

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6537143号
(P6537143)

(45) 発行日 令和1年7月3日 (2019. 7. 3)

(24) 登録日 令和1年6月14日 (2019. 6. 14)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/574 (2006. 01)
 GO 1 N 33/48 (2006. 01)
 GO 1 N 33/53 (2006. 01)
 CO 7 K 16/32 (2006. 01)

GO 1 N 33/574 Z N A A
 GO 1 N 33/48 P
 GO 1 N 33/53 Y
 CO 7 K 16/32

請求項の数 14 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2015-556303 (P2015-556303)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月15日 (2014. 5. 15)
 (65) 公表番号 特表2016-526147 (P2016-526147A)
 (43) 公表日 平成28年9月1日 (2016. 9. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/063527
 (87) 国際公開番号 W02014/185550
 (87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)
 審査請求日 平成29年5月10日 (2017. 5. 10)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-104027 (P2013-104027)
 (32) 優先日 平成25年5月16日 (2013. 5. 16)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稜
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100138911
 弁理士 櫻井 陽子
 (72) 発明者 武藤 誠
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
 国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の予後を診断する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象において癌の予後を判定するための方法であって、対象から採取したサンプル中の TRIO の 2681 位チロシン残基のリン酸化を検出するステップを含んで成り、リン酸化の不存在は癌の予後が良好であることを示す、方法。

【請求項 2】

サンプルは、原発癌腫から外科的切除により得た癌性組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

リン酸化の不存在は、原発癌腫の外科的切除後、長期の生存が見込まれることを示す、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

リン酸化の存在は、原発癌腫の外科的切除後、補助療法が必要であることを示す、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

リン酸化を、TRIO (pY2681) に結合するが、2681 位チロシン残基がリン酸化されていない TRIO には結合しない抗体によって検出する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

リン酸化を、免疫組織化学アッセイ、ウェスタン分析または ELISA により検出する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

10

20

【請求項 7】

癌は、大腸癌、乳癌、肺癌、膵臓癌および胃癌からなる群から選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

癌は、大腸癌および胃癌からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

癌は大腸癌である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

癌はステージⅠまたはⅡの大腸癌である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

癌はステージⅢの大腸癌である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

TRIO(pY2681)に結合するが、2681位チロシン残基がリン酸化されていないTRIOには結合しない抗体。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の抗体を含む、癌の予後を診断するための診断用組成物。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の抗体を含む、癌の予後を診断するためのキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、対象において癌の予後を診断するための、方法、診断用組成物およびキットに関する。

【背景技術】**【0002】**

癌は、多くの先進工業国において主な死因であり、癌死の直接の原因はしばしば、その重要臓器への転移である。大腸癌は、日本における癌死の原因の第3位である。毎年、人口100,000人当たり約100人の患者が新しく大腸癌と診断され、その死亡率は患者100,000人当たり30～40人であり、それはさらに増え続けている。

【0003】

化学療法および放射線療法のような癌療法にはリスクが伴うので、利益を受ける見込みが特に高い患者を適切に選ぶことが重要である。大腸癌の予後マーカーに関する研究はいくつかあるが（非特許文献 1～7）、リスクを伴う治療を必要としない、予後の良好な患者を特定するために十分ではない。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0004】**

【非特許文献 1】 Science 314: 268-274 (2006)

【非特許文献 2】 Science 318: 1108-1113 (2007)

【非特許文献 3】 NEJM 344: 1196-1206 (2001)

【非特許文献 4】 Clin. Cancer Res. 17: 1535-1545 (2011)

【非特許文献 5】 J. Clin. Oncol. 29: 17-24 (2011)

【非特許文献 6】 J. Clin. Oncol. 29: 1261-1270 (2011)

【非特許文献 7】 J. Clin. Oncol. 29: 4620-4626 (2011)

【0005】

これら文献を引用により本書の一部とする。

【発明の概要】**【0006】**

癌転移メカニズムの研究において、本発明者らは、Notch受容体切断がDAB1-ABL活性化を開始し、TRIOのTyrリン酸化(pY2681)を起こすことを示している。さらに本発明者らは

10

20

30

40

50

、TRIOのY2681におけるリン酸化が大腸癌(CRC)患者の予後不良に関連すること(図6A)、TRIO(pY2681)は、原発CRCの浸潤だけでなく、その転移および他の多くの種類の癌の浸潤・転移の引き金ともなること(図12および表2)を見出した。本発明者らはそのような知見に基づき本発明に至った。

【0007】

一態様において、本発明は、対象において癌の予後を診断する方法であって、対象から採取したサンプル中のTRIOの2681位チロシン残基のリン酸化を検出するステップを含んで成り、リン酸化の不存在は癌の予後が良好であることを示す、方法を提供する。

【0008】

他の一態様において、本発明は、TRIO(pY2681)に特異的に結合する抗体を提供する。

10

【0009】

他の一態様において、本発明は、本発明の抗体を含む、癌の予後を診断するための診断用組成物を提供する。

【0010】

他の一態様において、本発明は、本発明の抗体を含む、癌の予後を診断するためのキットを提供する。

【0011】

他の一態様において、本発明は、大腸癌を処置するためのABL阻害剤を含む医薬組成物を提供する。

【0012】

他の一態様において、本発明は、癌の転移を防止するためのABL阻害剤を含む医薬組成物を提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】CRC細胞においてNotchシグナル伝達はRhoを活性化し、浸潤を促進する。(AおよびB) Apc/Aes複合変異マウスにおいて、Rbpj遺伝子ノックアウトは腸腫瘍の浸潤を抑制する。Apc/Aes二重変異マウスおよびApc/Aes/Rbpj三重変異マウスの腸における腫瘍深達度を、H & E染色により組織病理学的に(A)、および数値として(B)調べた。各群においてn = 5。(A)中の点線は、粘膜筋板の位置を示す。(A)中のアスタリスクは、粘膜下組織に浸潤するCRC腺を示す。(B)において、粘膜内の略号(Mu)、粘膜下への到達の略号(Sm)、固有筋層への到達の略号(MP)、および漿膜への到達の略号(Se)で、深達度を示す。遺伝子型の略号については、実験方法の記載を参照されたい。(C) Apc/Aesマウスの浸潤腸腫瘍におけるRhoの活性化。Apc^{+/-Δ716}コントロール(Apc)およびApc/Aes変異マウスの正常腸粘膜の組織(N)および腫瘍組織(T)を、GTP-Rhoプルダウンアッセイによって調べた。総Rhoタンパク質の量も示す。(D) AesによるRho活性化の抑制。Colon26 TetON-Aes-Flag細胞を、DLL4の組換え細胞外ドメイン(rDLL4)でコートした培養プレートに播種し、FlagタグAes (Aes-F)を用いてドキシサイクリンにより誘導した。スクラッチの16時間後に細胞層を採り、GTP-Rhoを調べた。(EおよびF) 培養物中で、RhoまたはRockの阻害は、培養CRC細胞のMatrigel浸潤および経内皮遊走(TEM)を抑制する。それぞれ2つの用量でのRho阻害剤C3TまたはRock阻害剤Y-27632の存在下、RKOヒトCRC細胞のMatrigel浸潤(E)またはTEM(F)を調べた。(GおよびH) EDTA処理したヒトCRC細胞におけるNotch受容体活性化によるRho活性化の経時変化。RKO細胞を10 mM EDTAで2分間処理し、標準培地中で記載される時間にわたり培養し、GTP-Rhoを調べた。(I) Notch受容体をそのリガンドで活性化することによる、Rho活性化。RKO細胞をrDLL4でコートしたプレートに播種し、記載される時点で採取してGTP-Rhoプルダウンアッセイに付した。(J) CRC細胞における3つのNotch受容体パラログのノックダウンによるRho活性化の低下。RKO細胞に、Notch1、2および3のsiRNAの混合物(siNotch1/2/3)をトランスフェクトした(各パラログに#1および#2)。非サイレンシングsiRNA (Ns) およびトランスフェクションなし (-) をコントロールとして用いた。トランスフェクションの48時間後、細胞を10 mM EDTAを用いるかまたは用いずに処理し、GTP-Rhoを調べた。(K) Notch受容体活性化のγ-セクレターゼの阻害によるRho活性

30

40

50

化の抑制。RKO細胞を10 μ MのDAPTで12時間処理し、10 mM EDTAで処理し、Rhoプルダウンアッセイに付した。スケールバー：100 μ m。データは平均とSDで表す。* $p < 0.01$ および # $p < 0.05$ 。GTP-Rhoプルダウンアッセイについては、総Rhoタンパク質の量も測定した。図S1も参照されたい。

【図2】Rbpj依存性および非依存性いずれのNotchシグナル伝達も、CRC進展に重要な役割を果たす。Notch受容体活性化による初期相応答(A~D)および後期相応答(E~J) (A) NotchおよびRhoは、内皮細胞(EC)へのCRC細胞の付着に重要な役割を果たす。EGFP発現HCT116細胞を、C3TまたはDAPTを用いるかまたは用いずに2時間処理し、肺内皮細胞(LgEC)の層上に播種した。15分後に未結合HCT116細胞を洗い流し、付着を維持する細胞の数を蛍光計でカウントした。(BおよびC) 初期相Rho活性化は、RBPJに依存しない。非サイレンシングコントロール(Ns)またはRBPJノックダウン(shRBPJ)のショートヘアピンRNA構築物の2つの独立した発現ベクターのいずれかを導入して、安定なHCT116細胞クローン株を樹立した(B)。それらを2分間のEDTA処理後にRhoプルダウンアッセイに付した(C)。(D) ECへのCRC細胞付着は、RBPJ非存在下にも γ -セクレターゼ活性に依存する。(B)に記載したRBPJノックダウンまたはコントロール細胞を、DAPTを用いるかまたは用いずに2時間処理し、(A)に記載のように付着アッセイに付した。(E) RBPJは後期相Rho活性化に重要な役割を果たす。RBPJノックダウンまたはコントロール細胞をEDTAで処理し、6または12時間後にGTP-Rhoを調べた。(F) Rbpj 標的遺伝子はマウスおよびショウジョウバエに共通である。抗Rbpj Abを用いるRNA-seqおよびクロマチン免疫沈降(ChIP)-seqにより決定されるように、マウス脳において98遺伝子がRbpjにより直接に調節される。一方、ショウジョウバエにおいては、55遺伝子が、Notchシグナル伝達により、マウスRbpjに対するショウジョウバエのオルソログであるSu(H)が近位領域に結合して、調節される。これら2つの種において共通にRbpjにより発現調節される3遺伝子ファミリーを示す；マウス(ハエ)遺伝子記号。(G) ハエ、マウスおよびヒトのdab/Dab1/DAB1プロモーター領域に存在するNotch転写因子Su(H)/Rbpj/CBF1の高親和性結合モチーフ。高および低親和性配列モチーフを、それぞれ、黒塗り三角形および白抜き三角形で示す。ChIP解析(図2I、右)用のプライマー対を、横に並べた2個の三角形で示す。TSSは転写開始点である。(H) 培養CRC細胞において、組換えDLL4(rDLL4)リガンドはDAB1を誘導する。LS174T細胞を10 μ M DAPTを用いるかまたは用いずに24時間インキュベートし、rDLL4を用いるか用いずに予めコートした培養プレートに播種した。4時間後、DAB1 mRNAレベルを定量(q) RT-PCRにより定量した。(I) DAB1プロモーターへのRBPJの結合。抗Rbpjまたは抗NICD Abを用いるLS174T溶解物のChIPにより、qPCRにより決定されたDAB1遺伝子のゲノムプロモーターフラグメントを濃縮した。(J) Apc/AesマウスCRCにおいてDab1が誘導される。ApcおよびApc/Aes変異マウスの腫瘍において、Dab1は薄灰色に、核は濃灰色に染色される。四角で囲んだ部分を拡大したのが右側の図である。記号の意味は図1Aのものと同一である。T：腫瘍。S：間質。スケールバー：50 μ m。データは平均とSDで表す。* $p < 0.01$ 。図9も参照されたい。

【図3】DAB1はRho活性化によりCRCの浸潤および転移を促進する。(AおよびB) Dab1は、内因性CRCの進展に重要な役割を果たす。Apc/Aes二重変異マウスに腸上皮特異的Dab1 null変異を導入して、Apc/Aes/Dab1三重変異マウスを誘導した。用いた方法および記号の意味は、図1Aおよび図1Bに関して説明したものと同一である。(C、DおよびE) DAB1のノックダウンは、CRC移植物の転移を抑制する。高DAB1のLS174T細胞に、EGFPおよびDAB1に対するshRNAをコードする発現ベクターを導入した(shDAB1)(C)。2つのクローン株を樹立し、ヌードマウスの直腸に注射した。その肺転移を、蛍光解剖顕微鏡で調べ(D)、その数を数えた(E)。(F、GおよびH) インビボでDAB1発現はCRC転移を促進する。低DAB1のRKO細胞にEGFPおよびDAB1の発現ベクターを導入し(F)、ヌードマウスの直腸粘膜に移植した。評価(G)および定量化(H)をそれぞれ(D)および(E)と同様に行った。(I) DAB1は、Notchシグナル伝達による初期相および後期相いずれのRho活性化にも重要な役割を果たす。DAB1ノックダウンまたはコントロールクローンを10 mM EDTAで処理し、記載される時点でRhoプルダウンアッセイに付した。(J) Notch受容体切断およびDAB1による相乗的Rho活性化。DAB1発現RKO細胞を、EDTAを用いるかまたは用いずに2分間処理し、5分後にRhoプルダ

10

20

30

40

50

ウンアッセイに付した。(K) EDTA処理後のRBPJ依存性DAB1誘導。RBPJノックダウン (sh RBPJ; 赤) またはコントロール (Ns; 黒) HCT116細胞をEDTA処理し、所定の時点でDAB1 mRNAのqRT-PCRアッセイに付した。スケールバー: (A)では100 μ m、(D)および(G)では500 μ m。データは平均とSDで表す。*, $p < 0.01$ および#, $p < 0.05$ 。

【図4】DAB1およびABL自己のチロシンリン酸化は、Rho活性化およびCRC細胞浸潤に不可欠である。(AおよびB) イマチニブは内因性CRCの浸潤を抑制する。Apc/Aes複合変異マウスを、50 mg/kg/日のイマチニブを用いる(赤色)かまたは用いず(灰色)に9週間処置した(それぞれ $n = 5$)。用いた方法および記号の意味は、図1Aおよび図1Bに関して説明したものと同じである。(C) ヒトCRC細胞におけるABLノックダウンはMatrigel浸潤を抑制する。RKO細胞に、それぞれABL1 (siABL1)、ABL2 (siABL2)またはそれらの組み合わせに対する2つの独立したsiRNAセット (#1および#2)をトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、ABL1およびABL2の発現をqRT-PCRにより定量した(下図)。同時に、細胞のMatrigel浸潤を調べた(上図)。(D) ABLノックダウンはNotchシグナル伝達によるRho活性化を低下する。2セットの複合ノックダウンによるRhoに対する阻害効果を、EDTA処理から5分後のRKO細胞において調べた。(E) ABL阻害剤イマチニブは、CRC細胞のMatrigel浸潤を用量依存的に抑制する。RKO細胞をイマチニブで処理し、Matrigel浸潤を調べた。

(F) イマチニブは、Notch受容体活性化によるRho活性化を抑制する。RKO細胞をイマチニブ存在下または非存在下にEDTAで処理し、5分後にRhoプルダウンアッセイに付した。(G) CRC細胞においてDAB1はABLのTyrキナーゼ活性を向上する。レーン1~3: HCT116細胞に、等量のFlagタグ野生型DAB1 (レーン2)またはその5YF変異体 (レーン3)を発現させ、免疫沈降(IP)の後、リン酸化Tyr (pY) 含量をウェスタンブロッティング (WB)により測定した。レーン4~7: HCT116細胞にDAB1-FlagおよびHAタグ野生型 (WT) ABL1B (ABL1B-HA)を同時発現させた。レーン6および7におけるDAB1-Flag cDNAのインプット量は、レーン2および3におけるものとそれぞれ同じであった。レーン8~11: HCT116細胞に、レーン4~7と同じDAB1 cDNAセットおよびABL1Bのkinase-dead (KD)変異体を同時発現させた。データは、平均とSDで表す。*, $p < 0.01$ 。図10も参照のこと。

【図5】TRIOはABLおよびDAB1の存在下にTyrリン酸化されて、CRC浸潤を促進する。(A) TRIOドメイン構造の図 (Bateman, J. and Vactor, D. V., 2001, J. Cell Sci. 114:1973-1980からの改変版) およびリン酸化されうるTyr残基。図の上部に、3097 aaを含む野生型ヒトTRIO (TRIO WT) のドメインを示す。四角形は特異ドメインを示す。略号: GEF: グアニンヌクレオチド交換因子ドメイン; Ig: 免疫グロブリン様ドメイン; STK: セリン-スレオニンキナーゼドメイン。TRIO WT構造の下に、Tyr (Y)からPhe (F)への変異の位置を、赤色の「F」で示す。Igドメイン中の星印は、そのValへのミスセンス変異がヒト肺癌において見られるG2699を示す(図7Fおよび図7Gを参照されたい)。(BおよびC) CRC細胞において、TRIOノックダウンはNotchシグナル伝達により誘導されるRho活性化およびMatrigel浸潤を抑制する。HCT116細胞に、TRIO mRNAに対する2つの独立したsiRNA構築物をトランスフェクトした (siTRIO #1または#2)。48時間インキュベート後、細胞を、EDTAを用いるかまたは用いずに処理し、GTP-Rho (B) およびMatrigel浸潤 (C)を調べた。(D) CRC細胞において、TRIOはABLおよびDAB1の存在下にTyrリン酸化される。HCT116細胞に、T7タグTRIO 発現産物(T7-TRIO)を用いるかまたは用いずに形質導入し、同時に、HAタグABL1B (ABL1B-HA) および/またはFlagタグDAB1 (DAB1-Flag)を用いるかまたは用いずに形質導入した。用いる記号は、図4Gのものと同じである。(E) TRIOのC末端領域がABLによりリン酸化される。WTまたはYF変異T7-TRIOを、同時にABL1B-HAおよびDAB1-Flagを伴うかまたは伴わずに発現させ、pYをウェスタンブロット分析した。(F) ABLおよびDAB1の存在下に、TRIOのY1990およびY2681がリン酸化される。Y1990FおよびY2681F変異体(レーン2および4)ならびに4YFs (レーン6)においては、pYレベルは劇的に低かった。データは平均とSDで表す。*, $p < 0.01$ 。

【図6】ヒトCRCにおけるTRIO(Y2681)リン酸化は予後不良に相関する。(A) TRIO(pY2681)はCRC患者の予後不良に相関する。102人の患者の原発CRC標本において、免疫組織化学によりTRIO(pY2681)を調べ、カプラン-マイヤー解析を行った。(左図) TRIO(pY2681)免

10

20

30

40

50

疫染色において、全てのステージを含む患者全体のうち、32例が陰性(-)で、70例が陽性(+)であった。カイ二乗検定による(-)と(+)の比較、 $p = 0.01$ 。(中央図)ステージIおよびIIの患者全体では、TRIO(pY2681)陰性群は100%の5年生存率を示したが、TRIO(pY2681)陽性群は約20%の死亡率を示した。カイ二乗検定による(-) ($n = 23$) と (+) ($n = 40$) の比較、 $p = 0.04$ 。(右図) ステージIIの患者だけを見ても、陰性患者 ($n = 13$) が100%の生存率を示したのに対し、陽性患者 ($n = 33$) の生存率はステージIおよびIIの患者全体の生存率と同程度であった(カイ二乗検定において、 $p = 0.1$)。(B) 近くの正常粘膜(N)またはリンパ濾胞(L)よりもCRC細胞においてTRIO(pY2681)の染色が顕著である(矢じり印)。四角で囲んだ部分を拡大したものを挿入図に示す。(C、DおよびE) CRC細胞中のTRIO(pY2681)染色は、浸潤部の間質中にも認められた。出芽CRC細胞(D)および分散CRC細胞(E)においてTRIO(Y2681)が高度にリン酸化されていることがわかる(矢じり印)。スケールバー: 100 μm 。図11も参照されたい。

10

【図7】TRIO(Y2681)リン酸化はRhoGEF活性を高め、CRC細胞の浸潤を促進する。(A) ヒトCRC細胞における核AESとTRIO(pY2681)との逆相関。抗AES抗体および抗TRIO(pY2681)抗体で免疫染色した連続切片の2つのセットを示す。核AESを発現するCRC腺にはTRIO(pY2681)染色は殆どなく(矢印; 上段図)、TRIO(pY2681)陽性CRC腺にはAES発現がない(矢じり印; 下段図)ことがわかる。挿入図は、四角で囲んだ部分を拡大したものである。(B) マウス腸腫瘍において、Aesの欠損によりTrioがY2681においてリン酸化される。正常粘膜(N) および腸腫瘍(T) の溶解物において、IP-WBによりTrio(pY2681)を調べた。総Trioプロットも示す(Trio)。(C) TRIO(WT)はCRCのMatrigel浸潤を促進するが、TRIO(Y2681F)は促進しない。T7-TRIO(WT)またはT7-TRIO(Y2681F)と同時にABL1B-HA/DAB1-Flagをドキシサイクリン(Dox)誘導により発現するクローンRKO TetON細胞株を作製し、タンパク質発現およびMatrigel浸潤を調べた。(D) 無細胞RhoGEF GTP交換アッセイ。TRIO(WT)タンパク質を発現させ、免疫沈降し、組換えRhoA、およびRhoとの結合時に蛍光を発するmant-GTPと混合した。3アッセイの代表的結果を示す。(E) TRIO(pY2681)はRhoGEF活性のために重要な役割を果たす。T7タグTRIO (WTまたはY2681F) を精製し、そのRhoGEF活性を10分間測定した。TRIO[ima]: イマチニブ処理HEK293T細胞から精製したTRIOタンパク質。(F) TRIO(G2699V)はRhoGEF活性を高める。WTおよびG2699V変異TRIOを精製し、(E)に関して記載したのと同様に、そのRhoGEF活性を調べた。(G) TRIO(G2699V)は、Y2681におけるTyrリン酸化に、より感受性である。WTまたはG2699V T7-TRIOを、ABL1B-HA and DAB1-Flagの同時発現を伴うかまたは伴わずに発現させた。TRIOのpY含量をIP-WBにより調べた。スケールバー: 10 μm 。データは平均とSDで表す。*, $p < 0.01$ および #, $p < 0.05$ 。図12も参照されたい。

20

30

【図8】CRC細胞においてNotchシグナル伝達はRhoを活性化し、浸潤を促進する。(図1の補足) (A) Rac阻害は、CRCのMatrigel浸潤に対しあまり効果がない。アッセイ前およびアッセイ中に、RKO細胞をさまざまな濃度のRac阻害剤NSC27366で処理した。(B) EDTA処理によるNotch受容体の活性化。10 mM EDTAで5分間処理後、Notch1およびNICDを抗Notch1(C末端)抗体で沈降させ、検出した。 γ -セクレターゼ阻害剤DAPTによる処置がこの切断を阻害したことに注目されたい。(C) Colon26マウスCRC細胞のEDTA処理に応答したRhoの活性化。EDTA処理後、記載される時点で、活性Rhoをブルダウンした。総Rhoも調べた。

40

【図9】Rbpj依存性および非依存性いずれのNotchシグナル伝達も、CRC進展に重要な役割を果たす。(図2の補足) ヒト結腸細胞におけるDAB1発現。DAB1 mRNAの量をリアルタイムPCRにより測定した。

【図10】Dab1のチロシンリン酸化およびAblの自己チロシンリン酸化は、Rho活性化およびCRC細胞浸潤に不可欠である。(図4の補足) (A) SRC阻害剤PP2は(10 μM で) Matrigel浸潤に対しわずかに有効であるに過ぎないが、SRC-ABL両阻害剤ダサチニブは(0.01 μM で) HCT116細胞のMatrigel浸潤を高度に抑制する。*, $p < 0.01$ 、#, $p < 0.04$ 。(B) Apc/Aesマウスの腸腫瘍において、Dab1とAblが相互作用する。腫瘍溶解物の免疫沈降物を溶解し、抗Abl抗体および抗Dab1抗体を用いるウェスタンブロッティングにより検出した。

【図11】ヒトCRCにおけるTrio(Y2681)リン酸化は予後不良に相関する(図6の補足) Ty

50

rリン酸化TRIOに対する特異抗体の検証。pY1990またはpY2681を含む合成ペプチドでウサギに免疫することにより抗体を産生させ、アフィニティ精製し、免疫細胞化学に使用した。HEK 293T細胞に、T7タグ野生型 (WT)、Y1990FまたはY2681F TRIOの発現プラスミドと、ABL1BおよびDAB1の発現プラスミドを、同時トランスフェクトした。免疫蛍光法 (データを示していない) またはウェスタン分析により確認されるように、抗TRIO(pY1990)および抗TRIO(pY2681)はそれぞれunphosphorylatable TRIO(Y1990F)およびTRIO(Y2681F)変異体を認識できないことに注意されたい。ウェスタン分析には、TRIO(4YFs)変異体をTyrリン酸化のネガティブコントロールとして用いた (レーン5)。

【図12】TRIO(Y2681)リン酸化はRhoGEF活性を高め、CRC細胞の浸潤を促進する。(図7の補足) (AおよびB) 抗TRIO(pY2681)抗体を用いて免疫染色した直腸腺癌 (A) およびその肺転移 (B)。転移癌細胞が原発腫瘍よりもTRIO(pY2681)シグナルを多く含むことに注意されたい。 (CおよびD) 抗TRIO(pY2681)抗体を用いて免疫染色した結腸腺癌 (C) およびその卵巣転移 (D)。転移癌細胞が原発腫瘍のTRIO(pY2681)を維持することに注意されたい。

(EおよびF) 食道扁平上皮癌 (E) および胃腺癌 (F) のTRIO(pY2681)免疫組織化学。TRIO(pY2681)染色の強い癌細胞 (矢じり印) に注意されたい。四角で囲んだ部分を拡大して挿入図に示す。Mx: 転移。スケールバー: 100 μ m。

【図13】ヒトCRCにおけるTRIO(Y2681)リン酸化は予後不良に相関する。原発CRC標本のTrio(pY2681)に関する、疾患特異的生存のカプラン-マイヤー解析。(A) 全てのステージを含む患者全体において (n = 339)、150例が低Trio(pY2681)、189例が高Trio(pY2681)であった (ログランク検定においてP < 0.001)。(B) ステージIIのサブ集団 (n = 115): 低Trio(pY2681)患者 (n = 45) および高Trio(pY2681)患者 (n = 70) (P = 0.015)。(C) ステージIVのサブ集団 (n = 57): 低Trio(pY2681)患者 (n = 11) および高Trio(pY2681)患者 (n = 46) (P = 0.006)。

【図14】ヒト肺腺癌におけるTRIO(Y2681)リン酸化は予後不良に相関する。原発肺腺癌標本のTrio(pY2681)に関する、疾患特異的生存のカプラン-マイヤー解析。全てのステージを含む患者全体において (n = 214)、143例が低Trio(pY2681)、71例が高Trio(pY2681)であった (ログランク検定においてP = 0.002)。

【図15】ヒト胃癌におけるTRIO(Y2681)リン酸化は予後不良に相関する。原発胃癌標本のTrio(pY2681)に関する、疾患特異的生存のカプラン-マイヤー解析。ステージI~IIIの患者を合わせると (n = 172)、82例が低Trio(pY2681)、90例が高Trio(pY2681)であった (ログランク検定においてP < 0.001)。

【図16】ヒト膵臓癌におけるTRIO(Y2681)リン酸化は予後不良に相関する。原発膵臓癌標本のTrio(pY2681)およびSmad4に関する、疾患特異的生存の予備的カプラン-マイヤー解析。全てのステージの患者を合わせた (n = 20) (ログランク検定においてP = それぞれ0.063および0.064)。ここで、Trio(pY2681)およびSmad4のP値はほぼ同じであったが、統計学的に関連はなく (P = 0.51)、それぞれ独立していることが示唆される。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明において「TRIO」は、ヒトTRIOを含むすべての哺乳動物種の天然TRIOを指す。用語「天然TRIO」は、TRIOの天然に生じるバリエーション、例えば選択的スプライシングバリエーションおよび対立遺伝子バリエーションを包含する。本発明において「TRIOの2681位チロシン残基」は、配列番号1の2681位チロシン残基に対応する、天然TRIO中のチロシン残基を指し、これは該天然TRIOにおいて2681位になくてもよい。本発明において「TRIO(pY2681)」は、配列番号1の2681位チロシン残基に対応するチロシン残基がリン酸化されているTRIOを意味する。

【0015】

本発明において、癌の予後とは、癌を発症しやすい対象または癌と診断された対象の、生存期間、無再発生存期間、無増悪生存期間および転移可能性の予測を包含する。好ましい態様において、癌の予後とは、原発腫瘍の外科的切除後の対象の生存期間である。

【0016】

本発明において、用語「対象」および「患者」は、ヒト、サル、ウサギ、ニワトリおよびマウスを包含するが、それに限定されない。好ましい態様において、対象または患者はヒトである。好ましい態様において、対象または患者は、原発腫瘍の外科的切除を受けたヒト癌患者である。

【0017】

「サンプル」は、対象から得られるさまざまな種類のサンプルを包含し、固形組織サンプルまたはそれから誘導される組織培養物もしくは細胞を包含する。サンプルは、外科的切除、吸引または生検を包含するがそれに限定されない、当分野で知られたさまざまな方法で得ることができ、新鮮物または凍結物でありうる。用語「サンプル」はまた、採取後に何らかの方法で処理されたサンプル、例えば試薬による処理、可溶化、またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドのようなある種の成分の豊富化、あるいは切片化の目的で半固形または固形マトリックスへの包埋が施されたサンプルを包含する。好ましい態様においては、サンプルは、対象の癌組織から、癌腫除去手術時に得られる。癌組織は、内視鏡的に切除されたポリープ、または外科的に切除された原発もしくは転移癌腫に由来しうる。好ましくは、癌組織は、原発癌腫から外科的切除により得る。

10

【0018】

下記実施例に示すように、TRIOの2681位チロシン残基のリン酸化は癌転移に関与し、TRIO(pY2681)は大腸癌だけでなく他の癌においても見られる(図7および図12ならびに表2)。したがって、本発明の方法は、さまざまな癌に適用しうる。癌の例には、直腸癌および結腸癌を含む大腸癌；下記臓器の癌：副腎、血液(リンパ腫)、骨、脳、乳房、大腸、子宮内膜、食道、胆嚢、腎臓、咽頭、肝臓、肺、口腔、卵巣、脾臓、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸(GIST)、軟部組織、胃、精巣、甲状腺、膀胱、子宮頸部；扁平上皮癌、子宮癌、黒色腫、多発性骨髄腫およびB細胞リンパ腫、頭頸部癌、膠芽腫、ならびに関連する転移がある。一態様において、癌は、大腸癌、乳癌、肺癌、脾臓癌および胃癌からなる群から選択される。好ましい態様においては、癌は、大腸癌、乳癌、肺癌および胃癌からなる群から選択される。より好ましい態様においては、癌は、大腸癌および胃癌からなる群から選択される。より一層好ましい態様においては、癌は大腸癌である。

20

【0019】

大腸癌(CRCとも称される)のステージ分類は、癌が腸壁にどれほど深達しているか、癌が近隣の構造に達しているか、また、癌がリンパ節または遠隔臓器に転移しているか、に基づく(表1)。

30

【0020】

【表 1】

大腸癌のステージ分類

ステージ	
0	ステージ0 (in situ大腸癌)。大腸壁粘膜内に異常細胞が見られる。
I	ステージI大腸癌。癌が大腸壁粘膜から筋層に達している。
II	ステージII大腸癌。ステージIIAにおいては、癌は大腸壁筋層から漿膜に達している。ステージIIBにおいては、癌は漿膜中に広がっているが、近くの臓器に転移していない。ステージIICにおいては、癌は漿膜中に広がり、近くの臓器に転移している。
III	ステージIIIA大腸癌。癌は大腸壁粘膜から粘膜下組織および筋層に達してよく、近くのリンパ節1〜3個またはリンパ節の近くの組織に転移している。あるいは、癌は粘膜から粘膜下組織に達しており、近くのリンパ節4〜6個に転移している。 ステージIIIB大腸癌。癌は大腸壁筋層から漿膜に達しているか、または漿膜中に広がっているが近くの臓器に転移しておらず；近くのリンパ節1〜3個またはリンパ節の近くの組織に転移している。あるいは、癌は筋層または漿膜に達し、近くのリンパ節4〜6個に転移している。あるいは、癌は粘膜から粘膜下組織に達しており、筋層に達していてもよく；近くのリンパ節7個またはそれ以上に転移している。 ステージIIIC大腸癌。癌は大腸壁漿膜中に広がっているが、近くの臓器に転移しておらず；近くのリンパ節4〜6個に転移している。あるいは、癌は筋層から漿膜に達しているか、または漿膜中に広がっているが近くの臓器に転移しておらず；近くのリンパ節7個またはそれ以上に転移している。あるいは、癌は漿膜から近くの臓器および近くのリンパ節1個もしくはそれ以上またはリンパ節の近くの組織に転移している。
IV	ステージIV大腸癌。癌は血液およびリンパ節を介して他の身体部分、例えば肺、肝臓、腹壁または卵巣に転移している。

10

20

(<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/Patient/page2>)

30

【0021】

下記実施例に示すように、ステージIおよびIIの2つのサブ集団のCRC患者は、TRIO(pY2681)染色を用いてさらに分類することができる。すなわち、pY2681陰性の患者は100%の治癒を示した（再発が皆無であった）が、pY2681陽性の原発腫瘍を有した患者においては5年後の再発率が約20%であった（図6A、図13B）。したがって、現在のガイドラインに従い補助化学療法に付されないステージIおよびIIの患者について、本発明の方法により、術後に補助化学療法によるさらなる処置に付すことを考慮すべき患者を特定することができる。ステージIIIおよびIVの患者については、本発明の方法は、より高リスクのサブ集団を分類するのに有用である。したがって、本発明の方法は、I〜IVいずれのステージの大腸癌と診断された対象にも適用でき、ステージIまたはII、とりわけステージIIの大腸癌と診断された対象に対して特に有用である。

40

【0022】

TRIOの2681位チロシン残基のリン酸化は、抗TRIO(pY2681)抗体によって検出できる。本発明において「抗TRIO(pY2681)抗体」とは、TRIO(pY2681)に特異的に結合する抗体を意味する。「TRIO(pY2681)に特異的に結合する」抗体とは、TRIO(pY2681)に結合するが、2681位チロシン残基がリン酸化されていないTRIO（本発明において「未リン酸化TRIO(Y2681)」とも称する）には結合しない抗体を言う。

【0023】

リン酸化の検出は、免疫組織化学アッセイ、ELISA（酵素免疫吸着アッセイ）およびウェスタン分析法を含む、当分野で周知の多くの方法で行うことができる。好ましい態様に

50

においては、免疫組織化学アッセイを用いる。

【 0 0 2 4 】

一態様においては、サンプルは、外科的切除により得て、固定し、パラフィン等に包埋した組織サンプルである。組織サンプルの固定は、従来の方法で行いうる("Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3rd edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.; これら文献を引用により本書の一部とする)。例えば、中性に緩衝されたホルマリン、ブアン液またはパラホルムアルデヒドを、サンプルの固定に使用しうる。通例、サンプルを最初に固定し、次いでアルコールの上昇系列により脱水し、組織サンプルを切片化できるようにパラフィンまたは他の切片化媒体で浸潤し包埋する。別法として、凍結組織を切片化し、その切片を固定することもできる。好ましい態様においては、従来の方法で組織サンプルをパラフィンに包埋し加工しうる。組織サンプルを包埋後、ミクロトーム等で切片化することができる。切片の厚さは約3~5 μ mとしうる。切り出した切片は、いくつかの標準的な方法でスライド上に固着しうる。スライド接着剤の例には、シラン、ゼラチン、ポリ-L-リジン等があるが、それに限定されない。例えば、パラフィン包埋切片を、正に荷電したスライドおよび/またはポリ-L-リジンをコートしたスライドに固着しうる。包埋材料としてパラフィンを用いた場合は、通例、組織切片を脱パラフィン処理し、水で再水和する。いくつかの従来の標準的な方法で組織切片を脱パラフィン処理しうる。例えば、キシレンおよびアルコールの段階下降系列を使用しうる。市販の脱パラフィン用非有機剤、例えばHemo-De7 (CMS, Houston, Texas) を使用しすることもできる。

【 0 0 2 5 】

ブロッキングステップの後、組織切片を、標的抗原(すなわちTRIO(pY2681))に特異的に結合する抗体に、該抗体が組織サンプル中の標的抗原に結合するよう、適当な条件下に十分な時間、暴露する。そのための適当な条件は、ルーチンな実験によって決定することができる。さらなる抗体相互作用なしに標的抗原を可視化するように、抗体を、放射性同位体、蛍光標識または酵素標識で標識しうる。あるいは、標的抗原に特異的に結合する抗体を一次抗体として使用し、該一次抗体に結合する標識した二次抗体を併せて使用することができる。

【 0 0 2 6 】

癌組織中のTrio(pY2681)を検出するために、ELISAの変形であるcellular ELISA (CELISA)を用いることができる。CELISAは96ウェルプレートで行うことができ、それによりハイスループット分析が可能である。組織切片を各ウェルの底に付着させ、界面活性剤で透過性とする。その後、サンプルをウェル内でTRIO(pY2681)抗体と共にインキュベートする。未結合抗体を洗い流した後、結合した一次抗体を酵素結合二次抗体と結合させ、未結合の二次抗体を洗い流す。特異的に結合した二次抗体の量を、共役酵素反応の作用によって測定しうる(例えばSchlosser, M. et al., J. Immunol. Methods, 140: 101-109, 1991 参照; これを引用により本書の一部とする)。

【 0 0 2 7 】

対象から得たサンプル中のTRIOの2681位チロシン残基のリン酸化は、該サンプルを適当な対照サンプルと比較することにより検出しうる。対照サンプルの例には、ネガティブコントロールサンプル(例えば、健常対照から得た非癌組織、または予後の良好な癌患者から得た癌組織)またはポジティブコントロールサンプル(例えば予後不良の癌患者から得た癌組織)がある。

【 0 0 2 8 】

本発明において、リン酸化の不存在とは、ネガティブコントロールサンプルと比較してリン酸化レベルが有意でないことを意味する。一方、リン酸化の存在とは、ネガティブコントロールサンプルと比較してリン酸化レベルが有意であることを意味する。本発明にお

10

20

30

40

50

いて、リン酸化の不存在は、癌の予後が良好であることを示す。一態様において、リン酸化の不存在は、原発腫瘍の外科的切除後、長期の生存が見込まれることを示す。他の一態様において、リン酸化の不存在は、原発腫瘍の外科的切除後5年以内の再発が見込まれないことを示す。他の一態様において、リン酸化の不存在は、原発腫瘍の外科的切除後、補助療法が必要でないことを意味する。他の一態様において、リン酸化の存在は、原発腫瘍の外科的切除後、補助療法が必要であることを示す。補助療法は、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、標的療法、生物学的療法を包含し、好ましくは化学療法である。好ましい態様において、補助療法は、転移予防を考慮した、ABLキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブによる化学療法である。

【0029】

10

他の態様において、本発明は、対象において原発腫瘍の外科的切除後の補助療法において使用するためのABLキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブを提供する。好ましくは、対象はヒト大腸癌患者である。

【0030】

本発明において、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および抗体フラグメントを包含する。「抗体」は、齧歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ等）、鳥類（ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ等）、大型哺乳類（ヤギ、ヒツジ、ロバ等）において産生した抗体、ヒト抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体でありうる。

【0031】

20

抗TRIO(pY2681)抗体は、2681位にリン酸化チロシンを有するアミノ酸配列を有するTRIOに由来するペプチドを免疫抗原として用いて作製しうる。ペプチドの長さに特に制限はなく、5~30アミノ酸、好ましくは5~20アミノ酸、より好ましくは8~15アミノ酸でありうる。好ましい態様において、ペプチドは配列番号9のアミノ酸配列を有する。

【0032】

ポリクローナル抗体は、従来の方法、例えば"Antibodies: A Laboratory Manual", Lane, H. D. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989（引用により本書の一部とする）に記載される方法により作製しうる。要するに、動物、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、ヤギ、ヒツジまたはロバを、前記のようなTRIO由来ペプチドで免疫することによって、ポリクローナル抗体を作製しうる。

30

【0033】

モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975)（引用により本書の一部とする）に初めて記載されたハイブリドーマ法によって、または組換えDNA法（米国特許第4,816,567号；これを引用により本書の一部とする）によって作製しうる。モノクローナル抗体は、例えばClarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)（引用により本書の一部とする）またはMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)（引用により本書の一部とする）に記載される手法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから選抜することもできる。

【0034】

40

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウスに由来する抗体の重鎖および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域を有する抗体である。キメラ抗体は、マウス抗体の可変領域をコードするDNAとヒト抗体の定常領域をコードするDNAを連結し、発現ベクターに組み込み、抗体産生のための宿主に導入することによって得られる。

【0035】

ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物に由来する抗体の相補性決定領域（CDR）と、ヒト抗体のフレームワーク領域（FR）および定常領域からなる。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウスの抗体のCDRを、ヒト抗体のCDRに移植することによって得られる。特に、マウス抗体のCDRをヒト抗体FRに連結するよう設計したDNA配列を、PCRにより、CDRおよびFRの両方の末端とオーバーラップする部分を有するよう作製したいくつかのオリゴ

50

ヌクレオチドをプライマーとして用いて合成する。得られたDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、発現ベクターに組み込み、それを宿主に導入し発現させて抗体を得る（欧州特許EP 239400；国際特許出願公開WO 96/02576；これらを引用により本書の一部とする）。

【0036】

ヒト抗体を得る方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞でインビトロで感作し、感作リンパ球をヒト骨髓腫細胞、例えばU266と融合して、該抗原に結合しうる所望のヒト抗体を得る（特公平1-59878；これを引用により本書の一部とする）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を得ることもできる（国際特許出願公開WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 およびWO 96/33735；これらを引用により本書の一部とする）。さらに、ヒト抗体ライブラリーからパニングによりヒト抗体を選抜する技術も知られている。例えば、ファージディスプレイ法によりヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択する。選択されたファージの遺伝子を解析して、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定する。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定したら、該配列を含む適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を発現させることができる。これらの方法は周知であり、国際特許出願公開WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438およびWO 95/15388（これらを引用により本書の一部とする）に記載されている。

【0037】

抗体フラグメントの例には、Fab、F(ab')₂、Fv、1つのFabと全長Fcとを有するFab/c、およびH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させた一本鎖Fv（scFv）がある。抗体フラグメントは、抗体を、酵素、例えばパパインまたはペプシンで処理することによって得ることができる。別法として、そのような抗体フラグメントをコードする遺伝子を構築し、それを発現ベクターに導入し、適当な宿主細胞において抗体フラグメントを発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照；これらを引用により本書の一部とする）。

【0038】

本発明において、「抗体」は、さまざまな分子、例えば放射性同位体、蛍光標識および酵素標識のいずれかで修飾された抗体を包含する。放射性同位体の例には、³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³Hおよび¹³¹Iがある。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、ペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β - ガラクトシダーゼ等がある。蛍光標識の例には、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、Lissamine、ウンベリフェロン、フィコエリスリン、フィコシアニン、または市販のフルオロフォア、例えばSPECTRUM ORANGE7およびSPECTRUM GREEN7、および/または前記の1つまたはそれ以上の誘導体、または蛍光色素、例えばAlexaFluor、Cy3、Cy5がある。従来の方法を用いて、抗体を放射性同位体、蛍光標識または酵素標識で標識しうる（Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991); Methods in Enzym., 73:147-166 (1981)；これらを引用により本書の一部とする）。

【0039】

一態様において、本発明は、本発明の抗体を含んでなる、癌の予後を診断するための診断用組成物を提供する。本発明の診断用組成物は、本発明の方法に従って使用される。本発明の診断用組成物は、本書に記載される本発明の方法に従って使用するための指示と共に提供しうる。

【 0 0 4 0 】

一態様において、本発明は、本発明の抗体を含んでなる、癌の予後を診断するためのキットを提供する。本発明のキットは、本発明の方法に従って使用される。本発明のキットは、免疫組織化学アッセイ、ウェスタン分析またはELISAに使用されるものでありうる。本発明のキットは、他の任意の成分、例えば1つまたはそれ以上の緩衝液（例えばブロッキング緩衝液、洗浄緩衝液、基質緩衝液等）、他の試薬、例えば酵素標識により化学的变化を受ける基質（例えばクロモゲン）、および対照サンプル（ポジティブおよび/またはネガティブコントロール）、また、本書に記載される本発明の方法に従って使用するための指示を含みうる。

【 0 0 4 1 】

10

一態様において、本発明は、大腸癌を処置するためのABL阻害剤を含有する医薬組成物を提供する。

【 0 0 4 2 】

一態様において、本発明は、癌の転移を予防するためのABL阻害剤を含有する医薬組成物を提供する。転移は微小転移を包含する。癌の例には、直腸癌および結腸癌を含む大腸癌；下記臓器の癌：副腎、血液（リンパ腫）、骨、脳、乳房、大腸、子宮内膜、食道、胆嚢、腎臓、咽頭、肝臓、肺、口腔、卵巣、脾臓、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸（GIST）、軟部組織、胃、精巣、甲状腺、膀胱、子宮頸部；扁平上皮癌、子宮癌、黒色腫、多発性骨髄腫およびB細胞リンパ腫、頭頸部癌、膠芽腫、ならびに関連する転移がある。一態様においては、癌は、大腸癌、乳癌、肺癌、脾臓癌および胃癌からなる群から選択される。好ましい態様においては、癌は、大腸癌、乳癌、肺癌および胃癌からなる群から選択される。より好ましい態様においては、癌は、大腸癌および胃癌からなる群から選択される。より一層好ましい態様においては、癌は大腸癌である。

20

【 0 0 4 3 】

ABL阻害剤の例には、イマチニブ（4-(4-メチルピペラジン-1-イルメチル)-N-[4-メチル-3-(4-(ピリジン-3-イル)-ピリミジン-2-イルアミノ)フェニル]ベンズアミド）、ニロチニブ（4-メチル-N-[3-(4-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-5-(トリフルオロメチル)フェニル]-3-[(4-ピリジン-3-イルピリミジン-2-イル)アミノ]ベンズアミド）、ポナチニブ（3-(2-イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-3-イルエチニル)-4-メチル-N-[4-[(4-メチルピペラジン-1-イル)メチル]-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド）、ダサチニブ（N-(2-クロロ-6-メチルフェニル)-2-[[6-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-2-メチル-4-ピリミジニル]アミノ]-5-チアゾールカルボキサミド水和物）、ボスチニブ（4-[(2,4-ジクロロ-5-メトキシフェニル)アミノ]-6-メトキシ-7-[3-(4-ベチルピペラジン-1-イル)プロポキシ]キノリン-3-カルボニトリル）、およびバフェチニブ（INN0-406）（N-[3-([5,5'-ピピリミジン]-2-イルアミノ)-4-メチルフェニル]-4-[[3S]-3-(ジメチルアミノ)-1-ピロリジニル]メチル]-3-(トリフルオロメチル)ベンズアミド）、またはそれらの薬学的に許容しうる塩がある。好ましい態様においては、ABL阻害剤はイマチニブまたは薬学的に許容しうるその塩である。

30

【 0 0 4 4 】

イマチニブの薬学的に許容しうる塩には、薬学的に許容しうる酸付加塩、例えば、塩酸、硫酸またはリン酸のような無機酸との塩、または適当な有機カルボン酸またはスルホン酸との塩がある。そのような有機カルボン酸またはスルホン酸の例には、脂肪族モノまたはジカルボン酸、例えばトリフルオロ酢酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、ヒドロキシマレイン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸またはシュウ酸、またはアミノ酸、例えばアルギニンまたはリジン、芳香族カルボン酸、例えば安息香酸、2-フェニキシ安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、サリチル酸または4-アミノサリチル酸、芳香族-脂肪族カルボン酸、例えばマンデル酸または桂皮酸、複素芳香族カルボン酸、例えばニコチン酸またはイソニコチン酸、脂肪族スルホン酸、例えばメタン-、エタン-または2-ヒドロキシエタン-スルホン酸、または芳香族スルホン酸、例えばベンゼン-、p-トルエン-またはナフタレン-2-スルホン酸がある。好ましい態様においては、W09

40

50

9/03854 (引用により本書の一部とする)に記載されるイマチニブのモノメタンスルホン酸付加塩、すなわちイマチニブメシレートを使用する。

【 0 0 4 5 】

ABL阻害剤は、対象の種、年齢、個々の状態、投与方法、および問題になっている臨床像に応じた日用量で対象に投与する。例えば、ABL阻害剤を成人に約100～1000mg、好ましくは約200～600mg、より好ましくは約400～600mg、特に約400mgの日用量で投与しうる。

【 0 0 4 6 】

好ましい態様において、本発明の医薬組成物は、補助療法において使用される。好ましくは、補助療法は、患者の原発腫瘍の外科的切除後の治療である。

【 0 0 4 7 】

本発明は、大腸癌を処置する方法であって、それを必要とする患者にABL阻害剤を投与することを含んでなる方法、また、癌の転移を予防する方法であって、それを必要とする患者にABL阻害剤を投与することを含んでなる方法を提供する。本発明はまた、大腸癌を処置する医薬の製造のためのABL阻害剤の使用、および癌転移を予防する医薬の製造のためのABL阻害剤の使用を提供する。本発明の方法および使用は、本発明の医薬組成物に関して説明したように実施しうる。

【 0 0 4 8 】

本開示は、例えば以下のものに関する。

[1]

対象において癌の予後を診断する方法であって、対象から採取したサンプル中のTRIOの2681位チロシン残基のリン酸化を検出するステップを含んで成り、リン酸化の不存在は癌の予後が良好であることを示す、方法。

[2]

サンプルは、原発癌腫から外科的切除により得た癌性組織である、前記 1 に記載の方法。

[3]

リン酸化の不存在は、原発癌腫の外科的切除後、長期の生存が見込まれることを示す、前記 2 に記載の方法。

[4]

リン酸化の存在は、原発癌腫の外科的切除後、補助療法が必要であることを示す、前記 2 に記載の方法。

[5]

リン酸化を、TRIO(pY2681)に特異的に結合する抗体によって検出する、前記 1～4のいずれかに記載の方法。

[6]

リン酸化を、免疫組織化学アッセイ、ウェスタン分析またはELISAにより検出する、前記 1～5のいずれかに記載の方法。

[7]

癌は、大腸癌、乳癌、肺癌、膵臓癌および胃癌からなる群から選択される、前記 1～6のいずれかに記載の方法。

[8]

癌は、大腸癌および胃癌からなる群から選択される、前記 7 に記載の方法。

[9]

癌は大腸癌である、前記 8 に記載の方法。

[1 0]

癌はステージIまたはIIの大腸癌である、前記 9 に記載の方法。

[1 1]

癌はステージIIの大腸癌である、前記 1 0 に記載の方法。

[1 2]

TRIO(pY2681)に特異的に結合する抗体。

10

20

30

40

50

[1 3]前記 1 2 に記載の抗体を含む、癌の予後を診断するための診断用組成物。[1 4]前記 1 2 に記載の抗体を含む、癌の予後を診断するためのキット。[1 5]大腸癌を処置するためのABL阻害剤を含む医薬組成物。[1 6]癌の転移を防止するためのABL阻害剤を含む医薬組成物。[1 7]転移は微小転移である、前記 1 6 に記載の医薬組成物。

10

[1 8]癌は大腸癌である、前記 1 6 または 1 7 に記載の医薬組成物。[1 9]ABL阻害剤がイマチニブまたはその薬学的に許容し得る塩である、前記 1 5 ~ 1 8 のいずれかに記載の医薬組成物。[2 0]ABL阻害剤がイマチニブメシレートである、前記 1 5 ~ 1 9 のいずれかに記載の医薬組成物。[2 1]補助療法において用いられる、前記 1 5 ~ 2 0 のいずれかに記載の医薬組成物。

20

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】**【 0 0 4 9 】**

実験方法

変異マウス、CRC細胞および直腸内移植

Apc^{+/Δ716}変異マウスを既報のように作製し、維持した{Oshima, 1995}。Apc^{+/Δ716}マウスにおいて、既報のように、腸上皮特異的villinプロモーターにより発現が高められる Cre^{ERT2} によってAesをノックアウトすることにより、Apc^{+/Δ716}Aes^{Floxed/Floxed}vCre^{ERT2} (Apc/Aesと略される) マウスを作製した{Sonoshita, 2011}。Rbpj floxed allele を既報のように構築し{Han, 2002}、RIKEN BRCから入手し、Apc/Aesマウスに組み合わせて pc^{+/Δ716}Aes^{Floxed/Floxed}Rbpj^{Floxed/Floxed}vCre^{ERT2} (Apc/Aes/Rbpj) マウスを得た。Dab1 floxed allele を構築し (Imai et al., 近刊)、Apc/Aesマウスに組み合わせて pc^{+/Δ716}Aes^{Floxed/Floxed}Dab1^{Floxed/Floxed}vCre^{ERT2} (Apc/Aes/Dab1) マウスを得た。複合変異マウスの腫瘍組織病理を12週齢時点で解析した。ABL阻害のために、Apc/Aesマウスにイマチニブ (LC Laboratories) を、3週齢の時点から9週間にわたり、移植マウスにおいてBCR-ABL-形質転換細胞系の腫瘍形成活性を抑制する50 mg/kg/日 (i.p.) の用量で投与した{Buchdunger, 2001}。各変異遺伝子型について、5匹のマウスの、直径が2 mmを超える腫瘍全部で約100個を調べた。CRC細胞系をATCCから入手した。CRC細胞は、直腸平滑筋に移植後1週間以内に目に見える原発腫瘍を形成した。6週間後、マウスを安楽死させ、転移巣を蛍光顕微鏡 (Leica) で調べた。動物実験はすべて、京都大学動物実験委員会により承認されたプロトコルに従って行った。

30

40

【 0 0 5 0 】

活性Rhoプルダウンアッセイ

Rho活性化アッセイキット (Thermo) をその製造者のプロトコルに従って使用して、GTP-Rhoをプルダウンし、検出した。要するに、組織またはCRC細胞を溶解緩衝液で溶解し、溶解物中のGTP-RhoをRhotekinを用いてプルダウンし、ウェスタン分析により抗Rho抗体で検出した。

【 0 0 5 1 】

50

rDLL4実験

組換えDLL4 (rDLL4) (R&D) をPBSで再懸濁した。スクラッチおよびGTP-Rhoプルダウンアッセイのために、 $1\mu\text{g}$ を6ウェル培養プレートに入れ、その表面を $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のrDLL4でコートした。q-RT-PCRアッセイのためには、プレート表面を $0.1\sim 1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のrDLL4でコートした。4度で一晩インキュベート後、プレートをPBSで1回洗浄し、CRC細胞を播種した。HES1およびDAB1の発現解析のために、4時間後に細胞を溶解し、mRNAを抽出した。

【0052】

スクラッチアッセイ

FlagタグAesの発現がドキシサイクリンにより誘導されるように、Colon26 TetON-Aes-Flag細胞を既報のように作製した(Sonoshita et al., 2011)。rDLL4コートした培養プレートに細胞を播種し、サブコンフルエントまで培養し、スクラッチに先立ちドキシサイクリンで16時間にわたり処理した。スクラッチ形成の4時間後、細胞を活性Rhoのプルダウンアッセイに付した。

10

【0053】

Matrigel浸潤およびTEMアッセイ

培養した癌細胞を、Matrigel浸潤およびTEMアッセイに先立ち、C3T (Cytoskeleton)、Y-27632 (Wako)、NSC27366、PP2 (Calbiochem)、イマチニブまたはダサチニブ (LC Laboratories)で16時間処理した。Matrigel (BD) を用いて、既報のようにMatrigel浸潤アッセイを16時間行った{Sonoshita, 2011}。TEMアッセイのためには、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をTranswell (Corning)のupper chamberに播種した。1日(24時間)後、EGFP標識CRC細胞をHUVEC層上に播種した。24時間後、膜の下側に移動したCRC細胞を蛍光顕微鏡下にカウントした。

20

【0054】

EDTAによるNotch受容体活性化

培養したCRC細胞をPBSで洗浄し、PBS中の10 mM EDTAで2分間処理し、再び培地中でインキュベートした。この処理は、Notchのectodomain sheddingの促進によりNotch受容体を活性化することがわかっている (Rand et al., 2000; Tiyanont et al., 2011)。所定の時間インキュベート後、細胞を溶解し、切断NotchおよびGTP-Rhoを検出した。DAPT (Calbiochem) を培養CRC細胞に適用することにより γ -セクレターゼ活性を阻害した。

【0055】

30

ノックダウン実験

HiperFectトランスフェクション試薬 (QIAGEN)を用いて、CRC細胞にsiRNAオリゴ (QIAGEN) をトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞をMatrigel浸潤、GTP-Rhoプルダウン、または遺伝子発現アッセイに付した。移植実験のためには、DAB1のノックダウン配列 (shDAB1#1: AAGGATTAAGTAGGATGTCAA (配列番号2)、shDAB1#2: CCGGTACAAAGCCAAATTGAT (配列番号3)) をpLBベクター (Addgene)にそれぞれ挿入した。次いで、レンチウイルス粒子を調製し、LS174T細胞に導入して、構成的DAB1ノックダウンEGFP+細胞を誘導した。適当なRBPJノックダウンクローンを既報のように誘導した (Sonoshita et al., 2011)。

【0056】

40

接着アッセイ

確立されたプロトコルに従って接着アッセイを行った{Reymond, 2012}。要するに、ヒト肺内皮細胞を、コラーゲンコートしたプレートに播種した。細胞がコンフルエントに達して単層を形成したら、EGFP標識CRC細胞をその上に播種した。15分後、浮遊細胞をPBSで洗浄し、内皮細胞層に付着するCRC細胞の数を蛍光顕微鏡下にカウントした。

【0057】

0054

Dab/Dab1/DAB1プロモーター解析

ハエdab、マウスDab1およびヒトDAB1プロモーターを、UCSC Genome Browser Database (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)から選択した。高および低親和性Su(H)/Rb

50

pj結合部位のプロット分析を、既報のようにテキストベースの検索により行った (Nelles et al., 1999)。

【 0 0 5 8 】

定量PCR (q-PCR)

HES1、DAB1、ABL1およびABL2 mRNAの定量用のTaqMan プライマー/プローブをABIから購入した。CRC細胞および抗Rbpj (Institute of Immunology) および抗NICD (Cell Signaling Technology) 抗体を用いて、既報のプロトコルに従ってChIP解析を行った (Kakizaki et al., 2010)。ゲノムDNAの沈殿フラグメントについて、HES1遺伝子のプロモーター領域の濃縮を、Rbpjの高親和結合配列を挟むhHES1ChIP.F (CGTGTCTCCTCCTCCATT) (配列番号4) およびhHES1ChIP.R (GAACGCTCGTGTGAACTT) (配列番号5) プライマーを用い、SYBRグリーン (ABI) で調べた。同様に、hDAB1ChIP.F2 (CAAGCTCTGTGCTTGCTCA) (配列番号6) およびhDAB1ChIP.R2 (GTAGCTGTGTGGTCTTATCA) (配列番号7) プライマーを用いて、DAB1プロモーターフラグメントの濃縮を定量した。

【 0 0 5 9 】

免疫組織化学

凍結およびパラフィン包埋したマウス組織を、標準的な方法で調製した。ヒトCRC組織 (n = 102、ステージ0~4) を、京都大学倫理委員会により承認されたプロトコルに従い、2005~2007年の間にインフォームドコンセントの下に手術を受けた京都大学医学部附属病院の患者から、切除により得た。転移CRCおよび他のタイプの癌の解析のために、Human Tissue Arrayスライド (SuperBioChips) も本試験に含めた。切片をH & Eで染色するか、またはDAB1 (SIGMA)、Aes (Sonoshita et al., 2011)、TRIO(pY1990) またはTRIO(pY2681) に特異的な一次抗体(後述のように調製)、次いでAlexa Fluor (Molecular Probes) 結合またはビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories) と共にインキュベートした。

【 0 0 6 0 】

過剰発現実験

野生型DAB1 cDNA (提供者: Kamon Sanada, The University of Tokyo, Japan) をpMX-1 RES-EGFP (提供者: Toshio Kitamura, The University of Tokyo, Japan) に挿入した。レトロウイルス粒子を調製し、RK0細胞に導入し、EGFP+細胞がDAB1を安定に発現することを確認した。

【 0 0 6 1 】

免疫沈降-ウェスタン分析

ヒト大腸のcDNAプールからABL1B cDNAを調製し、ヘマグルチニン (HA) 配列でタグ付けしてABL1B-HAを構築した。QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) により野生型cDNAに変異を誘発して、kinase-dead ABL1B(K290R)-HA 変異体を誘導した。それらABL1Bコンストラクトを、pEFBosneo 発現ベクター (提供者: Shigekazu Nagata, Kyoto University, Japan) に挿入した。DAB1-Flag cDNAをpcDNA3 (Invitrogen) に挿入した。TRIO cDNA (提供者: Anne Debant, CRBM-CNRS, France) をT7配列でタグ付けし、CAGプロモーターおよびウサギβ-グロビンpoly(A)を持つpCX発現ベクター (提供者: Masaru Okabe, Osaka University, Japan) に挿入した。Tasuku Honjo, Kyoto University, Japan からNICD-Myc発現ベクターの提供を受けた。それら発現ベクターを、Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いてCRCまたはHEK293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから16時間後、細胞を溶解緩衝液 (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl および 1% NP-40) 中で溶解した。上清を、抗HA、Flag、T7またはMyc抗体 (MBL) を結合したアガロースと混合した。そのビーズを溶解緩衝液で洗浄し、次いでSDSサンプル緩衝液中で煮沸した。溶解したタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ナイロン膜に転写し、HA、Flag、Myc、リン酸化チロシン(pY; Cell Signaling Technology)、TRIO(pY2681) またはT7 (Novagen) に対する抗体でプローブした。内在性Notch1を抗Notch1 (Santa Cruz) で免疫沈降し、ウェスタン分析において同じ抗体でプローブした。内在性Dab1またはTrioを、マウス腸溶解物由来の抗Dab1または抗Trio抗体 (Santa Cruz) でそれぞれ免疫沈降した。

【 0 0 6 2 】

TRIO変異誘発

TRIO中のTyrリン酸化が起こり得る位置を、NetPhos2.0オンラインソフトウェアを用いて予測した(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (Blom et al., 1999)。候補の中から、発明者らは18Tyrを、QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)を用いて高い確率でPheに変異させて、YF unphosphorylatable変異体を構築した。同じキットを用いて、ヒト癌のTRIOの各点変異を、野生型TRIOに起こさせた。構築物の完全性を、DNAシーケンシングおよびウェスタン分析により確認した。

【 0 0 6 3 】

抗TRIO(pY1990)および抗TRIO(pY2681)抗体の作製

Scrum (Japan)において、ペプチド1985-1994 VRDLG(pY)VVEG (配列番号8)および2676-2686 NPNYI (pY)DVPPE (配列番号9)を合成し、ウサギに注射した。各抗体を、ELISAにより力価を確認した後、固定化抗原および対応する未リン酸化ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

【 0 0 6 4 】

免疫細胞化学

T7-TRIO、ABL1BHAおよびDAB1-Flagの発現プラスミドをHCT116細胞にトランスフェクトし、チャンバースライド(Thermo)に播種した。16時間インキュベート後、細胞をPBS中の3.7%ホルムアルデヒドで5分間処理して固定し、0.1% TritonX-100を含有するPBSで5分間処理して透過性とした後、5%正常口バ血清で30分間処理してブロックした。次いで、標本を、T7およびTyrリン酸化TRIOに特異的な一次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄後、Alexa Fluor結合二次抗体と共にインキュベートした。標本をPBSで洗った後、DAPI含有VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Labs)を用いてスライドガラスにマウントした。

【 0 0 6 5 】

RKO TetON細胞の作製

RKO細胞にpCMV-Tet3G (Clontech)をトランスフェクトし、G418 (Nacalai)耐性クローンを樹立した。「親」TetONクローンを、ドキシサイクリン(Clontech)に应答してルシフェラーゼを誘導するその能力により選抜した。そのような親株に、ABL1B-HAおよびDAB1-FlagのcDNAをコードするpTRE3Gベクター (Clontech)をトランスフェクトして、二重誘導性の「RKO TetON ABL1B-HA/DAB1-Flag」細胞を樹立した。次いでそれにpTRE3G結合T7-TRIO cDNAをトランスフェクトして、三重誘導性の「RKO TetON T7-TRIO/ABL1B-HA/DAB1-Flag」細胞を樹立した。

【 0 0 6 6 】

インビトロRhoGEF交換アッセイ

本発明者らは最初にHEK293T細胞にT7-TRIO (WT、Y2681FまたはG2699Vのいずれか)の発現プラスミドをトランスフェクトし、細胞溶解物の各TRIOタンパク質を、抗T7抗体 (MBL)を結合したアガロースを用いてプルダウンした。次いで、該TRIOフラクションを、Rho低分子GTPasesと結合するとより強い蛍光を発するmant-GTP(Cytoskeleton)の存在下に組換えRhoAと混合した (Rossman et al., 2002)。

【 0 0 6 7 】

データ解析

データを、SPSS (IBM) を用いてスチューデントのt検定またはカイ二乗検定により解析し、平均±SDとして表した。P値< 0.05を有意と見なした。

【 0 0 6 8 】

結果

Rbpjは腸腫瘍の浸潤に重要な役割を果たす

本発明者らが最近示したように、ApcおよびAes遺伝子の複合変異マウス (略してApc/Aesマウスと称される) の腸において浸潤および侵入腫瘍が発現する (図1A左) {Sonoshita, 2011}。 AesはCRCにおいてNotch依存性の転写を抑制するが、Aesの不在により抑制解除されたNotchシグナル伝達がどのように腸腫瘍の進展を促進するのかは解明されていない。

標的遺伝子発現において、Notchシグナル伝達の転写因子としてRbpj（ヒトにおいてCBF1としても知られる）が中心的役割を果たす{Artavanis-Tsakonas, 1999}。内因性CRCの進展におけるRbpjの役割を調べるために、本発明者らはApc/Aes二重変異マウスに腸上皮特異的にRbpj null変異を導入して{Han, 2002}、Apc/Aes/Rbpj三重変異マウスを作製した。興味深いことに、Rbpjのノックアウトは、腫瘍浸潤および侵入を、その大きさまたは数に影響することなく、劇的に低下した（図1Aおよび図1Bならびに示していないデータ）。これは、Notch標的遺伝子の転写によるCRC進展にRbpjが重要な役割を果たすことを示唆する。

【0069】

Notchシグナル伝達はRho活性化によりCRC細胞の浸潤および経内皮遊走(TEM)を促進する次に本発明者らは、CRC浸潤および侵入を促進するNotchシグナル伝達の下流エフェクターを調べた。Rhoファミリー低分子GTPasesは、よく特徴付けられた、癌転移に必須と考えられる細胞運動性のレギュレーターである{Hall, 1998; Hall, 2009; Weinberg, 2007}。したがって本発明者らはまず、良性（Apc）および侵襲性（Apc/Aes）大腸癌におけるRho、RacおよびCdc42の活性化状態をプルダウンアッセイによって調べた。本発明者らは、Apc/Aes複合変異マウスの腸腫瘍の溶解物において、GTP結合（すなわち活性形態の）Rhoのレベルが顕著に高く（図1C）、RacまたはCdc42のレベルは影響を受けないかまたは検出限界未満であること（データを示していない）を見出した。

【0070】

Notchリガンドタンパク質の組換え細胞外ドメインは、固体表面に固定されると、Notchシグナル伝達を活性化しうることが知られている{Varnum-Finney, 2000}（添付の図2Hおよび図2Iも参照のこと）。本発明者らも、スクラッチアッセイにおいて、固定されたDLL4の組換え細胞外部分（rDLL4）が、CRC細胞の遊走を促進することを報告している。スクラッチアッセイにおいて、Colon26 TetON-Aes-Flag細胞において、ドキシサイクリン誘導Aesは、Notchシグナル伝達を阻害し、遊走を抑制する{Sonoshita, 2011}。本発明者らは、スクラッチ後の該細胞株の遊走中に、Rhoが約1.7倍活性化され、これはAesの誘導により顕著に抑制されることを見出した（図1D）。これらの結果は、Notchシグナル伝達がRhoを活性化し、CRC進展を促進することを示唆する。

【0071】

本発明者らは、マウスにおいて産生される細胞外マトリックス混合物であるMatrigelに、CRC細胞がNotchシグナル伝達依存的に浸潤することを報告した{Sonoshita, 2011}。興味深いことに、Rho阻害剤C3TまたはRock阻害剤Y-27632は、RKOヒトCRC細胞のMatrigel浸潤およびTEMの両方を用量依存的に抑制し（図1Eおよび図1F）、別のヒトCRC細胞系であるHCT116のMatrigel浸潤およびTEMも両方抑制した（データを示していない）。一方、Racの、特異的阻害剤NSC23766による阻害は、培養CRC細胞の浸潤に影響を及ぼさなかった（図8A）。これらの結果は、Notchシグナル伝達によるRhoの活性化が、CRC浸潤に重要な役割を果たすことを示唆する。

【0072】

Rho活性化の経過を調べるために、本発明者らは、RKO細胞を10mM EDTAで2分間処理して、Notch受容体の構造変化を誘導し、 γ -セクレターゼによるS3部位の切断を起こさせた{Rand, 2000; Tiyanont, 2011}。本発明者らは、予想通り、EDTA処理後に切断受容体NICDを検出したが、これは γ -セクレターゼ阻害剤(GSI)DAPTによりブロックされた（図8B）。Rbpj誘導標的遺伝子発現の経過と一致して、EDTA処理の6～12時間後に強力なRho活性化が見られた（図1G）。興味深いことに、EDTA処理のわずか5分後に、一過性の弱いRho活性化も見られた（図1G）。この初期の活性化は、5～10分後にピークに達し、4時間で次第に弱まった（図1Gおよび図1H）。Colon26およびCMT93マウスCRC細胞ならびにDLD1、SW480およびLS174TヒトCRC細胞でも同様の結果が得られた（図8Cおよび示していないデータ）。これらの結果と一致して、プレート表面に固定されたrDLL4リガンドも、培養CRC細胞においてRhoを活性化した（図1I）。さらに、Rho活性化は、Notch受容体発現がノックダウンされるか（図1J）、またはNotch受容体活性化がDAPTにより阻害されると（図1K）、阻害された。

【 0 0 7 3 】

これらのデータは全体として、リガンド依存的Notch受容体活性化によるRho活性化の2つの異なる相、すなわち、それぞれ、標的遺伝子のRbpj 仲介転写に非依存性および依存性の、初期相（数分以内）および後期相（6時間後よりも遅い）の応答を示す（下記参照）。

【 0 0 7 4 】

初期相応答：CRC細胞におけるRho活性化は、ECへのその付着に重要な役割を果たす

癌細胞が脈管内侵入（intravasation）および脈管外への浸出（extravasation）を開始するためには、癌細胞が血管内壁に付着し、血管内壁を通過して遊走する必要がある{Miles, 2008; Weinberg, 2007}。本発明者らは、ECは、接触するCRC細胞において、Notchシグナル伝達を促進することを報告した{Sonoshita, 2011}。したがって本発明者らは、CRC細胞がECに接触してから短時間で、CRC細胞においてNotchシグナル伝達によりRhoが活性化され、その付着が強化されると仮定した。予想通り、C3T（Rho阻害剤）またはDAPT（GSI）は、播種から15分後の時点で洗浄した後の、EC層への付着を維持するCRCの数を低減した（図2A）。重要なことに、CRC細胞におけるRBPJノックダウン（図2B）は、初期相Rho活性化またはECへの付着に影響しなかった（図2Cおよび図2D）。これに一致して、DAPTは、RBPJがノックダウンされた場合も、CRC細胞のEC細胞付着を抑制した（図2D）。これらの結果は、初期相において、Rbpj非依存的に、Notch受容体切断がRhoを活性化し、CRC細胞のEC付着を促進することを示唆する。

【 0 0 7 5 】

後期相応答：Rbpj 転写はDisabled1（DAB1/Dab1）発現を誘導し、Rhoを活性化する

本発明者らは、後期相応答は初期相応答とは異なり、RBPJノックダウンにより顕著に抑制されることを見出した（図2E）。したがって本発明者らは、Rbpj 標的遺伝子の発現は、Rhoの後期相活性化に不可欠であり、この活性化が、CRC細胞がECに最初に付着した後の脈管内侵入および脈管外浸出を促進すると推測した。

【 0 0 7 6 】

最近、NICDトランスジェニックマウスにおいて、Rbpj 標的として98の遺伝子が報告された{Li, 2012}。興味深いことに、それらのうち3つの遺伝子は、ショウジョウバエにおいてもNotchシグナル伝達によって調節された{Krejci, 2009}。これらは、Disabled1（Dab1）（ショウジョウバエでは抑制される）、Notch1（Notch）、およびHes1/5（E(sp1)）遺伝子である（図2F）。

【 0 0 7 7 】

脳の発達においてDab1は神経細胞の移動能を高めるので{Sanada, 2004, Hashimoto-Torii, 2008}、本研究において本発明者らはDAB1に注目した。本発明者らは、ショウジョウバエにおけるのと同様に、ヒトDAB1およびマウスDab1遺伝子のいずれも、近位プロモーター領域に、高親和性Rbpj 結合配列モチーフを有することを見出した（図2G）。これは、Rbpj による転写が進化の過程で保存されたことを示唆する{Dowell, 2010}。一方、本発明者らは、Hes1誘導が広範なCRC細胞死を引き起こすことを見出した（データを示していない）。

【 0 0 7 8 】

DAB1発現に対するNotch受容体活性化の効果を調べるために、本発明者らは、ヒトCRC細胞系の中で実質的なDAB1 mRNAレベルを有するLS174TヒトCRC細胞（図9）に、固定化rDLL4を作用させた。本発明者らは、rDLL4は用量依存的にDAB1 mRNA発現を増加するが、DAPTはそれを阻害することを見出した（図2H）。さらに、Rbpj は優先的にDAB1遺伝子プロモーターに結合した（図2Gおよび図2I）。NICDもプロモーターDNAフラグメントに多く結合したので、Notch転写促進の組み合わせがDAB1発現を誘導することが示唆される。DAB1を比較的豊富に発現する別のCRC細胞系Colo205においても同様の結果が得られた（図S2および示していないデータ）。

【 0 0 7 9 】

本発明者らは、Notchシグナル伝達が活性化されたApc/AesマウスのCRCにおいてDab1が

顕著に誘導されるが{Sonoshita, 2011}、Apcマウスの腺腫においてはそうではないことをも見出した (図2J)。これらの結果は全体として、DAB1がCRC細胞におけるNotch転写標的の1つであることを示す。

【 0 0 8 0 】

DAB1はRho活性化によってCRCの浸潤および転移を促進しうる

CRC進展におけるDAB1の役割を調べるために、本発明者らは、Apc/AesマウスにDab1のhomozygous null変異をさらに導入して、Apc/Aes/Dab1三重変異マウスを作製した。注目すべきことに本発明者らは、Dab1変異が腸腫瘍の浸潤および脈管内侵入を抑制することを見出した (図3Aおよび図3B)。

【 0 0 8 1 】

CRCにおけるDAB1の転移促進作用を確認するために、本発明者らはまた、DAB1発現が構成的にノックダウンされたクローンLS174T誘導体を作製した (図3C)。それをヌードマウス直腸に移植した後、そのDAB1ノックダウン細胞の肺転移巣数が、コントロール細胞と比べ、顕著に少ないことを見出した (図3Dおよび図3E)。一方、低発現CRC細胞株の1つであるRKO (図9)におけるDAB1発現は、直腸からの肺転移を増加した (図3F、図3Gおよび図3H)。

【 0 0 8 2 】

重要なことに、DAB1ノックダウンCRC細胞において、初期相および後期相いずれのRho活性化応答も抑制された (図3I)。一方、Rhoを構成的に活性化するのに、DAB1発現のみで充分であった。また、初期相Rho活性化はDAB1発現により増強された (図3J)。本発明者らはまた、EDTAによるNotch活性化の約4時間後に、コントロールの非サイレンシングCRC細胞においてDAB1 mRNAが誘導されるが、RBPJノックダウンCRC細胞においてはそうではないことを見出した (図3K)。これらの結果は全体として、Notch切断後の初期相において、内在性DAB1がRhoを活性化し、その後、Rbpj誘導DAB1が後期相の持続的Rho活性化に寄与することを強く示唆する。このような解釈は、RBPJノックダウンが後期相Rho活性化のみを抑制し、初期相Rho活性化を抑制しないという結果(図2Cおよび図2E)と一致する。

【 0 0 8 3 】

Dab1は、Notchが仲介するRho活性化およびCRC浸潤に非常に重要な役割を果たすチロシンキナーゼAblを活性化する

DAB1は、マウス褐色細胞腫細胞の分化において、SRCおよびFYNを含むSRCファミリーチロシンキナーゼならびにAbelson (ABL)に結合するタンパク質の1つとして同定された{Howell, 1997}。ショウジョウバエにおいて、Notch受容体遺伝子 (N) は軸索誘導において遺伝的にAblと相互作用する{Giniger, 1998}。ABL1およびABL2 (ARGとしても知られる)を含むチロシンキナーゼのABLサブファミリーは哺乳動物において進化的保存され、細胞増殖および遊走のようなさまざまな生理学および病理学過程において多面的な役割を果たす{Colicelli, 2010}。

【 0 0 8 4 】

したがって本発明者らは、DAB1はABLを活性化することによりCRC転移を促進すると仮定した。内因性CRC進展において仮定されるABLの役割を確認するために、本発明者らは、Apc/AesマウスをABL阻害剤イマチニブ (Glivecとしても知られる {Buchdunger, 2001; Sawyers, 2003})で処置し、腫瘍の大きさまたは数における変化なしに、CRC浸潤が顕著に抑制されることを見出した (図4Aおよび図4B)。これに一致して、ABL1および/またはABL2遺伝子のノックダウン (図4C下) は、RKO細胞のMatrigel浸潤を顕著に抑制した(図4C上)。さらに、Rho活性化は、二重ABL1/ABL2ノックダウンによって抑制された (図4D)。同様に、イマチニブは、浸潤およびEDTA誘導Rho活性化を、用量依存的に抑制した (図4Eおよび図4F)。本発明者らは、ABLおよびSRCの両方の阻害剤であるダサチニブも、浸潤を顕著に抑制することを見出した(図10A)。進行CRC症例のサブセットにおいてSRCが過剰活性化されるが{Weinberg, 2007b}、本発明者らは、SRCファミリーの阻害剤PP2は、培養RKO細胞浸潤に対してあまり有効でないこと (有効性は約20%まで)を見出した (図10A)。実質的に同じ結果がHCT116細胞でも得られた (データを示していない)。これらの結果は、ABLがRho

10

20

30

40

50

活性化およびCRC進展においてNotch下流での役割を担うことを示唆する。

【0085】

神経細胞およびHEK293細胞において、DAB1はFYNのキナーゼ活性を増強する{Arnaud, 2003; Bock, 2003}。しかしながら、本発明者らのCRC浸潤アッセイにおいて、SRCファミリーの阻害剤PP2は弱い阻害を示したに過ぎない(図10A)。従って本発明者らは、DAB1が、CRC浸潤を促進するのに、主要なABL1スプライシングバリエーションであるABL1B{Hantschel, 2004, Colicelli, 2010}と相互作用するかを調べた。

【0086】

ABLは最大のキナーゼ活性を示すのに自己をリン酸化することが知られている{Hantschel, 2004}。本発明者らは、DAB1の同時発現が、Tyrリン酸化ABL1B (pY-ABL1B) レベルを用量依存的に高めることを見出した(図4G; レーン4~6を比較されたい)。神経細胞において、Tyrリン酸化DAB1 (pY-DAB1) は遊走のために不可欠であるが、これは、5個のTyr残基が、構造的には類似するがリン酸化を受けないPheで置き換えられた5YF-DAB1変異体の発現により、逆の効果がみられることからわかる{Sanada, 2004}。本発明者らは、5YF-DAB1発現CRC細胞においてpY-ABL1Bが低レベルに止まることを見出したが(図4G; レーン7)、これはABL活性化がpY-DAB1に依存することを示唆する。本発明者らはまた、野生型DAB1は、ABL1B存在下にTyrリン酸化されるが、5YF変異体はそうではないことを見出した(図4G; レーン5~7)。マウス腸腫瘍および培養細胞中でABLおよびDAB1は相互に物理的に作用するから、ABL1BはDAB1を直接にTyrリン酸化すると考えられる(図10B、およびHowell, 1997)。この解釈に一致して、DAB1は、ABL1Bのkinase-dead (KD) 変異体 (K290R; Barila, 2000) の存在下にはリン酸化されなかった(図4G; レーン9~10)。

【0087】

これらの結果は全体として、インビボでDAB1はABLの存在下にリン酸化され、pY-DAB1は逆にABLを活性化して、Notch受容体下流エフェクターの1つとしてCRC浸潤を促進することを示唆する。本発明者らは、ABL活性がCRCの悪性化進展に対する新規な治療標的であることを提案する。

【0088】

TRIO RhoGEFはDAB1およびABLの存在下にTyrリン酸化され、CRC浸潤を促進する

ショウジョウバエの神経細胞遊走において、ショウジョウバエTriple functional domain (dTrio) がdAblの下流エフェクターとして重要な役割を果たす{Forsthoefer, 2005}。TRIOは、Rhoファミリー低分子GTPaseを活性化しうるGEFタンパク質のDBLファミリーに属し、Rac (GEF1)とRho (GEF2)とに対する2つのGEFドメインを有する独特のファミリーメンバーである(図5A) {Debant, 1996; Bateman; 2001, Vigil; 2010}。ショウジョウバエにおいてTrio GEF1はRacを活性化し、神経細胞の遊走を起こすことがわかっている{Song, 2012}。Apc/AesマウスCRCにおいてRacは活性化されず、その阻害のCRC浸潤に対する効果は殆どないので(図8A、および示していないデータ)、本発明者らは、CRC進展におけるTRIOによるRho活性化に注目した。

【0089】

すなわち本発明者らはまず、HCT116細胞においてTRIO mRNA発現をノックダウンし、EDTAによるNotch受容体活性化後のGTP-Rhoレベルを調べた。注目すべきことに、TRIOノックダウンにより、GTP-RhoレベルおよびMatrigel浸潤能が顕著に低下した(図5Bおよび図5C)。本発明者らは、RKO細胞においても実質的に同様の結果を得た(データを示していない)。これらの結果は、TRIOが、Notch受容体が活性化された細胞において、Rho活性化によるCRC浸潤に重要な役割を果たすことを強く示唆する。

【0090】

ショウジョウバエS2細胞中でdTrioはdAbl存在下にTyrリン酸化されるので{Forsthoefer, 2005}、本発明者らは、ABLはCRC細胞においてもTRIOのTyrリン酸化を引き起こし、そのRho活性を高めると仮定した。仮定通り、本発明者らは、CRC細胞においてABL1Bが単独で、pY-TRIOレベルを少し高めることを見出した(図5D、レーン3)。興味深いことに、pY-TRIOレベルは、ABL1Bを野生型DAB1と同時発現させると顕著に上昇し、5YF変異DAB1と同時発

現させた場合にはそうならないことを見出した (図5D、レーン4~5)。一方、kinase-dead (KD) ABL1B変異体は、pY-TRIOレベルを上昇しなかった (図5D、レーン6~7)。これらの結果は全体として、TRIOのTyrリン酸化がABLのキナーゼ活性に依存することを示唆する。

【0091】

TRIO中のABL標的Tyr残基を特定するために、本発明者らはまず、TRIOの一次アミノ酸配列をオンラインNetPhos2.0ソフトウェアによりスクリーニングした{Blom, 1999}。それにより、61個のTyr残基すべてについてリン酸化可能性を予測し、スコアが0.5の閾値を超える30個を高可能性の候補と決定した。本発明者らは、そのうちの18個を、個別に、または組み合わせてPheに置き換えたTRIO変異体の作製に成功した (図5AのYF変異体)。

【0092】

次いで本発明者らは、それらYF変異体がインビボでTRIOタンパク質全体のpYレベルに影響するかを調べ、TRIO(18YFs) がTRIO(WT)と比べて顕著に低いpYレベルを示すことを見出した (図5E、レーン1~2)。TRIO(7YFs-a)およびTRIO(7YFs-b)はコントロールTRIO(WT)と同様にTyrリン酸化されたが、さらに4個のYF変異を1990位、2562位、2681位および2757位に有するTRIO(11YFs)は、pYレベルを顕著に低下した (図5E、レーン3~5)。それら4個のチロシンのみに変異を有するTRIO(4YFs)変異体においても、同様のpYレベル低下が見られた (図5E、レーン6)。Y1990FおよびY2681F変異体はあまり高くないpYレベルを示したので (それぞれ図5Fのレーン2および4)、本発明者らは、上記4個のチロシンのうちY1990およびY2681を、ABL-DAB1存在下のリン酸化の主要標的と決定した。

【0093】

TRIO(pY2681)は、ステージIおよびIIであっても予後が不良のCRC患者を見分けるのに役立つ

TRIOリン酸化の臨床的関連を調べるために、本発明者らは、ヒト原発CRC標本においてY1990および/またはY2681がリン酸化されているかを調べた。この目的のために、TRIO(pY1990)およびTRIO(pY2681)のそれぞれに特異的な抗体を作製した (図11)。しかしながら、TRIO(pY1990)陽性および陰性のCRC患者の間に生存率の差はあまりなかった ($p = 0.9$ 、データを示していない)。

【0094】

興味深いことに、TRIO(pY2681)陽性CRCを有する患者は、TRIO(pY2681)陰性CRCを有する患者と比べて、統計学的に有意に低い生存率を示した (全てのステージを含み、 $n = 102$ 、カイ二乗検定において $p = 0.01$; 図6A、左)。ステージIおよびIIの患者全体では、両ステージのTRIO(pY2681)陰性CRC患者は完全に (100%) 治癒したが、陽性患者の約20%という5年後の死亡率を示した ($n = 63$, $p = 0.04$; 図6A、中央)。ステージIIの患者だけを見ても ($n = 46$)、TRIO(pY2681)陽性と陰性の患者サブ集団の間に同様の分布が見られた ($p = 0.1$; 図6A、右)。すなわち、TRIO(pY2681)陰性CRC患者は、ステージIまたはIIで切除を受けた場合、再発を免れていた。したがって、TRIO(Y2681)のリン酸化状態は、他のバイオマーカー{Salazar, 2010}と比べて、患者の予後をより正確に予測するのに役立つ。

【0095】

近くの正常粘膜またはリンパ濾胞と比べて、CRC細胞は細胞質中に非常に高レベルのTRIO(pY2681)を含んでいた (図6B)。興味深いことに、TRIO(pY2681)シグナルは間質中の孤立した出芽または浸潤CRC細胞においても見られたので (図6C~図6E中、矢じり印)、TRIO(pY2681)がCRC浸潤に重要な役割を果たすことが示唆される。実際TRIO(pY2681)の存在は、深達度 (カイ二乗検定によるm、smおよびmpと、ss、seおよびsiとの比較、 $p < 0.0001$) およびステージ (カイ二乗検定による、ステージ0~IとステージII~IVとの比較、 $p = 0.02$; ステージ0~IIIとステージIVとの比較、 $p = 0.02$) に関連した。

【0096】

AesはTRIO(pY2681)のリン酸化を抑制する

AesはNotchシグナル伝達の阻害によりCRC進展を抑制する{Sonoshita, 2011}。興味深いことに、ヒトCRC標本において、核におけるAES発現は、TRIO(pY2681)レベルと逆相関していた (カイ二乗検定において $p < 0.01$ 、代表的な写真を図7Aに示す)。さらに、Apc/Aes腸

10

20

30

40

50

腫瘍のTrioの免疫沈降におけるpY2681シグナルは、Apcマウスのそれよりも強いことがわかった (図7B)。したがって、本発明者らは、TRIO(Y2681)リン酸化は、AESの欠損によるCRC転移において重要な役割を担うと仮定した。Aesは、核内フォーカスへNICD、MamIおよびRbpjを含むNotchシグナル伝達エフェクターを隔離するので{Sonoshita, 2011}、Aesは、NICDが仲介する初期相応答および後期相応答の両方を阻害することによりTRIO(Y2681)リン酸化を抑制すると考えられる。これらの結果は全体として、AESがTRIO RhoGEF (GEF2)の活性化において重要な役割を果たすことを示している。

【 0 0 9 7 】

TRIO(Y2681)リン酸化は、RhoGEF活性を高め、CRC浸潤を促進する

CRC浸潤におけるTRIO(pY2681)の役割を調べるために、TRIO(WT)またはunphosphorylatable TRIO(Y2681F)変異体のいずれかをABL1BおよびDAB1と同時に、ドキシサイクリン(Dox)依存的に発現するクローンRKO細胞を作製した (図7C)。興味深いことに、TRIO(WT)をABL1BおよびDAB1と同時発現させた場合は、RKO細胞のMatrigel浸潤能が高められたが、TRIO(Y2681F)の場合はそうならなかった (図7C)。

【 0 0 9 8 】

Rho活性化に対するTRIOのTyrリン酸化の効果を調べるために、インビトロで精製タンパク質を用いるRhoGEF GTP交換アッセイを行った。CRC細胞におけるさまざまな遺伝子変異によって生じる結果の混乱を避けるために、TRIO産生宿主細胞として、CRC細胞ではなくHEK293Tを選んだ。トランスフェクト細胞から精製したTRIO(WT)タンパク質は、既報{Debant, 1996}のように、組換えRhoAにおけるGDPからGTPへの交換反応を促進することを確認した (図7D)。重要なことに、イマチニブ処理トランスフェクト細胞から精製したTRIO(WT)は、顕著に低いRho活性化能を示したので (図7E)、TRIOによるRho活性化に内在性ABLキナーゼが重要な役割を果たすことが示唆される。注目すべきことに、TRIO(Y2681F)は同様に低いGEF活性を示したので (図7E)、Y2681リン酸化は最大GEF活性に不可欠であることが示唆される。これらの結果は全体として、ABLはTRIOのY2681のリン酸化を引き起こし、GTP-Rhoを増加し、その結果、CRC細胞浸潤を促進することを示唆する。

【 0 0 9 9 】

ヒト癌におけるTRIO点突然変異はRhoGEF活性を高める。

本発明者らはさらに、ヒト癌において存在するTRIO変異を調べた。本発明者らは、COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) データベースにおいて、さまざまな種類の癌の2% (4414中、102) に141のTRIO変異があることを見出した。注目すべきことに、CRCにおいてGEF2ドメインに1つの変異が存在することがわかった (L2044I)。また、Ig様ドメインおよびY2681を含むその先行領域に7つの変異があることがわかった。それらは、子宮内膜癌におけるE2652G、G2658S、T2695MおよびS2767L、乳癌におけるN2668S、腎臓癌におけるS2671Y、および肺癌におけるG2699V (図5Aにおいて星印で示す) である。これらのTRIO点変異体を作製し、そのRhoGEF活性を調べた。興味深いことに、TRIO(G2699V)変異体は、TRIO(WT)よりもRho活性化能が高く、Rac活性には影響しないことがわかった (図7F、および示していないデータ)。興味深いことに、TRIO(G2699V)は野生型よりも、ABLおよびDAB1存在下のTyrリン酸化に対する感受性が高かった (図7G)。これらの結果は全体として、ヒト癌の部分集団において、TRIOの変異が、そのDAB1-ABLによるTyrリン酸化を促進することによりRhoGEF活性を高め、癌の進展を起こすことを示唆する。

【 0 1 0 0 】

TRIO(pY2681)はさまざまな種類の癌において見られる。

本発明者らはさらに、TRIOのY2681が原発CRCだけでなく、その転移、また他の種類の癌においてもリン酸化されるかを調べた。その結果、TRIO(pY2681)は、転移細胞、また、さまざまな種類の癌においても見られることがわかった (図12、表2)。この結果は、この転移のメカニズムが、複数の種類の癌において重要な役割を果たすことを示唆する。

【 0 1 0 1 】

【表 2】

TRIO(pY2681)を有する臓器

副腎
血液 (リンパ腫)
骨
脳
乳房
大腸
子宮内膜
食道
胆嚢
腎臓
咽頭
肝臓
肺
口腔
卵巣
膵臓
前立腺
唾液腺
皮膚
小腸 (GIST)
軟部組織
胃
精巣
甲状腺
膀胱
子宮頸部

10

20

30

【 0 1 0 2 】

予後がTRIO(pY2681)と強く相関する癌の種類

CRCに関して、本発明者らは研究の範囲を拡大して、より多数の症例を調べた (図13)。全てのステージを含む全339の症例全体において、TRIO(pY2681)陰性患者の予後とTRIO(pY2681)陽性患者の予後の間に、統計学的に有意な差が認められた($P < 0.001$)。重要なことに、ステージIIの患者 ($n = 115$)において、陰性患者の5年生存率はほぼ100%であったのに対し、ステージIVの患者 ($n = 57$)においては、陰性患者の生存率は約50%、陽性患者の生存率はわずか約10%であった。

【 0 1 0 3 】

さらに、肺腺癌の患者 ($n = 214$) において、TRIO(pY2681)陰性と陽性の間で、予後の差が顕著であった ($P = 0.002$) (図14)。

【 0 1 0 4 】

同様に、ステージI~IIIの胃癌の患者 ($n = 214$) においても、TRIO(pY2681)陰性と陽性の間で、予後の差が顕著であった ($P < 0.001$) (図15)。

【 0 1 0 5 】

さらに、予備試験データ ($n = 20$) により、膵臓腺癌の患者は、Trio(pY2681)陰性であれば陽性であるよりも生存率が高い傾向が強いことが示されている (図16)。この傾向の統計学的有意性は、別の膵臓癌マーカーであるSmad4の場合と殆ど同じであったが、Trio(pY2681)とSmad4とは、関連のない、それぞれ独立したマーカーである。

40

50

【 0 1 0 6 】

引用文献 (文献はいずれも引用により本書の一部とする)

Androutsellis-Theotokis, A., Leker, R.R., Soldner, F., Heppner, D.J., Ravin, R., Poser, S.W., Rueger, M.A., Bae, S.-K., Kittappa, R., and McKay, R.D.G. (2006). Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo*. Nature 442, 823-826.

10

Arnaud, L., Ballif, B.A., Förster, E., and Cooper, J.A. (2003). Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of Disabled-1 during brain development. Curr Biol 13, 9-17.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284, 770-776.

20

【 0 1 0 7 】

Barilá, D., R., N., Gonfloni, S., Kretschmar, J., Moro, M., Bohmann, D., and Superti-Furga, G. (2000). A nuclear tyrosine phosphorylation circuit: c-Jun as an activator and substrate of c-Abl and JNK. *EMBO J* 19, 273-281.

Bateman, J., and Van Vactor, D. (2001). The Trio family of guanine-nucleotide-exchange factors: regulators of axon guidance. *J Cell Sci* 114, 1973-1980.

10

Billadeau, D.D. (2010). Vav proteins in cancer. In *The Rho GTPases in Cancer* (Springer Science+Business Media, LLC), pp. 77-92.

20

Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 295, 1351-1362.

Bock, H.H., and Herz, J. (2003). Reelin activates Src family tyrosine kinases in neurons. *Current Biology* 13, 18-26.

30

Buchdunger, E., Matter, A., and Druker, B.J. (2001). Bcr-Abl inhibition as a modality of CML therapeutics. *BBA* 1551, M11-M18.

【 0 1 0 8 】

Chen, W.-S., Kung, H.-J., Yang, W.-K., and Lin, W. (1999).

40

Comparative tyrosine-kinase profiles in colorectal cancers: Enhanced Arg expression in carcinoma as compared with adenoma and normal mucosa. *Int J Cancer* 83, 579-584.

Colicelli, J. (2010). ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Science Signaling* 3, re6.

10

Debant, A., Serra-Pagès, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S.-H., and Streuli, M. (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5466-5471.

20

DeGeer, J., Boudeau, J., Schmidt, S., Bedford, F., Lamarche-Vane, N., and Debant, A. (2013). Tyrosine phosphorylation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio regulates netrin-1/DCC-mediated cortical axon outgrowth. *Mol Cell Biol* 33, 739-751.

30

Dowell, R.D. (2010). Transcription factor binding variation in the evolution of gene regulation. *Trends Genet* 26, 468-475.

40

【 0 1 0 9 】

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soli" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.

Forsthoefel, D.J., Liebl, E.C., Kolodziej, P.A., and Seeger, M.A. (2005). The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in *Drosophila*. *Development* 132, 1983-1994.

10

Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 7618-7623.

20

Giniger, E. (1998). A role for Abl in Notch signaling. *Neuron* 20, 667-681.

Giniger, E. (2012). Notch signaling and neural connectivity. *Curr Opin Genet Dev* 22, 1-8.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

30

Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 5-14.

【 0 1 1 0 】

Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., and Honjo, T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International Immunology* 14, 637-645.

10

Hantschel, O., and Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Molcellbio* 5, 33-44.

Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, G., Sestan, N., and Rakic, P. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regurlates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60, 273-284.

20

Howell, B.W., Gertler, F.B., and Cooper, J.A. (1997). Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J* 19, 121-132.

30

Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., and Akiyama, T. (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and

40

G-protein signaling. *Science* 289, 1194-1197.

【 0 1 1 1 】

Kakizaki F, Aoki K, Miyoshi H, Carrasco N, Aoki M and Taketo MM. (2010). CDX transcription factors positively regulate expression of solute carrier family 5, member 8 in the colonic epithelium. *Gastroenterology* 138, 627-635.

Krejci, A., Bernard, F., Huusden, B.E., Collins, S., and Bray, S.J. (2009). Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Science Signaling* 2, 1-14.

10

Li, Y., Hibbs, M.A., Gard, A.L., Shylo, N.A., and Yun, K. (2012). Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and Hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells* 30, 741-752.

20

McDermott, U., Downing, J.R., and Stratton, M.R. (2011). Genomics and the continuum of cancer care. *NEJM* 364, 340-350.

Medley, Q.G., Serra-Pages, C., Iannotti, E., Seipel, K., Tang, M., O'Brien, S.P., and Streuli, M. (2000). The Trio guanine nucleotide exchange factor is a RhoA target. *J Biol Chem* 275, 36116-36123.

30

【 0 1 1 2 】

Miles, F.L., Pruitt, F.L., van Golen, K.L., and Cooper, C.R. (2008). Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25, 305-324.

Nellesen DT, Lai EC, Posakony JW. (1999). Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of enhancer of split complex genes to common transcriptional activators. *Dev Biol* 213, 33-53.

10

Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., and Taketo, M. (1995). Loss of *Apc* heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated *Apc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4482-4486.

20

Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric Notch receptors. *Mol Biol Cell* 20, 1825-1835.

30

Ranganathan, P., Weaver, K.L., and Capobianco, A.J. (2011). Notch signalling in solid tumors: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 11, 338-351.

【 0 1 1 3 】

Reymond, N., Riou, P. and Ridley, A.J. (2012). Rho GTPases

40

and Cancer Cell Transendothelial Migration. in Rho GTPases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer 827, 123-142.

Rossman KL, Worthylake DK, Snyder JT, Siderovski DP, Campbell SL and Sondek J. (2002). A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-associated guanine nucleotide exchange. EMBO J. 21, 1315-1326.

10

Salazar, R., Roepman, P., Capella, G., Moreno, V., Simon, I., al., e., and Tollenaar, R. (2011). Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and stage III colorectal cancer. J Clin Oncol 29, 17-24.

20

Sanada, K., and Gupta, A. (2004). Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. Neuron 42, 197-211.

30

Sawyers, C.L. (2003). Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. Genes Dev 17, 2998-3010.

Song, J.K., and Giniger, E. (2011). Noncanonical Notch function in motor axon guidance is mediated by Rac GTPase

40

and the GEF1 domain of Trio. Dev Dyn 240, 324-332.

【 0 1 1 4 】

Sonoshita, M., Aoki, M., Fuwa, H., Aoki, K., Hosogi, H., Sakai, Y., Hashida, H., Takabayashi, A., Sasaki, M., Robine, S., et al. (2011). Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell* 19, 125-137.

Steeg, P.S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3, 55-63.

Steven, R., Kubiseski, T.J., Zheng, H., Kulkarni, S., Mancillas, J., Morales, A.R., Hogue, C.W.V., Pawson, T., and Culotti, J. (1998). UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*. *Cell* 92, 785-795.

Tiyanont, K., Wales, T.E., Aste-Amezaga, M., Aster, J.C., Engen, J.R., and Blacklow, S.C. (2011). Evidence for increased exposure of the Notch1 metalloprotease cleavage site upon conversion to an activated conformation. *Structure* 19, 546-554.

Varnum-Finney, B., Wu, L., Yu, M., Brashem-Steln, C., Staats, S., Flowers, D., Griffin, J.D., and Bernstein, I.D. (2000). Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of Notch signaling. *J Cell Sci* 113, 4313-4318.

[0 1 1 5]

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10, 842-857.

Vooijs, M., Liu, Z., and Kopan, R. (2011). Notch: Architect, landscaper, and guardian of the intestine. *Gastroenterology* 141, 448-459.

10

Weinberg, R.A. (2007a). Cellular oncogenes. In *The Biology of Cancer* (New York: Garland Science), pp. 91-117.

Weinberg, R.A. (2007b). Moving out: invasion and metastasis. In *The Biology of Cancer* (Garland Science, New York), pp. 587-654.

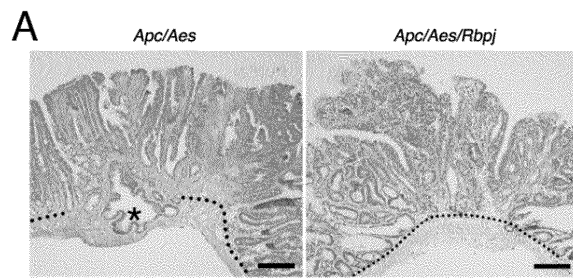
20

Yoshizuka, N., Moriuchi, R., Mori, T., Yamada, K., Hasegawa, S., Maeda, T., Shimada, T., Yamada, Y., Kamihira, S., Momonaga, M., et al. (2004). An alternative transcript derived from the trio locus encodes a guanosine nucleotide exchange factor with mouse cell-transforming potential. *J Biol Chem* 279, 43998-44004.

30

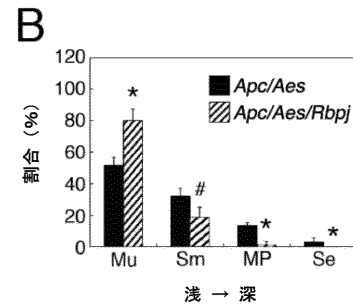
【図 1 A】

Fig. 1A



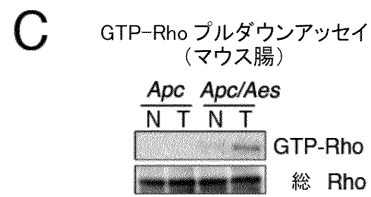
【図 1 B】

Fig. 1B



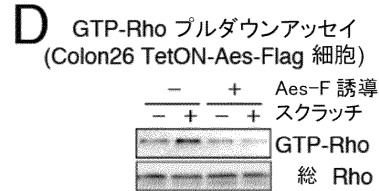
【図 1 C】

Fig. 1C



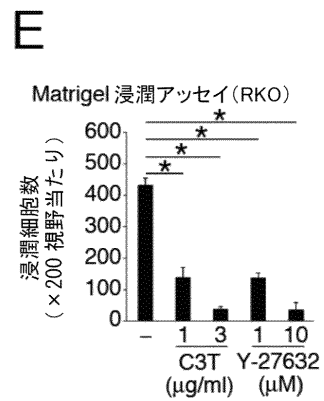
【図 1 D】

Fig. 1D



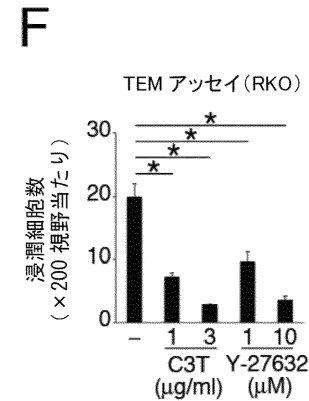
【図 1 E】

Fig. 1E



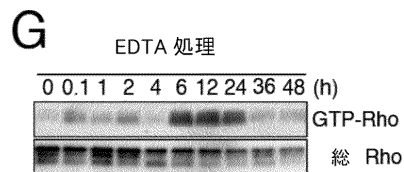
【図 1 F】

Fig. 1F



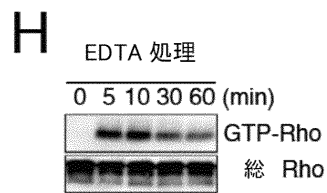
【図 1 G】

Fig. 1G



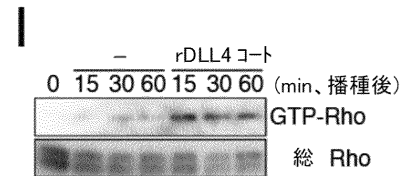
【図 1 H】

Fig. 1H



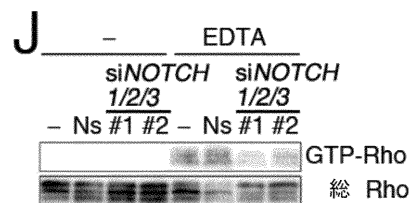
【図 1 I】

Fig. 1I



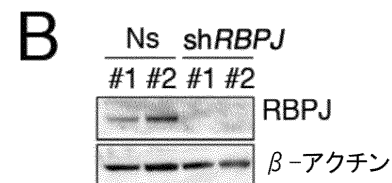
【図 1 J】

Fig. 1J



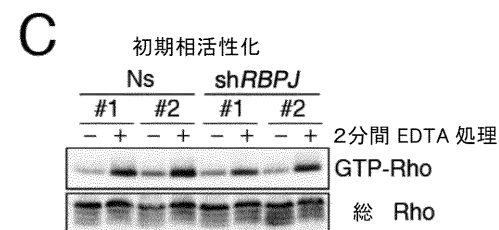
【図 2 B】

Fig. 2B



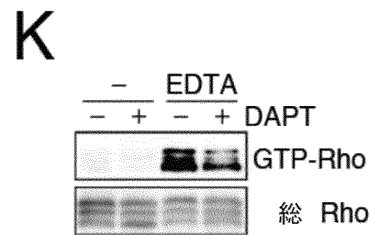
【図 2 C】

Fig. 2C



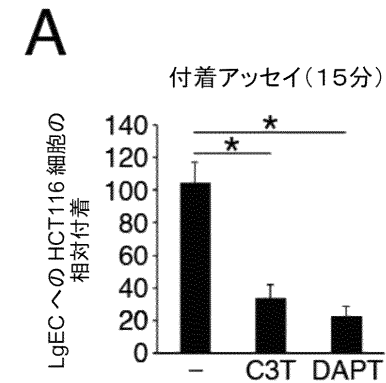
【図 1 K】

Fig. 1K



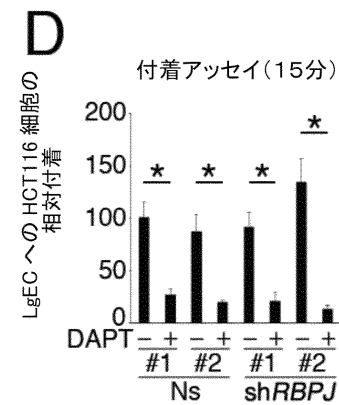
【図 2 A】

Fig. 2A



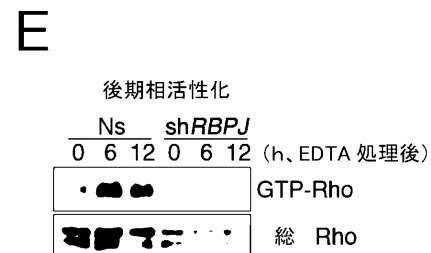
【図 2 D】

Fig. 2D



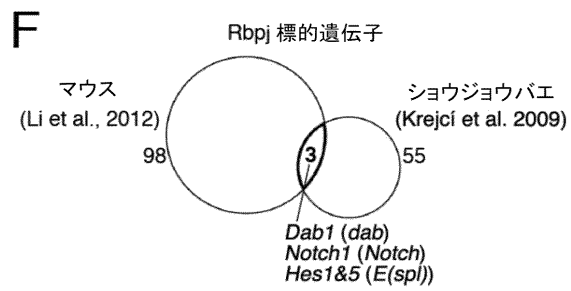
【図 2 E】

Fig. 2E



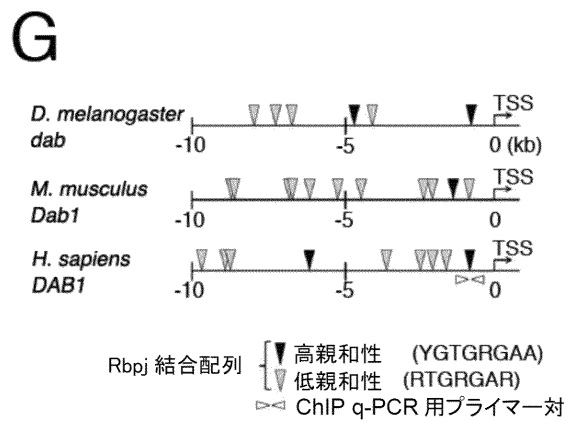
【図 2 F】

Fig. 2F



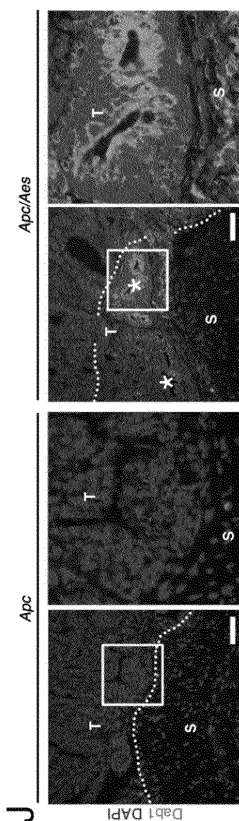
【図 2 G】

Fig. 2G



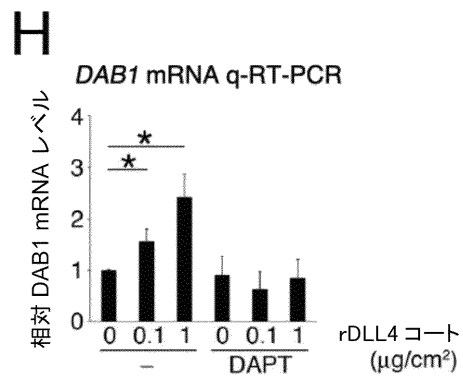
【図 2 J】

Fig. 2J



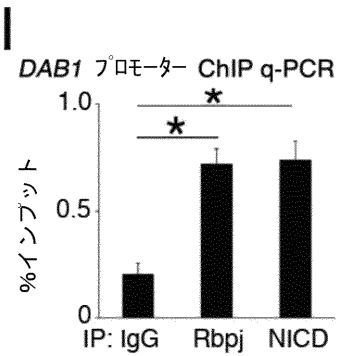
【図 2 H】

Fig. 2H



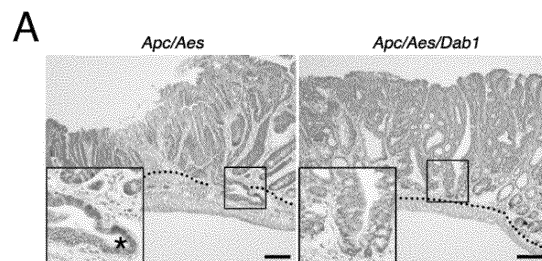
【図 2 I】

Fig. 2I



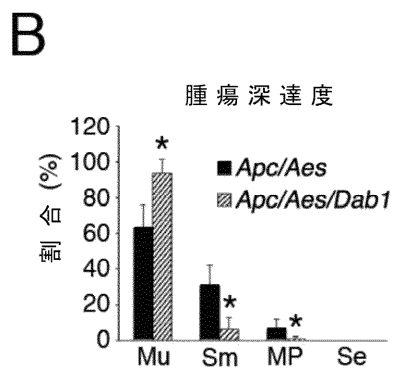
【図 3 A】

Fig. 3A



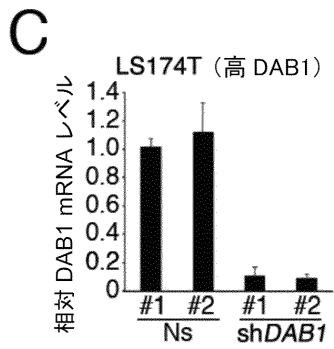
【図 3 B】

Fig. 3B



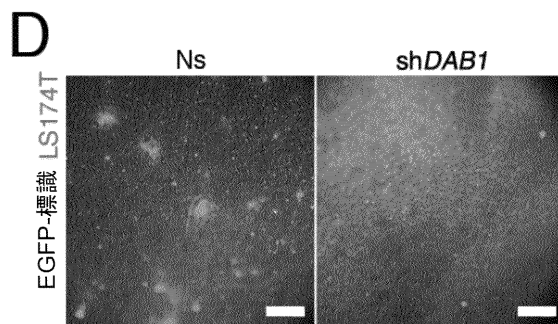
【図 3 C】

Fig. 3C



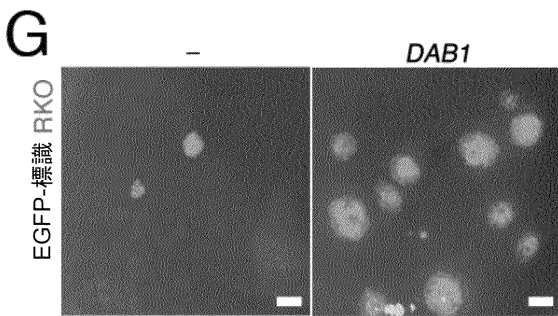
【図 3 D】

Fig. 3D



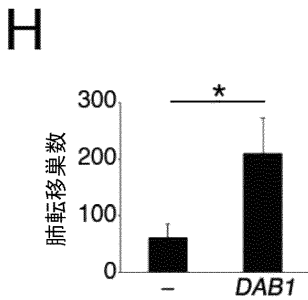
【図 3 G】

Fig. 3G



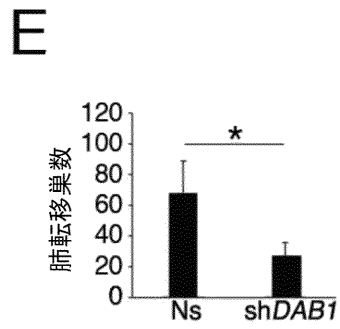
【図 3 H】

Fig. 3H



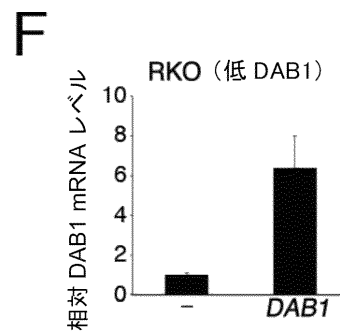
【図 3 E】

Fig. 3E



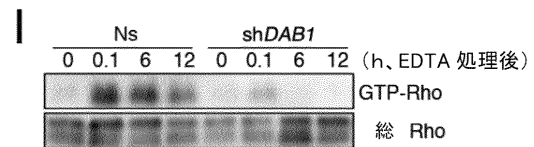
【図 3 F】

Fig. 3F



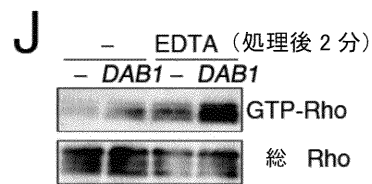
【図 3 I】

Fig. 3I



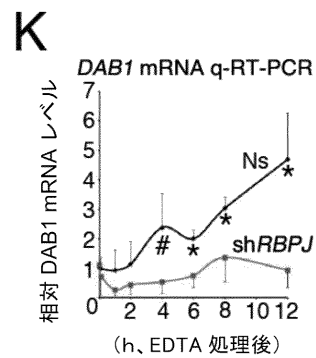
【図 3 J】

Fig. 3J



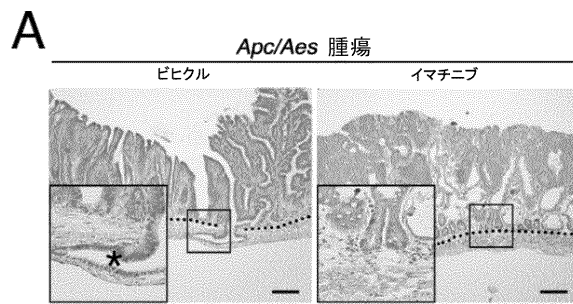
【図 3 K】

Fig. 3K



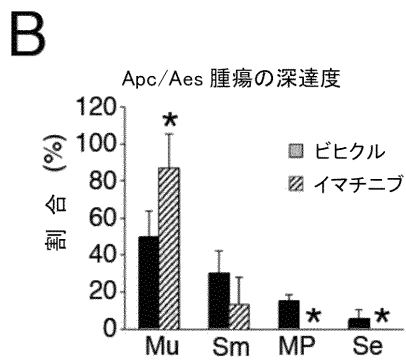
【図 4 A】

Fig. 4A



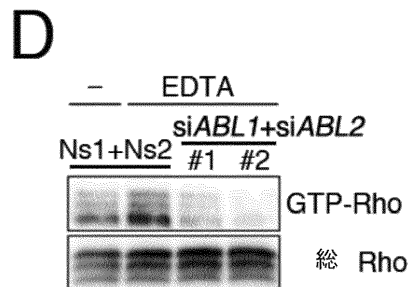
【図 4 B】

Fig. 4B



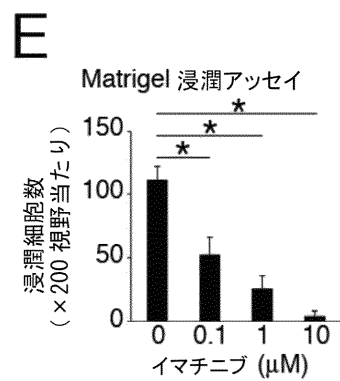
【図 4 D】

Fig. 4D



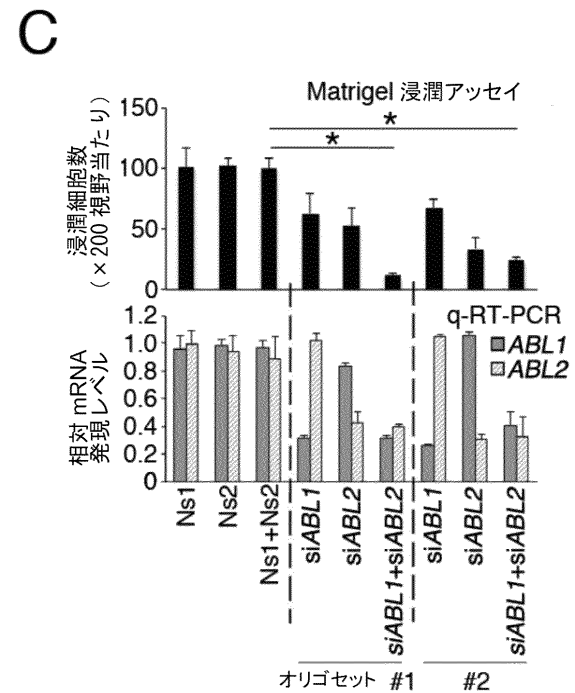
【図 4 E】

Fig. 4E



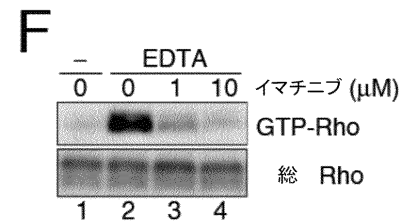
【図 4 C】

Fig. 4C



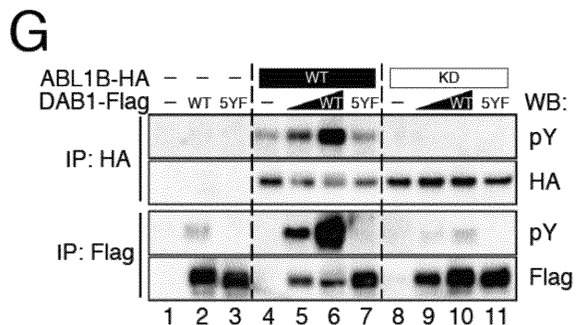
【図 4 F】

Fig. 4F



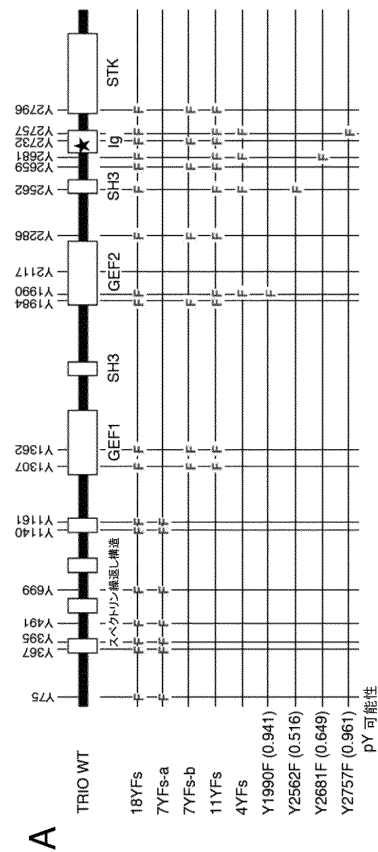
【図 4 G】

Fig. 4G



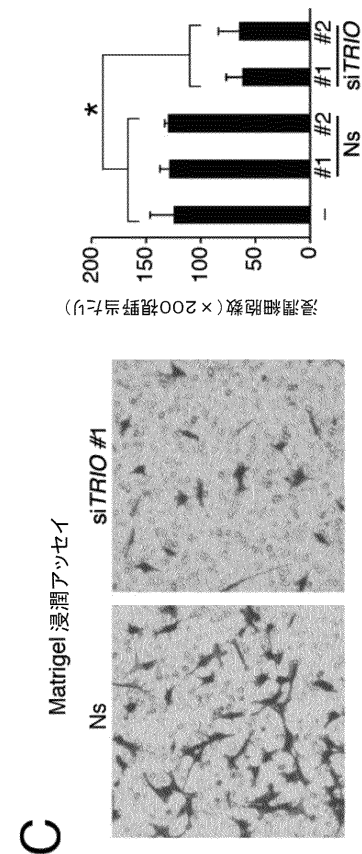
【 図 5 A 】

Fig. 5A



【 図 5 C 】

Fig. 5C

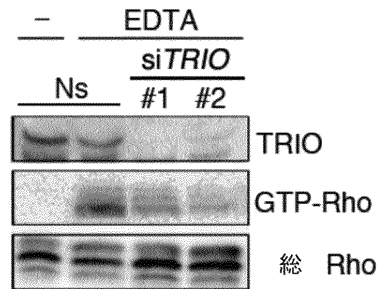


【 図 5 B 】

Fig. 5B

B

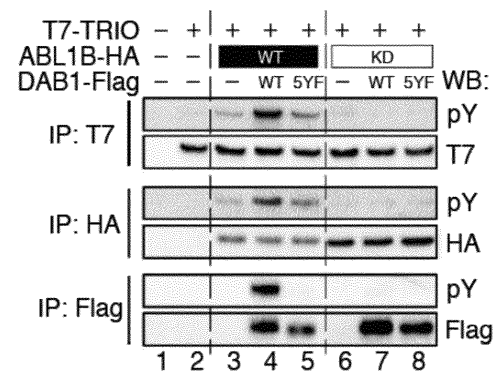
HCT116 細胞



【 図 5 D 】

Fig. 5D

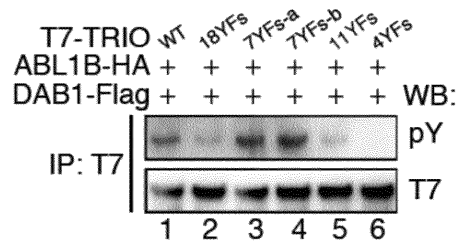
D



【 図 5 E 】

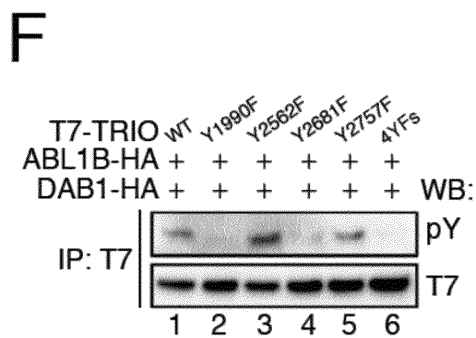
Fig. 5E

E



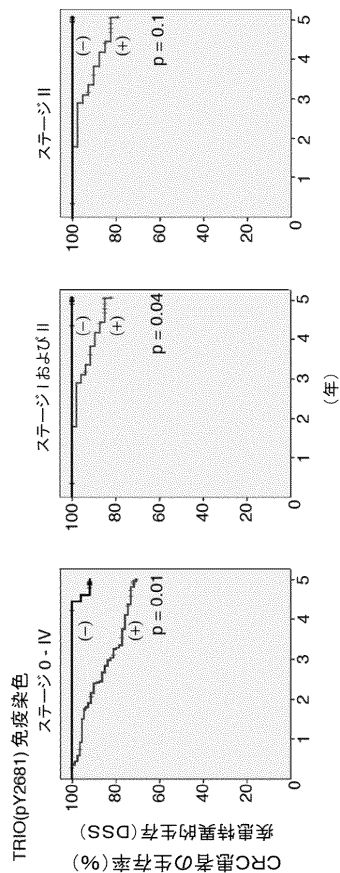
【図 5 F】

Fig. 5F



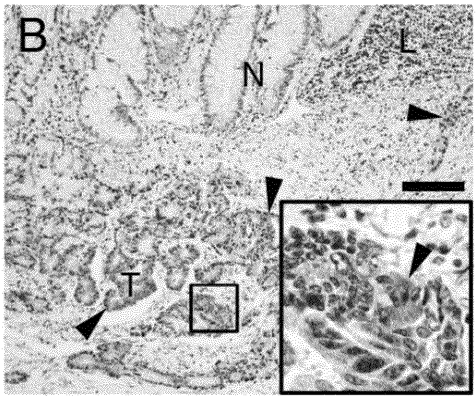
【図 6 A】

Fig. 6A



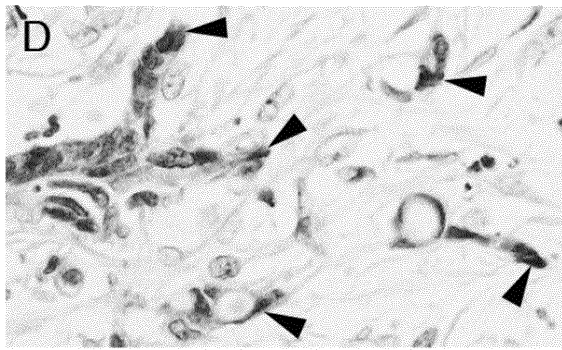
【図 6 B】

Fig. 6B



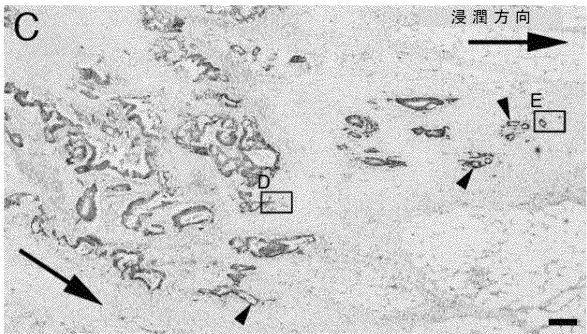
【図 6 D】

Fig. 6D



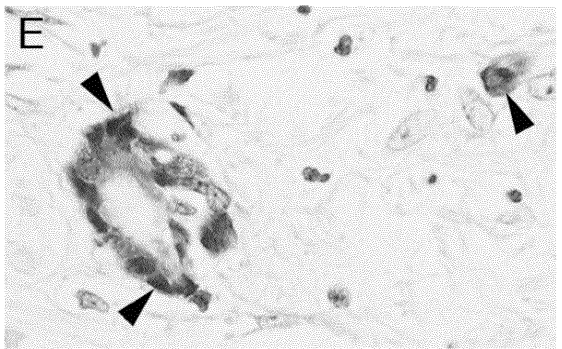
【図 6 C】

Fig. 6C



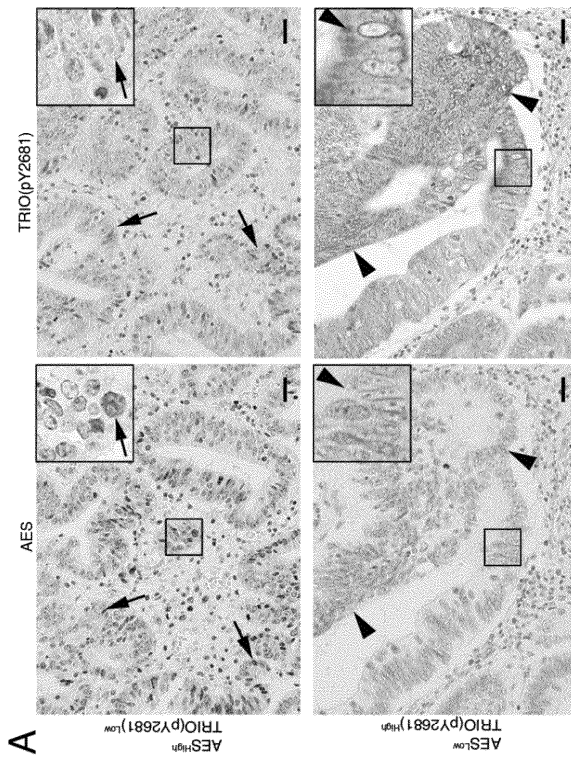
【図 6 E】

Fig. 6E



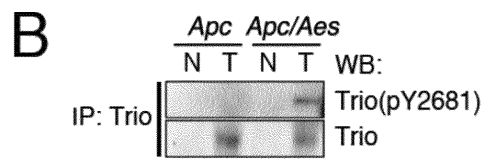
【図 7 A】

Fig. 7A



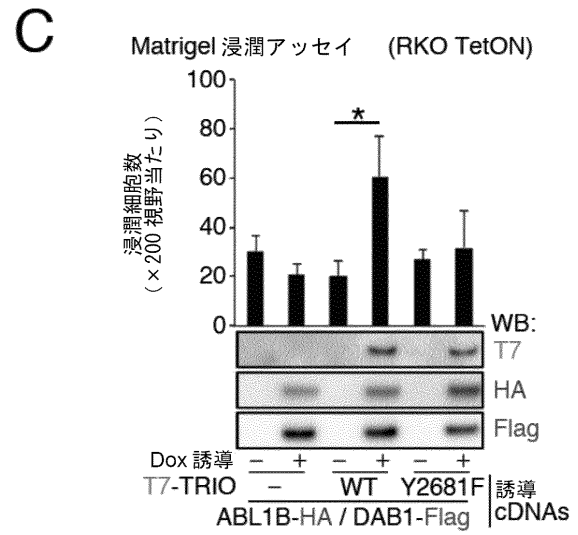
【図 7 B】

Fig. 7B



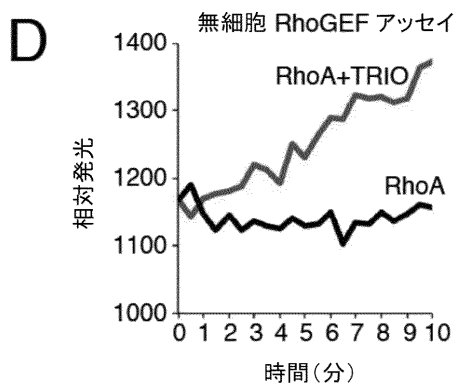
【図 7 C】

Fig. 7C



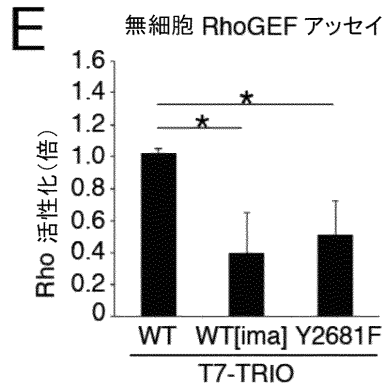
【図 7 D】

Fig. 7D

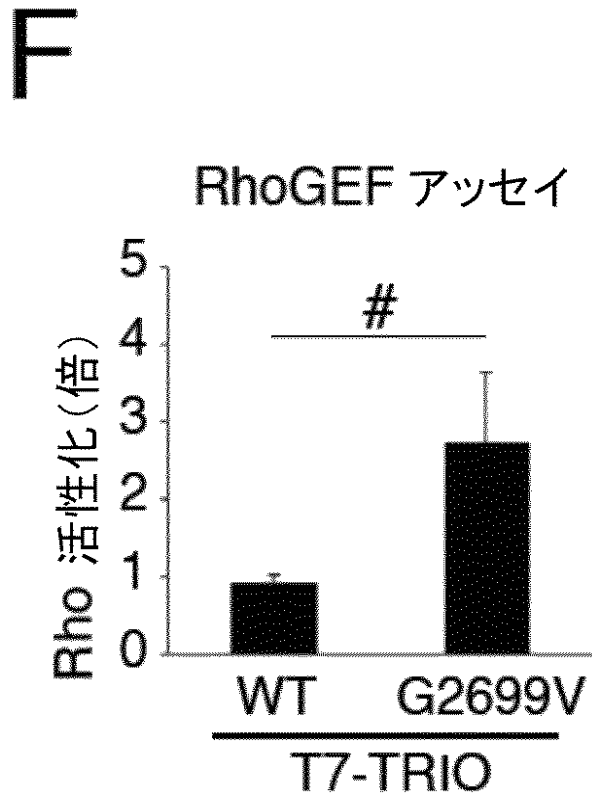


【図 7 E】

Fig. 7E

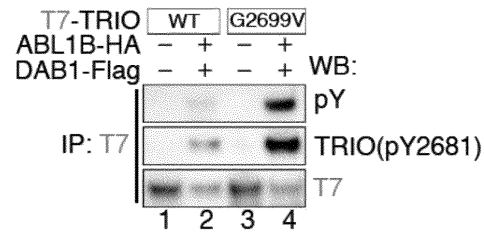


【図 7 F】
Fig. 7F



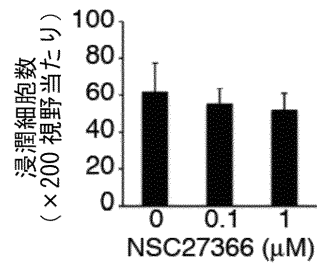
【図 7 G】
Fig. 7G

G



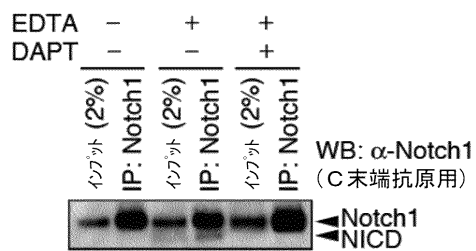
【図 8 A】
Fig. 8A

A Matrigel 浸潤アッセイ (RKO)



【図 8 B】
Fig. 8B

B



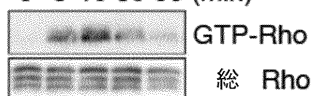
【図 8 C】
Fig. 8C

C

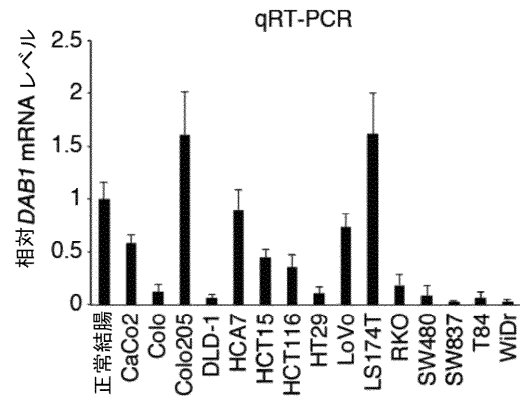
Colon26 マウス CRC 細胞

EDTA 処理

0 5 10 30 60 (min)

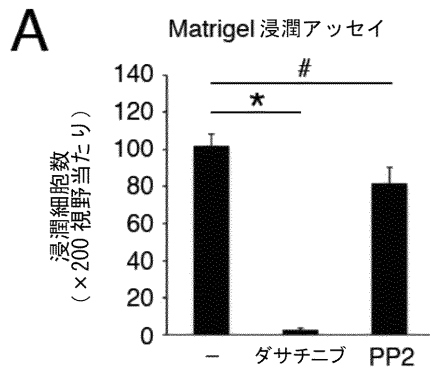


【図 9】
Fig. 9



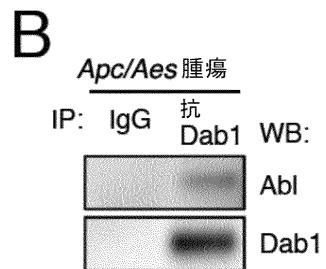
【図 10 A】

Fig. 10A



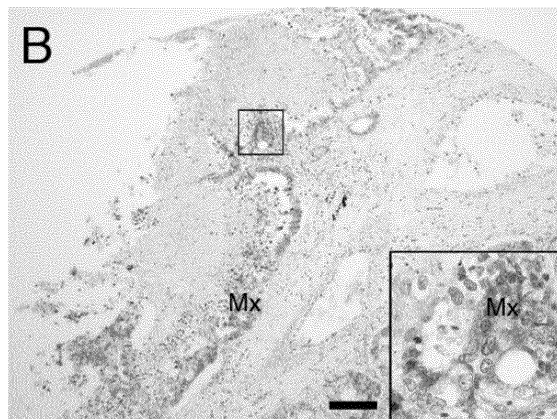
【図 10 B】

Fig. 10B



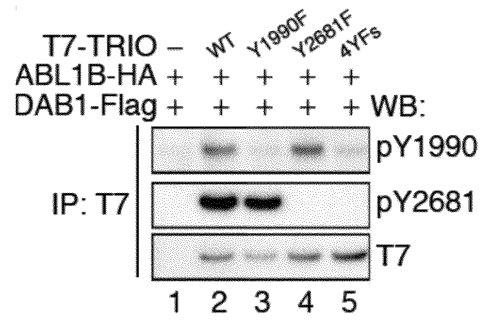
【図 12 B】

Fig. 12B



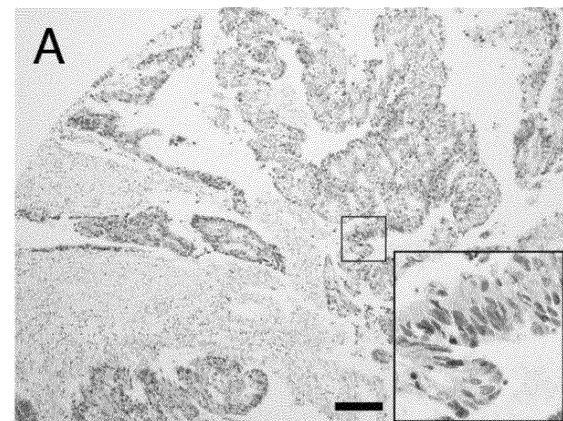
【図 11】

Fig. 11



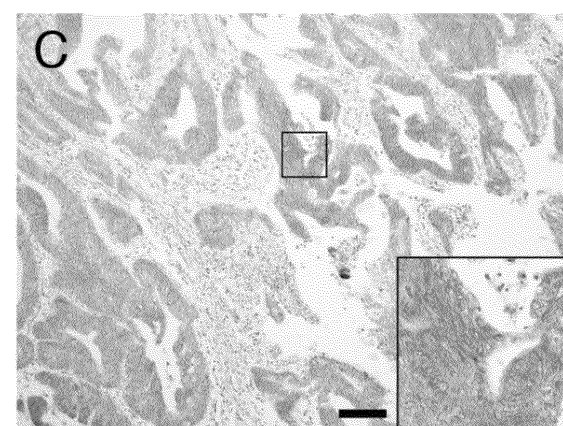
【図 12 A】

Fig. 12A



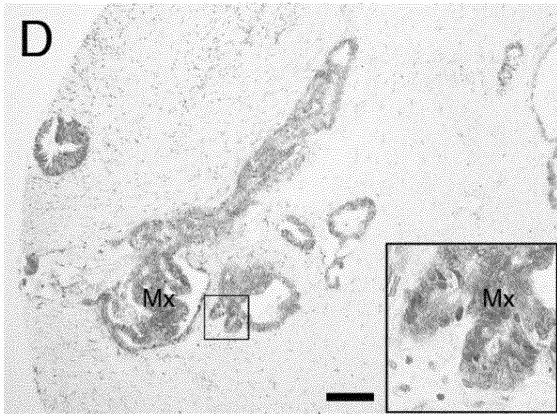
【図 12 C】

Fig. 12C



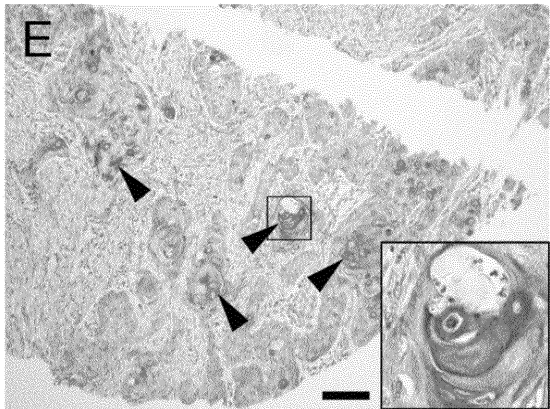
【図 1 2 D】

Fig. 12D



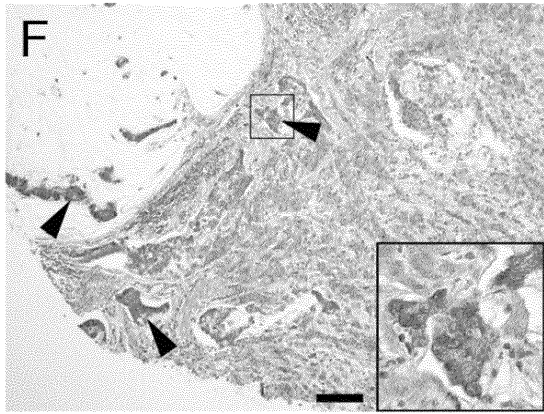
【図 1 2 E】

Fig. 12E



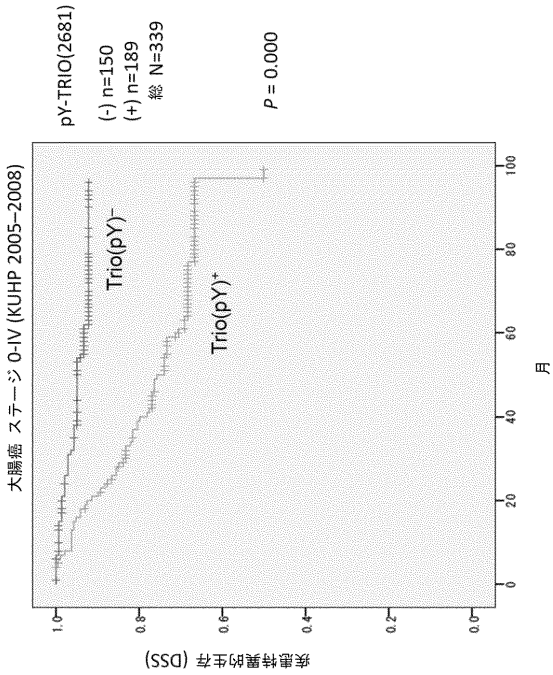
【図 1 2 F】

Fig. 12F



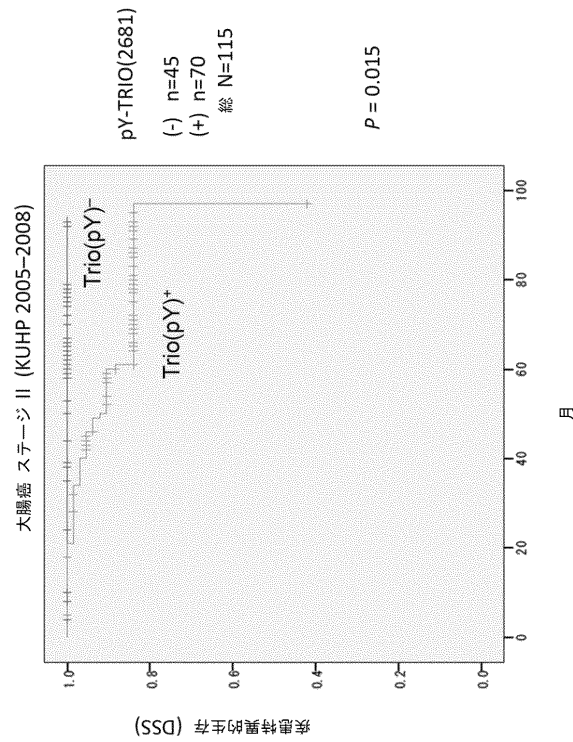
【図 1 3 A】

Fig. 13A



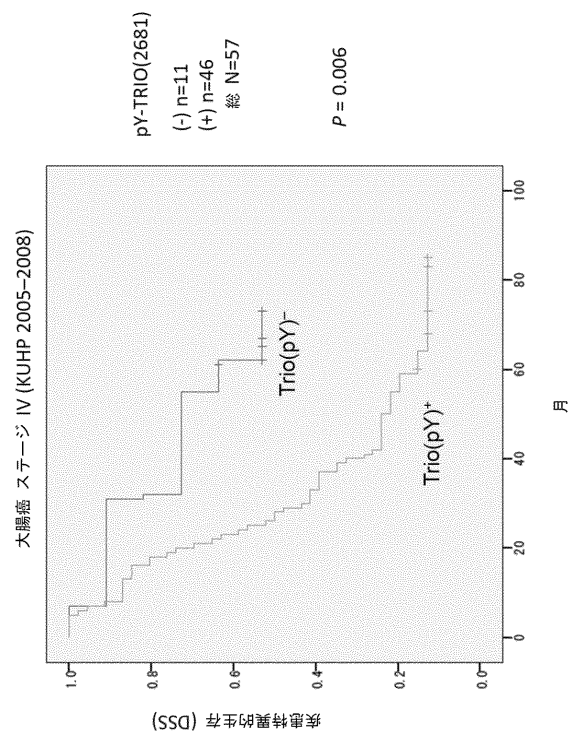
【図 13B】

Fig. 13B



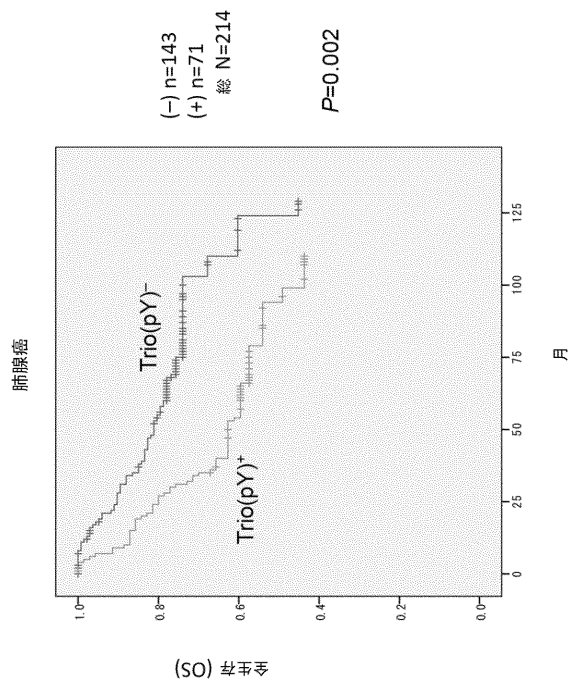
【図 13C】

Fig. 13C



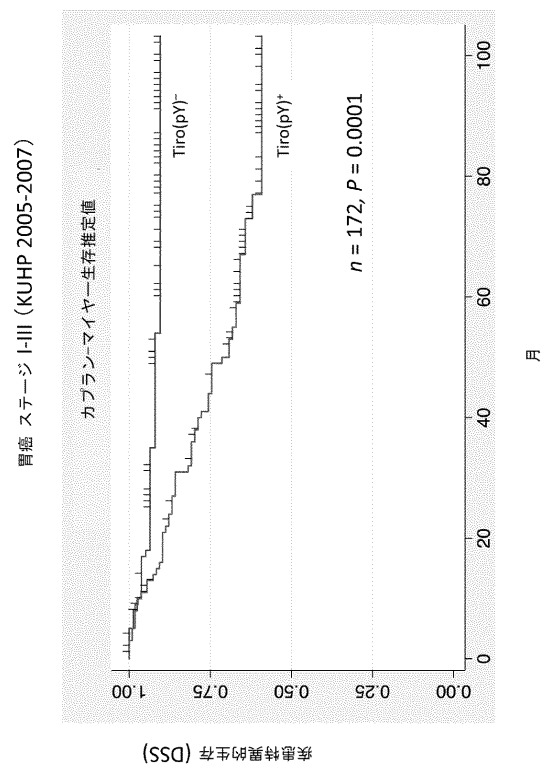
【図 14】

Fig. 14



【図 15】

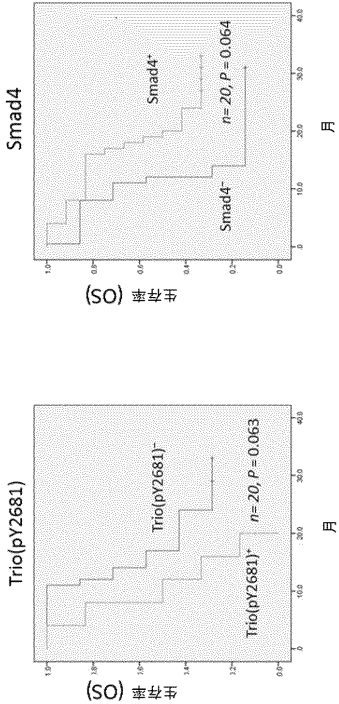
Fig. 15



【図 16】

Fig. 16

膵臓癌 (KUHP 2011)
Trio(pY2681) vs. Smad4



注 : Trio(pY2681)* と Smad4* の間に相関なし : P = 0.51

【配列表】

0006537143000001.app

フロンツページの続き

- (72)発明者 園下 将大
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 坂井 義治
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 河田 健二
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 板谷 喜朗
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 北条 弥作子

- (56)参考文献 米国特許第05994070 (US, A)
米国特許出願公開第2008/0255243 (US, A1)
北谷靖彦, PDGFRチロシンキナーゼ阻害剤による大腸癌間質反応の抑制と腫瘍増殖・転移抑制効果, 消化器科, 2007年, Vol.44, No.5, Page.463-467
Medley Quintus G, Signaling between focal adhesion kinase and trio, The Journal of biological chemistry, 2003年, Vol.278, No.15, Page.13265-13270
DeGeer Jonathan, Tyrosine phosphorylation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio regulates netrin-1/DCC-mediated cortical axon outgrowth, Molecular and cellular biology, 2013年 2月, Vol.33, No.4, Page.739-751, Electronic Publication Date: 10 Dec 2012
DEBANT A, The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains, Proc Natl Acad Sci USA, 1996年, Vol.93, No.11, Page.5466-5471
VAQUE Jose P, A Genome-wide RNAi Screen Reveals a Trio-Regulated Rho GTPase Circuitry Transducing Mitogenic Signals Initiated by G Protein-Coupled Receptors, Mol Cell, 2013年 1月10日, Vol.49, No.1, Page.94-108
Pantaleo, M. A., Targeted therapy in colorectal cancer: do we know enough?, Digestive and Liver Disease, 2006年, Vol.38, No.2, Page.71-77

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	诊断癌症预后的方法		
公开(公告)号	JP6537143B2	公开(公告)日	2019-07-03
申请号	JP2015556303	申请日	2014-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
[标]发明人	武藤誠 園下将大 坂井義治 河田健二 板谷喜朗		
发明人	武藤 誠 園下 将大 坂井 義治 河田 健二 板谷 喜朗		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 C07K16/32		
CPC分类号	A61K31/506 G01N33/57407 G01N33/57419 G01N33/57446 G01N33/57496 G01N33/6812 G01N2800/52 A61P1/04 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/3046 C07K16/40 C07K2317/34 G01N2333/91205 G01N2440/14		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/48.P G01N33/53.Y C07K16/32		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
审查员(译)	北条Yasakuko		
优先权	2013104027 2013-05-16 JP		
其他公开文献	JP2016526147A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于确定受试者中癌症预后的方法，其包括检测从受试者获得的样品中TR10的2681位酪氨酸残基的磷酸化的步骤。

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N	33/574 (2006. 01)	GO 1 N	33/574 Z N A A
GO 1 N	33/48 (2006. 01)	GO 1 N	33/48 P
GO 1 N	33/53 (2006. 01)	GO 1 N	33/53 Y
CO 7 K	16/32 (2006. 01)	CO 7 K	16/32

請求項の数 14 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2015-556303 (P2015-556303)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成26年5月15日 (2014. 5. 15)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2016-526147 (P2016-526147A)		京都府京都市左京区吉田本町 3 G 番地 1
(43) 公表日	平成28年9月1日 (2016. 9. 1)	(74) 代理人	100101454
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/063527		弁理士 山田 卓二
(87) 国際公開番号	W02014/185550	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成26年11月20日 (2014. 11. 20)		弁理士 青山 薫
審査請求日	平成29年5月10日 (2017. 5. 10)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	特願2013-104027 (P2013-104027)		弁理士 松谷 達子
(32) 優先日	平成25年5月16日 (2013. 5. 16)	(74) 代理人	100138911
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 櫻井 陽子
		(72) 発明者	武藤 誠
			京都府京都市左京区吉田本町 3 G 番地 1
			国立大学法人京都大学内

最終頁に続く