

(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2010-281799

(P2010-281799A)

(43) 公開日 平成22年12月16日(2010.12.16)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01) GO 1 N 33/574 B
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 S

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2009-137643 (P2009-137643)	(71) 出願人	304031427
(22) 出願日	平成21年6月8日 (2009.6.8)		愛知県
特許法第30条第1項適用申請有り 刊行物名 第34回大学院研究発表会抄録集 発行所 国立大学法人名古屋大学大学院教育委員会 抄録集発行日 平成20年12月8日		(71) 出願人	504139662
			国立大学法人名古屋大学
		(71) 出願人	000195524
			愛知県名古屋市千種区不老町1番
		(71) 出願人	000195524
			生化学工業株式会社
		(74) 代理人	100100549
			東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

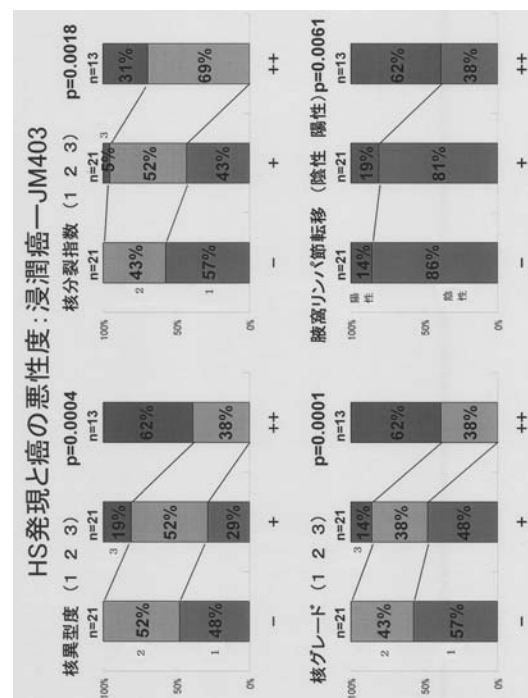
(54) 【発明の名称】 癌の悪性度の検知方法及び癌の悪性度の診断剤

(57) 【要約】

【課題】簡便かつ正確に癌の悪性度を検知できる新たな方法を提供すること。

【解決手段】癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造の存在の程度を検出するステップを含む、癌の悪性度の検知方法。

【選択図】図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中の $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造の存在の程度を検出するステップを含む、癌の悪性度の検知方法。

(ただし、前記構造における GlcA は D-グルクロン酸残基を、 GlcNH_3^+ は D-グルコサミン残基を、 $-$ はグリコシド結合をそれぞれ示す。)

【請求項 2】

前記の検出が、免疫組織染色法により行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記の検出が、前記 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体を用いて行われる、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体が、JM403 抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

癌組織が、乳癌組織である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

$\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体を含む、癌の悪性度の診断剤。

【請求項 7】

前記 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体が、JM403 抗体である、請求項 6 に記載の診断剤。

20

【請求項 8】

癌が乳癌である、請求項 6 または 7 に記載の診断剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の悪性度の検知方法及び癌の悪性度の診断剤に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、増殖の激しい細胞や生物学的悪性度の高い癌細胞を免疫組織的に検出する方法として、例えば Ki-67 タンパク質を抗体で染色し検出する方法（非特許文献 1）が知られている。Ki-67 タンパク質の検出には、あらかじめ試料をマイクロオープンで前処理する等の操作が必要であるなど、操作の迅速性の面で改善の余地がある。

30

また、染色体や DNA を指標に癌の悪性度を判別する方法も知られているが（特許文献 1、特許文献 2）、ハイブリダイゼーション等の操作が必要であり、迅速性・簡便性等の面で改善の余地がある。

また、特定の N 型糖鎖を指標として膀胱癌の悪性度を診断する方法（特許文献 3）や、ヘパラン硫酸プロテオグリカン遺伝子を包含する多種類の遺伝子群のなかから選択された少なくとも 8 種類の遺伝子の発現量を評価することによる胃癌の悪性度の評価方法（特許文献 4）も知られているが、ヘパラン硫酸糖鎖自体を指標とするものではない。

40

【0003】

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、通常、細胞膜や基底膜などの細胞外マトリクスに存在している。ヘパラン硫酸糖鎖に対するモノクローナル抗体の一つとして JM403 が知られており、このモノクローナル抗体は、ヘパラン硫酸糖鎖分子中の $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造を認識することが知られている。フローサイトメトリーを用いた解析により、この抗体は、扁平上皮癌由来細胞株である HSC-4 株及び HO-1N-1 株、大腸癌由来細胞株である LS174T 株及び C-1 株の細胞表面に結合することが知られている（特許文献 5）。しかしながら、JM403 の結合性が癌と正常細胞で異なることは示されておらず、この抗体が癌の診断に用いることができるかどうかは不明であった。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平11-258233号公報

【特許文献2】特開2000-342297号公報

【特許文献3】特開2007-212252号公報

【特許文献4】特開2004-248502号公報

【特許文献5】特開2007-298420号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Trihia H et al., Cancer, 97(5), p1321-1331 (2003)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、癌の悪性度の新たな検知法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、悪性度の高い癌組織ではヘパラン硫酸糖鎖が意外なことに細胞質内に存在していること、しかもそのヘパラン硫酸糖鎖は、浸潤性癌であるか非浸潤性であるかを問わず極めて特徴的な二糖構造を保持していることを見出し、この知見を癌の悪性度の検知方法に応用して、本発明に至った。

20

【0008】

すなわち本発明は、癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造の存在の程度を検出するステップを含む、癌の悪性度の検知方法（以下、「本発明方法」という。）を提供する。

（ただし、前記構造におけるGlcAはD-グルクロン酸残基を、GlcNH₃⁺はD-グルコサミン残基を、-はグリコシド結合をそれぞれ示す。以下同じ。）

この検出は、免疫組織染色法により行われることが好ましい。またその場合、ヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造の検出は、当該GlcA-GlcNH₃⁺構造に結合する抗体を用いて行われることが好ましい。また、このような抗体はJM403抗体であることが好ましい。

30

また、検知の対象となる癌組織は、乳癌組織であることが好ましく、乳管癌組織であることがより好ましい。

また、本発明は、GlcA-GlcNH₃⁺構造に結合する抗体を含む癌の悪性度の診断剤（以下、「本発明診断剤」という。）を提供する。ここで、GlcA-GlcNH₃⁺構造に結合する抗体はJM403抗体であることが好ましく、癌は乳癌であることが好ましい。

【発明の効果】

【0009】

本発明方法は、癌の悪性度を簡便、迅速かつ安価に検知することができ、極めて有用である。従来、特別な訓練・経験を積んだ専門の病理医が、病理組織における細胞の大きさ、形態その他の病理組織学的特徴を肉眼的に観察し、知識・経験に裏打ちされた総合的考察のもとに癌の悪性度を判定してきた。本発明方法を用いることにより、このような専門的な訓練・経験のない者であっても簡便、迅速かつ容易に、癌の悪性度を検知することができ、極めて有用である。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】正常乳腺部分の切片標本をJM403、10E4又はNAH46で免疫組織染色した結果を示す顕微鏡写真。

【図2】乳癌組織の切片標本をJM403、10E4又はNAH46で免疫組織染色した結果を示す顕微鏡写真。

50

【図3】免疫染色の程度（－、＋及び＋＋）に対応する像の一例として、乳癌組織の切片標本をJM403で免疫組織染色した場合の結果を示す顕微鏡写真。

【図4】浸潤性乳癌検体について、JM403で染色した場合の免疫染色の程度と、核異型度、核分裂指数、核グレード及び腋窩リンパ節転移の状況との関係をグラフ化した結果を示す。

【図5】浸潤性乳癌検体について、10E4で染色した場合の免疫染色の程度と、核異型度、核分裂指数、核グレード及び腋窩リンパ節転移の状況との関係をグラフ化した結果を示す。

【図6】浸潤性乳癌検体について、NAH46で染色した場合の免疫染色の程度と、核異型度、核分裂指数、核グレード及び腋窩リンパ節転移の状況との関係をグラフ化した結果を示す。

【図7】非浸潤性乳癌検体について、JM403、10E4又はNAH46で染色した場合の免疫染色の程度と、抗Ki-67抗体を用いたラベリング・インデックスとの関係をグラフ化した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

<1>癌の悪性度の検知方法

本発明方法は、癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造の存在の程度を検出するステップを含む、癌の悪性度の検知方法である。

【0012】

本発明方法における「癌組織」は、癌の部位や種類に応じて、癌患者又は癌の疑いがある者から通常の方法で摘出された組織を用いることができる。すなわち、本明細書にいう「癌組織」は、癌であることが確定した組織のみならず、癌であることが疑われる組織をも包含する概念である。

検知の対象となる癌組織は、特に限定はされないが、乳癌組織であることが好ましく、なかでも乳管癌組織であることが好ましい。

【0013】

本発明方法では、悪性度の検知対象とする癌組織の、細胞質内におけるヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造を検出することが必要となる。細胞質内におけるかかる構造を検出する方法は特に限定されないが、細胞質内の状態を最も忠実に反映させるべく、免疫組織染色法により行われることが好ましい。免疫組織染色法は、組織切片の作成、抗原抗体反応（一次）、洗浄、抗原抗体反応（二次）、洗浄、発色等の一連の各ステップを含め、それ自体公知の、通常の方法で行うことができる。

【0014】

また、上記構造の検出は、かかる構造が特異的に検出できる方法である限りにおいて特に限定されないが、当該GlcA-GlcNH₃⁺構造に結合する抗体を用いて行われることが好ましい。

【0015】

抗体の種類は特に制限されず、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体がより好ましい。モノクローナル抗体はそのフラグメントであってもよい。モノクローナル抗体のフラグメントとしては、例えば、F(ab')₂化抗体、Fab化抗体、短鎖抗体（scFv）、ダイアボディ（Dibodies）及びミニボディ（Minibodies）などが挙げられる。

モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスは特に制限されないが、IgMであることが好ましく、IgM、κ-chainであることがより好ましい。

【0016】

上記モノクローナル抗体は、例えば、タンパク質とGlcA-GlcNH₃⁺とを化学的に結合させてなる物質を抗原として免疫した哺乳動物（好ましくはマウス）の抗体産生細胞（好ましくはリンパ球）と哺乳動物（好ましくはマウス）のミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを作製し、得られたハイブリドーマからヘパラン硫酸糖鎖分子中

10

20

30

40

50

の $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマの培養上清からモノクローナル抗体を回収することにより得ることができる。

【0017】

以下に、モノクローナル抗体を得るための方法を詳細に示す。

モノクローナル抗体を得るための第一段階としては、抗体を産生する単クローンハイブリドーマを確立することが挙げられる。このハイブリドーマを確立する方法の具体的詳細は実施例で示すが、簡単には次の3工程からなる。

1. 免疫
2. 細胞融合
3. ハイブリドーマの選択と単クローン化

10

【0018】

1. 免疫

免疫の工程で用いる抗原は、タンパク質と $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ そのもの、あるいはその繰り返し構造 $(\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+)_n$ (ここでいう n は1以上の自然数) よりなる糖鎖、あるいは $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ そのもの、あるいはその繰り返し構造 $(\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+)_n$ (ここでいう n は1以上の自然数) よりなる糖鎖を含む糖鎖とを化学的に結合させてなる物質が好ましい。上記タンパク質は、ウシ血清アルブミン(以下、「BSA」という。)又はヘモシアニン(以下、「KLH」という。)であることが好ましい。

20

例えば、 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ またはその繰り返し構造と N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(以下、「SPDP」という)を反応させて、2-ピリジルジチオプロピニル $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ を得る。これをジチオスレイトル等の還元剤で還元し、チオール化 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ を得る。同様に、タンパク質と SPDP を反応させ、2-ピリジルジチオプロピニル化タンパク質を得る。次に、チオール化 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 溶液と 2-ピリジルジチオプロピニル化タンパク質溶液を混合することによって、 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ とタンパク質間に SS 結合を生成させ、 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+-\text{SS}-\text{タンパク質}$ を得る(以下、「 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 抗原」という)。

免疫される動物は豚、牛、マウス、ラット等の哺乳動物であることが好ましく、抗体産生細胞の相手となるミエローマ細胞がマウス由来のものであることが好ましいため、特にマウスが好ましい。例えば上記方法により調製した $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 抗原を哺乳動物に皮下注射することにより免疫を行うことができる。注射方法はこれに限らず、腹腔内注射、静脈注射でも良い。通常、免疫は数回に分けて行うが、免疫はアジュバントと共に投与することが好ましい。アジュバンとしては、ミョウバン、結核死菌、核酸、完全フロイドアジュバント、不完全フロイントアジュバント等、アジュバント効果が期待できるものであればよいが、特に、Tit er MAX Gold (シグマ社製) が良い。

30

【0019】

2. 細胞融合

最終免疫後にリンパ節或は脾臓を摘出し、得られるリンパ球を細胞融合に供する。細胞融合に使用される腫瘍細胞株としてはミエローマ細胞が好ましく、通常、マウスの BALB/c 由来の P3 -NS-1/1-Ag4-1、P3 -X63-Ag8-U1(P3 U1)、P3 -X63-Ag8-653、SP2/0-Ag14 等を用いることができる。

40

【0020】

3. ハイブリドーマの選択と単クローン化

ハイブリドーマの選択と単クローン化は下記に例示される方法により行うことができる。すなわち、ハイブリドーマの増殖の盛んな細胞培養上清を種々の分析法(例えばRIA法、プラーク法、凝集反応法、ELISA法、フローサイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロッティング法等)でヘパラン硫酸糖鎖分子中の $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ に反応する目的の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、次に、得られたハイブリドーマについ

50

てクローニングを行う。クローニングの方法としてはFACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) もしくは、一般によく用いられる限界希釈法等が挙げられる。例えば、限界希釈法では96ウェルプレートの1ウェルあたり細胞が1個以下になるように行うことが好ましい。どの方法を用いてもクローニングは2回繰返し行うことが好ましく、単一クローンとすることが好ましい。

【0021】

モノクローナル抗体を産生する方法としては、得られた単一クローンを、大量にin vitro で培養する方法、in vivo で培養 (腹水化) する方法が挙げられ、目的に応じて選択することができる。単一のハイブリドーマが作るモノクローナル抗体は、細胞培養液又は、ハイブリドーマを移植したマウスの腹水から分離精製することができる。これら粗抗体液からの抗体精製は、塩析、イオン交換、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動等、生化学的的一般的手法を適宜組み合わせることによって達成することができる。

10

【0022】

本発明の方法に用いることのできるモノクローナル抗体として、上記構造に特異的に結合するものである限りにおいて特に限定されないが、具体的には、JM403抗体が例示される。JM403抗体 (特表2005-524074号公報: Diabetologia, 37(3), p 313-320 (1994)) は、ヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造を特異的に認識するモノクローナル抗体である。その免疫グロブリンクラスはマウスIgMであり、抗原をヘパリチナーゼ処理することによって結合性が消失し、HA (ヒアルロン酸)、CS (コンドロイチン硫酸)、DS (デルマタン硫酸)、KS (ケラタン硫酸) とは実質的に結合しない。

20

このJM403抗体は生化学バイオビジネス株式会社から市販されており、その市販品をそのまま本発明方法に用いることもできる。

JM403抗体を用いる場合には、本発明方法は、「癌組織の細胞質内に存在する、JM403抗体に結合する抗原の存在の程度を検出するステップを含む、癌の悪性度の検知方法」と換言して理解することもできる。

【0023】

免疫組織染色によって癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造を検出する場合には、当該構造の「存在の程度」は、例えば免疫組織染色後の切片標本を光学顕微鏡で観察し、細胞質が免疫染色された細胞をカウントして、その全細胞数に占める割合を算出することによって示すことができる。また、前記構造の「存在の程度」は、細胞質が免疫染色された細胞の割合に応じて、例えば以下のように分類して示してもよい。

30

++ : 癌細胞の50%以上が染色されている

+ : 癌細胞の10%以上50%未満が染色されている

- : 染色されている癌細胞が10%未満である

【0024】

癌の悪性度は、このようにして検出され示された「癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中のGlcA-GlcNH₃⁺構造の存在の程度」と関連付けることによって検出することができる。すなわち、当該構造の存在の程度が高ければ高いほど、それだけ悪性度も高い、と評価することで検出することができる。すなわち、例えば、前記の「-」、「+」、「++」にしたがって分類した場合には、「++」が最も悪性度が高い、と評価・検出することができる。

40

【0025】

ここにいう悪性度は、核異型度、核分裂指数、核グレード、腋窩リンパ節転移、及び/又は抗Ki-67抗体を用いたラベリング・インデックス (Labeling Index) として把握してもよい。すなわち本発明方法における「癌の悪性度の検知方法」は、これら各指標の検知方法、例えば「核グレードの検知方法」等としての概念をも包含するものである。

【0026】

50

< 2 > 本発明診断剤

本発明診断剤は、 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体を有効成分とする、癌の悪性度の診断剤である。

本発明診断剤の有効成分である、「 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体」についての説明は、前記< 1 >と同様である。すなわち、本発明検知方法において用いることができる抗体を、そのまま本発明診断剤の有効成分として用いることができる。当該抗体に標識物質が直接結合していてもよいことはいうまでもない。

本発明診断剤は、「 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体」を有効成分として含有している限りにおいて、さらに他の成分を含有してもよい。このような他の成分の一例としては、例えば試薬的に許容される安定化剤、保存剤、賦形剤等を例示することができる。

本発明診断剤は、「 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体」をそのまま、又は必要に応じてさらに前記のような他の成分を添加して、通常試薬・製剤等の調製方法にしたがって製造することができる。

また本発明診断剤は、前記< 1 >における本発明検知方法に記載の方法にしたがって使用することができる。

【0027】

また、本発明診断剤は、 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体を検出する試薬をさらに含んでもよい。このような試薬としては、例えば、二次抗体（ $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体（一次抗体）に結合し、かつ標識物質が結合した抗体（当該一次抗体に係る免疫グロブリンに結合する抗体））を例示することができる。また、 $\text{GlcA}-\text{GlcNH}_3^+$ 構造に結合する抗体が標識物質と直接結合しているような場合において、例えば当該標識物質が酵素である場合には、当該酵素の基質（発色基質など）であってもよい。

さらに、他の構成成分として、例えば洗浄液、酵素反応停止液等を含んでもよい。また、測定バッチ同士の実施レベルを一定水準に保つための陽性コントロール（QCコントロール）を含有させることもできる。

これらの構成成分は、それぞれ別体の容器に収容し保存しておくことができる。

【0028】

以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、これにより本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】

【0029】

1. 癌組織

悪性度の検知の対象として、60名の乳癌患者から外科手術により切除した乳管癌組織を用いた。この60名の年齢は27～87歳（平均54.6歳）であり、その他の各種指標の内訳は以下のとおりであった。

- | | |
|----------------|------------------------|
| (1) 浸潤／非浸潤の別 | 非浸潤癌：5例、浸潤癌：55例 |
| (2) T分類 | T1：40例、T2：13例、T3：2例 |
| (3) 腋窩リンパ節転移 | 陽性17例、陰性38例 |
| (4) ホルモンレセプター | ER陽性：37例、PgR陽性：23例 |
| (5) HER2過剰発現 | あり：10例、なし：50例 |
| (6) 浸潤性癌の核グレード | グレード1：22、同2：22例、同3：11例 |

核グレードは、日本乳癌学会編「乳癌取扱い規約 第16版」（金原出版株式会社）に記載された基準にしたがって判定した。

【0030】

2. 切片標本の作製と免疫組織染色

上記の乳管癌組織について、ホルマリン・パラフィン切片を作成した。免疫組織染色は、抗ヘパラン硫酸モノクローナル抗体であるJM403、10E4及びNAH46（いずれも生化学バイオビジネス株式会社販売）、並びに抗Ki-67抗体（MIB-1, Abcam社

10

20

30

40

50

、Cambridge, UK)) を用い、A B C 法 (Avidin-Biotin Complex法) によって行った。具体的には、以下のとおり行った。

【0031】

パラフィン包埋した組織を4マイクロメートルの厚さに薄切した。この切片を脱パラフィン処理して内因性ペルオキシダーゼを0.1%の窒化ナトリウムと過酸化水素で不活化し、次いで内因性アビジン、ビオチン結合部位をAvidin/Biotin Blocking Kit SP-2001 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) を用いてブロックした。次いで、この切片を0.05%のカゼインと10%のヤギ血清を含有するリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中で30分間インキュベートして非特異的吸着をブロックした。

次いで、この切片を0.1%のカゼインを含有するPBSで0.5から5マイクログラム/mlに希釈した一次抗体 (JM403、10E4、NAH46又は抗Ki-67抗体) 中でインキュベートした。インキュベートは、摂氏4度で一晩行った。その後、切片を0.05%のカゼインを含有するPBSで洗浄した。

次いでこの切片を、ビオチン標識化されたマウス免疫グロブリンに対するヤギのF(ab') (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 中で30分間、室温でインキュベートした。その後、この切片を0.05%のカゼインを含有するPBSで洗浄した。

次いで、この切片をhorseradish peroxidase-streptavidin (Vectastain Elite ABC kit PK6100, Vector Laboratories Inc.) と反応させた。その後、この切片を0.05%のカゼインを含有するPBSで洗浄し、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) で染色して、さらにメチールグリーン溶液でカウンター染色を行った。

【0032】

なお、JM403、10E4及びNAH46は、それぞれ、ヘパラン硫酸糖鎖分子中の次の構造を認識するものである。

JM403 : GlcA-GlcNH₃⁺構造

10E4 : GlcA-GlcNS構造 (GlcNSは、N-硫酸グルコサミン残基を示す)

NAH46 : GlcA-GlcNAc構造 (GlcNAcは、N-アセチルグルコサミン残基を示す)

【0033】

3. 観察・評価

(1) 細胞質における免疫染色の程度

免疫組織染色後の切片標本を光学顕微鏡で観察し、細胞質が免疫染色された細胞の数をカウントし、以下のとおり免疫染色の程度を評価した。

++ : 乳癌細胞の50%以上が染色されている

+ : 乳癌細胞の10%以上50%未満が染色されている

- : 染色されている乳癌細胞が10%未満である

【0034】

コントロールとして、正常乳腺部分の切片標本をJM403、10E4又はNAH46で免疫組織染色した結果を図1に示す。その結果、60例のすべてにおいて、いずれの抗体を用いた場合にも、細胞質の染色は見られず、正常乳腺の基底膜及び血管壁に染色が見られた。

【0035】

乳管癌組織の切片標本をJM403、10E4又はNAH46で免疫組織染色した結果を図2に示す。その結果、JM403又はNAH46を用いた場合に、細胞質の染色がみられた。

【0036】

また、上記の各免疫染色の程度に対応する像の一例として、乳管癌組織の切片標本をJM403で免疫組織染色した場合の結果を図3に示す。図3の「-」の像における矢印は、血管壁における染色を示すものである。

10

20

30

40

50

【0037】

これらの結果から、乳管癌組織の切片標本をJM403又はNAH46で染色した場合には、細胞質が染色されることが示された。このことから、これら各々の抗体に特異的に結合する構造を有するヘパラン硫酸糖鎖が、乳管癌組織の細胞質内に存在していることが示された。

【0038】

(2) 乳管癌組織の細胞質内における染色の程度

乳管癌組織の切片標本をJM403、10E4又はNAH46で免疫組織染色した場合における、細胞質内の染色程度の分布(%)を表1に示す。表1から、JM403について陽性を示したもの(前記の「+」と「++」を合わせたもの)は、症例の約6割近くに及んだ。

10

なお、10E4で免疫組織染色したものについては、ほとんどが細胞膜のみ染色された。そこで、10E4で染色したものについては、細胞膜のみが染色されたものも含めてカウントした。

【0039】

【表1】

表1

	-	+	++	陽性率 (+&++)
JM403	41.7	36.7	21.6	58.3
10E4	55	33.3	11.7	45
NAH46	75	20	5	25

20

【0040】

(3) 細胞質の免疫染色の程度と、癌の悪性度に関する各指標との関係

(3-1) 浸潤性乳管癌について、上記の免疫染色の程度と、核異型度、核分裂指数、核グレード及び腋窩リンパ節転移の状況との関係をグラフ化した。

30

JM403で染色した場合の結果を図4に、10E4で染色した場合の結果を図5に、NAH46で染色した場合の結果を図6にそれぞれ示す。

【0041】

その結果、JM403で染色した場合には、細胞質の免疫染色の程度が強いほど核異型度・核分裂指数・核グレードが高く、腋窩リンパ節転移も陽性症例が増加し、これらの諸項目とJM403の発現には強い正の相関が各々認められた。また10E4で染色した場合には、免疫染色の程度と、核異型度、核分裂指数、核グレード及び腋窩リンパ節転移のいずれの間にも、有意な相関関係は認められなかった。

またNAH46で染色した場合には、免疫染色の程度と腋窩リンパ節転移との間において有意な正の相関は認められなかった。

40

【0042】

(3-2) 非浸潤性乳管癌の評価については、上記の免疫染色の程度と核グレードは浸潤癌の評価に用いられるものであり、非浸潤癌の評価には使用されない(日本乳癌学会編「乳癌取り扱い規約 第16版」(金原出版株式会社))、Ki-67 Labeling Indexとの関係を悪性度の評価指標に使用した。非浸潤癌3例と浸潤性乳管癌標本内の非浸潤性乳管癌のうち評価可能であった21例を合わせて解析した。結果を図7に示す。

その結果、JM403で染色した場合のみ、細胞質の染色の程度と公知の悪性度の指標であるKi-67ラベリング・インデックスとの間に有意に強い正の相関が認められた。

なお以上のデータ解析において、独立性の検定にはカイ二乗検定を、平均値の差の検定

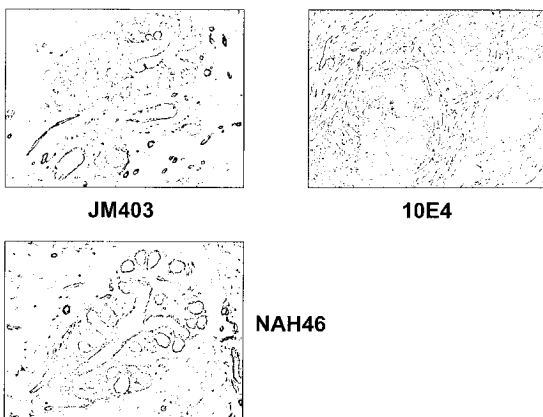
50

にはウィルコクソン (Wilcoxon) の順位和検定を用いた。

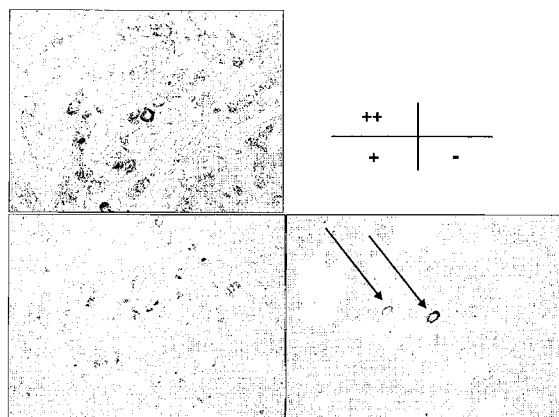
【 0 0 4 3 】

以上の結果から、癌組織の細胞質内に存在するヘパラン硫酸糖鎖分子中の GlcA-GlcNH_3^+ 構造の存在の程度を検出することにより、浸潤性・非浸潤性の癌を問わず、従来行われてきた病理組織学的判定に極めて近いかたちで、癌の悪性度の検知が可能であることが示された。

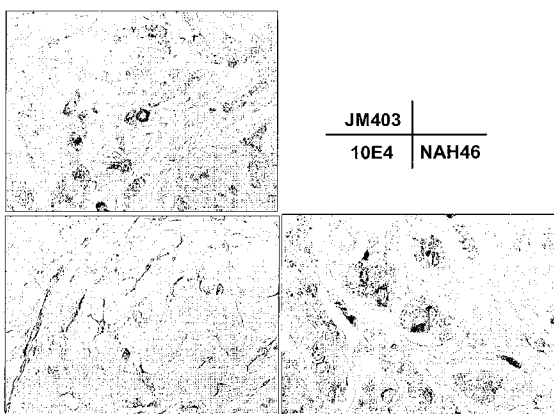
【 図 1 】



【 図 3 】

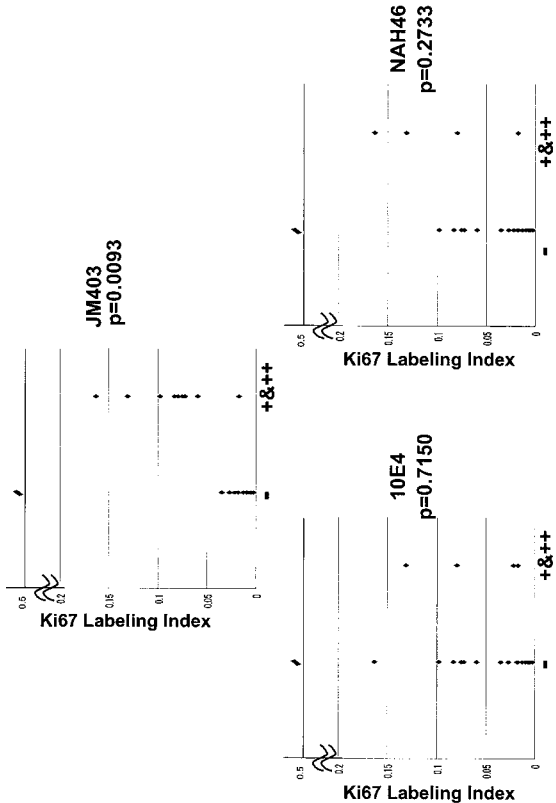


【 図 2 】



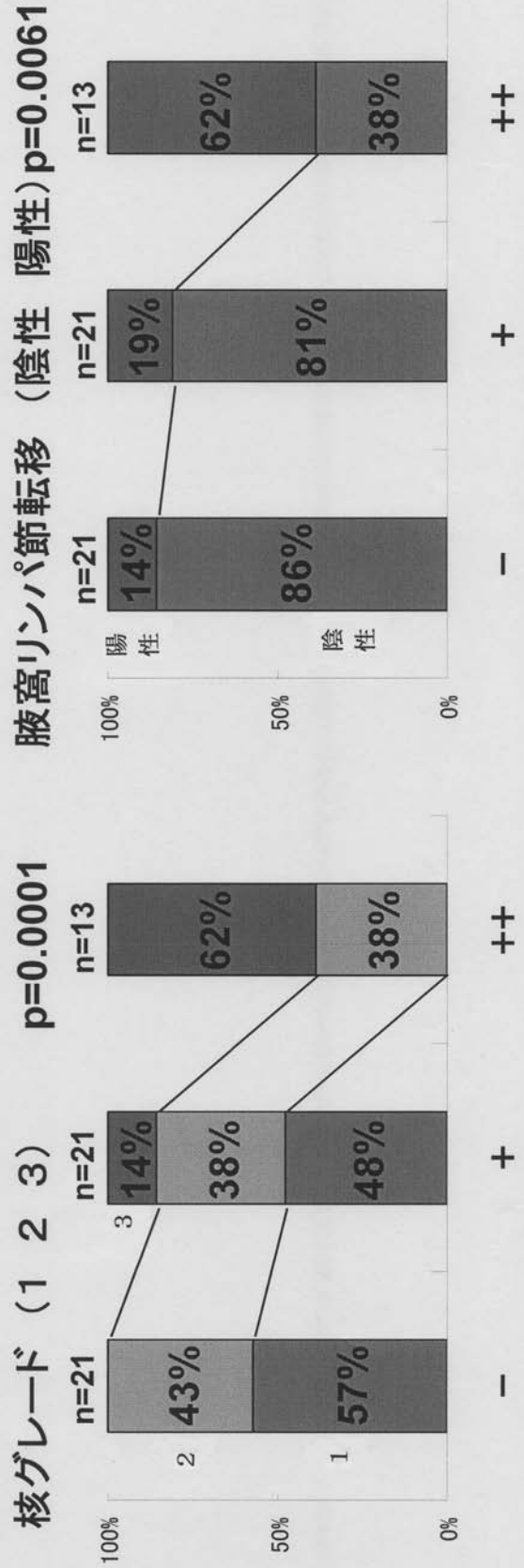
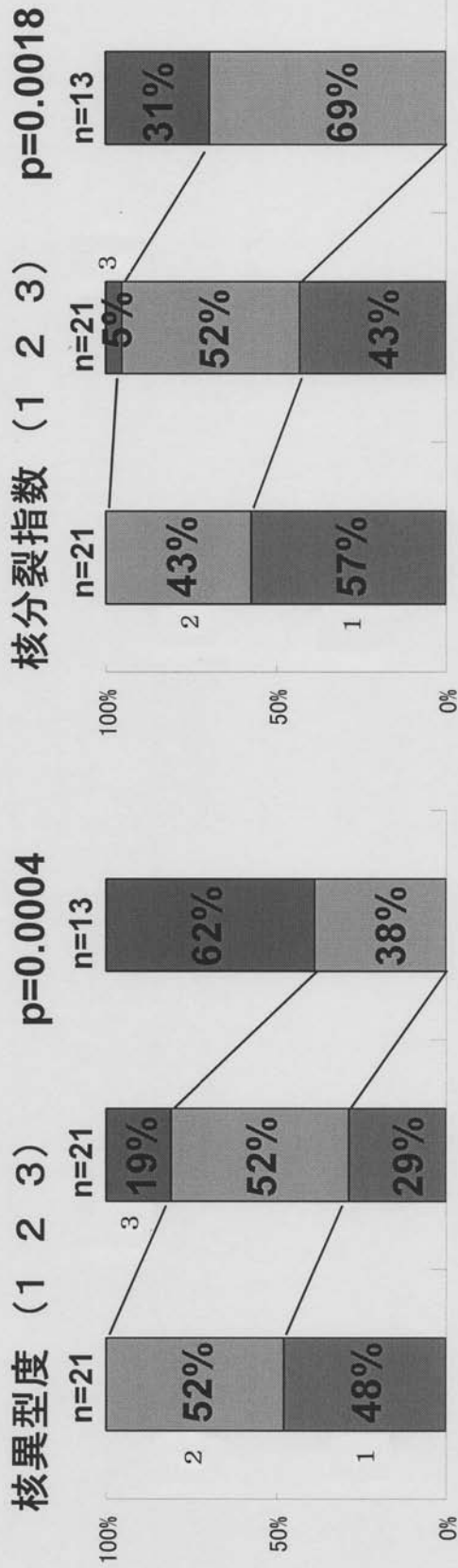
HS発現と癌の悪性度：非浸潤癌

【図 7】



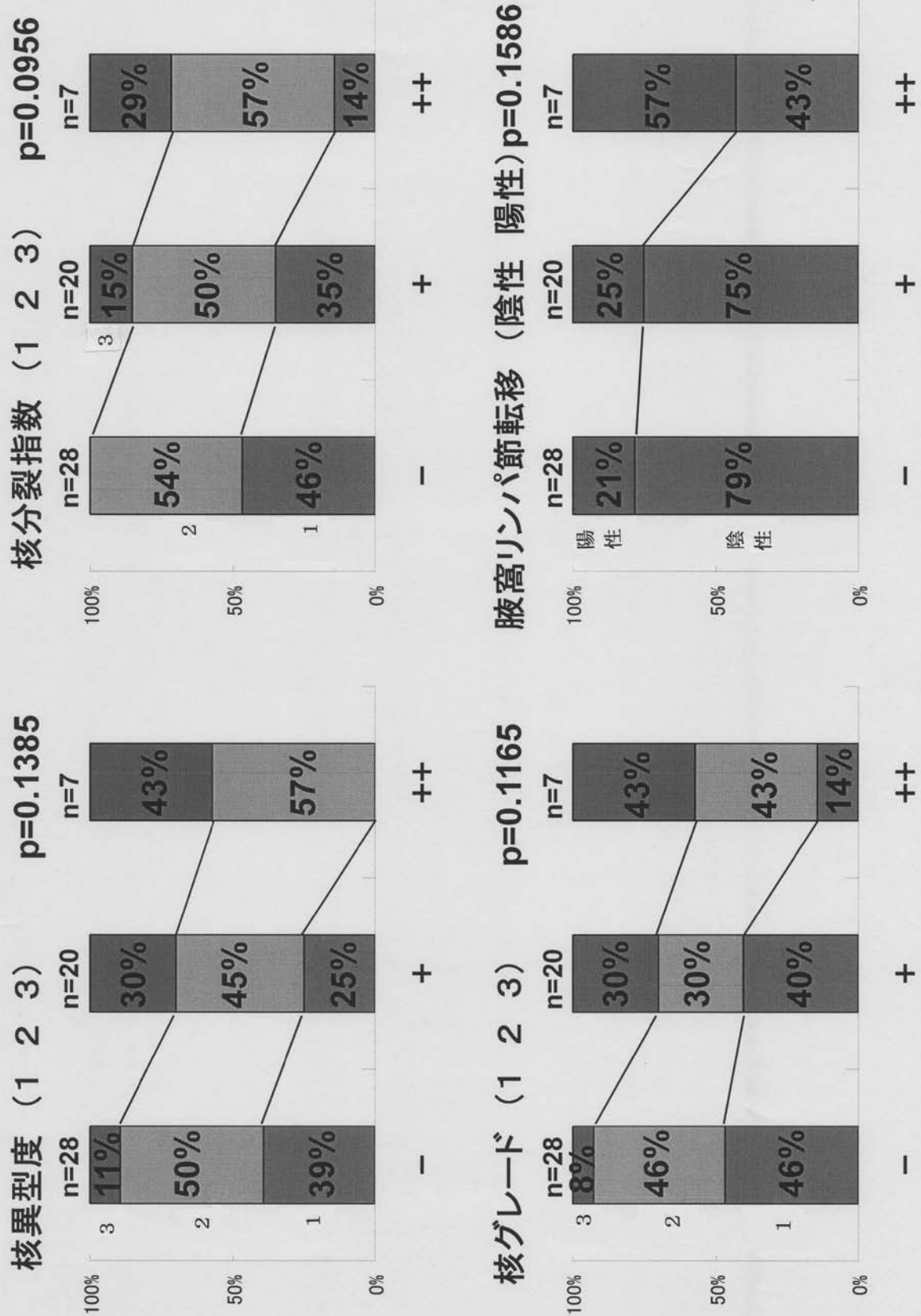
【図 4】

HS発現と癌の悪性度：浸潤癌—JM403



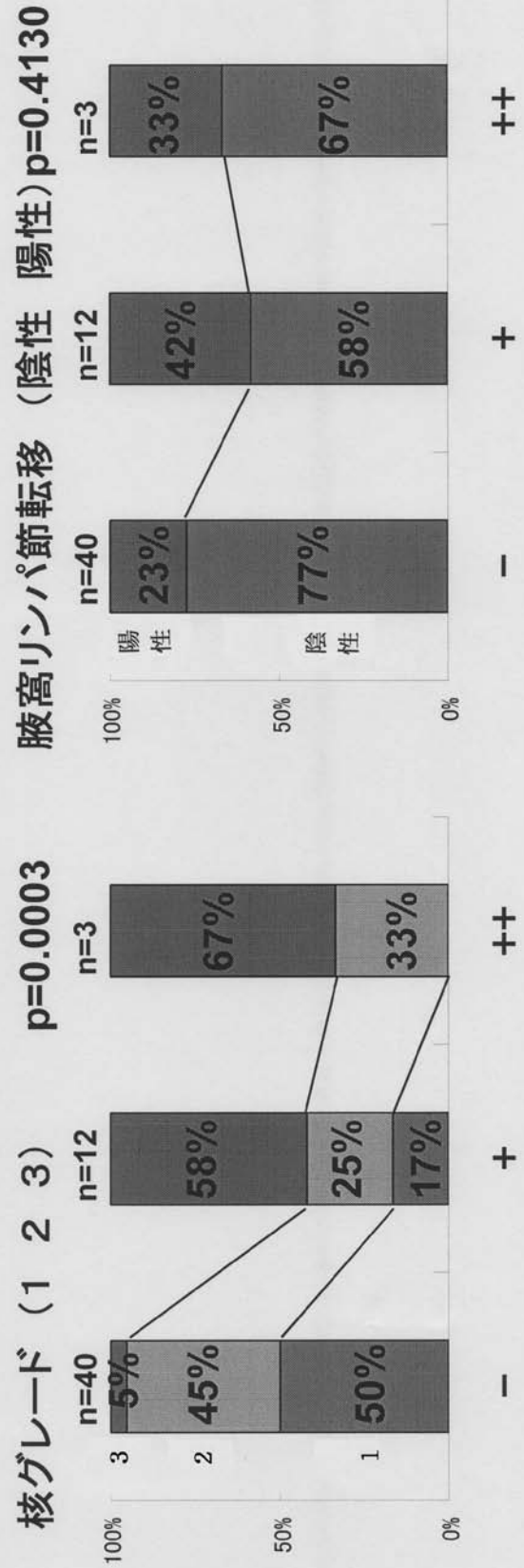
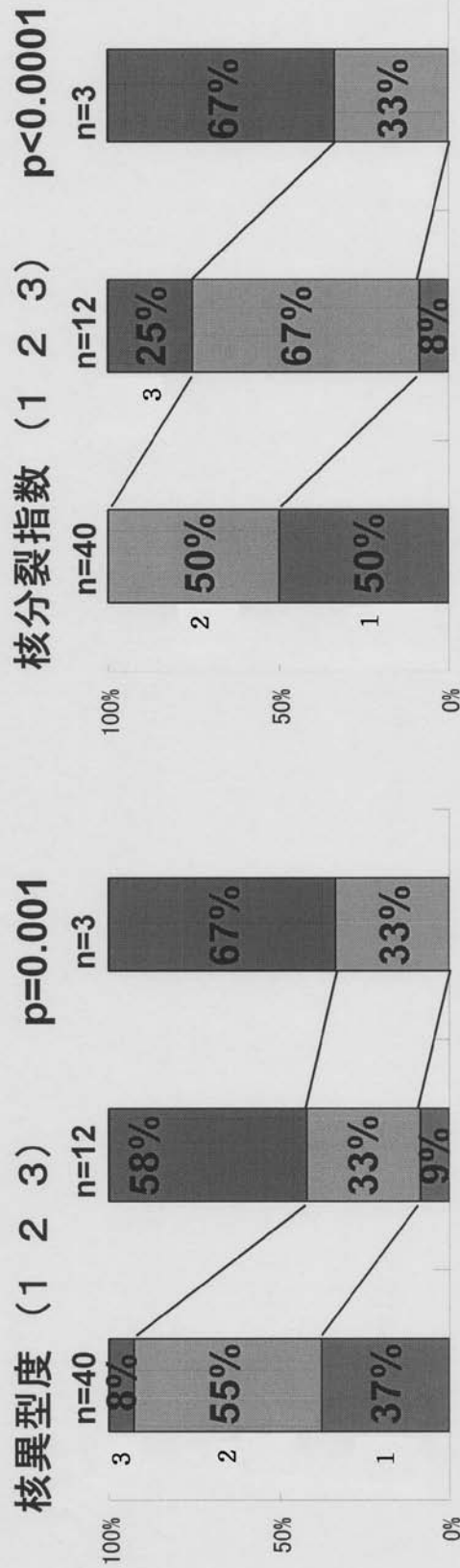
【図 5】

HS発現と癌の悪性度：浸潤癌—10E4



【図 6】

HS発現と癌の悪性度：浸潤癌—NAH46



フロントページの続き

- (74)代理人 100126505
弁理士 佐貫 伸一
- (74)代理人 100131392
弁理士 丹羽 武司
- (72)発明者 藤井 正宏
愛知県岡崎市欠町字栗宿 1 8 愛知県がんセンター愛知病院内
- (72)発明者 京ヶ島 守
愛知県名古屋市千種区鹿子殿 1 番 1 号 愛知県がんセンター研究所内
- (72)発明者 石丸 剛
東京都東大和市立野三丁目 1 2 5 3 番地 生化学バイオビジネス株式会社研究所内
- (72)発明者 角田 伸行
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 小田 高司
愛知県岡崎市欠町字栗宿 1 8 愛知県がんセンター愛知病院内
- (72)発明者 神奈木 玲児
愛知県名古屋市千種区鹿子殿 1 番 1 号 愛知県がんセンター研究所内

专利名称(译)	检测癌症恶性肿瘤的方法和癌症恶性肿瘤的诊断剂		
公开(公告)号	JP2010281799A	公开(公告)日	2010-12-16
申请号	JP2009137643	申请日	2009-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 生化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	爱知県 国立大学法人名古屋大学 生化学工业株式会社		
[标]发明人	藤井正宏 京ヶ島守 石丸剛 角田伸行 小田高司 神奈木玲児		
发明人	藤井 正宏 京ヶ島 守 石丸 剛 角田 伸行 小田 高司 神奈木 玲児		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.B G01N33/53.S		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
其他公开文献	JP5711877B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够轻松准确地检测癌症恶性肿瘤的新方法。
该方法包括检测存在于癌组织的细胞质中的硫酸乙酰肝素糖链分子中
GlcA-GlcNH 3 + 结构的存在程度。检测癌症恶性的方法。 点域4

