

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-249716

(P2008-249716A)

(43) 公開日 平成20年10月16日(2008.10.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 Z N A B	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 A	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 B	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 7 5	
<b>C O 7 K 14/47 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 S	

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-121720 (P2008-121720)	(71) 出願人	501245997
(22) 出願日	平成20年5月7日 (2008.5.7)		コリア リサーチ インスティテュート
(62) 分割の表示	特願2003-560565 (P2003-560565) の分割		オブ バイオサイエンス アンド バイオ テクノロジー
原出願日	平成14年12月28日 (2002.12.28)		大韓民国 305-333 テジョン、ユ ソングーク、オウンードン 52
(31) 優先権主張番号	10-2001-0088090	(74) 代理人	100102842
(32) 優先日	平成13年12月29日 (2001.12.29)		弁理士 葛和 清司
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(72) 発明者	コ, ジョン ヒョン
			大韓民国 テジョン-シ 305-761 、ユスンク、ジョンミン-ド、エクス ポ アパートメント #207-902

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌発生及び転移に関するタンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法及びそれを利用した診断キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌発生及び転移に関するタンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法を提供する。

【解決手段】 癌発生及び転移に関するタンパク質を測定することにより癌を診断する方法及び該方法を利用した診断キットに関するものである。より詳細には、タンパク質のグリコシル化の変化を測定して癌を診断する方法及び前記方法を利用した癌診断キットに関するものである。本発明の方法及びキットは、大腸癌、胃癌、肺癌及び肝臓癌を含む癌を高い感度で診断するのに有用に使用できる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

1) 患者から試料を採取する工程、及び  
2) 前記試料を対象に癌発生及び転移に關与するタンパク質のN-結合型糖鎖変化を測定する工程  
からなる癌診断方法。

## 【請求項 2】

試料が、血液または尿から採取されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

癌が、大腸癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、子宮癌、乳癌及び膵臓癌からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

糖鎖変化が、N-結合型 1,6N-アセチルグルコサミンの糖鎖側鎖変化であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

タンパク質が、PDF、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ、ガレクチン結合タンパク質、L3抗原、Mac-2結合タンパク質、血清タンパク質90K、腫瘍関連抗原90K、TIMP-1及び配列番号 6 ~ 11 で表されるペプチドを含むタンパク質からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

測定が、ELISAまたは免疫プロット法を含む抗原-抗体結合反応を利用することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

癌発生及び転移に關与するタンパク質に対する抗体、基体、緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質で標識された2次抗体、発色基質及び標識された抗体または標識されたL<sub>4</sub>-PHAで構成され、タンパク質の発現及び糖鎖変化を測定することにより癌を診断するキット。

## 【請求項 8】

癌が、大腸癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、子宮癌、乳癌及び膵臓癌からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

## 【請求項 9】

癌が、大腸癌であることを特徴とする、請求項 8 に記載のキット。

30

## 【請求項 10】

糖鎖変化が、N-結合型 1,6 N-アセチルグルコサミンの糖鎖側鎖変化であることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

## 【請求項 11】

タンパク質がPDF、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ、ガレクチン結合タンパク質、L3抗原、Mac-2結合タンパク質、血清タンパク質90K、腫瘍関連抗原90K、TIMP-1及び配列番号 6 ~ 11 で表されるペプチドを含むタンパク質からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

## 【請求項 12】

基体が、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製96ウェルプレート及びスライドガラスからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

40

## 【請求項 13】

発色酵素が、ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼからなる群から選択され、発色基質液が、ABTS(2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))及びOPD(o-フェニレンジアミン)、TMB(テトラメチルベンジジン) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

## 【請求項 14】

標識された抗体が、ビオチン(またはその誘導体)標識抗体であり、標識されたL<sub>4</sub>-PHAが

50

、ビオチン(またはその誘導体)標識L<sub>4</sub>-PHAであることを特徴とする、請求項7に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌発生及び転移に關与するタンパク質を測定することにより癌を診断する方法及び該方法を利用した診断キットに関するものである。より詳細には、タンパク質のグリコシル化の変化を測定することにより、とりわけ、癌の発生と転移に關連するタンパク質のN-結合型糖鎖変化を測定することにより、癌を診断する方法及びこれを用いた診断キットに関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

タンパク質の機能を分析する方法として長い間2次元電気泳動方法が多く使用されてきた。ところが、最近になって、MALDI-TOFのような質量分析器の発達とN-末端アミノ酸配列決定が簡単になるにつれて、ポストゲノム時代の機能分析方法としてプロテオミクスが登場した。しかし、プロテオミクスはダイナミックに動く生体に対して静止した一時点を選択的に分析するため、高度に複雑なシグナル伝達の結果発生すると知られている癌の研究には、ある程度の限界がある。癌の検出においては、染色による新しいスポットを観察するよりも、シグナル伝達の結果物として発現量の増加や翻訳後修飾を調べることが重要である。2次元電気泳動で検出できるタンパク質は非常に少量であるため、単純染色によっては分析が難しいのが実情である。タンパク質のグリコシル化を観察することにより、かかる問題点を克服し、翻訳後修飾に基づく分析上の間違いを修正することができる。癌患者群を対照群と比較する時、一般的な電気泳動ではスポットの差を発見できない場合にも、グリコシル化の変化をレクチンで分析すると、両群を明確に区別することが可能となる。これは、現在グリコミクス(glycomics)と呼ばれており、プロテオミクスの分析上の難しさを克服した一歩進んだ分析方法で、翻訳後修飾中のタンパク質のグリコシル化の変化を追跡することを特徴とする。

20

【0003】

発癌及び転移の過程で起きる細胞の生物学的変化を観察すると、細胞膜表面に存在する多くの種類の糖タンパク質や糖脂質が癌遺伝子からの特定のシグナルにより、「異常グリコシル化(aberrant glycosylation)」を生じ、これによる糖鎖の変化が細胞間の接着や認識に変化を起し、その結果、発癌及び癌転移をもたらす(ハコモリとカンナギ、J. Natl. Cancer Inst.、第71巻、231~251頁、1983年; フェイジ(Feizi)、Nature、第314巻、53~571頁、1985年)。細胞外部から刺激を受けると、シグナルは癌遺伝子ras、転写因子ets-1を介して伝達され、N-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)の発現を刺激する。前記GnT-Vは、糖タンパク質の基本糖鎖の1,6位にN-アセチルグルコサミンを付加する反応を触媒する酵素であり、癌の侵潤と転移に直接的な關連があることが知られている(デニス(Dennis)等、Science、第236巻、582~5853頁、1987年)。糖タンパク質は、タンパク質が合成された後小胞体ERで基本糖鎖が作られた後、ゴルジ体に移動して細胞の多様な生命現象の結果として色々な糖転移酵素により糖の付加がなされるのであるが、1次的な糖鎖(Primary sugar chain)は6種類のN-アセチルグルコサミン糖転移酵素(I-VI)が触媒して得られ、この中で、1,6-N-アセチルグルコサミン糖鎖を形成するGnT-Vが癌の発生と転移に深く關与すると考えられている。GnT-Vは、ゴルジ体に位置し、標的タンパク質は糖鎖に変化を受けて細胞表面や細胞外に分泌される。この時、糖タンパク質は標的細胞の表面タンパク質を認識し、これと接着して癌を誘発することになる。

30

40

【0004】

GnT-Vは、1987年にデニス等により、1,6側鎖が癌組織の増殖や癌転移が起きる時、高い程度で現れることが初めて報告された(デニス(Dennis)等、Science、第236巻、582~5853頁、1987年)。細胞表面タンパク質であるgp130はGnT-Vの主な標的タンパク質の一つであるが、1,6N-アセチルグルコサミン付加に高い転移活性があることが明らかにさ

50

れた。胚性管幹細胞においてGnT-Vが欠損したES細胞(GnT-Vノックアウト)マウスを構築し、ウイルス性癌遺伝子であるポリオマウイルスの中型T抗原(以下「PyMT」と称する)を導入して癌を誘発させると、PyMTだけを過剰発現させた他の正常マウスに比べて、GnT-VノックアウトマウスではPyMTにより誘導される癌の成長と転移が大きく抑制され(グラノフスキ(Granovsky)等、Nature Med.、第6巻、306~312頁、2000年)、1,6の側鎖化が特に乳癌マウスにおいて高い転移性を示した。最近の研究では、33種類の肝細胞癌(HCC)組織におけるGnT-Vの活性が、正常組織での活性と比べて50倍、癌周辺組織に比しては4倍高いことが裏付けられた(ヤオ(Yao)等、J Cancer Res. Clin. Oncol.、第124巻、27~307頁、1998年)。また、大腸癌細胞株WiDrにこのGnT-Vを過剰発現させたものを、免疫不全マウスに導入して大腸癌を誘導した場合、またはCAM分析方法で授精卵を利用して血管新生を調査した場合にも、高い転移活性が確認された(ミヨシ等、未発表データ、2001年)。このようにGnT-Vは、癌の転移過程に関与しており、組織に関係なしに高い転移活性を有するものと考えられている。このGnT-V酵素は、ヒトの肺癌細胞及びマウスの腎臓から精製され、該酵素のcDNAクローニング、ゲノム構造及びプロモータ領域の分析がなされた(グー(Gu)等、J Biochem.、第113巻、614~619頁、1993年；ソレイバ(Soreibah)等、J Biol. Chem.、第268巻、15381~15385頁、1993年；カン(Kang)等、J. Biol. Chem.、第271巻、26706~26712頁、1996年)。最近、本発明者らも転写因子であるets-1がGnT-Vの発現に大きく関与することを報告した(コ(Ko)等、J. Biol. Chem.、第274(33)巻、22941~22948頁、1999年)。一方、最近になって食生活の西洋化により、大腸癌は、現在男女共に4番目に高い発病率を示し、持続的な増加傾向を見せているが、大腸内視鏡の他には正確に大腸癌を診断する方法がないのが実情である。

10

20

#### 【0005】

以上のことを鑑みて、本発明者らは癌が誘発された細胞で糖転移酵素 GnT-Vにより付加された 1,6-N-アセチルグルコサミンを検出して、これを質量分析器でアミノ酸配列を分析して糖鎖変化を示す新しい糖タンパク質を発見し、検体から前記タンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法と前記方法を利用した癌の診断キットを開発することにより本発明を完成した。

#### 【0006】

#### 発明の詳細な説明

本発明の目的は、癌発生及び転移に関与するタンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法及び該方法を利用した診断キットを提供することである。

30

#### 【0007】

前記目的を達成するために本発明は、癌発生及び転移に関与するタンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法を提供する。

#### 【0008】

また、本発明は、前記方法を利用した診断キットを提供する。

#### 【0009】

以下、本発明を詳細に説明する。

前記目的を達成するために、本発明は、癌発生及び転移に関与するタンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法を提供する。

40

#### 【0010】

前記癌は、大腸癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、子宮癌、乳癌及び膵臓癌からなる群から選択できるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0011】

本発明は、正常細胞と比較することにより、癌細胞及び転移した細胞における、N-結合型糖鎖の変化である 1,6N-アセチルグルコサミンの変化を示す、タンパク質の糖鎖側鎖変化を測定する方法を提供する。1,6N-アセチルグルコサミンの糖鎖を形成するGnT-Vは、組織に関係なしに癌の発生と転移に関与し、1,6-N-アセチルグルコサミン糖鎖は、レクチンであるフィトヘマグルチニン-L<sub>4</sub>(以下「L<sub>4</sub>-PHA」と称する)により検出することができる。

50

## 【 0 0 1 2 】

癌の転移は、細胞間の認識および接着によるもので、認識と接着に關与する糖タンパク質は細胞の表面にあるかまたは細胞から分泌されるため、血液や尿等の体液からの初期マーカーの診断を通して癌診断が可能である。本発明の好ましい態様において、大腸癌特異的なマーカーを捜し出すためにGnT-V発現が相対的に低い大腸癌細胞株WiDrを使用した。GnT-Vを過剰発現する細胞株であるGnT-V/WiDrを大腸癌のモデルシステムとして用いてグリコミクスを遂行した。本発明では、転移性癌細胞の培養液を2次元電気泳動で分析した。その結果、二枚のゲルを得、一枚はクーマシーブリリアントブルーで染色し、もう一枚はレクチンプロットを遂行して、最後に正常細胞と比べて癌細胞及び転移性細胞で糖鎖変化を起こしたタンパク質を選別した(図5及び図6参照)。1,6N-アセチルグルコサミン側鎖を認識するレクチンプロットにより、癌細胞に何カ所で濃い強度のスポットが検出された。該スポットに該当するタンパク質が癌発生及び転移に關与して糖鎖変化を示すことが確認された。

10

## 【 0 0 1 3 】

ゲル上から該当するスポットを切り出し、タンパク質を切断した後、切断されたペプチドをエレクトロスプレーイオン化/四重極-飛行時間型(ESI/Q-TOF)質量分析器でアミノ酸配列を決定して、配列番号1~15で表されるペプチド配列を明らかにした。前記分析されたペプチド配列は、既存のタンパク質データベースと比較して正確なタンパク質の名称を同定し、各々の配列と分子量、等電点等をさらに分析した(表1参照)。

## 【 0 0 1 4 】

前記タンパク質は、N-結合型糖鎖はAsn-Xaa-Thr/Serという配列上でAsnに生じるといふ公知の事実を基にして確認した(バルキ(Varki)等、Essentials of glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 85~100頁、1999年)。

20

## 【 0 0 1 5 】

前記で分析された配列番号1及び配列番号2で表されるペプチド配列は、PDF(prostate-derived factor)の一部であり、PDFはTGF- $\beta$  (トランスフォーミング増殖因子)ファミリーのBMPs(骨形成タンパク質)の一つであって、軟骨形成を誘導して骨の発生と再生に關与するものとして知られていて(パラルカー(Paralkar)V.M.等、J Biol. Chem、第273巻13760~13767頁、1998年)、2カ所の保存されたN-結合型糖鎖部位を有している。前記タンパク質は、PDF、MIC-1(macrophage inhibitory cytokine-1)、PLAB(placental bone morphogenic protein)、GDF-15(growth/differentiation factor 15)等の名前で幾つかのグループによって発見された。

30

## 【 0 0 1 6 】

前記で分析された配列番号3、配列番号4及び配列番号5で表されるペプチド配列は、T細胞シクロフィリンとして知られているものでペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼともよばれ、配列上3カ所の保存されたN-結合型糖鎖部位を有している抗酸化システムの構成成分としてよく知られている。

## 【 0 0 1 7 】

前記で分析された配列番号6~11で表されるペプチド配列は、既知の様々なデータベースと比較した結果、新しいタンパク質であると判明した。4番目のペプチドにAsn-Xaa-Serの配列を持っていてN-結合型糖鎖を保有しているものと推定される。

40

## 【 0 0 1 8 】

前記で分析された配列番号12及び配列番号13で表されるペプチド配列は、ガレクチン結合タンパク質、L3抗原、Mac-2結合タンパク質、血清タンパク質90K、腫瘍関連抗原90K等の様々な名前で知られている。癌やAIDS患者の血液から検出され、ノーザンプロットの結果によれば正常組織、原発癌、腫瘍関連細胞株で高く発現するが、その発現は疾病のタイプによって多様であり、7カ所の保存されたN-結合型糖鎖部位を有している(ウルリッチ(Ullrich)A.等、J Biol. Chem.、第269巻、18401~18407頁、1994年)。

## 【 0 0 1 9 】

前記で分析された配列番号14及び配列番号15で表されるペプチド配列は、TIMP-1(t

50

issue inhibitor of matrix metalloproteinase-1)として知られており、TIMPは今まで4(1~4)種発見されていて、該タンパク質の分子量は22K~30Kと低分子量タンパク質であり、40~50%の相同性を有している。TIMP-1はグリコシル化によりトレイン(train)形態をとり、このためTIMP-1の分子量は高いように見えるが(図7参照)、N-末端がMMPsに付着しマトリックスメタロプロテアーゼの活性を阻害するものと知られていて、2カ所のN-結合型糖鎖を有している(ゴムルス-レウス(Gomlrs-Reuth)F.等、Nature、第389巻、77~81頁、1997年)。

【0020】

前記で明らかにした5種類のタンパク質のうち2種類、ガレクチン結合タンパク質(腫瘍関連抗原90K)及びTIMP-1は、癌の発生と転移に直接的に関与すると報告されているが、前記二種のタンパク質における癌に誘発された1,6N-アセチルグルコサミンの糖鎖側鎖変化に関する直接的な報告は、現在まで発表されていない。

10

【0021】

前記で明らかにした癌発生及び転移に関与し、糖鎖変化を示すタンパク質は、糖タンパク質であり、細胞の表面に存在するかそこから分泌されるため、血液や尿等の体液中の前記タンパク質の発現及びN-結合型糖鎖変化を測定することにより、癌を診断できる。

【0022】

前記癌発生及び転移に関与するタンパク質を利用して癌を診断する方法は、患者から試料を採取する工程(工程1)及び前記試料について癌発生及び転移に関与するタンパク質の発現及びN-結合型糖鎖変化を測定する工程(工程2)の2工程からなる。

20

【0023】

前記工程1の試料は、血液または尿から採取することができ、好ましくは一般的な血清分離法で調製する。

【0024】

前記工程2の測定方法としては、抗原-抗体反応の原理に基づくすべての分析方法が使用できる。その中でも抗原-抗体反応の分析に最もよく使用されるELISA(酵素結合免疫吸着検定法)と免疫プロット法を用いるのが好ましい。

【0025】

本発明者らは、癌を診断するために癌発生及び転移に関与するタンパク質に対する抗体を生産し、タンパク質の発現程度及びN-結合型糖鎖変化を測定する方法を提供する。

30

【0026】

ELISAを利用してタンパク質の発現程度及びN-結合型糖鎖変化を測定する方法は、

- 1) 基体に癌発生及び転移に関与するタンパク質に対する抗体を吸着させる工程、
- 2) 前記基体に検体の血清を添加して反応させ、その後それを洗浄する工程、
- 3) 標識された同一抗体または標識L<sub>4</sub>-PHAを添加して反応させる工程、
- 4) 前記基体を洗浄した後、発色酵素または蛍光物質が結合された2次抗体を添加して反応させる工程、及び
- 5) 発色基質液を添加して発色させた後、ELISAリーダーで吸光度を測定する工程を含む。

【0027】

工程1の基体は、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製96ウェルプレート及びスライドガラスからなる群から選択でき、本発明では96ウェルプレートを使用した。

40

【0028】

前記工程3の標識には、ビオチン等の化合物(またはその誘導体)を使用でき、ビオチン標識された同一抗体によって、癌発生及び転移に関与するタンパク質の発現を分析でき、ビオチン標識されたL<sub>4</sub>-PHAによって、N-結合型糖鎖変化である1,6N-アセチルグルコサミンの糖鎖側鎖変化を測定できる。

【0029】

工程4の抗体に結合される発色酵素には、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ

50

が使用でき、蛍光物質はFITC、RITC等が使用でき、本発明では特にペルオキシダーゼが結合された抗体を使用した。

【0030】

工程5の発色基質液には、ABTS(2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))またはOPD(o-フェニレンジアミン)、TMB(テトラメチルベンジジン)が使用でき、本発明では特にペルオキシダーゼにより発色するOPDを使用した。

【0031】

本発明の癌診断方法では、生物学的マイクロチップ(biological microchip)及び自動マイクロレイシステムを利用して大量に試料を分析できる。

【0032】

また、本発明は、癌発生及び転移に關与するタンパク質の発現または糖鎖変化を測定して癌を診断するキットを提供する。

【0033】

前記癌は、大腸癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、子宮癌、乳癌及び膵臓癌を包含するが、これらに限定されるものではなく、すべての種類の癌が本発明の対象になり得る。

【0034】

癌発生及び転移に關与するタンパク質は、PDF、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ、ガレクチン結合タンパク質、L3抗原、Mac-2結合タンパク質、血清タンパク質90K、腫瘍関連抗原90K、TIMP-1及び配列番号6～11で表されるペプチドを含むタンパク質からなる群から選択される。

【0035】

本発明の診断キットは、前記タンパク質の発現を定量分析または定性分析するかまたは、N-結合型糖鎖変化、具体的には1,6-N-アセチルグルコサミン糖鎖側鎖変化を測定するのに利用できる。前記分析のためにELISAを利用できる。例えば、前記タンパク質に対する抗体をコーティングした96ウェルマイクロタイタープレート等を利用したELISA用に前記診断キットを提供できる。

【0036】

本発明の診断キットは、前記タンパク質に対する抗体、基体、緩衝液、発色酵素または蛍光物質で標識された2次抗体、発色基質等を含むことができ、特に1,6-N-アセチルグルコサミン糖鎖側鎖変化を測定するためにL<sub>4</sub>-PHAを含むことができる。

【0037】

基体には、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製96ウェルプレート及びスライドガラス等が使用でき、発色酵素には、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが使用でき、蛍光物質には、FITC、RITC等が使用でき、発色基質液には、ABTS(2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))またはOPD(o-フェニレンジアミン)、またはTMB(テトラメチルベンジジン)が使用できる。

【0038】

また、本発明の診断キットで癌を診断するために、生物学的マイクロチップを利用した自動分析法を利用できる。例えば、癌発生及び転移に關連して糖鎖が変化したタンパク質等をスライドガラス等の表面に固定化させてタンパク質チップを作製し、タンパク質の糖鎖変化を同時に測定できるように診断キットを構成できる。このような診断キットは、前記タンパク質、緩衝液及びL<sub>4</sub>-PHA等を含む。

【0039】

例

本発明の実用的で、好ましい態様を、以下の例で説明する。

しかしながら、当業者は、本開示に基づき、本発明の精神と範囲の中で、変更や改良をなし得るものと解される。

【0040】

例1

細胞株の2次元電気泳動とレクチンプロット

10

20

30

40

50

本発明者らは、GnT-V/WiDr細胞株を大腸癌のモデルシステムとして該細胞株でのプロテオミクスを試みた。具体的には、細胞を培養した後、細胞内と細胞外に分泌されるタンパク質のうち、本酵素に関連して癌の悪化を惹起する具体的な標的タンパク質群を検索した。対照群細胞株であるMock/WiDr、ets-1を過剰発現する細胞株であるets-1/WiDr及びGnT-Vを過剰発現する細胞株であるGnT-V/WiDrを10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI培地(Gibco BRL社)で培養した。過剰発現細胞株は、米国のATCC(American Type Tissue Culture)社から購入した大腸癌細胞株WiDrに真核細胞過剰発現プラスミド(コ等、J. Biol. Chem.、第274(33)巻、22941~22948頁、1999年)と転写因子ets-1、そして糖転移酵素GnT-Vを導入した。ネオマイシン耐性遺伝子に対応して350 µg/mlの濃度でG418を処理した。コロニーが形成された時、ets-1は抗体を利用したウエスタンブロットで、GnT-VはcDNAを利用したノーザンブロットで検出した。2~3日後、CO<sub>2</sub>培養器中の培養プレートの底を細胞が90%程度覆った時(confluent)、細胞をPBS(リン酸緩衝食塩水)で2回以上洗って残存血清を除去した。スクレイパーで細胞を掻き集めた後、PBSで洗浄して1mlのPBSに懸濁させた後、超音波破碎機で1分ずつ3回細胞を破碎した。前記破碎細胞にTCA(トリクロロ酢酸)を含むアセトンを経最終濃度が10%になるように加え、タンパク質だけを沈殿させる。アセトンで3回以上洗って残留TCAを除去して乾燥した後、ゲルローディング緩衝溶液(8M尿素、2% Triton X-100、20 mM DTT、0.5%両性担体、プロモフェノールブルー色素)を加えて溶解し、Multiphor-II(Pharmarcia社)を利用して1次元電気泳動を実施した(18cmのドライストリップ、pH 3~10)。

10

20

## 【0041】

得られた1次元電気泳動ゲルをSDSと2-メルカプトエタノールを含む平衡緩衝溶液で平衡化させた後、Protean II(Bio-Rad社)を利用して12%ポリアクリルアミドで2次元電気泳動を実施した。得られた二枚のゲルを得、一枚はバイオセーフ(Biosafe)染色液(Bio-Rad社)を利用してクーマシーブリリアントブルー染色した。もう一枚は、半乾燥転写装置(Bio-Rad社)を利用してPVDF(ポリビニリデンジフルオリド)膜へ転写した。1,6-N-アセチルグルコサミン側鎖を認識するビオチン標識されたL-PHAを、側鎖を持った糖タンパク質に付くようにした後、HRP標識されたストレプトアビジンを付着させ、ECL蛍光反応を利用してフィルムに感光させた。

## 【0042】

対照群(Mock/WiDr)との比較のために同一条件で実験を行った。すなわち、まず1次元(等電点分離)電気泳動を行い、次にクーマシーブリリアントブルーで染色して(図3)、ゲルのタンパク質をPVDF膜に転写し、GnT-Vに特異的なL<sub>4</sub>-PHAでレクチンブロットを行った(図4)。3回以上の2次元電気泳動を行い、細胞内のタンパク質発現の変化をソフトウェア(PDQUEST、Bio-Rad社)を利用して分析した結果、タンパク質の発現プロファイルで4倍以上の差を見せるタンパク質は検出されなかった。図4のレクチンブロットでも大きな変化が見られなかった。

30

## 【0043】

## 例2

無血清培地の2次元電気泳動とレクチンブロット

本発明者らは、無血清培地で細胞株を培養して糖鎖の変化を調べた。具体的には、Mock/WiDr細胞株、ets-1/WiDr細胞株及びGnT-V/WiDr細胞株を10%ウシ胎児血清を含むRPMI(Gibco BRL社)培地で培養した。2~3日後、CO<sub>2</sub>培養器中の培養プレートの底を細胞が80%程度覆った時、PBSで2回以上洗って残存血清を除去した。さらに血清を含まないRPMI培地を入れて48時間培養した後、培養液を集めた。培地を濃縮した後、最終濃度10%になるようTCA(トリクロロ酢酸)を含むアセトンを加えてタンパク質を沈殿させた。アセトンで3回以上洗って残留TCAを除去し乾燥した後、ゲルローディング緩衝溶液(8M尿素、2% Triton X-100、20 mM DTT、0.5%両性担体、プロモフェノールブルー色素)を加えて溶解した後、前記例1と同じ方法で1次元電気泳動と2次元電気泳動を遂行した。

40

## 【0044】

2次元電気泳動の結果、FCSが微量残っていてPTM(翻訳後修飾)の大幅な変化が予想され

50

たため、発現量の比較はソフトウェアの限界上難しさがあつた。反面、L-PHAレクチンプロットの結果から、対照群と比べてets-1過剰発現細胞株で濃いスポットが検出され、GnT-V過剰発現細胞株で最も濃いスポットが観察されることが確認された(図5及び図6)。これらのスポットの中から12個のスポットを切り出し、5個のスポットを同定した。

【0045】

例3

#### ESI/Q-TOF質量分析器を利用したタンパク質の配列分析

本発明者らは、前記の5個のスポットに存在するタンパク質を同定するために、既にX線フィルムに感光させたPVDF膜(レクチンプロット)をクーマシーブリリアントブルーで染色し、感光したフィルムに再び付着させ、スポットの正確な位置を確認し、その後クーマシーブリリアントブルーで染色されたゲル上の該当するスポットを切り出した。30%のメタノールと100%アセトニトリルを利用して脱色後、10Uのトリプシン(Promega社)を加えて37℃で一晩切断した。ペプチドをアセトニトリルで抽出した後、遠心凍結乾燥機で凍結乾燥してESI/Q-TOF(エレクトロスプレーイオン化/四重極-飛行時間型)質量分析器でアミノ酸配列を決定した。ESIは、各ペプチドを分離する効果があり、タンデム質量分析は配列分析が可能である。

【0046】

その結果、ESI/Q-TOFにより配列番号1~15で表されるペプチド配列が決定され、前記配列はタンパク質のデータベースと比較して同定し、各々の配列と分子量(MW)、等電点(pI)等を以下に示した(表1)。

【0047】

【表1】

(表1)

No	配列	名称	機能	M.W	PI	N-結合型 グリコシル化
a	配列番号 1 配列番号 2	GDF-15	PLAB/TGF-βファミリー	34168.6	9.79	有
b	配列番号 3 配列番号 4 配列番号 5	シクロフィリン	ペプチジル-プロリル・シストランズ・インメラーゼ A	18012.7	7.86	有
c	配列番号 6 配列番号 7 配列番号 8 配列番号 9 配列番号 10 配列番号 11	未確認	未確認	約 20K	約 5.5	有
d	配列番号 12 配列番号 13	ガレクチン3結合蛋白質	ガレクチン結合血清蛋白質	65331.6	5.13	有
e	配列番号 14 配列番号 15	TIMP-1	マトリクスメタロプロテアーゼの組織阻害剤	23171.1	8.46	有

【0048】

これらの特性を下記に示す。上記のタンパク質は、N-結合型糖鎖がAsn-Xaa-Thr/Serという配列上のAsnに生じるといふ公知の事実にもとづいて確認した(バルキ(Varki)等、Essentials of glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA、85~100頁、1999年)。

【0049】

前記表1の配列番号1及び配列番号2で表されるペプチド配列を含むa、即ちPDF(prostate-derived factor)は、TGF(トランスフォーミング増殖因子)-ファミリーのBMPs(骨形成タンパク質)中の一つとして2ヵ所の保存されたN-結合型糖鎖部位を有している。このタンパク質は、PDFだけではなく、MIC-1(macrophage inhibitory cytokine-1)、PLAB(place ntal bone morphogenic protein)、GDF-15、PTGFP等の名前で色々なグループにより発見

10

20

30

40

50

された。

【0050】

配列番号3、配列番号4及び配列番号5で表されるペプチド配列を含むbは、T細胞シクロフィリンとして知られているもので、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼとも呼ばれ、3カ所の保存されたN-結合型糖鎖部位を有している。

【0051】

配列番号6～11で表されるペプチド配列を含むcは、既存の公知のデータベースと比較した結果、新しいタンパク質であると判明した。4番目のペプチドにAsn-Xaa-Serの配列を持っていてN-結合型糖鎖を保有しているものと推定される。

【0052】

配列番号12及び配列番号13で表されるペプチド配列を含むdは、ガレクチン結合タンパク質、L3抗原、Mac-2-結合タンパク質、血清タンパク質90K、腫瘍関連抗原90K等の様々な名前でも知られていて、7カ所の保存されたN-結合型糖鎖部位を有している。

【0053】

配列番号14及び配列番号15で表されるペプチド配列を含むeは、TIMP-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1)として知られ、ESI/Q-TOFに同定された前記timp-1の例である(図7)。TIMP-1は、図7に見られるようにグリコシル化によりトレイン形態となっており、これにより分子量は高く見える。TIMP-1はまた、2カ所のN-結合型糖鎖部位を含んでいる。

【0054】

例4

タンパク質の発現または糖鎖側鎖変化の測定

本発明者らは、前記で同定したタンパク質の発現または糖鎖変化を測定して癌を診断するため、ELISAを利用して前記タンパク質の発現及び糖鎖変化を測定した。

【0055】

まず、標的タンパク質のcDNAを得た後、真核細胞遺伝子発現ベクターにクローニングし、これをWiDr細胞株にクローニングして培養液からタンパク質を各1mg程度精製した後、アジュバンドと混ぜてウサギの皮下に注射してポリクローナル抗体を製造した。前記の抗体を所定量ずつ二枚の96ウェルプレートに吸着させた。即ち、96ウェルプレート(Maxisorb、Nunc社)にバクテリア由来のタンパク質Aを1ウェル当たり1μgずつ0.1M炭酸ナトリウム(pH 9.6)100μlの存在下で被覆し、続けてTBS-T(トリス緩衝食塩水-Tween、0.2M Tris-Cl、0.4 M NaCl、0.05% Tween-20)で洗浄し、上記で製造した抗体を付着させ、再びTBS-Tで洗浄し、非付着部分をブロッキングして安定化された抗体系を調製した。血液やその他の試料を再現性と統計処理のために連続希釈してプレートに加えた後、TBS-Tで3回洗浄した。この時、標的タンパク質は各々の特異抗体に付着している。タンパク質の発現は、ビオチン標識された同一抗体で確認し、1,6 N-アセチルグルコサミンの糖鎖変化は、レクチンにより確認し、ここでビオチン標識されたL-PHAを利用した。ビオチン標識された抗体を製造するために、抗体(5～10mg/ml)を250mlのSBRB(スクシニミジル-ビオチン反応バッファー)中、23で6時間透析した。NHS-ビオチン(N-ヒドロキシスクシニミジル-ビオチン)またはNHS-LC-ビオチン(長鎖スルホスクシニミジル-6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート由来ビオチン)をDMSO(ジメチルスルホキシド)中で、2～4mg/mlの濃度になるように調整し、それに抗体とビオチン溶液を1:30(Ab:ビオチン)の比率で混ぜた後、37で攪拌し、一時間放置してビオチンと抗体を結合させ、BBS(ホウ酸緩衝食塩水)に透析してビオチン標識された抗体を製造した。レクチンの場合には、市販のビオチン標識L-PHAを利用した。つぎに、ビオチン標識された抗体とレクチンは市販のアビジン-ペルオキシダーゼキットを利用して検出する。具体的には、ペルオキシダーゼの基質である0-フェニルアミンとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えて490nmでの吸光度を測定した。癌患者の血液試料中のタンパク質の発現と1,6 N-アセチルグルコサミンのグリコシル化の変化を測定し、これらを正常対照群と比較した。

【0056】

10

20

30

40

50

その結果、癌患者の血液における 1,6 N-アセチルグルコサミンのグリコシル化の程度が、正常血液に比べて 10 ~ 20 倍増加していることが確認された。

【0057】

産業上の利用の可能性

前記のように、本発明の癌発生及び転移に關与するタンパク質の糖鎖変化を測定して癌を診断する方法及びこれを利用した診断キットは、大腸癌を含む癌を効果的に診断できる。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】N-結合型糖鎖と關与する6種の糖転移酵素が触媒して得られる糖鎖を示した模式図である。

【図2】糖転移酵素GnT-Vにより 1,6N-アセチルグルコサミン(GlcNAc 1)が糖鎖に付加される過程を示した模式図である。

【図3】3種の細胞株(Mock/WiDr, ets-1/WiDr, GnT-V/WiDr)の2次元電気泳動で得たゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した結果を示す写真図である。

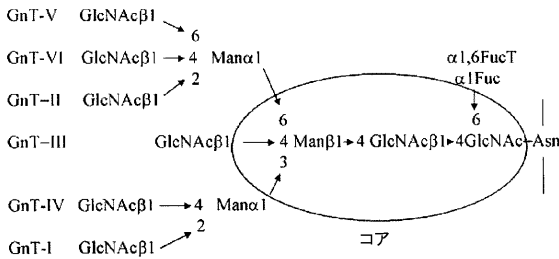
【図4】3種の細胞株に対する2次元電気泳動で得たゲルのレクチンプロットの結果を示す写真図である。

【図5】3種の細胞株に由来する無血清培地を2次元電気泳動後にクーマシーブリリアントブルーで染色した結果を示す写真図である。

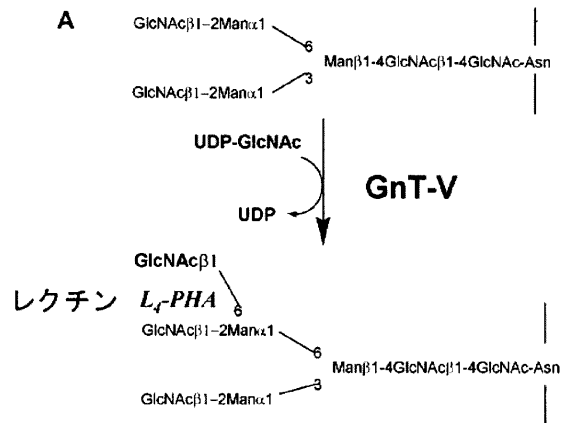
【図6】3種の細胞株に由来する無血清培地を2次元電気泳動後にL<sub>4</sub>-PHAによるレクチンプロットを行った結果を示す写真図である。

【図7】ESI/Q-TOFによる timp-1アミノ酸配列の分析結果を示すグラフである。

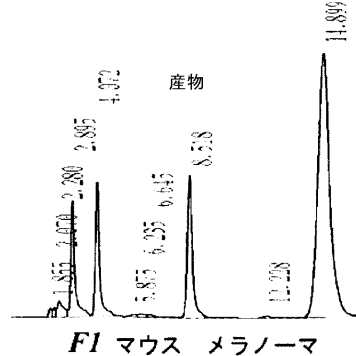
【図1】



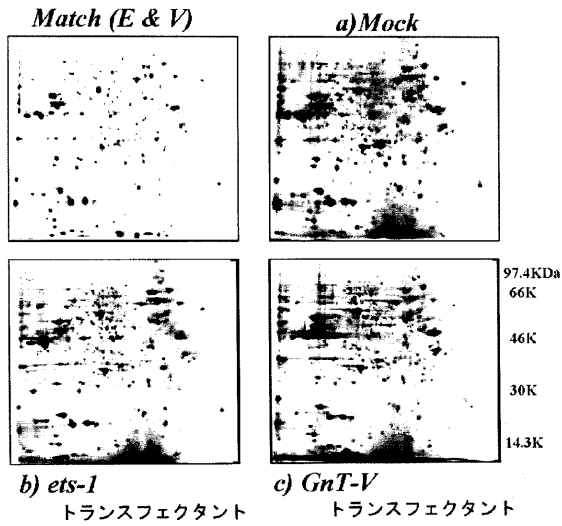
【図2】



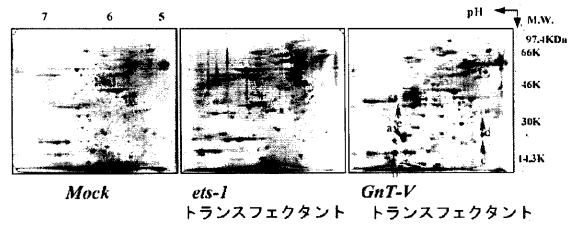
B 基質 (PA-糖)



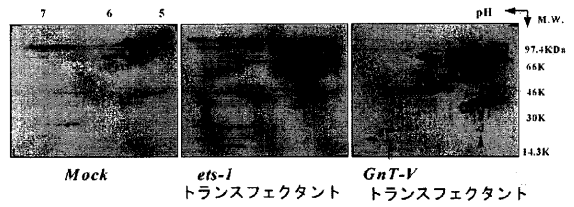
【 図 3 】



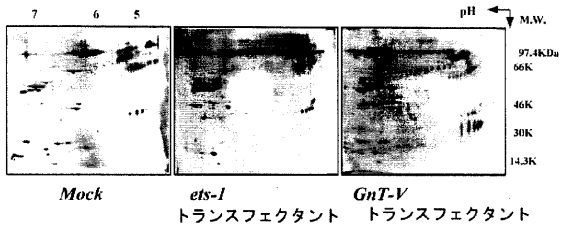
【 図 5 】



【 図 6 】

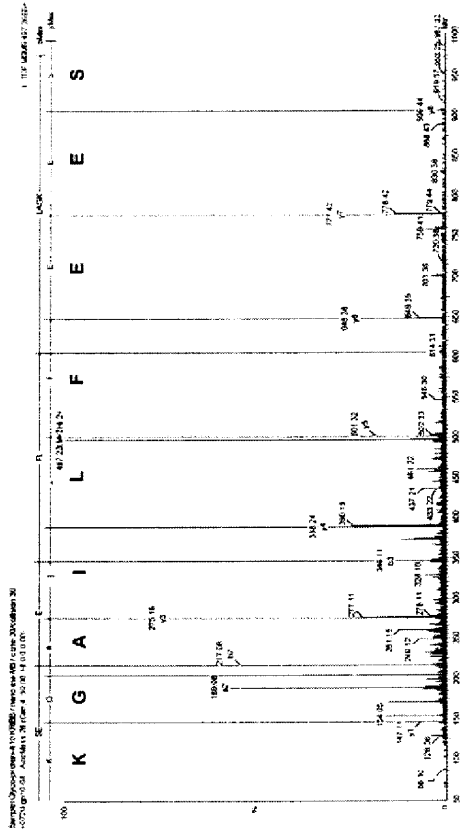


【 図 4 】



【 図 7 】

スポット'e'の MS/MS スペクトル  
SEEFLIAGK (M+H=993.5)



## 【配列表】

2008249716000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成20年6月6日(2008.6.6)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1) PDF、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ、ガレクチン結合タンパク質およびTIMP-1からなる群から選択される、N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質に対する抗体を、タンパク質発現確認用基体およびN-結合型糖鎖変化確認用基体に吸着させる工程、

2) 前記タンパク質発現確認用基体および前記N-結合型糖鎖変化確認用基体に個体から採取した血液からの試料を添加して反応させ、その後前記基体をそれぞれ洗浄する工程

3) 前記タンパク質発現確認用基体には標識された前記抗体を、前記N-結合型糖鎖変化確認用基体には標識されたL<sub>4</sub>-PHAをそれぞれ添加して反応させる工程、

4) 前記タンパク質発現確認用基体および前記N-結合型糖鎖変化確認用基体を洗浄した後、前記標識と結合する検出体が結合された発色酵素または蛍光物質を前記タンパク質発現確認用基体および前記N-結合型糖鎖変化確認用基体に添加して反応させる工程、および

5) 前記発色酵素に発色基質液を添加して発色させたあと、ELISAリーダーで吸光度を測定する工程、または前記蛍光物質を蛍光光度測定器で測定する工程を含む、前記N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質の発現、および該タンパク質のN-結合型糖鎖の変化を測定する方法。

【請求項2】

1) PDF、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ、ガレクチン結合タンパク質およびTIMP-1からなる群から選択される、N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質に対する抗体を、タンパク質発現確認用基体およびN-結合型糖鎖変化確認用基体に吸着させる工程、

2) 前記タンパク質発現確認用基体および前記N-結合型糖鎖変化確認用基体に個体から採取した血液からの試料を添加して反応させ、その後前記基体をそれぞれ洗浄する工程

3) 前記タンパク質発現確認用基体には前記抗体を、前記N-結合型糖鎖変化確認用基体には標識されたL<sub>4</sub>-PHAをそれぞれ添加して反応させる工程、

4) 前記タンパク質発現確認用基体および前記N-結合型糖鎖変化確認用基体を洗浄した後、前記タンパク質発現確認用基体には発色酵素または蛍光物質が結合された2次抗体を添加し、前記N-結合型糖鎖変化確認用基体には前記標識と結合する検出体が結合された発色酵素または蛍光物質を添加して反応させる工程、および、

5) 前記発色酵素に発色基質液を添加して発色させ、ELISAリーダーで吸光度を測定する工程、または前記蛍光物質を蛍光光度測定器で測定する工程を含む、前記N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質の発現、および該タンパク質のN-結合型糖鎖の変化を測定する方法。

【請求項3】

正常な個体から得た血液からの試料を利用して請求項1または2に記載の工程1)~5)を実施後、該試料により測定される、前記N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質の発現、および該タンパク質のN-結合型糖鎖変化の結果と、請求項1または2に記載の方

法により測定される結果を比較する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

基体が、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製 96 ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製 96 ウェルプレートおよびスライドガラスからなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

標識がビオチンで、検出体がアビジンである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

発色酵素がペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択され、蛍光物質が FITC、RITC からなる群から選択され、発色基質液が ABTS (2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))、OPD (o-フェニレンジアミン) および TMB (テトラメチルベンジジン) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

PDF、ペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ、ガレクチン結合タンパク質および TIMP-1 からなる群から選択される、N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質に対する抗体；

前記抗体が結合された、前記タンパク質発現確認用基体および N-結合型糖鎖変化確認用基体；

化合物で標識された  $L_4$ -PHA；

発色酵素が結合された前記標識と反応する検出体および発色基質液、あるいは蛍光物質が結合された前記標識と反応する検出体；ならびに、

緩衝溶液；

を含む、前記 N-結合型糖鎖変化と関連するタンパク質の発現、および該タンパク質の N-結合型糖鎖の変化を測定して大腸癌を診断するキット。

【請求項 8】

発色酵素または蛍光物質が結合された 2 次抗体をさらに含む、請求項 7 に記載のキット

【請求項 9】

ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製 96 ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製 96 ウェルプレートおよびスライドガラスからなる群から選択される基体を含む、請求項 7 または 8 に記載のキット。

【請求項 10】

標識がビオチンで、検出体がアビジンである、請求項 7 または 8 に記載のキット。

【請求項 11】

発色基質液がペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼからなる群から選択される発色酵素と、ABTS (2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))、OPD (o-フェニレンジアミン) および TMB (テトラメチルベンジジン) からなる群から選択される、請求項 7 または 8 に記載のキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

発癌及び転移の過程で起きる細胞の生物学的変化を観察すると、細胞膜表面に存在する多くの種類の糖タンパク質や糖脂質が癌遺伝子からの特定のシグナルにより、「異常グリコシル化(aberrant glycosylation)」を生じ、これによる糖鎖の変化が細胞間の接着や認識に変化を起し、その結果、発癌及び癌転移をもたらす(ハコモリとカンナギ、J. Natl. Cancer Inst.、第71巻、231~251頁、1983年；フェイス(Feizi)、Nature、第314巻、53

~57頁、1985年)。細胞外部から刺激を受けると、シグナルは癌遺伝子ras、転写因子ets-1を介して伝達され、N-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)の発現を刺激する。前記GnT-Vは、糖タンパク質の基本糖鎖の1,6位にN-アセチルグルコサミンを付加する反応を触媒する酵素であり、癌の浸潤と転移に直接的な関連があることが知られている(デニス(Dennis)等、Science、第236巻、582~585頁、1987年)。糖タンパク質は、タンパク質が合成された後小胞体ERで基本糖鎖が作られた後、ゴルジ体へ移動して細胞の多様な生命現象の結果として色々な糖転移酵素により糖の付加がなされるのであるが、1次的な糖鎖(Primary sugar chain)は6種類のN-アセチルグルコサミン糖転移酵素(I-VI)が触媒して得られ、この中で、1,6-N-アセチルグルコサミン糖鎖を形成するGnT-Vが癌の発生と転移に深く関与すると考えられている。GnT-Vは、ゴルジ体に位置し、標的タンパク質は糖鎖に変化を受けて細胞表面や細胞外に分泌される。この時、糖タンパク質は標的細胞の表面タンパク質を認識し、これと接着して癌を誘発することになる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

GnT-Vは、1987年にデニス等により、1,6側鎖が癌組織の増殖や癌転移が起きる時、高い程度で現れることが初めて報告された(デニス(Dennis)等、Science、第236巻、582~585頁、1987年)。細胞表面タンパク質であるgp130はGnT-Vの主な標的タンパク質の中の一つであるが、1,6N-アセチルグルコサミン付加に高い転移活性があることが明らかにされた。胚性管幹細胞においてGnT-Vが欠損したES細胞(GnT-Vノックアウト)マウスを構築し、ウイルス性癌遺伝子であるポリオーマウイルスの中型T抗原(以下「PyMT」と称する)を導入して癌を誘発させると、PyMTだけを過剰発現させた他の正常マウスに比べて、GnT-VノックアウトマウスではPyMTにより誘導される癌の成長と転移が大きく抑制され(グラノフスキ(Granovsky)等、Nature Med.、第6巻、306~312頁、2000年)、1,6の側鎖化が特に乳癌マウスにおいて高い転移性を示した。最近の研究では、33種類の肝細胞癌(HCC)組織におけるGnT-Vの活性が、正常組織での活性と比べて50倍、癌周辺組織に比しては4倍高いことが裏付けられた(ヤオ(Yao)等、J Cancer Res. Clin. Oncol.、第124巻、27~30頁、1998年)。また、大腸癌細胞株WiDrにこのGnT-Vを過剰発現させたものを、免疫不全マウスに導入して大腸癌を誘導した場合、またはCAM分析方法で受精卵を利用して血管新生を調査した場合にも、高い転移活性が確認された(ミヨシ等、未発表データ、2001年)。このようにGnT-Vは、癌の転移過程に関与しており、組織に関係なしに高い転移活性を有するものと考えられている。このGnT-V酵素は、ヒトの肺癌細胞及びマウスの腎臓から精製され、該酵素のcDNAクローニング、ゲノム構造及びプロモータ領域の分析がなされた(グー(Gu)等、J Biochem.、第113巻、614~619頁、1993年；ソレイバ(Soreibah)等、J Biol. Chem.、第268巻、15381~15385頁、1993年；カン(Kang)等、J. Biol. Chem.、第271巻、26706~26712頁、1996年)。最近、本発明者らも転写因子であるets-1がGnT-Vの発現に大きく関与することを報告した(コ(Ko)等、J. Biol. Chem.、第274(33)巻、22941~22948頁、1999年)。一方、最近になって食生活の西洋化により、大腸癌は、現在男女共に4番目に高い発病率を示し、持続的な増加傾向を見せているが、大腸内視鏡の他には正確に大腸癌を診断する方法がないのが実情である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

まず、標的タンパク質のcDNAを得た後、真核細胞遺伝子発現ベクターにクローニングし

、これをWiDr細胞株にクローニングして培養液からタンパク質を各1mg程度精製した後、アジュバンドと混ぜてウサギの皮下に注射してポリクローナル抗体を製造した。前記の抗体を所定量ずつ二枚の96ウェルプレートに吸着させた。即ち、96ウェルプレート(Maxisorb、Nunc社)にバクテリア由来のタンパク質Aを1ウェル当たり1 $\mu$ gずつ0.1M炭酸ナトリウム(pH 9.6)100 $\mu$ lの存在下で被覆し、続けてTBS-T(トリス緩衝食塩水 - Tween、0.2M Tris-Cl、0.4 M NaCl、0.05% Tween-20)で洗浄し、上記で製造した抗体を付着させ、再びTBS-Tで洗浄し、非付着部分をブロッキングして安定化された抗体系を調製した。血液やその他の試料を再現性と統計処理のために連続希釈してプレートに加えた後、TBS-Tで3回洗浄した。この時、標的タンパク質は各々の特異抗体に付着している。タンパク質の発現は、ビオチン標識された同一抗体で確認し、1,6 N-アセチルグルコサミンの糖鎖変化は、レクチンにより確認し、ここでビオチン標識されたL-PHAを利用した。ビオチン標識された抗体を製造するために、抗体(5~10mg/ml)を250mlのSBRB(スクシニミジル - ビオチン反応バッファー)中、23で6時間透析した。NHS-ビオチン(N-ヒドロキシスクシニミジル - ビオチン)またはNHS-LC-ビオチン(長鎖スルホスクシニミジル 6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート由来ビオチン)をDMSO(ジメチルスルホキシド)中で、2~4mg/mlの濃度になるように調整し、それに抗体とビオチン溶液を1:30(Ab:ビオチン)の比率で混ぜた後、37で攪拌し、一時間放置してビオチンと抗体を結合させ、BBS(ホウ酸緩衝食塩水)に透析してビオチン標識された抗体を製造した。レクチンの場合には、市販のビオチン標識 L-PHAを利用した。つぎに、ビオチン標識された抗体とレクチンは市販のアビジン - ペルオキシダーゼキットを利用して検出する。具体的には、ペルオキシダーゼの基質である0-フェニレンジアミンとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えて490nmでの吸光度を測定した。癌患者の血液試料中のタンパク質の発現と 1,6 N-アセチルグルコサミンのグリコシル化の変化を測定し、これらを正常対照群と比較した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008249716000001.app

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
 G 0 1 N 33/53 U  
 C 0 7 K 14/47
- (72)発明者 ファン,ソー ヤン  
 大韓民国 チョーンチュンナムド 356-983、セオサン-シ、パルボン-ミュン、ヤンギル  
 -リ 3-300
- (72)発明者 ソーン,ホスン  
 大韓民国 テジョン-シ 305-506、ユスン-ク、ボンサン-ドン、181-4、202
- (72)発明者 オー,セジョン  
 大韓民国 ソウル 158-774、ヤンチュン-ク、シンジュン-ドン、シンシガジ アパート  
 メント #1401-1205
- (72)発明者 リー,ジョン ファ  
 大韓民国 ソウル 137-796、セオチョ-ク、ジャムウォン-ドン、ハンシン2チャ アパ  
 ートメント #112-204
- (72)発明者 リー,サン チュル  
 大韓民国 テジョン-シ 305-335、ユスン-ク、コーン-ドン 395-3、ダスル ア  
 パートメント #103-901
- (72)発明者 ヨー,ジョン-シン  
 大韓民国 テジョン-シ 305-755、ユスン-ク、オウン-ドン 99、ハンビット アパ  
 ートメント #131-406
- (72)発明者 リー,デ-シル  
 大韓民国 テジョン-シ 305-761、ユスン-ク、ジョンミン-ドン、エクスポ アパート  
 メント #307-1702
- Fターム(参考) 4H045 AA10 BA09 BA53 CA40 EA51

专利名称(译)	通过测量参与癌症发展和转移的蛋白质的糖链变化来诊断癌症的方法和使用其的诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008249716A</a>	公开(公告)日	2008-10-16
申请号	JP2008121720	申请日	2008-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国研究所生物科学和生物技术		
[标]发明人	コジョンヒョン ファンソーヤン ソーンホスン オーセジョン リージョンファ リーサンチュル ヨージョンシン リーデシル		
发明人	コ,ジョン ヒョン ファン,ソー ヤン ソーン,ホスン オー,セジョン リー,ジョン ファ リー,サン チュル ヨー,ジョン-シン リー,デ-シル		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/53 C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/57469		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.B G01N33/574.A G01N33/531.B G01N33/543.575 G01N33/543.545.S G01N33/53.U C07K14/47 G01N33/574.BZN.A		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA09 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/EA51		
优先权	1020010088090 2001-12-29 KR		
其他公开文献	JP4621268B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过测量与癌症发展和转移有关的蛋白质的糖链变化来诊断癌症的方法。本发明涉及通过测量与癌症发展和转移有关的蛋白质来诊断癌症的方法，以及使用该方法的诊断试剂盒。更具体地，本发明涉及通过测量蛋白质的糖基化变化来诊断癌症的方法，以及使用该方法的癌症诊断试剂盒。本发明的方法和试剂盒可有效地用于以高灵敏度诊断包括结肠癌，胃癌，肺癌和肝癌的癌症。[选择图]无

(表1)

No	配列	名称	機能	M.W	PI	N-結合型 グリコシル化
a	配列番号 1 配列番号 2	GDF-15	PLAB/TGF- $\beta$ ファミ リ	34168.6	9.79	有
b	配列番号 3 配列番号 4 配列番号 5	シクロフ イリン	ペプチジル-アロリ ル・ シス-トランス・ イソメラーゼ A	18012.7	7.86	有
c	配列番号 6 配列番号 7 配列番号 8 配列番号 9 配列番号 10 配列番号 11	未確認	未確認	約 20K	約 5.5	有
d	配列番号 12 配列番号 13	ガレクチ ン3 結合 蛋白質	ガレクチン結合血清蛋 白質	65331.6	5.13	有
e	配列番号 14 配列番号 15	TIMP-1	マトリクスメタロプロテアーゼの 組織阻害剤	23171.1	8.46	有