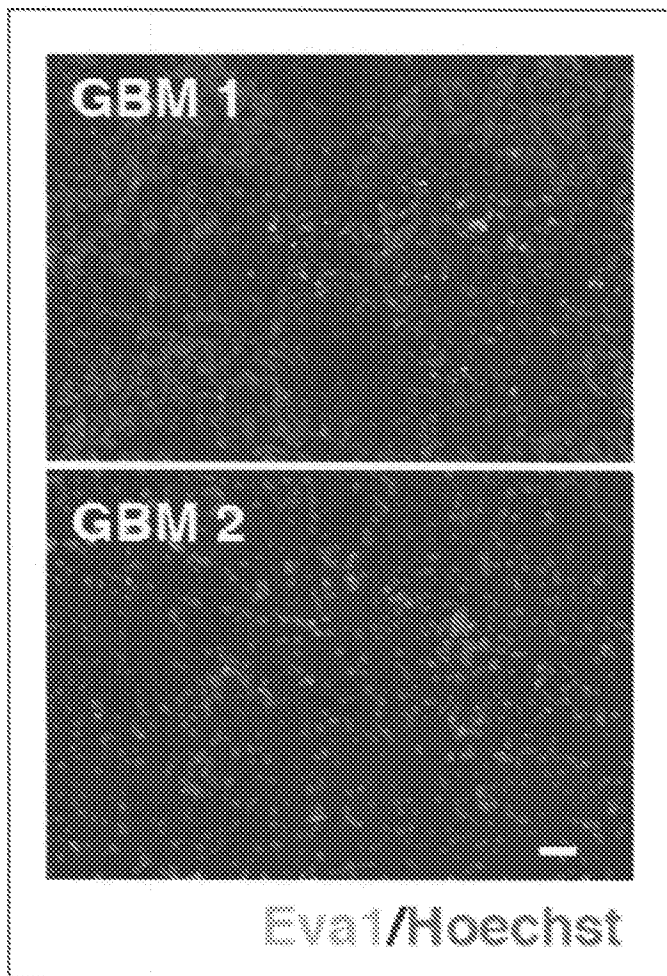
[図5]



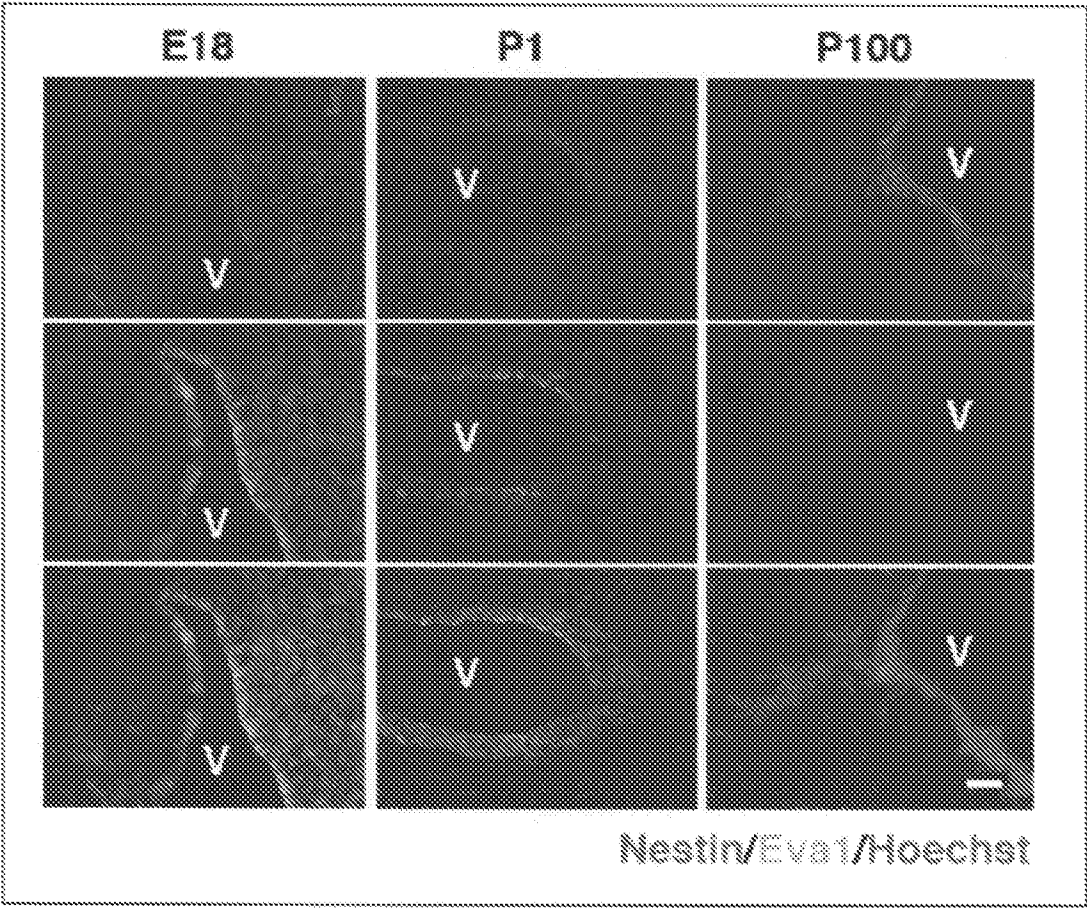
[図6]



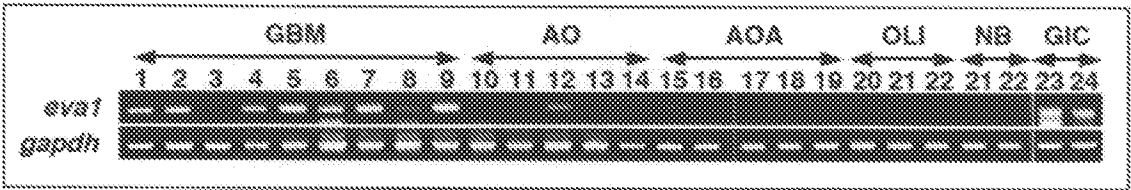
[図7]



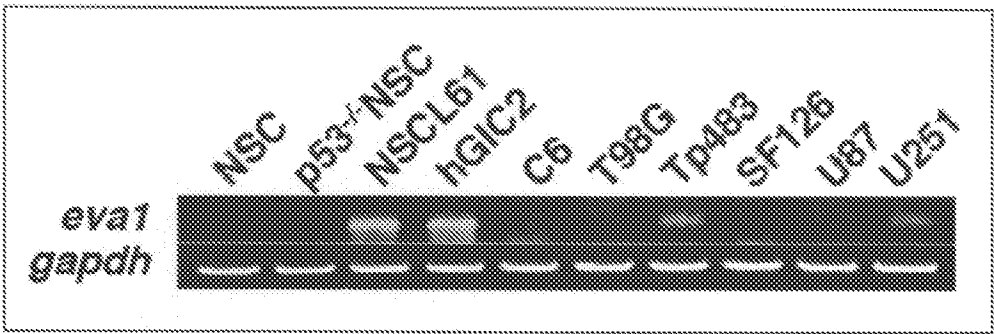
[図8]



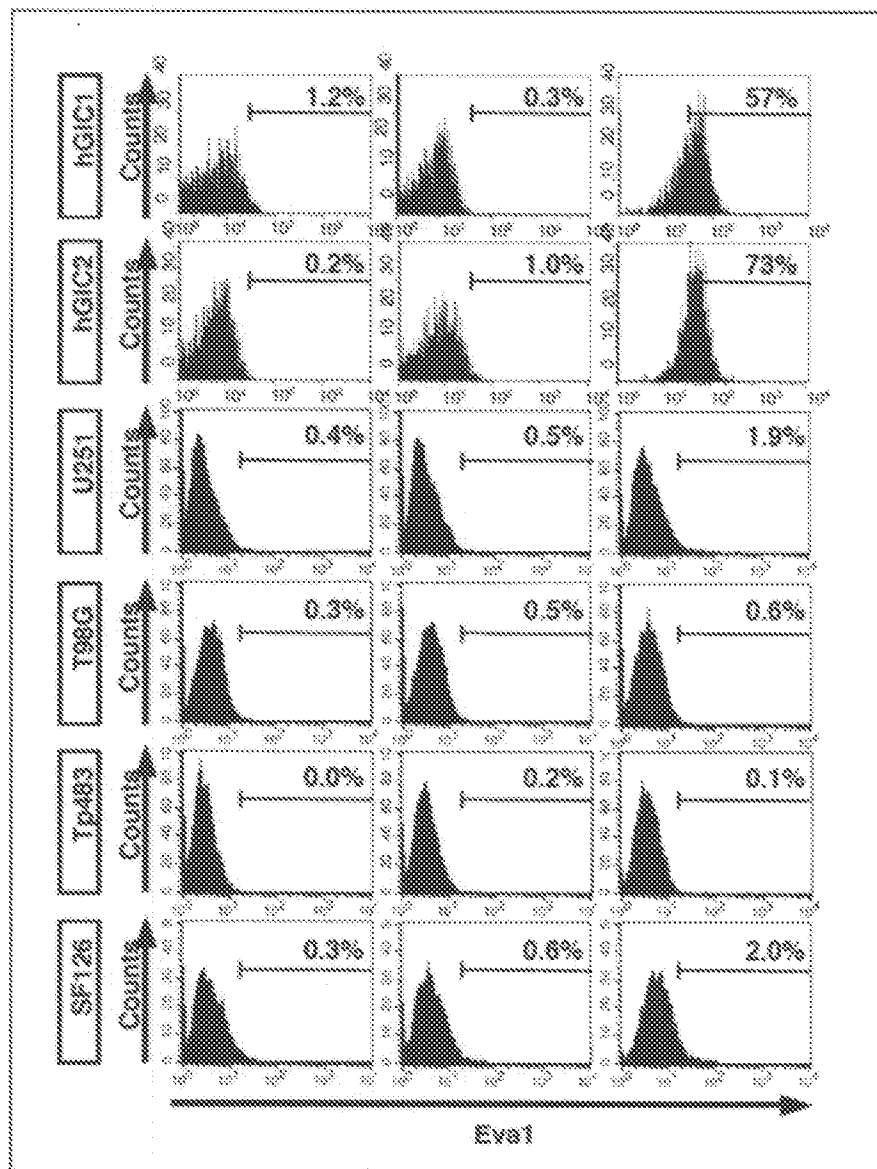
[図9]



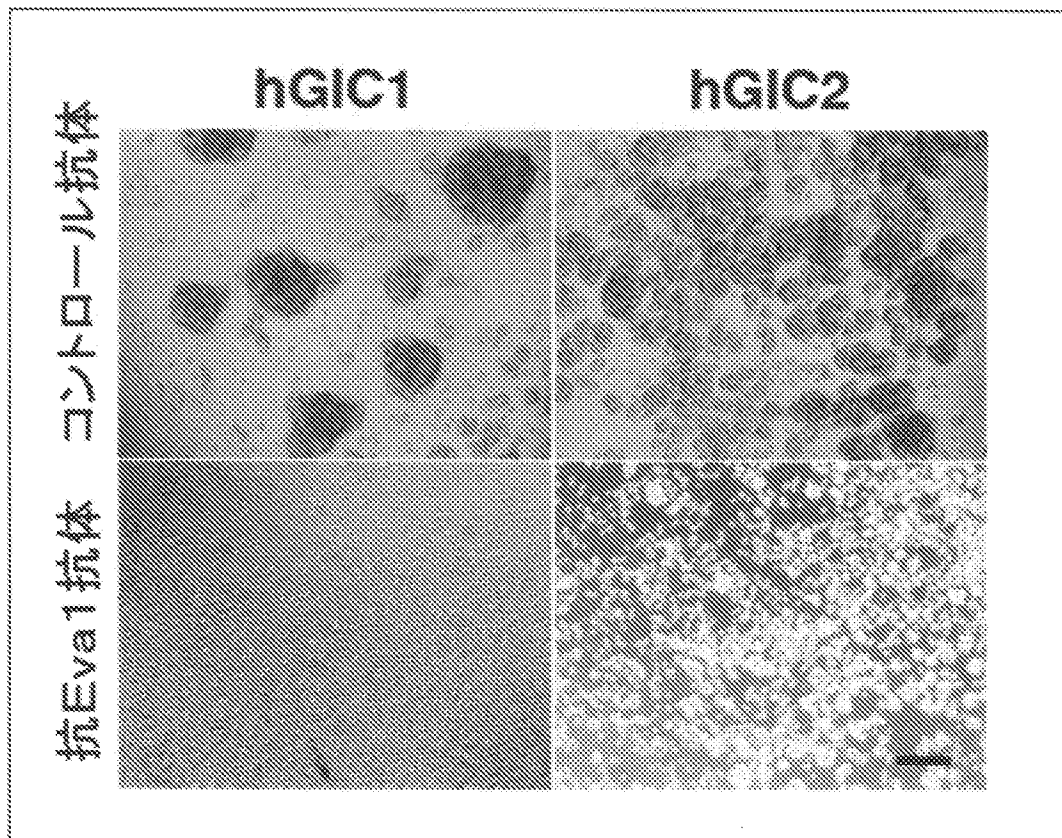
[図10]



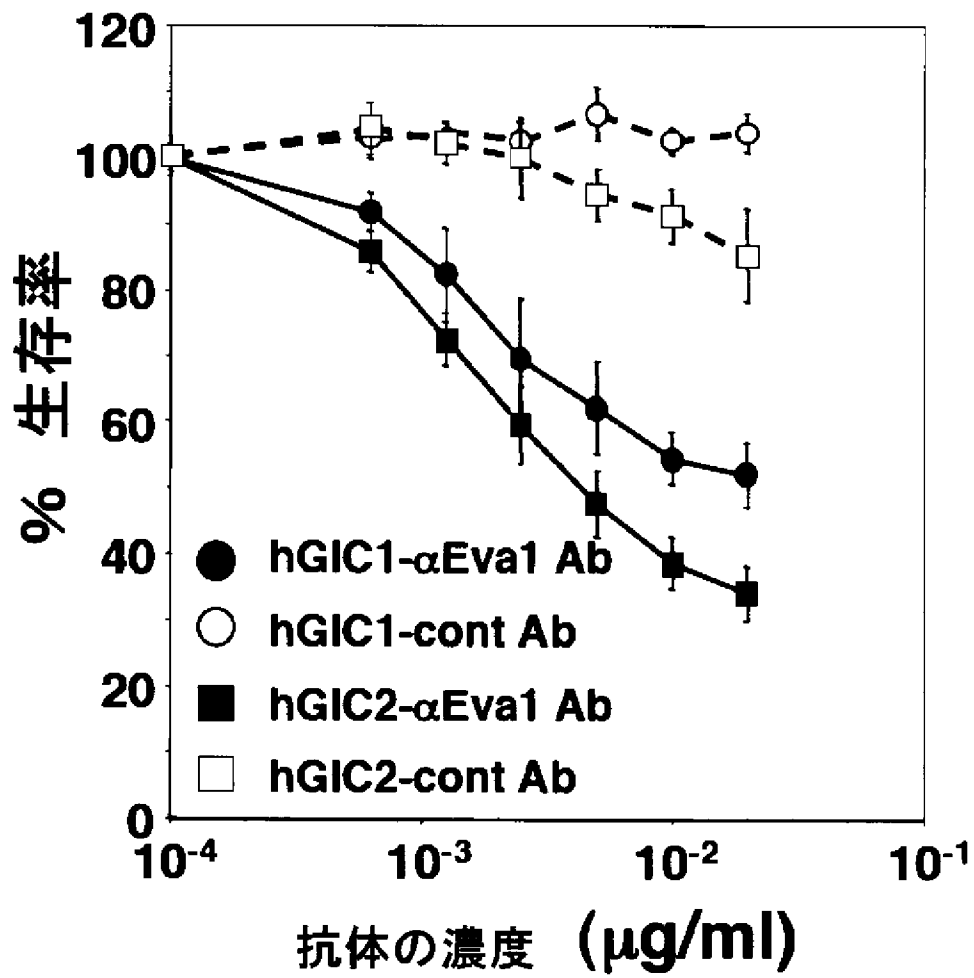
[図11]



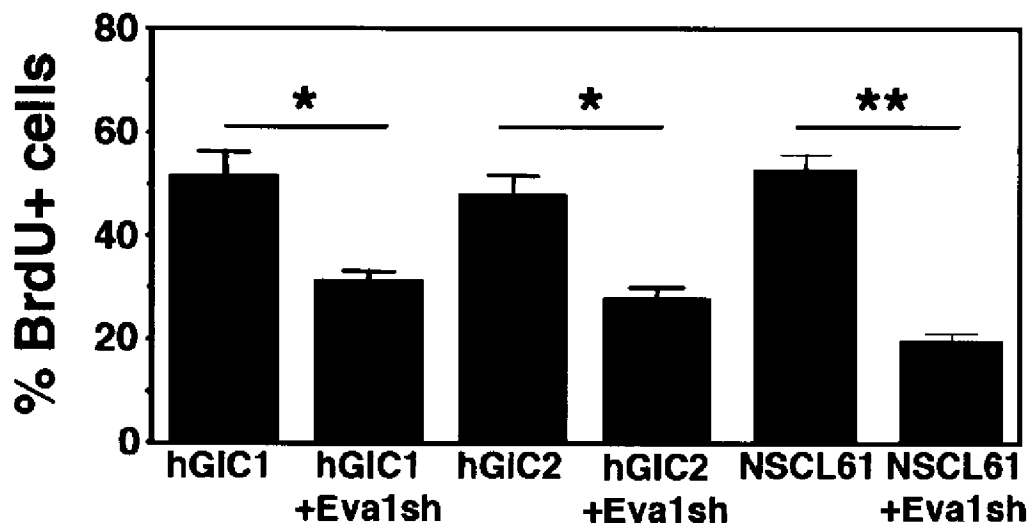
[図12]



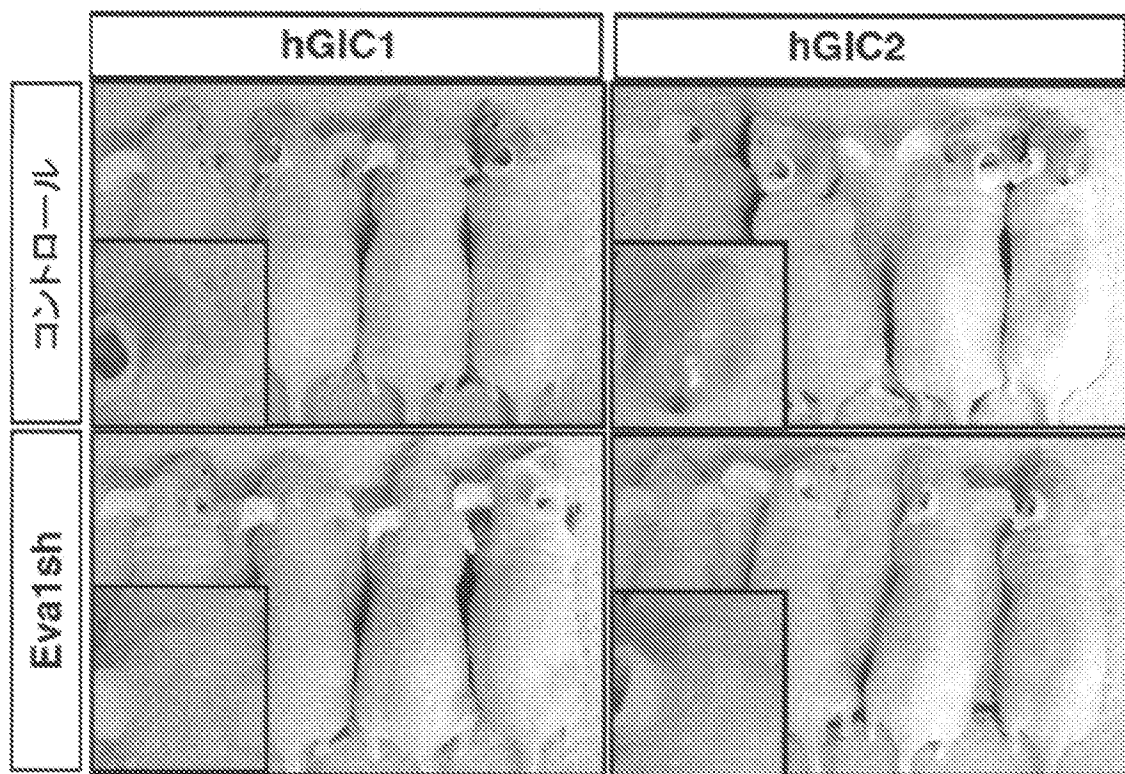
[図13]



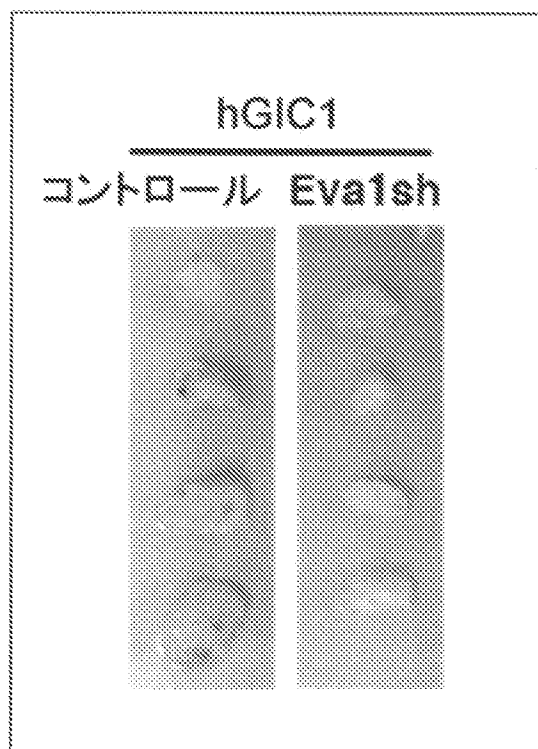
[図14]



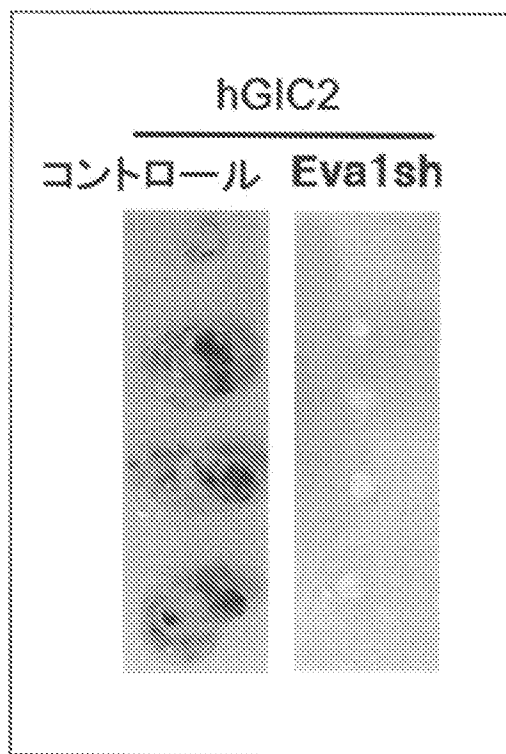
[図15]



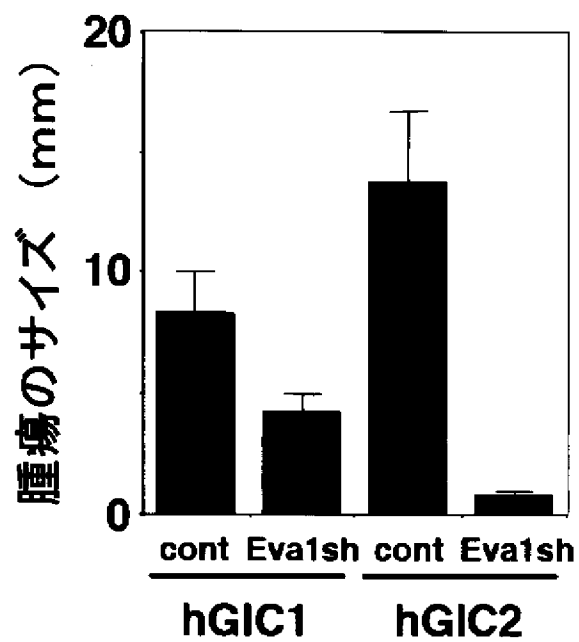
[図16]



[図17]



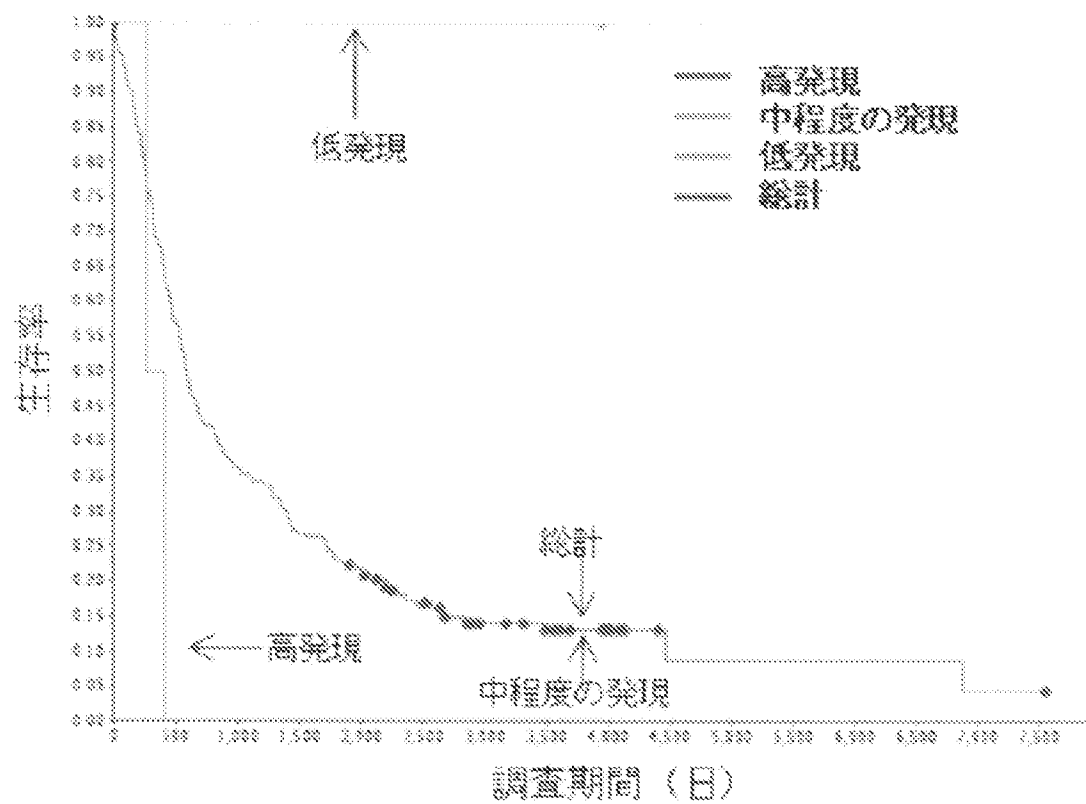
[図18]



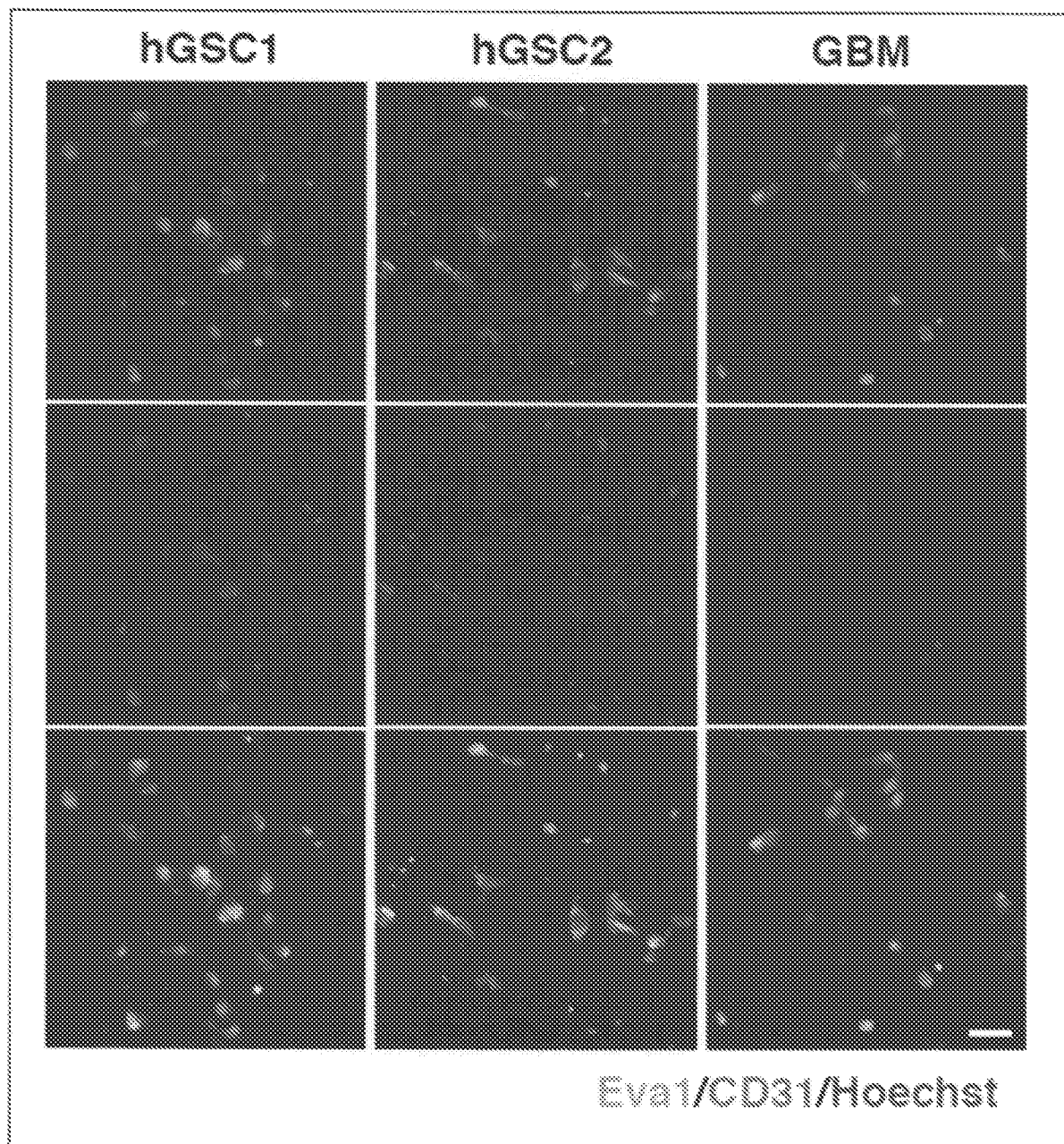
[図19]



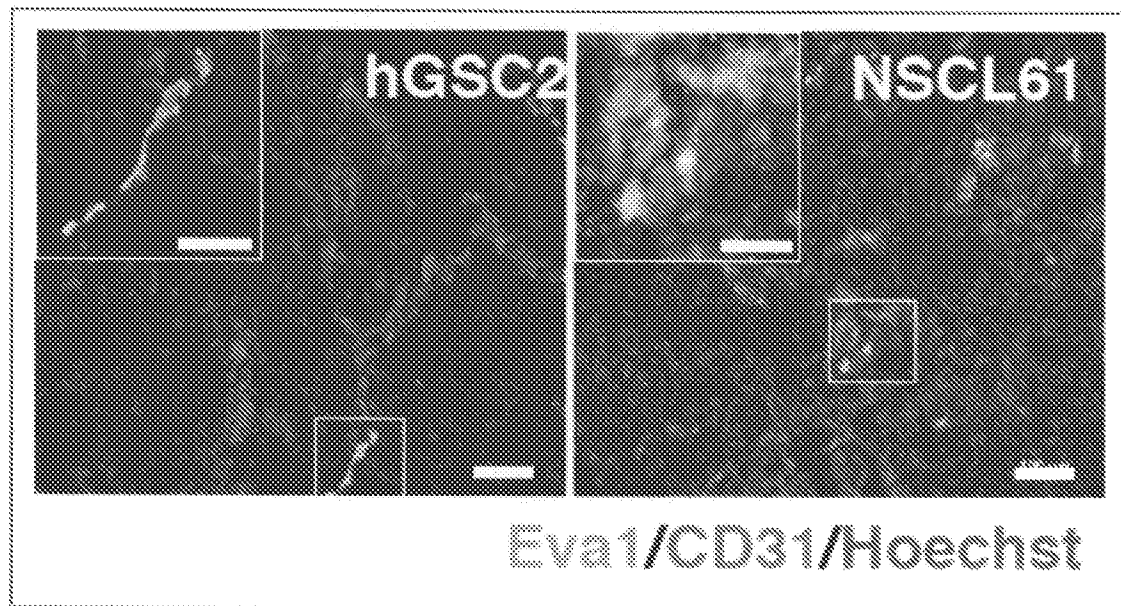
[図20]



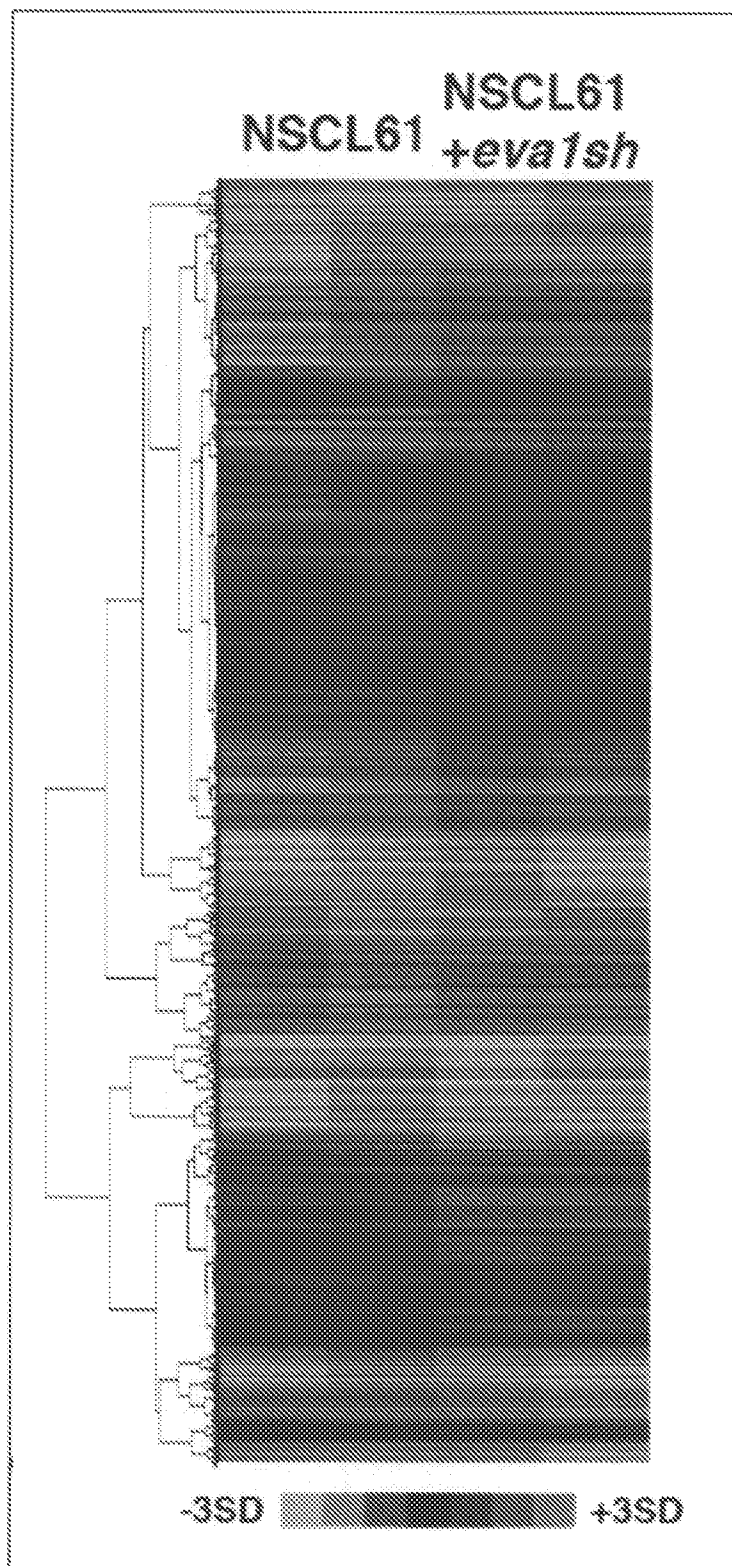
[図21]



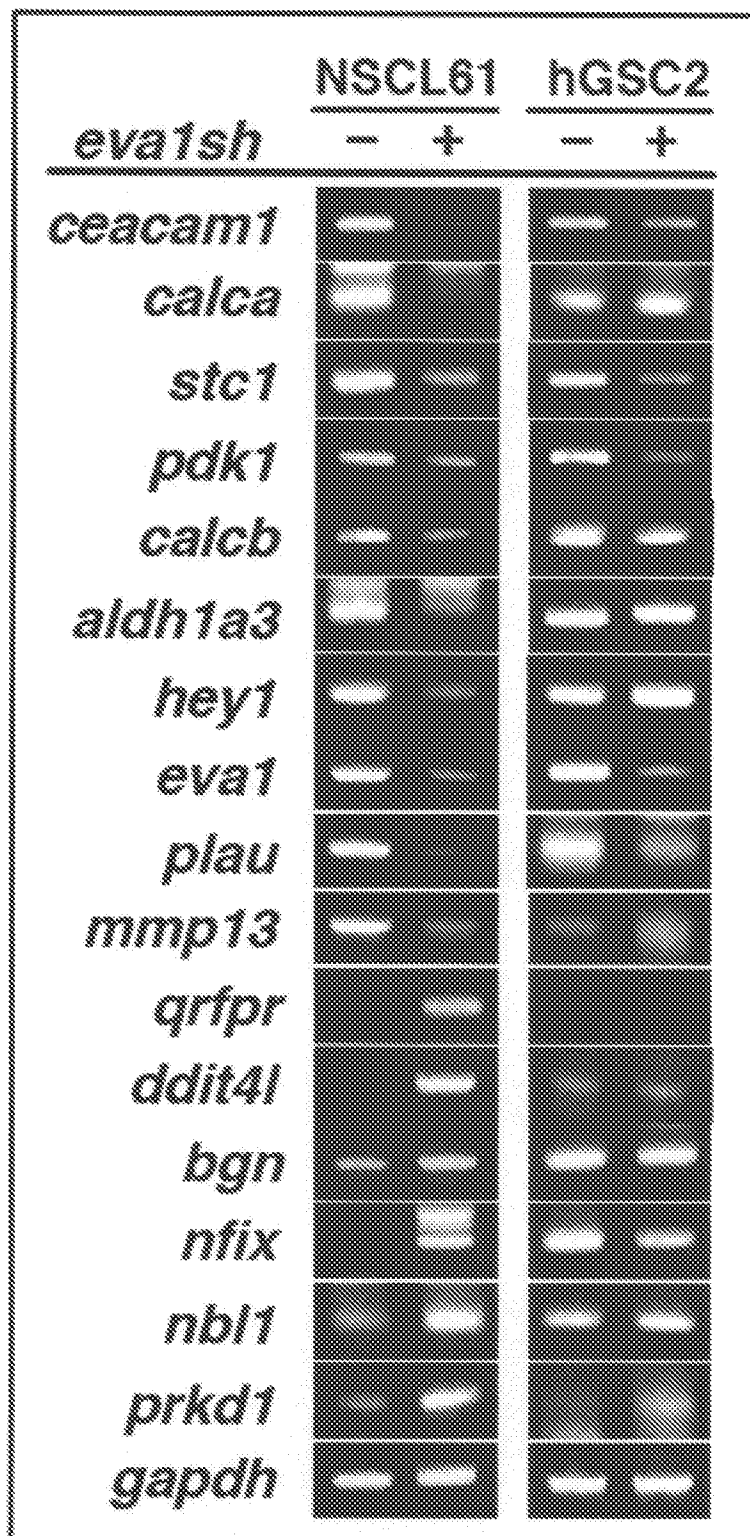
[図22]



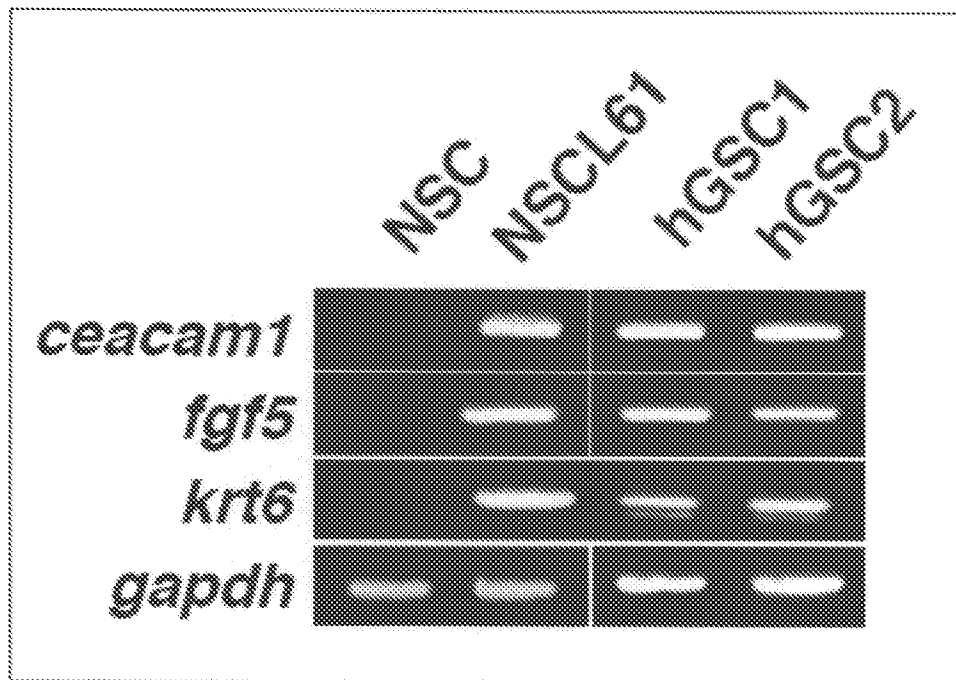
[図23]



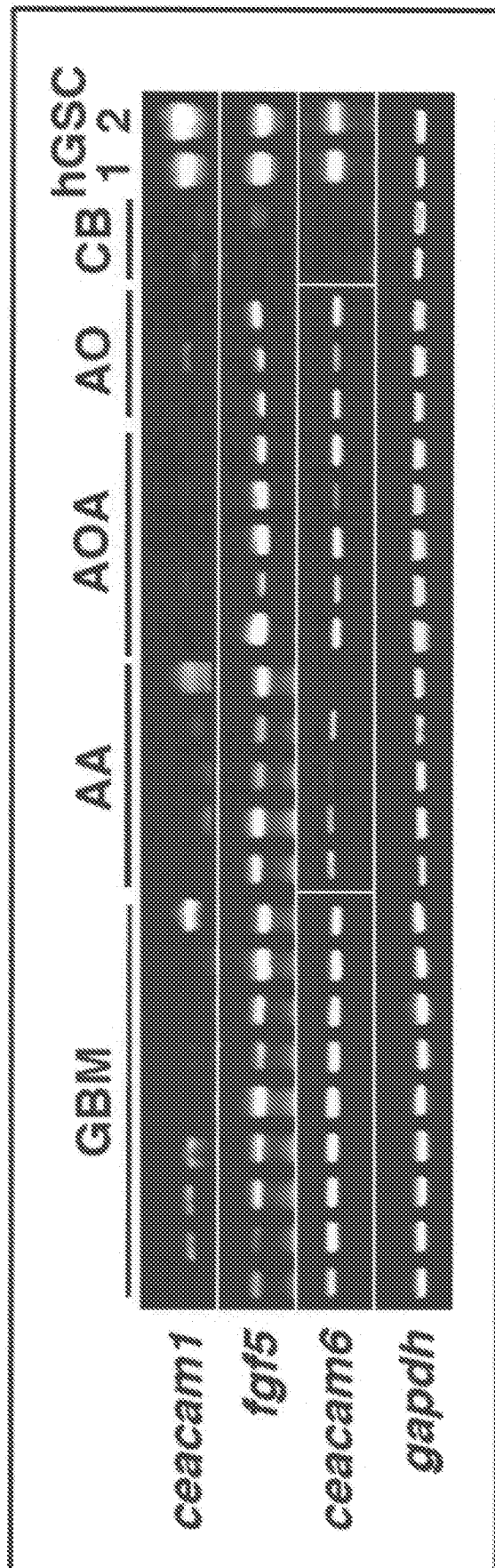
[図24]



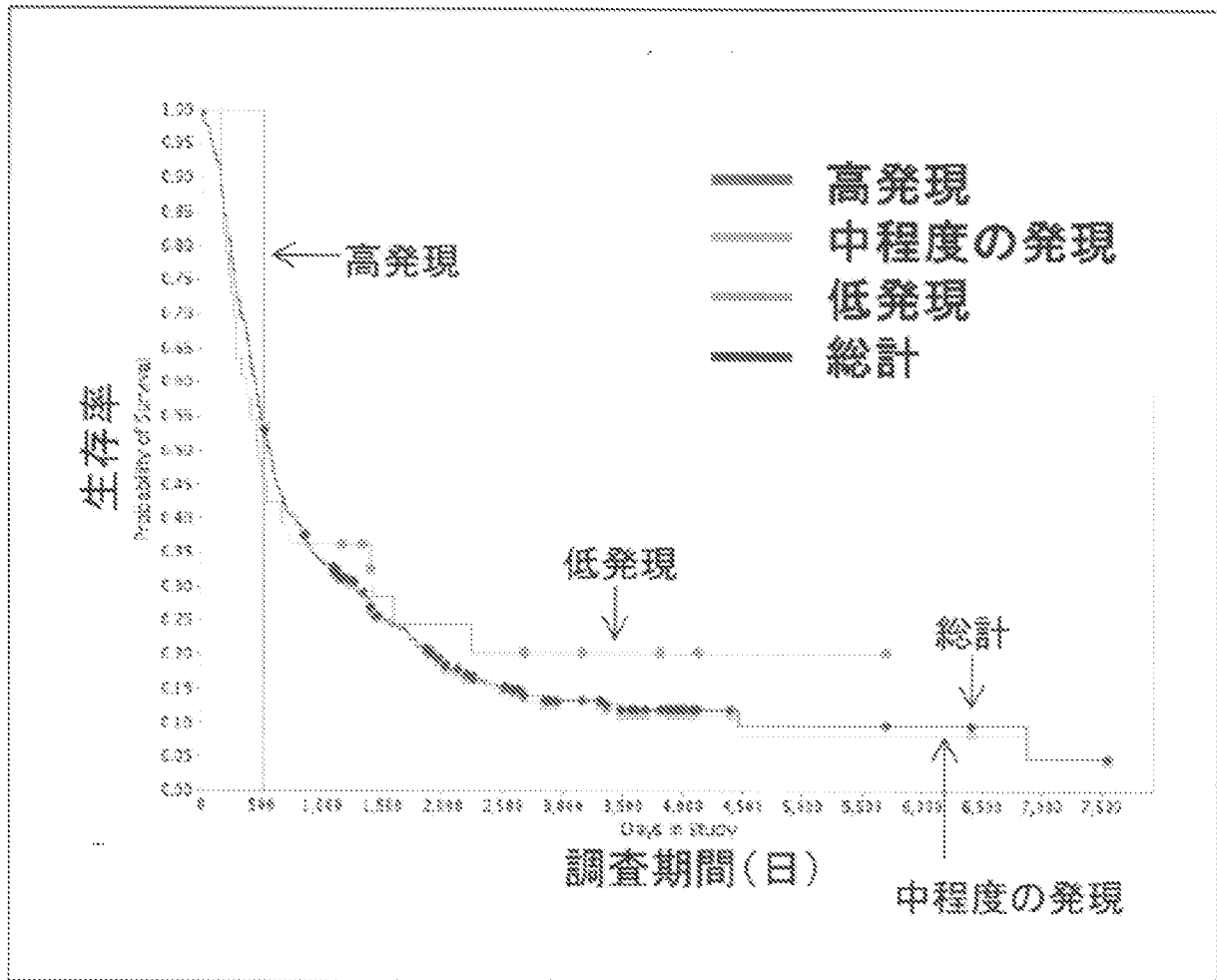
[図25]



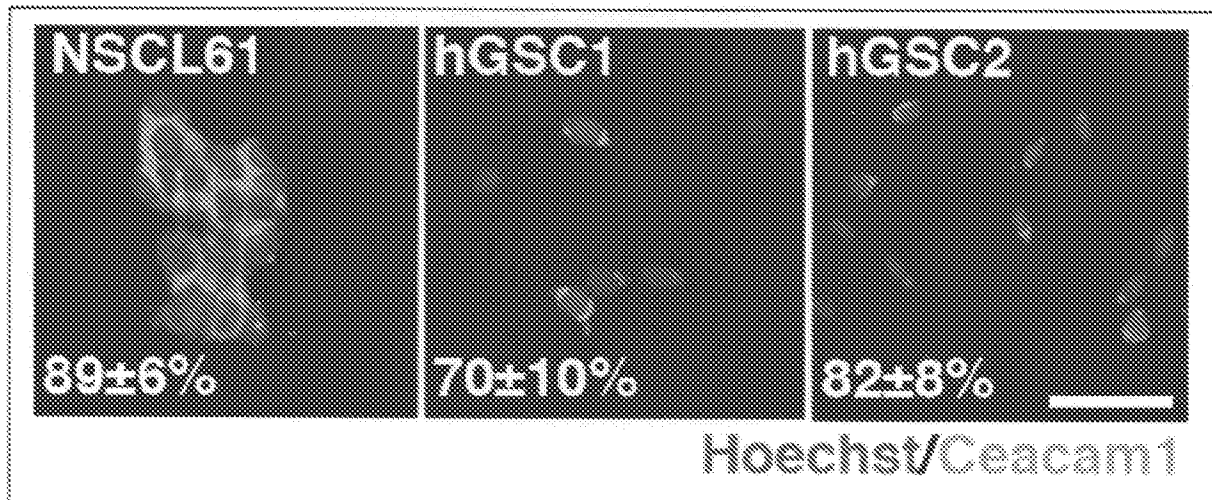
[図26]



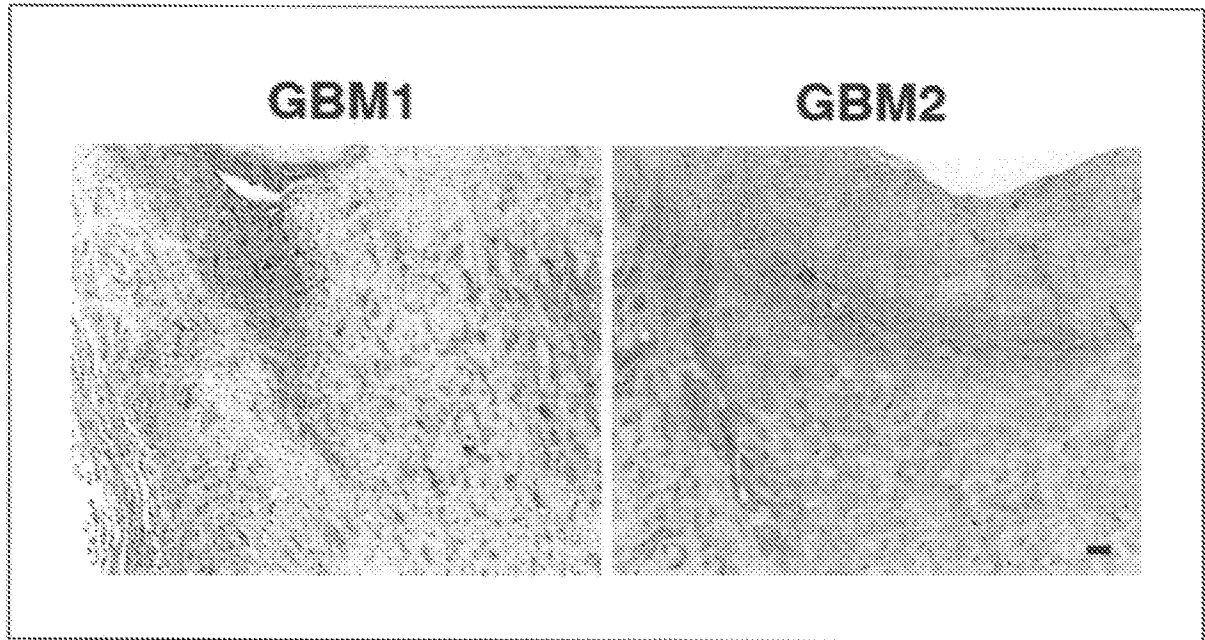
[図27]



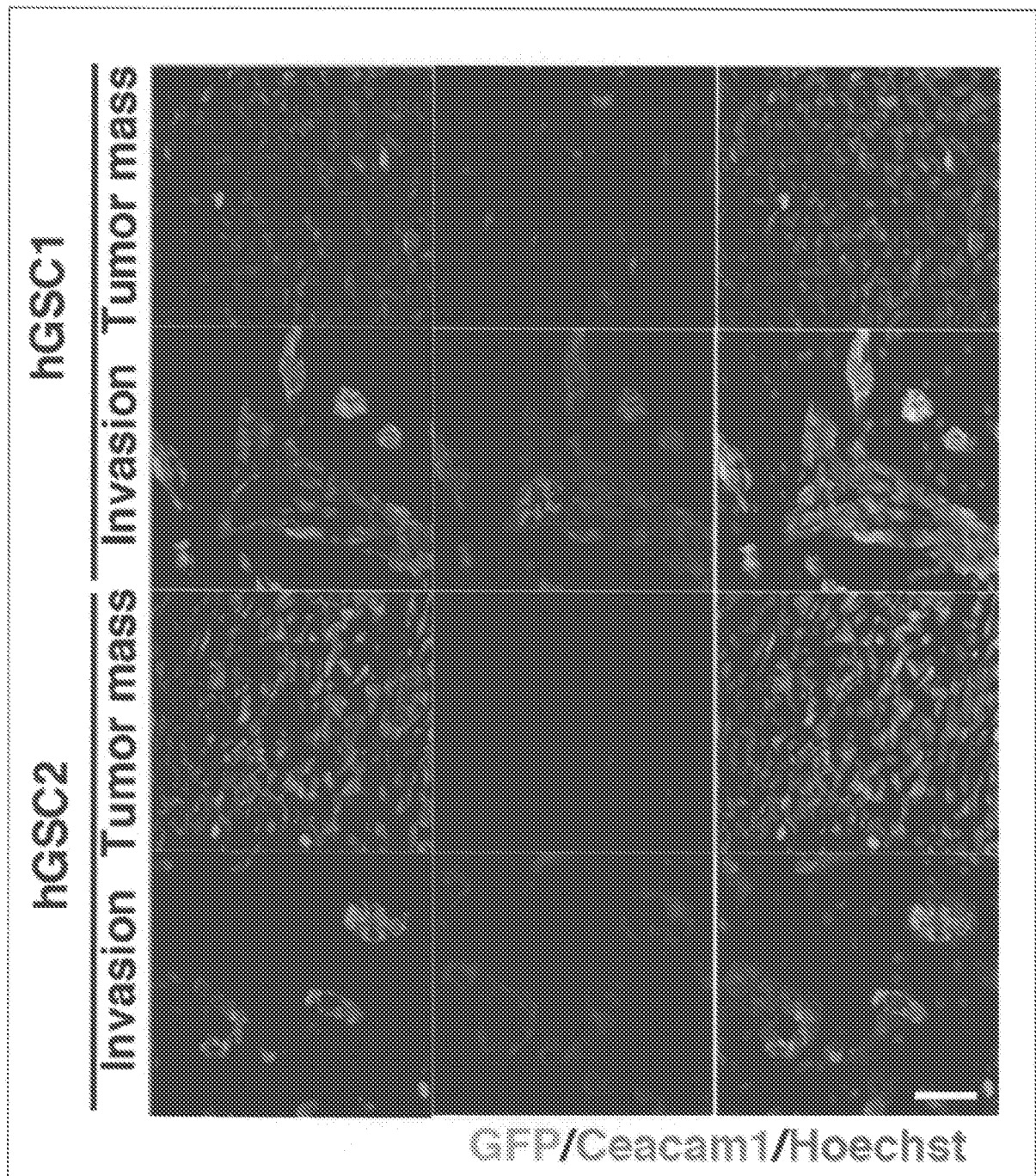
[図28]



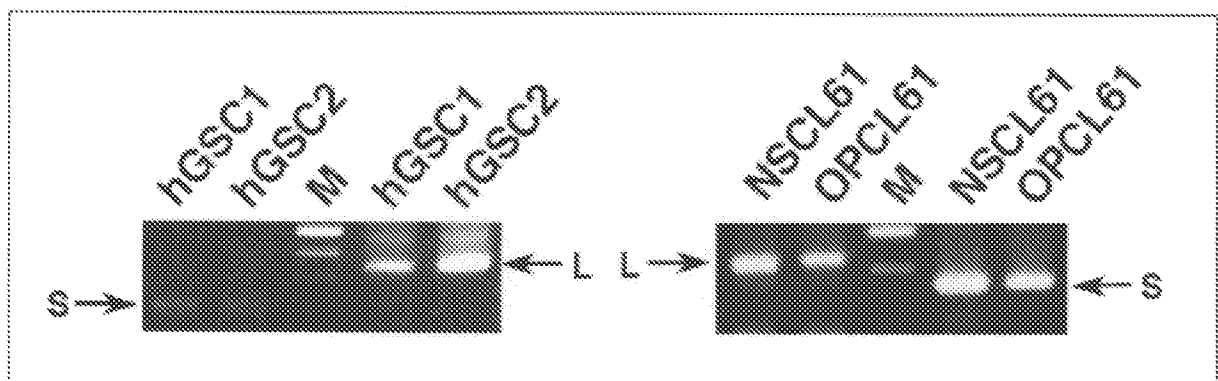
[図29]



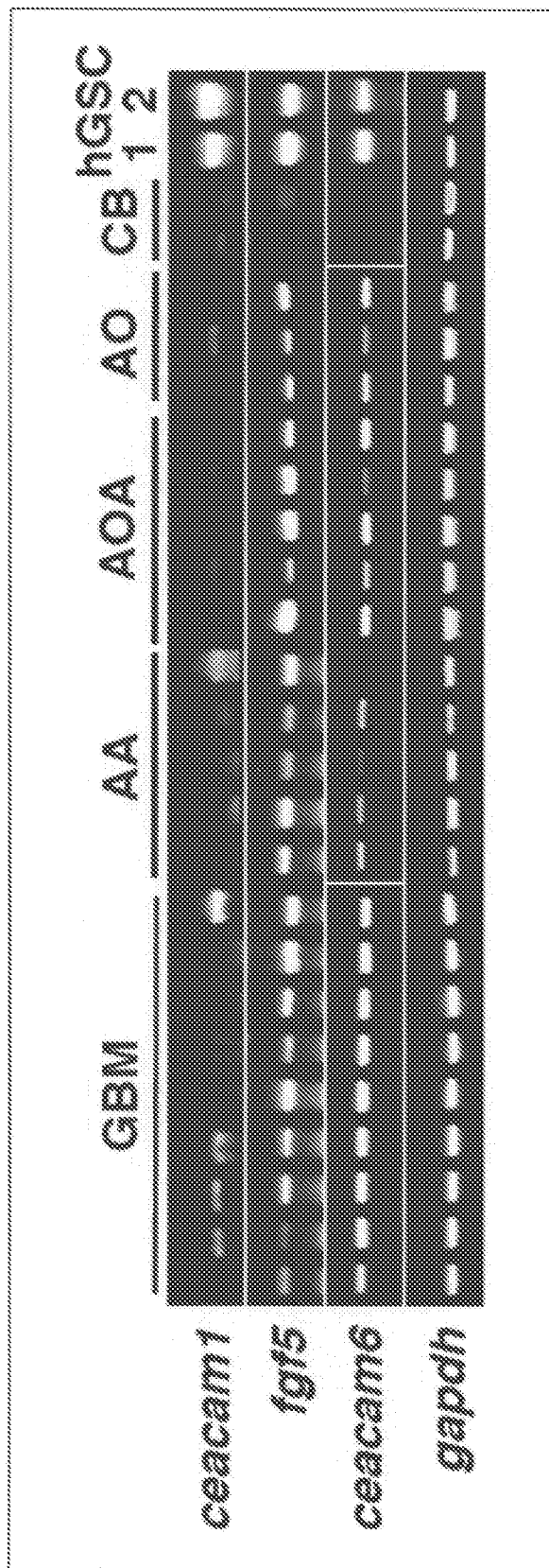
[図30]



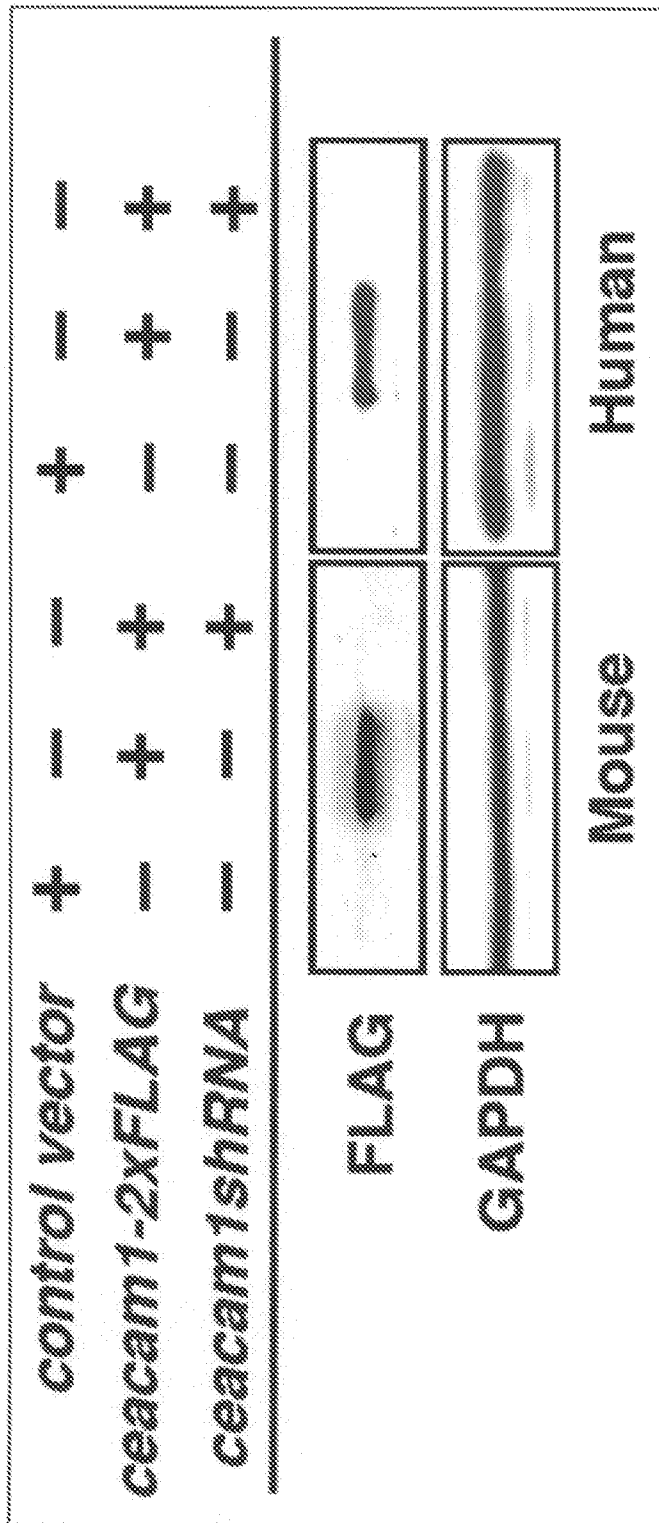
[図31]



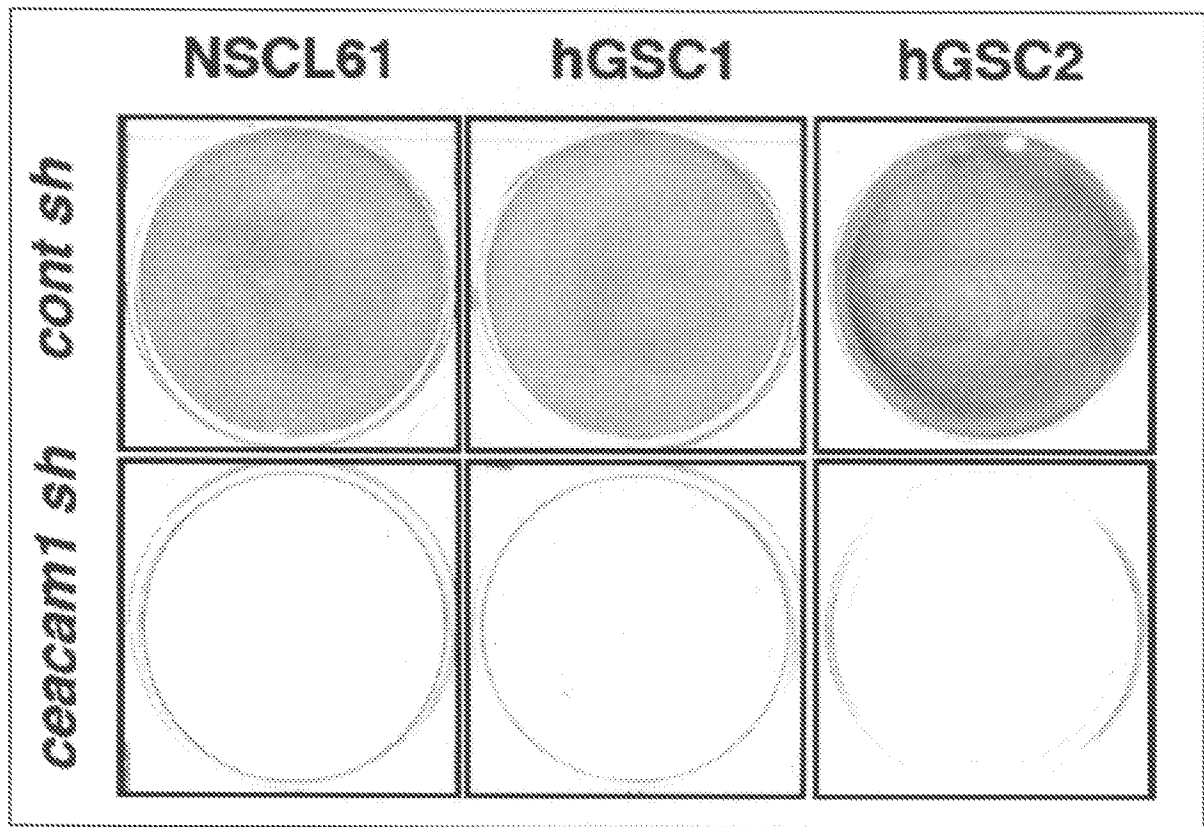
[図32]



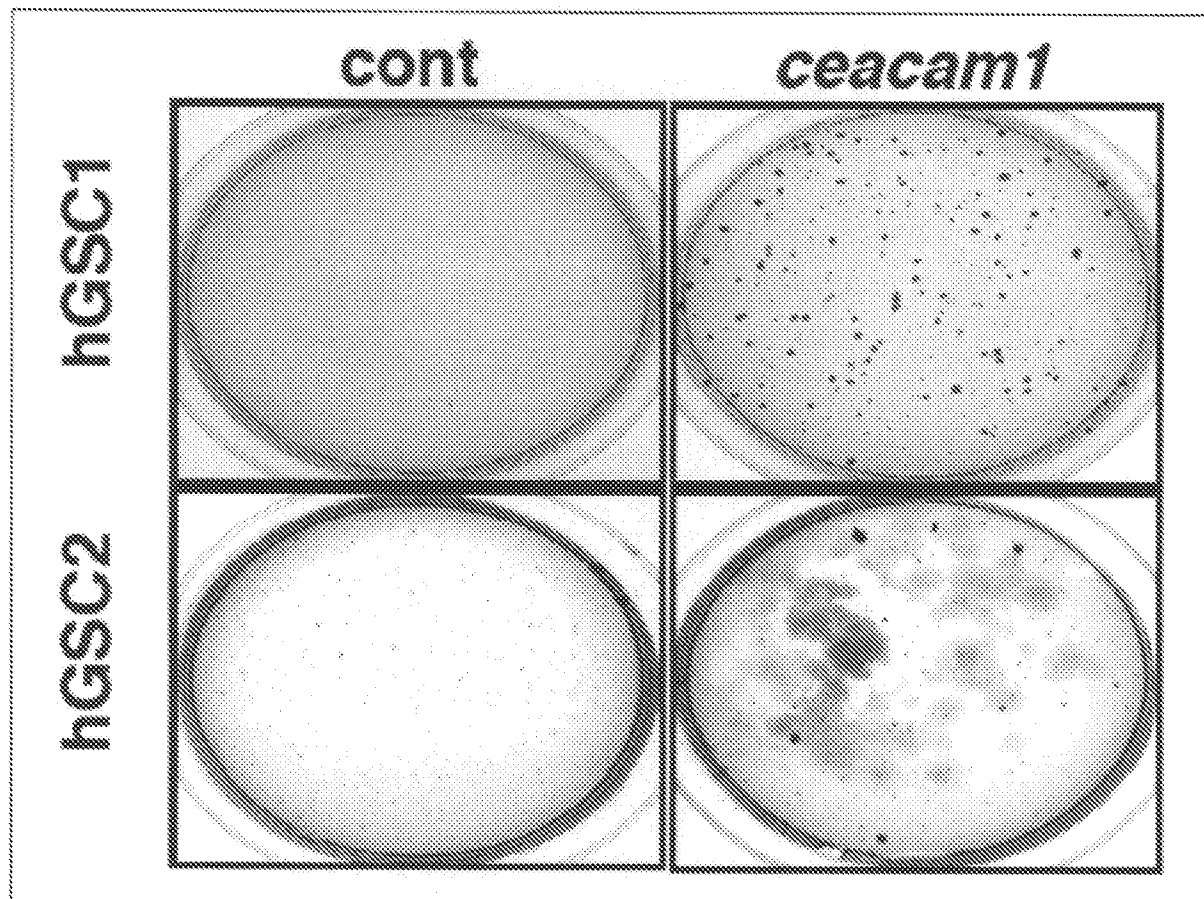
[図33]



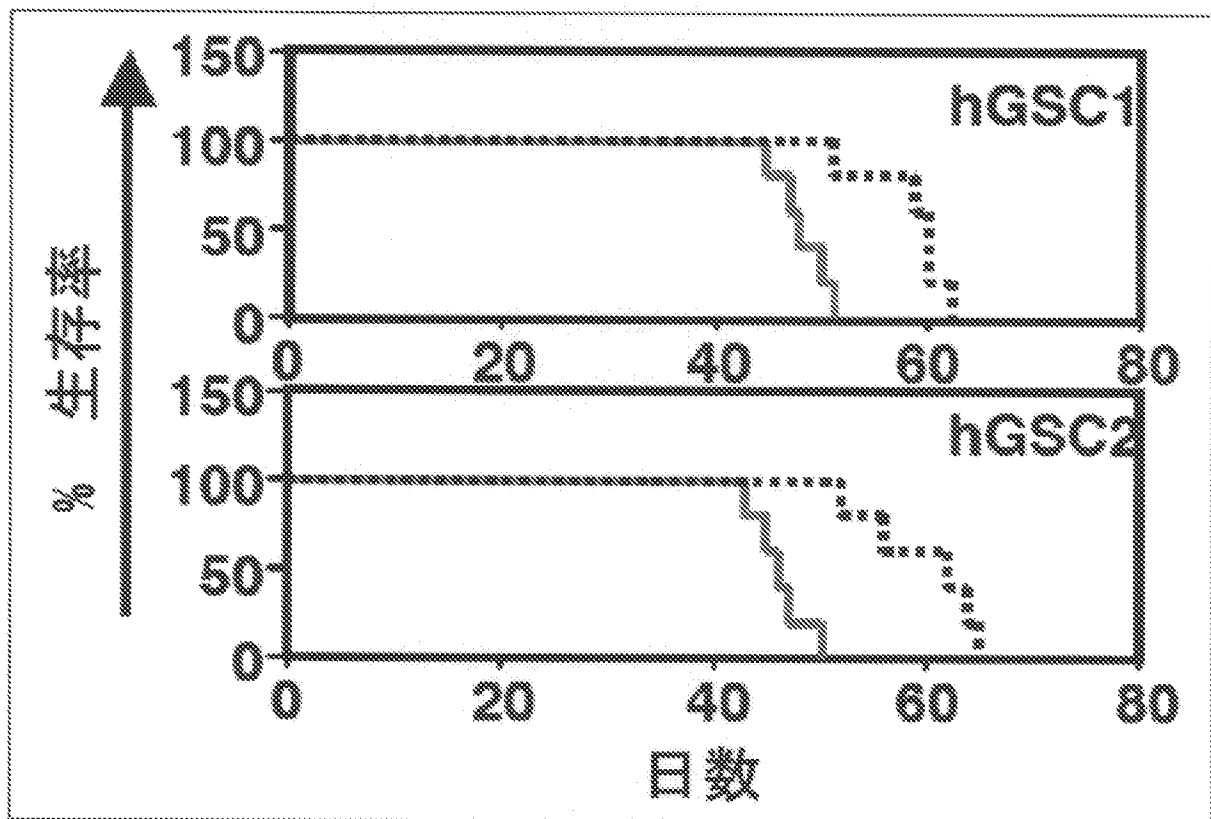
[図34]



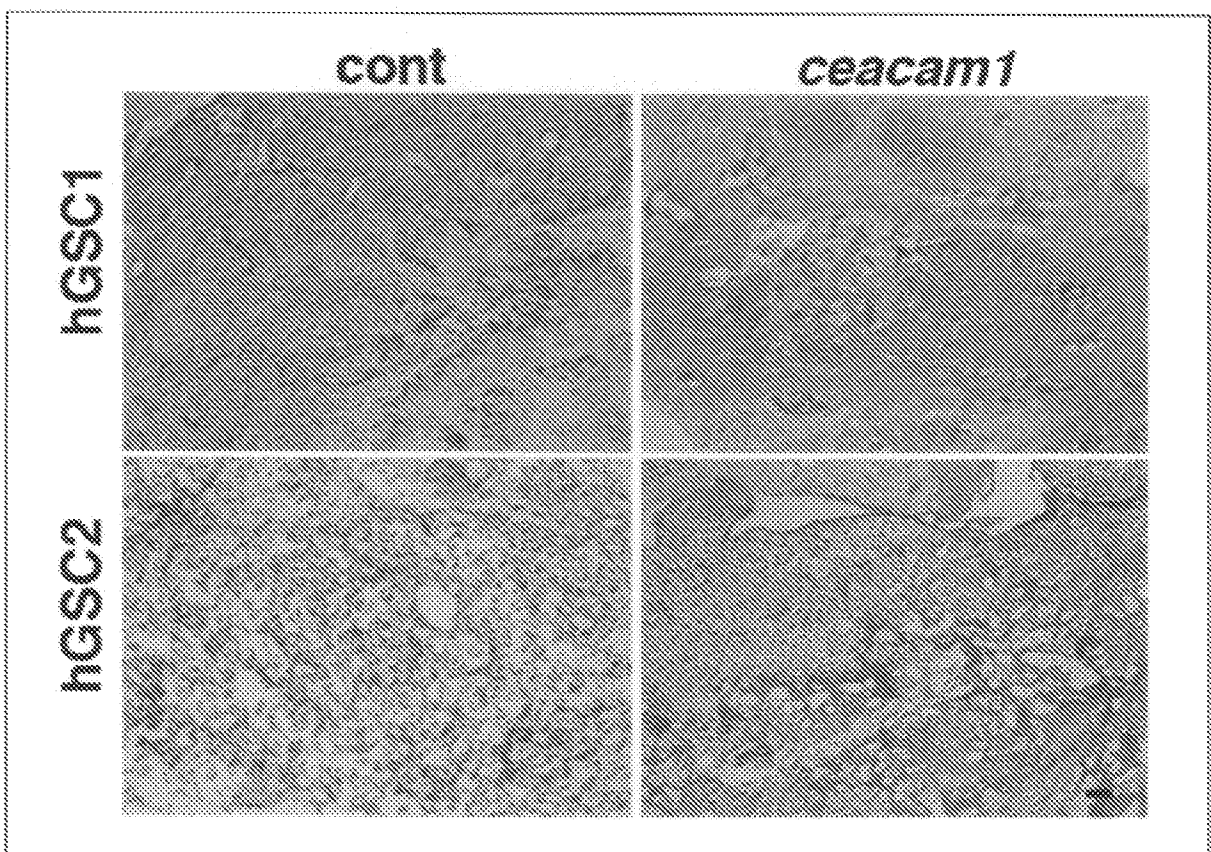
[図35]



[図36]



[図37]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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)

A61K45/00, A61K31/7105, A61K38/00, A61K39/395, A61P35/00

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), CPlus (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2009/126558 A1 (IBCPHARMACEUTICALS, INC.), 15 October 2009 (15.10.2009), paragraphs [0010], [0102] & US 2009191225 A1	2, 3 4-6, 8
Y	EBRAHIMNEJAD, A. et al, CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells, Am J Pathol, 2004, Vol.165, No. 5, p.1781-7 See Abstract, page 1783, right column, line 28-page 1784, left column, line 8, Figure 2	2-6
Y	SIMEONE, D.M. et al, CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer, Pancreas, 2007, Vol.34, No.4, p.436-43 See MATERIALS AND METHODS, FIGURE 1	4-6



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 October, 2011 (13.10.11)

Date of mailing of the international search report
25 October, 2011 (25.10.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KLETTING, P. et al, Radioimmunotherapy with anti-CD66 antibody: improving the biodistribution using a physiologically based pharmacokinetic model, J Nucl Med, 2010, Vol.51, No.3, p.484-91 See MATERIALS AND METHODS	8
A	JP 2010-529966 A (ASURAGEN, INC.), 02 September 2010 (02.09.2010), claims; paragraphs [0009] to [0012]; table 3 & US 2009/0227533 A1 & WO 2008/154333 A2 & CA 2689974 A & AU 2008261951 A1 & CN 101801419 A	2-6,8
A	WO 2008/073919 A2 (ASURAGEN, INC.), 19 June 2008 (19.06.2008), claims; paragraphs [0009] to [0011]; table 3 & US 2009163434 A1 & AU 2007333106 A1 & EP 2104734 A2 & CA 2671194 A1 & CN 101622348 A	2-6,8
A	JARZAB, B. et al, Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications, Cancer Res, 2005, Vol.65, No.4, p.1587-97 See Abstract, Table 2	2-6,8
A	GUTTINGER, M. et al, Epithelial V-like antigen (EVA), a novel member of the immunoglobulin superfamily, expressed in embryonic epithelia with a potential role as homotypic adhesion molecule in thymus histogenesis, J Cell Biol, 1998, Vol.141, No.4, p.1061-71 See Figure 2	2-6,8
A	US 2007/0293416 A1 (MCANDREWS HELD &MALLOY, LTD.), 20 December 2007 (20.12.2007), paragraph [0026], SEQ ID no.1 & EP 1988901 A2 & WO 2008/029271 A2	2-6,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072428

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1, 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 and 7 pertain to "methods for treatment of the animal body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1 (iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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. A61K45/00, A61K31/7105, A61K38/00, A61K39/395, A61P35/00

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、CAplus(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
X Y	WO 2009/126558 A1 (IBCPHARMACEUTICALS, INC.) 2009.10.15, 段落 【0010】、【0102】等 US 2009191225 A1	2、3 4-6、8
Y	EBRAHIMNEJAD, A. et al, CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells, Am J Pathol, 2004, Vol.165, No.5, p.1781-7 See Abstract, page 1783, right colum, line 28-page 1784, left colum, line 8, Figure 2	2-6

☒ 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 . 1 0 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 5 . 1 0 . 2 0 1 1

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)

安藤 公祐

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

4 4 9 6

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
Y	SIMEONE, D. M. et al, CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer, Pancreas, 2007, Vol. 34, No. 4, p. 436-43 See MATERIALS AND METHODS、FIGURE 1	4-6
Y	KLETTING, P. et al, Radioimmunotherapy with anti-CD66 antibody: improving the biodistribution using a physiologically based pharmacokinetic model, J Nucl Med, 2010, Vol. 51, No. 3, p. 484-91 See MATERIALS AND METHODS	8
A	JP 2010-529966 A (アシュラジェン インコーポレイテッド) 2010.09.02, 請求項、段落【0009】 - 【0012】、表 3 等 US 2009/0227533 A1 & WO 2008/154333 A2 & CA 2689974 A & AU 2008261951 A1 & CN 101801419 A	2-6、8
A	WO 2008/073919 A2 (ASURAGEN, INC.) 2008.06.19, 請求項、段落【0009】 - 【0011】、Table 3 等 US 2009163434 A1 & AU 2007333106 A1 & EP 2104734 A2 & CA 2671194 A1 & CN 101622348 A	2-6、8
A	JARZAB, B. et al, Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications, Cancer Res, 2005, Vol. 65, No. 4, p. 1587-97 See Abstract、Table 2	2-6、8
A	GUTTINGER, M. et al, Epithelial V-like antigen (EVA), a novel member of the immunoglobulin superfamily, expressed in embryonic epithelia with a potential role as homotypic adhesion molecule in thymus histogenesis, J Cell Biol, 1998, Vol. 141, No. 4, p. 1061-71 See Figure 2	2-6、8
A	US 2007/0293416 A1 (MCANDREWS HELD & MALLOY, LTD) 2007.12.20, 段落【0026】、SEQ ID No. 1 EP 1988901 A2 & WO 2008/029271 A2	2-6、8

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1、7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項1、7は、[手術又は治療による動物の体の処置方法]であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。