

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4392163号
(P4392163)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月16日(2009.10.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 Q 1/68 A

G 01 N 33/574 (2006.01)

G 01 N 33/574 A

請求項の数 8 (全 21 頁)

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-504687 (P2002-504687) |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年6月21日 (2001.6.21) |
| (65) 公表番号 | 特表2004-500895 (P2004-500895A) |
| (43) 公表日 | 平成16年1月15日 (2004.1.15) |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/019980 |
| (87) 国際公開番号 | W02001/098539 |
| (87) 国際公開日 | 平成13年12月27日 (2001.12.27) |
| 審査請求日 | 平成18年3月22日 (2006.3.22) |
| (31) 優先権主張番号 | 60/215,727 |
| (32) 優先日 | 平成12年6月21日 (2000.6.21) |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) |
| (31) 優先権主張番号 | 60/243,976 |
| (32) 優先日 | 平成12年10月27日 (2000.10.27) |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) |

| | |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 000004455 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号 |
| (73) 特許権者 | 500294958 ヒタチ ケミカル リサーチ センター インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 926 17 アーバイン ヘルス サイエンシー ズ ロード 1003 |
| (74) 代理人 | 100100549 弁理士 川口 嘉之 |
| (74) 代理人 | 100090516 弁理士 松倉 秀実 |
| (74) 代理人 | 100106622 弁理士 和久田 純一 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肺癌用遺伝子マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺癌の鑑別方法であって、

患者から単離された血液または非肺組織を用いて、配列番号16の塩基配列を含む遺伝子から発現したmRNA又はタンパク質の存在を判別することを含む方法。

【請求項 2】

マーカーであるサイトケラチン-19の存在を判別することをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

シンデカン1遺伝子から発現したmRNA又はタンパク質、コラーゲン1-2遺伝子から発現したmRNA又はタンパク質、及び、配列番号17の塩基配列を含む遺伝子から発現したmRNA又はタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーを判別することをさらに含む、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

前記判別が、RT-PCRによる、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

前記判別が、抗体結合による、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

前記患者が、哺乳動物である、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳動物が、ヒト、イヌまたはネコである、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

配列番号 1 6 の塩基配列を含むポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****[技術分野]**

本発明は、残留肺癌の診断および鑑別方法に関する。本発明はさらに、肺癌用の新規に同定された細胞マーカーの使用に関する。これらのマーカーとしては、シンデカン 1、コラーゲン 1 2、ならびに 2 つの新規タンパク質 7 0 1 3 および 7 0 1 8 が挙げられる。

10

【0 0 0 2】**[発明の背景]**

肺癌は工業国における最も一般的な癌の 1 つであり、非常に高い死亡率を有する。初期診断および有効な治療は現時点では利用可能でない。胸部 X 線はしばしば、肺癌スクリーニングに用いられるが、それは初期段階の癌の検出には有用でない。CT スキャンも用いられ、初期段階の癌の検出を可能にし得るが、この手法は時間を要し、被曝の危険性を有する。

20

【0 0 0 3】

癌細胞または微小転移はしばしば、黒色腫、甲状腺癌および前立腺癌患者の血流中で検出される。現在、逆転写ベースのポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR) は、癌特異的遺伝子またはマーカーを増幅することにより、無数の正常細胞内の単一癌細胞を検出し得るひとつ強力な方法である。これは、微小転移の RT - PCR 検出を、予後、適切な治療の選択、および各治療の効力のモニタリングのための有望な診断手法にする。さらに、血液試験はいかなる健康的被害をも誘導しないが、X 線または CT スキャンのような方法は有害作用をもたらす。さらに血液試験は、内視鏡検査および生検と比較して、引き起こす物理的不快が非常に小さい。肺癌はしばしば、初期段階、すなわち症候性疾患および多数の肺癌が脳、骨および肝臓における遠方の転移として再発する前でさえ、血行性転移を誘導する。これは、肺癌誘導性の血行性転移によるものである。しかしながらこの知識は、それが再発の診断および検出が極初期段階でのこれらの血行性転移に基づいてなされ得るということを示唆するため、有益である。しかしながら、血液中の転移性肺癌細胞の同定に利用可能な良好なマーカーはない。現在、肺癌マーカー、例えばサイトケラチン - 19 および CEA は、RT - PCR (逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応) による非小細胞肺癌の診断のために用いられるが、特異性を欠き、多数の擬陽性および陰性を生じる。

30

【0 0 0 4】

微小転移の RT - PCR は、次いで、多数の患者人口、血行性転移の高発生率、不十分な予後および高次癌治療のための高医療費のために、肺癌の検出に特に有益である。さらに特異的抗体は、今までのところ肺癌に利用可能ではない。

40

【0 0 0 5】

したがって、特異的マーカー、および血行性転移を検出することによる肺癌の診断方法が必要とされる。

【0 0 0 6】**[発明の概要]**

一実施形態は、患者から血液または非肺組織を単離すること、および、以下の：シンデカン 1、コラーゲン 1 2、7 0 1 3 および 7 0 1 8 からの少なくとも 1 つのマーカーの存在を判別することによる肺癌の鑑別方法である。本方法は、マーカーであるサイトケラチン - 19 の存在を判別することも含み得る。さらなる実施形態では、少なくとも 2 つのマーカーを判別する。さらなる実施形態では、2 より多いマーカーを判別する。判別方法は当業者に既知の任意のものであり得るが、RT - PCR および / または抗体結合も含み得る。患者は任意の生体であり得るが、一実施形態では、哺乳動物、特にヒト、イヌまたはネコである。

50

【 0 0 0 7 】

さらなる実施形態は、転移性癌細胞を単離または除去する方法であって、癌細胞を含む細胞または非肺組織を、シンデカン1、コラーゲン1 2、7013および7018からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーに特異的な抗体で処理することによる方法である。本方法は、マーカーであるサイトケラチン-18に特異的な抗体も含み得る。一実施形態では、抗体は金属粒子、蛍光粒子、クロマトグラフィービーズ、クロマトグラフィーゲルおよび固体支持体からなる群から選択される部分に結合される。さらなる実施形態では、2つのマーカーが用いられる。さらなる実施形態では、3つ以上のマーカーが用いられる。

【 0 0 0 8 】

10

さらなる実施形態は、マーカー7013として本明細書中でも同定される配列番号16の少なくとも17個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドである。

【 0 0 0 9 】

さらなる実施形態は、マーカー7018として本明細書中でも同定される配列番号17の少なくとも17個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドである。

【 0 0 1 0 】

さらなる実施形態は、患者における固形腫瘍の転移の鑑別方法であって、以下の：上記患者から血液または骨髄を単離すること、ならびにシンデカン1、コラーゲン1 2、7013および7018からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの存在を判別することによる方法である。本方法は、サイトケラチン-18を同定することも包含し得る。一実施形態では、上記固形腫瘍は胆管、結腸、乳房、子宮、食道および喉頭からなる群から選択される。

20

【 0 0 1 1 】

さらなる実施形態は、癌腫の鑑別方法であって、癌細胞を得ること、ならびに7013、7018およびその両方からなる群から選択されるマーカーの存在を判別することによる方法である。

【 0 0 1 2 】**[好ましい実施形態の詳細な説明]**

ディファレンシャルディスプレイを用いて、血中を循環し、正常血液細胞で発現しない、肺癌細胞で特異的に発現するmRNAを同定した。ディファレンシャルディスプレイ方法は、細胞中で発現する遺伝子のより包括的表現を可能にする古典的手法からの変法である。

30

【 0 0 1 3 】

候補遺伝子を同定するために、3つの主な技術が目下利用可能である。すなわち、サブトラクションライブラリー、ディファレンシャルディスプレイおよびDNAマイクロチップアレイである。しかしながらサブトラクションライブラリーは、潜在的に有用であるが、遺伝子配列の部分的類似性を示す遺伝子も同定することができ、非常に労力を要しつつ時間集約的技法である。DNAマイクロチップアレイは、使用が迅速かつ容易であるが、血液試料中の稀少遺伝子を検出するのに十分に感受性ではない。これは、本方法が特異的マーカーを発現しない正常細胞の大きなバックグラウンド（無数の白血球）内に特異的マーカーを発現する稀少微小転移を検出できる必要があるため、特に重要である。ディファレンシャルディスプレイ（dd-PCR）は、多重縮重プライマーの組合せを用いてすべての既存の遺伝子の増幅を可能にし、したがって稀少マーカーまたは遺伝子が検出されるという見込みを増大させる。

40

【 0 0 1 4 】

しかしながら、できるだけ多数の遺伝子を表現するようにディファレンシャルディスプレイ技術を改良するために、選択的増幅断片長多型（selective Amplified Fragment Length Polymorphism (s-AFLP)）を実施例1で用いた。このアプローチは、1) 遺伝子の3'末端のみを増幅する、2) より再現可能なゲルパターンを生成する、3) より少数の余分な遺伝子を同定する、および4) より選択的なPCR条件を用いるという利点を有す

50

る。本方法は、4つのマーカー、すなわち S y n d 、 C o l 、 7 0 1 3 および 7 0 1 8 の同定に至った。

【 0 0 1 5 】

これらのマーカーを用いて、疾患のあらゆる段階における患者の血中の肺癌細胞を判別し得る。当業者に既知の任意の方法を用いて、血中または任意の転移性組織中のマーカーを判別し得る。例えば、マーカーに特異的である細胞で発現する m R N A が判別され得る。

【 0 0 1 6 】

あるいは、タンパク質それ自体は、免疫技法、例えばウエスタンプロット、 F A C S 技術、 E L I S A および当業者に既知のその他の方法を用いて同定され得る。これら抗体または機能性抗体部分は、既知の方法を用いて購入、単離、または生産され得る。

10

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、マーカーの遺伝子発現が同定される。マーカーに関連した遺伝子の発現の判別を可能にする任意の方法が用いられ得る。典型的には、本方法は、遺伝子の発現に起因する m R N A を増幅する。一実施形態では、血液または組織からの m R N A の R T - P C R が用いられる。さらなる実施形態では、これらのマーカーを含む血中の細胞を判別するために抗体が用いられる。例えば細胞選別を用いて、これらのマーカーに対する抗体で蛍光標識されていた細胞を判別し得る。

【 0 0 1 8 】

一実施形態では、本方法は、血中または骨髄中の肺癌細胞の存在を判定するために用いられる。しかしながら、普通はこれらのマーカーを生じない任意の組織からの m R N A が用いられ得ることが想定される。例えば、典型的に転移の部位である器官からの m R N A が用いられ得る。したがって、さらなる実施形態では、本方法は、肝臓または脳のような器官中の肺癌細胞を判別するために用いられる。

20

【 0 0 1 9 】

一実施形態では、本方法は、疾患の極初期段階での肺癌細胞の存在を判別するために用いられる（さらなる実施形態では、肺癌細胞は寛解後に判別される）か、あるいは再発を判別するために用いられる。

【 0 0 2 0 】

さらなる実施形態では、マーカーは、 i n v i v o または i n v i t r o で肺癌細胞を標的化するために用いられる。一実施形態では、癌細胞を標的とし、血液から除去させるアフィニティー技法を用いて、身体から癌細胞が除かれる。

30

【 0 0 2 1 】

さらなる実施形態では、マーカーを用いて、血中もしくは骨髄中の転移性細胞を、または胆管、結腸、乳房、子宮、食道および喉頭のような癌により生成される転移性器官もしくは組織を鑑別する。あるいはマーカーは、血液から転移性細胞を除去するために用いられ得る。

【 0 0 2 2 】

さらなる実施形態では、マーカー 7 0 1 3 および 7 0 1 8 は、癌細胞またはその他の細胞が上皮由来のものであるか否かを判別するために用いられる。例えば細胞が一方または両方のマーカーを発現する場合、それは上皮由来のものであると考えられる。

40

【 0 0 2 3 】

患者は、癌を有することが可能な任意の動物であり得る。一実施形態では、患者は哺乳動物である。さらなる実施形態では、哺乳動物はペット、例えばイヌまたはネコである。さらなる実施形態では、患者はヒトである。

【 0 0 2 4 】

ここで以下の実施例を参照して本発明を説明する。しかしながら、これらの実施例は本発明を単に説明するものであって、本発明を限定するものではない、と理解される。

【 0 0 2 5 】

実施例 1 および 2 では、マーカーは、種々のディファレンシャルディスプレイ技法を用いて同定される。同定されるマーカーは、実施例 2 で説明される。

50

【0026】

実施例1

S-AFLPディファレンシャルディスプレイ

S-AFLPは、cDNAライブラリーからの制限断片の選択的PCR増幅に基づいている。2組の選択的プライマーを用いた。第1のもの、すなわち図1の選択的プライマーAは、3つの部分：コア配列、酵素特異的配列および3'末端の2つの選択的ヌクレオチドからなる。選択的配列の変異のために、これは $4^2 = 16$ 種類のプライマーを提供する。第2のもの、すなわち図1の選択的プライマーBも、3つの部分：アンカー配列、ポリT配列および蛍光標識される3'末端の2つの選択的ヌクレオチドからなる。ポリT(A、GおよびC)後の3つの選択的配列のために、これは次に、 $3 \times 4 = 12$ 種類のプライマーを提供する。したがって、ポリA領域を含めた3'末端cDNA制限断片はすべて、選択的PCRのこの方法により生成される192(16×12)群に含まれた。増幅断片のゲル表示上の各シグナルは、cDNAライブラリー中の非オーバーラップ遺伝子を示した。この技法を用いて、肺癌検体から単離されるRNAを、健常個体の血液からのRNAと比較した。癌検体中で過剰発現した示差的に発現した遺伝子を、腫瘍細胞播種に関する一般的遺伝子マーカーのための候補と考えた。

【0027】

S-AFLPを成功させるためには、優れた品質のRNAが重要であった。しかしながら肺検体は、肺胞マクロファージからの豊富なRNaseの存在により、RNAを調製するのが最も難しい組織の1つである。したがって、NCCR (Chuo-ku, Tokyo, Japan)から急速凍結肺癌検体を購入し、過去に記載されたようなAGPC法により全RNAを精製した (Tominaga, K., Miura, Y., Arakawa, T., Kobayashi, K. and Mitsuhashi, M. Clin. Chem., 42, 1750-1783, 1998)。アガロースゲル電気泳動またはマイクロキャピラリーチップを用いて、RNAの品質を評価し、2つのrRNAバンドの存在を確認した。次にS-AFLPに関して許容可能な検体を用いた。6つの肺癌検体を用い、各試料を異なる患者から得た。6つのうちの4つは腺癌であり、2つは扁平上皮癌であった。20の対照血液は、悪性疾患またはその他の疾患の病歴または現在の診断を有さない健常有志から得た。

【0028】

腫瘍および血液検体の全RNA調製物

新鮮な凍結腫瘍検体を液体窒素中で小片に壊した。グアニジン法により、100mg検体から全RNAを抽出した (Chomzynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159)。末梢血試料を、ヘパリン凝固防止剤含有試験管中に患者および健常有志の静脈から採取した。第1の試験管中には1~2mlの末梢血、および第2の試験管中には10mlの末梢血の、2つの試料を各被験者から採取した。第1の試験管は、針が皮膚をさしたときに針が引っかかった上皮細胞で汚染された可能性があるため廃棄し、第2の試験管のみをアッセイした。メーカーの使用説明書に従ってRibocap (商標) (RNature, Irvine, CA) を用いて、末梢血試料から全RNAを抽出した。18sおよび28sリボソームRNAバンドに関してアガロースゲル電気泳動により精製全RNA品質を検査し、UV分光分析器によりそれらの量を測定した。

【0029】

ディファレンシャルディスプレイS-AFLP解析

選択的プライマー技法を用いて、ディファレンシャル「S-AFLP」変法を実行した。

【0030】

6つの肺癌検体(肺癌組織)および5名の健常個体を含む2つのプールした健常血液試料をそれぞれS-AFLP解析のために用いた。全アッセイに用いたオリゴマーはすべて、Sawady Technology (Tokyo, Japan)から入手した。30μgの全RNAから、二本鎖cDNAを合成した。65度5分間変性後、以下の： $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のオリゴ(dT)₁₂₋₁₈プライマー (Life Technologies, USA)、 $500\mu\text{M}$ の各デオキシヌクレオチドトリホ

10

20

30

40

50

スフェート(d N T P) (Life Technologies)、50 mMのトリス - H C l (p H 8 . 3)、75 mMのK C l 、3 mMのM g C l ₂、10 mMのジチオトレイトル(D T T)、20 単位のR N A s i n (Life Technologies) および 10 , 000 単位 / m l のM M L V 逆転写酵素 (Life Technologies) を含有した 50 μl の反応ミックス中で 37 で 90 分間、R N A を逆転写した。最終濃度のために以下の構成成分：25 mMのトリス - H C l (p H 8 . 3)、100 mMのK C l 、10 mMの(N H ₄) ₂ S O ₄ 、5 mMのM g C l ₂ 、250 μMの各d N T P 、0 . 15 mMのN A D 、5 mMのD T T 、250 単位 / m l のD N A ポリメラーゼ (Life Technologies) 、および 30 単位 / m l のD N A リガーゼ (Life Technologies) を添加することにより、16 で 120 分間、第2鎖反応を実施した。反応後、試験管を氷上に置き、12 . 5 μl の 0 . 25 M エチレンジアミン四酢酸 (E D T A ; p H 7 . 5) を酵素不活性化のために添加した。生成物をフェノール / クロロホルムで1回抽出し、エタノール沈殿させた。二本鎖c D N A をX単位の4塩基認識制限酵素M b o 1 (G A T C ; New England Biolabs, USA) で 37 で 60 分間消化した。消化断片の5'末端のリン酸塩残基を仔牛腸アルカリホスファターゼ (C I A P ; Takara, Japan) を用いて除去して、連結過程中の自己連結を回避させた。20 単位のC I A P および 10 μl の 10 × アルカリ性リン酸塩緩衝液 (500 mM トリス - H C l (p H 9 . 0) 、10 mM M g C l ₂) を添加し、37 で 30 分間インキュベートした。生成物をフェノール / クロロホルムで2回抽出し、エタノール沈殿させた。断片をオリゴマーと連結させて、プライミング部位に導入した。連結のために以下のオリゴマーを用いた：(P 1) 5' - P - G A T C C C C T A T A G T G A G T C - 3' (リンカーオリゴマー) [配列番号 1] ；(P 2) 5' G A C T C A C T A T A G G G - P - 3' (ヘルパーオリゴマー) [配列番号 2] 。ヘルパーオリゴマーを 3' 末端でリン酸化して、オリゴマーニ量体の生成を防止した。1 : 100 : 200 モル比の消化断片 : ヘルパーオリゴマー : リンカーオリゴマーを用いて、連結反応を実施した。

【 0031 】

45 μl の反応物中で 15 μl のLigation High (Toyobo) を添加することにより、16 で一夜、反応を実施した。QIAquick Nucleotide Removalキット (Qiagen, Germany) による非連結オリゴマーの除去後、ポリAテールを含む 3' 末端の断片を増幅し、2種類の選択的プライマーを用いて検出した。それらのうちの1つ (P 3) は、3つの部分：アンカーオリゴマーの相補的配列、M b o 1 認識配列 (G A T C) および 3' 末端の2つの縮重ヌクレオチド (5' - G A C T C A C T A T A G G G A T C N N - 3') [配列番号 3] からなっていた。P 3 は、選択的配列 (N N) の変異のために、 $4^2 = 16$ 型を有した。第2の選択的プライマー (P 4) も3つの部分：アンカー配列、スルホローダミン 10 1 標識で標識されたポリT配列および 3' 末端の2つの縮重ヌクレオチド (5' - T C T C C T T T T T T T T T T T T T T V N - 3') [配列番号 4] からなっていた。選択的配列「V」がT以外の任意のヌクレオチドであるため、P 4 は $3 \times 4 = 12$ 型を有する。したがってポリA領域を含む 3' 末端 c D N A 制限断片はすべて、各自別々に 192 P C R 反応により 192 (= 16 × 12) 群に分類される。P C R は、E x T a q D N A ポリメラーゼ (Takara, Japan) を用いて実行し、サイクリングパラメータは 94 で 30 秒、56 で 1 分および 72 で 1 分 (30 サイクル) であった。Hitachi S Q - 3000 蛍光D N A シーケンサーで、1 X T B E (0 . 09 M トリス - ホウ酸塩および 0 . 02 M E D T A) および 7 M 尿素を含有するポリアクリルアミドゲル (4 % T 、 5 % C) 電気泳動により、増幅産物を分離した。

【 0032 】

当該 c D N A をゲルから切り出し、粉碎浸漬法により精製した。図 2 は、6つの候補を產生する試料ゲルを示す。バンドは、正常血液より肺癌R N A 中でより豊富である特定断片を示す。6つの肺癌組織レーンのうちの少なくとも2つにおいてバンドが存在し、どの正常血液レーンにも存在しない場合に、バンドを単離した。ディファレンシャルディスプレイはしばしば多数の擬陽性を生じるため、選択判定基準は重要であった。p G E M - T e a s y ベクター系 (Promega, USA) を用いて、単離断片をサブクローニングした。ミニブ

10

20

30

40

50

レパレーションにより精製された生成物を、Big Dye ターミネーターサイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems, CA, USA) および ABI Prism 377 DNA シーケンシング装置 (Applied Biosystems) を用いて、T7 プライマー (5' - TAA TAC G A C T C A C T A T A G - 3') [配列番号 15] を用いてシーケンシングした。

【0033】

ノーザンプロット解析

ホルムアルデヒドゲル電気泳動により全 RNA を分離し、ナイロン膜 (+) (Amersham Pharmacia, England) に移した。候補を pCR 2-1 を用いてクローニングした。配列解析により、クローンを検証した。プラスミド DNA を適切な酵素で制限処理し、in vitro 転写のために用いた。

【0034】

選択方法

最初に、健常血液中では陰性であり、肺癌中では陽性である 121 個の候補を同定した。これら 121 個の候補をシーケンシング後、GenBank ならびに発現配列タグ (EST) データベース中の既知の配列との相同性に関して、配列を解析した。

【0035】

真のシグナル対偽のシグナルの選択のための手法を以下に示す：当該バンドをディスプレイゲルから切り出し、DNA をクローニングした。次に当該単離物をシーケンシングした。遺伝子が血球中に普通に存在することを配列データが示した場合、それを廃棄した。次に特定プライマーを設計し、各クローンに関して PCR を実行した。まず正常血液 RNA を PCR により増幅し、PCR 産物が產生された場合には、候補を廃棄した。残りの 21 候補を、肺癌患者からの血液に対して検査し、シグナルがいかなる患者においても見出されない場合には候補を廃棄した。この手法から、4 つの候補の単離を生じた（実施例 2 参照）。

【0036】

【表 1】

肺癌血液検出のための候補マーカー

| 候補 | データベース | 説明 |
|-------|--------|--|
| シンデカン | nr | シンデカン-1 遺伝子 (エキソン 2~5) |
| コラーゲン | nr | プロ-2 (1) コラーゲン COL1A2 遺伝子 (エキソン 1) |
| 7013 | EST | ゲノムクローン 位置 1q32.2 |
| 7018 | EST | なし |

20

30

【0037】

実施例 2

候補遺伝子

候補マーカーを表 1 に示す。見出された第 1 の候補マーカーをシンデカン 1 遺伝子 (ヌクレオチド配列 PubMed アクセッション番号 BC008765、タンパク質配列アクセッション番号 AAH08765) と同定した。図 6 は、S-AFLP によりもたらされた断片の配列を提示する (配列番号 18)。この配列のblast 検索は、シンデカン 1 遺伝子 (genbank アクセッション番号 Z48199) のエキソン 2~6 に相当した。

40

50

シンデカン 1 は、細胞外マトリックスおよび成長因子と結合するプロテオグリカンのファミリーからの細胞表面膜貫通ヘパラン硫酸プロテオグリカンである。いくつかの癌において、この遺伝子の調節の不全が明らかにされた。

【 0 0 3 8 】

次の候補は、コラーゲン 1 - 2 と同定した（ヌクレオチド配列 P u b M e d アクセッショング番号 J 0 0 1 1 4 、タンパク質配列アクセッション番号 A A A 5 1 9 9 6 ）。図 7 は、s - A F L P により提供された旧断片（配列番号 2 0 ）ならびに新規断片（配列番号 1 9 ）の配列を提供する。この配列の b l a s t 検索は、コラーゲンプロ - 2 (1) 遺伝子 (g e n b a n k アクセッション番号 J 0 3 4 6 4) のエキソン 1 に相当した。これは、特に肺における広範発現遺伝子である。当該遺伝子が脂肪芽細胞腫における P L A G 1 (多形腺腫遺伝子 1) との融合タンパク質として関わることは興味深い。
10

【 0 0 3 9 】

第 3 の候補は、7 0 1 3 (配列番号 1 6) と呼ばれ、E S T データベースに対して検索した場合、新規遺伝子と同定された。図 8 は、s - A F L P から得られる断片の配列（配列番号 2 1 ）を示す。この断片を用いて、プライマー伸長法により大型断片を同定した（配列番号 1 6 ）。この大型断片を p C R I I 中にクローニングし、その結果生じたプラスミド p 7 0 1 3 は、ブダペスト条約下で、8 2 2 0 8 0 4 3 7 7 7 8 のラベルを付した F E D E X 発送により 2 0 0 1 年 6 月 2 1 日に A T C C (B e t h e s d a , M a r y l a n d , U S A) に寄託され、A T C C アクセッション番号を割り当てられた。c D N A ライブライアから大型クローニングを単離し、プラスミド p 7 0 1 3 / 1 2 は、ブダペスト条約下で、8 2 2 0 8 0 4 3 7 7 7 8 のラベルを付した F E D E X 発送により 2 0 0 1 年 6 月 2 1 日に A T C C (B e t h e s d a , M a r y l a n d , U S A) に寄託され、A T C C アクセッション番号を割り当てられた。プラスミドは、p C M V 6 - X L 4 中に約 2 2 0 0 塩基の挿入物を有する。B L A S T 検索の実行に際して、最高の相同性を示す E S T (G e n B a n k アクセッション番号 A K 0 0 2 2 0 8) 、およびゲノムクローン (G e n B a n k アクセッション番号 A L 0 3 5 4 0 8) を同定した。配列は任意の既知の遺伝子とのいかなる相同性も示さないが、いくつかの上皮癌において増幅を受けると報告されている領域である染色体 1 の q 3 2 領域に局在した。
20

【 0 0 4 0 】

次の候補は 7 0 1 8 (配列番号 1 7) と呼ばれ、これも新規の遺伝子である。図 9 は、s - A F L P から得られる断片の配列を提示する（配列番号 2 2 ）。この配列を用いて、c D N A にプライマー伸長して、大型断片を得た（配列番号 1 7 ）。この大型断片をプラスミド p C R I I 中でクローニングし、その結果生じたプラスミド p 7 0 1 8 は、ブダペスト条約下で、8 2 2 0 8 0 4 3 7 7 7 8 のラベルを付した F E D E X 発送により 2 0 0 1 年 6 月 2 1 日に A T C C (B e t h e s d a , M a r y l a n d , U S A) に寄託され、A T C C アクセッション番号を割り当てられた。B L A S T 検索の実行に際して、最高の相同性を示したが、既知の遺伝子とのいかなる相同性も示さない 2 つの E S T (G e n B a n k アクセッション番号 A W 9 5 6 7 2 7 および A W 4 5 2 7 9 5) を同定した。さらにそれは、今までのところいかなる染色体領域にも局在化されていない。
30

【 0 0 4 1 】

実施例 3 および 4 は、正常肺細胞および肺癌細胞系でマーカーが発現するか否かを判別する。

【 0 0 4 2 】

実施例 3

正常肺細胞および肺癌細胞系におけるマーカーの発現

これらのマーカーが正常ヒト肺細胞中で発現したか否かを判別するために、ヒト肺小気道上皮細胞、肺からの微小血管上皮細胞、気管支上皮細胞および正常ヒト肺纖維芽細胞からの同一量の R N A を用いて、正常ヒト肺 R N A で R T - P C R を実施した。

【 0 0 4 3 】

正常肺または肺癌細胞系からの全 R N A 調製

TRI REAGENT (登録商標) プロトコール (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) を用いた酸 - グアニジンチオシアネート / フェノール / クロロホルム抽出により、細胞から全 RNA を単離した。RNA を完全に精製する必要はなく、実際、プライマーがイントロンに及ぶ領域で設計される場合、多少の DNA 夾雜は許容可能である。

【0044】

R T - P C R

逆転写前に、すべての RNA 試料を DNase I で処理して、ゲノム DNA 夾雜がないことを保証した。全 RNA 1 μg 每に 1 単位の DNase I (Life Technologies) を用いた。生成物をフェノール / クロロホルムで 2 回抽出し、エタノール沈降させた。細胞系からの RNA の各 0.5 μg に対して 200 単位の MMLV 転写酵素を用いて (42 で 50 分間)、かつ血液全 RNA からの各 1 μg に対して 100 単位の 転写酵素 Revert Tra Ace (商標) を用いて (37 で 60 分間)、cDNA を合成した。

【0045】

まず、全 RNA の各 1 μg に対する 100 単位の逆転写酵素 Revert Tra Ace (商標) (TOYOB0, Japan)、50 μg / ml のオリゴ(dT)₁₂₋₁₈ プライマー (Life Technologies)、500 μM の各デオキシヌクレオチドトリホスフェート (dNTP) (Life Technologies) を用いて、37 で 60 分間、cDNA 合成を実施した。すべての PCR に関して、50 ng の全 RNA、10 pmol のプライマー対および 0.125 単位の EX Taq DNA ポリメラーゼを、25 μl 反応物の総容量中に用いた。各遺伝子マーカーに関するプライマー対およびサイクリング条件は以下の通りであった：SYNDマーカーをプライマー P5 (5' - T C A T G T G T G C A A C A G G G T A T - 3') [配列番号 5] およびプライマー P6 (5' - A A T A T T C C T G A T T C C A G C C C - 3') [配列番号 6] を用いて増幅した。サイクリング条件は、94 で 30 秒、65 で 1 分および 72 で 1 分 (30 サイクル) であった。プライマー P7 (5' O A G A G C A T T G T G C A A T A C A G T T T C A T T A A C T C C T - 3') [配列番号 7] およびプライマー P8 (5' - G G T T T T C T T A C A A A G G T T G A C A T T T C C T A A C A G - 3') [配列番号 8] を用いて、COL を増幅した。サイクリングパラメータは、94 で 30 秒、58 で 1 分および 72 で 1 分 (20 サイクル) であった。第 2 ラウンドの PCR 反応に関しては、反応ミックスは 1 μl の第 1 ラウンド PCR 産物を鑄型として、ならびにプライマー対 P3 および P4 を含入した。PCR の第 2 段階は、94 で 30 秒、60 で 1 分および 72 で 1 分を 20 回実施した。7013 を、プライマー P9 (5' - A A T G A A G G A G A C A T C T G G A G T G T G C G - 3') [配列番号 9] およびプライマー P10 (5' - A G A A A A G A A A G A T T A A G G T T C C C A T C T G C G - 3') [配列番号 10] を用いて増幅した。サイクリング条件は 94 で 30 秒、63 で 1 分および 72 で 1 分 (38 サイクル) であった。7018 を、プライマー P11 (5' - A T C C A T G C A C G T C A C T T T C C T T C C - 3') [配列番号 11] およびプライマー P12 (5' - T C A A G T A G G C A C A A C C C A G T C C T - 3') [配列番号 12] を用いて増幅した。サイクリング条件は 94 で 30 秒、63 で 1 分および 72 で 1 分 (38 サイクル) であった。CK-19 を、プライマー P13 (5' - C A A G A T C C T G A G T G A C A T G C G A A G - 3') [配列番号 13] およびプライマー P14 (5' - C G C T G A T C A G C G C C T G G A T A T G - 3') [配列番号 14] を用いて増幅した。サイクリングパラメータは 94 で 30 秒、60 で 1 分および 72 で 1 分 (20 サイクル) であった。第 2 ラウンドの PCR 反応に関しては、1 μl の第 1 ラウンド PCR 産物が鑄型であり、P13 および P14 の同一プライマー対は同一サイクルパラメータを有した。PCR 後、4% NuSieve GTG アガロースゲル (Takara, Japan) 上での電気泳動により、1 μl の PCR 産物を解析した。

【0046】

陽性対照として、全試料に - アクチンに関して PCR を施した。4 つの候補、7018

10

20

30

40

50

、7013、シンデカン1(Synd)、コラーゲン1A2(Col)のプライマー、および陽性対照サイトケラチン-19(Ck-19)のプライマーをRT-PCRのために用いた。サイトケラチン-19は、上皮細胞マーカーとして既知である。これらのマーカーに対する5つのプライマー対の使用により、PCR増幅を実施した。細胞系に関しては、0.1容量のRT反応物、10μMの各プライマーおよび1.24単位のTaqDNAポリメラーゼを、50μl反応物の総容量中に用いた。全血に関しては、0.1容量のRT反応物、10μmの各プライマーおよび0.125単位のEXTaqDNAポリメラーゼを、25μl反応物の総容量中に用いた。各プライマーのPCR条件は、表2に示したとおりである。アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を解析し、シーケンシングによりいくつかの生成物を確認した。

10

【0047】

【表2】

各プライマー対に関するPCR条件

| マーカー | 初期変性 | PCRサイクル | | | |
|------------|----------|---------------------------------|----------|----|------|
| | | 変性 | アニーリング | 伸長 | 最終伸長 |
| 7018 | 94°Cで1分間 | (94°Cで30秒 53°Cで30秒 72°Cで1分間)×35 | 72°Cで5分間 | | |
| 7913 | 94°Cで1分間 | (94°Cで30秒 60°Cで30秒 72°Cで1分間)×35 | 72°Cで5分間 | | 20 |
| シンデカン | 94°Cで1分間 | (94°Cで30秒 55°Cで30秒 72°Cで1分間)×35 | 72°Cで5分間 | | |
| コラーゲン | 94°Cで1分間 | (94°Cで30秒 52°Cで30秒 72°Cで1分間)×35 | 72°Cで5分間 | | |
| サイトケラチン-19 | 94°Cで1分間 | (94°Cで30秒 65°Cで30秒 72°Cで1分間)×35 | 72°Cで5分間 | | |
| β-アクチン | 94°Cで1分間 | (94°Cで30秒 53°Cで30秒 72°Cで1分間)×35 | 72°Cで5分間 | | |

【0048】

30

正常細胞のPCRの結果を表3に示す。これは、4つの新規単離マーカーが検査した正常肺細胞系中でしばしば発現したことを示す。さらに、新規マーカー7013および7018は、肺上皮細胞に特異的である(表3、ならびに図3も参照)。シンデカン1は、5つのRNAすべてで発現することが見出された。コラーゲン遺伝子も5つすべてで発現した。7013遺伝子は、7018と同様に、全体的肺癌組織および上皮細胞でのみ見出された。肺癌サイトケラチン-19に関するマーカーも、全体的肺および上皮細胞でのみ見出された。

【0049】

【表3】

肺RNAおよび肺細胞系RNAにおけるmRNAマーカーのRT-PCR増幅

| | 7018 | 7013 | シンデカン | コラーゲン | サイトケラチン-19 |
|----------------------------|------|------|-------|-------|------------|
| 全肺RNA | + | + | + | + | + |
| S A E C (小気道上皮細胞) | + | + | + | + | + |
| N H B E (気管支上皮細胞) | . | + | + | + | + |
| H M V E C - L (肺の微小血管内皮細胞) | . | - | + | + | - |
| N H L F (肺纖維芽細胞) | - | - | + | + | - |

40

50

【0050】

実施例4

肺癌細胞系におけるマーカーの発現

これらのマーカーが肺癌細胞系中で発現したか否かを判別するために、同量のRNAを用いて12個の肺癌細胞系からのRNAで、RT-PCRを実施した(表4参照)。アガロースゲル電気泳動により全PCR産物を解析し、シーケンシングによりいくつかの生成物を確認した。RNAすべてが同等に、陽性対照-アクチンを十分に増幅した。癌細胞系Lu99 (Yamada, et al. Giant cell carcinomas of the lung producing colony-stimulating factor in vitro and in vivo. Jpn. J. Cancer Res., 76:967-976, 1985)、PC13 (大細胞癌)、A549 (Imanishi, et al. Inhibition of growth of human lung adenocarcinoma cell lines by anti-transforming growth factor-alpha monoclonal antibody. J. Natl. Cancer Inst., 81:220-23, 1989)、PC14、NCI-H441 (腺癌)、PC1およびQG56 (扁平上皮癌)を用いた。

【0051】

図4に示したように、6つの肺癌細胞系中のRNA中のマーカーの存在もRT-PCRにより調べた。系のうち4つは腺癌で、レーン5および6のものは扁平上皮癌であった。シンデカン1は、6つすべてで発現したことが判明した。コラーゲン遺伝子は、6つのうち4つでは強く、2つでは弱く見出された。興味深いことに、7013および7018は、異なる発現パターンを示した。7013は、6つのうち4つで見出され、そして7018は6つの系のうち5つに見出された。これは、6つのうち5つに見出されたサイトケラチン-19に匹敵する。扁平上皮系5082は、サイトケラチン-19を発現しなかったが、7018を発現した。

【0052】

【表4】

肺癌細胞系からのRT-PCR発現マーカー

| 細胞系 | 細胞型 | 7018 | 7013 | シンデカン | コラーゲン | サイトケラチン-19 | |
|----------|--------|------|------|-------|-------|------------|----|
| A549 | 腺癌 | + | + | + | + | + | 30 |
| PC14 | 腺癌 | - | + | - | - | - | |
| NCI-H23 | 腺癌 | - | + | + | + | + | |
| NCI-H358 | 腺癌 | + | + | + | + | + | |
| NCI-H441 | 腺癌 | + | + | + | - | - | |
| SW 1573 | 腺癌 | + | - | + | + | + | |
| QG 56 | 扁平上皮細胞 | + | + | + | + | + | 40 |
| PC 1 | 扁平上皮細胞 | + | + | - | + | - | |
| NCI-H157 | 扁平上皮細胞 | + | - | + | + | - | |
| NCI-H520 | 扁平上皮細胞 | + | + | + | + | + | |
| Lu 99 | 大細胞 | - | - | - | - | + | |
| PC 13 | 大細胞 | + | + | - | - | - | |

【0053】

実施例5は、これらのマーカーを用いた血中の肺癌細胞の判別方法を提供する。実施例5では、R T - P C R を用いて、血液試料中のこれらのマーカーに関するm R N A の存在を判別する。

【0054】**実施例5****患者血液中のマーカーの発現**

1998年11月から2000年4月までの間に慶應大学病院で診断され、治療された肺癌患者68名、ならびに同一時期の慶應大学病院の転移性肺癌患者7名を調査した。患者の特徴を表5に示す。

10

【0055】

4つの候補7018、7013、シンデカン1(synd)、コラーゲン1A2(Col)、および陽性対照サイトケラチン-19(Ck-19)を用いたR T - P C R を用いて、患者の血液試料からのR N A を試験した。陽性結果として認めるためには、試料においてマーカーが良好に増幅し、そして-アクチンも良好に増幅しなければならない。

【0056】**全血からの全R N A 調製物**

ヘパリン凝固防止剤含有試験管中に、患者および健常有志の肘前静脈から、末梢血試料を採取した。標準低張溶液により赤血球(R B C)を溶解し、全血球集団をR i b o C a p注射器フィルター(RNAture, Irvine, CA)上に収集した。グアニジン溶液を添加し、その後標準A G P C 法を用いることにより、注射器フィルターからR N A を溶離した。18 sおよび28 sリボソームR N A バンドを有するアガロースゲル電気泳動により精製全R N A 品質を解析し、U V 分光計によりそれらの量を測定した。調製後、R N A ペレットを20 μ l のジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水中に再懸濁し、-80 で保存した。

20

【0057】**R T - P C R**

逆転写前に、全R N A 試料をD N a s e I で処理して、可能性のあるいかなるゲノムD N A 夾雑をも除去した。細胞系からのR N A の各0.5 μ g に対して200単位のM M L V 転写酵素を用いて(42で50分間)、全血液R N A からの各1 μ g に対して100単位の転写酵素R e v e r T r a A c e (商標)を用いて(37で60分間)、c D N A を合成した。

30

【0058】

全試料を、陽性対照としての-アクチンに関するP C R に付した。図5は、血液R N A からの陽性試験の一例を示す。4つの候補7018、7013、シンデカン1(synd)、コラーゲン1A2(Col)、ならびに上皮細胞マーカーとして既知であるサイトケラチン-19(Ck-19)のプライマーをR T - P C R のために用いた。細胞系のR T - P C R に関しては、0.1容量のR T 反応物、10 μ Mの各プライマーおよび1.24単位のT a q D N A ポリメラーゼを、50 μ l 反応物の総容量中に用いた。全血のR T - P C R に関しては、0.1容量のR T 反応物、10 μ Mの各プライマーおよび0.125単位のE X T a q D N A ポリメラーゼを、25 μ l 反応物の総容量中に用いた。P C R 条件は、表2と同様であった。

40

【0059】**【表5】**

肺癌患者の特徴

| 群 | 特徴 | 数 |
|----|---------|----|
| 性別 | 男性 | 48 |
| | 女性 | 20 |
| 年齢 | - 39 | 1 |
| | 40 - 49 | 14 |
| | 50 - 59 | 8 |
| | 60 - 69 | 18 |
| | 70 - 79 | 25 |
| | 80 - | 2 |
| 段階 | I A | 9 |
| | I B | 6 |
| | II A | 0 |
| | II B | 2 |
| | III A | 12 |
| | III B | 15 |
| | IV | 15 |
| | 再発 | 8 |
| | 不明 | 1 |
| 病歴 | 腺癌 | 35 |
| | 扁平上皮癌 | 19 |
| | 大細胞癌 | 3 |
| | 小細胞癌 | 2 |
| | 腺扁平上皮癌 | 1 |
| | 不明 | 8 |

【0060】

表6では、同定されたマーカーの存在に関して、肺癌患者および対照健常有志からの血液のR T - P C Rの結果を試験した。段階I ~ I V患者を、40名の健常有志と同様に、マーカーの発現に関して試験した。要約すると、結果は、4つの遺伝子7018、7013、S y n dおよびc o lは健常対照血中では発現しないが、癌細胞系中では発現することを示した(表6参照)。

【0061】

【表6】

肺腫瘍患者におけるR T - P C R解析の結果

| 患者 | N | シンデカン | コラーゲン | 7013 | 7018 | % |
|-----------|----|-------|-------|------|------|----|
| 段階I ~ I V | 68 | 13 | 9 | 25 | 3 | 54 |
| 健常者 | 20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |

【0062】

特に表7では、肺癌患者の血液試料において、各遺伝子はそれぞれ3%、41%、19%および16%発現したが、これら4つの遺伝子のうちの少なくとも1つは患者の血液試料の57%で発現する。また、サイトケラチン-19を用いると、これら5つの遺伝子のうちの少なくとも1つは71%の患者で発現する。1つまたはそれ以上のこれらの遺伝子は、腺癌の80.5%、および扁平上皮癌の68.4%で発現する。シンデカンは、13名

30

40

50

の肺癌患者で見出され、対照（健常）患者では見出されなかった。コラーゲンは、肺癌患者においてのみ見出された。7013マーカーは、肺癌患者において広範に発現したが、対照では全く発現しなかった。7018だけは、対照試料ならびに肺癌患者において発現することが判明した。

【0063】

【表7】

肺癌患者の血液中の陽性R T - P C R 発現マーカーの頻度

| 細胞型 | 患者数 | 7018 | 7013 | シンデカン | コラーゲン | 4つの組合せ | サイトケラチン-19 | 5つの組合せ | |
|--------|-----|------|------|-------|-------|--------|------------|--------|----|
| 腺癌 | 34 | 2 | 14 | 8 | 5 | 22 | 10 | 27 | 10 |
| 扁平上皮癌 | 21 | 1 | 7 | 3 | 2 | 10 | 7 | 13 | |
| 大細胞癌 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | |
| 腺扁平上皮癌 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 小細胞癌 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 不明 | 8 | 0 | 3 | 1 | 1 | 4 | 3 | 6 | |
| 合計 | 69 | 3 | 26 | 13 | 9 | 39 | 21 | 49 | 20 |

【0064】

したがって、患者の54%が、4つのマーカーのうちの少なくとも1つまたはそれ以上を表示した。

【0065】

要するに、肺癌患者の血液中に存在し、正常血液中には存在しない4つの新規の潜在的マーカーが同定された。マーカーのうちの2つは新規の遺伝子である。

【0066】

新規のマーカーの組合せは、検査した肺癌患者の血液の54%で観察され（表5）、これらのマーカーとサイトケラチン-19との組合せは、検査した肺癌患者の血液の68%で見出されるマーカーを生じた。したがって組合せは、初期段階の肺癌の微小転移の診断のために、または再発に関する診断のために理想的である。

【0067】

実施例6では、任意の型または段階の肺癌において肺癌細胞を判別する5つのマーカーを用いるアッセイの能力を調べる。

【0068】

実施例6

肺癌の型および段階による解析

異なる型および段階の肺癌を有する患者を、4つのマーカーの発現に関して試験した（表8参照）。

【0069】

【表8】

30

40

転移性肺癌患者の特徴

| 由来（細胞型） | 年齢 | 性別 |
|-----------|----|----|
| 胆管（腺癌） | 59 | F |
| 結腸（腺癌） | 60 | F |
| 乳房（腺癌） | 68 | F |
| 子宮（扁平上皮癌） | 68 | F |
| 子宮（扁平上皮癌） | 55 | F |
| 食道（扁平上皮癌） | 56 | M |
| 喉頭（扁平上皮癌） | 59 | M |

10

【0070】

実施例5と同様に、69名の肺癌患者の血液試料を慶應大学病院から得た。腫瘍-結節-転移(TNM)スコア(Mountain CE: A new international staging system for lung cancer. Chest 89:225S-233S, 1986)に従って、段階分類を実施した。RNAを精製し、RT-PCRを実施例5と同様に実施した。血液試料中の各マーカーの発現を解析し、結果を表9に示す。

20

【0071】

表9では、マーカーは後期段階で多少多く発現するようであるが、5つすべての組合せを用いる場合、それらは疾患の全段階で判別され得ることが観察され得る。したがって、これら5つの遺伝子を組合せて用いると、少なくとも1つの遺伝子は段階IAの56%で、IBの33%、IIの50%、IIIAの92%、IIIBの60%、ならびにIVの87%で発現する。

【0072】

【表9】

30

段階による肺癌患者の血液中の陽性RT-PCR発現マーカーの頻度

| 段階 | 7018 | 7013 | シンデ カン | コラ ーゲン | 4つの組合せ* | サイトケラチン -19 | 5つの組合せ** |
|------|------|------|-----------|-----------|---------|----------------|----------|
| IA | 1 | 2 | 0 | 3 | 4(44%) | 2 | 5(56%) |
| IB | 0 | 1 | 1 | 1 | 2(33%) | 1 | 3(50%) |
| II | 0 | 0 | 1 | 0 | 1(50%) | 1 | 2(100%) |
| IIIA | 0 | 9 | 4 | 0 | 10(83%) | 2 | 11(92%) |
| IIIB | 2 | 2 | 3 | 3 | 7(44%) | 5 | 9(56%) |
| IV | 0 | 9 | 3 | 2 | 11(69%) | 8 | 13(81%) |
| 再発 | 0 | 3 | 1 | 0 | 4(50%) | 2 | 6(75%) |

40

* 4つのマーカーの組合せ: 7013, 7018, シンデカンおよびコラーゲン

** 5つのマーカーの組合せ: 7013, 7018, シンデカン、コラーゲン、およびサイトケラチン-19

【0073】

転移性疾患有する患者からの血液を試験した場合、少なくとも1つのマーカーがすべての型の転移性疾患において検出されたことが観察され得る(表10参照)。これは、マーカーを用いて肺癌の全段階における疾患を検出すること、ならびに再発性転移を検出することができるることを示唆する。

50

【0074】

【表10】

転移性肺癌患者の血液中のマーカー検出

| 由来(細胞系) | 7018 | 7013 | シンデカン | コラーゲン | サイトケラチン -19 | |
|-----------|------|------|-------|-------|----------------|----|
| 胆管(腺癌) | - | + | - | - | - | |
| 結腸(腺癌) | + | - | + | + | - | |
| 乳房(腺癌) | + | + | - | - | + | 10 |
| 子宮(扁平上皮癌) | - | - | - | - | - | |
| 子宮(扁平上皮癌) | - | - | - | + | + | |
| 食道(扁平上皮癌) | - | + | + | - | + | |
| 喉頭(扁平上皮癌) | - | + | - | - | - | |

【0075】

実施例11

同定されたマーカーのうちの1つまたはそれ以上からのmRNAを用いた肺癌の存在の診断および解析 20

患者から血液を単離し、血液試料からのRNAを精製した。以下のマーカーのうちの少なくとも1つを用いて、RT-PCRを実施する：シンデカン1、コラーゲン1-2、7013および7018。-アクチンのような対照も実施する。あるいは、付加的マーカーであるサイトケラチン-19も、RT-PCRにより試験する。結果をプールし、各マーカーの発現に関して解析する。

【0076】

実施例12

同定されたマーカーのうちの1つまたはそれ以上に対する抗体を用いた肺癌の存在の診断および解析 30

マーカー：シンデカン1、コラーゲン1-2、7013および7018ならびにサイトケラチン-19に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を購入し、調製し、または患者の血液から単離した。当業者に既知の方法、例えばハイブリドーマ技法、融合タンパク質のウサギへの注射、ヒト化抗体の产生、ライブラリー技法等を用いて、抗体を調製する。さらに、全抗体または機能性部分を用い得る。患者からの血液を単離し、1つまたはそれ以上の同定されたマーカーに対する抗体で細胞を処置する。抗体を蛍光標識するか、あるいは二次抗体を蛍光標識する。FACS技法を用いて蛍光標識の存在により、これらのマーカーを有する細胞を判別する。異なる蛍光標識抗体を用いて各マーカーを判別し、単一血液試料中の2つ以上のマーカーの判別を可能にする。

【0077】

実施例13

血液または骨髄からの癌細胞の単離

シンデカン1、コラーゲン1-2、7013および7018ならびにサイトケラチン-18からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーに特異的な抗体で、当該細胞または当該細胞を含む非肺組織を処置することにより、転移性癌細胞を血液または骨髄から単離する。

【0078】

抗体を、金属粒子、蛍光粒子、クロマトグラフィービーズ、クロマトグラフィーゲルおよび固体支持体からなる群から選択される部分と結合させる。

【0079】

50

次に、癌細胞の転移元である部位の特定のために、または癌に特異的な活性化免疫細胞の產生のために、単離細胞を用い得る。あるいは本方法を用いて、血液から細胞を精製し得る。

【0080】

実施例14

全長cDNAクローンの単離

s-AFLP技法から得たクローンを用いて、全長cDNAクローンの検出のためのプライマーを設計する。ヒトcDNAライブラリーをStratagene (Torrey Pines, CA) から購入する。7013(配列番号16)または7018(配列番号17)に特異的なプローブを用いて、ライブラリーをスクリーニングする。陽性クローンを得た後、PCRを用いてクローンを試験し、シーケンシングする。

【0081】

実施例15

細胞上皮由来 / 癌腫の鑑別

マーカー7013および7018は上皮由来を有する細胞を特異的に判別したため、当該マーカーは、細胞が上皮由来を有するか否か、あるいは癌の場合にはそれが癌腫であるか否かを鑑別するために用いられる。マーカー7013および7018のみを用いて、FACS解析のために、実施例12と同様に細胞を処置する。細胞が一方または両方のマーカーにより蛍光標識される場合、細胞は上皮由来であるか、あるいは癌腫であると確定される。

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】好ましい実施形態で用いられる、修飾ディファレンシャルディスプレイ手法である選択的增幅断片長多型(s-AFLP)を示す。

【図2】正常血液レーンよりも肺癌RNAでより豊富であった6つの候補バンドを示すポリアクリルアミドゲルである。H:健常ヒト、L:肺癌組織。

【図3】各候補マーカーならびにサイトケラチン-19および-アクチンに関する肺細胞のRT-PCRを示すゲルである。

【図4】各候補マーカーならびにサイトケラチン-19および-アクチンに関する肺細胞のRT-PCRを示すゲルである。

【図5】血液RNAからの陽性PCRおよび陰性PCRの一例である。

30

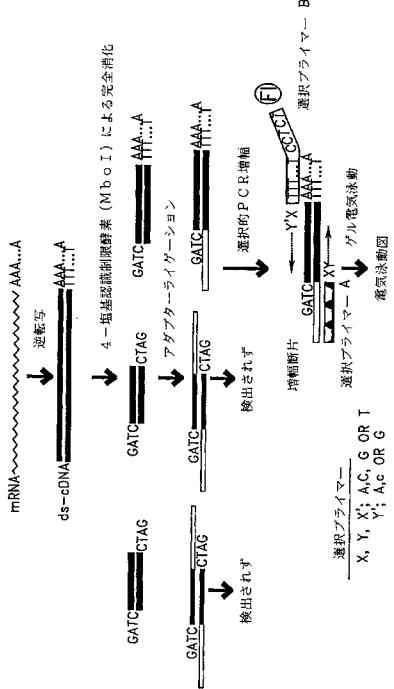
【図6】シンデカン1に関する配列情報ならびにプローブ配列である。

【図7】コラーゲン-1Pro-2に関する配列情報ならびにプローブ配列である。

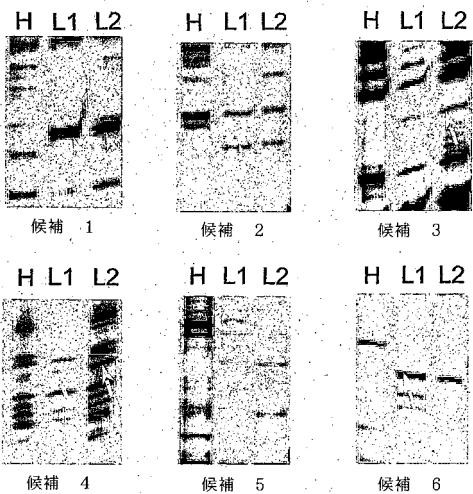
【図8】7013遺伝子に関する配列情報ならびにプローブ配列である。

【図9】7018遺伝子に関する配列情報ならびにプローブ配列である。

【図1】

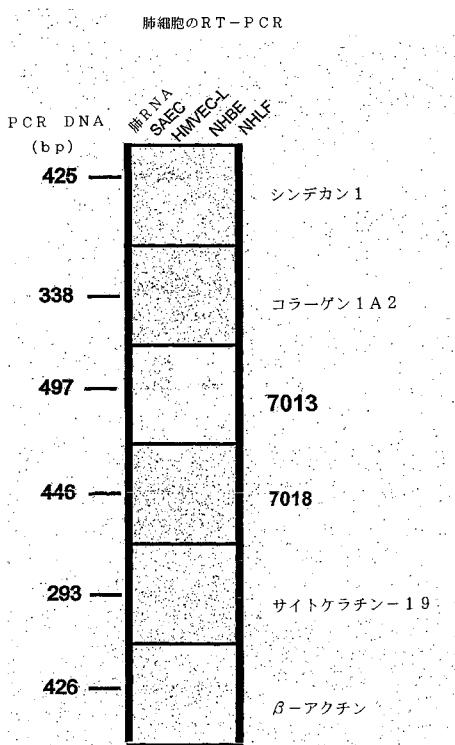


【図2】

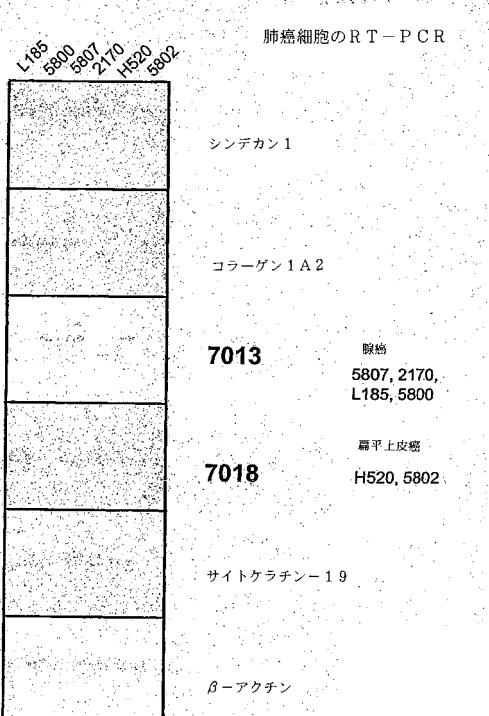


H : 健常ヒト血液
L : 肺癌組織

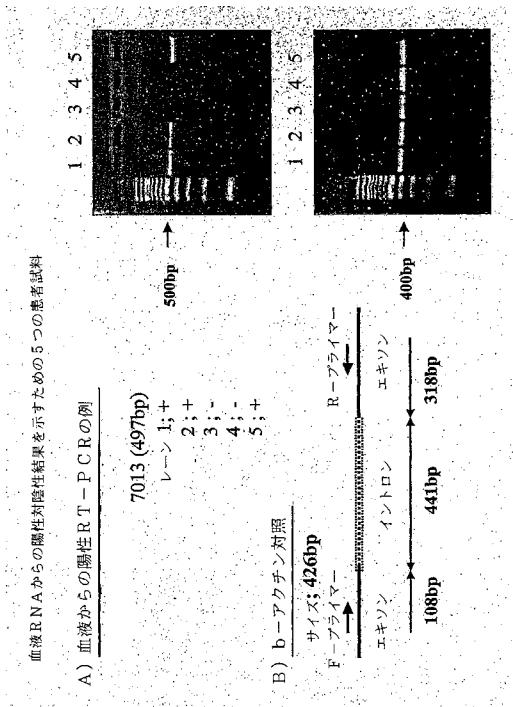
【 図 3 】



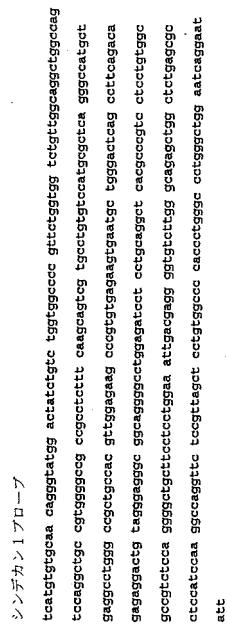
【 図 4 】



【 四 5 】



【 四 6 】



【圖 7】

Col プローブ
 5' CGTTTCTTACAAAGTTGACATTTCCTAACRGGGNTAAGA
 GTGTGAAAAAAATTCAATTGGGGGAGCGGGGGAA
 GGAGTTAATGAACTGTATTGCAACATGCTCT

【図 8】

7013のプローブ

cacctcccca aactcaggact gtctgtctgt gcagcaggatg caaggacgtg ttgaaactac
tcttcggcgc ctcccttgagat gatgtatccc tatggggggg gttaggtat tcgggttc
gacatotccc aaatgttgtt tttccggatg ccaaaaggctt ttggcccgat aatgcgtgt
cttacaggctg aggttgcacat gcateccccat cctctgagaaa aaagatccctc agacaatcc
tgtgtttctc ttgttcttca tttccaccgg gtctgttotca tacccaaacca gatttcgt
gagtgttaatgtt caggaggcat ggatgtacca accatggcc ctccggaccc acggccacca
ccggccgcgc cccacccgtt gcagcagcagc cagcagcagc agcagcagcga gcagcagcga
gatgtactt gacttaggaa taggcacagec cagagagaaa tggtatcaat gaaggagaca
ttccggatgt

【 义 9 】

ATCCATGCACTCACTTTCCTTCCACTGGGCAGGATAGCCGAGCACA
CCTCTTGCGCTCTCCCCGGTGCCTCCACTCCGAGGCTGTATGAG

ggcaggatag ccaacacac tcccttcgtt gctotcccg cccgggtggtt caactccgg
gggctgttat gaggactggg ttgtgccttt tgattttga aacacacaca agcaataaaa
agcctttcc tgcatttgtt gtgttggtgac catagcagat tatattttgtt tcctgtatgt
tttgtgtgtat aattttgtt tggttccaa gccgttcatgt catggccatgc gtgtccctgg
tagatgggtt aatgttacaa gaactccgtt agtcttccttca gggtgtccgtt cagcacgtt
tttacaatgtt atttttccat ccaaattgtt ccgtatgcgtt ggtatgcggc gtcagcggtt
ccagatgttccggccgggtt ggttcccccc gggggaccctt ttccctggccca ttctagggttgg
ggggctgtctt tttttggggca gggggac

【配列表】

0004392163000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100089244
弁理士 遠山 勉
(74)代理人 100098268
弁理士 永田 豊
(72)発明者 三橋 将人
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92714 アーバイン ブルックモント 8
(72)発明者 神原 秀記
東京都八王子市北野台1-4-3
(72)発明者 松永 浩子
東京都小平市小川西町4-15-8-603
(72)発明者 川村 雅文
東京都新宿区中落合2-17-26

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 国際公開第99/047674 (WO, A1)
Cancer Res., 1998, Vol. 58, No. 13, p. 2761-2765
第23回日本分子生物学会年会 プログラム・講演要旨集, 2000.11.25, p. 761, 4PB-211

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JDreamII)