

(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
2017年1月12日(12.01.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/007031 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070334
- (22) 国際出願日: 2016年7月8日(08.07.2016)
- (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 2015-138104 2015年7月9日(09.07.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人順天堂(JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 Tokyo (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 寺尾 泰久(TERAO, Yasuhisa); 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内 Tokyo (JP). 吉田 恵美子(YOSHIDA, Emiko); 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内 Tokyo (JP). 竹田 省(TAKEDA, Satoru); 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内 Tokyo (JP). 林崎 良英(HAYASHIZAKI, Yoshihide); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 伊藤 昌可(ITO, Masayoshi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 川路 英哉(KAWAJI, Hideya); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 田中 佑治(TANAKA, Yuji); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2017/007031 A1

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING LYMPH NODE METASTATIC POTENTIAL OF ENDOMETRIAL CANCER

(54) 発明の名称: 子宮体がんのリンパ節転移能の評価方法

(57) Abstract: Provided is a technique for discriminating lymph node metastatic endometrial cancer from lymph node non-metastatic endometrial cancer at a molecular level. A method for evaluating the occurrence of lymph node metastasis, the lymph node metastatic potential or the prognosis of endometrial cancer, said method comprising a step of measuring the level of expression of SEMA3D in a biological sample derived from a cancer tissue separated from an endometrial cancer patient.

(57) 要約: 子宮体がんであってリンパ節転移性のものと非転移のものとを、分子レベルで判別する手法の提供。子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料について、SEMA3Dの発現レベルを測定する工程を含む、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価する方法。

明 細 書

発明の名称：子宮体がんのリンパ節転移能の評価方法

技術分野

[0001] (関連出願及び参照による援用)

本出願は、2015年7月9日に出願した日本国特願2015-138104の優先権を主張するものであり、その全内容は本明細書において参照として援用される。

また、本明細書に引用される全ての文献は、あらゆる目的から全体として参照により援用される。いずれの文献の引用も、それが本発明に関する先行技術であることを認めるものと解釈されてはならない。

[0002] 本発明は、子宮体がんであってリンパ節転移性のものと非転移性のものとを分子レベルで判別する手法に関する。

背景技術

[0003] 子宮体がんは、進行期Ⅰ期の早期癌の再発率は約10%、5年生存率は90%を超え、予後は良好とされるがんの一つである。また、進行期Ⅰ・ⅠⅠ期の1180症例を対象としたGynecologic Oncology Group (GOG)の多数症例による検討では、頸部間質浸潤、腹腔細胞診陽性、付属器転移、リンパ節転移などのリスク因子がなければ術後の生存率は良好であることが示されている。

[0004] 早期子宮体がんの標準初回治療としては手術療法が第一選択となる。しかしながら、子宮体がんにおいて、リスク因子でありかつ進行期の判断基準でもあるリンパ節転移の有無を事前に検査することが難しい。そのため標準術式として単純子宮全摘術及び付属器切除術に加えてリンパ節郭清が実施され、摘出したリンパ節の病理診断を行って進行期を確定している。

[0005] この様な早期子宮体がんの5年生存率は85%－95%程度であり概ね良好である。しかしながら難治性のリンパ浮腫等、リンパ節郭清による副作用の問題があるだけでなく、病理診断は個々の診断医の形態学的判断に依存し

ており、また原理的に微小転移の見落としリスクがあるなど、確定診断の判断材料自体に潜在的な課題がある。実際にリンパ節郭清まで実施しているのにも関わらず、数%の患者は5年以内に再発しており、これらの予後不良患者に対する新たな再発予防や治療方法の開発が望まれている。

[0006] 一方で子宮体がんに関しても分子マーカー開発が盛んに行われ、CA125をはじめとする血中のコア蛋白関連分子がバイオマーカーとして診断に活用されている。CA125は病期の進行とともに検出値、陽性率が上昇するマーカーで、がんの悪化だけでなく治療効果の評価にも活用可能である。しかしながら、腫瘍量の少ない早期のがん患者では陽性率が低いため、再発予防を開始する診断材料には活用できない。

[0007] したがって、手術前の原発巣搔爬により得られた検体を測定すること、あるいは手術により摘出されたがん原発巣をすぐさま測定することによりリンパ節転移のリスクを判断することができれば、転移リスクの低い患者に対するリンパ節郭清を省略することができ、患者を難治性の合併症の恐れから解放することができる。そして、患者へのメリットの大きい効果的な個別化医療の実現が期待できる。

[0008] セマフォリン (Semaphorin) は、細胞間のシグナル伝達に関わるガイダンス分子として同定されたタンパク質群であり、血管や神経回路の形成や免疫細胞の調節に関わっている。セマフォリンはセマドメインに隣接する部分の配列の違いから7つのクラス (サブファミリー) に分けられており、セマフォリンクラス3は、血管内皮細胞及び腫瘍細胞の生存、増殖、アポトーシス、移行などの細胞プロセスの重要な調節因子として機能しており、細胞の形態や移動を制御することが認められている。このうちクラス3Dセマフォリン (SEMA3D) は、乳がん発生やこれに起因する腫瘍形成阻害及び血管形成を阻害することが報告されている (非特許文献1)。

しかしながら、SEMA3Dと子宮体がんとの関係や子宮体がんにおけるリンパ節転移との関係についてはこれまでに全く知られていない。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1: Kigel B, Varshavsky A, Kessler O, Neufeld G. Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells. PLoS ONE 2008;3: e3287

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、リンパ節転移性の子宮体がんとは転移性の子宮体がんでは異なるマーカー分子の特定と、当該マーカーの測定により子宮体がんではリンパ節転移性の子宮体がんとは転移性の子宮体がんを分子的に判別する手法を提供することに関する。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、子宮体がん患者のがん組織に発現するSEMA3Dについて、核酸レベルでの発現を測定し解析したところ、SEMA3Dの発現レベルが、リンパ節転移陽性群に対して陰性群の方が有意に高値であることを発見し、SEMA3Dがリンパ節転移性の子宮体がんとは転移性の子宮体がんを判別するためマーカーとして有用であることを見出した。また、当該SEMA3Dと、TACC2とを組み合わせて用いることにより、更に精度良くリンパ節転移性の子宮体がんとは転移性の子宮体がんを判別できることを見出した。

- [0012] すなわち、本発明は、以下の1)～13)に係るものである。

1) 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料について、SEMA3Dの発現レベルを測定する工程を含む、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価する方法。

2) 以下のa及びbの工程を含む、上記1)に記載の方法。

a) 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料中のSEMA3Dの発現レベルを測定する工程

b) SEMA3Dの発現レベルを、対照レベル又は閾値レベルと比較する工程

3) SEMA3Dの発現レベルが対照レベル又は閾値レベルよりも増加している場合に、リンパ節転移なし又はリンパ節転移能が低い又は予後が良好と判定する上記1)又は2)に記載の方法。

4) 生体試料中のSEMA3Dの発現レベルが、子宮体がん組織におけるSEMA3Dの転写産物又は翻訳産物の量である、上記1)～3)のいずれかに記載の方法。

5) 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料について、SEMA3D及びTACC2の発現レベルを測定する工程を含む、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価する方法。

6) 以下のc及びdの工程を含む、上記5)に記載の方法。

c) 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料中のSEMA3D及びTACC2の発現レベルを測定する工程

d) SEMA3D及びTACC2の発現レベルを、対照レベル又は閾値レベルと比較する工程

7) SEMA3Dの発現レベルをTACC2の発現レベルと比較したときの相対的な発現レベルが対照レベル又は閾値レベルよりも増加している場合に、リンパ節転移なし又はリンパ節転移能が低い又は予後が良好と判定する上記5)又は6)に記載の方法。

8) 生体試料中のSEMA3D及びTACC2の発現レベルが、子宮体がん組織におけるSEMA3D及びTACC2の転写産物又は翻訳産物の量である、上記5)～7)のいずれかに記載の方法。

9) SEMA3Dタンパク質と特異的に結合する抗体、又はSEMA3D遺伝子由来の核酸を特異的に認識するオリゴヌクレオチドを含有する、上記1)～4)のいずれかに記載の方法に用いる子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための検査用キット。

10) SEMA3Dタンパク質と特異的に結合する抗体及びTACC2タ

ンパク質と特異的に結合する抗体、又はSEMA3D遺伝子由来の核酸を特異的に認識するオリゴヌクレオチド及びTACC2遺伝子由来の核酸を特異的に認識するオリゴヌクレオチドを含有する、上記5)～8)に記載の方法に用いる子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための検査用キット。

11) 上記1)～8)のいずれかに記載の方法に用いる、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための装置。

12) SEMA3Dの、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するためのマーカーとしての使用。

13) SEMA3D及びTACC2の、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するためのマーカーとしての使用。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、リンパ節転移の可能性が皆無である子宮体がん検体を選択でき、これによって、不要なリンパ節郭清の回避を含めた手術方式に関する方針の示唆が得られる。リンパ節郭清を回避できれば、手術時間の短縮、手術侵襲の軽減、術後のリンパ浮腫などを防ぐことができる。また、本発明を用いることで、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後について、トレーニングを積んだ臨床検査技師のような専門家の主観によらなくても、それと同程度あるいはそれ以上の判定を客観的に行うことが可能になる。したがって、本発明は、患者検体の採取から解析まで患者の傍らで医療従事者が行う検査(POCT: Point of Care Testing)にも好適に利用できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]リンパ節転移陽性群及び陰性群におけるSEMA3DのRNA相対発現量。

[図2]SEMA3DのRNA相対発現量のROC曲線。縦軸：感度、横軸：偽陽性率(=1-特異度)。

[図3]リンパ節転移陽性群及び陰性群におけるTACC2(TACC2アイソ

フォームL又はS)のRNA相対発現量。

[図4]リンパ節転移陽性群及び陰性群におけるTACC2 (TACC2アイソフォームL又はS)のRNA発現量に対するSEMA3DのRNA相対発現量。

[図5]SEMA3DとTACC2 (TACC2アイソフォームL又はS)のRNA相対発現量の散布図。

[図6]SEMA3DとTACC2 (TACC2アイソフォームL又はS)の組み合わせ (SEMA3D-TACC2)のRNA相対発現量のROC曲線。
縦軸：感度、横軸：偽陽性率 (= 1 - 特異度)。

[図7] (A) 子宮体がん細胞のヘマトキシリンエオジン染色画像。(B) SEMA3D mRNAに対する蛍光in situ hybridization (FISH)画像、SEMA3DのmRNAを緑色で、DAPIによる核染色を青色で示す。(C) Bに対する陰性対照、DAPIによる核染色を青色で示す。(D) SEMA3Dタンパク質に対する免疫染色画像。(E) Dに対する陰性対照。(F) TACC2タンパク質に対する免疫染色画像。(G) Fに対する陰性対照。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明において、子宮体がんとは、子宮がんのうち子宮体部に発生する癌を意味する。子宮体がんは子宮腔側の上皮組織である子宮内膜に発生し、子宮内膜がんと同義である。子宮体がんは、がんの大きさ、広がり、浸潤や転移の状況から、日産婦臨床進行期分類 (2011年)によれば進行期がI~IVに分類されている。本発明において、評価の対象となる子宮体がんとしては、進行期によって特に制限されるものではないが、類内膜腺がんの高分化型腺がんであるのが好ましい。

[0016] 本発明において、子宮体がんにおけるリンパ節転移とは、子宮体がんが、骨盤内や大動脈周囲等のリンパ節において増殖することを意味する。

[0017] 本発明においてリンパ節転移の評価とは、子宮体がんのリンパ節への転移の有無を評価又は測定することを意味し、リンパ節転移能 (リンパ節転移性

) の評価とは、子宮体がんがリンパ節へ転移して増殖する能力を有するか否かを評価又は測定することを意味する。

[0018] 本発明において、予後の評価とは、子宮体がんの経過及び終末を予知することを意味する。子宮体がんにおける予後の良・不良はがんの転移の密接に関係し、がん細胞の転移における主要な経路の一つはリンパ節である。従って、リンパ節転移能の評価は子宮体がんの予後評価と密接な相関があり、リンパ節転移（能）がある場合は予後不良と評価でき、リンパ節転移（能）がない場合は予後良好と評価できる。

[0019] 本発明において用いられる生体試料は、評価対象となる子宮体がん患者から分離された術前或いは術中の子宮体がん組織である。当該生体試料は、測定に供するために適宜調製・処理される。例えば試料を核酸レベルでの測定に供する場合はRNA抽出液が調製され、試料をタンパク質レベルでの測定に供する場合はタンパク質抽出液が調製される。

生体試料からRNAを抽出する方法は、公知の任意の方法を用いることができる。具体的には、ライフテクノロジーズ社製Ambion RiboPureキット、キアゲン社製miRNeasy、同社製RNeasyが例示できるが、これらのうちキアゲン社製miRNeasyキットが好適に用いられる。

[0020] 本明細書において、「核酸」と云う用語は、DNA又はRNAを意味する。また、「DNA」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する。従って、DNAには、2本鎖のゲノムDNA、1本鎖のcDNAや該DNAと相補的な配列を有する1本鎖DNA等が包含される。また、「RNA」には、total RNA、mRNA、rRNA及び合成のRNAのいずれもが含まれる。

[0021] 後記実施例に示すとおり、子宮体部に限局した内膜腺癌G1及びG2症例（リンパ節転移陽性：7症例、リンパ節転移陰性：53症例）を対象とし、SEMA3Dの発現レベルを測定した結果、リンパ節転移陽性群に対して陰性群の方が有意に高値であり（図1）、感度及び特異度が共に高いことが示

された(図2)。したがって、SEMA3Dは子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するためのマーカーとなり得る。

SEMA3Dは、その遺伝子及びタンパク質が、NCBIに以下のように登録されている。

SEMA3D遺伝子：NM_152754 (配列番号1)

SEMA3Dタンパク質：NP_689967 (配列番号2)

[0022] また、SEMA3Dの発現レベルに加えて、TACC2の発現レベルを組み合わせて測定することにより、より精度の高い評価を行うことができる。

TACC2は、Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2 (UniProtKB/Swiss-Prot: TACC2#HUMAN (095359)) であるが、本発明においては、TACC2の遺伝子座に存在するTACC2アイソフォームを用いることもできる。ここで、TACC2アイソフォームとしては、例えば、ヒトリファレンスゲノム(GRCh37)の染色体番号10 (chr10)、開始位置123779316、終了位置123779341を転写開始領域(TSS)として持つ、配列番号3 (TACC2アイソフォームL) 又は4 (TACC2アイソフォームS) で示される塩基配列からなる遺伝子と、そこからコードされるタンパク質である、UniProtKB/Swiss-Prot: TACC2#HUMAN (095359, 配列番号5)、E9PBC6#HUMAN (E9PBC6, 配列番号6)、E7EMZ9#HUMAN (E7EMZ9, 配列番号7)のいずれか又はその一部が挙げられる。当該TACC2アイソフォームは子宮体がんのリンパ節転移を評価するためのマーカーとなり得ることを本出願人らは既に見出している(PCT/JP2015/050551)。

後記実施例に示すように、TACC2の遺伝子発現量は、リンパ節転移陰性群に対して陽性群の方が有意に高値であり(図3)、SEMA3DとTACC2の2つの遺伝子を組み合わせた相対発現量 $-\Delta Ct$ (SEMA3D - TACC2) >は、リンパ節転移陽性群において低発現、陰性群において高発現となる(図4)。また、リンパ節転移陽性群では $-\Delta Ct$ (SEMA3D) 低値、 $-\Delta Ct$ (TACC2) 高値であり、SEMA3DとTACC2の発現量は、リンパ節転移診断において負の相関が認められる(図5)

。さらにSEMA3DとTACC2を組み合わせた場合には、感度・特異度が、それぞれを単独で用いた場合よりさらに優れている（図6）。

したがって、SEMA3DとTACC2の組み合わせは、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するためのマーカーとして極めて有用である。

[0023] 本発明において、SEMA3D、又はSEMA3D及びTACC2（以下、これらを「マーカー」と称する）の発現レベルを測定する方法は、生体試料中のマーカーを確認可能な方法であれば良く、特に限定されない。すなわち、マーカーの発現レベルを検出又は定量できる方法であればよく、好適には、マーカーの核酸レベルでの検出又は定量、具体的には転写産物（mRNA）の検出又は定量、及びタンパク質レベルでの検出又は定量、具体的には翻訳産物（タンパク質）の検出又は定量が挙げられる。

[0024] 核酸レベルでの検出又は定量法としては、マーカー遺伝子由来の核酸にハイブリダイズするDNAをプライマーとしたPCR法、RT-PCR法、Smart Amp法、LAMP法等に代表される核酸増幅法や、マーカー遺伝子由来の核酸にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション法（DNAチップ、DNAマイクロアレイ、ドットプロットハイブリダイゼーション、スロットプロットハイブリダイゼーション、ノーザンプロットハイブリダイゼーション等）、塩基配列を決定する方法、又はこれらを組み合わせる方法から選ぶことができる。

[0025] ここで、測定に用いられるプローブ又はプライマー、すなわち、マーカー遺伝子由来の核酸を特異的に認識し増幅するためのプライマー、又はマーカー遺伝子由来の核酸を特異的に検出するためのプローブがこれに該当するが、これらは、前記配列番号1や配列番号3～4で示される塩基配列に基づいて設計することができる。ここで「特異的に認識する」とは、例えばノーザンプロット法において、実質的にマーカー遺伝子由来の核酸のみを検出できること、また例えばRT-PCR法において、実質的に当該核酸のみが生成される如く、当該検出物又は生成物が当該マーカー遺伝子由来の核酸である

と判断できることを意味する。

[0026] 具体的には、配列番号 1 や配列番号 3～4 で示される塩基配列からなる DNA 又はその相補鎖に相補的な一定数のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A : T (RNA の場合は U)、G : C の塩基対からなる 2 本鎖 DNA の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、当該一定数の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の同一性を有すればよい。塩基配列の同一性は、例えば、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST を用い、期待値 = 10 ; ギャップを許す ; フィルタリング = ON ; マッチスコア = 1 ; ミスマッチスコア = -3 の条件にて決定することができる。

[0027] 斯かるオリゴヌクレオチドは、プライマーとして用いる場合には、特異的なアニーリング及び鎖伸長ができればよく、通常、例えば 10 塩基以上、好ましくは 15 塩基以上、より好ましくは 20 塩基以上、かつ例えば 100 塩基以下、好ましくは 50 塩基以下、より好ましくは 35 塩基以下の鎖長を有するものが挙げられる。

[0028] また、プローブとして用いる場合には、特異的なハイブリダイゼーションができればよく、配列番号 1 や配列番号 3～4 で示される塩基配列からなる DNA (又はその相補鎖) の少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、例えば 10 塩基以上、好ましくは 15 塩基以上、かつ例えば 100 塩基以下、好ましくは 50 塩基以下、より好ましくは 25 塩基以下の鎖長のものが用いられる。

特異的なハイブリダイゼーションとは、実質的に目的の核酸のみにハイブリダイズすることを意味し、例えばストリンジентな条件下でハイブリダイズすることが挙げられる。ここで、ストリンジентな条件としては、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の洗浄条件、より厳しいハイブリダイズ条件としては「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程

度、さらに厳しいハイブリダイズ条件としては「0.1×SSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件を挙げることができる。ハイブリダイズ条件は、J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等に記載されている。

[0029] 尚、「オリゴヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができ、合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、通常標識したものが用いられる。標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例：³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C等）、酵素（例：β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等）等が挙げられる。

[0030] 例えば、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を利用する場合は、まずプローブDNAを放射性同位元素、蛍光物質等で標識し、次いで、得られた標識DNAを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした生体試料由来のRNAとハイブリダイズさせる。その後、形成された標識DNAとRNAとの二重鎖を、標識物に由来するシグナルを検出、測定する方法を用いることができる。

[0031] また、RT-PCR法を利用する場合は、まず生体試料由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製し、これを鋳型として標的のマーカの発現産物（転写産物）が増幅できるように調製した一对のプライマー（上記cDNA（-鎖）に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖）をこれとハイブリダイズさせる。その後、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する。増幅された二本鎖DNAの検出には、予めRI、蛍光物質等で標識しておいたプライマーを用いて上記PCRを行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法等を用いることができる。

[0032] また、DNAマイクロアレイを用いて検体中のmRNAの発現量を測定す

る場合は、支持体にマーカー遺伝子由来の核酸（cDNA又はDNA）の少なくとも1種を固定化したアレイを用い、mRNAから調製した標識化cDNA又はcRNAをマイクロアレイ上に結合させ、マイクロアレイ上の標識を検出することによって、mRNA発現量を測定することができる。

前記アレイに固定化される核酸としては、ストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸であればよく、例えば、マーカー遺伝子の全配列を有する核酸であってもよく、部分配列からなる核酸であってもよい。ここで、「部分配列」とは、少なくとも15～25塩基からなる核酸が挙げられる。

[0033] 尚、上記の測定において、マーカーの発現変動を比較する場合、予め発現量などの測定値を発現量が比較的安定している遺伝子との相対値として補正することができる。補正により、独立した複数の生体試料におけるマーカーの発現変動をより正確に比較することが可能となる。測定値の補正は、子宮体がんのリンパ節転移又はリンパ節転移能の有無において発現量が大きく変動しない遺伝子を内部標準として、マーカー遺伝子の発現量を補正することにより行うことができる。ここで、発現量が安定している遺伝子としては、一般的にハウスキーピング遺伝子であるGAPDHが用いられるが、本発明ではSUDS3遺伝子（NM_022491）が子宮体がん細胞でより安定した発現量を呈することを確認し、内部標準として用いた。

[0034] また、本発明において、マーカーの発現レベルの測定には、マーカーと生物学的活性が等価であるマーカーのホモログの発現レベルを測定することも包含される。

斯かるホモログ遺伝子としては、例えば配列番号1や配列番号3～4で示される塩基配列の相補配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、且つ配列番号2や配列番号5～7で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と生物学的活性が等価である、ポリヌクレオチドが挙げられる。

ここで、ストリンジентな条件としては、前記と同様に、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、より厳しくは「0.5×SSC、0.1%S

D S、4 2℃」、さらに厳しくは「0. 1×SSC、0. 1%SDS、6 5℃」を挙げることができる。このようなポリヌクレオチドとして、具体的には配列番号1や配列番号3～4で示される塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドを例示することができる。塩基配列の同一性は、前記BLAST等のアルゴリズムにより決定することができる。

[0035] マーカーのタンパク質レベルでの検出又は定量は、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体（抗SEMA3D抗体、抗TACC2抗体）を用いて、免疫学的に測定する方法が簡便であり好適である。免疫学的測定法としては、例えば、酵素免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学染色、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリー等が挙げられる。

例えば、ウェスタンブロット法によれば、一次抗体として上記の抗体を用いた後、二次抗体として放射性同位元素、蛍光物質又は酵素等で標識した一次抗体に結合する抗体を用いて、その一次抗体を標識し、これら標識物質由来のシグナルを放射線測定器、蛍光検出器等で測定することが行われる。

[0036] 尚、上記抗SEMA3D抗体や抗TACC2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い。また、抗体の一部（部分断片）又は抗体の一部を含むペプチドであって、抗体の抗原（マーカータンパク質）への結合作用を保持する抗体の断片を用いることもできる。斯かる抗体断片としては、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、一本鎖Fv(scFv)等が挙げられる。

[0037] これらの抗体は、公知の方法に従って製造することができる。具体的には、ポリクローナル抗体は、常法に従って大腸菌等で発現し精製したタンパク質を用いて、あるいは常法に従って当該タンパク質の部分ポリペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。

[0038] 一方、モノクローナル抗体は、常法に従って大腸菌等で発現し精製したタ

ンパク質又は該タンパク質の部分ポリペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞から得ることができる。また、モノクローナル抗体は、ファージディスプレイを用いて作製してもよい (Griffiths, A.D.; Duncan, A.R., Current Opinion in Biotechnology, Volume 9, Number 1, February 1998, p. 102-108(7))。

得られた抗体を酵素処理又は得られた抗体の配列情報を利用することにより、抗体の断片を得ることができる。

[0039] また、免疫組織化学分析法を行う場合には、患者から分離した生体試料を常法によりホルマリン固定をした後、パラフィンに包埋して組織片に薄切し、スライドガラスに貼り付けたものを切片試料として使用するのが好ましい。二次抗体としては、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼ等の酵素標識抗体を用いることができるが、ABC法やLSAB法等の三段階法、またDAKO社のEnVision検出システム等を用いて高感度な検出を行うのが好ましい。

[0040] 斯くして、子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料中のマーカの発現レベルが測定され、当該発現レベルに基づいて、リンパ節転移又はリンパ節転移能の有無、又は予後の悪さが評価される。具体的には、検出されたマーカの発現レベルを対照レベルと比較することによって評価される。

ここで、「対照レベル」とは、例えば、リンパ節転移がない子宮体がん患者から分離された子宮内膜がん組織若しくは子宮体がん患者から分離された正常組織におけるマーカの発現レベル、又は子宮体がんを発症していない健常人群におけるマーカの発現レベルが挙げられる。

例えば、対象患者のがん組織のSEMA3Dの発現レベルが、リンパ節転移がない子宮体がん患者から分離された子宮内膜がん組織、正常組織或いは健常人由来の組織における発現レベルに近い、当該発現レベルの範囲内に属する、或いは当該発現レベルより有意に高い場合には、当該患者の子宮体が

んはリンパ節転移がない又はリンパ節転移能が低い、又は予後が良好と評価できる。

また、対象患者のがん組織におけるTACC2の発現量に対するSEMA3Dの相対発現量が、リンパ節転移がない子宮体がん患者から分離された子宮内膜がん組織、正常組織或いは健常人由来の組織における発現レベルに近い、当該発現レベルの範囲内に属する、或いは当該発現レベルより有意に高い場合には、当該患者の子宮体がんはリンパ節転移がない又はリンパ節転移能が低い、又は予後が良好と評価できる。

[0041] また、本発明における子宮体がんのリンパ節転移又はリンパ節転移能の評価は、マーカーの発現レベルの上昇／減少により行うこともできる。この場合は、対照レベルとして、例えば正常組織、リンパ節転移がない子宮体がん患者から分離された子宮内膜がん組織或いは健常人の組織由来のマーカーの発現レベルに基いて、標準値（閾値レベル）を設定し、患者由来の生体試料におけるマーカーの発現レベルを標準値と比較する（例えば±2 S. D. の範囲を許容範囲とする）ことにより行うことができる。例えば、患者由来の生体試料におけるSEMA3Dの発現レベルが閾値レベルより高い場合に、当該患者の子宮体がんはリンパ節転移がない又はリンパ節転移能が低い、又は予後が良好と評価できる。また、患者由来の生体試料におけるTACC2の発現量に対するSEMA3Dの相対発現量が閾値レベルより高い場合に、当該患者の子宮体がんはリンパ節転移がない又はリンパ節転移能が低い、又は予後が良好と評価できる。

[0042] 以上より、本発明の方法に従い、必要に応じて他の方法（CT、MRIやPET-CTなど）との組み合わせで提供された情報に基づいて、リンパ節転移の可能性若しくはリンパ節転移能又は予後が判断される。リンパ節生検やリンパ節郭清を行う基準は医師の判断に委ねられるが、リンパ節転移の可能性がある又はリンパ節転移能が高いと判断された場合には、例えばリンパ節郭清を行うことができる。一方、リンパ節転移の可能性がない又はリンパ節転移能が低い、又は予後が良好と判断された場合には、リンパ節郭清を行

う必要はないと考えられる。

[0043] 本発明の子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための検査用キットは、患者から分離した生体試料におけるマーカーの発現レベルを測定するための検査試薬や測定デバイスを含むものである。具体的には、マーカーの転写産物（mRNA）と特異的に結合（ハイブリダイズ）するオリゴヌクレオチドを含む、核酸増幅、ハイブリダイゼーションのための試薬、或いは、本発明のマーカーの翻訳産物（タンパク質）を認識する抗体を含む免疫学的測定のための試薬や同抗体を固定した免疫測定デバイス等が挙げられる。当該キットに包含されるオリゴヌクレオチド、抗体等は、上述したとおり公知の方法により得ることができる。

また、当該検査用キットには、上記抗体や核酸の他、標識試薬、緩衝液、発色基質、二次抗体、ブロッキング剤や、試験に必要な器具やコントロール等を含むことができる。

[0044] 本発明の子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための装置は、本発明のマーカーの発現レベルを測定する手段と、取得したデータを評価又は判定する手段と、評価又は判定した結果を出力する手段とを備えたものであり、それぞれ公知の手段を用いて任意に構成することができる。

実施例

[0045] 実施例1 リンパ節転移性の子宮体がんと非転移の子宮体がんの判別

(1) 検体

子宮体部に限局した内膜腺癌G1及びG2症例で、術前に包括同意を得たリンパ節転移陽性患者7例と陰性患者53例を対象とし、原発巣摘出時に主要病変部を採取した。

摘出組織片は、摘出後速やかに液体窒素中で凍結し、2mLマイクロチューブに入れ-80℃で保存した。

[0046] (2) RT-qPCR法を用いたSEMA3D又はTACC2発現量の測定

1) RNAの抽出及び精製

保存組織片を2 mLサンプルチューブに50 mg以下に分割して入れ、ジルコニアビーズφ2.0とRNA抽出試薬(RNeasy(登録商標)Mini Kit(QIAGEN))を加えビーズ式細胞破碎装置(TOMY Micro Smash MS-100)を用いて13500 rpm、3分間ホモジネートした。次に、RNA抽出試薬のプロトコールに従ってRNAの抽出を行った。抽出RNAは、分光高度計(Thermo Nano Drop)による紫外線吸収(230、260、280 nm)を測定し、260/230比及び260/280比が1.9-2.2であることを確認した。

[0047] 2) cDNAの精製

1)で抽出した手術摘出検体由来の抽出RNA 2000 ng分から、Prime Script™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA)のプロトコールに従って、1st strand cDNAを合成した。

[0048] 3) RT-qPCRによるSEMA3D発現量又はTACC2アイソフォームL又はS(それぞれ配列番号3又は4)発現量の測定

Fast SYBR(登録商標)Green Master Mix(Applied Biosystems)のプロトコールに従って反応液を調製し、以下に示すプライマーを用いて、Life technologies 7500 Fast Real-Time PCR Systemを用いてRT-qPCRを行った。

a) SEMA3D primer(TAKARA Primer Set ID: HA239516)

b) SUDS3 primer(TAKARA Primer Set ID: HA237699)

c) TACC2アイソフォームL又はS primer:

Primer F: CCAgTTgCTgAAgggCAgAA(配列番号8)

Primer R: gCggACCTTggAgTCTgAg(配列番号9)

遺伝子発現量は、SEMA3D又はTACC2アイソフォームL又はSのCt値から対照遺伝子として定量したSUDS3のCt値を差し引き-1を掛けた $-\Delta Ct$ 値を算出し、unpaired student t-testでリンパ節転移陽性群と陰性群の統計学的有意差を評価した。対照遺伝子(ハウスキーピング遺伝子)として選択したSUDS3は、リンパ節転移陽

性群と陰性群の間での発現量の差が小さい遺伝子として確認されたものである。両遺伝子に対するこの定量試験においてPCR増幅効率がほぼ一定であることを確認した。

結果を図1及び図2に示す。

[0049] (3) 結果

1) SEMA3D発現量は、リンパ節転移陽性群に対して陰性群の方が有意に高値であった(図1、 $P=0.0065$)。さらにSEMA3Dの感度・特異度を算出してROC曲線を作成したところ、AUCは0.87であり、感度、特異度ともに高いバイオマーカーとなり得ることが示された(図2)。

以上より、SEMA3Dをマーカーとして、早期癌と進行癌及び組織悪性度に制限されることなく、リンパ節転移の有無を判定できると考えられる。

[0050] 2) TACC2アイソフォームL又はSの発現量は、リンパ節転移陰性群に対して陽性群の方が有意に高値であった(図3、 $P=0.0126$)。

3) SEMA3DとTACC2アイソフォームL又はSの2つの遺伝子を組み合わせた $-\Delta Ct$ (SEMA3D-TACC2アイソフォームL又はS)を検討した結果、リンパ節転移陽性群と陰性群において、相対発現量が有意に異なっていた(P 値 0.0004)。リンパ節転移陽性群は低発現、陰性群で高発現であった(図4)。また、リンパ節転移陽性群では $-\Delta Ct$ (SEMA3D)低値、 $-\Delta Ct$ (TACC2)高値であり、SEMA3DとTACC2アイソフォームL又はSの発現量は、リンパ節転移診断において負の相関を認めることが示された(図5)。

さらにSEMA3DとTACC2アイソフォームL又はSに関しての感度・特異度を算出しROC曲線を作成した。 $-\Delta Ct$ (SEMA3D)、 $-\Delta Ct$ (TACC2)の単遺伝子でのAUCは、0.87、0.78と共に高いものであったが、 $-\Delta Ct$ (SEMA3D-TACC2アイソフォームL又はS)のAUCは0.96とさらに感度・特異ともに優れていた(図6)。

以上より、SEMA3D及びTACC2を組み合わせたバイオマーカーは、早期癌と進行癌及び組織悪性度に制限されることなく、より精度よくリンパ節転移の有無の評価できることが示された。そこで、偽陰性率が0%となる極限（図6においてsensitivityが1.0、1-specificityが0.1以下になるポイント）にカットオフ値を設定した場合、子宮体がん群において癌組織を体内に残すリスクを回避しつつ、不要なリンパ節郭清の大半（92%）が省略可能になることが期待される。

[0051] 実施例2 SEMA3D又はTACC2の局在の検証

(1) SEMA3Dタンパク質又はTACC2タンパク質に対する免疫組織染色

1) 切片試料の調製

子宮体がん患者から分離した生体試料を常法によりホルマリン固定した後、パラフィンに包埋して3 μ mの組織片に薄切し、スライドガラスに貼り付けたものを切片試料として使用した。

[0052] 2) 免疫組織染色

切片について脱パラフィンを行った後、TACC2タンパク抗体反应用切片は、0.01M (pH6.0) クエン酸緩衝液中で120℃10分間オートクレーブし、抗原を賦活化した。SEMA3Dタンパク抗体反应用切片は、0.01M (pH6.0) クエン酸緩衝液中でMicro Wave 700Wで6分間加熱を2回行い、抗原を賦活化した。

それぞれの切片を3%過酸化水素溶液で10分間反応させペルオキシダーゼをブロックし、1次抗体反応は、10%ヤギ血清/PBSで2000倍に希釈したポリクローナルTACC2抗体 (MERCK MILLIPORE, #2397077) もしくはポリクローナルSEMA3D抗体 (SIGMA-ALDRICH, #HPA037522-100UL) と4℃で一晩インキュベートした。陰性対照実験では、ウサギIgG (DAKO, #1 X0936) を1次抗体として使用した。2次抗体反応は標識ストレプトアビジンビオチン法を用いて行い、抗原抗体複合体を3,3-ジアミノベンジジン溶液 (1mmol/L 3,3-ジアミノベンジジン、50mmol/L

PBS緩衝液 (pH 7.4)、0.006% H₂O₂) を用いて可視化した。核はヘマトキシリンエオジンで対比染色したのち検鏡観察を行った。ヘマトキシリンエオジン染色の結果を図7Aに、SEMA3Dタンパク質に対する免疫染色結果を図7Dに、Dに対する陰性対照を図7Eに、TACCタンパク質に対する免疫染色結果を図7Fに、Fに対する陰性対照を図7Gに示す。

[0053] (2) SEMA3D mRNAに対する蛍光 *in situ hybridization* (FISH)

1) FISHプローブ

SEMA3D mRNA (NM_152754) に対するFISHプローブは、Stellaris (登録商標) RNA FISHプローブデザイナー (Biosearch Technologies Inc., Petaluma, CA) (<https://www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer>) を用いて設計し、カルボキシフルオレセインで標識した。FISHプローブは、SEMA3D mRNAの全塩基配列に対して設計した25個のプローブを混合して使用した。使用したプローブを表1に示す。

[0054]

[表1]

プローブ名	プローブ配列(5' → 3')	配列番号
SEMA3D_1	caaagtgccagtgactggaa	配列番号10
SEMA3D_2	cacattctgtattggcatct	配列番号11
SEMA3D_3	tctgccagactccaaattat	配列番号12
SEMA3D_4	gatgtagtgggtgcatgag	配列番号13
SEMA3D_5	gccttaagaaaagtcgtcca	配列番号14
SEMA3D_6	tcataggtttgcttggaaca	配列番号15
SEMA3D_7	cagagtgccgctttatgaaa	配列番号16
SEMA3D_8	gtacaattgttgctgctca	配列番号17
SEMA3D_9	tctctggcaagacaacagtc	配列番号18
SEMA3D_10	gtcgccatattttacatctt	配列番号19
SEMA3D_11	gcttgttgggatttaggtat	配列番号20
SEMA3D_12	gggcttgcagtaatacatc	配列番号21
SEMA3D_13	ttgtatctcaaccgtgactc	配列番号22
SEMA3D_14	agattattgtcttgcctt	配列番号23
SEMA3D_15	taaacccttatttttagga	配列番号24
SEMA3D_16	tgcatggtaaattccatgct	配列番号25
SEMA3D_17	tttgtgtctgaccttatt	配列番号26
SEMA3D_18	gctacttataccctagtgaa	配列番号27
SEMA3D_19	ccatgcatattcagagggaa	配列番号28
SEMA3D_20	gccacagatcttgcattaag	配列番号29
SEMA3D_21	taattgcttgagctcgcta	配列番号30
SEMA3D_22	gggattctatttagcagcat	配列番号31
SEMA3D_23	attctccactactgttgtg	配列番号32
SEMA3D_24	agggcatctgacacatttg	配列番号33
SEMA3D_25	tgctaaccactcacaatacc	配列番号34

[0055] 2) 切片試料の調製

子宮体がん患者から分離した生体試料を常法によりホルマリン固定した後、パラフィンに包埋して4 μ mの組織片に薄切し、スライドガラスに貼り付けたものを切片試料として使用した。

[0056] 3) 蛍光 *in situ hybridization* (FISH)

プロトコール (www.biosearchtech.com/stellarisprotocols, Protocol for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue) に従って脱パラフィンを行った切片を、37°C 20分間10 μ g/mlのプロテイナーゼK (和

光純薬、#169-22761) を含有する 1 × P B S 中でインキュベートした。

陰性対照として使用したスライドに取り付けられた組織切片は、ハイブリダイゼーション工程前に 37℃ 30 分間 50 μg/ml のリボヌクレアーゼ A (ナカライテスク、#30100-31) で前処理し、切片中の mRNA を除去した。ハイブリダイゼーションは 125 nM のプローブを含むハイブリダイゼーション溶液と 37℃ で 16 時間反応させ、常法で DAPI による核染色を行った。AXIOVERT 200M 倒立広視野蛍光顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) により蛍光観察を行った。SEMA3D mRNA に対する蛍光 *in situ hybridization* の結果を図 7 B に、B に対する陰性対照を図 7 C に示す。図 7 B 中、SEMA3D mRNA を緑色で、図 7 B 及び C 中、DAPI による核染色を青色で示す。

[0057] (3) 結果

1) TACC2 タンパク質に対する免疫染色は子宮体がん細胞に一致して陽性を示し、具体的には子宮体がん細胞の細胞核に一致して陽性を呈した (図 7 F、G)。

2) SEMA3D タンパク質に対する免疫染色も子宮体がん細胞質に一致して陽性を示したが、同タンパク質は Ig ドメインを有し細胞外分泌されるため検体誤差が大きかった (図 7 D、E)。

3) SEMA3D 局在をさらに同定するために、SEMA3D mRNA に対するプローブを作成し、*in situ hybridization* (FISH) を行ったところ、SEMA3D mRNA の緑色蛍光は主に子宮体がん細胞の細胞質に一致して陽性を呈した (図 7 B、C)。

これらの結果により、同定されたマーカーは、検体に混在する間質細胞ではなく子宮体がん細胞のみで発現されることを実証した。

産業上の利用可能性

[0058] 本発明によれば、術前又は術中に採取した子宮内膜の原発巣を調べることで、子宮体がんのリンパ節転移有無の判断や発生の予測を、客観的に行うことができる。これにより、不要なリンパ節郭清を回避でき、術後リンパ浮腫

などの合併症を減らすことが可能となる。

すなわち、従来のリンパ節転移診断に用いられている画像評価や腫瘍マーカーでは早期癌や微小転移には適さないが、本発明のマーカー（SEMA3D、又はSEMA3D及びTACC2）は早期癌でもリンパ節転移を診断可能であり、微小転移も検出できる可能性がある。原発巣のマーカー遺伝子発現定量解析によるリンパ節転移診断が実現すれば、転移陰性群では、組織学的悪性度を考慮した上で後腹膜リンパ節郭清を省略できる症例を抽出することが可能となり、リンパ節郭清手術による合併症の回避や患者侵襲度の軽減が可能になると考えられる。

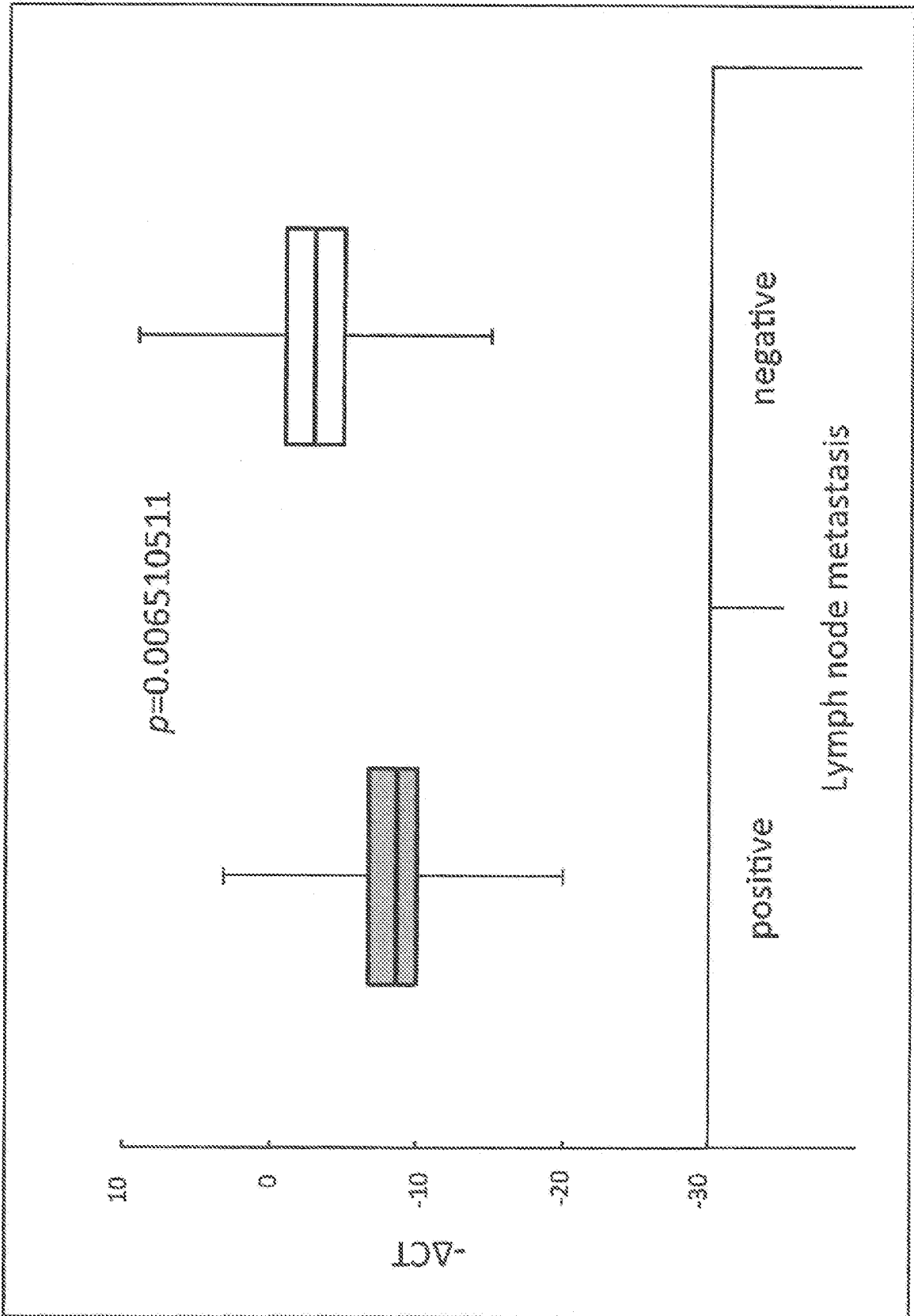
さらに、高リスクなどの理由により子宮体がん原発巣に加えリンパ節郭清も実施した結果であっても最終病理診断でリンパ節転移陰性の場合がある。この場合、リンパ節転移巣の摘出精度及び病理診断精度による偽陰性の可能性を否定できないが、SEMA3D低発現或いは（SEMA3D-TACC2）の低発現を認める場合はリンパ節転移のリスクが高いと判断し、根治療法及び再発予防としての術後治療の追加や経過観察間隔の設定などリスクに準じた個別医療を設定することが可能となるといえる。

請求の範囲

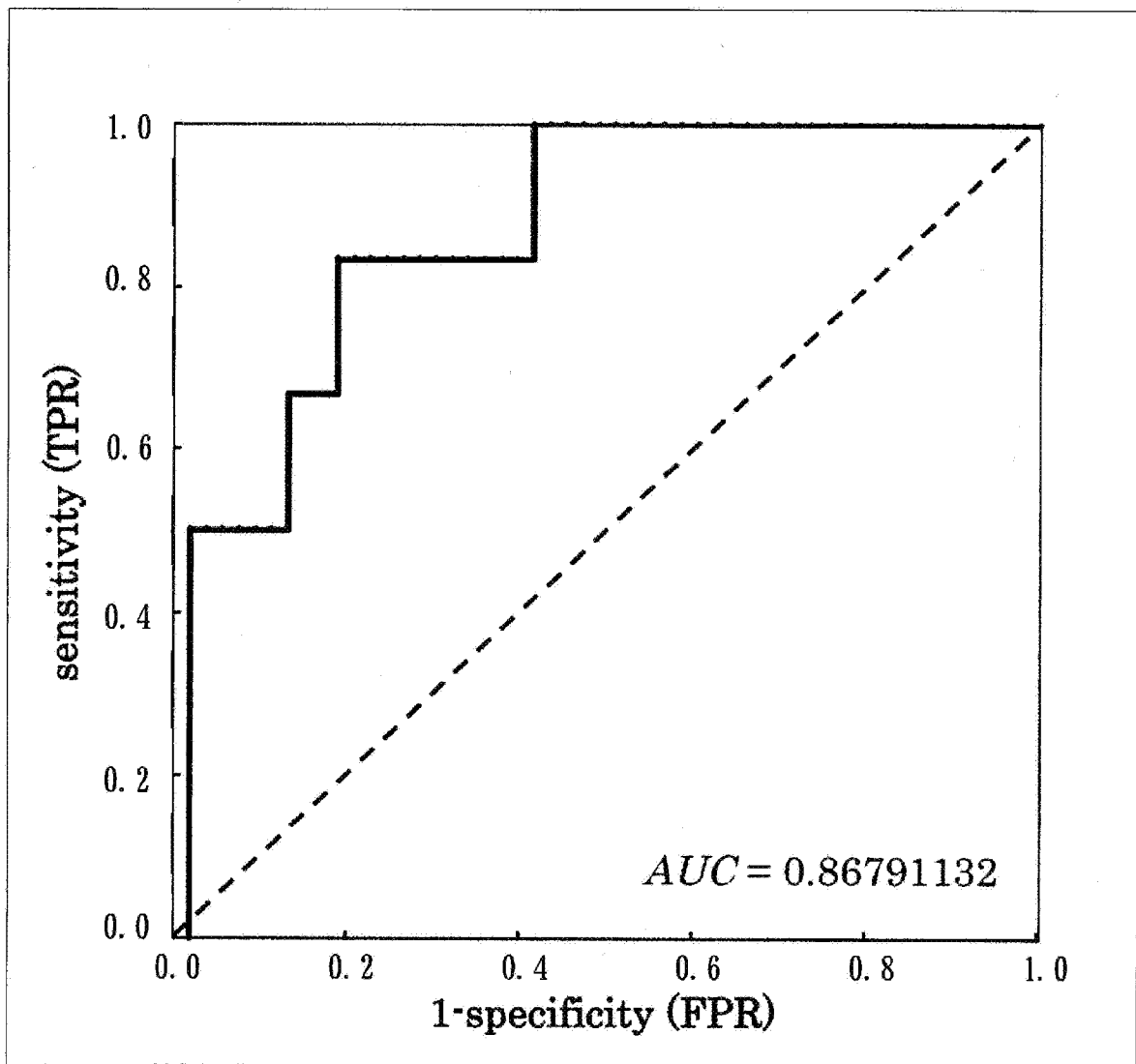
- [請求項1] 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料について、SEMA3Dの発現レベルを測定する工程を含む、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価する方法。
- [請求項2] 以下のa及びbの工程を含む、請求項1に記載の方法。
- a) 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料中のSEMA3Dの発現レベルを測定する工程
 - b) SEMA3Dの発現レベルを、対照レベル又は閾値レベルと比較する工程
- [請求項3] SEMA3Dの発現レベルが対照レベル又は閾値レベルよりも増加している場合に、リンパ節転移なし又はリンパ節転移能が低い又は予後が良好と判定する請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 生体試料中のSEMA3Dの発現レベルが、子宮体がん組織におけるSEMA3Dの転写産物又は翻訳産物の量である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料について、SEMA3D及びTACC2の発現レベルを測定する工程を含む、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価する方法。
- [請求項6] 以下のc及びdの工程を含む、請求項5に記載の方法。
- c) 子宮体がん患者から分離されたがん組織由来の生体試料中のSEMA3D及びTACC2の発現レベルを測定する工程
 - d) SEMA3D及びTACC2の発現レベルを、対照レベル又は閾値レベルと比較する工程
- [請求項7] SEMA3Dの発現レベルをTACC2の発現レベルと比較したときの相対的な発現レベルが対照レベル又は閾値レベルよりも増加している場合に、リンパ節転移なし又はリンパ節転移能が低い又は予後が良好と判定する請求項5又は6に記載の方法。

- [請求項8] 生体試料中のSEMA3D及びTACC2の発現レベルが、子宮体がん組織におけるSEMA3D及びTACC2の転写産物又は翻訳産物の量である、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] SEMA3Dタンパク質と特異的に結合する抗体、又はSEMA3D遺伝子由来の核酸を特異的に認識するオリゴヌクレオチドを含有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法に用いる子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための検査用キット。
- [請求項10] SEMA3Dタンパク質と特異的に結合する抗体及びTACC2タンパク質と特異的に結合する抗体、又はSEMA3D遺伝子由来の核酸を特異的に認識するオリゴヌクレオチド及びTACC2遺伝子由来の核酸を特異的に認識するオリゴヌクレオチドを含有する、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法に用いる子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための検査用キット。
- [請求項11] 請求項1～8のいずれか1項に記載の方法に用いる、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するための装置。
- [請求項12] SEMA3Dの、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するためのマーカーとしての使用。
- [請求項13] SEMA3D及びTACC2の、子宮体がんのリンパ節転移若しくはリンパ節転移能又は予後を評価するためのマーカーとしての使用。

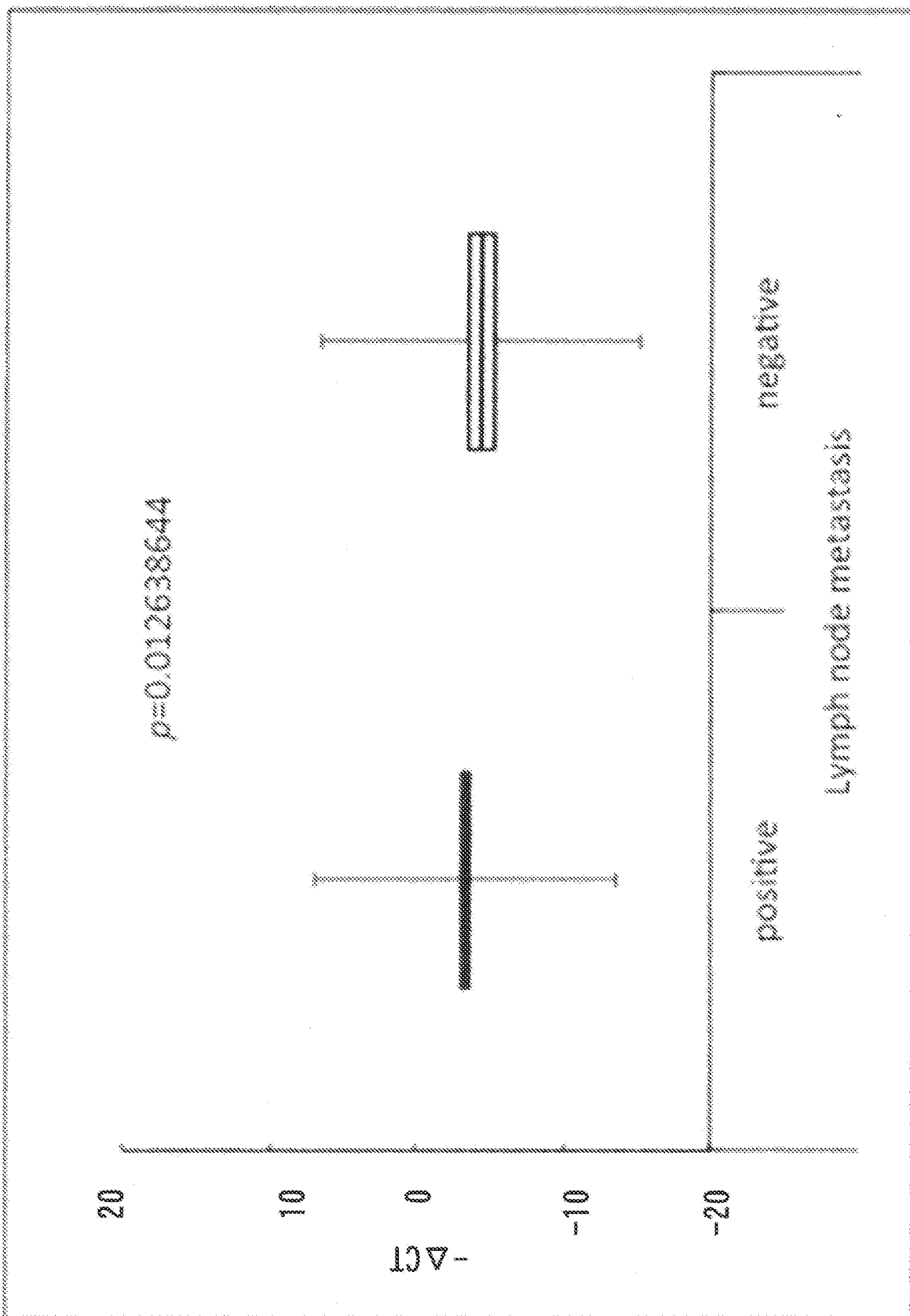
[図1]



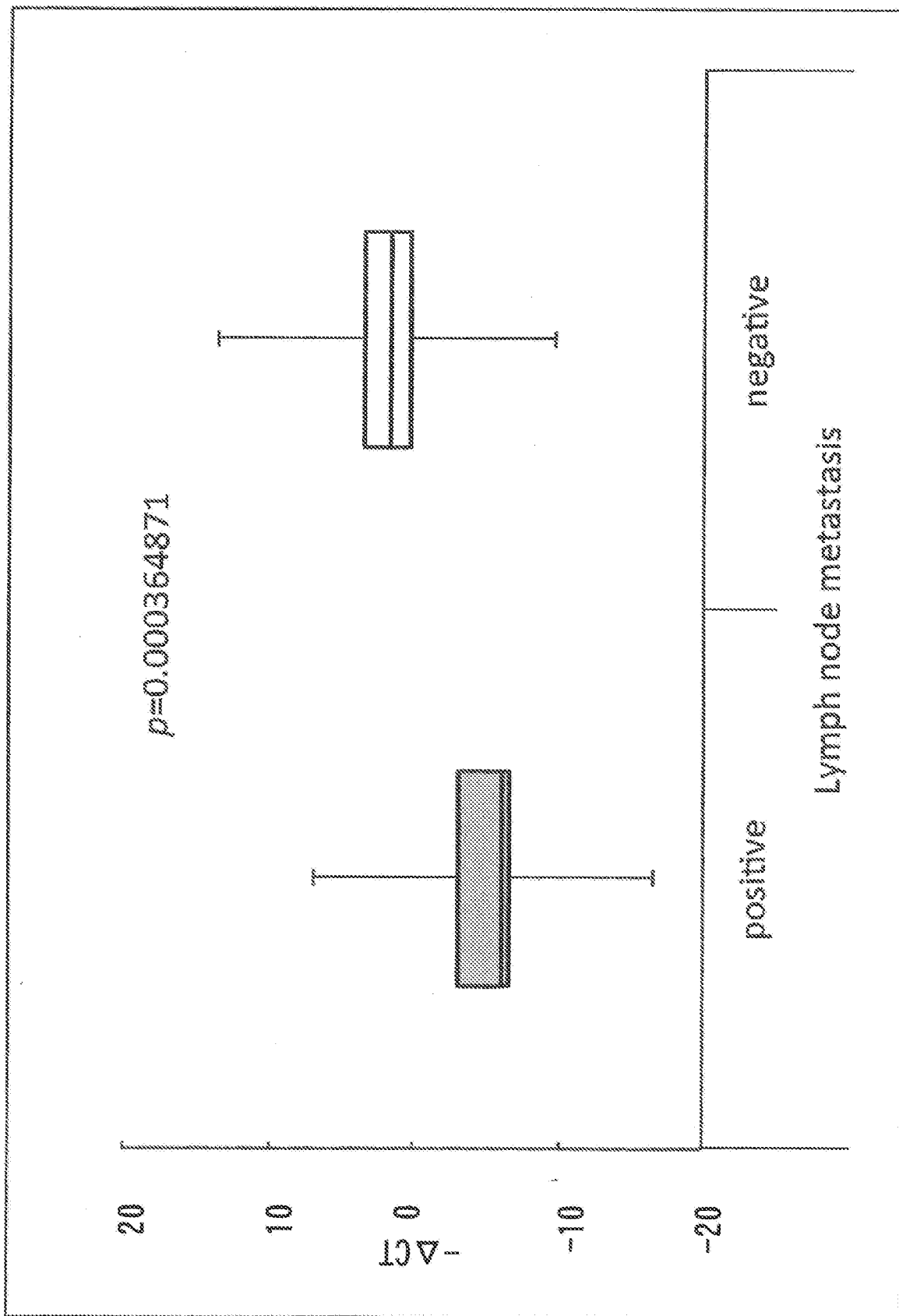
[図2]



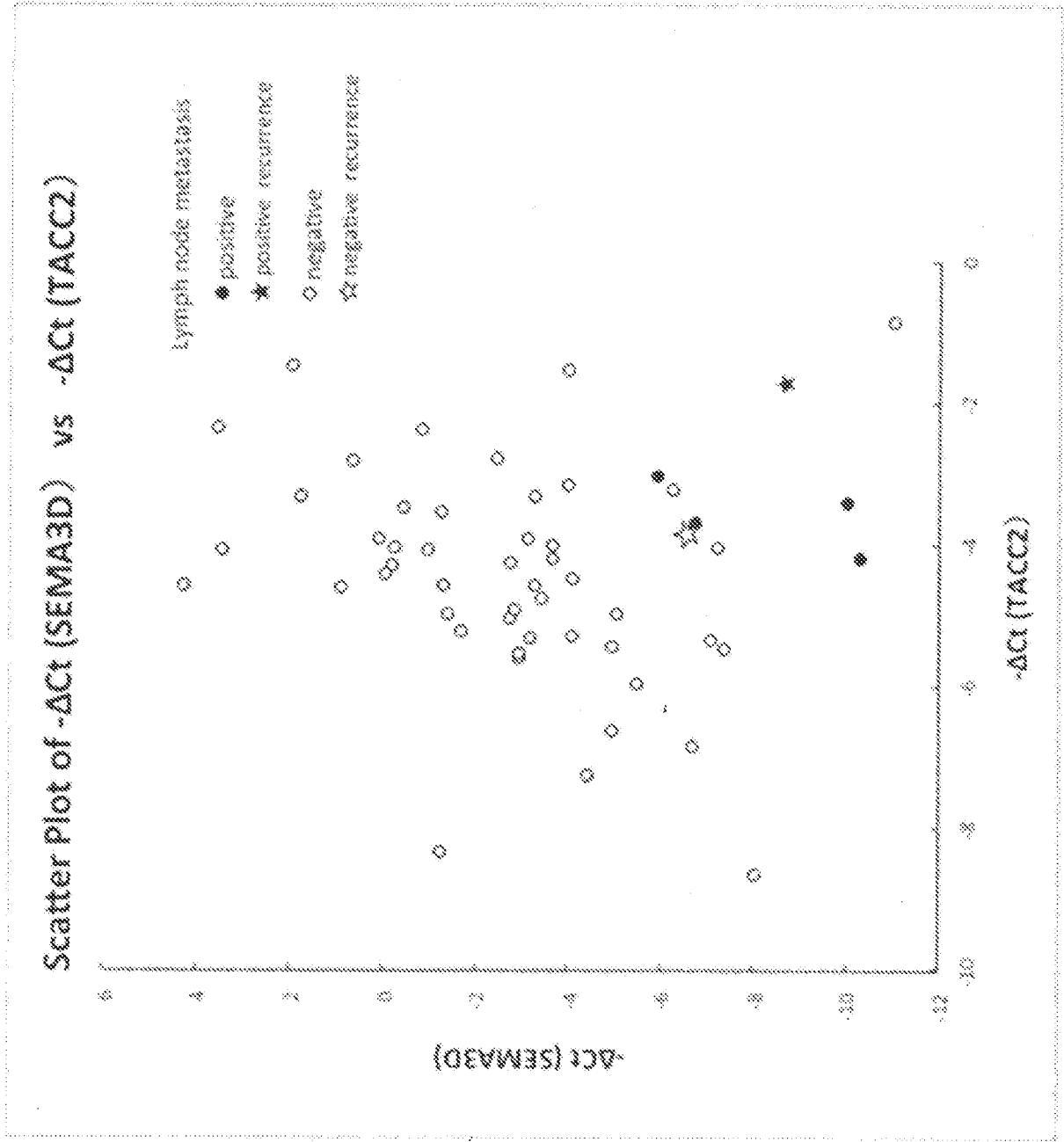
[図3]



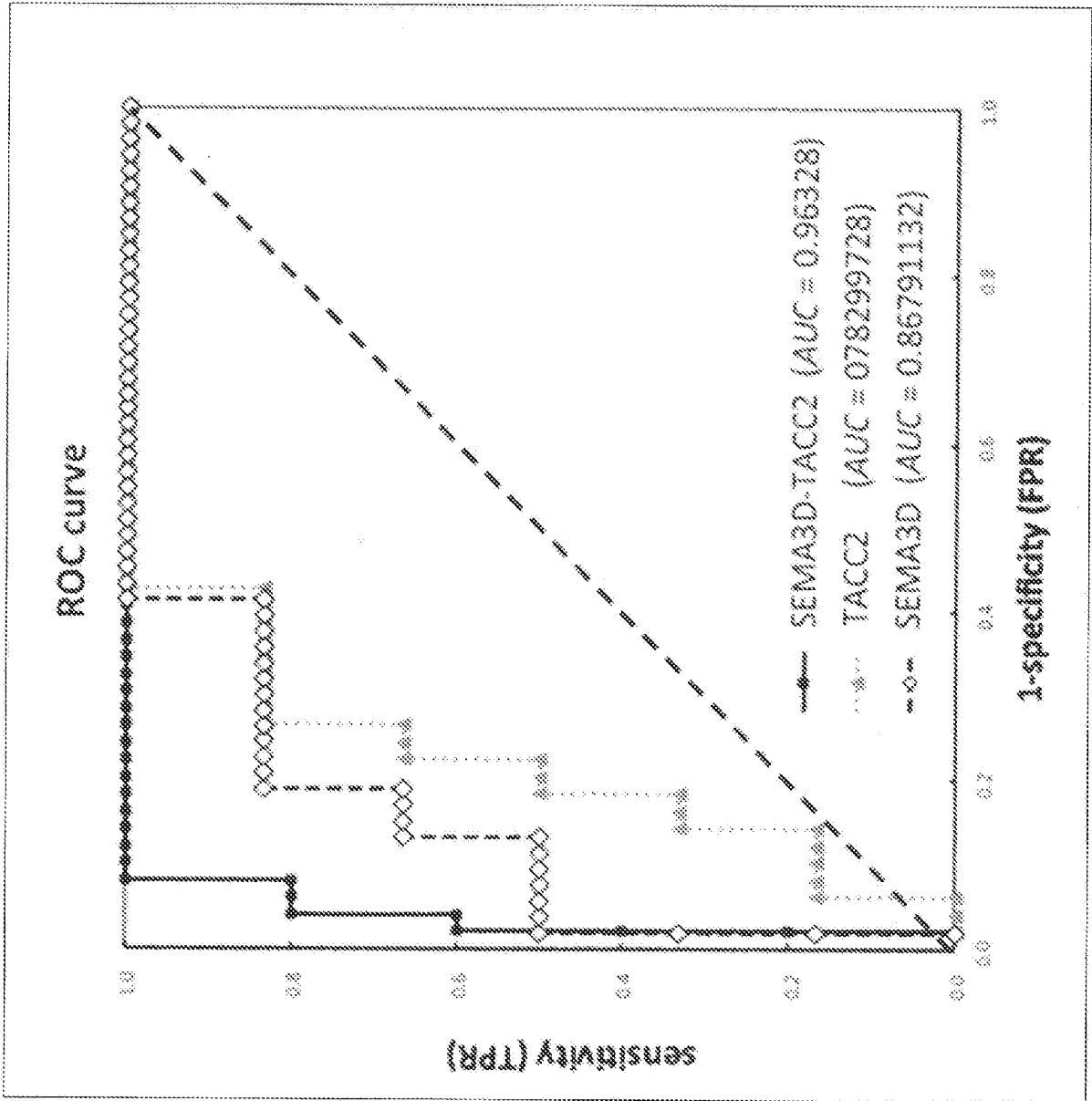
[図4]



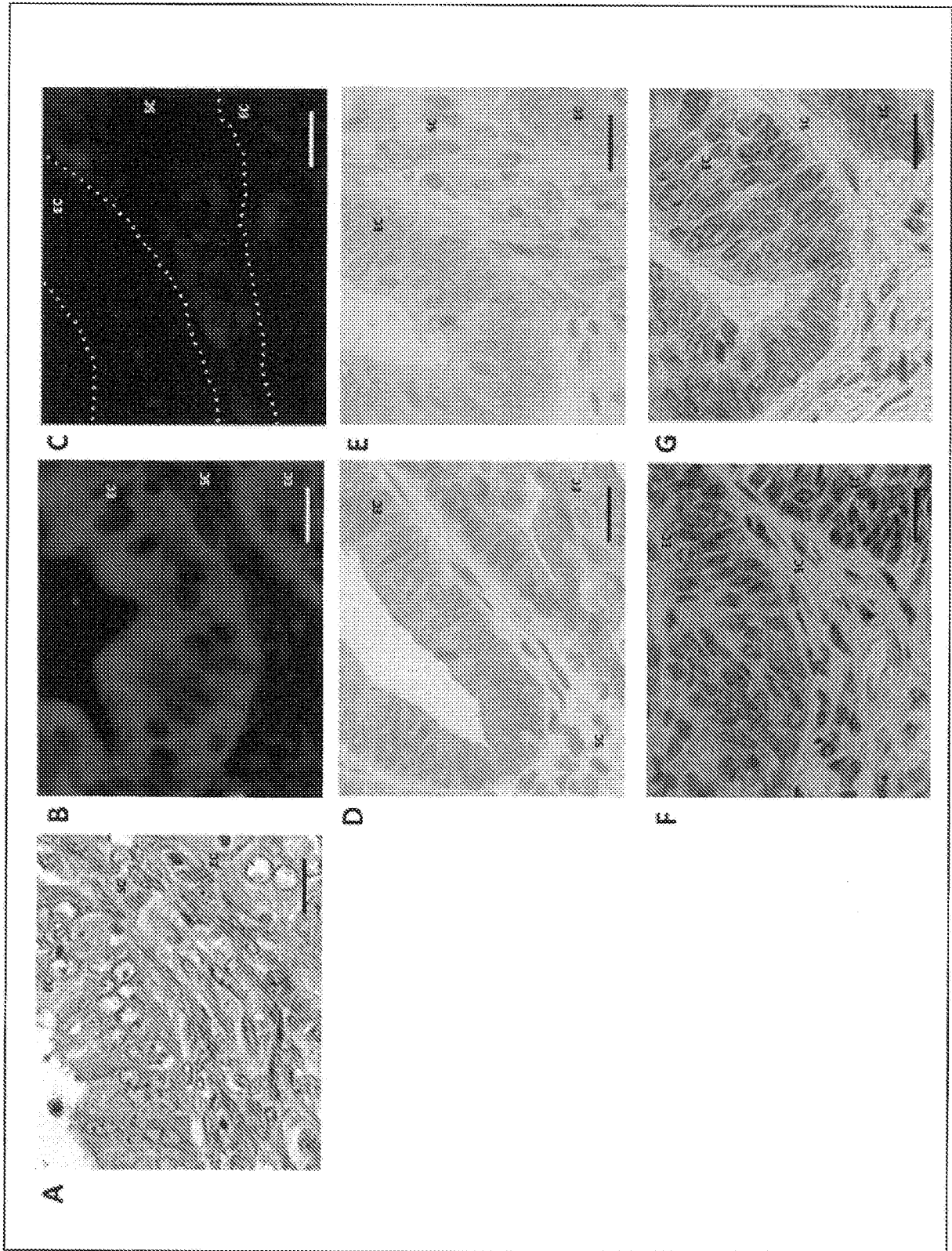
[5]



[図6]



[7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(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)

G01N33/53, C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/574

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Satoshi OHIRA et al., "Seijo Shikyu Naimaku to Naimakugan ni Okeru Semaphorin Hatsugen to sono VEGF Oyobi Neuropilin Hatsugen tono Hikaku", Acta Obstetrica et Gynaecologia Japonica, 2004, vol.56, no.2, page 357	1-13
A	Satoko SUDO et al., "Shikyutaigan Lymph-setsu Ten'i Biomarker no Tansaku", The Journal of the Japan Society of Gynecologic Oncology, 2011, vol.29, no.3, page 500	1-13
A	FISHMAN, A. M. D. et al., Detection of micrometastasis by cytokeratin-20 (reverse transcription polymerase chain reaction) in lymph nodes of patients with endometrial cancer, Gynecologic Oncology, 2000, Vol. 77, pp. 399-404	1-13

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
04 August 2016 (04.08.16)

Date of mailing of the international search report
16 August 2016 (16.08.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070334

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TROVIK J. et al., Stathmin overexpression identifies high-risk patients and lymph node metastasis in endometrial cancer, Clinical Cancer Research, 2011, Vol. 17, No. 10, pp. 3368-3377	1-13
P,A	WO 2015/105190 A1 (Juntendo Educational Foundation), 16 July 2015 (16.07.2015), (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(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（IPC））

Int.Cl. G01N33/53, C12M1/00, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/574

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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）

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	大平哲史 ほか, 正常子宮内膜と内膜癌における Semaphorin 発現とその VEGF および Neuropilin 発現との比較, 日本産科婦人科学会雑誌, 2004, Vol. 56, No. 2, pp. 357	1-13
A	首藤聡子 ほか, 子宮体癌リンパ節転移バイオマーカーの探索, 日本婦人科腫瘍学会雑誌, 2011, Vol. 29, No. 3, p. 500	1-13

☑ 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

04.08.2016

国際調査報告の発送日

16.08.2016

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁（ISA/J P）
 郵便番号100-8915
 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）

飯室 里美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

6220

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	FISHMAN, A. M. D. et al., Detection of micrometastasis by cytokeratin-20 (reverse transcription polymerase chain reaction) in lymph nodes of patients with endometrial cancer, Gynecologic Oncology, 2000, Vol. 77, pp. 399-404	1-13
A	TROVIK J. et al., Stathmin overexpression identifies high-risk patients and lymph node metastasis in endometrial cancer, Clinical Cancer Research, 2011, Vol. 17, No. 10, pp. 3368-3377	1-13
P, A	WO 2015/105190 A1 (学校法人順天堂) 2015.07.16, (ファミリーなし)	1-13