

(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2006-526390

(P2006-526390A)

(43) 公表日 平成18年11月24日(2006.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	2G054
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	4B024
GO1N 33/566 (2006.01)	GO1N 33/566	4B063
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-500924 (P2006-500924)	(71) 出願人	503121619 エモリー ユニバーシティ Emory University アメリカ合衆国 ジョージア 30322 、 アトランタ、 ノース デカター ロ ード 1784, スイート 130 1784 North Decatur Road, Suite 130, At lanta GA 30322, Uni ted States of Ameri ca
(86) (22) 出願日	平成16年1月13日 (2004.1.13)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月29日 (2005.8.29)	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/000755		
(87) 国際公開番号	W02004/062487		
(87) 国際公開日	平成16年7月29日 (2004.7.29)		
(31) 優先権主張番号	60/439,771		
(32) 優先日	平成15年1月13日 (2003.1.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 正常細胞およびがん細胞における遺伝子発現を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、正常細胞またはがん細胞における遺伝子発現を検出する方法を提供する。特に、細胞試料中の種々の腫瘍マーカーの存在または同マーカーの遺伝子発現の変化を検出し、同定し、または定量するための、蛍光画像化技法と組合せた分子ビーコン (MB) 技法を利用する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の少なくとも 1 つの腫瘍マーカー mRNA の存在を検出する方法であって、

i) 分析のための細胞の試料を提供することと、

ii) 腫瘍マーカー mRNA を標的とするオリゴヌクレオチドで前記試料を処理することと、オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つの結合エネルギー供与体部分および少なくとも 1 つの結合エネルギー受容体部分を含み、前記オリゴヌクレオチドはステム ループヘアピンを形成し、かつ前記供与体部分および受容体部分は標的の核酸塩基配列の少なくとも一部分により分離されることと、

iii) 適切なハイブリダイゼーション条件下で標的配列のハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量することと、前記試料中の標的配列の有無または量はオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と相関することと、

iv) オリゴヌクレオチドと測定される標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、腫瘍マーカーの存在を検出し、同定し、または定量することとを包含する方法。

【請求項 2】

前記腫瘍マーカーが、サバイピン、サイクリン D 1、Her 2 / neu、突然変異型 K-ras、キモトリプシノーゲン、塩基性繊維芽細胞増殖因子、癌胎児性抗原、前立腺特異抗原、 α -フェトプロテイン、 α -2-ミクログロブリン、膀胱腫瘍抗原、クロモグラニン A、ニューロン特異的エノラーゼ、S-100、TA-90、組織ポリペプチド抗原およびヒト絨毛性ゴナドトロピンからなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が血液、尿、腓液、腹水、乳管洗浄液、乳頭吸引物、穿刺生検物または組織からなる群から選択される少なくとも 1 つの供給源から採取される請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記組織が腓臓または乳房からの生検物である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記組織が凍結切片である請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が乳管洗浄液から採取される請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が腓液から採取される請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記腫瘍マーカーの存在の定量が FACS スキャン分析により成し遂げられる請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 および 13 からなる群から選択される 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチドが腫瘍マーカーであるサバイピンを標的とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 1、2 および 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記オリゴヌクレオチドが腫瘍マーカーであるサイクリン D 1 を標的とする請求項 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号3および4からなる群から選択される1つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項12記載の方法。

【請求項 14】

前記オリゴヌクレオチドが腫瘍マーカーであるHer2/neuを標的とする請求項1記載の方法。

【請求項 15】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号5および6からなる群から選択される1つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項14記載の方法。

【請求項 16】

前記オリゴヌクレオチドが腫瘍マーカーであるKras突然変異遺伝子を標的とする請求項1記載の方法。

【請求項 17】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号7、8、11、12および13からなる群から選択される1つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項16記載の方法。

【請求項 18】

腫瘍細胞中の突然変異遺伝子の存在を検出する方法であって、

i) 分析のための腫瘍細胞の試料を提供することと、

ii) 前記突然変異遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドで試料を処理することと、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの結合エネルギー供与体部分および少なくとも1つの結合エネルギー受容体部分を含み、前記オリゴヌクレオチドはステムループヘアピンを形成し、かつ前記供与体部分および受容体部分は標的の核酸塩基配列の少なくとも一部分により分離されることと、

iii) 適切なハイブリダイゼーション条件下で前記突然変異遺伝子の標的配列とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量することと、試料中の突然変異遺伝子の標的配列の有無または量はオリゴヌクレオチドの少なくとも1つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と関連することと

iv) オリゴヌクレオチドと測定される突然変異遺伝子の標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、突然変異遺伝子の存在を検出し、同定し、または定量することと

を包含する方法。

【請求項 19】

突然変異遺伝子が突然変異型K-ras遺伝子である請求項18記載の方法。

【請求項 20】

突然変異遺伝子の存在の定量がFACSスキャン分析により成し遂げられる請求項19記載の方法。

【請求項 21】

オリゴヌクレオチドが配列番号7、8、11、12および13からなる群から選択される1つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項19記載の方法。

【請求項 22】

生細胞における遺伝子発現の変化をモニタリングする方法であって、

i) 分析のための生細胞の試料を提供することと、

ii) 特定の遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで前記試料を処理することと、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの結合エネルギー供与体部分および少なくとも1つの結合エネルギー受容体部分を含み、前記オリゴヌクレオチドはステムループヘアピンを形成し、かつ前記供与体および受容体部分は標的の核酸塩基配列の少なくとも一部分により分離されることと、

iii) 適切なハイブリダイゼーション条件下で標的配列のハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量することと、前記試料中の標的配列の有無または量はオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドの少なくとも1つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と相関することと、

i v) オリゴヌクレオチドと測定される標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、前記特定の遺伝子の発現の変化を検出し、同定し、または定量することと

を包含する方法。

【請求項23】

遺伝子発現における変化の定量がFACSscan分析により、ならびに蛍光マイクロプレートリーダーにより成し遂げられる請求項22記載の方法。

【請求項24】

被験者における乳がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法であって、

i) 分析のための前記被験者からの細胞の試料を提供することと、

i i) 乳がんマーカー遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで前記試料を処理することと、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの結合エネルギー供与体部分および少なくとも1つの結合エネルギー受容体部分を含み、前記オリゴヌクレオチドはステムループヘアピンを形成し、かつ前記供与体部分および受容体部分は標的の核酸塩基配列の少なくとも一部分により分離されることと、

i i i) 適切なハイブリダイゼーション条件下で乳がんマーカー遺伝子配列との標的オリゴヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量することと、前記試料中の標的オリゴヌクレオチド配列の有無または量はオリゴヌクレオチドの少なくとも1つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と相関することと、

i v) オリゴヌクレオチドと測定される乳がん標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、乳がんの存在または進行を検出し、同定し、または定量することと

を包含する方法。

【請求項25】

前記乳がんマーカーが、サバイピン、サイクリンD1、Her2/neu、塩基性繊維芽細胞増殖因子、EGF受容体および癌胎児性抗原からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーである請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記試料が血液、尿、乳管洗浄液、腹水、乳頭吸引物、穿刺生検物または組織からなる群から選択される少なくとも1つの供給源から採取される請求項24記載の方法。

【請求項27】

前記組織が乳房またはリンパ節からの生検物である請求項26記載の方法。

【請求項28】

前記組織が凍結切片である請求項26記載の方法。

【請求項29】

前記乳がんの存在または進行の定量がFACSスキャン分析により成し遂げられる請求項24記載の方法。

【請求項30】

前記オリゴヌクレオチドが乳がんマーカーであるサバイピンを標的とする請求項24記載の方法。

【請求項31】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号1、2および9からなる群から選択される1つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項30記載の方法。

【請求項32】

前記オリゴヌクレオチドが乳がんマーカーであるサイクリンD1を標的とする請求項24記載の方法。

【請求項33】

10

20

30

40

50

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 3 および 4 からなる群から選択される 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記オリゴヌクレオチドが乳がんマーカーである Her 2 / neu を標的とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 5】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 5 および 6 からなる群から選択される 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

被験者における膵臓がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法であって 10

i) 分析のための前記被験者からの細胞の試料を提供することと、

ii) 膵臓がんマーカー遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで前記試料を処理することと、オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つの結合エネルギー供与体部分および少なくとも 1 つの結合エネルギー受容体部分を含み、前記オリゴヌクレオチドはステムループヘアピンを形成し、かつ前記供与体部分および受容体部分は標的の核酸塩基配列の少なくとも一部分により分離されることと、

iii) 適切なハイブリダイゼーション条件下で膵臓がんマーカー遺伝子配列との標的オリゴヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量することと、前記試料中の標的オリゴヌクレオチド配列の有無または量はオリゴヌクレオチドの 20

少なくとも 1 つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と相関することと、
iv) オリゴヌクレオチドと測定される乳がん標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、膵臓がんの存在または進行を検出し、同定し、または定量することと

を包含する方法。

【請求項 3 7】

前記膵臓がんマーカーがサバイピン、突然変異型 K - r a s 遺伝子および癌胎児性抗原からなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーである請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記試料が血液、尿、唾液、腹水、穿刺生検物または組織からなる群から選択される少なくとも 1 つの供給源から採取される請求項 3 6 記載の方法。 30

【請求項 3 9】

前記組織が凍結切片である請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記膵臓がんの存在または進行の定量が F A C S スキャン分析により成し遂げられる請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 1】

前記オリゴヌクレオチドが膵臓がんマーカーであるサバイピンを標的とする請求項 3 6 記載の方法。 40

【請求項 4 2】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 1、2 および 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

前記オリゴヌクレオチドが突然変異型 K - r a s 膵臓がんマーカーを標的とする請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 4】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 7、8、11、12 および 13 からなる群から選択される 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドである請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

試料中のがん細胞の存在を検出する方法であって、

i) 分析のための細胞の試料を提供することと、

ii) がん特異的マーカー遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで前記試料を処理することと、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの結合エネルギー供与体部分および少なくとも1つの結合エネルギー受容体部分を含み、前記オリゴヌクレオチドはステムループヘアピンを形成し、かつ前記供与体部分および受容体部分は標的の核酸塩基配列の少なくとも一部分により分離されることと、

iii) 適切なハイブリダイゼーション条件下で膀胱がんマーカー遺伝子配列との標的オリゴヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量することと、前記試料中に存在する標的オリゴヌクレオチド配列の有無または量はオリゴヌクレオチドの少なくとも1つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と相関することと、

iv) オリゴヌクレオチドと測定されるがん特異的標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、がん細胞の存在を検出し、同定し、または定量することとを包含する方法。

10

【請求項46】

がん細胞の存在の定量がFACSスキャン分析により成し遂げられる請求項45記載の方法。

【請求項47】

がん細胞が、乳がん、膀胱がん、卵巣がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、多発性骨髄腫、リンパ腫、膀胱がん、甲状腺髄様がん、神経内分泌腫瘍、類癌腫、精巣がん、妊娠栄養膜腫瘍形成、肺がん、黒色腫および胃がんからなる群から選択される1つまたは複数のがんから生じる請求項45記載の方法。

20

【請求項48】

請求項36記載の方法を実行するのに適した材料を含む、がん細胞の進行を検出またはモニタリングするための診断キット。

【請求項49】

請求項22記載の方法を実行するのに適した材料を含む、リアルタイムに生細胞における遺伝子発現の変化を検出するための診断キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、包括的には、分子ビーコン技法を用いた正常細胞および/またはがん細胞における腫瘍マーカー遺伝子および突然変異がん遺伝子の発現レベルの検査によりヒトのがん細胞を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願は、米国を除いた全ての国の指定についての出願人である米国国立大学であるエモリー大学、ならびにリリー・ヤング、ガング・ポー、チャールス・スタンレーおよびシンシア・コーエンの名義で、PCT国際特許出願として2004年1月13日に出願されている。

40

【0003】

[発明の背景]

乳がんは、最も一般的な種類のがんであり、女性の死亡の主因である。生存を延ばすための決定的要因は、乳がんを早期に診断することである。マンモグラフィーによる早期スクリーニングは疾患の死亡率を低減したが、しかし乳がん患者の約20%は依然としてマンモグラフィーでは見逃される。さらに異常マンモグラムを示す全患者のうち、生検により乳がんであると確認されたのはわずか10~20%であった(非特許文献1)。今のところ、乳がんの診断のための信頼できる血清腫瘍マーカーはない。したがって乳がんの早期診断のための新規なアプローチの開発が、患者の治療の成功ならびに患者の生存を延ば

50

すための決定的な重要性を有する。

【0004】

目下、乳管洗浄液は、細胞病理学的分析のために乳管上皮細胞を収集するための、侵襲性を最小限とした手法として用いられている（非特許文献2）。この手法は、乳頭開口部に微小カテーテルを挿入し、カニューレが挿入された乳管を通常の生理食塩水で洗浄し、洗浄流出液を収集することを包含する。正常、非定型または悪性の乳管細胞の存在を分析するために、約13,500個/乳管の細胞が収集され得る。しかしながら、異なる細胞の種類を同定するための現行の方法は形態学的分類によるものであり、これはしばしば不正確である。

【0005】

膵臓がんは、その予後が非常に悪いために、米国におけるがん死の四番目の死因である（非特許文献3）。米国では毎年、約29,000の新規の症例が診断され、28,000例が死亡している（非特許文献4）。診断後3ヶ月より長く生存する膵臓がん患者は50%未満であり、2年生き延びるのは彼等のうちの8%である（非特許文献5）。予後が悪いことに関する主な理由は、早期に見つかる膵臓がん患者が極少数であるという点である。伝統的な放射線写真撮影および超音波検査法を用いた膵臓がんの早期診断は、非常に難しい（非特許文献6）。最近数十年間の広範な生物医学的研究努力にもかかわらず、膵臓がん患者の90%以上がすでに診断時までには局所転移および/または遠隔転移を経験しており、しばしばその治癒を遅らせる。したがって、おそらくは腫瘍のサイズというよりむしろ分子マーカーに基づいて、膵臓がんの早期検出をすることが非常に重要である。

【0006】

（膵臓がんおよび乳がんの分子マーカー）

一般的にK-rasがん遺伝子は、早期膵臓がんの検出のための最も興味をそそる分子マーカーの1つである、ということが十分に確立されている（非特許文献7~12）。Gタンパク質ファミリーの一員であるK-rasは、細胞表面からの増殖促進エフェクターのシグナル伝達に関与する。K-rasの点突然変異は膵臓癌腫の80~100%に見出され、このことは、K-rasががん検出のための感度の良いマーカーであることを示唆している（非特許文献7）。さらに、これらの突然変異のほとんどがコドン12に集中しており、ビーコン設計の容易さという点でK-rasをさらに興味をそそるものにする。K-ras突然変異は膵臓がんの発症の極早期に起こるため、K-ras突然変異を標的とする試験は膵臓癌腫の早期検出をもたらす得る。

【0007】

近年、アポトーシスタンパク質の阻害剤（IAP）の一ファミリーの遺伝子が発見された（非特許文献13）。IAPは、カスパーゼ活性の抑制によりアポトーシス経路のカスケードを抑制する（非特許文献14）。漸増する証拠から、IAPタンパク質の1つであるサバイピンもいくつかの種類のがんに対する有望な腫瘍マーカーである、ということが示されている（非特許文献15~18）。サバイピンは、普通は胎児発生中に発現されるが、ほとんどの正常成人組織中では発現されない（非特許文献15）。19種類のヒトの正常組織および疾患組織からの350万の転写物の分析結果も、サバイピンが、試験された全てのがん組織中において一様に高レベルで発現されるが正常組織中では高レベルで発現されない上位4つの遺伝子のうちの1つである、ことを示している（非特許文献19）。近年の研究から、免疫組織化学法、免疫プロット法およびRT-PCR法により、膵管細胞の腺癌の77%、および膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMT）の56%においてサバイピンの存在が実証されている（非特許文献20）。サバイピンの発現は、膵管細胞癌腫の全ての進行度（ステージI~IV）において、例えば膵臓がん細胞中での新生物移行の早期ステージにおいても検出され得る。しかしながら、サバイピンの発現は、正常膵臓組織、腫瘍細胞周囲の炎症細胞、ならびに慢性膵炎患者からの膵臓組織中には検出されなかった。正常な膵臓およびその他の正常組織中にサバイピンの発現がないということは、サバイピンを膵臓がん細胞の検出のための理想的分子マーカーとするものである。

【0008】

10

20

30

40

50

正常乳房上皮から浸潤性乳管癌への移行は、多段階過程であり、過形成、非定型的過形成から非浸潤性乳管癌 (DCIS) への、ならびに浸潤性乳管癌への乳房組織における一連の組織学的変化を包含する。いくつかの腫瘍マーカーは、DCIS 病変および浸潤性乳がんにおいて存在することが判明した。細胞周期の重要な調節物質であるサイクリン D1 は DCIS の 80% において過剰発現され、一方、正常乳房組織においては、サイクリン D1 は低いかまたは存在しない (非特許文献 21 ~ 22)。Her-2/neu 遺伝子の増幅および過剰発現も、浸潤性乳がんの 30% および DCIS 組織の 60 ~ 80% で実証されている (非特許文献 23 ~ 25)。しかしながら Her-2/neu の過剰発現は、正常乳管細胞中および単純過形成においては見出されない (非特許文献 24 ~ 25)。これは、これらの遺伝子の調節が良性状態から癌腫への移行を規定する可能性があり、そしてサイクリン D1 および Her-2/neu の無秩序な過剰発現が乳癌における一般的早期事象であり得る、ということを示唆している。さらに高レベルのサバイピンも、浸潤性および転移性乳がんの患者から採取された乳がん組織の 71% において検出されるが、一方、周囲の正常乳房組織は陰性である。サバイピンのレベルの増大は、乳房腫瘍細胞のアポトーシスの閾値および生存能力をより高めるのに寄与する (非特許文献 16)。高レベルのサバイピンが乳がん患者の DCIS 組織の 80% 超において検出されるため、サバイピン遺伝子の発現は、乳がんの発症における早期腫瘍マーカーであると思われる (ヤン、エル、他 (Yang L. et al.)、未発表)。したがって、サイクリン D1、Her-2/neu およびサバイピンは、浸潤性前段階の乳がん細胞の早期検出のための感度の良い腫瘍マーカーである。

10

20

【0009】

サバイピンは、多数の一般的な種類の腫瘍、例えば前立腺、肺、結腸、胃、肝臓、脳、腎臓の腫瘍、黒色腫およびリンパ腫においても検出される (非特許文献 18)。例えば、ヒト結腸直腸がんの 64% が高レベルのサバイピンを発現する。サバイピン陽性の第 I 期患者の 5 年生存率は、サバイピン陰性の患者の場合より甚だ低い (非特許文献 26)。がん患者のサバイピン発現と予後との相関は、いくつかの他の種類の腫瘍でも実証されている (非特許文献 27 ~ 28)。いくつかの報告は、腫瘍細胞におけるサバイピン遺伝子の発現が化学療法または放射線療法に対する腫瘍細胞の耐性に寄与する、ということを示した (非特許文献 29 ~ 31)。したがってサバイピン遺伝子発現のレベルを用いて、化学療法剤に対するヒト腫瘍細胞の感受性を測定し得る。

30

【0010】

(分子ビーコン技法によるヒトがん細胞の検出)

目下、臨床試料における遺伝子突然変異の検出のために一般的に用いられる方法は、ゲノム DNA の DNA 精製または RNA 単離とその後の突然変異体を濃縮する (mutant-enriched) PCR または RT-PCR である。次に一本鎖高次構造多型 (SSCP)、制限酵素断片長多型 (RFLP) または対立遺伝子特異的オリゴデオキシヌクレオチドハイブリダイゼーション (ASOH) により、突然変異体 PCR 産物の存在が測定される (非特許文献 8 ~ 11、非特許文献 32 ~ 33)。PCR による K-ras 突然変異の同定はかなり感受性の高い分子レベルのアプローチであるが、しかし PCR に関する手法およびその後のアッセイは非常に時間を要し、臨床的手法とするのは困難である。今までのところ、蛍光標識した一般的な直線状オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法は蛍光バックグラウンドレベルが高く、単一塩基対の突然変異を有する mRNA の検出では感度が低いため、無傷の細胞における突然変異がん遺伝子の発現を直接検出することは非常に難しかった。突然変異体タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色は、通常は特異性を欠き、「擬陽性」データを生じる。非特異的な標識および内在性のペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼの存在により、多数の「擬陽性」が観察された。したがって、突然変異がん遺伝子を発現する腫瘍細胞の検出のための、より特異性の高いアッセイを開発することが重要である。

40

【非特許文献 1】ハリス他 (Harris et al.)、*「デティータ・ブイ・ティ (Detita VT) の著書」*、リップピンコット・ラーベン社 (Lippincott-Raven)、p.1557-1616 (1997)

50

- 【非特許文献 2】オシヨネシー他 (O'Shaughnessy et al.)、Cancer, 94(2): 292-298 (2002)
- 【非特許文献 3】パーカー他 (Parker et al.)、CA. Cancer J. Clin. 46: 5-27 (1996)
- 【非特許文献 4】ゴールド・イー・アイ (Gold E.I.)、Surg. Clin. North Am. 75: 819-839 (1995)
- 【非特許文献 5】米国国立衛生研究所 (National Institute of Health) : NIH Publication 93-2789 (1993)
- 【非特許文献 6】バーキン他 (Barkin et al.)、Gastroenterology Clinics of North America 28: 709-722 (1999) 10
- 【非特許文献 7】ミナモト他 (Minamoto et al.)、Cancer Detection & Prevention 24: 1-12 (2000)
- 【非特許文献 8】フタカワ他 (Futakawa et al.)、Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery 7: 63-71 (2000)
- 【非特許文献 9】ピュイグ他 (Puig et al.)、International Journal of Cancer 85(1): 73-77 (2000)
- 【非特許文献 10】ワタナベ他 (Watanabe et al.)、Pancreas 17: 341-7 (1998)
- 【非特許文献 11】シバタ他 (Shibata et al.)、International Journal of Oncology 12: 1333-1338 (1998)
- 【非特許文献 12】アーゲル他 (Urgell et al.)、European Journal of Cancer 36: 2069-2075, 2000 20
- 【非特許文献 13】ラカス他 (LaCasse et al.)、Oncogene 17: 3247-3259 (1998)
- 【非特許文献 14】デヴロー他 (Deveraux et al.)、EMBO Journal 17(8): 2215-2223 (1998)
- 【非特許文献 15】アルティエリ他 (Altieri et al.)、Lab. Invest. 79: 1327-1333 (1999)
- 【非特許文献 16】タナカ他 (Tanaka et al.)、Clin. Cancer Res. 6: 127-134 (2000)
- 【非特許文献 17】ムーア他 (Moore et al.)、J. of Insurance Med. 33: 202-203 (2001) 30
- 【非特許文献 18】アルティエリ他 (Altieri et al.)、Trends in Mol. Med. 7: 542-547 (2001)
- 【非特許文献 19】ヴェルクルスク他 (Velculescu et al.)、Nature Genetics 23: 387-388 (1999)
- 【非特許文献 20】サトン他 (Saton et al.)、Cancer 92: 271-278 (2001)
- 【非特許文献 21】ウェインスタット - サスロー他 (Weinstat-Saslow et al.)、Nat Med 1(12): 1257-1260 (1995)
- 【非特許文献 22】フォス他 (Vos et al.)、J. of Path. 187(3): 279-84 (1999)
- 【非特許文献 23】ヤノチコ他 (Janocko et al.)、Cytometry 46(3): 136-49 (2001)
- 【非特許文献 24】ポラー他 (Poller et al.)、Breast Cancer Res & Treat. 20(1): 3-10 (1991) 40
- 【非特許文献 25】ラマチャンドラ他 (Ramachandra et al.)、J. of Path. 161(1): 7-14 (1990)
- 【非特許文献 26】サレーラ他 (Sarela et al.)、Gut 46(5): 645-650 (2000)
- 【非特許文献 27】カプラー他 (Kappler et al.)、International Journal of Cancer. 95: 360-363 (2001)
- 【非特許文献 28】スワナ他 (Swana et al.)、New England Journal of Medicine. 341: 452-453 (1999)
- 【非特許文献 29】カトウ他 (Kato et al.)、International Journal of Cancer 95: 92-5 (2001) 50

【非特許文献 3 0】アズハタ他 (Azuhata et al.), Journal of Pediatric Surgery 36: 1785-1791 (2001)

【非特許文献 3 1】アサヌマ他 (Asanuma et al.), Japanese Journal of Cancer Research 91: 1204-9 (2000)

【非特許文献 3 2】フィッシャー他 (Fischer et al.), Laboratory Investigation 81: 827-831 (2001)

【非特許文献 3 3】クレイトン他 (Clayton et al.), Clinical Chemistry 46: 1929-1938 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

がん遺伝子および腫瘍抑制遺伝子の遺伝的变化、ならびに細胞の増殖を促進し細胞に転移能を提供する遺伝子発現異常によってがん細胞が発生する、ということが十分に確立されている。本明細書において用いられるがんの早期検出を達成する方法は、がん細胞中で発現されるが正常細胞中では発現が低いかまたは全く発現されない mRNA 転写物の検出によりがん細胞を同定することであろう。したがって今まで取り組まれなかった必要性が、上記の欠陥および不適切性に取り組むために当該技術分野に存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

[発明の概要]

本発明の種々の態様は、固定された、または生きている正常細胞およびがん細胞中での遺伝子発現のレベルを検出する方法を提供する。具体的には、細胞試料中の種々の腫瘍マーカーの存在またはその遺伝子発現の変化を検出し、同定し、または定量するための、蛍光画像化技法と組合せた分子ビーコン (MB) 技術を利用する方法が提供される。

【0013】

MB は、一端に蛍光体、他端に消光剤を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。MB は、その標的の mRNA が存在しない場合、蛍光体の蛍光が消光されるように、ステム-ループ構造を形成するように設計されている。ループ部分は、標的 mRNA 分子と相補的なプローブ配列を有する。ループの各末端近くのアーム配列は互いに相補的であり、アニーリングして MB のステムを形成する。MB が標的 mRNA 分子に遭遇すると、ループ、そしておそらくはステムの一部が標的 mRNA とハイブリダイズして、自発的に高次構造の変化を引き起こし、この変化がステムを離れさせる。消光剤が蛍光体から離れることにより、蛍光が回復する。ステム-ループ型プローブの主な利点は、直線状プローブより高い特異性でその標的を認識し得る、という点である。適正に設計された MB は、単一ヌクレオチドというわずかな違いを有する標的を区別し得る。MB の設計により、その標的ヌクレオチド配列との MB との特異的結合が可能となり、かつ、遊離 MB は蛍光を発しないので MB-標的複合体から非結合プローブを分離することなく、蛍光シグナルの発生によりハイブリダイゼーションが報告される。したがって MB は、無傷細胞中ならびに溶液中で、特定のヌクレオチド配列、例えば mRNA および DNA を高いノイズ対シグナル比で検出するための優れたツールをわれわれに提供するはずである。

【0014】

したがって一態様では、本発明は、試料中の少なくとも 1 つの腫瘍マーカー mRNA の存在を検出する方法に関する。当該方法は、分析のための細胞試料を提供すること、そして次に腫瘍マーカー mRNA を標的とする環状オリゴヌクレオチド (MB) で試料を処理することを包含する。次に、試料中に存在する標的配列の有無または量が検出可能な蛍光シグナルの変化と相関するように、適切なハイブリダイゼーション条件下で標的配列のハイブリダイゼーションが検出、同定、または定量される。次に、測定される標的配列との前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいて、腫瘍マーカーの存在が、検出、同定、または定量され得る。MB は、直接インキュベーションすることによりアセトン固定された細胞に送達されてもよいし、あるいはトランスフェクシ

10

20

30

40

50

ンにより生細胞中に送達されてもよい。固定された、または生きている腫瘍細胞中へのM B送達後の腫瘍マーカーmRNAの存在およびそのレベルの定量は、蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度を測定することにより、個々の細胞集団のFACS スキャン分析を用いて、あるいは蛍光マイクロプレートリーダーを用いて96ウエルプレート中でリアルタイムに相対的蛍光単位の変化をモニタリングすることにより成し遂げられる。

【0015】

検出されるべき任意の腫瘍マーカーであり、そして本発明の特定のいくつかの態様で検出される腫瘍マーカーは、サバイピン、サイクリンD1、Her2/neu、突然変異型K-ras、キモトリプシノーゲン、XIAP、塩基性繊維芽細胞増殖因子、EGF受容体、癌胎児性抗原、前立腺特異抗原、 α -フェトプロテイン、 α -2-ミクログロブリン、膀胱腫瘍抗原、クロモグラニンA、ニューロン特異的エノラーゼ、S-100、TA-90、組織ポリペプチド抗原およびヒト絨毛性ゴナドトロピンのうち1つまたは複数を含み得る。

10

【0016】

本発明の任意の態様では、試料は任意数の供給源のうちの一つまたは複数の供給源から採取可能であり、供給源の例としては血液、尿、唾液、腹水、乳管洗浄液、乳頭吸引物、穿刺生検物または組織が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の特定のいくつかの態様では、組織は膵臓または乳房からの生検物である。本発明の他の態様では、組織は顕微鏡用凍結切片の形態であり得る。

【0017】

本発明の別の態様は、腫瘍細胞中の突然変異遺伝子の存在を検出する方法であって、分析のための腫瘍細胞の試料を提供することと、次に突然変異遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドで試料を処理することとを包含する方法に関する。本発明の特定のいくつかの態様では、突然変異遺伝子は突然変異型K-ras遺伝子である。

20

【0018】

本発明のさらに別の態様は、生細胞中の遺伝子発現のレベルをモニタリングする方法に関する。

本発明のさらに別の態様は、被験者における乳がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法であって、乳がんマーカーの存在をモニタリングまたは検出することを包含する方法に関する。本発明の種々の態様において、乳がんマーカーは、サバイピン、サイクリンD1、Her2/neu、塩基性繊維芽細胞増殖因子および癌胎児性抗原のうちの一つまたは複数であり得る。本発明の特定のいくつかの態様では、試料は、血液、尿、乳管洗浄液、乳頭吸引物、腹水、穿刺生検物または組織のうちの一つまたは複数から採取されるが、これらに限定されない。

30

【0019】

本発明のさらに別の態様は、被験者における膵臓がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法であって、膵臓がんマーカーの存在に関して検出またはモニタリングすることを包含する方法に関する。本発明の種々の態様では、膵臓がんマーカーは、サバイピン、突然変異型K-ras遺伝子および癌胎児性抗原のうちの一つまたは複数であり得るが、これらに限定されない。本発明の種々の態様では、試料は、少なくとも一つの供給源、例えば血液、尿、唾液、穿刺生検物または組織（これらに限定されない）から採取され得る。

40

【0020】

本発明の別の態様は、試料中のがん細胞を検出する方法であって、がん特異的マーカー遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで細胞試料を処理することを包含する方法に関する。本発明の種々の態様では、がん細胞は、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、多発性骨髄腫、リンパ腫、膀胱がん、甲状腺髄様がん、神経内分泌腫瘍、類癌腫、精巣がん、妊娠栄養膜腫瘍形成、肺がん、黒色腫および胃がんのうちの一つまたは複数に由来するものでよいが、これらに限定されない。

【0021】

50

本発明のその他の態様は、1)がん細胞の進行を検出するかまたはモニタリングし；そして、2)生細胞中の遺伝子発現のレベルをリアルタイムに検出するための診断キットを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

[好ましい実施形態の詳細な説明]

本発明の種々の実施形態を、ここで詳細に説明する。本明細書中の記載ならびにその後の特許請求の範囲において用いる場合、「一つの(a)」、「一つの(an)」および「その(the)」の意味は、文脈から明らかに違う場合を除き、複数形を包含する。さらにまた本明細書中の記載ならびにその後の特許請求の範囲において用いる場合、「~中に(in)」の意味は、文脈から明らかに違う場合を除き、「~中に(in)」および「~の上に(on)」を包含する。

10

【0023】

本明細書中で用いられる用語は一般に、本発明の状況の範囲内で、かつそれぞれの用語が用いられる特定の状況において、当該技術分野におけるその用語の通常の意味を有する。本発明を説明するために用いられる特定のいくつかの用語について以下に、あるいは本明細書中の別の箇所において考察して、本発明の組成物および方法ならびにそれらの製造方法および使用方法を説明するに際して、実践者に付加的な案内を提供する。便宜のために、特定のいくつかの用語は、例えばイタリック体および/または引用符を用いて強調されることもある。強調しても用語の範囲および意味に影響を及ぼさない。用語の範囲および意味は、それが強調されてもされなくても、同一の状況においては同一である。当然ながら、同一の事柄は複数の方法で述べられ得る。従って、本明細書中で考察される任意の1つまたは複数の用語に関して代替的専門用語および同義語が用いられることがあり、ある用語が本明細書中で推敲されるにしてもまたは考察されるにしても、何らかの特定の意味を負わされることはない。特定のいくつかの用語に対して同義語が提示される。1つまたは複数の同義語を挙げることによって、他の同義語の使用が排除されることはない。例の使用は、本明細書中で説明される任意の用語の例を含めて、この明細書中のどこでも、例示的であるに過ぎず、本発明の範囲および意味あるいは任意の例示用語の範囲および意味をいかなる点においても限定するものではない。同様に、本発明は、この明細書中に示された種々の実施形態に限定されない。

20

30

【0024】

本明細書中で用いる場合、「約(about)」または「およそ(approximately)」とは概して、所与の値または範囲の20%以内、好ましくは10%以内、さらに好ましくは5%以内を意味するものとする。本明細書中に示された数量はおよその数量であり、「約」または「およそ」という用語が明白に記述されない場合には「約」または「およそ」である、ということの意味する。

【0025】

(定義)

「ハイブリダイゼーション」および「相補的」とは、本明細書中で用いる場合、2つのヌクレオチド間で正確に対合することができることをさす。例えばオリゴヌクレオチドのある部位のヌクレオチドがDNAまたはRNA分子の同一部位のヌクレオチドと水素結合し得る場合には、そのオリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは、その部位について互いに相補的である、またはハイブリダイズ可能であるとみなされる。オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは、各分子内の十分な数の対応する部位が互いに水素結合し得るヌクレオチドにより占められている場合にハイブリダイズする。当該技術分野では当然のことであるが、アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列はその標的核酸の配列とハイブリダイズするために同標的核酸の配列と100%相補的である必要はない。アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物と標的DNAまたはRNA分子との結合の場合、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能であり、そして特異的結合が望ましい条件下では、例えばin vivoアッセイまたは治療的処置の場合の生理学的条件下、あるいは

40

50

*in vitro*アッセイの場合にアッセイが実施される条件下では、アンチセンスオリゴヌクレオチドと非標的配列との非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性が存在する。

【0026】

本発明の状況では、「オリゴヌクレオチド」という用語は、リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)あるいはそれらの模倣物のオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語は、天然および/または合成の核酸塩基、糖およびヌクレオシド間(主鎖)共有結合からなるオリゴヌクレオチドを包含するが、これに限定されない。このような修飾または置換されたオリゴヌクレオチドが天然の形態よりも好ましいことが多いのは、望ましい特性、例えば細胞による取り込みの増強、核酸標的に対する親和性増強、および/またはヌクレアーゼの存在下での安定性増大のためである。

10

【0027】

本発明は、正常細胞およびがん細胞中での遺伝子発現を検出する方法を提供する。特に、細胞の試料中の種々の腫瘍マーカーの遺伝子発現の存在または変化を検出し、同定し、または定量するための方法が提供される。

【0028】

生きている腫瘍細胞ならびに固定された腫瘍細胞における遺伝子発現を検出するための分子ビーコン(MB)技術を、発明者等は開発した。MBは、一端に蛍光体、他端に消光剤を有する二重標識されたステム-ループヘアピン構造を有するオリゴヌクレオチドである。細胞内へMBを送達すると、MBが標的mRNAとハイブリダイズする場合に蛍光シグナルを生じる。したがって、標的mRNAががんの分子マーカーに相当する場合、がん細胞(明色)は正常細胞(暗色)から区別され得る。以下の方法、すなわち細胞の試料中の少なくとも1つの腫瘍マーカーmRNAの存在を検出する方法;腫瘍細胞中の突然変異遺伝子の存在を検出する方法;生細胞中の遺伝子発現の変化をモニタリングする方法;乳がんマーカーの存在をモニタリングまたは検出することを含む、被験者における乳がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法;膵臓がんマーカーの存在を検出またはモニタリングすることを含む、被験者における膵臓がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法;およびがん特異的マーカー遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで細胞の試料を処理することを含む、試料中のがん細胞を検出する方法が提供される。また、1)がん細胞の進行を検出またはモニタリングし;そして2)生細胞中の遺伝子発現の変化をリアルタイムに検出する診断キットも提供される。

20

30

【0029】

(分子ビーコン)

図1に略記したように、MBは、一端に蛍光体、他端に消光剤を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。決して限定されるものではないが、典型的には蛍光体は5'末端に結合され、消光剤は3'末端に結合される。MBは、その標的mRNAが存在しない場合は蛍光体の蛍光が消光されるように、ステム-ループ構造を形成するように設計される。ループ部分は、標的mRNA分子と相補的なプローブ配列を有する。用いられるよう意図される典型的蛍光体としては、Cy3(商標)蛍光体(Cy3アミダイト、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ所在のアマシャム・ファルマシア・バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech))、Alexa Fluor(登録商標)488(モレキュラー・プローブス(Molecular Probes));Alexa Fluor(登録商標)350(青色)、CMAC(7-アミノ-4-クロロメチルクマリン)、6-FAM(商標)およびFITCが挙げられるが、これらに限定されない。典型的消光剤としては、ダブシル(4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸)(Dabcyl-CPG、米国バージニア州スターリング所在のグレン・リサーチ(Glen Research))が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0030】

MBが標的mRNA分子に遭遇すると、ループとステムの一部とが標的mRNAとハイブリダイズして、ステムを分離させる自発的な構造変化を引き起こす。消光剤は蛍光体が

50

ら離れて、蛍光の回復をもたらす(ティアギ他(Tyagi et al.), Nature Biotechnol 14: 303-308 (1996); デュベルトレット他(Dubertret et al.), Nat Biotechnol 19: 365-370 (2001))。ステム-ループ型プローブの主な利点の1つは、該プローブが直線状オリゴヌクレオチドプローブより高い特異性で標的を認識し得るという点である。適正に設計されたMBは、単一ヌクレオチドというわずかな違いを有する標的を区別し得る(ティアギ他(Tyagi et al.), Nat Biotechnol 16: 49-53 (1998))。MBは、種々の用途、例えばDNA突然変異検出、タンパク質-DNA相互作用、PCRのリアルタイムモニタリング、遺伝子タイピング、および生細胞中のmRNA検出に利用されてきた(デュベルトレット他(Duertret et al.), Nat Biotechnol 19: 365-370 (2001); ダークス他(Dirks et al.), Histochem. & Cell Biol. 115(1): 3-11 (2001); ティアギ他(Tyagi et al.), Nat Biotechnol 16: 49-53 (1998); ソコル他(Sokol et al.), Proc Natl Acad Sci USA 95: 11538-11543 (1998))。

【0031】

本発明の種々の実施形態は、以下の方法、すなわち、細胞の試料中の少なくとも1つの腫瘍マーカーmRNAの存在を検出する方法、腫瘍細胞中の突然変異遺伝子の存在を検出する方法、生細胞中の遺伝子発現の変化をモニタリングする方法、乳がんマーカーの存在をモニタリングまたは検出することを含む、被験者における乳がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法、膵臓がんマーカーの存在を検出またはモニタリングすることを含む、被験者における膵臓がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法、およびがん特異的マーカー遺伝子配列を標的とするオリゴヌクレオチドで細胞の試料を処理することを含む、試料中のがん細胞を検出する方法を提供するが、このような方法は、

i) 分析のために細胞の試料を提供する工程と、

ii) 所望のマーカーまたは遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドで試料を処理する工程と、

iii) 適切なハイブリダイゼーション条件下で標的配列のハイブリダイゼーションを検出し、同定し、または定量する工程であって、試料中に存在する標的配列の有無または量がオリゴヌクレオチドの少なくとも1つの供与体部分または受容体部分と関連した検出可能なシグナルの変化と相関することを特徴とする工程と、

iv) オリゴヌクレオチドと測定される標的配列とのハイブリダイゼーションの有無または量に基づいてマーカーまたは遺伝子の存在を検出し、同定し、または定量する工程とを包含する。

【0032】

本発明者が意図しているのは、上記のような分子ビーコンとして使用するために構築された任意のオリゴヌクレオチドを本発明の方法に用い得るということである。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドとしては、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12および13のうちの1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは腫瘍マーカーであるサバイピンを標的とする。好ましい一実施形態では、サバイピンを標的とするオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1、2および9のうちの1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、腫瘍マーカーであるサイクリンD1を標的とする。好ましい一実施形態では、サイクリンD1を標的とするオリゴヌクレオチドとしては、配列番号3および4のうちの1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、腫瘍マーカーであるHer2/neuを標的とする。好ましい一実施形態では、Her2/neuを標的とするオリゴヌクレオチドとして配列番号5および6のうちの1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。さらに別の実施形態では、オリゴヌクレオチドはK-ras突然変異遺伝子腫瘍マーカーを標的とする。好ましい一実施形態では、K-ras突然変異遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドとして配列番号7、8、11、12および13のうちの1つまたは複数

が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

(腫瘍マーカーの検出)

種々の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載された分子ビーコン技術を用いて試料中の少なくとも1つの腫瘍マーカーmRNAの存在を検出する方法を提供する。当業者が容易に理解するように、本発明の方法は、試料中に存在する任意の腫瘍マーカーmRNAの存在を検出するために利用され得る。このようなマーカーとしては、サバイピン、サイクリンD1、Her2/neu、突然変異型K-ras、塩基性繊維芽細胞増殖因子、EGF受容体、XIAP、癌胎児性抗原、前立腺特異抗原、 α -フェトプロテイン、 α -2-ミクログロブリン、膀胱腫瘍抗原、クロモグラニンA、ニューロン特異的エノラーゼ、S-100、TA-90、組織ポリペプチド抗原およびヒト絨毛性ゴナドトロピンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】

(試料の収集)：試験されるべき細胞の試料は、日常的な診断手法により得ることができる。このような試料としては、血液、尿、細針穿刺吸引物、乳管洗浄液、腓液、腹水、乳頭吸引試料、あるいは任意のその他の組織、例えば患者の任意の場所(例えば乳房、膵臓またはリンパ節であるがこれらに限定されない)からの生検物(これらに限定されない)が挙げられるが、これらに限定されない。組織試料は、病理学的に調製された日常的な任意の種類試料、例えば顕微鏡スライド、プレートまたはウエルに付着させた任意の種類組織であり得る。好ましい一実施形態では、組織試料は組織の凍結切片である。別の好ましい実施形態では、試料は乳管洗浄液から採取される。さらに別の好ましい実施形態では、試料は腓液から採取される。

【0035】

(乳がん腫瘍細胞マーカーの検出)

本発明の特定のいくつかの実施形態は、本明細書中に記載された分子ビーコン技術を用いて被験者における乳がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法を提供する。本発明は、乳がんの腫瘍形成の早期に発現されることが示された遺伝子のmRNAを標的とするMBの組合せを用いて、乳管洗浄液および細針穿刺吸引物(FNA)から乳がん細胞を検出するための方法を提供する。本発明者らは、非浸潤性乳管癌の診断における各遺伝子の検出の予測値または2つもしくは3つの遺伝子の同時発現のモニタリングについて示した。本発明の特定のいくつかの実施形態では、乳管上皮細胞中のサバイピン、サイクリンD1およびHer-2/neu遺伝子の過剰発現を同時に検出する方法が提供される。本発明の方法は、特に腫瘍の単一細胞が複数のマーカー遺伝子を発現する場合に、これらの腫瘍マーカーの存在を検出するのに有用である。好ましい一実施形態では、乳管洗浄液中のサバイピン、サイクリンD1および/またはHer-2/neu発現細胞の検出のための方法が提供される。

【0036】

種々の実施形態において、本発明の方法は、サバイピン、サイクリンD1またはHer-2/neuのmRNAと特異的にハイブリダイズするよう設計されたMBを利用する。出願人等は、ヒト乳がん細胞株、正常乳房上皮細胞株および正常繊維芽細胞株におけるMBの特異性および感度、ならびに正常細胞存在下の単離腫瘍細胞を様々ながん細胞正常細胞比で同定する場合のMBの特異性および感度を実証した。提示された方法は、早期乳がんまたは様々なステージの非浸潤性乳管癌(DCIS)の患者および正常対照被験者から得られる乳管洗浄液および細針穿刺吸引物の細胞分画中のこれらの腫瘍マーカーの発現を検出するために利用され得る。

【0037】

(試料の収集)：試験されるべき細胞の試料は、日常的な診断手法により得られる。このような試料としては、血液、尿、細針穿刺吸引物、乳管洗浄液、腹水、乳頭吸引試料、あるいは任意のその他の組織(例えば乳房またはリンパ節上の任意の場所からの生検物であるが、これらに限定されない)が挙げられるが、これらに限定されない。組織試料は、病理学的に調製された日常的な任意の種類試料、例えば顕微鏡スライド、プレートま

たはウエルに付着させた任意の種類組織であり得る。好ましい一実施形態では、組織試料は組織の凍結切片である。

【0038】

試料は、乳がん患者または乳がんを発症する危険性が高い女性に関して任意の日常的な診断手法により得られる、と考えられる。非限定的な例として、がん患者が乳がんを除去するための手術を受けているとき、あるいは診療所に日常的に訪れているときに、患者からの乳管洗浄液が収集される。麻酔下で、マイクロカテーテルが管内に挿入され、生理食塩水が注入される。流出液が収集され、遠心分離により細胞画分が濃縮される。乳管洗浄液または吸引物由来の濃縮細胞画分は次に、スライドガラス上に置かれる。典型的には、cytorpin（登録商標）で作製した約10～15枚のスライドが、乳管1つあたり平均13,500個の上皮細胞を含む1つの乳管洗浄液から得られる。氷冷アセトン中で細胞が固定された後、スライドは、最適化されたインキュベーション条件で、1つまたは複数のMBとともに逐次または同時にインキュベートされ、次に蛍光顕微鏡下で検査される。各遺伝子に関するMBは異なる蛍光染料で標識されるため、試料中の標的腫瘍マーカーに関する任意のまたは全ての遺伝子を過剰発現する細胞の数が測定される。

10

【0039】

（分析）：本発明者らが意図しているのは、腫瘍マーカーの同定、モニタリングまたは検出手助けするために、あるいはがんの診断または進行のモニタリングを手助けするために、ある種の収集試料から得られる結果を別の収集試料から得られた結果と比較し得ることである。その後、同じスライドが染色され、良性、非定型または悪性の細胞の存在に関して、細胞病理学者により分析され得る。このような染色は、日常的な細胞学的染色、例えばH&Eまたは特異的抗体による免疫染色を包含し得る。

20

【0040】

（定量）：MBと、無傷細胞（固定された細胞または生きている細胞）中のその標的配列とのハイブリダイゼーションの検出は、蛍光顕微鏡法、FACS分析および蛍光マイクロプレートリーダーにより行われ得る。非限定的な例として、乳がん細胞をサバイピンおよびGAPDHのMBで同時トランスフェクトし、次にEGFで処理した。EGF処理後のサバイピン遺伝子発現の変化を、マイクロプレートリーダーで3時間、リアルタイムでモニタリングした。結果は、EGFが処理後30分以内にサバイピン遺伝子発現の増大を誘導する、ということを示した。

30

【0041】

（膵臓がん腫瘍マーカーの検出）

本発明の特定のいくつかの実施形態は、本明細書中に記載した分子ビーコン技術を用いて、被験者における膵臓がんの存在または進行を検出またはモニタリングする方法を提供する。

【0042】

膵臓がんの早期検出に関する重大な問題の1つは、多数の正常細胞集団の中の数個の腫瘍細胞を同定することができるアッセイを開発することである。目下、RT-PCRは、腫瘍細胞中で高度に発現される遺伝子の検出のための、あるいは突然変異型K-ras遺伝子のような突然変異遺伝子の産物、または癌胎児性抗原に関する、最も高感度のアッセイである。RT-PCRは $10^4 \sim 10^5$ 個の細胞中の1つの腫瘍細胞を検出し得るが、しかしこのようなアッセイは「擬陽性」を生じることがある。さらに、一般的な分子マーカーを用いた場合、末梢血および膵液中の遺伝子発現または突然変異遺伝子のRT-PCRによる検出では、がんを膵臓に局限することができない。なぜなら、多種類のがんならびにその他の非悪性疾患もそれらの分子マーカーを発現し得るからである。さらにRT-PCRアッセイは非常に時間を要し、典型的には1度に検出するのは1遺伝子であるため、がんの診断のための効率的臨床手法とはなりにくい。

40

【0043】

本発明者らは、本明細書中に開示されたような、末梢血および膵液試料中の少数の膵臓がん細胞を同定し得る高感度でより効率的な方法を開発した。本明細書中に開示されたM

50

Bを使用する方法は、単一種類のMBまたはいくつかのMBの組合せを用いて、混合細胞集団から膵臓がんまたは腫瘍細胞を検出するために用いられ得る。提供された方法を用いて、K-rasエキソン1のRT-PCR増幅後にK-ras突然変異を検出し得る。さらに種々の細胞学的または免疫染色手法が、開示された方法と一緒に用いられ得る。

【0044】

ハイリスク患者集団または膵臓がんを有する疑いのある患者における膵臓がんの早期検出のためには、非侵襲的または侵襲性を最小限とした手法により入手可能な患者試料からの臨床的アッセイを開発することが重要である。膵臓がん患者の血液、骨髄および腹腔中の播種性腫瘍細胞の存在を明示する証拠が次々と得られている（ラカス他（LaCasse et al.）, *Oncogene* 17: 3247-3259 (1998); リー他（Li et al.）, *Nature* 396: 580-584 (1998); タム他（Tamm et al.）, *Cancer Research* 58: 5315-5320 (1998); アンブロジーニ他（Ambrosini et al.）, *Nature Medicine* 3: 917-921 (1997)）。例えばいくつかのサイトケラチンおよび腫瘍マーカーを検出する抗体を用いた免疫組織化学的染色により、膵臓がん患者から得られた血液試料の28%でがん細胞が見出された。血液試料中のがん細胞の発見率は、腫瘍のステージに伴って増大した。しかしながら、第1期の膵臓がん患者の血液試料中には、がん細胞は見出されなかった（グラゲン他（Z'graggen et al.）, *Surgery* 129: 537-545 (2001)）。本発明は、全ステージの肝臓がん患者からの種々の試料を、本明細書中に開示されたMB技法を用いて検査して、膵臓腫瘍マーカー、例えば突然変異K-ras遺伝子およびサバイピン遺伝子（これらに限定されない）を発現する細胞を同定し得る高感度な方法を提供する。

【0045】

（試料の収集）：試験されるべき細胞の試料は、日常的な診断手法により得られる。このような試料としては、血液、尿、細針穿刺吸引物、膵液、あるいは任意のその他の組織（例えば膵臓または周囲組織からの生検物であるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。組織試料は、病理学的に調製された日常的な任意の種類試料、例えば顕微鏡スライド、プレートまたはウエルに付着させた任意の種類組織であり得る。好ましい実施形態では、組織試料は組織の凍結切片である。膵液は、診断的ERCP法を受けている患者から得られ得る。膵液は、十二指腸鏡を用いた膵液の分泌刺激およびサンプリングにより、自覚症状のない個体またはハイリスク集団において、非侵襲的に収集され得る。膵臓がん患者または膵臓腫瘍組織からの細針穿刺生検試料は、切除可能な腫瘍である場合、術後に収集され得る。

【0046】

（分析）：本発明者らが意図しているのは、腫瘍マーカーの同定、モニタリングまたは検出手助けするために、あるいはがんの診断または進行のモニタリングを手助けするために、ある種の収集試料から得られた結果を別の収集試料から得られた結果と比較し得ることである。その後、同じスライドが染色され、良性、非定型または悪性細胞の存在に関して、細胞病理学者により分析され得る。このような染色は、日常的な細胞学的染色、例えばH&Eまたは特異的抗体による免疫染色を包含し得る。

【0047】

血液および膵液を用いたMBを使用する検出の感度は、膵臓がんの外科的切除の後に、画像診断技術（例えばらせんCT、MRIもしくは内視鏡超音波）または病理学的診断により診断される膵臓がん病変のサイズおよびステージを比較することにより評価される。

【0048】

（突然変異遺伝子の存在のモニタリング）

本発明は、本明細書中に開示された分子ビーコン技術を用いて腫瘍細胞中の突然変異遺伝子の存在を検出する方法も提供する。このような突然変異遺伝子、例えばK-ras遺伝子の存在に関するモニタリングは、様々な種類のがん、例えば膵臓がん（これに限定されない）の診断および治療を手助けする、ということが意図される。

【0049】

（遺伝子発現における変化のモニタリング）

本明細書中に開示された分子ビーコン技術を用いて生細胞中の遺伝子発現の変化をリアルタイムでモニタリングする方法。このような方法は、標的遺伝子、例えば腫瘍マーカー、突然変異遺伝子等（これらに限定されない）の発現のモニタリングを可能にする。したがって、例えばある種のがんに遺伝的に罹患し易いとされている個体におけるがんの発症を、臨床医が検出し、モニタリングすることができる。このようにして、適切な治療が疾患の発症過程の早期に実施され、このことが実際に腫瘍またはがんの増殖の開始を防止するかまたは減少させ得る。生細胞における遺伝子発現レベルの検出により、種々の治療後の同一細胞集団においてリアルタイムで遺伝子発現の変化を測定することが可能になる、ということは重要である。この手法は、生物学的試薬による腫瘍細胞中の遺伝子発現の変化の検査のために、ならびに治療薬を用いたがん細胞の処置後の分子標的遺伝子の発現の評価のために用いられ得る。 10

【0050】

開示された方法を実行するのに適した任意の材料または試薬を包含する、リアルタイムで生細胞中の遺伝子発現の変化を検出するための診断キットも意図される。

（がん細胞の検出）

本発明は、本明細書中に開示された分子ビーコン技術を用いて試料中のがん細胞を検出する方法を提供する。1つまたは複数のがん、例えば乳がん、膵臓がん、卵巣がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、多発性骨髄腫、リンパ腫、膀胱がん、甲状腺髄様がん、神経内分泌腫瘍、類癌腫、精巣がん、妊娠栄養膜腫瘍形成、肺がん、黒色腫および胃がん（これらに限定されない）から生じるがん細胞が検出され得る、ということが意図される。開示された方法を実行するのに適した任意の材料または試薬を包含する、がん細胞を検出するための診断キットも意図される。 20

【0051】

本発明の範囲を限定することなく、本発明の実施形態に従った例示的方法およびそれに関連する結果を以下に示す。表題または副題が読み手の便宜のために実施例に用いられることもあるが、これらは本発明の範囲を少しも限定すべきものではない、ということに留意されたい。さらに、ある種の理論が本明細書中に提示および開示されるが、それらの理論が正しくても、正しくなくても、あらゆる特定の理論または作用スキームに関係なく本発明に従ってデータの処理、サンプリング、変換等が行われる限り、本発明の範囲は少しも限定されるべきではない。 30

【0052】

〔実施例〕

【実施例1】

【0053】

（サバイピンMBを用いた乳がん細胞株中のサバイピン遺伝子発現の予備的検出）

ヒトサバイピン遺伝子の27nt~43ntのcDNA配列と相補的なプローブ配列を用いて、同遺伝子に特異的なMBを設計し、合成した（5'-AlexaFluor488-CTGAGAAAGGGCTGCCAGTCTCAG-ダブシル-3'；配列番号1）。下線を付したサバイピンMBのステム配列は、最良の熱力学作用を達成するよう特別に設計されている。最初に、サバイピンMBの特異的ハイブリダイゼーションについて、合成サバイピンオリゴヌクレオチド標的を用いて*in vitro*で試験した。 40

【0054】

結果は、サバイピンMBがサバイピン標的に特異的に結合する、ということを示した（図2C）。サバイピン遺伝子を種々のレベルで発現する乳がん細胞株MDA-MB-231、MDA-MB-435およびMCF-7、ならびに正常ヒト乳房上皮細胞株（MCF-10A）において、サバイピンmRNA検出用のサバイピンMBの特異性をさらに検査した。固定した細胞とともにサバイピンMBを37℃で1時間インキュベートした後、細胞をPBSで洗浄し、ニコンの蛍光顕微鏡下で観察した。細胞をチェンバースライド上で増殖させ、アセトンで固定した。サバイピンMBはAlexaFluor488で標識した（緑色、図4A）。ウエスタンブロットによる乳がん細胞株および正常細胞株における 50

サバイピン発現の検出を、図4Bに示す。図4Aに示したように、腫瘍細胞は中～強の赤色蛍光を示すのに対し、MCF-10Aでは、弱い蛍光が観察されるだけであった。さらに、蛍光の強度はウエスタンブロットにより検出されるサバイピンのレベルと良好に相関する(図4B)。

【実施例2】

【0055】

(乳がん細胞中のサバイピンおよびサイクリンD1の発現の同時検出)

数種類の腫瘍マーカーMBによるがん細胞の検出の特異性を調べるために、さらなる試験を実行した。サイクリンD1およびHer2/neu遺伝子用のMBを設計し、合成した(表1)。次に、合成オリゴヌクレオチド標的を用いて*in vitro*でのMBの特異性を検査した。各MBの配列を表1に示す。下線を付した配列は遺伝子の一部ではなく、ステムを形成するように設計されている。種々の蛍光染料(6-FAM、Cy3、AlexaFluor488)を備えた同一配列を有するいくつかのサバイピンMBも合成した。サバイピンMB-FITCは、表2に示すように、異なる標的配列を有する。MBはMWGバイオテック(MWG Biotech、米国ノールカロライナ州ハイポイント所在)およびインテグレートッドDNAテクノロジー・インコーポレイテッド(Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT)、米国アイオワ州コーラルビル所在)により合成された。

10

【0056】

MBとその標的との特異的ハイブリダイゼーションを測定するために、MBをそのオリゴヌクレオチド標的と混合することによりハイブリダイゼーション試験を実行し、次に蛍光マイクロプレートリーダーにより蛍光強度を測定した。この試験の対照群は、異なる遺伝子由来のオリゴヌクレオチド標的と混合されたMBとした(図2Cおよび図2D)。MBとその標的との特異的結合を実証した後、ヒト乳房腫瘍細胞株および正常細胞株中でのサイクリンD1の検出におけるMBの特異性をさらに検査した(図4)。

20

【0057】

【表 1】

表1 サバイビン、サイクリンD1およびHer-2/neuのmRNA検出用の分子ビーコン

遺伝子	MBの設計	蛍光染料の 励起(Ex) および発光(Em) (色)
サバイビン	サバイビン mRNA (27 - 43 nt) 5'-Alexa Fluo 488- <u>CTGAGAAAGGGCTGCCAGTCTCAG</u> - ダブシル -3' (配列番号2)	Ex 491 nm Em 515 nm (緑色)
サイクリンD1	サイクリンD1 MB1 mRNA (376-394nt) 5'-テキサスレッド- <u>TGGAGTTGTCGGTGTAGACTCCA</u> - ダブシル -3'- (配列番号3) サイクリンD1 MB2 mRNA (698-715 nt) 5'-テキサスレッド- <u>CACTTGATCACTCTGGACAAGTG</u> - ダブシル -3'- (配列番号4)	Ex 596 nm Em 615nm (赤色)
Her-2/neu	Her-2/neu MB1 mRNA (エキソン2) 5'- Alexa Fluo 350- <u>TAGAGGTGGCGGAGCATCTCTA</u> - ダブシル -3'- (配列番号5) Her-2/neu MB2 mRNA (エキソン3) 5'- Alexa Fluo 350- <u>CAATCCGCAGCCTCTGCGATTG</u> - ダブシル -3'- (配列番号6)	Ex 346 nm Em 442 nm (青色)

10

20

30

【 0 0 5 8 】

サイクリンD1およびサバイビンのMBを用いた乳がん細胞の検出のために、100 nMのサイクリンD1およびサバイビンのMBの混合物を、アセトンで固定したMDA-MB-231細胞、SKBr3細胞、MDA-MB-435細胞、MCF-7細胞またはMCF-10A細胞とともに1時間インキュベートした。蛍光顕微鏡下で、蛍光強度を検査した(図4A)。ウエスタンブロット分析により検査したサバイビンおよびサイクリンD1のタンパク質のレベルを示す(図4B)が、図4Bでは、MBにより検出されたサバイビンおよびサイクリンD1 mRNAのレベルをタンパク質レベルで補正して示してある(図4B)。図7は、EGFでヒト乳がん細胞株のMCF-7細胞を処理した後に、分子ビーコンを用いて生細胞における遺伝子発現をリアルタイムで検出したものを示す。図8は、ドセタキセル処理が乳がん細胞株におけるサバイビン遺伝子発現のレベルを増大させることを示した。

40

【実施例3】

【 0 0 5 9 】

(初期乳がん組織中のサバイビン発現細胞の同定)

50

乳がんマーカーとしてサバイピンを用いることの実現可能性を調べるために、ウエスタンブロット分析により、正常組織および乳がん組織の対、ならびに対になっていない正常組織および乳がん組織におけるサバイピンタンパク質の発現を検査した。サバイピンは73%をこえる乳がん組織で発現されるが、正常乳房組織のいずれにおいても発現されない、ということが判明した(図10)。サバイピン抗体を用いた凍結組織切片の免疫蛍光染色も、サバイピンが浸潤性乳管癌細胞中で高度に発現されるが、正常乳管細胞中では発現されない、ということを示した(図5A)。興味深いことに、DCISの病変も中レベルのサバイピンを示した(図5A)。サバイピンMBを用いた凍結組織切片に関するサバイピン遺伝子発現の検査はさらに、DCIS病変、浸潤性乳管癌、および乳がん患者の流入部のリンパ節における転移においてサバイピンを発現するがん細胞を明示した。しかしながら、正常乳房組織中にサバイピン陽性細胞は見出されなかった(図5Aおよび図5B)。

10

【実施例4】

【0060】

(膵臓がんの細胞および組織中の突然変異型K-rasおよびサバイピンmRNAの検出のためのMBの設計)

ビーコンの構造のパラメータおよびハイブリダイゼーション条件を決定して、K-ras突然変異遺伝子の発現を検出するためのMBを設計し、合成した。これらを、表4に示す。80%を超えるK-ras突然変異がK-rasのコドン12の中に見出されるため(フォス他(Vos et al.), J. of Path. 187 (3): 279-84 (1999))、GGTからGATへの(GlyからAspへの)トランジションを検出するK-ras MB1、ならびにGGTからGTTへの突然変異を標的とするK-ras MB2を合成した(表2)。GGTからGATへの変異は、膵臓がんにおける最も一般的なK-ras点突然変異のうちの1つである(表3)。

20

【0061】

K-ras MB1またはMB2は、そのDNA標的と*in vitro*で選択的に結合し、他の非特異的DNA標的と比較して強い蛍光シグナルを生じる(図2)。膵臓がん細胞株中でのK-ras MBの特異性の検査も、K-ras MBが特定のk-ras突然変異を有する膵臓がん細胞を検出し得る、ということを実証した。図3に示したように、Panc-1細胞株はK-rasのGGTからGATへの突然変異を有し、K-ras MB1とともにインキュベートした後で強い蛍光強度を示したが、K-ras MB2で染色した細胞では弱い蛍光を示した。Capan-2細胞株はK-rasのGGTからGTTへの突然変異を含有し、K-ras MB2で染色した細胞においてより明るい蛍光を検出した。いずれの細胞株も、サバイピンMBにより検出すると、高レベルのサバイピンを発現していた(図3A)。一方、K-ras MBは、K-rasのGGTからTGTへの突然変異を有するMIA PaCa-2細胞株、あるいはK-ras野生型のBXPc-3細胞中では強い蛍光シグナルを生じなかった。しかしながらそれらの細胞は、サバイピンMB染色に関しては陽性であった。K-rasおよびサバイピンのMBのインキュベーションは、正常な皮膚繊維芽細胞から作製される正常細胞株(HDF)中で検出可能な蛍光シグナルを生じなかった、ということは重要である(図3B)。

30

40

【0062】

K-ras MBは、凍結組織切片上でK-ras突然変異を有する膵臓がん細胞を検出することもできた。K-ras MB1またはK-ras MB2とともに1時間インキュベートし、Hoechst 33342(商品名)で対比染色(青色)した後、デジタル画像化システムを用いて蛍光顕微鏡下でスライドを観察した。K-ras MB1は、K-rasコドン12のGGTからGATへの突然変異を含有する患者#1および#2からの膵臓がん組織の凍結切片においてGGTからGATへの突然変異型K-ras遺伝子を発現するがん細胞を検出した。しかしながら、K-rasのGGTからGTTへの突然変異を有する患者#5からの膵臓がん組織の凍結切片においては、K-ras MB2を用いたインキュベーション後に明赤色の蛍光細胞が見出されたが、K-ras MB1を用いたインキ

50

ュベーション後には見出されなかった(図6A)。

【0063】

膵臓がん組織中のサバイピン発現のサバイピンMBによる検出の実行可能性も検査した。最初に、膵臓がん組織中のサバイピンの発現を、抗サバイピンモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色により実証した。サバイピンタンパク質は膵臓がん組織中で高度に発現されるが、正常膵臓中では検出不可能である、ということを開明者らは示した(図6B)。

【0064】

【表2】

表2 K-rasコドン12およびサバイピン遺伝子のための分子ビーコンの設計ならびに対応する標的配列

A. 変異型K-rasおよびサバイピンのmRNAを検出するMBの設計

MB	標的配列	MBの設計
K-ras MB 1	K-rasコドン12の GGT→GAT変異	5'-Cy3-CCTACGCCAATCAGCTCCGTAGG-ダブシル-3' (配列番号7)
K-ras MB 2	K-rasコドン12の GGT→GTT変異	5'-テキサスレッド-CCTACGCCAACAGCTCCGTAGG-ダブシル-3' (配列番号8)
サバイピン MB 1	サバイピンのDNA (27~43ヌクレオチド)	5'-Cy3 (Alexia-Fluo488または 6-FAM)- CTGAGAAAGGGCTGCCAGTCTCAG-ダブシル-3'(配列番号2)
サバイピン MB 2	サバイピンのDNA (32~51ヌクレオチド)	5'-FITC-TGGTCCTTGAGAAAGGGCGACCA-ダブシル-3'(配列番号9)
GAPDH MB	GAPDHのDNA (504~521ヌクレオチド)	5'-Cy3-GAGTCCTTCCACGATACCGACTC-ダブシル-3'(配列番号10)

B. K-rasおよびサバイピンのMBのDNA標的として用意されたオリゴヌクレオチド

DNA標的	合成オリゴヌクレオチド配列
K-ras 野生型 (GGT)	5'-GTA GTT GGA GCT GGT GGC GTA GGC AAG AGTGCCTTGACGATACAGCTAATT CAG-3'
K-ras Mut 1 (GAT)	5'-GTA GTT GGA GCT GAT GGC GTA GGC AAG AGTGCCTTGACGATACAGCTAATT CAG-3'
K-ras Mut 2 (GTT)	5'-GTA GTT GGA GCT GTT GGC GTA GGC AAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATT CAG-3'
サバイピン	5'-CCTGCCTGGCAGCCCTTTCTCAAGGACCACCGCATCTCTACATTCAAGAAC-3'

【0065】

【表3】

表3 膵臓がん細胞株におけるK-rasの突然変異

細胞株	K-ras突然変異	変化	予想される 生成物	初期の膵臓組織に おける変異の割合 (%)
Panc-1	あり、コドン12	GGT → GAT	GLY → ASP	48+ / 101 (48%)
Capan-2	あり、コドン12	GGT → GTT	GLY → VAL	33+ / 101 (33%)
Miapaca-2	あり、コドン12	GGT → TGT	GLY → CYS	2+ / 101 (2%)
PSN-1	あり、コドン12	GGT → CGT	GLY → ARG	9+ / 101 (9%)
BXPC-3	なし	なし	GLY	なし
HDF	なし	なし	GLY	なし

【0066】

10

20

30

40

50

【表4】

表4 K-rasのコードン12の変異を標的とする分子ビーコンの設計

5'-ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCT <u>GGT</u> GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG-3'
分子ビーコン
GGT-GAT: 5'-Cy-3-CCTACGCC <u>ATC</u> AGCTCCGTAGG-ダブシル-3'-(配列番号7)
GGT-GTT: 5'-Cy-3-CCTACGCC <u>AAC</u> AGCTCCGTAGG-ダブシル-3'-(配列番号8)
GGT-CGT: 5'-Cy-3-CCTACGCC <u>ACG</u> AGCTCCGTAGG-ダブシル-3'-(配列番号11)
GGT-TGT: 5'-Cy-3-CCTACGCC <u>ACA</u> AGCTCCGTAGG-ダブシル-3'-(配列番号12)
GGT-GCT: 5'-Cy-3-CCTACGCC <u>AGC</u> AGCTCCGTAGG-ダブシル-3'-(配列番号13)

コードン12=下線部

10

20

【0067】

上記の詳細な説明、実施例およびデータは、本発明の製造および使用についての完全な説明を提供する。別記しない限り、引用した特許文献および非特許文献は全て、背景となる情報のみに関して、参照により本明細書中で援用される。本発明の精神および範囲を逸脱せずに本発明について多数の実施形態が成され得るため、本発明は本明細書に添付の特許請求の範囲に存在する。

【0068】

【表 5】

参照文献リスト

1. Altieri DC and Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab. Invest.* 79:1327-33, 1999.
2. Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in Mol. Med.* 7:542-547, 2001.
3. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine* 3:917-21, 1997. 10
4. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcah HE, and Farthing MJG. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma c patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 112:1114-1120, 1997.
5. Asanuma K, Moriai R, Yajima T, Yagihashi A, Yamada M, Kobayashi D and Watanab N. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:1204-9, 2000.
6. Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff A, Fukuzawa M, Sandler A. The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 36:1785-91, 2001. 20
7. Barkin JS and Goldstein JA. Diagnostic approach to pancreatic cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 28:709-22, 1999.
8. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX and Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancers. *International Journal of Cancer*, 58:185-191, 1994.
9. Buchler P, Conejo-Garcia JR, Lehmann G, Muller M, Emrich T, Reber HA, Buchler MW and Friess H. Real-time quantitative PCR of telomerase mRNA is useful for the differentiation of benign and malignant pancreatic disorders. *Pancreas* 22:331-40, 2001 30
10. Clayton SJ, Scott FM, Walker J, Callaghan K, Haque K, Liloglou T, Xinarianos G, Shawcross S, Ceuppens P, Field JK and Fox JC. K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clinical Chemistry* 46:1929-38, 2000.
11. Deveraux QL. Roy N. Stennicke HR. Van Arsdale T. Zhou Q. Srinivasula SM. Alnemri ES. Salvesen GS. Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO Journal*. 17(8):2215-23, 1998. 40
12. Dirks RW. Molenaar C. Tanke HJ. Methods for visualizing RNA processing and transport pathway in living cells. *Histochem. & Cell Biol.* 115(1): 3-11, 2001.
13. Dubertret B, Calame M, and Libchaber A. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 19:365-370, 2001.
14. Fischer C, Buthe J, Nollau P, Hollerbach S, Schulmann K, Schmiegel W, Wagener C

- and Tschentscher P. Enrichment of mutant KRAS alleles in pancreatic juice by subtractive iterative polymerase chain reaction. *Laboratory Investigation* 81:827-31, 2001.
15. Futakawa N, Kimura W, Yamagata S, Zhao B, Ilsoo H, Inoue T, Sata N, Kawaguchi Y, Kubota Y and Muto T. Significance of K-ras mutation and CEA level in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 7:63-71, 2000.
 16. Goggins M, Hruban RH and Kern SE. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *American Journal of Pathology* 156:1767-71, 2000. 10
 17. Gold EI, Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg. Clin. North Am.* 75:819-839, 1995.
 18. Harris JR, Morrow M, Norton L: Malignant tumors of breast. In Detita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): "Cancer: Principles and practice of oncology." Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. P. 1557-1616.
 19. Hosch S, Braun S, and Pantel K. Characterization of disseminated tumor cells. *Seminars in Surgical Oncology*, 20:265-271, 2001. 20
 20. Hruban RH, Stum PD, Slebos RJ, Wilentz RE, Musler AR, Yeo CJ, Sohn TA, Velthuy and Offerhaus GJA. Can K-ras codon 12 mutations be used to distinguish bile duct proliferations from metastases in the liver. *American Journal of Pathology* 151:943-94
 21. Janócko LE, Brown KA, Smith CA, Gu LP, Pollice AA, Singh SG, Julian T, Wolmark N, Sweeney L, Silverman JF, Shackney SE. Distinctive patterns of Her-2/neu, c-myc, and cyclin D1 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in primary human breast cancers. *Cytometry*. 46(3):136-49, 2001. 30
 22. Kappler M, Kohler T, Kampf C, Diestelkötter P, Wurl P, Schmitz M, Bartel F, Lautenschlager C, Rieber EP, Schmidt H, Bache M, Taubert H, Meye A. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *International Journal of Cancer*. 95:360-3, 2001.
 23. Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J and Fujii Y. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *International Journal of Cancer* 95:92-5, 2001. 40
 24. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG and MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17:3247-59, 1998.
 25. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 1999.
 26. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, and Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced

- by interference with survivin function. *Nature cell Biology* 1:461-466, 1999.
27. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC and Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396:580-4, 1998.
 28. Luttges J, Schlehe B, Menke MA, Vogel I, Henne-Bruns D and Kloppel G. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 85:1703-10, 1999. 10
 29. Minamoto T, Mai M and Ronai Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers--a review. *Cancer Detection & Prevention* 24:1-12, 2000.
 30. Moore M. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *Journal of insurance medicine* 33:202-3, 2001.
 31. Myung SJ, Kim MH, Kim YS, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Wan Seo D, Lee SK, Min YI and Kim JY. Telomerase activity in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer may be complementary to K-ras mutation. *Gastrointestinal Endoscopy* 51:708-13, 2000. 20
 32. Nakaizumi A, Uehara H, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Ohigashi H, Ishikawa O, Ishiguro S, Sugano K and Tatsuta M. Diagnosis of pancreatic cancer by cytology and measurement of oncogene and tumor markers in pure pancreatic juice aspirated by endoscopy. *Hepato-Gastroenterology* 46:31-7, 1999.
 33. National Institute of Health: National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1973-1990, NIH publication 93-2789. Bethesda, MD. 1993.
 34. Nomoto S, Nakao A, Ando N, Takeda S, Kasai Y, Inoue S, Kaneko T and Takagi H. Clinical application of K-ras oncogene mutations in pancreatic carcinoma: detection of micrometastases. *Seminars in Surgical Oncology* 15:40-46, 1998. 30
 35. Okai T, Watanabe H, Yamaguchi Y, Mouri I, Motoo Y and Sawabu N. EUS and K-ras analysis of pure pancreatic juice collected via a duodenoscope after secretin stimulation for diagnosis of pancreatic mass lesion: a prospective study. *Gastrointestinal Endoscopy* 50:797-803, 1999.
 36. O'Shaughnessy JA, Ljung BM, Dooley WC, Chang J, Kuerer HM, Hung DT, Grant MD, Khan SA, Phillips RF, Duvall K, Eubus DM, King BL, Anderson BO, Troyan SL, Kim J, Veronesi U, Cazzaniga M. Ductal lavage and the clinical management of women at high risk for breast carcinoma: a commentary. *Cancer*. 94(2):292-8, 2002. 40
 37. Parker SL, Tong T and Bolden S. Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 46:5-27, 1996.
 38. Pervin S, Singh R., and Chaudhuri G. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): Potential role of cyclin D

1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, Issue 6, 3583-3588, 2001.
39. Poddar SK. Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon prob in the detection of a target gene of adenovirus. *Molecular & Cellular Prodes.* 14:25-32, 2000.
40. Poller DN, Galea M, Pearson D, Bell J, Gullick WJ, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. Nuclear and flow cytometric characteristics associated with overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. & Treat.* 20(1):3-10, 1991.
41. Puig P, Urgell E, Capella G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, Farre A, Lluís F, Gonzalez-Sastre F, Mora J. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. *International Journal of Cancer.* 85(1):73-7, 2000. 10
42. Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Manton G and Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice. *American Journal of Gastroenterology* 96:700-4, 2001.
43. Ramachandra S, Machin L, Ashley S, Monaghan P, Gusterson BA. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in in situ breast carcinoma--a detailed morphological analysis. *J. of Path.* 161(1):7-14, 1990. 20
44. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ and Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Research* 57: 1731-1734, 1997.
45. Sarela AL, Macadam RCA, Farmery SM, Markham AF and Guillou PJ. Expression of the anti-apoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 46(5):645-650, 2000.
46. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A and Shimosegawa. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 92:271-278, 2001. 30
47. Seki K, Suda T, Aoyagi Y, Sugawara S, Natsui M, Motoyama H, Shirai Y, Sekine T, Kawai H, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M and Asakura H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in pancreatic juice with sample qualification. *Clinical Cancer Research* 7:1976-81, 2001.
48. Seregini E, Ferrari L, Martinetti A and Bombardieri E. Diagnostic and prognostic tumor markers in the gastrointestinal tract. *Seminars in Surgical Oncology* 20:147-166, 2001. 40
49. Shibata K, Mori M, Kitano S and Akiyoshi T. Detection of ras gene mutations in peripheral blood of carcinoma patients using CD45 immunomagnetic separation and nested mutant allele specific amplification. *International Journal of Oncology* 12:1333-8, 1998.

50. Sokol DL, Zhang X, Lu P, and Gewirtz AM. Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11538-11543, 1998.
51. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *New England Journal of Medicine*. 341:452-3, 1999.
52. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T and Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research* 58:5315-20, 1998. 10
53. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M and Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 6:127-34, 2000.
54. Tascilar M, Caspers E, Sturm PD, Goggins M, Hruban RH and Offerhaus GJ. Role of tumor markers and mutations in cells and pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *Annals of Oncology* 10 Suppl 4:107-10, 1999.
55. Tsourkas A, Behlke M, Rose S and Bao G. Hybridization kinetics and thermodynamics molecular beacons with structural variations. Submitted to *Biophysical J*, 2002. 20
56. Tyagi S and Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol* 14, 303-308, 1996.
57. Tyagi S, Bratu DP, and Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* 16:49-53, 1998.
58. Urgell E, Puig P, Boadas J, Capella G, Queralto JM, Boluda R, Antonijuan A, Farre A, Lluís F, Gonzalez-Sastre F and Mora J. Prospective evaluation of the contribution of K-ras mutational analysis and CA 19-9 measurement to cytological diagnosis in patients with clinical suspicion of pancreatic cancer. *European Journal of Cancer* 36:2069-75, 2000. 30
59. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Kinzler KW, et al. Analysis of human transcriptomes [letter]. *Nature Genetics* 23:387-8, 1999.
60. Vogel I, Kalthoff H, Disseminated tumour cells, their detection and significance for prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas. *Virchows Archiv* 439:109-17, 2001. 40
61. Vogel I, Kruger U, Marxsen J, Soeth E, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Kremer B, Juhl H Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor. *Clinical Cancer Research* 5:593-9, 1999.
62. Vos CB, Ter Haar NT, Peterse JL, Cornelisse CJ, van de Vijver MJ. Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast.

- J. of Path.187(3):279-84, 1999 Feb.
63. Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T and Sawabu N. Quantitative determination of K-ras mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* 17:341-7, 1998.
64. Weinstat-Saslow D, Merino MJ, Manrow RE, Lawrence JA, Bluth RF, Wittenbel KD, Simpson JF, Page DL, Steeg PS. Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nat Med* 1995 Dec;1(12):1257-60. 10
65. Yamada H, Yoshida T, Sakamoto H, Terada M and Sugimura T. Establishment of a human pancreatic adenocarcinoma cell line (PSN-1) with amplifications of both c-myc and activated c-Ki-ras by a point mutation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 140:167-73, 1986.
66. Yang L, and Zhang Y. Differential regulation of apoptotic cell death pathway in tumor cells affects GCV sensitivity in HSV-TK modified human tumor cell lines. Fourth Annual American Society for Gene Therapy, Seattle, May 30 to June 3, 2001. 20
67. Z'graggen K, Centeno BA, Castillo F, Jimenez RE, Werner J, and Warshaw AL. Biological implication of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients, *Surgery* 129:537-545, 2001.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 4 】

【図1】分子ビーコン(MB)の概略を示す図。(A)分子ビーコンは、ヘアピン構造を有する二重標識オリゴヌクレオチドである；(B)分子ビーコンが細胞内へ送達されると、該プローブと標的mRNAとのハイブリダイゼーションにより蛍光シグナルを生じ得る。 30

【図2】分子ビーコンプローブとそのオリゴヌクレオチド標的との*in vitro*での特異的結合を示す図。K-ras MB1、K-ras MB2、サバイピンおよびサイクリンD1 MBを、特異的または非特異的な合成DNA標的と混合し、37 (サバイピンおよびサイクリンD1)または50 (K-ras)で1時間インキュベートした。相対蛍光単位(RFU)を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。図中の棒グラフは、4連の試料の平均RFUである。AおよびB：K-ras MB1またはMB2は、K-ras Mut1またはMut2の標的と特異的に結合して、K-ras WT(野生型)標的または異なるk-ras突然変異を有する標的と比較して高い蛍光強度を生じた。CおよびD：サバイピンMBまたはサイクリンD1 MBは、サバイピンまたはサイクリンD1標的とのみハイブリダイズし、K-rasまたはHer-2標的とは結合せず、高レベルの蛍光シグナルを生じた。 40

【図3A】ヒト膵臓がん細胞株における突然変異型K-ras遺伝子およびサバイピン遺伝子の発現の同時検出による、膵臓がん細胞の分子ビーコンによる画像化を示す図。膵臓がん細胞株および正常細胞株をアセトンで固定した。細胞を、K-ras MB1-cy3 (GGT GAT)とサバイピンMB-FITCとの混合物、またはK-ras MB2-テキサスレッド(GGT GTT)とサバイピンMB-FITCとの混合物とともに、50で1時間インキュベートした。次に共焦点蛍光顕微鏡下でスライドを観察した。蛍光画像を撮影し、同一露出条件を用いて、各色に関する全ての画像を撮影した。赤色蛍光を有する細胞は、K-ras MB1またはK-ras MB2により検出されたように特定の 50

突然変異型 K - r a s を発現する膵臓がん細胞であった。細胞をさらにまた緑色の蛍光で二重標識すると、これらの腫瘍細胞は腫瘍マーカーであるサバイピンも発現していることが示された。本図は、特定の K - r a s 突然変異および高レベルのサバイピンを有する腫瘍細胞株中で突然変異型 K - r a s およびサバイピン遺伝子を発現している膵臓がん細胞の検出の特異性を示す。P a n c - 1 細胞株は、K - r a s の G G T から G A T への突然変異を有し、K - r a s M B 1 とともにインキュベートした後に強力な蛍光強度を示したが、K - r a s M B 2 染色細胞では弱い蛍光を示した。C a p a n - 2 細胞株は、K - r a s の G G T から G T T への突然変異を含有し、K - r a s M B 2 染色細胞においてより明るい蛍光が検出された。いずれの細胞株も、サバイピン M B により検出されたように、高レベルのサバイピンを発現した。

10

【図 3 B】ヒト膵臓がん細胞株における突然変異型 K - r a s 遺伝子およびサバイピン遺伝子の発現の同時検出による、膵臓がん細胞の分子ビーコンによる画像化を示す図。膵臓がん細胞株および正常細胞株をアセトンで固定した。細胞を、K - r a s M B 1 - c y 3 (G G T G A T) とサバイピン M B - F I T C との混合物、または K - r a s M B 2 - テキサスレッド (G G T G T T) とサバイピン M B - F I T C との混合物とともに、50 で 1 時間インキュベートした。次に共焦点蛍光顕微鏡下でスライドを観察した。蛍光画像を撮影し、同一露出条件を用いて、各色に関する全ての画像を撮影した。赤色蛍光を有する細胞は、K - r a s M B 1 または K - r a s M B 2 により検出されたように特定の突然変異型 K - r a s を発現する膵臓がん細胞であった。細胞をさらにまた緑色の蛍光で二重標識すると、これらの腫瘍細胞は腫瘍マーカーであるサバイピンも発現していることが示された。本図では、異なる突然変異型または野生型 K - r a s 遺伝子を発現する膵臓がん細胞は K - r a s の M B については弱い蛍光を示すかまたは陰性であるが、サバイピン M B では依然として検出され得ることを示す。K - r a s M B は、K - r a s の G G T から T G T への突然変異を有する M I A P a C a - 2 細胞株、あるいは K - r a s 野生型 B X P C - 3 細胞中では強力な蛍光シグナルは生じなかった。しかしながらそれらの細胞は、サバイピン M B 染色に対しては陽性であった。K - r a s およびサバイピン M B のインキュベーションは、正常な皮膚繊維芽細胞から作製される正常細胞株 (H D F) 中では検出可能な蛍光シグナルを生じなかった。

20

【図 3 C】ヒト膵臓がん細胞株における突然変異型 K - r a s 遺伝子およびサバイピン遺伝子の発現の同時検出による、膵臓がん細胞の分子ビーコンによる画像化を示す図。膵臓がん細胞株および正常細胞株をアセトンで固定した。細胞を、K - r a s M B 1 - c y 3 (G G T G A T) とサバイピン M B - F I T C との混合物、または K - r a s M B 2 - テキサスレッド (G G T G T T) とサバイピン M B - F I T C との混合物とともに、50 で 1 時間インキュベートした。次に共焦点蛍光顕微鏡下でスライドを観察した。蛍光画像を撮影し、同一露出条件を用いて、各色に関する全ての画像を撮影した。赤色蛍光を有する細胞は、K - r a s M B 1 または K - r a s M B 2 により検出されたように特定の突然変異型 K - r a s を発現する膵臓がん細胞であった。細胞をさらにまた緑色の蛍光で二重標識すると、これらの腫瘍細胞は腫瘍マーカーであるサバイピンも発現していることが示された。本図では、K - r a s M B の送達後の膵臓がん細胞および正常細胞の蛍光強度の比較を示す。A d o b e (登録商標) P h o t o S h o p (登録商標) ソフトウェアを用いて、3 つの無作為に選択した領域の各画像において蛍光強度を測定した。棒グラフ中の数字は、5 ~ 7 画像の平均蛍光強度を表す。

30

40

【図 4 A】腫瘍マーカーであるサイクリン d 1 およびサバイピンを発現しているヒト乳がん細胞の分子ビーコンによる画像化を示す図。本図では、サイクリン D 1 - テキサスレッドおよびサバイピン M B - A l e x a 4 8 8 の混合物とともに 37 で 1 時間インキュベートされた乳がん細胞株および正常な乳房上皮の細胞株を示す。該スライドを次に、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。蛍光画像を撮影し、同一露出条件を用いて、各色に関する全ての画像を撮影した。

【図 4 B】腫瘍マーカーであるサイクリン d 1 およびサバイピンを発現しているヒト乳がん細胞の分子ビーコンによる画像化を示す図。本図では、サバイピンおよびサイクリン D

50

1のMBにより検出される乳がん細胞株における蛍光強度のレベルが、ウエスタンブロット分析により検出されるサバイピンタンパク質およびサイクリンD1タンパク質のレベルと相関することを示す。

【図5A】サバイピンタンパク質の免疫蛍光染色またはサバイピンmRNA検出用サバイピンMBによる、DCISおよび浸潤期のヒト乳がん組織凍結切片におけるサバイピン発現の検出を示す図。乳がん組織または正常組織の凍結組織切片を、抗サバイピンポリクローナル抗体またはサバイピンMB-cy3とともにインキュベートした。サバイピンは早期腫瘍マーカーであり、サバイピンのmRNAおよびタンパク質はともに早期の乳がんである非浸潤性乳管癌(DCIS)で検出され得る。サバイピンは浸潤性乳がんでも検出されるが、正常な乳房組織中では検出されない。

10

【図5B】サバイピンタンパク質の免疫蛍光染色またはサバイピンmRNA検出用サバイピンMBによる、DCISおよび浸潤期のヒト乳がん組織凍結切片におけるサバイピン発現の検出を示す図。乳がん組織または正常組織の凍結組織切片を、抗サバイピンポリクローナル抗体またはサバイピンMB-cy3とともにインキュベートした。サバイピンMBはリンパ節中の転移性乳がん細胞を検出したが、このことは、患者のリンパ節中の乳がん細胞の存在を検出するための迅速且つ高感度な方法の開発の実現可能性を示す。

【図6A】膵臓がん組織の凍結組織切片における、突然変異型K-rasおよびサバイピンのmRNAを発現する膵臓がん細胞の特異的画像化を示す図。凍結組織切片を、K-rasMB1またはK-rasMB2、あるいはサバイピンMBとともに1時間インキュベートし、Hoechst33342(青色)で対比染色した。K-rasMB1は、K-rasのコードン12のGGTからGATへの突然変異を含有する患者#1および#2由来の膵臓がん組織の凍結切片において、GGTからGATへの突然変異型K-ras遺伝子が発現しているがん細胞を検出した。しかしながら、K-rasのGGTからGTTへの突然変異を有する患者#5由来の膵臓がん組織の凍結切片においては、K-rasMB2を用いたインキュベーション後に明赤色の蛍光細胞が見出され、K-rasMB1を用いたインキュベーション後には見出されなかった。

20

【図6B】膵臓がん組織の凍結組織切片における、突然変異型K-rasおよびサバイピンのmRNAを発現する膵臓がん細胞の特異的画像化を示す図。凍結組織切片を、K-rasMB1またはK-rasMB2、あるいはサバイピンMBとともに1時間インキュベートし、Hoechst33342(青色)で対比染色した。本図では、免疫蛍光またはサバイピンMB染色による凍結組織切片における膵臓がん細胞中のサバイピンタンパク質またはmRNAのレベルの検出を示す。免疫蛍光染色によるサバイピンタンパク質のレベルの検出については、膵臓がん組織および正常組織の凍結組織切片を、マウス抗サバイピン抗体(サバイピンAb)とともに、その後、FITCで標識したヤギ抗マウス二次抗体とともにインキュベートした。高レベルのサバイピンタンパク質およびmRNAが膵臓がん組織中に見出されたが、正常な膵臓組織中には見出されなかった。

30

【図7A】EGF処理後の生きている乳がん細胞におけるサバイピン遺伝子発現のリアルタイム検出を示す図。乳がん細胞株MCF-7を96ウエルプレート中で培養し、2%FBSを含有する培地中に一晩置いた。次に細胞を、リポフェクタミン2000を用いて3時間、200nMのサバイピン6FAMMBおよびGAPDHcy3MBの混合物でトランスフェクトした。次に200ngのEGFを培地に添加した。組織培養プレートを蛍光マイクロプレートリーダー中に直ちに入れて、相対蛍光単位(RFU)を30分毎に3時間測定した。図中の曲線は、3連試料の平均値を表し、6-FAM(サバイピンMB)とcy3(内部対照GAPDHMB)のRFUの比である。

40

【図7B】EGF処理後の生きている乳がん細胞におけるサバイピン遺伝子発現のリアルタイム検出を示す図。EGFで処理した、またはEGFで処理しなかったトランスフェクション済みの細胞を、共焦点顕微鏡下で24時間観察し、蛍光画像を撮影した。

【図8A】ドセタキセル処理後の様々な時点における、サバイピンMBを用いたサバイピン遺伝子発現の変化のリアルタイム検出を示す図。ヒト乳がん細胞株MCF-7およびMDA-MB-231を、96ウエルプレート中で培養した。100nMのサバイピンおよ

50

び G A P D H 用 M B 混合物でトランスフェクトした後、細胞を、化学療法薬ドセタキセルを用いて処理し (D o c)、または用いずに処理し、各群における蛍光強度の変化を、蛍光マイクロプレートリーダーで 4 8 時間、リアルタイムで測定した。

【図 8 B】ドセタキセル処理後の様々な時点における、サバイピン M B を用いたサバイピン遺伝子発現の変化のリアルタイム検出を示す図。トランスフェクトした細胞を、20nm (M D A - M B - 231) または 50nm (M C F - 7) のドセタキセルを用いて、または用いずに、24 ~ 48 時間処理し、次に共焦点顕微鏡下で観察して、蛍光画像を撮影した。

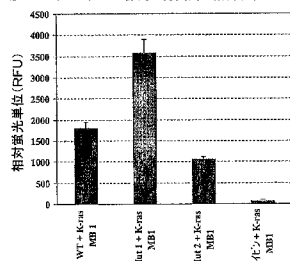
【図 9】生細胞中のサバイピン遺伝子発現のレベルが F A C s c a n (商標) 分析により検出され得ることを示す図。乳がん細胞株 M D A - M B - 231 および正常細胞株 H D F をサバイピン用または - アクチン用の M B で 3 時間トランスフェクトした。細胞を培養皿から回収し、正常細胞および腫瘍細胞におけるサバイピン遺伝子発現のレベルに関して F A C s c a n で分析した。結果から、生細胞における遺伝子発現のレベルも F A C s c a n を用いて定量的に測定され得る、ということが実証された。

【図 10】ウエスタンブロット分析による正常な乳房組織および乳がん組織中のサバイピンのレベルの検出を示す図。乳がん患者からの、正常組織および乳がん組織を対にした試料ならびに対になっていない正常組織および乳がん組織の試料についてのサバイピンのレベル。

10

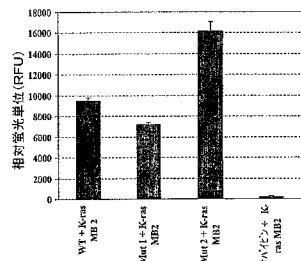
【 図 1 】

A. GGTからGATへの変異を標的とするK-rasMB1はMut1 (GAT) DNA標的に特異的に結合する



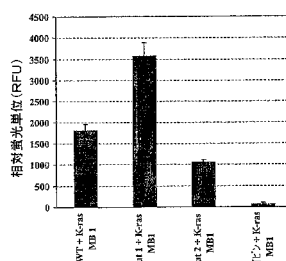
スチューデントのt検定: Mut1 vs WT P=0.001; Mut1 vs Mut2: p=3.9E-06

B. GGTからGTTへの変異を標的とするK-rasMB2はMut2 (GTT) DNA標的に特異的に結合する

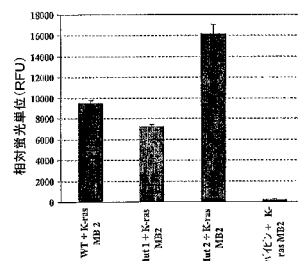


スチューデントのt検定: Mut2 vs WT P=7.5E-06; Mut2 vs Mut1: p=1.1E-06

【 図 2 】

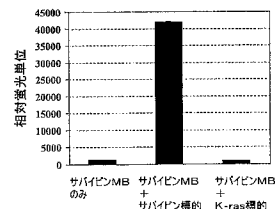


スチューデントのt検定: Mut1 vs WT P=0.001; Mut1 vs Mut2: p=3.9E-06

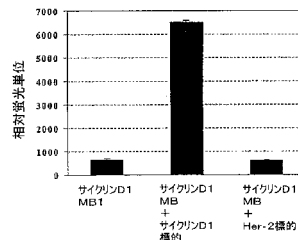
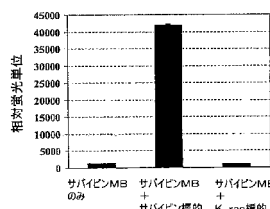
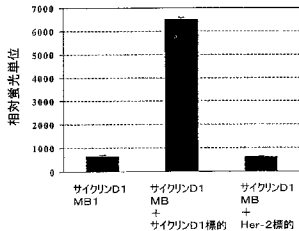


スチューデントのt検定: Mut2 vs WT P=7.5E-06; Mut2 vs Mut1: p=1.1E-06

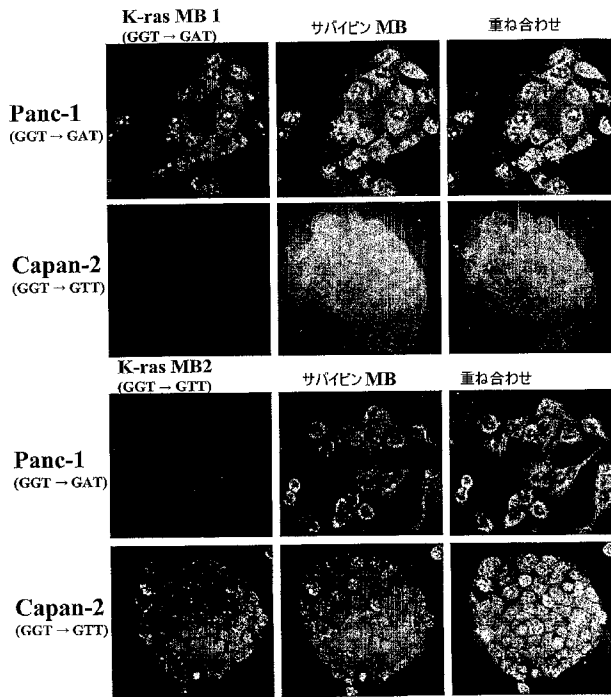
C. in vitroにおけるサバイピンMBのDNA標的への特異的結合の検出



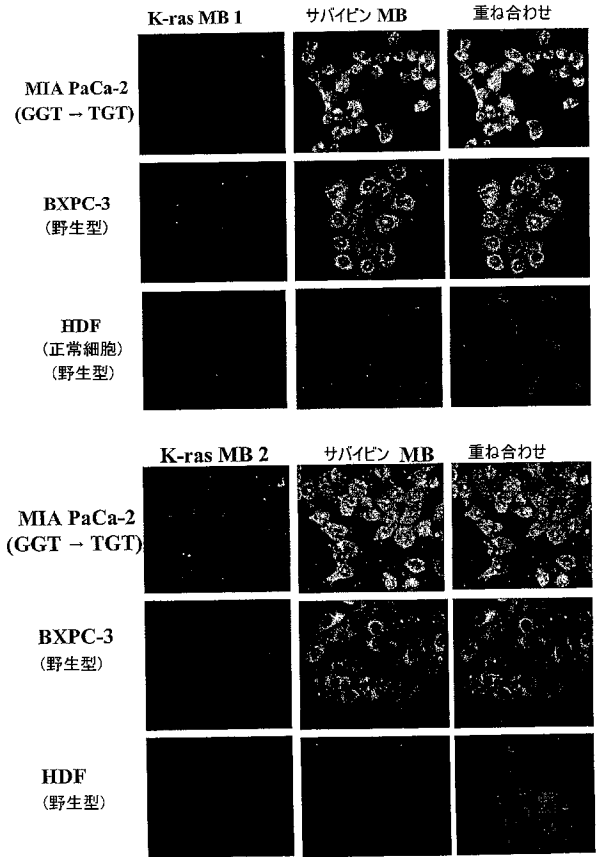
D. in vitroにおけるサイクリンD1 MBのDNA標的への特異的結合の検出



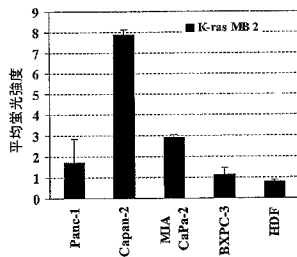
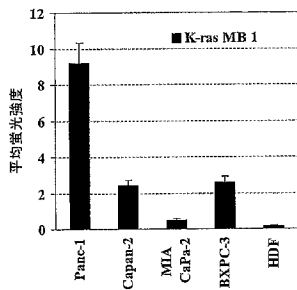
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 3 C 】

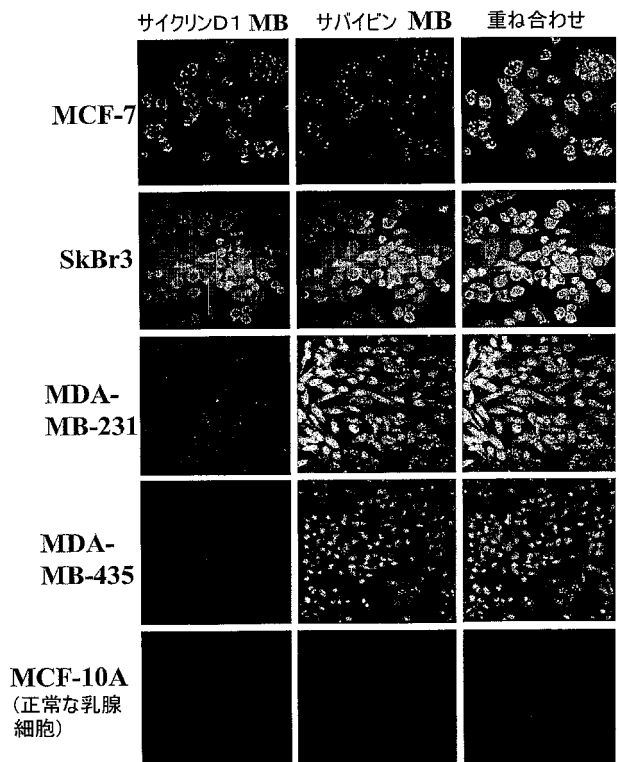


K-ras突然変異: GAT GTT TGT なし なし

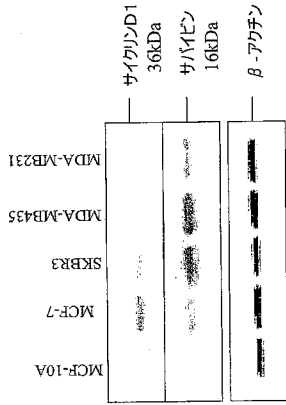
K-ras MB1: GGT → GAT; K-ras MB2: GGT → GTT

Comparison	p値	平均蛍光強度の比較(倍)
Panc-1 MB1 vs MB2	1.5E-06	5.3
Capan-2 MB2 vs Capan-2 MB1	0.0001	3.2
Panc-1 MB1 vs Capan-2 MB1	6.9E-06	3.8
Capan-2 MB2 vs panc-1 MB2	0.0004	4.6
Panc-1 MB1 vs MIA PaCa-2 MB1	6.6E-07	18.8
Capan-2 MB2 vs MIA PaCa-2 MB2	0.0004	2.7
Panc-1 MB1 vs BXPc-3 MB1	4.6E-06	3.7
BXPc-3 MB2 vs Capan-2 MB2	0.0002	7.0
HDF MB1 vs Panc-1 MB1	4.6E-07	67.6
HDF MB2 vs Capan-2 MB2	8.3E-06	18.0

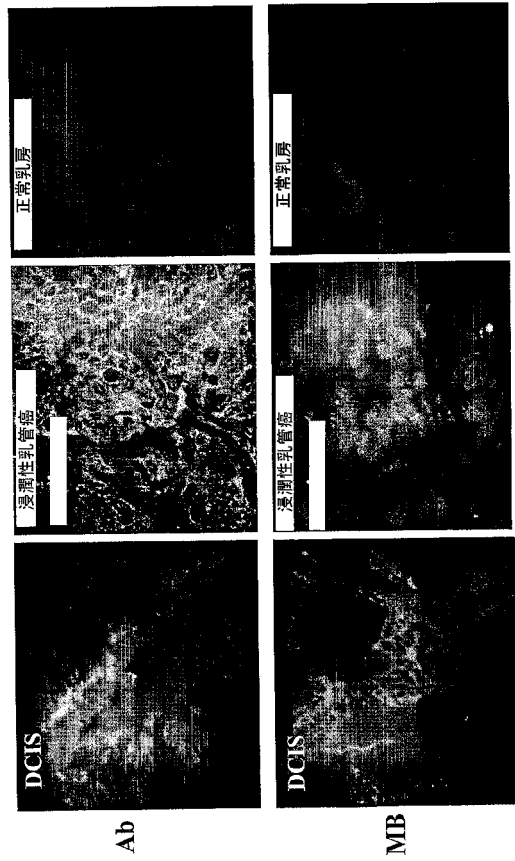
【 図 4 A 】



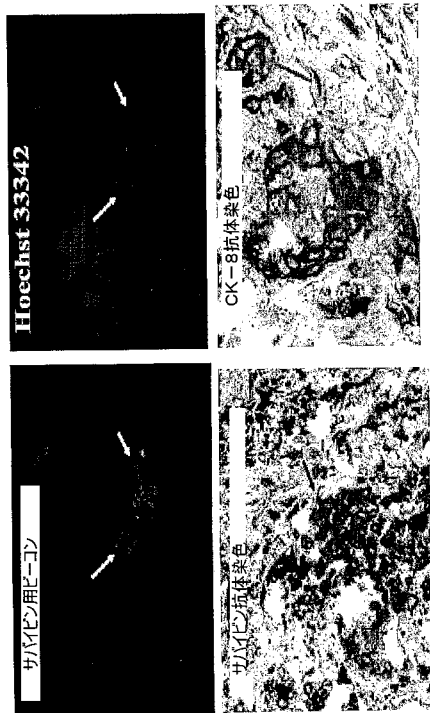
【 図 4 B 】



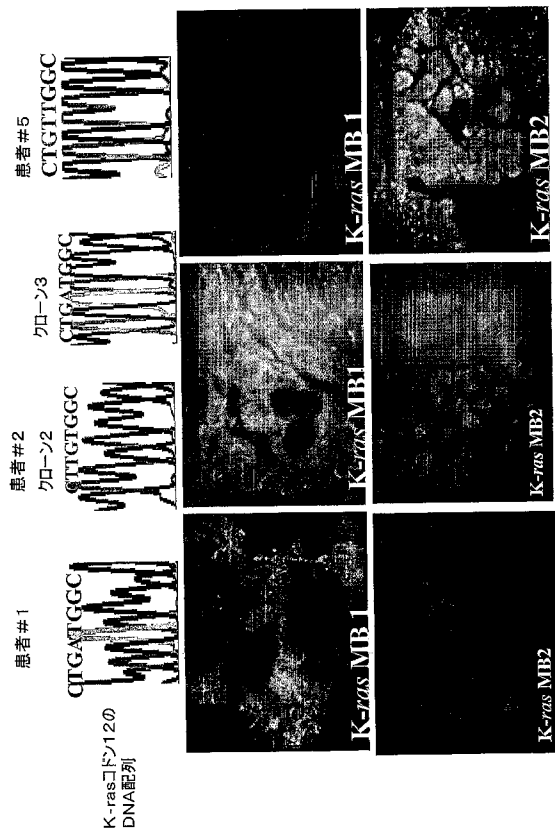
【 図 5 A 】



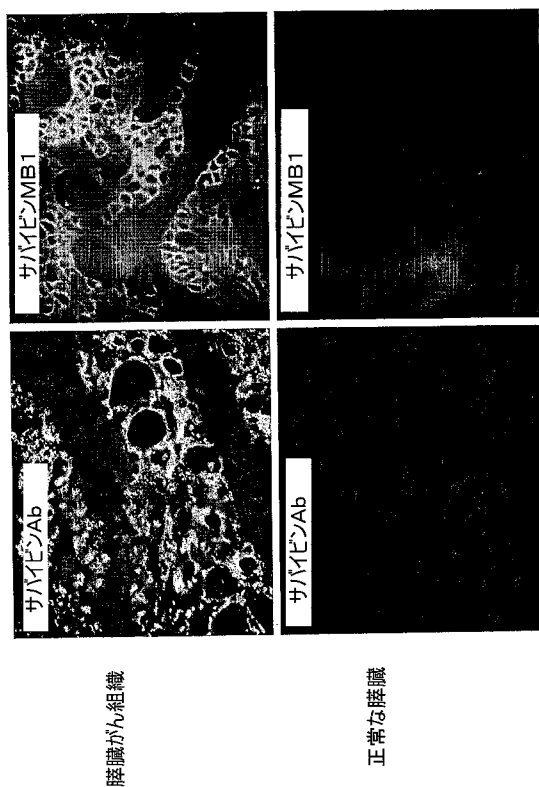
【 図 5 B 】



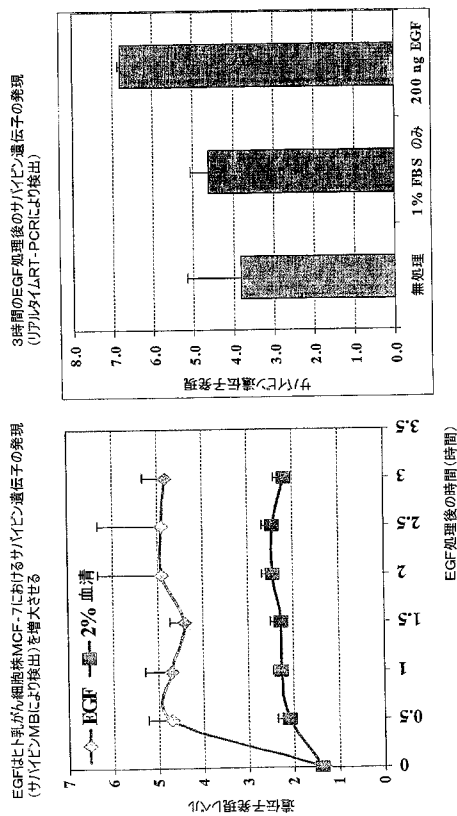
【 図 6 A 】



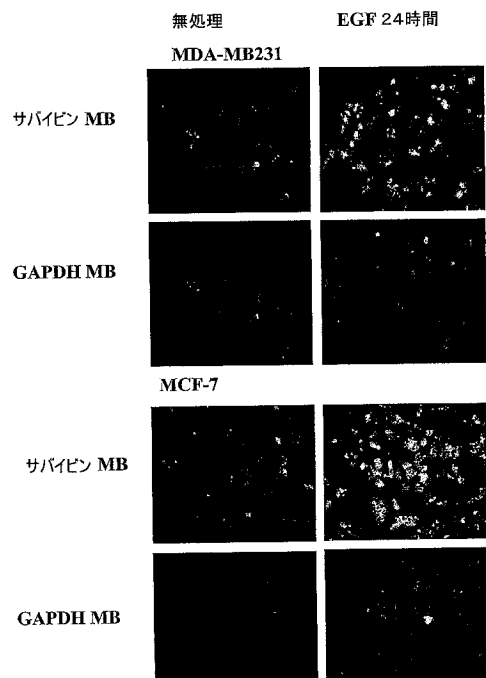
【 図 6 B 】



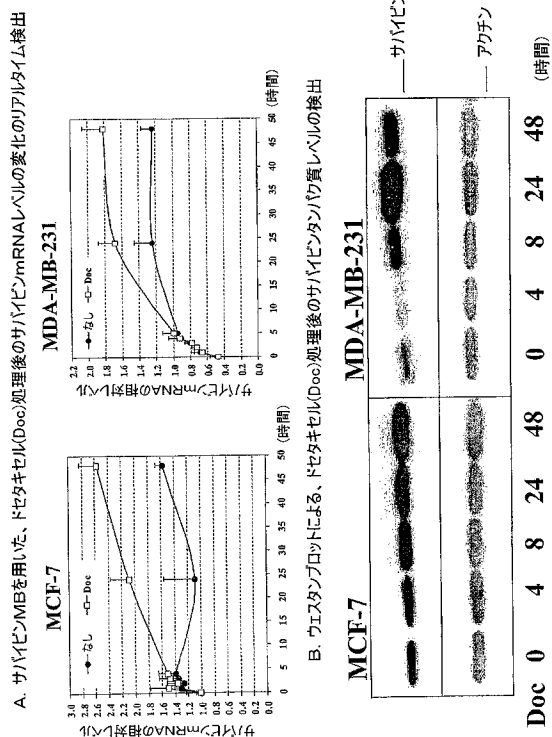
【 図 7 A 】



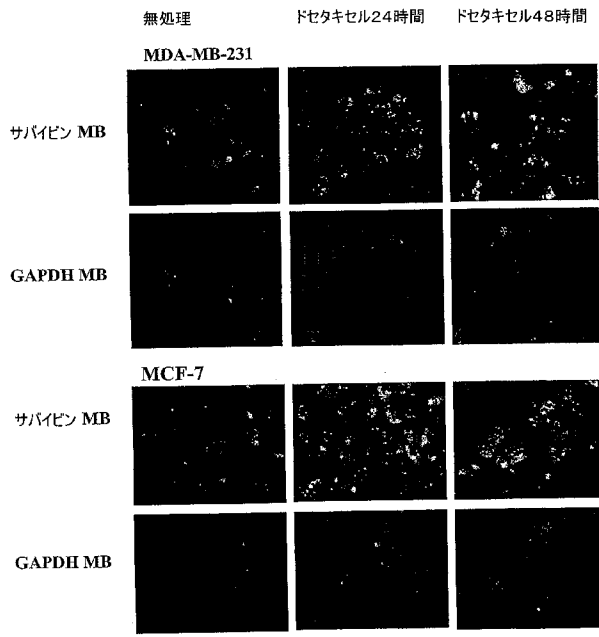
【 図 7 B 】



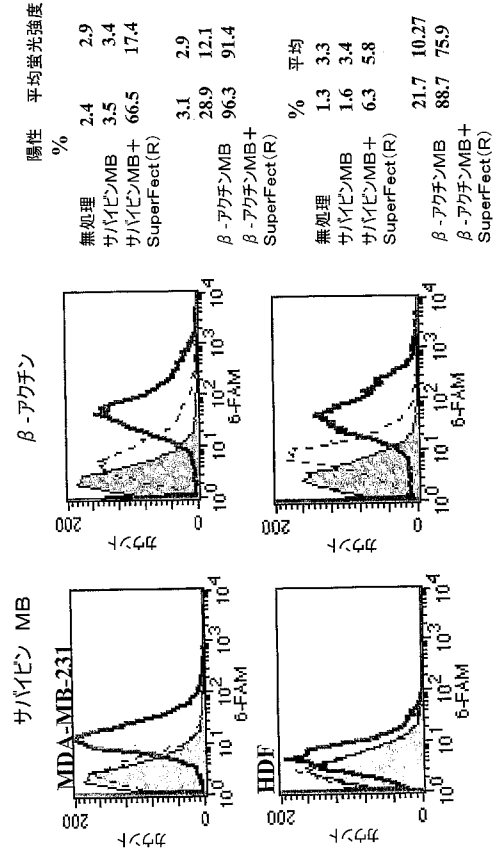
【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

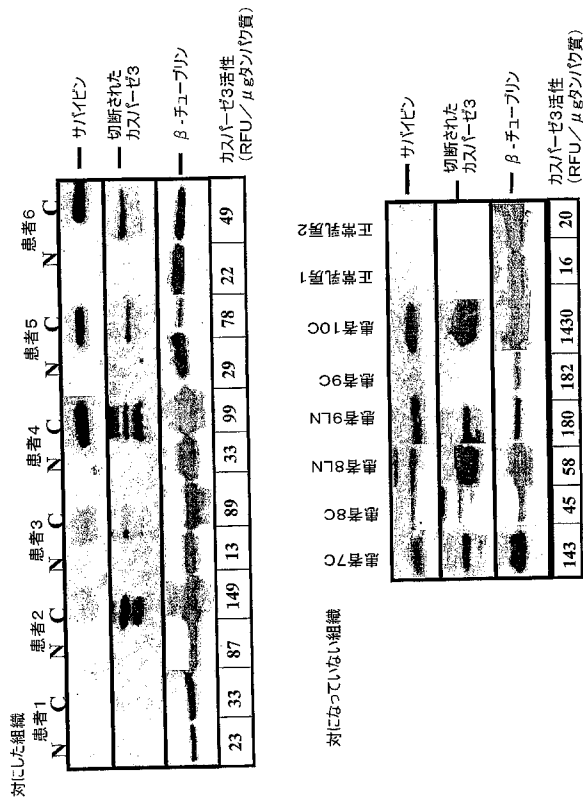


【 図 9 】



緑色で塗られたピーク: 無処理 (対照)、青色の点線: サバイピンMBのみ、赤色の線: サバイピンMB+SuperFect(R)

【 図 10 】



【配列表】

2006526390000001.app

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 21/78 (2006.01) G 0 1 N 21/78 C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, 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

(72)発明者 ヤング、リリー
 アメリカ合衆国 3 0 0 3 3 ジョージア州 ディケイター ウィロー コーブ 2 6 2 6

(72)発明者 バオ、ガン
 アメリカ合衆国 3 0 1 2 6 ジョージア州 メーブルトン バイニングス エステート ドライブ 6 6 3

(72)発明者 スタイリー、チャールズ
 アメリカ合衆国 3 0 3 1 9 ジョージア州 アトランタ クレストウィック ポイント 4 4 4 0

(72)発明者 コーエン、シンシア
 アメリカ合衆国 3 0 3 2 9 ジョージア州 アトランタ エヌイー キャロリン ドライブ 1 2 8 4

F ターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CB03 DA14 FB02
 2G054 AA07 CA22 CE02 EA03
 4B024 AA12 CA01 CA09 HA14
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QR32 QS34 QX02

专利名称(译)	检测正常细胞和癌细胞中基因表达的方法		
公开(公告)号	JP2006526390A	公开(公告)日	2006-11-24
申请号	JP2006500924	申请日	2004-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	埃默里大学		
申请(专利权)人(译)	埃默里大学		
[标]发明人	ヤングリリー バオガン ステイリーチャールズ コーエンシンシア		
发明人	ヤング、リリー バオ、ガン ステイリー、チャールズ コーエン、シンシア		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/48 G01N21/78 A61B A61B1/00 C07H21/00 G01N21/64		
CPC分类号	C12Q1/6818 C12Q1/6886 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/48.M G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/DA14 2G045/FB02 2G054/AA07 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	60/439771 2003-01-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了检测正常细胞或癌细胞中基因表达的方法。特别地，利用分子信标 (MB) 技术结合荧光成像技术来检测，鉴定或量化细胞样品中各种肿瘤标志物的存在或相同标志物的基因表达变化的方法提供。

遺伝子	MBの設計	蛍光染料の励起(Ex)および発光(Em)(色)
サバイビン	サバイビン mRNA (27 - 43 nt) 5'-Alexa Fluor 488- CTGAGAAAGGGCTGCCAGTCTCAG- ダブルシール -3' (配列番号2)	Ex 491 nm Em 515 nm (緑色)
サイクリンD1	サイクリンD1 MB1 mRNA (376-394nt) 5'-テキサスレッド- TGGAGTTGTCGGTGTAGACTCCA- ダブルシール -3' (配列番号3) サイクリンD1 MB2 mRNA (698-715 nt) 5'-テキサスレッド- CACTTGTACTCTGGACAAGTGTG- ダブルシール -3' (配列番号4)	Ex 596 nm Em 615nm (赤色)
Her-2/neu	Her-2/neu MB1 mRNA (エキソン2) 5'-Alexa Fluor 350-TAGAGGTGGCGGAGCATCTCTTA- ダブルシール -3' (配列番号5) Her-2/neu MB2 mRNA (エキソン3) 5'-Alexa Fluor 350-CAATCCGAGCCTCTGCGATTG- ダブルシール -3' (配列番号6)	Ex 346 nm Em 442 nm (青色)