

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体から分離された試料において、配列表の配列番号 2 ～ 30 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を有する C A P R I N - 1 タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有するポリペプチドの発現を測定することを含む、癌の検出方法であって、該抗体が、癌細胞表面に発現する該ポリペプチドと反応性を有することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

測定すべき前記ポリペプチドは、配列番号 2 ～ 30 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を有する C A P R I N - 1 タンパク質、又は該 C A P R I N - 1 タンパク質と 85 % 以上の配列同一性を有するポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記生体が、ヒト、イヌ又はネコである、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

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

【請求項 5】

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

【請求項 6】

前記生体がヒトであり、測定すべき前記ポリペプチドは配列番号 2 又は 4 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 7】

前記試料が、血清、血漿、腹水又は胸水である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリペプチドの発現の測定は、前記試料中に含まれる、該ポリペプチドをコードする m R N A を測定することにより行われる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 m R N A の塩基配列中の 15 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、前記試料中の前記 m R N A の存在量を調べる、請求項 8 記載の方法。

30

【請求項 10】

前記生体がイヌであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列中の 15 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記生体がヒトであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 1 又は 3 に示される塩基配列中の 15 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、請求項 9 記載の方法。

40

【請求項 12】

前記試料が組織又は細胞である、請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記癌が、脳腫瘍、頭、首、肺、子宮、又は食道の扁平上皮癌、メラノーマ、肺又は子宮の腺癌、腎癌、悪性混合腫瘍、肝細胞癌、基底細胞癌、肋細胞腫様歯肉腫、口腔内腫瘤、肛門周囲腺癌、肛門嚢腫瘍、肛門嚢アポクリン腺癌、セルトリ細胞腫、膣前庭癌、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、脂腺腺腫、汗腺癌、鼻腔内腺癌、鼻腺癌、甲状腺癌、大腸癌、気管支腺癌、腺癌、腺管癌、乳腺癌、複合型乳腺癌、乳腺悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、線維肉腫、血管周皮腫、骨肉腫、軟骨肉腫、軟部組織肉腫、組織球肉腫、粘液肉腫、未分化肉腫、肺癌、肥満細胞腫、皮膚平滑筋腫、腹腔内平滑筋腫、平滑筋腫、慢性型リンパ球

50

性白血病、リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小～中細胞型リンパ腫、副腎髄質腫瘍、顆粒膜細胞腫及び褐色細胞腫からなる群より選ばれる少なくとも１種の癌である、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】

前記ポリペプチドの発現量が対照と比べて多い場合に癌の悪性度が高くなることに基づき、癌の悪性度をさらに検出することを含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】

前記ポリペプチドの発現量が対照と比べて多い場合に癌の進行度が進んでいることに基づき、癌の進行度をさらに検出することを含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。

10

【請求項１６】

配列表の配列番号２～３０のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を有するCAPRIN-1タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有し生体内で産生されるポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を含む癌検出試薬であって、該抗体が、癌細胞表面に発現する該ポリペプチドと反応性を有することを特徴とする、癌検出試薬。

【請求項１７】

前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、癌細胞の表面に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、請求項１６記載の癌検出試薬。

20

【請求項１８】

前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号２～３０のうち配列番号６および配列番号１８を除く偶数の配列番号で表されるいずれかのアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号５０～９８又はアミノ酸残基番号２３３～３０５の領域内の連続する７個以上のアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを部分配列として含むポリペプチド、と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントを含むことを特徴とする、請求項１６又は１７記載の癌検出試薬。

【請求項１９】

前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号４３に結合する抗体又はその抗原結合性断片、配列番号４４と４５のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号４４と４６のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号４４と４７のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号４４と４８のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号４９と５０のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号５１と５２のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号５３と５４のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号５５と５６のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号５７と５８のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、あるいは配列番号５９と６０のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片である、請求項１６～１８のいずれか１項に記載の癌検出試薬。

30

40

【請求項２０】

配列表の配列番号１～２９のうち奇数の配列番号に示されるいずれかの塩基配列中の１５塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む癌検出試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、CAPRIN-1を腫瘍マーカーとする癌の検出方法に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

癌は全死亡原因の第一位を占める疾患であり、現在行われている治療は手術療法を主体に放射線療法と化学療法を組み合わせた、対処療法が主となっている。これまで医療技術の発達により、早期発見できれば癌は治せる可能性の高い病となってきた。そのため、癌患者の体力的、経済的負担なく、血清や尿などを用いて簡便に検査できる癌の検出方法が求められている。

【 0 0 0 3 】

血液や尿を用いた癌診断法として、最近では腫瘍マーカーなどの腫瘍生産物を測定する方法が普及してきた。腫瘍生産物とは、腫瘍に関連する抗原、酵素、特定のタンパク質、代謝産物、腫瘍遺伝子、腫瘍遺伝子生産物及び腫瘍抑制遺伝子などを指し、癌胎児性抗原 C E A、糖タンパク質 C A 1 9 - 9、C A 1 2 5、前立腺特異抗原 P S A、甲状腺で産生されるペプチドホルモンであるカルシトニンなどが一部の癌で腫瘍マーカーとして癌診断に活用されている。しかし多くの癌種においては、癌診断に有用な腫瘍マーカーは存在しない。また、現在知られている腫瘍マーカーの大部分は、体液中にはごく微量 (p g / m l オーダー程度) しか存在しないため、それらを検出するためには、高感度な測定法や特殊な技術が必要とされる。このような現状の中で、各種癌を簡便な操作で高感度に検出できる新規な癌検査手段が提供されれば、各種癌に対する診断用途が開かれると期待される。

10

【 0 0 0 4 】

また、癌の検出が可能だけでなく、目に見えない部分に発生した癌診断、癌の進行度診断、癌の悪性度や術後の経過診断、再発診断、転移診断などが可能であれば、非常に有用である。

20

【 0 0 0 5 】

具体的には、目に見えない部分に発生した癌診断が可能となれば、腹腔内など気づきにくい部分の癌の早期発見に有用である。また、腫瘍が肉眼で確認できるほど大きくない場合、超音波検査、C T (コンピュータトモグラフィ) 又は M R I (核磁気共鳴イメージング) でも発見できないような癌を発見することができる。

【 0 0 0 6 】

また、癌の進行度については、腫瘍の原発部位での拡がりの程度と、所属リンパ節や遠隔臓器への転移の有無とに基づき分類される。一般に、ステージと呼ばれる病期は 5 段階に分類されており、数字が大きくなるほど進行している。厳密には臓器によって定義が異なるが、例えば病期 0 は上皮内に留まっている癌、病期 I V は遠隔転移を起こしているような癌である。こういった癌の進行度がわかった場合には、適切な治療方針の決定のほか、抗癌剤治療効果診断が可能となる。治療方針の決定の具体例としては、前立腺癌などは悪性度が非常に低く、ほとんど進行しないまま治療を必要としないものも存在する一方、骨などに転移を起こして痛みを伴って患者を死に至らしめるような進行性のものも存在する。ホルモン療法や摘出手術などの治療にはそれぞれ副作用が伴うため、治療法を適切に判断し決定する必要がある。また、抗癌剤選択が適切か否かや、抗癌剤投与を終えるタイミングなどを適切に判断することができれば、患者の体力的、経済的負担も軽減できる。そのため、進行度が診断できることは重要である。

30

40

【 0 0 0 7 】

癌細胞は特徴の一つに幼若化すなわち脱分化するという性質がある。一部の癌を除いて、低分化あるいは未分化な分化度の低い癌細胞ほど、転移後の増殖も早く治療予後も不良である。このような癌を悪性度が高いという。逆に、高分化な癌細胞すなわち細胞分化度が高いものほど臓器の構造・機能的性質を残しており、比較的悪性度が低いと言える。こういった癌の悪性度がわかった場合、腫瘍が小さくても悪性度が高ければ腫瘍摘出時のマージンを多く確保したり、周辺組織の広範囲に注意して経過観察したりすることができる。

【 0 0 0 8 】

再発、転移を含む術後の経過診断ができる場合には、手術によって腫瘍が完全に摘出で

50

きたかどうかという診断が可能となる。摘出が完全でなかった場合は再発が起こる可能性が高いため、より注意深く短い間隔で経過観察を行ったり、場合によっては早期に再手術に踏み切ったりする判断材料となる。また、再発した場合にも早期に発見できる可能性が高い。遠隔転移を起こしている場合には発見が遅れがちであるが、転移診断が可能となれば、摘出部位とその周辺以外にも検査範囲を広げる判断材料となる。

【 0 0 0 9 】

ところで、イヌはヒトと比べ7倍早く年を取ることが知られている。最近、コンパニオンアニマルは家族の一員として飼育され、飼い主と同様の生活習慣を持っていることが多い。そのため、コンパニオンアニマルの癌罹患により、飼い主が将来癌を発症する危険性が高いことを予測することができる。コンパニオンアニマルの簡便で正確な癌診断が可能となれば、飼い主の癌予防の手がかりとなることが期待される。

10

【 0 0 1 0 】

現在、イヌの飼育数は日本では約670万頭、また米国では約1764万頭ともいわれている。狂犬病予防接種のほかに5種、7種、8種などの混合ワクチンが一般に普及し、イヌパルボウイルス感染症、イヌジステンパーウイルス感染症、イヌパラインフルエンザ（ケンネルコフ）、イヌアデノウイルス2型感染症（ケンネルコフ）、イヌ伝染性肝炎、イヌコロナウイルス感染症、レプトスピラ病といった致死率の高い感染症が減少した。そのため、イヌの平均寿命は延び、7歳以上の高齢犬は全飼育数の35.5%を占めている。死亡原因もヒトと同じく癌や高血圧、心臓病などが増加の一途をたどっている。米国では1年間に約400万頭が癌と診断されており、日本においても潜在的に約160万頭に何らかの腫瘍があるといわれている。

20

【 0 0 1 1 】

しかしながら、これまで簡便な動物用の癌診断薬は存在せず、動物医療においてはX線、CT、MRIによる撮影などの検査法も普及していない。触診や簡単な血液検査、X線撮影による検査を行って、獣医の経験に大きく依存した診断が行われているのが現状である。血清を用いた検査法も一部では行われ始めたが、イヌの腫瘍マーカーはまだ見つからないため、ヒトの腫瘍マーカーを用いたものとなっている。

【 0 0 1 2 】

正確な癌診断のためには、開腹手術が必要であり、イヌの体力的負担、飼い主の費用負担の問題が大きい。イヌやネコといったコンパニオンアニマルの癌診断を簡便に行うことができれば、早期発見や正確な診断につながりコンパニオンアニマルの癌治療に有用であると期待される。また、そういった血清を用いた簡便な癌診断が可能になれば、癌診断が可能になるだけでなく、定期的な健康診断や手術前診断、治療方針の決定に大きく貢献することが期待される。

30

【 0 0 1 3 】

コンパニオンアニマルはヒトのように健康診断が普及していないため発見が遅れ、腫瘍が大きくなって初めて飼い主が気づき、来院することが多い。その大きくなってしまった腫瘍が悪性である場合、手術などの外科的療法や抗癌剤などの投薬を行ったとしても、すでに手遅れとなる場合が非常に多い。そのため、獣医が悪性と判断した場合には手術せずに抗癌剤治療を行うのが一般的である。手術を行う場合にも、マージン確保の大きさや手術中の血液、細胞飛散対策といった手術中の対策も厳重に施す必要がある。手術後すぐに抗癌剤治療を開始し、経過観察も短い間隔で行うことが望ましい。最近普及しつつあるドッグドックといわれるイヌ健康診断に取り入れられれば、早期発見につながることが期待される。

40

【 0 0 1 4 】

一方、良性腫瘍である場合には、腫瘍が大きくとも手術に踏み切れる。手術後は切除部分のケアだけですみ、高価な抗癌剤治療を行う必要はなく、経過観察に神経を尖らせる必要もない。

【 0 0 1 5 】

このような現状から、動物の癌診断に適用できる高感度で簡便な癌検出手段が提供され

50

れば、正確で無駄のない治療が可能になり、飼い主にとっても獣医にとってもメリットが大きい。

【0016】

Cytoplasmic - and proliferation - associated protein 1 (CAPRIN - 1) は、休止期の正常細胞が活性化や細胞分裂を起こす際に発現し、また細胞内でRNAと細胞内ストレス顆粒を形成してmRNAの輸送、翻訳の制御に関与することなどが知られている細胞内タンパク質である。一方で、CAPRIN - 1には色々な別名が存在しており、その一例としてGPI - anchored membrane protein 1やMembrane component surface marker 1 protein (M11S1) などがあり、あたかも本タンパク質が細胞膜タンパク質であることが知られていたかのような名称がある。これらの別名は、元々、CAPRIN - 1の遺伝子配列がGPI結合領域を有し、大腸由来細胞株に発現する膜タンパク質であるとする報告（非特許文献9）に由来するが、後にこの報告でのCAPRIN - 1の遺伝子配列は誤りであり、現在GenBank等に登録されているCAPRIN - 1の遺伝子配列が1塩基欠損することによりフレームシフトが起きることでC末端から80アミノ酸が欠損し、その結果生じるartifact（74アミノ酸）が前報告でのGPI結合部分であり、さらに5'側にも遺伝子配列のエラーがあり、N末端から53アミノ酸が欠損していることが証明されている（非特許文献10）。また、現在GenBank等に登録されているCAPRIN - 1の遺伝子配列がコードするタンパク質は細胞膜タンパク質ではないことも報告されている（非特許文献10）。

【0017】

なお、CAPRIN - 1が細胞膜タンパク質であるとする非特許文献9の報告に基づき、特許文献1及び2には、M11S1の名称で、CAPRIN - 1が細胞膜タンパク質の1つとして癌治療などのターゲットとなりうることが記載されている（実施例には記載は一切ない）。しかし、非特許文献10の報告の通り、特許文献1及び2の出願当時から現在まで、CAPRIN - 1は細胞表面には発現していないものであることが通説になっており、CAPRIN - 1が細胞膜タンパク質であるという誤った情報のみに基づく特許文献1及び2の内容は、当業者の技術常識として理解されるべきものではないことは明らかである。さらに、CAPRIN - 1が乳癌などの癌細胞で、正常細胞に比べて高発現するという報告はない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【特許文献1】US2008/0075722

【特許文献2】WO2005/100998

【非特許文献】

【0019】

【非特許文献1】2008年度厚生労働省調査資料（日本）

【非特許文献2】日経サイエンス、2007年、3月号、p. 80 - 88（日本）

【非特許文献3】臨床検査2003年、12月発行、Vol. 47、No. 13、p. 1641 - 1654（日本）

【非特許文献4】イヌ・ネコの疾病統計2005年1月発行（日本）

【非特許文献5】Companion Animal Health Products : 2006 Edition By Tim Wesley, ANIMAL PHARM REPORTS

【非特許文献6】がんの拡がりと進行度、大阪府立成人病センター調査部 津熊秀明（日本）

【非特許文献7】Mol Endocrinol. 9: 243 - 54 (1995)

【非特許文献8】J Cell Biol. 145: 83 - 98 (1999)

【非特許文献9】J Biol Chem. 270: 20717 - 20723 (1995)

10

20

30

40

50

5)

【非特許文献 10】J Immunol. 172:2389-2400(2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

本発明の目的は、癌の診断に有用な癌の検出手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明者らは、鋭意研究の結果、イヌ精巣由来 cDNA ライブラリーと担癌犬の血清を用いた S E R E X 法により、担癌生体由来の血清中に存在する抗体と結合するタンパク質をコードする cDNA を取得し、その cDNA を基にして、配列番号 6、8、10、12 及び 14 で示されるアミノ酸配列を有するイヌ C A P R I N - 1 を作製した。また、取得した遺伝子のヒト相同性遺伝子を基にして、配列番号 2 及び 4 で示されるアミノ酸配列を有するヒト C A P R I N - 1 を作製した。そして、それらタンパク質をコードする遺伝子が、イヌ及びヒトの精巣と悪性の癌細胞に特異的に発現すること（後述の実施例 1 を参照）、及びそれらタンパク質のアミノ酸配列を基に作製された組換えポリペプチドが、担癌生体中の血清とのみ特異的に反応することを見出し、さらに、該組換えポリペプチドを用いて調製した抗体を利用して、担癌生体から特異的に C A P R I N - 1 を検出できることを見出し、本願発明を完成した。

10

【0022】

20

すなわち、本発明は、生体から分離された試料に対して行なう方法であって、C A P R I N - 1 の発現を測定することを含む癌の検出方法を提供する。また、本発明は、C A P R I N - 1 に対して生体内で誘導される抗体と抗原抗体反応するポリペプチドを含む癌検出用試薬を提供する。さらに、本発明は、C A P R I N - 1 と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を含む癌検出試薬を提供する。さらに、本発明は、配列表の配列番号 1、3、5、7、9、11、13 等に表示される塩基配列中の 15 塩基以上、好ましくは 20 ~ 25 塩基以上、より好ましくは 30 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む癌検出試薬を提供する。

【0023】

30

具体的には、本発明は以下の特徴を有する。

(1) 生体から分離された試料において、配列表の配列番号 2 ~ 30 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を有する C A P R I N - 1 タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有するポリペプチドの発現を測定することを含む、癌の検出方法。

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

(3) 上記生体が、ヒト、イヌ又はネコである、上記 (1) 又は (2) の方法。

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

40

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

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

(7) 前記ポリペプチドの発現の測定は、前記試料に含まれ得る、測定すべき前記ポリペプチドに対し前記生体内で誘導された抗体を免疫測定することにより行われる (1) ~ (6) のいずれかに記載の方法。

(8) 上記試料が、血清、血漿、腹水又は胸水である、上記 (1) ~ (7) のいずれかの方法。

50

(9) 前記ポリペプチドの発現の測定は、上記試料中に含まれる、該ポリペプチドをコードする mRNA を測定することにより行われる、上記 (1) ~ (6) のいずれかの方法。

(10) 上記 mRNA の塩基配列中の 15 塩基以上、好ましくは 20 ~ 25 塩基以上、より好ましくは 30 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、前記試料中の前記 mRNA の存在量を調べる、上記 (9) の方法。

(11) 上記生体がイヌであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列中の 15 塩基以上、好ましくは 20 ~ 25 塩基以上、より好ましくは 30 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、上記 (10) の方法。

(12) 上記生体がヒトであり、前記ポリヌクレオチドは配列番号 1 又は 3 に示される塩基配列中の 15 塩基以上、好ましくは 20 ~ 25 塩基以上、より好ましくは 30 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである、上記 (10) の方法。

(13) 上記試料が組織又は細胞である、上記 (9) ~ (13) のいずれかの方法。

(14) 前記癌が、脳腫瘍、頭、首、肺、子宮、又は食道の扁平上皮癌、メラノーマ、肺又は子宮の腺癌、腎癌、悪性混合腫瘍、肝細胞癌、基底細胞癌、軟細胞腫様歯肉腫、口腔内腫瘤、肛門周囲腺癌、肛門嚢腫瘍、肛門嚢アポクリン腺癌、セルトリ細胞腫、腔前庭癌、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、脂腺腺腫、汗腺癌、鼻腔内腺癌、鼻腺癌、甲状腺癌、大腸癌、気管支腺癌、腺癌、腺管癌、乳腺癌、複合型乳腺癌、乳腺悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、線維肉腫、血管周皮腫、骨肉腫、軟骨肉腫、軟部組織肉腫、組織球肉腫、粘液肉腫、未分化肉腫、肺癌、肥満細胞腫、皮膚平滑筋腫、腹腔内平滑筋腫、平滑筋腫、慢性型リンパ球性白血病、リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小~中細胞型リンパ腫、副腎髄質腫瘍、顆粒膜細胞腫及び褐色細胞腫からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の癌である、上記 (1) ~ (14) のいずれかに記載の方法。

(15) 上記ポリペプチドの発現量が対照と比べて多い場合に癌の悪性度が高くなることに基づき、癌の悪性度をさらに検出することを含む、上記 (1) ~ (15) のいずれかに記載の方法。

(16) 前記ポリペプチドの発現量が対照と比べて多い場合に癌の進行度が進んでいることに基づき、癌の進行度をさらに検出することを含む、上記 (1) ~ (16) のいずれかに記載の方法。

(17) 配列表の配列番号 2 ~ 30 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を有する CAPRIN - 1 タンパク質に対して生体内で誘導される抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有するポリペプチドを含む癌検出試薬。

(18) 配列表の配列番号 2 ~ 30 のうち偶数の配列番号に示されるいずれかのアミノ酸配列を有する CAPRIN - 1 タンパク質に対する抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有し生体内で産生されるポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を含む癌検出試薬。

(19) 前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、癌細胞の表面に結合する抗体又はその抗原結合性断片である、(18) の癌検出試薬。

(20) 前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号 2 ~ 30 のうち配列番号 6 および配列番号 18 を除く偶数の配列番号で表されるいずれかのアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号 50 - 98 又はアミノ酸残基番号 233 - 305 の領域内の連続する 7 個以上のアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを部分配列として含むポリペプチド、と免疫学的反応性を有する抗体又はそのフラグメントを含むことを特徴とする、(18) 又は (19) の癌検出試薬。

(21) 前記ポリペプチドと抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片が、配列番号 43 に結合する抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 45 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 46 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 47 のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 48 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 49 と 50 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 51 と 52 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 53 と 54 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 55 と 56 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 57 と 58 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、あるいは配列番号 59 と 60 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片である、(18) ~ (20) のいずれかに記載の癌検出試薬。

(22) 配列表の配列番号 1 ~ 29 のうち奇数の配列番号に示されるいずれかの塩基配列中の 15 塩基以上、好ましくは 20 ~ 25 塩基以上、より好ましくは 30 塩基以上の部分配列と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む癌検出試薬。

【発明の効果】

【0024】

本発明により、新規な癌の検出方法が提供される。後述の実施例において具体的に示されるように、CAPRIN-1 (又は Caprin-1 とともいう) のアミノ酸配列を基に作製した組換えポリペプチドは、癌患者の血清中に特異的に存在する抗体と反応する。したがって、本発明の方法により試料中の該抗体を測定すれば、生体内の癌を検出することができる。また、CAPRIN-1 自体を測定することによっても、生体内の癌を検出することができる。本発明の方法によれば、眼に見えない小さいサイズの癌や体内深部の癌も検出することができるため、健康診断等における癌の早期発見にも有用である。また、癌治療後の患者の経過観察に本発明の方法を利用すれば、再発した癌を早期に検出することもできる。さらに、本発明の方法によれば、腫瘍の増大や周辺組織への浸潤、リンパ節及び遠隔臓器への癌の転移といった、癌の進行度の診断も可能である。また、上記抗体の血清中存在量は、悪性度の高い癌患者において悪性度の低い癌患者よりも多いため、本発明の方法によれば、癌の悪性度の診断も可能である。また、下記実施例に記載される通り、精巢及び癌細胞において、CAPRIN-1 をコードする mRNA が特異的に高発現している。従って、該 mRNA を測定することによっても、癌の検出が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】CAPRIN-1 タンパクをコードする遺伝子の、正常組織及び腫瘍細胞株での発現パターンを示す図である。参照番号 1 ; CAPRIN-1 タンパクをコードする遺伝子の発現パターン、参照番号 2 ; GAPDH 遺伝子の発現パターンを示す。

【図2】実施例において大腸菌で製造し精製した、本発明で用いられるポリペプチドの 1 例であるイヌCAPRIN-1 由来ポリペプチドをクマシー染色で検出した図である。参照番号 3 ; イヌCAPRIN-1 由来ポリペプチドのバンドを示す。

【図3】実施例で調製したイヌCAPRIN-1 由来ポリペプチドを用いて行った担癌犬の癌診断結果の一部である。

【図4】実施例で調製したイヌCAPRIN-1 由来ポリペプチドを用いて行った担癌犬の癌詳細診断結果の一部である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明の方法では、生体から分離された試料を用いて、CAPRIN-1 の発現を測定する。CAPRIN-1 の発現を測定する方法としては、試料中に含まれるCAPRIN-1 に対する抗体を免疫測定する方法 (第1の方法)、試料中に含まれるCAPRIN-1 自体を免疫測定する方法 (第2の方法)、及び試料中に含まれるCAPRIN-1 をコードする mRNA を測定する方法 (第3の方法) が挙げられる。本発明の方法では、これらのいずれの方法でCAPRIN-1 の発現を測定してもよい。なお、本発明において、「測定」という用語には、検出、定性、定量及び半定量のいずれもが包含される。

【0027】

配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列はイヌの CAPRIN - 1 のアミノ酸配列である。該アミノ酸配列を有するイヌ CAPRIN - 1 は、イヌ精巣由来 cDNA ライブラリーと担癌犬の血清を用いた SEREX 法により、担癌犬由来の血清中に特異的に存在する抗体と結合するポリペプチドとして同定されたものである（実施例 1 参照）。すなわち、担癌犬体内では、配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列を有する CAPRIN - 1 に対する抗体が特異的に誘導されている。従って、上記第 1 の方法により配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列を有する CAPRIN - 1 に対する上記した抗体を測定することで、イヌの癌を検出できる（実施例 3 及び 4 参照）。また、上記第 2 の方法により抗原たる配列番号 6、8、10、12 又は 14 の CAPRIN - 1 自体を測定することでも、イヌの癌を検出できる（実施例 5 及び 6 参照）。また、下記実施例に記載される通り、CAPRIN - 1 をコードする mRNA は精巣と癌細胞で有意に高発現しているため（実施例 1 参照）、該 mRNA を測定することによっても、イヌの癌を検出することができる。

【0028】

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

【0029】

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

【0030】

本発明の方法では、配列番号 6、8、10、12 又は 14 のイヌ CAPRIN - 1 のみならず、その他の哺乳動物の CAPRIN - 1（以下、イヌ CAPRIN - 1 に対する「相同因子」（又は「ホモログ」）ということがある。また、単に「CAPRIN - 1」という場合には、イヌに限らず、他の哺乳動物由来の CAPRIN - 1 も包含される。）も測定対象となる。下記実施例に具体的に記載される通り、ヒト CAPRIN - 1 をコードする mRNA は、配列番号 6、8、10、12 又は 14 のイヌ CAPRIN - 1 同様、ヒトの精巣と癌細胞で有意に高発現しており、健常ヒト体内には該ヒト CAPRIN - 1 に対する抗体が検出されない。また、ネコ CAPRIN - 1 に対する抗体は、健常ネコ体内では検出されず、担癌ネコでのみ検出される。従って、イヌ以外の哺乳動物における CAPRIN - 1 の発現を測定することによっても、該哺乳動物の癌を検出することができる。本発明の方法で測定対象となるイヌ以外の CAPRIN - 1 としては、例えば、ヒト CAPRIN - 1、ネコ CAPRIN - 1 等が挙げられるが、これらに限定されない。なお、ヒト CAPRIN - 1 をコードする塩基配列及びそのアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1、3 及び 2、4 にそれぞれ示される通りであり、イヌ CAPRIN - 1 との配列同一性は塩基配列で 94 %、アミノ酸配列で 98 % である。イヌとヒトのように遺伝的に遠縁な哺乳動物間であっても、それぞれの CAPRIN - 1 のアミノ酸配列の配列同一性は 98 % と非常に高く、そのため、ヒト以外の哺乳動物との間でも、イヌ CAPRIN - 1 とその相同因子とは 85 % 程度以上の高い配列同一性を有するものと考えられる。すなわち、本発明の方法において発現を測定する CAPRIN - 1 は、特に限定されないが、配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示されるイヌ CAPRIN - 1 のアミノ酸配列と好ましくは 85 % 以上、より好ましくは 95 % 以上の配列同一性を有する。

【0031】

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

10

【0032】

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

20

【0033】

後述の実施例では、担癌動物生体に特異的な抗体を免疫測定するための抗原として、配列番号6及び配列番号8（イヌCAPRIN-1）のポリペプチド、及び配列番号2（ヒトCAPRIN-1）のポリペプチドを調製し、これらのポリペプチドと担癌生体由来の血清中の前記抗体との反応性を確認している。しかしながら、前記抗体はポリクローナル抗体であるから、配列番号6、8又は2の相同因子から成るポリペプチドであれば当然結合するし、また、該ポリペプチドの断片であっても、前記ポリクローナル抗体中にはその断片の構造を認識する抗体が含まれ得るため、やはり担癌生体由来の血清中に含まれる前記抗体と結合できる。すなわち、配列番号6、8又は2の相同因子のポリペプチド（すなわちCAPRIN-1全長タンパク質）であっても、その断片であっても、同様に担癌生体血清中に特異的に含まれる前記ポリクローナル抗体の測定に用いることができ、癌の検出に有用である。従って、本発明の第1の方法で免疫測定の抗原として用いられるポリペプチドは、CAPRIN-1（例えば配列番号6、8又は2）の全長領域から成るポリペプチドのみに限定されず、CAPRIN-1のアミノ酸配列中の連続する7個以上、好ましくは連続する8個以上、9個以上、又は10個以上のアミノ酸から成るポリペプチド断片であって、CAPRIN-1に対するポリクローナル抗体と抗原抗体反応するポリペプチド（以下、便宜的に「特異反応性部分ポリペプチド」ということがある）も包含される。なお、約7アミノ酸残基以上のポリペプチドであれば抗原性を発揮することがこの分野において知られている。ただし、アミノ酸残基の数があまりに少ないと、試料中に存在する、CAPRIN-1以外のタンパク質に対する抗体とも交叉反応してしまう可能性が高くなる。従って、免疫測定の精度を高める観点からは、ポリペプチド断片のアミノ酸残基の数は好ましくは30以上、もしくは50以上、さらに好ましくは100以上、もしくは150以上、さらに好ましくは300以上、さらに好ましくは600以上とするのが望ましく、さらには1000以上、1500以上としてもよい。

30

40

50

【0034】

抗原として用いるポリペプチドの好ましい具体例としては、配列番号2～30のうち偶数の配列番号のポリペプチド又はその断片が挙げられる。

【0035】

なお、配列番号2～30のうち偶数の配列番号（すなわち、配列番号2, 4, 6・・・28, 30）のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列はそれぞれ、配列番号1～29のうち奇数の配列番号（すなわち、配列番号1, 3, 5・・・27, 29）に示されている。

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

なお、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸（Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸（Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys）、酸性アミノ酸（Asp, Glu）、塩基性アミノ酸（Arg, Lys, His）、芳香族アミノ酸（Phe, Tyr, Trp, His）のように類似の性質を有するものにグループ分けでき、これらの間での置換、すなわち保存的置換、であればポリペプチドの性質が変化しないことが多いことが知られている。従って、CAPRIN-1のアミノ酸残基を置換する場合には、これらの各グループの間で置換することにより、対応抗体との結合性を維持できる可能性が高くなる。しかしながら、本発明では、上記改変体は、未改変体と同等もしくはほとんど同等の免疫誘導活性を付与する限り、非保存的置換を有していてもよい。

【0039】

本発明で用いられる上記ポリペプチドを部分配列として含み（すなわち、本発明で用いられるポリペプチドの一端又は両端に他の（ポリ）ペプチドが付加されたもの）、かつ、CAPRIN-1に対するポリクローナル抗体と抗原抗体反応により特異的に結合するポリペプチド（以下、便宜的に「特異反応性付加ポリペプチド」ということがある）も、上

記したポリペプチドと同様に癌の検出に用いることができる。

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

宿主細胞として真核細胞を用いる場合、発現ベクターとしては、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターを用いる。そのような発現ベクターとしては、pK A 1、p C D M 8、p S V K 3、p M S G、p S V L、p B K - C M V、p B K - R S V、E B Vベクター、p R S、p c D N A 3、p Y E S 2等が例示できる。上記と同様に、本発明で用いられるポリペプチドをコードするDNAをこのような発現ベクターに組み込み、該ベクターで真核宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、前記DNAがコードしているポリペプチドを真核宿主細胞中で発現させることができる。発現ベクターとしてp I N D / V 5 - H i s、p F L A G - C M V - 2、p E G F P - N 1、p E G F P - C 1等を用いた場合には、H i sタグ(例えば(H i s)₆~(H i s)₁₀)、F L A Gタグ、m y cタグ、H Aタグ、G F Pなど各種タグを付加した融合タンパク質として、上記ポリペプチドを発現させることができる。

10

【0044】

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

【0045】

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

20

【0046】

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

30

【0047】

試料中の抗体の測定は、上記したポリペプチドを抗原として用いた免疫測定により容易に行うことができる。免疫測定自体はこの分野において周知であり、反応様式で分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法、ウェスタンブロット法等がある。また、標識で分類すると、放射免疫測定、蛍光免疫測定、酵素免疫測定、ビオチン免疫測定等があり、いずれの方法を用いても上記抗体の免疫測定を行うことができる。特に限定されないが、サンドイッチE L I S Aや凝集法は、操作が簡便で大掛かりな装置等を必要としないため、本発明の方法における上記抗体の免疫測定方法として好ましく適用することができる。抗体の標識として酵素を用いる場合、酵素としては、ターンオーバー数が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たす物であれば特段の制限はなく、通常酵素免疫測定法に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3, 3', 5, 5'-テト

40

50

ラメチルベンジシンを、また酵素としてはアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトルフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては¹²⁵Iや³H等の通常ラジオイムノアッセイで用いられている物を使用することができる。蛍光色素としては、フルオロレッシンスイソチオシアネート(FITC)やテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)等の通常の蛍光抗体法に用いられる物を使用することができる。

【0048】

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

10

【0049】

本発明の第2の方法では、生体から得た試料中に含まれ得るCAPRIN-1が測定される。上述した通り、癌患者においてはイヌやヒト等のCAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体の量が有意に多いが、このことは、癌細胞において抗原であるCAPRIN-1の蓄積量が有意に多いことを示している。CAPRIN-1自体を測定することによっても、癌を検出することができるということは、下記実施例に具体的に記載されている通りである。従って、CAPRIN-1自体を測定することによっても、上記第1の方法と同様に、生体内の癌を検出することができる。

20

【0050】

試料中のポリペプチドの測定は、周知の免疫測定法により容易に行なうことができる。具体的には、例えば、CAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を作製し、これを用いて免疫測定を行うことにより、試料中に存在し得るCAPRIN-1を測定することができる。上述した通り、抗体には交叉反応性があるため、例えば、配列番号6のイヌCAPRIN-1と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を用いて、配列番号6のイヌCAPRIN-1のみならず、その他の哺乳動物におけるその相同因子、例えば配列番号2又は4のヒトCAPRIN-1やネコCAPRIN-1等も測定することができる。免疫測定方法自体は、上述した通り周知の常法である。

30

【0051】

なお、本検討において、CAPRIN-1は癌細胞の表面に発現する細胞膜タンパクであることが判明した。癌の生体中には多くのタンパク質分解酵素が含まれていることから、癌の生体中では、CAPRIN-1配列中の癌細胞の細胞外に発現する部分が分解を受けて癌細胞から分離し、CAPRIN-1配列中の癌細胞の細胞内に発現する部分よりも多く存在する。従って、本測定において用いられるCAPRIN-1に対する抗体又はその抗原結合性断片として、癌細胞の細胞表面に結合するものを用いれば、より多くのCAPRIN-1を検出でき、より高感度に癌を診断できる。従って本発明では、CAPRIN-1タンパク質の内、癌細胞の細胞表面に発現する部分に結合する抗体が好ましく用いられる。癌細胞の細胞表面に発現するCAPRIN-1タンパク質中の部分ペプチドとして、配列表の配列番号2~30のうち配列番号6および配列番号18を除く偶数番号で表されるアミノ酸配列中のアミノ酸残基番号(aa)50-98又はアミノ酸残基番号(aa)233-305の領域内の連続する7個以上のアミノ酸配列から成るポリペプチドが挙げられ、具体的には例えば、配列番号43又は配列番号61(配列番号61で表される

40

50

アミノ酸配列の中でも、配列番号 62 又は配列番号 63 で表されるアミノ酸配列の領域が好ましい。) で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられ、本発明で用いられる抗体は、これらペプチドに結合するすべての抗体が含まれる。具体的には、配列番号 43 に結合する抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 45 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 46 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 47 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 44 と 48 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 49 と 50 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 51 と 52 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 53 と 54 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 55 と 56 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片、配列番号 57 と 58 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片あるいは配列番号 59 と 60 のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

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

【0055】

本明細書で使用する「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイズの条

件下において、対象とする部分領域とのみハイブリダイズし、その他の領域とは実質的にハイブリダイズしないという意味である。

【0056】

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

10

【0057】

「実質的にハイブリダイズしない」とは、全くハイブリダイズしないか、ハイブリダイズするとしても対象とする部分領域にハイブリダイズする量よりも大幅に少なく、相対的に無視できる程度の微量しかハイブリダイズしないという意味である。そのような条件下で特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、対象の部分領域の塩基配列と一定以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられ、例えば70%以上、好ましくは80%以上、85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。最も好ましくは、該ポリヌクレオチドは、対象の部分領域の塩基配列と同一の塩基配列を有する。配列同一性の定義は、上記したアミノ酸配列の同一性と同様である。なお、癌検出用ポリヌクレオチドの末端に対象とハイブリダイズしない領域が含まれていても、プローブの場合には、ハイブリダイズする領域がプローブ全体のおよそ半分以上を占めていれば検出に用いることができるし、また、プライマーの場合には、ハイブリダイズする領域がプライマー全体のおよそ半分以上を占め、かつ3'末端側にあれば、正常にアニーリングして伸長反応を生じ得るので、検出に用いることができる。そのように、癌検出用ポリヌクレオチドの末端にハイブリダイズしない領域が含まれている場合において、対象の塩基配列との配列同一性を算出するときは、ハイブリダイズしない領域は考慮せず、ハイブリダイズする領域のみに着目して算出するものとする。

20

30

【0058】

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

40

【0059】

癌検出用ポリヌクレオチドの塩基数は、特異性を確保する観点から、18塩基以上が好

50

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

【0060】

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

【0061】

実際に、後述の実施例に記載されるように、例えば配列番号33及び34にそれぞれ示される塩基配列を有する一対のプライマーセットを用いれば、配列番号1～29のうち奇数の配列番号中の部分領域とも配列番号5中の部分領域とも特異的にハイブリダイズするので、配列番号6のイヌCAPRIN-1をコードするmRNAも、その相同因子をコードするmRNAも、いずれも測定することができる。従って、例えば、配列番号5中の部分領域と特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、配列番号6のイヌCAPRIN-1をコードするmRNAのみならず、配列番号2又は4のヒトCAPRIN-1をコードするmRNAも測定できるし、同様に、ネコ等のその他の哺乳動物のCAPRIN-1をコードするmRNAも測定することができる。癌検出用ポリヌクレオチドを設計する場合には、各配列番号(1～29のうち奇数の配列番号)の間で配列同一性が特に高い(好ましくは塩基配列が同一である)部分領域を選択することがより望ましい。イヌとヒトとの間で配列同一性が特に高い部分領域であれば、その他の動物種の相同遺伝子中にも該領域と配列同一性が非常に高い領域が存在すると予想されるので、そのように部分領域を選択すれば、イヌやヒト以外の動物種のCAPRIN-1をコードするmRNAを測定する精度も高めることができる。

【0062】

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

【0063】

PCRのような核酸増幅法自体はこの分野において周知であり、そのための試薬キット及び装置も市販されているので、容易に行うことができる。すなわち、例えば、鋳型となる被検核酸(例えば、配列番号2～30のうち偶数の配列番号に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子のcDNA)と、癌検出用ポリヌクレオチド(プライマー)の一対とを、公知の緩衝液中で、Taqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなどの耐熱性DNAポリメラーゼ及びdNTP(ここで、N=A, T, C又はG)の存在下で、変性、アニーリング、伸長の各工程を反応液の温度を変化させることにより行う。通常、変性工程は、90～95℃、アニーリング工程は、鋳型とプライマーのTm又はその近傍(好ましくは±4℃以内)、伸長工程はTaqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼなどの耐熱性DNAポリメラーゼの至適温度である72℃又はその付近の温度で行われる。各工程は30秒～2分程度で適宜選択される。この熱サイクルを例えば25～40回程度繰

り返すことにより、一对のプライマーで挟まれた鋳型核酸の領域が増幅される。なお、核酸増幅法はPCRに限定されるものではなく、この分野において周知の他の核酸増幅法も用いることができる。このように、癌検出用ポリヌクレオチドの一对をプライマーとして用い、被検核酸を鋳型として用いて核酸増幅法を行うと、被検核酸が増幅されるのに対し、試料中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物を検出することにより試料中に被検核酸が存在するか否かを知ることができる。増幅産物の検出は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いたいわゆるリアルタイム検出PCRを行うことにより、検体中の被検核酸の量を定量することも可能である。なお、リアルタイム検出PCR用のキットも市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて被検核酸を半定量することも可能である。なお、被検核酸は、mRNAでも、mRNAから逆転写したcDNAであってもよい。被検核酸としてmRNAを増幅する場合には、上記一对のプライマーを用いたNASBA法(3SR法、TMA法)を採用することもできる。NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一对のプライマーを用いて容易に実施することができる。

10

【0064】

プローブとしては、癌検出用ポリヌクレオチドに蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブを用いることができる。ポリヌクレオチドの標識方法自体は周知である。被検核酸又はその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、試料中に被検核酸が存在するか否かを調べることができる。あるいは、癌検出用ポリヌクレオチドを固相化し、被検核酸をハイブリダイズさせ、固相に結合した被検核酸を標識プローブ等で検出することも可能である。このような場合、固相に結合した癌検出用ポリヌクレオチドもプローブと呼ばれる。なお、ポリヌクレオチドプローブを用いた被検核酸の測定方法もこの分野において周知であり、緩衝液中、ポリヌクレオチドプローブを被検核酸とTm又はその近傍(好ましくは ± 4 以内)で接触させることによりハイブリダイズさせ、洗浄後、ハイブリダイズした標識プローブ又は固相プローブに結合された鋳型核酸を測定することにより行うことができる。このような方法には、例えばノーザンブロット、インサイチューハイブリダイゼーション、サザンブロット法等の周知の方法が包含される。本発明においては、周知のいずれの方法をも適用できる。

20

30

【0065】

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

40

【0066】

本発明の検出方法では、他の癌抗原や癌マーカーによる診断を組み合わせる用いてもよい。これにより、癌の検出精度をさらに高めることができる。例えば、本発明の方法にお

50

いて、癌患者特異的に存在する抗体を測定する際には、上記したポリペプチドと同様に、癌組織で多く発現する別のポリペプチドを抗原として組み合わせて用いることができる。また、本発明の方法と既に知られている癌マーカーによる診断とを組み合わせることもよい。

【0067】

本発明の検出方法によれば、生体内の癌を検出することができる。特に、後述の実施例に記載される通り、本発明の方法によれば眼に見えない小さいサイズの腫瘍や体内深部の腫瘍をも検出できるので、癌の早期発見に有用である。また、癌の治療後経過観察中の患者について本発明の検出方法を適用すれば、癌の再発があった場合にその癌を早期に検出することができる。

10

【0068】

また、担癌生体において、本発明で測定対象となるCAPRIN-1を発現する癌細胞の数が増加すればそれだけ、該生体内における該タンパク質及びそのmRNAの蓄積量が増大し、血清中にCAPRIN-1に対する抗体が多く産生される。一方、癌細胞の数が減少すればそれだけ、生体内の該タンパク質及びそのmRNAの蓄積量が減少し、血清中のCAPRIN-1に対する抗体が減少する。従って、対照と比べてCAPRIN-1の発現量が多い場合には、腫瘍の増大や癌の転移が生じている、すなわち癌の進行度が進んでいると判断することができる。実際に、後述の実施例に具体的に記載される通り、腫瘍の増大や転移といった癌の進行（悪性型）に伴い、担癌生体血清中の上記抗体量の上昇が観察されている。このように、本発明の方法によれば、癌の進行度を検出することもできる。

20

【0069】

また、後述の実施例に示される通り、同一種類の腫瘍において、悪性型では良性型よりも有意に上記抗体量が多い。そのため、CAPRIN-1の発現量が多い場合には、癌の悪性度がより高いと判断することができる。すなわち、本発明の方法によれば、癌の悪性度を検出することもできる。

【0070】

本発明の癌の検出方法の対象となる癌としては、CAPRIN-1を発現している癌であり、脳腫瘍、頭、首、肺、子宮、又は食道の扁平上皮癌、メラノーマ、肺又は子宮の腺癌、腎癌、悪性混合腫瘍、肝細胞癌、基底細胞癌、肋細胞腫様歯肉腫、口腔内腫瘍、肛門周囲腺癌、肛門囊腫瘍、肛門囊アポクリン腺癌、セルトリ細胞腫、膣前庭癌、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、脂腺腺腫、汗腺癌、鼻腔内腺癌、鼻腺癌、甲状腺癌、大腸癌、気管支腺癌、腺癌、腺管癌、乳癌、複合型乳癌、乳癌悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、線維肉腫、血管周皮腫、骨肉腫、軟骨肉腫、軟部組織肉腫、組織球肉腫、粘液肉腫、未分化肉腫、肺癌、肥満細胞腫、皮膚平滑筋腫、腹腔内平滑筋腫、平滑筋腫、慢性型リンパ球性白血病、リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小～中細胞型リンパ腫、副腎髄質腫瘍、顆粒膜細胞腫、褐色細胞腫などを挙げることができるが、これらに限定されない。また、本発明の方法の対象となる生体は哺乳動物であり、ヒトやイヌ、ネコが好ましい。

30

【0071】

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

40

【0072】

第1の方法で免疫測定の抗原として用いられる上記したポリペプチド（すなわち、配列番号2のイヌCAPRIN-1及びその相同因子、特異反応性部分ポリペプチド、特異反応性修飾ポリペプチド、並びに特異反応性付加ポリペプチド）は、癌検出試薬として提供することができる。該試薬は、上記ポリペプチドのみからなってもよく、また、該ポリペプチドの安定化等に有用な各種添加剤等を含んでいてもよい。また、該試薬は、プレートやメンブレン等の固相に固定化した状態で提供することもできる。なお、該ポリペプ

50

チドの好ましい例は上述した通りである。

【0073】

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

10

【0074】

さらにまた、第3の方法でmRNAの測定に用いられる上記した癌検出用ポリヌクレオチドも、癌検出試薬として提供することができる。この場合に癌検出用試薬も、該ポリヌクレオチドのみから成るものであってもよく、また、該ポリヌクレオチドの安定化等に有用な各種添加剤等を含んでいてもよい。該試薬中に含まれる該癌検出用ポリヌクレオチドは、好ましくはプライマー又はプローブである。癌検出用ポリヌクレオチドの条件及び好ましい例は上述した通りである。

【実施例】

【0075】

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

20

【0076】

実施例1：SEREX法による新規癌抗原タンパクの取得

(1) cDNAライブラリーの作製

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

30

【0077】

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

【0078】

(2) 血清によるcDNAライブラリーのスクリーニング

上記作製したイヌ精巣cDNAファージライブラリーを用いて、イムノスクリーニングを行った。具体的にはΦ90×15 mmのNZYアガロースプレートに2210クローンとなるように宿主大腸菌(XL1-Blue MRF')に感染させ、42℃、3~4時間培養し、溶菌斑(プラーク)を作らせ、IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトシド)を浸透させたニトロセルロースメンブレン(Hybond C Extra: GE Healthcare Bio-Science社製)でプレートを37℃で4時間覆うことによりタンパク質を誘導・発現させ、メンブレンにタンパク質を転写した。その後メンブレンを回収し0.5%脱脂粉乳を含むTBS(10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl pH 7.5)に浸し4℃で一晩振盪することによって非特異反応を抑制した。このフィルターを500倍希釈した患犬血清と室温で2~3時間反応させた。

40

【0079】

50

上記患犬血清としては、乳癌の患犬より採取した血清を用いた。これらの血清は - 8 0 で保存し、使用直前に前処理を行った。血清の前処理方法は、以下の方法による。すなわち、外来遺伝子を挿入していない λ ZAP Express ファージを宿主大腸菌 (XL1 - Blue MRF') に感染させた後、NZYプレート培地上で 37、一晩培養した。次いで 0.5 M NaCl を含む 0.2 M NaHCO₃ pH 8.3 のバッファーをプレートに加え、4 で 15 時間静置後、上清を大腸菌 / ファージ抽出液として回収した。次に、回収した大腸菌 / ファージ抽出液を NHS - カラム (GE Healthcare Bio - Science 社製) に通液して、大腸菌・ファージ由来のタンパク質を固定化した。このタンパク固定化カラムに患犬血清を通液、反応させ、大腸菌及びファージに吸着する抗体を血清から取り除いた。カラムを素通りした血清画分は、0.5 % 脱脂粉乳を含む TBS にて 500 倍希釈し、これをイムノスクリーニング材料とした。

【0080】

かかる処理血清と上記融合タンパク質をプロットしたメンブレンを TBS - T (0.05 % Tween 20 / TBS) にて 4 回洗浄を行った後、二次抗体として 0.5 % 脱脂粉乳を含む TBS にて 5000 倍希釈を行ったヤギ抗イヌ IgG (Goat anti Dog IgG - h + I HRP conjugated: BETHYL Laboratories 社製) を、室温 1 時間反応させ、NBT / BCIP 反応液 (Roche 社製) を用いた酵素発色反応により検出し、発色反応陽性部位に一致するコロニーを $\phi 90 \times 15$ mm の NZY アガロースプレート上から採取し、SM 緩衝液 (100 mM NaCl、10 mM MgClSO₄、50 mM Tris - HCl、0.01 %ゼラチン pH 7.5) 500 μ l に溶解させた。発色反応陽性コロニーが単一化するまで上記と同様の方法で、二次、三次スクリーニングを繰り返し、血清中の IgG と反応する 30940 個のファージクローンをスクリーニングして、5 個の陽性クローンを単離した。

【0081】

(3) 単離抗原遺伝子の相同性検索

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

【0082】

精製したプラスミドは、配列番号 31 に記載の T3 プライマーと配列番号 32 に記載の T7 プライマーを用いて、プライマーウォーキング法によるインサート全長配列の解析を行った。このシークエンス解析により配列番号 5, 7, 9, 11, 13 に記載の遺伝子配列を取得した。この遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列 (配列番号 6, 8, 10, 12, 14) を用いて、相同性検索プログラム BLASTサーチ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を行い既知遺伝子との相同性検索を行った結果、得られた 5 個の遺伝子全てが CAPRIN - 1 をコードする遺伝子であることが判明した。5 個の遺伝子間の配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において塩基配列 100 %、アミノ酸配列 99 % であった。この遺伝子のヒト相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94 %、アミノ酸

配列 98%であった。ヒト相同因子の塩基配列を配列番号 1, 3 に、アミノ酸配列を配列番号 2, 4 に示す。また、取得したイヌ遺伝子のウシ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 97%であった。ウシ相同因子の塩基配列を配列番号 15 に、アミノ酸配列を配列番号 16 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とウシ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 94%、アミノ酸配列 93~97%であった。また、取得したイヌ遺伝子のウマ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 93%、アミノ酸配列 97%であった。ウマ相同因子の塩基配列を配列番号 17 に、アミノ酸配列を配列番号 18 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とウマ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 93%、アミノ酸配列 96%であった。また、取得したイヌ遺伝子のマウス相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 87~89%、アミノ酸配列 95~97%であった。マウス相同因子の塩基配列を配列番号 19, 21, 23, 25, 27 に、アミノ酸配列を配列番号 20, 22, 24, 26, 28 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とマウス相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 89~91%、アミノ酸配列 95~96%であった。また、取得したイヌ遺伝子のニワトリ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 82%、アミノ酸配列 87%であった。ニワトリ相同因子の塩基配列を配列番号 29 に、アミノ酸配列を配列番号 30 に示す。なお、ヒト相同因子をコードする遺伝子とニワトリ相同因子をコードする遺伝子との配列同一性は、タンパク質に翻訳される領域において、塩基配列 81~82%、アミノ酸配列 86%であった。

【0083】

(4) 各組織での遺伝子発現解析

上記方法により得られた遺伝子に対しイヌ及びヒトの正常組織及び各種細胞株における発現を RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) 法により調べた。逆転写反応は以下の通り行なった。すなわち、各組織 50~100mg 及び各細胞株 5~10×10⁶ 個の細胞から TRIzol 試薬 (invitrogen 社製) を用いて添付のプロトコールに従い全 RNA を抽出した。この全 RNA を用いて Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen 社製) により添付のプロトコールに従い cDNA を合成した。PCR 反応は、取得した遺伝子特異的なプライマー (配列番号 33 及び 34 に記載) を用いて以下の通り行なった。すなわち、逆転写反応により調製したサンプル 0.25 µl、上記プライマーを各 2 µM、0.2 mM 各 dNTP、0.65 U の ExTaq ポリメラーゼ (宝酒造社製) となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を 25 µl とし、Thermal Cycler (BIO RAD 社製) を用いて、94 / 30 秒、60 / 30 秒、72 / 30 秒のサイクルを 30 回繰り返して行なった。なお、上記遺伝子特異的プライマーは、配列番号 5 の塩基配列 (イヌ CAPRIN-1 遺伝子) 中の 206 番~632 番及び配列番号 1 の塩基配列 (ヒト CAPRIN-1 遺伝子) 中の 698 番~1124 番塩基の領域を増幅するものであった。比較対照のため、GAPDH 特異的なプライマー (配列番号 35 及び 36 に記載) も同時に用いた。その結果、図 1 に示すように、健常なイヌ組織では精巣に強い発現が見られ、一方イヌ乳癌及び腺癌組織で発現が見られた。さらに、取得した遺伝子のヒト相同因子の発現を併せて確認したところ、イヌ CAPRIN-1 遺伝子と同様、正常組織で発現が確認できたのは精巣のみだったが、癌細胞では乳癌、脳腫瘍、白血病、肺癌、食道癌細胞株など、多種類の癌細胞株で発現が検出され、特に多くの乳癌細胞株で発現が確認された。この結果から、CAPRIN-1 は精巣以外の正常組織では発現が見られず、一方、多くの癌細胞で発現しており、特に乳癌細胞株に発現していることが確認された。

【0084】

10

20

30

40

50

なお、図1中、縦軸の参照番号1は、上記で同定した遺伝子の発現パターンを、参照番号2は、比較対照であるGAPDH遺伝子の発現パターンを示す。

【0085】

(5) 免疫組織化学染色

(5) - 1 マウスおよびイヌ正常組織におけるCAPRIN-1の発現

マウス(Balb/c、雌)およびイヌ(ビーグル犬、雌)をエーテル麻酔下およびケタミン/イソフルラン麻酔下で放血させ、開腹後、各臓器(胃、肝臓、眼球、胸腺、筋肉、骨髄、子宮、小腸、食道、心臓、腎臓、唾液腺、大腸、乳腺、脳、肺、皮膚、副腎、卵巣、膵臓、脾臓、膀胱)をそれぞれPBSの入った10cmディッシュに移した。PBS中で各臓器を切り開き、4% paraformaldehyde (PFA)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で一晩還流固定した。還流液を捨て、PBSで各臓器の組織表面をすすぎ、10%ショ糖を含むPBS溶液を50ml容の遠心チューブに入れ、その中に各組織を入れて4で2時間ローターを用いて振とうした。20%ショ糖を含むPBS溶液に入れ替え、4で組織が沈むまで静置後、30%ショ糖を含むPBS溶液に入れ替え、4で組織が沈むまで静置した。組織を取り出し、必要な部分を手術用メスで切りだした。次に、OCTコンパウンド(Tissue Tek社製)をかけて組織表面になじませた後、クライオモルドに組織を配置した。ドライアイスの上にクライオモルドにおいて急速凍結させた後、クライオスタット(LEICA社製)を用いて10~20μmに薄切し、スライドガラスごとヘアードライヤーで30分間風乾し、薄切組織がのったスライドガラス作製した。次にPBS-T(0.05% Tween20を含む生理食塩水)を満たした染色瓶に入れて5分ごとにPBS-Tを入れ替える操作を3回行った。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPEN(DAKO社製)で囲んだ後、ブロッキング液として、マウス組織はMOMマウスIgブロッキング試薬(VECTASTAIN社製)を、イヌ組織は10%牛胎児血清を含むPBS-T溶液をそれぞれのせ、モイストチャンバー上で室温で1時間静置した。次に実施例3で作製した癌細胞表面に反応する、配列番号:55の重鎖可変領域と配列番号:56の軽鎖可変領域を有するCAPRIN-1に対するモノクローナル抗体(モノクローナル抗体#8)をブロッキング液で10μg/mlに調製した溶液をのせ、モイストチャンバー内で4下で一晩静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、ブロッキング液で250倍に希釈したMOMビオチン標識抗IgG抗体(VECTASTAIN社製)をのせ、モイストチャンバー内に室温で1時間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、アビジン-ビオチンABC試薬(VECTASTAIN社製)をのせ、モイストチャンバー内で室温で5分間静置した。PBS-Tで10分間3回洗浄を行った後、DAB発色液(DAB 10mg + 30% H₂O₂ 10μl / 0.05M Tris-HCl (pH7.6) 50ml)をのせ、モイストチャンバー内に室温で30分間静置した。蒸留水でリンスし、ヘマトキシリン試薬(DAKO社製)を載せて室温で1分間静置後、蒸留水でリンスした。70%、80%、90%、95%、100%の各エタノール溶液に順番に1分間ずつ入れた後、キシレン中で一晩静置した。スライドガラスを取り出し、Glycer gel Mounting Medium(DAKO社製)で封入後、観察を行った。その結果、CAPRIN-1は、唾液腺、腎臓、結腸、胃の各組織において細胞内で僅かに発現が認められたが、細胞表面での発現は認められず、また、その他の臓器由来の組織では全く発現が認められなかった。

【0086】

(5) - 2 イヌ乳癌組織におけるCAPRIN-1の発現

病理診断で悪性乳癌と診断されたイヌの凍結された乳癌組織108検体を用いて、上述と同様の方法で凍結切片スライド作製および実施例3で作製したモノクローナル抗体#8を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN-1は108検体中100検体(92.5%)で発現が確認され、特に異型度の高い癌細胞表面に強く発現していた。

【0087】

10

20

30

40

50

(5) - 3 ヒト乳癌組織におけるCAPRIN - 1の発現

パラフィン包埋されたヒト乳癌組織アレイ (BIOMAX社製) の乳癌組織 188 検体を用いて、免疫組織化学染色を行った。ヒト乳癌組織アレイを 60 で 3 時間処理後、キシレンを満たした染色瓶に入れて 5 分ごとにキシレンを入れ替える操作を 3 回行った。次にキシレンの代わりにエタノールおよび PBS - T で同様の操作を行った。0.05 % Tween 20 を含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を満たした染色瓶にヒト乳癌組織アレイを入れ、125 で 5 分間処理後、室温で 40 分以上静置した。切片周囲の余分な水分をキムワイプでふき取り、DAKOPEN (DAKO社製) で囲み、Peroxidase Block (DAKO社製) を適量滴下した。室温で 5 分間静置後、PBS - T を満たした染色瓶に入れて 5 分ごとに PBS - T を入れ替える操作を 3 回行った。ブロッキング液として、10 % FBS を含む PBS - T 溶液をのせ、モイストチャンパー内で室温で 1 時間静置した。次に実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 8 を 5 %

FBS を含む PBS - T 溶液で 10 μ g / ml に調製した溶液をのせ、モイストチャンパー内に 4 で一晩静置した。PBS - T で 10 分間 3 回洗浄を行った後、Peroxidase Labelled Polymer Conjugated (DAKO社製) 適量滴下し、モイストチャンパー内で室温で 30 分間静置した。PBS - T で 10 分間 3 回洗浄を行った後、DAB 発色液 (DAKO社製) をのせ、室温で 10 分程度静置した後、発色液を捨て、PBS - T で 10 分間 3 回洗浄を行った後、蒸留水でリンスし、70 %、80 %、90 %、95 %、100 % の各エタノール溶液に順番に 1 分間ずつ入れた後、キシレン中で一晩静置した。スライドガラスを取り出し、Glycer gel Mounting Medium (DAKO社製) で封入後、観察を行った。その結果、CAPRIN - 1 は全乳癌組織 188 検体の内、138 検体 (73 %) で強い発現が認められた。

【0088】

(5) - 4 ヒト悪性脳腫瘍におけるCAPRIN - 1の発現

パラフィン包埋されたヒト悪性脳腫瘍組織アレイ (BIOMAX社製) の悪性脳腫瘍組織 247 検体を用いて、上述 (5) - 3 と同様の方法で実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 8 を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN - 1 は全悪性脳腫瘍組織 247 検体の内、227 検体 (92 %) で強い発現が認められた。

【0089】

(5) - 5 ヒト乳癌転移リンパ節におけるCAPRIN - 1の発現

パラフィン包埋されたヒト乳癌転移リンパ節組織アレイ (BIOMAX社製) の乳癌転移リンパ節組織 150 検体を用いて、上述 (5) - 3 と同様の方法で実施例 3 で作製したモノクローナル抗体 # 8 を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、CAPRIN - 1 は全乳癌転移リンパ節組織 150 検体の内、136 検体 (90 %) で強い発現が認められた。すなわち、乳癌から転移した癌組織においても CAPRIN - 1 は強く発現することが判った。

【0090】

実施例 2 : イヌ及びヒト新規癌抗原タンパクの作製

(1) 組換えタンパク質の作製

実施例 1 で取得した配列番号 5 の遺伝子を基に、以下の方法にて組換えタンパク質を作製した。PCR は、実施例 1 で得られたファージミド溶液より調製し配列解析に供したベクターを 1 μ l、Nde I 及び Kpn I 制限酵素切断配列を含む 2 種類のプライマー (配列番号 37 及び 38 に記載) を各 0.4 μ M、0.2 mM dNTP、1.25 U の PrimeSTAR HS ポリメラーゼ (宝酒造社製) となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を 50 μ l とし、Thermal Cycler (BIO RAD社製) を用いて、98 / 10 秒、68 / 1.5 分のサイクルを 30 回繰り返すことにより行った。なお、上記 2 種類のプライマーは、配列番号 6 (P47) のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR 後、増幅された DNA を 1 % アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて約 1.4 kbp の DNA 断片を精製した。

【0091】

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

10

【0092】

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

20

【0093】

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

30

【0094】

また、配列番号1の遺伝子を基に、以下の方法にてヒト相同遺伝子の組換えタンパク質を作製した。PCRは、実施例1で作製した各種組織・細胞cDNAよりRT-PCR法による発現が確認できたcDNAを1 μ l、SacI及びXhoI制限酵素切断配列を含む2種類のプライマー(配列番号41及び42に記載)を各0.4 μ M, 0.2mM dNTP, 1.25UのPrimeSTAR HSポリメラーゼ(宝酒造社製)となるように各試薬と添付バッファーを加え全量を50 μ lとし、Thermal Cycler(BIO RAD社製)を用いて、98 / 10秒、68 / 2.5分のサイクルを30回繰り返すことにより行った。なお、上記2種類のプライマーは、配列番号2のアミノ酸配列全長をコードする領域を増幅するものであった。PCR後、増幅されたDNAを1%アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて約2.1kbpのDNA断片を精製した。

40

【0095】

精製したDNA断片をクローニングベクターpCR-Blunt(invitrogen社製)にライゲーションした。これを大腸菌に形質転換後プラスミドを回収し、増幅された遺伝子断片が目的配列と一致することをシーケンスで確認した。目的配列と一致したプラスミドをSacI及びXhoI制限酵素で処理し、QIAquick Gel Extraction Kitで精製後、目的遺伝子配列を、SacI、XhoI制限酵素

50

で処理した大腸菌用発現ベクター pET30a (Novagen 社製) に挿入した。このベクターの使用により His タグ融合型の組換えタンパク質が産生できる。このプラスミドを発現用大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、1 mM IPTG による発現誘導を行うことで目的タンパク質を大腸菌内で発現させた。

【0096】

(2) 組換えタンパク質の精製

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

10

【0097】

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

【0098】

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

20

30

【0099】

上記方法によって得られた各精製標品のうち、 $200 \mu\text{l}$ を 1 mL の反应用緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7.4) に分注を行った後、エンテロキナーゼ (Novagen 社製) $2 \mu\text{l}$ 添加した後、室温にて一晚静置・反応を行い、His タグを切断し、Enterokinase Cleavage Capture Kit (Novagen 社製) を用いて添付プロトコールに従って精製を行った。次に、上記方法によって得られた精製標品 1.2 mL を、限外ろ過 NANOSEP 10K OMEGA (PALL 社製) を用いて、生理用リン酸緩衝液 (日水製薬社製) 置換した後、HT タフリンアクロディスク $0.22 \mu\text{m}$ (PALL 社製) にて無菌ろ過を行い、これを以下の実験に用いた。

40

【0100】

実施例 3: CAPRIN-1 に対する抗体の作製

(1) CAPRIN-1 由来ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製

CAPRIN-1 に結合する抗体を得るために、CAPRIN-1 由来ペプチド (Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Lys-Lys-Gly-Lys-Leu-Asp-Asp-Tyr-Gln (配列番号 43)) を合成した。このペプチド 1 mg を抗原として、等容量の不完全フロイントアジュバント (IFA) 溶液と混合し、これを 2 週間

50

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

10

20

30

40

50

【0101】

(2) CAPRIN-1タンパクに対するモノクローナルの作製

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

【0102】

作製したハイブリドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパクに対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。実施例2で調製したCAPRIN-1タンパク溶液1 μ g/mlを96穴プレート1ウェル当たりに100 μ l添加し、4℃にて18時間静置した。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5% Bovine Serum Albumin(BSA)溶液(シグマ社製)を1ウェル当たり400 μ l添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウェル当たり400 μ lのPBS-Tでウェルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウェル当たり100 μ l添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して15-30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり100 μ l添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmと595nmの吸光度値を測定した。その結果、吸光度値が高かった抗体を産生するハイブリドーマを複数個選抜した。

【0103】

選抜したハイブリドーマを96穴プレート1ウェル当たりに0.5個となるようにプレートに添加し培養した。1週間後、ウェル中に単一のコロニーを形成しているハイブリドーマが観察された。それらウェルの細胞をさらに培養して、クローニングされたハイブリ

ドーマが産生する抗体のCAPRIN-1タンパクに対する結合親和性を指標にハイブリドーマを選抜した。実施例2で調製したCAPRIN-1タンパク溶液 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を96穴プレート1ウェルあたりに $100\mu\text{l}$ 添加し、4にて18時間静置した。各ウェルをPBS-Tで3回洗浄後、0.5%BSA溶液を1ウェルあたり $400\mu\text{l}$ 添加して室温にて3時間静置した。溶液を除いて、1ウェルあたり $400\mu\text{l}$ のPBS-Tでウェルを3回洗浄後、上記で得られたハイブリドーマの各培養上清を1ウェルあたり $100\mu\text{l}$ 添加し、室温にて2時間静置した。PBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、PBSで5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェルあたり $100\mu\text{l}$ 添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェルあたり $100\mu\text{l}$ 添加して15-30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェルあたり $100\mu\text{l}$ 添加して反応を停止させ吸光度計を用いて 450nm と 595nm の吸光度値を測定した。その結果、CAPRIN-1タンパクに反応性を示すモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマ株を得、ハイブリドーマの培養上清をプロテインG担体を用いて精製し、CAPRIN-1タンパクに結合するモノクローナル抗体150個を得た。

10

【0104】

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

20

30

【0105】

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

40

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

【0106】

まず、PBSで $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に溶解した組換えCAPRIN-1タンパク質溶液 $100\mu\text{l}$ に、終濃度が 10mM になるようにDTT(Fluka社製)を添加し、95、5分間反応させてCAPRIN-1タンパク質内のジスルフィド結合の還元を行い、次に終濃度 20mM のヨードアセトアミド(和光純薬社製)を添加し、37、遮光条件下にて30分間チオール基のアルキル化反応を行った。得られた還元アルキル化CAPRIN-1タンパク質 $40\mu\text{g}$ に、#1~#10のCAPRIN-1に対するモノクローナ

50

ル抗体をそれぞれ50 µg 添加し、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 mL にメスアップして攪拌混合しながら4 で一晩反応させた。

【0107】

次に、トリプシン (プロメガ社製) を終濃度0.2 µg となるように添加し、37 1時間、2時間、4時間、12時間反応させた後、予め1% BSA (シグマ社製) を含むPBSでブロッキングし、PBSで洗浄したプロテインA - ガラスビーズ (GE社製) と1 mM炭酸カルシウム、NP-40緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、1% NP-40) 中で混合し、それぞれ30分間反応させた。

【0108】

反応液を25 mM炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した後、0.1% ギ酸100 µlを用いて抗原抗体複合体を溶出し、溶出液についてQ-TOF Premier (Waters-MicroMass社製) を用いてLC-MS解析を行った。解析は機器に付属のプロトコールに従った。

【0109】

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

【0110】

実施例4: CAPRIN-1のポリペプチドを用いた癌診断

(1) イヌの癌診断

悪性又は良性腫瘍の確認された患犬342頭と健常犬6頭の血液を採取し、血清を分離した。実施例2で作製したイヌCAPRIN-1のポリペプチド (配列番号8)、抗イヌIgG抗体を用いてELISA法にて該ポリペプチドに特異的に反応する血清中のIgG抗体価を測定した。

【0111】

作製したポリペプチドの固相化は、リン酸緩衝化生理食塩水にて5 µg/mLに希釈した組換えタンパク質溶液を96穴イモビライザーアミノプレート (ヌンク社製) に100 µl/well 添加し、4 で一晩静置して行った。ブロッキングは、0.5% BSA (bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)、シグマアルドリッチジャパン社製) 含有50 mM 重炭酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 8.4) (以下ブロッキング溶液) を100 µl/well 加え、室温で1時間振とうした。希釈にブロッキング溶液を用いた1000倍希釈血清を100 µl/well 添加し、室温で3時間振とうして反応させた。0.05% Tween 20 (和光純薬工業社製) 含有リン酸緩衝化生理食塩水 (以下PBS-T) で3回洗浄し、ブロッキング溶液にて3000倍希釈したHRP修飾イヌIgG抗体 (Goat anti Dog IgG-h+I HRP conjugated: BETHYL Laboratories社製) を100 µl/well 加え、室温で1時間振とうして反応させた。PBS-Tで3回洗浄し、HRP基質TMB (1-Step Turbo TMB (テトラメチルベンジジン)、PIERCE社) を100 µl/well 添加し、室温で30分間酵素基質反応させた。その後、0.5 M硫酸溶液 (シグマアルドリッチジャパン社製) を100 µl/well 加えて反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度測定を行った。コントロールとしては、作製した組換えタンパク質を固相化しないもの、担癌犬血清を反応させないものを上記と同様に行い比較することとした。

【0112】

上記癌診断に用いた全342検体中215検体で、摘出された腫瘍組織を用いた病理診断の結果、悪性と確定診断がされている。

10

20

30

40

50

【0113】

具体的には、悪性黒色腫、悪性混合腫瘍、肝細胞癌、基底細胞癌、筋細胞腫様歯肉腫、口腔内腫瘍、肛門周囲腺癌、肛門嚢腫瘍、肛門嚢アポクリン腺癌、セルトリ細胞腫、膣前庭癌、皮脂腺癌、皮脂腺上皮腫、脂腺腺腫、汗腺癌、鼻腔内腺癌、鼻腺癌、甲状腺癌、大腸癌、気管支腺癌、腺癌、腺管癌、乳腺癌、複合型乳腺癌、乳腺悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、線維肉腫、血管周皮腫、骨肉腫、軟骨肉腫、軟部組織肉腫、組織球肉腫、粘液肉腫、未分化肉腫、肺癌、肥満細胞腫、皮膚平滑筋腫、腹腔内平滑筋腫、平滑筋腫、扁平上皮癌、慢性型リンパ球性白血病、リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小～中細胞型リンパ腫、副腎髄質腫瘍、顆粒膜細胞腫、褐色細胞腫などの癌診断を受けている検体である。

10

【0114】

これら担癌犬生体由来の血清は、図3に示したように有意に高い組換えタンパク質に対する抗体価を示した。本診断法による悪性判断を健常犬平均値の2倍以上とした場合、108検体、50.2%で悪性と診断できることがわかった。この108検体の癌の種類は以下のとおりである。なお、検体によっては複数種類の癌を罹患しているものもあるが、以下に示す数値は癌の種類ごとの累計値である。

【0115】

悪性黒色腫6例、リンパ腫11例、化膿性炎症1例、顆粒膜細胞腫1例、肝細胞癌4例、悪性精巣腫瘍3例、口腔内腫瘍3例、肛門周囲腺癌7例、肉腫12例、乳腺癌35例、肺癌1例、腺管癌6例、皮脂腺癌2例、肥満細胞腫5例、平滑筋肉腫1例、扁平上皮癌3例、悪性混合腫瘍2例、血管周皮腫1例、移行性上皮癌1例、血管周皮腫1例、血管外膜細胞腫1例、皮脂腺上皮腫1例。

20

【0116】

さらに、末期癌患犬より採取した胸水、腹水を用いて、同様の診断を行った結果、血清を用いた本診断法による結果と同様の値を検出することができ、癌と診断することができた。

【0117】

また、本診断法を用いることにより、さらに目に見えない部分の癌診断、進行度診断、悪性度診断、術後の経過診断、再発診断、転移診断などのような診断が可能であることがわかった。以下に図4に示した詳細診断の具体例について数例をあげる。

30

【0118】

(2)-1 目に見えない腫瘍の癌診断

患犬1(フラットコーテットレトリバー)は、2007年6月7日時点で腫瘍が確認されていなかったが、その20日ほど後の2007年6月24日に左上顎犬歯の付け根の歯肉に有茎状の直径2mmの腫瘍が発見された患犬である。発見された日に有茎部を結糸し、切除を行っている。肉眼で腫瘍を確認できる以前の450nmでの吸光度は0.06であり、腫瘍発見時0.04と比較しても大きく変わらなかった。この結果から本手法を用いることにより、腹腔内など目に見えない部分の癌診断でも可能なことがわかった。

【0119】

また、腫瘍が肉眼で確認できる以前から値の上昇が確認され、腫瘍発生の前兆を示していたもの言える。よって、定期健診などの健康診断にも有用であることがわかる。

40

【0120】

(2)-2 癌の進行度診断

癌の進行度は腫瘍の大きさや深さ、周辺組織にどれほど影響を及ぼしているか、転移をしているかなどによって判断される。転移すなわち癌が進行すると以前より高い値が検出されることがわかった。

【0121】

(2)-3 癌の悪性度診断

基底細胞腫には悪性型と良性型とがあり、近年、新WHOでは悪性型を基底細胞癌、良性型を毛芽腫と分類するという傾向にあるとのことである。

50

【0122】

基底細胞癌（悪性）と診断された患犬2（ビーグル）は、手術時の血清診断の結果、450nmでの吸光度は0.04であった。一方、毛芽腫（良性）と診断された患犬3（雑種）は、手術時の血清診断の結果、450nmでの吸光度は0と全く検出されなかった。よって、同じ基底細胞腫でも、悪性型の基底細胞癌と良性型の毛芽腫を診断できることがわかった。

【0123】

次に、乳腺腫瘍について例を挙げる。乳腺腫瘍には、乳腺癌や乳腺悪性混合腫瘍といった悪性腫瘍と、悪性所見を示さない良性乳腺腫瘍がある。

【0124】

患犬4（シェットランドシープドッグ）は、2007年7月17日に乳腺癌にて、摘出手術を受けた患犬である。患犬4の腫瘍は3ヶ所あり、その摘出組織を用いた病理診断では、すべて同一診断名であった。強い異型性と浸潤性を有する乳腺組織が、やや広範囲に乳頭状・腺様・増殖しており脈管浸潤も標本上確認されたため、高度の悪性度を有する乳癌と診断されていた。この手術時に採血した血清診断の結果、450nmでの吸光度は0.41であった。

【0125】

一方、患犬5（トイプードル）は、2007年10月9日に、乳腺腫瘍の摘出手術を受けた患犬である。このときの摘出組織を用いた病理診断では、乳腺上皮細胞と筋上皮細胞両成分が増殖する腫瘍が形成されていたものの、筋上皮細胞成分は均一な紡錘形細胞で悪性所見は見られず、また、腺上皮細胞成分は軽度の大小不同や核異型が見られたものの、悪性所見の見当たらない良性乳腺腫と診断された。この手術時に採血した血清診断の結果、450nmでの吸光度は0であった。

【0126】

以上の2検体の結果からも悪性度の高い腫瘍は、悪性度の低い、すなわち良性の腫瘍に比べ、値が大きいことがわかった。

【0127】

また、乳腺癌や乳腺悪性混合腫瘍といった悪性腫瘍（乳癌）54検体と、悪性所見を示さない良性乳腺腫瘍21検体について診断結果の分布を調べたところ、良性乳腺腫瘍検体が健常犬と同様の分布を示すのに対し、乳癌検体では高い値を示す分布を示した。

【0128】

(2) - 4 術後の経過診断

患犬6（雑種）は、肥満細胞腫で来院し2005年5月23日に摘出手術を行っている。この際行った血清診断の結果、450nmでの吸光度は0.10であった。肥満細胞腫は完全に採りきれていない場合、再発や転移を繰り返す腫瘍のため、手術により腫瘍の完全切除ができたか否かということは、重要である。2006年12月19日の経過観察の際には、450nmでの吸光度は0.05と抗体価の低下が確認された。このとき再発は確認されていない。よって患犬6では、完全に腫瘍を切除できたために血清診断結果は手術時よりも低下したといえる。

【0129】

患犬7（ビーグル）は、2008年2月14日に肥満細胞腫の摘出手術を行っている。この際行った血清診断の結果、450nmでの吸光度は0.17であった。摘出した組織を用いた病理組織診断では、浸潤性増生が認められた中等度分化型（P a t n a i k I I 型）に相当する肥満細胞腫と診断された。2008年3月10日に経過観察で再来院した際、再び血清診断を行った結果、450nmでの吸光度は0.07であった。このとき転移や再発は確認されていない。よって患犬7では、完全に腫瘍を切除できたために血清診断結果は手術時よりも低下したといえる。

【0130】

(2) - 5 再発診断

患犬8（ハスキー）は、2007年5月8日に乳腺癌の摘出手術を行っている。この際

10

20

30

40

50

行った血清診断の結果、450nmでの吸光度は0.05であった。摘出した組織を用いた病理診断では、異型性の強い上皮系細胞が主に腺管構造を形成、増殖しており乳腺原発の腺癌と診断された。そのとき既にリンパ管内に多数の癌細胞が入っているのが確認されており、リンパ節や遠隔部への転移、再発のリスクが高いということであった。手術から約一ヶ月半後の2007年6月28日に同部位に再発が確認された。このときの血清診断の結果は0.09と値の上昇が確認された。患犬8では、腫瘍が切除しきれていなかったか又は、再発したために、診断結果が5月初旬よりも6月下旬のほうが大きく検出されたとわかった。

【0131】

(2) - 6 転移診断

患犬9(スコティッシュテリア)は、2003年2月 乳腺腫瘍、2003年8月 口腔内悪性黒色腫、2005年1月 口唇に悪性黒色腫、2005年4月13日 口腔内黒色腫と転移・再発を繰り返し、これらすべて手術で切除済みの患犬である。2005年4月の口腔内黒色腫の再発の後に、経過観察で再来院した2006年12月17日の血清診断の結果は、450nmでの吸光度が0.09であった。その半年後の2007年6月20日には頸部リンパ、膝きょうリンパが肥大して再来院している。リンパ腫であれば全身のリンパが腫れるが、患犬9については2箇所のみであったため、おそらく転移によるリンパ腫である可能性が高いとの臨床診断であった。本手法による診断によっても、450nmでの吸光度は0.10と上昇しており、以前存在した腫瘍の転移であることがわかった。

【0132】

患犬10(柴犬)は、2006年3月11日に右口唇部口腔悪性黒色腫にて腫瘍の摘出を行った患犬である。2006年6月10日から同年9月26日まで抗がん剤(シクロホスファシド)の治療歴があり、2006年5月23日から有機ゲルマニウム主成分のビレモS投薬継続中である。この腫瘍の転移と考えられる2007年3月20日の腫瘍摘出時に行った血清診断の結果は、450nmでの吸光度がほぼ0.03とほとんど検出されなかった。このときの摘出した組織を用いた病理診断では、転移性悪性黒色腫と診断されている。しかし、転移した黒色種の手術3ヵ月後の2007年6月27日に再び転移を起こしている。2007年3月20日は右頸部に腫瘍が発生したが、2007年6月27日はその反対側に発生し、腫瘍の形状も前回と類似した黒色の塊を形成しているとのことである。大きさは3.1×3.2×0.8cm大であり、臨床診断でも転移とのことである。このとき行った血清診断の結果は、450nmでの吸光度は、0.23と上昇しているのが確認され、以前存在した腫瘍の転移であることがわかった。

【0133】

(2) - 7 ヒトCAPRIN-1由来ポリペプチドを用いた癌診断

実施例2で作製したヒトCAPRIN-1のポリペプチド(配列番号2)を用いて、上記と同様にして、該ポリペプチドに反応する、イヌ血清中のIgG抗体価を測定した。健常犬血清を用いた検討結果では、上記と同様に450nmでの吸光度はほとんど検出されなかった。

【0134】

一方、患犬11(シーザー)は、2007年6月21日に乳腺癌の摘出手術を受けた患犬である。摘出した組織を用いた病理診断では、線維性結合織のややび慢性の増生に混じて、強い異型性と浸潤性を有する乳腺組織が大小の塊状に腺様-管状-乳頭状増殖している中等度の悪性度を持つ乳腺癌と診断されている。この患犬11の450nmでの吸光度は、0.26であった。

【0135】

(3) ネコの癌診断

次に担癌猫及び健常猫の診断を行った。上記で用いたイヌCAPRIN-1のポリペプチドと抗ネコIgG抗体を用いて、上記と同様にして、該ポリペプチドに特異的に反応するネコ血清中のIgG抗体価を測定した。2次抗体は、HRP修飾抗ネコIgG抗体(P

10

20

30

40

50

EROXIDASE - CONJUGATED GOAT IgG FRACTION TO CAT IgG (WHOLE MOLECULE): CAPPEL RESEARCH REAGENTS社製)をブロッキング溶液にて8000倍希釈して用いた。

【0136】

患猫1(雑種)は2007年5月8日に乳腺癌にて腫瘍の摘出手術を受けた患猫である。患猫1の450nmでの吸光度は、0.21であった。また、2006年10月17日に腺管癌にて摘出手術を受けた、患猫2(ヒマラヤン)においても450nmでの吸光度は、0.18であった。一方、健常猫では全く検出されなかった。

【0137】

また、実施例2で作製したヒトCAPRIN-1のポリペプチド(配列番号2)を用いて、上記と同様にして、該ポリペプチドに反応する、ネコ血清中のIgG抗体価を測定した。その結果、健常猫において、該ポリペプチドを固相化した場合には、450nmでの吸光度はほとんど検出されなかった。一方、患猫3(アメリカンショートヘア)は、2008年4月15日に乳腺癌の摘出手術を受けている。摘出した組織を用いた病理診断では、大小の壊死組織を伴い、強い異型性と浸潤性を有する乳腺組織が大小の塊状に筈状増殖している高度の悪性度を有する乳腺癌と診断されている。この患猫においても、450nmでの吸光度は、0.12であった。

【0138】

従って犬と同様、猫の場合も、癌を患った検体では値が検出され、一方健常の検体ではまったく検出されなかったため、猫についても犬と同様に、本手法にて癌診断が可能であることがわかった。

【0139】

(4)ヒトの癌診断

実施例2で作製したヒトCAPRIN-1のポリペプチド(配列番号2)と抗ヒトIgG抗体を用いて、該ポリペプチドに特異的に反応する健常人血清中のIgG抗体価を測定した。作製したポリペプチドの固相化は、リン酸緩衝化生理食塩水にて100μg/mLに希釈した組換えタンパク質溶液を96穴イモビライザーアミノプレート(ヌンク社製)に100μl/well添加し、4で一晩静置して行った。ブロッキングは、ブロックエース粉末(DSファーマバイオメディカル株式会社製)4gを精製水100mlに溶解した溶液を精製水で4倍希釈したもの(以下ブロッキング溶液)を100μl/well加え、室温で1時間振とうした。希釈にブロッキング溶液を用いた1000倍希釈血清を100μl/well添加し、室温で3時間振とうして反応させた。0.05%Tween 20(和光純薬工業社製)含有リン酸緩衝化生理食塩水(以下PBS-T)で3回洗浄し、ブロッキング溶液にて10000倍希釈したHRP修飾抗ヒトIgG抗体(HRP-Goat Anti-Human IgG(H+L) Conjugate: Zymed Laboratories社製)を100μl/well加え、室温で1時間振とうして反応させた。PBS-Tで3回洗浄し、HRP基質TMB(1-Step Turbo TMB(テトラメチルベンジジン)、PIERCE社)を100μl/well添加し、室温で30分間酵素基質反応させた。その後、0.5M硫酸溶液(シグマアルドリッチジャパン社製)を100μl/well加えて反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度測定を行った。ポジティブコントロールとしてリン酸緩衝化生理食塩水にて50μg/mLに調製した卵白アルブミン抗原を固相化したものを用いた。その結果、450nmでの吸光度は、卵白アルブミン抗原に対して健常人7人の平均で0.45と高い値を示した。一方、上記ポリペプチドに対しては0と全く検出されなかった。

【0140】

さらに、上記と同様にして、悪性乳癌を患っている患者由来の血清17検体(Promedex社から購入)に対して、上記と同様にしてヒト由来癌抗原タンパク(配列番号3のアミノ酸配列)に特異的に反応する血清中のIgG抗体価を測定した。その結果、450nmでの吸光度は、上記ポリペプチドに対して乳癌患者17人の平均で0.48と高い

10

20

30

40

50

値を示した。

【0141】

また、実施例2で作製したイヌCAPRIN-1のポリペプチド(配列番号8)と抗ヒトIgG抗体を用いて、上記と同様にして、該ポリペプチドに特異的に反応するヒト血清中のIgG抗体価を測定した。その結果、健常人7人の平均は0.04であったのに対し、乳癌患者17人の平均は0.55と高い値を示した。

以上のことから、ヒトにおいても、本手法によって癌を検出できることが判った。

【0142】

実施例5：抗原ポリペプチドを測定することによる癌診断

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

【0143】

1次抗体の固相化は、リン酸緩衝化生理食塩水にて5 μ g/mlの濃度に希釈したポリクローナル抗体を96穴イモビライザーアミノプレート(ヌンク社製)に100 μ l/well添加し、室温で2時間振とうして行った。ブロッキングは、0.5% BSA(bovine serum albumin(ウシ血清アルブミン)、シグマアルドリッチジャパン社製)含有50mM重炭酸ナトリウム緩衝溶液(pH 8.4)(以下ブロッキング溶液)を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうした。その後、ブロッキング溶液を用いて希釈した担癌生体由来血清を100 μ l/well添加し、室温で3時間振とうして反応させた。このとき希釈倍率は10-1000倍の10倍希釈系列で調整した。0.05% Tween 20(和光純薬工業社製)含有リン酸緩衝化生理食塩水(以下PBS-T)で3回洗浄し、2次抗体は、ブロッキング溶液にて1 μ g/mlの濃度に希釈した各モノクローナル抗体を100 μ l/well加え、室温で1時間振とうして反応させた。PBS-Tで3回洗浄し、3次抗体は、ブロッキング溶液にて5000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG(H+L)抗体(インビトロジェン社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して室温にて1時間静置した。PBS-Tでウェルを3回洗浄した後、TMB基質溶液(Thermo社製)を1ウェル当たり100 μ l添加して15-30分間静置して発色反応を行った。発色後、1規定硫酸を1ウェル当たり100 μ l添加して反応を停止させ吸光度計を用いて450nmの吸光度測定を行った。

【0144】

その結果、2次抗体に癌細胞の細胞表面に反応する#1~#10のモノクローナル抗体を用いた場合には、乳癌、悪性黒色腫などの担癌犬、担癌猫で、いずれの検体も0.3以上の吸光度値(ポリペプチドの値)が検出され、健常犬、健常猫では検出されなかった。一方、2次抗体にCAPRIN-1タンパク自体には反応するが、癌細胞の細胞表面に反応しないモノクローナル抗体を用いた場合には、いずれの検体もポリペプチドの値は検出されたものの、吸光度値はいずれも0.05以下であり、上記癌細胞の細胞表面に反応する抗体同士の組み合わせと比較すると低い値であった。

【0145】

従って、CAPRIN-1に対する抗体を用いて抗原ポリペプチドを検出するこの手法においても、癌を診断することができた。

【産業上の利用可能性】

【0146】

本発明は、癌の診断または検出のために産業上有用である。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2008-202320号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。また、本明細書で引用した全ての刊

10

20

30

40

50

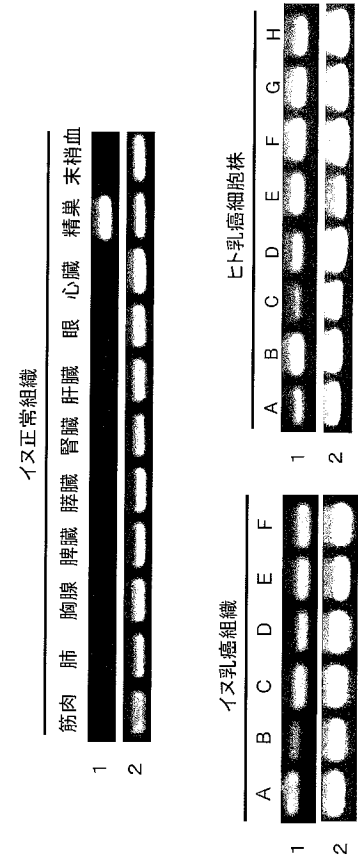
行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

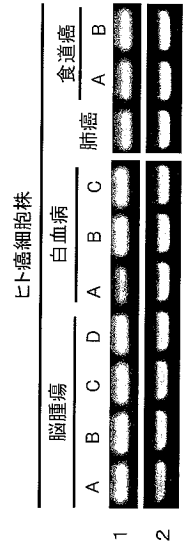
【 0 1 4 7 】

配列番号 3 1 ~ 4 2 : プライマー

【 図 1 】

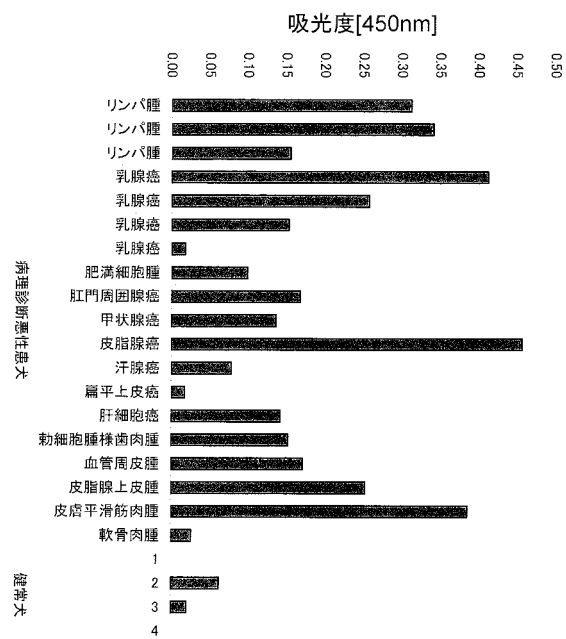


【 図 2 】

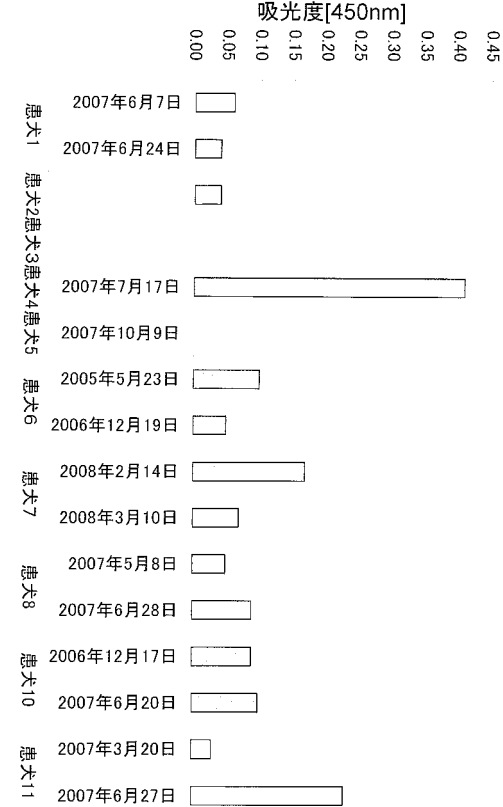


1 ← 3

【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

2014134550000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 0 7 K 16/18

F ターム(参考) 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA51 FA74

专利名称(译)	检测癌症的方法		
公开(公告)号	JP2014134550A	公开(公告)日	2014-07-24
申请号	JP2014074263	申请日	2014-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	岡野文義 鈴木佳奈		
发明人	岡野 文義 鈴木 佳奈		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 G01N33/57407 G01N33/57415 G01N33/6893 G01N33/53 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS36 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	2008202320 2008-08-05 JP		
其他公开文献	JP5825386B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过测量特定于各种癌症的肿瘤标志物来检测癌症的方法。 解决方案：在从活体中分离出的样品中，通过抗原抗体反应，可与抗CAPRIN-1蛋白的抗体发生反应，该蛋白具有序列表中甚至SEQ ID NOS：2至30所示的任何氨基酸序列 一种检测癌症的方法，该方法包括测量具有以下内容的多肽的表达：含有CAPRIN-1蛋白或其片段，针对该抗体的抗体或编码该多肽的多核苷酸的癌症检测试剂。 [选择图] 图3

