

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6041297号
(P6041297)

(45) 発行日 平成28年12月7日 (2016. 12. 7)

(24) 登録日 平成28年11月18日 (2016. 11. 18)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/574 (2006. 01)

GO 1 N 33/574

Z

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68

Z

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53

D

GO 1 N 37/00 (2006. 01)

GO 1 N 33/53

M

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 37/00

1 O 2

請求項の数 7 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-185847 (P2012-185847)

(22) 出願日 平成24年8月24日 (2012. 8. 24)

(65) 公開番号 特開2014-44092 (P2014-44092A)

(43) 公開日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)

審査請求日 平成27年7月24日 (2015. 7. 24)

(73) 特許権者 304020177

国立大学法人山口大学

山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1

(74) 代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74) 代理人 100102255

弁理士 小澤 誠次

(74) 代理人 100096482

弁理士 東海 裕作

(74) 代理人 100120086

弁理士 ▲高▼津 一也

(74) 代理人 100131093

弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 犬リンパ腫の診断方法及び診断キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (d) の工程を備えたことを特徴とする犬低 ~ 中分化型リンパ腫の診断方法。

(a) 犬被検体から採取した試料における DE P D C 1 B 遺伝子、又は DE P D C 1 B タンパク質の発現量を測定する工程；

(b) 非リンパ腫の犬対照から採取した試料における DE P D C 1 B 遺伝子、又は DE P D C 1 B タンパク質の発現量を測定する工程；

(c) 犬被検体から採取した試料における DE P D C 1 B 遺伝子、又は DE P D C 1 B タンパク質の発現量と、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量とを比較する工程；

(d) 犬被検体から採取した試料における DE P D C 1 B 遺伝子、又は DE P D C 1 B タンパク質の発現量が、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量に比して多い場合に、犬被検体が低 ~ 中分化型リンパ腫に罹患していると判定する工程；

【請求項 2】

遺伝子の発現量として、m R N A の発現量を測定することを特徴とする請求項 1 記載の犬低 ~ 中分化型リンパ腫を診断する方法。

【請求項 3】

遺伝子の発現量を、その遺伝子に相補的な塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配

10

20

列を含むヌクレオチドを固相化したマイクロアレイを用いて測定することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の犬低～中分化型リンパ腫を診断する方法。

【請求項 4】

遺伝子の発現量を、その遺伝子塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドをターゲットとしたリアルタイム PCR 法により測定する、請求項 1 又は 2 記載の犬低～中分化型リンパ腫を診断する方法。

【請求項 5】

タンパク質の発現量を、そのタンパク質に対する抗体を用いて測定することを特徴とする請求項 1 又は 2 のいずれか記載の犬低～中分化型リンパ腫を診断する方法。

【請求項 6】

免疫組織化学染色又は蛍光免疫組織化学染色により測定することを特徴とする請求項 5 記載の犬低～中分化型リンパ腫を診断する方法。

【請求項 7】

DEPDC1B 遺伝子、又は DEPDC1B タンパク質の発現量の測定手段を備えた、犬低～中分化型リンパ腫の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、犬リンパ腫の診断方法や診断キットに関し、より詳しくは、DEPDC1B 遺伝子、DEPDC1B タンパク質、DEPDC1 遺伝子又は DEPDC1 タンパク質を標的とした犬リンパ腫の診断方法や診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

ペットの長寿化に伴い、近年件数が急増しているのがペットの癌である。人間同様ペットの癌治療も進歩を遂げ、外科療法、放射線治療、化学療法（抗癌剤）の三大療法が積極的に行われている。犬は日本国内において約 1300 万頭が飼われており、ペットの中の飼育率が高い。犬の罹患する悪性腫瘍疾患のうち、最もよく認められる犬リンパ腫は、全腫瘍中で 7～24%、犬の造血系悪性腫瘍の 83% を占める [J-VET, (2008)3月号, p51 (非特許文献 1)]。

リンパ腫とは白血球の 1 種であるリンパ球が腫瘍性に増殖する悪性腫瘍であり、犬におけるリンパ腫の発生年齢は 6 ヶ月齢から 15 歳齢と幅広い範囲で認められるが、一般的には中～高齢（5～10 歳齢）のころに発生し、性別差は無い。発生リスクの高い犬種はボクサー、ゴールデンレトリバー、パッサートハウンドなどが挙げられている。リンパ腫は全身をめぐる血液の細胞である白血球が癌化するため、体のほぼすべての組織に発生する可能性がある。その発生する場所の違いにより症状や治療に対する反応、予後が異なる場合があるため、発生場所により、多中心型、胸腺型、消化器型、皮膚型、節外型などに分類される。

【0003】

これまでに報告されている犬リンパ腫の遺伝子診断とは、PCR 法を用いたリンパ系腫瘍クローン性（クローナリティー）解析であり、被検体試料中に、特定の遺伝子再構成がおこった均一な細胞集団が含まれているかどうか、すなわち、リンパ系腫瘍であるか否かを判定するものである [Vet. Pathol. (2003)40: p32-41 (非特許文献 2)]。つまり、T 細胞型リンパ腫であれば、T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を増幅するプライマーで PCR 法を行えば単一バンドが増幅され、B 細胞型リンパ腫であれば、免疫グロブリン重鎖 (IgH) 遺伝子を増幅するプライマーで PCR を行えば単一バンドが増幅され、B 細胞型であるか T 細胞型であるかが判定でき、リンパ腫の予後予測や治療方針の策定に有用である。

しかしながら、感染症などにより、ある抗原刺激に対して B 細胞又は T 細胞が反応性かつモノクローナルに増殖した場合にも、腫瘍ではないのにクローン性が検出されてしまう、偽陽性のケースが存在することから、この検査は犬リンパ腫の検出というよりは、病理

10

20

30

40

50

組織学的検査に追加し、犬リンパ腫の型の判定に用いられるに過ぎない。

【 0 0 0 4 】

癌治療の成功は、一部に、個体における癌の早期発見及び早期診断にかかっている。ヒトを対象とした癌診断法においては、cDNAマイクロアレイ技術や定量的RT-PCR法等を用いた、腫瘍特異的に高発現するmRNA測定検査に代表されるように、癌を早期かつ正確に診断するための研究開発が盛んである。獣医学領域においても、高度な獣医療に対するニーズが高まっていることから、犬の癌における信頼に足る遺伝子発現プロファイルの同定が求められている。また、患者の負担を考慮すると、針生検材料などのごく少量の検体での検査が可能であり、かつ、検査結果がより鋭敏で正確な診断法が望ましい。

【 0 0 0 5 】

DEPDC1B (DEP domain containing 1B) は、別名ではBRCC3 (breast cancer cell 3) とも呼ばれ、乳癌細胞の細胞分裂周期を制御する遺伝子として知られている [Int J Mol Med, (2007)Jan;19(1):29-39, (非特許文献3)]。また、ヒト乳癌組織に認められる染色体欠損部位にDEPDC1B遺伝子が含まれていたという報告もあり [Int J Cancer, (2006)Sep 1;119(5):p1052-60 (非特許文献4)]、ヒト乳癌とDEPDC1Bとの関連性が知られている。

一方、DEPDC1遺伝子は、別名ではDEPDC1A (DEP domain containing 1A) とも呼ばれ、ヒト膀胱癌において高発現していること、膀胱癌細胞の増殖にDEPDC1遺伝子発現が関与していることが知られている [Oncogene, (2007)Sep 27;26(44):p6448-55 (非特許文献5)] ほか、ヒト乳管癌組織上でのDEPDC1過剰発現 [Mol Cancer, (2011)Feb 11;10(1):15, (非特許文献6)] や、ヒト肺腺癌の一部のケースにおけるDEPDC1高発現と予後不良との相関も報告されており [Cancer Res, (2012)Jan 1;72(1):100-11, (非特許文献7)]、DEPDC1B遺伝子と同様、DEPDC1遺伝子はヒトにおける癌との関連性が知られている。しかし、両遺伝子とも、犬における機能や性質、犬の腫瘍における発現の報告は、未だに例が無い。

【 0 0 0 6 】

癌化についての遺伝子レベルでのメカニズムが解明されれば、遺伝子レベルにおける腫瘍細胞の検出や、癌悪性度の診断、進行の抑制をおこなうことが可能となり、さらに、メカニズムに基づく薬剤の選別、開発や治療法の確立が可能となる。

ヒトにおいて顕著に進んでいる癌研究ではあるが、ヒトでの発症機序が全て犬に当てはまるわけではない。例えば、ヒトにおいては、肥満と動物性脂肪分の高い食餌は大腸癌のリスクを高めるが、犬において、多くの愛玩犬が高脂肪食を与えられ肥満であるにも関わらず犬の大腸癌は稀であることから、罹患する癌の傾向や感受性が、ヒトと犬では異なることが説明できる [SCIENTIFIC AMERICAN, (2006)Dec;295(6):p94-101 (非特許文献8)]。

したがって、本発明の一つの目的は、犬における固形癌の診断等に有効な固形癌細胞の測定技術、殊に固形癌の進行に相関する臨床的指標を利用した上記測定技術を提供することにあり、本発明の解決すべき課題とした。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 大場恵典, (2008) J-VET;3月号: p51.

【 非特許文献 2 】 Burnett RC et al., (2003)Vet. Pathol.; 40: p32-41

【 非特許文献 3 】 Boudreau HE et al., (2007)Int J Mol Med.; Jan; 19(1): 29-39

【 非特許文献 4 】 Hrefna K et al., (2006)Int J Cancer; Sep 1; 119(5): p1052-60

【 非特許文献 5 】 Kanehira M et al., (2007)Oncogene; Sep 27; 26(44): p6448-55

【 非特許文献 6 】 Kretschmer C et al., (2011) Mol. Cancer; Feb 11; 10(1): 15.

【 非特許文献 7 】 Okayama H et al., (2012)Cancer Res.; Jan 1; 72(1): 100-11

【 非特許文献 8 】 Waters DJ et al., (2006)SCIENTIFIC AMERICAN; Dec;295(6): p94-101

【 発明の概要 】

【発明が解決しようとする課題】**【0008】**

本発明の課題は、犬リンパ腫を特異的に検出することができる、犬リンパ腫様癌の有無を診断する方法やそのためのキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を続けている。その過程において、犬リンパ腫特異的に高発現する遺伝子に着目して検討したところ、試行錯誤の末、DEPDC1B遺伝子やDEPDC1遺伝子が犬リンパ腫において有意に高発現することを見いだした。本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

10

【0010】

すなわち本発明は、(1)(a)犬被検体から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量を測定する工程；(b)非リンパ腫の犬対照から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量を測定する工程；(c)犬被検体から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量と、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量とを比較する工程；(d)犬被検体から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量が、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量に比して多い場合に、犬被検体が犬リンパ腫に罹患していると判定する工程；を備えたことを特徴とする犬リンパ腫の診断方法に関する。

20

【0011】

また本発明は、(2)遺伝子の発現量として、mRNAの発現量を測定することを特徴とする上記(1)に記載の犬リンパ腫を診断する方法や、(3)遺伝子の発現量を、その遺伝子に相補的な塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドを固相化したマイクロアレイを用いて測定することを特徴とする上記(1)または(2)に記載の犬リンパ腫を診断する方法に関する。

30

【0012】

また本発明は、(4)遺伝子の発現量を、その遺伝子塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドをターゲットとしたリアルタイムPCR法により測定する、上記(1)または(2)に記載の犬リンパ腫を診断する方法や、(5)タンパク質の発現量を、そのタンパク質に対する抗体を用いて測定することを特徴とする上記(1)または(2)にいずれか記載の犬リンパ腫を診断する方法に関する。

【0013】

また本発明は、(6)免疫組織化学染色又は蛍光免疫組織化学染色により測定することを特徴とする上記(5)記載の犬リンパ腫を診断する方法や、(7)犬被検体の犬リンパ腫悪性度又は犬リンパ腫分化度の程度を判定することを特徴とする上記(1)～(6)のいずれか記載の診断する方法に関する。

40

【0014】

さらに本発明は、(8)DEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量の測定手段を備えた、犬リンパ腫の診断キットに関する。

【発明の効果】**【0015】**

本発明により、犬リンパ腫を特異的に検出することにより、犬リンパ腫の早期診断が可能となる。また、一般的に癌は高分化型よりも低分化の方が悪性度は高いことが知られているが、本発明によると、DEPDC1B遺伝子やDEPDC1遺伝子の発現が、低～中

50

分化型犬リンパ腫組織に特異的に発現していることから、犬リンパ腫の悪性度又は進行度を診断することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】犬のT細胞型リンパ腫3症例より採取した細胞をリンパ腫試料とし、健常ビーグル犬3頭より採取したCD3陽性Tリンパ球を対照試料とした、Agilent社のAgilent Whole Canine Genome Oligo Microarrays 4x44KによるcDNAマイクロアレイ結果でのヒートマップ図を示す図面である。

【図2】犬リンパ腫細胞株12種類(17-71、3132、CL-1、CLBL-1、CLC、CLGL-90、CLK、CLL1390、Ema、GL-1、Nody-1、及びUL-1)、リンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞22例、健常ビーグル犬由来のTリンパ球とBリンパ球各2例、健常犬由来脾臓組織4例における、DEPDC1B遺伝子とDEPDC1遺伝子のmRNA発現をリアルタイムPCR法により解析した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の犬リンパ腫の診断(判定)方法としては、例えば、犬リンパ腫に罹患又は発症しているかどうか不明な犬被検体や犬リンパ腫かどうか識別が困難な癌腫に罹患している犬被検体(患犬)から採取した判定用試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量を測定する工程(a);非リンパ腫の犬対照から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量を測定する工程(b);犬被検体から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量と、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量とを比較する工程(c);犬被検体から採取した試料におけるDEPDC1B遺伝子、DEPDC1Bタンパク質、DEPDC1遺伝子及びDEPDC1タンパク質から選ばれる少なくとも1つの発現量が、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量に比して多い場合に、犬被検体が犬リンパ腫に罹患している、犬被検体の犬リンパ腫悪性度が高い、又は犬リンパ腫分化度が低い若しくは中程度であると判定する工程(d);を順次備えた方法であれば特に制限されず、ここで「悪性度が高い」又は「分化度が低い」犬リンパ腫とは、腫瘍の組織構築が瀰漫性で、構成細胞が大型の幼若リンパ芽球様細胞である犬リンパ腫のことをいい、また、「分化度が中程度」犬リンパ腫とは、「悪性度が高い」又は「分化度が低い」犬リンパ腫と、腫瘍の組織構築が濾胞性で、構成細胞は比較的成熟した小型のリンパ球である悪性度が低い又は分化度が高い犬リンパ腫との中間に位置する犬リンパ腫のことをいう。

なお、本発明の犬リンパ腫の診断方法には、犬リンパ腫の有無を判定する方法や、犬リンパ腫の有無を判定するためのデータを収集する方法や、犬リンパ腫治療の予後を予測するためのデータを収集する方法が含まれる。

【0018】

本発明において、「犬リンパ腫」とは、リンパ節、肝臓、脾臓、骨髄などの組織・器官・臓器から発生するリンパ系細胞の悪性腫瘍のことを意味する。

【0019】

本発明の犬被検体から採取した試料としては、犬リンパ腫が発生する可能性のあるリンパ系細胞を含むリンパ節、肝臓、脾臓などの組織・器官・臓器の非液性試料や、血液、骨髄液等の液性試料を例示することができる。例えば、上記非液性試料は、犬被検体より採取された後に、凍結処理が施された凍結組織であっても、病理組織学的処理が施された病理組織であってもよく、かかる病理組織としては、ホルマリン固定組織や、ホルマリン固定パラフィン包埋組織等を例示することができる。

【 0 0 2 0 】

本発明の非リンパ腫の犬対照から採取した試料としては、健常犬や獣医等当業者が通常用いる基準に照らして明らかにリンパ腫に罹患していないと判断される犬由来のリンパ系細胞を含むリンパ節、肝臓、脾臓などの組織・器官・臓器の非液性試料や、血液、骨髓液等の液性試料を例示することができる。また、これら対照試料は、採取された後に、犬被検体から採取した試料と同様の処理が施された対照試料であることが好ましい。

【 0 0 2 1 】

本発明の D E P D C 1 B 遺伝子や D E P D C 1 遺伝子（以下、これらを総称して「本件バイオマーカー遺伝子」という）の発現量を測定する方法としては、本件バイオマーカー遺伝子がコードする m R N A 又はその逆転写物（c D N A）の一部若しくは全部を特異的に検出できる方法であればどのような方法であってもよく、具体的には、犬被検体から採取した試料中の細胞における全 R N A を抽出・精製し、該遺伝子の m R N A に相補的な塩基配列からなるプローブを用いたノーザンブロッティング法で検出する方法や、犬被検体から採取した試料中の細胞における全 R N A を抽出・精製し、逆転写酵素を用いて c D N A を合成した後、該遺伝子の m R N A 由来の c D N A を特異的に増幅するプライマー対を用いた、競合的 P C R 法、リアルタイム P C R 法等の定量 P C R 法で検出する方法や、犬被検体から採取した試料中の細胞における全 R N A を精製し、逆転写酵素を用いて c D N A を合成した後、ビオチン（biotin）やジゴキシゲニン（digoxigenin）などで c D N A をラベルし、蛍光物質が標識されたビオチンに対する親和性の高いアビジン（avidin）やジゴキシゲニンを認識する抗体などで間接的に c D N A を標識した後、ガラス、シリコン、プラスチックなどのハイブリダイゼーションに使用可能な支持体上に固定化された、該遺伝子の c D N A に相補的な塩基配列からなるプローブを用いたマイクロアレイで検出する方法等を挙げることができる。

なお、上記定量 P C R 法を用いて検出する場合、ribosomal protein L32（R P L 3 2）、 β -アクチン、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ、リボソームタンパク質 P 1 などのハウスキーピング遺伝子を内部標準として用いてもよい。

【 0 0 2 2 】

本発明の D E P D C 1 B 遺伝子としては配列番号 1 に示される塩基配列からなる遺伝子、D E P D C 1 B タンパク質としては配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、あるいはこれら配列と 9 5 % 以上の同一性を有する同効物を好適に挙げることができる。また、本発明の D E P D C 1 遺伝子の塩基配列情報や D E P D C 1 タンパク質のアミノ酸配列情報は、N C B I（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>）等のデータベースを検索し、適宜入手することができ、D E P D C 1 遺伝子の塩基配列としては、Accession: X M _ 5 3 7 1 1 6 . 3 G I : 3 4 5 8 0 2 2 3 3（更新日；2011年12月2日）として登録されたものを、D E P D C 1 タンパク質のアミノ酸配列としては、Accession: X P _ 5 3 7 1 1 6 . 2 G I : 7 3 9 6 0 1 9 0（更新日；2011年12月2日）として登録されたものを、それぞれ具体的に例示することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の D E P D C 1 B タンパク質や D E P D C 1 タンパク質（以下、これらを総称して「本件バイオマーカータンパク質」という）の発現量を測定する方法としては、本件バイオマーカータンパク質の一部又は全部を特異的に検出できる方法であればどのような方法であってもよく、本件バイオマーカータンパク質を構成するペプチドを検出する質量分析法も含まれるが、本件バイオマーカータンパク質を特異的に認識する抗体を用いた方法が好ましく、具体的には、ウェスタンブロッティング法、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay（E L I S A）法、タンパク質アレイ（プロテインチップ）、免疫組織化学染色法、蛍光免疫組織化学染色法などを挙げることができる。

上記抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗イヌ抗体、キメラ抗体などの抗体であってもよく、また、この中には、F（a b '）₂、F a b、d i a b o d y、F v、S c F v、S c（F v）₂などの抗体の一部からなる抗体断片も含まれる。

【 0 0 2 4 】

逆に、犬被検体が犬リンパ腫に罹患していないと判定される場合とは、犬被検体から採取した試料における D E P D C 1 B 遺伝子、D E P D C 1 B タンパク質、D E P D C 1 遺伝子又は D E P D C 1 タンパク質の発現量が、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における、対応する D E P D C 1 B 遺伝子、D E P D C 1 B タンパク質、D E P D C 1 遺伝子又は D E P D C 1 タンパク質の発現量と比べ変化がない場合であり、ここで「変化がない」には統計学的有意差がないことも含まれる。

【 0 0 2 5 】

犬被検体から採取した試料における D E P D C 1 B 遺伝子又は D E P D C 1 B タンパク質の発現量と D E P D C 1 遺伝子又は D E P D C 1 タンパク質の発現量の両方が、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量よりも多いという比較結果が得られた場合（以下「重篤ケース」という）、犬被検体は犬リンパ腫に罹患している（罹患する）可能性が高い、犬被検体の犬リンパ腫悪性度が高い可能性が高い、又は被検組織の犬リンパ腫が低分化型若しくは中分化型のものである可能性が高いと判定することができる。他方、犬被検体から採取した試料における D E P D C 1 B 遺伝子又は D E P D C 1 B タンパク質の発現量と D E P D C 1 遺伝子又は D E P D C 1 タンパク質の発現量とのどちらか一方のみが、非リンパ腫の犬対照から採取した試料における対応する遺伝子又はタンパク質の発現量よりも多いという比較結果が得られた場合、前記重篤ケースに比べて、犬被検体は犬リンパ腫に罹患している（罹患する）可能性が低い、犬被検体の犬リンパ腫悪性度が高い可能性が低い、又は被検組織の犬リンパ腫が低分化型若しくは中分化型のものである可能性が低いと判定することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の犬リンパ腫の診断キットとしては、D E P D C 1 B 遺伝子、D E P D C 1 B タンパク質、D E P D C 1 遺伝子及び D E P D C 1 タンパク質から選ばれる少なくとも 1 つの発現量の測定手段を備えたものであれば特に制限されず、本件バイオマーカー遺伝子の測定手段には、本件バイオマーカー遺伝子がコードする m R N A 又はその逆転写物（c D N A）の一部若しくは全部を特異的に検出できる手段、例えば、前記 m R N A に相補的な塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドからなるプローブや該ヌクレオチドを固相化したマイクロアレイ、本件バイオマーカー遺伝子の塩基配列からなるヌクレオチド又はその一部配列を含むヌクレオチドをターゲットとしたリアルタイム P C R 法に用いられるプライマーセットを挙げることができ、本件バイオマーカータンパク質の測定手段には、本件バイオマーカータンパク質の一部又は全部を特異的に検出できる手段、例えば、バイオマーカータンパク質を特異的に認識する抗体等を挙げることができる。かかる本発明のキットには、本件バイオマーカー遺伝子や本件バイオマーカータンパク質を測定することにより、犬リンパ腫が診断しうる旨の取扱説明書を含めることが好ましい。

【 0 0 2 7 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例 1】

【 0 0 2 8 】

1 . c D N A マイクロアレイを用いた犬リンパ腫バイオマーカーの探索

1 - 1 犬被検体及び組織試料

リンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞は、山口大学動物医療センター又は東京大学動物医療センターに来院した犬のうち、細胞診又は病理組織学検査に基づいて高悪性度リンパ腫と診断された犬 2 3 頭から腫瘍細胞を含む組織試料を採取することにより単離した。それぞれの犬から採取した腫瘍細胞を含む組織試料は直ちに凍結し、R N A 抽出を行うまで - 8 0 で保存した。健常犬由来脾臓組織試料は、山口大学獣医内科学研究室において保存されている健常ビーグル由来脾臓組織試料を用いた。

1 - 2 リンパ球分離

山口大学動物医療センターにて飼育している健常ビーグル犬 3 頭より抗凝固剤（E D T

10

20

30

40

50

A)を用いて末梢血液を採取し、Lymphoprepを用いた密度勾配遠心法により末梢血単核球を回収した。T細胞特異的な細胞分子マーカーCD3に対する抗体(マウス抗イヌCD3抗体(CA17.2A12))や、B細胞特異的な細胞分子マーカーCD21に対する抗体(マウス抗イヌCD21抗体(CA2.1D6))や、かかる抗体に結合する抗マウス抗体マイクロビーズ(Miltenyi社製)を用いたMACS Separation Columns(Miltenyi社製)により、末梢血単核球からCD3陽性分画及びCD21陽性分画をそれぞれ採取した。CD3陽性T細胞やCD21陽性B細胞が分離できたことは、フローサイトメトリー(CyFlow Space、Partec社製)により確認した。

1-3 RNA抽出

凍結保存したリンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞試料(3例)からTRI reagent又はISOGENIIを用いて使用法に従い、トータルRNAを抽出した。なお、コントロールとして、上記実施例1の「2.リンパ球分離」の項目に記載の方法により単離した健常犬由来CD3陽性T細胞を用いた。

10

1-4 cDNAマイクロアレイ

抽出したトータルRNAを基に作製したcDNAを用い、マイクロアレイ(Agilent Whole Canine Genome Oligo Microarrays 4x44K)(Agilent社製)により、mRNAの発現解析を定法にしたがって行った。

1-5 結果

コントロールと比べmRNAの発現上昇が認められた3,303遺伝子のうち、84遺伝子が3倍以上発現上昇しており、かかる84遺伝子の中にはDEPDC1B遺伝子とDEPDC1遺伝子が含まれていることが明らかとなった(図1)。この結果は、DEPDC1B遺伝子及びDEPDC1遺伝子は、犬リンパ腫に特異的に高発現する遺伝子であることを示している。

20

【実施例2】

【0029】

2.リアルタイムPCR法を用いたDEPDC1B及びDEPDC1遺伝子のmRNAの発現解析

さらに、DEPDC1B及びDEPDC1遺伝子のmRNAの発現を定量的に解析するために、リアルタイムPCR法による解析を行った。

2-1 細胞株

30

本実施例において犬リンパ腫細胞株12種類(17-71、3132、CL-1、CLBL-1、CLC、CLGL-90、CLK、CLL1390、Ema、GL-1、Nody-1、及びUL-1)を用いた。このうち犬リンパ腫細胞株4種類(17-71、3132、CLGL-90、及びCLL1390)は、I10培地(IMDMに最終濃度10%のFetal Bovine Serum(FBS)、100U/ml及び100µg/mlのペニシリン/ストレプトマイシン(P&S)、L-glutamineを添加したもの)を用いて培養し、また、犬リンパ腫細胞株8種類(CL-1、CLBL-1、CLC、CLK、Ema、GL-1、Nody-1、及びUL-1)は、R10培地(RPMI 1640に最終濃度10%のFBS、100U/ml及び100µg/mlのP&S、55µMの2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加したもの)を用いて培養した。また、培養は5%のCO₂、37℃インキュベーター内で行った。

40

2-2 リアルタイムPCR法

上記犬リンパ腫細胞株12種類その他、上記実施例1で単離したリンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞22例(上記実施例1のマイクロアレイに用いた2例を含む)から上記実施例1に記載の方法によりトータルRNAを抽出し、Turbo DNA-free(Ambion社製)を用いてDNase処理を行い、添付の使用マニュアルに従ってSuperscriptII(Invitrogen社製)を用いたcDNA合成を行った。なお、コントロールとして、上記実施例1で単離した健常犬由来のTリンパ球とBリンパ球各2例その他、山口大学獣医内科学研究室において保存されている健常犬(ビーグル)由来リンパ節組織試料2例及び脾臓組織試料4例を用いた。各試料より合成したcDNAをQuantiTect SYBER Green PCR Kit(QIAGEN)を用いた定

50

量的PCR法に使用した。なお、定量PCR法に用いるDEPDC1B遺伝子を増幅するプライマーセット（配列番号5及び6）やDEPDC1遺伝子を増幅するプライマーセット（配列番号3及び4）の他、内部標準として用いるハウスキーピング遺伝子（ribosomal protein L32 [RPL32]）を増幅するプライマーセット（配列番号7及び8）は、イヌの塩基配列に基づいて設計した（表1参照）。95 15分間のプレヒーティング後、94 15秒間の熱変性、60 30秒間のアニーリング、72 30秒間の相補鎖合成を1サイクルとし、計40サイクルに機器（Applied Biosystems StepOne PCR system [Applied Biosystems社製]）を設定しPCR反応を行った。得られたデータの解析は、StepOne software V.2.2.2.（life technologies社製）を用いて行った。

2 - 3 シークエンス解析

それぞれのリアルタイムPCR産物に対して、BigDyeR Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit（ABI社製）を用いてシークエンス解析を行った。この解析にて、リアルタイムPCRにおいて目的とする遺伝子（DEPDC1BやDEPDC1遺伝子）が増幅されていることを確認した。

2 - 4 結果

図2に示すように、ハウスキーピング遺伝子（RPL32）と比較して健常犬由来リンパ球でのDEPDC1遺伝子の発現量は1/50、DEPDC1B遺伝子の発現量は1/28、Bリンパ球でのDEPDC1遺伝子の発現量は1/85、DEPDC1B遺伝子の発現量は1/595、健常犬由来リンパ節組織試料でのDEPDC1遺伝子の発現量は1/194、DEPDC1B遺伝子の発現量は1/109、脾臓組織試料でのDEPDC1B遺伝子の発現量は1/287であり、脾臓組織試料においてDEPDC1遺伝子の発現は認められなかった。一方、ハウスキーピング遺伝子（RPL32）と比較して12種類の犬リンパ腫細胞株でのDEPDC1遺伝子の発現量は4.7倍、DEPDC1B遺伝子の発現量は6.9倍、リンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞でのDEPDC1遺伝子の発現量は1/3.9、DEPDC1B遺伝子の発現量は2.9倍と両遺伝子の著しい発現上昇が認められた。さらに、リンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞22例のうち、低～中分化型リンパ腫を示す20例については、健常試料と比べすべてDEPDC1B及びDEPDC1遺伝子の発現が高かったのに対して（図2中の四角で囲った部分）、リンパ腫罹患犬由来腫瘍細胞22例のうち、高分化型リンパ腫を示す2例については、正常試料と同程度の発現量を示した（図2中の丸で囲った部分）。これらの結果は、上記実施例1のマイクロアレイの結果を支持するとともに、DEPDC1BやDEPDC1遺伝子が低～中分化型リンパ腫組織に特異的に発現することを示している。

【0030】

【表1】

リアルタイムPCRに用いたオリゴヌクレオチドプライマーの一覧

配列番号	プライマー	方向	塩基配列 (5'→3')	遺伝子名
3	YTM841	Forward	gctgtgctgtgctgaagaag	DEPDC1A
4	YTM842	Reverse	acgttggaaggaacaatc	
5	YTM657	Forward	ccacagagcacttcacagga	DEPDC1B
6	YTM658	Reverse	tctcttcgacattggcctct	
7	YTM370	Forward	tggttacaggagcaacaagaaa	RPL32
8	YTM371	Reverse	gcacatcagcagcacttca	

【産業上の利用可能性】

【0031】

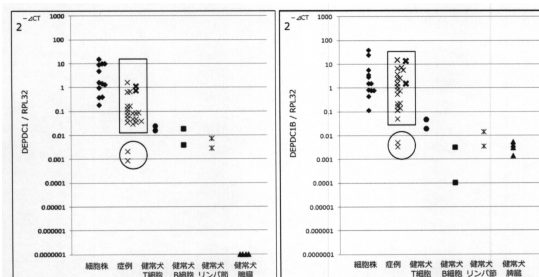
本発明は、犬リンパ腫予防や早期発見に必要な犬リンパ腫の新規検査法の提供が期待される他、犬リンパ腫の早期の段階で診断・治療をうける患畜が増えることや、犬リンパ腫

による死亡率を下げることが期待される。

【図 1】



【図 2】



* 図中✕で示された2例は、マイクロアレイに用いたT細胞型リンパ腫のうちの2症例を示す。

【配列表】

0006041297000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) G 0 1 N 33/48 P
G 0 1 N 33/53 Y
C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72)発明者 水野 拓也
山口市吉田 1 6 7 7 - 1 国立大学法人山口大学共同獣医学部内
(72)発明者 柳瀬 拓磨
山口市吉田 1 6 7 7 - 1 国立大学法人山口大学農学部内
(72)発明者 梅城 沙織
山口市吉田 1 6 7 7 - 1 国立大学法人山口大学大学院連合獣医学研究科内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 0 6 8 2 6 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 0 3 7 4 4 (U S , A 1)
特表 2 0 1 1 - 5 1 6 0 7 7 (J P , A)
特表 2 0 1 0 - 5 3 9 1 0 3 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 1 / 0 7 4 5 9 4 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 5 7 4
C 1 2 Q 1 / 6 8
G 0 1 N 3 3 / 4 8
G 0 1 N 3 3 / 5 3
G 0 1 N 3 7 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 9
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	犬淋巴瘤的方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP6041297B2	公开(公告)日	2016-12-07
申请号	JP2012185847	申请日	2012-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人山口大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人山口大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人山口大学		
[标]发明人	水野拓也 柳瀬拓磨 梅城沙織		
发明人	水野 拓也 柳瀬 拓磨 梅城 沙織		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/48 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/574.Z C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/48.P G01N33/53.Y C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12N15/12 C12Q1/686.Z C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB25 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB15 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX02		
代理人(译)	▲▼高津哉 堀内申		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2014044092A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：提供一种诊断狗淋巴瘤样癌存在的方法，能够特异性地检测狗淋巴瘤。解决方案：该方法包括：(a) 测量从分析物狗收集的样品中DEPDC1B基因，DEPDC1B蛋白，DEPDC1基因或DEPDC1蛋白的表达水平的过程；(b) 测量从没有淋巴瘤的对照犬中收集的样品中DEPDC1B基因，DEPDC1B蛋白，DEPDC1基因或DEPDC1蛋白的表达水平的过程；(c) 将从分析物狗中收集的标本中DEPDC1B基因，DEPDC1B蛋白，DEPDC1基因或DEPDC1蛋白的表达水平与从没有淋巴瘤的对照狗收集的标本中相应基因和蛋白质的表达水平进行比较的过程。；(d) 根据比较结果确定分析物狗是否患有狗淋巴瘤的过程。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特 許 公 報(B2)	(11) 特許番号 特許第6041297号 (P6041297)
(45) 発行日 平成28年12月7日(2016.12.7)	(24) 登録日 平成28年11月18日(2016.11.18)	
(51) Int. Cl.	F 1	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 Z	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 〇 2	
	請求項の数 7 (全 12 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2012-185847 (P2012-185847)	(73) 特許権者 304020177	
(22) 出願日 平成24年8月24日(2012.8.24)	国立大学法人山口大学	
(65) 公開番号 特開2014-44082 (P2014-44082A)	山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1	
(43) 公開日 平成28年3月13日(2014.3.13)	100107984	
審査請求日 平成27年7月24日(2015.7.24)	(74) 代理人 弁理士 廣田 雅紀	
	(74) 代理人 100102255	
	弁理士 小澤 誠次	
	(74) 代理人 100096482	
	弁理士 東海 裕作	
	(74) 代理人 100120086	
	弁理士 ▲高▼津 一也	
	(74) 代理人 100131093	
	弁理士 堀内 真	
(54) 【発明の名称】 犬リンパ腫の診断方法及び診断キット		最終頁に続く