

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6025607号
(P6025607)

(45) 発行日 平成28年11月16日(2016.11.16)

(24) 登録日 平成28年10月21日(2016.10.21)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N	27/62	V
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	D
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N	33/68	

請求項の数 30 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2013-36621 (P2013-36621)	(73) 特許権者	508092576
(22) 出願日	平成25年2月27日 (2013. 2. 27)		エーテーハー チューリヒ
(62) 分割の表示	特願2011-508892 (P2011-508892) の分割		スイス国 チューリヒ CH-8092
原出願日	平成21年5月12日 (2009. 5. 12)		レミシュトラーセ 101/エーテーハー トランスファー
(65) 公開番号	特開2013-140170 (P2013-140170A)	(73) 特許権者	510300706
(43) 公開日	平成25年7月18日 (2013. 7. 18)		カントンスシュピタル ザンクト. ガレ ン
審査請求日	平成25年3月28日 (2013. 3. 28)		スイス国 9007 ザンクト. ガレン
審判番号	不服2015-13083 (P2015-13083/J1)		ロアシャッハー シュトラーセ 95
審判請求日	平成27年7月9日 (2015. 7. 9)	(74) 代理人	100086759
(31) 優先権主張番号	08008910.5		弁理士 渡邊 喜平
(32) 優先日	平成20年5月14日 (2008. 5. 14)	(74) 代理人	100154184
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 生富 成一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の診断及び治療のためのバイオマーカー及びそれを用いて決定されるバイオマーカーアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

良性の前立腺肥大との区別のための限局性前立腺癌の診断及び/又はモニタリングのためにデータを取得する方法であって、ヒト血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのものの中の ASPN ; HYOU1 ; CTSD ; OLFM4 ; ICAM1 ; THBS1 からなる群から選択される、少なくとも2つのタンパク質の濃度の組み合わせ測定を行う方法。

【請求項 2】

ヒト血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのものの中の ASPN ; HYOU1 ; CTSD ; OLFM4 ; ICAM1 ; THBS1 からなる群から選択される、少なくとも3つのタンパク質の濃度の組み合わせ測定を用いる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記測定が、これらのタンパク質/その断片の検出のために、タンデム質量分析技術を使用して行われる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記測定が、これらのタンパク質/その断片の検出のために、選択反応検出法 (SRM) の態様のタンデム質量分析技術を使用して行われる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記測定が、これらのタンパク質/その断片の検出のために、液体クロマトグラフィーと組み合わせるタンデム質量分析技術を使用して、及び/又は酵素免疫吸着法 (ELISA) を使用して行われる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 6】

H Y O U 1 ; C T S D ; O L F M 4 ; I C A M 1 ; T H B S 1 からなる群から選択される、1つのさらなるタンパク質の測定を組み合わせ、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の、A S P Nタンパク質の濃度の組み合わせ測定を用い、限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、A S P Nタンパク質の濃度が55 ng / ml より高くなければならない、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、A S P Nタンパク質の濃度が60 ng / ml より高くなければならない、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、H Y O U 1タンパク質の濃度が35 ng / ml より高くなければならない、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、H Y O U 1タンパク質の濃度が40 ng / ml より高くなければならない、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、C T S Dタンパク質の濃度が32 ng / ml 未満でなければならず、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、C T S Dタンパク質の濃度が25 ng / ml 未満でなければならず、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、O L F M 4タンパク質の濃度が20 ng / ml 未満でなければならず、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、O L F M 4タンパク質の濃度が15 ng / ml 未満でなければならず、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、I C A M 1タンパク質の濃度が360 ng / ml 未満でなければならず、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのために、I C A M 1タンパク質の濃度が340 ng / ml 未満でなければならず、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の、A S P N ; H Y O U 1 ; C T S D ; O L F M 4 ; T H B S 1 からなる群から選択される少なくとも3つのタンパク質の濃度の組み合わせ測定を用い、前記診断 / モニタリングのために、さらに、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の前立腺特異抗原 (P S A) の濃度を、親和性試薬に基づく、酵素免疫吸着法 (E L I S A) の態様の抗体に基づくアッセイを用いて測定し、確定診断のためには、前記前立腺特異抗原の濃度が、2 ng / ml より高くなければならない請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の、A S P N ; H Y O U 1 ; C T S D ; O L F M 4 ; T H B S 1 からなる群から選択される少なくとも3つのタンパク質の濃度の組み合わせ測定を用い、前記診断 / モニタリングのために、さらに、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の前立腺特異抗原 (P S A) の濃度を、親和性試薬に基づくアッセイを用いて測定する請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の、A S P N ; H Y O U 1 ; C T S D ; O L F M 4 ; T H B S 1 からなる群から選択される少なくとも3つのタンパク

10

20

30

40

50

質の濃度の組み合わせ測定を用い、前記診断/モニタリングのために、さらに、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのものの中の前立腺特異抗原 (P S A) の濃度を、親和性試薬に基づく、酵素免疫吸着法 (E L I S A) の態様の抗体に基づくアッセイを用いて測定する請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、A S P N タンパク質の濃度が、55 ng / ml より高くなければならない、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、A S P N タンパク質の濃度が、60 ng / ml より高くなければならない、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 21】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、H Y O U 1 タンパク質の濃度が、35 ng / ml より高くなければならない、請求項 18 ~ 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、H Y O U 1 タンパク質の濃度が、40 ng / ml より高くなければならない、請求項 18 ~ 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、C T S D タンパク質の濃度が、32 ng / ml 未満でなければならず、請求項 18 ~ 22 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 24】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、C T S D タンパク質の濃度が、25 ng / ml 未満でなければならず、請求項 18 ~ 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、O L F M 4 タンパク質の濃度が、20 ng / ml 未満でなければならず、請求項 18 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、O L F M 4 タンパク質の濃度が、15 ng / ml 未満でなければならず、請求項 18 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 27】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、I C A M 1 タンパク質の濃度が、360 ng / ml 未満でなければならず、請求項 18 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、I C A M 1 タンパク質の濃度が、340 ng / ml 未満でなければならず、請求項 18 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 29】

前記診断/モニタリングのために、付加的に、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのものの中の前立腺特異抗原 (P S A) の濃度を、親和性試薬に基づく、酵素免疫吸着法 (E L I S A) の態様の抗体に基づくアッセイを用いて測定し、

確定診断のためには、前記前立腺特異抗原の濃度が 2 ng / ml より高くなければならず、

限局性前立腺癌の診断/モニタリングのためには、前記前立腺特異抗原の濃度が 2 ng / ml より高くなければならず、

非限局性前立腺癌の確定診断のためには、前記前立腺特異抗原の濃度が 100 ng / ml より高くなければならず、請求項 1 ~ 28 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 30】

前記診断／モニタリングのために、付加的に、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのものの中の前立腺特異抗原（PSA）の濃度を、親和性試薬に基づくアッセイを用いて測定し、確定診断のためには、前記前立腺特異抗原の濃度が 2 ng/ml より高くなければならない、請求項 1～29 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌、特に前立腺癌の診断目的及び／又は患者の層別化のための特異的バイオマーカーアッセイ、並びにこれらの特異的バイオマーカーアッセイを用いる診断法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

前立腺癌の診断及び治療は、10年間の研究努力にもかかわらず、今もなお、臨床における主要な課題である。前立腺癌の進行は不幸にも無症状で、急速な進行及び潜在的に危険な病変を早期に発見することが患者の健康にとって極めて重要である。というのも、病気からの完全な回復及び治癒は、病気の初期の段階でのみ可能であるからだ。

【0003】

前立腺癌に利用できる最も良い非侵襲診断検査は、直腸指診（DRE）を併用した、血液中の前立腺特異抗原（PSA）の検出である。PSAは、前立腺の上皮細胞によって生成されるタンパク質である。PSAは、カリクレインIII、セミニン、セミノグラゼ、
- セミノプロテイン及びP-30抗原としても知られており、正常な男性の血清に少量存在する34kD糖タンパク質であるが、多くの場合、前立腺癌の存在下及び他の前立腺障害で上昇する。前立腺癌の早期発見のために現在利用できる最も効果的な検査は、DREを併用しての、PSA測定のための血液検査である。正常値より高いPSAは、限局性（loc）及び転移性（met）前立腺癌（CaP）の両方に関係する。 20

【0004】

PSAだけの診断精度は60%ほどしかなく、その方法は選択性に主な欠点がある（不必要な前立腺生検又は手術を受ける間違った陽性症例が多すぎる）。実際、PSAレベルは、前立腺感染症、炎症、良性前立腺肥大症（肥大）又は過形成（BPH）、及び射精直後（recent ejaculation）にも上昇し、誤った陽性結果を引き起こしてしまう。 30

【0005】

従って、たとえ、各種パラメータ（例えばフリー及びトータルPSA）の同時測定に基づく新規の方法が、総合的な診断精度を上げるためのツールとして現れても、信頼性のある非侵襲性の診断／予後法はまだ不足している。血液中の大部分のPSAは、血清タンパク質に結合しているが、少量はタンパク質に結合しておらず、フリーPSAと呼ばれる。前立腺癌を有する男性では、トータルPSAに対するフリーPSAの割合は減少する。トータルPSAに対するフリー（非結合）PSAの割合が25%未満の場合、癌の危険性が高まる。この割合が低くなればなるほど、前立腺癌の確率は高くなる。しかしながら、トータル及びフリーPSAはともに射精直後には上昇し、24時間内に基準レベルまでゆっくりと戻るし、CaPに関連しない他のメカニズムがトータルPSAに対するフリーPSAの割合に影響を与えることもあり得る。 40

【0006】

診断同様、前立腺癌の治療及び／又は予後は、病気の多様性のために大きな課題を残している。前立腺癌の複合的なメカニズムが提案されたけれども、患者を層別化できる適切なシグネチャーや、治療介入法のためのキーとなる標的タンパク質の欠如は、今もなお実現可能な範囲にない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

従って、本発明の目的は、癌の診断、予後、治療及び治療のモニタリングのための、及び/又は、特に前立腺癌（限局性であろうと非限局性であろうと）の患者の層別化のための改善されたバイオマーカーアッセイ及び/又は薬剤標的を提供することである。留意すべき点は、原理的観点からは、提案の方法は癌に制限されることはなく、あらゆる種類のヒト又は動物の疾患又は機能障害に適応できる。実際の観点からは、以下に記載の翻訳アプローチのために使用できるモデル系の利用が限られる場合もある。

【 0 0 0 8 】

留意すべき点は、マウス（又は一般に動物、例えば非ヒト動物モデル）からの候補だけが本発明の一部ではないことである。潜在的なマーカー候補は、ヒト組織、近位体液（proximal fluids）、動物モデル細胞株、データマイニング等をも含む様々なソースから決めることができる。

10

【 0 0 0 9 】

しかしながら、バイオマーカー発見へのシステム生物学アプローチのより一般的な状況において、動物モデルの優位性はかなり際立っている。（様々な組織を襲う）様々な癌において、細胞網がかき乱されると仮定しよう。さらに、癌の異なる発現が同じ又は重複する擾乱を持ち得ると仮定すれば、どのように標的組織がこの擾乱に反応するかを究明するのに、マウス等の動物モデルは、擾乱を分離して又は擾乱を規定通り組み合わせ、特異的に適用することができる。その上さらに、この反応を構成するタンパク質のいくつかは、擾乱の直接の結果（例えばキナーゼが消失し又は変異した場合のホスホペプチドの喪失）又は代償性結果が標的組織に特定の指紋を残すと仮定すると、これらの指紋のいくつかは、我々が本明細書に記載する方法を用いて血清中に検出可能である。遺伝学的に明確なマウスモデルの顕著な特徴により、ヒト癌においても突然変異するとわかっている特定の遺伝子の突然変異と関連する変化を決定することが可能となり（我々の場合でいうと例えばPTEN）、それゆえすぐに、検査及び治療される患者のサブクラスを提案する（オーダーメイド医療）。臨床試験を計画する際、有病率と罹患人口における分子マーカー種の頻度について確かな知識を持っていることが多くの場合重要となる。高い可能性で良い反応を示す患者を、いわゆる患者層別化プロセスで選択してもよい。この情報に基づいて、有効なコホートのサイズを、所定の正確なマーカープロファイルに対して推測できる。アーカイブした組織におけるレトロスペクティブ研究より、例えば、臨床段階のための計画が決定され本格的に開始される（fixed and committed）前に、素早く早期にこれらのパラメータを決定することができる。

20

30

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、これらの診断/治療/モニタリング/予後/患者層別化のための特異的バイオマーカーアッセイ、及びこれらの特異的バイオマーカーアッセイを用いる診断/治療/モニタリング/予後/患者層別化の方法を提案することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

好ましくは、上述のように、親和性試薬に基づく決定は、抗体に基づく決定方法/アッセイであり、例えば、酵素免疫吸着法（ELISA）、又はマルチプレックス・ビーズ・アレイ・アッセイ（Multiplex Bead Array Assay）、又は特異的タンパク質濃度の測定を目的とする他の方法であるように選択される。

40

【 0 0 1 2 】

上述のように、この方法は、癌のバイオマーカーの系（systems）の決定に適用できるだけでなく、生命体の他の種類の疾病又は機能障害のためのバイオマーカーの系の決定にも適用できる。このような場合、上記方法においては（明細書の以下の詳解においても）、「癌の」（例えばサンプルに対して）という表現は、実質的に「病気の」又は「機能障害の」という表現によって置き換えられるべきである。

【 0 0 1 3 】

従って、本発明が提供するものの1つは、一方で、（前立腺）癌の発見のための非侵襲

50

的診断法の精度を高めるための、及び臨床診療で用いられる新しい治療／画像化標的を同定するための概念である。

【0014】

本発明はさらに、上記の方法を用いて決定され得る、又はそのような方法を用いて特異的に決定され得る、癌診断バイオマーカーアッセイ及び／又は治療標的に関する。特に、このようなバイオマーカーアッセイ及び／又は治療標的は、対応する方法の説明にてさらに以下で述べるようなセット(set)から成ってよく、例えば、限局性前立腺癌のための癌診断／治療バイオマーカーアッセイは、限局性前立腺癌のモニタリング、特に良性の前立腺肥大との区別のために、ヒト血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのものの中の、ASP_N；VTN；AOC₃；LOX；PGCP；PSAP；THBS₁；CFH；CLU；KIT；TFRC；LGALS₃BP；GOLPH₂；HYOU₁；CTSD；OLFM₄；AKAP₁₃；CP；CPE；CPM；ICAM₁；MSMB；TM9SF₃；GALNTL₄から得られる群から選択される、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つのタンパク質及び／又はタンパク質の断片の濃度の組み合わせ測定に基づくことができる。ここに挙げた遺伝子名、本明細書全体において一般的に使用されるエンター名、タンパク質名(短縮形)及び登録番号は、欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)、スイスバイオインフォマティクス研究所(SIB)、及びタンパク質情報リソース(PIR)から成る、UniProt Consortium(www.uniprot.org)に従って定義される通りである。これらのタンパク質／その断片の検出のために、好ましくは、測定はタンデム質量分析技術、好ましくは選択反応検出法(SRM)をより好ましくは液体クロマトグラフィーと組み合わせたもの、及び／又は酵素免疫吸着法(ELISA)を用いて行われる。

【0015】

本発明は、癌診断バイオマーカーアッセイ及び／又は治療標的に関する。特に、このようなバイオマーカーアッセイ及び／又は治療標的は、対応する方法の説明にてさらに以下で述べるようなセットから成ってよく、例えば、限局性前立腺癌のための癌診断／治療バイオマーカーアッセイは、ASP_N、及び任意にVTNに、AOC₃；LOX；PGCP；PSAP；THBS₁；CFH；CLU；KIT；TFRC；LGALS₃BP；GOLPH₂；HYOU₁；CTSD；OLFM₄誘導タンパク質及び／又はその断片の1つを組み合わせたものに基づくことができる。

【0016】

本発明は、ヒト血清、血漿又はその他の血液の派生物、又は血液そのものの中の、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つ又は少なくとも5つのタンパク質／ペプチドバイオマーカーの測定を含む、(ヒトの)疾患又は機能不全の、好ましくは癌の、最も好ましくは前立腺癌(限局性又は非限局性)の診断、治療及び／又は治療モニタリングのための癌診断／治療バイオマーカーアッセイに関する。このアッセイは、例えば、酵素免疫吸着法等の抗体に基づくアッセイであってよいが、LC-SRMアッセイであってよい。

【0017】

このような癌診断バイオマーカーアッセイの信頼性を高めるため、前立腺特異抗原(PSA)等のさらなる系の検出のために、親和性試薬に基づくアッセイ、例えば、酵素免疫吸着法(ELISA)等の抗体に基づくアッセイと組み合わせることができる。また、これに関しては、例えばビーズテクニクを用いる一連の抗体の多重化技術も可能である。

【0018】

本発明は、さらに、ヒトの血清、血漿又はその他の血液の派生物、又は血液そのものの中の、ASP_N誘導タンパク質／その断片、及びVTN誘導タンパク質／その断片の濃度の(好ましくは組み合わせた)測定を用いた、限局性前立腺癌の診断方法に関する。精度を高めるために、1つの(又はいくつかの)さらなる測定、つまり、AOC₃；LOX；PGCP；PSAP；THBS₁から得られる群から選択される、1つのさらなるタンパク質／その断片の測定を行うことが好ましい。PSA測定と組み合わせる場合、さらなるタンパク質／その断片は、さらに、CFH；CLU；KIT；TFRC；LGALS₃B

10

20

30

40

50

P ; GOLPH2 から選択することができる。

【0019】

好ましくは、このような方法において、タンデム質量分析技術、好ましくは選択反応検出法 (SRM) を液体クロマトグラフィー (通常先に行う) と組み合わせて使用して測定が行われる。選択的に又は付加的に、これらのタンパク質 / その断片の検出のために、酵素免疫吸着法 (ELISA) 等の抗体に基づくアッセイを用いることができる。組み合わせアプローチが可能であり、例えば、1つの系 (又は系の群) をSRM (例えばELISAが利用できない場合) を用いて決定し、残りの系をELISA技術等の抗体に基づく技術を用いることによって決定することができる。

【0020】

このような方法では、通常、限局性前立腺癌の確定診断のためには、ASPN誘導タンパク質 / その断片の濃度が、55 ng/ml より高く、好ましくは60 ng/ml より高くなければならず、任意で同時に、VTN誘導タンパク質 / 断片の濃度が3500 ng/ml 未満、好ましくは3300 ng/ml 未満でなければならない。

【0021】

好ましくは (as preferred)、さらに、上述の付加的な系の1つを測定する場合、AOC3誘導タンパク質 / その断片の濃度は250 ng/ml 未満、好ましくは220 ng/ml 未満でなければならない、
及び / 又はLOX誘導タンパク質 / その断片の濃度は580 ng/ml 未満、好ましくは550 ng/ml 未満でなければならない、
及び / 又はPGCP誘導タンパク質 / その断片の濃度は550 ng/ml より高く、好ましくは570 ng/ml より高くなければならず、
及び / 又はPSAP誘導タンパク質 / その断片の濃度は33000 ng/ml 未満、好ましくは32500 ng/ml 未満、最も好ましくは32250 ng/ml 未満でなければならない、
及び / 又はTHBS1誘導タンパク質 / その断片の濃度は12500 ng/ml より高く、好ましくは13000 ng/ml より高く、最も好ましくは13500 ng/ml より高くなければならず、
及び / 又はLGALS3BP誘導タンパク質 / その断片の濃度は390 ng/ml より高く、好ましくは400 ng/ml より高くなければならず、
及び / 又はGOLPH2誘導タンパク質 / その断片の濃度は80 ng/ml より高く、好ましくは90 ng/ml より高くなければならず、
及び / 又はHYOU1誘導タンパク質 / その断片の濃度は35 ng/ml より高く、好ましくは40 ng/ml より高くなければならず、
及び / 又はCTSD誘導タンパク質 / その断片の濃度は32 ng/ml 未満、好ましくは25 ng/ml 未満でなければならない、
及び / 又はOLFM4誘導タンパク質 / その断片の濃度は20 ng/ml 未満、好ましくは15 ng/ml 未満でなければならない。

【0022】

好ましくは、このような方法において、測定は、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の、ASPN ; HYOU1 ; CTSD ; OLFM4 から得られる群から選択される少なくとも3つのタンパク質及び / 又はタンパク質の断片の濃度の組み合わせ測定を用いて、良性の前立腺肥大から区別するための限局性前立腺癌の診断及び / 又は治療及び / 又はモニタリングのために行われる。診断 / モニタリングのために、好ましくは、さらに、ヒトの血清、血漿又は血液の派生物、又は血液そのもの中の前立腺特異抗原 (PSA) の濃度を、親和性試薬に基づく、好ましくは酵素免疫吸着法 (ELISA) 等の抗体に基づくアッセイを用いて測定する。さらに好ましくは、確定診断のためには、前立腺特異抗原の濃度が、2 ng/ml より高く、好ましくは4 ng/ml より高くなければならない。

【0023】

10

20

30

40

50

本明細書において、好ましくは、限局性前立腺癌の確定診断又はモニタリングのためには、ASPN誘導タンパク質/その断片の濃度が、55 ng/mlより高く、好ましくは60 ng/mlより高くなければならず、及び/又は、HYOU1誘導タンパク質/その断片の濃度が、35 ng/mlより高く、好ましくは40 ng/mlより高くなければならず、及び/又は、CTSD誘導タンパク質/その断片の濃度が、32 ng/ml未満、好ましくは25 ng/ml未満でなければならず、及び/又は、OLFM4誘導タンパク質/その断片の濃度が、20 ng/ml未満、好ましくは15 ng/ml未満でなければならない。

【0024】

上に挙げた及び以下で詳しく説明する閾値濃度に関して留意すべきは、これらは、特定の測定技術に依存してもよく、例えばここで用いる方法、つまりSRMは全種、つまり例えば遊離種及び結合種を測定するが、例えば、ELISA等の抗体に基づくアッセイは、これら2つの形を区別することができるため、後者の方法を用いる場合には異なる閾値濃度となる。従ってここで挙げる値は、特にSRM法を用いる測定に関するものであって、異なる方法を用いる場合には類推によって (by analogy) 値を状況に合わせて変えなければならない。しかしながら、これは、この分野の当業者の技術範囲内の変更の範疇である。

10

【0025】

本発明はさらに、ヒトの血清、血漿又はその他の血液の派生物、又は血液そのもの中の、ASPN及びCTSD及びTHBS1及びGALNTL4及びVTN誘導タンパク質/その断片の濃度の測定を、好ましくはPSAP; GSPT1; CEACAM1; HYOU1; EFNA5; KITから得られる群から選択される、1つのさらなるタンパク質/その断片の測定を組み合わせる、転移性前立腺癌の診断のための極めて高精度な方法に関する。

20

【0026】

好ましくは、限局性前立腺癌の診断方法の上記場合のように、測定は、これらのタンパク質/その断片の検出のために、タンデム質量分析技術、好ましくは選択反応モニタリング (SRM) を、より好ましくは液体クロマトグラフィーと組み合わせる用いて、及び/又は酵素免疫吸着法 (ELISA) 等の抗体に基づく方法を用いて行われる。

【0027】

非局限性 (転移性) 前立腺癌の確定診断のためには、ASPN誘導タンパク質/その断片の濃度が、60 ng/mlより高く、好ましくは65 ng/mlより高く、最も好ましくは68 ng/mlより高くなければならず、同時に、CTSD誘導タンパク質/断片の濃度が、120 ng/mlより高く、好ましくは130 ng/mlより高く、最も好ましくは133 ng/mlより高くなければならず、同時に、

30

THBS1誘導タンパク質/断片の濃度が、12000 ng/ml未満、好ましくは11500 ng/ml未満、最も好ましくは10750 ng/ml未満でなければならず、同時に、

GALNIL4誘導タンパク質/断片の濃度が、1400 ng/mlより高く、好ましくは1600 ng/mlより高く、最も好ましくは1650 ng/mlより高くなければならず、同時に、

40

VTN誘導タンパク質/断片の濃度が、3000 ng/mlより高く、好ましくは3150 ng/mlより高く、最も好ましくは3300 ng/mlより高くなければならない。

【0028】

好ましくは、さらに、上述の付加的な系の1つを測定する場合、PSAP誘導タンパク質/その断片の濃度が33000 ng/mlより高く、好ましくは34000 ng/mlより高くなければならず、及び/又はGSPT1誘導タンパク質/その断片の濃度が450 ng/mlより高く、好ましくは500 ng/mlより高く、より好ましくは510 ng/mlより高くなければ

50

ならず、

及び/又はCEACAM1誘導タンパク質/その断片の濃度が35 ng/mlより高く、好ましくは38 ng/mlより高くなければならず(この閾値はELISA決定に関連して計算したものでしかない)、

及び/又はHYOU1誘導タンパク質/その断片の濃度が80 ng/mlより高く、好ましくは89 ng/mlより高くなければならず、

及び/又はEFNA5誘導タンパク質/その断片の濃度が60 ng/mlより高く、好ましくは65 ng/mlより高くなければならず、

及び/又はKIT誘導タンパク質/その断片の濃度が90 ng/mlより高く、好ましくは95 ng/mlより高くなければならない。

10

【0029】

上述のように、限局性又は非限局性前立腺癌診断のために、上述の系の測定を、上記のようなバイオマーカー決定法の結果ではない、血清、血漿又はその他の血液の派生物、又は血液そのもののさらなるパラメータの測定と組み合わせることが有利である。例えば、診断のために、さらに、ヒトの血清、血漿又はその他の血液の派生物、又は血液そのものの中の前立腺特異抗原(PSA)の濃度を、酵素免疫吸着法(ELISA)等の対応する抗体に基づくアッセイを用いて測定することが可能で、この場合確定診断のためには、前立腺特異抗原(PSA)の濃度が通常2 ng/mlより高く、好ましくは4 ng/mlより高くなければならない。

【0030】

20

本発明のさらなる実施形態は、従属請求項に示す。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、バイオマーカーの探索、検証及び確認のための統合プロテオミクス手法の概略である。このスキームは2つの主要なセクションに分けられ、つまり、1つ目は、動物モデルを用いて行われる発見及び検証段階であり、2つ目は、人間の患者のサンプルを用いての確認段階である。イタリック体の数字は、次の行程のために同定及び考慮される糖タンパク質の数を示し、a)では、Capのマウスモデルからの前立腺組織を用いてインビボCap-特異的シグネチャーを発見するため、健康なマウスと癌のマウスからの組織及び血清からN-グリコペプチドの選択的濃縮を行った。これにより、後の行程のためのリソースとして機能する785の糖タンパク質の目録(catalogue)が作成可能である。MSに基づくラベルフリー定量を、同じマウスの組織及び血清サンプルに行った。この結果、癌サンプルと良性サンプルを比べて352の糖タンパク質の相対定量ができた。その後、基準に合致する164の糖タンパク質をさらなる調査のために選んだ。b)で、これらのバイオマーカー候補41を、マウスの血清で確認できた。c)にて、MSに基づく選択反応モニタリング(SRM)及びELISAにより、人間の患者で43の候補が確認できた。ヒト段階と動物段階との間の境界はフレキシブルであり、例えば、このような収集が実際に利用可能であれば、人間のサンプルにおいて検証段階を行うこともできる。

30

【図2】図2は、マウスのグリコプロテオーム目録の概略であり、マウスの前立腺組織及び血清で同定されたタンパク質の数をベン図に表す。定量化できたタンパク質の数を下に示す。

40

【図3】図3は、多変量法での選択した候補の判別精度を示す。患者を、統計ソフトウェアによって生成したルールに従って分類する。正しい予測の%を、モデルの精度として定義する。上に示したように、遺伝子名は欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)、スイスバイオインフォマティクス研究所(SIB)、及びタンパク質情報リソース(PIR)から成る、UniProt Consortium(www.uniprot.org)に従って定義された通りである。最初の行の影付きの項目は、どの系が1つのアッセイ内で交換可能かを示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

50

添付の図に、本発明の好ましい実施例を示す。

図に関して、これらは本発明の目下の好ましい実施形態を説明するためのものであって、これを制限するためのものではない。図1はバイオマーカーの探索、検証及び確認のための統合プロテオミクス手法の概略を示す。このスキームは2つの主要なセクションに分けられる、つまり、1つ目は、動物モデル(マウス)を用いて行われる発見及び検証段階(a)及び(b)であり、2つ目は、人間の患者のサンプルでの確認段階(c)である。

【0033】

以下の例では、本方法を前立腺癌用のバイオマーカーの決定に適用する。上記のように、しかしながら、これは、本方法を同等に乳癌、肺癌、卵巣癌等の他の種類の癌に適用してよく、また、一般的に、多尿(糖尿病及び他のタイプのもの)、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、クロイツフェルト・ヤコブ病等の神経変性疾患、多発性硬化症、関節リュウマチ等の自己免疫疾患、マラリア、HIV等の感染症、高血圧、アテローム性動脈硬化等の心疾患等の他のタイプの疾患又は機能障害にも同等に適用してもよい。本発明の実際の主旨と解釈されるべきではない。上記のように、動物モデル研究の主な強みは、特定の定義された擾乱を適用でき、これらの因果関係が測定されることである。同じ擾乱はまた他の種類の癌にも関係することができ、このことは、疾患関連等の一般用語が示唆することとは対称的に、誘導される擾乱の合理的根拠の結果としてマーカーを見ることができるということを意味する。

【0034】

最初の発見段階では、健康なマウスと前立腺癌のマウスそれぞれに対し、前立腺組織サンプル、血清サンプル及び両方が使用され、その結果4つの異なるシリーズの実験となるが、差のある動向の決定のために、健康な/癌のマウスの組織サンプルだけを比較し、他方、健康な/癌のマウスの血清を比較した。

【0035】

第1の工程(a)では、組織(以下より詳細に記載するように作製した)及び血清サンプルをトリプシンを用いて消化し、対応するプロテオーム消化物から、N結合型糖化タンパク質断片を選択し、SPE G技術(以下より詳細に記載する)を用いて抽出した。

【0036】

その後、この段階では差のある動向を決定せずに、糖タンパク質同定を質量分析法、特にショットガン法を用いて行った。この結果、トータルで、前立腺組織中に検出された糖タンパク質が532、血清中に検出された糖タンパク質が253であった。組織及び血清中に検出されたタンパク質は110であり、計785の糖タンパク質が検出された(図2に図示した)。

【0037】

ラベルフリー定量と名付けた次の段階は、タンパク質断片のシグナルの差のある動向の検出を目的とする。この実験は液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた実験で、クロマトグラフィーの溶出プロフィールに従って質量分析が行われる。この実験を用いて、健康なサンプルと癌のサンプルとの間の差のある動向を追跡することができる。このラベルフリー定量段階で差のある動向を示さなかったシグナル/タンパク質断片は、前述の785の糖タンパク質から棄却し、定量化タンパク質は352となった。このうち279は組織サンプルから生じたもので、160は血清サンプルから生じたものである(図2に示す)。

【0038】

これら352の定量化タンパク質は、さらに、顕著な差のある動向を示し、以下の表1に挙げて論じる8個の論理的根拠の少なくとも1つに適合するものだけが維持されるように選択される。これは、論理的根拠を用いたフィルタリング後、164の潜在的候補バイオマーカーの系となり、これらは、電子アノテーションを用いた、特定の糖タンパク質へシグナルを帰属させた結果として生じたものである。

【0039】

第2工程(b)では任意で、非ヒト系を用いた検証、というより認定(qualification

10

20

30

40

50

）が行われるが、最終的なバイオマーカーアッセイ法のために使用される最終的な分析ツールが使用される。それに従って、この工程（b）では、健康な/癌のマウスの血清だけが分析され、同じく消化されて、（a）について述べたように糖タンパク質が抽出されるが、その後、選択反応モニタリング（SRM）、すなわち液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を、特異的に定めた（合成した）絶対量測定のための内標準を用いた系の絶対量測定のために使用する。

【0040】

工程（b）に入った164の系から、41だけが、主に実際の理由から、絶対的に定量することができた。対応する41の系を、以下より詳しく説明した表2に挙げる。

【0041】

従って、次の工程に対しては、工程（a）から結果として生じた164の系全てを、確認である最終工程（c）のために使用する。工程（b）の結果を、さらに、RT-PCR、免疫組織化学、ウエスタンブロット法を用いて検証する。

【0042】

工程（c）では、基本的に、工程（b）と同じ処置が行われるが、今度は、健康な/癌の個人のヒト由来の血清サンプルを用いて行われる。SRM側から、これは、37候補に至った。可能な限り、工程（c）に入った164候補を利用可能なELISA法を用いてさらに確認し、さらに11の可能性のある候補に至った。

【0043】

一定の系はSRM検証及びELISA確認によって生じるという事実により、これは、最終的に43の候補バイオマーカー系となった。これらを表3に載せる。

【0044】

主要な観点から、これらのいずれかを、できる限り1つ又は数個組み合わせて、前立腺癌の検出のための分析において使用することができる。

【0045】

できるだけ高精度を保ちながら、必要な測定の数減らすことを考え、患者のデータ収集物との相関関係において、統計的手法（より詳細な説明については以下で見る）を43全ての系に適応し、図3に挙げる最終的な分析に至った。

【0046】

5つの特に高精度な分析を図3A)に挙げるが、これらのすべてに、ASPN及びVTNが存在することに留意しなければならない。従って、これに対応して、これらの遺伝子由来の糖タンパク質、というよりもこれらの糖タンパク質の断片は、良性の前立腺肥大（BPH）と限局性前立腺癌（locPca）との区別の高い指標となる。対応する精度は、80%を超え、PSA法の現状の精度より約20%ほど高い。

【0047】

ELISAを用いたPSA測定を付加的に組み込むと、図3B)に挙げるような、BPHとlocPcaとを識別するためのバイオマーカーアッセイがさらに9個統計的に見つかる。これらの系の全てにも、ASPN及びVTN誘導糖タンパク質が存在する。これらの組み合わせ測定の精度は、PSA測定を考慮しない場合よりさらに10%高く、前立腺癌の検出に対し、今までのところ未到の極めて高い精度となった。

【0048】

ELISAを用いるPSA測定を付加的に組み込んで、より多くのデータを用いると、図3C)に挙げるような、BPHとlocPcaとを識別するためのバイオマーカーアッセイがさらに5個統計的に見つかる。これら系のそれぞれには、ASPN、OLFM4、HYOU1、CTSD誘導糖タンパク質の群の系のうちの3つが存在する。対応する精度は、同じく80%を超え、PSA法の現状の精度より約20%ほど高い。

【0049】

最後に、図3D)には、locPcaとmetCPaとを識別するためのバイオマーカーアッセイに対する統計的結果を挙げる。各アッセイにおいて6個の系を組み合わせて測定することにより、100%の精度が達成される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

このように、提案する方法は、高精度のバイオマーカーアッセイの開発を目的とする強力なツールを提供するだけでなく、さらに、前立腺癌の特定の状況に対し、対応して決定されたバイオマーカーアッセイが、これまでに文献で報告されているものを超える予想外に高い精度を有することを示すのがわかる。

【 0 0 5 1 】

実験の詳細：

(I) 翻訳アプローチ：

翻訳アプローチは、前立腺癌に対するマウスモデルでの興味ある (interesting) 候補バイオマーカーの最初の同定、及びヒトの臨床サンプルでのこのような候補の確認に基づく。臨床で使用される候補バイオマーカーを確定した診断又は治療標的として同定するために、我々は、前立腺癌を発症している遺伝子的に明確なマウス (P t e n 条件付きノックアウト、c K O、例えば U S 2 0 0 6 / 0 0 6 4 7 6 8 参照) 及び正常な P t e n 対立遺伝子を有しこのような腫瘍を発症しない対照マウスからの前立腺組織及び血液の分析を開始した。

10

【 0 0 5 2 】

マウスモデルを用いるための論理的根拠：

我々は、遺伝的に明確な P t e n 条件付きノックアウトモデルを用いることを決めた。なぜならば、これらのマウスは腫瘍抑制遺伝子 P t e n の欠失を受けて、早期の上皮前立腺癌を発症するためである。この表現型はヒトの限局性前立腺癌と密接に関係しており、そのため、良性の過形成病変 (良性前立腺肥大症又は B P H) からヒト限局性前立腺癌を区別することのできる新規のバイオマーカーの同定のための理想的な出発点となる。さらに、P t e n c K O マウスモデルを使用することによって、P T E N 突然変異を有するか、又は P T E N シグナル伝達経路に沿った突然変異によって生じる何らかのアンバランスを有する層別化された患者専用に使われる、治療 / 画像標的及びバイオマーカーが同定できるようになる。マウスモデルの使用は、高度に不均一なヒト組織とは対照的に、前立腺組織が非常に均一で、環境条件及びタイミング等の主要変数を制御することができるため、候補バイオマーカーの最初の同定を容易にする。興味深いことに、前立腺癌組織量と総血液量の比は、人間に比べマウスでは 4 0 ~ 4 0 0 0 0 倍も高い。これは、もちろん、血液プロテオーム中の変化がヒトの患者サンプルよりこのようなモデルにおいてよりはっきりわかることが期待されるため、本質的な利点である。最後に、血液汚染を除去するために、マウスの組織だけを効果的にかん流させることができる (以下を参照) 。組織の血液タンパク質汚染は、多くの場合、特に低濃度で存在するタンパク質の同定を隠してしまう。さらに、かん流後組織に血液が存在しないことにより、なんら潜在的なバイアスなしに、比較プロテオミクス (血液 - 組織) を適応できるようになる (表 1、論理的根拠 1, 2, 4, 7 参照) 。

20

30

【 0 0 5 3 】

【表1】

表1		ヒト血清での確認のための対象となるタンパク質の選択				
論理的根拠のリスト					判別係数	
1		前立腺組織且つ血清で調節される潜在的バイオマーカー			>1.5又は<0.75	
2		前立腺組織で調節され且つ血清で検出される潜在的バイオマーカー			>1.5又は<0.75	
3		前立腺組織で調節され且つ分泌される潜在的バイオマーカー			>1.5又は<0.75	
4		癌を有するマウスの前立腺組織且つ血清で検出されるだけの潜在的バイオマーカー				
5		前立腺に特異的で且つ癌の組織又は血清で調節される潜在的バイオマーカー				
6		前立腺に特異的で且つ分泌される潜在的バイオマーカー				
7		前立腺組織又は血清で上方調節される潜在的バイオマーカー(>4x)				
8		知識に基づく選択に先立つ潜在的バイオマーカー(癌の進行中の生物学的機能)				
論理的根拠	遺伝子名	エントリー名	タンパク質名	登録番号	注釈又は予測される細胞局在(参照6)	
1	1	Ecm1	ECM1_MOUSE	細胞外基質タンパク質1	Q61508	分泌型
2	1	Egfr	EGFR_MOUSE	上皮成長因子受容体	Q01279	細胞膜/分泌型
3	1	Trf	TRFE_MOUSE	セロトランスフェリン	Q92111	分泌型
4	1	Pdia6	PDIA6_MOUSE	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A6	Q922R8	ER
5	1	Hsp90b1	ENPL_MOUSE	エンドプラスミン	P08113	ER
6	1	Rnase1	RNAS1_MOUSE	膵臓リボヌクレアーゼ	P00683	分泌型
7	1	Lifr	LIFR_MOUSE	白血病抑制因子受容体	P42703	細胞膜
8	2	Ighg1	IGH1M_MOUSE	Ig γ -1鎖 C領域、膜結合形状	P01869	分泌型
9	2	Clu	CLUS_MOUSE	クラスタリン	Q06890	分泌型
10	2	Cfh	CFAH_MOUSE	補体因子 H	P06909	分泌型
11	2	H2-L	HA1L_MOUSE	H-2 クラスI 組織適合抗原、L-D α 鎖	P01897	細胞膜
12	2	Col12a1	COCA1_MOUSE	コラーゲン α -1(XII)鎖	Q60847	分泌型
13	2	Dpp7	DPP2_MOUSE	ジペプチジルペプチダーゼ 2	Q9ET22	リソソーム
14	2	Pgcp	O70216_MOUSE	血漿グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ	Q9WVJ3	分泌型?
15	2	Cp	CERU_MOUSE	セルロプラスミン	Q61147	分泌型
16	2	Cfb	CFAB_MOUSE	補体因子 B	P04186	分泌型

10

20

30

40

17	2	Lrp1	LRP1_MOUSE	低比重リポタンパク受容体関連タンパク1	Q91ZX7	分泌型
18	2	Col1a1	CO1A1_MOUSE	コラーゲン α -1(I)鎖	P11087	分泌型
19	2	Itgav	ITAV_MOUSE	インテグリン α -V	P43406	細胞膜
20	2	Lama3	LAMA3_MOUSE	ラミニサブユニット α -3	Q61789	分泌型
21	2	Fn1	FN1_MOUSE	フィブロネクチン	P11276	分泌型
22	2	Anpep	AMPN_MOUSE	アミノペプチダーゼ N	P97449	細胞膜
23	2	Ctse	CATE_MOUSE	カテプシン E	P70269	エンドソーム
24	2	Ctsa	PPGB_MOUSE	リソソーム防御タンパク質	P16675	リソソーム
25	2	Ceacam1	CEAM1_MOUSE	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1	P31809	細胞膜
26	2	Ace	ACET_MOUSE	アンギオテンシン変換酵素、精巣特異的アイソフォーム	P22967	細胞膜/分泌型
27	2	Pdia3	PDIA3_MOUSE	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A3	P27773	ER
28	2	Sslp 1	SSLP1_MOUSE	分泌型精囊 Ly-6 タンパク 1	Q3UN54	分泌型
29	2	Btd	BTD_MOUSE	ビオチニダーゼ	Q8CIF4	分泌型
30	2	Atp1b2	AT1B2_MOUSE	ナトリウム/カリウム-トランスポーティング ATPase サブユニット β -2	P14231	細胞膜
31	2	Hspa5	GRP78_MOUSE	78 kDa グルコース関連タンパク質	P20029	ER
32	2	Psap	SAP_MOUSE	硫酸化糖タンパク質 1	Q61207	分泌型
33	2	Thbs1	TSP1_MOUSE	トロンボスポンジン 1	P35441	分泌型
34	2	Adcy3	ADCY3_MOUSE	アデニル酸シクラーゼ 3型	Q8VHH7	細胞膜
35	2	Ctbs	DIAC_MOUSE	ジ-N-アセチルキトビアーゼ	Q8R242	リソソーム
36	2	Ggh	GGH_MOUSE	γ -グルタミルヒドロラーゼ	Q9Z0L8	分泌型/リソソーム
37	2	Serping 1	IC1_MOUSE	血漿プロテアーゼ C1 阻害剤	P97290	分泌型/血漿?
38	2	L1cam	L1CAM_MOUSE	神経細胞接着分子 L1	P11627	細胞膜
39	2	1100001 H23Rik	PLBL1_MOUSE	推定ホスホリパーゼ B-like1	Q8VCI0	分泌型
40	2	Qsox1	QSOX1_MOUSE	スルフヒドリルオキシダーゼ 1	Q8BND5	分泌型/ゴルジ膜
41	2	Lrg1	Q91XL1_MOUSE	ロイシンリッチ α -2-糖タンパク質	Q91XL1	分泌型/血漿?
42	2	Lgals3bp	O35649_MOUSE	シクロフィリン C-結合タンパク質	O35649	細胞膜
43	2	Cd44	CD44_MOUSE	CD44抗原	P15379	細胞膜
44	3	Col14a1	COE1_MOUSE	コラーゲン α -1(XIV)鎖	Q80X19	分泌型

10

20

30

40

45	3	Fam3d	FAM3D_MOUSE	タンパク質FAM3D	P97805	分泌型
46	3	Pon3	PON3_MOUSE	血清パラオキシナーゼ /ラクトナーゼ3	Q62087	分泌型
47	3	Timp1	TIMP1_MOUSE	マトロプロテイナーゼ阻 害剤 1	P12032	分泌型
48	3	Abca16	Q6XBG1_MOUSE	ATP-結合カセット・トラ ンスポーター サブファ ミリーA メンバー16	Q6XBG1	血漿? 膜/ 分泌型?
49	3	Fbn1	FBN1_MOUSE	フィブリリン-1	Q61554	分泌型
50	3	Lum	LUM_MOUSE	ルミカン	P51885	分泌型
51	3	Lamb2	LAMB2_MOUSE	ラニンサブユニットβ-3	Q61292	分泌型
52	3	Vcan	CSPG2_MOUSE	ハニカン核タンパク質	Q62059	分泌型
53	3	Bgn	PGS1_MOUSE	バイグリカン	P28653	分泌型
54	3	Enpp5	ENPP5_MOUSE	エクトヌクレオチド ピロホスファターゼ/ホ スホジエステラーゼ ファミリー メンバー5	Q9EQG7	分泌型
55	3	Erap1	ERAP1_MOUSE	小胞体アミノペプチダーゼ 1	Q9EQH2	分泌型
56	3	Pxdn	PXDN_MOUSE	ペルオキシダジンホモログ	Q3UQ28	分泌型/ER
57	3	Col6a3	O88493_MOUSE	VI型コラーゲンα3サブユニッ ト	O88493	分泌型
58	3	Emilin1	EMIL1_MOUSE	EMILIN-1	Q99K41	分泌型
59	3	Mfap4	MFAP4_MOUSE	マイクロフィブリル結合糖タンパ ク質4	Q9D1H9	分泌型
60	3	Agrn	O08860_MOUSE	アグリリン	O08860	分泌型
61	3	Prelp	PRELP_MOUSE	プロラルギン(Prolargin)	Q9JK53	分泌型
62	3	Lamc1	LAMC1_MOUSE	ラニン サブユニットγ-1	P02468	分泌型
63	3	Lama1	LAMA1_MOUSE	ラニン サブユニットα-1	P19137	分泌型
64	3	Lama5	LAMA5_MOUSE	ラニン サブユニットα-5	Q61001	分泌型
65	3	Lama2	LAMA2_MOUSE	ラニン サブユニットα-2	Q60675	分泌型
66	3	Col6a5	A6H586_MOUSE	コラーゲンVI型α5	A6H586	分泌型
67	3	Lamb1-1	LAMB1_MOUSE	ラニン サブユニットβ-1	P02469	分泌型
68	3	Creg1	CREG1_MOUSE	タンパク質CREG1	O88668	分泌型
69	3	Sva	Q64367_MOUSE	精嚢自己抗原	Q64367	分泌型
70	3	Serpib6	SPB6_MOUSE	セルピン B6	Q60854	細胞膜?/ 分泌型?
71	3	Cpe	CBPE_MOUSE	カルホキシペプチダーゼ E	Q00493	分泌顆粒
72	3	9530002 K18Rik	SPIKL_MOUSE	セリンプロテアーゼ阻害因子 kazal-likeタンパク質	Q8CEK3	分泌型
73	3	Olfm4	OLFM4_MOUSE	オルファクトジン-4	Q3UZZ4	分泌型
74	3	Lama4	LAMA4_MOUSE	ラニン サブユニットα-4	P97927	分泌型
75	3	Fcgbp	A1LOS2_MOUSE	LOC100037259タンパク質	A1LOS2	分泌型/ER?/ ゴルジ?
76	3	Dmbt1	DMBT1_MOUSE	Deleted in malignant brain tumors 1protein	Q60997	分泌型/細胞膜

10

20

30

40

77	3	Wfdc3	Q14AE4_MOUSE	Wap four disulfide core domain 3	Q14AE4	分泌型
78	3	Spink5	Q5K5D4_MOUSE	Spink5 protein	Q5K5D4	分泌型
79	3	Ngp	Q61903_MOUSE	骨髄二次顆粒タンパク質	Q61903	分泌型
80	3	Col7a1	CO7A1_MOUSE	コラーゲン α -1(VII)鎖	Q63870	分泌型
81	3	Itih5	ITIH5_MOUSE	インターアルファトリプシンインヒター重鎖H5	Q8BJD1	分泌型
82	3	Hyal6	Q8CDQ9_MOUSE	仮想グリコシドヒドロラーゼファミリー56含有タンパク質	Q8CDQ9	分泌型?
83	3	BC023744	Q0P6B3_MOUSE	BC023744タンパク質	Q0P6B3	分泌型
84	3	Aspn	ASPN_MOUSE	アスポリン	Q99MQ4	分泌型
85	4	Postn	POSTN_MOUSE	ペリオスチン	Q62009	分泌型
86	4	Fmr1	FMR1_MOUSE	脆弱X精神遅滞タンパク質 1 ホモログ	P35922	分泌型?/細胞質性
87	4	Golga5	GOGA5_MOUSE	ゴルジンサブファミリーAメンバー5	Q9QYE6	ゴルジ
88	4	Grn	GRN_MOUSE	グラニューリン	P28798	分泌型
89	4	Man2b1	MA2B1_MOUSE	リソソーム α マンナーゼ	O09159	リソソーム
90	4	Nav1	NAV1_MOUSE	ニューロンナビゲータ1	Q8CH77	細胞質性
91	4	Ramp3	RAMP3_MOUSE	受容体活性調節タンパク質3	Q9WUP1	細胞膜
92	5	Tspan1	Q99J59_MOUSE	トラスパニン1	Q99J59	細胞膜
93	5	5430419 D17Rik	Q8BZE1_MOUSE	仮想スペラ外受容体	Q8BZE1	細胞膜
94	5	Grk5	GRK5_MOUSE	Gタンパク質共役受容体キナーゼ5	Q8VEB1	細胞質性
95	5	Azgp1	ZA2G_MOUSE	亜鉛 α 2糖タンパク質	Q64726	分泌型
96	6	Spink3	ISK3_MOUSE	セリンプロテアーゼ阻害因子 Kazal型3	P09036	分泌型
97	6	Egf	EGF_MOUSE	前上皮成長因子	P01132	細胞膜/ 分泌型
98	6	Msemb	MSMB_MOUSE	β ミクロセミンプロテイン	O08540	分泌型
99	6	Creld2	CREL2_MOUSE	EGF様ドメインを有するシステインリッチタンパク質2	Q9CYA0	分泌型/ER
100	6	Pbsn	PBAS_MOUSE	プロバシン	O08976	分泌型
101	6	Sbp	SPBP_MOUSE	前立腺スベルミン結合タンパク質	P15501	分泌型
102	7	Ermp1	ERMP1_MOUSE	小胞体メタロプロテイナーゼ1	Q3UVK0	ER膜
103	7	Pigr	PIGR_MOUSE	多量体免疫グロブリン受容体	O70570	細胞膜
104	7	Cadm1	CADM1_MOUSE	細胞接着分子1	Q8R5M8	細胞膜
105	7	Golph2	GOLM1_MOUSE	ゴルジリンタンパク質2	Q91XA2	ゴルジ
106	7	Tspan8	Q8R3G9_MOUSE	Tspan8	Q8R3G9	細胞膜
107	7	Adam3	Q62287_MOUSE	シリステチン	Q62287	細胞膜

10

20

30

40

108	7	Thy1	THY1_MOUSE	Thy-1膜糖タンパク質	P01831	細胞膜
109	7	Mme	NEP_MOUSE	ネプリライシン	Q61391	細胞膜
110	7	Apmap	APMAP_MOUSE	アジホサイト細胞膜結合タンパク質	Q9D7N9	細胞膜
111	7	Ergic3	ERGI3_MOUSE	小胞体-ゴルジ中間区画タンパク質3	Q9CQE7	ER/ゴルジ
112	7	953003J23Rik	Q8BM27_MOUSE	Weakly similar to LYSOZYME C, TYPE M	Q8BM27	分泌型
113	7	Ceacam10	CEAMA_MOUSE	癌胎児性抗原関連細胞接着分子10	Q61400	分泌型
114	7	Plxna3	P70208_MOUSE	プレキシン3	P70208	細胞膜
115	7	Vmn2r10	O35204_MOUSE	推定フェロモン受容体	O35204	細胞膜
116	7	Hyou1	HYOU1_MOUSE	低酸素上方調節タンパク質1	Q9JKR6	分泌型/ER
117	7	Defb50	BD50_MOUSE	β デフェンシン50	Q6TU36	分泌型
118	7	Fcgbp	Q8BZE2_MOUSE	仮想フォン・ウィグランド因子D型タンパク質	Q8BZG2	分泌型
119	7	Rai2	RAI2_MOUSE	レチノイン酸誘導タンパク質2	Q9QVY8	細胞核
120	7	Pnliprp1	LIPR1_MOUSE	腓リパーゼ関連タンパク質1	Q5BKQ4	分泌型
121	7	Pdia2	Q14AV9_MOUSE	Pdia2タンパク質	Q14AV9	ER膜
122	7	Hp	HPT_MOUSE	ハプトグロビン	Q61646	分泌型/血漿
123	7	Cpm	CBPM_MOUSE	カルボキシペプチダーゼM	Q80V42	細胞膜
124	7	Pigs	PIGS_MOUSE	GPITランスアミダーゼコンポーネントPIG-S	Q6PD26	ER
125	7	Mup3	MUP3_MOUSE	主要尿タンパク3	P04939	分泌型
126	7	Gc	VTDB_MOUSE	ヒタシND結合タンパク質	P21614	分泌型
127	7	Prom1	PROM1_MOUSE	プロミン-1	O54990	細胞膜
128	7	Vtn	VTNC_MOUSE	ヒトロネクチン	P29788	分泌型
129	7	Aoc3	AOC3_MOUSE	膜銅アミノキシダーゼ	O70423	細胞膜
130	8	Lamp1	LAMP1_MOUSE	リソソーム膜糖タンパク質1	P11438	リソソーム
131	8	Lamp2	LAMP2_MOUSE	リソソーム膜糖タンパク質2	P17047	リソソーム
132	8	Itgb1	ITB1_MOUSE	インテグリン β -1	P09055	細胞膜
133	8	Itgae	ITAE_MOUSE	インテグリン α -E	Q60677	細胞膜
134	8	Flt4	VGFR3_MOUSE	血管内皮細胞増殖因子受容体3	P35917	細胞膜
135	8	Tnc	TENA_MOUSE	テネイシン	Q80YX1	分泌型
136	8	Fap	SEPR_MOUSE	セプラーゼ	P97321	分泌型
137	8	Asph	Q6P8S1_MOUSE	アスパラキシン酸 β ヒドロキシラーゼ	Q6P8S1	ER
138	8	Asah1	ASAH1_MOUSE	酸性セラミダーゼ	Q9WV54	リソソーム
139	8	Atrn	ATR_N_MOUSE	アトラクチン	Q9WU60	細胞膜
140	8	Cacna2d1	CA2D1_MOUSE	電位依存性カルシウムチャネルサブユニット α 2/ δ 1	O08532	細胞膜
141	8	Chl1	CHL1_MOUSE	神経細胞接着分子L1	P70232	細胞膜/分泌型
142	8	Ctsd	CATD_MOUSE	カテプシンD	P18242	リソソーム

10

20

30

40

143	8	Dpp4	DPP4_MOUSE	ジペプチジルペプチダーゼ 4	P28843	細胞膜/分泌型
144	8	Gba	GLCM_MOUSE	グリコシルセラミダーゼ	P17439	リソソーム
145	8	Ncam1	NCA12_MOUSE	神経細胞接着分子 1	P13594	細胞膜
146	8	Plxnb2	Q3UH76_MOUSE	プレキシシン B2	Q3UH76	細胞膜
147	8	Ptprj	PTPRJ_MOUSE	タンパク質型チロシン-タンパク質フォスファターゼ η	Q64455	細胞膜
148	8	Ptprk	PTPRK_MOUSE	受容体型チロシン-タンパク質フォスファターゼ κ	P35822	細胞膜
149	8	Sirpa	SHPS1_MOUSE	チロシン-タンパク質フォスファターゼ非受容体型基質 1	P97797	細胞膜
150	8	Kit	KIT_MOUSE	mast/幹細胞成長因子受容体	P05532	細胞膜
151	8	Sema4d	SEM4D_MOUSE	セマフォリン4D	O09126	細胞膜
152	8	Apob48r	AB48R_MOUSE	アポ蛋白B-100受容体	Q8VBT6	細胞膜
153	8	Agtr1	AGTRA_MOUSE	1A型アンジオテンシンII受容体	P29754	細胞膜
154	8	Tm9sf3	TM9S3_MOUSE	膜貫通 9 スーパーファミリーメンバー 3	Q9ET30	細胞膜?
155	8	Galnt4	GLTL4_MOUSE	ホリペプチド-n-アセチルガラクトサミンルトランスフェラーゼ	Q8K1B9	ゴルジ
156	8	Efna5	EFNA5_MOUSE	エフリン-a5	O08543	細胞膜
157	8	F5	O88783_MOUSE	血液凝固因子V	O88783	分泌型
158	8	Nptn	NPTN_MOUSE	ニューロプラスチン	P97300	細胞膜
159	8	Lox	LYOX_MOUSE	タンパク質リジン-6-オキシダーゼ	P28301	分泌型
160	8	Mmel1	MMEL1_MOUSE	膜メタロインテグリンペプチダーゼ様1	Q9JLI3	細胞膜
161	8	Tfrc	TFR1_MOUSE	トランスフェリン受容体	Q62351	細胞膜
162	8	Gspt1	Q8K2E1_MOUSE	G1期からS期への転移1	Q8K2E1	
163	8	Akap13	Q3T998_MOUSE	Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質13	Q3T998	
164	8	Vasn	VASN_MOUSE	バソリン(Vasorin)	Q9CZT5	細胞膜
165	8	Icam1	ICAM1_MOUSE	細胞間接着分子1	P13597	細胞膜

10

20

30

ヒト血清での確認のための興味あるタンパク質の選択

マウスの血清及び組織中に検出した165の糖タンパク質を、ターゲット質量分析を通じた検証及びその後のヒト臨床サンプルでの確認のために選択した。この明細書で通常使用される、遺伝子名、エントリー名、タンパク質名(短縮形)及び登録番号は、欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)、スイスバイオインフォマティクス研究所(SIB)、及びタンパク質情報リソース(PIR)から成る、UniProt Consortium(www.uniprot.org)に従って定義された通りである。注釈又は予測される細胞局在は、Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H.(2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc. 2, 953-711に従う。

40

【0054】

マウスを用いて細胞培養系を用いない論理的根拠:

プロテオミクス技術は、インビトロの細胞株に容易に適応されるが、インビボモデルの使用には、より複雑な取り扱い及び初期のトラブルシューティングが必要とされる。しか

50

しながら、我々は、インビボモデルを用いることに決めた。なぜならば、これは、インビトロモデルに比べて、ヒト疾患の複雑さをより厳密に模倣するからである。従って、今日、新鮮分離臓器に適用されるスクリーンはわずかなので、ここに呈示するアプローチは珍しい。

【0055】

組織及び血液の抽出法：

マウスを麻酔して、左心室をピンで留めて血液を抜き出す。次にマウスの心臓をかん流させる。これにより、前立腺組織から血液を完全に抜き出すことができる。その後、組織サンプルを解剖し、純粋な前立腺組織を、液体窒素の存在下で、直ちに瞬間凍結させ (snap-frozen)、乳鉢と乳棒を用いて細かく砕く。血清を血液から抽出し、 -80°C にて使用するまで保存する。

10

【0056】

(II) 最新の質量分析法 (MS) 及びバイオインフォマティクス：N結合型グリコプロテオームに焦点を合わせる論理的根拠：

候補バイオマーカーを見つけるために、我々は、特に関連の高いサブプロテオームである、N結合型糖化タンパク質に焦点を合わせることに決めた。タンパク質のグリコシル化は、長い間、共通の翻訳後修飾として認識されてきた。通常、グリカンはセリン又はトレオニン残基に結合されるか (O結合型グリコシル化)、又はアスパラギン残基に結合される (N結合型グリコシル化)。N結合型グリコシル化部位は大抵、N x S / T 配列モチーフ (x はプロリンを除く任意のアミノ酸を示す) に該当する (fall into)。タンパク質のグリコシル化は、細胞外空間に存在するタンパク質の特徴的な翻訳後修飾である。これは、腫瘍によって特異的に分泌され又は流され、血流に放出されるタンパク質 (それらを価値の高いバイオマーカー候補とする) の大部分がグリコシル化されることを意味する。さらに、糖タンパク質の濃縮により、特に低濃度で存在する興味ある候補の正体を暴露できる。なぜなら、組織サンプル中の細胞骨格タンパク質及び血清サンプル中のアルブミン (35 ~ 50 mg / ml で存在する) 等の、非常に豊富なグリコシル化されていない関係のないタンパク質は、測定から排除されるからである。

20

【0057】

N結合型グリコペプチド抽出法及び定量化：

N結合型糖タンパク質を同定するために、我々は、Zhang, H., Li, X. J., Martin, D.B., and Aebersold, R. (2003) ヒドラジド化学、安定同位体標識法及び質量分析法を用いるN結合型糖タンパク質の同定及び定量化、Nat Biotechnol 21, 660-666 (この開示は、S P E Gに関する説明に明示的に含まれる) に従う、組織及び血清からのN-グリコペプチド固相抽出法 (S P E G) を用いた。グリコペプチドをそのグリカン部分を介して固体担体に結合させる。その後、グリコシル化されてないペプチドを洗い流して、N-グリコペプチドを酵素PNGase Fを用いて特異的に放出できる。この方法は組織及び血清に同様に適用することができる。

30

【0058】

トランスプロテオミクスパイプライン (T P P) ソフトウエア・スイート及びSuperHirn (例えば、Mueller et al. 定量的プロテオミクスデータに基づく質量分析のためのソフトウエア・ソリューションの評価、J Proteome Res (2008) vol.7 (1) pp.51-61参照) と組み合わせ、使用する質量分析機器セットアップ (L T Q - F T インスツルメント) の高い質量精度及び保持時間再現性により、共通のペプチド特性の同定及びダイレクトなラベルフリー定量が可能となった。これにより、異なるパイプ (run) からのペプチド溶出プロフィールを比較し、糖タンパク質比率を、同じタンパク質に属するN-グリコペプチドから計算した。

40

【0059】

検証及び確認段階：

最初の発見段階からの我々の結果を検証するために、様々な論理的根拠によって選択された興味あるタンパク質のリストを、選択反応モニタリング (S R M、例えば、Stahl-Ze

50

ng, J., Lange, V., Ossola, R., Eckhardt, K., Krek, W., Aebersold, R., and Domon, B. (2007) N - グリコサイトの多重反応モニタリングによる血漿タンパク質の高感度検出、Mol Cell Proteomics 6, 1809-1817参照)を用いたターゲット質量分析によって、対応するマウス血清中で定量化した。

【0060】

この新規のアプローチは、感度という点で従来の免疫検出法(例えば、酵素免疫吸着法 E L I S A)に匹敵するタンパク質の検出及び定量を同時に可能とし、バイオマーカー候補それぞれに対する面倒な最適化ステップや新しい抗体の生成を必要としないという利点を有する。S R M実験は、M S / M Sフラグメンテーション用の化合物のペアレントマス (parent mass)を特定し、その後単独のフラグメントイオンを具体的にモニタリングすることにより達成される。このようにして、S R Mは、非常に複雑なマトリックスの真ん中にモニタリング及び定量可能な特有のフラグメントイオンを送る。標的N - グリコサイト(脱グリコシル化された形の、無傷のタンパク質中でN - グリコシル化されたペプチド)に対応する、安定同位体ラベルのペプチドを合成し、内標準として使用した。これにより、マウスの血清中に存在する内因性糖タンパク質の絶対的定量が可能となった(表2)。

10

【0061】

【表 2】

表2 マウス血清中のSRMによって測定した糖タンパク質					
				p-値	p-値
	遺伝子名	タンパク質名	登録番号	8週	18週
1	Anpep	アミノペプチダーゼ N	P97449	0.4524	0.8517
2	Asah1	酸性セラミダーゼ	Q9WV54	0.6247	0.0186
3	Aspn	アスポリン	Q99MQ4	0.2619	0.0068
4	Atp1b2	ナトリウム/カリウム-トランスポート ATPaseサブユニット β -2	P14231	0.6055	0.0894
5	Atrn	アトラクチン	Q9WU60	0.7464	0.0079
6	Cacna2d1	電位依存性カルシウムチャネル サブユニット α 2/ δ 1	O08532	0.6186	0.1576
7	Cadm1	細胞接着分子1	Q8R5M8	0.8260	0.0670
8	Chl1	神経細胞接着分子 1	P70232	0.9771	0.0258
9	Clu	クラスタリン	Q06890	0.7098	0.1500
10	Cpm	カルボキシペプチダーゼ M	Q80V42	0.3680	0.1460
11	Ctsd	カテプシン D	P18242	0.5680	0.0176
12	Dpp4	ジペプチジルペプチダーゼ 4	P28843	0.2811	0.1521
13	Ecm1	細胞外基質タンパク質 1	Q61508	0.9629	0.0322
14	Fap	セプラーゼ	P97321	0.6198	0.1000
15	Flt4	血管内皮細胞増殖因子受容体 3	P35917	0.9818	0.1180
16	Fn1	フィブロネクチン	P11276	0.7536	0.2586
17	Gba	グリコシルセラミダーゼ	P17439	0.2033	0.0070
18	Golph2	ゴルジリンタンパク質 2	Q91XA2	0.2742	0.0114
19	Hyou1	低酸素上方調節タンパク質1	Q9JKR6	0.4711	0.0352
20	L1cam	神経細胞接着分子 L1	P11627	0.5814	0.7871
21	Lamp1	リソソーム膜糖タンパク質 1	P11438	0.7962	0.0939
22	Lamp2	リソソーム膜糖タンパク質 2	P17047	0.0206	0.0504
23	Lgals3bp	シクロフィリン C-結合タンパク質	O35649	0.4300	0.0800
24	Lifr	白血病抑制因子受容体	P42703	0.3391	0.0066
25	Lrp1	低比重リポタンパク受容体関連タンパク1	Q91ZX7	0.6288	0.0336
26	Ncam1	神経細胞接着分子 1	P13594	0.7807	0.0412
27	Nptn	ニューロプラスチン	P97300	0.3157	0.7977
28	Pgcp	血漿グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ	Q9WVJ3	0.8894	0.0635
29	Pigr	多量体免疫グロブリン受容体	O70570	0.4333	0.3961
30	Plxnb2	プレキシン B2	Q3UH76	0.4965	0.0243
31	Pnliprp1	隣りパーゼ関連タンパク質1	Q5BKQ4	0.9855	0.0194
32	Postn	ペリオスチン	Q62009	0.2395	0.0954
33	Prom1	プロミン-1	O54990	0.8580	0.3555
34	Psap	硫酸化糖タンパク質1	Q61207	0.6845	0.1519
35	Ptpnj	受容体型チロシンタンパク質フォスファターゼ η	Q64455	0.7613	0.1003
36	Ptpnk	受容体型チロシンタンパク質フォスファターゼ κ	P35822	0.6358	0.0095
37	Sirpa	チロシンタンパク質フォスファターゼ非受容体型基質 1	P97797	0.7780	0.1677
38	Thbs1	トロンボスポンジン 1	P35441	NA	0.0110
39	Tnc	テネイシン	Q80YX1	0.9564	0.1920
40	Vasn	バソリン(Vasorin)	Q9CZT5	0.4737	0.1717
41	Vtn	ビトロネクチン	P29788	0.3433	0.2021

生後 8 週及び 18 週での、対照及び前立腺癌を有するマウスからのマウス血清中の S R

Mによって測定された41の血清糖タンパク質のリスト。0.05未満(below)のp値は、対応するタンパク質に対し、通常のマウス(n=3)と前立腺癌を有するマウス(n=3)との間に統計的に顕著な差があることを示す。実験は、8週及び18週のマウスに対して行った。遺伝子名、タンパク質名(短縮形)及び登録番号は表1に挙げるように定義する。

【0062】

対照マウス(健常)及び前立腺癌を有する(癌の)マウスの血清中の興味ある各ペプチドに特異的なフラグメンテーションチャンネルをモニタリングすることにより、高感度・高選択な分析を行った。その後、マウスで検出した潜在的バイオマーカーのヒトの相同分子種を、標準ELISA技術及び同じくターゲット質量分析を用いて、ヒト血清で確認した。

10

【0063】

(III)多変量統計法：多変量法を用いることの論理的根拠及び利点：

シグネチャー又はバイオマーカーの組み合わせ検出は、単独バイオマーカー検出の使用に比べ、診断精度を高めることになり得る。これは、トータル及びフリーPSAを前立腺癌の診断のために同時に用いる場合にも当てはまる。われわれのケースでは、一団の候補バイオマーカーを測定して、BPHと限局性前立腺癌(locPca)とを、又は限局性と非限局性、つまり転移性前立腺癌(metPca)とを、最も良く判別することのできるシグネチャーが何かを求めることができる。さらに、我々は、全てのシグネチャーで共通に共有されるバイオマーカーが何かを見出し、これらを知的財産に関して価値が高いものとすることができる。バイオマーカーシグネチャーに基づいて患者を分類するために、我々は、二次判別分析を行った。二次判別分析の目的は、個体で測定される独立変数(バイオマーカー)に基づき、個体を2以上のグループ(例えば、BPHとlocPca)の1つに配分するルールを決定することである。このルールを記述するパラメータは、既に公知の分類を有する全ての個体の変数分析から算出される。判別ルールのバイアスを見積もるために、我々は、Jackknife leave one-out交差検定を適用する。分析は、統計ソフトウェアパッケージSYSTAT12及びSPSS14.0を用いて行った。

20

【0064】

結果：

最初に、我々は、対照及び癌を患っているマウスの両方のかん流前立腺組織及び血清から、N-グリコペプチドを抽出した。我々は、前立腺組織から全部で642の糖タンパク質を、血清から253の糖タンパク質を同定し、110のタンパク質を共通に検出した。我々は全部で785のN-糖タンパク質を含む目録を作成することができた。最初のマウスの糖タンパク質の目録から、我々は、癌を有するマウスからのサンプルと、それぞれ対照とを比較して、組織から279の糖タンパク質を、血清から160の糖タンパク質を定量化することができた(図2)。これらのタンパク質から、表1に挙げた論理的根拠の少なくとも1つを満たす165の糖タンパク質が、潜在的なバイオマーカーであると発見し、さらなる検証のために選択した。

30

【0065】

マウスの血清サンプルにSRMを用いることにより、我々は、165の最初の候補から41を検証し定量化できた(表2)。

40

【0066】

SRMによってマウスの血清で既にテストされた、あるいはマウスの前立腺組織から最初の発見段階で目立った有望な候補であった46の候補バイオマーカー(表3)を、さらに、52のヒトの血清サンプルで確認した。これは、ELISA及びSRMを適用することにより行った。

【0067】

【表3】

表3 ヒト血清で測定された43の血清糖タンパク質のリスト				
	遺伝子名	タンパク質名	登録番号	分析に用いた技術
1	AGTR1	1型アンジオテンシンII受容体	P30556	SRM
2	AKAP13	A-キナーゼアンカータンパク質13	Q12802	SRM
3	AOC3	膜銅アミノキシダーゼ	Q16853	SRM
4	APOB	アポタンパク質B-100	P04114	SRM
5	ASPN	アスポリン	Q9BXN1	SRM
6	ATRN	アトラクチン	O75882	SRM
7	AZGP1	亜鉛α2糖タンパク質	P25311	SRM
8	CADM1	細胞接着分子1	Q9BY67	SRM
9	CEACAM1	癌胎児性抗原関連細胞接着分子1	P13688	ELISA, SRM
10	CFH	補体因子H	P08603	SRM
11	CLU	クラスτεリン前駆体	P10909	SRM
12	CP	セルロプラスミン	P00450	SRM
13	CPM	カルボキシペプチダーゼM	P14384	SRM
14	CTSD	カテプシンD	P07339	SRM
15	ECM1	細胞外基質タンパク質1	Q16610	ELISA, SRM
16	EFNA5	エフリン-A5	P52803	SRM
17	F5	凝固因子V	P12259	SRM
18	FAM3D	タンパク質FAM3D	Q96BQ1	ELISA
19	GALNTL4	推定ポリペプチドN-アセチルガラクトサミンルトランスフェラーゼ様タンパク質4	Q6P9A2	SRM
20	GOLPH2	ゴルジリンタンパク質2	Q8NBJ4	SRM
21	GRN	グラニューリン	P28799	ELISA
22	GSPT1	真核ペプチド鎖終結因子GTP結合サブユニットERF3A	P15170	SRM
23	HYOU1	低酸素上方調節タンパク質1	Q9Y4L1	SRM
24	KIT	マスト/幹細胞成長因子受容体	P10721	SRM
25	KLK3	前立腺特異抗原	P07288	ELISA, SRM
26	L1CAM	神経細胞接着分子L1	P32004	SRM
27	LGALS3BP	ガレクチン-3-結合タンパク質	Q08380	ELISA, SRM
28	LOX	タンパク質リジン-6-オキシダーゼ	P28300	SRM
29	LRP1	低密度(prolow-density)リポタンパク質受容体関連タンパク質1	Q07954	SRM
30	MME	ネプリライシン	P08473	ELISA
31	MMP1	間質性コラゲナーゼ	P03956	SRM
32	NCAM1	神経細胞接着分子1	P13591	SRM
33	OLFM4	オルファクトメジン-4	Q6UX06	SRM
34	PGCP	血漿グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ	Q9Y646	SRM
35	PIGR	多量体免疫グロブリン受容体	P01833	ELISA
36	POSTN	ペリオスチン	Q15063	ELISA
37	PSAP	プロアクチベーターポリペプチド	P07602	SRM
38	SEMA4D	セマフォリン-4D	Q92854	SRM
39	TFRC	トランスフェリン受容体タンパク質1	P02786	SRM
40	THBS1	トロンボスポンジン-1	P07996	ELISA, SRM
41	TIMP1	メタロプロテアーゼ阻害剤1	P01033	ELISA, SRM

10

20

30

40

42	TM9SF3	TM9SF3タンパク質	Q8WUB5	SRM
43	VTN	ビトロネクチン	P04004	SRM
44	ICAM1	細胞間接着分子1	P05362	SRM
45	CPE	カルボキシペプチダーゼ E	P16870	ELISA
46	MSMB	β -ミクロセミノプロテイン	P08118	ELISA

ヒト血清で測定された46の血清糖タンパク質のリスト。

選択したバイオマーカー候補を、SRM又はELISAによって分析した。遺伝子名、タンパク質名(短縮形)及び登録番号は表1に挙げるように定義する。

【0068】

統計的分析:

統計的分析を受けて、我々は、アスポリン(ASPIN)、ビトロネクチン(VTN)及び膜銅アミノキシダーゼ(AOC3)からなる3-バイオマーカーシグネチャーを同定できた。このシグネチャーは、BPH(n=15)とlocPca(n=16)患者の識別で81%の精度を有した。つまり、このことは、我々の3-バイオマーカーシグネチャーによって、分析された患者の81%が正確に診断されたことを意味する。AOC3は、最も弱い寄与因子であることがわかった。従って我々はこのタンパク質を他の潜在的なバイオマーカーで置き換え、同様又はより高い精度(80%)を得るものを維持した。このようにして、次のタンパク質を個々に付け加えることができた: LOX、PGCP、PSAP、THBS1(図3A)。

【0069】

PSA自身の判別も同様に測定し、71%の精度で、BPH(n=15)とlocPca(n=16)患者を識別した。

【0070】

さらに、我々は、PSAのデータをASPIN及びVTNのコアシグネチャーに加えた。次のタンパク質の1つを含むことにより、最大90%の精度を達成した(図3B)。AOC3、CFH、CLU、KIT、LOX、TFRC、THBS1、LGALS3BP、GOLPH2。

【0071】

より多くのデータを用いた統計的分析を受けて、我々は、アスポリン(ASPIN)、カテプシン(CTSD)、低酸素上方調節タンパク質1(HYOU1)、及びオルファクトメジン-4(OLFM4)を含む5-バイオマーカーシグネチャーをさらに同定できた。このシグネチャーは、BPH(n=35)とlocPca(n=41)の患者の識別で87%の精度を有した。つまりこのことは、分析された患者の87%が、我々の5-バイオマーカーシグネチャーによって正確に診断できたことを意味する。PSA自身の識別も同様に測定したが、その結果、BPH(n=41)とlocPca(n=64)の患者の識別は72%の精度であった(図3C)。

【0072】

さらに、各ケースでこれら4つのタンパク質の1つだけを取り除くことにより、最大83%の精度を達成した(図3C)。

【0073】

同じデータセットを用いて、表3による系からの選択にいくらかあまり厳しくない基準(somewhat less stringent criterion)を適用することにより、バイオマーカーの精密なリストを決めて表4に集める。表4に挙げる系の少なくとも3つの群を、PSA(ELISA)測定と組み合わせて用いた分析により、約80%がそれを超える精度に至った。PSA(ELISA)測定と組み合わせて、表4に挙げる系の少なくとも4つを選択すると、約85%がそれを超える精度にさえ至った。

【0074】

表4に挙げる系のそれぞれに対する閾値は濃度閾値を示し、この上側又は下側(示すように)で確定診断を下すことができる。1つのアッセイ(例えば、表4から選択した3つ

10

20

30

40

50

のバイオマーカーの群)のマーカーの全ての濃度が、これらの濃度値を超える場合、上述の精度で確定診断を下すことができる。

【0075】

【表4】

表4 ヒト血清で測定された15の血清糖タンパク質のリスト						
	遺伝子名	タンパク質名	登録番号	分析に用いた技術	基本濃度	好ましい濃度
1	AKAP13	A-キナーゼアンカータンパク質13	Q12802	SRM	>2500	>2800
2	ASPN	アスポリン	Q9BXN1	SRM	>55	>60
3	CFH	補体因子H	P08603	SRM	<250000	<231500
4	CP	セルロプラスミン	P00450	SRM	<120000	<101500
5	CPE	カルボキシペプチダーゼ E	P16870	ELISA	>0.05 (OD)	>0.075 (OD)
6	CPM	カルボキシペプチダーゼ M	P14384	SRM	<110	<95
7	CTSD	カテプシンD	P07339	SRM	<32	<25
8	HYOU1	低酸素上方調節タンパク質1	Q9Y4L1	SRM	>35	>40
9	ICAM1	細胞間接着分子1	P05362	SRM	<360	<340
10	LGALS3BP	ガレクチン-3-結合タンパク質	Q08380	SRM	<400	<390
11	MSMB	β -ミクロセミノプロテイン	P08118	ELISA	>0.12 (OD)	>0.15 (OD)
12	OLFM4	オルファクトメジン-4	Q6UX06	SRM	<20	<15
13	TM9SF3	TM9SF3タンパク質	Q8WUB5	SRM	>8	>10
14	VTN	ビトロネクチン	P04004	SRM	<3500	<3300
15	GALNTL4	推定ポリペプチド・N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ様タンパク質4	Q6P9A2	SRM	<15	<10

統計的分析 (BPH (n = 35) 及び locPCa (n = 41)) 後のヒトの血清で測定される15の血清糖タンパク質の精密なリスト。遺伝子名、タンパク質名(短縮形)及び登録番号は表1に挙げるように定義する。1つ目の列には、基本濃度の閾値を ng/ml で示し、2つ目の列には、好ましい濃度の閾値を ng/ml で示す。ODと記されたところは、405nmで測定が行われ、相対値は市販の抗体 (CRE: R&D systems、ポリクローナル: Nr. AF3587、及び R&D systems、モノクローナル: MAB3587; MSMB: R&D systems、ポリクローナル: Nr. AF3780、及び Abnova、モノクローナル: H00004477-M08) を用いて与える。

【0076】

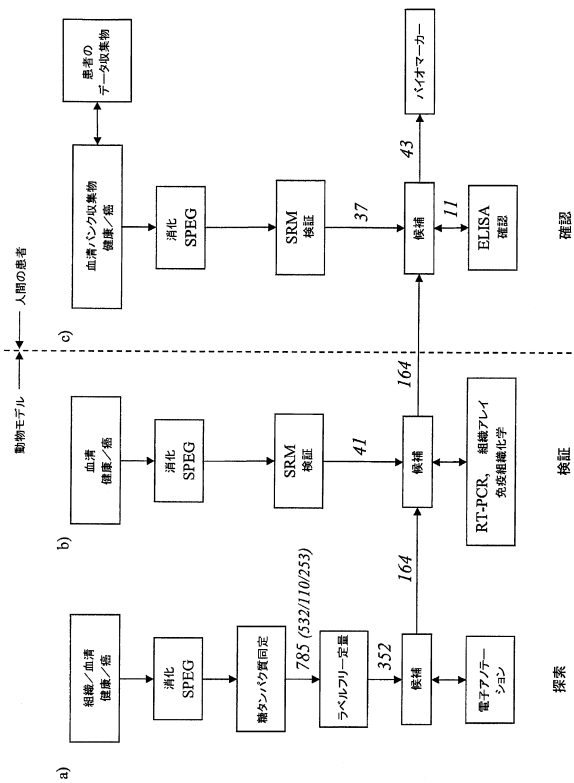
b) 以下のバイオマーカーを含むバイオマーカーシグネチャーを用いて、我々は、ケースの100%で、locPCa (n = 16) と metPCa (n = 21) 患者を正確に区別できた: アスポリン (ASPN)、ビトロネクチン (VTN)、カテプシンD (CSTD)、ポリペプチド・N-アセチル-ガラクトサミニルトランスフェラーゼ GALNTL4、ポリアクチベーター・ポリペプチド (PSAP) 及びトロンスポンジン-1 (THBS-1)。PSAPは、最も弱い寄与因子であることが分かった。これを除外しても、識別分析の97%精度が達成された。従って、我々は、他の潜在的バイオマーカーでこのタンパク質を置き換え、精度を高めたもの (>97%) を維持した。このようにして、以下のタンパク質を個々に加えることができた: CEACAM1、EFNA5、GSPT1、HYOU1、KIT (全てにおいて100%の精度が得られた) (図3)。

【0077】

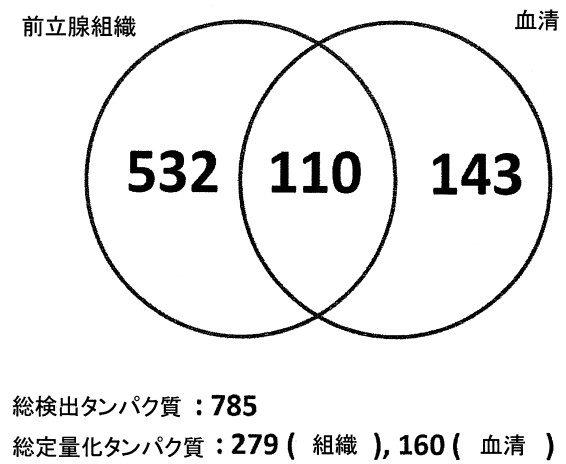
留意しなければならない点は、表3に挙げる系のいずれか、好ましくは2つの組み合わせ、最も好ましくは少なくとも3つ(又はちょうど3つ)の組み合わせ、少なくとも4つ

(又はちょうど4つ)の、又は少なくとも5つ
 (又はちょうど5つ)の糖タンパク質の組み合わせとしての系が、本発明によってカバーされるアッセイであり得る点である。上記のような特定の統計的に評価される系は、これらの統計的なテストに取り込まれる診断的側面に対し最も効果を発揮すると示し得るものである。異なる診断/予後/治療側面又は異なる統計的評価法を使用するために、異なる組み合わせもまた可能であり、本発明によるものと見なされるべきである。

【図1】



【図2】



【 3 - 1 】

良性前立腺肥大(BPH, n=15)と限局性前立腺癌(loePCa, n=16)との鑑別

A) 以下のバイオマーカーは、BPHとloePCaとの鑑別のためのコア部分に構造的に寄与した。

a	ROCE3 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)
	精度 81%	精度 80%	精度 80%
	感度 90%	感度 88%	感度 80%
	特異性 80%	特異性 80%	特異性 80%
b	PRSC2 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)
	精度 84%	精度 80%	精度 91%
	感度 88%	感度 88%	感度 85%
	特異性 80%	特異性 80%	特異性 80%
c	PRSC2 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)
	精度 81%	精度 81%	精度 80%
	感度 80%	感度 80%	感度 80%
	特異性 80%	特異性 80%	特異性 80%

B) 以下のバイオマーカーは、BPHとloePCaとの鑑別のためのコア部分に構造的に寄与した。

a	ROCE3 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 90%	精度 87%	精度 88%	精度 87%
	感度 90%	感度 87%	感度 88%	感度 87%
	特異性 93%	特異性 88%	特異性 88%	特異性 87%
b	PRSC2 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 87%	精度 80%	精度 80%	精度 87%
	感度 87%	感度 80%	感度 80%	感度 87%
	特異性 88%	特異性 80%	特異性 80%	特異性 87%
c	GLI1 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 90%	精度 90%	精度 90%	精度 90%
	感度 88%	感度 88%	感度 88%	感度 88%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%
d	ROCE3 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 81%	精度 80%	精度 80%	精度 80%
	感度 90%	感度 88%	感度 80%	感度 80%
	特異性 80%	特異性 80%	特異性 80%	特異性 80%
e	PRSC2 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 80%	精度 80%	精度 80%	精度 80%
	感度 80%	感度 80%	感度 80%	感度 80%
	特異性 72%	特異性 72%	特異性 72%	特異性 72%

B) 以下のバイオマーカーは、BPHとloePCaとの鑑別のためのPSAを含むコア部分に構造的に寄与した。

e	ROCE3 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 80%	精度 80%	精度 80%	精度 93%
	感度 90%	感度 88%	感度 88%	感度 93%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%
f	PRSC2 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 90%	精度 88%	精度 88%	精度 93%
	感度 88%	感度 88%	感度 88%	感度 93%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%
g	THBS1 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 50%	精度 50%	精度 50%	精度 50%
	感度 88%	感度 88%	感度 88%	感度 88%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%
h	IGFBP3 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 64%	精度 64%	精度 64%	精度 75%
	感度 75%	感度 75%	感度 75%	感度 75%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%
i	IGFBP3 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	PSA (ELISA)
	精度 81%	精度 81%	精度 81%	精度 81%
	感度 81%	感度 81%	感度 81%	感度 81%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%

【 3 - 2 】

良性前立腺肥大(BPH, n=35)と限局性前立腺癌(loePCa, n=41)との鑑別

C) 以下のバイオマーカーは、二重コンセンティツク回帰を用いたBPHとloePCaとの鑑別のためのコア部分に構造的に寄与した。

a	PSA (ELISA)	OLF44 (SRM)	HYOU1 (SRM)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)
	精度 87%	精度 87%	精度 87%	精度 87%	精度 87%
	感度 90%	感度 90%	感度 90%	感度 90%	感度 90%
	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%	特異性 93%
b	PSA (ELISA)	HYOU1 (SRM)	ASPN (SRM)	OLF44 (SRM)	
	精度 83%	精度 83%	精度 83%	精度 83%	
	感度 83%	感度 83%	感度 83%	感度 83%	
	特異性 83%	特異性 83%	特異性 83%	特異性 83%	
c	PSA (ELISA)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)	OLF44 (SRM)	
	精度 80%	精度 80%	精度 80%	精度 77%	
	感度 80%	感度 80%	感度 80%	感度 77%	
	特異性 83%	特異性 83%	特異性 83%	特異性 77%	

限局性前立腺癌(loePCa, n=16)と転移性前立腺癌(metPCa, n=21)との鑑別

D) 以下のバイオマーカーは、loePCaとmetPCaとの鑑別のためのコア部分に構造的に寄与した。

a	PRSC2 (SRM)	ASPN (SRM)	VTN (SRM)	THBS1 (ELISA)	GALNTL4 (SRM)
	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%
	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%
	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%
b	CEACAM1 (ELISA)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)	VTN (SRM)	THBS1 (ELISA)
	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%
	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%
	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%
c	ERAS (SRM)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)	THBS1 (ELISA)	GALNTL4 (SRM)
	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%
	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%
	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%
d	GRIP1 (SRM)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)	VTN (SRM)	THBS1 (ELISA)
	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%
	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%
	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%
e	HYOU1 (SRM)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)	VTN (SRM)	THBS1 (ELISA)
	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%
	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%
	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%
f	KIT (SRM)	ASPN (SRM)	CTSD (SRM)	THBS1 (ELISA)	GALNTL4 (SRM)
	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%	精度 100%
	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%	感度 100%
	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%	特異性 100%

フロントページの続き

- (72)発明者 ヴィルヘルム クレーク
スイス国 8704 ヘルリベルク ヴィーゼンライン 15
- (72)発明者 イゴレ シーマ
スイス国 6717 トーレ-ブレニオ カーサ コッコーニ
- (72)発明者 ルドルフ エバーソルド
スイス国 8049 チューリヒ ミッシェルシュトラーセ 52
- (72)発明者 ラルフ シース
スイス国 8037 チューリヒ ガイベルシュトラーセ 4
- (72)発明者 トーマス チェルニー
スイス国 9000 ザンクト.ガレン ローゼンガルテンシュトラーセ 1d
- (72)発明者 ジルケ ギレッセン
スイス国 9000 ザンクト.ガレン ロータッハシュトラーセ 9

合議体

審判長 郡山 順
審判官 尾崎 淳史
審判官 渡戸 正義

- (56)参考文献 特表2005-518522(JP, A)
国際公開第2006/019357(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
IPC G01N 33/53-33/577 DB CA BIOSIS MEDLINE STN

专利名称(译)	用于诊断和治疗前列腺癌的生物标志物和用其确定的生物标志物测定法		
公开(公告)号	JP6025607B2	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	JP2013036621	申请日	2013-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	广扫描舒皮焦油圣加伦		
申请(专利权)人(译)	Eteha苏黎世 广扫描舒皮焦油圣.圣加伦		
当前申请(专利权)人(译)	Eteha苏黎世 广扫描舒皮焦油圣.圣加伦		
[标]发明人	ヴィルヘルムクレーク イゴレシーマ ルドルフエバーソルド ラルフシース トーマスチエルニー ジルケギレッセン		
发明人	ヴィルヘルム クレーク イゴレ シーマ ルドルフ エバーソルド ラルフ シース トーマス チェルニー ジルケ ギレッセン		
IPC分类号	G01N27/62 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57434 G01N33/57407 G01N33/6848 G01N2333/47 G01N2333/70525 G01N2333/8146		
FI分类号	G01N27/62.V G01N33/53.D G01N33/68		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/LA07 2G041/LA08 2G045/AA13 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB03		
优先权	2008008910 2008-05-14 EP		
其他公开文献	JP2013140170A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种改进的方法，用于确定癌症诊断，预后，治疗和治疗监测的生物标志物分析和/或药物靶点。 溶液：ASPN; VTN; AOC 3; LOX; PGCP; PSAP; THBS 1; CFH; CLU; KIT; TFRC; LGALS 3 BP; GOLPH 2; HYOU 1; CTSD, 是人血清，血浆或血液的衍生物，使用选自OLFM 4; AKAP 13; CP; CPE; CPM; ICAM 1; MSMB : TM 9 SF 3; GALNTL 4的至少两种，优选至少三种蛋白质和/或蛋白质片段的浓度的组合测量特别是对于局部前列腺癌的诊断和/或治疗和/或监测以区别于良性前列腺腺大，所述测量的特征在于，为了检测这些蛋白质/其片段，串联质量分析技术。【选择图】无

論理的根拠のリスト	選択子名	エントリー名	タンパク質名	登録番号	注釈又は予測される細胞局在(参照6)
1	Ecm1	ECM1_MOUSE	細胞外基質タンパク質1	Q61508	分泌型
2	Egfr	EGFR_MOUSE	上皮成長因子受容体	Q01278	細胞膜/分泌型
3	Tre	TRE_MOUSE	セロトリン受容体	Q92111	分泌型
4	Pdia6	PDIA6_MOUSE	タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ A6	Q922R8	ER
5	Hsp90b1	ENPL_MOUSE	ヒートショックプロテイン	P08113	ER
6	Rnase1	RNASE1_MOUSE	リボ核酸分解酵素	P00883	分泌型
7	Lifr	LIFR_MOUSE	白血球抑制因子受容体	P42703	細胞膜
8	Ighg1	IGH1_MOUSE	免疫グロブリン G 鎖	P01869	分泌型
9	Clu	CLUS_MOUSE	クラスタリン	Q06890	分泌型
10	Cfb	CFAB_MOUSE	補体因子 B	P06800	分泌型
11	H2-L	H2L_MOUSE	H2 クラス II 組織適合抗原, L-D α 鎖	P01897	細胞膜
12	Col12a1	COL12A1_MOUSE	コラーゲン α1(XII)鎖	Q60847	分泌型
13	Dpp7	DPP2_MOUSE	ジスルフィドイソメラーゼ 2	Q9ET22	リソソーム
14	Pgap	Q70216_MOUSE	血漿グロタン結合カルボキシペプチダーゼ	Q9WVJ3	分泌型?
15	Cp	CERU_MOUSE	セロロプラスミン	Q61147	分泌型
16	Cfb	CFAB_MOUSE	補体因子 B	P04186	分泌型

