

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001 - 340081

(P2001 - 340081A)

(43)公開日 平成13年12月11日(2001.12.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/395	T 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 6 3
39/395		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 4
45/00		C 0 7 K 14/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 20数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 161930(P2000 - 161930)

(22)出願日 平成12年5月31日(2000.5.31)

(71)出願人 899000079
学校法人 慶應義塾
東京都港区三田2丁目15番45号
(72)発明者 河上 裕
神奈川県横浜市神奈川区片倉町757 - 120
(72)発明者 赤田 昌紀
東京都杉並区上井草3 - 16 - 27 - 301
(72)発明者 藤田 知信
東京都板橋区幸町9 - 3
(74)代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト膵癌抗原

(57)【要約】

【課題】 膵癌等の診断・治療に応用することができる膵癌抗原や、それをコードする遺伝子等を提供すること。

【解決手段】 膵癌細胞株から得られたmRNAを用いてRT - PCR法によりcDNAを作製し、このcDNAをλファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膵癌細胞cDNAライブラリー、合計 1.6×10^6 個のλファージcDNAクローンを、進行膵癌患者血清IgGを用いてスクリーニングすることにより、膵癌患者血清のみに反応し、健常人血清とは反応せず、膵癌細胞に選択的に発現する膵癌抗原KU - PAN - 1を単離する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする DNA。

(a)配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質

【請求項 2】 配列番号 8 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 3】 請求項 2 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 5】 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質。

【請求項 6】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド。

【請求項 7】 請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドと、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチド。

【請求項 8】 請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 9】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体。

【請求項 10】 請求項 8 又は 9 記載の抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチド。

【請求項 11】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 12】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損し又は前記遺伝子が過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 13】 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 12 記載の非ヒト動物。

【請求項 14】 被検物質と、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドとを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 15】 被検物質と、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

*【請求項 16】 請求項 14 又は 15 記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性促進物質。

【請求項 17】 請求項 14 又は 15 記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性抑制物質。

【請求項 18】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチド、又は請求項 8 若しくは 9 記載の抗体を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【請求項 19】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、又は請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチドとのインビトロ刺激により誘導された活性化 T 細胞。

【請求項 20】 請求項 4 又は 5 記載のタンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブ。

【請求項 21】 請求項 20 記載の癌の診断用プローブ及び／又は請求項 8 若しくは 9 記載の抗体を含有することを特徴とする癌の診断薬。

【請求項 22】 癌の診断薬が、膀胱癌、食道癌、大腸癌、乳癌から選ばれた 1 または 2 以上の癌の診断薬であることを特徴とする請求項 21 記載の癌の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、膀胱癌患者血清 IgG 抗体を用いて単離されたヒト膀胱癌抗原及びそれをコードする DNA、並びに膀胱癌抗原を用いた免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法、膀胱癌抗原を有効成分とする抗腫瘍剤、膀胱癌抗原をコードする DNA を用いる癌の診断用プローブ等に関する。

【0002】

【従来の技術】1995 年における本邦の膀胱癌による死亡数は 8965 名(14.7 人/10 万人)、女性 7054 名(11.1 人/10 万人)であり、男性の癌による死因の 5 位、女性の 7 位を占めている(厚生統計協会：国民衛生の動向、1997 年)。米国においても年間 25000 人が膀胱癌により死亡し、その数は増加傾向にある(CA Cancer J Clin 45, 8-30, 1995)。膀胱癌の 40% は局所進行型で治癒切除が困難であり、50% は遠隔転移を有している。このため術後 5 年の生存率は 18.2%、非手術例の 5 年の生存率は 2% と予後不良癌の代表とされている(斉藤洋一：膀胱癌全国登録調査報告 膀胱 11: 479-506, 1996)。膀胱癌に対する治療成績向上を目指し拡大郭清を伴う外科的切除術に加え、術中放射線療法、温熱療法、化学療法などの集学的治療が施行されているが、未だ満足する結果は得られていないため(松野正紀、砂村真琴、江川新一 膀胱癌の治療戦略 消化器癌 7: 197-203, 1997)、今までとは異なった概念に基づく治療の開発が期待されている。

*50 【0003】免疫療法は古くから次代の治療法としてさ

まざまな試みがなされてきたが、現在までのところ十分な効果を示すには至っていない。従来まで癌の免疫療法は非特異的免疫療法を中心として行われてきたが、本発明者らはメラノーマの腫瘍反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法により CD8 + T 細胞認識抗原を単離し (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3515-3519, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-6462, 1994, J. Exp. Med. 180, 347-352, 1994, J. Immunol. 154, 3961-3968, 1995, Immunologic Res. 16, 313-340, 1997)、この抗原を用いた特異的免疫療法により、一部のメラノーマに対して抗腫瘍効果が認められることを報告している (Microbiology Immunology 42, 803-813, 1998, Kawakami, Y., P.F. Robbins, R.F. Wang. et al. Identification of Melanoma antigens by T lymphocytes and their use in the immunotherapy of cancer. In Principle and Practice of Oncology. Update. V. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg eds. J.B. Lippincott Co. Philadelphia, p1-20, 1996, Nature Med. 4, 321, 1998)。腓癌においても特異的免疫療法の樹立とその標的となる癌抗原の同定が望まれているが、他の多くの癌と同様に腫瘍反応性 T 細胞の樹立は困難である。

【0004】一方、ドイツの Pfreundschuh, Oldらグループにより、担癌患者の腫瘍細胞の mRNA から作製した蛋白質を患者の自己血清でスクリーニングする SEREX 法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11810-11813, 1995) が報告されており、その他、メラノーマ、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌等において IgG 抗体が認識する癌抗原を、上記 SEREX 法により単離した報告もなされている (Int. J. Cancer 72, 965-971, 1997, Cancer Res. 58, 1034-1041, 1998, Int. J. Cancer 29, 652-658, 1998, Int. J. Oncol. 14, 703-708, 1999, Cancer Res. 56, 4766-4772, 1996, Hum. Mol. Genet 6, 33-39, 1997)。これらの抗原の中には CD8 + T 細胞に認識されるものも報告されており (J. Exp. Med. 187(2), 265-270, 1998)、SEREX 法により CD8 + T 細胞認識抗原が単離できる可能性が示されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌を治療できないのが現状である。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。本発明の課題は、腓癌等の診断・治療に応用することができるヒト腓癌抗原や、それをコードする遺伝子等を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

を解決するために鋭意研究し、腓癌細胞株から得られた mRNA を用いて RT-PCR 法により cDNA を作製し、この cDNA を λ ファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した腓癌細胞 cDNA ライブラリー、合計 1.6×10^6 個の λ ファージ cDNA クローンを、進行腓癌患者血清を用いて逐スクリーニングし、腓癌患者血清のみに反応し、健康人血清とは反応せず、腓癌を含む癌細胞に選択的に発現する腓癌抗原 KU-PAN-1 を見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA (a) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (b) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質 (請求項 1) や、配列番号 8 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA (請求項 2) や、請求項 2 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA (請求項 3) や、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (請求項 4) や、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質 (請求項 5) や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド (請求項 6) や、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドと、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質又は融合ペプチド (請求項 7) に関する。

【0008】また本発明は、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドに特異的に結合する抗体 (請求項 8) や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体 (請求項 9) や、請求項 8 又は 9 記載の抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチド (請求項 10) や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞 (請求項 11) や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損し又は前記遺伝子が過剰発現することを特徴とする非ヒト動物 (請求項 12) や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 12 記載の非ヒト動物 (請求項 13) に関する。

【0009】さらに本発明は、被検物質と、請求項 4 若しくは 5 記載のタンパク質又は請求項 6 記載のペプチドとを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法 (請求項 14)

や、被検物質と、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質を発

現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該タンパク質又はペプチドの免疫誘導活性を測定・評価することを特徴とする免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 15）や、請求項 14 又は 15 記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性促進物質（請求項 16）や、請求項 14 又は 15 記載のスクリーニング方法により得られる免疫誘導活性抑制物質（請求項 17）や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチド、又は請求項 8 若しくは 9 記載の抗体を有効成分として含有する抗腫瘍剤（請求項 18）や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質、請求項 6 記載のペプチド、又は請求項 10 記載のタンパク質若しくはペプチドとのインピトロ刺激により誘導された活性化 T 細胞（請求項 19）や、請求項 4 又は 5 記載のタンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブ（請求項 20）や、請求項 20 記載の癌の診断用プローブ及び／又は請求項 8 若しくは 9 記載の抗体を含有することを特徴とする癌の診断薬（請求項 21）や、癌の診断薬が、膵癌、食道癌、大腸癌、乳癌から選ばれた 1 または 2 以上の癌の診断薬であることを特徴とする請求項 21 記載の癌の診断薬（請求項 22）に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の対象となるタンパク質としては、配列表の配列番号 9 に示される膵癌抗原 KU-PAN-1 や、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質を例示することができ、ここで免疫誘導活性とは、抗体産生、細胞性免疫、免疫寛容等の免疫反応を誘導する活性をいい、かかる免疫誘導活性の中でも、末梢血の細胞障害性 T 細胞（CTL）前駆細胞の頻度を上昇させる T 細胞誘導活性を有するものが特に好ましい。また、本発明の対象となるペプチドとしては、上記タンパク質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドであれば特に制限されるものではないが、抗体の認識部位や、CD4+T 細胞及び／又は CD8+T 細胞の認識部位を構成するペプチドが好ましい。上記本発明の対象となるタンパク質及びペプチド、並びにこれらタンパク質及びペプチドに特異的に結合する抗体が特異的に結合する組換えタンパク質及びペプチドを総称して、以下「本膵癌抗原」ということがある。なお、本膵癌抗原の由来はヒトに限定されるものではない。

【0011】本発明の対象となる DNA としては、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 KU-PAN-1 をコードする DNA、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DN

A、配列番号 8 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部を含む DNA、あるいは該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA であれば特に制限されるものではないが、配列番号 8 に示される膵癌抗原 KU-PAN-1 をコードする cDNA をより具体的に例示することができる。かかる膵癌抗原 KU-PAN-1 をコードする cDNA の調製方法としては特に制限されるものではないが、例えば、膵癌細胞株から得られた mRNA を用いて RT-PCR 法により増幅した cDNA を λ ファージベクターに導入して大腸菌に感染させることによって作製した膵癌細胞 cDNA ライブラリーを、進行膵癌患者血清を用いてスクリーニングし、膵癌患者血清のみに反応し、健康人血清とは反応せず、膵癌を含む癌細胞に発現する本膵癌抗原をスクリーニングすることにより得ることができる。

【0012】また、配列番号 8 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、各種膵癌由来の DNA ライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズする DNA を単離することにより、膵癌抗原 KU-PAN-1 と同効な目的とする免疫誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA を得ることもできる。かかる DNA を取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42 でのハイブリダイゼーション、及び $1 \times \text{SSC}$ 、0.1% の SDS を含む緩衝液による 42 での洗浄処理を挙げることができ、65 でのハイブリダイゼーション、及び $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% の SDS を含む緩衝液による 65 での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0013】本発明の融合タンパク質や融合ペプチドとしては、本膵癌抗原とマーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体の Fc 領域、HRP、GFP などを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Myc タグ、His タグ、FLAG タグ、GST タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTA と His タグの親和性を利用した膵癌抗原 KU-PAN-1 等の精製や、T 細胞誘

導活性を有するタンパク質の検出や、膀胱癌抗原KU-PAN-1等に対する抗体の定量、膀胱癌の診断用マーカーなどとして、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0014】本発明の前記タンパク質やペプチドに特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記膀胱癌抗原KU-PAN-1等のタンパク質又はその一部を抗原として用いて常法により作製することができ、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体は、例えば、膀胱癌等の診断、ミサイル療法等の治療ばかりでなく、膀胱癌等の悪性腫瘍の発症機構を明らかにする上で有用である。

【0015】また、本発明の抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本膀胱癌抗原若しくはエピトープを含むその断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。

【0016】本発明の上記本膀胱癌抗原に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その本膀胱癌抗原を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本膀胱癌抗原やその抗原エピトープを含むペプチドに対する抗体は、膀胱癌等の診断や治療に使用できる可能性がある。そして、これら抗体が特異的に結合する組換えタンパク質又はペプチドも、前記のように本発明の本膀胱癌抗原に包含される。

【0017】本発明はまた、上記本膀胱癌抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる本膀胱癌抗原をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、

カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げることができる。

【0018】また、発現系としては、上記本膀胱癌抗原を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0019】上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる本膀胱癌抗原は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997)らの方法などを用いることができ、また、かかる本膀胱癌抗原を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、本膀胱癌抗原に対する抗体を結合させたカラムや、上記本膀胱癌抗原に通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、本膀胱癌抗原を得ることができる。

【0020】本発明において、上記本膀胱癌抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の本膀胱癌抗原をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性

化され、本腭癌抗原を発現する機能を失なった非ヒト動物をいい、また、本腭癌抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる本腭癌抗原を大量に産生する非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0021】ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、本腭癌抗原欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち本腭癌抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる本腭癌抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、本腭癌抗原のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

【0022】例えば、本腭癌抗原をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち本腭癌抗原ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、本腭癌抗原をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた本腭癌抗原をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの本腭癌抗原をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲティングベクターを作製する。

【0023】この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の本腭癌抗原ノックアウト

マウスを作製することができる。また、本腭癌抗原ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0024】本腭癌抗原のトランスジェニックマウスは、本腭癌抗原をコードするcDNAにチキンβ-アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビットβ-グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した本腭癌抗原をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0025】また、上記本腭癌抗原をコードする遺伝子若しくはDNA、本腭癌抗原、本腭癌抗原とマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質、本腭癌抗原に対する抗体、本腭癌抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞等は、以下に具体的に説明するように、腭癌、食道癌、大腸癌、乳癌等の治療や診断に有用であり、免疫誘導活性の促進又は抑制物質のスクリーニングに用いることができるばかりでなく、活性化T細胞(CD4抗原陽性T細胞、CD8抗原陽性T細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞、サプレッサーT細胞等の全てのT細胞を含む)の誘導等免疫応答のメカニズムの解明にも使用することができる。

【0026】本発明の免疫誘導活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法としては、被検物質と本腭癌抗原とを接触せしめ、該本腭癌抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法や、被検物質と本腭癌抗原を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該本腭癌抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法等を挙げることができる。上記細胞膜又は細胞としては、前記本腭癌抗原をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物又は野生型非ヒト動物などから得られる初代培養した細胞などの細胞や、本発明の本腭癌抗原を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、これら細胞の細胞膜などを具体的に例示することができ、かかる細胞膜又は細胞と被検物質との接触方法としては、被検物質の存在下に本腭癌抗原を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養する方法や、本腭癌抗原をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物に被検物質を投与する方法等を挙げることが

できる。

【0027】上記被検物質と本膵癌抗原とを用いたスクリーニング方法について、以下に具体的に例を挙げて説明するが、本発明のスクリーニング方法はこれらに限定されるものではない。上記被検物質と本膵癌抗原とを接触せしめ、該本膵癌抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、例えば、末梢血リンパ球から通常のインターロイキン-2を用いてインビトロで多量に増殖させた腫瘍浸潤T細胞の存在下に被検物質と本膵癌抗原とを接触せしめ、CTLなどのT細胞の誘導活性の増減を測定し、被検物質が非存在下の対照の場合と比較・評価する方法を具体的に例示することができる。また、上記被検物質と本膵癌抗原を発現している細胞膜又は細胞とを接触せしめ、該本膵癌抗原の免疫誘導活性を測定・評価する方法としては、本膵癌抗原発現細胞を被検物質の存在下で培養し、一定時間培養後細胞膜表面に発現された本膵癌抗原が減少又は増加したことを、本発明の本膵癌抗原に特異的に結合する抗体を用いて、ELISA等による免疫化学的に検出して、あるいはmRNAの発現が抑制又は促進したことを指標として評価する方法を具体的に例示することができる。上記mRNAの検出方法は、DNAチップ、ノーザンハイブリダイゼーション等の方法で行なうことができる他、本膵癌抗原をコードする遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をつないだ遺伝子を導入した細胞を用いると、被検物質による本膵癌抗原をコードする遺伝子の発現抑制又は促進は、前記レポーター遺伝子の活性を指標に検出することが可能である。

【0028】また本発明は、上記スクリーニング方法により得られる免疫誘導活性の促進を必要としている患者の治療等に用いられる免疫誘導活性促進物質や、免疫誘導活性の抑制を必要としている患者の治療等に用いられる免疫誘導活性抑制物質に関する。本発明はまた、本膵癌抗原又はこれに対する抗体を有効成分として含有する膵癌、食道癌、大腸癌、乳癌等に対する抗腫瘍剤に関する。例えば、本膵癌抗原を経口、静脈注射等により投与すると、インビボにおけるT細胞誘導活性が増大することによる抗腫瘍効果が期待できる。また上記抗体はミサイル療法に用いることができる。本発明はまた、本膵癌抗原とのインビトロ刺激により誘導された活性化T細胞に関する。例えば、末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球にIL-2とともに本膵癌抗原で刺激すると腫瘍反応性活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞は養子免疫療法に有効に用いることができる。

【0029】さらに本発明は、本膵癌抗原をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる癌の診断用プローブや、この癌の診断用プローブや本膵癌抗原に特異的に結合する抗体を含有する膵癌、食道癌、大腸癌、乳癌等の癌の診断薬に関する。上記診断用プローブとしては、本膵癌抗原をコードするDNA

(cDNA)又はRNA(cRNA)のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ(少なくとも20ベース以上)を有するものが好ましく、例えば、検体から得られた遺伝子と、本膵癌抗原をコードするDNA配列とを比較することにより、膵癌等の疾病の診断が可能となる。かかる検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げることができるがこれらに限定されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いてもよい。

【0030】

【実施例】以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[cDNAライブラリーの作製]文献(Tohoku J. exp. Med. 143, 33-46, 1984)記載の膵癌培養細胞株PK1、PK45及びPK59(東北大学の小針雅男博士から供与)をそれぞれ 1×10^8 になるまで培養した。培地としては、RPMI1640にを加え37℃、5%CO₂、湿度100%にて維持しているものを用いた。培養後、それぞれの細胞からグアニジン-塩化セシウム超遠心法によりRNAを抽出し、oligo(dT)を用いたポリ(A)セレクションにてmRNAを精製した。これら3つの培養細胞から得られたmRNAをそれぞれ0.5μgずつ混合し、ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用いて二本鎖cDNAを合成し、この二本鎖cDNAをλZAPIIベクターに挿入し、 3.0×10^6 個のクローンからなる膵癌λファージcDNAライブラリーを作製した。

【0031】[血清によるcDNAライブラリーのスクリーニング]上記作製したcDNAライブラリーを15cmNZYアガロースプレートに 1×10^4 クローンで播き、42℃で4時間培養して大腸菌(XL1-Blue)上に発現させた。この上にIPTGを吸収させたニトロセルロースフィルターをのせて37℃で4時間培養し、発現した融合蛋白質をニトロセルロースフィルターに移し、0.5%のTWIN20を含むTBS(10mMのTris-HCl、150mMのNaCl;pH7.5)でフィルターを洗浄することにより吸着したバクテリア、ファージを除去した後、5%の脱脂粉乳を含むTBSにて非特異反応を抑制した。このフィルターを100倍希釈した患者血清と室温で4時間反応させた。

【0032】上記患者血清としては、術前および術後の進行度評価ではpTMN分類においてステージIVを示し、採血時には補助化学療法及び放射線療法は行われておらず、感染性の疾患を認めない5人の膵癌患者[患者A(64才女性)、患者B(57才男性)、患者C(70才男性)、患者D(61才男性)、患者E(68才男性)]から採血したものをを用いた。これらの血清は-8

0 で保存し、使用直前に5容量%の脱脂粉乳を含むTBS (Tris-buffered saline) 溶液で100倍に最終的に希釈して用いた。この希釈した血清を、大腸菌のライセートと1:5の割合で混合し、4 で8時間放置後15000回転にて20分間遠心し上清を回収した。この上清に大腸菌とファージ由来の蛋白質を吸着させたニトロセルロースフィルター7枚を入れて8時間室温にて振盪し、上清中の非特異的な抗大腸菌抗体や抗ファージ抗体を吸着処理してから用いた。

【0033】かかる処理血清と上記融合蛋白質をブロットしたニトロセルロースフィルターとを室温で4時間反応させて血清中の抗体が反応したコロニーを、二次抗体として4000倍に希釈した抗ヒトIgG-Fc抗体 (anti human IgG Fc goat antibody alkaline phosphate conjugated CAPPEL) を用いて反応させ、Nitro blue tetrazolium (Boehringer) と5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl (SIGMA) による酵素発色反応により検出し、発色反

スクリーニング
グブランク数

患者	スクリーニング グブランク数	使用血清希釈倍率	陽性ブランク数	既知蛋白	未知蛋白
患者 A	293,000	1/1000, 1/200	0	0	0
患者 B	175,000	1/200	4	1	0
患者 C	186,000	1/200	2	2	0
患者 D	220,000	1/100	13	4	2
患者 E	522,000	1/100	28	6	5
合計	1,646,000	-	47	13	7

【0035】[単離抗原遺伝子の相同性検索] 上記得られた47個のファージからPCR法によりインサートDNAを増幅し、以後の解析に用いた。反応酵素にはExTaq (TAKARA) を用い、センスプライマーにT3 (5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'; 配列番号1)、アンチセンスプライマーにT7 (5'-GTAATACGACTCACA TAGGGC-3'; 配列番号2) を用いた。なお、反応条件は、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer) を用いて94 で1分間熱変性させ、55 で2分間アニーリングし、72 で2分間伸張反応させるというサイクルで35サイクル繰り返し行った。得られたPCR産物を、Big Dye DNA Sequencing Kit (ABI) とABI310オートシーケンサーとを用いてDNAシーケンスを行い、5'側の塩基配列を300~500bp程決定した。この結果19種類の異なった遺伝子が得られた。

*応陽性部位に一致するコロニーを15cmNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液 (100mMのNaCl、10mMのMgSO₄、50mMのTris-HCl、0.01%のgelatin; pH7.5) に溶解させた。発色反応陽性コロニーが単一化するまで上記と同様の方法で、2次、3次スクリーニングを繰り返し、血清中のIgGが反応するファージクローンを得た。5人の血清を用いて、合計で1.6×10⁶個のλファージクローンをスクリーニングした。結果を表1に示す。得られた47個の陽性クローンのうち、13個は膵癌患者Dから、28個は膵癌患者Eからのものであり、特定の患者血清に陽性クローンが集中する傾向が認められたが、この傾向は年齢や進行度とは無関係であることがわかった。

【0034】

【表1】

【0036】上記決定された19種類の遺伝子の塩基配列を、それぞれ相同性検索プログラムBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて遺伝子データベースで比較し、既知の遺伝子との相同性を検索した。結果を表2 (既知抗原遺伝子) 及び表3 (未知抗原遺伝子) に示す。19種類の遺伝子のうち、13種類は既知遺伝子と、6種類は機能不明遺伝子と相同性が認められたが、既知遺伝子のうちalpha 4 proteinには6個、DBI related proteinには4個、Human DNAJ proteinや M-phase phosphoproteinには3個の同一クローンが検出された。残りのクローンについてはそれぞれ1個のみ検出された。この中には癌遺伝子や癌抑制遺伝子は認められず、リボソーム蛋白が3種類認められた。

【0037】

【表2】

	Size (kb)	EST No.	Unigene No.	Identity	No. of isolated clones
PT14	0.7	AI131289	Hs.119500	Human acidic ribosomal phosphoprotein P2	1
PY3	2.5	AA304657	Hs.12469	PEPTIDIL-PROLYL-CIS-TRANS ISOMERASE A	1
PY39	1.3	AA098876	Hs.129849	PBK1 protein	1
PY9	2	H58562	Hs.151834	PINCH protein	1
PH1	2	AF069301	Hs.15250	DBI related protein	4
PY29	2		Hs.153766	NY-CO-33	1
PW4	1.5	Y10807	Hs.20521	Arginine Methyltransferase	1
PY19	3	-	-	M-phase phosphoprotein	1
PY43	1.5	Y08915	Hs.3631	alpha 4 protein	6
PT1		M34788	Hs.744	ferredoxin1	1
PT3	1	W46355			
PT8	0.8	AA621343	Hs.75447	Human RLIP76 protein	1
PW3	2	Z28407	Hs.75948	Human ribosomal protein L8	1
PT7	2.1	D13388	Hs.94	Human DNAJ protein	3

【0038】

* *【表3】

Clone	Size (kb)	EST No.	Unigene No.	Identity	cDNA sources	No. of isolated clones
P/Y7	1.5	AA165546	Hs.118741	EST	Eye, Muscle, Prostate, Germ cell, Ovary	1
P/Y2	2	AA777656				
P/Y36	2.2	AC004126	Hs.122555	EST (Human chromosome 11q)	Whole embryo	3
P/T13	0.8	AA350557	Hs.22199	EST	Infant brain	1
P/Y23	1.9	AA305109				
P/Y25	3.1	T31110	Hs.4900	H.sapiens Chromosome 16 BAC clone	Chromosome 16/18	3
P/T10	2.5	AA236619				
P/Y4	0.9	W07318	Hs.50735	EST	Lung	2
P/Y14	2.5	-	-	EST		1
P/Y34	2	-	-	no homology		1

【0039】上記6種類の機能不明遺伝子のうち5種類は米国国立生体工学情報センターのUniGeneによって統合整理され、Hs.118741、Hs.122555、Hs.22199、Hs.4900、Hs.7972の5種類の分子由来のものであると推定され、Hs.4900、Hs.122555にはそれぞれ3個の単離遺伝子が属していた。米国国立癌研究所Cancer Gene Anatomy Project (CGAP)のcDNAライブラリーデータベースを用いてcDNAが得られた由来組織を調べたところHs.122555は胎児組織のみに、Hs.118741は胚細胞、筋肉、卵巣癌、前立腺癌、胃癌などに、それ以外の遺伝子はさまざまな組織に由来する

ものであることがわかった。

【0040】[健常人血清及び膀胱癌患者血清中の各単離癌抗原に対するIgG抗体の検出]得られた上記各クローン[PT5 (DNAJ protein)、PT13 (EST)、PY2 (EST)、PY3 (CyclophilinA)、PY7 (EST)、PY14 (KU-PAN-1)、PY19 (M-phase phosphoprotein)、PY23 (EST)、PY34 (KIAA0871)]とインサートが入っていない陰性コントロールファージとを1:5の割合で発現するようにそれぞれを混合し、9cmNZYアガロースプレートに 5×10^2 クローンで播き、健常人及び膀胱癌患者の100倍に希釈した血清でスクリーニングを行った。健常人血清は、採血

時に健康体であり手術歴、自己免疫疾患の既往を有しない平均年齢27.8才の16人のボランティアから採血した。膀胱癌患者では、スクリーニングに使用した血清も含めて13例の血清を使用した。結果を表4に示す。この結果から、M-phase phosphoproteinは膀胱癌患者のみならず、健康人の血清においても抗体が検出されたが、それ以外の8種類の遺伝子は健康人血清とは反応せず、膀胱癌患者血清のみに反応していた。

【0041】

【表4】

	膀胱癌患者血清													合計 (n=13)	健康人血清 (n=16)
	患者A	患者B	患者C	患者D	患者E	患者F	患者G	患者H	患者I	患者J	患者K	患者L	患者M		
PT5 DNAJ Protein	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
PT10 EST	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2	0
PT13 EST	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	3	0
PY2 EST	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2	0
PY3 Cyclophirina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2	0
PY7 EST	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1	0
PY14 (no homology)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1	0
PY19 Mphase phosphoprotein	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2	2
PY23 EST	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1	0
PY34 (no homology)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2	0
陽性クローン数	0	0	0	4	0	0	8	0	2	2	0	0	1		

*cDNAクローニングに使用した血清

【0042】[単離癌抗原のmRNA発現を検出するためのRT-PCR法]次にクローンPY3、PY7、PY2、PT13、PY23、PY19、PY14及びPY34の遺伝子の各組織における発現特異性をRT-PCR法により調べてみた。正常組織由来のRNA(全てクローンテック社製より購入)、及び培養した線維芽細胞、EBウイルス感染B細胞、腫瘍浸潤T細胞、培養腫瘍細胞のRNAを各5μgずつ使用し、逆転写酵素AMV RTase XL(TAKARA)と、プライマーとしてオリゴ(dT)を用いてcDNAのパネルを作製し、得られたクローンの塩基配列より200~400bpのPCR産物が出来るように特異的なPCRプライマーを設計し、反応酵素にExTaq(TAKARA)を使用し、サーマルサイクラー(Perkin-Elmer)を用いて94で30秒間熱変性させ、72で1分間伸張反応させるというサイクルで35サイクル繰り返し行った。アニーリング温度はプライマーのTm値に合わせて設定した。このPCR産物をアガロースゲル電気泳動(1.5%)にかけ、エチジウムブロマイド(EtBr)で染色し、254nmの紫外線照射によりバンドを検出した。

【0043】この実験において発現差が認められたPY14クローン(KU-PAN-1)に対しては使用するパネルを増やし、再びRT-PCRを行った。使用したパネルは、脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、小腸、骨格筋、肺、精巣、胎盤、胃、大腸、膀胱の正常組織13種(全てクローンテック社製より購入)と、線維芽細胞、EBウイルス感染B細胞、腫瘍浸潤T細胞の正常培養細胞3種と、PK1、PK8、PK9、PK45P、PK59(膀胱癌)、Skme123、888me1(悪性黒色腫)、TE8(食道癌)、K1S(肺腺癌)、EBC1(肺扁平上皮癌)、HL60(急性骨髄性白血病)、K562(慢性骨髄性白血病)、MDA231(乳癌)、DLD1(大腸癌)、KU7、BC47(膀

胱癌)、PC3(前立腺癌)、RCCS(腎癌)の腫瘍培養細胞18種の合計34種を用いた。

【0044】PY14(KU-PAN-1)には、センスプライマーとして(5'-TGCCCAGCCAGAGATACAACCACAAG-3';配列番号3)を、アンチセンスプライマーとして(5'-CTGGCTAGGAGATGGCTTGGATTTGG-3';配列番号4)を作製し、熱変性94で30秒間、アニーリング62で30秒間、伸長反応72で1分間の条件で25サイクルのPCRを行った。コントロールとしてβアクチン(838bp)の発現を確認するため、βアクチンに特異的なセンスプライマー(5'-ATCTGGCACCCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3';配列番号5)とアンチセンスプライマー(5'-CGTTCATACTCCTGCTTGGCTGATCCACATCTGC-3';配列番号6)を用いて、熱変性94で30秒間、アニーリング68で2分間、伸長反応72で2分間の条件で25サイクルのPCRを行った。これらのPCRにより得られたPCR産物(cDNA)をアガロースゲル電気泳動(3%)にかけ、エチジウムブロマイド(EtBr)で染色し254nmの紫外線照射によりバンドを検出した。結果を図1(PY14)に示す。

【0045】図1の結果から、KU-PAN-1は25サイクルのPCR反応において正常精巣、PK1、PK59(膀胱癌)、TE8(食道癌)、U-87MO(脳腫瘍)、KIS(肺癌)、MDA231(乳癌)、DLD1(大腸癌)に発現が認められた。

【0046】[単離癌抗原のmRNA発現を検出するためのノーザンブロット法]正常組織(脳、胃、肺、脾臓、腎臓、小腸、膀胱、胎盤、精巣)由来のRNA9種、膀胱癌(KI、SA、SU、K1M、K2F)組織より抽出したRNA5種、膀胱癌培養株(PK1、PK8、

PK9、PK45P、PK59、PC135、PC165、Miapaka2、Panc1、Aspc1)より抽出したRNA10種、他の癌細胞株DLD1(大腸癌)、U87-MO(脳腫瘍)、MDA231(乳癌)、HL60(急性骨髄性白血病)、K562(慢性骨髄性白血病)及びTE8(食道癌)由来のRNA6種の計30種のRNAでKU-PAN-1に対するノーザンブロットを行った。RNA(各11 μ g)を、ホルムアミド及びホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランフィルター(Hybond XL, 10 Amersham)に移した。

【0047】次にKU-PAN-1に特異的なセンスプライマー(KU-PAN-1の遺伝子の618番目から643番目までの塩基配列:5'-TGCCCCAGCCAGAGATACAACCAACAAG-3';配列番号3)とアンチセンスプライマー(KU-PAN-1の遺伝子の1825番目から1848番目までの塩基配列:5'-CACAAAGGGTCTGGATGAGTCGGT-3';配列番号7)とを用いてPCRを行い、長さ1230bpのKU-PAN-1の遺伝子断片を作製20した。作製した遺伝子断片をHigh Prime DNA Labeling Kit(Boehringer)を用いて³²Pでラベリングしたプローブとし、Quick Hyb(Stratagene)をパイブリダイゼーションバッファーとして用いてナイロンメンブランフィルターを浸し、68℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、上記プローブを加えたQuick Hyb中により68℃で2時間ハイブリダイゼーションした。次いで、このハイブリダイゼーションしたナイロンメンブランフィルターを洗浄液I(2 $\times$ SSC、0.1%のSDS)で室温で15分間2回洗浄し、30洗浄液II(0.1 $\times$ SSC、0.1%のSDS)で65℃で60分間1回洗浄した。洗浄したナイロンメンブランフィルターを、Molecular Imager(BIORAD)を用いて放射性シグナルの検出を行った。結果を図2に示す。

【0048】図2に示されているように約3000bp*

*の位置にバンドが認められ、このバンドは、正常細胞においては精巢のみに発現していた。腫瘍組織では、膀胱組織3種(SU、K1M、K2F)、膀胱培養株2種(PK59、Panc1)、大腸癌(DLD1)、脳腫瘍(U87-MO)、乳癌(MDA231)及び食道癌(TE8)において強発現していた。このように、KU-PAN-1はRT-PCR及びノーザンブロットの結果より、正常組織にも僅かながら発現しているが、腫瘍組織とは明らかな発現量の差があったことから免疫治療の標的となり得ると考えられ、また精巢における発現については、免疫系から隔離された組織であることから、KU-PAN-1を実際に免疫療法に用いる際に精巢の障害が問題となる可能性は殆どない。

【0049】[KU-PAN-1の塩基配列・アミノ酸配列]単離したKU-PAN-1のcDNAは、全長は3035bpの配列番号8に示される塩基配列からなり、またKU-PAN-1は配列番号9に示されるように709個のアミノ酸配列から構成されていることがわかった。塩基配列による相同性検索を行った結果、1277bp以降の配列による相同性検索においては米国国立生体工学情報センターにHs.257102として1つにまとめられている遺伝子群と相同性があったが、1~1053bpまではデータベース上にホモロジーのある遺伝子は存在しなかったことから、KU-PAN-1は新規なタンパク質であることが確認できた。

【0050】

【発明の効果】本発明によると、生理的に重要であるKU-PAN-1等の膀胱癌抗原、それをコードするDNAを提供することができる。また、それら膀胱癌抗原やDNAは、膀胱癌、食道癌、大腸癌、乳癌等の治療や診断に有用であり、免疫誘導活性の促進又は抑制物質のスクリーニングに用いることができる。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> KEIO UNIVERSITY
<120> Pancreatic Carcinoma Antigens
<130> 2000-011
<140>
<141>
<160> 9
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
```

<400> 1
aattaaccct cactaaaggg
20

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Primer

<400> 2
gtaatacgac tcacataggg c
21

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-PAN-1 Sense
Primer

<400> 3
tgcccagcca gagatacaac cacaag
26

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:KU-PAN-1
Antisense Primer

<400> 4
ctggctagga gatggcttgg atttgg
26

<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-Actin
Specific Sense Primer

<400> 5
atctggcacc acaccttcta caatgagctg cg
32

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Beta-Actin

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:KU-PAN-1

Specific Antisense Primer

<400> 7

cacaaagggc ctggatgagt cggt

24

<210> 8

<211> 3035

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (541)..(2667)

<400> 8

acgggcccgc gctgcggcag cggcggcctc ggct

gcctgg ggagctcaaa ctggaggatt 60

ataaggatcg cctgaaaagt ggagagcatc ttaa

tccaga ccagttggaa gctgtagaga 120

aatatgaaga agtgctacat aatttggaat ttgc

caagga gcttcaaaaa accttttctg 180

ggttgagcct agatctacta aaagcgcaaa agaa

ggccca gagaaggag cacatgctaa 240

aacttgaggc tgagaagaaa aagcttcgaa ctat

acttca agttcagat gtattgcaga 300

acttgacaca ggagcacgta caaaaagact tcaa

aggggg tttgaatggc gcagtgtatt 360

tgccctcaaa agaacttgac tacctcatta agtt

ttcaaa actgacctgc cctgaaagaa 420

atgaaagtct gagacaaaca cttgaaggat ctac

tgtcta aattgctgaa ctgaggctat 480

tttgaaagta tcccagttcc caaaaatgcc aagg

aaaagg aagtaccact ggaggaagaa 540

atg cta ata caa tca gag aaa aaa aca caa

tta tcg aag act gaa tct 588

Met Leu Ile Gln Ser Glu Lys Lys Thr Gln

Leu Ser Lys Thr Glu Ser

1

5

10

15

gtc aaa gag tca gag tct cta atg gaa ttt

gcc cag cca gag ata caa 636

Val Lys Glu Ser Glu Ser Leu Met Glu Phe

Ala Gln Pro Glu Ile Gln

20

25

30

cca caa gag ttt ctt aac aga cgc tat atg

aca gaa gta gat tat tca 684

Pro Gln Glu Phe Leu Asn Arg Arg Tyr Met

Thr Glu Val Asp Tyr Ser

35

40

45

aac aaa caa ggc gaa gag caa cct tgg gaa

gca gat tat gct aga aaa 732

Asn Lys Gln Gly Glu Glu Gln Pro Trp Glu

Ala Asp Tyr Ala Arg Lys

aaa tcc aaa gca ggg tat gtt caa gag gaa
 caa aag aaa cag gag aca 1020
 Lys Ser Lys Ala Gly Tyr Val Gln Glu Glu
 Gln Lys Lys Gln Glu Thr
 145 150 155 1
 60
 cca aag ctg tgg cca gtt cag ctg cag aaa
 gaa caa gat cca aag aag 1068
 Pro Lys Leu Trp Pro Val Gln Leu Gln Lys
 Glu Gln Asp Pro Lys Lys
 165 170 175
 caa act cca aag tct tgg aca cct tcc atg
 cag agc gaa cag aac acc 1116
 Gln Thr Pro Lys Ser Trp Thr Pro Ser Met
 Gln Ser Glu Gln Asn Thr
 180 185 190
 acc aag tca tgg acc act ccc atg tgt gaa
 gaa cag gat tca aaa cag 1164
 Thr Lys Ser Trp Thr Thr Pro Met Cys Glu
 Glu Gln Asp Ser Lys Gln
 195 200 205
 cca gag act cca aaa tcc tgg gaa aac aat
 gtt gag agt caa aaa cac 1212
 Pro Glu Thr Pro Lys Ser Trp Glu Asn Asn
 Val Glu Ser Gln Lys His
 210 215 220
 tct tta aca tca cag tca cag att tct cca
 aag tcc tgg gga gta gct 1260
 Ser Leu Thr Ser Gln Ser Gln Ile Ser Pro
 Lys Ser Trp Gly Val Ala
 225 230 235 2
 40
 aca gca agc ctc ata cca aat gac cag ctg
 ctg ccc agg aag ttg aac 1308
 Thr Ala Ser Leu Ile Pro Asn Asp Gln Leu
 Leu Pro Arg Lys Leu Asn
 245 250 255
 aca gaa ccc aaa gat gtg cct aag cct gtg
 cat cag cct gta ggt tct 1356
 Thr Glu Pro Lys Asp Val Pro Lys Pro Val
 His Gln Pro Val Gly Ser
 260 265 270
 tcc tct acc ctt ccg aag gat cca gta ttg
 agg aaa gaa aaa ctg cag 1404
 Ser Ser Thr Leu Pro Lys Asp Pro Val Leu
 Arg Lys Glu Lys Leu Gln
 275 280 285
 gat ctg atg act cag att caa gga act tgt
 aac ttt atg caa gag tct 1452
 Asp Leu Met Thr Gln Ile Gln Gly Thr Cys
 Asn Phe Met Gln Glu Ser
 290 295 300

Ser Gln Glu Thr Ala Asn Tyr His Pro Asp
 Gly Thr Ile Gln Val Ser
 405 410 415
 aat ggt agc ctt gcc ttt tac cca gca cag
 acg aat gtg ttt ccc aga 1836
 Asn Gly Ser Leu Ala Phe Tyr Pro Ala Gln
 Thr Asn Val Phe Pro Arg
 420 425 430
 cct act cag cca ttt gtc aat agc cgg gga
 tct gtt aga gga tgt act 1884
 Pro Thr Gln Pro Phe Val Asn Ser Arg Gly
 Ser Val Arg Gly Cys Thr
 435 440 445
 cgt ggt ggg aga tta ata acc aat tcc tat
 cgg tcc cct ggt ggt tat 1932
 Arg Gly Gly Arg Leu Ile Thr Asn Ser Tyr
 Arg Ser Pro Gly Gly Tyr
 450 455 460
 aaa ggt ttt gat act tat aga gga ctc cct
 tca att tcc aat gga aat 1980
 Lys Gly Phe Asp Thr Tyr Arg Gly Leu Pro
 Ser Ile Ser Asn Gly Asn
 465 470 475 4
 80
 tat agc cag ctg cag ttc caa gct aga gag
 tat tct gga gca cct tat 2028
 Tyr Ser Gln Leu Gln Phe Gln Ala Arg Glu
 Tyr Ser Gly Ala Pro Tyr
 485 490 495

 tcc caa agg gat aat ttc cag cag tgt tat
 aag cga gga ggg aca tct 2076
 Ser Gln Arg Asp Asn Phe Gln Gln Cys Tyr
 Lys Arg Gly Gly Thr Ser
 500 505 510
 ggt ggt cca cga gca aat tcg aga gca ggg
 tgg agt gat tct tct cag 2124
 Gly Gly Pro Arg Ala Asn Ser Arg Ala Gly
 Trp Ser Asp Ser Ser Gln
 515 520 525
 gtg agc agc cca gaa aga gac aac gaa acc
 ttt aac agt ggt gac tct 2172
 Val Ser Ser Pro Glu Arg Asp Asn Glu Thr
 Phe Asn Ser Gly Asp Ser
 530 535 540
 gga caa gga gac tcc cgt agc atg acc cct
 gtg gat gtg cca gtg aca 2220
 Gly Gln Gly Asp Ser Arg Ser Met Thr Pro
 Val Asp Val Pro Val Thr
 545 550 555 5
 60
 aat cca gca gcc acc ata ctg cca gta cac
 gtc tac cct ctg cct cag 2268

Tyr Ala Asn Asp Gly Ala Pro Asp His Glu
Thr Ala Ser Asn His Ala

660

665

670

att ctt cag ctc ttc cag gga gac cag ata
tgg tta cgt ctg cac agg 2604

Ile Leu Gln Leu Phe Gln Gly Asp Gln Ile
Trp Leu Arg Leu His Arg

675

680

685

gga gca att tat gga agt agc tgg aaa tat
tct acg ttt tca ggc tat 2652

Gly Ala Ile Tyr Gly Ser Ser Trp Lys Tyr
Ser Thr Phe Ser Gly Tyr

690

695

700

ctt ctt tat caa gat tgaaagtcag tacagta
ttg acaataaaag gatggtgttc 2707

Leu Leu Tyr Gln Asp

705

taattagtgg gattgaagga aaagtagtct ttgc
cctcat gactgattgg tttaggaaaa 2767

tgtttttggt cctagaggga ggaggtcctt actt
ttttgt tttccttcct gaggtgaaaa 2827

atcaagctga atgacaatta gcactaatct ggca
ctttat aaattgtgat gtagcctcgc 2887

tagtcaagct gtgaatgtat attgtttgca ctta
atcctt aactgtatta acgttcagct 2947

tactaaactg actgcctcaa gtccaggcaa gtta
caatgc cttgttgtgc ctcaataaaa 3007

aagttacatg caaaaaaaaa aaaaaaaaa

3035

<210> 9

<211> 709

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Leu Ile Gln Ser Glu Lys Lys Thr Gln
Leu Ser Lys Thr Glu Ser

1

5

10

15

Val Lys Glu Ser Glu Ser Leu Met Glu Phe
Ala Gln Pro Glu Ile Gln

20

25

30

Pro Gln Glu Phe Leu Asn Arg Arg Tyr Met
Thr Glu Val Asp Tyr Ser

35

40

45

Asn Lys Gln Gly Glu Glu Gln Pro Trp Glu
Ala Asp Tyr Ala Arg Lys

50

55

60

Pro Asn Leu Pro Lys Arg Trp Asp Met Leu
Thr Glu Pro Asp Gly Gln

65

70

75

80

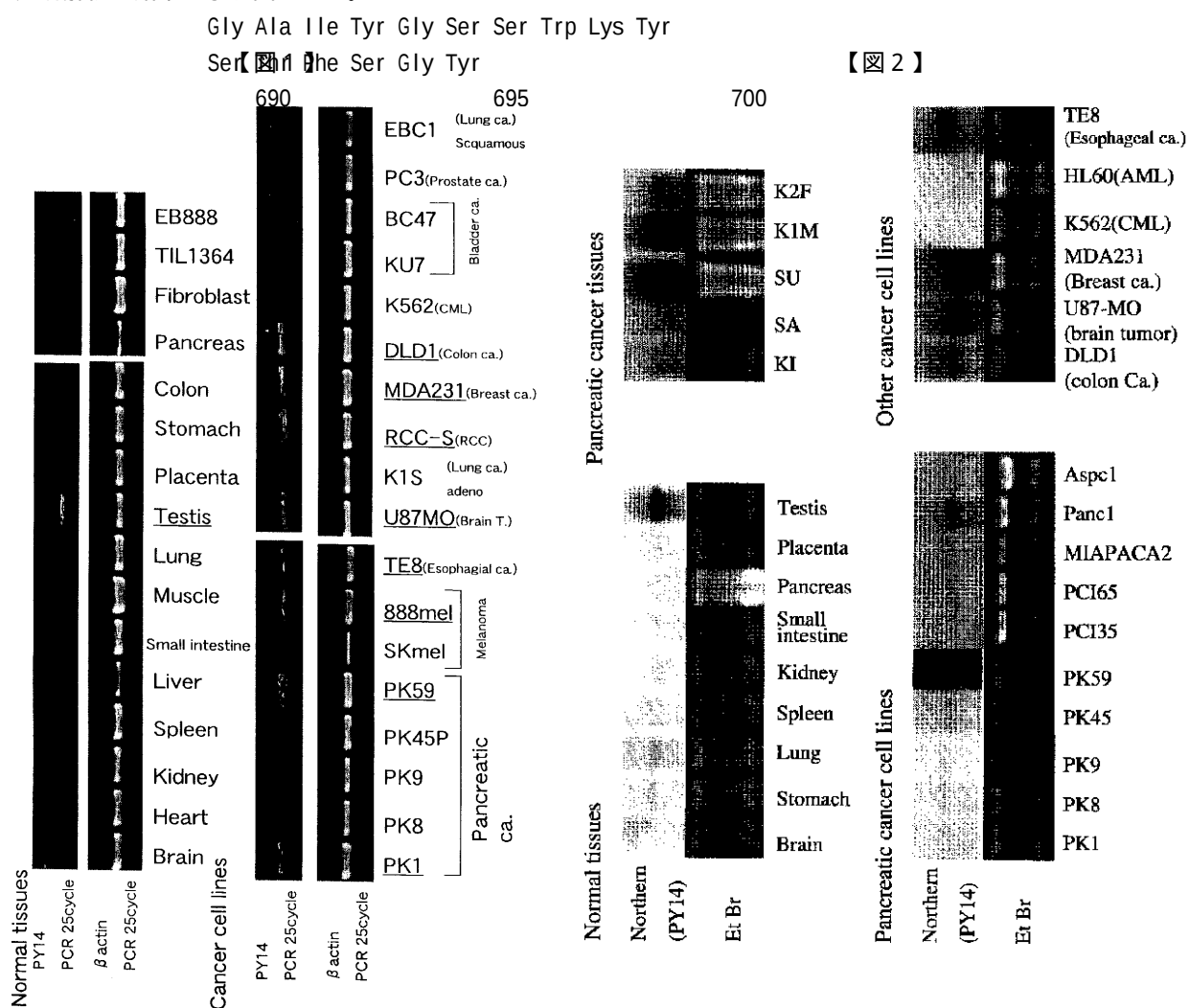
Glu Lys Lys Gln Glu Ser Phe Lys Ser Trp

Pro Glu Thr Pro Lys Ser Trp Glu Asn Asn
 Val Glu Ser Gln Lys His
 210 215 220
 Ser Leu Thr Ser Gln Ser Gln Ile Ser Pro
 Lys Ser Trp Gly Val Ala
 225 230 235 2
 40
 Thr Ala Ser Leu Ile Pro Asn Asp Gln Leu
 Leu Pro Arg Lys Leu Asn
 245 250 255
 Thr Glu Pro Lys Asp Val Pro Lys Pro Val
 His Gln Pro Val Gly Ser
 260 265 270
 Ser Ser Thr Leu Pro Lys Asp Pro Val Leu
 Arg Lys Glu Lys Leu Gln
 275 280 285
 Asp Leu Met Thr Gln Ile Gln Gly Thr Cys
 Asn Phe Met Gln Glu Ser
 290 295 300
 Val Leu Asp Phe Asp Lys Pro Ser Ser Ala
 Ile Pro Thr Ser Gln Pro
 305 310 315 3
 20
 Pro Ser Ala Thr Pro Gly Ser Pro Val Ala
 Ser Lys Glu Gln Asn Leu
 325 330 335
 Ser Ser Gln Ser Asp Phe Leu Gln Glu Pro
 Leu Gln Val Phe Asn Val
 340 345 350
 Asn Ala Pro Leu Pro Pro Arg Lys Glu Gln
 Glu Ile Lys Glu Ser Pro
 355 360 365

 Tyr Ser Pro Gly Tyr Asn Gln Ser Phe Thr
 Thr Ala Ser Thr Gln Thr
 370 375 380
 Pro Pro Gln Cys Gln Leu Pro Ser Ile His
 Val Glu Gln Thr Val His
 385 390 395 4
 00
 Ser Gln Glu Thr Ala Asn Tyr His Pro Asp
 Gly Thr Ile Gln Val Ser
 405 410 415
 Asn Gly Ser Leu Ala Phe Tyr Pro Ala Gln
 Thr Asn Val Phe Pro Arg
 420 425 430
 Pro Thr Gln Pro Phe Val Asn Ser Arg Gly
 Ser Val Arg Gly Cys Thr
 435 440 445
 Arg Gly Gly Arg Leu Ile Thr Asn Ser Tyr
 Arg Ser Pro Gly Gly Tyr
 450 455 460
 Lys Gly Phe Asp Thr Tyr Arg Gly Leu Pro

Gly Thr Leu Asp Gln Pro Ile Val Phe Asp
 Leu Leu Leu Asn Asn Leu
 595 600 605
 Gly Glu Thr Phe Asp Leu Gln Leu Gly Arg
 Phe Asn Cys Pro Val Asn
 610 615 620
 Gly Thr Tyr Val Phe Ile Phe His Met Leu
 Lys Leu Ala Val Asn Val
 625 630 635 6
 40
 Pro Leu Tyr Val Asn Leu Met Lys Asn Glu
 Glu Val Leu Val Ser Ala
 645 650 655
 Tyr Ala Asn Asp Gly Ala Pro Asp His Glu
 Thr Ala Ser Asn His Ala
 21 660 665 670 22

【図面の簡単な説明】
 【図1】RT-PCRによる膵癌抗原K1の発現解析の結果を示す図である。
 【図2】ノーザンブロット法による膵癌抗原K1の発現解析の結果を示す図である。



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド [*] (参考)
A 6 1 P 35/00		C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/00		16/18	4 C 0 8 5
14/47		19/00	4 H 0 4 5
16/18		C 1 2 N 1/15	
19/00		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 Q 1/02	
1/21		1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	M
G 0 1 N 33/15		33/577	A
33/50		C 1 2 P 21/02	C
33/53		21/08	
33/577		C 1 2 R 1:91)	
// C 1 2 P 21/02		)	
21/08		(C 1 2 P 21/02	
(C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 N 5/10		A 6 1 K 37/02	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	A
(C 1 2 P 21/02		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)			

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB41 CA26 FB02
FB03 FB05
4B024 AA01 AA11 BA36 BA80 CA04
CA07 CA09 CA11 CA20 DA02
DA06 EA03 FA10 FA20 GA11
GA19 GA27 HA13 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ21 QQ41 QQ43
QQ53 QQ61 QQ89 QR08 QR32
QR35 QR40 QR42 QR56 QR62
QR77 QR80 QS16 QS25 QS34
QS38 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
DA05 DA14
4B065 AA26X AA91X AA93Y AB01
AC14 AC20 BA02 BB01 BC31
BC47 BD50 CA24 CA44 CA46
CA60
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01
BA08 BA22 CA18 CA32 CA53
DA27 NA14 ZB082 ZB092
ZB262
4C085 AA14 AA19 BB36 CC02 DD22
DD33 DD34 EE01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41
CA41 DA75 DA76 DA80 EA28
EA51 FA74

专利名称(译)	人胰腺癌抗原		
公开(公告)号	JP2001340081A	公开(公告)日	2001-12-11
申请号	JP2000161930	申请日	2000-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人 慶應義塾		
[标]发明人	河上裕 赤田昌紀 藤田知信		
发明人	河上 裕 赤田 昌紀 藤田 知信		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 C07K14/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/395.T A61K45/00 A61P35/00 C07K14/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/577.A C12P21/02.C C12P21/08 C12R1/91 C12P21/02 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB41 2G045/CA26 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/FA10 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/GA27 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS38 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/BC31 4B065/BC47 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA60 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA32 4C084/CA53 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB36 4C085/CC02 4C085/DD22 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA80 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种可以用于胰腺癌等的诊断和治疗的胰腺癌抗原，以及编码该抗原的基因。 解决方案：通过使用从胰腺癌细胞系获得的mRNA通过RT-PCR制备cDNA并将该cDNA导入λ噬菌体载体以感染大肠杆菌，制备胰腺癌细胞cDNA文库， 通过使用晚期胰腺癌患者的血清IgG筛选1.6×10⁶λ噬菌体cDNA克隆， 它仅与胰腺癌患者的血清发生反应，而不与健康受试者的血清发生反应，而与胰腺癌细胞发生反应。 分离出选择性表达的胰腺癌抗原KU-PAN-1。

ダブルマーク数					
患者 A	293,000	1/1000,1/200	0	0	0
患者 B	175,000	1/200	4	1	0
患者 C	186,000	1/200	2	2	0
患者 D	220,000	1/100	13	4	2
患者 E	522,000	1/100	28	6	5
合計	1,646,000	-	47	13	7