

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-525026

(P2006-525026A)

(43) 公表日 平成18年11月9日(2006.11.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-514193 (P2006-514193)	(71) 出願人	593108772
(86) (22) 出願日	平成16年5月3日 (2004.5.3)		ヘルス リサーチ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月21日 (2005.11.21)		Health Research, Inc
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/013499		.
(87) 国際公開番号	W02004/099379		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 142
(87) 国際公開日	平成16年11月18日 (2004.11.18)		63、バッファロー、エルム アンド カ
(31) 優先権主張番号	60/467,733		ールトン ストリーツ (番地なし)、ロズ
(32) 優先日	平成15年5月2日 (2003.5.2)		ウェル パーク キャンサー インステイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		テュート ディヴィジョン内
		(74) 代理人	100068032
			弁理士 武石 靖彦
		(74) 代理人	100080333
			弁理士 村田 紀子
		(74) 代理人	100115222
			弁理士 徳岡 修二
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 形質細胞疾患の診断における JAG2 の発現の使用

(57) 【要約】

本発明は、多発性骨髄腫および意義不明のモノクローナル免疫グロブリン異常症などの形質細胞疾患がJAG2の発現の増加により特徴づけられるという所見に基づくものである。従って本発明は、JAG2の発現または過剰発現を検出することによる形質細胞疾患の診断のための方法を提供するものである。JAG2の発現または過剰発現は、増加したmRNAの転写または増加したタンパク質として検出できる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

形質細胞を含む個人由来の骨髄サンプルにおいて、

- a) JAG2mRNAの発現、または
- b) JAG2タンパク質

を検出することを含む、個人における形質細胞疾患の診断のための方法であって、

JAG2mRNAの発現またはJAG2タンパク質の存在が形質細胞疾患の指標であり、JAG2mRNAの発現の欠如またはJAG2タンパク質の発現の不在が形質細胞疾患以外の疾患の指標である方法。

【請求項 2】

JAG2mRNAの検出を、ノーザン・ブロットイング、インサイチュ・ハイブリダイゼーション、PCRに基づく方法、およびこれらの組み合わせから成る群から選択される方法により行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記PCRに基づく方法がRT-PCRである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

RT-PCRに用いるプライマー対が、配列番号 1 および配列番号 2 の配列を有するものである、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

JAG2タンパク質の検出を、当該JAG2タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントを用いて行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記JAG2タンパク質の検出を、モノクローナル抗体を用いるFACS分析を用いることにより行う、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記JAGS2タンパク質の検出を、ポリクローナル抗体を用いることにより行う、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記JAGS2タンパク質の検出を、モノクローナル抗体を用いることにより行う、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

前記モノクローナル抗体が配列番号 3 のペプチドに特異的なものである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 10】

JAG2mRNAの発現またはJAG2タンパク質の検出前に、前記骨髄サンプルを形質細胞に関して濃縮する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

形質細胞特異的抗体による選択的吸着により、前記骨髄サンプルを形質細胞に関して濃縮する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記骨髄細胞特異的抗体がCD138およびCD38から成る群から選択されるものである、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記骨髄サンプル中のJAG2mRNAの発現のレベルまたはJAGタンパク質のレベルをネガティブコントロールと比較する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

形質細胞を含む個人由来の骨髄サンプルにおいて、

- a) JAG2mRNAの発現、または
- b) JAG2タンパク質

を検出するステップを含む、個人における形質細胞疾患の重篤度を測定するための方法で

10

20

30

40

50

あって、

JAG2mRNAの発現のレベルまたはJAG2タンパク質のレベルが、MGUS、くすぶり型骨髄腫、多発性骨髄腫および形質細胞性白血病から成る群から選択される形質細胞疾患症状の指標である方法。

【請求項 1 5】

JAG2mRNAの発現の検出を、ノーザン・ブロットイング、インサイチュ・ハイブリダイゼーション、PCRに基づく方法およびこれらの組み合わせから成る群から選択される方法により行う、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記PCRに基づく方法がRT-PCRである、請求項 1 5 記載の方法。

10

【請求項 1 7】

RT-PCRに用いるプライマー対が、配列番号 1 および配列番号 2 の配列を有するものである、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

JAG2タンパク質の検出を、JAG2タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗原特異的フラグメントを用いて行う、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記JAG2タンパク質の検出を、モノクローナル抗体を用いるFACS分析を用いることにより行う、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

前記モノクローナル抗体が配列番号 3 のペプチドに特異的なものである、請求項 1 9 記載の方法。

20

【請求項 2 1】

形質細胞を含むサンプルにおける形質細胞疾患の診断のためのキットであって、JAG2をコードしている核酸分子に特異的にハイブリダイズする 1 種以上のプライマー対、およびRP-PCRを行うための試薬、を含むキット。

【請求項 2 2】

前記プライマー対の配列が配列 1 および配列 2 である、請求項 2 1 記載のキット。

【請求項 2 3】

JAG2タンパク質に特異的なモノクローナル抗体、当該モノクローナル抗体の抗原結合フラグメント、およびこれらの組み合わせから成る群から選択される抗体；および免疫学的検出を行うための試薬、を含む、形質細胞疾患の診断に有用なキット。

30

【請求項 2 4】

前記モノクローナル抗体が配列番号 3 のペプチドに特異的なものである、請求項 2 3 記載のキット。

【請求項 2 5】

前記モノクローナル抗体が検出可能な標識を有するものである、請求項 2 3 記載のキット。

【請求項 2 6】

JAG2タンパク質に特異的なモノクローナル抗体であって、当該モノクローナル抗体により、当該JAG2タンパク質を表面に発現する形質細胞に結合するもの。

40

【請求項 2 7】

配列番号 3 のペプチドに対して作成されたものである、請求項 2 6 記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、本明細書中に引用により組み込む、2003年5月2日に出願された米国仮出願第 60/467,733号に対する優先権を主張するものである。

本発明は概して形質細胞疾患の分野に関し、およびより詳細には、形質細胞疾患の診断

50

のための方法を提供するものである。

【背景技術】

【0002】

多発性骨髄腫(MM)は合衆国において2番目に多く発症する血液疾患である。およそ13,000の新たな症例が毎年診断される。MMは、分化したB細胞(即ち、形質細胞)を末期的に冒すクローナル形質細胞増殖性疾患である。それは全悪性血液腫瘍の10%を占める。化学的治療法がある程度進歩したにも関わらず、この疾患は未だ不治であり、40ヶ月のMM患者の半分しか生存しない。MM同様、意義不明のモノクローナル免疫グロブリン異常症(MGUS)が、血清および尿におけるモノクローナル免疫グロブリンおよび骨髄におけるモノクローナル形質細胞の増加により特徴づけられる。しかし、MGUS患者はMMの臨床的な症状を示さない。重要なのは、MGUSの患者の25%が骨髄腫を進行させることである。

10

【0003】

骨髄における腫瘍形質細胞の検出は、多発性骨髄腫の診断をなすのに、およびパラタンパク質に伴う他の疾患から当該疾患を区別するのに重要である。当該腫瘍細胞は1タイプのみ免疫グロブリン鎖鎖を産生し、骨髄におけるモノクローナル増加とポリクローナル増加の免疫細胞学による区別を可能とする(McLennan等、Brit. Med. J., vol. 308: pp1033-1036, 1994)。モノクローナル免疫グロブリンバンド(パラタンパク質)は血液または尿、または多発性骨髄腫の患者の98%においてはこの両方に見いだされる。残る2%の患者は非分泌性の疾患を有する(Kyle等、Stem Cells. vol2, pp56-60, 1995)。パラタンパク質の発見は、多発性骨髄腫の診断をサポートするが、診断をなすものではない。当該血清パラタンパク質は、IgM - これは多発性骨髄腫瘍では、極めてまれにしか生じない - 以外のいずれかの免疫グロブリンのクラスのものである。完全なモノクローナル免疫グロブリンは患者の80%のみにおいて血清中に検出され得るので、血液および尿の両方におけるパラタンパク質を調べることが重要である。同程度の割合の患者で、尿中に、過剰のモノクローナル遊離鎖鎖が含まれる。血液および尿パラタンパク質濃度の連続測定により、形質細胞疾患を示す有用な基準、治療に対する反応、当該疾患の安定性、および疾患の進行の到来が提供される。

20

【0004】

数種の他のマーカーを多発性骨髄腫において、診断のためでなく予備診断的ファクターとして考慮できる。これらのパラメータには、形質細胞標識指標、ベータ2-ミクログロブリン、細胞遺伝学的異常、形質芽の形態、インターロイキン-6、LDH、血管形成、免疫のフェノタイピング、DNA異倍数性、活性化癌遺伝子、および他のファクター(血液学/北米の癌治療、KyleおよびGertz編者、モノクローナル免疫グロブリン異常症および関連疾患、WB Saunders版中の、RajkumarA&Greipp, 1999pp 1295-1315において報告されている)が含まれる。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

骨髄における形質細胞の増加数の検出は、形質細胞疾患の多くの症例の指標であるが、これは、増殖そのものの原因についての情報、細胞増殖の調節に関する遺伝子の変異的発現などを提供する方法の場合、感染や他の突発性疾患の原因による現象の発生を排除しないものである。つまり、MGUSおよびMMの指標たる形質細胞の増殖に伴う変化した遺伝子発現を検出可能な、形質細胞疾患の診断方法が必要とされる。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、形質細胞疾患の検出のための組成物および方法を提供するものである。本方法は、Jagged2(JAG2)の発現がMM細胞系ならびに、MMまたはMGUSを含む形質細胞疾患と診断された患者から得た一次腫瘍で増加するが、他の血液細胞腫瘍または非血液腫瘍の患者では増加しないという所見に基づくものである。

【0007】

50

本発明の一態様では、患者から得た骨髄サンプルにおいてJAG2の発現を測定するための方法が提供される。JAG2の発現は、JAG2mRNAのレベルまたはJAG2タンパク質のレベルを測定することにより評価できる。JAG2mRNAのレベルの測定のための方法には、ノーザン・ブロッティング、オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーション、PCRに基づく方法およびインサイチュ・ハイブリダイゼーション法が含まれるが、これらには限定されない。JAG2タンパク質レベルの測定するための方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISAs)、免疫蛍光に基づく方法、およびFACSに基づく方法などの免疫アッセイが含まれるが、これらには限定されない。

【0008】

JAG2mRNAまたはタンパク質の測定のための組成物も提供される。当該組成物には、逆転写mRNAのPCR増幅に有用なプライマー、およびJAG2タンパク質の検出のためのポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む抗体が含まれる。

【0009】

本発明は、形質細胞疾患においてJAG2の発現が増加するという思いがけない所見に基づくものである。本明細書中に用いる「形質細胞疾患」なる用語は、血清または尿におけるモノクローナルIgGまたはIgMおよび骨髄におけるモノクローナル形質細胞の増加により特徴づけられる形質細胞の増殖性疾患を意味する。形質細胞疾患の例には、MGUS、MM、くすり型MM(smoldering MM)および形質細胞白血病が含まれる。

【0010】

JAG2の発現または過剰発現に関して提唱される効果を、図1 - これはどのようにJAG2が作用するかを示す図である - に記載するが、これは特定の理論によって拘束されることを意図するものではない。IL-6遺伝子は、NOTCH-1および-2遺伝子(これらは、細胞の運命の決定において複合的な重要な役割を果たす)により、CBF1/RBPJ-Kappa経路を介して誘因され得ると考えられる。NOTCH-1および-2の活性化形態は、CBF1を転写のリプレッサーからアクチベーターへと変換する。NOTCHタンパク質はリガンドの結合により活性化され、NOTCH-1および-2のリガンドの一つがJAG2である。本明細書に示す実施例でさらに記載するように、発明者等はMM細胞系ならびにMGUS/MM患者サンプルにおいて、メッセンジャーおよびタンパク質の両レベルでJAG2の発現が変化することを測定した。そのような発現は、一連の正常コントロール由来の形質細胞においては観察されない。JAG2発現の脱レギュレーションは、JAG2プロモーターの低メチル化の結果である。JAG2の変化した発現は、MGUS/MM発病における初期の現象を示し得る(図2)。

【0011】

従って本発明は、形質細胞におけるJAG2の発現または過剰発現を検出することによる形質細胞疾患の診断のための組成物および方法を提供するものである。JAG2発現のレベルは形質細胞疾患を有しない患者(正常な個人、NHLまたは乳癌と診断された患者)から得た形質細胞のサンプルにおいてはわずかしか見いだされないため、一態様では、形質細胞サンプルにおけるJAG2の発現の検出が形質細胞疾患の指標となると考えられる。他の態様では、患者サンプルにおけるJAG2の発現を、ネガティブコントロール(正常な個人または形質細胞疾患を有しない患者)における発現と比較する。JAG2の発現の差を、JAG2タンパク質またはmRNAがコントロールにおけるよりも高レベルで発現されることを示す「過剰発現」と名付ける。

【0012】

「診断」または「診断試験」なる用語は、疾患の進行のいずれかの段階での当該疾患の同定を意味し、即ち、個人が当該疾患を有するかどうかの測定を含み、および/または当該疾患の段階の測定を含む。

当該方法は、形質細胞を含む骨髄のサンプルを得ること、次いでJAG2の発現または過剰発現に関して当該サンプルを評価すること、を含む。JAG2の発現または過剰発現は、mRNAまたはJAG2タンパク質のレベルなどのJAGに関連する転写産物を検出することにより測定できる。

【0013】

一態様では、JAG2の発現のレベルの測定は、形質細胞サンプルにおける、JAG2核酸をコードするmRNAの存在を検出するための、核酸配列、特異的オリゴヌクレオチドなどの使用を包含する。当業者は、溶液ハイブリダイゼーションまたは固相法において、核酸ハイブリダイゼーションプローブを用いることができる。固相法では、試験またはプローブ核酸を、選択されたマトリックスまたは表面に吸着ないしは固定する。固定した一本鎖の核酸を次いで、³²P-ヌクレオチドないし、ビオチンなどの標識を共有結合させたヌクレオチドで典型的に標識された選択プローブを用いる特異的ハイブリダイゼーションに供する。例えば、周知の核酸に基づくマイクロアレイ - これは、プローブ核酸が固定されているものである - を用いてJAG2mRNA片を検出してよい。JAGmRNAの発現の検出のためのハイブリダイゼーション法のいくつかの例を以下に示す。

10

【0014】

サンプルがJAG2を発現している細胞を含むかどうかを測定するための核酸に基づく方法は、サンプルから抽出したmRNAのノーザン・プロット分析である。ノーザン・プロット分析を行うための方法は当業者に周知であり、またSambrook, J.等、(1989)モレキュラークロニング：研究室マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリープレス、コールド・スプリングハーバー、N.Y.に記載されており、mRNA抽出、mRNAの電気泳動分離、プロットティング、プローブ調製およびハイブリダイゼーションは全て周知の方法である。mRNAを検出するためのオリゴヌクレオチドプローブを含むハイブリダイゼーションプローブは、JAG2の公知の配列(NCBIデータベース：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>にて遺伝子番号、NM145159)から容易に作成ないし設計できる。ノーザン・プロット分析に関しては、mRNAをポリdTカラムを用いて抽出し、当該物質を電気泳動により分離し、ニトロセルロース紙などの適当なマトリックスへと移す。単離したフラグメントまたはフラグメント(複数)から作成した標識プローブを用いて、ニトロセルロース紙に固定した相補フラグメントの存在を視覚化できる。ハイブリダイゼーション条件は常套的に最適化して、バックグラウンドシグナルを最小にすることができる。

20

【0015】

本明細書中に用いる「オリゴヌクレオチド」なる用語は、一般に少なくとも10、好ましくは少なくとも15、およびより好ましくは少なくとも20ヌクレオチド、好ましくは100ヌクレオチド以下の核酸を意味する。一般にオリゴヌクレオチドは、好ましくは核酸シンセサイザーにて合成調製する。前記特許において記載されるように、核酸アレイのためにはオリゴヌクレオチドはインサイチュで合成できる。従って、オリゴヌクレオチドは、天然では生じないホスホエステルアナログ結合、チオエステル結合などを用いて調製できる。

30

【0016】

サンプルにおけるJAG2mRNAの発現を検出するための他の方法は、固定した形質細胞または、一次腫瘍の固定ないし凍結セクションをインサイチュ・ハイブリダイゼーションにより使用するものである。この方法では、標識したハイブリダイゼーションプローブを細胞または組織サンプルのセクションと、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下に接触させる。非特異的結合を除去した後、特異的プローブのハイブリダイゼーションを標識に基づいて検出する。

【0017】

JAG2タンパク質をコードするmRNAを検出するための他の方法は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)法を用いるものである。PCR法は当該分野で周知である。(PCR法を実行するための方法は、「PCRプロトコル：方法および応用への手引き」、Innis, M.A.等、Eds. アカデミックプレス、インコーポレイティッド、サンディエゴ、カリフォルニア、(1990)；および「ポリメラーゼ鎖反応」、Erllich, H.A.等、Eds.コールド・スプリングハーバープレス、コールド・スプリングハーバー、N.Y.(1989)に開示されている。)PCR法は、DNA分子に存在する配列にハイブリダイズする5'および3'プライマーを提供することにより、DNA配列の複数のコピーの高速作成を可能とするものである。PCR法の変法では、RT-PCR(「逆転写ポリメラーゼ鎖反応」)を用いて、生物学的サンプルに潜在的に存在する標的mRNAを特異的に増幅できる。mRNAを逆転写酵素に供することにより、mRNAの塩基配列に相補的なcDNAが

40

50

産生される。次いで大量の選択されたcDNAを、ポリメラーゼ鎖反応 - サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) により産生される熱安定性DNAポリメラーゼの活性に依存する、その増幅活性のためのもの - を用いて、作成できる。

【0018】

PCRプライマーならびにオリゴヌクレオチドプローブは、JAG2の配列からのcDNA配列情報を用いて、当業者により常套通り設計できる。プライマーは一般に8~50ヌクレオチド、好ましくは15~30ヌクレオチドである。PCR産物、即ち増幅されたDNAは、あらゆる周知の方法により検出できる。

他の態様では、JAG2タンパク質は、当該タンパク質の検出に対して指向される方法により検出できる。例えば、ウェスタン・ブロッティングおよび免疫細胞化学は共に、JAG2の存在または不在の検出を可能とするものである。他の免疫アッセイフォーマットも使用できる。例えば以下に記載するように、抗体に基づくFACS分析も、JAG2の発現およびその定量の検出に使用できる。

10

【0019】

抗体に基づく検出法では典型的には、第一抗体をサンプル中の形質細胞へと結合させ、次いで非特異的結合を除去し、標識した第二抗体または同様の検出分子を添加する。標識の検出により次いで、特異的抗体の形質細胞への結合の同定が可能となる。モノクローナル抗体(またはその抗原結合フラグメント)を用いる場合、抗体自体を標識し、それにより第二抗体を導入するステップを省略できる。抗体上の検出可能な標識は当該分野で周知であり、例えば適当なクロモジェニック基質または蛍光標識とインキュベートした際に発色を生じる酵素活性を有する標識が含まれる。定量は次いで、例えば視覚スペクトル・スペクトロメーターまたはFACS装置を用いて発色の程度を測定することによりなすことができる。

20

【0020】

ウェスタン・ブロッティング、細胞ホモジェネートまたはその精製フラクションを次いでゲル電気泳動に供し、次いでブロッティングフィルター(ニトロセルロースフィルターなど)に移す。当該フィルターを抗体に曝し、次いで標識された第二抗体または他の検出法を用いて特定タンパク質の存在を測定する。

免疫蛍光、組織セクションまたは細胞は典型的には固定し、次いで特異的抗体に曝す。一般的には、BSAなどのニュートラルなタンパク質を含む溶液での洗浄により非特異的結合を除去した後、第一抗体に対して指向された標識二次抗体を用いて、JAG2への特異的抗体の結合を間接的に示す。

30

【0021】

ELISAアッセイでは、抗-JAG2抗体を選択された表面、例えばポリスチレン・マイクロタイター・プレートのウェルなど、タンパク質を結合できる表面に固定する。洗浄して不完全に吸着されたポリペプチドを洗浄した後、試験サンプルを導入する。試験サンプルと結合ポリペプチドの間の特異的免疫複合体を形成後、当該免疫複合体の形成は、当該免疫複合体を、検出可能な標識を有する二次抗体へと供することにより測定できる。

【0022】

JAG2に対して指向されたポリクローナル抗体は、適当な対象をJAG2で免疫化することにより調製できる。免疫化された対象における抗-JAG2抗体タイターは、ELISAなどの標準的な方法により、固定されたJAG2を用いて経時的にモニターできる。所望により、JAG2に対して指向された抗体分子は、哺乳動物から(例えば、血液から)単離でき、さらにタンパク質アクロマトグラフィーなどの周知の方法により精製して、IgGフラクションを得ることができる。

40

【0023】

JAG2に対して指向されたモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilsteinにより最初に記載された(1975, *Nature* 256: 495-497)ハイブリドーマ法などの標準的な方法により産生できる。簡単には、不死化細胞系(典型的には骨髄腫)をJAG2で免疫化した哺乳動物からのリンパ球(典型的には脾臓細胞)へ融合し、次いで生じたハイブリドーマ細胞の培養上清を

50

スクリーニングして、JAG2タンパク質に結合するモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを同定する。典型的には、不死化細胞系(例えば、骨髄腫細胞系)は当該リンパ球と同じ哺乳動物種から得る。例えば、ネズミのハイブリドーマは、本発明の免疫形成調製物で免疫化したマウス由来のリンパ球を不死化マウス細胞系と融合することにより作成できる。好ましい不死化細胞系は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含有する培養培地(「HAT培地」)に感受性のあるマウス骨髄腫細胞系である。多数の骨髄腫細胞系のいずれか、例えばP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/0-Ag14骨髄腫系を、標準法に従い融合パートナーとして用いてよい。これらの骨髄腫細胞は、アメリカ・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、Rockville, Md.から入手可能である。典型的にはHAT感受性マウス骨髄腫細胞をマウス脾臓細胞とポリエチレングリコールを用いて融合する。融合から生じたハイブリドーマ細胞を次いで、非融合および非生産性の融合骨髄腫細胞を殺すHAT培地を用いて選択する(非融合脾臓細胞は、形質転換しないが故に数日後死ぬ)。本発明のモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマ培養上清を、JAG2に結合する抗体に関して、例えば標準的なELISAアッセイを用いてスクリーニングすることにより検出する。ヒトのハイブリドーマは同様の方法で調製できる。従って本発明は、JAG2タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマをも含む。

10

【0024】

モノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマを調製するための別法は、組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(例えば抗体ファージディスプレイライブラリー)をJAG2タンパク質またはそのフラグメントでスクリーニングすることにより、モノクローナル抗体を同定および単離することである。

20

抗体の抗原結合フラグメントも使用できる。これらには、Fab、F(ab)'₂およびFvが含まれる。他の例は単鎖の抗体フラグメント、即ちScFvである。これらは通常、全抗原結合部位を含み、また、特異的結合特性を残す最小の抗体フラグメントである。

【0025】

形質細胞疾患の診断において、サンプルは当該分野で周知の方法により骨髄から得る。一度サンプルを骨髄から得たら、JAG2の発現の検出および、形質細胞などの細胞の同定は同一の方法または別個の方法で行うことができる。つまり、形質細胞をまず、形質細胞特異的分子に特異的なアフィニティを有する分子を配列化させたカラムを用いるなどの標準的な方法により、単離できる。例えば磁気性ビーズ(Miltenyis)を結合した抗-CD-138を使用できる。他の態様では、JAG2の免疫蛍光検出を形質細胞などの細胞の同定と、二重ないし三重免疫蛍光法を用いることにより組み合わせることができる。例えば二重蛍光標識は、JAG2およびCD138(またはCD38)の検出に関して行うことができる。この態様の他の変法では、三重蛍光標識を、JAG2、CD138、およびIgGの および 鎖の検出に関して行うことができる。典型的には全免疫蛍光法には、アイソタイプコントロールまたはポリクローナルの場合には一次抗体のみのいずれかと反応させがコントロールが含まれる。

30

【0026】

一態様では、JAG2の発現のレベルを用いて当該疾患の段階を測定する。つまり、JAG2の発現のレベルに基づき、MGUS、くすぶり型MM、MMまたは形質細胞白血病の診断をなすことができる。診断により、適当な治療的アプローチを選択できる。例えば、MMまたは形質細胞白血病などのより進行した段階では典型的に、より積極的な治療が必要となる。

40

【0027】

本発明はまた、形質細胞疾患の検出のためのキットを提供する。当該キットはJAG2mRNA、JAG2タンパク質またはその両方の検出のためのコンポーネントを含んでよい。例えば当該キットは、JAG2をコードしている核酸分子に特異的にハイブリダイズする1種以上のプライマー対またはJAG2タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体(本明細書中では「検出ユニット」と呼ぶ)またはこれらの組み合わせを含み得る。

【0028】

以下の実施例を本発明を説明するために示すが、いずれにしても限定的であることを意

50

図するものではない。

実施例 1

本態様は、MM細胞系におけるJAG2転写の特定を記載するものである。JAG2の発現または過剰発現が転写レベルで存在するかどうかを決定するために発明者等は、JAG2cDNAの別個の領域に特異的なプライマーを用いて一連のRT-PCR実験を行った。発明者等は正常のB-リンパ球および急性白血病細胞系(MUTZ5)を非MMネガティブコントロールとして用いた。

【0029】

トータルのRNAをToTALLY(登録商標)RNA抽出キット(Ambion, Austin, TX)を製造業者の指示に従い用いて調製した。第一鎖cDNA合成(MBIフラグメント、Hanover, MD)を、42 にて1時間、1 μ gのトータルRNAを用いて行った。PCRを、200 μ Mの各デオキシヌクレオトリホスフェート中100ngのcDNAおよび5pモルの各JAG2(フォワード; 5'GAC GTG CTC TA C CAG TGC AAG AA3' (配列番号1)およびリバース; 5'AAC AAC CAC AGG TGC GTC AAC AG3 '(配列番号2)またはGAPDHプライマー(ヒトGAPDH RT-PCRプライマー、Stratagene, La Jolla, CA))を用いて行った。PCRサイクルは以下の通りである: 92 にて2分間の初期変性および72 にて最終10分間の延長を伴う、92 にて20秒間、57 にて20秒間、72 にて2分間の35サイクル。期待されるPCR産物は、912bpJAG2フラグメントまたは525bpGAPDHフラグメントのいずれかである。PCR産物(10 μ l)を、エチジウムブロマイドを満した1%アガロースゲル上で電気泳動し、次いで撮影した。RT-PCR増幅を3回まで繰り返し、結果の再現性を確認した。

10

【0030】

結果を図3に示す。試験した全MM細胞系(K620、KMSM1、-2、RPMI8226、U266)は、RT-PCRにより検出されるJAG2転写産物を示したが、全非MMコントロールは、RT-PCRによってほとんど検出されないシグナルを有してネガティブであることが見いだされた。

20

【0031】

実施例 2

本態様は、MM細胞系におけるJAG2タンパク質の増加した発現を示すものである。本態様を説明するべく発明者等は、JAG2タンパク質のカルボキシ末端に対して指向されたヤギポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いて、9MM細胞系の免疫組織学(IHC)を行った。これら細胞系の8つはIL6とは無関係であり、一つはIL-6依存性であった(IL-6との無関係は、形質細胞白血病を示す)。当該細胞系の4つをウェスタン・プロットにより試験した。図4Aに示すように、末梢血液リンパ球、正常形質細胞およびMM細胞系の、JAG2抗体を用いた比較免疫染色は、細胞系でのJAG2発現を示したが、コントロールにおいては示さなかった(Bリンパ球および正常形質細胞はCD138+/JAG2-である)。サイトスピンを同じ細胞系およびコントロールから調製し、アセトンを用いて10分間室温にて固定し、次いで空気乾燥した。免疫蛍光に関しては、細胞をヤギ抗-JAG2ポリクローナル抗体(Santa Cruz, Santa Cruz, CA)と共にインキュベートし、次いでモノクローナルPC結合抗CD138抗体(PharMingen-BD, Franklin Lakes, NJ)と合わせたFITC結合ウサギ抗-ヤギ(Santa Cruz)と共にインキュベートした。核をジ-アミド-フェニル-インドール(DAPI)(Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA)で核染色した。免疫細胞化学に関しては、抗-JAGS 2抗体をDABで顕在化し、抗-CD138モノクローナル抗体をファストレッド(FastRed)で顕在化する二重染色キット(Dako, Carpinteria, CA)を用いた。核の核染色は行わなかった。

30

40

【0032】

4MM細胞系のウェスタン・プロット分析(図4B)により、JAG2の発現を確認した。レトロウイルスにより転移されたJAG2を構造的に発現しているNIH3T3細胞系(レーン2)(シカゴのイリノイ大学のMiele博士から入手)を参照として用いた。これらの典型的な実施例は、発明者等の細胞系で観察された発現または過剰発現が、レトロウイルスLTRにより指向される異所性発現に匹敵するものであることを示す。

【0033】

実施例 3

本態様は、FACS分析によるJAG2タンパク質の測定を記載するものである。新鮮なサン

50

ルにおけるJAG2タンパク質レベルを評価するために、発明者等はFACSアプローチを開発した。発明者等は、悪性(細胞系)および、正常BMならびに扁桃由来の形質細胞におけるJAG2の発現レベルを定量できた。発明者等は二重染色アプローチ(抗-CD138-PEおよびJAG2-FITC)および単染色アプローチ(JAG2-FITC)を用いた。二重染色アプローチでは、細胞を氷上0.5%のホルマリンを用いて固定する。洗浄後、0.5mlのFITC浸透溶液(BD Biosciences, San Jose, CA)を添加し、10分間室温にてインキュベートした。その後、細胞を1 μ gの抗JAG2一次抗体と共にインキュベートし、次いで、2.5 μ gのFITC標識二次抗体と共にインキュベート後、1 μ gの抗-cd138PE抗体と共にインキュベートした。単染色アプローチでは、形質細胞は抗CD-138結合磁気性ビーズ上にて濃縮する。発明者等は、インターロイキン(IL-2、-4、-10および-12)および抗-CD40Lのパネルを用いたB細胞の培養後得られた形質細胞をさらに分析した。全FACS実験には、ヤギIgアイソタイプまたは抗-JAG2一次抗体のみのいずれかと反応させたコントロールを含めた。図5に示すように、正常形質細胞はヤギアイソタイプコントロール抗体に匹敵するJAG2の発現レベルを示したが、全MM細胞系は著しいJAG2の発現を示した。

10

【0034】

実施例4

本態様は、JAG2タンパク質の発現が一次腫瘍においても観察されることを示すものである。本態様を説明するべく、MGUS、MMまたは無関係の疾患(コントロールのためのもの)の患者から新鮮な臨床サンプルを得た。患者サンプルならびに、その形質細胞の状態に関するその原則的な特徴を表1に示す。

20

【0035】

14人のこれらの患者は、以下の追跡実験で認められるMM、MGUSまたはくすぶり型骨髄腫いずれかを有する新規な患者または患者(複数)であった。非形質細胞疾患患者から4つのサンプルを得た。回収した骨髄(BM)を各々CD138カラムを用いるポジティブ選択を用いて形質細胞を単離するか、またはBMにおける形質細胞の割合が低すぎる場合にはFACS分析に直接供した(形質細胞の割合が低すぎる場合は、精製プロセス中に生じるロスの結果、細胞数が少なすぎて分析できなくなり、それゆえ高速分析(JAG2+アイソタイプ)を行うことができない)。FACS分析は患者サンプルにおいて、三色検出システムを用いて行い、悪性形質細胞におけるJAG2発現の高速分析を確実なものとする。発明者等は、各個々の患者において検出された単鎖Igにより、抗JAG2(FITC)、抗-CD138(トータルのBMを用いた場合)または抗-CD38(CD138+精製後)および抗- kappaまたは抗-lambdaを用いた。このアプローチを用いて、適当な細胞集団を、JAG2タンパク質レベルに関して分析した。全場合において、免疫蛍光または二重染色免疫組織化学(Dako)を、二重染色において抗-CD138(ローダミン-赤または、ファストレッド-赤にて顕在化される)および抗-JAG2(FITC-緑または茶(DAB))を用いて顕在化される)を用いてさらに行った(図6)。表1に示すように、全MM関連サンプルは顕著なJAG2の発現を示したが、非MMサンプルは示さなかった。これらの結果は発明者等の細胞系で得られた結果と一致する。サンプルのいくつか(CD138選択後、発明者等が両実験のために十分な細胞を得たもの)において行ったRP-PCRは、同様の転写レベルの増加を示した(データは示さず)。

30

【0036】

40

【表 1】

新鮮なサンプルを用いて、FACSおよび免疫蛍光分析により、形質細胞疾患患者または非形質細胞疾患患者において得られた結果のまとめ

BM #	BM % 細胞密度	% 形質細胞	臨床診断	モノクローナル タンパク質	JAG2 発見
9091	30	4	PCDなし	MCPなし	-
4666	30	3	PCDなし	MCPなし	-
4502	40	7	真性赤血球 増加症	MCPなし	-
7812	30	5	リン病	MCPなし	-
3201	-	1	扁桃細胞	PCMなし	-
4790	-	2	扁桃細胞	PCMなし	-
1980	30	3	PCDなし	PCMなし	-
3205	50	1	低グレード NHL	IgA カッパ	-
1409	30	6	乳癌	MCPなし	-
4438	>90	66	MM	IgG ラムダ	+
1906	30-40	3	MM rem.にて	IgG カッパ	+
6368	40	14	MM	IgG ラムダ	+
8961	45	4	MGUS	IgA カッパ	+
9625	40	5	くすぶり型 MM	IgG ラムダ	+
1130	30	10	MGUS	IgG カッパ	+
8768	30	4	MGUS	IgA ラムダ	+
2247	70	7	治療されたMM	IgG カッパ	+
2976	60	4	治療されたMM	IgA カッパ	+
2477	50	31	MM	IgG ラムダ	+
1291	70	17	MM	IgG カッパ	+
4087	30	31	MM	IgG カッパ	+
1154	30	5	MGUS	IgG カッパ	+
13544	>90	90	MM	IgG カッパ	+
1332965	70	25	MM	IgG ラムダ	+
073886	30	10	MGUS	IgA ラムダ	+
0838	80	75	MM	IgA カッパ	+

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

実施例 5

本態様は、モノクローナル抗体をJAG2タンパク質の発現の検出のために作成および使用できることを示すものである。本態様を説明するべく、JAG2のNOTCH-1への結合に關与す

ると考えられるJAG2の領域に対応するペプチドを合成した。当該ペプチドの配列はCDENYYS ATCNKFCRPRND(配列番号3)である。ペプチドをスカシ貝ヘモシアニン(KLH)に結合させた。マウスを結合ペプチドで免疫化し、ポリクローナル抗体反応を形成した。血清を回収し、ELISAにより試験した。脾臓を当該動物から取り出し、当該細胞をマウス骨髄腫細胞と融合し、ハイブリドーマを作成した。2つのモノクローナル抗体M2(IgG1)およびM8(IgM)を同定した。これらのモノクローナル抗体を、FACS分析をMM細胞系RPMI18226にて行うために用いた。結果を図7に示す。二次抗体のみを用いたトップパネルでは、この二次抗体に特徴的なピークが観察される。M2またはM8抗体を用いる場合、蛍光ピークのシフトが観察され、これは、これらの抗体の特異的結合およびそれゆえこれらの細胞におけるJAG2の発現を示す。

10

【0038】

実施例6

本態様は、一次腫瘍サンプルにおけるJAG2発現と当該疾患の段階との関連を示すものである。本態様を説明するべく、発明者等はJAG2の発現をFACSにより、JAG2ポリクローナル抗体およびコントロールとしてのヤギアイソタイプを用いて評価した。図8に示すように、正常形質細胞(骨髄、扁桃)、MGUSから形質細胞白血病への当該疾患の段階に伴い、JAG2の発現が増加する。従って、JAG2タンパク質またはmRNAのレベルの測定を用いて、当該疾患の段階を評価でき、治療をしかるべく設計できる。

【0039】

実施例7

本態様は、JAG2の発現を用いて形質細胞疾患を他の血液学的疾患から区別し、それにより別個の診断を提供できることを示すものである。本態様を以下の実施例により説明する。発明者等が試験した患者サンプルの一つにおいて、骨髄での形質細胞の増加があり、また、タンパク質電気泳動により観察されるモノクローナル免疫グロビンバンドはそれが多発性骨髄腫であることを示した。しかし、JAG2発現の評価をFACS分析により前記のごとく行った場合、JAG2レベルの増加は観察されなかった。従って、本発明の方法により、この症例において別個の診断がされ、それを形質細胞疾患としては分類しなかった。患者はその後、非-ホジキンリンパ腫を有すると分類された。

20

【0040】

本明細書中に示す実施例は、JAG2の過剰発現を用いてMMおよびMGUSなどの形質細胞疾患を診断できることを示す。特定の実施例を示したが、当業者は、本明細書中に記載する態様に対する通常の変更が可能であり、この変更は請求項により包含される本発明の範囲内にあることが意図されるものであることを認識するであろう。

30

【0041】

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Coignet, Lionel

<120> Use of JAG2 Expression in Diagnosis of Plasma Cell Disorders

<130> 03551.0160

<150> US 60/467,733

40

<151> 2003-05-02

<160> 3

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR forward primer

<400> 1

gacgtgctct accagtgcaa gaa

23

50

<210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> PCR reverse primer
 <400> 2
 aacaaccaca ggtgcgtaa cag 23
 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <220>
 <223> peptide corresponding to JAG2
 <400> 3
 cys asp glu asn tyr tyr ser ala thr cys asn lys
 5 10
 phe cys arg pro arg asn asp
 15

10

【図面の簡単な説明】

20

【0042】

【図1】図1は、JAG2を発現している細胞#1でのNOTCHの生理学的活性化およびNOTCHを発現している細胞#2を図示したものである。Aは、JAG2が細胞対細胞の接触によりNOTCHを結合することを示す。Bは、JAG2の結合により、NOTCHの細胞内部分(NOTCH-IC)のタンパク質分解的裂開が誘導されることを示す。Cは、一度裂開されると、NOTCH-ICは核へ転移することを示す。Dは、一度核内へ入ると、NOTCH-ICはCBF1などの下流エフェクターに結合して、例えばIL-6遺伝子の転写を活性化することを示す。

【図2】図2は、MMにおける進行性遺伝的現象を示す。各患者で必ずしも各段階が認められるわけではないが、正常形質細胞からMGUSへ - 細胞は不死化されるが、形質転換はされず、かつ進行的に蓄積ないし骨の破壊を起こすこともない - ; 髄内骨髓腫へ - 細胞がBMミクロ環境へと閉じこめられ、蓄積し、かつ骨の破壊を引き起こす - ; 髄外骨髓腫へ - 細胞がより迅速に増殖し、そして血液(形質細胞白血病)または他の髄外部位へと成長する - ; 骨髓腫細胞系へ - 細胞はインビトロにて増殖され得る - と、順序だって進行すると考えられる。このモデルは、臨床での進行に関連する遺伝的現象に関して考えられるタイミングをまとめたものである。

30

【図3】図3は、JAG2-ネガティブ[正常形質細胞(PC)およびMUTZ5-ALL]および-ポジティブ(K620、KMSM-1、-2およびRPMI8226)細胞系におけるJAG2転写のレベルを評価するRT-PCR実験の代表的な結果を示すものである。GAPDHレベルは、各チューブに存在するcDNAの量を正規化するのに用いた。

【図4A】図4Aは、末梢血リンパ球、正常形質細胞およびMM細胞系の、JAG2(およびCD138)抗体を用いた比較免疫染色を示す。

40

【図4B】図4Bは、正常PC、JAG2を過剰発現しているNIH3T3細胞系および4MM細胞系(K620、KMSM1、-2、RPMI8226)のウエスタン・プロット分析を示す。

【図5】図5は、A)正常、およびB)MM形質細胞の、JAG2発現に関するFACS分析を示す。ヤギIgアイソタイプまたは抗-JAG2一次抗体を用いたCD138+形質細胞のJAG2発現特性を示す。

【図6】図6は、抗-JAG2および抗-CD138抗体を用いた、患者サンプルにおける免疫蛍光(A)および二重染色免疫組織化学(B)を示す。

【図7】図7は、二次抗体のみ、M2またはM8モノクローナル抗体を用いたRPMI18226MM細胞系のFACS分析を示す。これらの実験では、ハイブリドーマ上清は濃縮しなかった。

50

【図8】図8は、正常形質細胞、MGUS、くすぶり型MM、MMおよび細胞系において検出された個々の発現のレベル(アイソタイプIg「バックグラウンド」と比較)を図示するものである。

【配列表】

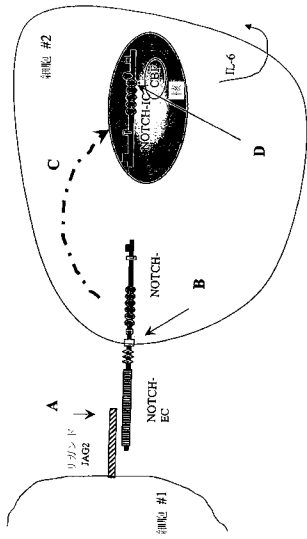
SEQUENCE LISTING

```

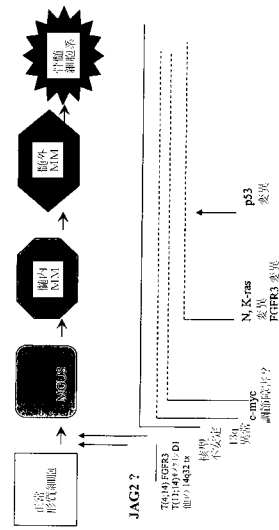
<110> Coignet, Lionel
<120> Use of JAG2 Expression in Diagnosis of Plasma Cell Disorders
<130> 03551.ONEW 10
<150> US 60/467,733
<151> 2003-05-02
<160> 3
<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> PCR forward primer 20
<400> 1
gacgtgctct accagtgcaa gaa 23
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> PCR reverse primer
<400> 2
aacaaccaca ggtgctcaa cag 23 30
<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> homo sapiens
<220>
<223> peptide corresponding to JAG2
<400> 3
cys asp glu asn tyr tyr ser ala thr cys asn lys 40
                    5                10
phe cys arg pro arg asn asp
                    15

```

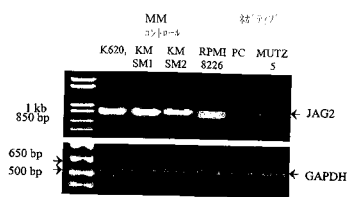
【 図 1 】



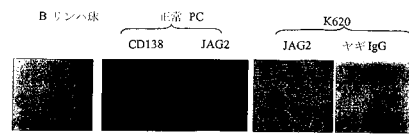
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 A 】



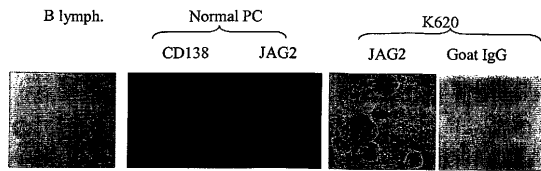


Figure 4A

【 図 5 】

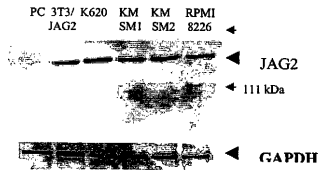
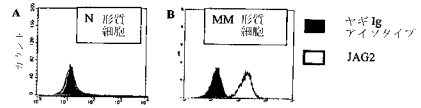
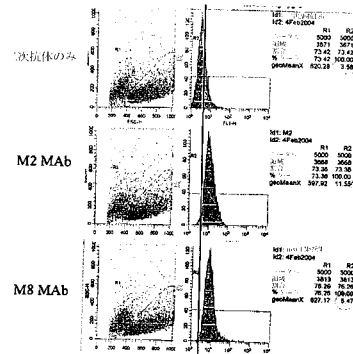
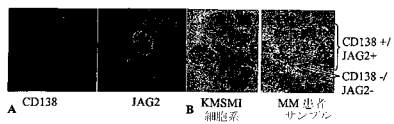


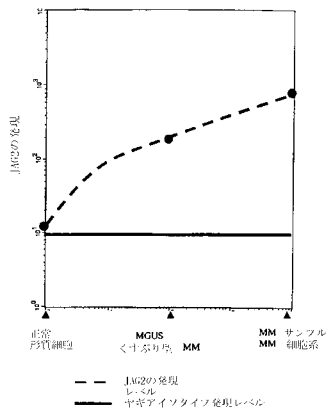
Figure 4B

【 図 6 】

【 図 7 】



【 図 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成18年6月7日 (2006.6.7)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2006525026000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/13499
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/04; C07K 1/00 US CL : 435/6, 91.21; 536/33.4; 530/300 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.21; 536/33.4; 530/300 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2001/0048930 (LAMB et al) 6 December 2001 (6.12.2001) page 2, paragraphs 0035, 0037, 0041, page 4, 0059-0062.	1-25
X	US 6,291,210 (SAKANO et al) 18 September 2001 (18.09.2001), entire document, especially col. 24, line 31-54, col. 15, line 30-48,	26, 27
---		-----
Y		1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 21 January 2005 (21.01.2005)		Date of mailing of the international search report 16 FEB 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Suryaprabha Chunduru</i> Suryaprabha Chunduru Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/13499

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- in written format
- in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in computer readable form
- furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/13499

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Biosis, Embase, Caplus, Lifesci, Medline, Registry, EAST databases
search terms: Jag2, mRNA, plasma cell disorder, PCR

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 7
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100124796
弁理士 重本 博充

(74) 代理人 100125586
弁理士 大角 菜穂子

(72) 発明者 コワネ, リオネル, ジ.
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 0 5 1、アムハースト、チェイスウッド レーン 1 2 0

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA12 BA43 CA02 CA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR56 QR62
QS16 QS25 QS34 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA13 DA14
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA50 EA51 FA72 GA26

专利名称(译)	JAG2表达在浆细胞疾病诊断中的应用		
公开(公告)号	JP2006525026A	公开(公告)日	2006-11-09
申请号	JP2006514193	申请日	2004-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	健康研究股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	健康研究公司		
[标]发明人	コワネリオネルジ		
发明人	コワネ,リオネル,ジ.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 C12N15/09 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543 C12P21/08 C07H21/04 C07K1/00 C12N C12P19/34 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57407 G01N33/57426		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 C12N15/00.A C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/543.597 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/CA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	竹石彦 徳冈修治		
优先权	60/467733 2003-05-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明基于以下发现：浆细胞疾病如多发性骨髓瘤和未知显著的单克隆免疫球蛋白病的特征在于JAG2的表达增加。因此，本发明提供了通过检测JAG2的表达或过表达来诊断浆细胞疾病的方法。JAG2的表达或过表达可以被检测为增加的mRNA转录或增加的蛋白质。

BM #	BM % 細胞密度	% 形質細胞	臨床診断	モノクローナル ガンパク質	JAG2 発見
9091	30	4	PCDなし	MCPなし	-
4666	30	3	PCDなし	MCPなし	-
4502	40	7	真性赤血球 増加症	MCPなし	-
7812	30	5	ホジキン病	MCPなし	-
3201	-	1	扁桃細胞	PCMなし	-
4790	-	2	扁桃細胞	PCMなし	-
1980	30	3	PCDなし	PCMなし	-
3205	50	1	低グレード NHL	IgA カップ	-
1409	30	6	乳癌	MCPなし	-
4438	>90	66	MM	IgG ラムダ	+
1906	30-40	3	MM rem. にて	IgG カップ	+
6368	40	14	MM	IgG ラムダ	+
8961	45	4	MGUS	IgA カップ	+
9625	40	5	くすぶり型 MM	IgG ラムダ	+
1130	30	10	MGUS	IgG カップ	+
8768	30	4	MGUS	IgA ラムダ	+
2247	70	7	治療されたMM	IgG カップ	+
2976	60	4	治療されたMM	IgA カップ	+
2477	50	31	MM	IgG ラムダ	+
1291	70	17	MM	IgG カップ	+
4087	30	31	MM	IgG カップ	+
1154	30	5	MGUS	IgG カップ	+
13544	>90	90	MM	IgG カップ	+
1332965	70	25	MM	IgG ラムダ	+
073886	30	10	MGUS	IgA ラムダ	+
0838	80	75	MM	IgA カップ	+