

(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2012-517607

(P2012-517607A)

(43) 公表日 平成24年8月2日(2012.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 1
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62	V

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2011-550133 (P2011-550133)
 (86) (22) 出願日 平成22年2月12日 (2010.2.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年8月10日 (2011.8.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/000416
 (87) 国際公開番号 WO2010/096154
 (87) 国際公開日 平成22年8月26日 (2010.8.26)
 (31) 優先権主張番号 61/154,303
 (32) 優先日 平成21年2月20日 (2009.2.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511195633
 オンコノム, インコーポレイテッド
 ONCONOME, INC
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9805
 2 レッドモンド ノースイースト ナイ
 ンティースストリート 15385
 (74) 代理人 110000246
 特許業務法人OFH特許事務所
 (72) 発明者 エーダブリュ, エバ, アイウエイ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9805
 2 ショアライン ノース トゥーハンド
 レッドストリート 114
 Fターム(参考) 2G041 CA01 DA05 EA04 GA09 HA01
 LA07 LA08

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸癌の診断及び予後判定のための用具セット及び方法

(57) 【要約】

【課題】

本発明の一の実施形態では、大腸癌の存在を示す生物指標化合物(バイオマーカー、biomarker)及びその組み合わせを特定することにより大腸癌を発見する方法、及び用具セットを提供する。

【解決手段】

本発明の一実施形態は、被検体の大腸癌を検出する方法であって、該被検体から生体サンプルを取得する行程と、該生体サンプルに含まれる一つ又は複数のバイオマーカーを検出する行程と、前記生体サンプルにおける一つ又は複数のバイオマーカーの濃度及び/又は発現レベル(expression level)を、正常な対照サンプル(control sample)における一つ又は複数のバイオマーカーの濃度及び/又は発現レベルと比較する行程と、を有する方法である。

【選択図】 図 1 2

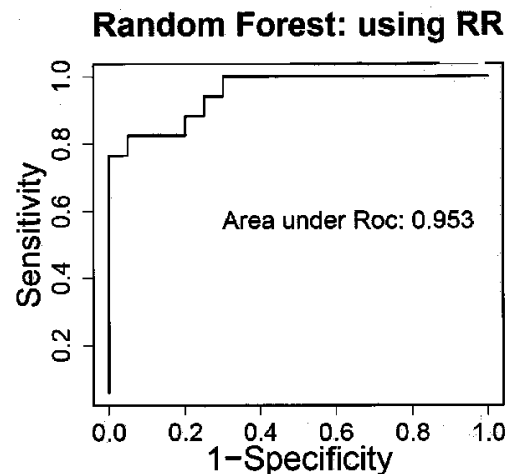


Figure 12

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体における大腸癌を検出する方法であって、
被検体から生体サンプルを採取する工程と、
前記生体サンプルについて、表 1 に示す一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルを測定する工程と、

前記一つ又は複数のバイオマーカについて測定された前記発現レベルを、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数のバイオマーカの対応する発現レベルと比較する工程と、

前記比較に基づき、前記被検体が大腸癌を持つ可能性を決定する工程と、
を有する方法。

10

【請求項 2】

前記生体サンプルは、全血、血漿、血清、組織サンプル、尿、細胞サンプル、及び癌サンプルの群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生体サンプルは血清である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

被検体から採取された一つ又は複数のバイオマーカの前記発現レベルは、正常な対照サンプルにおける発現レベルと比較した差異を有し、かつ、前記差異は、被検体における大腸癌の存在を示すものである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記差異は、正常な対照サンプルと比較して、被検体において増加し、少なくとも 1.05 倍より大きく、かつ、前記差異は、被検体における大腸癌の存在を示すものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記差異は、正常な対照サンプルと比較して、被検体において減少し、少なくとも 0.9 倍より少なく、かつ、前記差異は、被検体における大腸癌の存在を示すものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記一つ又は複数のバイオマーカはタンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記一つ又は複数のバイオマーカは、ORM1、GSN、補体 C2、補体 C9、PZP、CRP、CFHR1、CFHR2、SERPINA3、HABP2、CNDP1、CFHR2、SAA2、補体 C3 類似の LOC653879 (LOC653879 similar to Complement C3)、PROZ、PON3、RARRES2、GGH、PRG4、MCAM、及び FN1 から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記一つ又は複数のバイオマーカは、ORM1、GSN、C9、FN1、SERPINA3、PZP、C2、PROZ、PRG、及び SAA2 から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記差異は、質量分析法、免疫組織化学的方法、ELISA、又はウェスタン・ブロット法により測定される、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記差異は、相対的定量多重反応モニタリング (MRM-MS) -LC/MS/MS により測定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 12】

前記差異は、表 1 に示す一つ又は複数のバイオマーカから抽出されたペプチドに対応する安定同位体標識ペプチドを用いた、定量多重反応モニタリング (MRM-MS) -LC/MS/MS により測定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 13】

前記一つ又は複数のバイオマーカは核酸である、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 14】

生体サンプルにおける前記一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較する工程を更に含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度は、RT-PCRにより検出される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

生体サンプルに含まれる、表 1 にリストされた一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較することにより、大腸癌を検出するためのキットであって、バイオマーカに対し選択的に結合させる抗体又は抗体フラグメントと、使用説明書とを備えるキット。

10

【請求項 17】

生体サンプルに含まれる、一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較することにより、大腸癌を検出するためのキットであって、mRNA抽出バッファと、少なくとも一つの逆転写酵素と、表 1 にリストされたタンパク質バイオマーカの一つ又は複数のアミノ酸残基 (amino acid residues) を核酸配列にコードさせる少なくとも一組のプライマと、使用説明書とを備えるキット。

20

【請求項 18】

生体サンプルに含まれる、表 1 にリストされた一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較することにより、大腸癌を検出するためのキットであって、表 1 にリストされた一つ又は複数のバイオマーカから抽出されるペプチドに対応する同位体標識ペプチドと、内部標準物質と、一組の校正物質と、使用説明書とを備えるキット。

【請求項 19】

前記一つ又は複数のバイオマーカは更にCEAを含む、請求項 1 乃至 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記一つ又は複数のバイオマーカは、更にCEAと糖鎖抗原 19 - 9 とを含む、請求項 1 乃至 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、大腸癌を診断する方法に関し、特に、バイオマーカのパネル (panel) を用いて、生体サンプルから大腸癌を診断する方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

大腸癌 (colorectal cancer、CRC) は、米国社会に多く蔓延する第 3 位の悪性腫瘍であり、2005年には新たにおよそ145,000人が大腸癌と診断され、56,000人が死亡している。治療法が進歩しているとはいえ、その有効性に大きな進展はなく、特に、初期段階で診断を受けた患者が長く生存しているという事実から見ても、罹患率や死亡率を減少させる基本施策は早期診断である。癌の進行段階がステージIである患者の5年生存率は85%であるのに対し、ステージIIの患者では65~75%、ステージIIIの患者では35~50%である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 3 】

大腸癌についての最も一般的な非侵襲性試験は、便潜血検査 (fecal occult blood test、FOBT) である。都合の悪いことに、FOBTは、偽陽性となる確率が高いことに加え、全ての癌が出血するとは限らないことから、その感度 (診断における適中率) は約 50% 程度であり、初期の悪性腫瘍を検出できない場合がある。癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen: CEA)、糖鎖抗原 19-9、及び脂質関連シアル酸などの多くの血清マーカーも、大腸癌について研究されてきた。しかしながら、これらの血清マーカーは感度が低いことから、アメリカ臨床腫瘍学会 (American Society of Clinical Oncology) は、いずれの血清マーカーも大腸癌のスクリーニングや診断の用途には推奨できないとし、その使用は手術後の調査用途に限るべきとしている。結腸癌を検出するための最も信頼できる標準的方法として、結腸鏡検査やS状結腸鏡検査があるが、これらの侵襲性試験は、高価で、高度に訓練を受けた人員を必要とし、不快感があり、かつ、腸穿孔の発生リスクと死亡リスクを増大させる。また、内視鏡に対して通常行われる殺菌処理は、バクテリアや多くのウイルスに効果がある反面、プリオンに対しては効果がないことがあり、その結果、結腸鏡検査は、患者をプリオン病に晒してしまう可能性がある。上記の状況から、大腸癌についての新しいバイオマーカー試験や診断テストの実現が、今なお強く望まれている。大腸癌の治療は、その癌の進み具合に強く依存しているため、臨床医、研究者、及び様々な医療関係者、究極的には患者も含めた全ての人々が、大腸癌の進行段階特定のための診断ツールを探し求め続けているのである。

10

【 課題を解決するための手段 】

20

【 0 0 0 4 】

以下に示す詳細な説明は、添付図面に関連付けて理解することができる。

ただし、以下に示す詳細な説明は、本発明を例示するものであって、発明の内容を特定の実施例に限定することを意図したものではない。

【 0 0 0 5 】

本発明の実施形態について、まずその全体を概説した後、実験結果について説明する。以下の詳細説明の後に、配列リストを記載した2つの追加資料を付す。

【 0 0 0 6 】

タンパク質の特定及び定量化についての、質量分析法を基礎とする各種の手法により、複雑な生体サンプルについての包括的かつ大規模な比較プロテオーム解析が可能となっている。特に、多重反応モニタリング質量分析 (multiple-reaction-monitoring mass spectrometry、MRM-MS) は、最先端の質量分析法であり、複合生体混合物 (complex biological mixture) に含まれている特定のペプチドの同定と定量化を、非常に高感度かつ高速に実行することができる。このためMRM-MSは、候補マーカーに基づいて臨床試料のスクリーニングを短時間で大量に処理し得る手法として期待されている。MRM-MSは、製薬業における微小分子の検出手段として、あるいは、臨床研究室における薬物代謝物の分析手段として確立された手法である。疾患検出に用いることができると考えられるバイオマーカーが多量の場合には、ELISA等の従来の診断ツールは、高価な試薬を要しかつ処理時間が長いことから、一般的にはプロテオーム解析に用いるのは適当でない。可搬型装置によるMRM-MS分析は、安価でかつ短時間処理が可能となることから、臨床検査部門における次世代の分析プラットフォームとして魅力的な選択肢であり、大腸癌の進行段階特定を行う診断ツールを開発するための基盤として有望なものである。

30

40

【 0 0 0 7 】

本発明の一実施形態は、大腸癌に関連付けられた一群のバイオマーカーを特定することを、基礎の一部としている。これらのバイオマーカーのリストを、表1に示す。これらのバイオマーカーは、大腸癌患者の生体サンプルにおいては、正常な対照試料 (control sample。以下、「対照サンプル」と称する。) とは異なるレベルで存在する。したがって、本発明の一実施形態は、表1に示された少なくとも一つのバイオマーカーの量又はレベルを検出又は測定することにより種々の進行段階にある大腸癌の診断、予後判定、及びモニタリングを行う方法に関する。本発明の特定の実施形態では、表1に示されたバイオマーカーのうち

50

の、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ等々（少なくとも9乃至20、あるいはそれ以上の種類のバイオマーカを、任意の組み合わせで含むものとする）の種類のバイオマーカの存在、量、及び/又はレベルを測定する。本発明の他の実施形態では、癌胎児性抗原（CEA）、糖鎖抗原19-9などの、表1に示されていない追加のバイオマーカの量やレベルも測定され、本発明に係る更に別の実施形態では、これらの追加のバイオマーカが測定されて、異なる種類の癌や他の病変が検出される。

【0008】

「生体サンプル」という用語は、人間の患者から採取された何らかの生体サンプルを言い、組織サンプル、細胞サンプル、腫瘍サンプル、及び、血液、血清、血漿、又は尿などの生体液を含む。本発明の一実施形態では、生体サンプルは血清である。

10

【0009】

「バイオマーカ」とは、生体内の細胞又は組織により生成された分子であって、その存在、その発現レベル、あるいはその形態が、癌（例えば大腸癌）と関連付けられる。このような分子には、核酸、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、及び、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチドを含むタンパク質や、多糖体、脂質、あるいは種々の微小分子や作用基（functional group）を付加することによ修飾されたタンパク質が含まれる。

【0010】

〔診断方法〕

本発明の一実施形態では、被検体から採取した生体サンプルに含まれる、表1に示す一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルと、一つ又は複数の対照サンプルに含まれる上記一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルとの違いから、被検体における大腸癌の存在を検出する。一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルは、対照サンプルより生体サンプルにおいて大きい場合もあれば（即ち、発現上昇型バイオマーカ、up-regulated biomarker）、対照サンプルより生体サンプルにおいて小さい場合もある（即ち、発現低下型バイオマーカ、down-regulated biomarker）。発現上昇型バイオマーカの発現レベルをクラス分けする場合の閾値は、対照サンプルにおける発現レベルに対する固定の乗数とすることができ、その値は、バイオマーカの種類と診断対象である病変に依存して、約1.05～約50となる。同様に、発現低下型バイオマーカの発現レベルをクラス分けする場合の閾値は、対照サンプルにおける発現レベルに対する固定の乗数とすることができ、その値は、バイオマーカの種類と診断対象である病変に依存して、約0.9～約0.1以下となる。

20

30

【0011】

本発明の一実施形態は、ステージII及びステージIIIの大腸癌とステージIの大腸癌とを識別する方法である。この方法は、（1）大腸癌を持つ被検体からの生体サンプルにおける、表1に示す一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルを測定するステップと、（2）被検体の生体サンプルにおける一つ又は複数のバイオマーカの上記発現レベルを、対照サンプルにおける上記一つ又は複数のバイオマーカの発現レベル又は予め定めた値とを比較して、その被検体のサンプルにおける上記一つ又は複数のバイオマーカの発現変化の程度を特定するステップと、（3）ステップ（2）において特定した各バイオマーカの発現変化の程度を、ステージIの大腸癌について予め測定された参照値と比較するステップと、を有している。一つ又は複数の発現上昇型バイオマーカの発現変化の程度がステージIの大腸癌について予め測定された参照値よりも大きいとき、及び/又は、一つ又は複数の発現低下型バイオマーカの発現レベルの倍率変化がステージIの大腸癌について予め測定された参照値よりも小さい場合は、その被検体は、ステージII又はステージIIIの大腸癌を持つものと診断される。

40

【0012】

本発明の他の実施形態は、大腸癌の治療管理、大腸癌に対して行った治療法の有効性のモニタリング、及び、癌の治療確認に用いられる方法である。この方法は、（1）大腸癌を持つ被検体から採取した生体サンプルにおける、表1に示す一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルを繰り返し測定するステップと、（2）上記サンプルについての測定され

50

た一つ又は複数のバイオマーカの、上記発現レベルの各測定値を、対照サンプル群における上記一つ又は複数のバイオマーカの発現レベル、又は治療過程における一連の比較対照として予め測定された対照値 (control value) と比較するステップと、(3) 上記一つ又は複数のバイオマーカのそれぞれについて、上記一つ又は複数のバイオマーカの各発現レベルとそれらに対応する対照値との差異が減少したときは、その一つ又は複数のバイオマーカに関して治療は効果的であったものと判断するステップと、(4) 治療が効果的であったものとされたバイオマーカの数の、バイオマーカの総数に対する、割合を特定して、治療の総合的な有効性を決定するステップと、を有している。

【0013】

本発明の一実施形態は、生体サンプルにおけるバイオマーカの発現を検出することのできる、大腸癌診断キットである。例えば、このキットは、酵素免疫法 (ELISA)、放射免疫測定法 (radioimmunoassay、RIA)、及び/又は、免疫組織化学的試験 (immunohistochemical test) などの、抗体に基づく免疫測定法を実行するのに適した試薬を含むことができる。例えば、このキットは、表1にリストされた、一つ又は複数のバイオマーカであるタンパク質に固有の結合剤 (例えば、抗体) やフラグメントを含むことができる。さらにキットは、一つ又は二つの標準物質 (standard)、アッセイ希釈液 (assay diluent)、洗浄バッファ (wash buffer)、及び、マイクロタイタープレート (microtiter plate) のような固体支持体 (solid support) を含むことができる。本発明の他の実施形態では、キットには、表1に示す一つ又は複数のタンパク質バイオマーカをコードする核酸を測定するための、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse-transcription polymerase chain reaction、RT-PCR) 分析に適した試薬を含むことができる。例えば、そのキットには、生体サンプルからトータルRNAを分離する一つ又は複数の手段と、分離したトータルRNAからcDNAを生成する手段と、表1にリストされた一つ又は複数のタンパク質バイオマーカをコードする核酸を増幅するのに適したプライマーのいくつかのペアを含むことができる。

【0014】

〔バイオマーカを検出する方法〕

本発明の一実施形態である方法を用いて、一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルを公知の技術により測定することができる。以下に示すように、種々の技術を用いて、mRNA及び/又はタンパク質レベルのバイオマーカを検出することができる。質量分析法は、この分野では周知の技術であり、タンパク質などの生体分子の定量化及び/又は特定に用いられている。本発明の一実施形態では、タンデム質量分析 (MS/MS)、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC/MS/MS)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry、MALDI-TOF/MS)、表面増強レーザー脱離イオン化質量分析 (surface enhanced laser desorption ionization mass spectrometry、SELDI-MS) のような質量分析法と組み合わせられた、高圧液体クロマトグラフィー (high pressure liquid chromatograph、HPLC) やゲル電気泳動法などのクロマトグラフ技術を用いて、表1にリストされた一つ又は複数のマーカを検出することができる。本発明の一実施形態は、(1) 大腸癌を持っているか、又は持っている疑いのある被検体から採取した生体サンプルにおける、表1に示す一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルを測定するステップと、(2) 上記生体サンプルにおける上記バイオマーカの濃度及び/又は発現レベルを、これに対応する対照サンプル群における濃度及び/又は発現レベル若しくは予め測定された値と比較するステップと、を有する方法である。本発明の特定の実施形態では、検査された一つ又は複数のバイオマーカの被検体における発現レベルが、対照サンプルにおける発現レベルと比較して、発現上昇又は発現低下についての閾値より、それぞれ、大きいか又は小さい場合、若しくは、上記バイオマーカについて測定された濃度が、予め測定された所定値に対応する濃度閾値より大きいか又は小さい場合に、大腸癌が存在するものと判断される。しかしながら、調査された一つ又は複数のバイオマーカの発現レベル又は濃度を差分として表現することにより、大腸癌の存在を判断することもできる。

10

20

30

40

50

【0015】

本発明の一実施形態では、表1にリストされたバイオマーカを、MRM-MSを用いて特定し、分析し、定量化することができる。タンパク質バイオマーカから切り離された特定のトリプシンペプチドを、そのタンパク質バイオマーカの化学量論的な代表物として選択することができる。選択されたトリプシンペプチドの量は、そのタンパク質の濃度尺度を与える内部標準物質として安定同位体標識ペプチドを用い、当該安定同位体標識ペプチドに対する相対量として測定するか、又は、その発現レベルを対照サンプルと比較することにより相対量として測定することができる。一つの分析方法として、相対的定量MRM-MSを組み合わせたLC/MS/MSに基づく分析法を用いることができる。

【0016】

本発明の他の実施形態では、ウエスタンブロット法分析や酵素標識免疫測定法（enzyme-linked immunoabsorbent assay、ELISA）などの免疫学的方法を用いてバイオマーカのタンパク質を測定することにより、生体サンプルに含まれる当該バイオマーカを検出することができる。バイオマーカのタンパク質の測定には、種々の免疫学的測定法を用いることができる。表1に示す種々のバイオマーカについての固有の抗体は、標準的な技術を用いて容易に取得又は生成することができる。

【0017】

本発明の更に他の実施形態では、表1に示すタンパク質バイオマーカをコードする核酸（例えば、mRNA）を測定することにより、生体サンプルに含まれる上記バイオマーカを検出することができる。本発明の一実施形態では、生体サンプルからRNAが分離される。変性アガロースゲルの上でRNAを前処理し、前処理したRNAをニトロセルロースやナイロンメンブレン等の適切な支持体にトランスファ（transfer）してノーザンブロットティングを行うことにより、RNA転写物（RNA transcript）の検出を行うことができる。次に、上記前処理を行ったRNAに対し、放射標識されたcRNA又はRNAとのハイブリッド形成を行い（hybridize）、洗浄した後、オートラジオグラフィ（autoradiography）により分析を行う。RNA転写物の検出は、RT-PCRなどの様々な公知の増幅手法を用いても行うことができる。

【0018】

〔治療法のスクリーニング〕

バイオマーカの発現は、与えられた被検体におけるゲノムレベルの異常発現（例えば、遺伝子増幅）、転写レベルの異常発現（例えば、mRNA転写物生成の増加）、又はタンパク質レベルの異常発現（例えば、翻訳、翻訳後修飾など）のいずれかの結果と考えられる。増加方向に異常発現するバイオマーカは、それらの生物学的活性及び/又は生物学的発現を阻害する物質を使用して調整することができ、減少方向に異常発現するバイオマーカは、それらの生物学的活性又は生物学的発現を促進する物質を使用して調整することができる。このような物質は、大腸癌を持つ患者の治療に用いることができ、「治療薬」と呼ばれる。表1に示すバイオマーカと直接的又は間接的に相互作用することのできる物質は、酵母ツーハイブリッド（yeast-2-hybrid）法やファージディスプレイ（phage display）を含む、結合試験法（binding assay）などの様々な公知の方法を用いて特定することができる。本発明の一実施形態は、以下に示す表1にリストされた一つ又は複数のバイオマーカの異常発現に起因する大腸癌を治療するための治療薬をスクリーニングする方法を提供する。

【0019】

10

20

30

40

【表 1】

大腸癌を持つ被検体と正常な対照試料との間で異なる発現を示す、20種類のタンパク質バイオマーカのリスト

タンパク質名/遺伝子名	登録番号 スイスプロットの 遺伝子ID	発現型	p値
α -1-酸性糖タンパク質1 ORM1	P02673 5004	上昇	0.042
ゲルゾリン GSN	P06396 2934	低下	0.013

補体C2 C2	P06681 717	上昇	0.051
補体C9成分 C9	P02748 735	上昇	0.0082
妊娠帯タンパク質 PZP	P20742 5858	上昇	0.0094
C反応性タンパク質 CRP	P02741 1401	上昇	0.0382
補体H因子関連タンパク質1 CFHR1	Q03591 3078	上昇	0.0003
プラズマ・セリン・プロテアーゼ阻害剤 SERPINA3	P05154 5104	上昇	0.0108
ヒアルロン酸結合タンパク質2 HABP2	Q14520 3026	上昇	0.0111
Beta-Ala-His ペプチダーゼ阻害剤 CNDP1	Q96KN2 84735	低下	0.0032
補体H因子関連タンパク質2 CFHR2	P36980 3080	上昇	0.0019
血清アミロイドAタンパク質 SAA	P02735 6288,6289	上昇	0.0069
補体C3様遺伝子LOC653879 LOC653879	P01024 653879	上昇	0.0109
ビタミンK依存性タンパク質Z PROZ	P22891 8858	低下	0.0029
血清パラオキシナーゼ/ラクトナーゼ3 PON3	Q15166 5446	低下	0.0305
レチノイン酸受容体レスポンドタンパク質2 RARRES2	Q99969 5919	上昇	0.0023
ガンマ・グルタミンヒドラーゼ GGH	Q92820 8836	上昇	0.0041
プロテオグリカン4 PRG4	Q92954 10216	上昇	0.0202
細胞表面糖タンパク質MUC18 MCAM	P43121 4162	上昇	0.006
FN1 フィブロネクチンの8-イソ体 FN1	P02751 2335	上昇	0.024

10

20

30

40

【0020】

本発明は、表1にリストされたバイオマーカに限られるものではないと理解すべきである。大腸癌及び他の種類の癌、又は他の病変を検出するための、他のバイオマーカが見出される可能性がある。

【0021】

付録1：表1に示す20種のバイオマーカについてのアミノ酸配列を示す。

付録2：表1に示す20種のバイオマーカについてのヌクレオチド配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【0022】

50

【図 1】 14 個の血清試料の SDS-PAGE ゲルの画像を示す図である。

【図 2 A】 1 $\mu\text{g/ml}$ のウサギポリクローナル・アンチヒューマン・フィブロネクチン抗体を用いた、大腸癌を含む血清試料と正常な血清試料のウェスタン・ブロットを示す図である。

【図 2 B】 陰性標準試料として 1 $\mu\text{g/ml}$ のウサギ IgG1 アイソタイプ抗体を用いた、大腸癌を含む血清試料と正常な血清試料のウェスタン・ブロットを示す図である。

【図 3】 α -1-酸性糖タンパク質 1 (α -1-acid glycoprotein 1, ORM 1) ワーキングペプチド (working peptide) の、選択反応モニタリング質量分析 (selected-reaction-monitoring mass spectrometry, SRM-MS) における代表的なクロマトグラムを示す図である。

【図 4】 33 個の血清サンプルについての 3 つの ORM 1 ワーキングペプチドの、多重反応モニタリング質量分析 (multiple-reaction-monitoring mass spectrometry, MRM-MS) における代表的なペプチド傾向線を示す図である。

【図 5】 アミロイド A タンパク質 (SAA2)、ORM1、プラズマ・セリン・プロテアーゼ阻害剤 (SERPINA3)、及び C9 補体成分 (C9 complement component) の血清値を、癌の場合と正常な場合とについて比較するボックスプロット (箱ひげ図) を示す図である。

【図 6】 SERPINA3、ORM1、SAA2、及び C9 についての行列散布図である。

【図 7】 血漿サンプルと血清サンプルについての階層的クラスタ分析を示す図である。

【図 8】 C9 タンパク質の 3 つのトランジション・ペプチド (transition peptide) についての MRM-MS C9 傾向線を示す図である。

【図 9】 ランダム・フォレスト・モデル (random-forest model) を用いた場合の、48 個の血清サンプルセットについての受信者操作特性 (Receiver Operating Characteristic, ROC) 曲線を示す図である。

【図 10】 ブースティング法 (boosting method) により作成された、48 個の血清サンプルセットについての ROC 曲線を示す図である。

【図 11】 ランダム・フォレスト・モデルにより作成された、33 個の血清サンプルセットについての ROC 曲線を示す図である。

【図 12】 ランダム・フォレスト・モデルにより作成された、13 個の血清サンプルセットについての ROC 曲線を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

〔例〕

本発明は、ここに記載された例に限定されるものと解釈すべきではない。本発明の実施形態は、通常の知識を持つ当業者が有する技術の範囲内における、任意の及び全ての応用、及び、全ての等価な変形を含むものとする。

【0024】

1. 例 1: 大腸癌に関するバイオマーカーの特定: 発見段階]

〔血清サンプルの試験〕

大腸癌を持つ 8 個のサンプルと、年齢及び性別を対応させた 6 個の正常な対照サンプル 6 個とを含む、総数 14 個の血清サンプルを調査した: 8 個の大腸癌サンプルについての大腸癌の進行段階は、2 個がステージ I、2 個がステージ II、2 個がステージ III、2 個がステージ IV である。

【0025】

〔ゲル・エンハンスト (Gel-Enhanced) LC/MS/MS〕

MARS-7 スピнкаラム (アジレント社製) を用いて、各血清サンプルにつき 2 μL を用いて不要タンパク質の選択除去 (ディプリーション) を行い、除去後にタンパク質の量を測定した。SDS-PAGE ローディングバッファ (loading buffer) を用いて、各サンプルにつき 20 μg を可溶化した。4-12% Bis-Tris Novex ゲル (インビトロジェン社製) に、各サンプルを一つずつ浸み込ませた。図 1 は、14 個の血清サンプルの、SDS-PAGE ゲル画像である。101 ~ 114 の各レーンには、各血清サンプルを 20 μg ずつロードしている。ゲルは、クマシー染料 (SimplyBlue (登録商標)) を用いて着色した後、格子を使って 1 レーン

10

20

30

40

50

ずつ 24 個のバンド (帯) に分けた。

【 0 0 2 6 】

〔ゲル内消化 (In-gel digestion)〕

各バンドについて、ProQuestワークステーションを用いて、以下のようにトリプシン消化を行った。(1) DTTを用い 60 で各サンプルを還元し、室温まで冷却する。(2) 続いて、ヨードアセトアミドにより各サンプルをアルキル化し、37 のトリプシン存在下で 4 時間にわたって孵置する。(3) 次に、ギ酸を加えて反応を停止させる。

【 0 0 2 7 】

〔LC/MS/MS〕

Thermo LTQ Orbitrap XL を用いたnano LC/MS/MSにより、ゲル内消化物 (gel digests) を分析した。30 μ l の加水分解物質を、フローレート 10 μ L/min で 75 μ m C12 ペント付きカラムにロードし、300 nL/min の速さで溶出させた。1 時間グラジエント溶出 (one hour gradient) を行った。プロダクトイオンデータを、Mascot 検索エンジンを用いて IPI Human v3.38 データベースで検索した。Mascot 検索に使用したパラメータは、以下のとおりである。

【 0 0 2 8 】

検索の種類 (Type of search) : MS/MS イオンサーチ (Ion Search)、
 酵素 (Enzyme) : トリプシン (Trypsin)、
 固定修飾 (Fixed modifications) : カルバミドメチル (Carbamidomethyl) (C)、
 可変修飾 (Variable modifications) : 酸化 (Oxidation (M, Acetyl (N-term, Pyro -glu (N-term Q))、
 質量値 (Mass values) : モノアイソトピック (Monoisotopic)、
 タンパク質質量 (Protein Mass) : 無制限 (Unrestricted)、
 ペプチド質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : \pm 10 ppm (Orbitrap); \pm 2.0 Da (LTQ)、
 フラグメント質量許容差 (Fragment Mass Tolerance) : \pm 0.5 Da (LTQ)、
 切断ミス最大数 (Max Missed Cleavage) : 1。

【 0 0 2 9 】

誤り発見率 (false discovery rate) を評価して正しいタンパク質同定ができるように、Mascot 検索エンジンの出力ファイルを Scaffold プログラム (www.proteomesoftware.com) により分析し、レーン毎の非冗長リストを生成するための対照調査及びフィルタリングを行った。出力は、タンパク質毎のスペクトルカウント (spectral count) である。スペクトルカウントは、サンプル間における存在量の半定量的尺度をなす (semi-quantitative measure of abundance across samples)。スペクトルカウントは、合致したペプチドの数と、それらのペプチドが検出された回数を示している。

【 0 0 3 0 】

〔結果〕

全部で 435 種のタンパク質を特定した。ボックスプロットとスチューデント t 検定法を用いて、p 値 < 0.05 を持つ 42 種のタンパク質を特定した。さらに、S-plus 統計処理ソフトウェアによる探索的データ解析及び主成分分析を用いて、統計解析を行い、42 種のマーカについての、病変サンプルと正常サンプルの間における差異を調査した。これらのマーカの生物学的 / 臨床的な関連性についての主成分分析の結果から、表 1 にリストした 20 種のバイオマーカから成るセットが導き出された。例 2 において後述するように、MRM-MS 分析により、これらの 20 種のタンパク質の有効性を検証した。プロダクトイオン・スペクトラムの、断片化データ (fragmentation data) の特性に基づいて、10 種のタンパク質を選択した。

【 0 0 3 1 】

2. 例 2 : バイオマーカの免疫検出

表 1 にリストしたバイオマーカの発現を検証するため、ウェスタン免疫プロットを行った。ORM1、GSN、SAA、PROZ、PON3、MCAM1、PZP、及び FN1 に対する抗体は、サンタクルー

ズバイオテクノロジー社から取得した。発見段階で用いたサンプルから11個の血清サンプルを選択し、各血清サンプルの1 μ lの部分標本を、SDS-PAGEローディングバッファ内で可溶化し、4-12% Bis-Tris Novex ゲル (インヴィトロジェン社製) にロードした。これらのゲルを、120Vの電圧で60分間の電気泳動にかけ、Bio-Radセミドライ式電気プロット装置 (Bio-Rad semi-dry electroblotting unit) を90分間用いて、SDS-PAGEゲル内で分離した血清タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。プロット部分は、Starting Block (登録商標) ブロッキングバッファ (ピラス社製) によりブロックし、一次抗体と共に一晩、4 $^{\circ}$ Cの状態 で 孵 置 した 後、Tween 20を0.05%含むTBS (TBS-T) により10分洗浄を3回行った。次に、プロット部分を、二次抗体に結合させたホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase、HRP) と共に室温で1時間孵置した後、TBS-Tにより15分洗浄を4回行った。SuperSignal Substrate (ピラス社製) を用いて信号検出を行い、Kodak 2000 Image Stationを用いてプロットを画像化した。図2Aは、1 μ g/mlのウサギポリクローナル・アンチヒューマン・フィブロネクチン抗体を用いた、大腸癌を持つ血清試料と正常な血清試料のウェスタン・プロットを示す図、及び、図2Bは、陰性標準試料として1 μ g/mlのウサギIgG1アイソタイプ抗体を用いた、大腸癌を持つ血清試料と正常な血清試料のウェスタン・プロットを示す図である。図2A及び図2Bに示されたレーンの番号を、左から右に向かって1乃至11とする。一番左のレーン1はステージIの結腸癌サンプル、レーン2はレーン1及びレーン3と被験者の年齢及び性別を整合させた正常サンプル、レーン3はステージIIAの結腸癌サンプル、レーン4はレーン5と被験者の年齢及び性別を整合させた正常サンプル、レーン5はステージIIIAの結腸癌サンプル、レーン6はステージIIIBの結腸癌サンプル、レーン7はレーン6の被験者と年齢及び性別を整合させた正常サンプル、レーン8はステージIVの結腸癌サンプル、レーン9はレーン8の結腸癌サンプルの被験者と年齢及び性別を整合させた正常サンプル、レーン10はステージIの結腸癌サンプル、ステージ11はレーン10の結腸癌サンプルの被験者と年齢及び性別を整合させた正常サンプルを示している。各レーンには、1 μ lの血清サンプルがロードされている。

10

20

30

40

50

【0032】

3. 例3: MRM-MS分析の開発と検証: MRM-MSによるペプチドパネルの選択

表1にリストしたバイオマーカのペプチドは、MRM-MS分析手法におけるディスカバリーデータ (discovery data) から選択したものである。貯蔵しておいた病変サンプル及び正常サンプルについてのMRM-MS分析を行うことで容易に解析することのできるペプチドのパネル (panel) の範囲で、全てのタンパク質を個別に調査した。良好な結果を示したペプチドについては、最も量の多い二つのプロダクトイオンを見出すためのスキャンを1回だけ行うこととして、病変サンプル群及び正常サンプル群について再度分析を実施した。最も良好な結果を示すものとして選択された一つ又は複数のペプチドをそれぞれ含む10種のタンパク質を、多重測定に用いるMRM-MSパネルとして選択した。図3は、-1-酸性糖タンパク質1 (ORM1) ワーキング・ペプチド (working peptide) の、選択反応モニタリング質量分析 (SRM-MS) における代表的なクロマトグラムを示す図である。

【0033】

〔10多重 (10-plex) 相対的タンパク質MRM-MS分析〕

これらの10種のバイオマーカを用いる10多重 (10-plex) 相対的タンパク質分析法を開発した。10種のバイオマーカについてのMRM-MS分析に用いられた、トランジション・ペプチド (transition peptide) の配列 (sequence) の要約を、表3に示す。この分析手法の性能を評価するため、例1における正常サンプルを3つに分け、各サンプルについて前処理から質量分析までを行って解析し、本分析手法の再現性を評価した。

【0034】

〔ディプリション (Depletion) 〕

(1) 製造元から示された手順に従い、MARS7 スピンカラム (アジレント社製) を用いて、15 μ Lの血清について、不要タンパク質の選択除去を行った。(2) 続いて、5KDa MWCO スピンフィルターを用いて、サンプルのバッファを25mMの炭酸水素アンモニウムに置

換した。(3)次に、ブラッドフォード(Bradford)法によるタンパク質定量分析を行った

【0035】

〔溶液消化(Solution digestion)〕

サンプルのタンパク質消化を次のように行った:(1)DTTを用いて60で還元し、室温まで冷却。(2)ヨードアセトアミドによりアルキル化し、トリプシン存在下で3718時間の孵置。(3)ギ酸付加により反応停止の後、上澄みについての直接分析(direct analysis)。

【0036】

〔LC/MRM-MS〕

ペプチドの分離は、C12レジンを充填した内寸15cm×100µmのカラム(Jupiter Proteo、フェノメネックス社製)を用いて、一定流量800nm/Lにて、グラジエント条件下(under gradient condition)で分離した。グラジエント条件の概要を表2に示す。溶剤Aの成分は、0.1%のギ酸と0.1%のアセトニトリルとを含んだ水であり、溶剤Bの成分は、0.1%のギ酸を含むアセトニトリルである。サンプルは、捕獲法(trapping strategy)を用いてカラム上にロードした。注入量は30µLとし、各サンプルについてカラム内に500ngのペプチドが装填されるように実験を最適化した。注入から次の注入までの時間で測った全実行時間(runtime)は20分であった。

【0037】

〔表2〕

LC(液体クロマトグラフィ)における溶剤A及び溶剤Bを用いたグラジエント条件の概要

時間(分)	%溶剤A	%溶剤B
0.00	99	1
10.00	75	25
12.00	50	50
13.00	5	95
14.00	5	95
14.10	99	1
17.00	99	1

【0038】

サーモフィニガン(ThermoFinnigan)社製タンデム四重極(TSQ Ultra)質量分析計をSRMモードで用いて、ペプチドの検出を行った。質量計の設定は、スプレイ電圧2.2V、キャピラリー温度250である。Q1(hSRM)では分解能0.2 FWHM、Q3では分解能0.7 FWHMを用いた。衝突ガスは、圧力1.5 mTorrのアルゴンとした。SRMトランジション毎の滞留時間(dwelling time)は、10 msであった。MRM-MSによる実験は、すべて3回実行し、データは、LCQuanソフトウェア・パッケージ(サーモフィニガン社製)を用いて処理した。

【0039】

〔結果〕

10種の全タンパク質についての、各トランジション・ペプチド(transition peptide)の解析的相対標準偏差パーセント(percent analytical relative standard deviation、%RSD)及び技術的%RSDの要約を、表4に示す。トランジション・ペプチドでは、C2タンパク質を除き、解析的%RSD及び技術的%RSD共に低い値を示した(それぞれ、<10%及び<20%)。ここで、解析的%RSDとは、各サンプルからそれぞれ3回の注入を行って得られた相対標準偏差パーセントであり、技術的%RSDとは、各サンプルをそれぞれ3回処理し(ディプリーション3回、消化3回)、各処理毎に1回の注入を行って得られた相対標準偏差パーセントをいう。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

【 表 3 】

10種のタンパク質についてのトランジション・ペプチドの概要

タンパク質	トランジション・ペプチドの配列		
	ペプチド1	ペプチド2	ペプチド3
ORM1	SEQ ID NO 1: WFYIASAFR	SEQ ID NO 2: TEDTIFLR	SEQ ID NO 3: SDWYTDWK
GSN	SEQ ID NO 4: IFVWK	SEQ ID NO 5: QTQVSVLPEGETP LFK	SEQ ID NO 6: AGALNSNDAFV LK
C9	SEQ ID NO 7: YAFELK	SEQ ID NO 8: LSPIYNLVPVK	SEQ ID NO 9: AIEDYIEFSVR
FN1	SEQ ID NO 10: WLPSSSPVTGYR	SEQ ID NO 11: IYLYTLNDNAR	SEQ ID NO 12: SYTITGLQPGTD YK
SERPIN A3	SEQ ID NO 13: EQLSLLDR	SEQ ID NO 14: EIGELYLPK	SEQ ID NO 15: ITLLSALVETR

10

20

PZP	SEQ ID NO 16: ATVLNYLPK	SEQ ID NO 17: AVGYLITGYQR	
C2	SEQ ID NO 18: HAFILQDTK	SEQ ID NO 19: AVISPGFDVFAK	
PROZ	SEQ ID NO 20: GLLSGWAR		
PRG4	SEQ ID NO 21: AIGPSQHTIR		
SAA2	SEQ ID NO 22: SFFSFLGEAFDG AR		

30

【 0 0 4 1 】

【表 4】

10種のタンパク質の、一つのトランジション・ペプチドについての解析的%RSD及び技術的%RSDの概要

タンパク質	ペプチド1	
	解析的%RSD	技術的%RSD
ORM1	3%	8%
GSN	9%	15%
C9	7%	12%
FN1	1%	17%
SERPINA3	6%	11%
PZP	5%	18%
C2	16%	25%
PROZ	8%	12%
PRG4	3%	11%
SAA2	10%	24%

10

20

【0042】

選択されたトリプシンペプチドの量は、そのタンパク質の濃度尺度を与える内部標準物質として安定同位体標識ペプチドを用い、当該安定同位体標識ペプチドと比較した相対量として測定するか、又は、その発現レベルを対照サンプルと比較した相対量として測定することができる。

【0043】

4. 例4：33個の血清サンプル（第1回目の数量拡大サンプル）を用いて行った10種のバイオマーカについての有効性検証

30

結腸癌についての10種のタンパク質バイオマーカの相対的な発現レベルを、患者から採取した33個の血清サンプルにおいてモニタした。併せて、バイオマーカ発見に用いた13個のサンプルにおいても、上記バイオマーカの発現レベルをモニタした。この33個のサンプルセットは、年齢性別を整合させた18個の正常な血清サンプルと、15個の結腸癌を持つ血清サンプルとで構成されている。この15個の結腸癌の血清サンプルの、癌の進行段階は、4個がステージI、5個がステージII、8個がステージIII、1個がステージIVである。33個の血清サンプルは、同じ機関から同じ収集手順により集められたものである。例1で用いた最初の14個のサンプルのうちの、13個のサンプルについても、同じ分析手法により検査を行った。すべてのサンプルについて、等量のタンパク質を分析処理した。各サンプルの2つの分析用複製物（analytical replicates）からデータを収集して分析を行った。後述するデータ概要では、正常なサンプルグループについての各タンパク質の平均値に対する、特定の進行段階（ステージ）にある病変サンプル全体についての、当該タンパク質の平均値の比率を示す。図4は、33個の血清サンプルについての3つのORM1ワーキングペプチドの、選択反応モニタリング質量分析（SRM-MS）における代表的なペプチド傾向線を示す図である。サンプルID番号38715から38732までは、正常な被検体のサンプルであり、サンプルID番号38733から38750までは、結腸癌を持つ被検体のサンプルである

40

【0044】

〔サンプル前処理段階〕

サンプルの順番はランダムとし、同じグループからのサンプルが連続して処理されない

50

ようにした。サンプルの前処理は次のように行った：(1)ディブリーション、(2)例3と同様の溶液消化。ただし、サンプルは96個のウェル(well、窪み)を持つプレートに収容し、トリプシン存在下で一晩消化した。

【0045】

〔LC/MRM-MS〕

各サンプルに内部標準物質を加えた。その後、各サンプルを、例3に示した条件と同じLC/MRM-MS条件を用いて検査した。

【0046】

〔結果〕

【表5】

10

サンプル	ステージ1: 正常	p値	ステージ2: 正常	p値	ステージ3: 正常	p値	ステージ4: 正常	p値
SERPINA3	2.04	0.008151	3.74	0.000243	4.60	0.011396	1.79	NA
FN1	0.71	0.347941	0.59	0.125433	0.79	0.460251	0.45	NA
SAA2	6.43	0.006389	19.88	0.001009	14.24	0.012542	31.60	NA
PROZ	0.80	0.331598	0.69	0.186481	1.08	0.701716	0.61	NA
PZP	0.91	0.835463	1.73	0.088589	2.20	0.030897	0.85	NA
C9	1.61	0.026879	2.73	0.000015	2.91	0.000366	2.55	NA
PRG4	1.04	0.919156	1.65	0.182810	1.78	0.040367	1.34	NA
C2	1.12	0.805110	2.16	0.006040	1.55	0.130820	0.87	NA
GSN	0.55	0.022829	0.30	0.000224	0.83	0.447100	0.28	NA
ORM1	1.41	0.095748	3.24	0.000000	3.24	0.000054	2.37	NA

20

10種のバイオマーカーはすべて、発現が異なっていた。この血清サンプル群においては、10種のバイオマーカーのうち7つは、大腸癌の一つ又は複数のステージについて、p値0.05以下の範囲で癌グループと正常グループとで異なる発現を示すことが確認された。

【0047】

〔統計的分析〕

S-plus統計処理ソフトウェアを用いて、探索的データ解析、多変量解析、及び判別分析を行った。図5は、アミロイドAタンパク質(SAA2)、ORM1、プラズマ・セリン・プロテアーゼ阻害剤(SERPINA3)、及びC9補体成分の血清値を、癌の場合と正常な場合とについて比較するボックスプロット(箱ひげ図)を示す図である。図5では、x軸はスペクトルカウントを示し、y軸はサンプルのカテゴリ(癌及び正常)を示している。図6は、SERPINA3、ORM1、SAA2、及びC9についての行列散布図である。x軸及びy軸に沿って付されたラベルは、スペクトルカウントを示している。丸は対照サンプル群を示し、三角は癌サンプル群を示している。癌サンプルと対照サンプルの間には、両者を区分する空間が認められる。これは、癌状態と正常状態との間の差異が、これらの変数(即ち、バイオマーカー)の組み合わせに関連していることを示唆している。

30

【0048】

病的状態と正常状態とを分類するクラシファイヤ(classifier、分類手段)としてC9、ORM1、SAA2、及びSERPINA3の4つのマーカーを使い、これら複数のバイオマーカーの異なる組み合わせについて、多変量解析と判別解析を行った。17個の癌サンプルのうち16個のサンプルは、癌を持つものとして正しく分類され、15個の正常サンプルのうち15個のサンプルは正常なものとして正しく分類された。4つのマーカーを用いて解析を行ったときの、S-plus統計処理ソフトウェアの出力であるプラグイン分類表(plugin classification table)を表6に示す。

40

【0049】

【表 6】

	癌	正常	誤差	事後誤差
癌	16	1	0.0588235	0.00695156
正常	0	15	0.0000000	0.0653836
全体			0.0588235	0.0062816

【 0 0 5 0 】

判別解析では、病的状態と正常状態とを分類するクラシファイヤとしてC9、ORM1、SAA2、SERPINA3、PZP、PRG4、及びPROZの7つのマーカを用いた。17個の癌サンプルのうち16個のサンプルは、癌を持つものとして正しく分類され、15個の正常サンプルのうち15個のサンプルは正常なものとして正しく分類された。7つのマーカを用いて解析を行ったときの、S-plus統計処理ソフトウェアの出力であるプラグイン分類表 (plug-in classification table) を表7に示す。

【 0 0 5 1 】

【表 7】

	癌	正常	誤差	事後誤差
癌	16	1	0.0588235	0.0588235
正常	0	15	0.0000000	0.0663935
全体			0.0588235	0.0001280

【 0 0 5 2 】

病的状態と正常状態とを分類するクラシファイヤとしてC9、ORM1、SAA2、SERPINA3、PZP、PRG4、PROZ、及びGSNの8つのマーカを用い、異分散共変量構成 (heteroscedastic covariance structure) での判別解析を行った。17個の癌サンプルのうち17個のサンプルが、癌を持つものとして正しく分類され、15個の正常サンプルのうち15個のサンプルが正常なものとして正しく分類された。S-plus統計処理ソフトウェアの出力であるプラグイン分類表 (plug-in classification table) を表8に示す。

【 0 0 5 3 】

【表 8】

	癌	正常	誤差	事後誤差
癌	17	0	0	0.0e+000
正常	0	15	0	9.8e-006
全体			0	4.6e-006

【 0 0 5 4 】

複数のバイオマーカを使用すると、検査の適中率 (predictive value) が増加し、診断、患者の層別化、及び患者のモニタリングといった臨床用途での有用性が高まる。

【 0 0 5 5 】

5. 例 5 : 血漿サンプルセットにおける10種のバイオマーカの有効性検証

10多重相対的タンパク質MRM-MS分析を、血漿サンプルについてテストした。サンプルは全て治療前及び手術前に収集したものである。大腸癌を持つ5個の血漿サンプルと1個の正常なプール血漿サンプルとを、正常な血清サンプルと大腸癌を持つ血清サンプルと共に検査した。大腸癌を持つ上記5個の血漿サンプルは、1個のステージIの癌サンプルと、

2 個のステージIIの癌サンプルと、2 個のステージIIIの癌サンプルと、で構成されている。各サンプルを、例 3 に示したのと同じ手順により、LC/MRM-MS用に前処理を行って処理した。

【 0 0 5 6 】

〔 LC/MRM-MS 〕

各サンプルに内部標準物質を加えた。その後、例 3 に示した条件と同じLC/MRM-MS条件を用いて、各サンプルを検査した。

【 0 0 5 7 】

〔 結果 〕

PROG4を除く全てのバイオマーカが検出された。この血漿サンプル群においては、PZP_p ep2 (SEQ ID NO: 17) を除き、9 種のバイオマーカの全てのトランジション・ペプチド (transition peptide) が、癌サンプル群と正常サンプル群とで異なる発現を示すことが確認された。9 種のバイオマーカについての、各トランジション・ペプチドの変化の程度及び p 値を、表 9 にリストした。9 種のバイオマーカのトランジション・ペプチドは、C2_p ep1 (SEQ ID NO: 18)、SAA2 (SEQ ID NO: 22)、及びPROZ_pep1 (SEQ ID NO 20) を除き、p 値が全て0.05未満であった。図 7 は、血漿サンプルと血清サンプルの階層的クラスタ分析を示す図である。図 7 において、C-plasmaと書かれているのは、大腸癌を持つ血漿サンプルである。

10

【 0 0 5 8 】

【表9】

検出された9種のバイオマーカの、トランジション・ペプチドの倍率変化 (fold change) とp値

タンパク質 ペプチド	トランジション・ペプチド の配列	倍率変化 (癌:正常)	p値
C2_pep1	SEQ ID NO 18: HAFILQDTK	6.95	0.217062141
C2_pep2	SEQ ID NO 19: AVISPGFDVFAK	2.78	0.002870429
C9_pep1	SEQ ID NO 7: YAFELK	2.83	1.30572E-05
C9_pep2	SEQ ID NO 8: LSPIYNLVPVK	4.49	1.05609E-06
C9_pep3	SEQ ID NO 9: AIEDYIEFSVR	4.50	0.000124535
FN1_pep1	SEQ ID NO 10: WLPSSSPVTGYR	3.34	0.000265144
FN1_pep2	SEQ ID NO 11: IYLYTLNDNAR	3.22	0.000460216
FN1_pep3	SEQ ID NO 12: SYTITGLQPGETDYK	3.39	0.000148397
GSN_pep1	SEQ ID NO 4: IFVWK	1.71	0.021196134
GSN_pep2	SEQ ID NO 5: QTQVSVLPEGGETPLF K	2.46	0.00175376
GSN_pep3	SEQ ID NO 6: AGALNSNDAFVLK	1.63	0.041756746
ORM1_pep1	SEQ ID NO 1: WFYIASAFR	5.85	2.14067E-05
ORM1_pep2	SEQ ID NO 2: TEDTIFLR	4.13	0.000362804
ORM1_pep3	SEQ ID NO 3: SDWYTDWK	3.31	9.58596E-06
SAA2_pep1	SEQ ID NO 22: SFFSFLGEAFDGAR	1750.2	0.258875784
PZP_pep1	SEQ ID NO 16: ATVLNLYPK	2.09	0.090043107
PROZ_pep1	SEQ ID NO 20: GLLSGWAR	7.37	0.346022569
SERPINA3_pep 1	SEQ ID NO 13: EQLSLLDR	3.72	7.20014E-05

10

20

30

40

SERPINA3_pep 2	SEQ ID NO 14: EIGELYLPK	4.87	0.000202835
SERPINA3_pep 3	SEQ ID NO 15: ITLLSALVETR	4.27	0.001260361

【 0 0 5 9 】

6 . 例 6 : 4 8 個の血清サンプル (第 2 回目の数量拡大サンプル) を用いた、1 0 種のバイオマーカについての有効性検証

健康な人から採取したサンプルと癌患者から採取したサンプルとを含む 4 8 個の血清サンプルについての、1 0 種のタンパク質バイオマーカの相対量データを取得することにより、結腸癌に関するこれら 1 0 種のバイオマーカの相対的な発現レベルを更に確認して、有効性を検証した。この 4 8 個の血清サンプルは、例 4 で使用した 3 3 個の血清サンプルと同じ機関から収集したものである。4 8 個のサンプルのうち、2 4 個は結腸鏡検査で陰性を確認した健康な人から採取したサンプルであり、残りの 2 4 個は種々のステージにある大腸癌患者から採取したサンプルである。この 2 4 個の大腸癌サンプルには、ステージ I の患者からのサンプル 1 個と、ステージ II の患者からのサンプル 1 2 個と、ステージ III の患者からのサンプル 6 個と、ステージ IV の患者からのサンプル 5 個が含まれている。

10

【 0 0 6 0 】

〔 サンプル前処理段階 〕

サンプルの処理の順番はランダムとし、同じグループから採取したサンプルが連続して処理されないようにした。各サンプルにつき、3 回の重複処理を行った (同じサンプルについて、質量分析を 3 回行った) 。サンプルの準備は次のように行った : (1) ディプリーション、(2) 例 3 と同様の溶液消化。ただし、サンプルは 9 6 個のウェル (well、窪み) を持つプレートに収容し、トリプシン存在下で一晩消化した。

20

【 0 0 6 1 】

〔 LC/MRM-MS 〕

各サンプルに内部標準物質を加えた。その後、各サンプルを、例 3 に示した条件と同じ LC/MRM-MS 条件を用いて検査した。図 8 は、C9 タンパク質の 3 つのトランジション・ペプチドについての MRM-MS C9 傾向線を示す図である。

【 0 0 6 2 】

〔 結果 〕

これらのサンプルからは、1 0 種のタンパク質のうちの 8 種が検出された。PRG4 と SAA2 は検出されなかった。これらのタンパク質のうち、C9、FN1、GSN、及び SERPINA3 の 4 種 (1 0 種のペプチド) については、健康なグループと結腸癌を持つグループとを比較した場合の p 値は 0.05 未満であった。表 1 0 は、ステージ (進行段階) の異なる各癌グループについての p 値 (t 検定) を示している (ステージ II、ステージ III、及びステージ IV の癌グループを健康グループと比較した結果である) 。ステージ I の癌サンプルについては、数量が 1 個であったので p 値は示されていない。

30

【 0 0 6 3 】

【表 1 0】

タンパク質レベルでの結果:各グループから検出された8種のタンパク質についての、
対照グループと比較したp値

	C2	C9	FN1	GSN	ORM1	PROZ	PZP	SERPIN A3
ステージⅡ	0.797	0.054	0.001	0.264	0.682	0.241	0.657	0.121
ステージⅢ	0.455	0.006	0.004	0.029	0.242	0.757	0.443	0.041
ステージⅣ	0.694	0.409	0.529	0.170	0.283	0.279	0.556	0.006
全ての癌	0.825	0.020	0.001	0.022	0.493	0.891	0.526	0.016

10

【表 1 1】

ペプチドレベルでの結果:検出された8種のバイオマーカのトランジション・ペプチドの、
倍率変化とp値

タンパク質 ペプチド	トランジション・ペプチド の配列	倍率変化 (癌:正常)	p値
C2_pep1	SEQ ID NO 18: HAFILQDTK	1.06	0.54551
C2_pep2	SEQ ID NO 19: AVISPGFDVFAK	1.07	0.489746
C9_pep1	SEQ ID NO 7: YAFELK	1.65	0.000325
C9_pep2	SEQ ID NO 8: LSPIYNLVPVK	1.52	0.007926
C9_pep3	SEQ ID NO 9: AIEDYIEFSVR	1.65	0.010036

20

30

FN1_pep1	SEQ ID NO 10: WLPSSSPVTGYR	0.72	0.008734
FN1_pep2	SEQ ID NO 11: IYLYTLNDNAR	0.67	0.000948
GSN_pep1	SEQ ID NO 4: IFVWK	0.80	0.001601
GSN_pep2	SEQ ID NO 5: QTQVSVLPEGGETPLF K	0.80	0.140187
GSN_pep3	SEQ ID NO 6: AGALNSNDAFVLK	0.81	0.009414
ORM1_pep1	SEQ ID NO 1: WFYIASAFR	1.31	0.190992
ORM1_pep2	SEQ ID NO 2: TEDITFLR	1.10	0.493723
ORM1_pep3	SEQ ID NO 3: SDWYTDWK	1.22	0.222723
PROZ_pep1	SEQ ID NO 20: GLLSGWAR	1.00	0.982778
PZP_pep1	SEQ ID NO 16: ATVLNLYPK	1.10	0.212562
PZP_pep2	SEQ ID NO 17: AVGYLITGYQR	1.16	0.674164
SERPINA3_pep 1	SEQ ID NO 13: EQLSLDR	1.60	0.002006
SERPINA3_pep 2	SEQ ID NO 14: EIGELYLPK	1.50	0.006981
SERPINA3_pep 3	SEQ ID NO 15: ITLLSALVETR	1.58	0.005854

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

〔統計解析〕

表 9 に示すペプチドのうち、C2_pep1 (SEQ ID NO 18)、PROZ_pep1 (SEQ ID NO 20) 及び PZP_pep2 (SEQ ID NO 17) を除く 17 種のペプチドを使用して統計解析を行った。ランダム・フォレスト (Random Forest) 及びブースティング (Boosting) という 2 つの分類法を用いて受信者動作特性 (Receiver operating Characteristic、ROC) 曲線を作成し、結腸癌患者と対照被検体とを識別する際の、バイオマーカーの診断精度を評価した。この分析は、以下のように行った：(1) 48 個の血清サンプルを、32 個のサンプルから成るトレーニングセットと、16 個のサンプルから成るテストセットとに、ランダムに分割する；(2) 分割後に、トレーニングセットのデータを、ランダム・フォレスト・モデルとブースティング・モデルに適合させる。このテストデータセットについて上記モデルを評価し、変数重要度 (variable importance) と ROC 曲線下面積 (area under ROC curves) とを記録する；(3) 上記のランダムなサンプル分割を 100 回行って、ステップ (1) 及び (2) を 100 回繰り返す。100 回のランダム分割について、得られた結果を平均化した。図 9 は、ランダム・フォレスト・モデルを用いた場合の、48 個の血清サンプルセットについての受信者操作特性 (ROC) 曲線を示す図である。曲線下面積 (area under curve、AUC) は 0.868、標準偏差は 8.7% である。図 10 は、ブースティング法を用いた場合の、48 個の血清サンプルセットについての ROC 曲線を示す図である。曲線下面積 (AUC) は 0.901、標準偏差は 5.4% である。両手法による分析結果では、感度 (sensitivity) は 80%、特定性 (specificity) は 80% となった。

【0065】

図11は、ランダム・フォレスト・モデルにより作成された、33個の血清サンプルセットについてのROC曲線を示す図である。さらに、48個のサンプルセットをトレーニング・セットとして用いて、ランダム・フォレスト・モデルに基づく統計解析を行い、例4で使用した33個の血清モデルの検査を行った。図11に示すROC曲線が得られ、ALUは0.891であった。このROC曲線に基づく、特定性は90%、感度は85%となる。33個の血清サンプルセット、及び、例4で用いた13個の血清サンプルセットについても、ランダム・フォレスト法を用いた統計解析を行った。図12は、13個の血清サンプルセットについての、ランダム・フォレスト・モデルにより作成されたROC曲線を示す図である。図12に示すROC曲線は、33個の血清サンプルをトレーニング・セットとして用いて13個の血清サンプルを検査して得られたものである。ALUは0.953であり、この値は、感度が約83%、特定性が約95%であることを示している。

10

【0066】

7. 例7：絶対的定量MRM-MS分析法の開発

安定アイソトープ希釈質量分析 (stable isotope dilution mass spectrometry) を用いて、絶対的定量MRM-MS分析法を更に開発した。この分析法では、サンプル消化時に目標タンパク質をトリプシン消化 (trypsin digestion) することにより得られる“特徴”ペプチドを選択して、タンパク質の定量化を行う。これらの特徴ペプチドは、固有の配列を持ち (即ち、ゲノム内の他のタンパク質の中には存在しない)、そのタンパク質自身の、定量的、化学量論的な代理物として用いられる。この特徴ペプチドを合成し、安定同位体で標識して内部標準物として用いれば、標識された体外由来の特徴ペプチドからの信号と体内由来の標識されていない特徴ペプチドからの信号とを比較することにより、目標とするタンパク質の濃度を測定することができる。定量化に用いるペプチド標準物の性能を最適化すべく、表1に示す各タンパク質について、表3にリストしたトランジション・ペプチド以外のペプチドを特徴ペプチドの選択肢とし、これらのペプチドについて評価を行った。

20

【0067】

〔特徴ペプチドの選択と検出〕

各タンパク質についての特徴ペプチドの候補群を、そのペプチドが血清スペクトル・ライブラリに含まれているか否かに基づいて作成した。この血清スペクトル・ライブラリは、例1に示した発見実験の際に観測された全てのペプチドについての照合データであり、各ペプチドのサイズや、アミノ酸組成などの物理データが含まれている。

30

【0068】

6つの対照サンプルと6つの病変サンプルを用いて、対照プールと病変プールの2つのプールを作成した。特徴ペプチドの全ての候補を含む各タンパク質について、両サンプル群の分析を行った。Skylineプログラムを用いて、マスクロマトグラムを視覚的に調査した。次に示す一つ又は複数の基準に適合するものは特徴ペプチドの候補から除外した：(1) どちらのサンプル群においてもピークを示さないもの；(2) ピークは検出されたが、生成イオン比 (product ion ratio) が両サンプル群間で同様でないもの；(3) 干渉によるものと考えられる複数のピークが検出されたもの。対照プールからの3個のサンプルと病変プールからの3個のサンプルを3回に分けて準備し (varA、varB、varC)、分散検定も行った。次に、これら3個のサンプルのそれぞれについて、分析を3回行った。これらのサンプルには、以下のような処理を行っている：(1) ディブリーション、(2) 例3と同様の溶液消化 (但し、血清サンプルの量は15 µlではなく10 µlとした)。次に、例3と同様のLC/MRM-MS条件を用いて、サンプルを検査した。解析的分散 (analytical variance) と技術的分散 (technical variance) が20%より大きいペプチドを、候補から除外した。

40

【0069】

〔多重分析法の検証〕

選択したペプチドを用いて、多重分析法を構築した。選択した特徴ペプチドを用いるこ

50

の多重分析法を更に評価するため、分散検定とパイロット試験を行った。表 1 2 は、多重分析用に選択しパイロット試験に用いたペプチドのリストである。

【 0 0 7 0 】

【 表 1 2 】

多重分析用に選択された特徴ペプチドのリスト

タンパク質	選択した特徴ペプチドの配列		
ORM1	SEQ ID NO 1: WFYIASAFR	SEQ ID NO 2: TEDITFLR	SEQ ID NO 3: SDWYTDWK
	SEQ ID NO 23 YVGGQEHFAHLLIL R		
GSN	SEQ ID NO 4: IFVWK	SEQ ID NO 5: QTQVSVLPEGGETPL FK	SEQ ID NO 6: AGALNSNDAFVL K
	SEQ ID NO 24 HVVPNEVVQR	SEQ ID NO 25 SEDCFILDHGK	
C9	SEQ ID NO 8: LSPIYNLVPVK	SEQ ID NO 9: AIEDYIEFSVR	SEQ ID NO 26 SIEVFGQFNGK
	SEQ ID NO 27 TSNFNAISLK		
FN1	SEQ ID NO 10: WLPSSSPVTGYR	SEQ ID NO 11: IYLYTLNDNAR	SEQ ID NO 12: SYTITGLQPGTD YK
	SEQ ID NO 28 VTWAPPPSIDLTNF LVR		
SERPINA3	SEQ ID NO 13: EQLSLDR	SEQ ID NO 15: ITLLSALVETR	SEQ ID NO 29 ADLSGITGAR
	SEQ ID NO 30: AVLDVFEEGTEASA ATAVK		
PZP	SEQ ID NO 16: ATVLNYLPK	SEQ ID NO 17: AVGYLITGYQR	SEQ ID NO 31: SLFTDLVAEK
	SEQ ID NO 32: NQGNTWLTAFLK	SEQ ID NO 33: SSGSLLNNAIK	
C2	SEQ ID NO 18: HAFILQDTK	SEQ ID NO 19: AVISPGFDVFAK	SEQ ID NO 34: ECQGNVWSG TEPICR
	SEQ ID NO 35 EILNINQK	SEQ ID NO 36: DFHINLFR	

10

20

30

40

PROZ	SEQ ID NO 20: GLLSGWAR	SEQ ID NO 37: APDLQDLPWQVK	SEQ ID NO 38: ENFVLTTAK
	SEQ ID NO 39: YSLWFK		
PRG4	SEQ ID NO 40: ITEVWGIPSPIDTVF TR	SEQ ID NO 41: GFGGLTGQIVAALST AK	SEQ ID NO 42: IQYSPAR
	SEQ ID NO 43: DQYYNIDVPSR	SEQ ID NO 44: CFESFER	
SAA2	SEQ ID NO 22: SFFSFLGEAFDGR	SEQ ID NO 45: GPGGWAAEAISDAR	SEQ ID NO 46: FFGHGAEDSLA DQAANEWGR
CFHR2	SEQ ID NO 47: ITCAEEGWSPTPK	SEQ ID NO 48: GWSTPPK	SEQ ID NO 49: TGDIVEFVCK
	SEQ ID NO 50: LVYPSCEEK		
LOC65387 9	SEQ ID NO 51: IHWESASLLR	SEQ ID NO 52: NTLIYLDK	SEQ ID NO 53: VYAYYNLEESCT R
	SEQ ID NO 54: ACEPGVDYVYK	SEQ ID NO 55: TFISPIK	
HABP2	SEQ ID NO 56: FTCACPDQFK	SEQ ID NO 57: VVLGDQDLK	SEQ ID NO 58: LIANTLCNSR
	SEQ ID NO 59: FLNWIK		

10

20

30

40

【 0 0 7 1 】

〔分散検定〕

対照プールからの3個のサンプルと病変プールからの3個のサンプルとで構成される貯蔵サンプル (pooled sample) を3回に分けて前処理し、varA、varB、varCの3つのサンプル群を作成した。各サンプル群について3回の分析を行った。これらの3回の分析は、それぞれ異なる日に行った。サンプルは、以下のように処理した：(1) ディブリーション、(2) 例3と同様の溶液消化 (但し、血清サンプルの量は15 μ lではなく10 μ lとした)。各サンプルに、内部標準物質を加えた。次に、例3と同様のLC/MRM-MS条件を用いてサンプルを検査した。

【 0 0 7 2 】

〔パイロット試験〕

正常な血清サンプル6個と大腸癌を持つ血清サンプル6個 (このうち、2個がステージII、3個がステージIII、1個がステージIVである) から成る12個の血清サンプルについて、3回の試験を行った。表13は、多重分析法で検査された13種のタンパク質についての疾病対対照比率 (disease-to-control ratio) とp値である。表14は、多重分析法を用いて13種のタンパク質をペプチドレベルで検査したときの、選択されたペプチドについての病変対正常比率とp値である。

【 0 0 7 3 】

【表 1 3】

タンパク質レベルの、多重パイロット試験の結果：疾病対対照比率とp値

タンパク質	比率： 疾病/対照	p値
ORM1	3.12	0.0008
GSN	0.34	0.0001
C9	2.97	0.0001
FN1	0.33	0.0003
SERPINA3	2.84	0.000007
PZP	3.05	0.1086
C2	1.34	0.0541
PROZ	0.72	0.1664
PRG4	0.81	0.2014
SAA2	52.60	0.0066
CFHR2	0.68	0.0499
LOC65387	0.97	0.8451
HABP2	1.14	0.3621

10

20

30

【 0 0 7 4】

【表 1 4】

ペプチドレベルの、多重パイロット試験の結果：疾病対対照比率とp値

タンパク質	ペプチド	比率：	p値
-------	------	-----	----

		疾病/正常	
ORM1	SEQ ID NO 1: WFYIASAFR	2.50	0.0033156
ORM1	SEQ ID NO 2: TEDTIFLR	2.47	0.0003729
ORM1	SEQ ID NO 3: SDVVYTDWK	3.87	0.0000128
ORM1	SEQ ID NO 23 YVGGQEHFAHLLILR	3.86	0.0010666
GSN	SEQ ID NO 4: IFVWK	0.32	0.0000422
GSN	SEQ ID NO 5: QTQVSVLPEGGETPLFK	0.32	0.0000399
GSN	SEQ ID NO 6: AGALNSNDAFVLK	0.34	0.0000089
GSN	SEQ ID NO 24 HVPNEVVVQR	0.32	0.0000097
GSN	SEQ ID NO 25 SEDCFILDHGK	0.31	0.0000336
C9	SEQ ID NO 8: LSPIYNLVPVK	3.08	0.0000184
C9	SEQ ID NO 9: AIEDYIEFSVR	3.24	0.0001148
C9	SEQ ID NO 26 SIEVFGQFNGK	2.94	0.0000027
C9	SEQ ID NO 27 TSNFNAAISLK	2.79	0.0000551
FN1	SEQ ID NO 10: WLPSSSPVTGYR	0.28	0.0000131
FN1	SEQ ID NO 11: IYLYTLNDNAR	0.28	0.0000457
FN1	SEQ ID NO 12: SYTITGLQPGETDYK	0.30	0.0000578
FN1	SEQ ID NO 28 VTWAPPPSIDLTNFLVR	0.33	0.0010085

10

20

30

40

SERPINA3	SEQ ID NO 13: EQLSLLDR	3.24	0.0000512
SERPINA3	SEQ ID NO 15: ITLLSALVETR	2.94	0.0000022
SERPINA3	SEQ ID NO 29 ADLSGITGAR	3.10	0.0000062
SERPINA3	SEQ ID NO 30: AVLDVFEEGTEASAATAVK	2.61	0.0000085
PZP	SEQ ID NO 16: ATVLNYLPK	1.04	0.8121794
PZP	SEQ ID NO 17: AVGYLITGYQR	7.97	0.1318286
PZP	SEQ ID NO 31: SLFTDLVAEK	7.44	0.1350599
PZP	SEQ ID NO 32: NQGNTWLTAFVLK	1.07	0.7614844
PZP	SEQ ID NO 33: SSGSLNNAIK	1.00	0.9896744
C2	SEQ ID NO 18: HAFILQDTK	1.40	0.0324419
C2	SEQ ID NO 19: AVISPGFDVFAK	1.39	0.0104918
C2	SEQ ID NO 34: ECQNGVWSGTEPICR	1.23	0.1953067
C2	SEQ ID NO 35: EILNINQK	1.29	0.1055677
C2	SEQ ID NO 36: DFHINLFR	1.32	0.0238423
PROZ	SEQ ID NO 20: GLLSGWAR	0.79	0.3017053
PROZ	SEQ ID NO 39: YSLWFK	0.51	0.2008887
PRG4	SEQ ID NO 40: ITEVWGIPSPIDTVFTR	0.73	0.2066627
PRG4	SEQ ID NO 41:	0.75	0.1399844

10

20

30

40

	GFGGLTGQIVAALSTAK		
PRG4	SEQ ID NO 42: IQYSPAR	0.93	0.7253475
PRG4	SEQ ID NO 43: DQYYNIDVPSR	0.84	0.3454110
PRG4	SEQ ID NO 44: CFESFER	0.67	0.0228997
SAA2	SEQ ID NO 22: SFFSFLGEAFDGR	41.34	0.0017767
SAA2	SEQ ID NO 45: GPGGWAAEAISDAR	102.78	0.0095953
SAA2	SEQ ID NO 46: FFGHGAEDSLADQAANEWGR	57.81	0.0012913
CFHR2	SEQ ID NO 47: ITCAEEGWSPTPK	1.76	0.0268359
CFHR2	SEQ ID NO 48: GWSTPPK	0.28	0.0000001
CFHR2	SEQ ID NO 49: TGDIVEFVCK	1.30	0.3480817
CFHR2	SEQ ID NO 50: LVYPSCEEK	1.29	0.4772370
LOC653879	SEQ ID NO 51: IHWESASLLR	0.82	0.4210371
LOC653879	SEQ ID NO 52: NTLIYLDK	0.90	0.4952480
LOC653879	SEQ ID NO 53: VYAYYNLEESCTR	1.00	0.9992529
LOC653879	SEQ ID NO 54: ACEPGVDYVYK	0.96	0.7893764
LOC653879	SEQ ID NO 55: TFISPIK	0.87	0.4728866
HABP2	SEQ ID NO 56: FTCACPDQFK	1.01	0.9363291
HABP2	SEQ ID NO 57: VVLGDQDLK	1.10	0.5591393

10

20

30

40

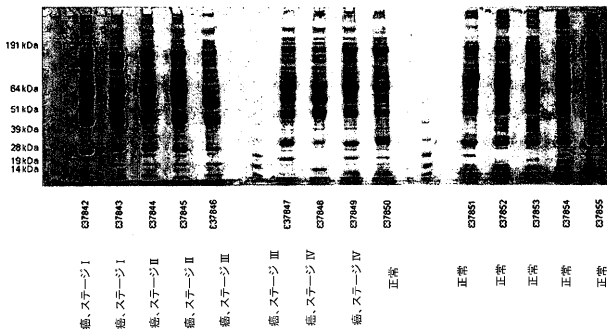
HABP2	SEQ ID NO 58: LIANTLCNSR	1.11	0.5277824
HABP2	SEQ ID NO 59: FLNWIK	1.20	0.1554325

10

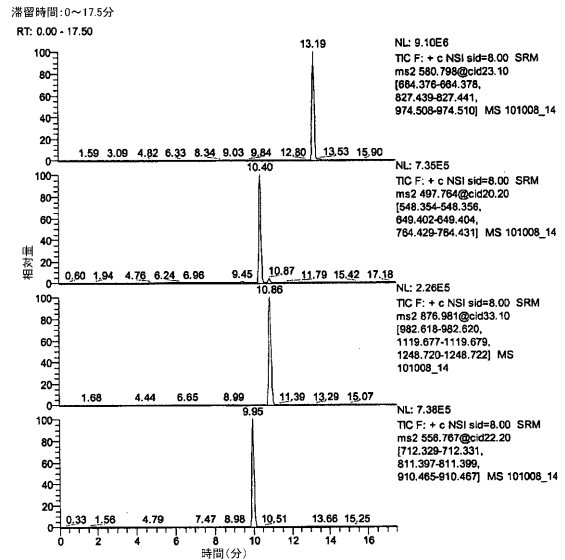
【 0 0 7 5 】

1 3 種のタンパク質のパネルのうち、ORM1、GSN、C9、FN1、SERPINA3、C2、PRG4、SAA2、及びCFHR2の9種のタンパク質は、一つ又は複数のペプチドにおいてp値が0.05未満である。表12に示すペプチドからSEQ ID NO 23、SEQ ID NO 5、SEQ ID NO 25、SEQ ID NO 28、SEQ ID NO31、SEQ ID NO 18、SEQ ID NO 34、SEQ ID NO 44、SEQ ID NO 48、及びSEQ ID NO 53を除いた46種のペプチドを、特徴ペプチドとして選択した。46種の軽いペプチドと、重同位体で標識された46種のペプチドとを含む92種のペプチドは、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック (Thermo-Fisher Scientific) 社から入手した。この重同位体は、C末端リシン (C-terminus lysine) 又はアルギニンに標識されている。

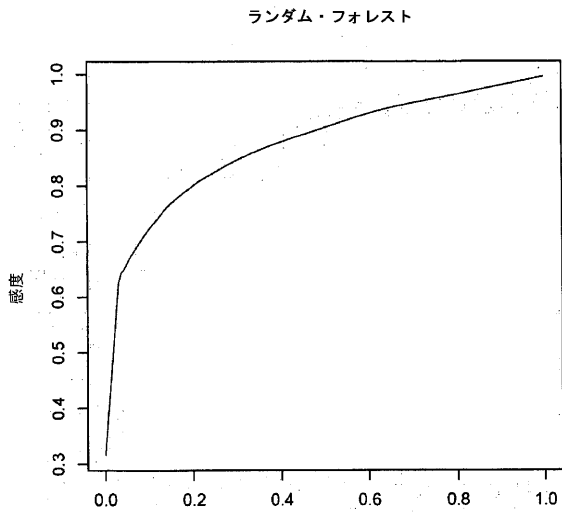
【 図 1 】



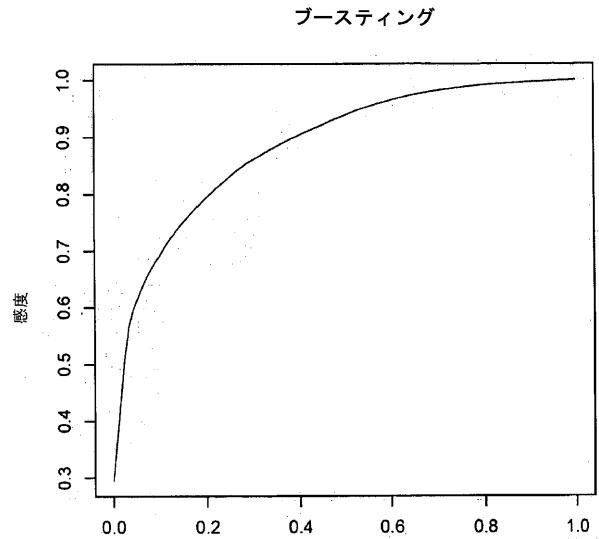
【 図 3 】



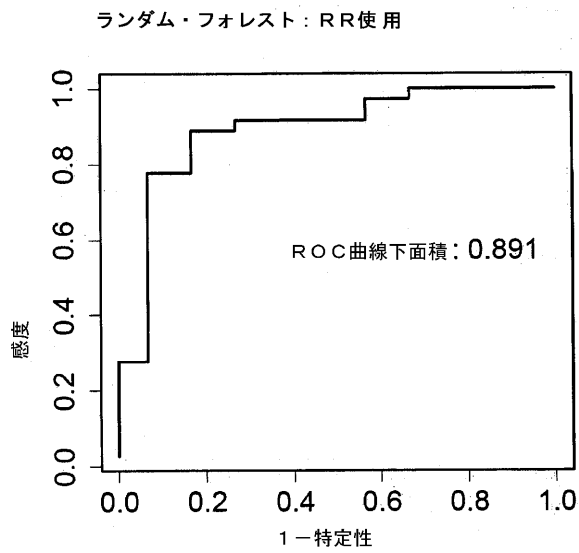
【図 9】



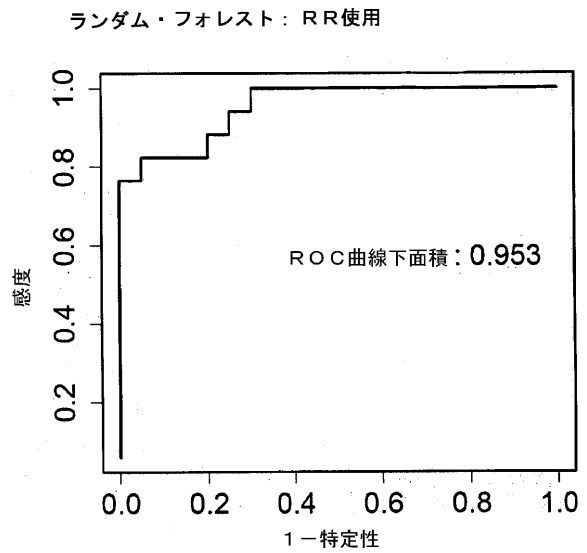
【図 10】



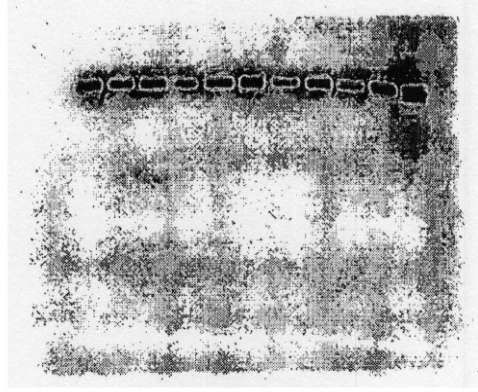
【図 11】



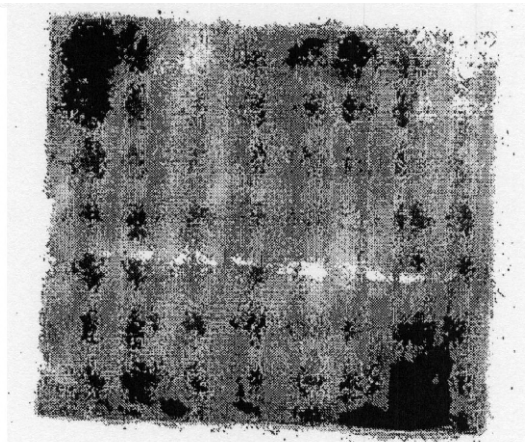
【図 12】



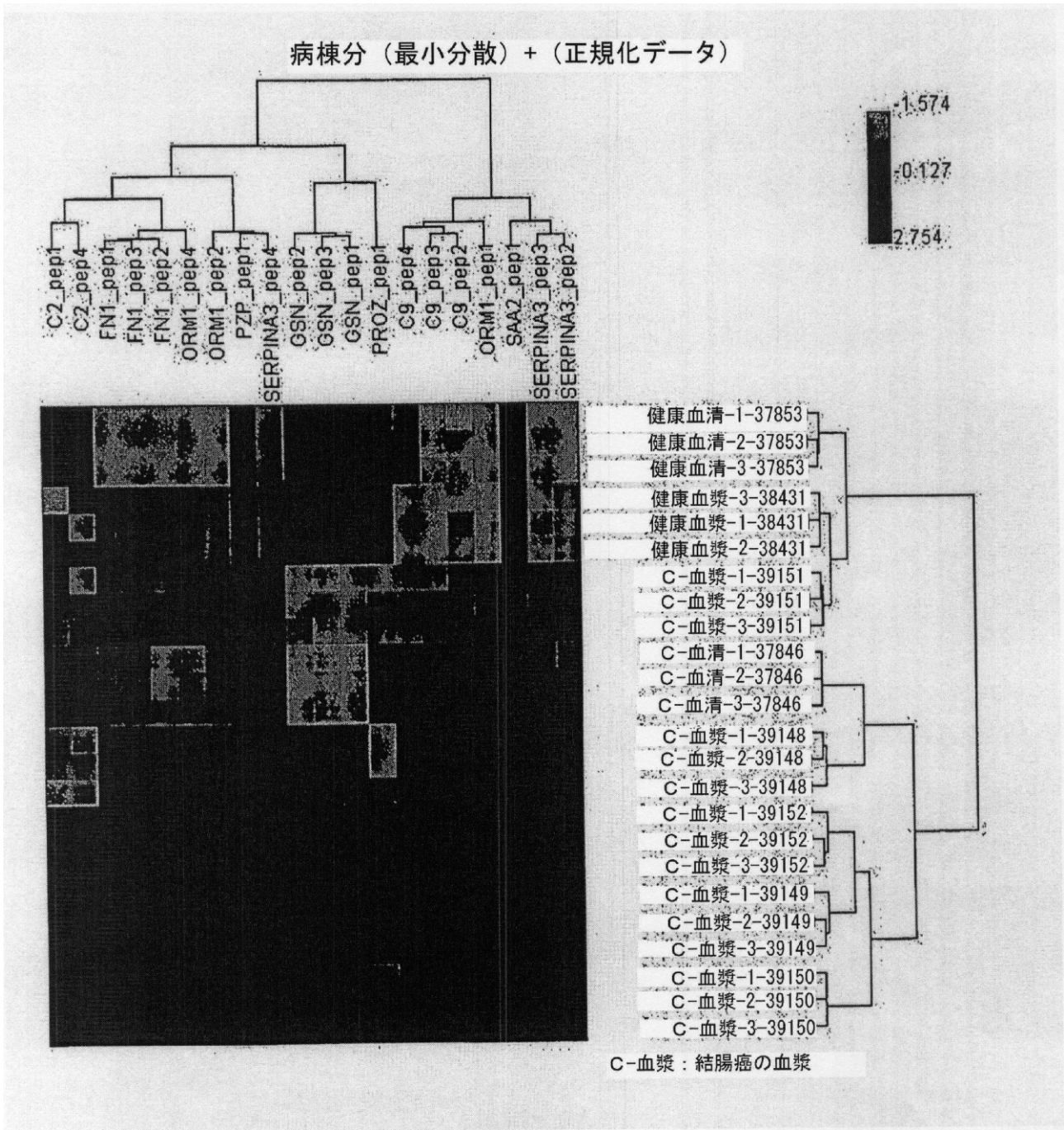
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【図7】



【配列表】

2012517607000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成23年8月11日(2011.8.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検体における大腸癌を検出する方法であって、
被検体から生体サンプルを採取する工程と、

前記生体サンプルについて、一つ又は複数のバイオマーカの発現レベルを測定する工程であって、前記一つ又は複数のバイオマーカは、 - 1 - 酸性糖タンパク質 1 (ORM1)、ゲルゾリン (GSN)、補体C2 (C2)、補体C9成分 (C9)、妊娠帯タンパク質 (PZP)、C反応性タンパク (CRP)、補体H因子関連タンパク質 1 (CFHR1)、プラズマ・セリン・プロテアーゼ阻害剤 (SERPINA3)、ヒアルロン酸結合タンパク質 2 (HABP2)、Beta-Ala-His ペプチダーゼ阻害剤 (CNDP1)、補体H因子関連タンパク質 2 (CFHR2)、血清アミロイドAタンパク質 (SAA)、補体C3様遺伝子LOC653879 (LOC653879)、ビタミンK依存性タンパク質Z (PROZ)、血清パラオキシナーゼ/ラクトナーゼ 3 (PON3)、レチノイン酸受容体レスポングタンパク質 2 (RARRES2)、ガンマ・グルタミルヒドラーゼ (GGH)、プロテオグリカン 4 (PRG4)、細胞表面糖タンパク質MUC18 (MCAM)、又はFN1フィブロネクチンの8-イソ体 (FN1) のいずれかである行程と、

前記一つ又は複数のバイオマーカについて測定された前記発現レベルを、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数のバイオマーカの対応する発現レベルと比較する工程と、

前記比較に基づき、前記被検体が大腸癌を持つ可能性を決定する工程と、
を有する方法。

【請求項 2】

前記生体サンプルは、全血、血漿、血清、組織サンプル、尿、細胞サンプル、及び癌サンプルの群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生体サンプルは血清である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

被検体から採取された一つ又は複数のバイオマーカの前記発現レベルは、正常な対照サンプルにおける発現レベルと比較した差異を有し、かつ、前記差異は、被検体における大腸癌の存在を示すものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記差異は、正常な対照サンプルと比較して、被検体において増加し、少なくとも1.05倍より大きく、かつ、前記差異は、被検体における大腸癌の存在を示すものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記差異は、正常な対照サンプルと比較して、被検体において減少し、少なくとも0.9倍より少なく、かつ、前記差異は、被検体における大腸癌の存在を示すものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記一つ又は複数のバイオマーカはタンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記一つ又は複数のバイオマーカは、ORM1、GSN、補体C2、補体C9、PZP、CRP、CFHR1、CFHR2、SERPINA3、HABP2、CNDP1、CFHR2、SAA2、補体C3類似のLOC653879 (LOC653879 similar to Complement C3)、PROZ、PON3、RARRES2、GGH、PRG4、MCAM、及びFN1から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記一つ又は複数のバイオマーカは、ORM1、GSN、C9、FN1、SERPINA3、PZP、C2、PROZ、PRG、及びSAA2から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記差異は、質量分析法、免疫組織化学的方法、ELISA、又はウェスタン・ブロット法により測定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 11】

前記差異は、相対的定量多重反応モニタリング (MRM-MS) -LC/MS/MSにより測定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 12】

前記差異は、表 1 に示す一つ又は複数のバイオマーカから抽出されたペプチドに対応する安定同位体標識ペプチドを用いた、定量多重反応モニタリング (MRM-MS) -LC/MS/MSにより測定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 13】

前記一つ又は複数のバイオマーカは核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

生体サンプルにおける前記一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較する工程を更に含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度は、RT-PCRにより検出される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

生体サンプルに含まれる、表 1 にリストされた一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較することにより、大腸癌を検出するためのキットであって、バイオマーカに対し選択的に結合させる抗体又は抗体フラグメントと、使用説明書とを備えるキット。

【請求項 17】

生体サンプルに含まれる、一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数の核酸バイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較することにより、大腸癌を検出するためのキットであって、mRNA抽出バッファと、少なくとも一つの逆転写酵素と、表 1 にリストされたタンパク質バイオマーカの一つ又は複数のアミノ酸残基 (amino acid residues) を核酸配列にコードさせる少なくとも一組のプライマと、使用説明書とを備えるキット。

【請求項 18】

生体サンプルに含まれる、表 1 にリストされた一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度を、正常な対照サンプルにおける前記一つ又は複数のバイオマーカの、存在又は不存在、若しくは総量又は濃度と比較することにより、大腸癌を検出するためのキットであって、表 1 にリストされた一つ又は複数のバイオマーカから抽出されるペプチドに対応する同位体標識ペプチドと、内部標準物質と、一組の校正物質と、使用説明書とを備えるキット。



【請求項 19】

前記一つ又は複数のバイオマーカは更にCEAを含む、請求項 1 乃至 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記一つ又は複数のバイオマーカは、更にCEAと糖鎖抗原 19 - 9 とを含む、請求項 1 乃至 20 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/000416
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'colorectal cancer, biomarker, expression, diagnosis, microarray, etc.'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Saito et al., "Gene profile analysis of colorectal cancer cell lines by cDNA macroarray" Oncol Rep, Vol. 17, No. 5, pp1061-1065, May 2007 - see the whole document, especially Abstract; Table III.	16-18
X	Gay et al., "In colon carcinogenesis, the cytoskeletal protein gelsolin is down-regulated during the transition from adenoma to carcinoma" Hum Pathol, Vol. 39, No. 10, pp1420-1430, 24 Jul 2008 (Epub) - see the whole document, especially Abstract; Figures 1-7.	16-18
X	Lee et al., "Induction of alpha1-acid glycoprotein mRNA by cytokines and differentiation in human colon carcinoma cell" Mol Cells, Vol. 11, No. 2, pp164-169, 30 Apr 2001 - see the whole document, especially Abstract; Figures 1-7.	16-18
X	Croce et al., "Alpha 1-acid glycoprotein(AGP): a possible carrier of sialyl lewis X (slewis X) antigen in colorectal carcinoma" Histol Histopathol, Vol. 20, No. 1, pp91-97, Jan 2005 - see the whole document, especially Abstract; Table 1; Figure 3.	16-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 OCTOBER 2010 (25.10.2010)		Date of mailing of the international search report 26 OCTOBER 2010 (26.10.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Lee, Jun Hyuk Telephone No. 82-42-481-8115 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/000416

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-15,19,20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-15, 19 and 20 are directed to a method for detecting colorectal cancer in a subject comprising 'obtaining a biological sample from a subject'. The method is thus considered a diagnostic method falling into the category of methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods [Article 17(2)(a)(i), Rule 39.1(v) PCT].
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See an Extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/000416

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kent et al., "The use of symptoms to predict colorectal cancer site. Can we reduce the pressure on our endoscopy services?" Colorectal Dis, Vol. 12, No. 2, pp114-118, 17 Jan 2009 Jan (Epub) - see the whole document, especially Abstract; Pages 116-117.	16-18
X	Koike et al., "Preoperative C-reactive protein as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer" J Surg Oncol, Vol. 98, No. 7, pp540-544, 01 Dec 2008 - see the whole document, especially Abstract; Table 1; Figure 1.	16-18
X	Gutfeld et al., "Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis" J Histochem Cytochem, Vol. 54, No. 1, pp63-73 22 Aug 2005 (Epub) - see the whole document, especially Abstract; Figures 1-3.	16-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/000416

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
None			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/000416

Continuation of Box No. III.

This ISA found at least 20 inventions in this application as follows:

-**Group 1:** Claims 16-18 are drawn to an invention featuring a kit for detecting colorectal cancer by comparing the presence or absence, or the amount or concentration, of ORM1 biomarker listed in table 1.

-**Groups 2-20:** Claims 16-18 are drawn to 19 inventions featuring a kit for detecting colorectal cancer by comparing the presence or absence, or the amount or concentration, of a biomarker selected from 19 biomarkers listed in table 1.

The single general concept linking Groups 1-20 together is merely 'detecting a biomarker for diagnosing colorectal cancer' This common concept is, however, described in 'US 2006/0200320 A1 (07 Sep 2006)' and, therefore, does not represent any contribution over the prior art.

Hence the inventions do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because the above mentioned common concept fails to make a contribution over the prior art within the meaning of PCT Rule 13.2.

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA14 DA36 FA36 FB01 FB03
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR01 QR32 QR35
QR55 QR62 QS25 QS32 QX01

专利名称(译)	结直肠癌诊断和预后的工具集和方法		
公开(公告)号	JP2012517607A	公开(公告)日	2012-08-02
申请号	JP2011550133	申请日	2010-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	ONCONOME		
申请(专利权)人(译)	Onkonomu公司		
[标]发明人	エーダブリュエバアイウエイ		
发明人	エーダブリュ,エバ,アイ-ウエイ		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/25 C12Q1/68 G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/57419		
FI分类号	G01N33/68 C12Q1/25 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA05 2G041/EA04 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/LA07 2G041/LA08 2G045/AA26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR01 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01		
优先权	61/154303 2009-02-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的某些实施方案提供了与结肠直肠癌的检测相关的方法和组合物，其基于生物标志物的鉴定和指示结肠直肠癌存在的生物标志物的组合。本发明的一个实施方案提供了通过从受试者获得生物样品来检测受试者中的结肠直肠癌的方法；检测样品中存在的一种或多种生物标志物；并且将生物样品中的一种或多种生物标志物的浓度和/或表达水平与正常对照样品中一种或多种生物标志物的浓度和/或表达水平进行比较。

