

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6630766号  
(P6630766)

(45) 発行日 令和2年1月15日(2020.1.15)

(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>GO 1 N</b>	<b>33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/574	A
<b>GO 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53	M
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/11</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/11	Z
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/6813</b>	<b>(2018.01)</b>	C 1 2 Q	1/6813	Z
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/6886</b>	<b>(2018.01)</b>	C 1 2 Q	1/6886	Z

請求項の数 21 (全 79 頁)

(21) 出願番号	特願2018-74354 (P2018-74354)
(22) 出願日	平成30年4月9日(2018.4.9)
(62) 分割の表示	特願2016-518429 (P2016-518429) の分割
原出願日	平成27年9月18日(2015.9.18)
(65) 公開番号	特開2018-141795 (P2018-141795A)
(43) 公開日	平成30年9月13日(2018.9.13)
審査請求日	平成30年4月9日(2018.4.9)
(31) 優先権主張番号	10-2014-0140695
(32) 優先日	平成26年10月17日(2014.10.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)
(31) 優先権主張番号	10-2014-0140714
(32) 優先日	平成26年10月17日(2014.10.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)

(73) 特許権者 514005836  
エスケー テレコム カンパニー リミテ  
ッド  
SK TELECOM CO., LTD  
.  
大韓民国 04539 ソウル、チュング  
、ウルチロ、65 (ウルチロ 2ーガ)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓癌診断用組成物およびこれを用いた膵臓癌診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象の試料での、LRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1) を含む膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) マーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む、高危険群IPMNの選別診断用組成物であって、

前記試料が対象から分離された血液、血清または血漿である、高危険群IPMNの選別診断用組成物。

【請求項2】

前記組成物は、低危険群IPMNと区別して高危険群IPMNを選別するものである請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記IPMNマーカーは、CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、TTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択された1種以上のマーカーを追加的に含むものである請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記IPMNマーカーは、TTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択された1種マーカーとLRG1を含むマーカーである請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

10

20

前記IPMNマーカーは、TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択された2種のマーカーとLRG1を含む組み合わせマーカーである請求項3に記載の組成物。

【請求項6】

対象の試料での、

CLU(Clusterin preproprotein);および  
LRG1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein  
1、LRG1)、CA19-9(carbohydrate antigen 19-9  
)、TTR(Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA  
)、C1R(Complement C1r subcomponent precursor)およびKLKB1(Plasma Kallikrein protein;)からなる群より選択された一つ以上のマーカーを含むIPMNマーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む、高危険群IPMNの選別診断用組成物であって、

10

前記試料が対象から分離された血液、血清または血漿である、  
高危険群IPMNの選別診断用組成物。

【請求項7】

前記IPMNマーカーは、LRG1、CA19-9、TTR、C1RおよびKLKB1からなる群より選択された1種マーカーとCLUを含む組み合わせマーカーである請求項6に記載の組成物。

20

【請求項8】

前記IPMNマーカーは、LRG1、CA19-9、TTR、C1RおよびKLKB1からなる群より選択された2種のマーカーとCLUを含む組み合わせマーカーである請求項6に記載の組成物。

【請求項9】

前記LRG1蛋白質はNCPI Accession No:NP\_443204.1のアミノ酸配列を含み、前記TTR蛋白質はNCPI Accession No:NP\_000362.1のアミノ酸配列を含み、前記C1R蛋白質はNCPI Accession No:NP\_001724.3のアミノ酸配列を含み、前記CLU蛋白質はNCPI Accession No:NP\_001822.3のアミノ酸配列を含み、前記KLKB1蛋白質はNCPI Accession No:NP\_000883.2アミノ酸配列を含む請求項1乃至8のうちのいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項10】

前記蛋白質の発現水準を測定する製剤が、前記蛋白質に特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガンド、PNA(peptide nucleic acid)またはアプタマー(aptamer)を含む請求項1または6に記載の組成物。

【請求項11】

前記mRNAの発現水準を測定する製剤が、前記遺伝子に特異的に結合するプライマー、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドを含む請求項1または6に記載の組成物。

【請求項12】

請求項1乃至11のうちのいずれか一項による組成物を含む、高危険群IPMNの選別診断用キット。

40

【請求項13】

前記キットが、RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)キット、DNAチップキット、ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)キット、蛋白質チップキット、ラピッド(rapid)キットまたはMRM(Multiple reaction monitoring)キットである請求項12に記載の高危険群IPMNの選別診断用キット。

【請求項14】

50

対象の試料に対して、請求項 1 乃至 11 のうちのいずれか一項による高危険群 I P M N の選別診断用組成物による膵管内乳頭粘液性腫瘍 ( I n t r a d u c t a l p a p i l l a r y m u c i n o u s n e o p l a s m 、 I P M N ) マーカー蛋白質の発現水準またはこれを暗号化する遺伝子の m R N A 発現水準をそれぞれ測定する段階、および

前記対象の高危険 I P M N 有無を決定するために、前記測定されたマーカーの発現水準を、対照群マーカーの発現水準と比較する段階を含み、

前記試料が対象から分離された血液、血清または血漿である、  
高危険群 I P M N の診断の情報を提供する方法。

【請求項 15】

前記対象は、外科的切除術によって I P M N 組織が除去された患者である請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記対照群は、正常群、I P M N と膵管腺癌腫を除いた膵臓疾患を有する患者、または低危険 I P M N を有する対象である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記高危険群 I P M N は、高異形成 ( H i g h g r a d e d y s p l a s i a ) と侵襲型 ( i n v a s i v e t y p e ) の I P M N を含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記高危険 I P M N は、I P M N 由来膵管腺癌腫を含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記マーカーの発現水準測定が、該当蛋白質にそれぞれ特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガンド、P N A ( p e p t i d e n u c l e i c a c i d ) またはアプタマー ( a p t a m e r ) を用いることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記マーカーの発現水準測定または比較が、

蛋白質チップ分析、免疫測定法、リガンドバインディングアッセイ、M A L D I - T O F ( M a t r i x A s s i s t e d L a s e r D e s o r p t i o n / I o n i z a t i o n T i m e o f F l i g h t M a s s S p e c t r o m e t r y ) 分析、S E L D I - T O F ( S u l f a c e E n h a n c e d L a s e r D e s o r p t i o n / I o n i z a t i o n T i m e o f F l i g h t M a s s S p e c t r o m e t r y ) 分析、放射免疫測定、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体結合分析法、二次元電気泳動分析、液体クロマトグラフィー - 質量分析 ( l i q u i d c h r o m a t o g r a p h y - M a s s S p e c t r o m e t r y 、 L C - M S ) 、 L C - M S / M S ( l i q u i d c h r o m a t o g r a p h y - M a s s S p e c t r o m e t r y / M a s s S p e c t r o m e t r y ) 、 ウエスタンブロット法および E L I S A ( E n z y m e l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y ) からなる群より選択されるものを用いて行われることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 21】

前記 m R N A 発現水準測定が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R ) 、競合的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ ( R P A ) 、ノーザンブロットングまたは D N A チップによって行われることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膵臓癌の発病または発病可能性の判断に用いることができる、特定マーカー遺伝子の蛋白質発現水準または m R N A の発現水準を測定する製剤を含む膵臓癌診断用組成物とキット、およびこれを用いた膵臓癌診断方法に関するものである。

50

## 【背景技術】

## 【0002】

現代人の主要疾患のうち、癌の治療方法と診断方法に関する研究は発病頻度の高い肺ガン、肝癌、胃ガンなどを中心に比較的活発に行われている。しかし、発病頻度の低い食道癌、大腸癌、膵臓癌などに対する研究は相対的に低調であることが実情である。

## 【0003】

特に、膵臓癌は、初期には別に症状を感じなく、全身転移が起こった後に痛みと体重減少などの症状が現れることが普通であり、さらに治癒率が低い方であるので、定期的な診断が非常に重要である。臨床症状は大部分が徐々に発病し、虚弱になりやすく、食欲減退、体重減少は最もありふれた症状である。膵臓癌は5年生存率が1 - 4%、生存期間中央値5ヶ月に達する致命的な癌であって、人体の癌のうちの最も不良な予後を示している。また、80 - 90%患者において診断時に完治を期待する根治的切除が不可能な状態で発見されるため予後が不良であり、治療は主に抗癌療法に依存しているので、どんな人体癌よりも早期診断法開発が切実に要望されている。

10

## 【0004】

現在まで膵臓癌に効果があると知られた5 - フルオロウラシル、ゲムシタピン (gemcitabine)、タルセバ (tarceva) を含むいくつかの抗ガン剤の治療効果は極めて低調であり、抗ガン治療に対する反応率は15%内外に過ぎず、このような事実は、膵臓癌患者の予後を向上させるためにはより効果的な早期診断法および治療法の開発が切実に要求されていることを示唆する。致命的な膵臓癌に進行する前段階である膵臓癌の前駆病変に対する適切な診断と治療が膵臓癌治療成績向上に非常に重要である。

20

## 【0005】

膵臓癌または膵臓癌前駆病変の診断は、血液検査 (CA19 - 9)、胃、十二指腸のX線造影検査、皮膚および肝を通じた胆道撮影と逆行性内視鏡胆道撮影術が使用されている。これら方法によって疾病の病変を発見したが、最近では超音波撮影およびコンピュータ断層撮影が最も多く使用される。より精密な組織検査を行って比較的正確な検査結果を得ることもできる。しかし、前記診断方法は、正確度が落ちたり、患者の苦痛が伴われるなどその遂行方法が非常に不便であるため被検者らに敬遠されているのが実情である。したがって、簡便で速かに膵臓癌または膵臓癌前駆病変を診断することができる検査方法の開発が要求されてきた。

30

## 【0006】

最近、健康検診や膵臓以外の他の疾患の診断のために腹部超音波 (abdominal ultrasound、US)、腹部コンピュータ断層撮影 (computed tomography、CT)、磁気共鳴画像診断 (magnetic resonance imaging、MRI) などの画像診断検査が多く施行されることにより膵臓の悪性病変が頻繁に発見される。画像診断において嚢胞性病変の形態を示す病変は病理所見では良性病変から前癌病変 (pre-malignant lesion) と悪性病変に至るまで多様な疾患を含んでいるので臨床的に重要である。

## 【0007】

しかし、CT、MRIのような画像診断検査の発展にもかかわらず良性病変から前癌、嚢胞性病変まで多様な病理所見を有する膵臓の嚢胞性病変を手術前に正確に鑑別することはまだ難しいのが実情である。したがって、臨床的には、膵臓の嚢胞性病変が悪性化する可能性がある腫瘍病変であるか否か、そして悪性化可能性があればまだ前癌段階の病変であるか或いはすでに悪性病変を伴っているか鑑別することが重要である。

40

## 【0008】

大韓民国特許第10 - 0819122号および大韓民国公開特許第2012 - 0082372号には、マトリリン (matrilin)、トランスサイレチン (transthyretin)、ストラチフィン (stratifin) などを含む多様な膵臓癌マーカーを用いた技術を開示している。また、大韓民国公開特許第2009 - 0003308号は個体の血液試料からREG4蛋白質の発現量を検出して膵臓癌を診断する方法を開示し

50

ており、大韓民国出願公開第2012-0009781号は個体の膵臓癌診断に必要な情報を提供するために個体から分離した癌組織中のXIST RNAの発現量を測定する分析方法を、大韓民国出願公開第2007-0119250号は正常ヒトの膵臓組織と比較してヒト膵臓癌組織において異なる形態で発現された新規遺伝子LBF313ファミリーを開示しており、米国出願公開第2011/0294136号はケラチン8蛋白質などのバイオマーカーを用いた膵臓癌診断方法を開示している。しかし、マーカーごとにその診断効率および正確性において大きな差を示すので、効果がさらに優れたマーカーを発掘しこれを用いた診断方法を開発する必要性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

本発明の目的は、膵臓癌の発病、発病可能性または危険度を簡便に早期診断することができる膵臓癌診断マーカーを提供することにある。

【0010】

本発明の目的は、膵臓癌の発病、発病可能性または危険度を簡便に早期診断することができる膵臓癌診断用組成物を提供することである。

【0011】

本発明の他の目的は、前記組成物を含む膵臓癌診断用キットを提供することである。

【0012】

本発明の他の目的は、前記診断用組成物またはキットを用いて膵臓癌を診断する方法または膵臓癌の診断のための情報を提供する方法を提供することである。

20

【0013】

本発明の追加の目的は、前記診断用組成物またはキットを用いて、探知対象において膵臓癌の存否または悪性度を決定する方法を提供することである。

【0014】

本発明の目的は、膵臓癌の発病、発病可能性または危険度を簡便に早期診断することができる膵臓癌診断マーカーの膵臓癌診断用途を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

前記目的を達成するために、本発明は、膵臓癌診断用マーカー遺伝子の蛋白質の発現水準またはmRNAの発現水準を測定する製剤を含む膵臓癌または前駆病変の診断用組成物であって、前記診断用組成物を含む膵臓癌の診断用キット、および膵臓癌を有するか疑われる対象での膵臓癌の存否を決定する方法または悪性度を決定する方法を提供する。前記膵臓癌診断用組成物またはキットは分析方法に適した一種類またはそれ以上の追加成分、溶液または装置をさらに含むことができる。

30

【0016】

本発明のまた他の実施形態において、前記膵臓癌診断は、正常群と区別して膵臓癌を選別的に検出するか、多様な癌のうちの膵臓癌を選別的に検出するか、CA19-9の数値が37U/ml未満である膵臓癌を検出することができる。具体的に、前記膵臓癌診断用組成物またはキットは、正常群と膵臓癌患者群を区別して膵臓癌群を検出または診断するだけでなく、比較的初期診断が難しい1期および2期の膵臓癌(PDAC)を区別して検出または診断することができ、癌以外の多様な膵臓関連疾患、例えば、膵臓炎および胆嚢炎と区別して膵臓癌を選別することができ、他の種類の癌、例えば乳癌、大腸癌および/または甲状腺癌などと区別して膵臓癌を選別的に検出または診断することができ、知られた膵臓癌診断マーカー、例えばCA19-9の数値が37U/ml未満である膵臓癌をCA19-9の数値が37U/ml未満である正常、膵臓炎および胆嚢炎などの膵臓関連疾患と区別されるように検出することができる。

40

【0017】

前記マーカー遺伝子は、少なくとも3種類またはそれ以上のマーカー遺伝子の組み合わせであって、具体的に、

50

(a) CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9);  
(b) LRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1); および  
(c) TTR (Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA)、C1R (Complement C1r subcomponent precursor)、CLU (Clusterin preproprotein) および KLB1 (Plasma Kallikrein protein) からなる群より選択された一つ以上のマーカー遺伝子を含む膵臓癌診断用マーカーを含む。

**【0018】**

前記他の目的を達成するために、本発明は、前記膵臓癌診断用組成物を含む膵臓癌診断用キットを提供する。

**【0019】**

前記他の目的を達成するために、本発明は、膵臓癌発病有無を診断しようとする対象から試料を得る段階;

前記試料から少なくとも3種類またはそれ以上のマーカー遺伝子の組み合わせであって、具体的に(a) CA19-9; (b) LRG1; および(c) TTR、C1R、CLU および KLB1 からなる群より選択されたいずれか一つ以上のマーカー遺伝子を含む膵臓癌マーカーの蛋白質の発現水準または mRNA 発現水準をそれぞれ測定する段階;

前記対象から得られたマーカー遺伝子の発現水準をそれぞれ正常対照群試料での発現水準と比較して、前記膵臓癌発病有無を診断しようとする対象を膵臓癌または発病可能性の高い対象群と決定する段階を含む、膵臓癌の診断方法または膵臓癌診断の情報を提供する方法に関するものである。

**【0020】**

前記決定する段階において、マーカー遺伝子の発現水準比較結果、対象での CA19-9 の発現水準が正常対照群での発現水準より高く、LRG1 の発現水準が正常対照群での発現水準より高く、TTR 蛋白質の発現水準または TTR 蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA の発現水準が正常対照群での発現水準より低いか、C1R 蛋白質の発現水準または C1R 蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA の発現水準が正常対照群での発現水準より高いか、CLU 蛋白質の発現水準または CLU 蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA の発現水準が正常対照群での発現水準より低いか、KLB1 蛋白質の発現水準または KLB1 蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA の発現水準が正常対照群での発現水準より低い場合、膵臓癌発病可能性が高いと判定する段階を含む、膵臓癌の診断方法または膵臓癌診断のための情報を提供する方法を提供する。

**【0021】**

本発明の追加の一例は、LRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1) を含む膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) マーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子の mRNA の発現水準を測定する製剤を含む、高危険群 IPMN の選別診断用組成物に関するものである。前記 IPMN マーカーは、CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、TTR、C1R、CLU および KLB1 からなる群より選択された1種以上のマーカーを追加的に含むことができる。例えば、前記 IPMN マーカーは、TTR、C1R、CLU および KLB1 からなる群より選択された1種のマーカーと LRG1 を含むマーカーであるか、TTR、C1R、CLU および KLB1 からなる群より選択された2種のマーカーと LRG1 を含む組み合わせマーカーであり得る。

**【0022】**

本発明の追加の一例は、CLU (Clusterin preproprotein); および

LRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein

10

20

30

40

50

1、LRG1)、CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)、TTR(Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA)、C1R(Complement C1r subcomponent precursor)およびKLKB1(Plasma Kallikrein protein;)からなる群より選択された一つ以上のマーカーを含むIPMNマーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む、高危険群IPMNの選別診断用組成物に関するものである。例えば、前記IPMNマーカーは、LRG1、CA19-9、TTR、C1RおよびKLKB1からなる群より選択された1種のマーカーとCLUを含む組み合わせマーカー、またはLRG1、CA19-9、TTR、C1RおよびKLKB1からなる群より選択された2種のマーカーとLRG1を含む組み合わせマーカーであり得る。

10

#### 【0023】

本発明による一例は、対象の試料に対して、前記IPMNマーカー蛋白質の発現水準またはこれを暗号化する遺伝子のmRNA発現水準をそれぞれ測定する段階、

前記測定されたマーカーの発現水準を、対照群マーカーの発現水準と比較する段階、および

前記マーカー発現水準の比較結果を用いて前記対象の高危険IPMN有無を決定する段階を含む、

高危険群IPMNを診断する方法に関するものである。

#### 【発明の効果】

20

#### 【0024】

本発明は、膵臓癌の診断マーカーを提供することによって、膵臓癌の発病可能性、早期診断および病気程度を有意的に予測または把握することができ、膵臓癌の腫瘍形成研究に活用することができる。また、本発明の診断方法は、非侵襲的に血液などから簡単に膵臓癌を早期診断することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0025】

【図1】化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)による対照群および膵臓癌患者群でのCA19-9蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図2】MRM定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のLRG1蛋白質の発現量を示すグラフである。

30

【図3】MRM定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のTTR蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図4】MRM定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のC1R蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図5】MRM定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のCLU蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図6】MRM定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のKLKB1蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図7】ELISA定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のLRG1蛋白質の発現量を示すグラフである。

40

【図8】ELISA定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のTTR蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図9】ELISA定量分析による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のCLU蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図10】免疫比濁法(immunoturbidimetric assay)による対照群および膵臓導管腺癌腫患者群のTTR蛋白質の発現量を示すグラフである。

【図11】CA19-9、LRG1およびTTR蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA1

50

9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 1 2】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 1 3】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区分のための診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

10

【図 1 4】 C A 1 9 - 9 の数値が 3 7 U / m l 以下である実験群を対象にして、 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 1 5】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は E L I S A 方法によって測定された。

20

【図 1 6】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は E L I S A 方法によって測定された。

【図 1 7】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区分のための診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は E L I S A 方法によって測定された。

30

【図 1 8】 C A 1 9 - 9 の数値が 3 7 U / m l 以下である実験群を対象にして、 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 および T T R 蛋白質は E L I S A 方法によって測定された。

【図 1 9】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 蛋白質は E L I S A 方法によって、 T T R 蛋白質は免疫比濁法によって測定された。

40

【図 2 0】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時と C A 1 9 - 9 および T T R の 2 種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、 L R G 1 蛋白質は E L I S A 方法によって、 T T R 蛋白質は免疫比濁法によって測定された。

【図 2 1】 C A 1 9 - 9、 L R G 1 および T T R 蛋白質を同時に使用した時と C A 1 9 -

50

9 蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区分のための診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA方法によって、TTR蛋白質は免疫比濁法によって測定された。

【図22】CA19-9の数値が37U/ml以下である実験群を対象にして、CA19-9、LRG1およびTTR蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA方法によって、TTR蛋白質は免疫比濁法によって測定された。

10

【図23】CA19-9、LRG1およびC1R蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図24】CA19-9、LRG1およびC1R蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

20

【図25】CA19-9、LRG1およびC1R蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区分のための診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図26】CA19-9の数値が37U/ml以下である実験群を対象にして、CA19-9、LRG1およびC1R蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

30

【図27】CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図28】CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

40

【図29】CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区分のための診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図30】CA19-9の数値が37U/ml以下である実験群を対象にして、CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断

50

性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図31】CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA方法によって測定された。

【図32】CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA方法によって測定された。

10

【図33】CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区別のための診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA方法によって測定された。

【図34】CA19-9の数値が37U/ml以下である実験群を対象にして、CA19-9、LRG1およびCLU蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA方法によって測定された。

20

【図35】CA19-9、LRG1およびKLKB1蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図36】CA19-9、LRG1およびKLKB1蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌初期病期診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

30

【図37】CA19-9、LRG1およびKLKB1蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌とその他の癌の区別のための診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図38】CA19-9の数値が37U/ml以下である実験群を対象にして、CA19-9、LRG1およびKLKB1蛋白質を同時に使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時とCA19-9およびTTRの2種類マーカーの組み合わせ使用時の膵臓癌診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

40

【図39】LRG1蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の高危険群IPMNの診断性能（AUCおよび検出感度）を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図40】（LRG1+CA19-9）、（LRG1+TTR）、（LRG1+CLU）

50

、(LRG1 + C1R)、または(LRG1 + KLB1)の2種類組み合わせ蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図41】図40の続きである。

【図42】図41の続きである。

【図43】図42の続きである。

【図44】図43の続きである。

【図45】(LRG1 + CA19-9 + TTR)、(LRG1 + CA19-9 + CLU)、(LRG1 + CA19-9 + C1R)および(LRG1 + CA19-9 + KLB1)の3種類組み合わせ蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

10

【図46】図45の続きである。

【図47】図46の続きである。

【図48】図47の続きである。

【図49】(LRG1 + TTR + CLU)、(LRG1 + TTR + C1R)、(LRG1 + TTR + KLB1)、(LRG1 + CLU + C1R)、(LRG1 + CLU + KLB1)、および(LRG1 + C1R + KLB1)の3種類組み合わせ蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

20

【図50】図49の続きである。

【図51】図50の続きである。

【図52】図51の続きである。

【図53】図52の続きである。

【図54】図53の続きである。

30

【図55】(CLU + CA19-9)、(CLU + TTR)および(CLU + KLB1)の2種類組み合わせ蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、TTR、CLUおよびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図56】図55の続きである。

【図57】図56の続きである。

【図58】(CLU + CA19-9 + TTR)、(CLU + CA19-9 + C1R)、(CLU + CA19-9 + KLB1)、(CLU + TTR + C1R)、(CLU + TTR + KLB1)、および(CLU + C1R + KLB1)の3種類組み合わせ蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

40

【図59】図58の続きである。

【図60】図59の続きである。

【図61】図60の続きである。

【図62】図61の続きである。

【図63】図62の続きである。

【図64】LRG1蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の低危

50

険群 I P M N と区別される高危険群 I P M N の診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、L R G 1 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 6 5】( L R G 1 + C A 1 9 - 9 )、( L R G 1 + T T R )、( L R G 1 + C L U )、( L R G 1 + C 1 R )、および ( L R G 1 + K L K B 1 ) の 2 種類組み合わせマーカー蛋白質を使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時の低危険群 I P M N と区別される高危険群 I P M N の診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、L R G 1、T T R、C L U、C 1 R および K L K B 1 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 6 6】図 6 5 の続きである。

【図 6 7】図 6 6 の続きである。

【図 6 8】図 6 7 の続きである。

【図 6 9】図 6 8 の続きである。

【図 7 0】( C A 1 9 - 9 + L R G 1 + T T R )、( C A 1 9 - 9 + L R G 1 + C 1 R )、( C A 1 9 - 9 + L R G 1 + C L U )、および ( C A 1 9 - 9 + L R G 1 + K L K B 1 ) の 3 種類組み合わせマーカー蛋白質を使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時の低危険群 I P M N と区別される高危険群 I P M N の診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、L R G 1、T T R、C L U、C 1 R および K L K B 1 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 7 1】図 7 0 の続きである。

【図 7 2】図 7 1 の続きである。

【図 7 3】図 7 2 の続きである。

【図 7 4】( L R G 1 + T T R + C L U )、( L R G 1 + T T R + C 1 R )、( L R G 1 + T T R + K L K B 1 )、( L R G 1 + C L U + C 1 R )、( L R G 1 + C L U + K L K B 1 ) および ( L R G 1 + C 1 R + K L K B 1 ) の 3 種類組み合わせマーカー蛋白質を使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時の低危険群 I P M N と区別される高危険群 I P M N の診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、L R G 1、T T R、C L U、C 1 R および K L K B 1 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 7 5】図 7 4 の続きである。

【図 7 6】図 7 5 の続きである。

【図 7 7】図 7 6 の続きである。

【図 7 8】図 7 7 の続きである。

【図 7 9】図 7 8 の続きである。

【図 8 0】( C L U + C A 1 9 - 9 )、( C L U + T T R )、( C L U + C 1 R ) および ( C L U + K L K B 1 ) の 2 種類組み合わせマーカー蛋白質を使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時の低危険群 I P M N と区別される高危険群 I P M N の診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、L R G 1、T T R、C L U、C 1 R および K L K B 1 蛋白質は M R M 定量分析によって測定された。

【図 8 1】図 8 0 の続きである。

【図 8 2】図 8 1 の続きである。

【図 8 3】図 8 2 の続きである。

【図 8 4】( C L U + C A 1 9 - 9 + T T R )、( C L U + C A 1 9 - 9 + C 1 R )、( C L U + C A 1 9 - 9 + K L K B 1 )、( C L U + T T R + C 1 R )、( C L U + T T R + K L K B 1 ) および ( C L U + C 1 R + K L K B 1 ) の 3 種類組み合わせマーカー蛋白質を使用した時と C A 1 9 - 9 蛋白質を単独で使用した時の低危険群 I P M N と区別される高危険群 I P M N の診断性能 ( A U C および検出感度 ) を比較したものである。前記 C A 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A ) によって、L R G 1、T T

10

20

30

40

50

R、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。

【図85】図84の続きである。

【図86】図85の続きである。

【図87】図86の続きである。

【図88】図87の続きである。

【図89】図88の続きである。

【図90】LRG1蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の低危険群IPMNと区別される高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA分析によって測定された。

10

【図91】(LRG1+CA19-9)、(LRG1+TTR)および(LRG1+CLU)の2種類組み合わせマーカー蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の低危険群IPMNと区別される高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はELISA分析によって測定された。

【図92】図91の続きである。

【図93】図92の続きである。

【図94】(LRG1+CA19-9+TTR)、(LRG1+CA19-9+CLU)、(LRG1+CA19-9+TTR+CLU)および(LRG1+TTR+CLU)の組み合わせマーカー蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の低危険群IPMNと区別される高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はELISA分析によって測定された。

20

【図95】図94の続きである。

【図96】図95の続きである。

【図97】図96の続きである。

【図98】(CLU+CA19-9)、(CLU+TTR)および(CLU+CA19-9+TTR)の組み合わせマーカー蛋白質を使用した時とCA19-9蛋白質を単独で使用した時の低危険群IPMNと区別される高危険群IPMNの診断性能(AUCおよび検出感度)を比較したものである。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1、TTR、CLU、C1RおよびKLB1蛋白質はELISA分析によって測定された。

30

【図99】図98の続きである。

【図100】図99の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明において、用語“膵臓癌(pancreatic cancer)”とは、膵臓細胞に起源する癌(癌腫)または腫瘍を意味する。膵臓癌には様々な種類があり、手術的切除によって治療可能な良性腫瘍から予後が非常に良くない悪性腫瘍に至るまで多様な種類を含み、良性腫瘍、悪性腫瘍、そして良性や悪性に变化する場合などを含む。例えば、膵臓癌の悪性腫瘍としては膵管細胞から発生した膵管腺癌腫(Pancreatic ductal adenocarcinoma、PDAC)が膵臓癌の約90%程度を占めていて一般に膵臓癌といえば膵管腺癌腫を意味する狭い意味として使用される場合もあるが、それ以外の多様な種類の膵臓癌、例えば神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor)および腺房細胞癌腫(acinar cell tumor)を含む。また他の例として、代表的な嚢胞性腫瘍として漿液性嚢胞性腫瘍、粘液性嚢胞性腫瘍、膵管内乳頭粘液性腫瘍(Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN)、固形偽乳頭腫瘍などを含む。

40

50

## 【0027】

好ましくは、前記膵臓癌は、膵管腺癌腫またはIPMNであり得、前記膵管腺癌腫は多様な原因によって発生でき、例えば、IPMNに由来した膵管腺癌腫であるかIPMNと関係なく発生でき、またはIPMN-由来膵管腺癌腫を除くこともできる。WHOの腫瘍分類ではIPMNを、主膵管またはその主要分枝から発生する腫瘍であって上皮が体腔内に乳頭状に成長し多様な程度に粘液を分泌して膵管が嚢胞性に拡張することが特徴である腫瘍であると定義している。

## 【0028】

IPMNは、形態学的に主膵管のびまん性拡張、粘液や腫瘤による非整形の陰影欠損、副膵管の嚢胞性拡張、乳頭開口部の拡大および多量の粘液が乳頭開口部から排出される所見などで特徴づけられ、組織学的には膵管内に粘液を分泌する細胞の乳頭状成長を特徴とし、良性から悪性まで多様なスペクトルを有する疾患である。IPMNは、腫瘍が発生する位置と病変の範囲によって主膵管型(main duct type)、分枝膵管型(branch duct type)、混合型(mixed type)に分けられる。

## 【0029】

IPMNの予後を決定する因子は、侵襲性、リンパ節転移、血管侵襲、組織学的所見、切除縁の組織学的所見などであり、このうちの最も重要なものは侵襲性である。侵襲性癌が発生する前のIPMNは治癒可能な疾患であるが、侵襲性癌が発生した後のIPMNは残存膵臓や膵臓外組織に再発が50-90%で発生する。IPMNは治癒的切除後にも残存膵臓に再発が可能であるため、長期的に追跡観察が必要であり、生存率を高めるためには適切な処置が必要である。

## 【0030】

したがって、IPMNの悪性度評価は以後予後観察および処置方法の選択において非常に重要であり、通常IPMNの悪性度は手術後顕微鏡的組織検査を通じて区分され、軽異形成(Low)、中等異形成(Intermediate)、高異形成(High grade dysplasia)、浸潤癌を伴うIPMN(IPMN associated with an invasive carcinoma)に分けられ、羅列した順に悪性度が高まる。周辺stroma(基質)の浸潤がある浸潤癌(invasive carcinoma)の部分は膵臓癌において最もありふれている形態の癌腫である導管腺癌(ductal adenocarcinoma)の形態や粘液性非嚢胞性癌(mucinous noncystic carcinoma)(膠様癌(colloid carcinoma))の形態を示すことができる。

## 【0031】

本発明において、前記IPMNの悪性度および/または浸潤性によって高異形成(High grade dysplasia)と侵襲型(invasive type)を悪性亜型(malignant subtype)または高危険(High risk)IPMNと定義し、軽異形成(Low)および中等異形成(Intermediate grade dysplasia)を低危険(low risk)IPMNに区分してこれら悪性度を区分する方法および組成物、キットを提供する。本発明による膵臓癌関連マーカーは低危険群IPMNと区別して高危険群IPMNを選別することができる。

## 【0032】

また、本発明は前記膵臓癌診断用組成物を含む膵臓癌診断用キットを提供する。好ましくは、前記キットはRT-PCRキット、DNAチップキット、ELISAキット、蛋白質チップキット、ラピッド(rapid)キットまたはMRM(Multiple reaction monitoring)キットであり得る。

## 【0033】

本発明で使用された用語“診断”は、特定疾病または疾患に対する対象(subject)の感受性(susceptibility)を判定すること、対象が特定疾病または疾患を現在有しているかどうかを判定すること、特定疾病または疾患にかかった対象の予後(prognosis)(例えば、前-転移性または転移性癌状態の同定、癌の段階決

10

20

30

40

50

定または治療に対する癌の反応性決定)を判定すること、またはセラメトリクス ( t h e r a m e t r i c s ) (例えば、治療効能に対する情報を提供するために客体の状態をモニターすること)を含む。好ましくは、本明細書において診断は膵臓癌発病有無または発病可能性(危険性)を確認することである。

【0034】

本発明で使用された用語“マーカー”、“バイオマーカー”または“診断用マーカー”とは、正常または病的な状態を区分することができるか、治療反応を予測することができるか、客観的に測定することができる標識子を意味する。特に、本発明において膵臓癌に関しては、正常対照群(膵臓癌でない個体)に比べて膵臓癌を有するか膵臓癌発病可能性(危険性)がある個体において蛋白質発現水準または遺伝子発現水準が有意的に増加するか減少する様相を呈する、ポリペプチドまたは核酸(例:mRNAなど)、脂質、糖脂質、糖蛋白質、糖(単糖類、二糖類、オリゴ糖類など)などのような有機生体分子などを意味する。

10

【0035】

本発明は、(a)CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)の発現水準を測定する製剤、(b)LRG1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1)の発現水準を測定する製剤、および(c)TTR(Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA);C1R(Complement C1r subcomponent precursor)、CLU(Clusterin preproprotein)およびKLKB1(Plasma Kallikrein protein)からなる群より選択されたいずれか一つ以上のマーカー発現水準を測定する製剤を含む、膵臓癌診断マーカーの蛋白質発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む膵臓癌診断用組成物を提供する。

20

【0036】

本発明は、少なくとも3種類以上のマーカーの組み合わせ、例えば(a)CA19-9;(b)LRG1;および(c)TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択されたいずれか一つとの組み合わせられたマーカー遺伝子を活用することによって、対象から膵臓癌の発病有無または発病可能性有無を効果的に診断することができる。

30

【0037】

本発明で膵臓癌診断用マーカーとして使用されるCA19-9蛋白質は、従来使用されている膵臓癌マーカーであって、消化器系の癌の予後判定のための腫瘍標識子検査に用いることができる。

【0038】

本発明で用いた他の膵臓癌診断用マーカーであるLRG1蛋白質は、血管形成に関与し、子宮内膜癌、肺ガンなどに関連がある。LRG1は、NCBI Accession #NP\_443204.1であり得る。

【0039】

本発明で使用可能な膵臓癌診断用マーカーは、TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択された1種以上であり得る。TTR蛋白質は、127個のアミノ酸残基から構成された小単位が血液中で4合体を形成する血漿蛋白質の一つであって甲状腺ホルモンを脳に輸送する役割を果たし、アルツハイマー、乳癌、卵巣ガン、胃ガンなどに関連がある。C1R蛋白質は、補体(complement)システムのうちの一番先に発見されたものであって、体内免疫作用と関連があり、アルツハイマーおよび腎臓癌と関連がある。CLU蛋白質は、血液内蛋白質の凝固を防止する役割を果たすと知られており、アルツハイマー、肺ガンなどに関連がある。KLKB1蛋白質は、血液凝固に関与し、高血圧および肺ガンと関連がある。

40

【0040】

具体的な例として、TTRはNCBI Accession #NP\_000362.

50

1であり、C1RはNCBI Accession #NP\_001724.3であり、CLUはNCBI Accession #NP\_001822.3であり、KLKB1はNCBI Accession #NP\_000883.2であり得る。

【0041】

本発明者らは膵臓導管腺癌腫 (Pancreatic ductal adenocarcinoma、PDAC) 患者、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) 患者、および慢性胆嚢炎 (chronic cholecystitis) 患者個体の血漿試料を分析し、下記表1のような方法でCA19-9およびLRG1とTTR、C1R、CLU、KLKB1のうちの一つから構成される3種類のマーカー遺伝子の組み合わせを用いて、前記疾病がない個体である正常対照群の血漿試料を分析し、前記バイオマーカー組み合わせの有効性を確立した。

10

【0042】

【表1】

過程	方法	個数
膵臓癌診断マーカー候補	Data mining Microarray analysis	1,000
MRM-MS適用可能候補	MRM-MS	246
単独診断性能優秀候補	単独マーカー基準AUC>0.6	143
SIS適用可能候補	SISを用いたMRM-MS	54
最終候補	1~3個蛋白質組み合わせマーカー候補のうち の多様な条件で性能が維持される組み合わせマーカー	4

20

【0043】

本発明に使用された用語、“蛋白質の発現水準測定”とは、膵臓癌を診断するために生物学的試料において膵臓癌診断用マーカー (蛋白質) またはこれを暗号化する遺伝子の存在有無と発現程度を確認する過程を意味する。

30

【0044】

前記蛋白質の発現水準測定または比較分析方法としては、蛋白質チップ分析、免疫測定法、リガンド結合法、MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、放射免疫測定、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体結合分析法、二次元電気泳動分析、液体クロマトグラフィー-質量分析 (liquid chromatography - Mass Spectrometry、LC-MS)、LC-MS/MS (liquid chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)、ウエスタンブロッティングおよびELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) などがあるが、これに制限されるわけではない。

40

【0045】

本発明による膵臓癌診断用組成物において、CA19-9蛋白質、LRG1蛋白質、TTR蛋白質、C1R蛋白質、CLU蛋白質またはKLKB1蛋白質の発現水準を測定する製剤は、CA19-9蛋白質、LRG1蛋白質、TTR蛋白質、C1R蛋白質、CLU蛋白質またはKLKB1蛋白質にそれぞれ特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガン

50

ド、PNA (peptide nucleic acid) またはアプタマー (aptamer) を含むことができる。

【0046】

本発明に使用された用語“抗体”は抗原と特異的に結合して抗原-抗体反応を起こす物質を示す。本発明の目的上、抗体は、CA19-9蛋白質、LRG1蛋白質、TTR蛋白質、C1R蛋白質、CLU蛋白質またはKLB1蛋白質に対してそれぞれ特異的に結合する抗体を意味する。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および組換え抗体を全て含む。前記抗体は当業界に広く公知された技術を用いて容易に製造することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、前記膵臓癌マーカー蛋白質抗原を動物に注射し動物から採血して抗体を含む血清を取得する過程を含む当業界に広く公知された方法によって生産することができる。このようなポリクローナル抗体は、ヤギ、ウサギ、羊、猿、馬、豚、牛、犬などの任意の動物から製造することができる。また、モノクローナル抗体は、当業界に広く公知されたハイブリドーマ方法 (hybridoma method; Kohler および Milstein (1976) European Journal of Immunology 6: 511-519 参照)、またはファージ抗体ライブラリー技術 (Clackson et al, Nature, 352: 624-628、1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222: 58、1-597、1991 参照) を用いて製造することができる。前記方法で製造された抗体は、ゲル電気泳動、透析、塩沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなどの方法を用いて分離、精製することができる。また、本発明の抗体は2個の全長の軽鎖および2個の全長の重鎖を有する完全な形態だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合機能を有している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub> および Fv などがある。

【0047】

本発明に使用された用語“PNA (Peptide nucleic acid)”は人工的に合成された、DNA または RNA と似た重合体を示し、1991年デンマークコペンハーゲン大学のNielsen、Egholm、BergとBuchardt教授によって初めて紹介された。DNAはリン酸-リボス糖骨格を有するに反して、PNAはペプチド結合によって連結された繰り返されたN-(2-アミノエチル)-グリシン骨格を有し、これによってDNAまたはRNAに対する結合力と安定性が大きく増加し、分子生物学、診断分析およびアンチセンス治療法に使用されている。PNAは、文献[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). “Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide”. Science 254 (5037): 1497-500]に詳細に開示されている。

【0048】

本発明において“アプタマー”はオリゴ核酸またはペプチド分子であり、アプタマーの一般的な内容は文献[Bock LC et al., Nature 355 (6360): 5646 (1992); Hoppe-Seyler F, Butz K “Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine”. J Mol Med. 78 (8): 42630 (2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. “An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library”. Proc Natl Acad Sci USA. 95 (24): 142727 (1998)]に詳細に開示されている。

【0049】

本発明に使用された用語“mRNAの発現水準測定”とは、膵臓癌を診断するために生物学的試料において膵臓癌診断用蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA存在有無と発現程

10

20

30

40

50

度を確認する過程であって、mRNAの量を測定することを意味する。

【0050】

そのための分析方法としては、逆転写重合酵素反応(RT-PCR)、競合的逆転写重合酵素反応(Competitive RT-PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素反応(Real-time RT-PCR)、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ(RPA; RNase protection assay)、ノーザンブロットング(Northern blotting)、DNAチップなどがあるが、これに制限されるわけではない。

【0051】

本発明による膵臓癌診断用組成物において、CA19-9、LRG1、TTR、C1R、CLUまたはKLKB1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤は、CA19-9、LRG1、TTR、C1R、CLUまたはKLKB1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAにそれぞれ特異的に結合するプライマー、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドを含む。本発明によるCA19-9、LRG1、TTR、C1R、CLUおよびKLKB1蛋白質の情報はUniProtなどに知られているので、当業者であればこれに基づいて前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAにそれぞれ特異的に結合するプライマー、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドを容易にデザインすることができる。

10

【0052】

本発明で使用された用語“プライマー”は標的遺伝子配列を認知する断片であって、正方向および逆方向のプライマー対を含むが、好ましくは、特異性および感受性を有する分析結果を提供するプライマー対である。プライマーの核酸配列が試料内存在する非-標的配列と不一致な配列であるため、相補的なプライマー結合部位を含有する標的遺伝子配列のみ増幅し非特異的な増幅を誘発しないプライマーである時、高い特異性が付与され得る。

20

【0053】

本発明で使用された用語“プローブ”とは試料内の検出しようとする標的物質と特異的に結合できる物質を意味し、前記結合を通じて特異的に試料内の標的物質の存在を確認することができる物質を意味する。プローブの種類は当業界で通常使用される物質であって制限はないが、好ましくはPNA(peptide nucleic acid)、LNA(locked nucleic acid)、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、RNAまたはDNAであり得、最も好ましくはPNAである。より具体的に、前記プローブはバイオ物質として生物に由来するかこれと類似しているものまたは生体外で製造されたものを含むものであって、例えば、酵素、蛋白質、抗体、微生物、動植物細胞及び器官、神経細胞、DNA、およびRNAであり得、DNAはcDNA、ゲノムDNA、オリゴヌクレオチドを含み、RNAはゲノムRNA、mRNA、オリゴヌクレオチドを含み、蛋白質の例としては抗体、抗原、酵素、ペプチドなどを含むことができる。

30

【0054】

本発明で使用された用語“アンチセンス”はアンチセンスオリゴマーがワトソン-クリック塩基対の形成によってRNA内の標的配列と混成化されて、標的配列内で典型的にmRNAとRNA:オリゴマーヘテロ二重体の形成を許す、ヌクレオチド塩基の配列およびサブユニット間バックボーンを有するオリゴマーを意味する。オリゴマーは標的配列に対する正確な配列相補性または近似相補性を有し得る。

40

【0055】

また、本発明は前記膵臓癌診断用組成物を含む膵臓癌診断用キットを提供する。例えば、前記キットはRT-PCRキット、DNAチップキット、ELISAキット、蛋白質チップキット、ラピッド(rapid)キットまたはMRM(Multiple reaction monitoring)キットであり得る。

【0056】

本発明による膵臓癌診断用組成物またはこれを含む診断用キットは、CA19-9とLRG1そしてTTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択されたいずれ

50

か一つ以上のマーカーを含む膵臓癌マーカーを使用することによって、CA19-9の単独マーカーを使用する組成物またはキットやCA19-9とLRG1の2個のマーカーを使用する組成物またはキットに比べて診断性能が非常に優れる。

【0057】

前記膵臓癌診断用キットは、分析方法に適した種類またはそれ以上の他の構成成分組成物、溶液または装置をさらに含むことができる。

【0058】

例えば、前記診断用キットは、逆転写重合酵素反応を行うために必要な必須要素をさらに含むことができる。逆転写重合酵素反応キットは、マーカー蛋白質を暗号化する遺伝子に対して特異的なプライマー対を含む。プライマーは前記遺伝子の核酸配列に特異的な配列を有するヌクレオチドであって、約7bp乃至50bpの長さ、より好ましくは約10bp乃至30bpの長さを有し得る。また、対照群遺伝子の核酸配列に特異的なプライマーを含むことができる。その他、逆転写重合酵素反応キットは、テストチューブまたは他の適切な容器、反応緩衝液(pHおよびマグネシウム濃度は多様)、デオキシヌクレオチド(dNTPs)、Taq-ポリメラーゼおよび逆転写酵素のような酵素、DNase、RNase抑制剤DEPC-水(DEPC-water)、滅菌水などを含むことができる。

【0059】

また、本発明の診断用キットは、DNAチップを遂行するために必要な必須要素を含むことができる。DNAチップキットは、遺伝子またはその断片に該当するcDNAまたはオリゴヌクレオチド(oligonucleotide)が付着されている基板、および蛍光標識プローブを製作するための試薬、製剤、酵素などを含むことができる。また、基板は、対照群遺伝子またはその断片に該当するcDNAまたはオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0060】

また、本発明の診断用キットは、ELISAを遂行するために必要な必須要素を含むことができる。ELISAキットは前記蛋白質に対して特異的な抗体を含む。抗体はマーカー蛋白質に対する特異性および親和性が高く他の蛋白質に対する交差反応性が殆どない抗体であって、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または組換え抗体である。また、ELISAキットは対照群蛋白質に特異的な抗体を含むことができる。その他、ELISAキットは結合された抗体を検出できる試薬、例えば、標識された2次抗体、発色団(chromophores)、酵素(例:抗体とコンジュゲートされる)およびその基質または抗体と結合できる他の物質などを含むことができる。

【0061】

また、本発明による膵臓癌診断用組成物またはこれを含む診断用キットは、膵臓癌患者と正常人を区分する用途以外にも、膵臓癌初期病期(1期または2期)の患者と正常人を区分する用途として使用することができる。

【0062】

したがって、本発明は、(a)CA19-9の発現水準を測定する製剤、(b)LRG1の発現水準を測定する製剤、および(c)TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択されたいずれか一つ以上のマーカーの発現水準を測定する製剤を含む、膵臓癌初期病期、例えば1期または2期病期の膵臓癌診断用組成物を提供する。

【0063】

また、本発明による膵臓癌診断用組成物またはこれを含む診断用キットは、膵臓癌患者と正常人を区分する用途以外にも、その他の癌患者から膵臓癌患者を選別的に検出する用途として使用することができる。したがって、本発明は、(a)CA19-9の発現水準を測定する製剤、(b)LRG1の発現水準を測定する製剤、および(c)TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択されたいずれか一つ以上のマーカーの発現水準を測定する製剤を含む膵臓癌とその他の癌を区分するための組成物を提供する。

【0064】

さらに、本発明は、前記膵臓癌診断用組成物または前記膵臓癌診断用キットを用いて対象の膵臓癌診断する方法または膵臓癌診断の情報を提供する方法を提供する。前記診断方法は下記の段階を含む：

膵臓癌発病有無を診断しようとする対象から試料を得る段階；

前記対象試料から (a) CA19-9、(b) LRG1 および (c) TTR、C1R、CLU および KLB1 からなる群より選択されたいずれか一つ以上のマーカーを含む膵臓癌マーカーの蛋白質発現水準または mRNA の発現水準を測定する段階；

前記対象試料の (a) CA19-9、(b) LRG1 および (c) TTR、C1R、CLU および KLB1 からなる群より選択されたいずれか一つ以上のマーカーを含む膵臓癌マーカーの発現水準を、それぞれ相応する正常対照群試料のマーカーの発現水準と比較する段階；および

前記マーカーの発現水準比較結果を用いて対象の膵臓癌有無を決定する段階。

#### 【0065】

本発明による対象の膵臓癌診断する方法または膵臓癌診断の情報を提供する方法に適用される前記“対象”は膵臓癌の発病有無を診断しようとする対象であって患者、患者疑い群または正常群を含み、例えば、癌診断を受けない健康人であって健康検診でPDACを早期診断しようとする対象であるか、膵臓癌患者のうちの手術によって癌が除去された患者の同種癌再発を診断するための定期的な検査のための対象を含む。一実施形態では前記対象は哺乳類を、他の実施形態ではヒトを意味するものであり得る。

#### 【0066】

前記マーカーの発現水準比較結果を用いて対象の膵臓癌有無を決定する段階は、具体的に膵臓癌発病有無を診断しようとする対象でのCA19-9蛋白質の発現水準またはCA19-9蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準が正常対照群での発現水準より高く、LRG1蛋白質の発現水準またはLRG1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準が正常対照群での発現水準より高く、TTR蛋白質の発現水準またはTTR蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準が正常対照群での発現水準より低いか、C1R蛋白質の発現水準またはC1R蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準が正常対照群での発現水準より高いか、CLU蛋白質の発現水準またはCLU蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準が正常対照群での発現水準より低いか、KLB1蛋白質の発現水準またはKLB1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準が正常対照群での発現水準より低い場合に膵臓癌発病可能性が高いと判定することができる。

#### 【0067】

前記方法において“試料”とは、生物学的試料 (biological sample) であって膵臓癌発病によって蛋白質発現水準または遺伝子発現水準に差がある組織、細胞、血液、血清、血漿、唾液、脳脊髄液または尿のような試料などを意味し、好ましくは血液、血清または血漿を意味する。

#### 【0068】

前記CA19-9およびLRG1蛋白質または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAは膵臓癌患者での発現水準が正常対照群での発現水準と比較して増加し、TTR、CLUおよびKLB1蛋白質または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAは膵臓癌患者での発現水準が正常対照群での発現水準と比較して減少し、C1R蛋白質または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAは膵臓癌患者での発現水準が正常対照群での発現水準と比較して増加するので、膵臓癌発病有無を診断しようとする対象での前記(a)CA19-9、(b)LRG1および(c)TTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択されたいずれか一つを含むマーカーの蛋白質または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準を測定することによって膵臓癌発病可能性を判定することができる。

#### 【0069】

例えば、CA19-9およびLRG1蛋白質または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの膵臓癌患者での発現水準が正常対照群での発現水準と比較して増加し、TTR蛋

10

20

30

40

50

白質または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA の膵臓癌患者での発現水準が正常対照群での発現水準と比較して減少する場合に、前記対象は膵臓癌発病可能性が高いと判定することができる。

【 0 0 7 0 】

前記「膵臓癌発病有無を診断しようとする対象での CA19-9 蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準が正常対照群での発現水準より高い」とは、多様な方法によって測定される時、膵臓癌発病有無を診断しようとする対象での CA19-9 蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準が正常対照群での発現水準より 1.0 倍を超過、1.5 倍を超過、2 倍を超過、3 倍を超過、5 倍を超過または 10 倍を超過することを意味する。前記表現は、LRG1 または C1R 蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準を称する時に同様に適用される。

10

【 0 0 7 1 】

また、前記「膵臓癌発病有無を診断しようとする対象での TTR 蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準が正常対照群での発現水準より低い」とは、多様な方法によって測定される時、膵臓癌発病有無を診断しようとする対象での TTR 蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準が正常対照群での発現水準より 0.1 倍未満、0.2 倍未満、0.3 倍未満、0.5 倍未満または 1 倍未満であることを意味する。前記表現は、CLU または KLB1 蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準を称する時に同様に適用される。

20

【 0 0 7 2 】

一つの実施形態において、前記「膵臓癌発病可能性が高いと判定すること」は、膵臓癌診断関数を用いて行うことができる。前記膵臓癌診断関数の例としては下記関数式 1 が挙げられる：

< 関数式 1 >

【 0 0 7 3 】

【 数 1 】

$$f(x) = \operatorname{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

30

【 0 0 7 4 】

上記の式において、

$x$  は、膵臓癌診断用マーカーの発現水準測定値、

$\alpha_i$  は、SVM におけるラグランジュ乗数、

$y_i$  は、正常群 / 膵臓癌群の識別子、

$x_i$  は、基準測定値を、そして

$b$  は、補正值を意味する。

【 0 0 7 5 】

前記関数は、SVM (Support Vector Machine) から導出される。SVM は、ラグランジュ最適化理論 (Lagrangian optimization theory) に基づいて与えられた条件を満足する関数を推定するアルゴリズムであって、このうちの最大マージン分類子 (Maximum margin classifier) を使用する分類分析方法を適用する場合をサポートベクター分類 (Support Vector Classification, SVC) という。前記関数に CA19-9 および LRG1 と、TTR、C1R、CLU および KLB1 のうちのいずれか一つの MRM 相対測定値を代入した時、関数値が 1 であれば膵臓癌発病可能性が高いと診断し、関数値が -1 であれば正常と診断する。

40

【 0 0 7 6 】

50

本発明の方法は、膵臓癌発病可能性をCA19-9およびLRG1と、TTR、C1R、CLUおよびKLB1のうちのいずれか一つの蛋白質またはそのmRNAの発現数値を膵臓癌診断関数に代入してその結果で膵臓癌発病可能性を直ちに判定することができるところ、医師の臨床学的判断が必要でない。

【0077】

本研究では診断関数をSVMで構築したが、これは用途によってニューラルネットワーク(Neural Network)、ランダムフォレスト(Random Forest)などの様々な機械学習法(Machine Learning)をはじめとする様々の種類の判別関数構築法(Discriminant Analysis)で実現され得る。

10

【0078】

また、(a)膵臓癌発病有無を診断しようとする対象から試料を得る段階；(b)前記試料からCA19-9蛋白質の発現水準またはCA19-9蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準、およびLRG1蛋白質の発現水準またはLRG1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準を測定する段階；(c)前記試料からTTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択されたいずれか一つの蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する段階；および(d)前記(b)および(c)で測定された数値を下記関数式1に代入して膵臓癌発病可能性を判定する段階を含む、膵臓癌の診断方法を提供する：

<関数式1>

20

【0079】

【数2】

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^n a_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

【0080】

上記の式において、 $x$ はCA19-9およびLRG1と、TTR、C1R、CLUおよびKLB1のうちのいずれか一つの蛋白質の新規測定値を、 $a_i$ はSVMにおけるラグランジュ乗数を、 $y_i$ は正常群/膵臓癌群の識別子を、 $x_i$ は基準測定値を、そして $b$ は補正值を意味する。

30

【0081】

本発明の方法において、前記蛋白質発現水準は、該当蛋白質にそれぞれ特異的に結合する抗体を用いて測定および比較することができる。前記抗体と生物学的試料内の該当蛋白質が抗原-抗体複合体を形成するようにして、これを検出する方法を用いる。

【0082】

本発明で使用された用語“抗原-抗体複合体”は、生物学的試料中の該当遺伝子の存在または不存在を確認するための蛋白質抗原とこれを認知する抗体の結合物を意味する。前記抗原-抗体複合体の検出は、当業界に公知されたような方法、例えば分光学的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、電気的、吸光的、化学的およびその他の方法を用いて検出

40

【0083】

本発明の目的上、前記蛋白質発現水準測定または比較分析方法としては、蛋白質チップ分析、免疫測定法、リガンドバイディングアッセイ、MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)分析、SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)分析、放射免疫測定、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体結合分析法、二次元電気泳動分析、液体クロマトグラフィー

50

- 質量分析 (liquid chromatography - Mass Spectrometry、LC-MS)、LC-MS/MS (liquid chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)、ウエスタンブロットおよびELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) などがあるが、これに制限されるわけではない。

【0084】

本発明において、CA19-9、LRG1、C1R、CLUおよびKLCB1蛋白質それぞれの発現水準自体を測定および比較するために、LC-MRM方法を用いることができる。

【0085】

具体的に、生物学的試料中の蛋白質を体積%基準に95%蒸留水、5%アセトニトリル、0.1%ホルム酸の溶液と5%蒸留水、95%アセトニトリルおよび0.1%ホルム酸の溶液を50分間95:5乃至15:85の体積比率で濃度勾配を加えながらLC分析カラムを通過させて分離することができる。溶液混合比率によって特定物質に対する分解能が変わり得るため濃度勾配を実施し、前記範囲は多様な蛋白質を同時に分離するための最適範囲である。まず、カラムをSol A (95%蒸留水、5%アセトニトリル、0.1%ホルム酸)で10分間平衡化した後、Sol B (5%蒸留水、95%アセトニトリル、0.1%ホルム酸)で50分間5%から85%まで、5分間85%の濃度勾配を通じてペプチドを溶出した。

【0086】

質量分析ではMS/MSモードであるMRM (Multiple reaction monitoring)で定量を実施できる。SIM (Selected Ion Monitoring)が質量分析器のソース部分で一度衝突して生じたイオンを用いる方法である反面、MRMは一度割れたイオンのうちの特定イオンをもう一度選択して連続的に連結された他のMSのソースをもう一度通過させて衝突させた後にこの中から得られたイオンを用いる方法である。SIMでは選択された定量イオンが血漿からも検出されるイオンである場合に定量の妨害になることがあるという問題点がある。反面、MRMを用いる場合、同一質量を有するイオンであってももう一度割れば分子構造が変わりながら差別化された傾向を示すので、これを定量イオンとして使用すればバックグラウンドで妨害になるピークが除去されより一層きれいなベースラインを得ることができる。さらに、安定同位体標準 (Stable isotope standard、SIS) ペプチドを合成して測定し、これを標的ペプチドの測定値と比較することによって、より優れた分析

【0087】

前記分析方法を通じて、正常対照群での蛋白質発現水準と膵臓癌個体での蛋白質発現水準を比較することができ、膵臓癌マーカー遺伝子から蛋白質への有意の発現量増減有無を判断して、膵臓癌発病可能性の有無を診断することができる。

【0088】

また、本発明の方法において、CA19-9、LRG1、C1R、CLUおよびKLCB1蛋白質を暗号化するそれぞれの遺伝子のmRNA発現水準の測定または比較は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、競合的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティングまたはDNAチップなどを使用することができるが、これに制限されるわけではない。前記測定方法を通じて正常対照群でのmRNA発現量と膵臓癌発病有無を診断しようとする対象のmRNA発現量を確認することができ、これら発現量程度を比較することによって膵臓癌発病可能性の有無を診断または予測することができる。

【0089】

一方、本発明は膵臓癌診断方法のための情報を提供するために、(a)膵臓癌発病有無を診断しようとする対象から試料を得る段階；(b)前記試料からCA19-9蛋白質の発現水準またはCA19-9蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準、およびLR

10

20

30

40

50

G1蛋白質の発現水準またはLRG1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準をそれぞれ測定する段階；(c)前記試料からTTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択されたいずれか一つの蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する段階；(d)前記CA19-9蛋白質の発現水準またはCA19-9蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準、および前記LRG1蛋白質の発現水準またはLRG1蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNA発現水準をそれぞれ正常対照群試料での発現水準と比較する段階；および(e)前記TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択されたいずれか一つの蛋白質の発現水準または前記蛋白質を暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準をそれぞれ正常対照群試料での発現水準と比較する段階を含む、膵臓癌マーカーの検出方法を提供する。

10

**【0090】**

本発明の膵臓癌診断用マーカー、組成物、キットおよび診断方法において、前記膵臓癌はIPMNであり得、具体的には高危険群IPMNであり得る。前記組成物は低危険群IPMNと区別して高危険群IPMNを選別するか、正常群、IPMNと膵管腺癌腫を除いた膵臓疾患を有する患者、または低危険IPMNを有する対象である対照群と区別して、高危険群IPMNを選別的に診断することができる。高危険群IPMNは高異形成(High grade dysplasia)と侵襲型(invasive type)IPMNを含むことができ、前記高危険IPMNはIPMN由来膵管腺癌腫を含むことができる。

**【0091】**

20

本発明の追加の一実施形態において、LRG1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1)を含む膵管内乳頭粘液性腫瘍(Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN)マーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む、高危険群IPMNの選別診断用組成物に関するものである。前記IPMNマーカーは、CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)、TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択された1種以上のマーカーを追加的に含むことができる。例えば、前記IPMNマーカーは、TTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択された1種マーカーとLRG1を含むマーカー、またはTTR、C1R、CLUおよびKLKB1からなる群より選択された2種のマーカーとLRG1を含む組み合わせマーカーであり得る。

30

**【0092】**

本発明の他の一実施形態は、CLU(Clusterin preproprotein)；および

LRG1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1)、CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)、TTR(Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA)、C1R(Complement C1r subcomponent precursor)およびKLKB1(Plasma Kallikrein protein)；からなる群より選択された一つ以上のマーカーを含むIPMNマーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む、高危険群IPMNの選別診断用組成物に関するものである。

40

**【0093】**

本発明のまた他の一実施形態は対象の試料に対して、前記IPMNマーカー蛋白質の発現水準またはこれを暗号化する遺伝子のmRNA発現水準をそれぞれ測定する段階、

前記測定されたマーカーの発現水準を、対照群マーカーの発現水準と比較する段階、および

前記マーカー発現水準の比較結果を用いて前記対象の高危険IPMN有無を決定する段階を含む、高危険群IPMNを診断する方法に関するものである。

**【0094】**

50

前記マーカーの発現水準を測定する段階以前に、対象がIPMNを有するか否かを確認する段階を追加的に含むことができる。前記確認する段階は、画像診断法、組織検査法または遺伝子マーカーを用いた方法によって遂行することができ、例えば、腹部超音波検査、腹部コンピュータ断層撮影(Computed tomography、CT)、内視鏡的逆行性膵胆管造影術(endoscopic retrograde cholangiopancreatography、ERCP)、磁気共鳴膵胆道造影術(magnetic resonance cholangiopancreatography、MRCP)、超音波内視鏡検査(Endoscopic ultrasonography、EUS)などを含むが、これに限定されるのではない。また、バイオマーカーを用いた診断は知られた膵臓癌診断マーカーであるCA-19-9などを用いて行うことができる。組織検査法はFNA(fine needle aspiration)生検などが挙げられる。

10

## 【0095】

前記対照群は正常群、IPMNと膵管腺癌腫を除いた膵臓疾患を有する患者、または低危険IPMNを有する対象である場合、前記IPMNマーカーを活用して正常人および多様な膵臓疾患と区別されるように高危険群IPMNを診断することができ、また対照群が低危険群IPMN患者である場合、低危険群IPMNと区別されるように高危険群IPMNを選別的に診断することができる。

## 【0096】

前記方法は、対象が高危険IPMNと決定された場合、外科的切除術、薬物投与などの処置方法を遂行する段階を追加的に含むことができる。

20

## 【0097】

前記方法は、対象が低危険IPMNと決定された場合、薬物投与、または予後のモニタリングなどの処理を遂行する段階を追加的に含むことができる。

## 【0098】

その他、前記IPMNマーカー、発現水準測定、および決定する段階などは前述のとおりである。

## 【0099】

以下、本発明を実施例を通じてさらに詳しく説明する。しかし、下記実施例は本発明を例示するためのものであって、本発明がこれら実施例によって制限されるわけではない。

30

## 【実施例】

## 【0100】

実施例1：実験のためのサンプルの準備

膵臓癌を効果的に診断するための蛋白質組み合わせを発掘するために、下記表2および表3のように、5ヶ病院の患者の同意下に膵臓癌、その他の癌、膵臓炎および胆嚢炎患者群(表2)と正常群(表3)を構成した。

## 【0101】

試験1は、PDAC区分試験のためのサンプル群として、対照群は正常、膵臓炎および胆嚢炎群から構成され、実験群は膵臓癌(PDAC)群から構成された。

## 【0102】

試験2は、PDAC初期病期区分試験のためのサンプル群として、対照群は正常、膵臓炎および胆嚢炎群から構成され、実験群は膵臓癌(PDAC)1期および2期群から構成された。

40

## 【0103】

試験3は、癌/膵臓癌選択性試験のためのサンプル群として、対照群はその他の癌群から構成され、実験群は膵臓癌群から構成された。その他の癌は乳癌52例、大腸癌45例、甲状腺癌52例である。

## 【0104】

試験4はCA19-9が臨床的に性能を発揮しない状態でのPDAC区分試験のためのサンプル群として、対照群はCA19-9の数値が37U/ml未満である正常、膵臓炎

50

および胆嚢炎群から構成され、実験群はCA19-9の数値が37U/ml未満である膵臓癌(PDAC)群から構成された。

【0105】

【表2】

区分	膵臓癌 (1/2/ 3/4期)	訓練セット *	試験1	試験2	試験3	試験4
合計	396	316	80	50	80	29
	(20/2 28/31 /117)	(16/1 82/25 /93)	(4/4 6/6/ 24)	(4/4 6/0/ 0)	(4/4 6/6/ 24)	(3/2 1/1/ 4)
AMC	75	60	15	15	15	10
	(10/6 3/1/ 1)	(8/50 /1/1)	(2/1 3/0/ 0)	(2/1 3/0/ 0)	(2/1 3/0/ 0)	(2/8 /0/0)
NCC	128	102	26	6	26	7
	(3/27 /25/7 3)	(2/22 /20/5 8)	(1/5 /5/1 5)	(1/5 /0/0)	(1/5 /5/1 5)	(1/3 /1/2)
SMC	96	76	19	10	19	5
	(1/50 /2/4 3)	(1/40 /1/3 4)	(0/1 0/1/ 9)	(0/1 0/0/ 0)	(0/1 0/1/ 9)	(0/3 /0/2)
SNU H	50	40	10	10	10	1
	(3/45 /2/0)	(2/36 /2/0)	(1/9 /0/0)	(1/9 /0/0)	(1/9 /0/0)	(0/1 /0/0)
YMC	47	38	9	9	9	6
	(3/43 /1/0)	(3/34 /1/0)	(0/9 /0/0)	(0/9 /0/0)	(0/9 /0/0)	(0/6 /0/0)

10

20

【0106】

【表3】

サンプル区分	機関	合計	訓練セ ット*	試験1	試験2	試験3	試験4
その 他の 癌	SMC	149	0	0	0	149	0
膵臓良 性疾患	AMC	47	33	14	14	0	14
	SMC	30	26	4	4	0	4
	SNU H	5	4	1	1	0	1
	YMC	27	25	2	2	0	2
	合計	109	88	21	21	0	21
胆嚢炎	SNU H	48	40	8	8	0	8
正常	SNU H	300	240	60	60	0	60

30

40

【0107】

- AMC: Asan Medical Center (ソウルアサン病院)
- NCC: National Cancer Center (国立癌センター)
- SMC: Samsung Medical Center (三星ソウル病院)
- SNUH: Seoul National University Hospital

50

(ソウル大学病院)

- YMC: Yonsei Medical Center (セブランス病院)

\* 訓練セットから導出された分類子 (classifier) で全ての試験遂行

【0108】

実施例2: MRM-MS方法による膵臓癌診断マーカー組み合わせの発掘および性能分析  
<2-1> 血液試料前処理

各血液試料40 $\mu$ lを除去カラム (depletion column) に通過させて血液の最も多い比率を占めている7個の蛋白質を欠失させ、3kDaフィルターで濃縮した後、BCA定量を行って、そのうちの200 $\mu$ gに該当する血漿を取って6Mウレア (urea) で変性させ、20mM DTTおよび50mM ヨード酢酸 (iodoacetic acid) を使用して還元およびアルキル化させた。ここにトリプシンを50:1 (蛋白質:トリプシン、w/w) の比率で37 $^{\circ}$ Cで16時間処理して蛋白質をペプチドに作った後、前記ペプチドをC18 OASISカラム (Waters, USA) を用いて脱塩し凍結乾燥した。前記凍結乾燥されたペプチドを溶液A (98%蒸留水、2%アセトニトリル、0.1%ホルム酸) に溶かし、これに対してMRM分析を行った。

【0109】

<2-2> トランジション選定

MRM分析を行うために、特定蛋白質の特徴的な電荷対質量比 ( $m/z$ ) を有するペプチドを選定し (Q1)、このペプチドを電気的な衝撃で断片化させた時に発生する様々な切片イオンのうちの該当ペプチドに対して特徴的な  $m/z$  を有する断片イオンを選定した (Q3)。このQ1とQ3の組み合わせは特定蛋白質に特異的なイオンの組み合わせであって、これをトランジションと称し、高分解能 (triple quadrupole) 質量分光分析器でこの特徴的なQ1とQ3でイオンを順次に通過させた時に得られる信号を定量的情報に換算して定量分析を行った。米国ワシントン大学のMacCosS研究チームが開発したスカイライン (SKYLine) という公開ソフトウェアを用いてNIST (National Institute of Standards and Technology) ライブラリーのペプチドタンデム質量スペクトル (peptide tandem mass spectra) を基盤にして  $m/s/m/s$  データが存在するペプチドに対して、総強度が高い順に1個の蛋白質当たり最大10個のペプチドを選定した。ペプチドの長さはアミノ酸最小7個から最大24個に選定した。

【0110】

但し、トリプシンによって切断されて生成できる全体ペプチドのうちの下記に該当するアミノ酸を含むか特定モチーフ (motif) を有するペプチドは次の通り信号値が良くないと知られているため除いた:

(a) 該当ペプチド内にメチオニンが存在する場合、生体内ROS (reactive oxygen species) によって酸化が発生し質量値が32Da増加;

(b) 該当ペプチド内にヒスチジンが存在する場合、R-グループの正電荷によって該当ペプチドの電荷状態が変わる;

(c) 該当ペプチド内にNxS/Tモチーフが存在する場合、N-糖化が発生し質量値が移動 (shift) する;

(d) 該当ペプチド内にトリプシンによって切られるRやKの次にプロリンが存在する場合、未切断 (missed cleavage) が発生することがある。

【0111】

前駆体 (precursor) 電荷は+2価電荷を有するペプチドを選定し、イオン電荷は+1価電荷、イオンタイプはy-イオンを使用した。蛋白質ブラスト (Protein Blast) Pおよびスカイライン (Skyline) プログラムを用いて独特のトランジションおよびペプチドを選別し、最終選別されたトランジションは予測する停滞時間 (Retention time, RT) 範囲内に属したのもののみを使用した。RT予測のために、600個のSISペプチドMRM分析を行い、これを通じて疎水性図表 (hydrophobicity scale) とRTクロマトグラムに基づいた検量線 (c

10

20

30

40

50

calibration curve)を計算した。

【0112】

<2-3> LCおよびMRM

LCはアジレント社の1260-毛細管LCを使用し、ペプチドの分離のために毛細管RR0.5×150の3.5umのカラムを使用した。試料は5μlを注入し、流速は20μl/分に設定した。まず、カラムをSol A(体積基準に95%蒸留水、5%アセトニトリル、0.1%ホルム酸)で10分間平衡化した後、Sol AとSol B(体積基準に5%蒸留水、95%アセトニトリル、0.1%ホルム酸)を50分間95:5から15:85まで、5分間15:85の体積比率で濃度勾配を加えてペプチドを溶出した。

10

【0113】

質量分析器(Mass spectrometer)としてアジレント社のtriple quadrupole 6490-QQQ装備を用いて選定蛋白質に対するトランジションに対してMRMモードでモニターした。バッチ(Batch)間偏差を補正するために各試料にスパイク(spiking)された5fmol-ガラクトシダーゼペプチド(GDFQFNISR[C13N15]、547.3/646.4)も同時にモニターした。

【0114】

<2-4> データ定量分析

定量性を確認するために、内部標準ペプチドである-ガラクトシダーゼペプチド(GDFQFNISR[C13N15]、547.3/646.4m/z)を0.09、0.27、0.82、2.5、7.4、22.2、66.7および200fmolにそれぞれ希釈した後、ここに標的ペプチド分析条件と同様に血漿10ugをマトリックスに入れて分析を行った。また、内因性(endogenous)信号を確認する目的で内部標準ペプチドを入れない場合も分析に含ませ、全ての9個の濃度点で3回繰り返してMRM定量し標準曲線(standard curve)を決定した。

20

【0115】

各個人別MRM結果は、スカイライン(MacCoss Lab、ver1.4.1)を用いて該当MRMトランジションのイオン抽出クロマトグラフィー(XIC、Extraction chromatography)を生成し、各トランジションのピーク面積を計算しこれを再び時間経過によって図式化した。さらに、各標的ペプチドに対するSIS(Stable isotope standard)ペプチドを合成して測定し、該当標的ペプチド測定値との比率を計算して血液内の量を各蛋白質別に定量分析した。

30

【0116】

前記MRM定量分析結果を用いて表1の方法で導出した4個の組み合わせマーカに含まれている蛋白質の膵臓癌患者群での発現様相は次の通りである。

【0117】

図1および2に示されているように、CA19-9およびLRG1蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に増加するのを確認することができ、前記CA19-9およびLRG1を膵臓癌診断用マーカーとして選抜した。

40

【0118】

図3乃至6に示されているように、TTR、CLUおよびKLKB1蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に減少するのを確認することができ、C1R蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に増加するのを確認することができた。

【0119】

実施例3: ELISA方法による膵臓癌診断用蛋白質組み合わせの発掘および性能分析

膵臓癌患者群および正常群を対象にしてLRG1、TTRおよびCLU蛋白質の発現量をELISA法によって測定した。LRG1の場合はIBL社のhLRG1 ELISAキットを使用し、TTRの場合はAssayPro社のプレアルブミンELISAキット

50

を使用し、CLUの場合はR&D Systems社のHuman Clusterin Quantikineキットを使用し、各ELISA測定は製造会社のプロトコルによって行った。

#### 【0120】

具体的に、実験する前にELISAキットと分析する検体を室温に置いた後、検体を専用希釈液で希釈（LRG1：1，000倍；TTR：80，000倍；CLU：2，091倍）した。各ウェルに標準、対照群および検体をそれぞれ50μlずつ分注した。各ウェルにカバーシーラーを覆って2時間室温に置いた後、各ウェルにある溶液を捨ててから蒸留水で洗浄する過程を4回繰り返した。その後、200μlのコンジュゲートを各ウェルに分注した。各ウェルに新たなカバーシーラーで覆って2時間室温に置いた後、蒸留水で洗浄する過程を4回繰り返した。その後、200μlの基質溶液を各ウェルに分注した後、室温に30分間置いた。その後、50μlの反応中止溶液を各ウェルに分注した後、540nmまたは570nmで吸光度を測定し、濃度値を計算して結果を整理した。

10

#### 【0121】

前記ELISA定量分析の結果、図7乃至9に示されているように、LRG1蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に増加し、TTR蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に減少し、CLU蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に減少することが確認され、これは実施例2のMRM-MS結果と同様であった。

#### 【0122】

実施例4：免疫比濁法（immunoturbidimetric assay）による膵臓癌診断用マーカーの発掘および性能分析

20

膵臓癌患者群および正常群を対象にしてTTR蛋白質の発現量を免疫比濁法（immunoturbidimetric assay）によって測定した。前記測定は、ロシュダイアグノスティクス（Roche Diagnostics）社のCOBAS INTEGRAL 800 Prealbuminを用いて製造社のプロトコルによって行った。

#### 【0123】

具体的に、実験する前に機器と分析する検体を室温に置いた後、検体を50μlずつ分注した。分注した検体を専用希釈液で4倍希釈した。前記希釈した検体200μlを機器に投入し、機器から出力する濃度値で結果を整理した。

30

#### 【0124】

前記免疫比濁法による定量分析の結果、図10に示されているように、TTR蛋白質の発現が正常群に比べて膵臓癌患者群において特異的に減少することが確認され、これは実施例2および3のMRM-MSおよびELISA結果と同様であった。

#### 【0125】

実施例5：MRM-MS方法によるCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーの診断性能

<5-1>PDAC区分のためのCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーの診断性能

40

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質はロシュダイアグノスティクス（Roche Diagnostics）社のCOBAS Elecsys CA 19-9機器を用いた化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）によって、LRG1およびTTR蛋白質はMRM定量分析によって測定した。

#### 【0126】

膵臓癌診断関数を用いた場合、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせの膵臓癌診断マーカーとしての性能をROCグラフのAUCと $S_n|_{s_p=0.9}$ で示した。ROCグラフは感度（sensitivity）と特異度（specificity）がどんな関係を有して変わるかを二次元平面上に表現したものであり、ROCグラフの下

50

の面積 (AUC; 0 AUC 1) が広いほど正確であると判断することができる。  $S_n |_{S_p=0.9}$  は特異度 (specificity) が 0.9 である時の感度 (sensitivity) 値であって、検出感度を示す数値であり、その値が大きいほど正確であると判断することができる。

【0127】

前記 AUC および  $S_n |_{S_p=0.9}$  の測定結果を表 4 および図 11 に示した。

【0128】

【表 4】

マーカー組み合わせ	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
CA19-9+LRG1+TTR	0.9312	0.8250
CA19-9+LRG1	0.9305	0.8125
CA19-9+TTR	0.8823	0.7125
LRG1+TTR	0.8027	0.5375
CA19-9	0.8259	0.7250
LRG1	0.7104	0.4375
TTR	0.6573	0.1375

10

【0129】

上記表 4 および図 11 に示されているように、本発明による CA19-9、LRG1 および TTR の組み合わせは、AUC が 0.9312 であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$  が 0.8250 であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA19-9、LRG1 および TTR の組み合わせは、CA19-9、LRG1 および TTR をそれぞれ単独で使用または 2 個ずつ組み合わせ使用するときより膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

20

【0130】

<5-2> PDAC 初期病期区分のための CA19-9、LRG1 および TTR 組み合わせマーカーの診断性能

実施例 2 の MRM-MS 方法を用いて、CA19-9、LRG1 および TTR の組み合わせマーカーの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記 CA19-9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) によって、LRG1 および TTR 蛋白質は MRM 定量分析によって測定した。前記 AUC および  $S_n |_{S_p=0.9}$  の測定結果を表 5 および図 12 に示した。

30

【0131】

【表 5】

試験区分	マーカー組み合わせ	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
5-2	CA19-9+LRG1+TTR	0.9070	0.7600
	CA19-9+TTR	0.8440	0.6400
	CA19-9	0.7924	0.6400
5-3	CA19-9+LRG1+TTR	0.8994	0.8250
	CA19-9+TTR	0.8494	0.7125
	CA19-9	0.7964	0.6875
5-4	CA19-9+LRG1+TTR	0.8295	0.5172
	CA19-9+TTR	0.6753	0.2069
	CA19-9	0.5198	0.2414

40

【0132】

上記表 5 および図 12 に示されているように、本発明による CA19-9、LRG1 お

50

よびTTRの組み合わせは、AUCが0.9070であり、 $Sn|_{Sp=0.9}$ が0.7600であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より膵臓癌初期病期診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

#### 【0133】

<5-3>癌/膵臓癌区分のためのCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカーの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびTTR蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $Sn|_{Sp=0.9}$ の測定結果を表5および図13に示した。

10

#### 【0134】

前記表5および図13に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.8994であり、 $Sn|_{Sp=0.9}$ が0.8250であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より癌/膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

20

#### 【0135】

<5-4>CA19-9<37U/mlの実験群を対象にしたCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーのPDAC区分診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能をCA19-9<37U/mlの実験群を対象に分析した。主に臨床では測定者のCA19-9測定値が37U/ml以上である時に膵臓癌と判断する。したがって、CA19-9<37U/mlの実験群ではCA19-9が膵臓癌診断マーカーとしての性能を発揮できない。前記CA19-9蛋白質はロシュダイアグノスティクス(Roche Diagnostics)社のCOBAS Elecsys CA 19-9機器を用いた化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびTTR蛋白質はMRM定量分析によって測定した。

30

#### 【0136】

膵臓癌診断関数を用いた場合、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせの膵臓癌診断マーカーとしての性能をROCグラフのAUCと $Sn|_{Sp=0.9}$ で示した。ROCグラフは感度(sensitivity)と特異度(specificity)がどんな関係を有して変わるかを二次元平面上に表現したものであり、ROCグラフの下の面積(AUC; 0 AUC 1)が広いほど正確であると判断することができる。 $Sn|_{Sp=0.9}$ は特異度(specificity)が0.9である時の感度(sensitivity)値であって、検出感度を示す数値であり、その値が大きいほど正確であると判断することができる。前記AUCおよび $Sn|_{Sp=0.9}$ の測定結果を表5および図14に示した。

40

#### 【0137】

前記表5および図14に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.8295であり、 $Sn|_{Sp=0.9}$ が0.5172であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

#### 【0138】

実施例6:ELISA方法によるCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカー

50

## 一の診断性能

実施例5でMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析したことをELISA方法で性能再現有無を確認し、ELISA方法でもCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは膵臓癌診断性能が優れているのを確認することができた。

## 【0139】

<6-1>PDAC区分のためのCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカの診断性能

実施例3のELISA方法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびTTR蛋白質はELISA方法によって測定した。

## 【0140】

前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表6および図15に示した。

## 【0141】

## 【表6】

試験区分	マーカー組み合わせ	AUC	$S_n _{S_p=0.9}$
6-1	CA19-9+LRG1+TTR	0.9315	0.8250
	CA19-9+TTR	0.9060	0.7750
	CA19-9	0.8259	0.7250
6-2	CA19-9+LRG1+TTR	0.9144	0.7800
	CA19-9+TTR	0.8937	0.7400
	CA19-9	0.7924	0.6400
6-3	CA19-9+LRG1+TTR	0.8981	0.8250
	CA19-9+TTR	0.8488	0.7750
	CA19-9	0.7964	0.6875
6-4	CA19-9+LRG1+TTR	0.8287	0.5172
	CA19-9+TTR	0.7408	0.3793
	CA19-9	0.5198	0.2414

## 【0142】

上記表6および図15に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.9315であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.8250であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0143】

<6-2>PDAC初期病期区分のためのCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカの診断性能

実施例3のELISA方法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびTTR蛋白質はELISA方法によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表6および図16に示した。

## 【0144】

前記表 6 および図 1 6 に示されているように、本発明による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは、AUC が 0.9144 であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$  が 0.7800 であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーである CA 1 9 - 9 を単独で使用した時より膵臓癌初期病期診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0145】

< 6 - 3 > 癌 / 膵臓癌区分のための CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR 組み合わせマーカーの診断性能

実施例 3 の ELISA 方法を用いて、CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせマーカーの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記 CA 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) によって、LRG 1 および TTR 蛋白質は ELISA 方法によって測定した。前記 AUC および  $S_n|_{S_p=0.9}$  の測定結果を表 6 および図 1 7 に示した。

10

【0146】

前記表 6 および図 1 7 に示されているように、本発明による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは、AUC が 0.8981 であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$  が 0.8250 であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーである CA 1 9 - 9 を単独で使用した時より癌 / 膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

20

【0147】

< 6 - 4 > CA 1 9 - 9 < 37 U / ml の実験群を対象にした CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR 組み合わせマーカーの PDAC 区分診断性能

実施例 3 の ELISA 方法を用いて、CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を CA 1 9 - 9 < 37 U / ml の実験群を対象にして分析した。主に臨床では測定者の CA 1 9 - 9 測定値が 37 U / ml 以上である時に膵臓癌と判断する。したがって、CA 1 9 - 9 < 37 U / ml の実験群では CA 1 9 - 9 が膵臓癌診断マーカーとしての性能を発揮できない。前記 CA 1 9 - 9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) によって、LRG 1 および TTR 蛋白質は ELISA 方法によって測定した。前記 AUC および  $S_n|_{S_p=0.9}$  の測定結果を表 6 および図 1 8 に示した。

30

【0148】

前記表 6 および図 1 8 に示されているように、本発明による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは、AUC が 0.8287 であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$  が 0.5172 であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーである CA 1 9 - 9 を単独で使用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0149】

実施例 7 : 免疫比濁法による CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR 組み合わせマーカーの診断性能

40

実施例 5 で MRM - MS 方法を用いて、CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を分析したことを免疫比濁法で性能再現有無を確認し、免疫比濁法でも CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせは膵臓癌診断性能が優れているのを確認することができた。

【0150】

< 7 - 1 > PDAC 区分のための CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR 組み合わせマーカーの診断性能

実施例 4 の免疫比濁法を用いて、CA 1 9 - 9、LRG 1 および TTR の組み合わせマ

50

ーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA方法によって、TTR蛋白質は免疫比濁法によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表7および図19に示した。

【0151】

【表7】

試験区分	マーカー組み合わせ	AUC	$S_n _{S_p=0.9}$
7-1	CA19-9+LRG1+TTR	0.9402	0.8250
	CA19-9+TTR	0.9001	0.7500
	CA19-9	0.8259	0.7250
7-2	CA19-9+LRG1+TTR	0.9146	0.7600
	CA19-9+TTR	0.8678	0.6800
	CA19-9	0.7924	0.6400
7-3	CA19-9+LRG1+TTR	0.8965	0.8250
	CA19-9+TTR	0.8367	0.7500
	CA19-9	0.7964	0.6875
7-4	CA19-9+LRG1+TTR	0.8439	0.5172
	CA19-9+TTR	0.7255	0.3103
	CA19-9	0.5198	0.2414

10

20

【0152】

上記表7および図19に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.9402であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.8250であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

30

【0153】

<7-2>PDAC初期病期区分のためのCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーの診断性能

実施例4の免疫比濁法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカーの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA方法によって、TTR蛋白質は免疫比濁法によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表7および図20に示した。

【0154】

前記表7および図20に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.9146であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.7600であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より膵臓癌初期病期診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

40

【0155】

<7-3>癌/膵臓癌区分のためのCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーの診断性能

実施例4の免疫比濁法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマ

50

ーカーの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA方法によって、TTR蛋白質は免疫比濁法によって測定した。前記AUCおよび $S n |_{S p = 0.9}$ の測定結果を表7および図21に示した。

【0156】

前記表7および図21に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.8965であり、 $S n |_{S p = 0.9}$ が0.8250であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より癌/膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

10

【0157】

<7-4> CA19-9 <37U/mlの実験群を対象にしたCA19-9、LRG1およびTTR組み合わせマーカーのPDAC区分診断性能

実施例4の免疫比濁法を用いて、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能をCA19-9 <37U/mlの実験群を対象にして分析した。主に臨床では測定者のCA19-9測定値が37U/ml以上である時に膵臓癌と判断する。したがって、CA19-9 <37U/mlの実験群ではCA19-9が膵臓癌診断マーカーとしての性能を発揮できない。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1蛋白質はELISA方法によって、TTR蛋白質は免疫比濁法によって測定した。前記AUCおよび $S n |_{S p = 0.9}$ の測定結果を表7および図22に示した。

20

【0158】

前記表7および図22に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは、AUCが0.8439であり、 $S n |_{S p = 0.9}$ が0.5172であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用する時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

30

【0159】

実施例8：MRM-MS方法によるCA19-9、LRG1およびC1R組み合わせマーカーの診断性能

<8-1> PDAC区分のためのCA19-9、LRG1およびC1R組み合わせマーカーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S n |_{S p = 0.9}$ の測定結果を表8および図23に示した。

40

【0160】

【表8】

マーカー組み合わせ	AUC	$S n  _{S p = 0.9}$
CA19-9+LRG1+C1R	0.9296	0.8375
CA19-9+TTR	0.8823	0.7125
CA19-9	0.8259	0.7250

【0161】

上記表8および図23に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは、AUCが0.9296であり、 $S n |_{S p = 0.9}$ が0.8375であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された

50

。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用する時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0162】

< 8 - 2 > PDAC初期病期区分のためのCA19-9、LRG1およびC1R組み合わせマーカーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせマーカーの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表9および図24に示した。

10

【0163】

【表9】

	AUC	$S_n _{S_p=0.9}$
CA19-9+LRG1+C1R	0.9097	0.7800
CA19-9+LRG1	0.9094	0.7400
CA19-9+C1R	0.8658	0.6600
LRG1+C1R	0.7297	0.3800
CA19-9	0.7924	0.6400
LRG1	0.6362	0.3800
C1R	0.5137	0.1400

20

【0164】

上記表9および図24に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは、AUCが0.9097であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.7800であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせはCA19-9、LRG1およびC1Rをそれぞれ単独または2個ずつ組み合わせで使用する時より膵臓癌初期病期診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

30

【0165】

< 8 - 3 > 癌/膵臓癌区分のためのCA19-9、LRG1およびC1R組み合わせマーカーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせマーカーの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表10および図25に示した。

【0166】

【表 10】

試験区分	組み合わせマーカ-	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
8-3	CA19-9+LRG1+C1R	0.9088	0.8375
	CA19-9+TTR	0.8494	0.7125
	CA19-9	0.7964	0.6875
8-4	CA19-9+LRG1+C1R	0.8160	0.5517
	CA19-9+TTR	0.6753	0.2069
	CA19-9	0.5198	0.2414

10

## 【0167】

上記表10および図25に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは、AUCが0.9088であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$ が0.8375であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカ-としての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは商用膵臓癌マーカ-であるCA19-9を単独で使用する時より癌/膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0168】

<8-4> CA19-9 <37U/mlの実験群を対象にしたCA19-9、LRG1およびC1R組み合わせマーカ-のPDAC区分診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせマーカ-の膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびC1R蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n |_{S_p=0.9}$ の測定結果を表10および図26に示した。

## 【0169】

前記表10および図26に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは、AUCが0.8160であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$ が0.5517であって、膵臓癌診断マーカ-としての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびC1Rの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカ-であるCA19-9を単独で利用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

20

30

## 【0170】

実施例9：MRM-MS方法によるCA19-9、LRG1およびCLU組み合わせマーカ-の診断性能

<9-1> PDAC区分のためのCA19-9、LRG1およびCLU組み合わせマーカ-の診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカ-の膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定された。前記AUCおよび $S_n |_{S_p=0.9}$ の測定結果を表11および図27に示した。

40

## 【0171】

【表 1 1】

マーカー	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
CA19-9+LRG1+CLU	0.9338	0.8500
CA19-9+LRG1	0.9305	0.8125
CA19-9+CLU	0.8662	0.7250
LRG1+CLU	0.8004	0.6125
CA19-9	0.8259	0.7250
LRG1	0.7104	0.4375
CLU	0.6456	0.2250

10

## 【0172】

上記表 1 1 および図 2 7 に示されているように、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは、AUC が 0.9338 であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$  が 0.8500 であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは CA19-9、LRG1 および CLU をそれぞれ単独または 2 個ずつ組み合わせ使用するときより膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0173】

< 9 - 2 > PDAC 初期病期区分のための CA19-9、LRG1 および CLU 組み合わせマーカーの診断性能

20

実施例 2 の MRM-MS 方法を用いて、CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせマーカーの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記 CA19-9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) によって、LRG1 および CLU 蛋白質は MRM 定量分析によって測定した。前記 AUC および  $S_n |_{S_p=0.9}$  の測定結果を表 1 2 および図 2 8 に示した。

## 【0174】

【表 1 2】

試験区分	マーカー組み合わせ	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
9-2	CA19-9+LRG1+CLU	0.9027	0.7800
	CA19-9+TTR	0.8440	0.6400
	CA19-9	0.7924	0.6400
9-3	CA19-9+LRG1+CLU	0.9093	0.8500
	CA19-9+TTR	0.8494	0.7125
	CA19-9	0.7964	0.6875
9-4	CA19-9+LRG1+CLU	0.8384	0.5862
	CA19-9+TTR	0.6753	0.2069
	CA19-9	0.5198	0.2414

30

40

## 【0175】

上記表 1 2 および図 2 8 に示されているように、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは、AUC が 0.9027 であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$  が 0.7800 であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーである CA19-9 を単独で使用する時より膵臓癌初期病期を診断する性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0176】

< 9 - 3 > 癌 / 膵臓癌区分のための CA19-9、LRG1 および CLU 組み合わせマーカー

50

### カーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表12および図29に示した。

#### 【0177】

前記表12および図29に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせは、AUCが0.9093であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.8500であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせは商用膵臓癌マーカであるCA19-9を単独で使用する時より癌/膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

10

#### 【0178】

<9-4> CA19-9 <37U/mlの実験群を対象にしたCA19-9、LRG1およびCLU組み合わせマーカのPDAC区分診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はMRM定量分析によって測定された。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表12および図30に示した。

20

#### 【0179】

前記表12および図30に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせは、AUCが0.8384であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.5862であって、膵臓癌診断マーカとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカであるCA19-9を単独で利用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

#### 【0180】

実施例10: ELISA方法によるCA19-9、LRG1およびCLU組み合わせマーカの診断性能

30

実施例9でMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析したことをELISA方法で性能再現有無を確認し、ELISA方法でもCA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせは膵臓癌診断性能が優れているのを確認することができた。

#### 【0181】

<10-1> PDAC区分のためのCA19-9、LRG1およびCLU組み合わせマーカの診断性能

実施例3のELISA方法を用いて、CA19-9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA定量分析によって測定された。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表13および図31に示した。

40

#### 【0182】

【表 1 3】

	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
CA19-9+LRG1+CLU	0.9399	0.8000
CA19-9+LRG1	0.9323	0.8000
CA19-9+CLU	0.8980	0.8000
LRG1+CLU	0.8607	0.5750
CA19-9	0.8259	0.7250
LRG1	0.8320	0.5750
CLU	0.7083	0.3000

10

## 【0183】

上記表 1 3 および図 3 1 に示されているように、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは、AUC が 0.9399 であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$  が 0.8000 であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは CA19-9、LRG1 および CLU をそれぞれ単独または 2 個ずつ組み合わせ使用するときより膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0184】

< 1 0 - 2 > PDAC 初期病期区分のための CA19-9、LRG1 および CLU 組み合わせマーカーの診断性能

20

実施例 3 の ELISA 方法を用いて、CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせマーカーの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記 CA19-9 蛋白質は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) によって、LRG1 および CLU 蛋白質は ELISA 定量分析によって測定した。前記 AUC および  $S_n |_{S_p=0.9}$  の測定結果を表 1 4 および図 3 2 に示した。

## 【0185】

【表 1 4】

試験区分	マーカー組み合わせ	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$
1 0 - 2	CA19-9+LRG1+CLU	0.9193	0.7000
	CA19-9+TTR	0.8937	0.7400
	CA19-9	0.7924	0.6400
1 0 - 3	CA19-9+LRG1+CLU	0.9079	0.8000
	CA19-9+TTR	0.8488	0.7750
	CA19-9	0.7964	0.6875
1 0 - 4	CA19-9+LRG1+CLU	0.8435	0.4828
	CA19-9+TTR	0.6753	0.2069
	CA19-9	0.5198	0.2414

30

40

## 【0186】

上記表 1 4 および図 3 2 に示されているように、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは、AUC が 0.9193 であり、 $S_n |_{S_p=0.9}$  が 0.7000 であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による CA19-9、LRG1 および CLU の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーである CA19-9 を単独で使用する時より膵臓癌初期病期を診断する性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0187】

50

< 10 - 3 > 癌 / 膵臓癌区分のためのCA19 - 9、LRG1およびCLU組み合わせマーカの診断性能

実施例3のELISA方法を用いて、CA19 - 9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19 - 9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n | S_p = 0.9$ の測定結果を表14および図33に示した。

【0188】

前記表14および図33に示されているように、本発明によるCA19 - 9、LRG1およびCLUの組み合わせは、AUCが0.9079であり、 $S_n | S_p = 0.9$ が0.8000であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19 - 9、LRG1およびCLUの組み合わせは商用膵臓癌マーカであるCA19 - 9を単独で使用する時より癌 / 膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0189】

< 10 - 4 > CA19 - 9 < 37 U / ml の実験群を対象にしたCA19 - 9、LRG1およびCLU組み合わせマーカのPDAC区分診断性能

実施例3のELISA方法を用いて、CA19 - 9、LRG1およびCLUの組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19 - 9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびCLU蛋白質はELISA定量分析によって測定された。前記AUCおよび $S_n | S_p = 0.9$ の測定結果を表14および図34に示した。

【0190】

前記表14および図34に示されているように、本発明によるCA19 - 9、LRG1およびCLUの組み合わせは、AUCが0.8435であり、 $S_n | S_p = 0.9$ が0.4828であって、膵臓癌診断マーカとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19 - 9、LRG1およびCLUの組み合わせは商用膵臓癌診断マーカであるCA19 - 9を単独で利用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0191】

実施例11:MRM - MS方法によるCA19 - 9、LRG1およびKLKB1組み合わせマーカの診断性能

< 11 - 1 > PDAC区分のためのCA19 - 9、LRG1およびKLKB1組み合わせマーカの診断性能

実施例2のMRM - MS方法を用いて、CA19 - 9、LRG1およびKLKB1の組み合わせマーカの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19 - 9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n | S_p = 0.9$ の測定結果を表15および図35に示した。

【0192】

【表15】

	AUC	$S_n   S_p = 0.9$
CA19 - 9 + LRG1 + KLKB1	0.9382	0.8625
CA19 - 9 + LRG1	0.9305	0.8125
CA19 - 9 + KLKB1	0.8744	0.7250
LRG1 + KLKB1	0.8608	0.7000
CA19 - 9	0.8259	0.7250
LRG1	0.7104	0.4375
KLKB1	0.6076	0.1750

10

20

30

40

50

## 【0193】

上記表15および図35に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせは、AUCが0.9382であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.8625であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせはCA19-9、LRG1およびKLKB1をそれぞれ単独または2個ずつ組み合わせて使用する時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0194】

<11-2> PDAC 初期病期区分のためのCA19-9、LRG1およびKLKB1組み合わせマーカーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせマーカーの膵臓癌初期病期区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定された。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表16および図36に示した。

## 【0195】

## 【表16】

試験区分	マーカー組み合わせ	AUC	$S_n _{S_p=0.9}$
11-2	CA19-9+LRG1+KLKB1	0.9148	0.8000
	CA19-9+TTR	0.8440	0.6400
	CA19-9	0.7924	0.6400
11-3 Table	CA19-9+LRG1+KLKB1	0.8924	0.8625
	CA19-9+TTR	0.8494	0.7125
	CA19-9	0.7924	0.6400
11-4	CA19-9+LRG1+KLKB1	0.8349	0.6207
	CA19-9+TTR	0.6753	0.2069
	CA19-9	0.5198	0.2414

## 【0196】

上記表16および図36に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせは、AUCが0.9148であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.8000であって、膵臓癌初期病期区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用する時より膵臓癌初期病期診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

## 【0197】

<11-3> 癌/膵臓癌区分のためのCA19-9、LRG1およびKLKB1組み合わせマーカーの診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせマーカーの癌および膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびKLKB1蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $S_n|_{S_p=0.9}$ の測定結果を表16および図37に示した。

## 【0198】

前記表16および図37に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLKB1の組み合わせは、AUCが0.8924であり、 $S_n|_{S_p=0.9}$ が0.8625であって、癌と膵臓癌区分のための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLKB1

の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より癌/膵臓癌区分性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0199】

<11-4> CA19-9 <37U/ml>の実験群を対象にしたCA19-9、LRG1およびKLB1組み合わせマーカーのPDAC区分診断性能

実施例2のMRM-MS方法を用いて、CA19-9、LRG1およびKLB1の組み合わせマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびKLB1蛋白質はMRM定量分析によって測定した。前記AUCおよび $Sn|_{Sp=0.9}$ の測定結果を表16および図38に示した。

10

【0200】

前記表16および図38に示されているように、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLB1の組み合わせは、AUCが0.8349であり、 $Sn|_{Sp=0.9}$ が0.6207であって、膵臓癌診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるCA19-9、LRG1およびKLB1の組み合わせは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より膵臓癌診断性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0201】

実施例12：膵臓癌診断 - データ統計分析

<12-1> CA19-9 + LRG1 + TTR

20

統計分析のためにSVM(Support Vector Machine)を用いた。SVMはラグランジュ最適化理論(Lagrangian optimization theory)に基づいて与えられた条件を満足する関数を推定するアルゴリズムであって、この中の最大マージン分類子(Maximum margin classifier)を使用する分類分析方法を使用する場合をサポートベクター分類(Support Vector Classification, SVC)という。本実施例では二つのサンプル群のうちの一つのサンプル群を使用し、該当サンプル群内の二つの集団(正常集団と癌患者集団)間差を最大にするSVCを機械学習を通じて導出して下記のような膵臓癌診断関数を構成した。

【0202】

30

【数3】

$$f(x) = \operatorname{sgn}\left(\sum_{i=1}^n a_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

$x$  は、膵臓癌診断用マーカーの発現水準測定値、

$a_i$  は、SVMにおけるラグランジュ乗数、

$y_i$  は、正常群/膵臓癌群の識別子、

$x_i$  は、基準測定値を、そして

$b$  は補正値を意味する。

40

【0203】

上記の式において、関数値が1であれば膵臓癌と、-1であれば正常と判断する。前記関数を用いて膵臓癌有無を判断した。

【0204】

具体的に、3名の正常対照群からCA19-9測定値、TTRおよびLRG1のMRM定量値としてそれぞれ(7.4、1.451、3.2359)、(6.3、1.0718、2.136)および(26.1、1.2053、3.1797)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(7.4, 1.451, 3.2359) = -1$ 、 $f(6.3, 1.0718, 2.136) = -1$ 、 $f(26.1, 1.2053, 3.1797) = -1$ と計算され、前記対象を正常と判別することができた。

50

## 【0205】

また、3名の膵臓癌患者からCA19-9測定値、TTRおよびLRG1のMRM定量値としてそれぞれ(45318、4.898、1.2514)、(145、2.4608、1.6616)と(889、2.5153、1.5474)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(45318, 4.898, 1.2514) = 1$ 、 $f(145, 2.4608, 1.6616) = 1$ 、 $f(889, 2.5153, 1.5474) = 1$ と計算され、前記対象を膵臓癌と判別することができた。

## 【0206】

<12-2> CA19-9 + LRG1 + C1R

統計分析のためにSVM(Support Vector Machine)に基づいた関数式1を用いて膵臓癌有無を判断した。

10

## 【0207】

3名の正常対照群からCA19-9測定値、LRG1およびC1RのMRM定量値としてそれぞれ(7.4、1.451、1.0748)、(6.3、1.0718、0.4531)および(26.1、1.2053、1.0929)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(7.4, 1.451, 1.0748) = -1$ 、 $f(6.3, 1.0718, 0.4531) = -1$ 、 $f(26.1, 1.2053, 1.0929) = -1$ と計算され、前記対象を正常と判別することができた。

## 【0208】

また、3名の膵臓癌患者からCA19-9測定値、LRG1およびC1RのMRM定量値としてそれぞれ(45318、4.893、1.3742)、(145、2.4608、1.483)と(889、2.5153、1.474)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(45318, 4.893, 1.3742) = 1$ 、 $f(145, 2.4608, 1.483) = 1$ 、 $f(889, 2.5153, 1.474) = 1$ と計算され、前記対象を膵臓癌と判別することができた。

20

## 【0209】

<12-3> CA19-9 + LRG1 + CLU

統計分析のためにSVM(Support Vector Machine)に基づいた関数式1を用いて膵臓癌有無を判断した。3名の正常対照群からCA19-9測定値、LRG1およびCLUのMRM定量値としてそれぞれ(7.4、1.451、3.3803)、(6.3、1.0718、3.1325)および(26.1、1.2053、2.8642)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(7.4, 1.451, 3.3803) = -1$ 、 $f(6.3, 1.0718, 3.1325) = -1$ 、 $f(26.1, 1.2053, 2.8642) = -1$ と計算され、前記対象を正常と判別することができた。

30

## 【0210】

また、3名の膵臓癌患者からCA19-9測定値、LRG1およびCLUのMRM定量値としてそれぞれ(45318、4.893、1.6821)、(145、2.4608、2.545)と(889、2.5153、1.5101)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(45318, 4.893, 1.6821) = 1$ 、 $f(145, 2.4608, 2.545) = 1$ 、 $f(889, 2.5153, 1.5101) = 1$ と計算され、前記対象を膵臓癌と判別することができた。

40

## 【0211】

<12-4> CA19-9 + LRG1 + KLB1

統計分析のためにSVM(Support Vector Machine)に基づいた関数式1を用いて膵臓癌有無を判断した。3名の正常対照群からCA19-9測定値、LRG1およびKLB1のMRM定量値としてそれぞれ(7.4、1.451、1.2801)、(6.3、1.0718、0.961)および(26.1、1.2053、1.5657)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(7.4, 1.451, 1.2801) = -1$ 、 $f(6.3, 1.0718, 0.961) = -1$

50

、 $f(26.1, 1.2053, 1.5657) = -1$ と計算され、前記対象を正常と判別することができた。

【0212】

また、3名の膵臓癌患者からCA19-9測定値、LRG1およびKLKB1のMRM定量値としてそれぞれ(45318、4.893、0.555)、(145、2.4608、0.5347)と(889、2.5153、0.8084)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(45318, 4.893, 0.555) = 1$ 、 $f(145, 2.4608, 0.5347) = 1$ 、 $f(889, 2.5153, 0.8084) = 1$ と計算され、前記対象を膵臓癌と判別することができた。

【0213】

実施例13：膵臓癌初期病期診断 - データ統計分析

統計分析のためにSVM(Support Vector Machine)に基づいた関数式1を用いて膵臓癌初期病期有無を判断した。3名の正常対照群からCA19-9測定値、LRG1およびKLKB1のMRM定量値としてそれぞれ(7.4、1.451、1.2801)、(6.3、1.0718、0.961)および(26.1、1.2053、1.5657)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(7.4, 1.451, 1.2801) = -1$ 、 $f(6.3, 1.0718, 0.961) = -1$ 、 $f(26.1, 1.2053, 1.5657) = -1$ と計算され、前記対象を正常と判別することができた。

【0214】

また、3名の膵臓癌初期病期患者からCA19-9測定値、LRG1およびKLKB1のMRM定量値としてそれぞれ(154.52、4.0994、1.2722)、(190.16、4.5008、0.7645)と(1052.8、3.5696、0.6775)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(154.52, 4.0994, 1.2722) = 1$ 、 $f(190.16, 4.5008, 0.7645) = 1$ 、 $f(1052.8, 3.5696, 0.6775) = 1$ と計算され、前記対象を膵臓癌初期病期患者と判別することができた。

【0215】

実施例14：膵臓癌とその他の癌の区分診断 - データ統計分析

統計分析のためにSVM(Support Vector Machine)に基づいた関数式1を用いて膵臓癌初期病期有無を判断した。3名のその他の癌患者からCA19-9測定値、LRG1およびKLKB1のMRM定量値としてそれぞれ(8、1.3985、0.7085)、(10.68、0.9864、0.776)および(7.32、1.1431、0.9214)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(8, 1.3985, 0.7085) = -1$ 、 $f(10.68, 0.9864, 0.776) = -1$ 、 $f(7.32, 1.1431, 0.9214) = -1$ と計算され、前記対象をその他の癌患者と判別することができた。

【0216】

また、3名の膵臓癌患者からCA19-9測定値、LRG1およびKLKB1のMRM定量値としてそれぞれ(280.72、4.0849、0.9165)、(4000、5.7558、0.7216)と(120.32、6.2917、0.555)を得て、これを前記診断関数に代入した結果、関数値がそれぞれ $f(154.52, 4.0994, 1.2722) = 1$ 、 $f(190.16, 4.5008, 0.7645) = 1$ 、 $f(1052.8, 3.5696, 0.6775) = 1$ と計算され、前記対象を膵臓癌患者と判別することができた。

【0217】

実施例15：実験のためのサンプルの準備

悪性亜型(malignant subtype)のIPMNを効果的に探知するために、下記表17のように、ソウル大学病院の患者の同意下に正常群と実験群(高危険群)に区分した。

## 【0218】

試験5は、高異形成(High grade dysplasia)と侵襲型(invasive type)を高危険(malignant)亜型IPMN実験群として構成し、軽異形成(low dysplasia)IPMN、中等異形成(intermediate dysplasia)IPMN、正常群および良性炎症同伴疾患患者としての胆石症患者を対照群として構成した。

## 【0219】

試験6は、MMS分析方法によって高危険群と低危険群を選別探知するかどうかを確認するために、高異形成(High grade dysplasia)と侵襲型(invasive type)を、高危険(malignant(悪性?))亜型IPMN実験群を軽異形成(low dysplasia)IPMNおよび中等異形成(intermediate dysplasia)IPMNと選別探知するための実験群として構成した。

## 【0220】

試験7は、ELISA分析方法によって高危険群と低危険群を選別探知するかどうかを確認するために、高異形成(High grade dysplasia)と侵襲型(invasive type)を、高危険(malignant(悪性?))亜型IPMN実験群を軽異形成(low dysplasia)IPMNおよび中等異形成(intermediate dysplasia)IPMNと選別探知するための実験群として構成した。

## 【0221】

## 【表17】

項目	グループ	サンプル種類	サンプル数
試験5	実験群	高危険IPMN (High/Invasive)	17 (8/9)
	対照群	良性IPMN (Low/Intermediate)	16 (6/10)
		胆石症	22
		正常人	24
		総計	79
試験6	高危険IPMN	高危険IPMN (High/Invasive)	17 (8/9)
	低危険IPMN	良性IPMN (Low/Intermediate)	16 (6/10)
		総計	33
試験7	高危険IPMN	高危険IPMN (High/Invasive)	25 (13/12)
	低危険IPMN	良性IPMN (Low/Intermediate)	18 (11/7)
		総計	43

## 【0222】

実施例16：MRM-MS方法による高危険IPMNの探知

実施例2のMRM-MS方法を用いて、下記表32のマーカ-の高危険IPMNに対する診断性能を分析した。前記CA19-9蛋白質はロシュダイアグノスティクス(Roche Diagnostics)社のCOBAS Elecsys CA 19-9機器を用いた化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)によって、LRG1およびTTR蛋白質はMRM定量分析によって測定した。

## 【0223】

膵臓癌診断関数のような方法で診断関数を用いた場合、CA19-9、LRG1およびTTRの組み合わせの診断マーカ-としての性能をROCグラフのAUCと $Sn|_{Sp=}$

0.9で示した。ROCグラフは感度(sensitivity)と特異度(specificity)がどんな関係を有して変わるかを二次元平面上に表現したものであり、ROCグラフの下の面積(AUC; 0 < AUC < 1)が広いほど正確であると判断することができる。Sn|Sp = 0.9は特異度(specificity)が0.9である時の感度(sensitivity)値であって、検出感度を示す数値であり、その値が大きいほど正確であると判断することができる。

## 【0224】

前記AUCおよびSn|Sp = 0.9の測定結果を表18および図39乃至図63に示した。

## 【0225】

10

## 【表18】

マーカー	AUC	Sn Sp = 0.9	結果図面
CA19-9	0.6948	0.2000	**
LRG1	0.7375	0.4000	39
LRG1+CA19-9	0.8438	0.5333	40
LRG1+TTR	0.9479	0.7333	41
LRG1+CLU	0.8146	0.6000	42
LRG1+C1R	0.8448	0.7333	43
LRG1+KLKB1	0.8969	0.7333	44
LRG1+CA19-9+TTR	0.9500	0.9333	45
LRG1+CA19-9+CLU	0.9104	0.8667	46
LRG1+CA19-9+C1R	0.8708	0.6667	47
LRG1+CA19-9+KLKB1	0.8938	0.8667	48
LRG1+TTR+CLU	0.9653	0.8667	49
LRG1+TTR+C1R	0.9542	0.7333	50
LRG1+TTR+KLKB1	0.9010	0.8000	51
LRG1+CLU+C1R	0.9542	0.8000	52
LRG1+CLU+KLKB1	0.9031	0.8667	53
LRG1+C1R+KLKB1	0.8500	0.7333	54
CLU+CA19-9	0.8479	0.7333	55
CLU+TTR	0.8885	0.6000	56
CLU+KLKB1	0.8656	0.7333	57
CLU+CA19-9+TTR	0.9365	0.6667	58
CLU+CA19-9+C1R	0.8229	0.6000	59
CLU+CA19-9+KLKB1	0.8969	0.7333	60
CLU+TTR+C1R	0.9062	0.6667	61
CLU+TTR+KLKB1	0.8604	0.6667	62
CLU+C1R+KLKB1	0.8917	0.8000	63

20

30

## 【0226】

上記表18および図39乃至図63に示されているように、本発明によるマーカーまたは2以上のマーカー組み合わせは、対照群と区別されるように高危険群IPMNを選別的に探知するための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による組み合わせマーカーは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より高危険群IPMN探知性能がさらに優れているのを確認することができた。

40

## 【0227】

実施例17：MRM-MS方法による低危険IPMNと高危険IPMNの選別探知

低危険IPMNと高危険IPMNを区別して探知するために、実施例15の試料試験6に対して、実施例16のMMS分析法と実質的に同様な方法で下記表19に示す試験を行った。前記AUCおよびSn|Sp = 0.9の測定結果を表19および図64乃至図89

50

に示した。

【0228】

【表19】

150	AUC	$S_n  _{s_p=0.9}$	結果図面
CA19-9	0.6296	0.2000	**
LRG1	0.7148	0.2667	64
LRG1+CA19-9	0.8333	0.4667	65
LRG1+TTR	0.8704	0.4000	66
LRG1+CLU	0.8222	0.4667	67
LRG1+C1R	0.8593	0.4000	68
LRG1+KLKB1	0.8630	0.4000	69
CA19-9+LRG1+TTR	0.9074	0.6000	70
CA19-9+LRG1+C1R	0.9000	0.6000	71
CA19-9+LRG1+CLU	0.8667	0.6000	72
CA19-9+LRG1+KLKB1	0.9037	0.8000	73
LRG1+TTR+CLU	0.8407	0.4667	74
LRG1+TTR+C1R	0.8185	0.4667	75
LRG1+TTR+KLKB1	0.8815	0.3333	76
LRG1+CLU+C1R	0.8963	0.6000	77
LRG1+CLU+KLKB1	0.8889	0.4000	78
LRG1+C1R+KLKB1	0.9074	0.6000	79
CLU+CA19-9	0.7407	0.4000	80
CLU+TTR	0.7333	0.3333	81
CLU+C1R	0.7778	0.6000	82
CLU+KLKB1	0.8111	0.3333	83
CLU+CA19-9+TTR	0.8741	0.6000	84
CLU+CA19-9+C1R	0.8185	0.7333	85
CLU+CA19-9+KLKB1	0.8741	0.6000	86
CLU+TTR+C1R	0.8481	0.3333	87
CLU+TTR+KLKB1	0.8333	0.4000	88
CLU+C1R+KLKB1	0.8889	0.6000	89

【0229】

上記表19および図64乃至図89に示されているように、本発明によるマーカーまたは2以上のマーカー組み合わせは、低危険群IPMNと区別されるように高危険群IPMNを選別的に探知するための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明による組み合わせマーカーは商用膵臓癌診断マーカーであるCA19-9を単独で使用した時より高危険群IPMN探知性能がさらに優れているのを確認することができた。

【0230】

実施例18：ELISA方法による低危険IPMNと高危険IPMNの選別探知

実施例17でMRM-MS方法を用いてマーカーの膵臓癌区分に対する診断性能を分析したことをELISA方法で性能再現有無を確認し、ELISA方法でも表20のマーカー組み合わせは高危険IPMNの区別診断性能が優れているのを確認することができた。

【0231】

具体的に、低危険IPMNと高危険IPMNを区別して探知するために、実施例15の試験7に対して、実施例6のELISA分析法と実質的に同様な方法で下記表20に示す試験を行った。前記AUCおよび $S_n |_{s_p=0.9}$ の測定結果を表34および図90乃至図100に示した。

【0232】

【表 20】

150	AUC	$S_n  _{S_p=0.9}$	結果図面
CA19-9	0.5667	0.2800	**
LRG1	0.6978	0.3600	90
LRG1+CA19-9	0.8067	0.6400	91
LRG1+TTR	0.7356	0.1600	92
LRG1+CLU	0.8244	0.6400	93
LRG1+CA19-9+TTR	0.8511	0.6000	94
LRG1+CA19-9+CLU	0.8689	0.5600	95
LRG1+CA19-9+TTR+CLU	0.8578	0.6000	96
LRG1+TTR+CLU	0.8511	0.5200	97
CLU+CA19-9	0.7889	0.4800	98
CLU+TTR	0.8178	0.5600	99
CLU+CA19-9+TTR	0.7911	0.1200	100

10

## 【0233】

上記表 20 および図 90 乃至図 100 に示されているように、本発明によるマーカーまたは 2 以上のマーカー組み合わせは低危険群 IPMN と区別されるように高危険群 IPMN を選別的に探知するための診断マーカーとしての性能が非常に優れていることが確認された。特に、本発明によるマーカーは商用膵臓癌診断マーカーである CA19-9 を単独で使用した時より高危険群 IPMN 探知性能がさらに優れているのを確認することができた。

20

以下、本発明の実施形態を示す。

(1) (a) CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、(b) LRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG) および (c) TTR (Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA); C1R (Complement C1r subcomponent precursor)、CLU (Clusterin preproprotein) および KLKB1 (Plasma Kallikrein protein; ) からなる群より選択された一つ以上のマーカーを含む膵臓癌診断用マーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子の mRNA の発現水準を測定する製剤を含む、膵臓癌診断用組成物。

30

(2) 前記膵臓癌診断は、正常群と区別して膵臓癌を選別的に検出するか、多様な癌のうちの膵臓癌を選別的に検出するか、CA19-9 の数値が 37 U/ml 未満である膵臓癌を検出することである (1) に記載の組成物。

(3) 前記膵臓癌は、膵管腺癌腫または高危険群膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) である (1) に記載の組成物。

(4) 前記膵管腺癌腫は、1 期または 2 期の膵管腺癌腫である (3) に記載の組成物。

40

(5) 膵管腺癌腫は、IPMN 由来したものではない (3) に記載の組成物。

(6) 前記 LRG1 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_443204.1 のアミノ酸配列を含み、前記 TTR 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_000362.1 のアミノ酸配列を含み、前記 C1R 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_001724.3 のアミノ酸配列を含み、前記 CLU 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_001822.3 のアミノ酸配列を含み、前記 KLKB1 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_000883.2 アミノ酸配列を含む (1) に記載の組成物。

(7) 前記マーカー蛋白質の発現水準を測定する製剤が前記蛋白質に特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガンド、PNA (peptide nucleic acid)

50

またはアプタマー (aptamer) を含むことを特徴とする、(1)に記載の膵臓癌診断用組成物。

(8)前記マーカーmRNAの発現水準を測定する製剤が前記遺伝子に特異的に結合するプライマー、プローブまたはアンチセンスヌクレオチドを含むことを特徴とする、(1)に記載の膵臓癌診断用組成物。

(9)(1)乃至(8)のうちのいずれか一による組成物を含む、膵臓癌診断用キット。  
(10)前記キットがRT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)キット、DNAチップキット、ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)キット、蛋白質チップキット、ラピッド(rapid)キットまたはMRM(Multiple reaction monitoring)キットであることを特徴とする、(9)に記載の膵臓癌診断用キット。

(11)対象の試料での少なくとも3種以上の膵臓癌マーカー蛋白質の発現水準またはこれを暗号化する遺伝子のmRNA発現水準を測定する段階、前記測定された各マーカーの発現水準を、それぞれ正常対照群試料から得られたマーカーの発現水準と比較する段階、および前記発現水準の比較結果を用いて前記対象の膵臓癌発病危険性を決定する段階を含み、前記少なくとも3種以上の膵臓癌マーカーは、(a)CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)、(b)LRG1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG)および(c)TTR(Transthyretin、ATTR、Prealbumin、TBPA);C1R(Complement C1r subcomponent precursor)、CLU(Clusterin preproprotein)およびKLKB1(Plasma Kallikrein protein;)からなる群より選択された一つ以上のマーカーを含む膵臓癌診断用マーカーである、膵臓癌の診断方法。

(12)前記決定段階は、前記マーカーの発現水準を比較した結果、測定対象の試料での(a)CA19-9および(b)LRG1発現水準がそれぞれ正常対照群での発現水準より高く、測定対象の試料での(c)TTR、CLU、およびKLKB1発現水準が正常対照群での発現水準より低いか、測定対象の試料でのC1Rの発現水準が正常対照群での発現水準より高い場合、膵臓癌と決定する、(11)に記載の膵臓癌の診断方法。

(13)前記膵臓癌の決定段階は、前記マーカーの発現水準を下記関数式1に代入して膵臓癌発病可能性を判定する段階を含む、(11)に記載の膵臓癌の診断方法：

<関数式1>

【数4】

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

上記の式において、

$x$  は膵臓癌マーカーのうちのいずれか一つの発現水準測定値、

$\alpha_i$  はSVM(Support Vector Machine)におけるラグランジュ乗数、

$y_i$  は正常群/膵臓癌群の識別子、

$x_i$  は基準測定値、そして

$b$  は補正值を意味する。

(14)前記試料が血液、血清または血漿である、(11)に記載の膵臓癌の診断方法。

(15)前記マーカーの発現水準測定が該当蛋白質にそれぞれ特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガンド、PNA(peptide nucleic acid)またはアプタマー(aptamer)を用いることである、(11)に記載の膵臓癌の診断方法。

(16)前記マーカーの発現水準測定または比較が、蛋白質チップ分析、免疫測定法、リ

10

20

30

40

50

ガンドバイディングアッセイ、MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、放射免疫測定、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体結合分析法、二次元電気泳動分析、液体クロマトグラフィー-質量分析 (liquid chromatography - Mass Spectrometry、LC-MS)、LC-MS/MS (liquid chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)、ウエスタンブロット法およびELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) からなる群より選択されるものを用いて行われる、(11) に記載の膵臓癌の診断方法。

10

(17) 前記mRNA発現水準測定が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、競合的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ (RPA)、ノーザンブロットイングまたはDNAチップによって行われる、(11) に記載の膵臓癌の診断方法。

(18) 前記膵臓癌は膵管腺癌腫 (PDAC) 可能性を有する対象である (11) に記載の方法。

(19) 前記膵管腺癌腫は、IPMN由来の膵管腺癌腫である (18) に記載の方法。

20

(20) 前記膵臓癌診断は、正常群および癌以外の膵臓関連疾患と区別して膵臓癌を選別的に検出するか、多様な癌のうちの膵臓癌を選別的に検出するか、CA19-9の数値が37U/ml未満である膵臓癌を検出することである (11) に記載の方法。

(21) 前記膵臓癌診断は、膵臓炎および胆嚢炎からなる群れより選択された1種以上の膵臓関連疾患から膵臓癌を選別的に検出することである (20) に記載の方法。

(22) 前記膵臓癌は、膵管腺癌腫または高危険群膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) である (11) に記載の方法。

(23) LRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1) を含む膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) マーカー蛋白質またはこれを暗号化する遺伝子のmRNAの発現水準を測定する製剤を含む、高危険群IPMNの選別診断用組成物。

30

(24) 前記組成物は、低危険群IPMNと区別して高危険群IPMNを選別するものである (23) に記載の組成物。

(25) 前記IPMNマーカーは、CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、TTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択された1種以上のマーカーを追加的に含むものである (23) に記載の組成物。

(26) 前記IPMNマーカーは、TTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択された1種マーカーとLRG1を含むマーカーである (25) に記載の組成物。

40

(27) 前記IPMNマーカーは、TTR、C1R、CLUおよびKLB1からなる群より選択された2種のマーカーとLRG1を含む組み合わせマーカーである (25) に記載の組成物。

(28) CLU (Clusterin preproprotein); およびLRG1 (Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1、LRG1)、CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、TTR (Transferrin、ATTR、Prealbumin、TBPA)、C1R (Complement C1r subcomponent precursor) およびKLB1 (Plasma Kallikrein protein;) からなる群より選択された一つ以上のマーカーを含むIPMNマーカー蛋白質またはこれを暗号化す

50

る遺伝子の mRNA の発現水準を測定する製剤を含む、高危険群 IPMN の選別診断用組成物。

(29) 前記 IPMN マーカーは、LRG1、CA19-9、TTR、C1R および KLB1 からなる群より選択された 1 種マーカーと CLU を含む組み合わせマーカーである (28) に記載の組成物。

(30) 前記 IPMN マーカーは、LRG1、CA19-9、TTR、C1R および KLB1 からなる群より選択された 2 種のマーカーと LRG1 を含む組み合わせマーカーである (28) に記載の組成物。

(31) 前記 LRG1 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_443204.1 のアミノ酸配列を含み、前記 TTR 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_000362.1 のアミノ酸配列を含み、前記 C1R 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_001724.3 のアミノ酸配列を含み、前記 CLU 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_001822.3 のアミノ酸配列を含み、前記 KLB1 蛋白質は NCPI Accession No: NP\_000883.2 アミノ酸配列を含む (26) 乃至 (30) のうちのいずれか一に記載の組成物。

(32) 前記蛋白質の発現水準を測定する製剤が、前記蛋白質に特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガンド、PNA (peptide nucleic acid) または アプタマー (aptamer) を含む (23) または (28) に記載の組成物。

(33) 前記 mRNA の発現水準を測定する製剤が、前記遺伝子に特異的に結合するプライマー、プローブまたは アンチセンスヌクレオチドを含む (23) または (28) に記載の組成物。

(34) (26) 乃至 (30) のうちのいずれか一による組成物を含む、高危険群 IPMN の選別診断用キット。

(35) 前記キットが、RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) キット、DNA チップキット、ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) キット、蛋白質チップキット、ラピッド (rapid) キットまたは MRM (Multiple reaction monitoring) キットである (34) に記載の高危険群 IPMN の選別診断用キット。

(36) 対象の試料に対して、(26) 乃至 (30) のうちのいずれか一による高危険群 IPMN の選別診断用組成物による膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm、IPMN) マーカー蛋白質の発現水準またはこれを暗号化する遺伝子の mRNA 発現水準をそれぞれ測定する段階、前記測定されたマーカーの発現水準を、対照群マーカーの発現水準と比較する段階、および前記マーカー発現水準の比較結果を用いて前記対象の高危険 IPMN 有無を決定する段階を含む、高危険群 IPMN を診断する方法。

(37) 前記マーカーの発現水準を測定する段階以前に、対象が IPMN を有するか否かを確認する段階を追加的に含む (36) に記載の方法。

(38) 前記確認する段階は、画像診断法、組織検査法または遺伝子マーカーを用いた方法によって行われる (37) に記載の方法。

(39) 前記対象は、外科的切除術によって IPMN 組織が除去された患者である (36) に記載の方法。

(40) 前記対照群は、正常群、IPMN と膵管腺癌腫を除いた膵臓疾患を有する患者、または低危険 IPMN を有する対象である (36) に記載の方法。

(41) 前記高危険群 IPMN は、高異形成 (High grade dysplasia) と侵襲型 (invasive type) の IPMN を含む (36) に記載の方法。

(42) 前記方法は、対象の高危険 IPMN と決定された場合、外科的切除術または薬物投与の処置段階遂行する段階を追加的に含む (36) に記載の方法。

(43) 前記方法は、対象の低危険 IPMN と決定された場合、薬物投与または予後モニタリングを遂行する段階を追加的に含む (38) に記載の方法。

10

20

30

40

50

(44) 前記高危険IPMNの決定段階は、前記マーカーの発現水準を比較した結果、測定対象の試料での(a)CA19-9および(b)LRG1発現水準が対照群での発現水準より高く、測定対象の試料での(c)TTR、CLU、およびKLKB1発現水準が正常対照群での発現水準より低いか、測定対象の試料でのC1Rの発現水準が正常対照群での発現水準より高い場合、対象の高危険IPMNと決定する(36)に記載の方法。

(45) 前記高危険IPMNは、IPMN由来膵管腺癌腫を含む(36)に記載の方法。

(46) 前記試料が、血液、血清または血漿であることを特徴とする、(36)に記載の方法。

(47) 前記マーカーの発現水準測定が、該当蛋白質にそれぞれ特異的に結合する抗体、オリゴペプチド、リガンド、PNA (peptide nucleic acid) またはアプタマー (aptamer) を用いることを特徴とする(36)に記載の方法。

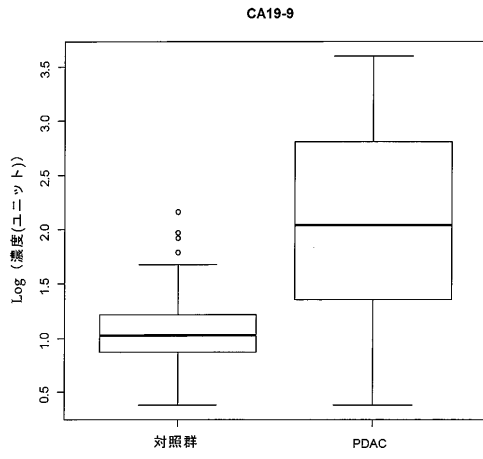
(48) 前記マーカーの発現水準測定または比較が、蛋白質チップ分析、免疫測定法、リガンドバイndingアッセイ、MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、SELDI-TOF (Sulfate Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、放射免疫測定、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体結合分析法、二次元電気泳動分析、液体クロマトグラフィー-質量分析 (liquid chromatography - Mass Spectrometry、LC-MS)、LC-MS/MS (liquid chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)、ウエスタンブロット法およびELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) からなる群より選択されるものを用いて行われることを特徴とする(36)に記載の方法。

(49) 前記mRNA発現水準測定が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、競合的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ(RPA)、ノーザンブロットイングまたはDNAチップによって行われることを特徴とする(36)に記載の方法。

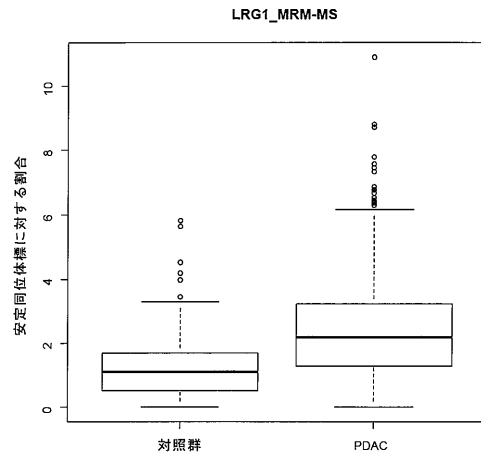
10

20

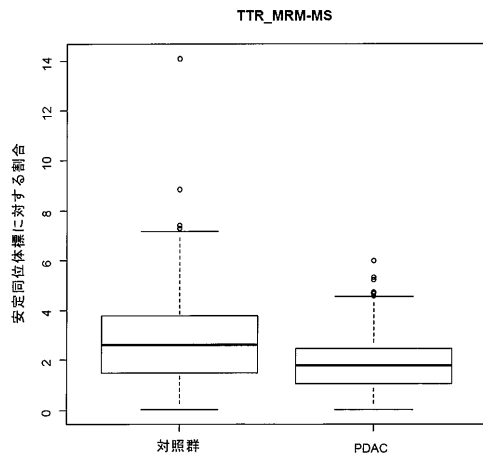
【 図 1 】



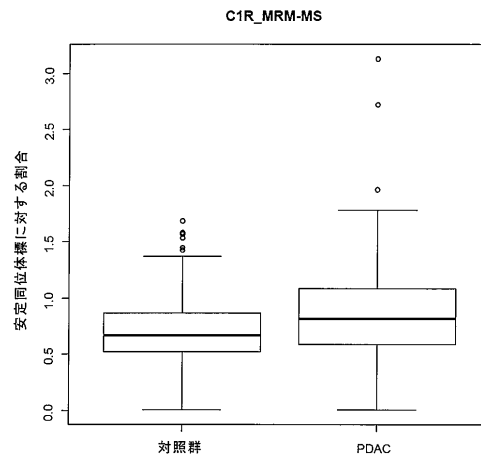
【 図 2 】



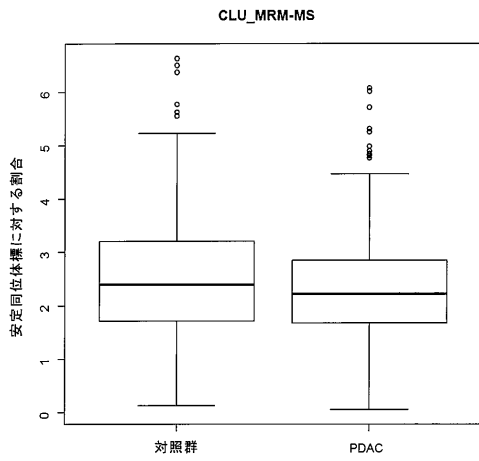
【 図 3 】



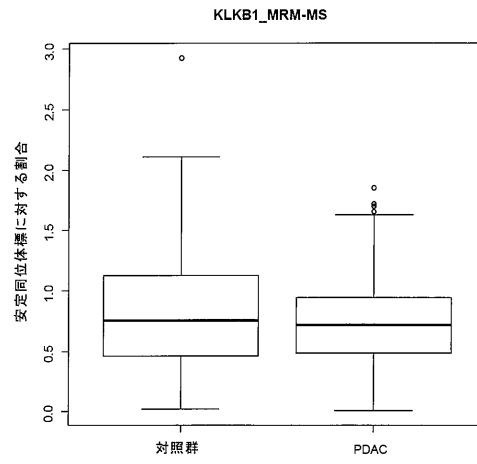
【 図 4 】



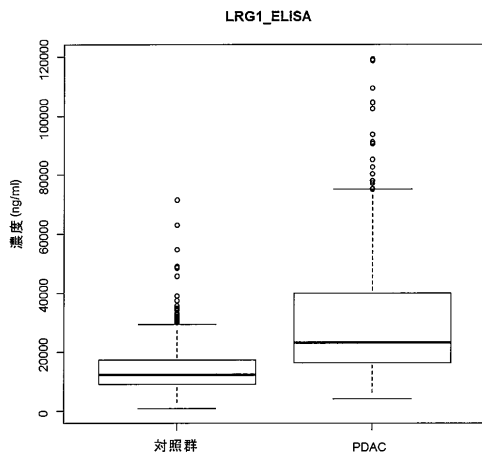
【 図 5 】



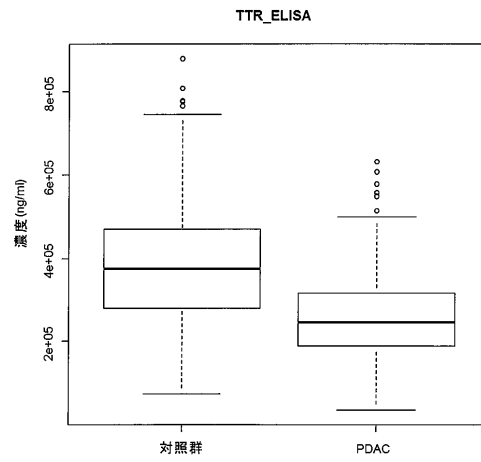
【 図 6 】



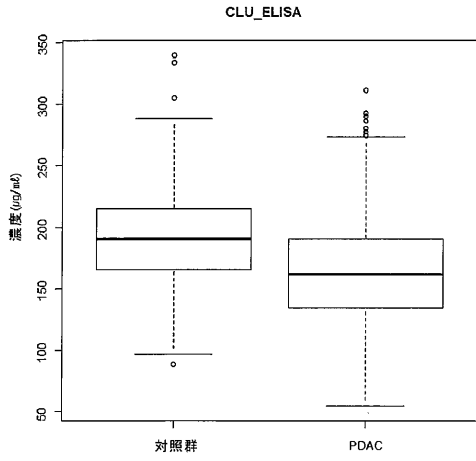
【 図 7 】



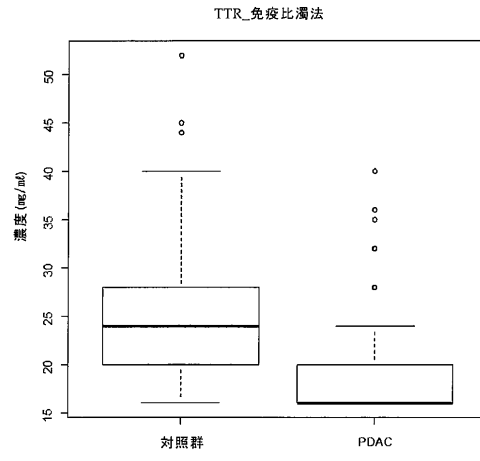
【 図 8 】



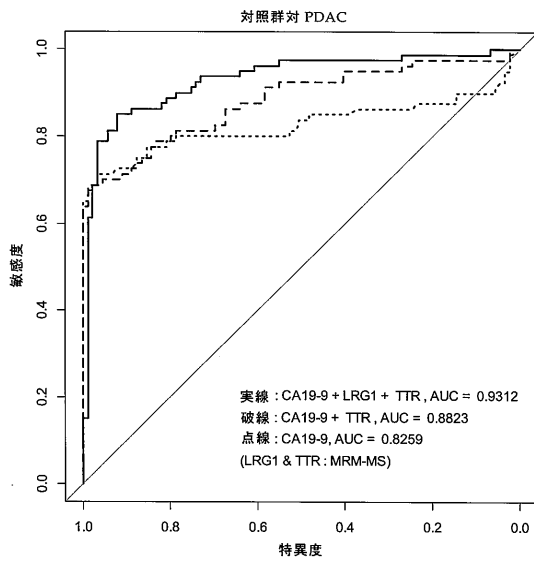
【 図 9 】



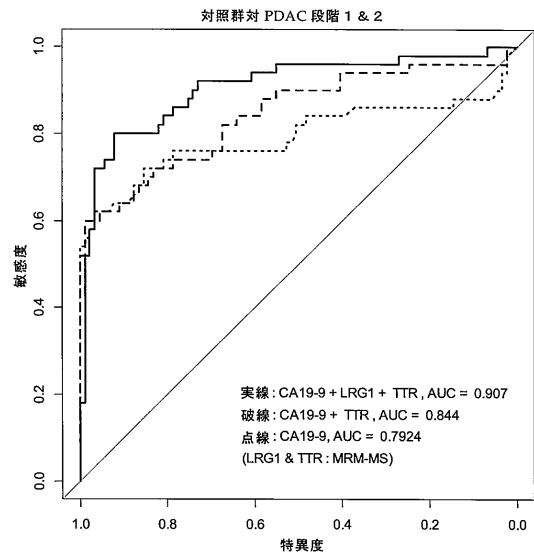
【 図 10 】



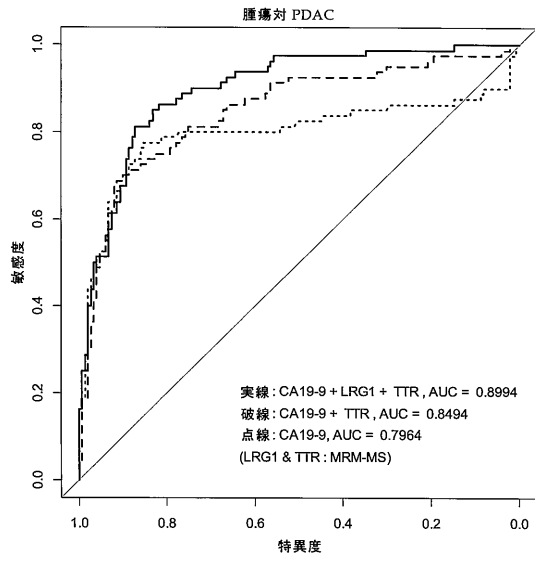
【 図 11 】



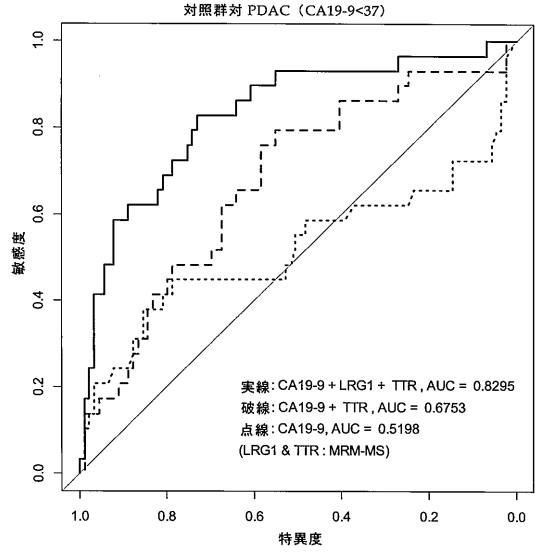
【 図 12 】



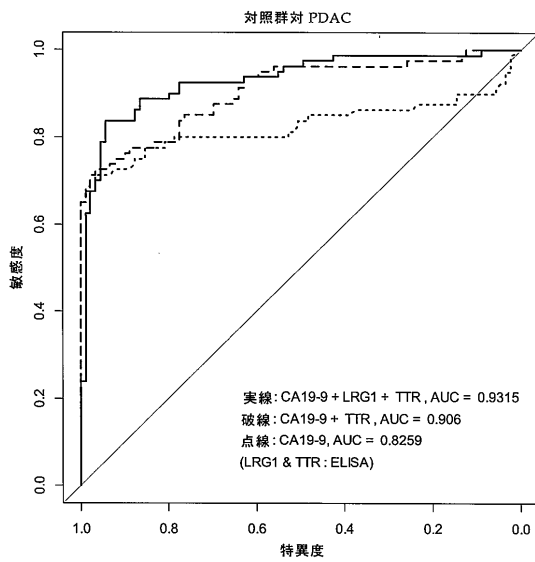
【 図 1 3 】



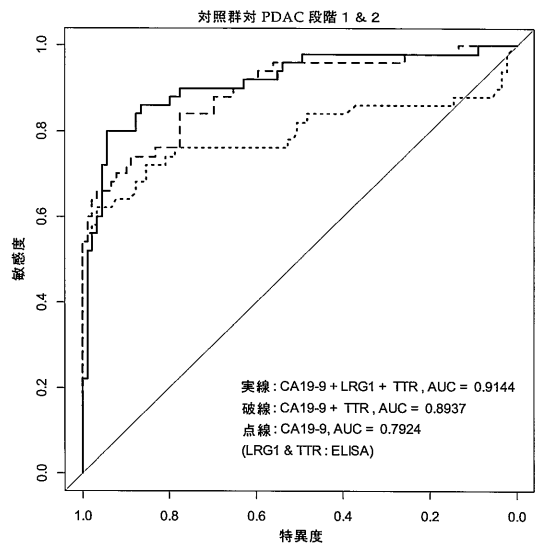
【 図 1 4 】



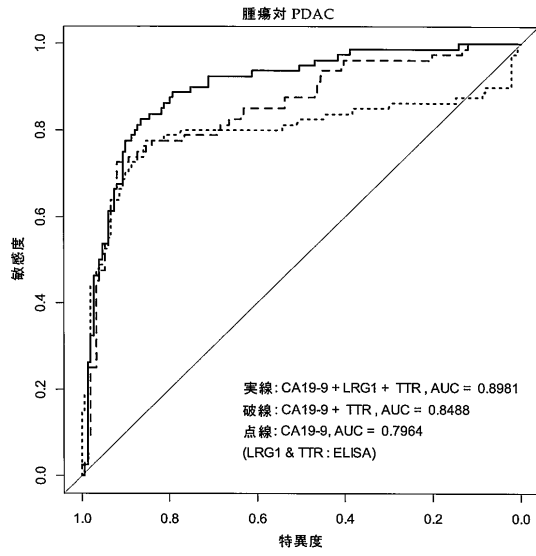
【 図 1 5 】



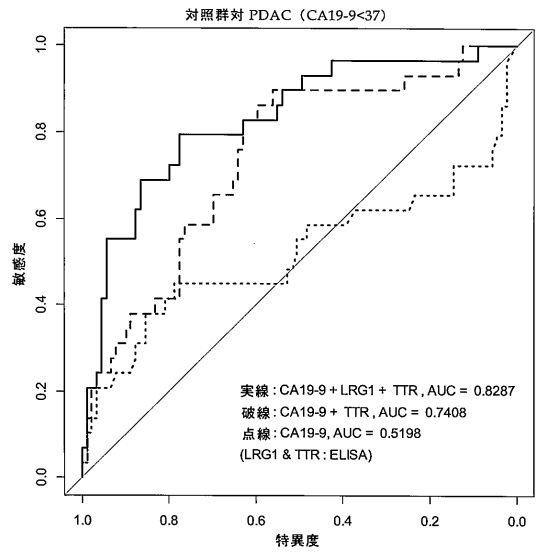
【 図 1 6 】



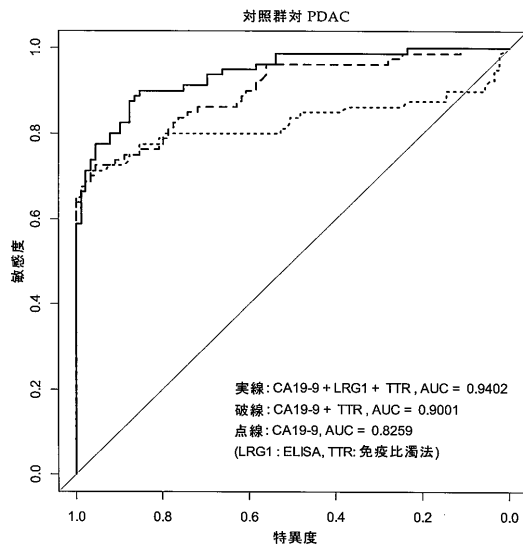
【 図 17 】



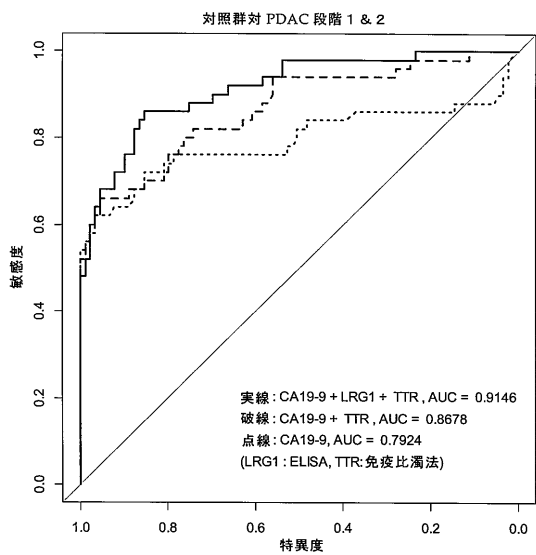
【 図 18 】



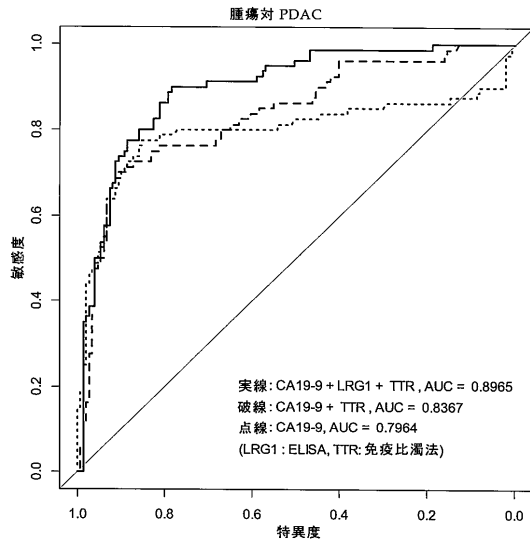
【 図 19 】



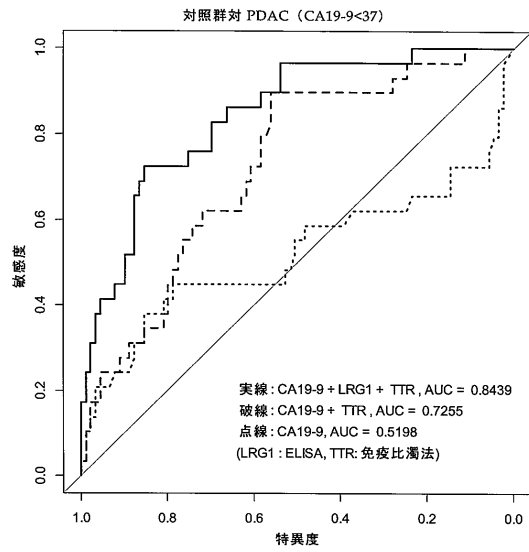
【 図 20 】



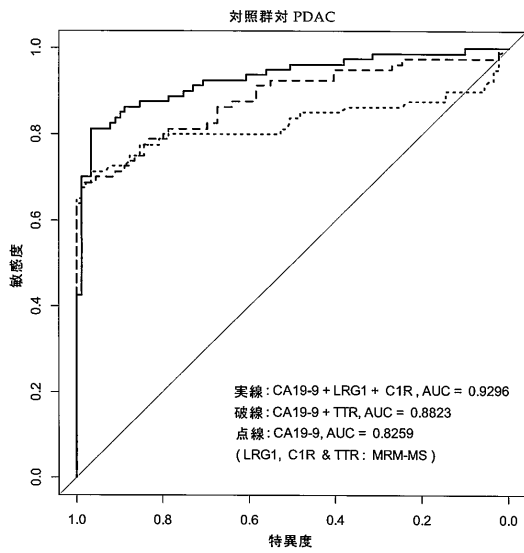
【图 2 1】



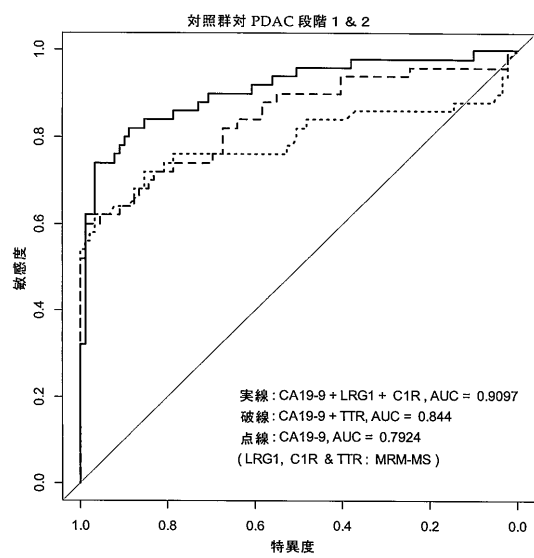
【图 2 2】



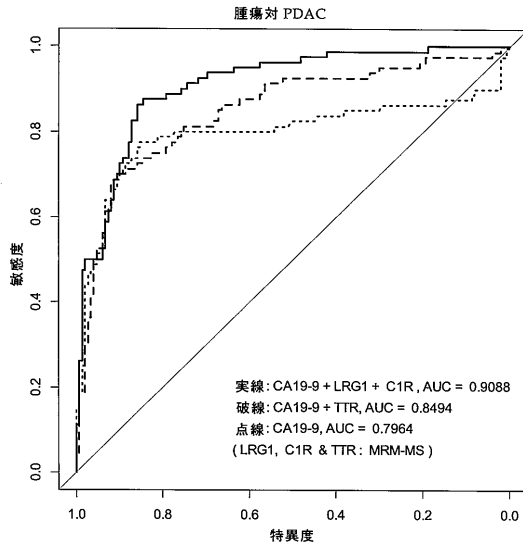
【图 2 3】



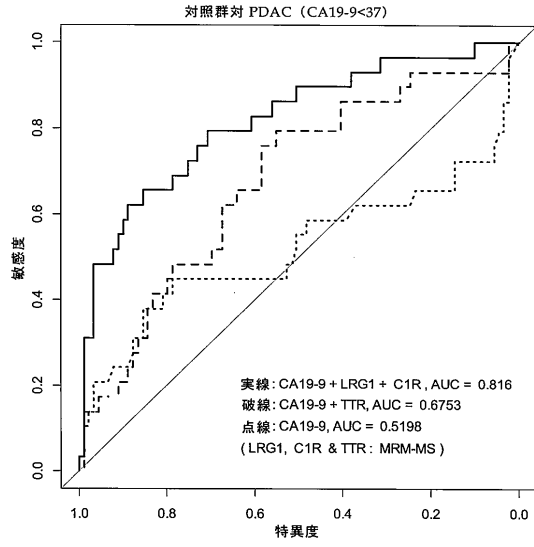
【图 2 4】



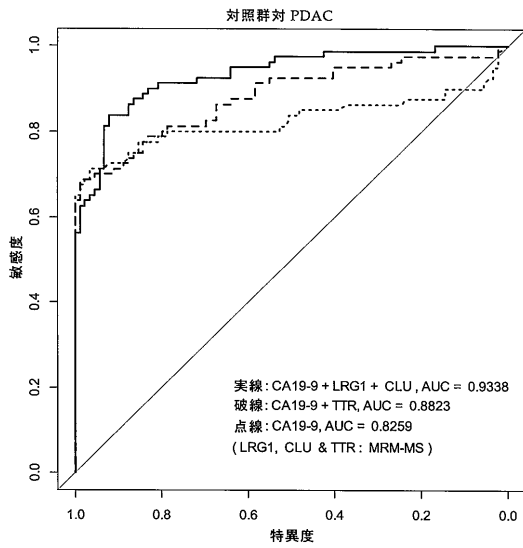
【 図 2 5 】



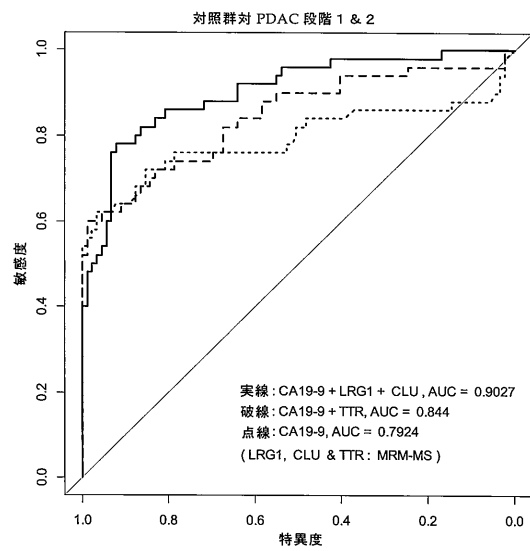
【 図 2 6 】



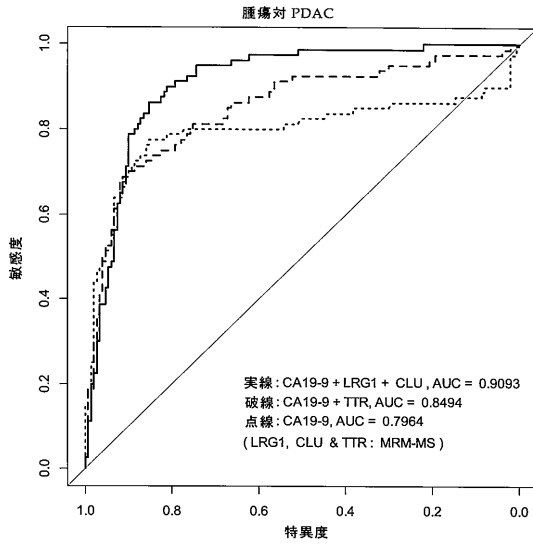
【 図 2 7 】



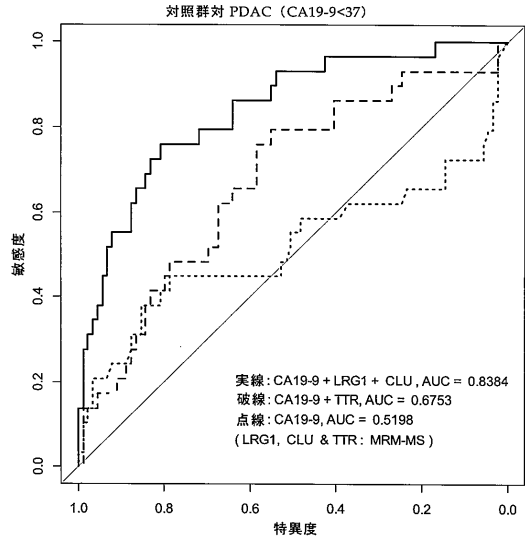
【 図 2 8 】



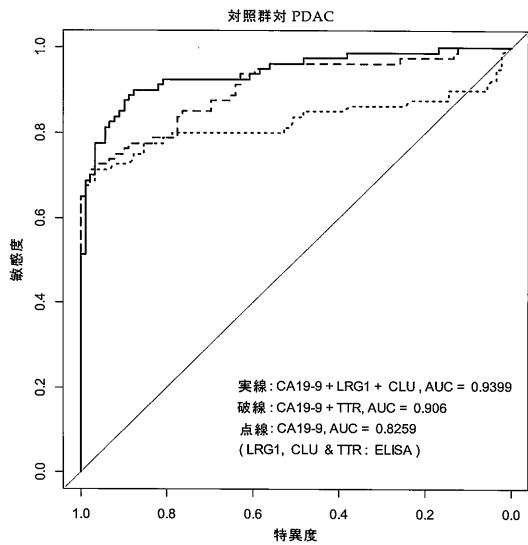
【 図 29 】



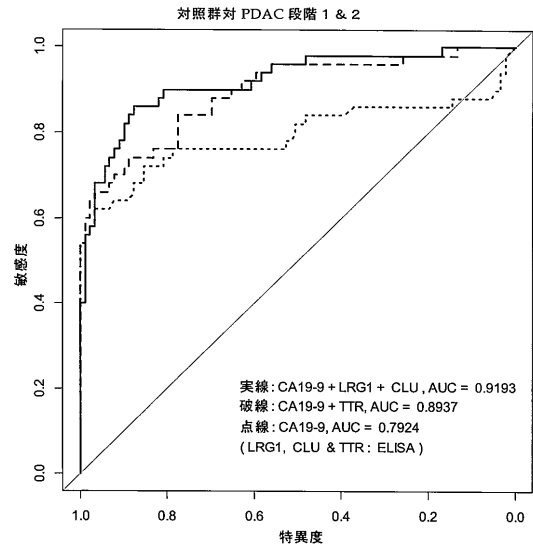
【 図 30 】



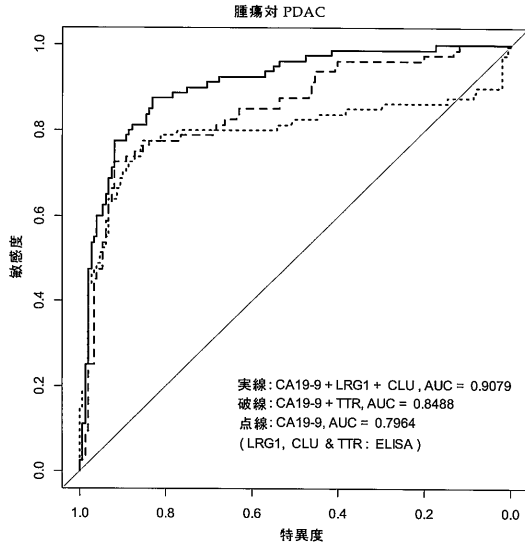
【 図 31 】



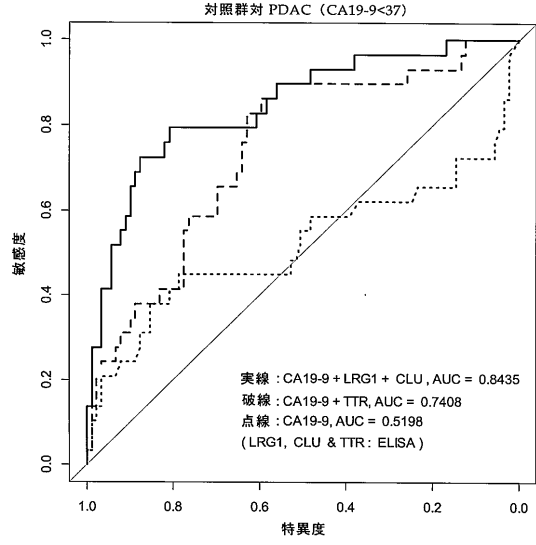
【 図 32 】



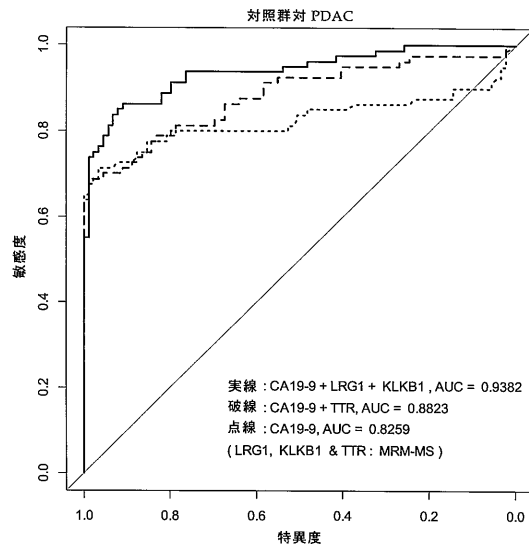
【 図 3 3 】



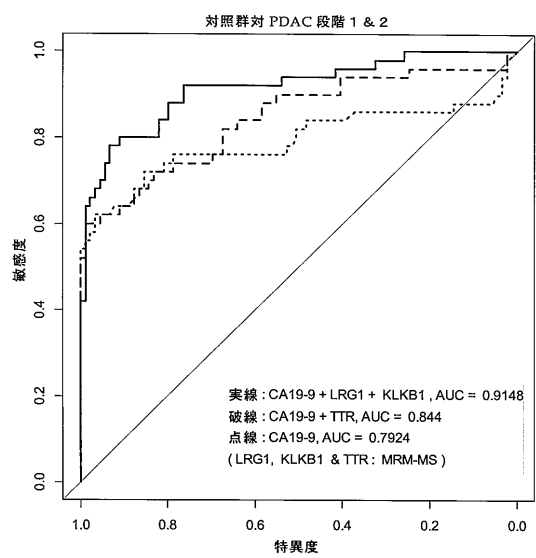
【 図 3 4 】



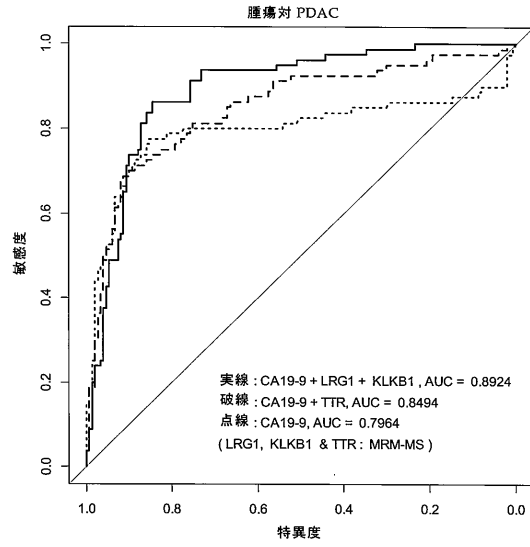
【 図 3 5 】



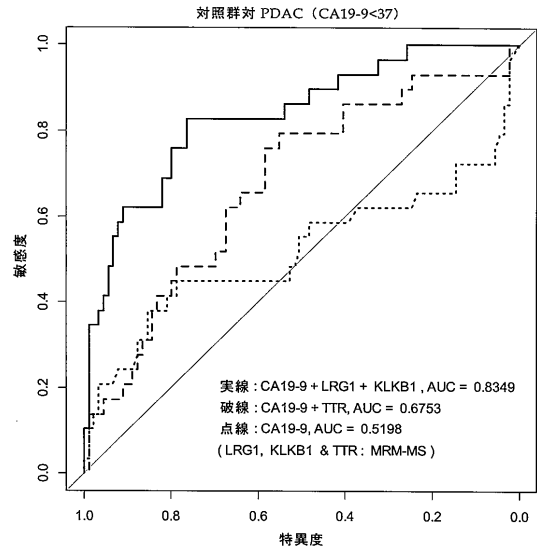
【 図 3 6 】



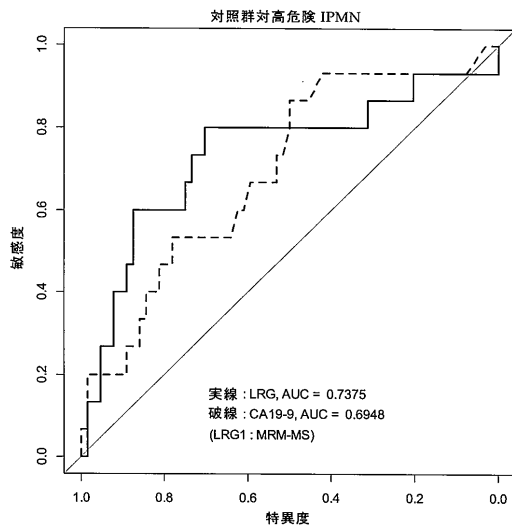
【 図 3 7 】



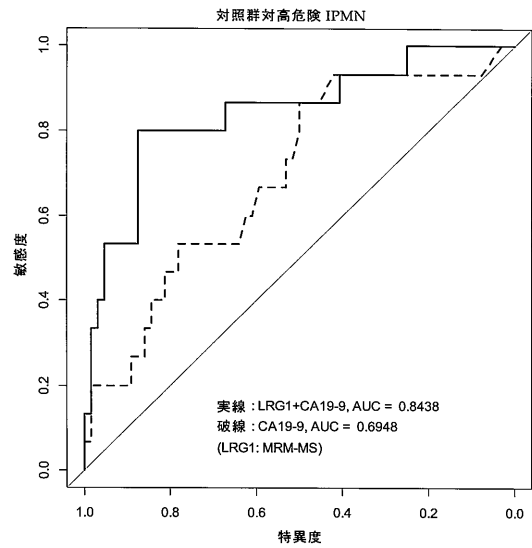
【 図 3 8 】



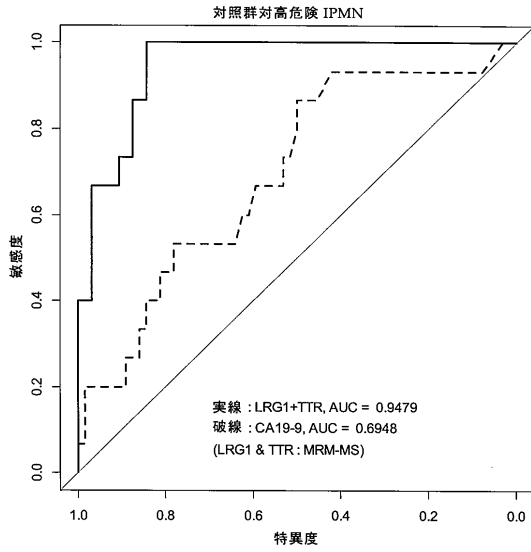
【 図 3 9 】



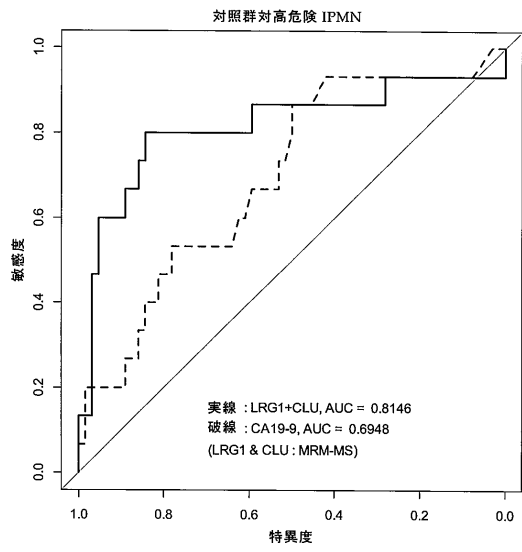
【 図 4 0 】



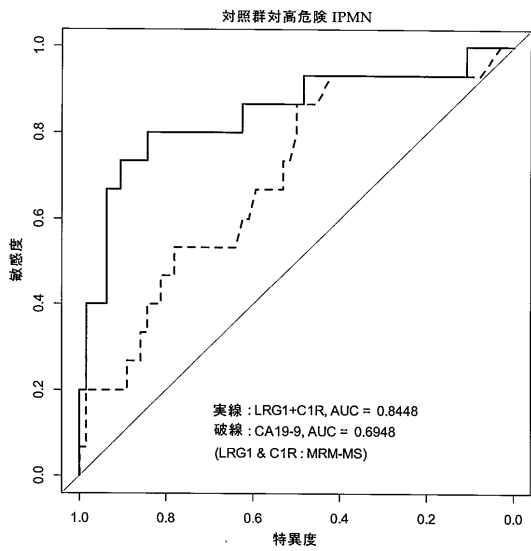
【 図 4 1 】



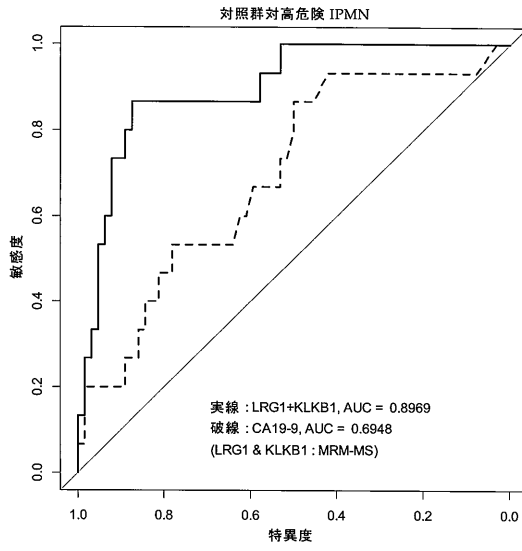
【 図 4 2 】



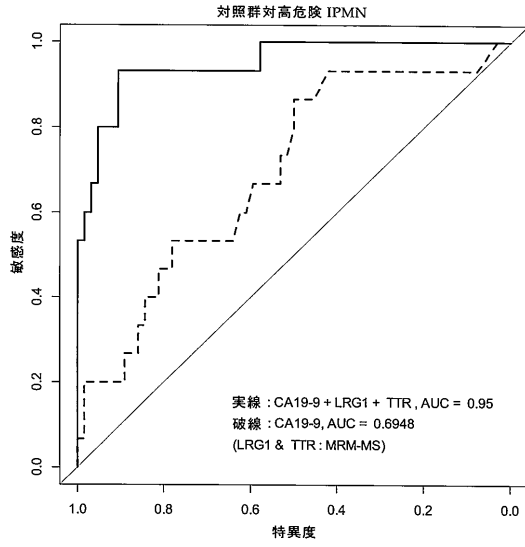
【 図 4 3 】



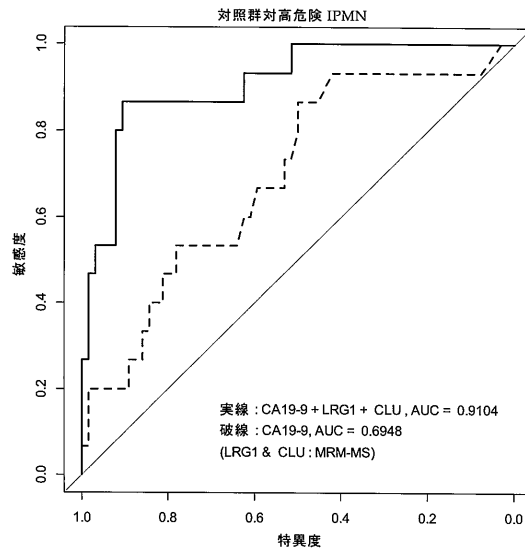
【 図 4 4 】



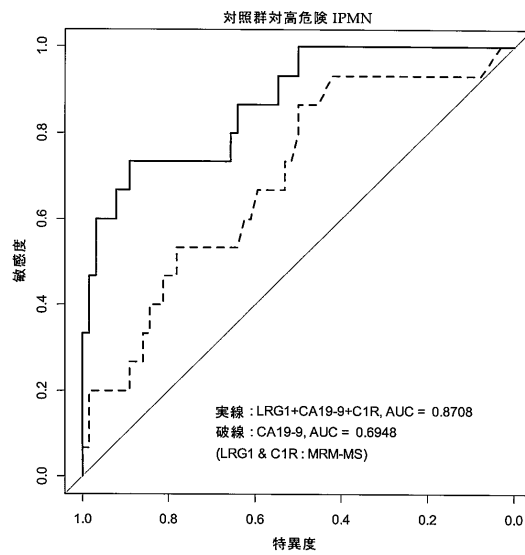
【 図 4 5 】



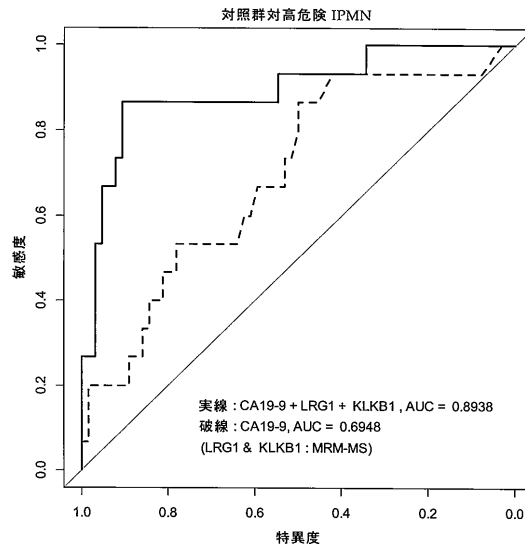
【 图 4 6 】



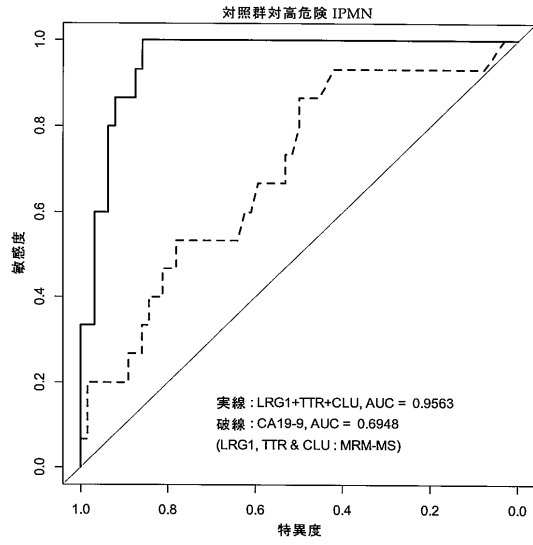
【 图 4 7 】



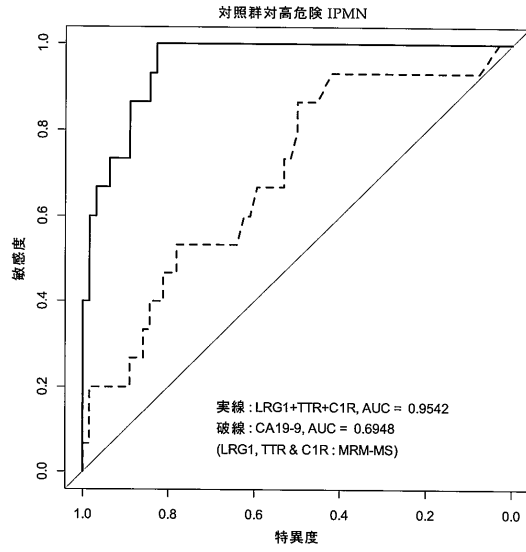
【 图 4 8 】



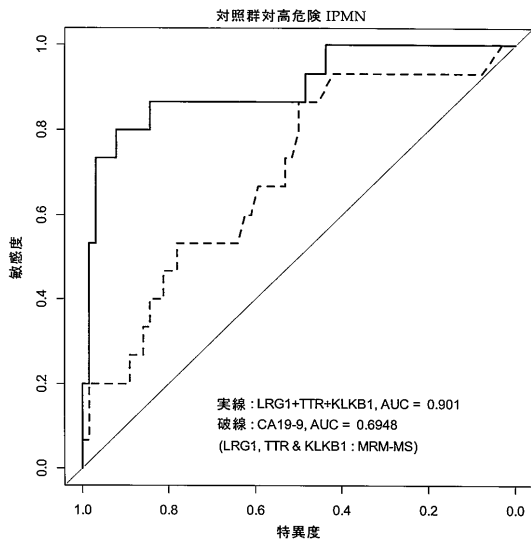
【 図 49 】



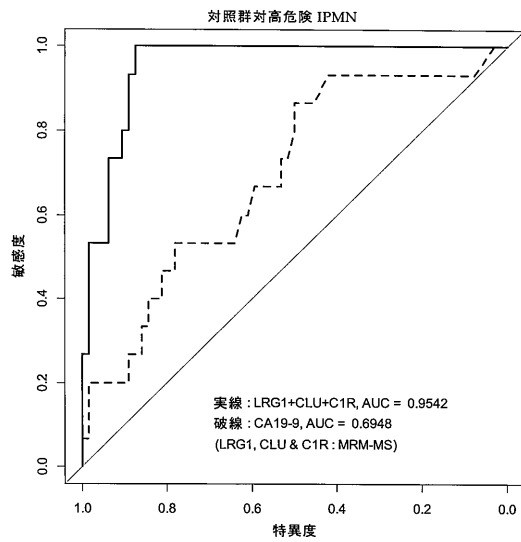
【 图 50 】



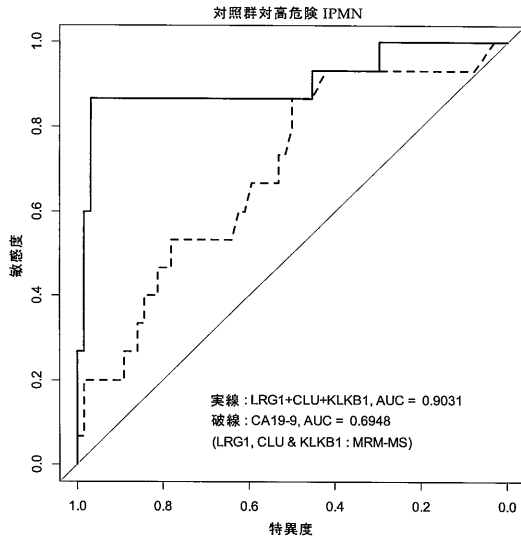
【 图 51 】



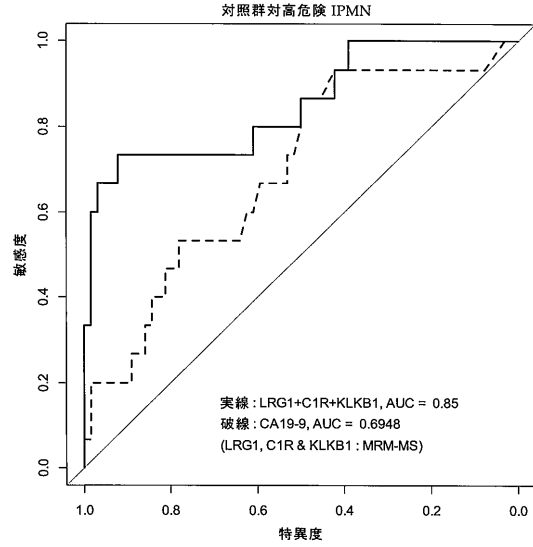
【 图 52 】



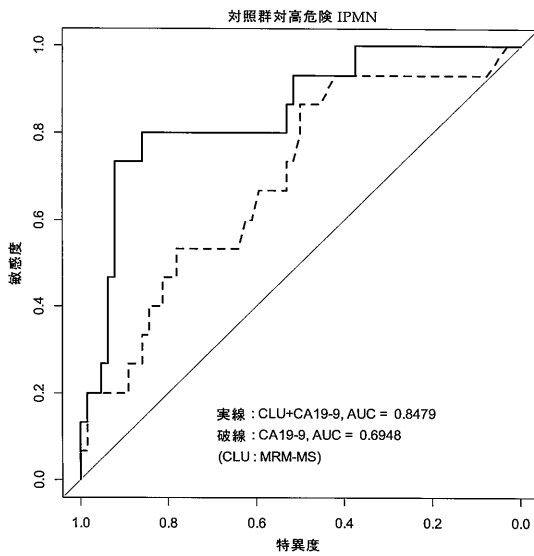
【 図 5 3 】



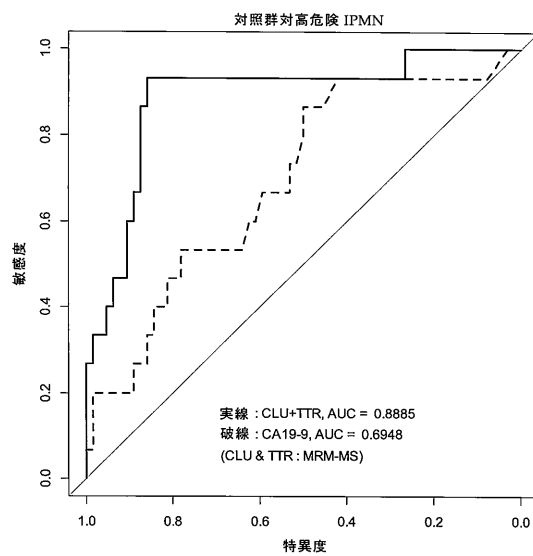
【 图 5 4 】



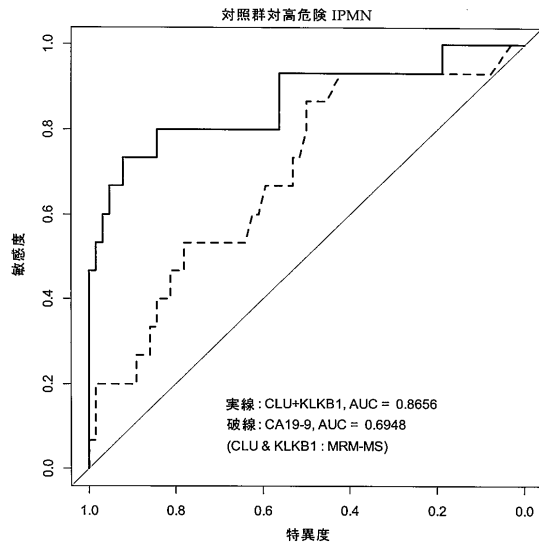
【 图 5 5 】



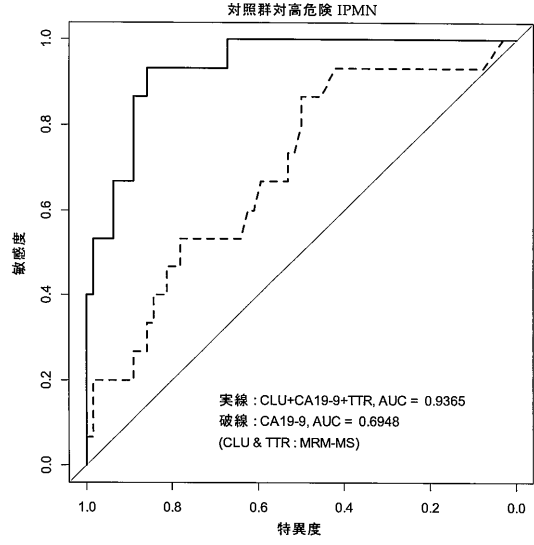
【 图 5 6 】



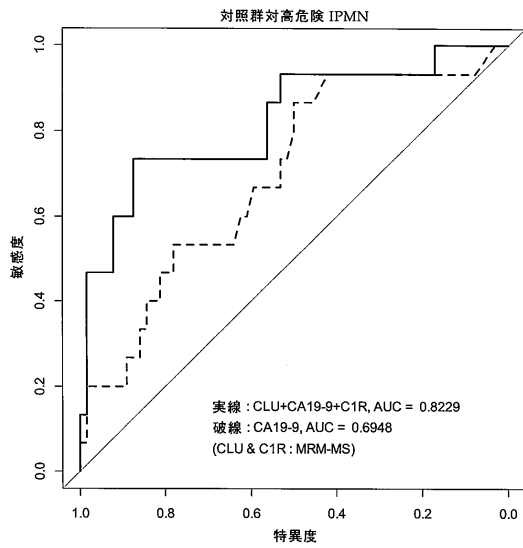
【 57 】



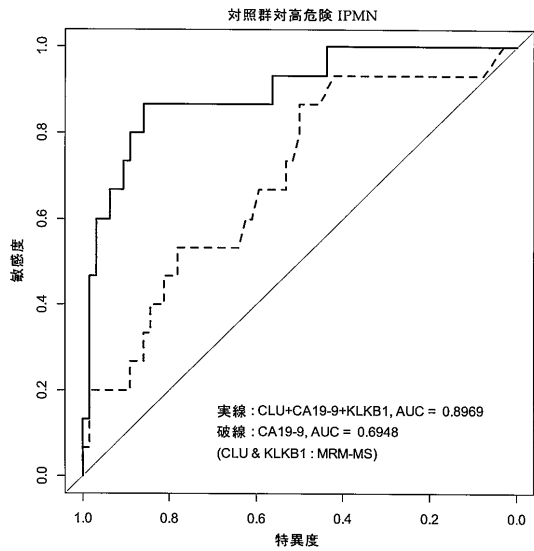
【 58 】



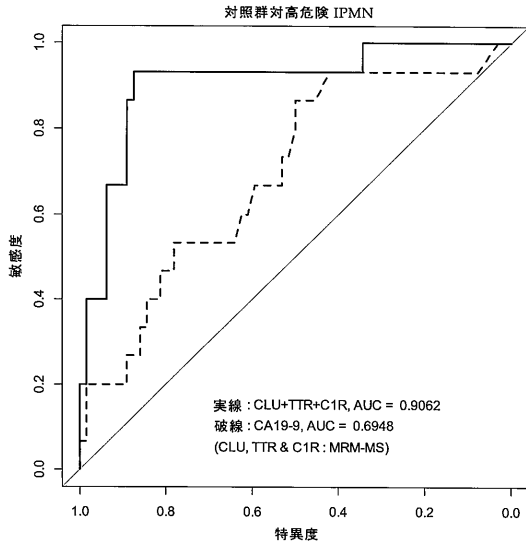
【 59 】



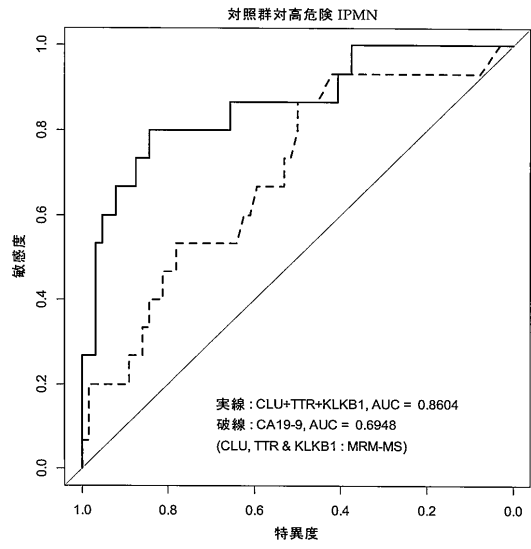
【 60 】



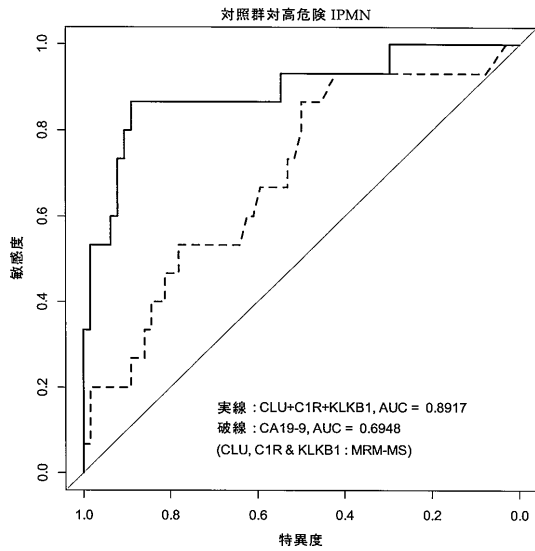
【 図 6 1 】



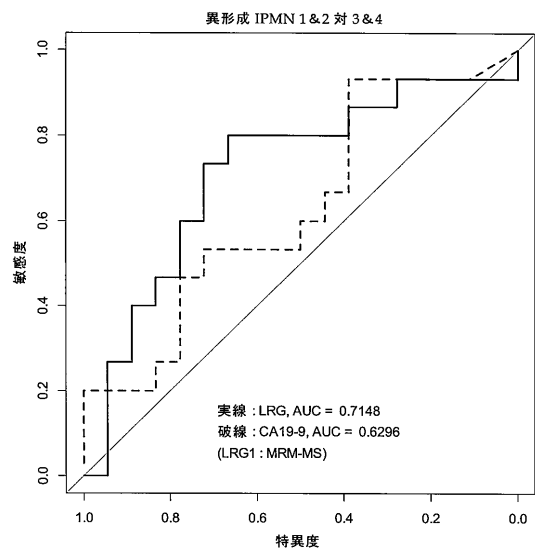
【 图 6 2 】



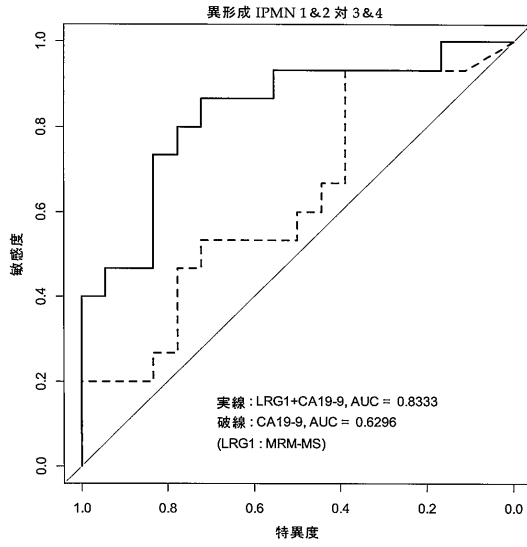
【 图 6 3 】



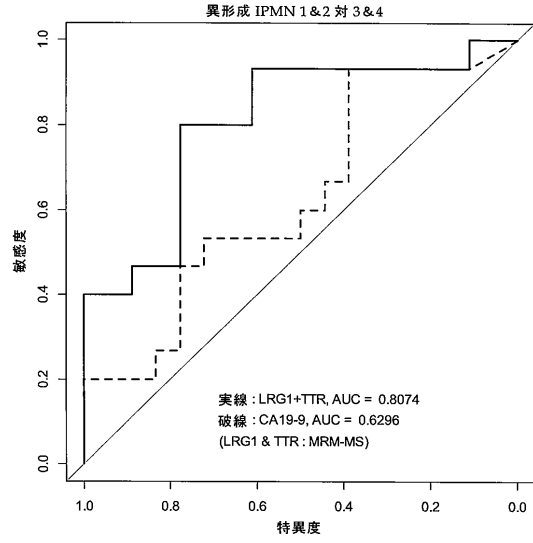
【 图 6 4 】



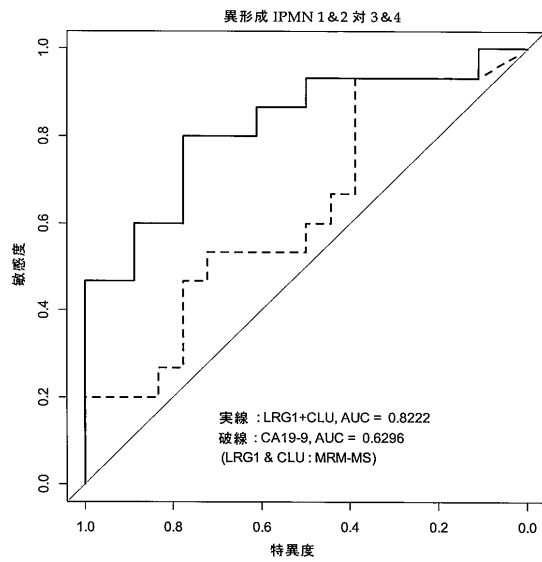
【 図 6 5 】



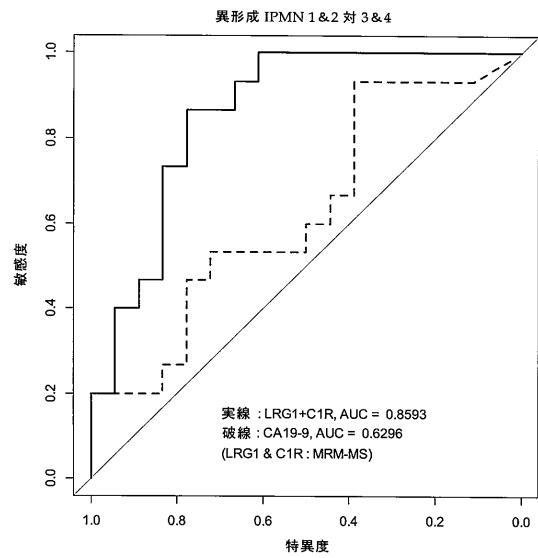
【 図 6 6 】



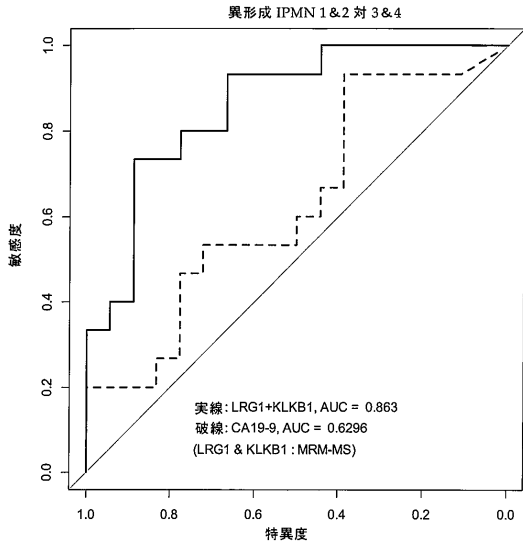
【 図 6 7 】



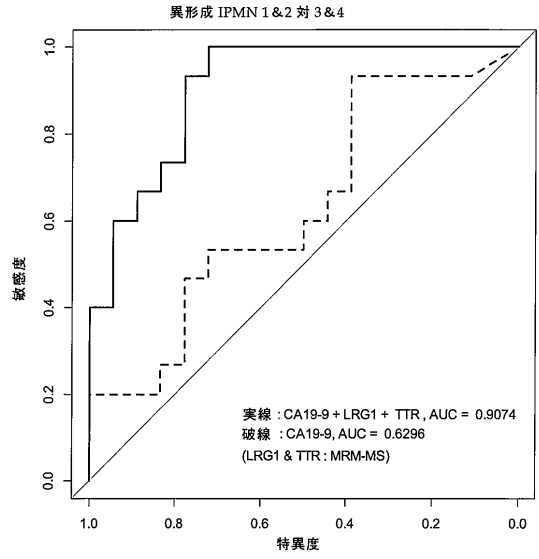
【 図 6 8 】



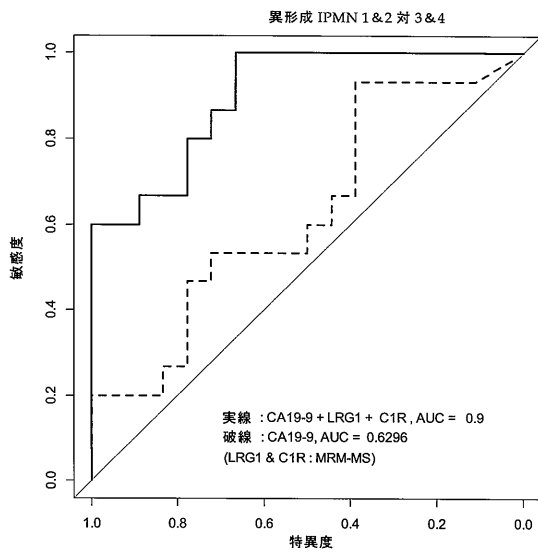
【 図 6 9 】



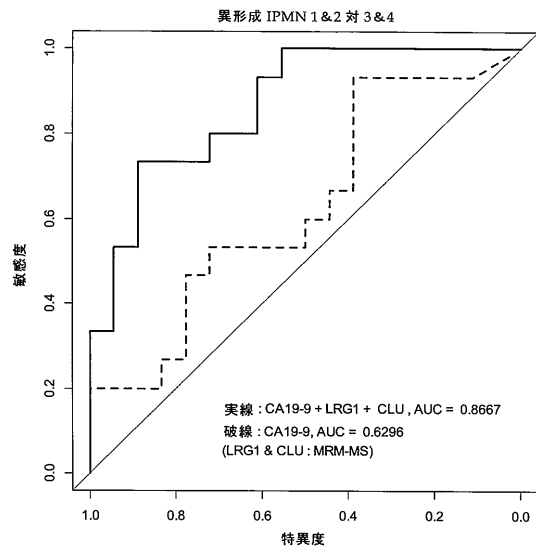
【 図 7 0 】



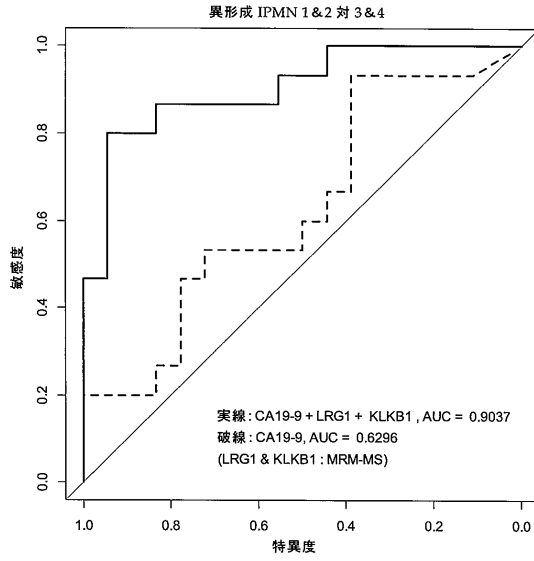
【 図 7 1 】



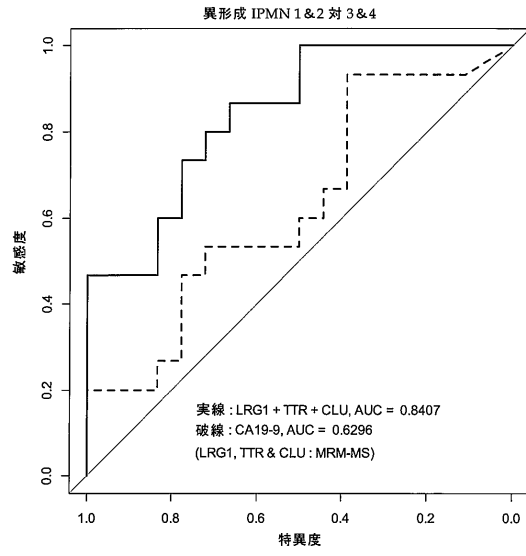
【 図 7 2 】



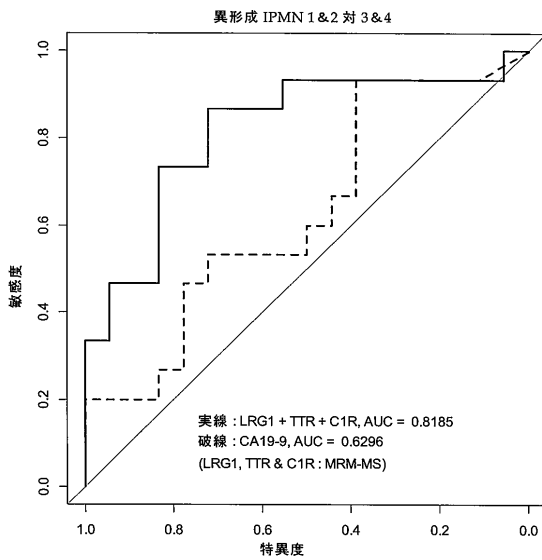
【 図 7 3 】



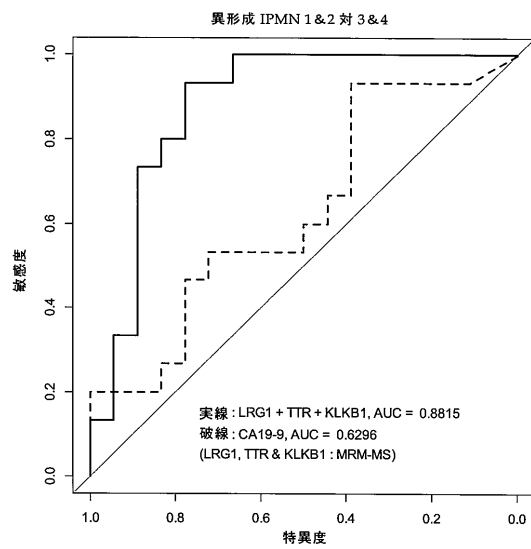
【 図 7 4 】



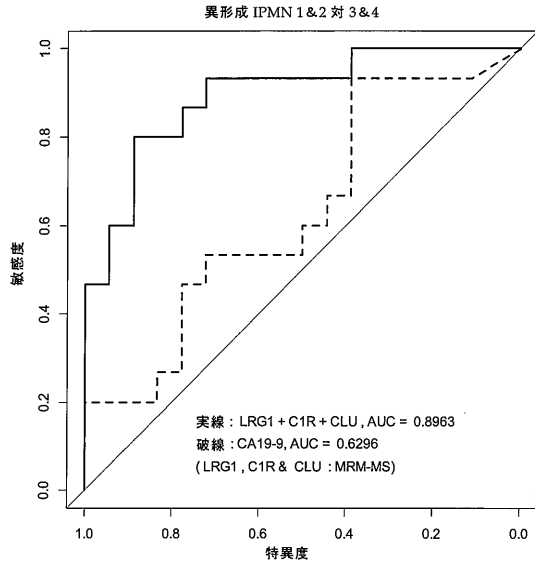
【 図 7 5 】



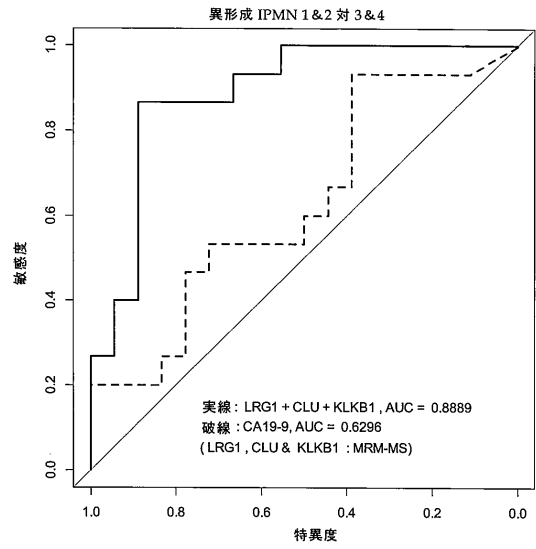
【 図 7 6 】



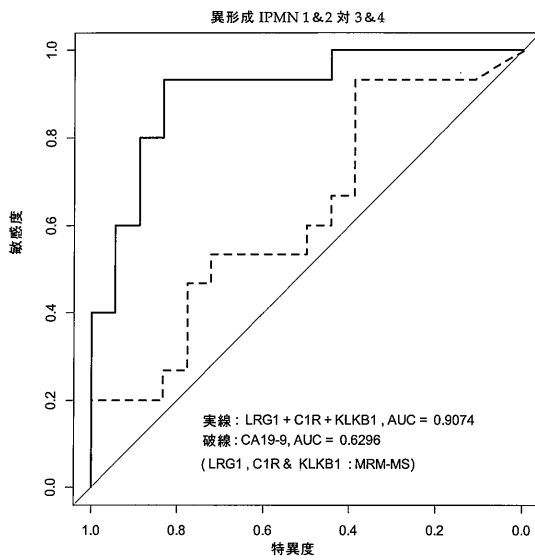
【 図 7 7 】



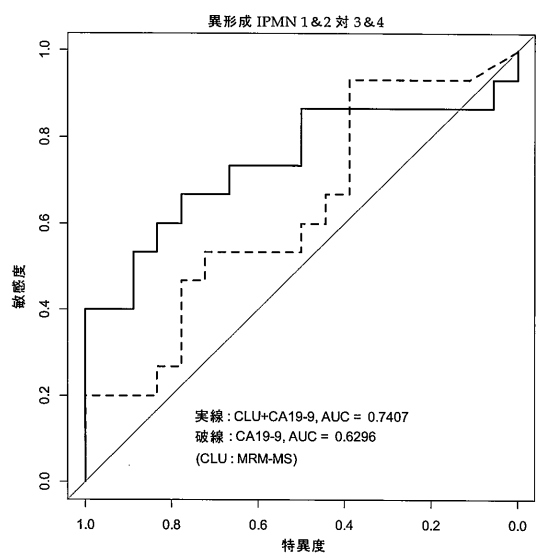
【 図 7 8 】



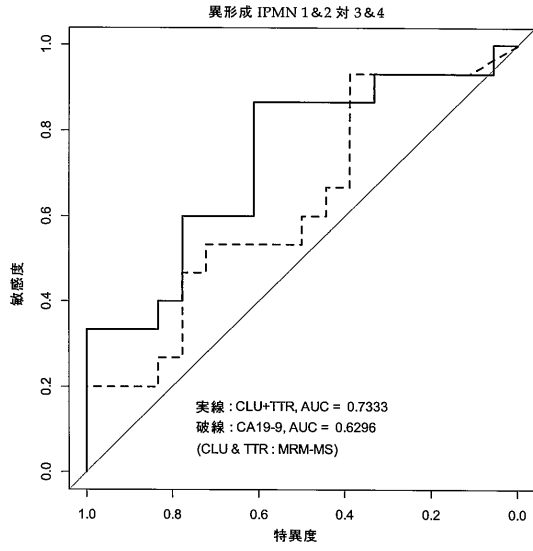
【 図 7 9 】



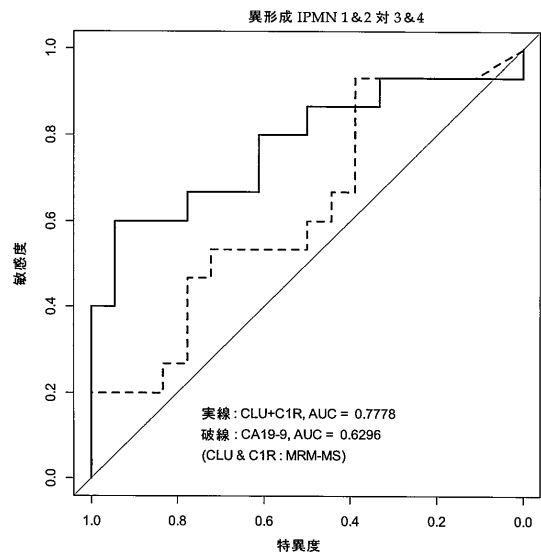
【 図 8 0 】



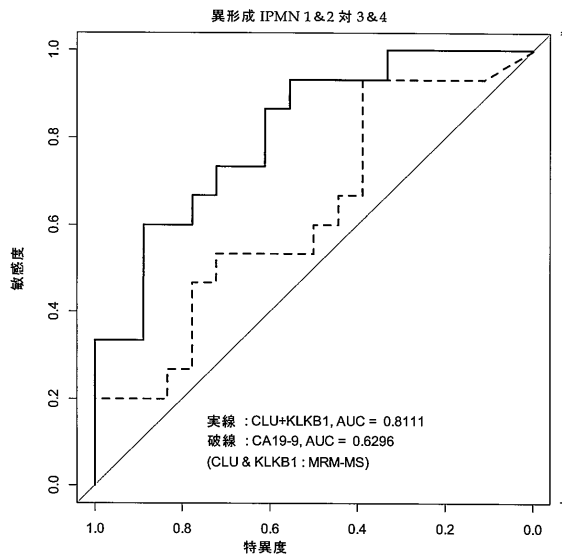
【 図 8 1 】



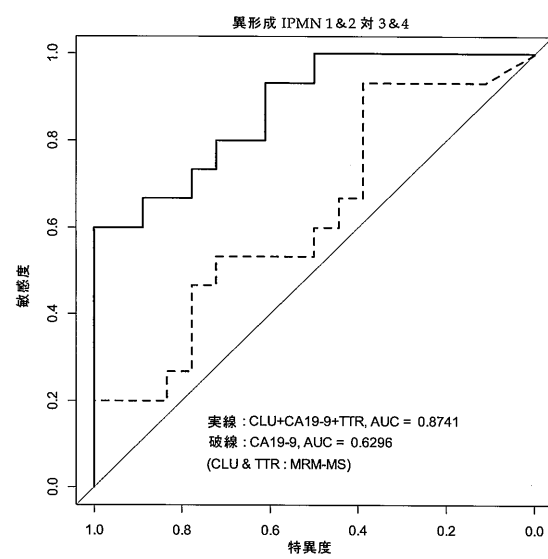
【 図 8 2 】



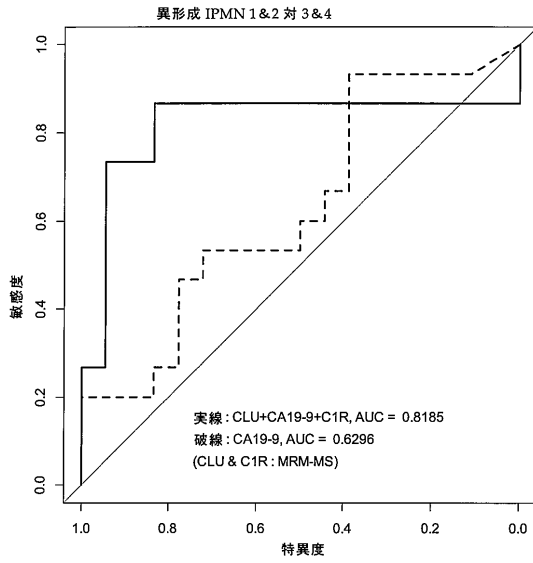
【 図 8 3 】



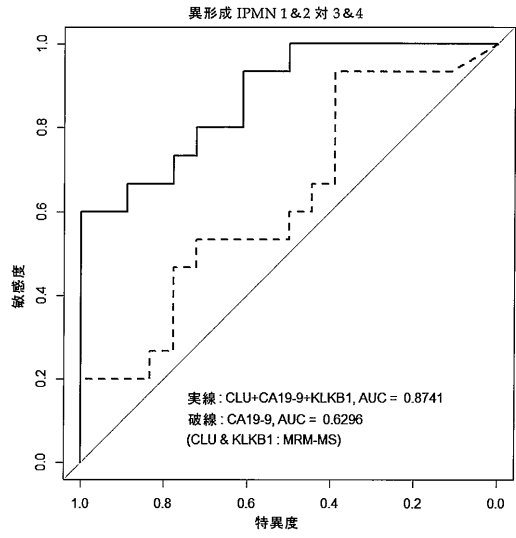
【 図 8 4 】



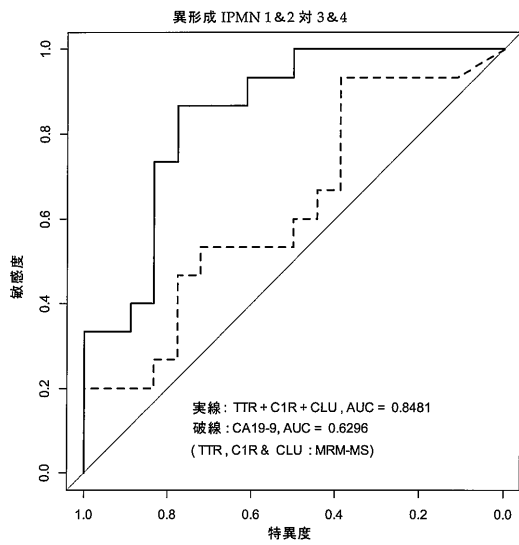
【 8 5 】



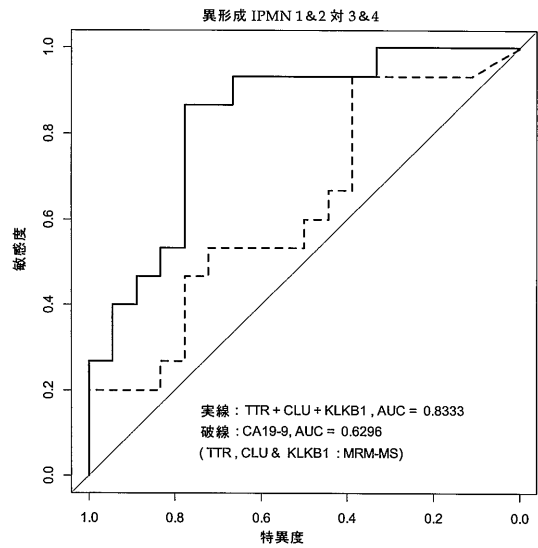
【 8 6 】



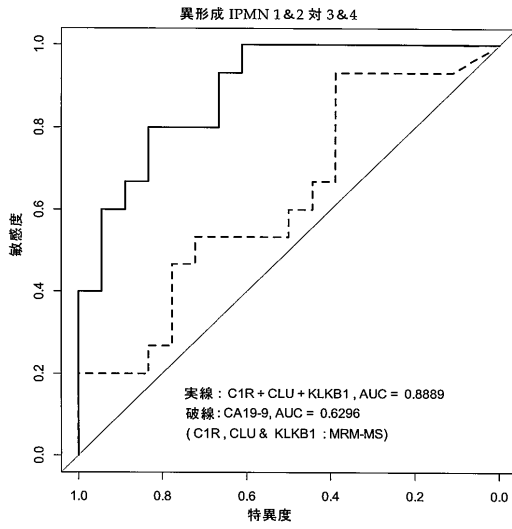
【 8 7 】



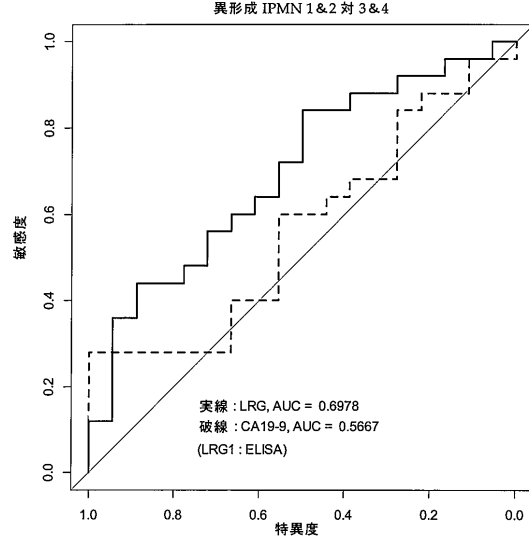
【 8 8 】



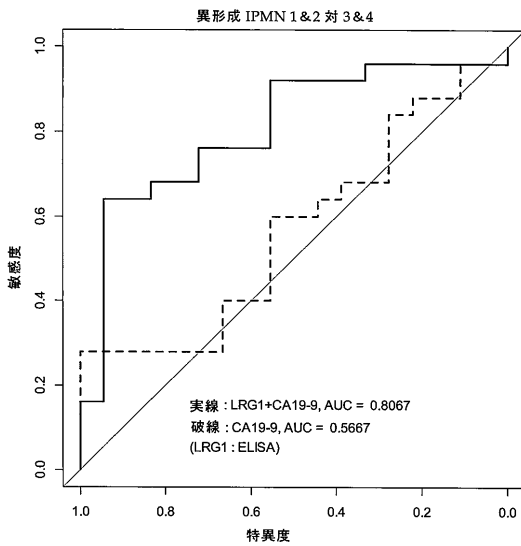
【 図 89 】



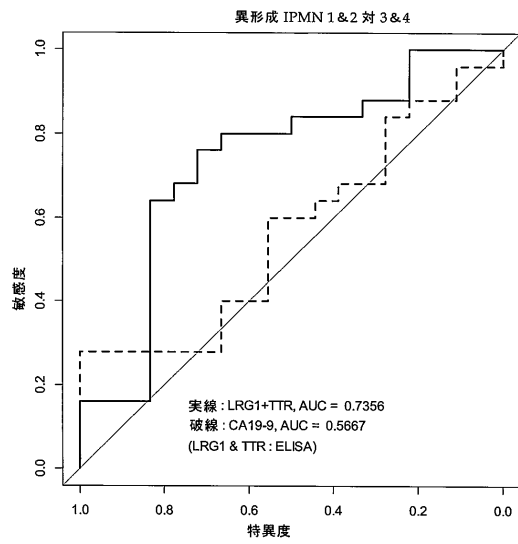
【 図 90 】



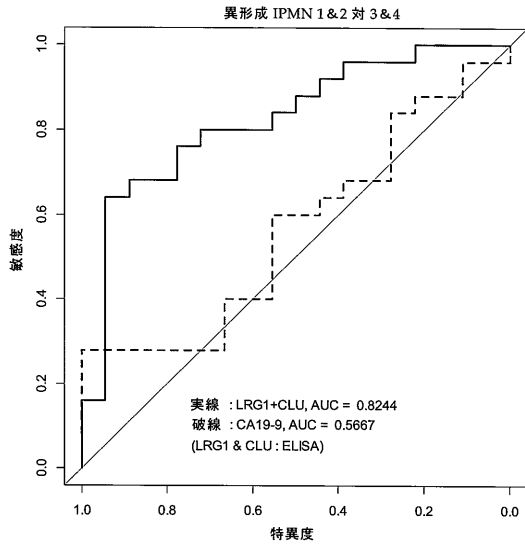
【 図 91 】



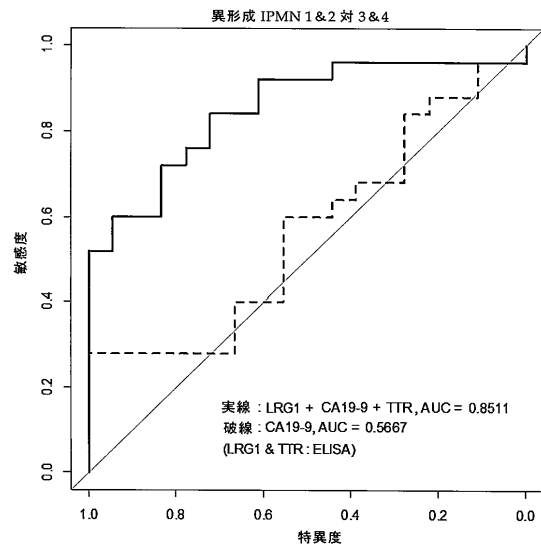
【 図 92 】



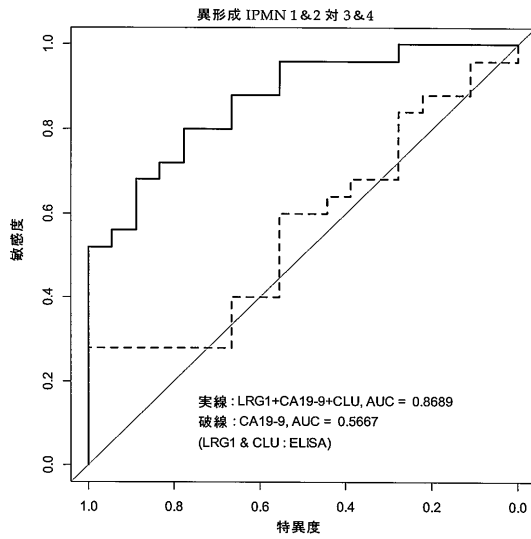
【 図 9 3 】



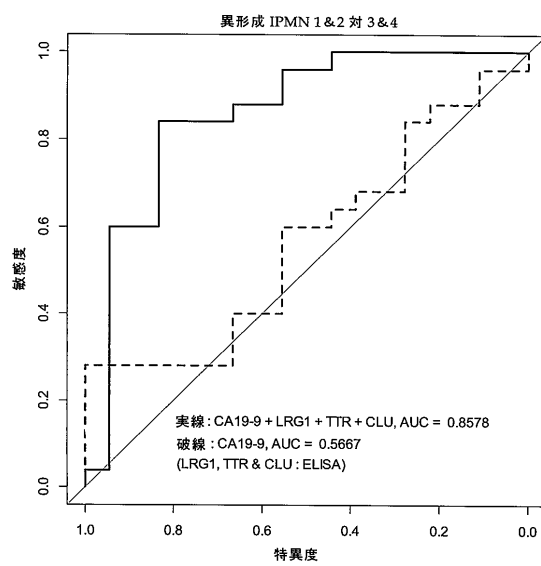
【 図 9 4 】



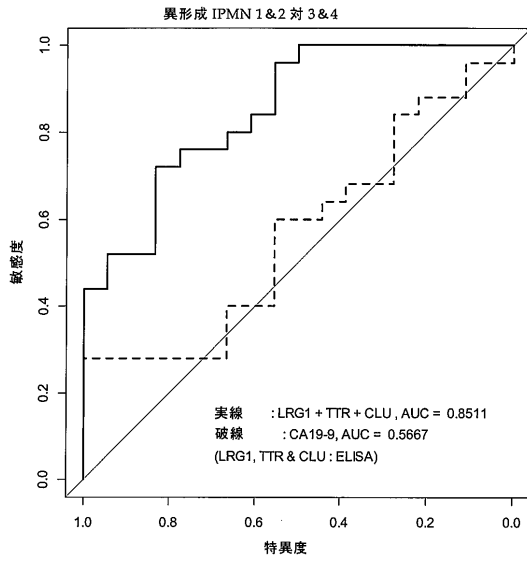
【 図 9 5 】



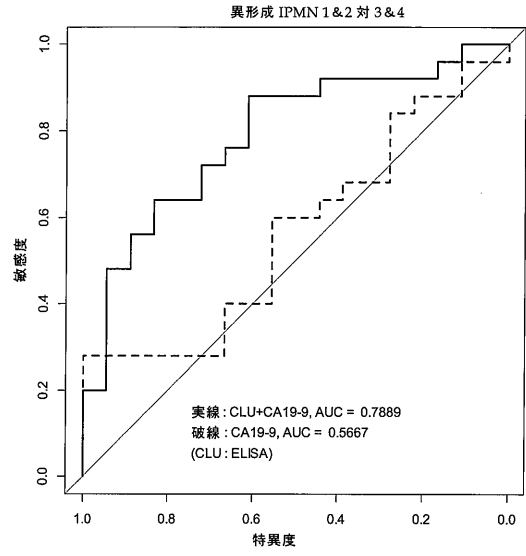
【 図 9 6 】



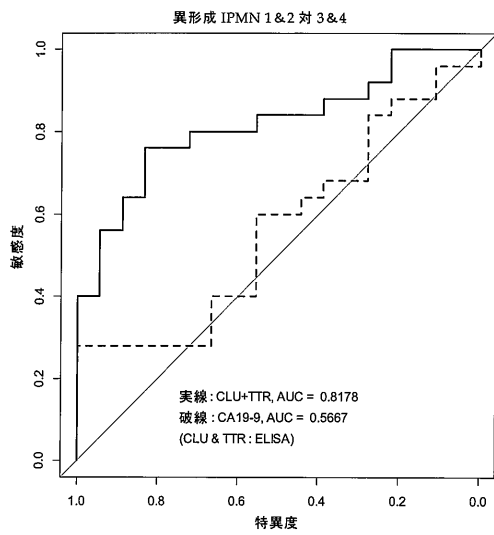
【 図 9 7 】



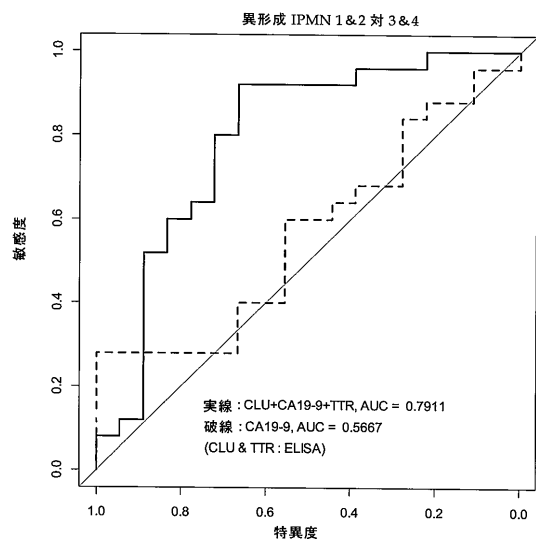
【 図 9 8 】



【 図 9 9 】



【 図 1 0 0 】



## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 10-2015-0092393

(32)優先日 平成27年6月29日(2015.6.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
韓国(KR)

(73)特許権者 513246872

ソウル大学校産学協力団

SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION

大韓民国 ソウル 08826 クアナク-グ クアナク-ロ 1

1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, KOREA

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100169579

弁理士 村林 望

(72)発明者 チョイ, ヨンファン

大韓民国 04539 ソウル, チュン-ク, ウルチ-ロ, 65

(72)発明者 ナムクン, ジュンヒュン

大韓民国 04539 ソウル, チュン-ク, ウルチ-ロ, 65

(72)発明者 イ, スン ゴン

大韓民国 04539 ソウル, チュン-ク, ウルチ-ロ, 65

(72)発明者 ハン, サンジョ

大韓民国 04539 ソウル, チュン-ク, ウルチ-ロ, 65

(72)発明者 ジャン, ジン-ヨン

大韓民国 06190 ソウル, カンナム-ク, サムソン-ロ 64-ギル 36, 102-601

(72)発明者 パク, テスン

大韓民国 06556 ソウル, ソチヨ-ク, パンベ-ロ 249, 104-1002

(72)発明者 キム, ヨンスー

大韓民国 06284 ソウル, カンナム-ク, サムソン-ロ 212, 31-1315

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0109035(US, A1)

特表2013-510094(JP, A)

FURUKAWA, K. et al., Clinicopathological Significance of Leucine-Rich alpha 2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients With Pan, Pancreas, 2014年 7月, Vol.44/No.1, pp.93-98

JIN, J. et al., Clinical significance of clusterin expression in pancreatic adenocarcinoma, WORLD JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY, 2012年, Vol.10/No.146, pp.1-6

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	胰腺癌诊断组合物和使用该组合物的胰腺癌诊断方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6630766B2</a>	公开(公告)日	2020-01-15
申请号	JP2018074354	申请日	2018-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	韩国移动通信株式会社 首尔大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	SK电信有限公司 首尔国立大学产学协力机构		
当前申请(专利权)人(译)	SK电信有限公司 首尔国立大学产学协力机构		
[标]发明人	チョイヨンファン ナムクンジュンヒユン イスンゴン ハンサンジョ ジャンジンヨン パクテスン キムヨンスー		
发明人	チョイ,ヨンファン ナムクン,ジュンヒユン イ,スンゴン ハン,サンジョ ジャン,ジン-ヨン パク,テスン キム,ヨンスー		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12N15/11 C12Q1/6813 C12Q1/6886		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/57438 G01N2333/4728		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.M C12N15/11.Z C12Q1/6813.Z C12Q1/6886.Z C07K16/18 C12M1/34.B C12M1/34.F C12M1/34.Z C12P21/08 C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/FA04 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA72		
优先权	1020140140695 2014-10-17 KR 1020140140714 2014-10-17 KR 1020150092393 2015-06-29 KR		
其他公开文献	JP2018141795A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

诊断胰腺癌的组合物，试剂盒和方法技术领域本发明涉及诊断胰腺癌的组合物，试剂盒和方法，其包括用于测量可用于确定胰腺癌的发作或发作可能性的某些标志物基因的蛋白质或mRNA表达水平的试剂。通过提供用于诊断胰腺癌的标志物，可以进行胰腺癌或癌前病变的发生的早期诊断以及疾病严重程度的重要预测，从而可以用于胰腺癌的肿瘤发生研究。。另外，本发明的诊断方法允许以非侵入性方式方便地检测诸如血液的样品中的胰腺癌。

(45) 発行日 令和2年1月15日 (2020. 1. 15)

(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019. 12. 13)

(5) Int. Cl.

F I

<b>GO 1 N</b>	<b>33/574</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>GO 1 N</b>	33/574	A
<b>GO 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>GO 1 N</b>	33/53	M
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/11</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	15/11	Z
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/6813</b>	<b>(2018. 01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	1/6813	Z
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/6886</b>	<b>(2018. 01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	1/6886	Z

請求項の数 21 (全 79 頁)

(21) 出願番号 特願2018-74354 (P2018-74354)

(22) 出願日 平成30年4月9日 (2018. 4. 9)

(62) 分割の表示 特願2016-518429 (P2016-518429) の分割

原出願日 平成27年9月18日 (2015. 9. 18)

(65) 公開番号 特開2018-141795 (P2018-141795A)

(43) 公開日 平成30年9月13日 (2018. 9. 13)

審査請求日 平成30年4月9日 (2018. 4. 9)

(31) 優先権主張番号 10-2014-0140695

(32) 優先日 平成26年10月17日 (2014. 10. 17)

(33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(31) 優先権主張番号 10-2014-0140714

(32) 優先日 平成26年10月17日 (2014. 10. 17)

(33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(73) 特許権者 514005836

エスケー テレコム カンパニー リミテ

ッド

SK TELECOM CO., LTD

大韓民国 04539 ソウル、チュンク

ン、ウルチロ、65 (ウルチロ 2-ガ)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳転写診断用組成物およびこれを用いた脳転写診断方法