

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4633984号
(P4633984)

(45) 発行日 平成23年2月16日(2011.2.16)

(24) 登録日 平成22年11月26日(2010.11.26)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/574 (2006.01)

GO 1 N 33/574

D

請求項の数 13 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2001-510845 (P2001-510845)	(73) 特許権者	501411178
(86) (22) 出願日	平成12年4月26日 (2000.4.26)		バイオセプター プロプライアタリー リ
(65) 公表番号	特表2003-504643 (P2003-504643A)		ミテッド
(43) 公表日	平成15年2月4日 (2003.2.4)		オーストラリア国 2000 ニューサウ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2000/000363		スウェールズ州 シドニー オコンネル
(87) 国際公開番号	W02001/006259		ストリート 26 レベル 10
(87) 国際公開日	平成13年1月25日 (2001.1.25)	(74) 代理人	100079049
審査請求日	平成19年2月28日 (2007.2.28)		弁理士 中島 淳
(31) 優先権主張番号	PP 9911	(74) 代理人	100084995
(32) 優先日	平成11年4月21日 (1999.4.21)		弁理士 加藤 和詳
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100085279
			弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類における前腫瘍状態および/または腫瘍状態の同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト組織における前腫瘍または腫瘍の有無を決定する方法であって、
 前腫瘍または腫瘍の有無を決定する同一のヒト組織から、第1の切片および第2の切片を提供すること、
 前記第1の切片を一次抗体である抗 P 2 X ₇ ピュリナージック受容体抗体と接触させること、
 前記第2の切片を一次抗体である非免疫血清と接触させること、
 前記第1の切片および第2の切片を、前記一次抗体が前記切片に結合することができる条件下でインキュベートすること、
 前記第1の切片および第2の切片を洗浄して未結合の一次抗体を除去すること、
 前記洗浄した第1の切片および第2の切片を、前記一次抗体と結合可能な二次抗体と接触させること、
 前記第1の切片および第2の切片を洗浄して未結合の二次抗体を除去すること、
 前記第1の切片を観察して前記二次抗体の結合を決定し、前記第1の切片の P 2 X ₇ ピュリナージック受容体の発現プロフィールを検出すること、
 前記第2の切片を観察して前記二次抗体の結合を決定し、前記第2の切片のプロフィールを決定すること、および
 前記第1の切片への前記二次抗体の結合を前記第2の切片への前記二次抗体の結合と比較して、前記第1の切片への抗 P 2 X ₇ ピュリナージック受容体抗体の結合が前記第2の

10

20

切片と比べて上昇していることを決定すること、
を含み、

前記第1の切片への抗P2X₇ピュリナージック受容体抗体の結合が前記第2の切片と比べて上昇していることが前腫瘍または腫瘍の存在を示し、これによりヒト組織における前腫瘍または腫瘍の有無を決定する、方法。

【請求項2】

前記ヒト組織が上皮組織である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記組織が前立腺である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記組織が乳房である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記抗P2X₇ピュリナージック受容体抗体が、ポリクロナール抗血清である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記抗P2X₇ピュリナージック受容体抗体が、モノクロナール抗血清である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記抗P2X₇ピュリナージック受容体抗体が、1揃いのポリクロナール抗体である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記抗体の結合の検出が、ELISAによって行なわれる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記抗体の結合の検出が、RIAによって行なわれる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記抗体の結合の検出が、ウェスタンブロットによって行なわれる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

ヒト組織における前腫瘍および/または腫瘍の有無を決定するための、抗P2X₇ピュリナージック受容体抗体の使用。

【請求項12】

被験体における前立腺癌を検出する方法であって、P2X₁、P2X₂、P2X₃、および/またはP2X₇抗体を各々用いて、被験体からの前立腺の細胞および/または組織のP2X₁、P2X₂、P2X₃、および/またはP2X₇ピュリナージック受容体の発現プロファイルを検出することを包含し、ここで、良性前立腺過形成を有する前立腺からの前立腺細胞および/または組織の発現プロファイルと比較した、前立腺の細胞および/または組織内のP2Xピュリナージック受容体発現プロファイルの密度増大が前立腺癌の存在の検出となる、方法。

【請求項13】

P2X₇ピュリナージック受容体の発現プロファイルを検出する、請求項12に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、哺乳類における前腫瘍状態および/または腫瘍状態を同定する方法、特に、組織および体液内の前腫瘍細胞および腫瘍細胞を、これら細胞中のピュリナージック受容体の区別的発現に基づいて同定する方法に関する。

【0002】

10

20

30

40

50

(背景)

癌を診断するとき、癌細胞の大きさや形状の変異性の程度、活発に分裂する細胞の割合、周辺構造物への浸潤など、生検サンプル中の細胞的特徴が考慮される。一般的に用いられる組織学的染料は、細胞下エレメントを区別的に標識するヘマトキシリン（一次染色）およびエオシン（対比染色）である。その他の診断方法では、例えば癌胎児性抗原（CEA）など、顕微鏡的分析のために可視化できる、細胞または組織の内部（細胞内エピトープを介する）あるいは表面上（細胞外エピトープを介する）の特別な診断的分子に対する抗体を用いる。以下で、幾つかの具体例を考察する。

【0003】

(前立腺癌)

西側世界では、前立腺癌の発生率が、過去5年間で2倍以上と驚くべき割合で増加している。これはどの腫瘍と比べても最も高い発生率であり、全世界で男性の癌による死亡の原因としては肺癌に次いで最も多く、またオーストラリアでは主要な死亡原因となっている[1]。良性前立腺過形成（BPH）は、50歳以上の男性によく見られ、前立腺上皮内新生物（PIN）の前駆体の可能性があり、それ自身、前立腺癌の前駆体である。剖検によると、男性の70%で80歳になるまでに前立腺に悪性細胞が見られることが判明している[2]。この疾患は人種による変動が顕著なことが特徴で、アフリカ系米国人に最も多く見られ、コーカサス人が中位、ラテンアメリカ系が僅かに低く、そしてアジア人が最も少ない。とはいえ後者のグループでは、これは最も急速に増加している腫瘍形態である。最近まで、この違いが人種上の遺伝的変異によるものか、あるいは食事によるものなのか明らかではなかった。研究により、今では食事が主な影響要因であることが分かっている[3]。

【0004】

(前立腺癌の現在の診断および治療)

この疾患の重大性にもかかわらず、診断方法は殆どなく、かつ不正確である。直腸診（DRE）、超音波、前立腺酸性ホスファターゼ値、アンドロゲン破壊（ablation）、前立腺特異的抗原（PSA）の密度、PSAの速度（velocity）、PSA年齢特異的参照範囲、およびGleasonの組織病理学的悪性度分類など現在行われている予後判定方法は、前立腺癌の臨床的結果についての信頼できる予測情報を提供できない[4]。例えば、研究によるとDREでは偽陰性率が36.9%という結果を示している[5]。PSAは、前立腺以外の多くの組織に關与する33-kDaセリンプロテアーゼであり[6]、アンドロゲン、グルココルチコイドおよびプロゲステロンによってアップレギュレーションされ、成長因子の調節に関わっていると考えられている。残念ながら、血清PSAレベルでは偽陰性診断が23%、偽陽性診断が36.7%の発生率となっている[6]。新しいスクリーニング法で検出されたケースの半分以上が、実際には偽陽性であると示唆されている[7]。PSA密度、速度、および年齢特異的参照範囲などの追加的試験を導入することで、スクリーニング法を改善しようとする試みは、まだ明確ではない。ある研究は、正常PSAの上限を4.5ng/mLに引き上げた年齢特異的PSA参照範囲を適用すると、実質的な数の臨床的に重要な癌の検出に失敗するという結果を示している[8]。このような不確実さを考えると、前立腺の生検は、悪性度を確認するためにしばしば実施されるが、この検査はまた偽陰性診断が23%という非常に不満足な成績を有している[9]。

【0005】

治療法の選択は、組織切片の顕微鏡的分析に基づく臨床的病期分類に大きく依存する[10]。この方法は、組織学的外観を臨床的結果に関連づける相当な経験と判断に左右される。残念ながら、前立腺癌組織は、非常に不均一であり、検査対象の切片において、診断上重要な特徴が簡単に見逃されてしまう可能性がある。状況をさらに複雑にしているのは、手術および放射線治療の結果を検討するための無作為抽出および対照型の臨床試験が過去に行われていないことである[2]。治療法の選択肢には、根治的な前立腺切除、放射線治療、アンドロゲン剥奪（deprivation）、および「経過観察」がある。「経過観察」が根治的介入か、という問題に対する決定的な答えには、前立腺癌の介入対観察対照試験の結果が待たれる[11]。患者にとって、これら決定の結果は重大問題である。例えば根治

10

20

30

40

50

的前立腺切除は、しばしば尿失禁、インポテンス、膀胱頸狭窄および抑うつを引き起こす [12]。良性前立腺過形成 (BPH)、前立腺上皮内新生物 (PIN)、異型腺腫様過形成 (AAH)、および前立腺癌を確実に区別する改良されたマーカーが、早急に必要とされていることは明白である。

【0006】

(癌におけるP2X受容体の役割)

ノルアドレナリン、アセチルコリンといった神経伝達物質は、シナプスおよび神経筋接合部においてのみならず、様々な組織および器官における伝達物質特異細胞受容体においても作用する。これらの受容体は、細胞内にイオンを導入する孔様の膜貫型チャンネルである。細胞内エネルギー貯蔵の分子のカレンシー (currency) として最も良く知られているアデノシン3リン酸 (ATP) は、最初は、平滑筋を収縮させるその能力に基づき、末梢神経伝達物質として取り上げられた [13]。ATPは他の神経伝達物質と同様の方法で作用し、(比較的遅い) Gタンパク質共役組織受容体 (P2Y)、比較的最近になって特徴が明らかにされた (速時性) リガンド・ゲート性のピュリナージック (purinergic) (P2X₁₋₇) イオンチャンネルの双方を活性化させることができ、さらに共伝達物質 (co-transmitter) としても作用できる。比較的最近発見されたにもかかわらず、ピュリナージック伝達系は、進化の極めて早い段階で進化したようである [14]。

【0007】

現在、遺伝的に異なるP2X受容体のサブタイプが、7個ある。それらは、コリン作動性およびアドレナリン作動性のシステムと同じくらい広く分布し、ほとんどの哺乳類の細胞で見られる [14]。これらの受容体は、神経末端もしくは局所的組織源からの細胞外ATPによって活性化される、即時反応性、膜結合性、リガンド依存性、カルシウム透過性、陽イオン選択性のチャンネルの新たなクラスを構成する [15-18]。それらは、専らカルシウムイオン透過性であるが、カリウム、ナトリウムなどその他の陽イオンも通し、それによって脱分極を仲介する [19]。例えば、肺上皮では、P2XチャンネルはCl⁻チャンネルのアップレギュレーション、K⁺分泌を刺激し、Na⁺吸収を阻害する (21)。ATPは、P2X受容体のアップレギュレーションを介して、DNA合成および細胞増殖を刺激し得る [14]。この機能は、ホスホリパーゼCの刺激、およびイノシトール-ホスフェート感受性細胞内貯蔵からのイオン化カルシウムの放出、並びに他のシグナル導入経路に関連している。これらの作用は、ATPとポリペプチド成長因子の相乗作用によって増強される [20]。P2X受容体を通じてのカルシウム流入はまた、他の神経伝達物質の分泌をトリガーし、カルシウム依存性カリウムチャンネルを活性化するシグナルの役目を果たし、他のタイプのカルシウムチャンネルを不活性化し、シナプス小胞膜のエンドサイトーシス性修復を制御し、神経伝達物質の合成を促進し、分泌に利用可能なシナプス小胞のプールを調整し、さらに複数の形態のシナプス柔軟性をトリガーする。P2X受容体の単一刺激作用に対する反応の多様性は、カルシウムで活性化される経路が多数あることを示唆している [21]。

【0008】

ピュリナージック受容体を介して作用する細胞外ATPも、ヒト乳癌細胞、前立腺癌細胞、ヒト腺癌細胞、および線維芽細胞の細胞系に対して直接的な抗癌作用を有する。細胞障害性のTリンパ球およびナチュラルキラー細胞 (NK) は、腫瘍細胞を攻撃する際にATPを放出する [22]。S期ブロック、アポトーシス、ヌクレオチドに対する透過性増大、糖ホスフェート、イオン、および他の抗癌剤との相乗作用を誘導することにより、形質転換された細胞増殖のみが阻害される。非形質転換細胞に対して、これらの効果は認められていない [14]。

【0009】

奇妙なことに、腫瘍細胞は、異常に高レベルのATPを含むことが知られている [23]。アデノシンおよびATPは共に、内皮からの一酸化窒素合成を刺激して腫瘍内血流を増大させ、その結果、強力な血管拡張を引き起こす [24]。この場合、ATPは、2PY受容体を介して作用する (26)。一酸化窒素放出は、P2X受容体の機能にも関連する。例えば、非妊娠ヒツジの子宮筋層に見られる一酸化窒素合成活動の90%は、カルシウムイオンチャンネル

10

20

30

40

50

依存性である [25]。

【 0 0 1 0 】

上皮接着タンパク質も、癌の拡大に重要な役割を果たしている [26]。創傷の治癒において、細胞損傷シグナルは、細胞外P2X受容体と細胞間細隙 (gap) 結合を介して広がり、カルシウムイオンによって誘発される波動伝播を刺激する [27]。P2Xチャンネルによって通された細胞内カルシウムイオンは、微小細管に沿った膜結合性オルガネラの輸送、ECMの再モデル化、および接着分子であるE-カドヘリンのアップレギュレーションをトリガーする [28]。前立腺上皮腺房に見られる筋上皮細胞は、in situおよびインビトロの両方で、癌細胞に対し重要なパラクリン効果を発揮する。癌細胞は、ECM分子、タンパク質分解酵素インヒビター、および脈管形成インヒビターの高レベル発現によっても影響を受ける [29]。転移性浸潤の際、細胞外カルシウム流入は、浸潤性細胞による組織内浸透を助長する膜会合型の金属結合タンパク質分解酵素を活性化させる。ウロキナーゼ・プラスミノゲン活性化因子もまた、乳癌および前立腺癌を含む幾つかの悪性疾患の進行に深く関与している [30]。

10

【 0 0 1 1 】

比較的簡便な技術を用いて、より信頼度の高い結果を提供するためには、癌の病期分類ならびに診断に関する現在の技術を改善する必要がある。自動化が可能な診断方法も有益であろう。

【 0 0 1 2 】

本発明の目的は、従来技術の少なくとも幾つかの欠陥を克服あるいは大幅に改善するか、または有益な代替法を提供する、前腫瘍性の (pre-neoplastic) 細胞および / または腫瘍性の (neoplastic) 細胞を同定する方法を提供することである。

20

【 0 0 1 3 】

(発明の概要)

ピュリナージック神経系は、これよりもよく知られているが作用のより遅いアドレナリン作動性およびコリン作動性の神経系と並行に作動する。これらと同様、ピュリナージック神経系は、脳、シナプス、神経筋接合部、末梢神経系および平滑筋において作動する。これら作用の速いリガンド・ゲート性陽イオン受容体チャンネルを活性化させる伝達物質はATPであり、これは組織内のピュリナージック受容体をトリガーすることによって作用し、細胞内へのイオン流入を含む様々な代謝性反応を生じる。

30

【 0 0 1 4 】

P2Xピュリナージック受容体のサブタイプそれぞれの細胞外ドメインを区別できる、高度に特異的でユニークな一揃いの抗体が開発されている。これらの受容体は、免疫細胞化学法を用いて容易に可視化でき、細胞表面、管状および点状の標識など、様々な発現パターンで存在する。驚くべきことに、P2X受容体の発現が、前癌 (pre-cancer) および癌の各病期、さらには若年対年齢の哺乳類の各組織についても特徴的であることが明らかにされている。これらの変化は、成長、細胞外マトリックス、代謝性因子および神経支配因子の際立った差異、並びに上皮イオン化カルシウムおよび微小細管の増大を随伴する。本発明は従って、前癌状態 (例えば、過形成)、癌病期を診断し、発癌の基礎的な生理と病因を研究するための新しいツールを提供する。

40

【 0 0 1 5 】

第1の態様によると、本発明は、哺乳類における前腫瘍および / または腫瘍状態を病期分類および / または診断する方法であって、該哺乳類からの細胞および / または組織のP2Xピュリナージック受容体発現プロファイルの検出、並びに正常な細胞および / または組織の予め定められた発現プロファイルと該プロファイルとの比較を包含する方法、を提供する。

【 0 0 1 6 】

第2の態様によると、本発明は、哺乳類における発癌の病因を決定する方法であって、哺乳類からの細胞および / または組織のP2Xピュリナージック受容体発現プロファイルの検出、並びに正常な細胞および / または組織の予め定められた発現プロファイルと該プロフ

50

ィールとの比較を包含する方法、を提供する。

【0017】

第3の態様によると、本発明は、被験体における前立腺癌を診断する方法であって、P2X₁、P2X₂、P2X₃、および/またはP2X₇抗体を各々用いて、被験体からの前立腺の細胞および/または組織のP2X₁、P2X₂、P2X₃、および/またはP2X₇ピュリナージック受容体の発現プロファイルを検出することを包含し、ここで、良性前立腺過形成を有する前立腺からの細胞および/または組織の発現プロファイルと比較した、前立腺の細胞および/または組織内のP2Xピュリナージック受容体発現プロファイルの密度増大が前立腺癌の存在の診断となる方法、を提供する。

【0018】

第4の態様によると、本発明は、被験体における乳癌を診断する方法であって、P2X₂またはP2X₃抗体を各々用いて、被験体からの乳房の細胞および/または組織のP2X₂またはP2X₃ピュリナージック受容体の発現プロファイルを検出することを包含し、ここで、正常被験体の乳房からの乳房細胞および/または組織の発現プロファイルと比較した、乳房細胞および/または組織内のP2Xピュリナージック受容体発現プロファイルの密度減少が乳癌の存在の診断である方法、を提供する。

【0019】

第5の態様によると、本発明は、哺乳類の被験体における前腫瘍および/または腫瘍状態を病期分類および/または診断するためのP2Xピュリナージック受容体抗体試薬の使用を提供する。

【0020】

第6の態様によると、本発明は、哺乳類の被験体における発癌の病因を決定するためのP2Xピュリナージック受容体抗体試薬の使用を提供する。

【0021】

第7の態様によると、本発明は、P2Xピュリナージック受容体特異的抗体試薬と複合体化された、哺乳類の単離された細胞または組織サンプルを提供する。

【0022】

第8の態様によると、本発明は、哺乳類における前腫瘍および/または腫瘍状態を診断するキットであって、哺乳類からの細胞および/または組織を含むサンプルにおいてP2Xピュリナージック受容体発現プロファイルを検出する手段、並びに予め定められた発現レベルと該発現レベルを比較する手段を含むキット、を提供する。

【0023】

第9の態様によると、本発明は、P2Xピュリナージック受容体に特異的な抗体試薬であって、前腫瘍または腫瘍状態にある細胞および/または組織と正常な細胞および/または組織とを区別し得る試薬、を提供する。

【0024】

第10の態様によると、本発明は、前腫瘍または腫瘍状態にある細胞および/または組織と正常な細胞および/または組織とを区別するのに使用されるとき、P2Xピュリナージック受容体に特異的である抗体試薬を提供する。

【0025】

第11の態様によると、本発明は、細胞および/または組織中の機能性P2X受容体と非機能性P2X受容体を区別するのに使用されるとき、P2Xピュリナージック受容体に特異的である抗体試薬を提供する。

【0026】

好ましくは、哺乳類はヒトであるが、該方法がどのような哺乳類にも適用し得ることは当業者に明白であろう。好ましくは、細胞は、前立腺の組織および/または細胞、或いは、乳房の組織および/または細胞である。これら細胞は、生検により入手し得るが、体液、あるいは前立腺の組織および/または細胞の場合は直腸診滲出物または精液からも入手し得る。

【0027】

10

20

30

40

50

好ましくは、抗体試薬は、ポリクロナール抗血清を含む。好ましくは、P2X抗体試薬は、P2X₁、P2X₂、P2X₃、P2X₄、P2X₅、P2X₆、またはP2X₇ 受容体に特異的であり、最も好ましいのは、P2X₁、P2X₂、P2X₃、またはP2X₇ 受容体に特異的である。抗体試薬は、ポリクロナールまたはモノクロナールである1揃いの抗体であり得ることは当業者に明白であろう。この1揃いのP2X受容体抗体は、P2X受容体サブタイプの何れかの組み合わせ、特にP2X₁、P2X₂、P2X₃、およびP2X₇ の組み合わせを含み得ることも当業者に明白であろう。

【0028】

好ましくは、P2X受容体発現プロファイルの検出は、免疫組織化学的手段による。細胞または組織サンプルのソースおよび入手可能な試薬によっては、P2X受容体がELISA、RIAあるいは類似の免疫学的技法を含む別の手段によって検出できることは当業者に明白であろう。好ましくは、P2X受容体は、比色分析アッセイによって検出される。ウェスタンブロット法およびP2Xピュリナージック受容体mRNAの検出が、P2X受容体発現プロファイルの決定に有用であり得ることも当業者に明白であろう。

【0029】

本発明に関連して、「前腫瘍 (pre-neoplastic) 細胞」という用語は、過形成 (hyperplastic) または肥大性 (hypertrophic) である細胞を含む。

本発明に関連して、「1揃いの抗体 (suite of antibodies)」という用語は、同一または異なる抗原に特異的な幾つかの異なる抗体を含み、P2X受容体サブタイプの各々を特異的に区別できる、ポリクロナール抗体を含む。抗体がモノクロナールの場合、「1揃いの抗体」という用語は、P2X受容体サブタイプの各々を特異的に区別できる抗体のパネルも含む。

【0030】

本発明に関連して、「発現プロファイル」の検出は、発現のパターンまたは密度の検出を含む。

【0031】

文脈において別途明確に定められていない場合には、「含む」、「含んでいる」、および類似の語は、詳細な説明および特許請求の範囲全てにわたり、排他的あるいは網羅的な意味と対立するものとしての包括的な意味、即ち、「を含むが、これらに限定されるものではない」という意味に解釈されるものとする。

【0032】

(発明の説明)

本発明の望ましい実施態様を、実施例のみ、および添付の図面を参照しながら説明する。

【0033】

実施例1 - 免疫組織化学的手法

本研究で用いられた免疫組織化学的方法は、パークレー (Barclay) から翻案したものである [31]。厚さ8 μ mの切片を、冷凍切断器リヒャルト・ユング2800フリゴカット (Reichert Jung 2800 Frigocut) を使って、未固定の凍結組織から切除した。切片を室温で1時間風乾した後、20 $^{\circ}$ Cでアセトンにて12時間固定し、抗体標識化に先立って室温で1時間風乾した。続いて、切片を、ウサギまたはヒツジの抗P2X₁、P2X₂、P2X₃、P2X₄、P2X₅、P2X₆、またはP2X₇抗体のいずれか1つと共に室温でインキュベートした。洗浄後、切片は、二次抗体中でインキュベートした (ウサギ一次物には、HRP共役ヤギ抗ウサギ二次抗体 (Dako) の1:30の希釈物で30分、ヒツジ一次物には、HRP共役ヤギ抗ヒツジ二次抗体 (Dako) で)。スライドを再度すすぎ、続いて、15%のジアミノベンジジン4塩酸塩 (DAB - シグマ) に10分間浸漬した。切片をすすぎ、風乾し、DPX (メルクMerck) にマウントした。対照スライドは、一次培養の間は希釈緩衝液中でインキュベートし、その後、実験用スライドと同様の方法で処理した。陰性対照スライドは、一次抗体を非免疫血清に置き換えたこと以外、実験用スライドと同様の方法で処理した。

【0034】

実施例2 - 抗体産生

ハンセン (Hansen) ら [15] が採用したアプローチに従い、ラットP2X₁ [32]、P2X₂ [33

10

20

30

40

50

]、P2X₃ [34]、ラットP2X₄ [35]、ラットP2X₅ [36]、ラットP2X₆ [36]、ラットP2X₇ [37]、ヒトP2X₇ [38]、ヒトP2X₁ [39]、ヒトP2X₃ [40]、ヒトP2X₄ [41]、およびヒトP2X₅ [42]のクローン化した受容体のコンセンサス配列を、適切なエピトープについて調べた。ラットP2X₁に使用されているセグメント、Lys199-Cys217に対応する非相同エピトープが、ラットP2X₃、ラットP2X₆、およびラットP2X₇で用いられた。6kDaジフテリア毒素ドメインとの架橋結合のためのC末端側Cys残基が付着した配列、Ile235-Gly251を使用したラットP2X₄には、様々な変異が適用された。Cys130-Gly153のCIドメイン [15] 内にある領域からP2X₂エピトープが選択された。第2の膜貫ドメイン近傍ではあるが、依然として細胞外（やはり共役のためにC末端側Cysが付着しているLys314-Ile333）である領域から、ラットP2X₅エピトープが選択された。ラットP2X₄とはおおむね相同ではあるが、P2X₄とP2X₅との交叉標識は発生しなかった。ラットの配列に対する全ての抗体は、対応するヒト受容体の標識が可能であった。ヒトP2X₁およびP2X₇の配列には、別の一個のエピトープが使用された。これは、正にLys68-Val184から第1膜貫ドメインにC末端側を取り、マレイミドカプロイルNヒドロキシスクシンイミドを使って、ジフテリア毒素ドメインを介して共役のためにN末端側Cysを付着させたものである。ヒトP2X₃抗体に関するエピトープはラットに用いられたものと等価な配列であり、一方、ヒトP2X₄およびヒトP2X₅に関するエピトープはそれぞれCys270-Asn287とCys272-Ser288であった。合成はすべて、ABIシンセサイザー [43] で標準的なt-BOCケミストリーを用いて行われた。ペプチド抗原複合体は、5mg/mLで水に懸濁し、フロイント完全アジュバントと混合してアリコートを経乳化した。ペプチド2mgを含む1mLの乳剤を筋肉注射し、フロイント不完全アジュバントを使用して、2週間の間隔で2回目、3回目、4回目、および5回目の免疫化を引き続き行なった。各々のエピトープに使用されたウサギまたはヒツジにおいて適切な抗体力価が得られたことが明らかになった後、静脈穿刺により最終血を10-12週間目に採取した。この血液は37℃で30分間インキュベートされ、4℃で15時間保存された後、遠心法で血清が採取され、小さなアリコートとして-20℃で保存された。血清は各々のペプチドに特異的な抗体について、ELISA検定法で試験された [15]。ELISA検定法で、バックグラウンドを超える吸収度1.0となる血清希釈の逆数として定められる抗体力価は、免疫前サンプルの225 ± 25と比較して、75,000 ± 4,000の範囲であった。

抗体の特定エピトープに対する各々の抗体のアフィニティ精製は、バックグラウンドの低下を引き起こしたが、同一の標識傾向を示した。

【 0 0 3 5 】

実施例3 抗体の特異性

使用されたそれぞれのP2X抗血清は、多くのケースで類似の分布を有しているが、他のケースでは、区別的に異なる分布になっており、抗血清が特異性を欠如していないことを示す。特異性は、同族ペプチドに対する血清のアフィニティ精製によって実証された。抗体の特異性をさらに検証するため、10mM濃度のP2X₁エピトープの存在下および非存在下で、対応するP2X₁cDNAをトランスフェクトされた細胞に、P2X₁に対する抗体のような個々の抗体を加えた。トランスフェクトされた Xenopus の卵母細胞に免疫学的標識および共焦点画像撮影を実施した結果、予想した通り、発現されたP2X₁が細胞膜内に位置し、吸収コントロールとしての10mM濃度の同族ペプチドの存在は、P2X₁染色をブロックすることを

実証した [18]。他の全ての抗体の個々の特異性についても、同様に実証された。

【 0 0 3 6 】

実施例4 形態の超微細構造検査のための組織標本

組織は、形態学的検査のために以下のように処理された： 大きさ約3mm x 3mmの切片を0.1Mトリス緩衝液、pH7.2中2.5%グルタルアルデヒドで1時間固定した。その後、切片を洗浄し、2%の4酸化オスミウム水溶液中で2時間、後固定した。さらに洗浄した後、組織を一連の等級のアルコールで脱水し、スパー（Spurr's）樹脂に包埋した。50℃で18時間硬化を行った。ダイヤモンドナイフで100nm切片を切り出し、酢酸ウラニルおよびレイノルドクエン酸鉛を用いて通常の方法で染色してから、フィリップス（Phillips）400の透過型

電子顕微鏡で検査した。

【0037】

実施例5 超微細構造の免疫細胞化学

スレイター (Slater) の方法 [44] を使用した。簡単に述べると、薄い切片 (100nm) を切り出し、300番ニッケル製のメッシュグリッドに載せた。30分間ブロッキング液 (PBS中1%のBSA) 中でインキュベートした後、室温で1時間、HRP共役ヤギ抗ウサギ二次抗体またはHRP共役ヤギ抗ヒツジ二次抗体 (1:100に希釈) を含むブロッキング液 (0.05%のトウイン20を添加したもの) の液滴表面上に切片を置いた。グリッドはその後、PBSの中で10分間3回すすいでから、10nmのゴールド (ナノプローブ) と共役させたヤギ抗ウサギ二次抗体の液滴上に1時間室温にて置いた。グリッドはさらにPBSで2回、ついで蒸留水で1回、各々10分間洗浄し、その後、2%の4酸化オスミウム水溶液の蒸気下に1分間置いた。次に切片を、酢酸ウラニル水溶液で20分間、クエン酸鉛で10分間染色し、蒸留水で10分間2回すすいだ後、フィリップス (Phillips) 400透過型電子顕微鏡で、80kVで検査した。

10

【0038】

実施例6 ヒト癌組織内のP2X受容体

正常な4例とヒト前立腺癌6例の研究において、P2X₁、P2X₃、およびP2X₄サブタイプは、ヒト前立腺癌組織で顕著な増加を示した。正常な組織では、これらサブタイプに関する標識は全く認められなかった。癌組織内のP2X₁の標識パターン (図1) は、前立腺疾患の各病期ごとに標識された腺房上皮細胞の比率が増えるという点で特に興味深く、腫瘍性形質転換とP2X₁腺房標識の程度の直接的な相関を示唆する。幾つかの前立腺癌細胞では、P2X₅も増加した (結果は示されていない)。正常な組織では、P2X₅の標識はごく僅かか又は全く見られなかった。

20

【0039】

実施例7 若年対高齢ウイスターラットにおけるP2X受容体、成長、神経支配、および代謝性因子、イオン化カルシウム・モジュレーション

P2X受容体とアポトーシス:

12週齢のラット4匹と1.5年齢のラット4匹の前立腺を比較した研究から、加齢ラットで、ヒトにおけるBPHに類似した、上皮過形成の著しい増加が検出された (図2)。ヒトの癌組織におけるように、P2X₁、P2X₃、およびP2X₄の受容体、ならびにチロシンキナーゼA受容体抗体は、若いラットのそれと比較した場合、加齢ラットの前立腺上皮でアップレギュレーションされていた。先に論じた通り、これは、タンパク質リン酸化 (活性化)、DNA合成、細胞内微小細管の発現 (オルガネラ輸送)、他の神経伝達物質に関する周辺受容体のアップレギュレーション、細胞増殖、およびアポトーシスを示唆する上皮細胞へのイオン (主として、イオン化カルシウム) 流入の増大を示す。アルファ (1B) (電圧・ゲート性カルシウムチャンネル) の増加、およびカルシウム調節ホルモンであるスタニオカルシン (stanniocalcin) の低下も、加齢ラットの前立腺に見られた。PDGFとIGF-1は共にアポトーシスを阻害し、加齢ラットで減少した。この様に、加齢ラットの前立腺は、アポトーシスおよびヒト前立腺癌組織と類似するP2X受容体発現の変化を受けるのであり、従って、前立腺癌の病因の研究に利用され得る。

30

【0040】

神経支配、他の受容体、および代謝性因子:

加齢ラットでは、前立腺上皮下の線維筋性隔壁において微小細管構造の増加があった。これら構造は、アポトーシスに関連したピュリナージック受容体P2X₁、P2X₇、イオン化カルシウム、および神経支配因子VAMP、ムスカリン性受容体 (M2)、SV-2、SNAP-25、S-100、トランスフェリン受容体を写した顕微鏡写真像に類似して見え、加齢ラットではそのいずれもがアップレギュレーションされていた。アルファ (1B) 電圧・ゲート性カルシウムチャンネルおよびチロシンキナーゼA受容体も、加齢ラットでアップレギュレーションされていた。スタニオカルシンはダウンレギュレーションされていたが、P2X₁およびP2X₇のアポトーシス性カルシウムチャンネル受容体はアップレギュレーションされていた。これらのデータは、加齢ラットにおける前立腺上皮のカルシウムイオン流入、代謝速度、微小細

40

50

管輸送および神経支配の増大を示すと同時に、このモデルがヒト前立腺癌の研究にも使用できることを示唆する。

【 0 0 4 1 】

実施例8 - 乳癌細胞系

凍結切片として供給された6例の乳癌細胞系において、P2X₁、P2X₃、およびP2X₄ピュリナージック・サブタイプを、前立腺組織の標識に用いたのと同様の技法で標識した。標識のパターン(図3)は、ヒト前立腺癌組織(図1)および加齢の雄ウイスター(Wistar)ラットの前立腺(図2)の双方で見られた標識パターンを起想させるものであった。

【 0 0 4 2 】

実施例9 前立腺癌の診断(図4a-f、および5a-f)

ピュリナージック受容体カルシウムチャンネル(P2X₁₋₇)に特徴的である発現を、正常な前立腺組織と前立腺疾患の各期を示す65例の病理学的な前立腺組織において調査した。即ち、正常、BPH、前腫瘍、および癌性(Gleason分類によるスコアスコア5-9)の各病期である。明瞭な転移の特徴がP2X₁、P2X₂、P2X₃、およびP2X₇で標識された組織に認められた。P2X抗体産生と標識化のプロトコルの長々しい最適化と標準化のプロセスの後、標準化されたプロトコルが開発された。各々濃度0.5 μg/mL IgGで、1:100でPBSに希釈したP2X₁、P2X₂、P2X₃、およびP2X₇サブタイプの混合物は、上記の転移の特徴を実証するのに最適の試薬であることが判明した。P2X₄、P2X₅、またはP2X₆標識は、それほど有意ではなかった。前立腺癌の各カテゴリーに属する組織切片の標識にこの試薬を用いたところ、癌の進行に伴って、核から細胞質および外側原形質膜へのP2X標識の連続的発現と転移が起こり、最後は、主に尖端上皮で発現することが明らかになった(図4f、5c、5f)。

【 0 0 4 3 】

P2X標識は、BPH組織では完全に脱発現化されていた(図4b、4e)。前腫瘍性P2Xの転移は、3つの異なる病期で起きた。第1期は、薄いバックグラウンド上に密で顕著なP2X標識された上皮核(PEN)で特徴付けられた(図4c、4f)。第2期は、PENの進行する脱発現化と、密で顕著な点状の細胞質標識の外観、核膜および外側原形質膜の標識、ならびに尖端上皮上のシグナル増加が特徴的であった(図5b、5c)。第3期は、核膜上でのみ標識された核(NO)、細胞質シグナルの不在、点状標識というより均質で、尖端上皮に密な標識で示された(図5e、5f)。

【 0 0 4 4 】

本研究では、ケースの56%がヘマトキシリン エオシン(H & E)染色法により正常もしくはBPHと診断され、第1期または第2期のP2X標識を示した。残りのケースは、Gleason分類でG5からG9の範囲のスコアで、P2Xは第2期または第3期の標識の特徴を有していた。第3期の標識は、常に癌の組織学的特徴を随伴していた(図5e)。真性非腫瘍性BPH組織は、全てのP2Xサブタイプの完全な脱発現化が上皮および間質で起こったため、容易に見分けられた。組織学的には正常と診断されたが、P2X標識の特徴を示している生検組織は、代謝レベルで初期の(前腫瘍性)形質転換過程にあり得ると我々は提起する。「正常」組織における第2期の特徴の呈示は、前腫瘍性過程がこの組織内でさらに進行していることを示唆する。記載されたP2X標識の特徴は、それぞれの組織学的分類を代表する細胞の全領域にわたって、病期特異的であり、均一である。BPHおよび癌領域の双方を含んでいた穿刺では、P2Xの標識は明確かつ一様に、BPHまたは癌標識パターンの1つのいずれかに区別された。本技法は、非腫瘍性前立腺疾患の患者を早期癌の患者から除外し(および勇気付ける)、悪性に転じる可能性のある急速に発達している前腫瘍状態も同定できると提案されている。このような情報により、より早くかつ正確に治療決定を下すことが可能になり得る。

【 0 0 4 5 】

実施例10 乳癌の診断

サブタイプP2X₂、P2X₃、およびP2X₇は、正常なものと比較すると、乳癌の生検組織で著しくダウンレギュレーションされる。サブタイプP2X₁、P2X₄、P2X₅、およびP2X₆は、正常、癌性いずれの組織でも標識されなかった。内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制するために

10

20

30

40

50

、組織を3%の過酸化水素、および5%のウマ血清で予備インキュベートした。染色パターンの例は、図6a-mに示す。

【 0 0 4 6 】

本発明は、特定の実施例に関連して記述されているが、本発明がその他の多くの形態で実施できることは当業者に認識可能であろう。

【 0 0 4 7 】

文献

1. リアン (Lian) FR、ビュイアン (Bhuiyan) M、リー (Li) YW、ウォール (Wall) N、クロート (Kraut) M、サーカー (Sarkar) FH: 非小細胞肺癌の細胞系におけるゲニステイン誘発G(2)-m阻止、P21 (Waf1) のアップレギュレーション、およびアポトーシス (Genistein-Induced G(2)-M Arrest, P21 (Waf1) Upregulation, and Apoptosis in a Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line)。Nutr. & Cancer, 31: 184-191, 1998。 10
2. ヒューイー (Hoey) J: 前立腺癌: 進行と不安 (Prostate cancer: progress and perplexity)。CMAJ, 159: 1-3, 1998。
3. コロネル (Kolonel) LN、ノムラ AM、ハインズ (Hinds) MW、ヒロハタ T、ハンキン (Hankin) JH、リー (Lee) J: ハワイにおける癌発症での食事の役割 (Role of diet in cancer incidence in Hawaii)。Cancer Res., 43: 2397s-2402s, 1983。
4. フェストウッチャ (Festuccia) C、ヴィンセンティーニ (Vincentini) C、ディ・パスクワレ (di Pasquale) AB、アチエート (Aceto) G、ザッツェローニ (Zazzeroni) F、ミアーノ (Miano) L、ボローニャ (Bologna) M: 良性前立腺過形成と前立腺癌の短期組織培養物におけるプラスミノゲン活性化因子の活動 (Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma)。Oncol. Res., 7: 131-138, 1995。 20
5. サクセナ (Saxena) S、ムハンティ (Mohanty) NK、ジャイン (Jain) AK: 前立腺症男性における前立腺癌のスクリーニング (Screening of prostate cancer in males with prostatism)。Ind. J. Pathol. Micro., 40: 441-450, 1997。
6. ディアマンディス (Diamandis) EP、ユー (Yu) H: 前立腺以外を源とする前立腺特異抗原 (Nonprostatic source of prostate-specific antigen)。Urol. Clin. Nth. Am., 24: 275-282, 1997。
7. ウェイラー (Weyler) J: 前立腺癌: スクリーニングか経過観察か? (Prostate cancer: screening or watchful waiting?) Ann. Oncol., 9: 9-11, 1999。 30
8. バスラー (Bassler) TJ、オロースコー (Orozco) R、バスラー (Bassler) IC、オダード (Odowd) GJ、ステイミー (Stamey) TA: 正常前立腺特異抗原の上限引き上げにより見逃される60代男性の前立腺癌のほとんどは臨床的に有意である (Most Prostate Cancers Missed By Raising the Upper Limit of Normal Prostate-Specific Antigen For Men in Their Sixties Are Clinically Significant)。Urol., 52: 1064-1069, 1998。
9. ラッバーニ (Rabban) F、ストラウムバーキス (Stroumbakis) N、カーヴァ (Kava) B R、クックソン (Cookson) MS、フェア (Fair) WR: 偽陰性6分の一前立腺生検の事例および臨床的重要性 (Incidence and clinical significance of false-negative sextant prostate biopsies)。J. Urol., 159: 1247-1250, 1998。 40
10. ガオ (Gao) X、ポーター (Porter) AT、グリニョン (Grignon) DJ、ポンテ (Pontes) JE、ホン (Honn) KV: ヒト前立腺癌のための診断および予後のマーカー (Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer)。Prostate, 31: 264-281, 1997。
11. スモール (Small) EJ: 前立腺癌 (Prostate cancer)。Curr. Opin. Oncol., 9: 277-286, 1997。
12. ミュール (Moul) JW、ムーニアン (Mooneyhan) RM、カウ (Kao) TC、マクラウド (McLeod) DG、クリューイス (Cruess) DF: 根治的前立腺切除後の失禁、インポテンスおよび狭窄を予測する術前および手術要因 (Preoperative and Operative Factors to Predict Incontinence, Impotence and Stricture After Radical Prostatectomy)。Prost. Can. & Prost. Dis., 1: 242-249, 1998。 50

13. ドゥルーリー (Drury) A、セント=ジェルジ (Szent-Gyorgyi) A: アデニン化合物の哺乳類の心臓に対する作用に関連したその生理学的活動 (The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon their mammalian Heart)。J. Physiol., 68: 213-237, 1929。
14. アブラッキオ (Abbracchio) M、バーンストック (Burnstock) G: ピュリナージックシグナル: 病態生理学的役割 (Purinergic signaling: pathophysiological roles)。Jap. J. Pharmacol., 78: 113-145, 1998。
15. ハンセン (Hansen) MA、バーデン (Barden) JA、バルカー (Balcar) VJ、キーイー (Key) KA、ベネット (Bennett) MR: P2X受容体の細胞外ドメインの構造的モチーフと特徴 (Structural motif and characteristics of the extracellular domain of P2X receptors)。Biochim & Em. Biophys. Res. Comm., 236: 670-675, 1997。 10
16. ハンセン (Hansen) MA、バルカー (Balcar) VJ、バーデン (Barden) JA、ベネット (Bennett) MR: ラット膀胱内の神経結節状構造での平滑筋におけるP2X1受容体の単一クラスターの分布 (The distribution of single P2X1 receptor clusters on smooth muscle in relation to nerve varicosities in the rat urinary bladder)。J. Neurocytol., 27: 529-539, 1998。
17. ハンセン (Hansen) M、ダットン (Dutton) J、バルカー (Balcar) V、バーデン (Barden) J、ベネット (Bennett) M: ラットの血管におけるP2X (ピュリナージック) 受容体の分布 (P2X (purinergic) receptor distributions in rat blood vessels)。J. Auton. Nerv. Syst., 75: 147-155, 1999。 20
18. ダットン (Dutton) J、ハンセン (Hansen) M、バルカー (Balcar) V、バーデン (Barden) J、ベネット (Bennett) M: ラット膀胱の神経結節状構造での平滑筋細胞におけるP2X受容体クラスターの発達 (Development of P2X receptor clusters on smooth muscle cells in relation to nerve varicosities in the rat urinary bladder)。J. Neurocytol., 1998。
19. フィリポヴィック (Filipovic) DM、アデバンジョー (Adebanjo) OA、ザイーディ (Zaidi) M、リーヴス (Reeves) WB: L1c-Pk1細胞内のP2X受容体の機能的、分子的根拠 (Functional and molecular evidence for P2x receptors in L1c-Pk1 Cells)。Am. J. Physiol., 43: F1070-F1077, 1998。
20. アブラッキオ (Abbracchio) M: 細胞の成長と分化におけるP1およびP2受容体 (P1 and P2 receptors in cell growth and differentiation)。Drug Dev. Res., 39: 393-406, 1996。 30
21. オーガスティン (Augustine) G、ベッツ (Betz) H、ボマー (Bommert) K、チャールトン (Charlton) M、デベロ (DeBello) W、ハンズ (Hans) M、スワンデュラ (Swandulla) D: シナプス前部のカルシウムシグナルの分子経路、ステイアー (Stjarne) ら「神経伝達物質放出における分子および細胞機序」より (Molecular pathways for presynaptic calcium signaling, in Molecular and Cellular Mechanisms of Neurotransmitter Release)。Editors Raven Press, New York: 139-155, 1994。
22. ディフィリジリオ (DiFirgilio) F、ピッツォ (Pizzo) P、ザノヴェッロ (Zanovello) P、ブロンテ (Bronte) V、コッラーヴォ (Collavo) D: 細胞介在細胞毒性のメディエーターとしての可能性を有する細胞外ATP (Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity)。Immunol. Today, 11: 274-277, 1990。 40
23. シームス (Siems) W、グリューン (Grune) T、シュミット (Schmidt) H、ティコノフ (Tikhonov) Y、ピメノフ (Pimenov) A: 異なる腫瘍成長段階にあるエールリッヒ腹水腫瘍のマウスの宿主細胞におけるプリンヌクレオチドのレベル (Purine nucleotide levels in host tissues of Ehrlich ascities tumor-bearing mice in different growth phases of the tumor)。Cancer Res., 53: 5143-5147, 1993。
24. ナトリ (Natori) Y、モリグチ (Moriguchi) M、フジワラ (Fujiwara) S、タケシタ (Takeshita) I、フクイ (Fukui) M、イワキ (Iwaki) T、カナイデ (Kanaide) H: ATP誘発性腫瘍内血流増大におけるL-NMMAおよびL-NNAの効果 (Effects of L-NMMA and L-NNA o 50

n the selective ATP-induced enhancement of intratumoral blood flow)。J. Cereb., Bolld Flow Metab., 12: 120-127, 1992。

25. フィグエロア (Figuroa) JP、マースマン (Massmann) GA: 非妊娠ヒツジの子宮における一酸化窒素シンターゼ活動のエストロゲンによる増加 (Estrogen increases nitric oxide synthase activity in the uterus of nonpregnant sheep)。Am. J. Obstet. Gynecol., 173: 1539-1545, 1995。

26. ラッバーニ (Rabban) SA、シン (Xing) RH: ホルモン依存性悪性疾患の浸潤と転移におけるウロキナーゼ (uPA) の役割とその受容体 (uPAR) (Role of urokinase (uPA) and its receptor (uPAR) in invasion and metastasis of hormone-dependent malignancies)。Int. J. Oncol., 12: 911-920, 1998。

27. チッカレリ (Ciccarelli) R、ディロリオ (Dilorio) P、バレリーニ (Ballerini) P、アンボロシーニ (Ambrosini) G、ジュリアーニ (Giuliani) P、ティボーン (Tibone) G、カチャーリ (Caciagli) F: 外因性ATPおよび関連類似体の星状神経膠細胞の分離一次培養物の増殖率に対する効果 (Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes)。J. Neurosci. Res., 39: 556-566, 1994。

28. ポッター (Potter) SW、ガザ (Gaza) G、モリス (Morris) JE: 発情期および妊娠初期におけるマウス子宮のE-カドヘリンのデグラデーション (Estradiol induces E-cadherin degradation in mouse uterine epithelium during the estrous cycle and early pregnancy)。J. Cell. Physiol., 169: 1-14, 1996。

29. ケデシアン (Kedeshian) P、スターンリヒト (Sternlicht) MD、ニューイアン (Nguyen) M、シャオ (Shao) ZM、バースキー (Barsky) SH: ヒューマトリック、独自の生化学的生物学的属性を有する新しい筋上皮性の基質ゲル (Humatrix, a Novel Myoepithelial Matrical Gel With Unique Biochemical and Biological Properties)。Cancer Lett., 123: 215-226, 1998。

30. デトルフセン (Dethlefsen) SM、ラーブ (Raab) G、モーゼズ (Moses) MA、アダム (Adam) RM、クラグスブルーン (Klagsbrun) M、フリードマン (Freeman) MR: 細胞外カルシウム流入により助長された金属タンパク質分解酵素の分裂とプロテインキナーゼに依存しないヘパリン結合EGF様成長因子の分泌 (Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase)。C. J. Dell. Biochem., 69: 143-153, 1998。

31. バークレー (Barclay) A: ラットのリンパ球組織のモノクローナル抗体で決定されるリンパ細胞個体群の局在 (The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues)。Immunology 42: 593-600, 1981。

32. ヴァレラ (Valera) S、ハッシー (Hussy) N、エヴァンス (Evans) RJ、アダミ (Adami) N、ノース (North) RA、サープレナント (Surprenant) A、ビュエル (Buell) G: (細胞外ATPのP2X受容体によって決定されるリガンド依存性イオンチャンネルの新しいクラス (A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP) [コメント参照]。Nature, 371: 516-519, 1994。

33. ブレーク (Brake) AJ、ヴァーゲンバッハ (Wagenbach) MJ、ジュリアス (Julius) D: イオン向性ATP受容体によって決定されるリガンド依存性イオンチャンネルの新しい構造モチーフ (New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor)。Nature, 371: 519-523, 1994。

34. ルイス (Lewis) C、ナイトハート (Neidhart) S、ホーリー (Holy) C、ノース (North) RA、ビュエル (Buell) G、サープレナント (Surprenant) A: P2X2およびP2X3受容体サブユニットの同時発現による感覚ニューロンのATP依存性電流 (Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons) [コメント参照]。Nature, 377: 423-435, 1995。

10

20

30

40

50

35. ビュエル (Buell) G、コロー (Collo) G、ラーセンドレン (Rassendren) F: P2X受容体: 明らかになってきたチャンネル系統群 (P2X receptors: an emerging channel family)。Eur. J. Neurosci., 8: 2221-2228, 1996。
36. コロー (Collo) G、ノース (North) RA、カワシマ (Kawashim) E、マーロ=ピッチ (Merlo-Pich) E、ナイトハート (Neidhart) S、サープレナント (Surprenant) A、ビュエル (Buell) G: P2X5およびP2X6受容体のクローン化ならびにATP依存性イオンチャンネル拡大系統群の分布と属性 (Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels)。J. Neurosci., 16: 2495-2507, 1996。
37. サープレナント (Surprenant) A、ラーセンドレン (Rassendren) F、カワシマ (Kawashim) E、ノース (North) RA、ビュエル (Buell) G: P2X受容体 (P2X7) として識別された細胞外ATPの細胞崩壊P2Z受容体 (The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7))。Science, 272: 735-738, 1996。 10
38. ラーセンドレン (Rassendren) F、ビュエル (Buell) GN、ヴィルジーニョ (Virginio) A、コロー (Collo) G、ノース (North) RA、サープレナント (Surprenant) A: ATP受容体、P2X7の透過。ヒトcDNAのクローン化と発現 (The permeabilizing ATP receptors, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA)。J. Biol. Chem., 272: 5482-5486, 1997。
39. ロングハースト (Longhurst) PA、シュヴェーゲル (Schwegel) T、フォランダー (Folander) K、スヴァンソン (Swanson) R: ヒトP2X1受容体: 分子のクローン化、組織の分布、および染色体17への局在 (The human P2X1 receptor: molecular cloning, tissue distribution, and localization to chromosome 17)。Biochim. Biophys. Acta., 1308: 185-188, 1996。 20
40. ガルシア=ガズマン (Garcia-Guzman) M、ステューマー (Stuhmer) W、サトウ (Soto) F: ヒトP2X3プリノセプタの分子的特徴付けおよび薬理学的属性 (Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor)。Brain Res. Mol. Brain Res., 47: 59-66, 1997。
41. ゴメス=ヘルナンデス (Gomez-H & Hernandez) JM、ルンド (Lund) PE、ステューマー (Stuhmer) W: ヒト組換え型P2X4受容体の特徴づけにより明らかにされるラット同族体との薬理学的差 (Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue)。Mol. Pharmacol., 51: 109-118, 1997。 30
42. リー (Le) KT、パーケット (Paquet) M、ニューエル (Noel) D、バビンスキー (Babinski) K、セグユエラ (Seguela) P: 脳および免疫機構からの天然切型のヒトP2XATP受容体サブユニットの一次構造および発現 (Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system)。FEBS Lett., 418: 195-199, 1997。
43. バーデン (Barden) JA、カスバートソン (Cuthbertson) RM、ジア=ゼン (Jia-ZH & En) W、モーズリー (Moseley) JM、ケンプ (Kemp) BE: 15位 (PTHrP[Ala15]-(1-34)のIle置換Alaを含む上皮小体ホルモン関連プロテイン (残基1-34) の解離構造 (Solution structure of parathyroid hormone related protein (residues 1-34) containing an Ala substituted for an Ile in position 15 (PTHrP[Ala15]-(1-34)))。J. Biol. Chem., 272: 29572-29578, 1997。 40
44. スレーター (Slater) M、パタヴァ (Patava) J、キングハム (Kingham) K、メイソン (Mason) RS: 生体内ヒト骨芽組織様細胞への17 エストラジオールによる細胞外マトリックスへの成長因子取り込みのモジュレーション (Modulation of growth factor incorporation into the extracellular matrix of human osteoblast-like cells in vitro by 17 estradiol)。Am. J. Physiol., 267: E990-E1001, 1994。
45. キース (Kiess) W、ギャラハー (Gallaher) B: プログラムされた細胞死/アポトーシスに対するホルモンの制御 (Hormonal control of programmed cell death/apoptosis) 50

s)。Eur. J. Endocrinol., 138: 482-491, 1998。

【図面の簡単な説明】

【図1】 正常なヒト前立腺（左）と、進行した前立腺癌患者（右）から採った生検サンプルにおけるP2X₁標識化のレベルの例を示す。

【図2】 若い（12週齢）ラット（左）の前立腺上皮（E）と、顕著な過形成（右）を示す加齢ラット（18月齢；右）の組織の比較を示す。

【図3】 正常な乳房（左）と、乳房の腫瘍組織の実質的なダウンレギュレーション（右）におけるP2X₁標識化の例を示す。

【図4】 図4a、b、dおよびeは、PSAが増加している71歳男性から採ったコア生検を示す。診断はBPH。H & E染色（4a）により、前立腺腺房（A）の尖端上皮（矢印）に軽度の過形成が見られる。図4dは、この領域（矢印）の高倍率顕微鏡写真である。同一領域の抗P2Xによる標識（4b）は、BPH（4b矢印）の特徴であるP2X受容体の完全な脱発現化（de-expression）を示す。図4eは、軽度の過形成上皮（4e矢印）中のP2Xの完全な脱発現化を示す、この領域の高倍率顕微鏡写真である。図4c、69歳男性のコア生検切片。PSAは不明。このケースはまた、H & E染色（図示されていない）によりBPHと診断されているが、隆起上皮核（PEN）（4c矢印）に特徴付けられるように、異なる第1期のP2X標識が特徴である。図4fは、図4cに示されるように、これら密に標識された核（4f矢印）の高倍率顕微鏡写真である。図4aおよび4dは、H & E染色である。図4b、c、eおよびfは、抗P2X免疫ペルオキシダーゼ標識である。対比染色なし。低倍率顕微鏡写真（4a、bおよびc）の目盛りは、1cm=150 μm。高倍率顕微鏡写真（4d、eおよびf）の目盛りは、1cm=40 μmである。

【図5】 図5a-cは、PSAが増加している57歳男性のコア生検（3回穿刺として提供）を示す。2箇所穿刺では、進行癌領域に隣接するBPH領域が含まれると診断された。Gleason分類によるスコアは8。図5aは、H & E染色で癌性マーカー（5a矢印）のないBPHの一領域を示す。図5bは、P2X₁抗体で標識された同一ブロックの連続切片である。P2X標識は、転移（translocation）第2期の特徴である。H & E染色法によりBPHと診断された組織において、これら特徴が認められるということは、前腫瘍性変化の存在のみならず、こうした変化が一層進んでいることを示唆する。図5cは、図5b矢印部分の腺房の連続切片の高倍率顕微鏡写真である。これは以下のような第2期の特徴を示している： 若干のPENが残存する（N矢印先端）が、標識の殆どは、点状で細胞質（P矢印）であることを示した。先の実験では、各々の点は個別に標識されたP2X受容体、もしくは受容体の小さな限局性斑（patch）である。側方の原形質膜は鮮明に標識され（L矢印）、尖端上皮（A矢印）に標識がある。

図5d-fは、PSAが8.1である81歳男性のコア生検（3回穿刺）を示す。このケースでは、診断は浸潤性腺癌で、Gleason分類によるスコアは6であった。H & E染色（図5d）で、BPHと侵襲性癌（隆起小核、基底膜浸潤、および異常な腺房構造）の両方の領域を示した。図5eは、尖端上皮（矢印）においてはP2X標識が増加するが、シグナル全体では一般的に減少することを示す。高倍率顕微鏡写真（図5f）では、P2X転移第3期に典型的なこれらP2X標識の特徴が示されている。標識は尖端上皮に集中しているため、第2期（図5b）に比べるとそれほど密ではない。核膜（N矢印）のものを除き、核は標識を有していない。標識は点状というより均質で、ほとんどが尖端上皮で認められる（A矢印）。転移過程が完了すると、P2Xの標識は通常尖端上皮に集中し、その後、標識は脱発現化される（D）。図5aおよび5dはH & E染色である。図5b、c、eおよびfは、P2X免疫ペルオキシダーゼ標識。対比染色なし。低倍率顕微鏡写真（5a、b、dおよびe）の目盛りは、1cm=150 μm。高倍率顕微鏡写真（5cおよびf）の目盛りは、1cm=40 μmである。

【図6 a】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

【図6 b】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

【図6 c】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

【図6 d】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

【図6 e】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

【図6 f】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

- 【図 6 g】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。
- 【図 6 h】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。
- 【図 6 i】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。
- 【図 6 j】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。
- 【図 6 k】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。
- 【図 6 l】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。
- 【図 6 m】 正常な組織と比較した乳癌生検組織での染色パターンを示す。

【図 1】

下記の図は、正常なヒト前立腺（左）および進行した前立腺癌を有する患者（右）からの半検定アンギルにおける P2X1 標識レベルの例を示す。



【図 2】

下記の図は、若い（12週齢）ラット（左）からの前立腺上皮（E）と比較した、加齢ラット（18月齢）からの組織が顕著な過形成（右）を示す。



【 図 3 】

下記の図は、正常な乳房における P2X1 標識の例 (右) および乳癌組織における実質的なダウンレギュレーションを示す。



【 図 4 】

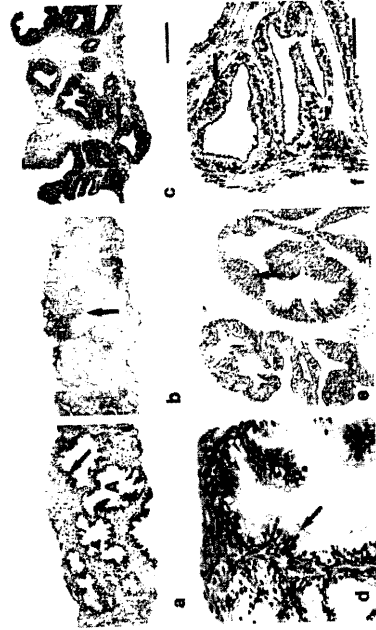


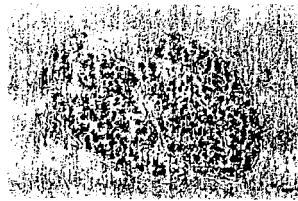
Fig 4

【 図 5 】



Fig 5

【 図 6 a 】

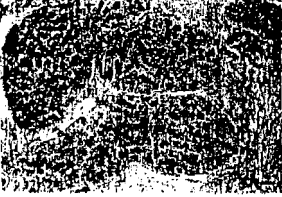


低倍率：正常組織、P2x2 標識
目盛 - 50µm.

【 図 6 b 】




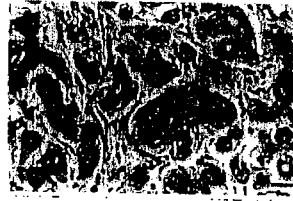
低倍率：乳癌、P2x2

【 6 c】

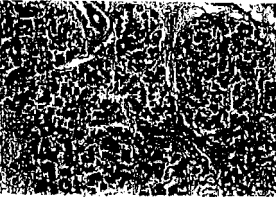


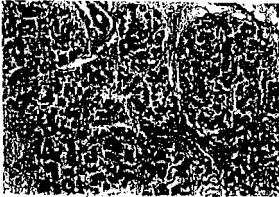
低倍率：正常組織、H&E 染色
目盛 = 50 μ m.

【 6 f】

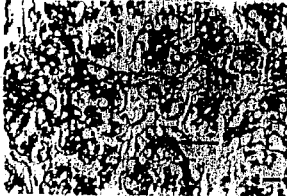


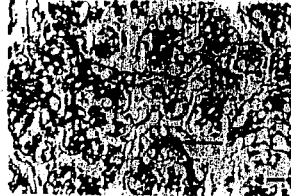
高倍率：乳癌、H&E 染色

【 6 d】




低倍率：乳癌、H&E 染色

【 6 g】




高倍率：正常組織、P2x2 標識

【 6 e】




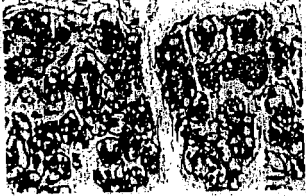
高倍率：正常組織、H&E 染色

【 6 h】




高倍率：癌組織、P2x2 標識

【 6 i】




高倍率：正常組織、P2x3 標識
目盛 20 μ m. 矢印 = 上皮腺房

【 6 k】




高倍率：正常組織、P2x7 標識
目盛 = 20 μ m. 矢印 = 上皮腺房

【 6 j】



高倍率：癌組織、P2x3 標識

【 6 l】



高倍率：癌組織、P2x7 標識

【 図 6 m 】



-

参照：正常組織、目盛-50μm、残留内因活性を有する赤血球（矢印）

フロントページの続き

- (72)発明者 スレイター、 マイケル
オーストラリア国 2192 ニューサウスウェールズ州 ベルモア バーウッド ロード フ
ラット 3 / 5 1 1
- (72)発明者 バーデン、 ジュリアン
オーストラリア国 2122 ニューサウスウェールズ州 マーズフィールド マワラ クレセ
ント 4 8

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表平10-501122(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

专利名称(译)	用于鉴定哺乳动物中肿瘤前状态和/或肿瘤状态的方法		
公开(公告)号	JP4633984B2	公开(公告)日	2011-02-16
申请号	JP2001510845	申请日	2000-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	生物权威控股有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物权杖专有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物权杖专有限公司		
[标]发明人	スレイターマイケル バーデンジュリアン		
发明人	スレイター、マイケル バーデン、ジュリアン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12N5/06 C12Q1/02 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/57492		
FI分类号	G01N33/574.D		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	1999PP9911 1999-04-21 AU		
其他公开文献	JP2003504643A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定哺乳动物中肿瘤前和/或肿瘤状态的方法，特别涉及基于这些细胞中嘌呤能受体的差异表达鉴定组织和体液中的肿瘤前和肿瘤细胞的方法。

【 図 1 】

図1は、正常と癌細胞(右)および癌細胞を有する患者(左)からの腫瘍サンプルを示している。P2X1受容体の発現を示す。



癌細胞
正常細胞