

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6094220号
(P6094220)

(45) 発行日 平成29年3月15日(2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日(2017.2.24)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
CO 7 K 16/30	(2006.01)	CO 7 K 16/30	
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	C

請求項の数 23 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-543815 (P2012-543815)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月3日(2012.8.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/069824
 (87) 国際公開番号 W02013/018885
 (87) 国際公開日 平成25年2月7日(2013.2.7)
 審査請求日 平成27年7月9日(2015.7.9)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-171364 (P2011-171364)
 (32) 優先日 平成23年8月4日(2011.8.4)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000003159
 東レ株式会社
 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 井戸 隆喜
 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
 レ株式会社 基礎研究センター内
 (72) 発明者 岡野 文義
 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
 レ株式会社 基礎研究センター内

審査官 渡邊 吉喜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓癌の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体から分離された試料において、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により特異的に結合する反応性を有するCAPRIN-1タンパク質由来ポリペプチド、又は該ポリペプチドをコードする核酸、の存在又は量を測定することを含む、膵臓癌を検出するための方法。

【請求項2】

測定すべき前記ポリペプチドは、配列番号2~30のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列からなるCAPRIN-1タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記被験体が、ヒト又はイヌである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記被験体がイヌであり、測定すべき前記ポリペプチドは配列番号2~30のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記被験体がイヌであり、測定すべき前記ポリペプチドは配列番号6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記被験体がヒトであり、測定すべき前記ポリペプチドは配列番号2又は4に示される

アミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリペプチドの存在又は量の測定は、前記試料に含まれ得る、測定すべき前記ポリペプチドに対し前記被験体内で誘導された抗体を免疫学的測定することにより行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリペプチドをコードする核酸の存在又は量の測定は、前記試料中に含まれる、該ポリペプチドをコードする核酸を測定することにより行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記核酸の塩基配列又はその相補的配列中の 15 ~ 19 塩基又はそれ以上、或いは 20 ~ 30 塩基又はそれ以上、の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、前記試料中の前記核酸の存在又は量を測定する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記被験体がイヌであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列又はその相補的配列中の 15 ~ 19 塩基又はそれ以上、或いは 20 ~ 30 塩基又はそれ以上、の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記被験体がヒトであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 1 又は 3 に示される塩基配列又はその相補的配列中の 15 ~ 19 塩基又はそれ以上、或いは 20 ~ 30 塩基又はそれ以上、の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ポリペプチドの存在又は量の測定は、前記試料中に含まれる、該ポリペプチドを測定することにより行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記測定が免疫学的測定である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記試料が血液、血清、血漿、腹水、胸水、組織又は細胞である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

CAPRIN - 1 タンパク質に対して被験体内で誘導される抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する 1 もしくは複数の CAPRIN - 1 タンパク質由来ポリペプチド を含む、膵臓癌を検出するための試薬又はキット。

【請求項 16】

CAPRIN - 1 タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有し被験体内で産生される CAPRIN - 1 タンパク質由来ポリペプチド と抗原抗体反応する 1 もしくは複数の抗体又はその抗原結合性断片を含む、膵臓癌を検出するための試薬又はキット。

【請求項 17】

CAPRIN - 1 タンパク質が、配列番号 2 ~ 30 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項 15 又は 16 記載の試薬又はキット。

【請求項 18】

前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、膵臓癌細胞の表面に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、請求項 16 又は 17 記載の試薬又はキット。

【請求項 19】

前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号 2 ~ 30 のうち配列番号 6 および配列番号 18 を除く偶数の配列番号で表されるいずれかのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列中のアミノ酸残基番号50～98又はアミノ酸残基番号233～344の領域内の連続する7～12個又はそれ以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドと免疫学的反応性を有する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、請求項16～18のいずれか1項記載の試薬又はキット。

【請求項20】

前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号43のアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と45のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と46のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と47のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と48のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号49と50のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号51と52のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号53と54のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号55と56のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号57と58のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、及び配列番号59と60のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片からなる群から選択される1もしくは複数の抗体又はその抗原結合性断片である、請求項16～19のいずれか1項に記載の試薬又はキット。

【請求項21】

配列番号1～29のうち奇数の配列番号に示されるかつCAPRIN-1タンパク質をコードするいずれかの塩基配列又はその相補的配列中の15～19塩基又はそれ以上、或いは20～30塩基又はそれ以上、の部分配列と特異的にハイブリダイズする1もしくは複数のポリヌクレオチドを含む、膵臓癌を検出するための試薬又はキット。

【請求項22】

請求項15～21のいずれか1項に記載の少なくとも1つの試薬又はキットを用いて、被験体の試料中の、CAPRIN-1タンパク質、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体、もしくはCAPRIN-1タンパク質をコードする核酸、の存在又は量を測定することを含み、膵臓癌を検出するための方法。

【請求項23】

請求項1～14のいずれか1項に記載の方法において、請求項15～21のいずれか1項に記載の少なくとも1つの試薬又はキットを用いて、被験体の試料中の、CAPRIN-1タンパク質、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体、もしくはCAPRIN-1タンパク質をコードする核酸、の存在又は量を測定することを含み、膵臓癌を検出するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CAPRIN-1を腫瘍マーカーとする膵臓癌の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

難治性の癌の一つである膵臓癌の患者数は我国で1万人以上であると報告され、その発生は年々増加してきており、今後も増えていくことが予想されている。膵臓癌の場合、たとえ外科手術ができたとしても小さな癌が他の臓器に浸潤・転移していることが多いため再発することが多く、5年生存率は9%と予後が非常に悪い。また術後の再発予防を目的として抗癌剤の一つであるゲムシタピンが適用されている。しかし、ゲムシタピンの投与による効果は主に痛みをとるのみであり、腫瘍縮小効果や延命効果はほとんど望めない。その他にも現在胃癌に使われる抗癌剤ティーエスワンを使う病院も存在するが、やはり治療効果を望むことはできない状況である。

【0003】

10

20

30

40

50

膵臓癌の予後改善のためには他の癌同様早期発見が重要であるが、初期症状がほとんどないため早期発見が困難である。現在、生体試料中の癌胎児性抗原 C E A、糖タンパク質 C A 1 9 - 9、D u p a n - 2 が膵臓癌の腫瘍マーカーとして測定する方法が膵臓癌の検出に活用されている。しかしこれらの腫瘍マーカーは、膵臓癌が進行して始めて上昇するものであり、また進行時に正常値を示す場合があり、正確な膵臓癌の検出を行うには十分でないとされている。また、現在知られている腫瘍マーカーの大部分は、体液中にはごく微量 (p g / m L オーダー程度) しか存在しないため、それらを検出するためには、高感度な測定法や特殊な技術が必要とされる。このような現状の中で、膵臓癌を簡便な操作で高感度に検出できる新規な癌検査手段が提供されれば、膵臓癌に対する診断用途が開かれると期待される。早期発見するためには、定期的な精密検査を受ける必要があり、膵臓癌に罹っていない健康人および癌患者の体力的、経済的負担なく、血清や尿などを用いて簡便に検査できる癌の検出方法が求められている。

10

【 0 0 0 4 】

また、犬においても膵臓癌は難治性の癌であり、膵臓癌に罹った場合の症状は、腹部にしこりが確認できるものの、むしろ急激に元気がなくなったり、ふらついたり、歩行異常等の低血糖による症状であり、このような症状に至ってやっと発症に気付くケースがほとんどである。また、このような症状が見られた時には既に膵臓癌は進行した状態であることが多く、治療法は手術で膵臓癌を取り除く他、支持療法や抗癌剤が投与されているのみである。膵臓癌に罹った犬もヒトと同様に有効な膵臓癌治療を可能にするためには早期発見が重要になるが、ヒトと同様、これまで犬では膵臓癌を早期発見できるような簡便な癌診断薬は存在せず、動物医療においては X 線、C T、M R I による撮影などの検査法も普及していない。触診や簡単な血液検査、X 線撮影による検査を行って、獣医の経験に大きく依存した診断が行われているのが現状であり、犬の膵臓癌診断に適用できる高感度で簡便な癌検出手段が提供されれば、適切な治療が可能になり、飼い主にとっても獣医にとってもメリットが大きい。

20

【 0 0 0 5 】

C y t o p l a s m i c - a n d p r o l i f e r a t i o n - a s s o c i a t e d p r o t e i n 1 (C A P R I N - 1) は、休止期の正常細胞が活性化や細胞分裂を起こす際に発現し、また細胞内で R N A と細胞内ストレス顆粒を形成して m R N A の輸送、翻訳の制御に関与することなどが知られている細胞内タンパク質である。一方で、C A P R I N - 1 のタンパク質をコードする遺伝子が、イヌ及びヒトの精巣と悪性の癌細胞に特異的に発現し、C A P R I N - 1 に対する抗体による乳癌細胞を用いた F C M 解析の結果、乳癌細胞の表面に C A P R I N - 1 が発現し、さらに乳癌組織を用いた免疫組織化学染色の結果から、C A P R I N - 1 が乳癌で強く発現していることが示されている。さらに、前述の抗体が、リンパ球の機能を介して乳癌細胞を障害すること、および乳癌細胞を移植した担癌マウスモデルにおいて C A P R I N - 1 に対する抗体が強い抗腫瘍効果を発揮することも報告されている (特許文献 1)。また、癌患者血清中の C A P R I N - 1 に対して被験体内で誘導される抗体または抗原抗体反応するポリペプチドを測定することにより、乳癌などの癌の診断が可能であることが報告されている (特許文献 2)。しかし、C A P R I N - 1 が膵臓癌で発現していることおよび膵臓癌患者血清中の C A P R I N - 1 に対して被験体内で誘導される抗体または抗原抗体反応するポリペプチドを測定することにより、膵臓癌の診断が可能になることはこれまで一切報告がない。

30

40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 国際公開 W O 2 0 1 0 / 0 1 6 5 2 6

【 特許文献 2 】 国際公開 W O 2 0 1 0 / 0 1 6 5 2 7

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

50

本発明の目的は、膵臓癌の診断に有用な膵臓癌の検出手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、鋭意研究の結果、CAPRIN-1が膵臓癌で発現していること、CAPRIN-1タンパク質を用いて膵臓癌患者血清中に誘導されたCAPRIN-1に対する抗体を測定すること、さらには、それらタンパク質を用いて作製した抗体が、膵臓癌組織中のCAPRIN-1に結合することにより膵臓癌の診断、検査もしくは検出が可能であることを見出し、本願発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、被験体から分離された試料に対して行なう方法であって、CAPRIN-1の発現を測定することを含む膵臓癌の検出方法を提供する。明細書中で使用される「検出」という用語は、検査又は評価と置き換えることができる。また、本発明は、CAPRIN-1に対して被験体内で誘導される抗体と抗原抗体反応するポリペプチドを含む膵臓癌を検出するための試薬又はキットを提供する。さらに、本発明は、CAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を含む膵臓癌検出試薬又はキットを提供する。さらに、本発明は、配列表の配列番号1、3、5、7、9、11、13・・・29に示される塩基配列中の15～19塩基又はそれ以上、或いは20～30塩基又はそれ以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、膵臓癌を検出するための試薬又はキットを提供する。明細書中で使用される「膵臓癌を検出するための試薬又はキット」は、「膵臓癌検出用試薬又はキット」と称することもできる。

【0010】

具体的には、本発明は以下の特徴を有する。

【0011】

(1)被験体から分離された試料において、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により特異的に結合する反応性を有するポリペプチド、又は該ポリペプチドをコードする核酸、の存在又は量を測定することを含む、膵臓癌の検出方法。

【0012】

(2)測定すべき前記ポリペプチドは、配列番号2～30のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列からなるCAPRIN-1タンパク質、又は該CAPRIN-1タンパク質と85～90%又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである、上記(1)の方法。

【0013】

(3)上記被験体が、ヒト又はイヌである、上記(1)又は(2)の方法。

【0014】

(4)上記被験体がイヌであり、測定すべき前記ポリペプチドは配列番号2～30のうち偶数の配列番号に示されるアミノ酸配列を含む、上記(3)の方法。

【0015】

(5)上記被験体がイヌであり、測定すべき上記ポリペプチドは配列番号6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列を含む、上記(4)の方法。

【0016】

(6)上記被験体がヒトであり、測定すべき上記ポリペプチドは配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列を含む、上記(3)の方法。

【0017】

(7)前記ポリペプチドの存在又は量の測定は、前記試料に含まれ得る、測定すべき前記ポリペプチドに対し前記被験体内で誘導された抗体を免疫学的測定することにより行われる、(1)～(6)のいずれかの方法。

【0018】

(8)前記ポリペプチドをコードする核酸の存在又は量の測定は、上記試料中に含まれる、該ポリペプチドをコードする核酸を測定することにより行われる、上記(1)～(6)のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

(9) 上記核酸の塩基配列又はその相補的配列中の 1 5 ~ 1 9 塩基又はそれ以上、好ましくは 2 0 ~ 2 5 塩基又はそれ以上、より好ましくは 3 0 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、前記試料中の前記核酸の存在又は量を測定する、上記 (8) の方法。

【 0 0 2 0 】

(1 0) 上記被験体がイヌであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列又はその相補的配列中の 1 5 ~ 1 9 塩基又はそれ以上、好ましくは 2 0 ~ 2 5 塩基又はそれ以上、より好ましくは 3 0 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、上記 (9) の方法。

10

【 0 0 2 1 】

(1 1) 上記被験体がヒトであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 1 又は 3 に示される塩基配列又はその相補的配列中の 1 5 ~ 1 9 塩基又はそれ以上、好ましくは 2 0 ~ 2 5 塩基又はそれ以上、より好ましくは 3 0 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、上記 (9) の方法。

【 0 0 2 2 】

(1 2) 前記ポリペプチドの存在又は量の測定は、前記試料中に含まれる、該ポリペプチドを測定することにより行われる、上記 (1) ~ (6) のいずれかの方法。

【 0 0 2 3 】

(1 3) 前記測定が免疫学的測定である、上記 (1 2) の方法。

20

【 0 0 2 4 】

(1 4) 前記試料が血液、血清、血漿、腹水、胸水、組織又は細胞である、上記 (1) ~ (1 3) のいずれかの方法。

【 0 0 2 5 】

(1 5) C A P R I N - 1 タンパク質に対して被験体内で誘導される抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する 1 もしくは複数のポリペプチドを含む膵臓癌を検出するための試薬又はキット。

【 0 0 2 6 】

(1 6) C A P R I N - 1 タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有し被験体内で産生されるポリペプチドと抗原抗体反応する 1 もしくは複数の抗体又はその抗原結合性断片を含む膵臓癌を検出するための試薬又はキット。

30

【 0 0 2 7 】

(1 7) C A P R I N - 1 タンパク質が、配列番号 2 ~ 3 0 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列からなる、(1 5) 又は (1 6) の試薬又はキット。

【 0 0 2 8 】

(1 8) 前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、膵臓癌細胞の表面に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、(1 6) 又は (1 7) の試薬又はキット。

【 0 0 2 9 】

(1 9) 前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号 2 ~ 3 0 のうち配列番号 6 および配列番号 1 8 を除く偶数の配列番号で表されるいずれかのアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号 5 0 ~ 9 8 又はアミノ酸残基番号 2 3 3 ~ 3 4 4 の領域内の連続する 7 ~ 1 2 個又はそれ以上のアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを部分配列として含むポリペプチド、と免疫学的反応性を有する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、(1 6) ~ (1 8) のいずれかの試薬又はキット。

40

【 0 0 3 0 】

(2 0) 前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号 4 3 のアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 4 4 と 4 5 のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 4 4 と 4 6 のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配

50

列番号44と47のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と48のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号49と50のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号51と52のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号53と54のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号55と56のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号57と58のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、及び配列番号59と60のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片からなる群から選択させる1もしくは複数の抗体又はその抗原結合性断片である、前記(16)~(19)のいずれかの試薬又はキット。

10

【0031】

(21)配列表の配列番号1~29のうち奇数の配列番号に示されるかつCAPRIN-1タンパク質をコードするいずれかの塩基配列又はその相補的配列中の15~19塩基又はそれ以上、好ましくは20~25塩基又はそれ以上、より好ましくは30塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズする1もしくは複数のポリヌクレオチドを含む膵臓癌を検出するための試薬又はキット。

【0032】

(22)上記(15)~(21)のいずれかに記載の少なくとも1つの試薬又はキットを用いて、被験体の試料中の、CAPRIN-1タンパク質、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体、もしくはCAPRIN-1タンパク質をコードする核酸、の存在又は量を測定することを含み、膵臓癌の検出方法。

20

【0033】

(23)上記(1)~(14)のいずれかに記載の方法において、上記(15)~(21)のいずれかに記載の少なくとも1つの試薬又はキットを用いて、被験体の試料中の、CAPRIN-1タンパク質、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体、もしくはCAPRIN-1タンパク質をコードする核酸、の存在又は量を測定することを含み、膵臓癌の検出方法。

【0034】

本発明により、新規な膵臓癌の検出方法が提供される。後述の実施例において具体的に示されるように、CAPRIN-1(又は「Caprin-1」ともいう)のアミノ酸配列を基に作製した組換えポリペプチドは、膵臓癌患者の血清中に存在する抗体と特異的に反応することができる。したがって、本発明の方法により試料中の該抗体を測定すれば、被験体内の膵臓癌を検出することができる。また、CAPRIN-1自体を測定することによっても、被験体内の膵臓癌を検出することができる。さらにまた、後述の実施例に記載される通り、被験体の精巢及び膵臓癌細胞において、CAPRIN-1遺伝子が特異的に高発現している(明細書では、以下、このような発現産物を、CAPRIN-1(タンパク質)をコードする核酸と称することもある。)。従って、該核酸を測定することによっても、膵臓癌の検出が可能である。また、膵臓癌組織におけるCAPRIN-1の(発現の)存在又は量をCAPRIN-1に対する抗体を用いて測定することが可能である。従って、膵臓癌患者に事前に上記測定を行うことにより、CAPRIN-1を標的とした治療薬、例えば抗体医薬を適用すべき膵臓癌患者の選抜も可能になる。

30

40

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明の方法では、被験体から分離された試料を用いて、CAPRIN-1の(発現の)存在又は量を測定する。CAPRIN-1の(発現の)存在又は量を測定する方法としては、試料中に含まれるCAPRIN-1に対する抗体を免疫学的に測定する方法(第1の方法)、試料中に含まれるCAPRIN-1自体を免疫学的に測定する方法(第2の方法)、及び試料中に含まれるCAPRIN-1をコードする核酸(例えば、mRNA又は、mRNAから合成されるcDNA)を測定する方法(第3の方法)が挙げられる。本発明の方法では、これらのいずれの方法でCAPRIN-1の(発現の)存在又は量を測定

50

してもよい。なお、本発明において、「測定」という用語には、検出、定性、定量及び半定量のいずれもが包含される。

【0036】

配列番号6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列はイヌのCAPRIN-1のアミノ酸配列である。該アミノ酸配列を有するイヌCAPRIN-1は、担癌犬由来の血清中に特異的に存在する抗体と結合するポリペプチドとして同定されたものであり(後述の実施例1参照)、担癌犬体内では、配列番号6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列を有するCAPRIN-1に対する抗体が特異的に誘導されている。すなわち、上記第1の方法により、配列番号6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列を有するCAPRIN-1に対する上記の抗体を測定することによって、イヌの膵臓癌を検出できる。また、上記第2の方法により、抗原である配列番号6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列を有するCAPRIN-1自体を測定することによっても、イヌの膵臓癌を検出できる。さらにまた、上記第3の方法に関連して、CAPRIN-1遺伝子は、膵臓癌細胞で有意に高発現しているため、該核酸を測定することによっても、イヌの膵臓癌を検出することができる。

10

【0037】

なお、本明細書で使用する「アミノ酸配列を有する」とは、アミノ酸残基がそのような順序で配列しているという意味である。従って、例えば、「配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、配列番号2に示されるMet Pro Ser Ala・・(中略)・・Gln Gln Val Asnのアミノ酸配列を持つ、709アミノ酸残基のサイズのポリペプチドを意味する。また、例えば、「配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド」を「配列番号2のポリペプチド」と略記することができる。「塩基配列を有する」という表現についても同様である。本明細書中、「有する」という用語は、「含む」又は「からなる」という表現で置き換えてもよい。

20

【0038】

また、本明細書中で使用する「ポリペプチド」とは、複数のアミノ酸がペプチド結合することによって形成される分子をいい、構成するアミノ酸数が多いポリペプチド分子のみならず、アミノ酸数が少ない低分子量の分子(オリゴペプチド)や、全長タンパク質も包含され、本発明では配列番号2~30のうち偶数の配列番号(すなわち、配列番号2、4、6、・・・、26、28、30)のいずれかに示すアミノ酸配列を有するCAPRIN-1の全長タンパク質も包含される。

30

【0039】

さらにまた、本明細書中で使用する「被験体」とは、哺乳動物及び鳥類を含む脊椎動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒト、イヌ、ウシ、ウマなどである。

【0040】

さらに、本明細書中で使用する「試料」は、膵臓癌を検出するための検査用生体試料であり、被験体から分離された体液、組織又は細胞を包含する。ここで、体液は、例えば血液、血清、血漿、腹水、胸水などを包含するが、これらに制限されない。また、組織又は細胞は、癌への罹患が疑われる膵臓の組織又は細胞を包含する。

40

【0041】

本発明の方法では、配列番号6、8、10、12又は14のイヌCAPRIN-1のみならず、その他の哺乳動物のCAPRIN-1(以下、イヌCAPRIN-1に対する「相同因子」(又は「ホモログ」もしくは「オーソログ」と称する場合もある。また、単に「CAPRIN-1」という場合には、イヌに限らず、ヒトを含む他の哺乳動物由来のCAPRIN-1も包含される。)も測定対象となる。後述の実施例に具体的に記載される通り、ヒトCAPRIN-1遺伝子は、ヒトの膵臓癌細胞で有意に高発現しており、健康ヒト体内には該ヒトCAPRIN-1に対する抗体が検出されない。従って、イヌ以外の哺乳動物におけるCAPRIN-1の発現を測定することによっても、該哺乳動物の膵臓癌を検出することができる。本発明の方法で測定対象となるイヌ以外のCAPRIN-

50

1 としては、例えば、ヒトCAPRIN-1が挙げられるが、これらに限定されない。なお、ヒトCAPRIN-1をコードする塩基配列及びそのアミノ酸配列は、配列表の配列番号1、3及び2、4にそれぞれ示される通りであり、イヌCAPRIN-1との配列同一性は塩基配列で94%、アミノ酸配列で98%である。イヌとヒトのように遠縁な哺乳動物間であっても、それぞれのCAPRIN-1のアミノ酸配列の配列同一性は98%と非常に高く、そのため、ヒト以外の哺乳動物との間でも、イヌCAPRIN-1とその相同因子とは85%程度以上の高い配列同一性を有するものと考えられる。すなわち、本発明の方法において発現を測定するCAPRIN-1は、特に限定されないが、配列番号6、8、10、12又は14に示されるイヌCAPRIN-1のアミノ酸配列と好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する。

10

【0042】

上記第1の方法において、試料中に存在し得る上記抗体の測定は、該抗体と抗原抗体反応する抗原物質を用いた免疫学的測定により容易に行うことができる。免疫学的測定法自体は下記に詳述するとおり周知の常法である。免疫学的測定の抗原物質としては、例えば、担癌イヌ体内で該抗体を誘導するもとなつた配列番号6、8、10、12又は14のイヌCAPRIN-1タンパク質、又は該タンパク質のエピトープを含む断片、を用いることができる。また、抗体には交叉反応性があり、実際に免疫原となつた抗原物質以外の分子であっても、分子上に免疫原のエピトープと類似した構造が存在すれば、その分子は免疫原に対して誘導された抗体と抗原抗体反応により結合し得る。特に、ある哺乳動物由来のタンパク質と、他の哺乳動物由来のその相同因子の間では、アミノ酸配列の配列同一性も高く、エピトープの構造も類似している場合が多い。後述の実施例に具体的に記載される通り、配列番号6、8、10、12又は14のイヌCAPRIN-1は、該イヌCAPRIN-1に対し担癌イヌ体内で誘導された抗体と抗原抗体反応するし、また、ヒトCAPRIN-1は、担癌イヌ体内で誘導された上記抗体と抗原抗体反応する。従って、本発明の第1の方法では、免疫学的測定の抗原として、いずれの哺乳動物由来のCAPRIN-1を用いることもできる。

20

【0043】

通常、タンパク質等のような、複雑な構造をとる分子量の大きい抗原物質の場合、分子上に構造の異なる複数の部位が存在している。従って、被験体内では、そのような抗原物質に対し、複数の部位をそれぞれ認識して結合する複数種類の抗体が生産される。すなわち、被験体内でタンパク質等の抗原物質に対して生産される抗体は、複数種類の抗体の混合物であるポリクローナル抗体である。本発明者らが見出した、担癌被験体由来の血清中に特異的に存在し組換えCAPRIN-1タンパク質と抗原抗体反応により特異的に結合する抗体もまた、ポリクローナル抗体である。なお、本発明において「ポリクローナル抗体」といった場合には、抗原物質を体内に含む被験体由来の血清中に存在する抗体であって、該抗原物質に対して該被験体内で誘導された抗体を指す。

30

【0044】

後述の実施例では、担癌動物生体に特異的な抗体を免疫学的測定するための抗原として、配列番号6及び配列番号8(イヌCAPRIN-1)のポリペプチド、及び配列番号2(ヒトCAPRIN-1)のポリペプチドを調製し、これらのポリペプチドと担癌被験体由来の血清中の前記抗体との反応性を確認している。しかしながら、前記抗体はポリクローナル抗体であるから、配列番号6、8又は2の相同因子から成るポリペプチドであれば当然結合するし、また、該ポリペプチドの断片であっても、前記ポリクローナル抗体中にはその断片の構造を認識する抗体が含まれ得るため、やはり担癌被験体由来の血清中に含まれる前記抗体と結合できる。すなわち、配列番号6、8又は2の相同因子のポリペプチド(すなわちCAPRIN-1全長タンパク質)であっても、その断片であっても、同様に担癌被験体血清中に特異的に含まれる前記ポリクローナル抗体の測定に用いることができ、癌の検出に有用である。従って、本発明の第1の方法で免疫学的測定の抗原として用いられるポリペプチドは、CAPRIN-1タンパク質(例えば配列番号6、8又は2)

40

50

の全長領域から成るポリペプチドのみに限定されず、CAPRIN-1タンパク質のアミノ酸配列中の連続する7~12個又はそれ以上、好ましくは連続する8個以上、9個以上、又は10個以上のアミノ酸から成るポリペプチド断片であって、CAPRIN-1タンパク質に対するポリクローナル抗体と抗原抗体反応するポリペプチド(以下、便宜的に「特異反応性部分ポリペプチド」ということがある)も包含される。なお、約7~12アミノ酸残基又はそれ以上のポリペプチドであれば抗原性を発揮することがこの分野において知られている。ただし、アミノ酸残基の数があまりに少ないと、試料中に存在する、CAPRIN-1タンパク質以外のタンパク質に対する抗体とも交叉反応してしまう可能性が高くなる。従って、免疫学的測定 of 精度を高める観点からは、ポリペプチド断片のアミノ酸残基の数は好ましくは20以上、30以上、もしくは50以上、さらに好ましくは100以上、もしくは150以上、さらに好ましくは300以上、さらに好ましくは600以上とするのが望ましく、さらには1000以上、1500以上としてもよい。

10

【0045】

抗原として用いるポリペプチドの好ましい具体例としては、配列番号2~30のうち偶数の配列番号のそれぞれのポリペプチド、又はそのエピトープを含む断片(すなわち、約7~12アミノ酸残基又はそれ以上のポリペプチド断片)が挙げられる。

【0046】

なお、配列番号2~30のうち偶数の配列番号(すなわち、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30)のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列はそれぞれ、配列番号1~29のうち奇数の配列番号(すなわち、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29)に示されている。

20

【0047】

一般に、タンパク質抗原において、該タンパク質のアミノ酸配列のうち少数のアミノ酸残基が置換され、欠失され、付加され、又は挿入された場合であっても、元のタンパク質とほぼ同じ抗原性を有していることがあることは当業者において広く知られている。従って、CAPRIN-1タンパク質のアミノ酸配列のうち少数の(好ましくは、1個もしくは数個の)アミノ酸残基が置換され、欠失され、及び/又は挿入された配列を有するポリペプチドであって、元の配列と80%以上、85~90%又はそれ以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、さらにより好ましくは99%以上の配列同一性を有し、かつ、CAPRIN-1に対する抗体と抗原抗体反応により特異的に結合するポリペプチド(以下、便宜的に「特異反応性修飾ポリペプチド」ということがある)も、上記したポリペプチドと同様に癌の検出に用いることができる。好ましくは、該特異反応性修飾ポリペプチドは、CAPRIN-1のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸残基が置換され、欠失され、付加され、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を有する。本明細書中で使用される「数個」とは、2~10の整数、好ましくは2~6の整数、さらに好ましくは2~4の整数を表す。

30

【0048】

本明細書中で使用する、アミノ酸配列の「配列同一性」とは、比較すべき2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように両アミノ酸配列を整列させ、一致したアミノ酸残基数を全アミノ酸残基数で除したものを百分率(%)で表したものである。上記整列の際には、必要に応じ、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTAL W等の周知のプログラムを用いて行なうことができる(Karlin及びAltschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:2264-2268, 1993; Altschulら, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997)。

40

【0049】

なお、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸(Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸(Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr,

50

Cys)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸(Phe, Tyr, Trp, His)のように類似の性質を有するものにグループ分けすることができ、これらの間での置換、すなわち保存的置換、であればポリペプチドの性質が変化しないことが多いことが知られている。従って、CAPRIN-1のアミノ酸残基を置換する場合には、これらの各グループの間で置換することにより、対応抗体との結合性を維持できる可能性が高くなる。しかしながら、本発明では、上記改変体は、未改変体と同等もしくはほとんど同等の免疫誘導活性を付与する限り、非保存的置換を有していてもよい。

【0050】

本発明で用いられる上記ポリペプチドを部分配列として含み(例えば、本発明で用いられるポリペプチドの一端又は両端に他の(ポリ)ペプチドが付加されたもの)、かつ、CAPRIN-1に対する抗体と抗原抗体反応により特異的に結合するポリペプチド(以下、便宜的に「特異反応性付加ポリペプチド」ということがある)も、上記したポリペプチドと同様に膵臓癌の検出に用いることができる。

【0051】

本発明で用いられる上記ポリペプチドは、例えば、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って合成することができる(日本生化学会編、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、化学修飾とペプチド合成、東京化学同人(日本)、1981年)。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。あるいは、公知の遺伝子工学的手法(Sambrookら、Molecular Cloning、第2版、Current Protocols in Molecular Biology(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology、第3版、A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology(1995)、John Wiley & Sonsなど)を用いて容易に調製することができる。例えば、配列番号2のヒトCAPRIN-1又はその相同因子をコードする遺伝子を発現している組織から抽出したRNAから、該遺伝子のcDNAをRT-PCRにより調製し、該cDNAの全長又は所望の一部を発現ベクターに組み込んで、宿主細胞中に導入し、目的とするポリペプチドを得ることができる。配列番号6、8、10、12及び14のイヌCAPRIN-1をコードするcDNAの塩基配列はそれぞれ配列番号5、7、9、11及び13に、そのヒト相同因子である配列番号2及び4のヒトCAPRIN-1をコードするcDNAの塩基配列はそれぞれ配列番号1及び3に示されているため、RT-PCRに用いるプライマーはこれらの塩基配列を参照して容易に設計できる。また、後述するとおり、ヒト以外の哺乳動物のCAPRIN-1をコードする遺伝子は、配列番号1~29のうち奇数の配列番号の塩基配列を参照して設計したプライマーにより増幅し得るため、例えばネコCAPRIN-1をコードするcDNAも上記と同様の手法により容易に調製し得る。RNAの抽出、RT-PCR、ベクターへのcDNAの組み込み、ベクターの宿主細胞への導入は、例えば以下に記載するとおり、周知の方法により行なうことができる。また、用いるベクターや宿主細胞も周知であり、種々のものが市販されている。

【0052】

上記宿主細胞としては、上記ポリペプチドを発現可能な細胞であればいかなるものであってもよく、原核細胞の例としては大腸菌など、真核細胞の例としてはサル腎臓細胞COS1、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO、ヒト胎児腎臓細胞株HEK293、マウス胎仔皮膚細胞株NIH3T3、等の哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが挙げられる。

【0053】

宿主細胞として原核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、原核細胞中で複製可能

10

20

30

40

50

なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、マルチクローニングサイト、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子、等を有する発現ベクターを用いる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBlue-scriptII、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。上記ポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで原核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを原核宿主細胞中で発現させることができる。この際、該ポリペプチドを、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。なお、上記ポリペプチドをコードするDNAは、例えば上記したようにRT-PCRによりcDNAを調製して得ることができ、また後述するように市販の核酸合成機を用いて常法により合成することもできる。なお、配列番号2及び4のCAPRIN-1をコードする遺伝子のcDNAの塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号1及び3に示されている。

10

【0054】

宿主細胞として真核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターを用いる。そのような発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pYES2などが例示できる。上記と同様に、本発明で用いられるポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで真核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを真核宿主細胞中で発現させることができる。発現ベクターとしてpIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1等を用いた場合には、Hisタグ(例えば(His)₆~(His)₁₀)、FLAGタグ、mycタグ、HAタグ、GFPなど各種タグを付加した融合タンパク質として、上記ポリペプチドを発現させることができる。

20

【0055】

発現ベクターの宿主細胞への導入は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション、ウイルス感染、リポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、等の周知の方法を用いることができる。

【0056】

宿主細胞から目的のポリペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせることができる。例えば尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒分別沈殿法、透析、遠心分離、限外ろ過、ゲルろ過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水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、逆相クロマトグラフィー等が挙げられる。

30

【0057】

以上の方法によって得られるポリペプチドには、他の任意のタンパク質との融合タンパク質の形態にあるものも含まれる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)やHisタグとの融合タンパク質などが例示できる。このような融合タンパク質の形態のポリペプチドも、上記した特異反応性付加ポリペプチドに包含され、本発明の第1の検出方法に用いることができる。さらに、形質転換細胞で発現されたポリペプチドは、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける場合がある。このような翻訳後修飾されたポリペプチドも、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体との抗原抗体反応による特異的結合性を有する限り、本発明の第1の検出方法において使用可能である。この様な翻訳修飾としては、N末端メチオニンの脱離、N末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリスチル化、イソプレニル化、リン酸化などが例示できる。

40

【0058】

試料中の抗体の測定は、上記したポリペプチドを抗原として用いた免疫学的測定により容易に行うことができる。免疫学的測定自体はこの分野において周知であり、反応様式で分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法、ウェスタンブロット法等がある。また、

50

標識で分類すると、放射免疫測定、蛍光免疫測定、酵素免疫測定、ビオチン免疫測定等があり、いずれの方法を用いても上記抗体の免疫学的測定を行うことができる。特に限定されないが、サンドイッチE L I S Aや凝集法は、操作が簡便で大掛かりな装置等を必要としないため、本発明の方法における上記抗体の免疫学的測定方法として好ましく適用することができる。抗体の標識として酵素を用いる場合、酵素としては、ターンオーバー数が大きいこと、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たす物であれば特段の制限はなく、通常の酵素免疫測定法に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤、ビオチン-(ストレプト)アビジン系などを用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてはアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては¹²⁵Iや³H等の通常ラジオイムノアッセイで用いられている物を使用することができる。蛍光色素としては、フルオロレッセンスイソチオシアネート(FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、シアニン蛍光色素(Cy3、Cy5等)、等の通常の蛍光抗体法に用いられる物を使用することができる。

10

20

【0059】

なお、これらの免疫学的測定法自体は周知であり、本明細書で説明する必要はないが、簡単に記載すると、例えば、サンドイッチ法では、抗原として用いる上記ポリペプチドを固相に不動化し、血清等の試料と反応させ、洗浄後、適当な二次抗体を反応させ、洗浄後、固相に結合した二次抗体を測定する。抗原ポリペプチドを固相に不動化することにより、未結合の二次抗体を容易に除去することができるため、本発明の癌の検出方法の実施形態として好ましい。二次抗体としては、例えば試料がイヌ由来であれば、抗イヌIgG抗体を用いることができる。二次抗体を上記に例示した標識物質で標識しておくことにより、固相に結合した二次抗体を測定することができる。こうして測定した二次抗体量が血清試料中の上記抗体量に相当する。標識物質として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって抗体量を測定できる。標識物質として放射性同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定することができる。

30

【0060】

本発明の第2の方法では、被験体から得た試料中に含まれ得るCAPRIN-1が測定される。上述した通り、健常の被験体と比べて膵臓癌をもつ被験体においては、イヌやヒト等のCAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体の量が有意に多いが、このことは、膵臓癌細胞において抗原であるCAPRIN-1の蓄積量が有意に多いことを示している。健常の被験体でのCAPRIN-1の発現は、検出限界以下もしくは組織中での発現は弱く細胞内部での発現に留まるものである。CAPRIN-1自体を測定することによっても、膵臓癌を検出することができるということは、下記実施例に具体的に記載されている通りである。従って、CAPRIN-1自体を測定することによっても、上記第1の方法と同様に、被験体内の膵臓癌を検出することができる。

40

【0061】

試料中のポリペプチドの測定は、周知の免疫学的測定法により容易に行なうことができる。具体的には、例えば、CAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を作製し、これを用いて免疫学的測定を行うことにより、試料中に存在し得るCAPRIN-1を測定することができる。上述した通り、抗体には交叉反応性があるため、例えば、配列番号6のイヌCAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を用いて、配列番号6のイヌCAPRIN-1のみならず、その他の哺乳動物における

50

その相同因子、例えば配列番号2又は4のヒトCAPRIN-1も測定することができる。免疫学的測定方法自体は、上述した通り周知の常法である。

【0062】

なお、本検討において、CAPRIN-1は膵臓癌細胞の表面に発現する細胞膜タンパク質であることが判明した。癌をもつ被験体の癌組織には多くのタンパク質分解酵素が含まれていることから、癌組織では、CAPRIN-1配列中の癌細胞の細胞外に発現する部分が分解を受けて癌細胞から分離し、CAPRIN-1配列中の癌細胞の細胞内に発現する部分よりも多く存在する。従って、本測定において用いられるCAPRIN-1に対する抗体又はその抗原結合性断片として、膵臓癌細胞の細胞表面に結合するものを用いれば、より多くのCAPRIN-1を検出でき、より高感度に膵臓癌を診断できる。

10

【0063】

従って、本発明では、CAPRIN-1タンパク質分子の内、膵臓癌細胞の細胞表面に発現する部分に結合する抗体が好ましく用いられる。膵臓癌細胞の細胞表面に発現するCAPRIN-1タンパク質中の部分ペプチドとして、配列表の配列番号2～30のうち配列番号6および配列番号18を除く偶数番号で表されるアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号(aa)50～98又はアミノ酸残基番号(aa)233～305の領域内の連続する7～12個又はそれ以上のアミノ酸配列から成るポリペプチドが挙げられ、具体的には、該ポリペプチドのアミノ酸配列として非限定的に、例えば、配列番号43又は配列番号61(ここで、配列番号61で表されるアミノ酸配列の中でも、配列番号62又は配列番号63で表されるアミノ酸配列の領域が好ましい。)で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。また、本発明で用いられる抗体は、これらのポリペプチドに結合するすべての抗体が含まれる。具体的には、配列番号43のアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と45のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と46のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と47のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号44と48のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号49と50のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号51と52のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号53と54のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号55と56のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号57と58のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片あるいは配列番号59と60のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片が挙げられる。

20

30

【0064】

本明細書中で使用する「抗原結合性断片」とは、抗体分子中に含まれるFab断片、F(ab')₂断片、Fv断片のような、抗原との結合能を有する抗体断片を意味する。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナルでもよいが、免疫学的測定のためには、再現性が高いモノクローナル抗体が好ましい。ポリペプチドを免疫原とするポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の調製方法は周知であり、常法により容易に行うことができる。例えば、CAPRIN-1又はその断片を単独で或いはキーホールリンペットヘモシアン(KLH)、カゼイン、血清アルブミン等のキャリアタンパク質に結合させたものを免疫原とし、アジュバントと共に動物に免疫することにより、CAPRIN-1に対する抗体を誘起することができる。免疫した動物から採取した脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、CAPRIN-1と結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、これを増殖させて、培養上清からCAPRIN-1を対応抗原とするモノクローナル抗体を得ることが出来る。なお、上記の方法は周知の常法である。

40

【0065】

50

本発明の第3の方法では、生体から得た試料中に含まれ得る、CAPRIN-1をコードする核酸（例えばmRNA又は、mRNAから合成されたcDNA）が測定される。後述の実施例に具体的に示される通り、配列番号6、8、10、12又は14のイヌCAPRIN-1又は配列番号2又は4のヒトCAPRIN-1をコードする核酸は、膵臓癌細胞において有意に高発現している。従って、試料中の該核酸を測定することによっても、生体内の癌を検出することができる。

【0066】

試料中のmRNAは、例えば、該mRNAを鋳型とするリアルタイム検出RT-PCRのような常法により定量することができ、常法であるノーザンプロットにおける染色強度等によっても概ね定量することができる。配列番号2～30のうち偶数の配列番号のCAPRIN-1をコードするcDNAの配列は、それぞれ配列番号1～29のうち奇数の配列番号に示される通りであるから、これらの配列をもとに、配列番号1～29のうち奇数の配列番号に示される塩基配列中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド（以下、「癌検出用ポリヌクレオチド」という）を調製し、該ポリヌクレオチドをプローブや核酸増幅法におけるプライマーとして用いて、該mRNAの試料中存在量を測定することができる。後述するとおり、配列番号1～29のうち奇数の配列番号に示される塩基配列中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであれば、イヌ及びヒト以外の哺乳動物におけるCAPRIN-1をコードするmRNAも測定することができる。なお、本発明において、ポリヌクレオチドはRNAでもDNAでもよい。

【0067】

本明細書で使用する「特異的にハイブリダイズする」とは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下において、対象とする部分領域とのみハイブリダイズし、その他の領域とは実質的にハイブリダイズしないという意味である。

【0068】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下」とは、通常のPCRのアニーリングやプローブによる検出に用いられる条件下のことをいい、例えば、Taqポリメラーゼを用いたPCRの場合には、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.3～9.0)、1.5mM MgCl₂といった一般的な緩衝液を用いて、54～60程度の適当なアニーリング温度で反応を行なうことをいい、また、例えばノーザンハイブリダイゼーションの場合には、5 x SSPE、50%ホルムアミド、5 x Denhardt's solution、0.1～0.5% SDS、あるいは0.1～5 x SSC、0.1～0.5% SDS、といった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて、42～65程度の適当なハイブリダイゼーション温度で反応を行なうことをいう。さらにハイブリダイゼーションのあとで、例えば0.1～0.2 x SSC、0.1% SDSにて洗浄を行う。ただし、適当なアニーリング温度又はハイブリダイゼーション温度は、上記例示に限定されず、プライマー又はプローブとして用いる癌検出用ポリヌクレオチドのT_m値及び実験者の経験則に基づいて定められ、当業者であれば容易に定めることができる。

【0069】

「実質的にハイブリダイズしない」とは、全くハイブリダイズしないか、ハイブリダイズするとしても対象とする部分領域にハイブリダイズする量よりも大幅に少なく、相対的に無視できる程度の微量しかハイブリダイズしないという意味である。そのような条件下で特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、対象の部分領域の塩基配列と一定以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられ、例えば70%以上、好ましくは80%以上、85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。最も好ましくは、該ポリヌクレオチドは、対象の部分領域の塩基配列と同一の塩基配列を有する。配列同一性の定義は、上記したアミノ酸配列の同一性と同様である。なお、癌検出用ポリヌクレオチドの末端に対象とハイブリダイズしない領域が含まれていても、プローブの場合には、ハイブリダイズする領域がプローブ全体の

10

20

30

40

50

およそ半分以上を占めていれば検出に用いることができるし、また、プライマーの場合には、ハイブリダイズする領域がプライマー全体のおよそ半分以上を占め、かつ3'末端側にあれば、正常にアニーリングして伸長反応を生じ得るので、検出に用いることができる。そのように、癌検出用ポリヌクレオチドの末端にハイブリダイズしない領域が含まれている場合において、対象の塩基配列との配列同一性を算出するときは、ハイブリダイズしない領域は考慮せず、ハイブリダイズする領域のみに着目して算出するものとする。

【0070】

なお、本発明において、「部分配列」（「部分領域」ともいう）とは、配列番号1～29のうち奇数の配列番号に示される塩基配列中の一部の配列を言い、連続する15～19塩基又はそれ以上、好ましくは連続する18塩基以上、より好ましくは連続する20塩基以上又は25塩基以上、さらに好ましくは連続する30、40又は50塩基以上の配列である。なお、本明細書において、「配列番号5に示される塩基配列」と言った場合には、配列番号5に実際に示されている塩基配列の他、これと相補的な配列も包含する。従って、例えば「配列番号5に示される塩基配列を有するポリヌクレオチド」と言った場合には、配列番号5に実際に示されている塩基配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、その相補的な塩基配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、及びこれらから成る二本鎖ポリヌクレオチドが包含される。本発明で用いられるポリヌクレオチドを調製する場合や、本発明で用いられるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製する場合には、適宜いずれかの塩基配列を選択することとなるが、当業者であれば容易にその選択をすることができる。

【0071】

癌検出用ポリヌクレオチドの塩基数は、特異性を確保する観点から、18塩基以上が好ましい。サイズは、プローブとして用いる場合には、好ましくは18塩基以上、さらに好ましくは20塩基以上からコード領域の全長以下が好ましく、プライマーとして用いる場合には、18塩基以上が好ましく、50塩基以下が好ましい。癌検出用ポリヌクレオチドの好ましい例としては、配列番号1～29のうち奇数の配列番号に示される塩基配列中の連続する18塩基以上からなるポリヌクレオチドが挙げられる。

【0072】

本明細書を参照した当業者には明らかであるが、配列番号6、8、10、12又は14のイヌCAPRIN-1タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA又は、mRNAから合成されるcDNA）量の測定には、配列番号5、7、9、11又は13中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドが用いられ、また、配列番号2又は4のヒトCAPRIN-1をコードする核酸（例えば、mRNA又は、mRNAから合成されるcDNA）量の測定には、配列番号1又は3中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドが用いられる。ただし、ある哺乳動物由来のタンパク質と他の哺乳動物由来のその相同因子とは、通常、塩基配列レベルでも配列同一性が高く、配列番号1～13の塩基配列との配列同一性も94～100%と非常に高い。そのため、例えば配列番号5中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドは、該部分領域に対応する配列番号1～29のうち奇数の配列番号中の部分領域とも特異的にハイブリダイズし得る。

【0073】

実際に、後述の実施例に記載されるように、例えば配列番号33及び34にそれぞれ示される塩基配列を有する一对のプライマーセットを用いれば、配列番号1～29のうち奇数の配列番号中の部分領域とも配列番号5中の部分領域とも特異的にハイブリダイズするので、配列番号6のイヌCAPRIN-1をコードするmRNAも、その相同因子をコードするmRNAも、いずれも測定することができる。従って、例えば、配列番号5中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、配列番号6のイヌCAPRIN-1をコードするmRNAのみならず、配列番号2又は4のヒトCAPRIN-1をコードするmRNAも測定できるし、同様に、ネコ等のその他の哺乳動物のCAPRIN-1をコードするmRNAも測定することができる。癌検出用ポリヌクレオチドを設

計する場合には、各配列番号（1～29のうち奇数の配列番号）の間で配列同一性が特に高い（好ましくは塩基配列が同一である）部分領域を選択することがより望ましい。イヌとヒトとの間で配列同一性が特に高い部分領域であれば、その他の動物種の相同遺伝子中にも該領域と配列同一性が非常に高い領域が存在すると予想されるので、そのように部分領域を選択すれば、イヌやヒト以外の動物種のCAPRIN-1をコードするmRNAを測定する精度も高めることができる。

【0074】

被検核酸の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドをPCRのような核酸増幅法のプライマー又はプローブとして用いて被検核酸を測定する方法自体は周知であり、例えば下記実施例に具体的に詳述されるRT-PCRの他、ノーザンブロット、インサイチュハイブリダイゼーション等が挙げられる。本発明においてmRNA量を測定する場合には、これら周知の測定方法のいずれをも採用できる。

【0075】

PCRのような核酸増幅法自体はこの分野において周知であり、そのための試薬キット及び装置も市販されているので、容易に行うことができる。すなわち、例えば、鋳型となる被検核酸（例えば、配列番号2～30のうち偶数の配列番号に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子のcDNA）と、癌検出用ポリヌクレオチド（プライマー）の一对とを、公知の緩衝液中で、Taqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなどの耐熱性DNAポリメラーゼ及びdNTP（ここで、N=A, T, C又はG）の存在下で、変性、アニーリング、伸長の各工程を反応液の温度を変化させることにより行う。通常、変性工程は、90～95℃、アニーリング工程は、鋳型とプライマーのTm又はその近傍（好ましくは±4℃以内）、伸長工程はTaqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなどの耐熱性DNAポリメラーゼの至適温度である72℃又はその付近の温度で行われる。各工程は30秒～2分程度で適宜選択される。この熱サイクルを例えば25～40回程度繰り返すことにより、一对のプライマーで挟まれた鋳型核酸の領域が増幅される。なお、核酸増幅法はPCRに限定されるものではなく、この分野において周知の他の核酸増幅法も用いることができる。このように、癌検出用ポリヌクレオチドの一对をプライマーとして用い、被検核酸を鋳型として用いて核酸増幅法を行うと、被検核酸が増幅されるのに対し、試料中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物を検出することにより試料中に被検核酸が存在するか否かを知ることができる。増幅産物の検出は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いたいわゆるリアルタイム検出PCRを行うことにより、検体中の被検核酸の量を定量することも可能である。なお、リアルタイム検出PCR用のキットも市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて被検核酸を半定量することも可能である。なお、被検核酸は、mRNAでも、mRNAから逆転写したcDNAであってもよい。被検核酸としてmRNAを増幅する場合には、上記一对のプライマーを用いたNASBA法（3SR法、TMA法）を採用することもできる。NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一对のプライマーを用いて容易に実施することができる。

【0076】

プローブとしては、癌検出用ポリヌクレオチドに蛍光標識、放射性標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブを用いることができる。ポリヌクレオチドの標識方法自体は周知である。被検核酸又はその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、試料中に被検核酸が存在するか否かを調べることができる。あるいは、癌検出用ポリヌクレオチドを固相化し、被検核酸をハイブリダイズさせ、固相に結合した被検核酸を標識プローブ等で検出することも可能である。このような場合、固相に結合した癌検出用ポリヌクレオチドもプローブと呼ばれ

10

20

30

40

50

る。なお、ポリヌクレオチドプローブを用いた被検核酸の測定方法もこの分野において周知であり、緩衝液中、ポリヌクレオチドプローブを被検核酸と T_m 又はその近傍（好ましくは ± 4 以内）で接触させることによりハイブリダイズさせ、洗浄後、ハイブリダイズした標識プローブ又は固相プローブに結合された鋳型核酸を測定することにより行うことができる。このような方法には、例えばノーザンプロット、インサイチュールハイブリダイゼーション、サザンプロット法等の周知の方法が包含される。本発明においては、周知のいずれの方法をも適用できる。

【0077】

本発明の検出方法では、上記のとおり測定したCAPRIN-1の（発現の）存在又は量に基づいて、対象動物（「被験体」ともいう）が膵臓癌に罹患しているか否か等を評価する。膵臓癌の検出は、対象動物におけるCAPRIN-1の（発現の）存在又は量を測定するのみでも可能であるが、検出精度を高める観点からは、1ないし複数の健常者試料におけるCAPRIN-1の発現量（抗体量、ポリペプチド量又はmRNA量）を調べて健常者基準値を取得し、対象動物の測定値を該健常者基準値と比較することが好ましい。さらに検出精度を高めたい場合には、膵臓癌に罹患していることがわかっている多数の患者から得た試料についてCAPRIN-1発現量を調べて膵臓癌患者基準値を取得し、対象動物の測定値を健常者基準値及び膵臓癌患者基準値の双方と比較してもよい。上記基準値は、例えば、各試料におけるCAPRIN-1発現量を数値化し、その平均値を算出することによって定めることができる。なお、健常者基準値と膵臓癌患者基準値は、予め多数の健常者及び膵臓癌患者についてCAPRIN-1発現量を調べて定めておくことができる。そのため、本発明の方法で基準値との比較を行なう場合には、予め定めた基準値を用いてもよい。

【0078】

本発明の検出方法では、他の癌抗原や癌マーカーによる診断を組み合わせ用いてもよい。これにより、膵臓癌の検出精度をさらに高めることができる。例えば、本発明の方法において、膵臓癌患者特異的に存在する抗体を測定する際には、上記したポリペプチドと同様に、癌組織で多く発現する別のポリペプチドを抗原として組み合わせ用いることができる。また、本発明の方法と既に知られている癌マーカーによる診断とを組み合わせ行なってもよい。

【0079】

本発明の膵臓癌の検出方法の対象となる膵臓癌としては、CAPRIN-1を発現している膵臓癌であり、膵管癌（Pancreatic ductal carcinoma）、浸潤性膵管癌（Invasive pancreatic ductal carcinoma）、膵臓癌の腺癌（Adenocarcinoma）、腺房細胞癌（Acinar Cell Carcinoma）、腺扁平上皮癌（Adenosquamous Carcinoma）、巨細胞腫（Giant cell tumor）、膵管内乳頭粘液性腫瘍（Intraductal papillary-mucinous neoplasm（IPMN））、粘液性嚢胞腺癌（Mucinous cystic neoplasm（MCN））、膵芽腫（Pancreatoblastoma）、漿液性嚢胞腺癌（Serous cystadenocarcinoma）、固体乳頭状癌（Solid-pseudopapillary tumor（SPT））、ガストリノーマ（Gastrinomas（Zollinger-Elisson症候群））、グルカゴノーマ（Glucagonomas）、インスリノーマ（Insulinomas）、多発性内分泌腺腫症1（Multiple Endocrine Neoplasia Type-1（MEN1）（Wermer症候群））、非機能性島細胞腫（Nonfunctional Islet Cell Tumor）、ソマトスタチノーマ（Somatostatinomas）、VIP産生腫瘍（VIPomas）を挙げることができるが、これらに限定されない。また、本発明の方法の対象となる被験体は哺乳動物であり、ヒトやイヌが好ましい。

【0080】

本発明の方法に供する試料としては、血液、血清、血漿、腹水、胸水などの体液、組織、細胞が挙げられる。特に、上記第1の方法及び第2の方法においては、血清、血漿、腹水、胸水、組織試料及び細胞試料を好ましく用いることができ、また、mRNA等の核酸を測定する上記第3の方法においては、組織試料及び細胞試料が好ましい。

【0081】

第1の方法で免疫学的測定の前原として用いられる上記した1もしくは複数のポリペプチド(すなわち、配列番号2のイヌCAPRIN-1及びその相同因子、特異反応性部分ポリペプチド、特異反応性修飾ポリペプチド、並びに特異反応性付加ポリペプチド)は、膵臓癌検出用試薬又は膵臓癌検出用キットとして提供することができる。該試薬は、上記ポリペプチドのみからなってもよく、また、該ポリペプチドの安定化等に有用な各種添加剤、測定に必要な緩衝液、二次抗体、酵素用基質等を別個に含んでいてもよい。また、該試薬は、プレートやメンブレン等の固相に固定化した状態で提供することもできる。なお、該ポリペプチドの好ましい例は上述した通りである。

10

【0082】

第2の方法でCAPRIN-1自体を免疫学的測定する際に用いられる、CAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片も、膵臓癌検出試薬として提供することができる。この場合の膵臓癌検出試薬も、上記抗体又は抗原結合性断片のみから成るものであってもよく、また、該抗体又は抗原結合性断片の安定化等に有用な各種添加剤等を含んでいてもよい。また、該抗体又は抗原結合性断片は、マンガンや鉄等の金属を結合させたものであってもよい。そのような金属結合抗体又は抗原結合性断片を体内に投与すると、抗原タンパク質がより多く存在する部位に該抗体又は抗原結合性断片がより多く集積するので、MRI等によって金属を測定すれば、抗原タンパク質を産生する膵臓癌細胞の存在を検出することができる。

20

【0083】

さらにまた、第3の方法でmRNA等の核酸の測定に用いられる上記した膵臓癌検出用ポリヌクレオチドの1もしくは複数も、膵臓癌検出試薬又は膵臓癌検出用キットとして提供することができる。この場合に膵臓癌検出用試薬も、該ポリヌクレオチドのみから成るものであってもよく、また、該ポリヌクレオチドの安定化等に有用な各種添加剤、測定に必要な緩衝液、標識(例えば、蛍光ラベル)等を別個に含んでいてもよい。該試薬中に含まれる該膵臓癌検出用ポリヌクレオチドは、好ましくはプライマー又はプローブである。膵臓癌検出用ポリヌクレオチドの条件及び好ましい例は上述した通りである。

30

【実施例】

【0084】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって制限されないものとする。

【0085】

[実施例]: SEREX法による膵臓癌抗原タンパク質の取得

(1) cDNAライブラリーの作製

健常な犬の精巣組織から酸グアニジウム-フェノール-クロロホルム法(Acid guanidium-Phenol-Chloroform法)により全RNAを抽出し、Oligotex-dT30 mRNA purification Kit(宝酒造社製)を用いてキット添付のプロトコールに従ってポリA RNAを精製した。

40

【0086】

この得られたmRNA(5 µg)を用いてイヌ精巣cDNAファージライブラリーを合成した。cDNAファージライブラリーの作製にはcDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Giga pack II Gold Cloning Kit(STRATAGENE社製)を用い、キット添付のプロトコールに従ってライブラリーを作製した。作製したcDNAファージライブラリーのサイズは 7.73×10^5 pfu/mlであった。

【0087】

50

(2) 血清によるcDNAライブラリーのスクリーニング

上記作製したイヌ精巢cDNAファージライブラリーを用いて、イムノスクリーニングを行った。具体的には90×15mmのNZYアガロースプレートに2210クローンとなるように宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')に感染させ、42℃、3~4時間培養し、溶菌斑(ブランク)を作らせ、IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトシド)を浸透させたニトロセルロースメンブレン(Hybond C Extra: GE Healthcare Bio-Science社製)でプレートを37℃で4時間覆うことによりタンパク質を誘導・発現させ、メンブレンにタンパク質を転写した。その後メンブレンを回収し0.5% 脱脂粉乳を含むTBS(10mM Tris-HCl、150mM NaCl pH7.5)に浸し4℃で一晩振盪することによって非特異反応を抑制した。このフィルターを500倍希釈した患犬血清と室温で2~3時間反応させた。

10

【0088】

上記患犬血清としては、膀胱癌の患犬より採取した血清を用いた。これらの血清は-80℃で保存し、使用直前に前処理を行った。血清の前処理方法は、以下の方法による。すなわち、外来遺伝子を挿入していないZAP Expressファージを宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')に感染させた後、NZYプレート培地上で37℃、一晩培養した。次いで0.5M NaClを含む0.2M NaHCO₃ pH8.3のバッファーをプレートに加え、4℃で15時間静置後、上清を大腸菌/ファージ抽出液として回収した。次に、回収した大腸菌/ファージ抽出液をNHS-カラム(GE Healthcare Bio-Science社製)に通液して、大腸菌・ファージ由来のタンパク質を固定化した。このタンパク質固定化カラムに患犬血清を通液、反応させ、大腸菌及びファージに吸着する抗体を血清から取り除いた。カラムを素通りした血清画分は、0.5%脱脂粉乳を含むTBSにて500倍希釈し、これをイムノスクリーニング材料とした。

20

【0089】

かかる処理血清と上記融合タンパク質をプロットしたメンブレンをTBS-T(0.05% Tween 20/TBS)にて4回洗浄を行った後、二次抗体として0.5%脱脂粉乳を含むTBSにて5000倍希釈を行ったヤギ抗イヌIgG(Goat anti Dog IgG-h+I HRP conjugated: BETHYL Laboratories社製)を、室温1時間反応させ、NBT/BCIP反応液(Roche社製)を用いた酵素発色反応により検出し、発色反応陽性部位に一致するコロニーを90×15mmのNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液(100mM NaCl、10mM MgClSO₄、50mM Tris-HCl、0.01%ゼラチン、pH7.5)500μl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、二次、三次スクリーニングを繰り返し、血清中のIgGと反応する30940個のファージクローンをスクリーニングして、5個の陽性クローンを単離した。

30

【0090】

(3) 単離抗原遺伝子の相同性検索

上記方法により単離した5個の陽性クローンを塩基配列解析に供するため、ファージベクターからプラスミドベクターに転換する操作を行った。具体的には宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')を吸光度OD₆₀₀が1.0となるよう調製した溶液200μlと、精製したファージ溶液250μlさらにEx Assist helper phage(STRA TAGENE社製)1μlを混合した後37℃で15分間反応後、LB培地を3ml添加し37℃で2.5~3時間培養を行い、直ちに70℃の水浴にて20分間保温した後、4℃、1000×g、15分間遠心を行い、上清をファージミド溶液として回収した。次いでファージミド宿主大腸菌(SOLR)を吸光度OD₆₀₀が1.0となるよう調製した溶液200μlと、精製したファージ溶液10μlを混合した後37℃で15分間反応させ、50μlをアンピシリン(終濃度50μg/ml)含有LB寒天培地に播き37℃一晩培養した。トランスフォームしたSOLRのシングルコロニーを採取し、

40

50

アンピシリン（終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）含有 LB 培地 37 にて培養後、QIAGEN plasmid Miniprep Kit（キアゲン社製）を使って目的のインサートを持つプラスミド DNA を精製した。

【0091】

精製したプラスミドは、配列番号 31 に記載の T3 プライマーと配列番号 32 に記載の T7 プライマーを用いて、プライマーウォーキング法によるインサート全長配列の解析を行った。このシーケンス解析により配列番号 5, 7, 9, 11, 13 に記載の遺伝子配列を取得した。この遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列（配列番号 6, 8, 10, 12, 14）を用いて、相同性検索プログラム BLASTサーチ（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）を行い既知遺伝子との相同性検索を行った結果、得られた 5 個の遺伝子全てが CAPRIN-1 をコードする遺伝子であることが判明した。5 個の遺伝子間の配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において塩基配列 100%、アミノ酸配列 99% であった。このイヌ遺伝子（配列番号 5, 7, 9, 11, 13 のいずれか）とヒト相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 98% であった。ヒト相同因子の塩基配列を配列番号 1, 3 に、アミノ酸配列を配列番号 2, 4 に示す。また、取得したイヌ遺伝子とウシ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 97% であった。ウシ相同因子の塩基配列を配列番号 15 に、アミノ酸配列を配列番号 16 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とウシ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 93~97% であった。また、取得したイヌ遺伝子とウマ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 93%、アミノ酸配列 97% であった。ウマ相同因子の塩基配列を配列番号 17 に、アミノ酸配列を配列番号 18 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とウマ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 93%、アミノ酸配列 96% であった。また、取得したイヌ遺伝子とマウス相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 87~89%、アミノ酸配列 95~97% であった。マウス相同因子の塩基配列を配列番号 19, 21, 23, 25, 27 に、アミノ酸配列を配列番号 20, 22, 24, 26, 28 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とマウス相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 89~91%、アミノ酸配列 95~96% であった。また、取得したイヌ遺伝子とニワトリ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 82%、アミノ酸配列 87% であった。ニワトリ相同因子の塩基配列を配列番号 29 に、アミノ酸配列を配列番号 30 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とニワトリ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 81~82%、アミノ酸配列 86% であった。

【0092】

（4）ヒト膵臓癌細胞株での遺伝子発現解析

上記方法により得られた遺伝子に対しヒトの正常組織（乳腺、脳、骨髄、肺、食道、膵臓、精巣）、膵臓癌細胞株 4 種（Capan-2、MIA PaCa-2、PANC-1、BxPC-3）における発現を RT-PCR（Reverse Transcription-PCR）法により調べた。逆転写反応は以下の通り行なった。すなわち、各組織 50~100mg 及び各細胞株 5~10 $\times 10^6$ 個の細胞から TRIzol 試薬（Invitrogen 社製）を用いて添付のプロトコールに従い全 RNA を抽出した。この全 RNA を用いて Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR（Invitrogen 社製）により添付のプロトコールに従い cDNA を合成した。PCR 反応は、取得した遺伝子特異的なプライマー（配列番号 33 及び 34 に記載）を用いて以下の通り行なった。すなわち、逆転写反応により調製したサンプル 0.25 μl 、上記プライマーを各 2 μM 、0.2 mM 各 dNTP、0

．65 UのExTaqポリメラーゼ（宝酒造社製）となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を25 μ lとし、Thermal Cycler（BIO RAD社製）を用いて、94 / 30秒、60 / 30秒、72 / 30秒のサイクルを30回繰り返して行った。なお、上記遺伝子特異的プライマーは、配列番号1の塩基配列（ヒトCAPRIN-1遺伝子）中の698番～1124番塩基の領域を増幅するものであった。比較対照のため、GAPDH特異的なプライマー（配列番号35及び36に記載）も同時に用いた。ヒトCAPRIN-1遺伝子の発現を確認したところ、正常組織で発現が確認できたのは精巣のみだったが、膵臓癌細胞株では発現が検出された。この結果から、CAPRIN-1は精巣以外の正常組織では発現が見られず、一方、膵臓癌細胞株においても発現していることが確認された。

10

【0093】

（5）マウスおよびイヌ正常組織におけるCAPRIN-1の発現

マウス（Balb/c、雌）およびイヌ（ビーグル犬、雌）をエーテル麻酔下およびケタミン/イソフルラン麻酔下で放血させ、開腹後、各臓器（胃、肝臓、眼球、胸腺、筋肉、骨髄、子宮、小腸、食道、心臓、腎臓、唾液腺、大腸、乳腺、脳、肺、皮膚、副腎、卵巣、膵臓、脾臓、膀胱）をそれぞれPBSの入った10cmディッシュに移した。PBS中で各臓器を切り開き、4% paraformaldehyde（PFA）を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）で一晩還流固定した。還流液を捨て、PBSで各臓器の組織表面をすすぎ、10%ショ糖を含むPBS溶液を50ml容の遠心チューブに入れ、その中に各組織を入れて4℃で2時間ローターを用いて振とうした。20%ショ糖を含むPBS溶液に入れ替え、4℃で組織が沈むまで静置後、30%ショ糖を含むPBS溶液に入れ替え、4℃で組織が沈むまで静置した。組織を取り出し、必要な部分を手術用メスで切りだした。次に、OCTコンパウンド（Tissue Tek社製）をかけて組織表面になじませた後、クライオモールドに組織を配置した。ドライアイスの上にクライオモールドにおいて急速凍結させた後、クライオスタット（LEICA社製）を用いて10～20 μ mに薄切し、スライドガラスごとヘアードライヤーで30分間風乾し、薄切組織がのったスライドガラスを作製した。次にPBS-T（0.05% Tween20を含む生理食塩水）を満たした染色瓶に入れて5分ごとにPBS-Tを入れ替える操作を3回行った。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPEN（DAKO社製）で囲んだ後、ブロッキング液として、マウス組織はMOMマウスIgブロッキング試薬（VECTASTAIN社製）を、イヌ組織は10%牛胎児血清を含むPBS-T溶液をそれぞれのをせ、モイストチャンバー上で室温で1時間静置した。次に後述の実施例3で作製したモノクローナル抗体であって、癌細胞表面に反応する、配列番号：55の重鎖可変領域と配列番号：56の軽鎖可変領域を有するCAPRIN-1に対する該モノクローナル抗体（モノクローナル抗体#8）を、ブロッキング液で10 μ g/mlに調製した溶液をのせ、モイストチャンバー内で4℃で一晩静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、ブロッキング液で250倍に希釈したMOMビオチン標識抗IgG抗体（VECTASTAIN社製）をのせ、モイストチャンバー内に室温で1時間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、アビジン-ビオチンABC試薬（VECTASTAIN社製）をのせ、モイストチャンバー内で室温で5分間静置した。PBS-Tで10分間3回

20

30

40

【0094】

50

【実施例2】：イヌ及びヒトCAPRIN-1タンパク質の作製

(1) 組換えタンパク質の作製

実施例1で取得した配列番号5の遺伝子を基に、以下の方法にて組換えタンパク質を作製した。PCRは、実施例1で得られたファージミド溶液より調製し配列解析に供したベクターを1 μ l、NdeI及びKpnI制限酵素切断配列を含む2種類のプライマー（配列番号37及び38に記載）を各0.4 μ M、0.2mM dNTP、1.25UのPrimeSTAR HSポリメラーゼ（宝酒造社製）となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を50 μ lとし、Thermal Cycler（BIO RAD社製）を用いて、98 / 10秒、68 / 1.5分のサイクルを30回繰り返すことにより行った。なお、上記2種類のプライマーは、配列番号6（イヌCAPRIN-1）のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR後、増幅されたDNAを1%アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて約1.4kbpのDNA断片を精製した。

10

【0095】

精製したDNA断片をクローニングベクターpCR-Blunt（invitrogen社製）にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシーケンシングで確認した。目的配列と一致したプラスミドをNdeI及びKpnI制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kitで精製後、目的遺伝子配列を、NdeI、KpnI制限酵素で処理した大腸菌用発現ベクターpET30b（Novagen社製）に挿入した。このベクターの使用によりHisタグ融合型の組換えタンパク質が産生できる。このプラスミドを発現用大腸菌BL21（DE3）に形質転換し、1mM IPTGによる発現誘導を行うことで目的タンパク質を大腸菌内で発現させた。

20

【0096】

また、配列番号7の遺伝子を基に、以下の方法にてイヌ相同遺伝子の組換えタンパク質を作製した。PCRは、実施例1で作製した各種組織・細胞cDNAよりRT-PCR法による発現が確認できたcDNAを1 μ l、NdeI及びKpnI制限酵素切断配列を含む2種類のプライマー（配列番号39及び40に記載）を各0.4 μ M、0.2mM dNTP、1.25UのPrimeSTAR HSポリメラーゼ（宝酒造社製）となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を50 μ lとし、Thermal Cycler（BIO RAD社製）を用いて、98 / 10秒、68 / 2.5分のサイクルを30回繰り返すことにより行った。なお、上記2種類のプライマーは、配列番号8のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR後、増幅されたDNAを1%アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて約2.2kbpのDNA断片を精製した。

30

【0097】

精製したDNA断片をクローニングベクターpCR-Blunt（invitrogen社製）にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシーケンスで確認した。目的配列と一致したプラスミドをNdeI及びKpnI制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kitで精製後、目的遺伝子配列を、NdeI、KpnI制限酵素で処理した大腸菌用発現ベクターpET30b（Novagen社製）に挿入した。このベクターの使用によりHisタグ融合型の組換えタンパク質が産生できる。このプラスミドを発現用大腸菌BL21（DE3）に形質転換し、1mM IPTGによる発現誘導を行うことで目的タンパク質を大腸菌内で発現させた。

40

【0098】

また、配列番号1の遺伝子を基に、以下の方法にてヒト相同遺伝子の組換えタンパク質を作製した。PCRは、実施例1で作製した各種組織・細胞cDNAよりRT-PCR法による発現が確認できたcDNAを1 μ l、SacI及びXhoI制限酵素切断配列を含む2種類のプライマー（配列番号41及び42に記載）を各0.4 μ M、0.2mM

50

dNTP, 1.25 UのPrimeSTAR HSポリメラーゼ(宝酒造社製)となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を50 μ lとし、Thermal Cycler (BIO RAD社製)を用いて、98 / 10秒、68 / 2.5分のサイクルを30回繰り返すことにより行った。なお、上記2種類のプライマーは、配列番号2のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR後、増幅されたDNAを1% アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて約2.1 kbpのDNA断片を精製した。

【0099】

精製したDNA断片をクローニングベクターpCR-Blunt (Invitrogen社製)にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシーケンスで確認した。目的配列と一致したプラスミドをSacI及びXhoI制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kitで精製後、目的遺伝子配列を、SacI、XhoI制限酵素で処理した大腸菌発現ベクターpET30a (Novagen社製)に挿入した。このベクターの使用によりHisタグ融合型の組換えタンパク質が産生できる。このプラスミドを発現用大腸菌BL21 (DE3)に形質転換し、1 mM IPTGによる発現誘導を行うことで目的タンパク質を大腸菌内で発現させた。

【0100】

(2) 組換えタンパク質の精製

上記で得られた、配列番号1, 5, 7の遺伝子を発現するそれぞれの組換え大腸菌を30 μ g/mlカナマイシン含有LB培地にて600nmでの吸光度が0.7付近になるまで37 $^{\circ}$ Cで培養後、イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド終濃度が1 mMとなるよう添加し、37 $^{\circ}$ Cで4時間培養した。その後4800 rpmで10分間遠心し集菌した。この菌体ペレットをリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁し、さらに4800 rpmで10分間遠心し菌体の洗浄を行った。

【0101】

この菌体をリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁し、氷上にて超音波破碎を行った。大腸菌超音波破碎液を6000 rpmで20分間遠心分離し、得られた上清を可溶性画分、沈殿物を不溶性画分とした。

【0102】

可溶性画分を、定法に従って調製したニッケルキレートカラム(担体: Chelating Sepharose (商標) Fast Flow (GE Health Care社)、カラム容量5 mL、平衡化緩衝液としての50 mM塩酸緩衝液(pH 8.0))に添加した。未吸着画分をカラム容量の10倍量の50 mM塩酸緩衝液(pH 8.0)と20 mMイミダゾール含有20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)にて洗浄操作を行った後、直ちに、100 mMイミダゾール含有20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)にて6ベッド溶出した。クマシー染色によって目的タンパク質の溶出を確認した100 mMイミダゾール含有20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)溶出画分を強陰イオン交換カラム(担体: Q Sepharose (商標) Fast Flow (GE Health Care社)、カラム容量5 mL、平衡化緩衝液としての20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0))に添加した。未吸着画分をカラム容量の10倍量の20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)と200 mM 塩化ナトリウム含有20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)にて洗浄操作を行った後、直ちに、400 mM塩化ナトリウム含有20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)にて5ベッド溶出を行い、配列番号2, 6, 8に示されるアミノ酸配列を有する各タンパク質の精製画分を得、以降これら精製画分を投与試験用の材料とした。

【0103】

上記方法によって得られた各精製標品のうち、200 μ lを1 mlの反应用緩衝液(20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ pH 7.4)に分注を行った後、エンテロキナーゼ(Novagen社製)2 μ l添加した後、室温にて一晩静置・反応を行い、Hisタグを切断し、Enterokinase Clea

10

20

30

40

50

vage Capture Kit (Novagen社製)を用いて添付プロトコールに従って精製を行った。次に、上記方法によって得られた精製標品1.2mlを、限外ろ過NANOSEP 10K OMEGA (PALL社製)を用いて、生理用リン酸緩衝液(日水製薬社製)置換した後、HTタフリンアクロディスク0.22 μ m (PALL社製)にて無菌ろ過を行い、これを以下の実験に用いた。

【0104】

[実施例3]: CAPRIN-1に対する抗体の作製

(1) CAPRIN-1由来ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製

CAPRIN-1に結合する抗体を得るために、CAPRIN-1由来ペプチド(Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Lys-Lys-Gly-Lys-Leu-Asp-Asp-Tyr-Gln(配列番号43))を合成した。このペプチド1mgを抗原として、等容量の不完全フロイントアジュバント(IFA)溶液と混合し、これを2週間毎に4回、ウサギの皮下に投与を行った。その後血液を採取し、ポリクローナル抗体を含む抗血清を得た。さらにこの抗血清をプロテインG担体(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて精製し、CAPRIN-1由来ペプチドに対するポリクローナル抗体を得た。次に得られたポリクローナル抗体の、癌細胞表面のCAPRIN-1に対する反応性を、乳癌細胞を用いて検討した。具体的には、 10^6 個のヒト乳癌細胞株MDA-MB-231Vを1.5ml容のマイクロ遠心チューブにて遠心分離し、これに上記ポリクローナル抗体を含む0.1%牛胎児血清(FBS)入りPBS溶液を添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄した後、0.1%FBSを含むPBSで500倍希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体(インビトロジェン社製)を添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社のFACSキャリバーにて蛍光強度を測定した。一方、上記と同様の操作を、ポリクローナル抗体の代わりに0.1%FBSを含むPBSを添加したものをコントロールとした。その結果、ポリクローナル抗体を処理した細胞は、コントロールの細胞に比べて蛍光強度が強く、従って、得られたポリクローナル抗体が乳癌細胞の細胞表面に結合するものであることが判った。

【0105】

(2) CAPRIN-1タンパク質に対するモノクローナルの作製

実施例2で調製した配列番号2に示される、抗原タンパク質(ヒトCAPRIN-1)100 μ gを等量のMPL+TDMアジュバント(シグマ社製)と混合し、これをマウス1匹当たりの抗原溶液とした。抗原溶液を6週齢のBalb/cマウス(日本SLC社製)の腹腔内に投与後、1週間毎にさらに3回投与を行った。最後の免疫から3日後に摘出した脾臓を滅菌した2枚のスライドガラスに挟んで擦り潰し、PBS(-)(日水社製)を用いて洗浄し1500rpmで10分間遠心して上清を除去する操作を3回繰り返して脾臓細胞を得た。得られた脾臓細胞とマウスミエローマ細胞SP2/0(ATCCから購入)とを10:1の比率にて混和し、そこに37 $^{\circ}$ Cに加熱した10%FBSを含むRPMI1640培地200 μ lとPEG1500(ベーリンガー社製)800 μ lを混和して調製したPEG溶液を加えて5分間静置して細胞融合を行った。1700rpmで5分間遠心し、上清を除去後、ギブコ社製のHAT溶液を2%当量加えた15%FBSを含むRPMI1640培地(HAT選択培地)150mlで細胞を懸濁し、96穴プレート(ヌンク社製)の1ウェル当たり100 μ lずつ、プレート15枚に播種した。7日間、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件で培養することで、脾臓細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを得た。

【0106】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパク質に対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。実施例2で調製したCAPRIN-1タンパク質溶液1 μ g/mlを96穴プレート1ウェル当たりに100 μ l添加し、4 $^{\circ}$ Cにて18時間静置した。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5%Bovine Serum Albumin(BSA)溶液(シグマ社製)を1ウェル当たり400 μ l添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウェル当たり400 μ lのPBS-Tでウェル

10

20

30

40

50

を3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウェル当たり100 μ l添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して15-30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり100 μ l添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmと595nmの吸光度値を測定した。その結果、吸光度値が高かった抗体を産生するハイブリドーマを複数個選抜した。

【0107】

選抜したハイブリドーマを96穴プレート1ウェル当たり0.5個となるようにプレートに添加し培養した。1週間後、ウェル中に単一のコロニーを形成しているハイブリドーマが観察された。それらウェルの細胞をさらに培養して、クローニングされたハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパク質に対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。実施例2で調製したCAPRIN-1タンパク質溶液1 μ g/mlを96穴プレート1ウェル当たり100 μ l添加し、4℃にて18時間静置した。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5%BSA溶液を1ウェル当たり400 μ l添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウェル当たり400 μ lのPBS-Tでウェルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウェル当たり100 μ l添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して15-30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり100 μ l添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmと595nmの吸光度値を測定した。その結果、CAPRIN-1タンパク質に反応性を示すモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマ株を得、ハイブリドーマの培養上清をプロテインG担体を用いて精製し、CAPRIN-1タンパク質に結合するモノクローナル抗体150個を得た。

【0108】

次にそれらモノクローナル抗体の内、CAPRIN-1が発現する癌細胞の細胞表面に反応性を示すものを、乳癌細胞を用いて選抜した。具体的には、10⁶個のヒト乳癌細胞株MDA-MB-231Vを1.5ml容のマイクロ遠心チューブにて遠心分離し、これに上記各ハイブリドーマの上清100 μ lを添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄した後、0.1%牛胎児血清を含むPBSで500倍希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体(インビトロジェン社製)を添加し、氷上で1時間静置した。PBSで洗浄後、ベクトンディッキンソン株式会社のFACSキャリバーにて蛍光強度を測定した。一方、上記と同様の操作を、抗体の代わりに培地を添加したものをコントロールとした。その結果、コントロールに比べて蛍光強度が強い、すなわち、乳癌細胞の細胞表面に反応するモノクローナル抗体10個(#1~#10)を選抜した。これらモノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域それぞれの配列を配列番号:44~60に示す。上記モノクローナル抗体#1は配列番号:44の重鎖可変領域と配列番号:45の軽鎖可変領域を含み、#2は配列番号:44の重鎖可変領域と配列番号:46の軽鎖可変領域を含み、#3は配列番号:44の重鎖可変領域と配列番号:47の軽鎖可変領域を含み、#4は配列番号:44の重鎖可変領域と配列番号:48の軽鎖可変領域を含み、#5は配列番号:49の重鎖可変領域と配列番号:50の軽鎖可変領域を含み、#6は配列番号:51の重鎖可変領域と配列番号:52の軽鎖可変領域を含み、#7は配列番号:53の重鎖可変領域と配列番号:54の軽鎖可変領域を含み、#8は配列番号:55の重鎖可変領域と配列番号:56の軽鎖可変領域を含み、#9は配列番号:57の重鎖可変領域と配列番号:58の軽鎖可変領域を含み、#10は配列番号:59の重鎖可変領域と配列番号:60の軽鎖

10

20

30

40

50

可変領域を含む。

【0109】

(3) 乳癌細胞の細胞表面に反応するCAPRIN-1に対する抗体が結合するCAPRIN-1タンパク質中のペプチドの同定

上記で取得した、乳癌細胞の細胞表面に反応する#1~#10のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体を用いて、それらが認識するCAPRIN-1タンパク質中の部分配列の同定を行った。

【0110】

まず、PBSで1 μ g/ μ lの濃度に溶解した組換えCAPRIN-1タンパク質溶液100 μ lに、終濃度が10mMになるようにDTT(Fluka社製)を添加し、95、5分間反応させてCAPRIN-1タンパク質内のジスルフィド結合の還元を行い、次に終濃度20mMのヨードアセトアミド(和光純薬社製)を添加し、37、遮光条件下にて30分間チオール基のアルキル化反応を行った。得られた還元アルキル化CAPRIN-1タンパク質40 μ gに、#1~#10のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体をそれぞれ50 μ g添加し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)1mLにメスアップして攪拌混合しながら4で一晩反応させた。

10

【0111】

次に、トリプシン(プロメガ社製)を終濃度0.2 μ gとなるように添加し、37 1時間、2時間、4時間、12時間反応させた後、予め1% BSA(シグマ社製)を含むPBSでブロッキングし、PBSで洗浄したプロテインA-ガラスビーズ(GE社製)と1mM炭酸カルシウム、NP-40緩衝液(20mM リン酸緩衝液(pH7.4)、5mM EDTA、150mM NaCl、1% NP-40)中で混合し、それぞれ30分間反応させた。

20

【0112】

反応液を25mM炭酸アンモニウム緩衝液(pH8.0)で洗浄した後、0.1%ギ酸100 μ lを用いて抗原抗体複合体を溶出し、溶出液についてQ-TOF Premier(Waters-MicroMass社製)を用いてLC-MS解析を行った。解析は機器に付属のプロトコールに従った。

【0113】

その結果、#1~#10のCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体がいずれも認識するCAPRIN-1の部分配列として、配列番号61のポリペプチドが同定された。さらに、モノクローナル抗体#1~#4、#5~#7および#9が認識する、上記配列番号61のポリペプチド中の部分配列として配列番号62のペプチドが同定され、さらにその部分配列ペプチドである配列番号63のペプチドをモノクローナル抗体#1~#4が認識することが判った。

30

【0114】

[実施例4]: CAPRIN-1のポリペプチドを用いた膵臓癌診断

(1) イヌの膵臓癌診断

摘出された腫瘍組織を用いた病理診断の結果、悪性の膵管癌と確定診断が患犬の血液を採取し、血清を分離した。実施例2で作製したイヌCAPRIN-1タンパク質(配列番号8)、抗イヌIgG抗体を用いてELISA法にてイヌCAPRIN-1タンパク質に特異的に反応する血清中のIgG抗体価を測定した。

40

【0115】

作製したイヌCAPRIN-1タンパク質の固相化は、リン酸緩衝化生理食塩水にて5 μ g/mLに希釈した組換えタンパク質溶液を96穴イモビライザーアミノプレート(ヌンク社製)に100 μ l/well添加し、4で一晩静置して行った。ブロッキングは、0.5%BSA(bovine serum albumin(ウシ血清アルブミン)、シグマアルドリッチジャパン社製)含有50mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)(以下ブロッキング溶液)を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうした。希釈にブロッキング溶液を用いた1000倍希釈血清を100 μ l/well添加し、室

50

温で3時間振とうして反応させた。0.05% Tween 20 (和光純薬工業社製) 含有リン酸緩衝化生理食塩水(以下PBS-T)で3回洗浄し、ブロッキング溶液にて3000倍希釈したHRP修飾イヌIgG抗体(Goat anti Dog IgG-h+HRP conjugated: BETHYL Laboratories社製)を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうして反応させた。PBS-Tで3回洗浄し、HRP基質 TMB(1-Step Turbo TMB(テトラメチルベンジジン)、PIERCE社)を100 μ l/well添加し、室温で30分間酵素基質反応させた。その後、0.5M硫酸溶液(シグマアルドリッチジャパン社製)を100 μ l/well加えて反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度測定を行った。コントロールとしては、作製した組換えタンパク質を固相化しないもの、あるいは担癌犬血清を反応させないものを上記と同様に行い比較することとした。

10

【0116】

その結果、これら担癌犬生体由来の血清は、コントロールよりも高いイヌCAPRIN-1タンパク質に対する抗体価を示した。

【0117】

(2) ヒトCAPRIN-1タンパク質を用いたイヌの膵臓癌診断

実施例2で作製したヒトCAPRIN-1タンパク質(配列番号2)を用いて、上記と同様にして、ヒトCAPRIN-1タンパク質に反応する、イヌ血清中のIgG抗体価を測定した。健常犬血清を用いた検討結果では、上記と同様に450nmでの吸光度はほとんど検出されなかった。一方、(1)の膵臓癌の患犬の血清はコントロールよりも高いヒトCAPRIN-1タンパク質に対する抗体価を示した。

20

【0118】

(3) ヒトの膵臓癌診断

実施例2で作製したヒトCAPRIN-1タンパク質(配列番号2)と抗ヒトIgG抗体を用いて、該ポリペプチドに特異的に反応する健常人血清中のIgG抗体価を測定した。ヒトCAPRIN-1タンパク質の固相化は、リン酸緩衝化生理食塩水にて100 μ g/mLに希釈した組換えタンパク質溶液を96穴イモビライザーアミノプレート(ヌンク社製)に100 μ l/well添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して行った。ブロッキングは、ブロックエース粉末(DSファーマバイオメディカル株式会社製)4gを精製水100mLに溶解した溶液を精製水で4倍希釈したもの(以下ブロッキング溶液)を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうした。希釈にブロッキング溶液を用いた1000倍希釈血清を100 μ l/well添加し、室温で3時間振とうして反応させた。0.05% Tween 20 (和光純薬工業社製) 含有リン酸緩衝化生理食塩水(以下PBS-T)で3回洗浄し、ブロッキング溶液にて10000倍希釈したHRP修飾抗ヒトIgG抗体(HRP-Goat Anti-Human IgG(H+L) Conjugate: Zymed Laboratories社製)を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうして反応させた。PBS-Tで3回洗浄し、HRP基質 TMB(1-Step Turbo TMB(テトラメチルベンジジン)、PIERCE社)を100 μ l/well添加し、室温で30分間酵素基質反応させた。その後、0.5M硫酸溶液(シグマアルドリッチジャパン社製)を100 μ l/well加えて反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度測定を行った。ポジティブコントロールとしてリン酸緩衝化生理食塩水にて50 μ g/mLに調製した卵白アルブミン抗原を固相化したものを用いた。その結果、450nmでの吸光度は、卵白アルブミン抗原に対しては高い値を示した。一方、ヒトCAPRIN-1タンパク質に対してはゼロ(0)と全く検出されなかった。

30

40

【0119】

さらに、上記と同様にして、膵管癌を患っている患者由来の血清に対して、上記と同様にしてヒトCAPRIN-1タンパク質(配列番号2のアミノ酸配列)に特異的に反応する血清中のIgG抗体価を測定した。その結果、450nmでの吸光度は、健常人では検出限界以下であるのに対し、膵臓癌患者では高い値を示した。また、実施例2で作製した

50

イヌCAPRIN-1タンパク質（配列番号8）と抗ヒトIgG抗体を用いて、上記と同様にして、イヌCAPRIN-1タンパク質に特異的に反応するヒト血清中のIgG抗体価を測定した。その結果、健常人に対し、膵臓癌患者は高い値を示した。

【0120】

以上のことから、ヒトにおいても、本手法によって膵臓癌を検出できることが判った。

【0121】

[実施例5]：CAPRIN-1に対する抗体を用いた膵臓癌診断

(1) CAPRIN-1タンパク質を測定することによる膵臓癌診断

実施例3(1)で取得した、CAPRIN-1由来ペプチド（配列番号43）に対するポリクローナル抗体と実施例3(2)で取得した、CAPRIN-1タンパク質に対する各モノクローナル抗体を組み合わせて用いることによる、サンドイッチELISA法により、実施例4(1)～(3)においてCAPRIN-1タンパク質を用いた癌診断で陽性反応が得られた検体（担癌個体由来血清）中に含まれるCAPRIN-1タンパク質自体の検出を行った。1次抗体としてポリクローナル抗体を、2次抗体として各モノクローナル抗体を用いた。上記各抗体に特異的に反応する、血清中の該タンパク質量を測定した。

【0122】

1次抗体の固相化は、リン酸緩衝化生理食塩水にて5 μ g/mlの濃度に希釈したポリクローナル抗体を96穴イモビライザーアミノプレート（ヌンク社製）に100 μ l/well添加し、室温で2時間振とうして行った。ブロッキングは、0.5%BSA（bovine serum albumin（ウシ血清アルブミン）、シグマアルドリッチジャパン社製）含有50mM重炭酸ナトリウム緩衝溶液（pH8.4）（以下ブロッキング溶液）を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうした。その後、ブロッキング溶液を用いて希釈した担癌生体由来血清を100 μ l/well添加し、室温で3時間振とうして反応させた。このとき希釈倍率は10-1000倍の10倍希釈系列で調整した。0.05%Tween20（和光純薬工業社製）含有リン酸緩衝化生理食塩水（以下PBS-T）で3回洗浄し、2次抗体は、ブロッキング溶液にて1 μ g/mlの濃度に希釈した各モノクローナル抗体を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうして反応させた。PBS-Tで3回洗浄し、3次抗体は、ブロッキング溶液にて5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG（H+L）抗体（インビトロジェン社製）を1ウェル当たり100 μ l添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液（Thermo社製）を1ウェル当たり100 μ l添加して15-30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり100 μ l添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmの吸光度測定を行った。

【0123】

その結果、2次抗体に癌細胞の細胞表面に反応する#1～#10のモノクローナル抗体を用いた場合には、膵管癌の担癌犬で、いずれの検体も高い吸光度値が検出され、健常犬では検出されなかった。一方、2次抗体にCAPRIN-1タンパク質自体には反応するが、癌細胞の細胞表面に反応しないモノクローナル抗体を用いた場合には、いずれの検体もポリペプチドの値は検出されたものの、吸光度値はいずれも検出限界以下であり、上記癌細胞の細胞表面に反応する抗体同士の間組み合わせと比較すると低い値であった。

【0124】

従って、CAPRIN-1に対する抗体を用いてCAPRIN-1タンパク質を検出するこの手法においても、癌を診断又は検査することができた。

【0125】

(2) 免疫組織化学染色法による膵臓癌組織上の抗原ポリペプチドを測定することによる癌の診断又は検査

パラフィン包埋されたヒト膵臓癌組織アレイ（BIOMAX社製）の膵臓癌組織101検体を用いて、免疫組織化学染色を行った。ヒト膵臓癌組織アレイを60 $^{\circ}$ で3時間処理後、キシレンを満した染色瓶に入れて5分ごとにキシレンを入れ替える操作を3回行った。次にキシレンの代わりにエタノールおよびPBS-Tで同様の操作を行った。0.0

10

20

30

40

50

5% Tween 20を含む10mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)を満たした染色瓶にヒト膵臓癌組織アレイを入れ、125 で5分間処理後、室温で40分以上静置した。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPEN(DAKO社製)で囲み、Peroxidase Block(DAKO社製)を適量滴下した。室温で5分間静置後、PBS-Tを満たした染色瓶に入れて5分ごとにPBS-Tを入れ替える操作を3回行った。ブロッキング液として、10% FBSを含むPBS-T溶液をのせ、モイストチャンバー内で室温で1時間静置した。次に実施例3で作製したモノクローナル抗体#1~10を5% FBSを含むPBS-T溶液で10µg/mlに調製した溶液をのせ、モイストチャンバー内に4 で一晩静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、Peroxidase Labelled Polymer Conjugated(DAKO社製)適量滴下し、モイストチャンバー内で室温で30分間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、DAB発色液(DAKO社製)をのせ、室温で10分程度静置した後、発色液を捨て、PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、蒸留水でリンスし、70%、80%、90%、95%、100%の各エタノール溶液に順番に1分間ずつ入れた後、キシレン中で一晩静置した。スライドガラスを取り出し、Glycer gel Mounting Medium(DAKO社製)で封入後、観察を行った。その結果、いずれの抗体を用いても膵臓癌組織中の膵臓癌細胞膜および膵臓癌細胞内にCAPRIN-1の発現を確認することができ、例えば抗体#8を用いた免疫組織化学染色の結果では、CAPRIN-1は全膵臓癌組織101検体の内、54検体(54%)で強い発現が認められた。

10

20

同様の方法にてヒト膵臓正常組織を含むパラフィン包埋されたヒト正常組織アレイ(BIOMAX社製)を用いて、免疫組織化学染色を行った。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPEN(DAKO社製)で囲み、Peroxidase Block(DAKO社製)を適量滴下した。室温で5分間静置後、PBS-Tを満たした染色瓶に入れて5分ごとにPBS-Tを入れ替える操作を3回行った。ブロッキング液として、10% FBSを含むPBS-T溶液をのせ、モイストチャンバー内で室温で1時間静置した。次に実施例3で作製したモノクローナル抗体#1~10を5% FBSを含むPBS-T溶液で10µg/mlに調製した溶液をのせ、モイストチャンバー内に4 で一晩静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、Peroxidase Labelled Polymer Conjugated(DAKO社製)適量滴下し、モイストチャンバー内で室温で30分間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、DAB発色液(DAKO社製)をのせ、室温で10分程度静置した後、発色液を捨て、PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、蒸留水でリンスし、70%、80%、90%、95%、100%の各エタノール溶液に順番に1分間ずつ入れた後、キシレン中で一晩静置した。スライドガラスを取り出し、Glycer gel Mounting Medium(DAKO社製)で封入後、観察を行った。その結果、いずれの抗体を用いても膵臓由来の正常組織は染色されず、CAPRIN-1の発現は認められなかった。

30

【産業上の利用可能性】

【0126】

本発明は、膵臓癌の診断または検出のために産業上有用である。

40

【0127】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

【0128】

配列番号31~42: プライマー

【配列表】

0006094220000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(56) 参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 0 1 6 5 2 7 (W O , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 7 5 7 2 2 (U S , A 1)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	检测胰腺癌的方法		
公开(公告)号	JP6094220B2	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	JP2012543815	申请日	2012-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	井戸隆喜 岡野文義		
发明人	井戸 隆喜 岡野 文義		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 C07K16/30 C12N15/02 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/47 C07K14/4738 C07K16/30 C07K16/303 C07K2317/34 C07K2317/56 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57438 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.M C12Q1/68.ZNA.A C07K16/30 C12N15/00.C C12P21/08		
优先权	2011171364 2011-08-04 JP		
其他公开文献	JPWO2013018885A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

技术领域本发明涉及使用新型肿瘤标志物检测胰腺癌的方法，具体地，涉及使用新型肿瘤标志物检测胰腺癌的方法，特别是从受试者中分离的多肽，用于检测胰腺癌的试剂或试剂盒，其包含CAPRIN-1蛋白或其片段，针对其的抗体或编码其的多核苷酸，以及用于检测胰腺癌的方法提供。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6094220号 (P6094220)
(45) 発行日 平成29年3月15日(2017.3.15)	(24) 登録日 平成29年2月24日(2017.2.24)	
(51) Int. Cl.	F 1	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
	請求項の数 23 (全 31 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2012-543815 (P2012-543815)	(73) 特許権者 000003159	
(86) (22) 出願日 平成24年8月3日(2012.8.3)	東レ株式会社	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2012/068824	東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号	
(87) 国際公開番号 W02013/018885	(74) 代理人 100091086	
(87) 国際公開日 平成25年2月7日(2013.2.7)	弁理士 平木 祐輔	
審査請求日 平成27年7月9日(2015.7.9)	(74) 代理人 100118773	
(31) 優先権主張番号 特願2011-171364 (P2011-171364)	弁理士 藤田 郎	
(32) 優先日 平成23年8月4日(2011.8.4)	(72) 発明者 井戸 隆喜	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	神奈川県横浜市広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内	
	(72) 発明者 岡野 文義	
	神奈川県横浜市広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内	
	審査官 渡邊 吉喜	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 腫瘍標の検出方法		