

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-505429

(P2013-505429A)

(43) 公表日 平成25年2月14日(2013.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く

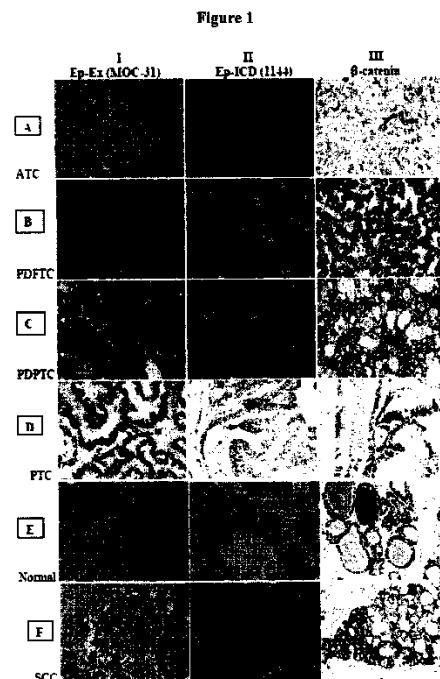
(21) 出願番号 特願2012-529080 (P2012-529080)
 (86) (22) 出願日 平成22年9月21日 (2010. 9. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年5月16日 (2012. 5. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2010/001503
 (87) 国際公開番号 W02011/032296
 (87) 国際公開日 平成23年3月24日 (2011. 3. 24)
 (31) 優先権主張番号 61/244, 173
 (32) 優先日 平成21年9月21日 (2009. 9. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505109875
 マウント シナイ ホスピタル
 カナダ国 エム5ジー 1エックス5 オン
 タリオ, トロント, ユニバーシティ ア
 ベニュー 600
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ウォルフィッシュ, ポール
 カナダ国 エム5アール 3ブイ7 オン
 タリオ, トロント, ヨークビル アベ
 ニュー 68, スイート 402
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 甲状腺癌を診断および処置するための方法および組成物

(57) 【要約】

被験体において甲状腺癌を検出、診断、およびモニタリングするための方法が記載される。これらの方法には、被験体由来の試料において、E p - I C Dおよび - カテニンを含むマーカーを測定する工程が含まれる。本発明はまた、本発明の方法を実行するためのキットおよび組成物を提供する。本発明のマーカーは、甲状腺癌のマーカーであり、具体的には、E p C A Mポリペプチドおよびそのドメイン（具体的には、エクストドメインE p E xと細胞内ドメインE P - I C D）、ならびに、 - カテニン（本明細書中ではまとめて「ポリペプチド甲状腺癌マーカー」という）、ならびに、そのようなポリペプチドおよびそのドメインをコードするポリヌクレオチド（本明細書中ではまとめて「ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー」という）が、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、未分化甲状腺癌（A T C））の生体マーカーを構成する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体において甲状腺癌と関係がある甲状腺癌マーカーを検出するための方法であって：

(a) 患者から試料を得る工程；

(b) 1つまたはそれより多い甲状腺癌マーカーを前記試料中で検出または同定する工程；および

(c) 検出した量を標準について検出した量と比較する工程

を含むか、あるいは本質的に前記工程からなり、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが E p - I C D および / または - カテニンである、方法。

【請求項 2】

甲状腺癌を診断するための方法であって：

(a) 被験体由来の試料から抽出される甲状腺癌マーカーのレベル；と

(b) 対照試料中の甲状腺癌マーカーのレベル

とを比較する工程を含み、ここでは、前記対照中の対応するレベルと比較した、甲状腺癌マーカーのレベルの有意な差が甲状腺癌の指標となり、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C D、 - カテニン、および状況に応じて E p E x である、方法。

【請求項 3】

前記被験体が、甲状腺癌のリスクがあるか、またはスクリーニングが必要な被験体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

甲状腺試料を特性決定または分類するための方法であって、対照と比較して甲状腺癌マーカーの発現の差を検出する工程を含み、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C D、 - カテニン、および状況に応じて E p E x である、方法。

【請求項 5】

被験体において甲状腺癌の特定の病期を診断する方法であって、前記被験体から得た試料中の甲状腺癌マーカーの状態を決定する工程を含み、ここでは、前記マーカーの異常な状態が特定の病期の存在を示し、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C D または - カテニンである、方法。

【請求項 6】

甲状腺癌についての処置の候補である被験体を同定するための診断方法であって、前記被験体から得た試料中の甲状腺癌マーカーの状態を決定する工程を含み、ここでは、前記試料中の前記甲状腺癌マーカーの異常な状態が、処置が望ましいかまたは必要であることを示し、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C D、 - カテニン、および状況に応じて E p E x である、方法。

【請求項 7】

前記異常な状態が、上昇した状態であってよく、低い状態であってよく、また陰性の状態であってよい、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

被験体において甲状腺癌の浸潤性または転移能を診断するための方法であって：

(a) 前記被験体から試料を得る工程；

(b) 甲状腺癌マーカーを前記試料中で検出する工程；および

(c) 検出した量を標準について検出した量と比較する工程

を含み、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C D および / または - カテニンである、方法。

【請求項 9】

前記標準または対照が、より低い悪性度の甲状腺癌を持つ被験体において検出されたレベルまたは量を含む、請求項 1 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

被験体において未分化甲状腺癌 (A T C) を診断するための方法であって：

(a) 被験体由来の試料を、標的である甲状腺癌マーカーのレベルを測定することができ

10

20

30

40

50

る試薬と接触させる工程であって、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C D、
 - カテニン、および状況に応じてE p E xである、工程；および
 (b) A T Cを有していない被験体から、もしくは異なる時間に前記被験体から採取した
 類似する試料から得た対照レベルを上回る、前記被験体由来の前記試料中での、E p - I
 C D、および - カテニンの少なくとも1つのレベルの増大、ならびに、状況に応じて、
 E p E xの減少に基づいて、前記被験体においてA T Cの診断を提供する工程
 を含む、方法。

【請求項11】

被験体において甲状腺癌の進行をモニタリングするための方法であって：(a) 第1の時
 点での患者由来の試料中で甲状腺癌マーカーを検出する工程；(b) 次の時点で工程(a
)を繰り返し行う工程；および(c) 工程(a)で検出したレベルと工程(b)で検出し
 たレベルを比較し、それにより、前記癌の進行をモニタリングする工程を含み、ここでは
 、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C Dまたは - カテニンである、方法。

10

【請求項12】

前記甲状腺癌マーカーが以下の工程により検出されるポリペプチドである、請求項1～1
 1のいずれか1項に記載の方法：

(a) 前記試料を、前記ポリペプチドまたはその一部に特異的に結合する結合剤と接触さ
 せる工程；および

(b) 予め決定した標準と比較して、前記結合剤に結合するポリペプチドの量を前記試料
 中で検出する工程。

20

【請求項13】

被験体において浸潤性甲状腺癌または転移能を持つ甲状腺癌の存在を検出あるいは診断す
 るための方法であって：

(a) 甲状腺癌マーカーに特異的に結合する結合剤を提供する工程；

(b) 前記結合剤と前記甲状腺癌マーカーとを含有する複合体の形成を可能にする条件下
 で、前記結合剤を前記被験体由来の試料と接触させる工程；

(c) 前記複合体の存在または量を決定する工程；および

(d) 前記被験体における浸潤性甲状腺癌または転移能を持つ甲状腺癌の存在を決定する
 ために、前記量を標準と比較する工程

を含み、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C Dまたは - カテニンである、
 方法。

30

【請求項14】

前記結合剤が抗体である、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記甲状腺癌マーカーがポリヌクレオチドである、請求項1～11のいずれか1項に記載
 の方法。

【請求項16】

前記ポリヌクレオチドがm R N Aまたはその断片である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記ポリヌクレオチドが以下の工程により検出される、請求項15に記載の方法：

40

(a) 前記試料を、前記ポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接
 触させる工程；および

(b) 予め決定した標準値またはカットオフ値と比較して、前記ポリヌクレオチドにハイ
 ブリダイズする核酸のレベルを前記試料中で検出し、それから、前記被験体における甲
 状腺癌の存在または不在を決定する工程。

【請求項18】

前記m R N Aが増幅反応を使用して検出される、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記増幅反応が、前記ポリヌクレオチドまたはそのようなポリヌクレオチドの相補鎖にハ
 イブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを利用するポリメラーゼ連鎖反応である

50

、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ポリヌクレオチドが RT-PCR を使用して検出される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 mRNA が、前記ポリヌクレオチドまたはそのようなポリヌクレオチドの相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを利用するハイブリダイゼーション技術を使用して検出される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

被験体において甲状腺癌を阻害することについて試験薬剤の潜在的有効性を評価するための方法であって：(a) 被験体から得た、前記試験薬剤に曝した第 1 の試料中の 1 つまたはそれより多い甲状腺癌マーカーのレベルであって、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、Ep-ICD および / または - カテニンである、レベルと、(b) 前記被験体から得た第 2 の試料中の前記甲状腺癌マーカーのレベルであって、ここでは、前記試料は前記試験薬剤に曝していない、レベルとを比較する工程を含み、ここでは、前記第 2 の試料と比較した前記第 1 の試料中での前記甲状腺癌マーカーの発現レベルの有意な差が、前記試験薬剤が、前記被験体において甲状腺癌を阻害することについて有効である可能性があることの指標となる、方法。

10

【請求項 23】

被験体において甲状腺癌を阻害するための薬剤を選択する方法であって：(a) 前記被験体から癌細胞を含有している試料を得る工程；(b) 前記試料のアリコートを複数の試験薬剤の存在下に別々に曝す工程；(c) 前記アリコートのそれぞれにおける 1 つまたはそれより多い甲状腺癌マーカーのレベルを比較する工程；および (d) 他の試験薬剤と比較して、前記試験薬剤のうちの 1 つを含有している前記アリコート中で前記甲状腺癌マーカーのレベルを変化させる前記試験薬剤のうちの 1 つを選択する工程を含み、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、Ep-ICD および / または - カテニンである、方法。

20

【請求項 24】

他の試験薬剤と比較して、前記試験薬剤のうちの少なくとも 1 つを含有している前記アリコート中で前記甲状腺癌マーカーのレベルを変化させる、前記試験薬剤のうちの少なくとも 1 つを、前記被験体に対して投与する工程をさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

試験化合物の甲状腺癌細胞の発癌の可能性を評価する方法であって：(a) 前記試験化合物の存在下および不在下で、甲状腺癌細胞の別々のアリコートを維持する工程；ならびに、(b) 前記アリコートのそれぞれにおける 1 つまたはそれより多い甲状腺癌マーカーの発現を比較する工程を含み、ここでは、前記試験化合物の不在下で維持した前記アリコートと比較した、前記試験化合物の存在下で維持した前記アリコート中の甲状腺癌マーカーのレベルの有意な差が、前記試験化合物が、甲状腺癌細胞の発癌の可能性を持つことの指標となり、前記甲状腺癌マーカーが、Ep-ICD および / または - カテニンである、方法。

30

【請求項 26】

前記試料が、組織、抽出物、細胞培養物、細胞溶解物、洗浄液 (lavage fluid)、または生理学的流体から得られる、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記試料が腫瘍組織から得られる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

甲状腺癌マーカーに結合する結合剤、または甲状腺癌マーカーをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするかもしくは甲状腺癌マーカーをコードするポリヌクレオチドを増幅する作用物質を含有している、浸潤性甲状腺癌あるいは転移能を持つ甲状腺癌を検出ならびに / あるいは診断するためのキットであって、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、Ep-ICD または - カテニンである、キット。

【請求項 29】

50

甲状腺癌マーカーに結合する抗体、または甲状腺癌マーカーをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするかもしくは甲状腺癌マーカーをコードするポリヌクレオチドを増幅するポリヌクレオチドの、甲状腺癌の浸潤性もしくは転移能を検出および/あるいは診断するための使用であって、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C Dまたは - カテニンである、使用。

【請求項30】

甲状腺癌の浸潤性もしくは転移能を検出および/または診断することにおける使用のための、甲状腺癌マーカーに結合する抗体または甲状腺癌マーカーをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするかもしくは甲状腺癌マーカーをコードするポリヌクレオチドを増幅するポリヌクレオチドを含有している組成物であって、ここでは、前記甲状腺癌マーカーが、E p - I C Dまたは - カテニンである、組成物。

10

【請求項31】

被験体において甲状腺癌を処置する方法であって、甲状腺癌の処置を必要とする被験体に対して、E p - C A M、E p - I C D、または - カテニンに特異的な抗体を送達する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、甲状腺癌を検出する、診断する、予想する、モニタリングする、および特性決定するため、ならびに、甲状腺癌の処置のための、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌）と関係があるマーカー、組成物、キット、ならびに方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

上皮細胞接着分子（E p C A M）は、いくつかのヒトの悪性腫瘍中で頻りに過剰発現を示す、40 k D aの膜貫通型糖タンパク質である〔非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3〕。E p C A Mは、迅速に増殖している上皮腫瘍上でのその高発現が原因で、癌マーカーとして最初に同定された〔非特許文献4の中で議論されている〕。正常な上皮は、変化しやすいが、一般的には癌細胞よりも低いレベルでE p C A Mを発現する。これは、正常な幹細胞および前駆細胞中でも過剰発現され〔非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7〕、そして、乳癌、結腸癌、膵臓癌、および前立腺癌中の癌源細胞の中でも過剰発現される〔A l - H a j j Mら、2003；O ' B r i e n C Aら、2007；R i c c i - V i t t i a n i Lら、2007〕。最近、E p C A Mが、広汎性子宮全摘出術後の子宮頸癌患者において、末梢血中のE 6 / E 7 - H P V腫瘍遺伝子を発現している循環中の腫瘍細胞の中で検出された〔W e i s m a n n Pら、2009〕。多くの癌組織および正常組織のE p C A M染色について、大規模なデータベースがある。しかし、これらの研究は全て、E p C A M前駆体もしくは細胞に結合したE p E x、または両方を検出しかねない、E p C A Mの細胞外ドメインに特異的な抗体を使用していた〔非特許文献3〕。

30

【0003】

E p C A Mは、細胞接着、細胞増殖、分化、移動、細胞周期の調節において重要な役割を担う多面的分子であり、癌および幹細胞のシグナル伝達に関与している〔M u n zら、2009〕。E p C A M発現を調節する分子機構は十分には理解されていない。最近、制御的膜内切断（R I P）が、インビトロおよびインビボでその分裂促進的シグナルトランスデューサーとして作用することが示された〔M a e t z e lら、2009〕。E p C A MエクストドメインであるE p E xの、プロテアーゼ - T A C Eおよびプレセニン - 2による切断および脱落により、その細胞内ドメイン（E p - I C D）が遊離し、これは核に移行する。F H L 2ならびにW n t経路の構成要素である - カテニンおよびL e f - 1とのE p - I C Dの会合により、L e f - 1コンセンサス部位でD N Aに結合し、遺伝子の転写を誘導して、細胞増殖の増大をもたらす核複合体が形成し、これは、免疫不全マウスにおいて発癌性であることが示されている〔M a e t z e l , 2009〕。発癌性シグ

40

50

ナルトランスドューサー、細胞接着分子、および癌幹細胞マーカーとしてのE p C A Mの多数の役割を考慮すると[L i t v i n o v S Vら、1997; M u n zら、2009]、ヒトの癌における核E p - I C Dの臨床的重要性を立証することが重要である。

【0004】

核E p - I C Dは、ヒトの結腸癌において予備的研究段階にあることが最近報告されたが、正常な結腸上皮においてはそうではない[M a e t z e l , 2009]。固形腫瘍における相当の不均質性を考慮すると、他のヒトの癌における核E p - I C Dの臨床的重要性はまだ立証されていない。さらに、E p C A Mは、c - m y c、サイクリンAおよびEのアップレギュレーションにより細胞増殖を増大させることが示されている[M u n zら、2004]。

10

【0005】

甲状腺癌(TC)は、内分泌系悪性腫瘍全体の90%を占め、世界中では122,800例の年間発症率、そして米国においてはおよそ33,000の症例が新たに診断されると推定される[R e i sら、2005; J e m a lら、2008]。未分化甲状腺癌(anaplastic thyroid cancer)(ATC)は稀であるが、この悪性腫瘍の極めて浸潤性の形態であり、甲状腺癌全体の2%未満を占める。ATCは一般的には、局所的に拡がり、隣接構造を圧迫する、迅速に拡大する頸部腫瘍の症状を示し、所属リンパ節と遠隔部位に広まる傾向がある[P a s i e k a J Lら、2003; A r e C & S h a h a 2006]。最も高分化型の甲状腺癌は、それらに初期転移の傾向があるにもかかわらず、良好な予後を示し、95%を上回る5年相対生存率がある。しかし、分化の度合いが低い甲状腺腫瘍である未分化甲状腺腫瘍および他の浸潤転移性甲状腺癌は致命的であり得、生存期間メジアンは4か月から5年の範囲である[A r e C & S h a h a , 2006]。臨床転帰におけるこのばらつきは、それらの悪性腫瘍の発生の間に浸潤性甲状腺腫瘍および非浸潤性甲状腺腫瘍が後天的に獲得した遺伝子損傷の差が原因であり得る。

20

【0006】

ATCの病因は、B R A F、R A S、 - カテニン、P I K 3 C A、T P 5 3、A X I 1、P T E N、およびA P C遺伝子中の突然変異と関係がある[S m a l l r i d g e R Cら、2009の中で議論されている]。セリン/スレオニンキナーゼP o l l o様キナーゼ1(P L K 1)のアップレギュレーションを示すという、ATC中での遺伝子発現の特徴が同定されており、ATCにおける治療標的としてのその可能性が研究されている[S a l v a t o r e Gら、2007 CR; N a p p i T Cら、2009]。しかし、浸潤性TCを同定するための、実証された予想用分子マーカーは存在していない。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】S p i z z oら、B r e a s t C a n c e r R e s T r e a t . (2004); 86: 207~13

【非特許文献2】W e n t Pら、B r J C a n c e r . (2006); 94: 128~35

40

【非特許文献3】W e n q i Dら、J C a n c e r R e s C l i n O n c o l . (2009); 135: 1277~85

【非特許文献4】T r z p i s Mら、A m J P a t h o l . (2007); 171: 386~95

【非特許文献5】S t i n g l Jら、B r e a s t C a n c e r R e s T r e a t . (2001); 67: 93~109

【非特許文献6】S c h m e l z e r Eら、F r o n t B i o s c i . (2008); 13: 3096~100

【非特許文献7】T r z p i s Mら、F r o n t B i o s c i . (2008); 13: 5050~5

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、甲状腺癌のマーカに関する。具体的には、E p C A Mポリペプチドおよびそのドメイン（具体的には、エクストドメインE p E xと細胞内ドメインE P - I C D）、ならびに、 β -カテニン（本明細書中ではまとめて「ポリペプチド甲状腺癌マーカー」という）、ならびに、そのようなポリペプチドおよびそのドメインをコードするポリヌクレオチド（本明細書中ではまとめて「ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー」という）が、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、未分化甲状腺癌（A T C））の生体マーカーを構成する。ポリペプチド甲状腺癌マーカーおよびポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー、ならびにそれらの一部または断片は、本明細書中ではまとめて「甲状腺癌マーカー」と呼ばれる場合がある。

10

【0009】

用語「甲状腺癌マーカー」には、本発明のいくつかの態様においては、W n tタンパク質およびW n tタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれ得る。したがって、「ポリペプチド甲状腺癌マーカー」には、いくつかの態様においては、W n tタンパク質が含まれ、そして「ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー」には、いくつかの態様においては、W n tタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【0010】

したがって、甲状腺癌マーカーおよび甲状腺癌マーカーと相互作用する物質が、甲状腺癌の検出、診断、特性決定、分類、およびモニタリング（すなわち、癌の進行または治療的処置の有効性のモニタリング）に、甲状腺癌の素因がある被験体の同定に、ならびに、予後または患者の生存性の決定に使用され得る。本発明の複数の態様においては、甲状腺癌マーカー（具体的には、E p - I C D、 β -カテニン、およびE p E x）が、甲状腺癌の浸潤性（a g g r e s s i v e n e s s）の特性決定に使用される。本発明のいくつかの態様においては、上記甲状腺癌マーカーは、転移能または患者の生存性を決定するために使用される。本発明はまた、甲状腺組織の状態を評価するための方法と、甲状腺癌の診断および治療のための方法も検討する。

20

【0011】

甲状腺癌マーカー（単数または複数）がアッセイされる本発明の方法は、他のマーカーをアッセイする方法と比較して高い感度および/または特異性を有し得る。臨床的感度の向上は、約5～10%の感度の向上、具体的には、6～9%の感度の向上、より具体的には、8%の感度の向上であり得る。本発明の方法の1つの実施形態においては、腫瘍試料中で検出された甲状腺癌マーカー（単数または複数）は、少なくとも約80～99%の甲状腺癌の臨床的感度を提供し、具体的には、90～95%、より具体的には、91%、92%、93%、94%、95%、または98%の甲状腺癌の臨床的感度を提供する。核E p - I C D、核 β -カテニン、および細胞質 β -カテニンのうちの1つ以上が腫瘍試料中で検出される本発明の複数の実施形態においては、臨床的感度は約80～90%を上回り得、より具体的には、約80～85%を上回る、最も具体的には、約83%、84%、85%、90%、95%、または98%を上回り得る。臨床的感度および特異性は、当業者に公知の方法を使用して決定され得る。

30

40

【0012】

本発明の方法にしたがうと、試料中の甲状腺癌マーカーは、（a）マーカーに対応するポリペプチドもしくはポリペプチド断片；（b）マーカーがそれと実質的に同一である少なくとも1つの部分を有している転写された核酸もしくはその断片；および/または（c）転写された核酸もしくはその断片（ここでは、上記核酸はマーカーとハイブリダイズする）の、試料中での存在を検出することにより評価することができる。

【0013】

本発明の1つの態様においては、患者において、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、未分化甲状腺癌）と関係がある甲状腺癌マーカーを検出するための

50

方法が提供される。この方法には以下の工程が含まれるか、または本質的に以下の工程からなる：

- (a) 患者から試料を得る工程；
- (b) 1つ以上の甲状腺癌マーカーを上記試料中で検出または同定する工程、および
- (c) 上記検出した量を、標準について検出した量と比較する工程。

【 0 0 1 4 】

本発明の方法にしたがうと、甲状腺組織は、例えば、(a) 甲状腺癌マーカー；(b) ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーがそれと実質的に同一である少なくとも1つの部分を有している、転写された核酸もしくはその断片；および/または(c) 転写された核酸もしくはその断片(ここでは、上記核酸はポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーとハイブリダイズする)の、試料中での存在を検出することにより、評価あるいは特性決定することができる。試料中の甲状腺癌マーカーは、本明細書中に記載される、当該分野で一般的に公知の方法により決定され得る。

10

【 0 0 1 5 】

1つの態様において、本発明は、甲状腺試料を特性決定または分類するための方法を提供する。この方法には、対照と比較して第1の複数の甲状腺癌マーカーの発現の差を検出する工程が含まれる。第1の複数のマーカーは、E p - I C D、 - カテニン、および状況に応じてE p E xからなる。

【 0 0 1 6 】

本発明の1つの態様は、患者において甲状腺癌を検出するための方法を提供する。この方法には、患者から得た試料中の甲状腺癌マーカーの状態を決定する工程が含まれ、ここでは、試料中の異常な状態が甲状腺癌の存在を示す。甲状腺癌マーカーは、特定の病期と相関関係があり得る。したがって、本発明の別の態様は、患者において甲状腺癌の特定の病期を診断する方法を提供する。この方法には、患者から得た試料中の甲状腺癌マーカーの状態を決定する工程が含まれ、ここでは、マーカーの異常な状態が特定の病期の存在を示す。

20

【 0 0 1 7 】

本発明の別の態様は、患者において甲状腺癌をスクリーニングする方法を提供する。この方法には、甲状腺癌のリスクがあるか、または患者から得た試料中の甲状腺癌マーカーの状態をスクリーニングし、決定する必要がある患者を同定する工程が含まれる。ここでは、マーカーの異常な状態が、甲状腺癌の存在またはその特定の病期を示す。

30

【 0 0 1 8 】

別の態様は、甲状腺癌の処置の候補である患者を同定する工程、および上記患者から得た試料中の甲状腺癌マーカーの状態を決定する工程を含む診断方法を提供する。ここでは、試料中の甲状腺癌マーカーの異常な状態が、処置が望ましいかまたは必要であることを示す。

【 0 0 1 9 】

本発明の複数の態様においては、異常な状態は、上昇した状態、低い状態、または陰性の状態であり得る。甲状腺癌を検出または診断するための本発明の1つの実施形態においては、異常な状態は上昇した状態である。

40

【 0 0 2 0 】

1つの態様において、本発明は、被験体においてA T Cを診断するための方法を提供する。この方法には以下の工程が含まれる：

(a) 被験体由来の試料を、標的である甲状腺癌マーカー(具体的には、E p - I C D、 - カテニン、ならびに状況に応じてE p E xおよびc - m y cから選択される少なくとも1つの甲状腺癌マーカー)のレベルを測定することができる試薬と接触させる工程；ならびに

(b) A T Cを有していない被験体から、または異なる時間に上記被験体から採取した類似する試料から得た対照レベルを上回る、上記被験体由来の試料中の、E p - I C Dおよび - カテニン、および状況に応じてc - m y cのうちの少なくとも1つのレベルの増大

50

、ならびに、状況に応じて E p E x の低下に基づいて、上記被験体において A T C の診断を提供する工程。

【 0 0 2 1 】

本発明のこの態様の複数の実施形態においては、測定される甲状腺癌マーカーは核 E p - I C D、核 - カテニン、細胞質 - カテニン、および状況に応じて E p E x である。

【 0 0 2 2 】

本発明の 1 つの実施形態においては、患者において、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、未分化甲状腺癌）と関係がある、E p - I C D、 - カテニン、E p E x、および E p C A M のうちの 1 つ以上を検出するための方法が提供される。この方法には、以下の工程が含まれるか、または本質的に以下の工程からなる：

- (a) 患者から試料を得る工程；
- (b) E p - I C D、 - カテニン、E p E x、および E p C A M のうちの 1 つ以上を、上記試料中で検出または同定する工程；ならびに
- (c) 上記検出した量を標準について検出した量と比較する工程。

【 0 0 2 3 】

本発明の特定の実施形態においては、患者において A T C を診断するための方法が提供される。この方法には以下の工程が含まれるか、または本質的に以下の工程からなる：

- (a) 核 E p - I C D、核 - カテニン、および細胞質 - カテニンのうちの 1 つ以上を試料中で検出または同定する工程；ならびに
- (b) 上記検出した量を、標準について検出した量と比較する工程であって、ここでは、核 E p - I C D、核 - カテニン、および細胞質 - カテニンのうちの 1 つ以上の増大が A T C の指標となる工程。

【 0 0 2 4 】

本発明の特定の実施形態においては、患者において A T C を診断するための方法が提供される。この方法には以下の工程が含まれるか、または本質的に以下の工程からなる：

- (a) 核 E p - I C D、核 - カテニン、細胞質 - カテニン、および E p E x（例えば、膜 E p E x）のうちの 1 つ以上を、試料中で検出または同定する工程；ならびに
- (b) 上記検出した量を標準について検出した量と比較する工程であって、ここでは、核 E p - I C D、核 - カテニン、および細胞質 - カテニンのうちの 1 つ以上の増大、ならびに E p E x の減少もしくは E p E x が存在しないことが A T C の指標となる、工程。

【 0 0 2 5 】

本発明の特定の態様においては、患者において、浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌と関係がある甲状腺癌マーカー（好ましくは、E p - I C D および / または - カテニン）を検出するための方法が提供される。この方法には以下の工程が含まれるか、または本質的に以下の工程からなる：

- (a) 患者から試料（例えば、腫瘍試料）を得る工程；
- (b) 甲状腺癌マーカー（好ましくは、E p - I C D および / または - カテニン）を、上記試料中で検出する工程；ならびに
- (c) 上記検出した量を標準について検出した量またはカットオフ値と比較する工程。

【 0 0 2 6 】

用語「検出する」または「検出」には、標的マーカー（単数または複数）、サブユニット、試薬が結合した標的の組み合わせなどの有無をアッセイすることまたは別の方法で立証すること、あるいは、甲状腺癌の 1 つ以上の実質的特徴（例えば、浸潤性、転移能、または患者の生存性）を確認する、立証する、または別の方法で決定するためにアッセイを行うことが含まれる。標準は、疾患を有していない対照被験体または初期段階の疾患（例えば、甲状腺乳頭癌のような低悪性度の甲状腺癌）を有している対照被験体由来の試料について、あるいは、上記被験体の他の試料から定量化したレベルに対応し得る。

【 0 0 2 7 】

本発明は、患者が甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌、より具体的には、A T C）に罹患しているかどうか、またはその素因があるかどうかを評価す

10

20

30

40

50

る方法を提供する。この方法には：

- (a) 患者由来の甲状腺癌マーカーのレベル；と
 - (b) 甲状腺癌に罹患していない対照患者または低悪性度の甲状腺癌に罹患した対照患者から得た同じタイプの試料中の甲状腺癌マーカーの標準レベル
- とを比較する工程が含まれる。ここでは、甲状腺癌マーカーの対応する標準レベルと比較した甲状腺癌マーカーのレベルの変化が、患者が甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌、より具体的には、A T C）に罹患していることの指標となる。

【 0 0 2 8 】

患者が浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌（具体的には、A T C）に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの態様では、対応する正常レベルもしくは低悪性度の甲状腺癌を有している患者由来のレベルと比較した、試料中での高レベルの核 E p - I C D、核 - カテニン、または細胞質 - カテニンと、低レベルの E p E x（例えば、膜 E p E x）または E p E x が存在しないことが、患者が浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌（具体的には、A T C）に罹患していることの指標となる。

10

【 0 0 2 9 】

患者が未分化甲状腺癌に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の核 E p - I C D のレベルが標準に対して比較され、標準と比較して高レベルの核 E p - I C D が未分化甲状腺癌の指標となる。

【 0 0 3 0 】

患者が未分化甲状腺癌に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の核 - カテニンのレベルが標準に対して比較され、標準と比較して高レベルの核 - カテニンが未分化甲状腺癌の指標となる。

20

【 0 0 3 1 】

患者が未分化甲状腺癌に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の細胞質 - カテニンのレベルが標準に対して比較され、標準と比較して高レベルの細胞質 - カテニンが未分化甲状腺癌の指標となる。

【 0 0 3 2 】

患者が未分化甲状腺癌に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の膜 E p E x のレベルが標準に対して比較され、標準と比較して低レベルの膜 E p E x または膜 E p E x が存在しないことが未分化甲状腺癌の指標となる。

30

【 0 0 3 3 】

患者が濾胞性甲状腺癌（F T C）に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の膜 E p E x、核 E p - I C D、細胞質 E p - I C D、および - カテニンのレベルが標準に対して比較される。

【 0 0 3 4 】

患者が濾胞性甲状腺癌（F T C）に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の膜 E p E x、核 E p - I C D、および細胞質 E p - I C D のレベルが標準に対して比較される。1つの実施形態では、核 E p - I C D が存在しないことまたは低レベルの核 E p - I C D と、状況に応じて、高レベルの細胞質 - カテニンが存在する。

40

【 0 0 3 5 】

患者が甲状腺乳頭癌（P T C）に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の膜 E p E x、核 E p - I C D、細胞質 E p - I C D、および - カテニンのレベルが標準に対して比較される。1つの実施形態では、核 E p - I C D および - カテニンは存在しないか、または、低レベルの核 E p - I C D および - カテニンが存在する。

【 0 0 3 6 】

患者が、甲状腺の扁平上皮細胞癌に罹患しているかどうかを評価するための本発明の方法の1つの実施形態においては、患者由来の試料中の膜 E p E x、核 E p - I C D、細胞

50

質 E p - I C D、および - カテニンのレベルが標準に対して比較される。

【0037】

特定の態様においては、本発明の方法は、被験体において甲状腺癌の病期を診断するため、または被験体において甲状腺癌を特性決定するために使用される。1つの実施形態では、この方法には：

(a) 上記患者由来の試料（例えば、生検試料）に由来する甲状腺癌マーカーのレベル；と

(b) 甲状腺癌を持たない患者または甲状腺癌の異なる病期（例えば、低悪性度の甲状腺癌）にある対照患者から得た同じタイプの対照試料中、あるいは、異なる時間に採取したその患者由来の試料による甲状腺癌マーカーのレベル

とを比較する工程が含まれ、ここでは、対照試料中の対応するレベルと比較した甲状腺癌マーカーのレベルの変化が、その患者が、より浸潤性の甲状腺癌または転移性の甲状腺癌に罹患していることの指標となる。

【0038】

複数の実施形態において、浸潤性甲状腺癌は A T C であり、甲状腺癌マーカーは、核 E p - I C D、核 - カテニン、および細胞質 - カテニンのうちの1つ以上である。特定の実施形態においては、甲状腺癌マーカーは核 E p - I C D である。

【0039】

本発明はさらに、被験体における、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌、より具体的には、A T C）の検出あるいは診断のための、非侵襲的であり非外科的である方法を提供する。この方法には以下の工程が含まれる：被験体から試料（例えば、生検試料）を得る工程；上記試料を甲状腺癌マーカー（単数または複数）を検出するための手順に供する工程；甲状腺癌を有していない対照被験体または低悪性度の甲状腺癌を有している対照被験体から、あるいは異なる時間に採取したその患者由来の試料から得た甲状腺癌マーカー（単数または複数）のレベルに対して、甲状腺癌マーカー（単数または複数）のレベルを比較することにより、甲状腺癌を検出あるいは診断する工程。本発明のこの方法の複数の実施形態においては、甲状腺癌マーカー（単数または複数）は、核 E p - I C D、核 - カテニン、細胞質 - カテニンのうちの1つ以上である。特定の実施形態においては、甲状腺癌マーカーは核 E p - I C D である。

【0040】

本発明の複数の態様においては、浸潤性甲状腺癌（具体的には、A T C）が、対照から、または異なる時間に採取したその患者由来の試料から得たそのようなレベルと比較した場合の、核 E p - I C D、核 - カテニン、細胞質 - カテニンのうちの1つ以上のレベルの増大の決定により検出される、診断される、または特性決定される。

【0041】

特定の実施形態においては、本発明は、被験体において甲状腺癌の浸潤性を診断するための方法を提供する。この方法には以下の工程が含まれる：

(a) 被験体由来の試料（例えば、腫瘍試料）中の核 E p - I C D の量を決定する工程；

(b) 上記試料中の核 - カテニンおよび - カテニンの一方または両方の量を決定する工程；

(c) 上記試料中の E p E x の量を決定する工程；

(d) 工程 (a) の結果と工程 (b) の結果、および状況に応じて工程 (c) の結果を数学的に組み合わせ、数学的組み合わせを得る工程；ならびに

(e) 甲状腺癌の浸潤性に対して上記数学的組み合わせを比較するかまたは相関させる工程。

【0042】

上記組み合わせは、好ましくは、予め決定された標準についての数学的組み合わせに対して比較される。

【0043】

1つの態様においては、本発明は、患者において甲状腺癌の進行をモニタリングするた

10

20

30

40

50

めの方法を提供する。この方法には以下の工程が含まれる：

(a) 最初の時点の患者試料 (例えば、生検試料) 中の甲状腺癌マーカー (単数または複数) を検出する工程；

(b) 次の時点で工程 (a) を繰り返し行う工程；および

(c) (a) で検出したレベルと (b) で検出したレベルを比較し、それにより、患者において甲状腺癌の進行をモニタリングする工程。

【 0 0 4 4 】

本発明は、甲状腺癌を有している患者を分類するための方法を提供する。この方法には、患者由来の試料 (例えば、腫瘍試料) 中の甲状腺癌マーカー (単数または複数) を測定する工程、および分類群に階層化した甲状腺癌患者から甲状腺癌マーカーについて測定した値に対して、測定した値を相関させる工程が含まれる。この方法は、患者の生存性を予想するために使用することができる。ここでは、甲状腺癌マーカー (単数または複数) が生存性の予想となり、上記分類群には、全生存率が既知である群が含まれる。本発明のこの方法の複数の態様においては、甲状腺癌マーカー (単数または複数) は、E p - I C D および - カテニン (具体的には、核 E p - I C D、核 - カテニン、および細胞質 - カテニン) から選択される。様々な実施形態において、測定される値は、より正確な定量化を提供するため、そして実験によるばらつきを補正するために正規化することができる。

10

【 0 0 4 5 】

本発明の特に有用な態様においては、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー (好ましくは、E p - I C D および / または - カテニンをコードするポリヌクレオチド) が検出され、患者由来の試料 (例えば、生検試料) 中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーのレベルが、甲状腺癌を有していない患者、低悪性度の甲状腺癌を有している患者の試料由来のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーのレベル、または同じ患者の複数の試料に由来するレベルと比較される。本発明の方法は、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー、および好ましくは、E p - I C D をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、1 つ以上のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、または核酸を利用することができる。本発明の 1 つの態様においては、E p - I C D m R N A が検出される。

20

【 0 0 4 6 】

本発明は、被験体由来の試料において甲状腺癌 (より具体的には、甲状腺癌の病期) を診断および特性決定するための方法に関する。この方法には、上記試料から核酸 (好ましくは、m R N A) を単離する工程、および上記試料中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを検出する工程が含まれる。1 つの実施形態では、標準または対照と比較した、上記試料中の E p - I C D および / または - カテニンをコードするポリヌクレオチドの増大したレベルの存在が、甲状腺癌の浸潤性または転移能の指標となり、特に、A T C の指標となる。

30

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、被験体において、甲状腺癌の存在または不在、あるいは、甲状腺癌の浸潤性または転移能を決定するため、具体的には、被験体において A T C を決定するための方法を提供する。この方法には、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) にハイブリダイズする核酸のレベルを試料中で検出する工程、および上記レベル (単数または複数) を予め決定した標準値またはカットオフ値と比較する工程、ならびにそれから、被験体における甲状腺癌の存在または不在、あるいは甲状腺癌の浸潤性または転移能を決定する、具体的には、被験体において A T C を決定する工程が含まれる。1 つの実施形態においては、被験体において甲状腺癌の浸潤性または転移能を決定するための方法が提供される。この方法には以下の工程が含まれる：(a) 被験体から採取した試料を E p - I C D および / または - カテニンをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させる工程；ならびに、(b) 予め決定した標準値またはカットオフ値と比較して、オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする核酸のレベルを上記試料中で検出し、それから、被験体における癌の浸潤性または転移能を決定する工程。

40

50

【0048】

1つの態様においては、本発明は、患者において甲状腺癌の浸潤性または転移能を評価する方法を提供する。この方法は：

(a) 患者由来の試料中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）のレベル；と

(b) 甲状腺癌に罹患していない対照患者もしくは低悪性度の甲状腺癌を有している対照患者から得た同じタイプの試料中、または異なる時間に採取したその患者由来の試料からのポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の対照レベル

とを比較する工程を含む。ここでは、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の対応する対照レベルと比較した、上記ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）レベルの変化が、甲状腺癌の浸潤性または転移能の指標となる。

10

【0049】

患者が浸潤性または転移性甲状腺癌（具体的には、ATC）に罹患しているかどうかを評価するための本発明の特定の方法においては、対応する対照レベルと比較した、試料中の高レベルのEp-ICDおよび/または - カテニンが、上記患者が浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌に罹患していることの指標となる。

【0050】

特定の実施形態においては、mRNAである核酸の量が、例えば、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）またはそのようなポリヌクレオチドの相補鎖（complement）にハイブリダイズする少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような増幅反応により検出される。他の実施形態では、mRNAの量が、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）またはその相補鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを利用し、ハイブリダイゼーション技術を使用して検出される。

20

【0051】

mRNAの検出を使用する場合は、上記方法は、標準的な方法にしたがって、単離したmRNAを、cDNAに変換するための試薬と混合する工程；変換したcDNAを、増幅産物を生成するための適切なプライマー混合物とともに増幅反応試薬で処理する工程；ならびに、試料中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の存在を検出するために増幅産物を分析する工程により行うことができる。mRNAについては、分析工程は、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の存在を検出するためのRT-PCR分析を使用して行うことができる。分析工程は、増幅産物中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の存在を定量的に検出する工程、ならびに、類似するプライマーを使用して導いた正常な試料および悪性腫瘍の試料（例えば、組織試料、具体的には、異なる病期の甲状腺癌を有している患者由来の組織試料）中での既知である有無についての予想される値のパネルに対して、検出したポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の量を比較する工程により行うことができる。

30

【0052】

したがって、本発明は、(a) 試料からmRNAを単離する工程、および上記mRNAを、mRNAをcDNAに変換する試薬と混合する工程；(b) 変換したcDNAを、増幅産物を生成するために、増幅反応試薬およびポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）にハイブリダイズする核酸プライマーで処理する工程；(c) mRNAポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー（単数または複数）の量を検出するために増幅産物を分析する工程；ならびに、(d) 類似する核酸プライマーを使用して導いた正常な組織および悪性腫瘍組織（例えば、異なる病期の甲状腺癌を持つ患者由来の組織）について予想した値のパネルについて検出した量に対して、mRNAの量を比較する工程により、mRNAが検出される方法を提供する。

40

【0053】

タンパク質に基づく方法もまた、被験体において甲状腺癌（具体的には、甲状腺癌、より具体的には、ATCの浸潤性または転移能）を診断およびモニタリングするために使用

50

することができる。この方法には、被験体由来の試料において甲状腺癌マーカーを検出する工程が含まれる。甲状腺癌マーカーは、甲状腺癌マーカーについての結合剤 (binding agent)、好ましくは、甲状腺癌マーカーと特異的に反応する抗体またはその一部を使用して検出され得る。

【0054】

本発明は、患者が甲状腺癌 (具体的には、浸潤性または転移性甲状腺癌、より具体的には、ATC) に罹患しているかどうかを評価する方法を提供する。この方法には：

(a) 患者由来の試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーのレベル；と

(b) 非癌試料中または低悪性度の甲状腺癌を持つ患者由来の試料中、あるいは、異なる時間に採取したその患者由来の試料によるポリペプチド甲状腺癌マーカーの対照レベルとを比較する工程が含まれる。ここでは、対照レベルと比較した、患者由来の試料中での有意に異なるポリペプチド甲状腺癌マーカーのレベル (例えば、患者試料中で高い) が、上記患者が、甲状腺癌、または浸潤性もしくは転移性甲状腺癌 (具体的には、ATC) に罹患していることの指標となる。

10

【0055】

別の態様において、本発明は、患者において、甲状腺癌 (具体的には、ATC) の有無、あるいは甲状腺癌の浸潤性または転移能を決定するための方法を提供する。この方法には、以下の工程が含まれる：(a) 患者から得た生物学的試料を、ポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) に特異的に結合する結合剤と接触させる工程；および (b) 予め決定した標準値またはカットオフ値と比較して、結合剤 (単数または複数) に結合するポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) の量を上記試料中で検出し、それから、患者における甲状腺癌の浸潤性または転移能の有無を決定する工程。

20

【0056】

1つの実施形態において、本発明は、被験体由来の生物学的試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) を定量化することにより、被験体において甲状腺癌を検出する、診断する、病期診断する、およびモニタリングするための方法に関する。この方法には、(a) 生物学的試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されたポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) に特異的な抗体と反応させる工程；ならびに、(b) 検出可能な物質を検出する工程が含まれる。

30

【0057】

別の実施形態において、本発明は、試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) の発現を検出するために抗体を使用する方法を提供する。この方法には：(a) ポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) に特異的な抗体を、抗体：タンパク質複合体の形成を可能にする条件下で試料と混合する工程；および (b) 上記複合体の形成を検出する工程が含まれる。ここでは、複合体の形成が、試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) の発現を示す。発現は、標準と比較され得、甲状腺癌、あるいは、甲状腺癌 (具体的には、ATC) の浸潤性または転移能の診断となる。

【0058】

1つの態様においては、本発明は、患者において甲状腺癌の進行をモニタリングするための方法を提供する。この方法には以下の工程が含まれる：

40

(a) 第1の時点での患者試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカー (単数または複数) を検出する工程；および

(b) 次の時点で工程 (a) を繰り返し行う工程；ならびに

(c) (a) で検出したレベルと (b) で検出したレベルを比較し、それにより、患者において甲状腺癌の進行をモニタリングする工程。

【0059】

本発明はさらに、患者において、甲状腺癌 (より具体的には、浸潤性または転移性甲状腺癌) についての治療の有効性を評価する方法に関する。この方法には：

(a) 患者に治療の少なくとも一部を提供する前に患者から得た第1の試料中の甲状腺癌マーカーのレベル；と

50

(b) 治療後に患者から得た第2の試料中の甲状腺癌マーカーのレベルとを比較する工程が含まれる。

【0060】

第1の試料と比較した、第2の試料中の甲状腺癌マーカーの有意に異なるレベルが、その治療が甲状腺癌（より具体的には、未分化甲状腺癌）の阻害に有効であることの指標となる。1つの実施形態では、この方法は、甲状腺癌（より具体的には、浸潤性または転移性甲状腺癌）の阻害について治療の有効性を評価するために使用され、第1の試料と比較した第2の試料中での核E p - I C D、核 - カテニン、または細胞質 - カテニンの低いレベルが、その治療が癌あるいは転移の阻害に有効であることの指標となる。治療は、甲状腺癌を処置するための任意の治療であり得、これには、化学療法、免疫療法、遺伝子治療、放射線治療、および外科手術による組織の切除が含まれるが、これらに限定されるわけではない。したがって、この方法は、例えば、全身腫瘍組織量の減少、腫瘍の浸潤性または転移能を評価するために、治療前、治療の間、および治療後に患者を評価するために使用され得る。

10

【0061】

本発明は、甲状腺組織または甲状腺癌に対する環境要因の影響を決定するための方法を検討する。この方法には、環境要因の存在下および不在下での甲状腺癌マーカーを比較する工程が含まれる。

【0062】

本発明はまた、甲状腺癌の処置について試験薬剤の潜在的有効性を評価するための方法、ならびに、甲状腺癌の処置のための薬剤を選択する方法を提供する。

20

【0063】

本発明は、試験化合物の、甲状腺癌の一因となる可能性を評価する方法を検討する。この方法には以下の工程が含まれる：

(a) 試験化合物の存在下および不在下で病的細胞の別々のアリコートを維持する工程；ならびに

(b) 各アリコート中の甲状腺癌マーカーのレベルを比較する工程。

【0064】

試験化合物の不在下で維持したアリコートと比較した、試験化合物の存在下で維持した（または試験化合物に曝された）アリコート中のマーカーのレベルの有意な差は、その試験化合物が甲状腺癌の一因となっている可能性があることを示す。

30

【0065】

本発明はまた、甲状腺癌マーカーまたは甲状腺癌マーカーと相互作用する薬剤を含有する、薬学的組成物または診断用組成物を提供する。具体的には、本発明は、ポリペプチド甲状腺癌マーカーもしくはそのようなマーカーに結合する薬剤、またはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーにハイブリダイズするもしくはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを増幅する作用物質を含有している、薬学的組成物あるいは診断用組成物を提供する。

【0066】

1つの実施形態において、この組成物には、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーまたはその断片に特異的にハイブリダイズするプローブが含まれる。別の実施形態においては、ポリメラーゼ連鎖反応方法論を使用してポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを増幅することができる特異的プライマー（単数または複数）対を含有している組成物が提供される。なおさらなる実施形態においては、組成物に、ポリペプチド甲状腺癌マーカーまたはその断片に結合する結合剤（単数または複数）（例えば、抗体）が含まれる。プローブ、プライマー、および結合剤は、検出可能な物質で標識することができる。

40

【0067】

1つの実施形態においては、本発明の薬学的組成物または診断用組成物には、E p - I C D、 - カテニン、および/またはE p E xに特異的な抗体が含まれる。1つの実施形態では、本発明の薬学的組成物または診断用組成物には、E p - I C D、 - カテニン、および/またはE p E xをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチ

50

ド（例えば、プローブ）が含まれる。1つの実施形態では、本発明の診断用組成物に、E p - I C D、 - カテニン、および/またはE p E xをコードするポリヌクレオチドを増幅するプライマーが含まれる。

【0068】

別の態様において、本発明は、甲状腺癌（具体的には、甲状腺癌、より具体的には、A T Cの浸潤性または転移能）を診断するための組成物の製造における、甲状腺癌マーカーと相互作用する薬剤の使用に関する。

【0069】

本発明の方法には、W n tタンパク質、およびW n tタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出する工程が含まれ得る。本発明の方法にはまた、甲状腺癌と関係があるさら
10
さらに別のマーカー（例えば、ガレクチン - 3、サイログロブリン、E - カドヘリン、 - アクチン、F H L 2、およびL e f - 1）を検出する工程が含まれる場合もある。さらに、甲状腺癌マーカーの量は、甲状腺癌の他のマーカーと数学的に組み合わせることができる。1つの実施形態において、本発明は、被験体において甲状腺癌を検出するまたは診断するための方法を提供する。この方法には以下の工程が含まれる：

（a）被験体由来の試料中の甲状腺癌マーカーの量を決定する工程；

（b）試料中の甲状腺癌と関係がある他のマーカー（具体的には、ガレクチン - 3、サイ
10
ログロブリン、E - カドヘリン、c - M y c、 - アクチン、F H L 2、およびL e f - 1からなる群より選択されるマーカー）の量を決定する工程；

（c）工程（a）の結果と工程（b）の結果を数学的に組み合わせ、数学的組み合わせ
20
を得る工程；ならびに

（d）甲状腺癌の存在、または甲状腺癌の浸潤性もしくは転移能に対して、上記数学的組
み合わせを比較するかあるいは相関させる工程。

【0070】

この組み合わせは、好ましくは、予め決定された標準についての数学的組み合わせと比
較される。特定の態様において、本発明は、甲状腺癌マーカーと、被験体由来の試料中の
ガレクチン - 3およびサイログロブリンのうち的一方または両方との組み合わせを決定す
ることにより、甲状腺癌を検出する、特性決定する、あるいは診断するための方法を提供
する。

【0071】

本発明にはまた、本発明の方法を実行するためのキットも含まれる。1つの態様におい
て、本発明は、甲状腺癌マーカーを含む、甲状腺癌を検出する、診断する、または特性決
定するためのキットを提供する。特定の態様において、本発明は、被験体において甲状腺
癌を診断するまたは特性決定するための試験キットを提供する。これには、甲状腺癌マ
ーカー（単数または複数）と相互作用する薬剤が含まれる。1つの実施形態では、キットは
、患者が浸潤性または転移性甲状腺癌（具体的には、A T C）に罹患しているかどうかを
評価するためのものであり、これには、E p - I C D、 - カテニン、および状況に応じてE p E xのレベルを同定するならびに/または評価するための試薬が含まれる。

【0072】

したがって、本発明は、画像化のための標識を持ち、甲状腺癌マーカー（単数または複
40
数）に結合する1種類以上の薬剤を哺乳動物に投与する工程、ならびにその後、哺乳動物
を画像化する工程を含む、インビボ方法を検討する。本発明の好ましい態様にしたごと
、以下の工程を含む、甲状腺癌を画像化するためのインビボ方法が提供される：

（a）患者に、甲状腺癌マーカー（単数または複数）に結合する薬剤（この薬剤は、甲
状腺癌を画像化するための標識を持っている）を注射する工程；

（b）上記薬剤をインビボでインキュベートし、甲状腺癌マーカー（単数または複数）に
結合できるようにする工程；および

（c）甲状腺癌に局在化した標識の存在を検出する工程。

【0073】

本発明の1つの実施形態においては、薬剤は、甲状腺癌マーカー（単数または複数）を
50

認識する抗体である。本発明の別の実施形態では、薬剤は、甲状腺癌マーカー（単数または複数）を認識する化学物質である。

【0074】

試薬は、甲状腺癌マーカー（単数または複数）を画像化するための標識を持つ。画像化に有用な標識の例は、陽電子放出型断層撮影（「PET」）スキャナー、化学発光物質（例えば、ルシフェリン）、および酵素マーカー（例えば、ペルオキシダーゼまたはホスファターゼ）により検出可能な、放射性標識、蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、核磁気共鳴活性標識、陽電子を放出する放射性同位元素である。短射程放射線放射体（Short-range radiation emitter）（例えば、短射程検出プローブにより検出可能な放射性同位元素）もまた利用することができる。

10

【0075】

本発明はまた、甲状腺癌についての多数のマーカーを使用する、本明細書中に記載する、場所を特定する方法または画像化方法も検討する。

【0076】

本発明は、本発明の薬学的組成物を被験体に投与する工程または本発明の薬学的組成物を使用する工程を含む、甲状腺癌（具体的には、ATC）を処置する方法を提供する。1つの態様においては、本発明は、甲状腺癌細胞（例えば、ATC細胞）を破壊するかもしれないか、またはEp-ICDもしくは -カテニンの活性を遮断するために治療的に使用することができる、Ep-ICDまたは -カテニンに特異的なアンタゴニスト（例えば、抗体）を提供する。加えて、Ep-ICDまたは -カテニンは、Ep-ICDまたは -カテニンを発現する腫瘍の免疫介在性崩壊あるいは増殖阻害を促進するための様々な免疫治療方法において使用され得る。

20

【0077】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、本発明の精神および範囲内での様々な変更および改変が、この詳細な説明から当業者に明らかであるので、詳細な説明と特異的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示してはいるものの、例示の目的のためのみに提供されていることが理解されるものとする。

【0078】

本発明を、以下の図面と関連させてここに記載する。

30

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1は、甲状腺癌中のEpEx、Ep-ICD、および -カテニンの免疫組織化学的分析である。未分化甲状腺癌は、検出可能な膜EpEx染色を示さなかった（IA）；分析した全ての他のサブタイプの甲状腺癌と正常な甲状腺組織は、原形質膜EpEx染色を示した（IB～IF）。核Ep-ICD染色は、未分化の甲状腺癌と分化の度合いが低い甲状腺癌（IIA～IICおよびIIF）においてのみ観察され、高分化型の甲状腺癌と正常な甲状腺組織（IID、IIE）においては観察されなかった。核Ep-ICD染色、核もしくは細胞質 -カテニン染色との相関は浸潤性甲状腺癌（IIIA～IIICおよびIIF）において観察され、一方、膜性染色は、浸潤性が低い甲状腺癌と正常な甲状腺組織（IIID、IIIE）において観察された。

40

【図2】図2は、同じ甲状腺癌患者におけるEpEx、Ep-ICD、および -カテニンの免疫組織化学的分析である。膜EpEx染色は、未分化甲状腺癌切片においては観察されず（IA）、扁平上皮細胞切片中ではぼんやりした膜EpEx染色が観察され（IB）、強い膜EpEx染色が、分化の度合いが低い切片と正常な切片の両方において観察された（IC、ID）。未分化の切片と分化の度合いが低い切片における核および細胞質Ep-ICD染色（IIA～IIC）、正常組織中での膜性および細胞質染色（IID）。未分化甲状腺癌切片中の核および細胞質 -カテニン染色（IIIA）、この検体の他のサブセット中の膜 -カテニン染色（IIIB～IID）。

【図3-1】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および -カテニンの発

50

現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現（3のメジアンスコアを持つ、太い横線）を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す（3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0～4の範囲）。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-2】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現（3のメジアンスコアを持つ、太い横線）を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す（3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0～4の範囲）。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-3】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発

10

20

30

40

50

現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現（3のメジアンスコアを持つ、太い横線）を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す（3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0～4の範囲）。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-4】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現（3のメジアンスコアを持つ、太い横線）を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す（3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0～4の範囲）。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-5】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発

10

20

30

40

50

現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現(3のメジアンスコアを持つ、太い横線)を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す(3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0~4の範囲)。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-6】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現(3のメジアンスコアを持つ、太い横線)を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す(3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0~4の範囲)。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-7】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発

10

20

30

40

50

現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現(3のメジアンスコアを持つ、太い横線)を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す(3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0~4の範囲)。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図3-8】図3は、甲状腺癌中でのEpEx、Ep-ICD、および β -カテニンの発現のボックスプロット分析である。正常な甲状腺組織と様々なタイプの甲状腺癌のパラフィンに包埋した切片において免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例1に記載するようにして得た合計の免疫染色スコアを示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。Iは、正常組織およびPTC中での膜性局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現(3のメジアンスコアを持つ、太い横線)を示す。パネルAIIは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中でのEpExの細胞質局在化、ATCにおいては検出可能な発現が存在しないこと、ならびに、SCC中での様々に低下した発現を示す。パネルAIIIは、正常組織および甲状腺癌の全てのサブタイプに検出可能なEpExの核局在化が存在しないことを示す。パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。パネルBIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での可変のEp-ICDの膜局在化を示す。パネルBIIは、正常組織、PTC、ATC、FTCおよびSCC、PDPTC、ならびにPDFTC中での細胞質Ep-ICDの局在化を示す。パネルBIIIは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATCにおける核局在化とSCC中での可変の発現を示す(3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0~4の範囲)。パネルCは、 β -カテニン染色についてのボックスプロットを示す。CIは、ATCのみにおける核染色を示す。パネルCIIは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける細胞質 β -カテニンを示す。パネルCIIIは、正常組織と、ATCのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 β -カテニンを示す。パネルDは、Visiopharm Integrator Systemを使用した、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるEp-ICDの核染色を示す。分析した全てのATC、1つのPDPTC、および1つのPDFTCが核Ep-ICDの発現を示した。

【図4】図4は、ヒトの原発性甲状腺腫瘍中のEpCAMの定量的リアルタイムPCR分

10

20

30

40

50

析である。ヒストグラムは、甲状腺癌の様々なサブセットの中での E p C A M 転写物のレベルを示す。

【図 5 A】図 5 は、全生存率の累積寄与率のカプラン・マイヤー推定値である：(A) 膜 E p E x 発現の喪失。(B) 核 E p - I C D の蓄積。(C) 核 - カテニンの蓄積。(D) 甲状腺癌において同時に起こる核 E p - I C D と - カテニンの発現。

【図 5 B】図 5 は、全生存率の累積寄与率のカプラン・マイヤー推定値である：(A) 膜 E p E x 発現の喪失。(B) 核 E p - I C D の蓄積。(C) 核 - カテニンの蓄積。(D) 甲状腺癌において同時に起こる核 E p - I C D と - カテニンの発現。

【図 5 C】図 5 は、全生存率の累積寄与率のカプラン・マイヤー推定値である：(A) 膜 E p E x 発現の喪失。(B) 核 E p - I C D の蓄積。(C) 核 - カテニンの蓄積。(D) 甲状腺癌において同時に起こる核 E p - I C D と - カテニンの発現。

【図 5 D】図 5 は、全生存率の累積寄与率のカプラン・マイヤー推定値である：(A) 膜 E p E x 発現の喪失。(B) 核 E p - I C D の蓄積。(C) 核 - カテニンの蓄積。(D) 甲状腺癌において同時に起こる核 E p - I C D と - カテニンの発現。

【図 6 A】図 6 は、ヒトの甲状腺癌由来細胞株中での E p C A M の発現である。(A) パネル I - 免疫組織化学 - E p E x 染色は、A R O (これまでは A T C 細胞と考えられていた結腸癌細胞)、W R O (これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、および T T (甲状腺髄様癌細胞) においては原形質膜に局在化していた。細胞質 E p - E x は C A L - 6 2 中で検出されたが、E p E x 染色は T P C - 1 (低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞) 中では観察されなかった(原寸 x 2 0 0)。

パネル I I - E p - I C D を用いた免疫組織化学 (1 1 4 4)。E p - I C D 染色は、A R O (これまでは A T C 細胞と考えられていた結腸癌細胞)、W R O (これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、および T T (甲状腺髄様癌細胞) においては原形質膜と細胞質に局在化していた。細胞質 E p - I C D は C A L - 6 2 中で検出されたが、T P C - 1 (低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞) 中では E p - I C D 染色は観察されなかった(原寸 x 2 0 0)。

パネル I I I。免疫蛍光 - E p E x 染色は、A R O、W R O、および T T の原形質膜に(中央のパネル)、そして C A L - 6 2 中では細胞質に局在化していた(原寸 x 4 0 0)。

パネル I V - 核局在化を明確にするために、4' - 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I) 核酸染色 (原寸 x 4 0 0) を示す。(B) 免疫蛍光分析。M O C - 3 1 での強い E p E x 染色は、A R O および W R O 細胞中では原形質膜に局在化していたが、E p - I C D 染色は、C A L - 6 2 細胞中では細胞質と核に局在化していた(原寸 x 4 0 0)。

(C) 甲状腺癌細胞株の同じパネル中での E p C A M の発現のウェスタンプロット分析。細胞溶解物を S D S - P A G E により分離し、E p C A M に対する抗体 (B 3 0 2) を使用して E p C A M についてプローブした(上のパネル)。

確実に等量をローディングするために、同じ溶解物を - アクチンでプローブした(下のパネル)。4 0 k D a のバンドが、A R O、W R O、および T T 細胞中で観察されたが、T P C - 1 細胞中ではバンドは検出されなかった。(D) 甲状腺癌細胞株の同じパネル中での E p C A M の定量的リアルタイム P C R 分析。A R O、W R O、T T 細胞中での G A P D H に対する E p C A M の比を示すが、T P C - 1 細胞中では転写物を定量化することができなかった。

(E) 甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいて M O C - 3 1 および - カテニンをを用いた免疫蛍光 E p E x 染色。(F) 甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいて M O C - 3 1 および c - m y c をを用いた免疫蛍光 E p E x 染色。

【図 6 B】図 6 は、ヒトの甲状腺癌由来細胞株中での E p C A M の発現である。(A) パネル I - 免疫組織化学 - E p E x 染色は、A R O (これまでは A T C 細胞と考えられていた結腸癌細胞)、W R O (これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、および T T (甲状腺髄様癌細胞) においては原形質膜に局在化していた。細胞質 E p - E x は C A L - 6 2 中で検出されたが、E p E x 染色は T P C - 1 (低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞) 中では観察されなかった(原寸 x 2 0 0)。

パネル I I - E p - I C D を用いた免疫組織化学 (1 1 4 4)。E p - I C D 染色は、A R O (これまでは A T C 細胞と考えられていた結腸癌細胞)、W R O (これまでは浸潤性の濾胞性甲

10

20

30

40

50

状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜と細胞質に局在化していた。細胞質Ep-ICDはCAL-62中で検出されたが、TPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中ではEp-ICD染色は観察されなかった(原寸×200)。パネルIII。免疫蛍光-EpEx染色は、ARO、WRO、およびTTの原形質膜に(中央のパネル)、そしてCAL-62中では細胞質に局在化していた(原寸×400)。パネルIV-核局在化を明確にするために、4'-6'-ジァミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)核酸染色(原寸×400)を示す。(B)免疫蛍光分析。MOC-31での強いEpEx染色は、AROおよびWRO細胞中では原形質膜に局在化していたが、Ep-ICD染色は、CAL-62細胞中では細胞質と核に局在化していた(原寸×400)。(C)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの発現のウェスタンブロット分析。細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、EpCAMに対する抗体(B302)を使用してEpCAMについてプローブした(上のパネル)。確実に等量をローディングするために、同じ溶解物を-アクチンでプローブした(下のパネル)。40kDaのバンドが、ARO、WRO、およびTT細胞中で観察されたが、TPC-1細胞中ではバンドは検出されなかった。(D)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの定量的リアルタイムPCR分析。ARO、WRO、TT細胞中でのGAPDHに対するEpCAMの比を示すが、TPC-1細胞中では転写物を定量化することができなかった。(E)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31および-カテニンを用いた免疫蛍光EpEx染色。(F)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびc-mycを用いた免疫蛍光EpEx染色。

10

20

【図6C】図6は、ヒトの甲状腺癌由来細胞株中でのEpCAMの発現である。(A)パネルI-免疫組織化学-EpEx染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜に局在化していた。細胞質Ep-ExはCAL-62中で検出されたが、EpEx染色はTPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中では観察されなかった(原寸×200)。パネルIII-Ep-ICDを用いた免疫組織化学(1144)。Ep-ICD染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜と細胞質に局在化していた。細胞質Ep-ICDはCAL-62中で検出されたが、TPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中ではEp-ICD染色は観察されなかった(原寸×200)。パネルIII。免疫蛍光-EpEx染色は、ARO、WRO、およびTTの原形質膜に(中央のパネル)、そしてCAL-62中では細胞質に局在化していた(原寸×400)。パネルIV-核局在化を明確にするために、4'-6'-ジァミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)核酸染色(原寸×400)を示す。(B)免疫蛍光分析。MOC-31での強いEpEx染色は、AROおよびWRO細胞中では原形質膜に局在化していたが、Ep-ICD染色は、CAL-62細胞中では細胞質と核に局在化していた(原寸×400)。(C)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの発現のウェスタンブロット分析。細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、EpCAMに対する抗体(B302)を使用してEpCAMについてプローブした(上のパネル)。確実に等量をローディングするために、同じ溶解物を-アクチンでプローブした(下のパネル)。40kDaのバンドが、ARO、WRO、およびTT細胞中で観察されたが、TPC-1細胞中ではバンドは検出されなかった。(D)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの定量的リアルタイムPCR分析。ARO、WRO、TT細胞中でのGAPDHに対するEpCAMの比を示すが、TPC-1細胞中では転写物を定量化することができなかった。(E)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31および-カテニンを用いた免疫蛍光EpEx染色。(F)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびc-mycを用いた免疫蛍光EpEx染色。

30

40

【図6D】図6は、ヒトの甲状腺癌由来細胞株中でのEpCAMの発現である。(A)パネルI-免疫組織化学-EpEx染色は、ARO(これまではATC細胞と考え

50

られていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜に局在化していた。細胞質Ep-ExはCAL-62中で検出されたが、EpEx染色はTPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中では観察されなかった(原寸×200)。パネルII-Ep-ICDを用いた免疫組織化学(1144)。Ep-ICD染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜と細胞質に局在化していた。細胞質Ep-ICDはCAL-62中で検出されたが、TPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中ではEp-ICD染色は観察されなかった(原寸×200)。パネルIII。免疫蛍光-EpEx染色は、ARO、WRO、およびTTの原形質膜に(中央のパネル)、そしてCAL-62中では細胞質に局在化していた(原寸×400)。パネルIV-核局在化を明確にするために、4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)核酸染色(原寸×400)を示す。(B)免疫蛍光分析。MOC-31での強いEpEx染色は、AROおよびWRO細胞中では原形質膜に局在化していたが、Ep-ICD染色は、CAL-62細胞中では細胞質と核に局在化していた(原寸×400)。(C)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの発現のウェスタンブロット分析。細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、EpCAMに対する抗体(B302)を使用してEpCAMについてプローブした(上のパネル)。確実に等量をローディングするために、同じ溶解物を-アクチンでプローブした(下のパネル)。40kDaのバンドが、ARO、WRO、およびTT細胞中で観察されたが、TPC-1細胞中ではバンドは検出されなかった。(D)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの定量的リアルタイムPCR分析。ARO、WRO、TT細胞中でのGAPDHに対するEpCAMの比を示すが、TPC-1細胞中では転写物を定量化することができなかった。(E)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31および-カテニンを用いた免疫蛍光EpEx染色。(F)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびc-mycを用いた免疫蛍光EpEx染色。

【図6E】図6は、ヒトの甲状腺癌由来細胞株中でのEpCAMの発現である。(A)パネルI-免疫組織化学-EpEx染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜に局在化していた。細胞質Ep-ExはCAL-62中で検出されたが、EpEx染色はTPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中では観察されなかった(原寸×200)。パネルII-Ep-ICDを用いた免疫組織化学(1144)。Ep-ICD染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜と細胞質に局在化していた。細胞質Ep-ICDはCAL-62中で検出されたが、TPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中ではEp-ICD染色は観察されなかった(原寸×200)。パネルIII。免疫蛍光-EpEx染色は、ARO、WRO、およびTTの原形質膜に(中央のパネル)、そしてCAL-62中では細胞質に局在化していた(原寸×400)。パネルIV-核局在化を明確にするために、4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)核酸染色(原寸×400)を示す。(B)免疫蛍光分析。MOC-31での強いEpEx染色は、AROおよびWRO細胞中では原形質膜に局在化していたが、Ep-ICD染色は、CAL-62細胞中では細胞質と核に局在化していた(原寸×400)。(C)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの発現のウェスタンブロット分析。細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、EpCAMに対する抗体(B302)を使用してEpCAMについてプローブした(上のパネル)。確実に等量をローディングするために、同じ溶解物を-アクチンでプローブした(下のパネル)。40kDaのバンドが、ARO、WRO、およびTT細胞中で観察されたが、TPC-1細胞中ではバンドは検出されなかった。(D)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの定量的リアルタイムPCR分析。ARO、WRO、TT細胞中

10

20

30

40

50

でのGAPDHに対するEpCAMの比を示すが、TPC-1細胞中では転写物を定量化することができなかった。(E)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびβ-カテニンを用いた免疫蛍光EpEx染色。(F)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびc-mycを用いた免疫蛍光EpEx染色。

【図6F】図6は、ヒトの甲状腺癌由来細胞株中でのEpCAMの発現である。(A)パネルI - 免疫組織化学 - EpEx染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜に局在化していた。細胞質Ep-ExはCAL-62中で検出されたが、EpEx染色はTPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中では観察されなかった(原寸×200)。パネルII - Ep-ICDを用いた免疫組織化学(1144)。Ep-ICD染色は、ARO(これまではATC細胞と考えられていた結腸癌細胞)、WRO(これまでは浸潤性の濾胞性甲状腺癌細胞と考えられていた結腸癌細胞)、およびTT(甲状腺髄様癌細胞)においては原形質膜と細胞質に局在化していた。細胞質Ep-ICDはCAL-62中で検出されたが、TPC-1(低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞)中ではEp-ICD染色は観察されなかった(原寸×200)。パネルIII。免疫蛍光 - EpEx染色は、ARO、WRO、およびTTの原形質膜に(中央のパネル)、そしてCAL-62中では細胞質に局在化していた(原寸×400)。パネルIV - 核局在化を明確にするために、4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)核酸染色(原寸×400)を示す。(B)免疫蛍光分析。MOC-31での強いEpEx染色は、AROおよびWRO細胞中では原形質膜に局在化していたが、Ep-ICD染色は、CAL-62細胞中では細胞質と核に局在化していた(原寸×400)。(C)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの発現のウェスタンブロット分析。細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、EpCAMに対する抗体(B302)を使用してEpCAMについてプローブした(上のパネル)。確実に等量をローディングするために、同じ溶解物をβ-アクチンでプローブした(下のパネル)。40kDaのバンドが、ARO、WRO、およびTT細胞中で観察されたが、TPC-1細胞中ではバンドは検出されなかった。(D)甲状腺癌細胞株の同じパネル中でのEpCAMの定量的リアルタイムPCR分析。ARO、WRO、TT細胞中でのGAPDHに対するEpCAMの比を示すが、TPC-1細胞中では転写物を定量化することができなかった。(E)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびβ-カテニンを用いた免疫蛍光EpEx染色。(F)甲状腺癌細胞株の同じパネルにおいてMOC-31およびc-mycを用いた免疫蛍光EpEx染色。

【図7-1】図7は、癌細胞株および陽性対照である結腸癌細胞株を免疫毒素VB4-845/VB6-845で処理した際のEpCAM陽性甲状腺癌細胞の増殖の阻害を示す。

【図7-2】図7は、癌細胞株および陽性対照である結腸癌細胞株を免疫毒素VB4-845/VB6-845で処理した際のEpCAM陽性甲状腺癌細胞の増殖の阻害を示す。

【図7-3】図7は、癌細胞株および陽性対照である結腸癌細胞株を免疫毒素VB4-845/VB6-845で処理した際のEpCAM陽性甲状腺癌細胞の増殖の阻害を示す。

【図8】図8は、様々な濃度のVB4-845での処理の前後にウェスタンブロットにより決定した、複数の細胞株中でのEpCAMの発現に対するVB4-845の効果を示す。

【図9A】図9は、甲状腺乳頭癌-1(Thyroid papillary carcinoma-1)(TPC-1)細胞およびVB4(A)およびPBS(B)で処理したSCIDマウスにおける腫瘍の大きさのばらつきを示す。

【図9B】図9は、甲状腺乳頭癌-1(Thyroid papillary carcinoma-1)(TPC-1)細胞およびVB4(A)およびPBS(B)で処理したSCIDマウスにおける腫瘍の大きさのばらつきを示す。

【図10】図10は、甲状腺癌中でのEpExの膜染色を示している散布図である。

【図11】図11は、甲状腺癌中でのEpExの細胞質染色を示している散布図である。

【図12】図12は、甲状腺癌中でのEp-ICDの膜染色を示している散布図である。

10

20

30

40

50

【図13】図13は、甲状腺癌中でのEp-ICDの細胞質染色を示している散布図である。

【図14】図14は、甲状腺癌中でのEp-ICDの核染色を示している散布図である。

【図15】図15は、ATCをPTCと識別するための、EpICDの核染色のROC曲線分析である。

【図16】図16は、ATCをPTCと識別するための、EpExの膜染色のROC分析である。

【図17】図17は、甲状腺腫瘍中でのEpExおよびEp-ICDの発現の免疫組織化学的分析を示す。顕微鏡写真は、良性甲状腺腫瘍(A)、非浸潤性悪性甲状腺腫瘍(C)、浸潤性悪性甲状腺腫瘍(E)および(G)におけるEpExの膜発現の染色を示す。Ep-ICDの核発現は、良性甲状腺腫瘍(B)、非浸潤性悪性甲状腺腫瘍(D)、浸潤性悪性甲状腺腫瘍(F)および(H)において観察される。M、膜染色；N、核染色。顕微鏡写真は全て、原寸×400である。

10

【図18】図18は、フィリピン人患者における膜EpEx発現の散布図分析である。良性甲状腺腫瘍、臨床的には非浸潤性である甲状腺悪性腫瘍および臨床的には浸潤性である甲状腺悪性腫瘍における合計の免疫染色スコアの分布を示している散布図。縦軸は、実施例に記載する合計の免疫組織化学染色スコアを示す。4のカットオフを、陽性を決定するために使用した。EpExの膜発現の低下が、分析したフィリピン人の浸潤性の悪性腫瘍の症例のほとんどにおいて観察された。高い膜EpEx発現が、良性腫瘍の症例と非浸潤性悪性腫瘍の症例の全てにおいて観察された。4のカットオフスコアを、陽性(膜発現の喪失)を決定するために使用した。

20

【図19】図19は、フィリピン人患者における核Ep-ICDの発現の散布図分析である。良性甲状腺腫瘍、臨床的には非浸潤性である甲状腺悪性腫瘍、および臨床的には浸潤性である甲状腺悪性腫瘍において決定した合計の免疫染色スコアの分布を示している散布図。縦軸は、実施例に記載する合計の免疫組織化学染色スコアを示す。4のカットオフを、陽性を決定するために使用した。Ep-ICDの核発現の増大が、分析したフィリピン人の浸潤性の甲状腺悪性腫瘍のほぼ全てにおいて観察されたが、良性腫瘍と非浸潤性の悪性腫瘍の症例においては観察されなかった。

【図20】図20は、フィリピン人の良性甲状腺腫瘍、非浸潤性癌および浸潤性癌における、膜EpEx(A、C)および核Ep-ICD(B、D)の受信者動作特性(Receiver operating characteristic)(ROC)曲線を示す。ROC曲線を、膜EpExおよび核Ep-ICDの発現の感度と1-特異性に基づいて作製した。縦軸は感度を示し、横軸は1-特異性を示す。癌についての感度、特異性、および曲線下面積(AUC)値を表8にまとめる。

30

【図21】図21は、核Ep-ICDのボックスプロット分析(B)と膜EpExの発現の喪失(A)を示す。

【図22】図22は、膜EpExの発現と核Ep-ICDの発現のボックスプロット分析を示す。良性甲状腺腫瘍、臨床的には非浸潤性である甲状腺悪性腫瘍、および臨床的には浸潤性である甲状腺悪性腫瘍の組織切片の、免疫組織化学により決定した合計の免疫染色スコアの分布を示しているボックスプロット。縦軸は、実施例に記載する合計の免疫組織化学染色スコアを示す。A. EpExの膜発現の低下が、分析したフィリピン人である浸潤性悪性腫瘍の症例のほとんどにおいて観察された。高い膜EpExの発現が、良性腫瘍の症例と非浸潤性悪性腫瘍の症例の全てにおいて観察された。4のカットオフを、陽性(膜発現の喪失)を決定するために使用した。B. Ep-ICDの核発現の増大が、分析したフィリピン人である浸潤性の甲状腺悪性腫瘍のほぼ全てにおいて観察されたが、良性腫瘍と非浸潤性悪性腫瘍の症例においては観察されなかった。4のカットオフを、陽性を決定するために使用した。

40

【発明を実施するための形態】

【0080】

(発明の詳細な説明)

50

本発明は、甲状腺癌マーカーの発現と、甲状腺癌（具体的には、甲状腺癌、より具体的には、ATC、の浸潤性または転移能）との間での新しく発見した相関関係に関する。本明細書中に記載される甲状腺癌マーカーは、甲状腺癌を（具体的には、甲状腺癌（より具体的には、ATC）の浸潤性または転移能を）診断する、検出する、あるいは特性決定するための方法を提供する。試料中の浸潤性または転移性甲状腺癌の存在または不在を診断あるいは検出するための方法、および甲状腺癌の進行をモニタリングするための方法、ならびに患者の甲状腺癌の診断および特性決定と関係がある甲状腺癌の特徴についての情報を提供するための方法を提供する。

【0081】

他の場所に明記されない限りは、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解されている意味と同じ意味を有する。以下の定義は当業者を補い、本出願に関するものであり、いずれの関連する場合または無関係の場合にも帰属するものではない。本明細書中に記載する方法と同様または等価である任意の方法および材料を本発明の実施において使用することができるが、特定の材料および方法が本明細書中に記載される。

10

【0082】

終点により本明細書中に記載する数的範囲には、その範囲内に含まれる全ての数および分数が含まれる（例えば、1～5には、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4、および5が含まれる）。その全ての数および分数が、用語「約」により修飾されると見なされることもまた理解される。用語「約」は、言及されている数のプラスまたはマイナス0.1～50%、5～50%、または10～40%、好ましくは、10～20%、より好ましくは、10%、または15%を意味する。本明細書中および添付の特許請求の範囲において使用する場合は、単数形の「a」、「an」、および「the」には、その状況が別に明記されない限りは、複数についての言及も含まれる。

20

【0083】

用語「甲状腺癌」は、甲状腺の任意の悪性のプロセスをいう。甲状腺癌の例としては、甲状腺乳頭癌、甲状腺乳頭癌の濾胞性変異型、濾胞腺癌、ヒュルトレ細胞腫、未分化甲状腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺リンパ腫、分化の度合いが低い甲状腺癌、および甲状腺原発血管肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の複数の態様においては、甲状腺癌は甲状腺髄様癌である。本発明の複数の態様においては、甲状腺癌は浸潤性の癌であるか、または転移能があり、具体的には、浸潤性の甲状腺髄様癌もしくは濾胞性甲状腺癌、または転移能がある甲状腺髄様癌もしくは濾胞性甲状腺癌である。本発明の複数の態様においては、甲状腺癌は未分化の甲状腺癌（ATC）である。

30

【0084】

「転移能」は、開始部位（すなわち、甲状腺）から体内の他の部位へと移動する癌細胞の能力または可能性をいう。

【0085】

用語「試料」などは、甲状腺癌マーカーまたは結合剤（例えば、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体）を発現しているまたはそれを含有していることがわかっているか、あるいはそのように疑われる材料を意味する。試料は生物学的供給源に由来し得（「生物学的試料」）、例えば、組織（例えば、生検試料）、抽出物、または細胞培養物（細胞（例えば、腫瘍細胞）を含む）、細胞溶解物、および生物学的もしくは生理学的流体（physiological fluid）（例えば、全血、血漿、血清、唾液、脳脊髄液、汗、尿、母乳、腹水など）であり得る。試料は、供給源から得たものがそのまま直接使用される場合があり、また、試料の特性を変化させるための予備処理（例えば、血液からの血漿の調製、粘性がる液体の希釈など）後に使用される場合もある。本発明の特定の態様においては、試料は、ヒトの血清のようなヒトの生理学的流体である。本発明の特定の態様においては、試料は生検試料である。本発明の特定の態様においては、試料は良性組織、悪性組織、または正常組織の試料である。

40

【0086】

50

本発明にしたがって分析することができる試料としては、臨床的に関連する供給源由来のポリヌクレオチド、好ましくは、発現されたRNAまたはそれに由来する核酸(cDNA、またはRNAポリメラーゼプロモーターが組み込まれているcDNAから導いた増幅したRNA)が挙げられる。当業者に明らかであるように、標的ポリヌクレオチドには、全細胞RNA、ポリ(A)⁺メッセンジャーRNA(mRNA)またはその分画、細胞質mRNA、あるいはcDNAから転写されたRNA(すなわち、cRNA)を含むが、これらに限定されないRNAが含まれ得る。

【0087】

標的ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を使用して、1つ以上のヌクレオチドで検出可能に標識することができる。標識は、RNAの長さに沿って均一に取り込まれることが好ましく、高い効率で行われることがさらに好ましい。検出可能な標識は、発光標識、蛍光標識、生物発光標識、化学発光標識、放射性標識、および比色分析用様式であり得るが、これらに限定されるわけではない。

10

【0088】

患者試料由来の標的ポリヌクレオチドは、標準のポリヌクレオチドとは異なるように標識することができる。標準には、正常な個体(例えば、甲状腺癌に罹患していないかまたは甲状腺癌の素因がない個体、具体的には、正常な個体または異なる病期にある患者由来の試料からプールしたもの)由来の標的ポリヌクレオチドが含まれる。標的ポリヌクレオチドは、同じ個体に由来し得るが、異なる時間に採取されたものであり得、これにより、一連の処置の間および後のマーカーの発現の変化もしくはマーカーの発現がないことにより、処置の有効性が示される。

20

【0089】

用語「被験体」、「患者」、および「個体」は、本明細書中では互換的に使用され、甲状腺癌に罹患しているか、または甲状腺癌を有していると疑われる、甲状腺癌の素因がある、または甲状腺癌についてスクリーニングされている(具体的には、実際の浸潤性甲状腺癌もしくは転移能(より具体的には、ATC)、またはその疑い)哺乳動物のような温血動物をいう。この用語には、家畜、競技用動物、霊長類、およびヒトが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、この用語はヒトをいう。

【0090】

本明細書中で使用される場合は、用語甲状腺癌を「有していると疑われる被験体」は、甲状腺癌の指標となる1つ以上の症候(例えば、顕著なしこりまたは塊)を示しているか、あるいは、癌についてのスクリーニングが行われている(例えば、定期健診の際に)被験体をいう。甲状腺癌を有していると疑われる被験体はまた、1つ以上のリスクファクターを有し得る。甲状腺癌を有していると疑われる被験体は、一般的には、癌について試験されていない。しかし、甲状腺癌を「有していると疑われる被験体」には、最初の診断が下されたが、その病期が明らかではない個体が含まれる。この用語にはさらに、かつて癌を有していたヒト(例えば、寛解状態にある個体)が含まれる。

30

【0091】

本明細書中で使用される場合は、用語「甲状腺癌のリスクがある被験体」は、甲状腺癌(具体的には、浸潤性または転移性甲状腺癌、より具体的には、ATC)の発症についての1つ以上のリスクファクターを持つ被験体をいう。リスクファクターとしては、性別、年齢、遺伝的素因、環境暴露、これまでの癌の発症、既存の癌以外の疾患、および生活習慣が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0092】

本明細書中で使用される場合は、用語被験体において「甲状腺癌を特性決定すること」は、被験体における癌試料の1つ以上の特性の同定をいい、これには、被験体の予後または生存性が含まれるが、これらに限定されるわけではない。癌は、1つ以上のマーカー(本明細書中に開示する甲状腺癌マーカーを含むがこれに限定されない)の発現の同定により特性決定され得る。

【0093】

50

本明細書中で使用される場合は、用語「処置する」または「処置」は、特定の症状の1つ以上の症候または特徴を部分的あるいは完全に緩和する、改善する、軽減する、阻害する、予防する、その発症を遅らせる、その重篤度を下げる、および/またはその発症を少なくするために使用される任意の方法をいう。処置は、症状を伴う病状を発症するリスクを小さくする目的のために、その症状の徴候を示していないおよび/またはその症状の極めて初期の徴候を示している被験体に投与され得る。したがって、被験体の状態に応じて、この用語は、本発明のいくつかの態様においては、症状を予防することをいい、これには、症状の発症を予防すること、または症状と関係がある徴候を予防することが含まれる。この用語にはまた、症状および/または症候が重篤な状態に進行しないように、その症状および/または症候を維持することが含まれる。処置は、短期間の方法、また、長期にわたる方法のいずれで行われる場合もある。この用語はまた、症状に苦しむ前にそのような症状の重篤度またはそのような症状と関係がある症候を軽減することという。そのような苦しむ前の症状の予防またはその重篤度の低下は、その症状に苦しんでいる時ではない、被験体への治療の投与をいう。予防にはまた、症状の再発、またはそのような症状と関係がある1つ以上の症候の予防も含まれる。用語「処置」および「治療的に」は、「処置」を上記で定義したのと同様に、処置の行動をいう。介入の目的は、症状と闘うことであり、これには、症候もしくは合併症の発症を予防するまたは遅らせるため、あるいは、症候もしくは合併症を緩和するため、あるいは症状を排除するための治療の投与が含まれる。

10

20

【0094】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は本明細書中では互換的に使用され、これは、共有結合および/または非共有結合により連結されたアミノ酸の少なくとも1つの分子鎖を示す。この用語には、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質、ならびにポリペプチドの翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など）が含まれる。タンパク質断片、アナログ、突然変異型または変異型タンパク質、融合タンパク質などもまた、この用語の意味に含まれる。

【0095】

用語「EpCAM」は、上皮成長因子（EGF）様ドメインとサイログロブリン反復ドメインを含有するI型膜タンパク質をいう。具体的には、これは、大きな細胞外ドメイン（265アミノ酸）（EpEx）、23アミノ酸の1つの膜貫通部分（配列番号1のアミノ酸266～288）、および26アミノ酸の短い細胞質ドメイン（Ep-ICD - 配列番号1の - アミノ酸289～413）からなる。2つのEGF様反復は、細胞外ドメインの中に位置している（Balzarら、2001）。成熟酵素は314アミノ酸からなる[EpCAM（CD326）の概要については、Baeuerle PA and O Gires, British Journal of Cancer（2007）96, 417 - 423頁を参照のこと]。この用語には、EpCAM（具体的には、ヒトEpCAM）の天然配列のポリペプチド、イソ型、前駆体、およびキメラまたは融合タンパク質が含まれる。本発明で利用することができるEpCAMポリペプチドとしては、アクセッション番号NP_002345および配列番号1の中で見られる配列を含むポリペプチドが挙げられるが、これに限定されない。本発明の特定の態様においては、EpCAMの複数のドメイン（具体的には、Ep-ICDとEpEx）が本発明の方法において利用される。

30

40

【0096】

用語「 α -カテニン」は、いくつかのアルマジロリピート（すなわち、タンパク質 - タンパク質相互作用に関与しているおよそ50個のアミノ酸の配列）を含む接着結合タンパク質をいう。各反復は3つのヘリックスからなり、ヘリックス1とヘリックス3は互いに逆並行であり、ヘリックス2と直角に交わり、そしてヘリックス1とヘリックス2との間の鋭角のターンを可能にするグリシン残基が保存されている（Aberle H, ら、J Cell Sci. 1994年12月; 107（Pt 12）: 3655 - 63; van Hengel, J., ら、Cytogenet. Cell Genet. 70（1 -

50

2)、68-70(1995)を参照のこと)。この用語には、 β -カテニン(具体的には、ヒト β -カテニン)の天然配列のポリペプチド、イソ型、前駆体、およびキメラまたは融合タンパク質が含まれる。本発明において利用することができる β -カテニンポリペプチドとしては、Swiss-Protアクセッション番号P35222.1、Genbank NP_001091679、および配列番号7の中で見られる配列を含有しているポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0097】

「Wntタンパク質」は、胚発生の間の細胞間相互作用を調節する、高度に保存されている分泌型シグナル伝達分子のファミリーをいう。Wntタンパク質には、Wntシグナル伝達分子の産生、標的細胞上の受容体とのそれらの相互作用、および細胞のWntリガンドとの接触により生じる標的細胞の生理学的反応を調節するタンパク質が含まれ、これには標的タンパク質が含まれる。Wntタンパク質としては、Wntタンパク質(例えば、Wnt1、Wnt3、Wnt4、Wnt5B、Wnt7A、Wnt10A、Wnt10B)、Frizzled(FRZ)ファミリーの細胞表面受容体、Dishevelledファミリータンパク質、axinタンパク質(例えば、Axin1、Axin2)、WTX、PORC1、RSPO4、VANGL1、GSK-3、APC、TCF/LEFファミリーの転写因子(例えば、TCF4)、膜貫通タンパク質LRP、スクレロスチン(sclerostin)、三量体Gタンパク質、CK1、GSK3、Norrin、WTX、PORC1、RSPO4、VANGL1、および標的タンパク質(例えば、C-myc)が挙げられるが、これらに限定されるわけではない(MacDonald BT,ら、Dev Cell. 2009年7月; 17(1): 9-26; Cadigan KM Curr Biol. 2008年10月28日; 18(20): R943-7を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0098】

「天然配列のポリペプチド」には、天然由来のポリペプチドと同じアミノ酸配列を有しているポリペプチドが含まれる。そのような天然配列のポリペプチドは自然界から単離することができるか、または組み換えもしくは合成手段により産生することができる。この用語には、特に、自然界に存在している短縮型もしくは分泌型のポリペプチド、ポリペプチド変異体(自然界に存在している変異体形態(例えば、異なるようにスプライシングされた形態もしくはスプライシング変異体を含む)、および自然界に存在している対立遺伝子変異体が含まれる。

【0099】

用語「ポリペプチド変異体」は、天然配列のポリペプチドと少なくとも約10%、20%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性、具体的には、少なくとも約70~80%、より具体的には、少なくとも約85%、なおより具体的には、少なくとも約90%、最も具体的には、少なくとも約95%、97%、または99%のアミノ酸配列同一性を有しているポリペプチドを意味する。特定のポリペプチド変異体は、アクセッション番号NP_002345、および配列番号1、またはSwiss-Protアクセッション番号P35222.1、Genbank NP_001091679、および配列番号7において同定されている配列に対して、少なくとも70~80%、85%、90%、95%、97%、または99%のアミノ酸配列同一性を有する。そのような変異体としては、例えば、1つ以上のアミノ酸残基が、ポリペプチドの全長配列もしくは成熟配列のN末端またはC末端に付加されているか、あるいはそのN末端またはC末端から欠失しているポリペプチドが挙げられ、これには他の種由来の変異体が含まれるが、天然配列ポリペプチドは除外される。本発明の態様においては、変異体は、対応する天然配列のポリペプチドの免疫原性活性を保持している。

【0100】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の配列同一性は、配列をアラインメントし、必要に応じて最大のパーセント配列同一性を得るためにギャップを導入した後の、そして

配列同一性の一部としての保存的置換を全く考慮しない、ポリペプチド中のアミノ酸残基あるいは核酸配列と同一である候補配列中のアミノ酸残基あるいはヌクレオチドの割合(%)として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性またはパーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、例えば、公に利用することができるコンピューターソフトウェア(GCGプログラムパッケージ(Devereux J.ら、Nucleic Acids Research 12(1):387, 1984); BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Atschul, S.F.ら、J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)を含む)を使用して、様々な従来法で行うことができる。BLAST Xプログラムは、NCBIおよび他の供給業者(BLAST Manual, Atschul, S.ら、NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Atschul, S.ら、J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)から公に入手することができる。当業者は、アラインメントを測定するための適切なパラメーター(比較しようとする配列の全長にわたり最大のアラインメントを得るために必要な任意のアルゴリズムを含む)を決定することができる。同一性および類似性を決定するための方法は、公に入手することができるコンピュータープログラムにおいて体系化されている。

10

【0101】

ポリペプチド変異体には、全長のポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含む、天然のポリペプチドのアミノ酸配列に対して十分に同一であるアミノ酸配列、または天然のポリペプチドのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含有するポリペプチドが含まれる。ポリペプチドの一部分または断片は、例えば、3~5、8~10、10、15、15~20、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上のアミノ酸の長さのポリペプチドであり得る。ポリペプチドの複数の領域が欠失した部分あるいは断片は、組み換え技術により調製することができ、ポリペプチドに特異的な抗体を形成する能力のような、1つ以上の機能的活性について評価することができる。ポリペプチドの1つの部分または断片には、ポリペプチドの1つのドメイン、具体的には、1つの細胞外ドメインまたは細胞内ドメインが含まれ得る。

20

【0102】

対立遺伝子変異体もまた、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされるタンパク質に導入されるように、天然のポリペプチド配列をコードする核酸に置換、付加、または欠失を導入することにより作製することができる。突然変異は、標準的な方法(例えば、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘発)により導入することができる。1つの実施形態では、保存的置換が、1つ以上の予想される非必須アミノ酸残基に作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似する側鎖を持つアミノ酸で置き換えられている置換であり、そのいくつかは当該分野で公知である。

30

【0103】

自然界に存在している対立遺伝子変異体には、天然のポリペプチド配列由来の保存的アミノ酸置換が含まれる場合があり、またこれには、ポリペプチドホモログ(例えば、マウスポリペプチド)中の対応する位置に由来するアミノ酸の置換が含まれる場合もある。

【0104】

本明細書中で開示するポリペプチドには、キメラタンパク質または融合タンパク質が含まれる。「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」には、異種ポリペプチド(すなわち、異なるポリペプチド)に動作可能であるように連結されたポリペプチド全体またはその一部(好ましくは、生物学的活性のある部分)が含まれる。融合タンパク質において、用語「動作可能であるように連結された」は、ポリペプチドと異種ポリペプチドが互いにインフレームで融合されていることを示すように意図される。異種ポリペプチドは、ポリペプチドのN末端に融合することができ、また、C末端に融合することもできる。有用な融合タンパク質は、ポリペプチドがGST配列のC末端に融合されているGST融合タンパク質である。融合タンパク質の別の例は、ポリペプチド全体またはその一部が免疫グロブリンタンパク質ファミリーの1つのメンバーに由来する配列に対して融合されている

40

50

、免疫グロブリン融合タンパク質である。キメラタンパク質および融合タンパク質は、標準的な組み換えDNA技術により作製することができる。

【0105】

本明細書中に開示する方法において使用されるポリペプチドは、様々な供給源から（例えば、ヒトの複数の組織タイプから、または他の供給源から）単離される場合があり、また、組み換え方法もしくは合成方法により、またはこれらの技術および類似する技術の任意の組み合わせにより調製される場合もある。

【0106】

「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかをいう。この用語には、二本鎖および一本鎖のDNA、ならびに、二本鎖および一本鎖のRNA、ポリヌクレオチドのメチル化もしくはキャッピングのような修飾型ならびに未修飾の形態が含まれる。用語「ポリヌクレオチド」と「オリゴヌクレオチド」は本明細書中では互換的に使用される。ポリヌクレオチドには、さらなるコード配列または非コード配列が含まれる場合があるが、必ずしも必要ではなく、また、これが、他の分子および/または担体もしくは支持材料に対して連結させられている場合もあるが、これは必ずしも必要ではない。本発明の方法で使用するためのポリヌクレオチドは、特定の方法に適している任意の長さであり得る。特定の用途においては、この用語は、アンチセンス核酸分子（例えば、センスポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーに対して逆方向のmRNAまたはDNA鎖）をいう。

【0107】

ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーとしては、ポリペプチド甲状腺癌マーカー（天然配列のポリペプチド、ポリペプチド甲状腺癌マーカーの一部を含むポリペプチド変異体、イソ型、前駆体、およびキメラポリペプチドを含む）をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。本発明において利用することができるEpCAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、アクセッション番号UniProtKB/TrEMBL Q6FG26、UniProtKB/Swiss-Prot 16422、Genbank NM_002354およびBC014785、または配列番号2の配列、あるいはそれらの断片を含有する核酸が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。本発明において利用することができる - カテニンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、GenBankアクセッション番号NM_001904.3、NM_001098209、またはNM_001098210、あるいは、配列番号8、9、または10の配列を含有する核酸が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0108】

本発明の方法において使用されるポリヌクレオチドとしては、相補的核酸配列、およびこれらの配列に対して実質的に同一である（例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、または45%、好ましくは、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性）核酸が挙げられる。

【0109】

ポリヌクレオチドにはまた、遺伝子コードの縮重が原因で、1つの核酸配列とは異なる配列も含まれる。一例として、本明細書中に開示する甲状腺癌マーカーのヌクレオチド配列内のDNA配列多型は、そのアミノ酸配列には影響を及ぼさないサイレント突然変異を生じ得る。1つ以上のヌクレオチドにおけるバリエーションが、自然な対立遺伝子のバリエーションが原因で、1つの集団の個体間に存在し得る。ポリペプチドのアミノ酸配列中に変化を導くDNA配列多型もまた存在し得る。

【0110】

本明細書中に開示する方法において使用することができるポリヌクレオチドとしてはまた、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーの核酸配列に対してストリンジентな条件（好ましくは、高ストリンジエンシーの条件）下でハイブリダイズする核酸も挙げられる。DNAのハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシーの条件は当業者に公

10

20

30

40

50

知であるか、または Ausubelら(編) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6の中に見ることができる。一般的には、ストリンジェントな条件は、定義したイオン強度およびpHでの特定の配列についての熱融点(thermal melting point)(T_m)よりも約5%低く選択され得る。 T_m は、標的配列に相補的であるプローブの50%がその標的配列に対して平衡状態でハイブリダイズする温度(定義されたイオン強度、pH、および核酸濃度下での)である。一般的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオンまたは他の塩(例えば、約0.01~1.0Mのナトリウムイオン)であり、そして温度が、短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30°Cであり、そして長いプローブ、プライマー、およびオリゴヌクレオチドについては少なくとも60°Cである条件である。例えば、ハイブリダイゼーションは、6.0x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)で、約45°Cで行われ得、続いて、2.0xSSCで、50°Cでの、または6xSSC、0.5%のSDS、および50%のホルムアミドを含有する溶液中で42°Cでの洗浄が行われ得、続いて、0.1xSSCおよび0.5%のSDSの溶液中で68°Cでの洗浄が行われ得る。

10

【0111】

ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーにはまた、短縮型の核酸または核酸断片、およびDNAに対応するmRNAの選択的スプライシングにより生じる、本明細書中で開示するかまた言及する核酸の変異体形態も含まれる。ポリヌクレオチドの断片としては、特定のヌクレオチド配列の1つの領域に対応する(すなわち、特定のヌクレオチド配列の1つの領域と同一であるかまたはそれに相補的である)おおよそ少なくとも約6ヌクレオチド、具体的には、少なくとも約8ヌクレオチド、より具体的には、少なくとも約10~12ヌクレオチド、そしてなおより具体的には、15~20ヌクレオチドの連続する配列を含むポリヌクレオチド配列が挙げられる。

20

【0112】

対照または標準(例えば、正常なレベル、異なる病期に由来するレベル、または1人の患者由来の他の試料中でのレベル)と比較した患者試料中での、マーカーの「有意に異なる」レベルまたはマーカーレベルの「有意な差」は、その検出アッセイの標準誤差より大きいまたは小さいレベルを示し得、好ましくは、レベルは、対照または標準よりも、それぞれ、少なくとも約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍高いか、あるいは低い。

30

【0113】

「マイクロアレイ」および「アレイ」は、甲状腺癌と関係がある生体分子を検出するため(例えば、遺伝子発現を測定するため)に使用することができる、核酸またはヌクレオチドのアレイ、あるいはタンパク質またはペプチドのアレイをいう。例えば、Affymetrix, Inc.より製造されているインサイチュで合成されたオリゴヌクレオチドアレイGeneChip(商標)、またはIncyte Genomics Inc.により製造されているスポット状のcDNAアレイであるLifeArray(商標)のように、様々なアレイが市販されている。マイクロアレイの準備、使用、および分析は当業者に周知である(例えば、Brennan, T.M.ら(1995)米国特許第5,474,796号; Schenaら(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweilerら(1995), PCT出願番号WO95/251116; Shalton, D.ら(1995)PCT出願番号WO95/35505; Heller, R.A.ら(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; およびHeller, M.J.ら(1997)米国特許第5,605,662号を参照のこと)。

40

【0114】

「結合剤」は、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的に結合するポリペプチド、抗体、リボソーム、またはアプタマーのような物質をいう。物質は、それが、ポリペプチド甲

50

甲状腺癌マーカーと検出可能なレベルで反応し、無関係な配列または異なるポリペプチドの配列を含有するペプチドと検出できるほどには反応しない場合に、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに「特異的に結合する」。結合特性はE L I S Aを使用して評価することができ、E L I S Aは当業者が容易に行うことができる。

【0115】

結合剤は、ペプチド成分、RNAもしくはDNA分子、またはポリペプチドを持つ、あるいはそれらを持たないリボソームであり得る。結合剤は、ポリペプチド甲状腺癌マーカー配列、そのペプチド変異体、またはそのような配列の非ペプチド模倣物を含むポリペプチドであり得る。例として、ポリペプチド甲状腺癌マーカーの配列は、上記ポリペプチドにより媒介される機能を調節することができるポリペプチドのペプチド部分であり得る。

10

【0116】

アダプターとしては、核酸およびタンパク質に結合するDNAまたはRNA分子が挙げられる。甲状腺癌マーカーに結合するアダプターは従来技術を使用して、過度の実験を行うことなく産生することができる[例えば、アダプターのインビトロでの選択を記載している以下の刊行物を参照のこと：Klugら、Mol. Biol. Reports 20: 97-107 (1994)；Wallisら、Chem. Biol. 2: 543-552 (1995)；Ellington, Curr. Biol. 4: 427-429 (1994)；Latorら、Chem. Biol. 2: 291-303 (1995)；Conradら、Mol. Div. 1: 69-78 (1995)；およびUphoffら、Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 281-287 (1996)]。

20

【0117】

本発明での使用のための抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されるわけではない：合成抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組み換え体抗体、抗体断片（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂）、dAb（ドメイン抗体；Wardら、1989, Nature, 341: 544-546を参照のこと）、抗体重鎖、細胞内抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体軽鎖、単鎖F_vs (scFv)（例えば、単特異的抗体、二重特異的抗体などを含む）、抗イデオタイプ (ant-Id) 抗体、抗体部分を含むタンパク質、キメラ抗体（例えば、マウス抗体の結合特異性を含むが、残りの部分はヒト起源のものである抗体）、誘導體（例えば、酵素結合体または標識された誘導體）、ダイアポディー、直鎖抗体、ジスルフィド結合により連結されたF_vs (sdFv)、

多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、上記のいずれかのエピトープ結合断片、および必要な特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の改変された立体配置。抗体には、任意のタイプの抗体（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、およびIgY）、任意のクラスの抗体（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）、または任意のサブクラスの抗体（例えば、IgG2aおよびIgG2b）が含まれ、抗体は、必ずしも、任意の特定のタイプ、クラス、またはサブクラスのものである必要はない。本発明の特定の実施形態においては、抗体はIgG抗体、またはそのクラスもしくはサブクラスである。抗体は、鳥類および哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリ）を含む任意の動物起源由来の抗体であり得る。

30

40

【0118】

「組み換え体抗体」には、組み換え手段により調製されたか、発現させられたか、作製されたか、または単離された抗体（例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターを使用して発現させられた抗体、組み換え体であるコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックであるおよび/またはトランスクロモソーマル (transchromosomal) である動物（例えば、マウスまたはウシ）から単離された抗体、あるいは、免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシング (splicing) を含む任意の他の手段によって調製されたか、発現させられたか、作製されたか、または単離された抗体）が含まれる。

50

【0119】

「モノクローナル抗体」は、均質であるかまたは実質的に均質である抗体の1つの集団から得られる抗体をいう。一般的には、それぞれのモノクローナル抗体が、1つの抗原上の単一のエピトープを認識する。本発明の複数の態様においては、モノクローナル抗体は、単一のハイブリドーマまたは他の細胞により産生される抗体であり、これは、例えば、ELISAまたは当該分野で公知の他の抗原結合アッセイもしくは競合結合アッセイにより決定されるように、1つの甲状腺癌マーカーにのみ特異的に結合する。この用語は、抗体を作製するための特定の方法には限定されず、例えば、これらは、ハイブリドーマ法により産生される場合があり、また、当該分野で公知の方法を使用してファージライブラリーから単離される場合もある。

10

【0120】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、断片、ならびにキメラを含む抗体は、当業者に周知の方法を使用して調製することができる。単離された天然のポリペプチド甲状腺癌マーカーまたは組み換え体であるポリペプチド甲状腺癌マーカーを、抗体を調製するために利用することができる。例えば、モノクローナル抗体の調製については、Kohlerら(1975) *Nature* 256: 495-497; Kozborら(1985) *J. Immunol Methods* 81: 31-42; Coteら(1983) *Proc Natl Acad Sci* 80: 2026-2030; および Coleら(1984) *Mol Cell Biol* 62: 109-120を; モノクローナルFab断片の調製については、Huseら(1989) *Science* 246: 1275-1281を; そして、抗体を同定するためのファージミドまたはB-リンパ球免疫グロブリンライブラリーの調製については、Pound(1998) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa, N.J.を参照のこと。ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体はまた、科学的供給業者または商業的供給業者から入手することもできる。本発明の1つの実施形態においては、抗体は、これらが 10^{-7} Mより大きいか、それに等しい K_d で結合する場合には、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに対して反応性がある。

20

【0121】

EpCAMポリペプチドに特異的な抗体の例を表1に示す。

【0122】

マーカーの「状態」は、マーカーの有無、もしくは程度/レベル、またはマーカーのいくつかの物理的、化学的、もしくは遺伝的特徴をいう。そのような特徴としては、発現レベル、活性レベル、構造(配列情報)、コピー数、翻訳後修飾などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。マーカーの状態は、直接決定される場合も、また間接的に決定される場合もある。いくつかの実施形態においては、状態は、試料中のマーカーのレベルを決定することにより決定される。試料中の要素の「レベル」は、当該分野でのその通常の意味を有し、これには、定量的決定(例えば、mg/mL、倍数変化など)と定性的決定(例えば、マーカーの有無の決定、またはマーカーのレベルが標準と比較して高いか、低い、またはさらには存在するかどうかの決定)が含まれる。

30

【0123】

用語「異常な状態」は、試料中のマーカーの状態がマーカーについての参照状態とは異なることを意味する。参照状態は、正常な被験体由来の試料、症状を有している複数被験体由来の平均化された試料、または異なる時間に採取した同じ被験体由来の試料(単数または複数)中のマーカーの状態であり得る。異常な状態としては、マーカー(単数または複数)の増大、低下、有無が挙げられる。試料中のマーカーレベルの決定には、試料中のマーカーのレベルを決定することが含まれ、異常な状態は、標準と比較した低いレベル(検出不可能なレベルを含む)または高いレベル(ゼロを上回る任意の量を含む)のいずれかであり得る。被験体は、被験体の試料中のマーカーの状態が症状と相関関係がある(例えば、マーカーのレベルが標準または参照に近い、あるいは、その値を超えると症状と相関関係があるというおおよその閾値を超えるレベルで存在している)場合に、本明細書

40

50

中で開示する症状について高い可能性を有し得る。本明細書中に開示する症状について高い可能性がある被験体として、マーカーが異常な状態である被験体が挙げられ、そのような場合として、被験体がそのような状態を有していない場合でも、被験体はその状態について高い可能性がある。

【0124】

「上昇した状態」は、マーカーの1つ以上の特性が標準よりも高いことを意味する。本発明の複数の態様においては、この用語は、標準と比較した1つの特性の増大をいう。「低い状態」は、マーカーの1つ以上の特性が、標準よりも低いことを意味する。本発明の複数の態様においては、この用語は、標準と比較した1つの特性の低下をいう。「陰性状態」は、マーカーの1つ以上の特性が存在しないまたは検出不可能であることを意味する。

10

【0125】

(一般的な方法)

様々な方法を、甲状腺癌マーカーを含む甲状腺癌の診断および予後の評価、ならびにそのような障害の素因がある被験体の同定に利用することができる。このような方法では、例えば、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーおよびその断片、ならびに、ポリペプチド甲状腺癌マーカー(ペプチド断片を含む)に特異的な結合剤(例えば、抗体)を利用することができる。具体的には、上記ポリヌクレオチドおよび抗体は、例えば、(1)ポリヌクレオチド突然変異の存在の検出、あるいは、障害ではない状態と比較した、mRNAの過剰発現または低発現のいずれかの検出、あるいは、特定の症状もしくはそのような症状に対する罹患しやすさと相関関係があり得るポリヌクレオチド転写物の選択的にスプライシングされた形態の定性的もしくは定量的検出;および(2)障害ではない状態と比較したポリペプチドの過剰量または過少量のいずれか、あるいは、障害状態もしくは障害状態への進行と相関関係がある修飾された(例えば、全長よりも短い)ポリペプチドの存在の検出に使用することができる。

20

【0126】

本明細書中に開示する方法は、(例えば、宿主から新しく取り出した細胞の群において)悪性細胞の存在の可能性を評価するために使用することができる。このような方法は、腫瘍を検出するため、それらの増殖を定量化し、モニタリングするため、および疾患の診断および予後診断に役立てるために使用することができる。例えば、高レベルの核E p - I C D、核 - カテニン、または細胞質 - カテニンが、浸潤性甲状腺癌または転移性甲状腺癌(具体的には、A T C)の指標となる。

30

【0127】

1つの態様において、本発明は、甲状腺癌(より具体的には、A T C)の浸潤性または病期を決定するための方法を検討する。この方法には、患者由来の細胞中のポリペプチド甲状腺癌マーカーおよび甲状腺癌と関係がある他のマーカーのレベルのプロフィールを作る工程、ならびに、このプロフィールを参照プロフィールと比較して、疾患の浸潤性または病期の指標となる試験細胞についてのプロフィールを同定する工程が含まれる。

【0128】

本発明の方法には、試験しようとする被験体由来の試料中で定量化した甲状腺癌マーカーの量を、予め決定した標準値またはカットオフ値と比較することが必要である。標準値は、別の試料またはその被験体由来のより早い段階での試料について定量化されたレベル、あるいは、対照試料(具体的には、低悪性度の癌を有している被験体由来の試料)について定量化されたレベルに対応し得る。健康な被験体または癌被験体由来の対照試料についてのレベルは、前向きおよび/または後ろ向き統計学的試験により立証することができる。臨床的に明らかな疾患または異常を有していない健康な被験体を、統計学的試験のために選択することができる。診断は、対照試料または同じ被験体について定量化された以前のレベルと比較して、統計学的に異なる甲状腺癌マーカーのレベルを見出すことにより行うことができる。

40

【0129】

50

本発明はまた、甲状腺癌の多数のマーカ―を使用する、本明細書中に記載する方法を検討する。したがって、本発明は、生物学的試料を、甲状腺癌マーカ―または甲状腺癌の特異的指標となる他のマーカ―の存在を分析するための方法を検討する。本明細書中に記載する方法は、他のマーカ―またはそれらのマーカ―をコードするポリヌクレオチドを検出するための試薬を含めることにより改変することができる。他のマーカ―の例としては、ガレクチン - 3、サイログロブリン、E - カドヘリン、 α - カテニン、FHL2、および Lef - 1、c - Myc、ならびに β - アクチン（具体的には、ガレクチン - 3）が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0130】

（核酸の方法）

本明細書中に記載するように、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌または転移能を持つ甲状腺癌、より具体的には、ATC）を、試料中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカ―のレベルに基づいて検出することができる。核酸分子を検出するための技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーションアッセイ）は当該分野で周知である。

【0131】

プローブを、ポリヌクレオチドを検出するためのハイブリダイゼーション技術において使用することができる。この技術には、一般的には、核酸中の相補的配列に対するプローブの特異的アニーリングに好ましい条件下で（例えば、本明細書中で議論するようなストリンジェントな条件下で）、患者由来の試料または他の細胞性の供給源から得た核酸をプローブと接触させ、インキュベートすることが含まれる。インキュベーション後、アニーリングしなかった核酸が除去され、プローブにハイブリダイズした核酸の存在が、もしあれば、検出される。

【0132】

試料中のポリヌクレオチドの検出に使用するヌクレオチドプローブは、当該分野で公知の従来法を使用して構築することができる。プローブには、生物のゲノムの一部に対応するDNAまたはDNA模倣物、あるいは、相補性RNAまたはRNA模倣物が含まれ得る。核酸は、塩基部分で、糖部分で、またはリン酸骨格部分で修飾することができる。DNAは、標準的な方法（例えば、ゲノムDNAまたはクローニングした配列のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅）を使用して得ることができる。当該分野で公知のコンピュータプログラムを使用して、必要な特異性と最適な増幅特性を持つプライマーを設計することができる。

【0133】

ヌクレオチドプローブは、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C などの適切なシグナルを提供し、十分な半減期を有する放射性標識のような検出可能な物質で標識することができる。使用できる他の検出可能な物質としては、特異的に標識された抗体、蛍光化合物、酵素、標識抗原に対して特異的な抗体、および発光化合物によって認識される抗原が挙げられる。検出しようとする核酸に対するプローブのハイブリダイゼーションおよび結合の速度、ならびにハイブリダイゼーションに利用できる核酸の量に関して適切な標識を選択することができる。標識プローブは、Sambrookら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual（第2版）に一般的に記載されているように、ニトロセルロースフィルターもしくはナイロンメンブレンのような固体支持体上の核酸にハイブリダイズさせることができる。核酸プローブは、好ましくはヒト細胞中で、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカ―を検出するために使用することができる。ヌクレオチドプローブはまた、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカ―を含む甲状腺癌の診断に、甲状腺癌の進行をモニタリングする際に、また、治療的処置をモニタリングする際にも有用であり得る。

【0134】

試料中のポリヌクレオチドの検出には、PCRのような増幅方法を使用する特定の遺伝子配列の増幅、これに続いて行われる、増幅した分子の、当業者に公知の技術を使用する

10

20

30

40

50

分析が含まれ得る。例えば、PCRに基づくアッセイでは、ポリヌクレオチドの一部を増幅させるため、および試料に由来するポリヌクレオチドの一部を増幅させるために、オリゴヌクレオチドプライマーを利用することができる。ここでは、上記オリゴヌクレオチドプライマーは上記ポリヌクレオチドに特異的である（すなわち、それにハイブリダイズする）。増幅されたcDNAが、次に、当技術分野で周知の技術（例えば、ゲル電気泳動法）を使用して分離され、検出される。

【0135】

アッセイ条件下でハイブリダイゼーションを最大化するためには、本発明の方法において利用するプライマーおよびプローブは、一般には、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーの一部に対して少なくとも約60%、好ましくは、少なくとも約75%、およびより好ましくは少なくとも約90%の同一性を有する；すなわちこれらは、少なくとも10ヌクレオチド、および好ましくは、少なくとも20ヌクレオチドの長さである。1つの実施形態においては、プライマーおよびプローブは、少なくとも約10~40ヌクレオチドの長さである。プライマーの例は、配列番号3~6である。

10

【0136】

ハイブリダイゼーション反応および増幅反応はまた、本明細書中で議論するように、ストリンジেন্টな条件下で行うこともできる。

【0137】

本明細書に記載するハイブリダイゼーション技術および増幅技術を使用して、ポリヌクレオチド発現の質的側面および量的側面をアッセイすることができる。例えば、RNAはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを発現することが知られている細胞型または組織から単離し、ハイブリダイゼーション（例、標準的なノーザン分析）またはPCR技術を利用して試験することができる。

20

【0138】

プライマーおよびプローブは、生検または切除により得た患者組織の組織切片（固定したものおよび/または凍結したもの）上でインサイチュで、すなわち、直接使用することができる。

【0139】

本発明の1つの態様においては、PCRが逆転写と組み合わせて適用される、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を利用する方法が提供される。一般的には、RNAが、標準的な技術を使用して試料組織から抽出され、cDNAを生成するために逆転写される。cDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応のための鋳型として使用される。cDNAは、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーに特異的であるように設計されたプライマーのセットにハイブリダイズさせられる。プライマーおよび鋳型がアニーリングすると、DNAポリメラーゼを利用してプライマーから伸長させて、鋳型のコピーが合成される。DNA鎖は変性させられ、臭化エチジウム染色およびアガロースゲル電気泳動法によって可視化できるように十分なDNAが生成するまで、この手順が複数回繰り返される。

30

【0140】

増幅は、甲状腺癌が疑われる被験体、甲状腺癌に罹患していないかまたは初期段階の疾患を有しているかまたは浸潤性もしくは転移性疾患（具体的には、ATC）を有している個体から得られた試料について行うことができる。この反応は、少なくとも2桁の範囲に及ぶ倍率のcDNAの段階希釈液について行うことができる。非癌性の試料または初期段階の癌の試料の同じ希釈物と比較した、被験体試料の倍率希釈物中での発現の統計学的有意差を、癌の存在に対して陽性で見なすことができる。

40

【0141】

ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーに由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイ中で標的として使用できる。マイクロアレイを使用して、ポリヌクレオチドの発現レベルをモニタリングし、遺伝子の変異、突然変異、および多型を同定することができる。マイクロアレイからの情報は、遺伝子機能を決定するため、障害の遺伝的根拠を理解するため、障害を診断するため、および治療薬を開発してその活性をモニター

50

するために使用できる。したがって、本発明にはまた、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーおよび状況に応じて他の甲状腺癌マーカーを含有しているアレイも含まれる。アレイは、そのアレイ内のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーの発現をアッセイするために使用することができる。本発明は、ポリヌクレオチドの発現の定量化を可能にする。

【0142】

本発明は、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを含有しているマイクロアレイを提供する。1つの実施形態においては、本発明は、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌または転移能を持つ甲状腺癌、具体的には、ATC）と関係がある試料を識別するためのマイクロアレイを提供する。このマイクロアレイには、支持体に結合させたポリヌクレオチドプローブの位置を指定することができるアレイ、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーに相補的でありそれにハイブリダイズすることができる配列を含むポリヌクレオチドプローブが含まれている。

10

【0143】

1つの実施形態においては、アレイを、そのアレイ中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーの発現の時間的経過をモニタリングするために使用することができる。これは、腫瘍の進行のような様々な生物学的状況において行うことができる。

【0144】

アレイはまた、正常細胞と異常細胞におけるポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーおよび状況に応じた他の甲状腺癌マーカーの示差的発現パターンを確認するためにも有用であり得る。これは、診断的または治療的介入のための分子標的となる可能性がある一連の核酸を提供し得る。

20

【0145】

（タンパク質の方法）

結合剤を、様々な診断用途およびアッセイ用途に使用することができる。試料中の標的分子を検出するために結合剤を使用するための様々なアッセイ形式が当業者に公知である（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988を参照のこと）。一般的には、被験体における浸潤性甲状腺癌または転移能を持つ甲状腺癌（具体的には、ATC）の有無を、（a）被験体由来の試料を結合剤と接触させること；（b）試料中で、結合剤に結合するポリペプチドのレベルを検出すること；および（c）ポリペプチドのレベルを、予め決定した標準値またはカットオフ値と比較することにより決定することができる。本発明の特定の態様においては、結合剤は抗体である。

30

【0146】

1つの態様において、本発明は、被験体由来の生物学的試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを定量化することによる、被験体において甲状腺癌をモニタリングまたは診断するための診断方法を提供する。この方法には、試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されたポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体と反応させる工程、および検出可能な物質を検出する工程が含まれる。

【0147】

本発明の1つの態様においては、以下の工程を含むか、または本質的に以下の工程からなる、甲状腺癌（具体的には、ATC）の浸潤性または転移能を検出あるいは診断するための方法が提供される：

40

- （a）ポリペプチド甲状腺癌マーカーを含有していると疑われる試料を得る工程；
- （b）抗体に結合して複合体を形成させるために有効な条件下で、上記試料を、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的に結合する抗体と接触させる工程；
- （c）上記複合体の量を定量化することにより、上記試料中に存在するポリペプチド甲状腺癌マーカーの量を測定する工程；および
- （d）上記試料中に存在するポリペプチド甲状腺癌マーカーの量を、対照中のポリペプチド甲状腺癌マーカーの量と比較する工程であって、ここでは、対照中の量と比較した試料

50

中のポリペプチド甲状腺癌マーカーの量の変化または有意な差が、浸潤性甲状腺癌または転移能を持つ甲状腺癌（具体的には、ATC）の指標となる、工程。

【0148】

1つの実施形態において、本発明は、以下の工程を含む、個体において甲状腺癌の進行をモニタリングするための方法を検討する：

(a) ポリペプチド甲状腺癌マーカーに結合する抗体を個体由来の試料と、上記抗体と試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを含有する複合体が形成するように、接触させる工程；

(b) 上記試料中の複合体形成の存在もしくは量を決定または検出する工程；

(c) 遅い時点で、工程(a)と工程(b)を繰り返し行う工程；および

(d) 工程(b)の結果と工程(c)の結果を比較する工程であって、ここでは、複合体の形成量の差が、疾患、病期、進行、上記個体の癌の浸潤性および/または転移能の指標となる、工程。

【0149】

複合体の量はまた、甲状腺癌のリスクがない個体、または異なる病期の甲状腺癌に罹患している個体、あるいは異なる時点での同じ個体に由来する複合体の量の典型である値に対して比較することもできる。

【0150】

ポリペプチド甲状腺癌マーカーまたは誘導体（例えば、酵素結合体または標識誘導体）と特異的に反応する抗体を、様々な試料（例えば、生物学的材料、具体的には、組織試料）中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを検出するために使用することができる。これらは、診断用試薬または予後診断用試薬として使用することができ、これらは、ポリペプチド甲状腺癌マーカーのレベルの異常、または構造の異常、および/あるいはポリペプチド甲状腺癌マーカーの時間的、組織的、細胞性、もしくは細胞内での位置の異常を検出するために使用することができる。抗体はまた、ポリペプチド甲状腺癌マーカーを含む、甲状腺癌に対するそれらの影響を決定するために、インビトロで可能性がある治療用化合物をスクリーニングするためにも使用することができる。インビトロでの免疫アッセイもまた、特定の治療法の有効性を評価またはモニタリングするために使用することができる。

【0151】

抗体は、ポリペプチド甲状腺癌マーカーの抗原性決定基と抗体との間での結合相互作用による任意の免疫アッセイに使用することができる。試料中の抗原のインビトロでの決定のための免疫アッセイ手順もまた、当該分野で周知である[免疫アッセイ手順の一般的な記載については、例えば、Paterersonら、Int. J. Can. 37: 659 (1986)およびBurchellら、Int. J. Can. 34: 763 (1984)を参照のこと]。試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーの質的および/または定量的決定は、直接または間接的のいずれかの形式での、競合的あるいは非競合的免疫アッセイ手順により行うことができる。抗体を使用するポリペプチド甲状腺癌マーカーの検出としては、例えば、正方向、逆方向、または同時の様式のいずれかで行われる免疫アッセイを挙げることができる。免疫アッセイの例は、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(例えば、ELISA)、免疫蛍光法、免疫沈降法、ラテックス凝集法、血球凝集法、組織化学検査、およびサンドイッチ(免疫測定)アッセイである。あるいは、抗体のポリペプチド甲状腺癌マーカーに対する結合は、例えば、Biacore(登録商標)、微小熱量測定法、またはナノカンチレバー(nano-cantilever)のような、表面プラズモン共鳴(SPR)手順を使用して直接検出することができる。これらの用語は、当業者に周知であり、当業者であれば他の免疫アッセイ形式を知っているか、または過度の実験を行わずとも、容易に認識できるであろう。

【0152】

ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体は、検出可能な物質で標識することができる。この検出可能な物質の存在に基づいて生物学的試料中での場所を突き止めることができる。検出可能な物質の例として以下が挙げられるが、これらに限定されるわけではない

10

20

30

40

50

：放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）、ルミノールなどの発光標識；および酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリンホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ）、ビオチニル基（これは、マーキングされたアビジン（例えば、光学的方法もしくは熱量測定方法により検出できる蛍光マーカ―または酵素活性を含有するストレプトアビジン）により検出することができる）、ならびに、二次レポーター（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）により認識される予め決定されたポリペプチドエピトープ。いくつかの実施形態では、標識は、立体障害の可能性を減少させるために、様々な長さのスペーサーアームを介して結合させられる。抗体は、電子顕微鏡によっ

10

20

30

40

50

【0153】

抗体を検出できるように標識することができる1つの方法は、抗体を酵素に直接連結させることである。後に、酵素がその基質に曝されると、酵素は検出することができる生成物を産生する。酵素である検出可能な物質の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、マレイン酸デヒドロゲナーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸（glucose-6-phosphate）、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 α -5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロホスフェート、トリオースホスフェートイソメラーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼである。

【0154】

免疫アッセイシステムにおいて感度を高めるためには、蛍光を放射する金属原子（例えば、Eu（ユーロピウム）および他のランタニド）を使用することができる。これらは、金属キレート形成する基（例えば、DTPAまたはEDTA）により所望する分子に結合させることができる。

【0155】

生体発光化合物はまた、検出可能な物質としても使用され得る。生体発光性の検出可能な物質の例は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

【0156】

一次抗原-抗体反応が、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに対して反応性がある抗体に対して特異性を有している二次抗体の導入により増幅される、間接的方法もまた利用され得る。例えば、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに対して特異性を有している抗体がウサギIgG抗体である場合は、二次抗体は、本明細書中に記載するように検出可能な物質で標識されたFc断片特異的抗体である、ヤギ抗ウサギIgGである。

【0157】

上記抗体を結合させるまたは標識するための方法は、当業者であれば容易に行うことができる。

【0158】

光学顕微鏡および電子顕微鏡を使用して抗原の位置を確認するための当該分野で公知の細胞化学的技術が、ポリペプチド甲状腺癌マーカーを検出するために使用され得る。一般的には、抗体が検出可能な物質で標識され得、ポリペプチド甲状腺癌マーカーが、検出可能な物質の存在に基づいて組織および細胞中で位置を確認され得る。

【0159】

本発明の方法の状況では、試料、結合剤（例えば、抗体）またはポリペプチド甲状腺癌マーカーが、担体または支持体（例えば、アガロース、セルロース、ニトロセルロース、デキストラン、セファデックス、セファロース、リボソーム、カルボキシメチルセルロース、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、濾紙、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、ナイロン、または絹など）上に固定され得る。支持体材料は、球状、円筒状、または平

坦状を含む任意の可能な形態とすることができる。したがって、担体は、例えば、チューブ、試験プレート、ウェル、ビーズ、ディスク、球体などの形状であり得る。固定化された材料は、知られている化学的方法または物理的方法（例えば、臭化シアノゲンカップリング）を使用して、材料を好適な不溶性担体と反応させることによって調製することができる。結合剤（例えば、抗体）を、第1の結合剤に特異的な第2の結合剤を使用して間接的に固定化することができる。例えば、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的なマウス抗体を、担体または支持体上にコーティングされたFcフラグメント特異的抗体であるヒツジ抗マウスIgG抗体を使用して固定化することができる。

【0160】

放射性標識が検出可能な物質として使用される場合、ポリペプチド甲状腺癌マーカーの位置を、オートラジオグラフィーによって局在化することができる。オートラジオグラフィーの結果は、様々な光学的方法によりオートラジオグラフにおける粒子の密度を測定することにより、または粒子を計数することにより、定量化することができる。

10

【0161】

時間分解蛍光測定法を、蛍光シグナル、標識、または検出可能な物質を検出するために使用することができる。例えば、Christopoulos TKおよびDiamandis EP、Anal Chem、1992:64:342~346に記載される方法を、従来 of 時間分解型蛍光計とともに使用することができる。

【0162】

本発明の1つの実施形態にしたがうと、生物学的試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを検出するための免疫アッセイには、結合剤とポリペプチド甲状腺癌マーカーを含有する複合体（単数または複数）の形成を可能にする条件下で、試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的に結合する結合剤の量を接触させる工程、および上記試料中に含まれるポリペプチド甲状腺癌マーカーの量の測定値として、上記複合体（単数または複数）の存在または量を決定する工程が含まれる。

20

【0163】

本発明の1つの実施形態にしたがうと、ポリペプチド甲状腺癌マーカー抗体が、酵素で直接または間接的に標識され、上記酵素の基質が添加される方法が提供される。ここでは、基質は、その基質、または酵素と基質との反応産物が、ランタニド金属（好ましくは、ユーロピウムおよびテルビウム）と蛍光複合体を形成するように選択される。ランタニド金属（単数または複数）が添加され、ポリペプチド甲状腺癌マーカーが、蛍光複合体の蛍光を測定することにより試料中で定量化される。酵素は、ランタニド金属と錯体を形成する、その酵素の基質またはその酵素と基質との反応産物の能力に基づいて選択される。

30

【0164】

そのような蛍光複合体を提供する酵素および酵素の基質の例は、Diamandisの米国特許第5,312,922号に記載されている。例えば、抗体が、アルカリホスファターゼで直接または間接的に標識される場合は、この方法で利用される基質は、4-メチルウンベリフェリルホスフェート、5-フルオロサリチルホスフェート、またはジフルニサルホスフェートであり得る。複合体の蛍光強度は、典型的には、時間分解型蛍光計を使用して測定される。

40

【0165】

ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体はまた、酵素で間接的に標識される場合もある。例えば、抗体がリガンド結合対の一方のパートナーに対して結合させられ得、そして酵素が、リガンド結合対の他方のパートナーに対してカップリングさせられ得る。代表的な例として、アビジン-ビオチン、およびリボフラビン-リボフラビン結合タンパク質が挙げられる。複数の実施形態では、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体が酵素で標識される。

【0166】

本発明の方法の複数の態様には、(a)被験体由来の生物学的試料をポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体と反応させる工程（ここでは、上記抗体は酵素で直接または

50

間接的に標識される) ; (b) 酵素の基質を添加する工程 (ここでは、上記基質または上記酵素と基質との反応産物が蛍光複合体を形成するように、基質が選択される) ; (c) 蛍光複合体の蛍光を測定することにより、上記試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを定量化する工程 ; および (d) 被験体患者または対照被験体由来の他の試料について得られたレベルに対して、定量化したレベルを比較する工程が含まれる。1つの実施形態では、ポリペプチド甲状腺癌マーカーは E p - I C D、および - カテニンであり、上記定量化したレベルが、正常な被験体、初期段階の疾患を有している被験体、または異なる時点での同じ被験体について定量化したレベルに対して比較される。ここでは、対照被験体と比較したマーカーのレベルの増大が、A T C および / または予後不良もしくは生存性の指標となる。

10

【 0 1 6 7 】

本発明の特定の実施形態には、以下の工程が含まれる :

(a) 生物学的試料を、検出可能な物質で直接または間接的に標識されたポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な第 1 の抗体および固定化されたポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な第 2 の抗体とともにインキュベートする工程 ;

(b) 上記第 1 の抗体を上記第 2 の抗体から分離して、第 1 の抗体相と第 2 の抗体相を提供する工程 ;

(c) 上記第 1 の抗体相と上記第 2 の抗体相中の検出可能な物質を検出し、それにより、上記生物学的試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを定量化する工程 ; および

(d) 定量化したポリペプチド甲状腺癌マーカーを、予め決定した標準についてのレベルと比較する工程。

20

【 0 1 6 8 】

標準は、疾患を有していないかまたは初期段階の疾患を有している対照被験体由来の試料について、あるいはその被験体の他の試料から定量化したレベルに対応し得る。標準と比較した E p - I C D および / または - カテニンレベルの増大が、未分化甲状腺癌の指標となり得る。

【 0 1 6 9 】

1つの実施形態にしたがうと、本発明は、免疫アッセイによってポリペプチド甲状腺癌マーカーを測定することによる、試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを決定するための手段を提供する。様々な競合的または非競合的免疫アッセイ方法を、血清中のポリペプチド甲状腺癌マーカーを測定するために使用できることは、当業者に明らかであろう。競合的方法では、典型的には、ポリペプチド甲状腺癌マーカーおよびポリペプチド甲状腺癌マーカーの標識された形態に対する固定化された抗体または固定化することができる抗体が利用される。試料のポリペプチド甲状腺癌マーカーと標識されたポリペプチド甲状腺癌マーカーが、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体に対する結合について競合する。抗体に結合した得られる標識されたポリペプチド甲状腺癌マーカー (結合した画分) の、結合しないままであったもの (非結合画分) との分離後、結合した画分または非結合画分のいずれかにおいて標識の量が測定され、そして、任意の従来の様式で (例えば、標準曲線との比較により) 試験試料中のポリペプチド甲状腺癌マーカーの量と相関させられ得る。

30

40

【 0 1 7 0 】

別の態様では、非競合的方法が、ポリペプチド甲状腺癌マーカーの決定に使用される。最も一般的な方法は「サンドイッチ」法である。このアッセイでは、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な2つの抗体が利用される。これらの抗体のうちの一方は直接または間接的に標識され (「検出抗体」)、もう一方は固定化されるかまたは固定化することができる (「捕獲抗体」)。捕獲抗体と検出抗体は、試験試料と同時に、または連続して接触させることができる。連続的な方法は、捕獲抗体を試料とともにインキュベーションし、検出抗体をその後の予め決定された時間で添加することによって行うことができる。あるいは、検出抗体を最初に試料とともにインキュベーションすることができ、次いで捕獲抗体を加えることができる。必要なインキュベーション (単回または複数回) が行われた

50

後、アッセイを完了させるために、捕獲抗体が液体の試験混合物から分離され、標識が、分離された捕獲抗体相の少なくとも一部分において、または、液体の試験混合物の残り部分の少なくとも一部分において測定され得る。一般的には、捕獲抗体は捕獲抗体相において測定される。その理由は、捕獲抗体相が、捕獲抗体と検出抗体との間で「サンドイッチ」になったポリペプチド甲状腺癌マーカーを含むからである。別の実施形態においては、標識が、捕獲抗体と液体の試験混合物を分離することなく測定され得る。

【0171】

具体的には、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な本発明のマウスポリクローナル/モノクローナル抗体と、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的なウサギポリクローナル/モノクローナル抗体のサンドイッチ免疫アッセイが利用される。

10

【0172】

ポリペプチド甲状腺癌マーカーについての典型的な二部位免疫測定アッセイでは、捕獲抗体と検出抗体のうち的一方または両方がポリクローナル抗体であるか、あるいは、捕獲抗体と検出抗体のうち的一方または両方がモノクローナル抗体である（すなわち、ポリクローナル/ポリクローナル、モノクローナル/モノクローナル、またはモノクローナル/ポリクローナル）。検出抗体において使用される標識は、当該分野で従来から知られている任意の標識から選択することができる。標識は酵素または化学発光部分であり得るが、しかし、放射性同位体、蛍光団、および検出可能なリガンド（例えば、リガンドについての標識された結合パートナーによる二次的な結合によって検出することができる）などもまた可能である。1つの態様においては、抗体は、酵素と基質との反応産物が蛍光複合体を形成するように選択される基質を添加することによって検出される酵素で標識される。捕獲抗体は、試験混合物の残り部分から分離されるための手段を提供するように選択され得る。したがって、捕獲抗体は、既に固定化された形態または不溶性の形態でアッセイに導入することができるか、あるいは、固定化することができる形態（すなわち、固定化がアッセイへの捕獲抗体の導入に続いて達成されることを可能にする形態）であり得る。固定化された捕捉抗体には、固相（例えば、磁性粒子、ラテックス粒子、マイクロタイタープレートウエル、ビーズ、キュベットまたは他の反応容器）に共有結合的または非共有結合により結合させた抗体を含めることができる。固定化することができる捕獲抗体の一例が、リガンド部分（例えば、ハプテン、ビオチンなど）で化学的に修飾され、続いて、リガンドについての結合パートナー（例えば、抗体、アビジンなど）の固定化された形態との接触によって固定化することができる抗体である。1つの実施形態においては、捕獲抗体は、固相に結合させた捕獲抗体についての種特異的な抗体を使用して固定化することができる。

20

30

【0173】

（スクリーニング方法）

本発明ではまた、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC）の処置におけるそれらの潜在的有効性について試験薬剤または試験化合物を評価するための方法を検討する。試験薬剤および試験化合物としては、ペプチド（例えば、Igテールの融合タンパク質を含む可溶性ペプチド、ランダムペプチドライブラリーのメンバー、ならびに、D型および/またはL型のアミノ酸から作製されたコンビナトリアルケミストリーにより誘導した分子ライブラリーのメンバー）、ホスホペプチド（ランダムまたは部分縮重の特異的ホスホペプチドライブラリーのメンバーを含む）、抗体[例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、断片（例えば、Fab、Fab₂、およびFab発現ライブラリー断片、およびそれらのエピトープ結合断片）]、ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンス、siRNA）、ならびに、小さい有機分子または無機分子が挙げられるが、これらに限定されない。これらの薬剤または化合物は、内因性の生理学的化合物、または天然の化合物、または合成化合物であり得る。

40

【0174】

本発明は、甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC）の処置

50

における潜在的有効性について、試験薬剤を評価するための方法を提供する。この方法には：

(a) 患者から得た、試験薬剤に曝した第 1 の試料中の 1 つ以上の甲状腺癌マーカー、および状況に応じた他のマーカーのレベル；と

(b) 患者から得た第 2 の試料中で、1 つ以上の甲状腺癌マーカー、および状況に応じた他のマーカーのレベル（ここでは、上記試料は試験薬剤に曝していない）

とを比較する工程が含まれる。ここでは、第 2 の試料と比較した第 1 の試料中の 1 つ以上の甲状腺癌マーカーおよび状況に応じた他のマーカーの発現レベルの有意な差が、この試験薬剤がその患者の甲状腺癌の処置に有効である可能性があることの指標となる。

【 0 1 7 5 】

第 1 の試料および第 2 の試料は、患者から得た単一の試料の複数の部分であり得、または、患者から得たプールした試料の一部でもあり得る。

【 0 1 7 6 】

1 つの態様において、本発明は、患者において甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、A T C）を処置するための薬剤を選択する方法を提供する。この方法には：

(a) 患者から試料を得る工程；

(b) 複数の試験薬剤の存在下で試料のアリコートを手々に維持する工程、

(c) アリコートのそれぞれの中での 1 つ以上の甲状腺癌マーカーおよび状況に応じた他のマーカーを比較する工程；ならびに、

(d) 他の試験薬剤と比較して、その試験薬剤を含有するアリコートにおいて 1 つ以上の甲状腺癌マーカーおよび状況に応じた他のマーカーのレベルを変化させる試験薬剤の 1 つを選択する工程

が含まれる。

【 0 1 7 7 】

1 つの態様において、本発明は、被験体において甲状腺癌を阻害するための薬剤を選択する方法を提供する。この方法には、(a) 被験体から癌細胞を含有している試料を得る工程；(b) 複数の試験薬剤の存在下に試料のアリコートを手々に曝す工程；(c) アリコートのそれぞれの中での 1 つ以上の甲状腺癌マーカーを比較する工程；ならびに(d) 他の試験薬剤と比較して、その試験薬剤を含有しているアリコートにおいて甲状腺癌マーカーのレベルを変化させる試験薬剤の 1 つを選択する工程が含まれ、ここでは、甲状腺癌マーカーは、E p - I C D および / または - カテニンである。この方法にはさらに、被験体に、他の試験薬剤と比較してその試験薬剤を含有しているアリコートにおいて甲状腺癌マーカーのレベルを変化させる試験薬剤のうち少なくとも 1 つを投与する工程が含まれ得る。

【 0 1 7 8 】

1 つの態様において、本発明は、試験化合物の甲状腺癌細胞の発癌の可能性を評価する方法を提供する。この方法には：(a) 試験化合物の存在下および不在下で甲状腺癌細胞の別々のアリコートを維持する工程；ならびに、(b) アリコートのそれぞれの中での 1 つ以上の甲状腺癌マーカーの発現を比較する工程が含まれる。ここでは、試験化合物の不在下で維持したアリコートと比較した、試験化合物の存在下で維持した甲状腺癌マーカーのレベルの有意な差が、その試験化合物が甲状腺癌細胞の発癌の可能性を持つことの指標となる。ここでは、甲状腺癌マーカーは、E p - I C D および / または - カテニンである。

【 0 1 7 9 】

(キット)

本発明は、甲状腺癌を診断するため、および具体的には、甲状腺癌（より具体的には、A T C）の浸潤性または転移能を検出するために本発明の方法を実行するためのキットを検討する。そのようなキットは典型的に、診断アッセイを行うために必要な 2 つ以上の構成要素が含まれる。構成要素としては、化合物、試薬、容器および / または装置が挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されるわけではない。したがって、本明細書中に記載する方法は、本明細書中に記載する少なくとも1つの薬剤（例えば、抗体、プローブ、プライマーなど）を含有する事前に包装された診断キットを利用することにより行うことができる。そのような診断キットは、例えば、臨床状況において、甲状腺癌に罹患している患者を診断するために、また、甲状腺癌を発症する素因を示すそのような個体を診断するために、および具体的には、甲状腺癌（より具体的には、ATC）の浸潤性または転移能を決定するために都合よく使用することができる。

【0180】

本発明は、甲状腺癌を診断するため、具体的には、甲状腺癌（より具体的には、ATC）の浸潤性または転移能を決定するための、本明細書中に記載する結合剤（単数または複数）を含有しているキットを含む容器を検討する。例えば、キットには、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的な抗体、酵素（単数または複数）で標識された抗体に対する抗体、および酵素（単数または複数）の基質が含まれ得る。キットにはまた、マイクロタイタープレートのウェル、標準、アッセイ希釈液、洗浄緩衝液、接着プレートのカバー、および/またはキットを使用して本発明の方法を実行するための説明書も含まれ得る。

10

【0181】

1つの態様では、本発明は、被験体において甲状腺癌（具体的には、甲状腺癌、より具体的には、ATCの浸潤性または転移能）を診断するための試験キットを提供する。これには、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに結合する抗体、および/またはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーにハイブリダイズするかもしくはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを増幅するポリヌクレオチドが含まれる。別の態様では、本発明は、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに結合する抗体、および/またはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーにハイブリダイズするかもしくはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを増幅するポリヌクレオチドの、甲状腺癌の診断または検出、具体的には、甲状腺癌の浸潤性もしくは転移能の診断または検出のための組成物の製造における使用に関する。

20

【0182】

本発明のさらなる態様では、キットに、ポリペプチド甲状腺癌マーカーのエピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片と、甲状腺癌細胞と関係があるそれらのエピトープに対する抗体の結合を検出するための手段が、試験の前にさらに希釈され得る濃縮物（凍結乾燥させられた組成物を含む）としてのいずれかで含まれる。具体的には、本発明は、甲状腺癌（具体的には、ATC）の浸潤性または転移能を診断するためのキットを提供する。このキットには、既知の量の、ポリペプチド甲状腺癌マーカーに特異的に結合する第1の結合剤が含まれる。ここでは、第1の結合剤に検出可能な物質が含まれるか、または第1の結合剤が検出可能な物質に直接もしくは間接的に結合する。

30

【0183】

試料中のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーのレベルを検出するためのキットが設計され得る。そのようなキットには、一般的に、本明細書中に記載するオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーが含まれ、これらは、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーにハイブリダイズするか、またはポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを増幅する。オリゴヌクレオチドは、例えば、PCRまたはハイブリダイゼーション手順において使用され得る。標的のポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーを検出するために有用な試験キットもまた提供され、これには、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカー、およびその断片または相補物を含有している容器が含まれる。キットには、配列番号3～6のプライマーのうちの1つ以上が含まれ得る。

40

【0184】

本発明のキットにはさらに、血液を採取し安定化させるためのランセットおよび吸収紙または布を含む、試験試料（例えば、血清）を収集するために有用なツールを含む容器が含まれ得る。

【0185】

（コンピューターシステム）

50

本明細書中で検討する分析方法は、以下に記載する当該分野で公知のコンピューターシステムおよび方法の使用により実行することができる。したがって、本発明は、1つ以上の甲状腺癌マーカーを含むコンピューターで読み取り可能な媒体を提供される。「コンピューターで読み取り可能な媒体」は、コンピューターによる直接の読み取りおよびアクセスが行われ得る任意の媒体をいい、これには、磁気記憶媒体（例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ）；光学記憶媒体（例えば、CD-ROM）；電氣的記憶媒体（例えば、RAMおよびROM）、ならびに、これらのカテゴリーのハイブリッド（例えば、磁気/光学記憶媒体）が含まれるが、これらに限定されない。したがって、本発明は、患者および対照について同定されたマーカーがその上に記録されているコンピューターで読み取り可能な媒体を検討する。

10

【0186】

「記録された」は、情報をコンピューターで読み取り可能な媒体上に保存するためのプロセスをいう。当業者は、本明細書中に開示する1つ以上のマーカーについての情報を含む製品を作製するために、情報をコンピューターで読み取り可能な媒体上に記録するための現在知られている方法のうちの任意のものを容易に適応させることができる。

【0187】

様々なデータ処理装置のプログラムおよび形式を、1つ以上の甲状腺癌マーカーについての情報を保存するために使用することができる。例えば、情報は、WordPerfectおよびMicrosoft Wordのような市販されているソフトウェアでフォーマットされた文書作成処理用テキストファイルで表すことができ、あるいは、データベースアプリケーション（例えば、DB2、Sybase、Oracleなど）で保存されたASCIIファイルの形態で表すことができる。いくつものデータプロセッサ構造化形式（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を、マーカー情報がその上に記録されているコンピューターで読み取り可能な媒体を得るために適応させることができる。

20

【0188】

マーカー情報をコンピューターで読み取り可能な形態で提供することにより、当業者は、様々な目的のためにその情報に日常的にアクセスすることができる。例えば、当業者は、治療の間または治療後に得られたマーカー情報をデータ記憶手段内に保存されている情報と比較するために、コンピューターで読み取り可能な形態の情報を使用することができる。

30

【0189】

本発明は、患者が甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC）を有しているかどうか、または、そのような症状についての素因があるかどうかを決定するための方法を実行するための命令を収容するための媒体を提供する。この方法には、1つ以上の甲状腺癌マーカーの有無を決定すること、ならびに、そのようなマーカーの有無に基づいて、上記症状または上記症状についての素因を決定すること、そして、状況に応じて、医療手当または処置を勧告することが含まれる。

【0190】

本発明はまた、被験体が本明細書中に開示する症状を有しているかどうか、または本明細書中に開示する症状についての素因があるかどうかを決定するための方法を、電子的システムで、および/またはネットワークで提供する。この方法には、1つ以上のマーカーの有無を決定すること、ならびに、そのようなマーカーの有無に基づいて、被験体が上記症状を有しているかどうか、または上記症状についての素因があるかどうかを決定すること、そして、状況に応じて、医療手当または処置を勧告することが含まれる。

40

【0191】

本発明はさらに、被験体が本明細書中に開示する症状を有しているかどうか、または本明細書中に開示する症状についての素因があるかどうかを決定するための方法をネットワークで提供する。この方法には、(a)被験体についての表現型情報と、被験体由来の試料に関連する本明細書中に開示する1つ以上のマーカーについての情報を受け取ること、(b)マーカーに対応するネットワークから情報を取得すること、および(c)表現型情

50

報とマーカーについての情報に基づいて、被験体が上記症状を有しているかどうか、または上記症状についての素因があるかどうかを決定すること、ならびに、(d)状況に応じて、医療手当または処置を勧告することが含まれる。

【0192】

本発明はなおさらに、病的細胞または病的組織を同定する選択された記録を同定するためのシステムを提供する。本発明のシステムには、一般には、デジタルコンピューター、コンピューターに接続されたデータベースサーバー、データがその上に保存されているデータベースサーバーに接続されたデータベース(データには、本明細書中に開示する1つ以上のマーカーを含むデータの記録を含む)、および、所望する選択基準に基づく質問をデータベース内のデータファイルに適用して、所望する選択基準と合致する記録の報告を得るためのコード機構が含まれる。

10

【0193】

本発明は、被験体が本明細書中に開示する症状(具体的には、ATC)を有しているかどうか、または本明細書中に開示する症状についての素因があるかどうかを決定するための事業方法を検討する。この方法は、(a)被験体についての表現型情報と、被験体由来の試料に関連する本明細書中に開示する1つ以上のマーカーについての情報とを受け取ること、(b)マーカーに対応するネットワークから情報を取得すること、および(c)表現型情報、マーカーについての情報、および取得した情報に基づいて、被験体が上記症状を有しているかどうか、または上記症状についての素因があるかどうかを決定すること、および状況に応じて、医療手当または処置を勧告することが含まれる。

20

【0194】

本発明の1つの態様では、本明細書中に記載するコンピューターシステム、構成要素および方法は、症状をモニターするために、または症状の病期を決定するために使用される。

【0195】

(治療的適用)

本発明は、甲状腺癌(具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC)を含む、本明細書中に開示する甲状腺癌マーカーと関係がある治療的適用を検討する。甲状腺癌マーカーは、治療の標的であり得る。例えば、核Ep-ICDが、浸潤性甲状腺癌およびATCの処置の標的であり得る。治療方法としては、抗体療法の使用を含む免疫療法が挙げられる。1つの態様で、本発明は、甲状腺癌(具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC)を予防するために使用することができる1つ以上の抗体を提供する。別の態様において、本発明は、甲状腺癌(具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC)を予防する、阻害する、または軽減する方法を提供する。この方法には、甲状腺癌マーカー(例えば、Ep-ICD)に結合する抗体を、上記症状または上記症状の発症を予防する、阻害する、または軽減するために有効な量で患者に投与する工程が含まれる。

30

【0196】

甲状腺癌マーカー(具体的には、Ep-ICD)に結合する抗体は、標識、薬物、または細胞傷害性薬剤、受容体の標的結合領域、接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン、またはケモカインと組み合わせることができる。本発明の複数の態様においては、甲状腺癌マーカー(具体的には、Ep-ICD)が細胞傷害性薬剤(例えば、化学療法薬)、または毒素、もしくはその活性断片に結合させられ得る。毒素およびその対応する断片の例として、ジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンなどが挙げられる。細胞傷害性薬剤は、抗体に対して放射性同位体を結合させること、または抗体に共有結合させられたキレート化剤に対する放射性核種の結合により調製された放射性化学物質であり得る。抗体はまた、1つ以上の低分子毒素(例えば、カリケアマイシン、メイタンシン、トリコテセン(trichothene)、およびCC1065)に結合させることができる(米国特許第5,208,020号を参照のこと)。

40

50

【0197】

本発明の方法は、1種類の抗体、ならびに、異なる個々の抗体（例えば、他のマーカーの異なるエピトープを認識する抗体）の組合せまたは「カクテル」を投与することを検討する。そのようなカクテルが、甲状腺癌マーカーの異なるエピトープに結合する、および/または異なるエフェクター機構を利用する抗体を含むので、そのようなカクテルは特定の利点をいくつか有し得る。組み合わせたそのような抗体は、相乗的な治療効果を示し得る。加えて、1つ以上のマーカー特異的抗体の投与を、他の治療剤と組み合わせることができる。特異的抗体は、その「ネイキド(naked)」形態もしくは非結合形態で投与することができ、または、それに結合体化された治療剤を有し得る。

【0198】

本発明はまた、被験体において甲状腺癌を処置する方法を検討する。この方法には、Ep-CA M（具体的には、EpExまたはEp-ICD）に特異的な抗体を、それを必要とする被験体に送達する工程が含まれる。本発明の1つの態様においては、抗体は、細胞傷害性薬剤または毒素（上記を参照のこと）に結合させられる。抗体は、例えば、米国特許第7557190号、および同US7459538号、米国特許出願公開番号第20050163785号および同第20070122406号および同第20070196366号、ならびに、McDonaldら(Drug Design, Development and Therapy 2008; 2:105-114)に開示されている治療用抗体であり得る。特定の実施形態では、抗体は、毒素（より具体的には、VB4-845免疫毒素）に結合させられた抗体である(Viventia Biotechnologies Inc., Ontario, Canada)。

【0199】

より具体的には、本発明の1つの態様にしたが、甲状腺癌を有している被験体を処置する方法が提供される。ここでは、Ep-CA M（具体的には、EpExまたはEp-ICD）に特異的な抗体が治療有効量で投与される。さらなる態様においては、抗体は薬学的に許容され得る形態で提供される。

【0200】

1つの態様においては、本発明は、甲状腺癌の処置のための薬学的組成物を提供する。ここでは、上記組成物は、Ep-CA M（具体的には、EpExまたはEp-ICD）に特異的な抗体を、薬学的に許容され得る担体、賦形剤、またはビヒクルとともに含むことを特徴とする。

【0201】

本発明の方法で使用される抗体は、所望される送達方法に適している担体を含む薬学的組成物に配合することができる。適している担体には、抗体と組み合わせた場合にも、抗体の機能を保持し、かつ、被験体の免疫系との反応性を有さない任意の物質が含まれる。例としては、滅菌リン酸塩緩衝化生理的食塩水および静菌水などのような、多数の標準的な薬学的担体の全てが含まれる（一般的には、Remington's Pharmaceutical Sciences（第16版、A. Osal編、1980）を参照のこと）。

【0202】

1つ以上のマーカー特異的抗体処方物は、抗体を部位または損傷に送達することができる任意の経路によって投与することができる。投与経路としては、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内などが挙げられるが、これらに限定されない。抗体調製物を凍結乾燥させて、滅菌粉末として、（好ましくは減圧下）保存することができ、その後、例えば、ベンジルアルコール保存剤を含有する静菌水、または滅菌水で、注射前に再構成することができる。

【0203】

処置には、一般的には、有効用量での許容され得る投与経路による抗体調製物の反復投与が含まれる。投薬量は、当業者によって一般に理解されている様々な要因に依存し、そのような要因には、症状の病因、症状の病期、使用する抗体の結合親和性および半減期、患者におけるマーカーの発現の程度、および所望される定常状態での抗体濃度レベル、処

10

20

30

40

50

置の頻度、ならびに、本発明の処置方法との組合せで使用される何らかの治療剤の影響が含まれる。適切な用量を規定する際の決定要素は、特定の状況において治療的に有効であるために必要な特定の抗体の量である。反復投与は、所望される効果を達成するために必要とされ得る。1つ以上のマーカー抗体の直接的な投与もまた可能であり、特定の状況で利点を有し得る。

【0204】

患者は、最も効果的な投薬計画および関連する要素の決定を助けるために、甲状腺癌マーカーについて評価され得る。本明細書中に記載するアッセイ方法または類似するアッセイが、処置前の患者においてマーカーレベルを定量化するために使用され得る。そのようなアッセイはまた、治療期間を通じてモニタリングするために使用することができ、他のパラメーター（例えば、マーカーのレベル）を評価することと組合せて治療の成功を判定するために有用であり得る。

10

【0205】

本明細書中で開示するポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーは、そのポリヌクレオチドを高レベルで発現するベクターで細胞または組織をトランスフェクトすることにより、オフにすることができる。そのような構築物は、細胞を、翻訳できないセンス配列またはアンチセンス配列で満たすことができる。DNAに組み込まれなくても、そのようなベクターは、全てのコピーが内在性ヌクレアーゼにより機能しなくなるまで、RNA分子を転写し続けることができる。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルスに由来するベクター、あるいは様々な細菌プラスミドに由来するベクターを、標的化された臓器、組織または細胞集団にポリヌクレオチドを送達するために使用することができる。当業者に周知の方法を、アンチセンスのようなポリヌクレオチドを発現するであろう組み換え体ベクターを構築するために使用することができる（Sambrookら（前出）およびAusubelら（前出）に記載されている技術を参照のこと）。

20

【0206】

インビボ治療、インビトロ治療およびエクスピボ治療に適している、ベクターを細胞または組織に導入するための方法は当該分野で周知である。例えば、トランスフェクションによる送達またはリポソームが当該分野で周知である。

【0207】

遺伝子発現の改変を、ポリヌクレオチド甲状腺癌マーカーの調節領域（すなわち、プロモーター、エンハンサー、およびイントロン）に対するアンチセンス分子（DNA、RNA、またはPNA）を設計することによって得ることができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、転写開始部位（例えば、リーダー配列の-10領域から+10領域までの間）に由来する。アンチセンス分子はまた、それらが、転写物がリポソームに結合することを妨げることによりmRNAの翻訳を阻害するように設計することができる。阻害はまた、「三重らせん」塩基対形成方法論を使用して達成することができる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子、または調節分子が結合するために十分に開く二重らせんの能力を損なう。三本鎖DNAを使用する治療的利点は、Geer JEらにより（Huber BEおよびB I Carr（1994）、Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt Kisco, N.Y.中に）まとめられている。

30

40

【0208】

リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒する酵素活性RNA分子である。リボザイムは、相補的な標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、その後のエンドヌクレアーゼ的切断によって作用する。したがって、本発明は、ポリヌクレオチドマーカーのエンドヌクレアーゼ的切断を特異的かつ効率的に触媒することができる、操作されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が検討される。

【0209】

任意の可能性のあるRNA標的内の特異的なリボザイム切断部位は、GUA、GUU、およびGUCの配列を含むリボザイム切断部位について標的分子をスキャンすることによ

50

って最初に同定することができる。そのような部位が同定されると、切断部位を含有する標的遺伝子のその領域に対応する15リボヌクレオチド~20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドを無効にし得る二次構造の特徴について評価することができる。候補の標的の好適性もまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する接近し易さを調べることによって明らかにすることができる。

【0210】

本発明は、患者の甲状腺癌（具体的には、浸潤性甲状腺癌、より具体的には、ATC）を予防する、阻害する、または軽減する方法を提供し、この方法には、以下の工程が含まれる：

- (a) 患者から腫瘍試料を得る工程；
- (b) 複数の試験薬剤の存在下で試料のアリコートを手別に維持する工程；
- (c) それぞれのアリコートにおける、本明細書中に開示する甲状腺癌マーカーおよび状況に応じた1つ以上の他のマーカーのレベルを比較する工程；
- (d) 他の試験薬剤と比較して、その試験薬剤を含有しているアリコートの中で甲状腺癌マーカーおよび状況に応じた他のマーカーのレベルを変化させる少なくとも1つの試験薬剤を、患者に投与する工程。

【0211】

本明細書中に記載する活性な治療用物質を、従来の様式で、例えば、注射（皮下、静脈内など）、経口投与、吸入、経皮適用または直腸投与により投与することができる。投与経路に応じて、活性な物質は、活性な物質を不活性化する可能性がある酵素、酸、および他の天然の状態の作用から活性な物質を保護するために、1つの物質でコーティングすることができる。適切な界面活性剤を用いて適切な溶媒中の、遊離の塩基または薬学的に許容され得る塩としての活性な化合物の溶液を、調製することができる。グリセロール、液状ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中の分散液を、あるいは油中の分散液を調製することができる。

【0212】

本明細書中に記載する組成物は、被験体に投与することができる薬学的に許容され得る組成物の調製についてそれ自体が公知である方法によって調製することができ、その結果、有効量の活性な物質が、薬学的に許容され得るビヒクルとの混合物において組み合わせられる。適しているビヒクルは、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第21版, 2005, University of the Sciences in Philadelphia (編), Mack Publishing Company)、および1999年に刊行されたThe United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19)に記載されている。これに基づくと、組成物には、1つ以上の医薬的に許容され得るビヒクルまたは希釈剤と一緒に含み、そして生理学的流体に関して適しているpHおよび等浸透圧を持つ緩衝化された溶液中に含まれる、活性な物質の溶液が含まれるが、これに限定されない。

【0213】

組成物は、単独で、または他の治療剤もしくは他の処置形態との組み合わせのいずれかで、治療剤として適応される。本発明の組成物は、同時に、別々に、または、他の治療剤もしくは治療と連続して投与することができる。

【0214】

本発明の方法を使用して同定された組成物および試薬/化合物の治療活性は、適切な動物モデルを使用してインビボで評価することができる。

【0215】

下記の非限定的な実施例は本発明の例示である。

【実施例】

【0216】

(実施例1)

ヒトの原発性甲状腺癌中ならびに浸潤性および非浸潤性甲状腺癌細胞株のパネル中でのEpExタンパク質とEp-ICDタンパク質の発現を、EpCAMのEp-ExドメインとEp-ICDドメインに特異的な抗体を使用する免疫組織化学(IHC)により調べ、その知見をウェスタンブロッティングにより確認した。EpCAMの過剰発現が転写量の増大に寄与しているかどうかを決定するために、定量的リアルタイムPCR(Q-PCR)をこれらの腫瘍中のEpCAM転写物の分析に使用した。さらに、核のEp-ICDとβ-カテニンについての同時染色を、甲状腺癌における発癌性Ep-ICDシグナル伝達の予後的な重要性を立証するために行った。

【0217】

以下の材料と方法を、本実施例に記載する研究に利用した。

【0218】

(材料および方法)

(患者および組織検体)

本研究は、Ontario Ethics Committee and Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadaにより承認された。全ての特許の情報を提供し、署名入り同意を得た。30個の甲状腺癌パラフィンブロックを、Department of Pathology, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadaのアーカイブから回収した。15個の甲状腺腫瘍と15個の隣接する正常組織を含む30個の新しい凍結試料もまた、定量的リアルタイムPCR分析のための研究に含めた。これらの組織をRNAlater Tissue Protect溶液(Qiagen, Mississauga, ON)中で急速冷凍し、使用するまで-80℃で保存した。それぞれの症例をさらなる実験の前に病理学者により精査した。

【0219】

患者の経過観察のデータをデータバンクから検索して、腫瘍中でのタンパク質発現を腫瘍転帰と関連させてこれらのタンパク質の予後との関連を評価した。患者を最短で15カ月間、最長で199カ月間経過観察した。

【0220】

(抗体)

抗EpCAMモノクローナル抗体MOC-31(AbD Serotec, Oxford, UK)は、EpCAMのアミノ末端領域中の細胞外成分(EGF1ドメイン-aa27~59)を認識する[Chaudry Maら、2007]。EpCAMの細胞内ドメイン、β-EpICD抗体1144(Epitomics)は、EpCAMの細胞質ドメインを認識する。β-カテニンのaa571~781に対して惹起させられたβ-カテニン抗体(カタログ番号610154, BD Sciences, San Jose, CA)およびc-myc抗体(C19, sc-788, アフィニティー精製されたウサギポリクローナル抗体, Santa Cruz Biotechnology Inc.)。

【0221】

(細胞株)

M. Ringel, The Ohio State University, OHによる結腸癌細胞株WRO(これまでは甲状腺癌細胞株と考えられていた)とARO結腸癌細胞株(これまではATC細胞株と考えられていた)を、10%のウシ胎児血清(FBS)、2mmol/LのL-グルタミン、1mmol/Lのピルビン酸ナトリウム、および1xの非必須アミノ酸を補充したRPMI 1640の中で増殖させた。TPC-1(高分化型の甲状腺乳頭癌細胞株)を、5%のFBSと2mmol/LのL-グルタミンを補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で維持した。甲状腺髄様癌株TT(J. Fagin, University of Cincinnati, Cincinnati, OHによる)を、10%のFBSを補充したF-12K培地(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)中で増殖さ

10

20

30

40

50

せた。未分化甲状腺癌細胞株 CAL 62 (J . F a g i n による) を、10% の F B S を補充した D M E M 中で増殖させた。全ての細胞株を、加湿した 5% の C O₂ インキュベーターの中で 37 で培養し、70 ~ 80% のコンフルエント細胞を以下に記載する実験に使用した。

【0222】

(甲状腺癌中での E p E x および E p - I C D の発現についての免疫組織化学)

4 μ m の厚みの連続切片をパラフィンブロックから切り、ガラススライド上にマウントした。これらの切片を脱パラフィンし、キシレンと段階的なアルコール系列により水和した。これらのスライドを 0 . 3% の H₂O₂ で室温で 30 分間処理して、内因性のペルオキシダーゼ活性をブロックした。正常なウマまたはヤギ血清で非特異的結合をブロックした後、これらの切片を、抗 E p E x マウスモノクローナル抗体 M O C - 3 1 (希釈率 1 : 200) または - E p I C D 抗体 1 1 4 4 (希釈率 1 : 200)、またはマウスモノクローナル - カテニン抗体 (希釈率 1 : 200) とともに 30 分間、そしてビオチニル化された二次抗体 (ウマ抗マウス抗体またはヤギ抗ウサギ抗体) とともに 30 分間インキュベートした。これらの切片を、最後に、V E C T A S T A I N E l i t e A B C R e a g e n t (V e c t o r l a b s , B u r l i n g a m e , C A) とともにインキュベートし、ジアミノベンゼジン (d i a m i n o b e n z e d i n e) を色素原として使用した。

10

【0223】

(免疫組織化学染色の評価)

免疫陽性染色 (I m m u n o p o s i t i v e s t a i n i n g) を、記載されているように組織切片の 5 つの領域において評価した [R a l h a n ら、2008]。臨床転帰について盲検とした 2 人の評価者により観察した時に、上皮細胞が、細胞質、原形質膜、および / または核において免疫陽性を示した場合には、切片を陽性としてスコアした。これらの切片は以下のようにスコアした : 0、< 10% の細胞が免疫反応性を示した ; 1、10 ~ 30% の細胞が免疫反応性を示した ; 2、30 ~ 50% の細胞が免疫反応性を示した ; 3、50 ~ 70% の細胞が免疫反応性を示した ; および 4、> 70% の細胞が免疫反応性を示した。切片をまた、以下のように、強度に基づいて半定量的にスコアした : 0、なし ; 1、弱い ; 2、中程度 ; および 3、強い。最後に、合計スコア (0 ~ 7 の範囲) を、甲状腺癌と正常な甲状腺組織切片のそれぞれについて、陽性率のスコアと強度のスコアを足し算することにより得た。免疫組織化学のデータについて、以前に記載されているように統計分析を行った [R a l h a n ら、2008]。

20

30

【0224】

免疫組織化学的スコアのデータを、V i s i o p h a r m I n t e g r a t o r S y s t e m (V i s i o p h a r m , H o r s h o l m , D e n m a r k) を使用して確認した。このソフトウェアは、陽性である茶色の染色の強度の差に基づいて膜性、細胞質性、または核の染色を同時に定量化することができないので、核染色だけを定量化した。

【0225】

(統計分析)

免疫組織化学のデータについて、S P S S 10 . 0 ソフトウェア (C h i c a g o) を使用して統計分析を行った。ボックスプロットを使用して、正常な甲状腺組織と甲状腺癌における膜 E p E x、核 E p - I C D、および核または細胞質 - カテニンの発現の合計スコアの分布を決定した。2 のカットオフを、統計試験についての核 - カテニン免疫陽性の陽性基準と定義した。膜 - カテニンについては、6 のスコアを発現の喪失と定義した。

40

【0226】

E p E x、E p - I C D、および / または - カテニンの染色の発現と、患者の全体的な生存性との間での相関関係を、 Kaplan - M e i e r プロットを用いて生存性のデータから構築した生命表を使用して評価した。

【0227】

50

(細胞株、凍結検体、パラフィン切片からのRNAの単離、およびファーストストランドcDNAの合成)

RNAの単離は全て、製造業者の説明書にしたがって行った。全RNAを、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, MA)を使用して細胞株から抽出した。High Pure RNA Tissue KitとHigh Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Mannheim, Germany)を使用して、それぞれ、新しい凍結甲状腺組織検体およびFFPE試料からRNAを単離した。RNAの量を、ND-1000分光光度計 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE)を使用して測定した。ファーストストランドcDNAの合成は、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)を使用して行った。5 μ lの反応産物を、リアルタイムPCRの鋳型として使用した。

10

【0228】

(定量的リアルタイムRT-PCR)

定量的リアルタイムRT-PCR (Q-PCR)分析を、SYBR Green I Master Kit (Roche, Mannheim, Germany)とともにLightCycler 480 (Roche, Mannheim, Germany)を、製造業者の説明書にしたがって使用して行った。リアルタイムPCR反応を、95 で5分間のインキュベーションにより開始し、続いて、45サイクルの、95 で10秒間の変性、65 で15秒間のアニーリング、および72 で15秒間の伸長を行った。融解曲線分析を、PCRの完了直後に行った。全ての反応を3連で行い、この実験を少なくとも2回繰り返した。データを、LightCycler 480ソフトウェア1.5を使用して分析した。

20

【0229】

EpCAMおよびGAPDHについてのプライマーは、Probe Finder アッセイ設計ソフトウェア (Roche, Mannheim, Germany)を使用して設計し、これは、Sigmaにより合成され、HPLC精製された。プライマー配列は以下のとおりであった: EpCAM、5' - CCATGTGCTGGTGTGTGA A - 3' [配列番号3] (正方向)および5' - TGTGTTT TAGTTCAATGGATGATCCA - 3' [配列番号4] (逆方向); GAPDH、5' - AGCCACATCGCTCAGACAC - 3' [配列番号5] (正方向)および5' - GCCCAATACGACCAAATCC - 3' [配列番号6] (逆方向)。

30

【0230】

(免疫組織化学)

浸潤性および非浸潤性甲状腺癌細胞 (WRO、CAL-62、TT、およびTPC-1)と対照細胞 (ARO)をカバーガラス上にプレートし(1 \times 10³)、一晚増殖させた。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、4%のパラホルムアルデヒドを使用して固定した。免疫組織化学によるEp-Ex、Ep-ICD、および -カテニンの検出のために、固定した細胞を、MOC-31、1144 (希釈率1:200)、またはマウスモノクローナル -カテニン抗体で、それぞれ30分間染色し、ビオチニル化した二次抗体で30分間染色した。切片を最後に、VECTASTAIN Elite ABC Reagent (Vector Labs, Burlingame, CA)とともにインキュベートし、ジアミノベンゼジン (diaminobenzidine)を色素原として使用した。

40

【0231】

免疫蛍光の検出のためには、ヤギ抗マウスIgG-FITC (Sigma, St Louis, MO)またはIgG-Alexaを二次抗体として使用した。核をDAPIで染色した。免疫蛍光を蛍光顕微鏡 (Leica DM IRBE, Houston, TX)を使用して検出した。

【0232】

50

(ウェスタンブロッティング)

細胞溶解物を、溶解緩衝液(0.15 mMのNaCl、5 mMのEDTA (pH 8.0)、1%のTriton、10 mMのTris-Cl (pH 7.4))およびプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)中に調製した。細胞溶解物(30 µgのタンパク質)をSDS-PAGEにより分解し、PVDFメンブレン(Millipore, Billerica, MA)に移した。このメンブレンを抗EpCAMマウスモノクローナル抗体B302(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)(希釈率1:500)で、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次ヤギ抗マウス抗体で、そして製造業者の説明書(PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA)にしたがって化学発光検出システムでプローブした。タンパク質ローディングについての対照として、プロットを、マウスモノクローナル抗体C-4(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)(希釈率1:1000)を使用して、-アクチンについてプローブした。定量化は、Image Gaugeソフトウェア(Altura Software Inc.)を使用した濃度測定により行った。

10

【0233】

(結果)

(甲状腺癌中でのEpExおよびEp-ICDの発現の免疫組織化学的分析)

甲状腺癌中でのEp-ExとEp-ICDの臨床的重要性を決定するために、それらの発現を、それぞれ、ドメイン特異的抗体MOC-31および1144を使用して免疫組織化学によりアーカイブした組織において分析した。原形質膜でのEpEx免疫反応性はATCにおいては観察されなかった(図1、パネルIA)。膜EpExの喪失によりその細胞質/核での蓄積を生じたかどうかを決定するために、Ep-ICDの免疫染色を1144抗体を使用して行った。強い核および細胞質Ep-ICD免疫染色がATCにおいて観察された(図1、パネルIIA)。活性化されたEp-ICDは、-カテニンに結合し、インビトロで癌細胞の細胞増殖を活性化させることが示されている[Maezleら、2009]。-カテニンの免疫染色を、細胞質/核Ep-ICDと核/細胞質-カテニンとの間に何らかの相関関係があるかどうかを決定するために、連続切片において行った。この研究は、ATCにおける細胞質および核-カテニンの同時免疫染色を示した(図1、パネルIII A)。

20

30

【0234】

比較すると、分化の度合いが低い濾胞性甲状腺癌(PDFTC)のサブセットは、細胞間接触の領域に局在化した強い局所性のEpEx膜染色を示した(図1、パネルIB)。中程度の核染色および細胞質Ep-ICD免疫染色が、これらの腫瘍において観察された(図1、パネルIIB)。そして、弱い細胞質染色および顕著な膜染色が-カテニンについて観察された(図1、パネルIII B)。分化の度合いが低い甲状腺乳頭癌(PDPTC)はEpExの膜染色を示した(図1、パネルIC)。核染色およびぼんやりした細胞質Ep-ICD免疫染色は、これらの腫瘍においては観察されなかった(図1、パネルIIC)。膜染色および弱い細胞質染色が-カテニンについて観察された(図1、パネルIII C)。高分化型の甲状腺乳頭癌(WDPTC)は強いEpEx膜染色を示した(図1、パネルID)。これらの腫瘍においては、核染色は観察されなかったが、弱い細胞質Ep-ICD免疫染色が観察された(図1、パネルIID)。そして強い膜染色が-カテニンについて観察された(図1、パネルIII D)。比較すると、正常な(非悪性)甲状腺組織は、基底のEpEx膜免疫反応性を示し(図1、パネルIE)、そしてぼんやりした細胞質もしくは核Ep-ICD染色を示したか、または細胞質もしくは核Ep-ICD染色を示さず(図1、パネルIII E)、-カテニンについて基底の膜免疫反応性を示した(図1、パネルIII E)。扁平上皮細胞癌変異体は、ぼんやりしたEpEx膜免疫反応性を示し(図1、パネルIF)、強い細胞質および核Ep-ICD染色を示し(図1、パネルIII F)、そして-カテニンについては膜性および細胞質性の免疫反応性を

40

50

示した(図1、パネルI I I F)。

【0235】

核Ep-ICD染色を、visioフォーム(visioform)を使用して定量化した。甲状腺癌の様々なサブタイプにおける核Ep-ICD陽性の割合(%)を示しているヒストグラムを図1Gに示す。5つのATCが全て、核陽性を示した。核Ep-ICD陽性の面積の合計は12~40%の範囲に及んだ。注目すべきは、1つのPDPTCと1つのPDFTCもまた、核Ep-ICD陽性を示したことであった。全体では、甲状腺腫瘍の様々なサブタイプにおけるβ-カテニンの発現の分析が、ATCにおける細胞質および核での発現を示したが、PDFTCおよびPDPTC中、ならびにWDPTC中、さらには非悪性甲状腺組織中では、膜局在化が観察された。

10

【0236】

異なる病状を有している同じ患者の様々な組織ブロック由来の組織切片の分析は、個々の甲状腺腫瘍において観察したように、これらのタンパク質の発現パターンにおいて差を示した。図2のパネルA Iは、EpExの膜染色を示していないATC切片を示す。一方、パネルA I Iは、連続ATC切片中でのEp-ICDの強い核および細胞質局在化を示し、パネルA I I Iは、核および細胞質でのβ-カテニンの発現を示す。同じ患者由来の別の組織ブロックはSCCを示し、パネルB Iは、局所的なぼんやりした膜EpCAMの発現を示し、一方、パネルB I Iは、強い核および細胞質でのEp-ICDの発現を示し、そしてパネルB I I Iは、核および膜でのβ-カテニンの発現を示す。比較すると、PDFTCを示している同じ患者由来の別の組織ブロックは膜EpExだけを示したが(パネルC I)、細胞質Ep-ICDだけが観察され(パネルC I I)、核の免疫染色を伴わない膜β-カテニンが観察された(パネルC I I I)。同じ患者由来の正常な甲状腺組織は、EpCAMについて強い膜性染色(パネルD I)を示し、Ep-ICDについては核での強い染色を示さず(パネルD I I)、β-カテニンについては膜性染色を示した(パネルD I I I)。同じ患者において観察されたこれらの様々な染色パターンは、甲状腺癌の様々なサブセットにおけるこれらのタンパク質の示差的発現の観察を裏付ける。

20

【0237】

(ボックスプロット分析)

正常な甲状腺組織と甲状腺癌の様々なサブタイプのパラフィンに包埋した切片中で決定したEpEx、Ep-ICD、およびβ-カテニンの合計の免疫染色スコアの分布を、図3に示す。パネルAは、EpEx染色についてのボックスプロットを示す。A Iは、正常組織およびPTC中での膜EpEx局在化を示し、ATC中では検出できるほどの発現がないこと、ならびに、FTCおよびSCC中での様々に低下した発現を示す(3のメジアンスコアを持つ、太い横線)。パネルA I Iは、正常組織、PTC、PDPTC、PDFTC、およびFTC中での細胞質EpEx局在化を示し、ATC中では検出できるほどの発現がないこと、およびSCC中での様々に低下した発現を示す。パネルA I I Iは、正常組織、または甲状腺癌の全てにおいて、検出できるほどの核EpEx染色がないことを示す。

30

【0238】

パネルBは、Ep-ICD染色についてのボックスプロットを示す。Iは、いくつかのPTC、PDFTC、およびPDPTCにおける膜Ep-ICD局在化を示すが、ATC、FTC、およびSCCにおいては膜性染色を示さなかった。パネルB I Iは、正常組織、PTC、ATC、FTC、およびSCC、PDPTC、ならびにPDFTCにおける細胞質Ep-ICD局在化を示す。パネルB I I Iは、0のメジアンスコアを持つPTC、FTC、PDPTC、PDFTC、および正常な甲状腺組織と比較した、ATC中での核Ep-ICD局在化とSCC中での様々な発現(3のメジアンスコアを持つ、太い横線、縦の棒で示すように0~4の範囲)を示す。

40

【0239】

パネルCは、β-カテニン染色についてのボックスプロットを示す。Iは、ATCだけにおける核染色を示す。パネルC I Iは、分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける

50

細胞質 - カテニンを示す。パネルC I I Iは、正常組織と、A T Cのほとんどを除く分析した甲状腺癌の全てのサブタイプにおける膜 - カテニンを示す。

【0240】

免疫組織化学的スコアのデータを、V i s i o p h a r m I n t e g r a t o r S y s t e mを使用してさらに確認した。図3Dは、甲状腺癌の様々なサブタイプにおけるE p - I C Dの核染色を示す。分析した全てのA T Cおよび1つのP D P T Cおよび1つのP D F T Cが核E p - I C D発現を示した。

【0241】

(甲状腺癌中でのE p C A Mの発現の定量的リアルタイムR T - P C R分析)

浸潤性甲状腺癌および非浸潤性甲状腺癌におけるE p C A Mの示差的発現を、Q - P C Rにより転写レベルで決定した。図4は、甲状腺腫瘍および非悪性(組織学的には正常な)甲状腺組織中でのE p C A M転写物のレベルを示す。A T Cは、F T CおよびP T Cと比較して極めて低いレベルのE p C A M転写物を示した。E p C A M転写物と甲状腺癌の浸潤性との間では相関関係は観察されなかった。

10

【0242】

(E p E x、E p - I C D、および - カテニンの発現の疾患の転帰との関連性)

Kaplan-Meier生存性分析により、核E p - I C Dの発現を示している甲状腺癌患者について全生存率の低下が明らかになった($p < 0.0001$ 、図5A)。全生存率のメジアンは、核E p - I C Dを示さなかった患者についての185カ月と比較して、核E p - I C Dを示している患者においては5カ月であった。膜E p E xの喪失を示している患者は、膜性発現を示している患者(メジアン = 185カ月)よりも短い全生存率(メジアン = 5カ月)を有していた($p < 0.0001$ 、図5B)。核 - カテニンを示している患者は、核 - カテニンを示さなかった患者(メジアン = 185カ月)よりも短い全生存率(メジアン = 5カ月)を有していた($p = 0.0014$ 、図5C)。E p - I C Dおよび - カテニンの両方の核発現を示している甲状腺癌患者は、それらを示さなかった患者(メジアン = 185カ月)よりも短い全生存率(メジアン = 5カ月)を有していた($p = 0.0014$ 、図5D)。

20

【0243】

(浸潤性のヒト甲状腺癌細胞株中でのE p E xの細胞内局在化)

浸潤性のヒト甲状腺癌および非浸潤性のヒト甲状腺癌において観察されたE p E xとE p - I C Dの示差的な細胞内局在化を、インビトロで増殖させた甲状腺癌細胞株においてシミュレーションし、免疫組織化学により決定した。原形質膜に局在化した強いE p E x免疫染色が、W R O細胞、甲状腺髄様癌T T、および陽性対照である結腸癌細胞A R O(これまではA T C細胞と考えられていた)において免疫組織化学により検出されたが、未分化甲状腺癌細胞(C A L - 62)と低悪性度の甲状腺乳頭癌細胞(T P C - 1)の中では膜E p C A M染色は検出されなかった(図6A、パネルI)。これらの知見を免疫蛍光により確認した(図6A、パネルI I I)。

30

【0244】

細胞質および核でのE p - I C D染色がC A L - 62細胞において観察され、比較して、W R O細胞は、細胞質E p - I C Dとぼんやりした核染色を示した(図6B、パネルI IおよびI V)。図6B、パネルI Vに示したE p E x染色とE p - I C D染色を統合した画像は、W R O細胞中での強い膜染色とぼんやりした細胞質染色を示す。T T細胞中では、E p E xは、膜中の細胞間接触部位に強い局所性の染色と、ぼんやりした細胞質E p - I C D染色を示した。比較すると、未分化C A L - 62細胞は、核および細胞質E p - I C D染色を示し、E p E x染色は示さなかったかまたはぼんやりしたE p E x染色を示した。対照的に、非浸潤性の甲状腺乳頭癌細胞株T P C - 1は、検出できるほどのE p E x染色またはE p - I C D染色を示さなかった。

40

【0245】

ウェスタンブロット分析により、A R O、W R O、およびT T細胞中でのE p E xの顕著な過剰発現が裏付けられた。比較すると、低いE p E xレベルがC A L - 62細胞中で

50

観察され、そしてTPC - 1細胞中ではEpExは検出されなかった(図6C)。

【0246】

Q-PCR分析は、癌細胞株の同じパネル中でEpCAM転写物のレベルにおいて顕著な差を示さなかった。図6Dは、ARO、WRO、TT、およびCAL - 62細胞中でのEpCAM/GAPDH比を示す。転写物は、TPC - 1細胞中では定量化できなかった。

【0247】

(発癌性シグナルトランスデューサーとしてのEpCAM)

EpCAMの発癌性は、その細胞内ドメインの切り離しにより活性化されるとの説が提案されている。この細胞内ドメインは、Wnt経路の構成要素の活性化により細胞の核にシグナルを伝達することができる。原形質膜からのEpEx発現の喪失、細胞質での蓄積、および核への移動と、Wnt経路の構成要素である - カテニンの細胞内局在化および標的遺伝子(例えば、c - myc)の発現との間に何らかの相関関係があるかどうかを決定するために、これらのタンパク質の発現を甲状腺癌細胞株の上記パネルにおいて分析した。図6Eおよび6Fは、WRO細胞およびARO細胞における、細胞間接触部位での強いEpExの発現と、 - カテニンおよびc - mycの細胞質および核での局在化を示すが、これらはCAL - 62、TT、およびTPC - 1細胞中では示されない。

【0248】

(考察)

本研究の重要な発見は以下である：(i)未分化甲状腺腫瘍は膜EpExの喪失を示したが、腫瘍細胞の細胞質と核においてはEp - ICDの蓄積の増大を示し、これは、同時に起こる - カテニンの発現と並行して起こった。このことは、Ep - ICDが、これらの腫瘍において発癌性シグナルトランスデューサーとして作用し得、その結果である、 - カテニンを含むWnt経路の構成要素の活性化が、これらの腫瘍の迅速な増殖とそれらの予後不良の主な原因となり得ることを示唆している；(ii)EpExの膜での過剰発現が、高分化型濾胞性甲状腺癌および甲状腺乳頭癌の両方において観察されたが、分化の度合いが低い濾胞性甲状腺癌および甲状腺乳頭癌のサブセットは核Ep - ICDを示した；(iii)EpExは、培養物中の癌細胞、WRO、およびTTの表面上で過剰発現されていたが、未分化甲状腺癌細胞(CAL62)と浸潤性が低い細胞TPC - 1においては膜上では検出されず、一方で、核Ep - ICDがCAL62細胞中で検出された。これらは、臨床的知見を裏付けている。

【0249】

本研究は、Ep - ICDの細胞質ドメインに特異的な抗体を使用することについての最初の報告である。Ep - ICDの細胞質ドメインは、ATC中でのその細胞質および核での蓄積が実証されている。EpCAMの調節された膜内タンパク質分解(RIP)は、最近、Ep - ICDを産生するとの説が提案されている。Ep - ICDは、癌細胞においてEpCAMシグナル伝達を導入し、Wntタンパク質を活性化し、それにより、 - カテニンと標的遺伝子であるc - mycおよびサイクリンD1の核内での蓄積の増加を生じることが示されている(Munzら、2009)。ATC中での細胞質および核でのEp - ICDと - カテニンの同時発現が、Ep - ICDシグナル伝達の活性化とその結果であるWnt経路の構成要素の活性化の主な原因がATCの迅速な増殖であり得ることを示唆していることが明らかにされている。

【0250】

- カテニンは、標準的なWnt経路に関与しているシグナル伝達因子として重要な役割を担っている[L i Hら、2002]。 - カテニンの核局在化は、口腔白板症における前癌性の変化に関与しており[Ishida Kら、2007]、ヒトの癌(結腸直腸癌、胃癌、および食道癌を含む)の悪性転換と関係があることが知られている[Morin PJ 1997, Ogasawara N 2006, Takayama T, 1996, Zhou XB 2002]。標準的なWntシグナル伝達経路の活性化は、 - カテニンの核転座を生じ[Lustig B 2003]、したがって、核 - カテニ

10

20

30

40

50

ンは活性な細胞増殖についてのマーカーである。膜性および細胞質性の発現とは対照的に、 β -カテニンの核局在化は、腫瘍の進行に關与している。ATCにおける核での β -カテニン発現は、これらの腫瘍の浸潤性の性質の反映である。

【0251】

さらに、浸潤性甲状腺癌細胞株CAL62におけるインビトロでの知見は、Ep-ICD、 β -カテニン、およびc-mycの同時局在化を示唆しており、これは、ATC、ならびに、SCC、PDPTC、およびPDFTCのサブセットの浸潤性の性質の主要な原因であり得る、発癌性のEp-ICDシグナル伝達の活性化、Wnt経路の構成要素の活性化、およびその標的タンパク質であるc-mycの過剰発現を裏付けている。生存性についての分析データもまた、膜EpExの喪失と甲状腺癌患者の全生存率の低下との関係を明らかに示している($p < 0.0001$)。さらに、核Ep-ICDの蓄積($p < 0.0001$)および核 β -カテニンの発現($p = 0.0014$)は、単独で、またはEp-ICD($p = 0.0014$)との併用において、これらのタンパク質の核での蓄積を示さなかったこれらの甲状腺癌患者(メジアン = 185カ月)と比較した、低い全生存率(メジアン = 5カ月)と関係があることが明らかになった。これは、浸潤性甲状腺癌についての悪い予測として、単独での、または核 β -カテニンとの組み合わせにおける核Ep-ICDの臨床的重要性を強調している最初の報告である。

10

【0252】

甲状腺癌細胞株および原発性甲状腺腫瘍におけるインビトロでの知見は、高分化型甲状腺癌および分化の度合いが低い甲状腺癌の原形質膜中でのEpExの過剰発現を示唆しており、免疫療法の標的としてのその可能性を強調している。初期の免疫組織化学的研究において、Ensignerら(2006)が、高分化型の甲状腺癌および分化の度合いが低い甲状腺癌においてEpExの過剰発現を報告したが、分析した22個のATCにおいては発現が観察されなかったことに注目すべきである。この結果もまた、MOC-31(Ep-CAMの細胞外ドメインを認識する抗体)を使用して、ATCにおける細胞表面からのEpExの発現の喪失を確認する。ほとんどの高分化型および分化の度合いが低い濾胞性甲状腺癌ならびに甲状腺乳頭癌細胞の原形質膜上でのEpExの過剰発現は、EpExを癌マーカーとして、ならびに免疫療法の標的としての理想的な候補とする。ATC中での膜EpExの喪失とその核局在化は、新規の治療的アプローチがこれらの腫瘍においてEp-ICDを標的化するために必要であることを示唆している。

20

30

【0253】

(結論)

結論として、浸潤性甲状腺癌(未分化甲状腺癌、およびいくつかの分化の度合いが低い甲状腺乳頭癌)における膜EpExの喪失とEp-ICDの核での蓄積が明らかになった。それに付随する、これらの腫瘍における核 β -カテニンの増大は、これらの腫瘍におけるWnt経路のシグナル伝達の活性化を示唆していた。さらに、膜EpExの喪失、またはEp-ICDの核での蓄積は、単独で、あるいは β -カテニンとの組み合わせにおいて、甲状腺癌患者の低い全生存率と関係があった。Ep-ICDは浸潤性甲状腺癌のマーカーとなり得、新規の治療薬の標的である可能性がある。

【0254】

(実施例2)

(EpCAM - 可能性がある治療標的)

VB4-845/VB6-845で処理した場合のEpCAM陽性甲状腺癌の細胞増殖の阻害

EpCAM特異的免疫毒素であるVB4-845/VB6-845の細胞増殖に対する効果を、甲状腺癌細胞株のパネルにおいて、ならびに、様々なレベルのEpCAMの発現を持つ陽性対照である結腸癌細胞株において試験した。図7に示すように、MTTをベースとする細胞の生存性アッセイは、VB4-845が、WRO細胞およびARO細胞において増殖を阻害し、それぞれ、1pMおよび0.7pMのIC₅₀を有していたことを示した。比較すると、甲状腺髓様癌株TTは、この免疫毒素での処理に対してわずかに反応

40

50

したが、乳頭状細胞株 T P C - 1 および未分化細胞株 C A L - 6 2 は、検出できるほどの膜性 E p C A M 発現がなく、V B 4 - 8 4 5 に対して非反応性であった。同様の結果が、V B 6 - 8 4 5 で処理した同じ細胞株においても観察された（未公開データ）。

【0255】

甲状腺癌細胞株における V B 4 - 8 4 5 によるアポトーシスの誘導

F A C S による、V B 4 - 8 4 5 で処理した甲状腺癌細胞の細胞周期分析は、T T 細胞および T P C - 1 細胞と比較した、W R O 細胞および陽性対照である A R O 細胞中での s u b G 0 画分の顕著な増加が反映するアポトーシスの時間依存性誘導を示した。細胞株中での E p C A M の発現に対する V B 4 - 8 4 5 の効果もまた、様々な濃度の V B 4 - 8 4 5 での処理の前後に、ウェスタンブロッティングにより決定した。図 8 は、免疫毒素で処理した W R O 細胞中での E p C A M の発現の用量依存性の減少を示す。E p C A M の発現は、未処理の T P C - 1 細胞または V B 4 - 8 4 5 で処理した T P C - 1 細胞中で検出されなかった。

10

【0256】

免疫毒素と E p C A M の結合により生じた V B 4 - 8 4 5 細胞傷害性

免疫毒素 V B 4 - 8 4 5 は、抗 E p C A M 単鎖可変断片を P s e u d o m o n a s 外毒素 A の毒性と組み合わせた組み換え体融合タンパク質である。このタンパク質には、2 つのヘキサヒスチジンタグが隣接している。フローサイトメトリーアッセイにより決定すると、V B 4 - 8 4 5 との 2 時間のインキュベーション後に、抗 H i s 抗体が、E p C A M の発現を示している細胞において検出された。

20

【0257】

T P C - 1 細胞 (10^6) を、6 週齢の S C I D マウスに注射した。4 週間後、 $100 \mu\text{l}$ の P B S 中の $7.5 \mu\text{g}$ の V B 4 を、2 日毎にそれぞれの腫瘍について腫瘍の周囲に注射した。およそ 2 週間後、マウスを、主に大きすぎる腫瘍を理由として屠殺した。腫瘍の大きさを測定し、V B 4 での処理と P B S での処理との間で比較した。また、E p C A M の発現を、インビボおよびインビトロの両方で T P C - 1 についてスクリーニングした。腫瘍の大きさのばらつきの理由から、腫瘍の容積を割合 (%) に変換した。V B 4 で処理した場合には、10 個の腫瘍のうち 4 個が小さくなったが (図 9 (A))、P B S 群においては、8 個の腫瘍のうち 1 つしか小さくならなかった (図 9 (B))。

30

【0258】

(実施例 3)

以下の材料および方法を本実施例に記載する研究において利用した。

【0259】

(患者および組織検体)

本研究は、M o u n t S i n a i H o s p i t a l R e s e a r c h E t h i c s B o a r d , T o r o n t o , C a n a d a により承認された。I H C 分析については、正常な甲状腺組織 (N = 9)、非腫瘍性過形成性 / コロイド結節 (N = 1)、甲状腺乳頭癌 (P T C、N = 86)、濾胞性甲状腺癌 (F T C、N = 2)、分化の度合いが低い P T C (N = 1)、分化の度合いが低い F T C (N = 1)、甲状腺髄様癌 (N = 3)、島状癌 (N = 6)、S C C (N = 4)、未分化の甲状腺癌 (N = 11) のアーカイブされた組織ブロックを腫瘍バンクから取り出し、病理学者により精査し、以下に記載するように E p - I C D 抗体および E p E x 抗体 (M o c 3 1) での免疫染色のための組織切片の切断に使用した。

40

【0260】

以下は、研究結果についての考察である。

【0261】

(散布図分析)

図 10 ~ 14 の散布図は、分析した、正常な甲状腺組織と甲状腺腫瘍の 9 つのサブタイプにおける、E p - I C D および E p E x の膜 / 細胞質 / 核の免疫組織化学染色スコアの分布を説明する。A T C 群と S C C 群は、膜 E p E x 染色の顕著な減少を示し、4 未満の

50

平均スコアを有しており、島状癌は膜 E p E x の中程度の減少を示した。注目すべきは、A T C が E p E x の喪失を示し、1 未満の膜 I H C スコアを有していたことである (図 1 0)。正常な甲状腺組織の群と同様に、他の浸潤性が低い甲状腺腫瘍のサブタイプは高い E p E x 膜染色を示し、6 を上回る平均 I H C スコアを有していた (図 1 0)。E p E x の細胞質染色についての観察においては (図 1 1)、正常な甲状腺の群と同様に、いくつかの浸潤性が低い甲状腺癌のサブタイプ (例えば、P T C、F T C) は、A T C、S C C、および島状癌のサブタイプを含むより浸潤性である甲状腺癌のサブタイプよりも高い E p E x 染色を示した。A T C 群は、検出できるほどの低い E p E x 染色を示さなかったが、またはぼんやりした免疫反応性を示した。

【 0 2 6 2 】

重要なこととして、E p C A M の細胞内細胞質ドメイン (E p - I C D) に特異的な抗体を使用した場合の、膜染色を 図 1 2 に示し、図 1 3 は、甲状腺腫瘍のサブタイプの全てにおいて、および正常な甲状腺の群においてもまた観察された 4 ~ 5 の I H C スコアの平均発現レベルを示す。核 E p - I C D 染色の増大 (4 のカットオフを上回る) が、試験した 1 1 個の A T C 組織ブロックのうちの 1 0 個において観察され (図 1 4)、4 . 7 の平均染色スコアを有していた。浸潤性が低いサブタイプである S C C 群においては、4 個の症例のうちの 2 個が、4 のカットオフに達する核 E p - I C D 染色を示した。8 6 個の P T C 組織ブロック全てのうち、大部分の腫瘍が極めて低い E p I C D 核染色を示し、0 . 6 の平均スコアを有していた (表 2)。これは正常な群と類似している。他のサブタイプ (例えば、H P、F T C、P D P T C、P D F T C、M T C、島状癌) は全て、低レベルの E p I C D 核染色を示し、0 ~ 2 の間の E p - I C D 核発現スコアを有していた (図 1 4)。

【 0 2 6 3 】

(甲状腺腫瘍における E p - I C D および E p E x の発現の免疫組織化学的分析)

比較した 2 つの腫瘍である甲状腺癌サブタイプ (甲状腺乳頭癌と未分化甲状腺癌) のうち (表 2)、A T C 群は、陽性を決定するために 4 のカットオフを選択した場合には 1 1 個の組織ブロックのうちの 1 0 個において (9 0 . 9 %) 核 E p - I C D 陽性を示したが、1 1 個の組織全てが、4 のカットオフ値で E p E x の膜発現の喪失を示した。8 6 個の P T C 組織のうちの 1 個だけ (1 . 2 %) が核 E p - I C D 陽性を明らかに示した。P T C における 4 . 5 の高い核 E p I C D スコアの病歴との相関関係は、患者がリンパ節転移の証拠がある 3 5 歳の男性であったことを明らかにした。3 の核 E p - I C D スコアを持つ別の P T C 患者は、敗血症を伴う転移性膵臓癌を有していた。E p - I C D 染色スコアと E p E x I H C 染色スコアは、P T C 群と A T C 群との間で有意に異なっており、これにより、浸潤性甲状腺癌を非浸潤性甲状腺癌 (T C) と識別した。

【 0 2 6 4 】

(R O C 曲線分析)

R O C 曲線を、最も浸潤性である甲状腺癌のサブタイプ A T C を、最も頻繁に観察されたが非浸潤性である甲状腺癌のサブタイプ P T C から識別するために、膜 E p E x と核 E p - I C D について作製した (図 1 5 および 1 6)。R O C 分析の結果を表 4 にまとめる。4 のカットオフで、核 E p - I C D の蓄積により、9 0 . 9 % の感度、9 8 . 8 % の特異性、そして 0 . 9 9 3 1 の A U C で、A T C を P T C から識別した (図 1 5 および表 4)。これは、高レベルの核 E p I C D の蓄積が、浸潤性甲状腺癌のサブタイプを他の非浸潤性甲状腺癌のサブタイプから識別するための優れた生体マーカーとなる可能性があることを示唆している。図 1 5 および表 5 に示すように、核 E p I C D の I H C 染色スコアのカットオフを 2 . 5 ~ 4 の間で選択すると、この生体マーカー (核 E p I C D) は、9 0 ~ 1 0 0 % の高い感度、および 9 5 ~ 9 8 % の高い特異性で、A T C を P T C から識別することができる。4 のカットオフでは、膜 E p E x 発現の喪失によってもまた、1 0 0 % の高い感度、9 8 . 8 % の高い特異性、および 0 . 9 1 4 の A U C 値で、A T C の症例全てを P T C から識別することができた (図 1 6 および表 6)。陽性予想値は 9 1 . 6 7 % であり、陰性予想値は 1 0 0 % である (図 1 6 および表 6)。図 1 6 および表 7 に示

10

20

30

40

50

すように、E p E x 膜 I H C 染色スコアのカットオフを 3 . 5 ~ 5 の間で選択すると、この生体マーカー（膜 E p E x ）により、90 ~ 100 % の高い感度および 95 ~ 100 % の高い特異性で、A T C を P T C から識別することができる。

【0265】

（実施例4）

（フィリピン人の甲状腺癌の研究）

フィリピン人の集団について、甲状腺癌の発症率が高いことを観察し、これらの腫瘍はフィリピン人ではない患者よりも浸潤性が高かった。E p E x と E p - I C D の発現を、フィリピン人患者の浸潤性甲状腺癌と非浸潤性甲状腺癌において分析した。結果を以下に示す。

10

【0266】

（フィリピン人の甲状腺腫瘍における E p - I C D の発現の免疫組織化学的分析）

比較した3つの腫瘍群のうち（表3）、浸潤性悪性腫瘍群は、10個の組織のうちの7個において核 E p - I C D 陽性を示し、4の I H C スコアカットオフ値で、10個の組織のうちの6個が E p E x の膜発現の喪失を示した。分析した9個の良性腫瘍の症例と11個の非浸潤性悪性腫瘍の症例のいずれにおいても、E p E x の膜発現の喪失は観察されなかった。非浸潤性甲状腺癌は、核 E p - I C D 陽性を示さず、分析した9個の良性腫瘍のうちのみならず1つだけが核 E p - I C D 陽性を示した。図17に示す顕微鏡写真は、良性甲状腺腫瘍（A）および非浸潤性悪性腫瘍（C）における膜 E p E x 発現を示し、E p E x の膜発現の喪失が、10個の浸潤性悪性甲状腺腫瘍の症例の全てにおいていくつかの領域で観察された（E、G）。E p - I C D 核発現が、浸潤性悪性甲状腺腫瘍（F、H）において観察されたが、良性腫瘍群および非浸潤性悪性腫瘍群においては観察されなかった（B、D）。

20

【0267】

（ボックスプロット分析）

図18および19の散布図、図21Aおよび21B、ならびに図22Aおよび22Bのボックスプロットは、分析したフィリピン人の甲状腺腫瘍の症例の3つの群（全部で30の症例）における膜 E p E x 染色スコアと核 E p - I C D 染色スコアの分布を示した。核 E p - I C D 染色の増大（4のカットオフを上回る）は、試験した10個の浸潤性悪性腫瘍のうち7個において見られ（図22B）、4.3の平均染色スコアを示していた。

30

4のカットオフに達した核 E p - I C D 染色は、9個の良性腫瘍のうちではわずか1つにおいてしか観察されず、11個の非浸潤性悪性腫瘍組織のいずれにおいても観察されなかった。試験した9個の良性甲状腺腫瘍組織の全ておよび11個の非浸潤性悪性腫瘍の全てが、高レベルの膜 E p E x 染色を示し、およそ7の平均スコアを有している（図21（A））。膜 E p E x 発現の喪失は、浸潤性悪性腫瘍の症例の3分の2において観察された（図22A）。

【0268】

（ROC 曲線分析）

ROC 曲線を、悪性甲状腺腫瘍を良性腫瘍から識別するために（図20A、B）、また、浸潤性悪性腫瘍を非浸潤性腫瘍と識別するために（図20C、D）、膜 E p E x と核 E p - I C D について作製した。結果を含む関連する ROC 分析を表8にまとめる。

40

【0269】

核 E p - I C D の蓄積により、33.33%の感度、88.89%の特異性、および0.703の A U C 値で、悪性甲状腺腫瘍を良性腫瘍と識別した。核 E p - I C D の蓄積により、80%の感度、100%の特異性、1.0の A U C で、浸潤性悪性甲状腺腫瘍を非浸潤性癌と識別した（表8）。膜 E p E x の発現の喪失により、28.57%の感度、100%の特異性、および0.857の A U C 値で、悪性甲状腺腫瘍を良性腫瘍から識別した。核 E p - I C D の蓄積により、60%の感度、100%の特異性、および0.914の A U C で、浸潤性の悪性甲状腺腫瘍を非浸潤性癌から識別した（表8）。

【0270】

50

【表 1】

表 1

E p C A M に特異的な既知の抗体

抗体	エピトープ	参考文献
AUA1	EGF 様ドメイン I	Durbin ら
Ber-EP4	EGF 様ドメイン I	Latza ら
CO 17-1A	EGF 様ドメイン I	Herlyn ら
C215	EGF 様ドメイン I	Bjork ら
ESA, EGP-2, EGP40	実証されていない	Simon ら
FU-MK-1	実証されていない	Watanabe ら
GA733-2	EGF 様ドメイン I	Szala ら
HEA125	実証されていない	Momburg ら
K928	実証されていない	Quak ら
K931	EGF 様ドメイン I	Copper MP
KSA, KS-1, KS1/4	EGF 様ドメイン I	Varki ら
MM104	システインをほとんど含まない領域	Schön ら
MH99	EGF 様ドメイン I	Mattes ら
MOC31	EGF 様ドメイン I	Myklebust ら
MT201	実証されていない	Naundorf ら
VU-1D9	EGF 様ドメイン I	Tsubura ら
2G8	EGF 様ドメイン II	未公開データ
311-1K1	システインをほとんど含まない領域	Helfrich ら
323/A3	EGF 様ドメイン I	Edwards ら

10

20

【 0 2 7 1 】

【表 2】

表 2

良性甲状腺腫瘍および悪性甲状腺腫瘍における E p E x および E p - I C D の免疫組織化学的分析

腫瘍組織	ブロックの数 (N)	核 EpICD 陽性 (n)	核 EpICD 陽性 (%)	IHC スコア 平均 ± 標準偏差	t 検定 p 値	膜 E p E x (n)	膜 E p E x 割合 (%)	IHC スコア 平均 ± 標準偏差	t 検定 p 値
PTC	86	1	1.2	0.57±0.77	P<0.001	1	1.2	6.47±0.66	P<0.001
ATC	11	10	90.9	4.73±1.01		11	100	0.61±1.36	

注: ≥ 4 のカットオフ値を使用して、核 Ep-ICD 陽性を決定した; ≤ 4 スコアのカットオフ値を使用して、膜 E p E x 発現の喪失を決定した。

30

【 0 2 7 2 】

【表 3】

表 3

フィリピン人の甲状腺癌腫瘍における核 E p - I C D 発現および膜 E p E x 発現の生体マーカー分析

Ep-ICD 核染色スコア	AUC	感度 (%)	特異性 (%)	PPV (%)	NPV (%)	漸近 Sig (Asymptotic Sig.)
PTC vs. ATC	0.993	90.90	98.80	90.90	98.80	<0.001
EpEX 膜染色スコア	AUC	感度 (%)	特異性 (%)	PPV (%)	NPV (%)	漸近 Sig (Asymptotic Sig.)
PTC vs. ATC	0.914	100	98.80	91.67	100	<0.001

注: ≥ 4 のカットオフ値を使用して核 Ep-ICD 陽性を決定した; ≤ 4 スコアのカットオフ値を使用して、膜 E p E x 発現の喪失を決定した。

40

【 0 2 7 3 】

50

【表4】

表4
核E p I C DについてのROC曲線

ROC曲線下面積	
面積	0.9931
標準誤差	0.006375
95%の信頼区間	0.9806~1.006
P値	<0.0001
データ	
対照(PTC)	86
患者(ATC)	11
行方不明になった対照	0
行方不明になった患者	0

10

【0274】

【表5】

表5
PTCからATCを識別するためのE p I C D核染色

カットオフ	感度(%)	特異性(%)
>2.300	100	95.35
>2.850	100	96.51
>3.150	90.91	97.67
>3.650	90.91	98.84
>4.250	54.55	98.84
>4.750	54.55	100
>5.500	27.27	100

20

【0275】

【表6】

表6
E p E X-膜についてのROC曲線

ROC曲線下面積	
面積	0.9989
標準誤差	0.001768
95%の信頼区間	0.9955 to 1.002
P値	<0.0001
データ	
対照(PTC)	86
患者(ATC)	11
行方不明になった対照	0
行方不明になった患者	0

30

40

【0276】

【表 7】

表 7

PTCからATCを識別するためのEpEx膜染色

カットオフ	感度 (%)	特異性 (%)
<3.300	90.91	100
<3.550	90.91	98.84
<4.000	100	98.84
<4.550	100	97.67
<4.750	100	96.51
<5.050	100	95.35

10

【0277】

【表 8】

表 8

フィリピン人の甲状腺癌腫瘍における核Ep-ICD発現と膜EpEx発現の生体マーカー分析

Ep-ICD 核染色スコア	AUC	感度 (%)	特異性 (%)	PPV (%)	NPV (%)	漸近Sig (Asymptotic Sig.)
良性腫瘍対悪性腫瘍	0.703	33.33	88.89	87.5	36.3	0.085
非浸潤性癌対浸潤性癌	1.0	80.00	100	100	83.33	0.000
EpEX膜染色スコアの喪失	AUC	感度 (%)	特異性 (%)	PPV (%)	NPV (%)	漸近Sig (Asymptotic Sig.)
良性腫瘍対悪性腫瘍	0.857	28.57	100	100	37.50	0.002
非浸潤性癌対浸潤性癌	0.914	60.00	100	100	73.33	0.001

20

30

注：4のカットオフ値を使用して陽性を決定した。

刊行物についての完全な引用

【0278】

40

【化 1】

1. Spizzo G, et al, . *Breast Cancer Res Treat.* 2004;**86**:207–13
2. Went P, et al, . *Br J Cancer.* 2006;**94**:128–35.
3. Wenqi D, et al., *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;**135**:1277–85
4. Trzpis M, et al., *Am J Pathol.* 2007;**171**:386–95.
5. Stingl J, et al., *Breast Cancer Res Treat.* 2001;**67**:93–109.
6. Schmelzer E, et al., *Front Biosci.* 2008;**13**:3096–100.
7. Trzpis M, et al., *Front Biosci.* 2008;**13**:5050–5. 10
8. Al-Hajj M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;**100**:3983–8.
9. O'Brien CA, et al, *Nature.* 2007;**445**:106–10..
10. Ricci-Vitiani L, et al, *Nature.* 2007;**445**:111–5.
11. Weismann P, et al, *Neoplasma.* 2009;**56**:230–8..
12. Munz M, et al, *Cancer Res.* 2009;**69**:5627–9.
13. Maetzel D et al, *Nat Cell Biol.* 2009;**11**:162–71.
14. Litvinov SV, et al, *J Cell Biol.* 1997;**139**:1337–48 20
15. Münz M, et al, *Oncogene.* 2004;**23**:5748–58.
16. Reis EM, et al, *Cancer Res.* 2005;**65**:1693–9.
17. Jemal A, et al, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;**58**:71–96.
18. Pasiaka JL. et al, *Curr Opin Oncol.* 2003;**15**:78–83
19. Are C, Shaha AR. *Ann Surg Oncol.* 2006;**13**:453–64
20. Smallridge RC, et al, *Endocr Relat Cancer.* 2009;**16**:17–44.
21. Salvatore G, et al, *Cancer Res.* 2007;**67**:10148–58. 30
22. Nappi TC, et al, *Cancer Res.* 2009;**69**:1916–23.
23. Morin PJ. *Bioessays.* 1999;**21**:1021–30..
24. Brembeck FH, et al, *Curr Opin Genet Dev.* 2006;**16**:51–9.
25. Garcia-Rostan G et al., *Am J Pathol.* 2001;**158**:987–96.
26. Rocha AS, et al, *Histopathology.* 2003;**42**:580–7.
27. Lantsov D, et all, *Histopathology.* 2005;**47**:248–56.
28. Gujral TS, et al, *Cancer Res.* 2008;**68**(5):1338–46.
29. Ensinger C, et al, . *J Immunother.* 2006;**29**:569–73. 40
30. Chaudry MA, et al, . *Br J Cancer.* 2007;**96**:1013–9.
31. Ralhan R, et al, . *JProteome Res.* 2009;**8**:300–9.

【 0 2 7 9 】

【化2】

32. Li H, et al, *Cancer Biol Ther.* 2002;1:621-5.
33. Ishida K, et al, . *Mol Cancer.* 2007;6:62.
34. Morin PJ, et al, . *Science.* 1997;275:1787-90.
35. Ogasawara N, et al, *Histopathology.* 2006;49:612-21.
36. Takayama T, et al, . *Am J Pathol.* 1996;148:39-46.
37. Bian YS, et al, . *Am J Clin Pathol.* 2000;114:583-90.
38. Lustig B, Behrens J. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129:199-221.
39. Antolovic D, et al, *BMC Biotechnol.* 2010;10:35.
40. El-Sahwi Ket al, *Mol Cancer Ther.* 2010;9(1):57-66.
41. Raffel A, et al, *Eur J Endocrinol.* 2010;162(2):391-8.
42. Terris B, et al, *J Hepatol.* 2010;52(2):280-1.

10

本発明は、本明細書中に記載される特定の実施形態によって範囲が限定されることはない。そのような実施形態は、本発明の1つの態様の単に1つの例示と意図され、また、任意の機能的に等価な実施形態が本発明の範囲には含まれるからである。実際、本明細書中に示され、また、記載された変化に加えて、本発明の様々な変化が、前記の説明および添付されている図面から当業者には明らかであろう。そのような変化は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれるように意図される。

20

【0280】

本明細書中で言及した全ての刊行物、特許および特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が、その全体が言及により組み込まれたことが具体的かつ個々に示されているかのようにそれと同じ程度に、それらの全体が言及により組み込まれる。本明細書中で言及した全ての刊行物、特許、および特許出願は、それらの中で報告されている、本発明と一緒に使用され得る抗体、方法論などを記載および開示する目的のために、言及により本明細書中に組み込まれたこととする。本明細書中の事項はいずれも、本発明に

30

【0281】

(配列表)

配列番号1

NP__002345

【0282】

【化3】

MAPPQVLAFG	LLAAATATF	AAQEECVCE	NYKLAVNCFV	NNRQCQCTS	VGAQNTVICS	60
KLAAKCLVMK	AEMNGSKLGR	RAKPEGALQN	NDGLYDPCD	ESGLFKAKQC	NGTSTCWCVN	120
TAGVRRTDKD	TEITCSERVR	TYWIIIELKH	KAREKPYDSK	SLRTALQKEI	TTRYQLDPKF	180
ITSILYENNV	ITIDLQNSS	QKTQNDVDIA	DVAYYFEKDV	KGESLFHSKK	MDLTVNGEQL	240
DLDPGQTLIY	YVDEKAPEFS	MQGLKAGVIA	VIVVVVIAV	AGIVVLVISR	KKRMAYEKA	300
EIKEMGEMHR	ELNA					314

40

配列番号2

ヒト上皮細胞接着分子 (EPCAM)、mRNA

アクセッション NM__002354

【0283】

【化4】

1 aactgcagcg ccgggggctgg gggagggggag cctactcact cccccaactc cggggcgggtg
61 actcatcaac gagcaccagc ggccagaggt gagcagtcgc ggggaaggggc cgagaggcgg
121 ggccgccagg tcgggcaggt gtgcgctccg ccccgccgcg cgcacagagc gctagtcctt
181 cggcgagcga gcaccttcga cgcgggtccg ggacccccctc gtcgctgtcc tcccgcagcg
241 gaccgcggtg ccccaggcct cgcgctgccc ggccggctcc tcgtgtccca ctcccggcgc
301 acgccctccc gcgagtcctc ggccccctcc gcgccccctc tctcggcgcg cgcgcagcat
361 ggcgcccccg caggtcctcg cgttcgggct tctgcttgcc gcggcgacgg cgacttttgc
421 cgcagctcag gaagaatgtg tctgtgaaaa ctacaagctg gccgtaact gctttgtgaa
481 taataatcgt caatgccagt gtacttcagt tgggtcacia aatactgtca tttgctcaaa
541 gctggctgcc aaatgtttgg tgatgaaggg agaaatgaat ggctcaaaac ttgggagaag
601 agcaaaacct gaaggggccc tccagaacaa tgatgggctt tatgatcctg actgcgatga
661 gagcgggctc tttaaaggcca agcagtgcaa cggcacctcc atgtgctggt gtgtgaacac
721 tgctggggtc agaagaacag acaaggacac tgaaataacc tgctctgagc gagtgagaac
781 ctactggatc atcattgaac taaaacacia agcaagagaa aaaccttatg atagtaaaag
841 tttgoggact gcacttcaga aggagatcac aacgcgttat caactggatc caaaatztat
901 cagcagatatt ttgtatgaga ataatgttat cactattgat ctggttcaaa attcttctca
961 aaaaactcag aatgatgtgg acatagctga tgtggcttat tattttgaaa aagatgttaa
1021 aggtgaatcc ttgtttcatt ctaagaaaaat ggacctgaca gtaaatgggg aacaactgga
1081 tctggatcct ggtcaaaact taatttatta tgttgatgaa aaagcacctg aattctcaat
1141 gcagggtcta aaagctgggt ttattgctgt tattgtggtt gtggtgatag cagttgttgc
1201 tggaattggt gtgctgggta tttccagaaa gaagagaatg gcaaagtatg agaaggctga
1261 gataaaggag atgggtgaga tgcataggga actcaatgca taactatata atttgaagat
1321 tatagaagaa gggaaatagc aaatggacac aaattacaaa tgtgtgtgcg tgggacgaag
1381 acatctttga aggtcatgag tttgttagtt taacatcata tatttgtaat agtgaaacct
1441 gtactcaaaa tataagcagc ttgaaactgg ctttaccat cttgaaattt gaccacaagt
1501 gtcttatata tgcagatcta atgtaaaatc cagaacttgg actccatcgt taaaattatt
1561 tatgtgtaac attcaaatgt gtgcattaaa tatgcttcca cagtaaaatc tgaaaaactg
1621 atttgtgatt gaaagctgcc tttctattta cttgagtctt gtacatacat acttttttat
1681 gagctatgaa ataaaaacatt ttaaactgaa tttcttaaaa aaaaaaaaaa a

10

20

配列番号 3

【0284】

【化5】

5'-CCATGTGCTGGTGTGTGAA-3'

配列番号 4

【0285】

【化6】

5'-TGTGTTTTAGTTCAATGGATGATCCA-3'

30

配列番号 5

【0286】

【化7】

5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

配列番号 6

【0287】

【化8】

5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

40

配列番号 7

- カテニン Swiss - Prot : P35222 . 1 および Genbank NP__0

01091679

【0288】

【化 9】

1 matgadlme1 dmamepdrka avshwqqgsy ldsgihsgat ttapslsgkg npeedvdt
 61 qvlyeweggf sqsftqeqva didgqyamtr agrvraamfp etldegmqip stqfdaahpt
 121 nvqrlaepsq mlkhavnli nyqddaelat raipeltkl1 ndedqvvvnk aavmvhqlsk
 181 keasrhaimr spqmvsaivr tmqntndvet arctagtlhn lshhreglla ifksggipal
 241 vkmlgspvds vlfyaaitllh nlllhqegak mavrlagg1q kmvallnkt1 vkflaittdc
 301 lqilaygnqe skliilasgg pqualvnmrt ytyekllwtt srvlkvlsv1 ssnkpaivea
 361 ggmqalglhl tdpsqrlvqn clwtrlnlsd aatkqegmeg llgtlvqllg sddinvvtca
 421 agilsnltn nyknkmmvcq vggiealvrt v1ragdredi tepaicalrh ltsrhqeaem
 481 aqnavrlhyg lpvkvkllhp pshwplik1at vglirnlalc panhaplreq gaiprlvqll
 541 vrahqdtqrr tsmgg1tqqf vegvrmeev egctgalhil ardvhnrv1i rgIntiplfv
 601 qllyspieni qrvaagvlce laqdkeaaea ieaegatapl tellhsrneg vatyaav1lf
 661 rmsedkpgdy kkr1svelts slfrtepmaw netad1gldi gaggeplgyr qddpsyr1sfh
 721 sgygqdal1g mdpmmehemg gh1pgady1p dglpdlghaq dlmdglpp1gd snqlawfdtd
 781 1

10

配列番号 8

- カテニン mRNA NM_001904.3 (ヒト)

【0289】

【化10】

1 aggatacagc ggcttctg1c1g cgacttataa gagctccttg tgcggcgcca ttttaagcct
 61 ctcgg1tctgt ggcagcagc1g ttggcccggc cccgggagc1g gagagc1gagg ggag1cgggag
 121 acggaggaag gtctgaggag cagcttcag1t cccgc1ccgag ccgccaccgc aggtc1gagga
 181 cgg1tcggact cccgcggc1g1g gaggagcctg ttcccctgag ggtatttgaa gtataccata
 241 caactg1ttt1 gaaaatccag cgtggacaat ggctactcaa gctgatttga tggag1tgga
 301 catggccatg gaaccagaca gaaaagc1ggc tggtagtcac tggcagcaac agtcttacc1t
 361 ggactctgga atccattctg gtgccactac cacagctcct tctctgagtg gtaaaggcaa
 421 tcttgaggaa gaggatgtg1g atacctcca agtcctgtat gagtgggaac agggattt1c
 481 tcagtccttc actcaagaac aagtagctga tattgatgga cagtatgcaa tgactcgagc
 541 tcagagggta cgagctgcta tgttccctga gacattagat gagg1ccatgc agatcccatc
 601 tacacag1tt gatgctgctc atcccactaa tgtccagcgt ttggctgaac catcacagat
 661 gctgaaacat gcagttgtaa acttgattaa ctatcaagat gatgcagaac ttgccacacg
 721 tgcaatccct gaactgacaa aactgctaaa tgacgaggac cagg1tggtg ttaataaggc
 781 tgcag1ttatg gtccatcagc tttctaaaaa ggaagcttcc agacacgcta tcatgcgttc
 841 tcctcagatg gtgtctgcta ttgtacgtac catgcagaat acaaatgatg tagaaacagc
 901 tcg1ttgtacc gctgggacct tgcataacct ttcccatcat cgtgagg1ct tactggccat
 961 ctttaag1tct ggagggcattc ctgccctgg1t gaaaatgctt gg1tccaccag tggattctg1t
 1021 gttg1ttttat gccattacaa ctctccacaa ccttttatta catcaagaag gagctaaaat
 1081 ggcag1tgogt ttagctgg1tg ggctgcagaa aatgg1ttg1c ttgctcaaca aaacaaatgt
 1141 taaattct1tg gctattacga cagactgcct tcaaattt1ta gcttatggca accaagaaag
 1201 caagetcatc atactggcta gtggtggacc ccaagctt1ta gtaaataataa tgaggacc1ta
 1261 tacttac1gaa aaactactgt ggaccacaag cagag1tgctg aagg1tgctat ctgtctgctc
 1321 tagtaataag ccggctattg tagaagctgg tggaa1tgcaa gctttaggac ttcacctgac
 1381 agatccaag1t caacgtcttg ttcagaactg tctttg1gact ctcaggaatc ttcagatgc
 1441 tgcaactaaa caggaagg1ga tggaaag1tct ccttgggact cttg1ttcagc ttc1tggttc

20

30

【0290】

【化 1 1】

```

1501 agatgatata aatgtggtca cctgtgcagc tggaaattcct tctaacctca cttgcaataa
1561 ttataagaac aagatgatgg tctgccaagt ggggtgtata gaggetcttg tgcgtactgt
1621 ccttcgggct ggtgacaggg aagacatcac tgagcctgcc atctgtgctc ttcgtcatct
1681 gaccagccga caccaagaag cagagatggc ccagaatgca gttcgccttc actatggact
1741 accagttgtg gttaaagctct tacacccacc atcccactgg cctctgataa aggctactgt
1801 tggattgatt cgaaatcttg ccctttgtcc cgcaaatcat gcacctttgc gtgagcaggg
1861 tgccattoca cgactagttc agttgcttgt togtgcaeat caggataccc agcgccttac
1921 gtccatgggt gggacacagc agcaatttgt ggagggggtc cgcattggaag aaatagttga
1981 aggttgtacc ggagcccttc acatcctagc tcgggatggt cacaaccgaa ttgttatcag
2041 aggactaaat accattccat tgtttgtgca gctgctttat tctcccattg aaaacatcca
2101 aagagtagct gcaggggtcc tctgtgaact tgcctcaggac aaggaagctg cagaagctat
2161 tgaagctgag ggagccacag ctccctctgac agagttaact cactctagga atgaaggtgt
2221 ggcgacatat gcagctgctg ttttgttccg aatgtctgag gacaagccac aagattacaa
2281 gaaacggctc tcagttgagc tgaccagctc tctcttcaga acagagccaa tggcttggaa
2341 tgagactgct gatccttggc ttgatattgg tgcccagggg gaacccttg gatatcgcca
2401 ggatgatcct agctatcgtt cttttcactc tgggtggatat ggccaggatg ccttgggtat
2461 ggaccccatg atggaacatg agatgggtgg ccaccaccct ggtgctgact atccagttga
2521 tgggctgcca gatctggggc atgcccagga cctcatggat gggctgcctc caggtgacag
2581 caatcagctg gcctggtttg atactgacct gtaaatcacc ctttaggtaa gaagtttaa
2641 aaagccagtt tgggtaaaat acttttactc tgccctacaga acttcagaaa gacttgggtg
2701 gtaggggtgg agtggtttag gctatttcta aatctgccac aaaaacaggt atatactttg
2761 aaaggagatg tcttggaaac ttggaatggt ctccagattc tggttgttat gtgatcatgt
2821 gtggaagtta ttaactttaa tgttttttgc cacagctttt gcaacttaat actcaaatga
2881 gtaacatttg ctgtttttaa cattaatagc agcctttctc tctttataca gctgtattgt
2941 ctgaacttgc attgtgattg gcctgtagag ttgctgagag ggctcgaggg gtgggctggt
3001 atctcagaaa gtgcctgaca cactaaccaa gctgagtttc ctatgggaac aattgaagta
3061 aactttttgt tctggtcctt tttggctcag gagtaacaat acaaatggat tttgggagtg
3121 actcaagaag tgaagaatgc acaagaatgg atcacaagat ggaatttatc aaaccctagc
3181 cttgcttggt aaattttttt tttttttttt ttaagaatat ctgtaatggt actgactttg
3241 cttgctttga agtagctcct tttttttttt tttttttttt tttgcagtaa ctgtttttta
3301 agtctctcgt agtgtttaagt tatagtgaat actgctacag caatttteta tttttaagaa
3361 ttgagtaatg gtgtagaaca ctaattcata atcactctaa ttaattgtaa tctgaataaa
3421 gtgtaacaat tgtgtagcct ttttgtataa aatagacaaa tagaaaatgg tccaattagt
3481 ttccttttta atatgcttaa aataagcagg tggatctatt tcatgttttt gatcaaaaac
3541 tatttgggat atgtatgggt agggtaaatc agtaagaggt gttatttggg acctgttttt
3601 ggacagttta ccagttgect tttatoccaa agttgttgta acctgctgtg atacgatgct
3661 tcaagagaaa atgctggttat aaaaaatggt tcagaattaa acttttaatt cattcgattg

```

10

20

30

配列番号 9

NM_001098209 mRNA 直鎖状ヒトカテニン(カドヘリン結合タンパク質)
)、 1、88kDa

【0291】

【化 1 2】

1 aggatacagc ggcttctgcg cgacttataa gagctccttg tgcggcgcca ttttaagcct
 61 ctccggtctgt ggcagcagcg ttggcccggc cccgggagcg gagagcgagg ggagggcgag
 121 acggaggaag gtctgaggag cagcttcagt ccccgccgag ccgccaccgc aggtcgagga
 181 cggctggact cccgcgggcg gaggagcctg tccccctgag ggtatttgaa gtataccata
 241 caactgtttt gaaaatccag cgtggacaat ggctactcaa gctgatttga tggagttgga
 301 catggccatg gaaccagaca gaaaagcggc tgttagtcac tggcagcaac agtcttacct
 361 ggactctgga atccattctg gtgccactac cacagctcct tctctgagtg gtaaaggcaa
 421 tcctgaggaa gaggatgtgg atacctccca agtcctgtat gagtgggaac agggattttc
 481 tcagtccttc actcaagaac aagtagctga tattgatgga cagtatgcaa tgactcgagc
 541 tcagagggta cgagctgcta tgttcccctga gacattagat gagggcatgc agatcccatc
 601 tacacagttt gatgctgctc atcccactaa tgtccagcgt ttggctgaac catcacagat
 661 gctgaaacat gcagttgtaa acttgattaa ctatcaagat gatgcagaac ttgcacacgc
 721 tgcaatccct gaactgacaa aactgctaaa tgacgaggac caggtggtgg ttaataaggc
 781 tgcagttatg gtccatcagc tttctaaaaa ggaagcttcc agacacgcta tcatgogtto
 841 tcctcagatg gtgtctgcta ttgtacgtac catgcagaat acaaatgatg tagaaacagc
 901 tcgtttgtacc gctgggacct tgcataacct ttcccatcat cgtgagggct tactggccat
 961 ctttaagtct ggagggcatte ctgccctggt gaaaatgctt gggtccaccag tggattctgt
 1021 gttgtttttat gccattacaa ctctccacaa ctttttatta catcaagaag gagctaaaat
 1081 ggcagtgctg ttagctgggtg ggctgcagaa aatgggtgcc ttgctcaaca aaacaaatgt
 1141 taaattcttg gctattacga cagactgcct tcaaatttta gcttatggca accaagaaag
 1201 caagctcatc atactggcta gtggtggacc ccaagcttta gtaaataata tgaggaccta
 1261 tacttacgaa aaactactgt ggaccacaag cagagtgcct aaggtgctat ctgtctgctc
 1321 tacttaagaa ccggctattg tagaagctgg tggaaatgcaa gctttaggac ttcacctgac
 1381 agatccaagt caacgtcttg ttcagaactg tctttggact ctcaggaatc tttcagatgc
 1441 tgcaactaaa caggaagggg tggaaaggtct ccttgggact cttgttcagc tttcgggttc
 1501 agatgatata aatgtgggtca cctgtgcagc tggaaattctt tctaacctca cttgcaataa
 1561 ttataagaac aagatgatgg tctgccaagt ggggtggtata gaggctcttg tgcgtactgt
 1621 ccttcgggct ggtgacaggg aagacatcac tgagcctgcc atctgtgctc ttcgtcatct
 1681 gaccagccga caccaagaag cagagatggc ccagaatgca gttcgccttc actatggact
 1741 accagttgtg gttaagctct tacaccacc atcccactgg cctctgataa aggctactgt
 1801 tggatttgat cgaaatcttg ccctttgccc cgcaaatcat gcacctttgc gtgagcaggg
 1861 tgccattcca cgactagttc agttgcttgt tctgtcacat caggataccc agcgcggtac
 1921 gtccatgggt gggacacagc agcaatttgt ggaggggggtc cgcattggaag aaatagttga
 1981 aggttgatcc gggagccctc acatcctagc tccggatggt cacaaccgaa ttgttatcag
 2041 aggactaaat accattccat tgtttgtgca gctgctttat tctcccattg aaaacatcca
 2101 aagagtaget gcaggggtcc tctgtgaact tgctcaggac aaggaagctg cagaagctat
 2161 tgaagctgag ggagccacag ctccctctgac agagttactt cactctagga atgaaggtgt
 2221 ggcgacatat gcagctgctg ttttgttccg aatgtctgag gacaagccac aagattacaa
 2281 gaaacggcct tcagttgagc tgaccagctc tctcttcaga acagagccaa tggcttgga
 2341 tgagactgct gatcttggac ttgataattg tgcccaggga gaaccccttg gatatcgcca
 2401 ggatgactct agctatcgtt cttttcactc tgggtgatat ggccaggatg ccttgggtat
 2461 ggagccccat atggaacatg agatgggtgg ccaccacct ggtgctgact atccagttga
 2521 tgggctgcca gatctggggc atgcccagga cctcatggat gggctgcctc caggtgacag
 2581 caatcagctg gcctggtttg atactgacct gtaaactatc ctttagctgt attgtctgaa
 2641 cttgcattgt gattggcctg tagagttgct gagagggctc gaggggtggg ctggtatctc
 2701 agaaagtgcc tgacacacta accaagctga gtttccctatg ggaacaattg aagtaaactt
 2761 tttgttctgg tccttttttg tccgaggagta acaatacaaa tggattttgg gactgactca
 2821 agaagtgaag aatgcacaag aatggatcac aagatggaat ttatcaaac ctgaccttgc
 2881 ttgttaaatt tttttttttt tttttttaag aatatctgta atggactga ctttgccttc
 2941 tttgaagtag ctcttttttt tttttttttt ttttttttgc agtaactgtt ttttaagtct
 3001 ctccgtagtgt taagttatag tgaactctgc taccgaatt tctaattttt aagaattgag
 3061 taatgggtga gaacactaat tcataatcac tctaattaat tgtaactgta ataaagtga
 3121 acaattgtgt agcctttttg tataaaatag acaaatagaa aatgggtccaa ttagtttct
 3181 ttttaatatg cttaaaataa gcaggtggat ctatttcatg tttttgatca aaaactatct
 3241 gggatatgta tgggtagggt aatcagtaa gaggtgttat ttggaacctt gttttggaca
 3301 gtttaccagt tgccttttat cccaaagtgt ttgtaacctg ctgtgatagc atgcttcaag
 3361 agaaaatgcg gttataaaaa atggttcaga attaaacttt taattcatte gattg

配列番号 1 0

NM_001098210 mRNA 直鎖状ヒトカテニン(カドヘリン結合タンパク質)

【0292】

【化 1 3】

1 aggatacagc ggcttctgcg cgacttataa gagctccttg tgcggcgcca ttttaagcct
 61 ctcgggtctgt ggcagcagcg ttggcccggc cccgggagcg gagagcgagg ggagggcgag
 121 acggaggaag gtctgaggag cagcttcagt ccccgccgag ccgccaccgc aggtcgagga
 181 cggtcggact cccgcggcgg gaggagcctg ttcccctgag ggtatattgaa gtataccata
 241 caactgtttt gaaaatccag cgtggacaat ggctactcaa gctgatttga tggagttgga
 301 catggccatg gaaccagaca gaaaagcggc tgtagtcac tggcagcaac agtcttacct
 361 ggactctgga atccattctg gtgccactac cacagctcct tctctgagtg gtaaaggcaa
 421 tcttgaggaa gaggatgtgg atacctcca agtctctgat gagggggaaac agggattttc
 481 tcagtccttc actcaagaac aagtagctga tattgatgga cagtatgcaa tgactcgagc
 541 tcagagggta cgagctgcta tgttccctga gacattagat gagggcatgc agatcccatc
 601 tacacagttt gatgetgctc atcccactaa tgtccagcgt ttggctgaac catcacagat
 661 gctgaaacat gcagttgtaa acttgattaa ctatcaagat gatgcagaac ttgccacacg
 721 tgcaatccct gaactgacaa aactgctaaa tgacgaggac caggtggtgg ttaataaggc
 781 tgcagttatg gtccatcagc tttctaaaaa ggaagcttcc agacacgcta tcatgcgttc
 841 tctcagatg gtgtctgcta ttgtacgtac catgcagaat acaaatgatg tagaaacagc
 901 tcgttgtacc gctgggacct tgcataacct tcccctcat cgtgagggct tactggccat
 961 ctttaagtct ggagggcattc ctgcctggg gaaaatgctt ggttcaccag tggattctgt
 1021 gttgttttat gccattacaa ctctccaca ccttttatta catcaagaag gagctaaaat
 1081 ggcagtgctg ttagctgggtg ggctgcagaa aatgggtgct ttgctcaaca aaacaaatgt
 1141 taaattcttg gctattacga cagactgcct tcaaatttta gcttatggca accaagaaag
 1201 caagctcatc atactggcta gtggtggacc ccaagcttta gtaaataataa tgaggaccta
 1261 tacttacgaa aaactactgt ggaccacaag cagagtgctg aagggtgctat ctgtctgctc
 1321 tagtaataag ccggctattg tagaagctgg tggaaatgcaa gctttaggac ttcacctgac
 1381 agatccaagt caacgtcttg ttcagaactg tctttggact ctcaggaatc ttcagatgc
 1441 tgcaactaaa caggaagggg tggaaagctt ccttgggact cttgttcagc tctgggttc
 1501 agatgatata aatgtggtca cctgtgcagc tggaaattctt tctaacctca cttgcaataa
 1561 ttataagaac aagatgatgg tctgccaaat ggggtggtata gaggctcttg tgcgtactgt
 1621 ccttcgggct ggtgacaggg aagacatcac tgagcctgcc atctgtgctc ttcgtcatct
 1681 gaccagccga caccaagaag cagagatggc ccagaatgca gttcgccttc actatggact
 1741 accagttgtg gttaagctct tacacccacc atcccactgg cctctgataa aggctactgt
 1801 tggattgatt cgaaaatcttg cctttgtcc cgcaaatcat gcacctttgc gtgagcaggg
 1861 tgccattcca cgactagttc agttgcttgt tctgtcacat caggataccc agcgcctgac
 1921 gtccatgggt gggacacagc agcaatttgt ggggggggtc cgcattggaag aaatagttga
 1981 aggttgacc ggagcccttc acatcctagc tcgggatggt cacaaccgaa ttgttatcag
 2041 aggactaaat accattccat tgtttgtgca gctgctttat tctccattg aaaacatcca
 2101 aagagtagct gcaggggtcc tctgtgaact tgctcaggac aaggaagctg cagaagctat
 2161 tgaagctgag ggagccacag ctctctgac agagttactt cactctagga atgaaggtgt
 2221 ggcgacatat gcagctgctg ttttgttccg aatgtctgag gacaagccac aagattacaa
 2281 gaaacggcct tcagttgagc tgaccagctc tctcttcaga acagagccaa tggcttggaa
 2341 tgagactgct gatottggac ttgatattgg tgcccagggg gaaccccttg gatatcgcca
 2401 ggatgatcct agctatcgtt cttttcactc tgggtggatat ggccaggatg ccttgggtat
 2461 ggaccctatg atggaacatg agatgggtgg ccaccaccct ggtgctgact atccagttga
 2521 tgggctgcca gatctggggc atgcccagga cctcatggat gggctgcctc caggtgacag
 2581 caatcagctg gcctgggttg atactgacct gtaaatacct ctttaggagt aacaatacaa
 2641 atggattttg ggagtgactc aagaagtgaa gaatgcacaa gaatggatca caagatggaa
 2701 tttatcaaac cctagccttg cttgttaaat tttttttttt ttttttttaa gaatatctgt
 2761 aatggtagct actttgcttg ctttgaagta gctctttttt tttttttttt tttttttttg
 2821 cagtaactgt tttttaagtc tctcgtagtg ttaagttata gtgaatactg ctacagcaat
 2881 ttctaatttt taagaattga gtaatgggtg agaacactaa ttcataatca ctctaattaa
 2941 ttgtaatctg aataaagtgt aacaattgtg tagccttttt gtataaaata gacaaataga
 3001 aatgggtcca attagtttcc tttttaatat gcttaaaata agcaggtgga tctatttcat
 3061 gtttttgatc aaaaactatt tgggatattg atgggtaggg taaatcagta agaggtgta
 3121 tttggaacct tgttttggac agtttaccag ttgcctttta tcccaaagtt gttgtaacct
 3181 gctgtgatac gatgcttcaa gagaaaatgc gggtataaaa aatgggttcag aattaaactt
 3241 ttaattcatt cgattg

10

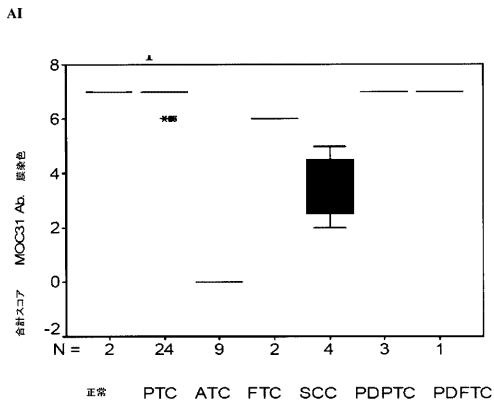
20

30

40

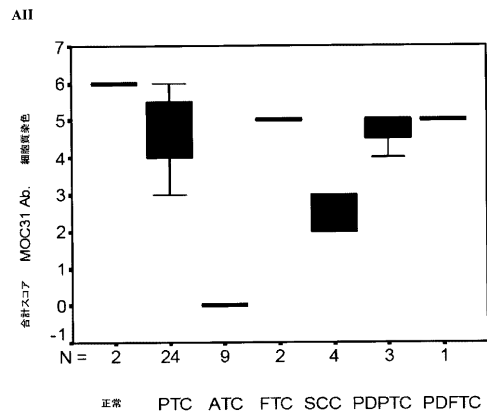
【 図 3 - 1 】

Figure 3



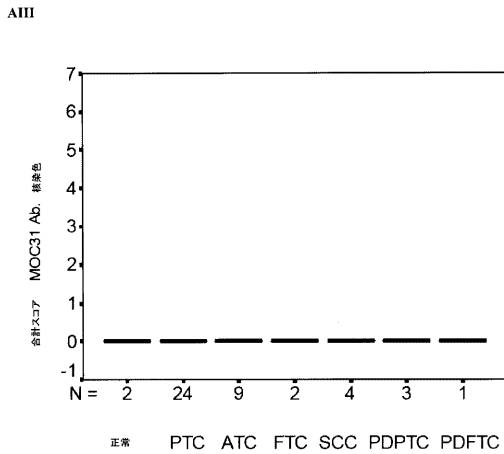
【 図 3 - 2 】

Figure 3



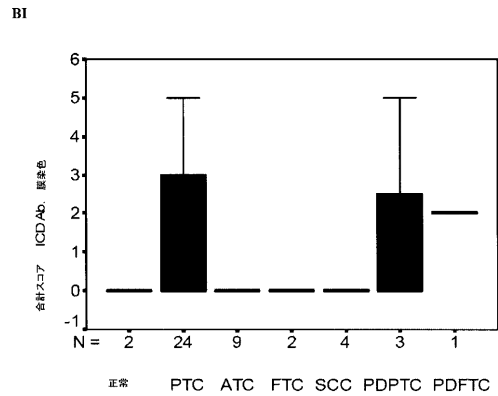
【 図 3 - 3 】

Figure 3



【 図 3 - 4 】

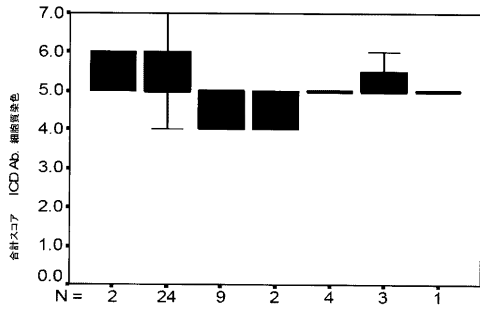
Figure 3



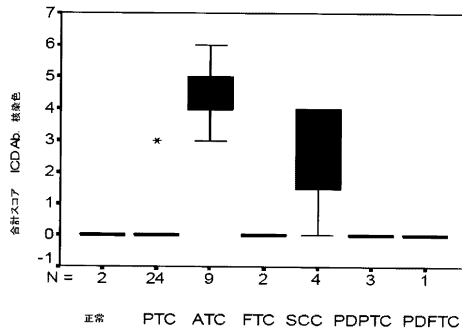
【 図 3 - 5 】

Figure 3

BII



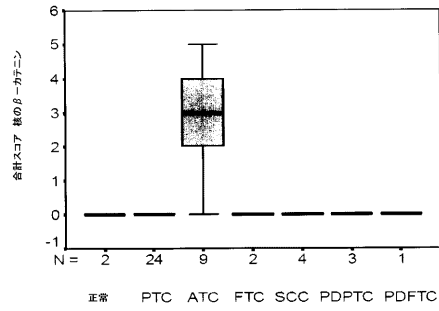
BIII



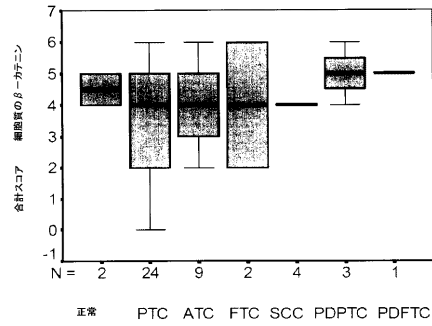
【 図 3 - 6 】

Figure 3

CI



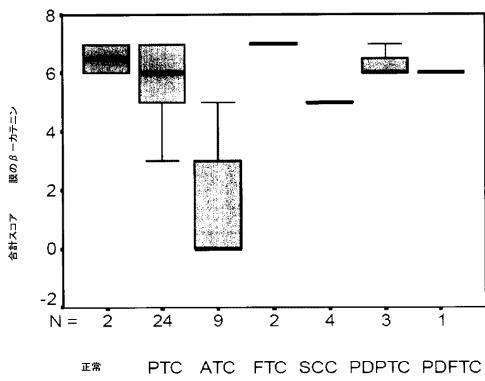
CII



【 図 3 - 7 】

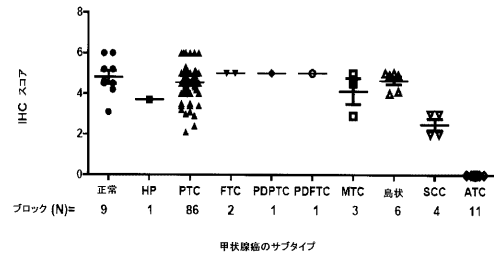
Figure 3

CIII



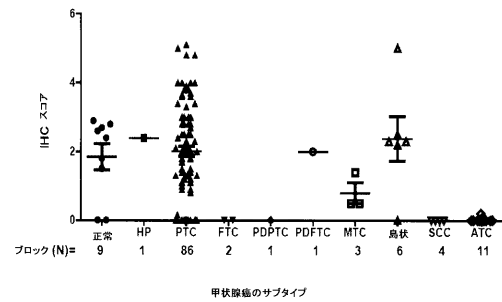
【 図 1 1 】

Figure 11



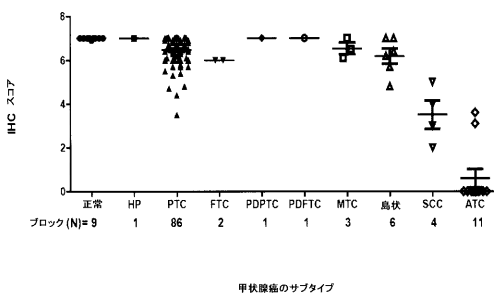
【 図 1 2 】

Figure 12



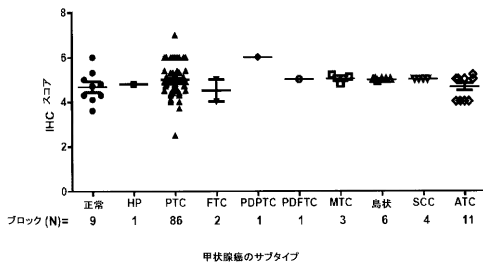
【 図 1 0 】

Figure 10



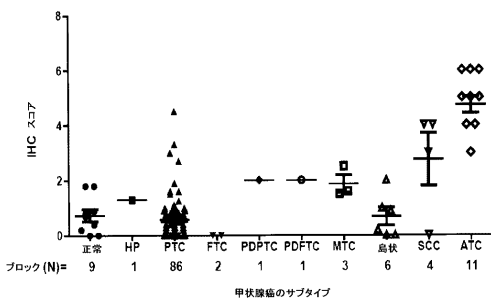
【 図 1 3 】

Figure 13



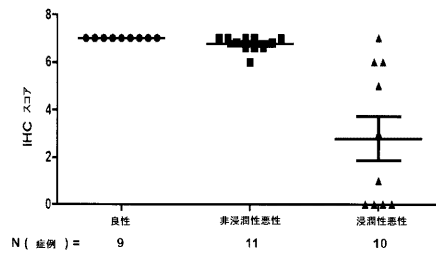
【 図 1 4 】

Figure 14



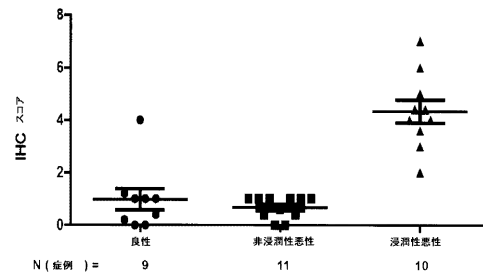
【 図 1 8 】

Figure 18



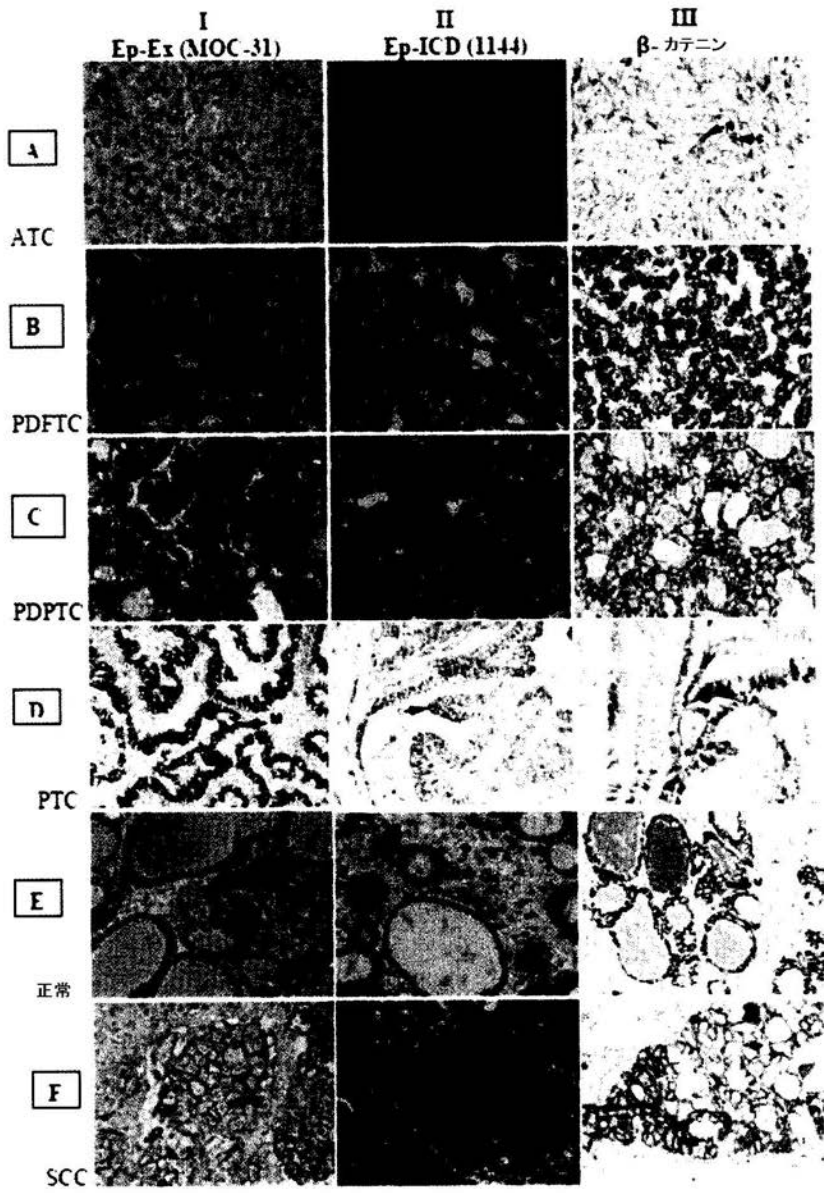
【 図 1 9 】

Figure 19



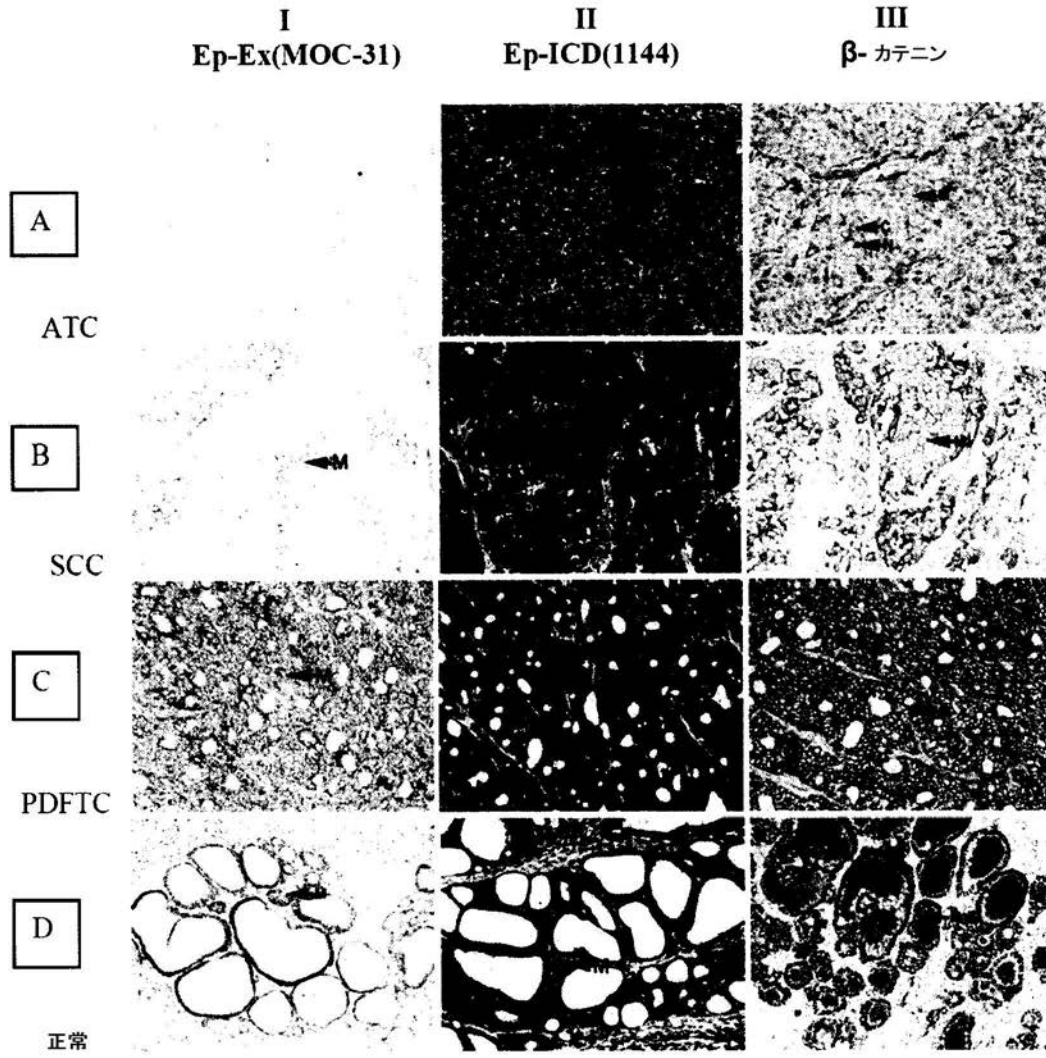
【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

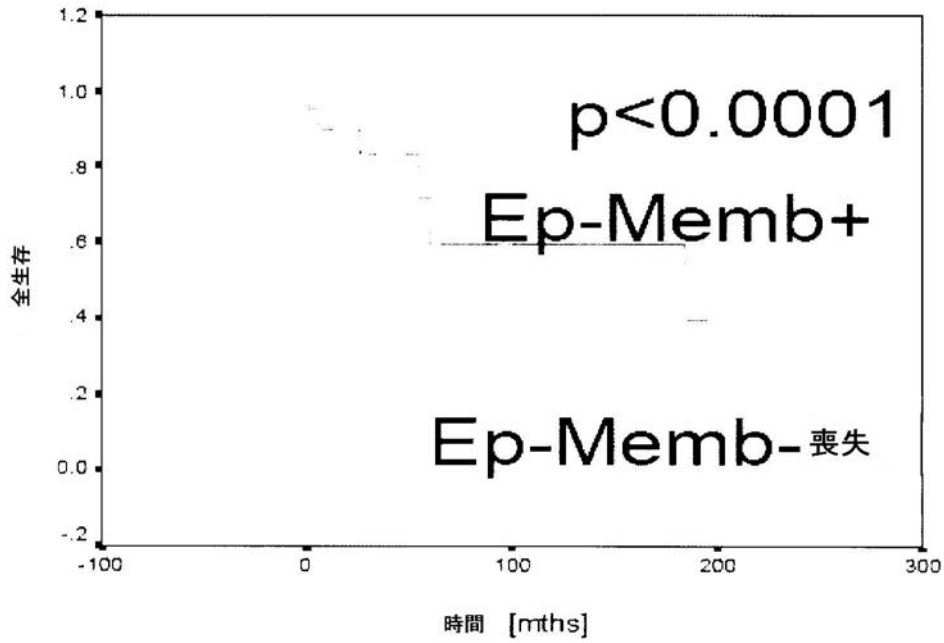
Figure 2



【 図 5 A 】

Figure 5

(A)

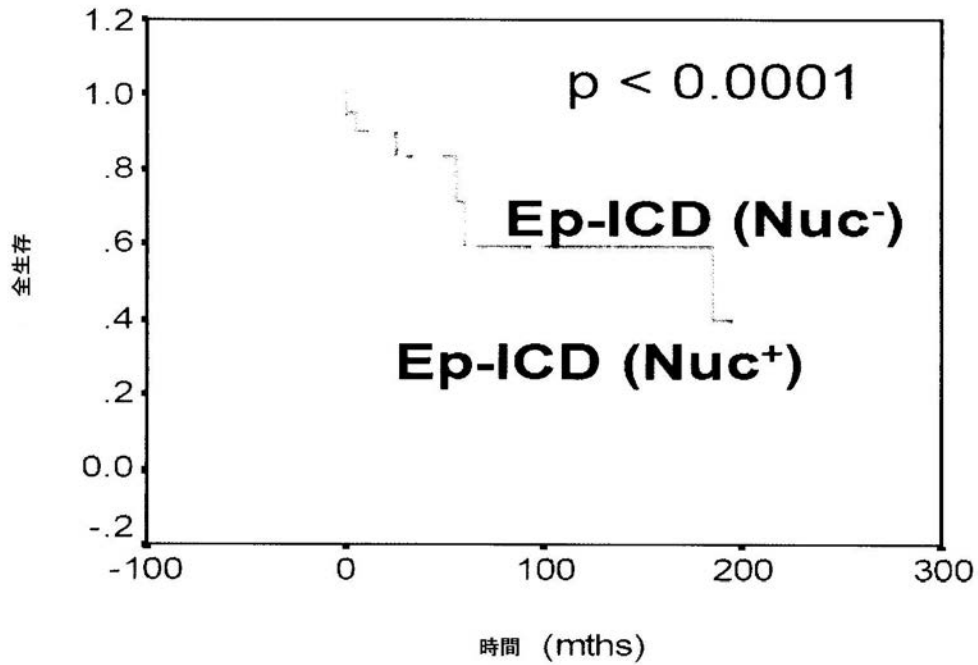


メジアン DFS, Ep-Memb- 喪失 = 5 mths
メジアン DFS, Ep-Memb+ = 185 mths

【 図 5 B 】

Figure 5

(B)



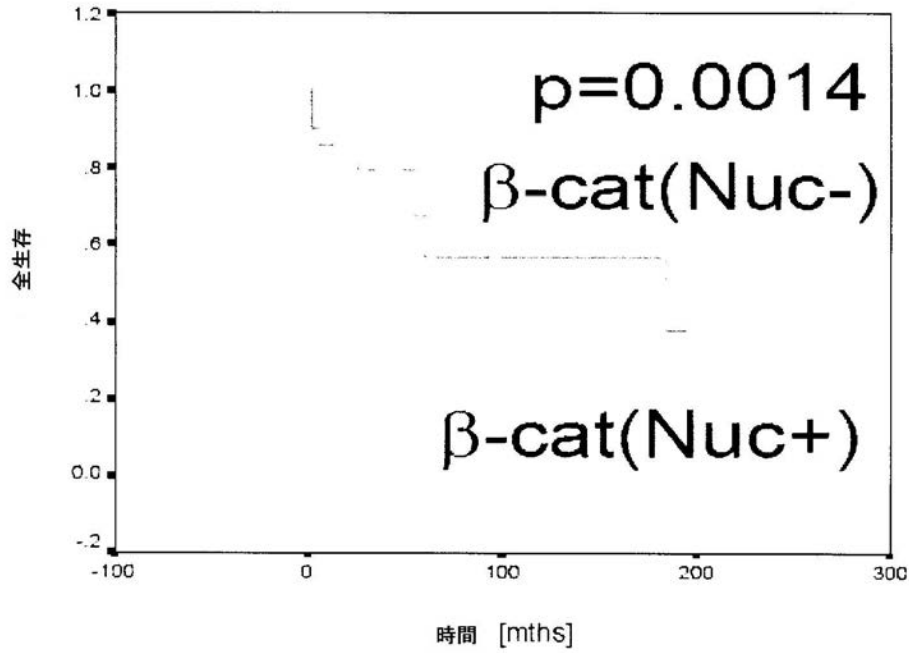
メジアン DFS, EpCAM Nuc+= 5 mths

メジアン DFS, EpCAM Nuc- = 185 mths

【 図 5 C 】

Figure 5

(C)



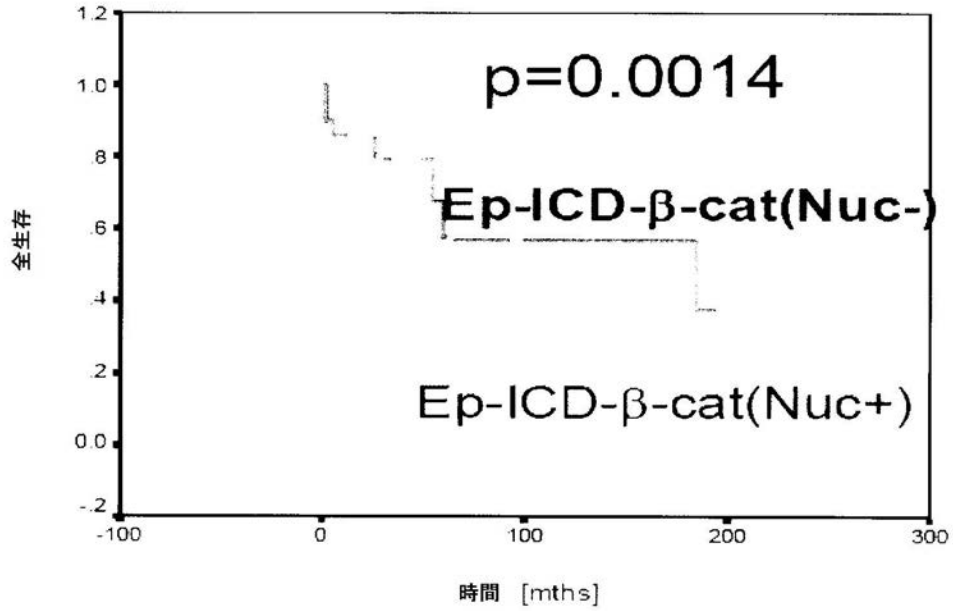
メジアン DFS, $\beta\text{-cat Nuc+}$ = 5 mths

メジアン DFS, $\beta\text{-cat Nuc-}$ = 185 mths

【 図 5 D 】

Figure 5

(D)



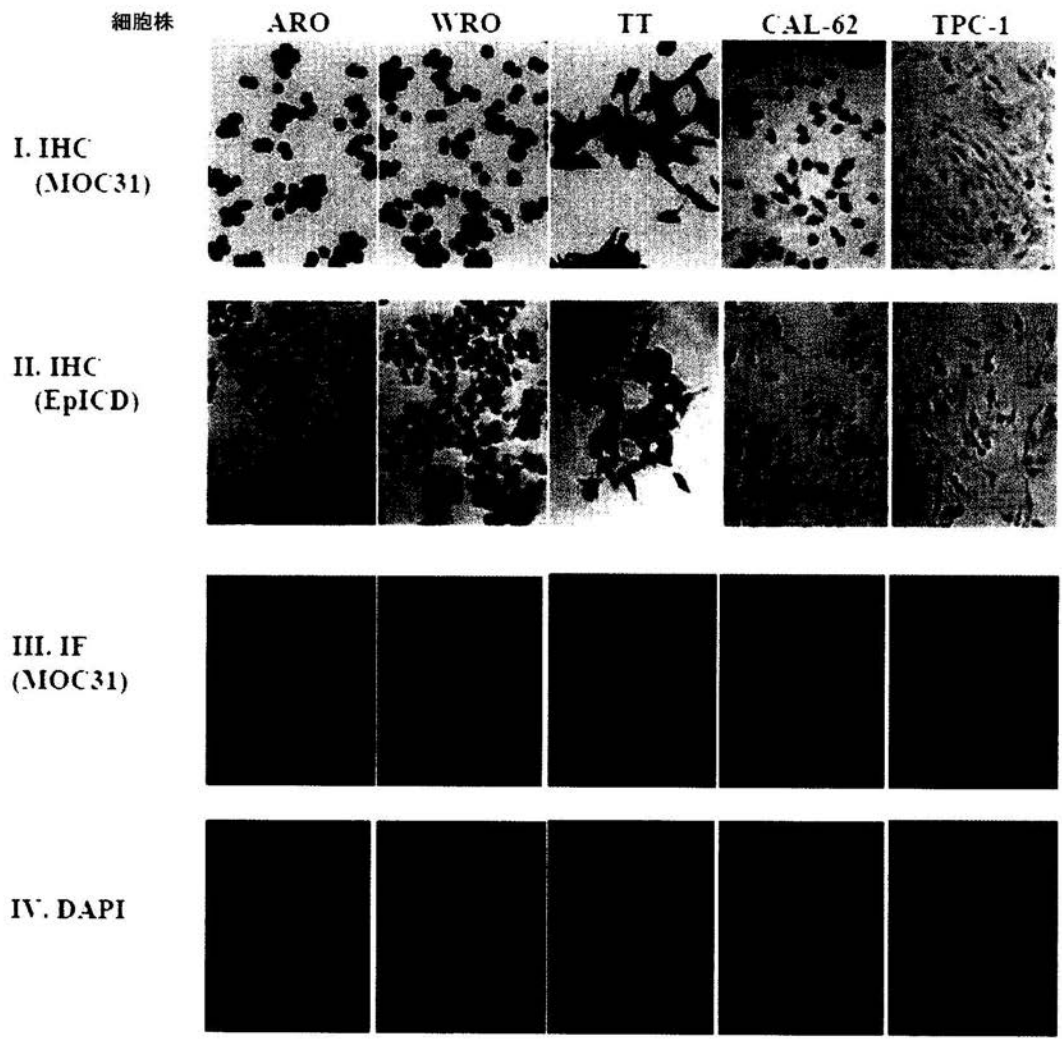
メジアン DFS, Ep-ICD-β-cat Nuc+= 5 mths

メジアン DFS, Ep-ICD-β-cat Nuc- =185 mths

【 図 6 A 】

Figure 6

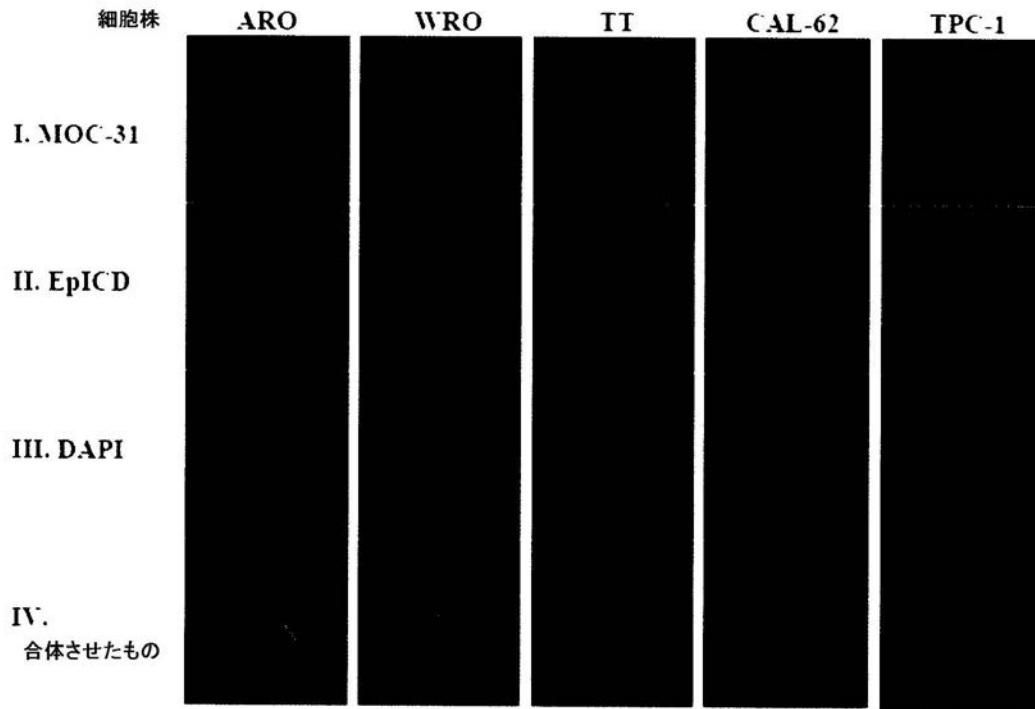
(A)



【 図 6 B 】

Figure 6

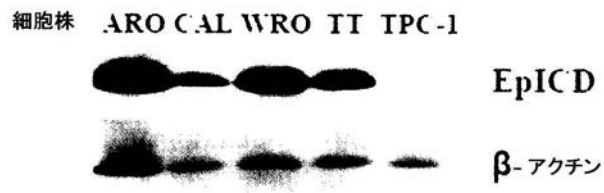
(B)



【 図 6 C 】

Figure 6

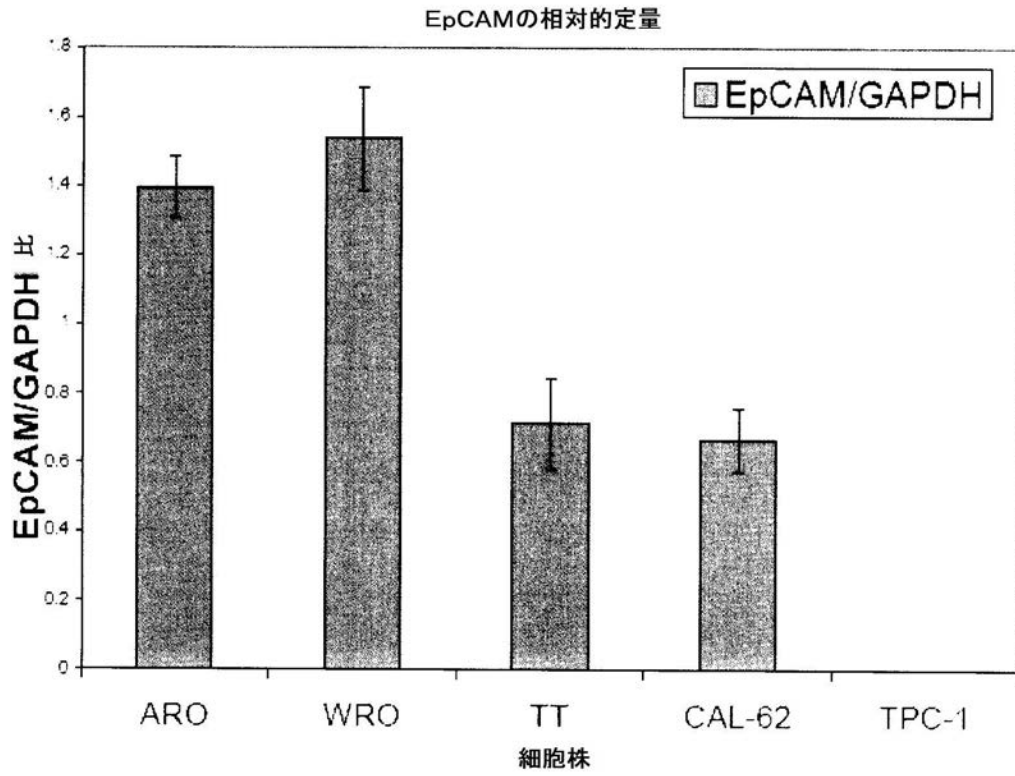
(C)



【 図 6 D 】

Figure 6

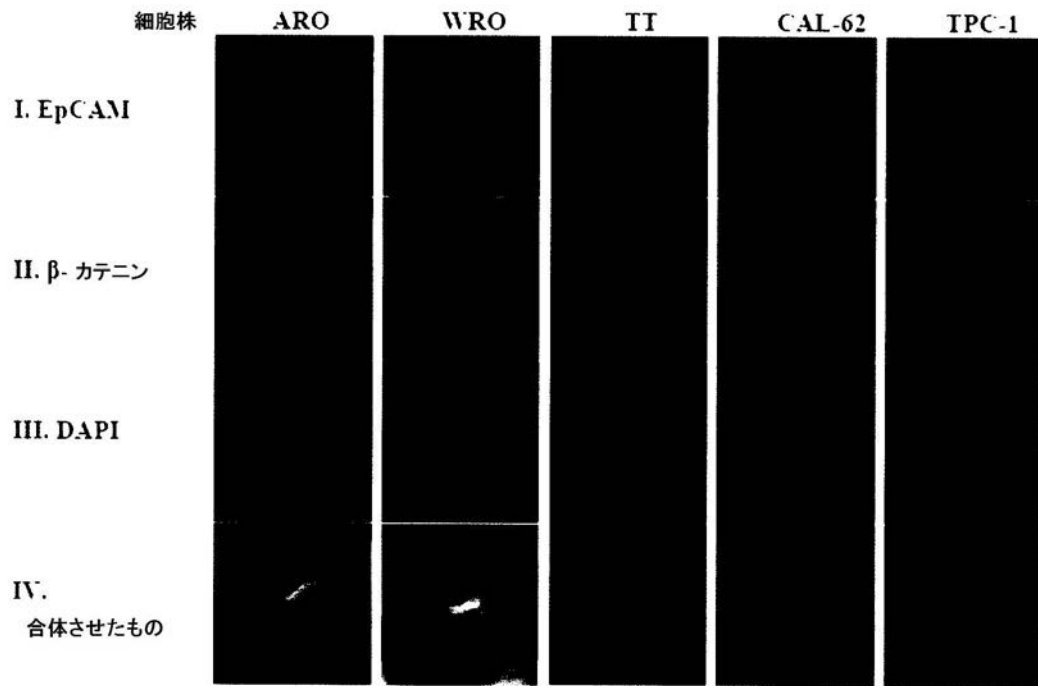
(D)



【 図 6 E 】

Figure 6

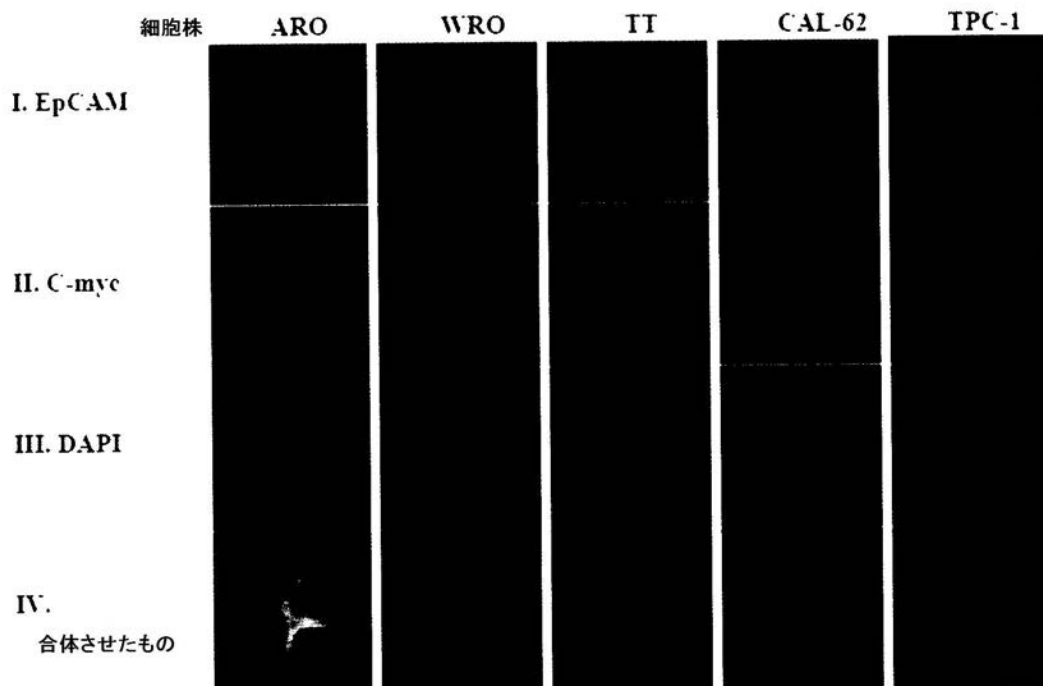
(E)



【 図 6 F 】

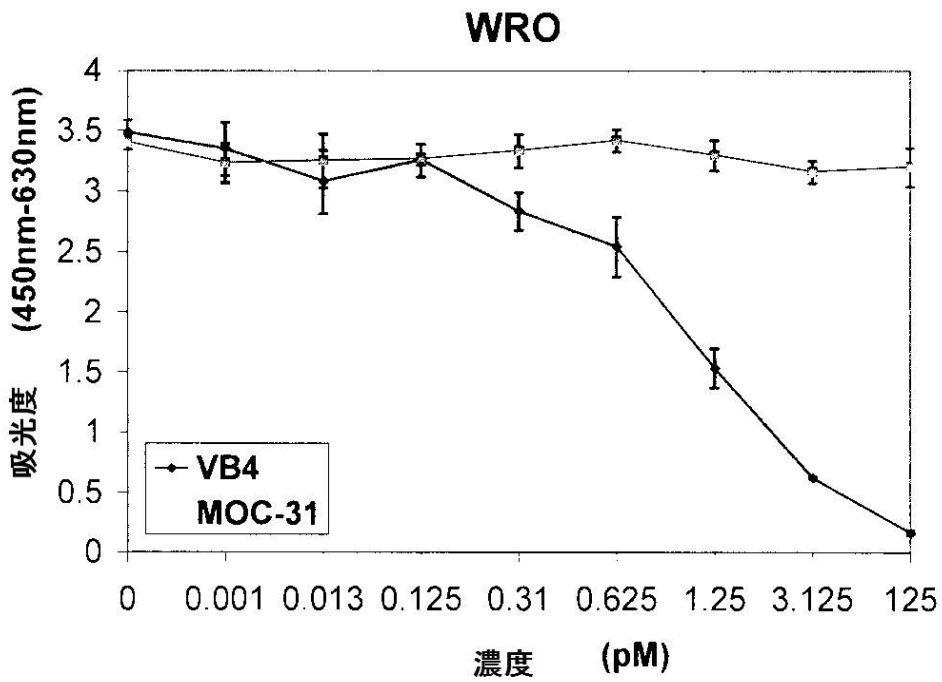
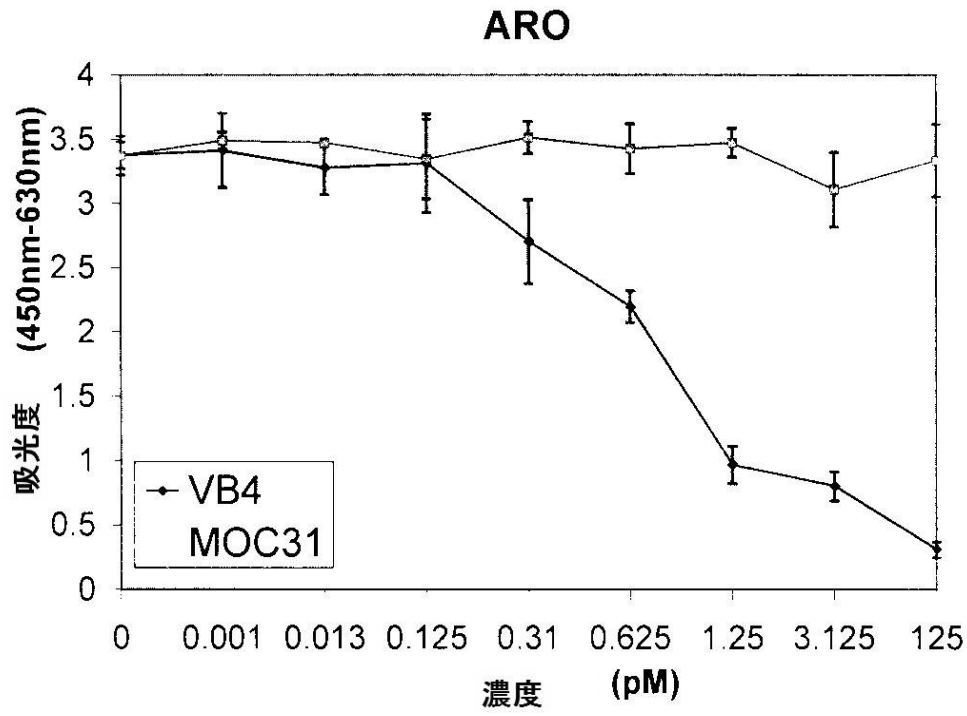
Figure 6

(F)



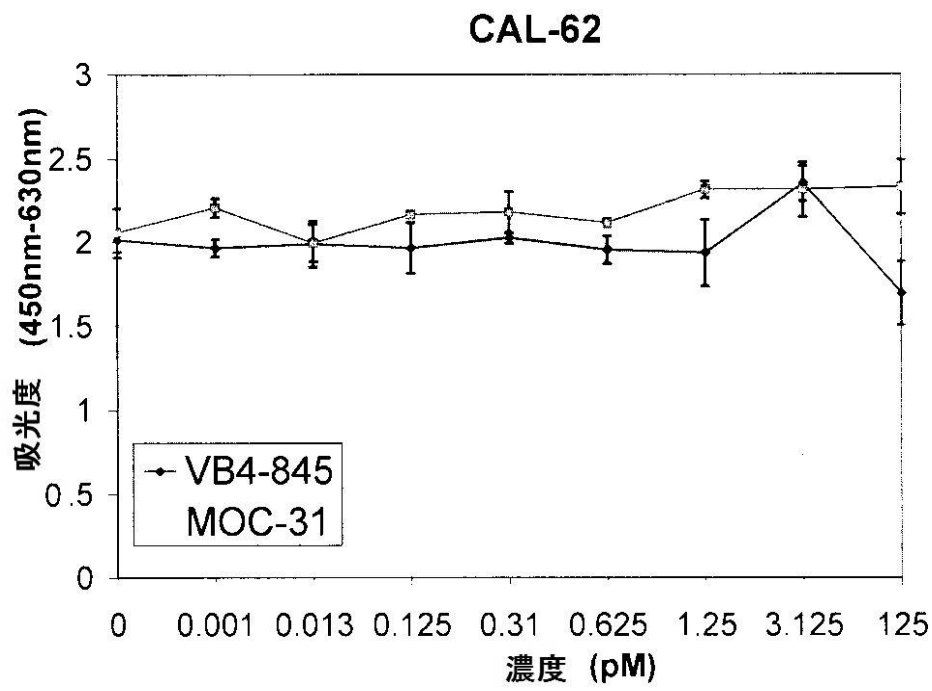
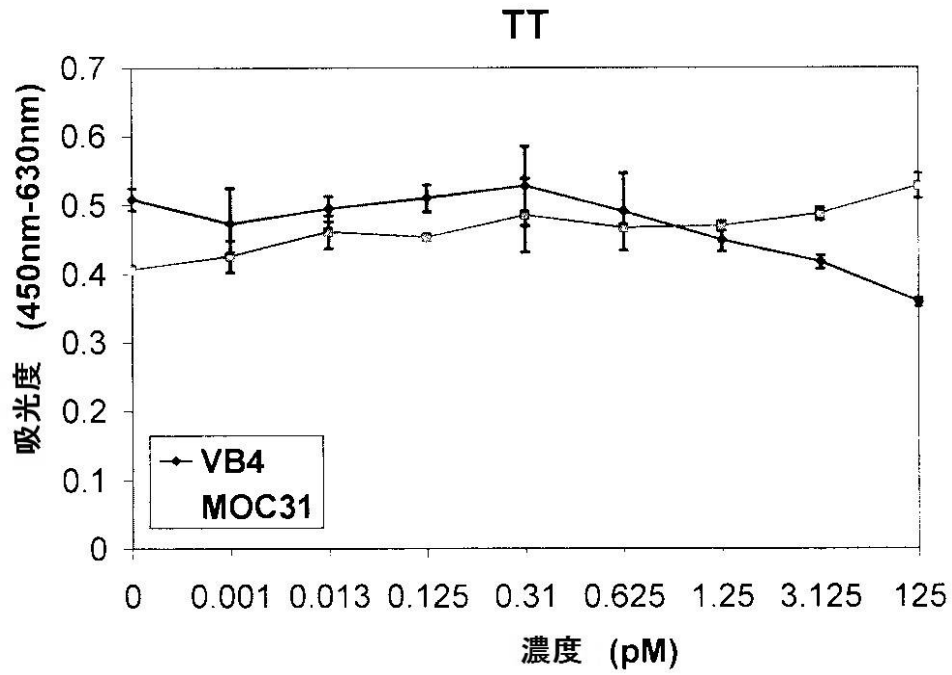
【 図 7 - 1 】

Figure 7



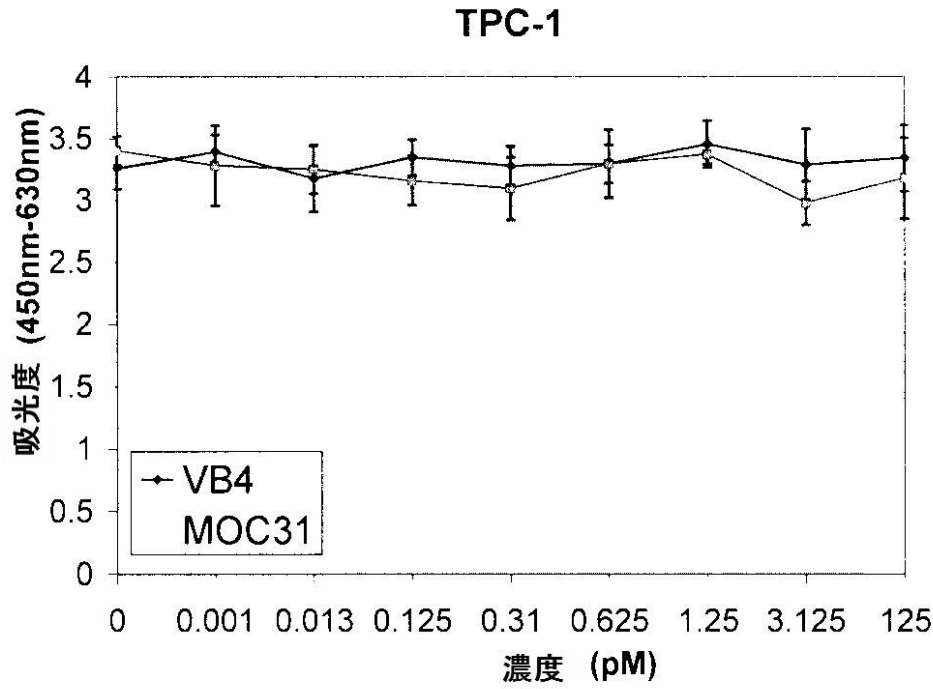
【 図 7 - 2 】

Figure 7



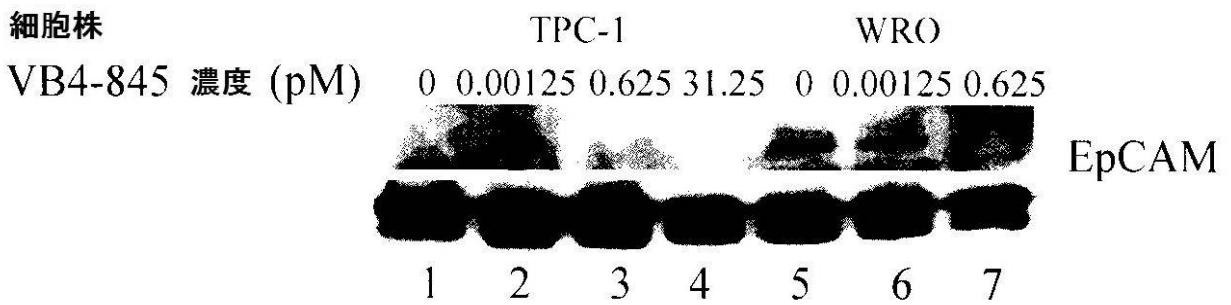
【 図 7 - 3 】

Figure 7



【 図 8 】

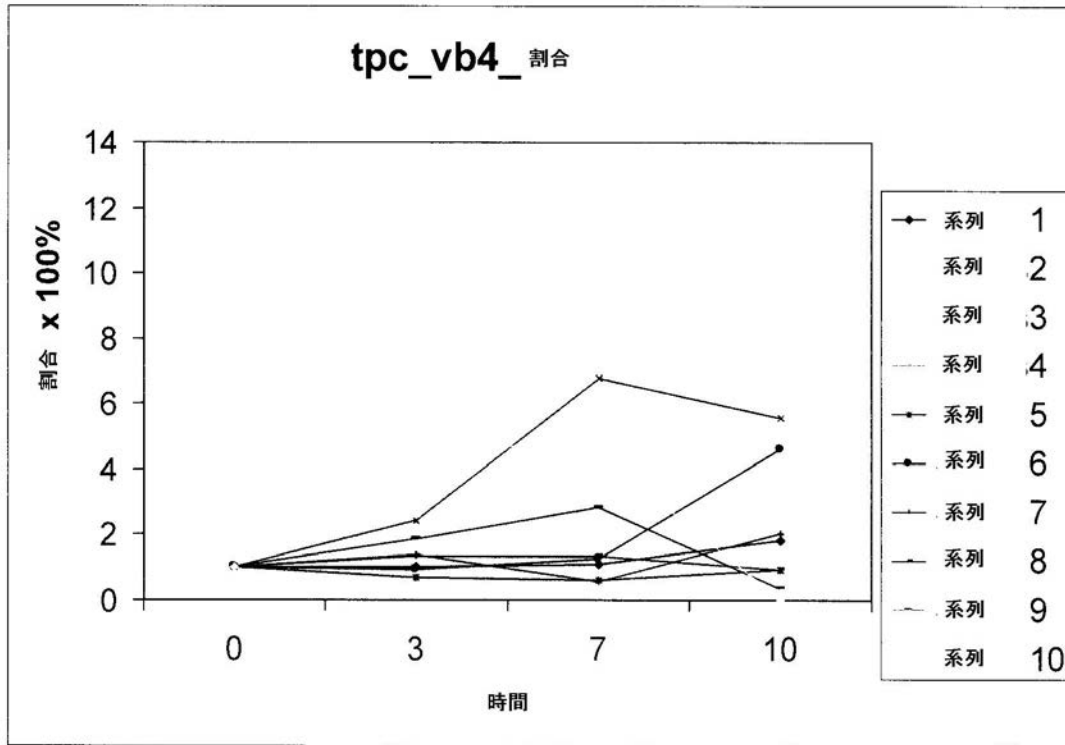
Figure 8



【 図 9 A 】

Figure 9

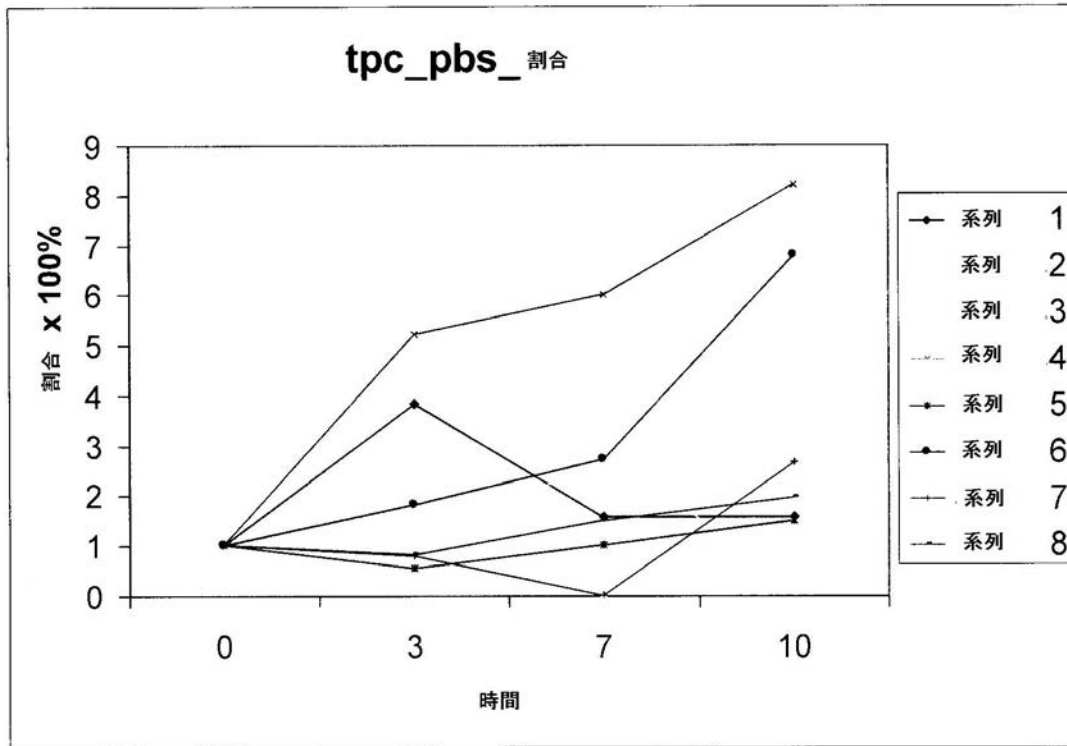
(A)



【 図 9 B 】

Figure 9

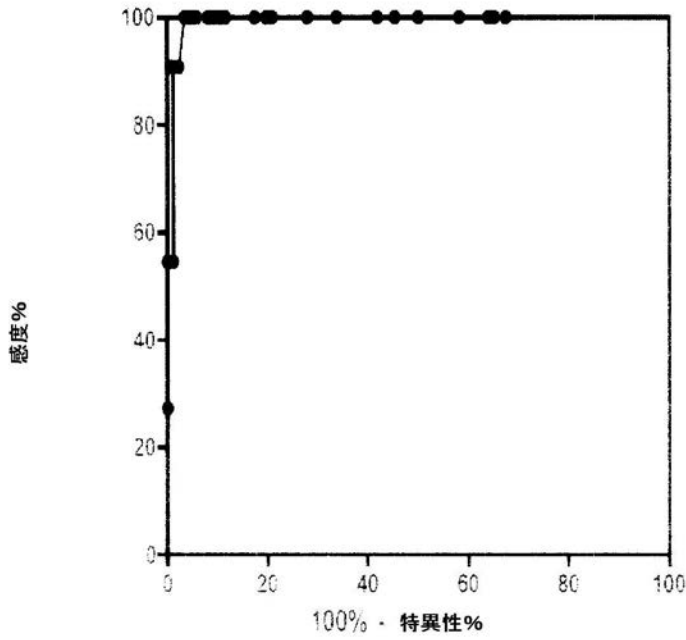
(B)



【 図 1 5 】

Figure 15

ROC 曲線

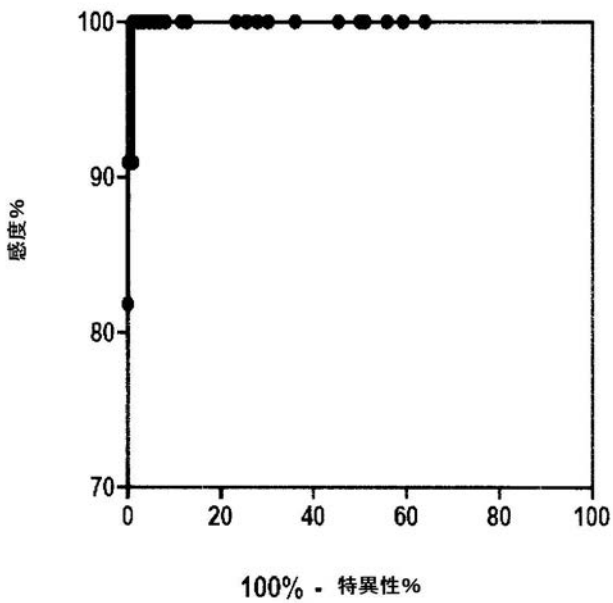


AUC	0.9931
4をカットオフとして 使用した特異性	98.80%
PPV	90.90%

【 図 1 6 】

Figure 16

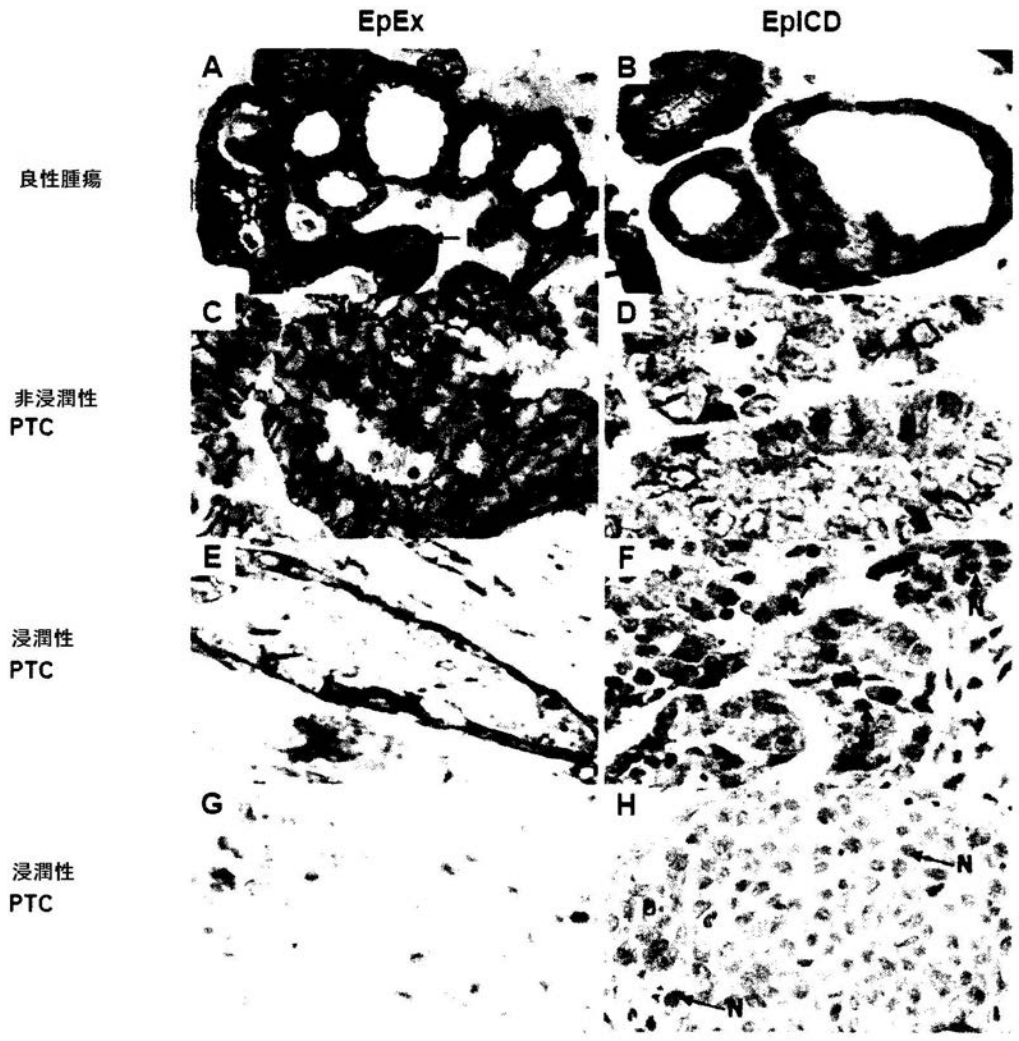
ROC 曲線



AUC	0.9989
4をカットオフとして 使用した特異性	98.80%
PPV	91.67%

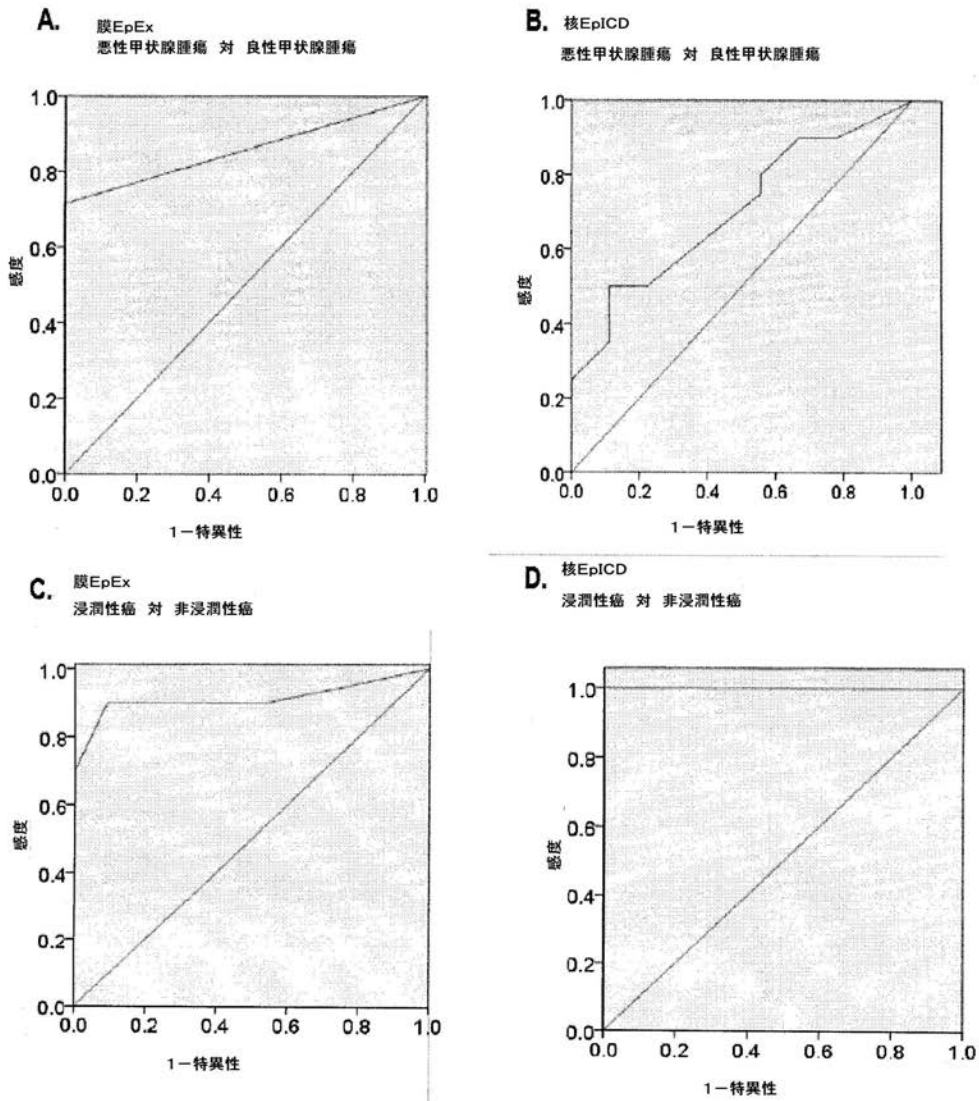
【 图 1 7 】

Figure 17



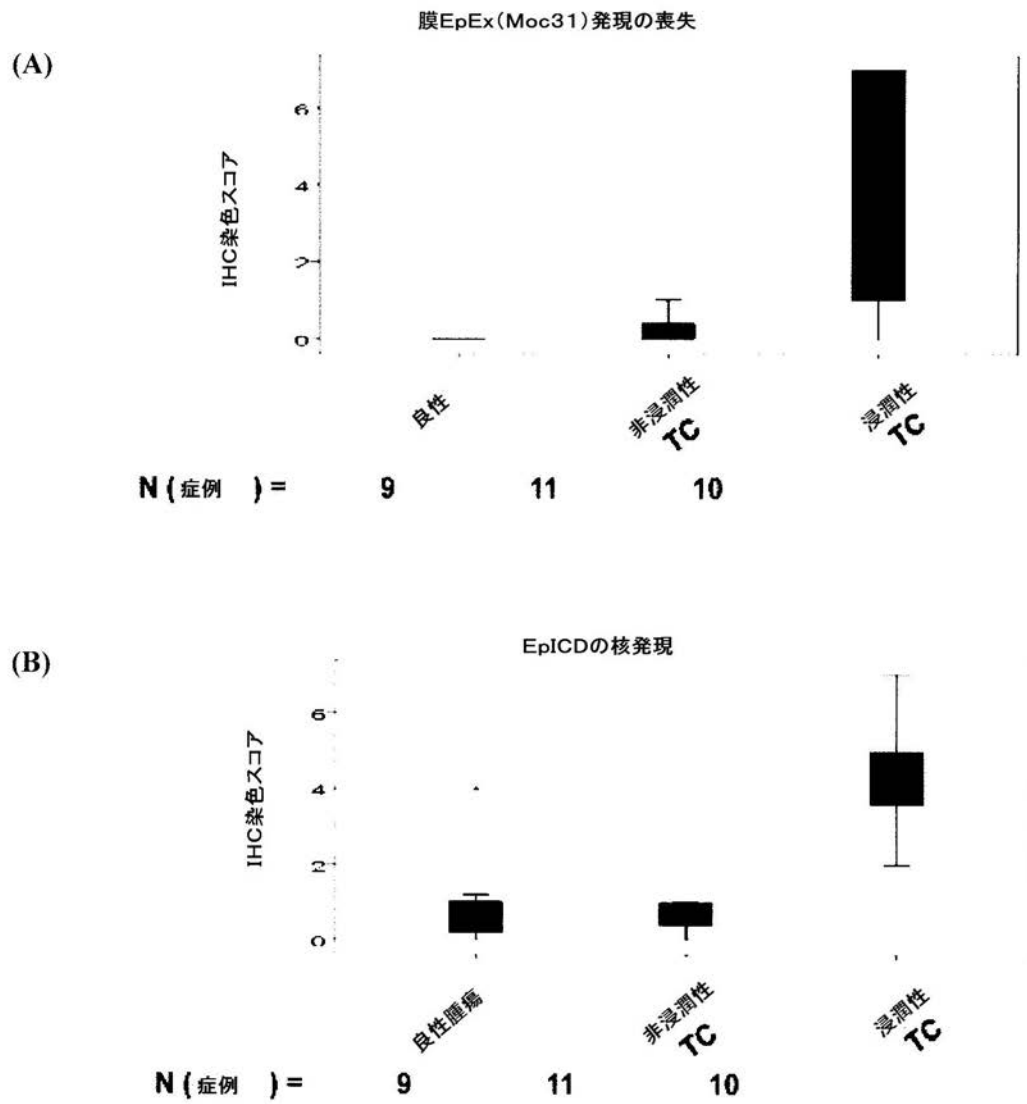
【 图 20 】

Figure 20



【 図 2 1 】

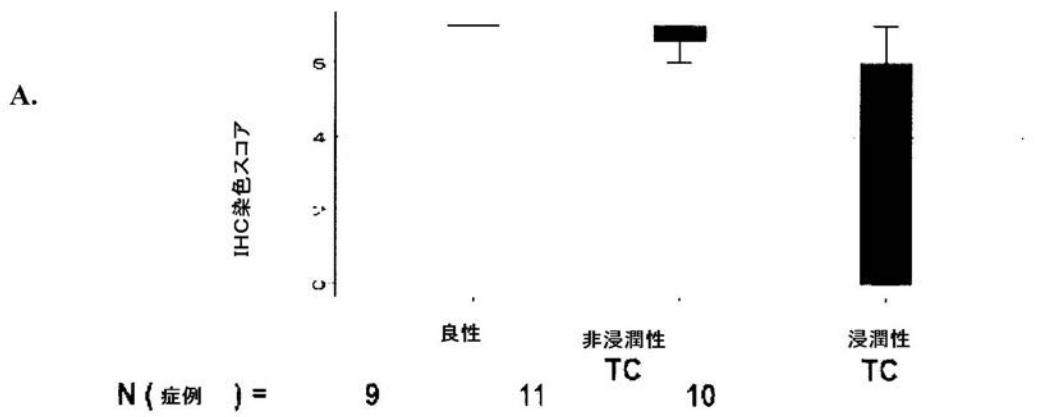
Figure 21



【 図 2 2 】

Figure 22

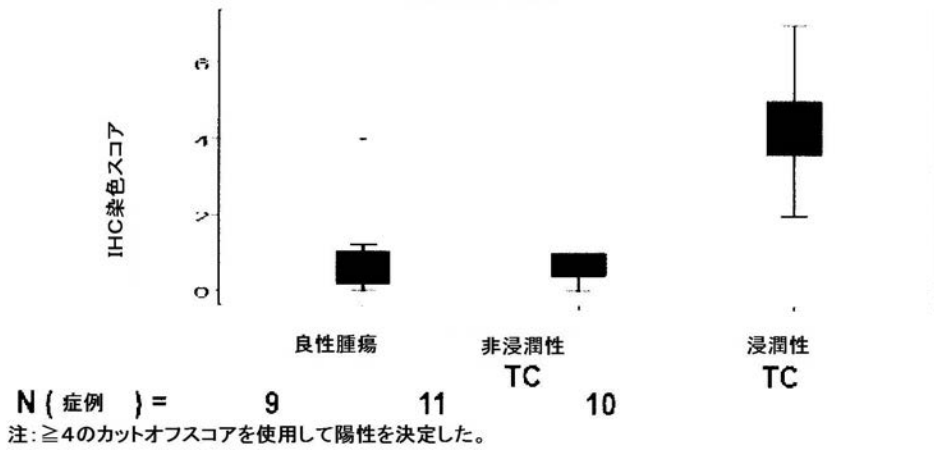
EpEx(Moc31)の膜発現



注: ≤4のカットオフスコアを使用して陽性(膜発現の喪失)を決定した。

B.

EpICDの核発現



注: ≥4のカットオフスコアを使用して陽性を決定した。

【 配 列 表 】

[2013505429000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2010/001503
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01), <i>G01N 33/574</i> (2006.01), <i>G01N 33/68</i> (2006.01), <i>C40B 30/04</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01), <i>G01N 33/574</i> (2006.01), <i>G01N 33/68</i> (2006.01), <i>C40B 30/04</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, Epoque (EPODOC), Total Patent, PubMed, Scopus Keywords: thyroid, cancer, tumour, catenin, EpCAM, epithelial cell adhesion molecule, intracellular domain, ectodomain, marker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WISEMAN, S.M. et al. "Anaplastic thyroid carcinoma: expression profile of targets for therapy offers new insights for disease treatment". ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY. 10 November 2006 (10-11-2006), V. 14(2), p. 719-729. ISSN: 1068-9265. whole document	1-8 and 10-31
X	WISEMAN, S.M. et al. "Identification of molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic thyroid carcinoma". ARCHIVES OF SURGERY. August 2007 (08-2007), V. 142(8), p. 717-729. ISSN: 0004-0010. whole document.	1-9 and 11-31
X	GARCIA-ROSTAN, G. et al. "β-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis". AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. March 2001 (03-2001), V. 158(3), p. 987-996. ISSN: 0002-9440. whole document.	1-9 and 11-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 November 2010 (22-11-2010)	Date of mailing of the international search report 7 January 2011 (07-01-2011)	
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Authorized officer Tera Mosher (819) 994-4248	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2010/001503**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2010/001503**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. Claim Nos. : 1, 3, 8, 9, 12, 14-21, 23, 24, 26, 27 and 31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 1, 3, 8, 9, 12, 14-21, 23, 24, 26, 27 and 31 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged purposes or uses of the product defined in claims 1, 3, 8, 9, 12, 14-21, 23, 24, 26, 27 and 31.
2. Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1-31 (partially) are directed to methods for detecting or diagnosing thyroid cancer using β -catenin. Methods to select test agents using β -catenin as well as the use of and kits comprising antibodies to β -catenin are also claimed.
Group B - Claims 1-31 (partially) are directed to methods for detecting or diagnosing thyroid cancer using Ep-ICD. Methods to select test agents using Ep-ICD as well as the use of and kits comprising antibodies to Ep-ICD are also claimed.
Group C - Claims 2-4, 6, 7, 10, 12, 14-21 and 31 (partially) are directed to methods for detecting or diagnosing thyroid cancer using EpEx.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2010/001503

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ENSINGER, C. et al. "EpCAM overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases". JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY. September/October 2006 (09/10-2006), V. 29(5), p. 569-573. ISSN: 1524-9557. whole document.	31 1-31
P,X	RALHAN, R. et al. "EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis". BMC CANCER. 25 June 2010 (25-06-2010), V. 10, p.331-341. ISSN: 1471-2407. whole document.	1-8 and 11-31
P, X	CHO, N.L. et al. "Sulindac reverses aberrant expression and localization of β -catenin in papillary thyroid cancer cells with the BRAF ^{V600E} mutation". THYROID. 01 June 2010 (01-06-2010), V.20(6), p. 615-622. ISSN: 1557-9077.	
A	WO 2007/141029 A1 (MAETZEL, D. et al.) 13 December 2007 (13-12-2007).	
A	US 2008/0075741 A1 (LEE, M. et al.) 27 March 2008 (27-03-2008).	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2010/001503

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2008075714A1	27 March 2008 (27-03-2008)	AU2003273542A1	19 December 2003 (19-12-2003)
		AU2003273542A8	19 December 2003 (19-12-2003)
		AU2003293408A1	30 June 2004 (30-06-2004)
		CA2507581A1	24 June 2004 (24-06-2004)
		EP1530418A2	18 May 2005 (18-05-2005)
		EP1530418A4	12 October 2005 (12-10-2005)
		EP1567008A2	31 August 2005 (31-08-2005)
		EP1567008A4	08 October 2008 (08-10-2008)
		JP2005529115T	22 September 2005 (22-09-2005)
		JP2006508682T	16 March 2006 (16-03-2006)
		US2004018531A1	29 January 2004 (29-01-2004)
		US7217568B2	15 May 2007 (15-05-2007)
		US2007292872A1	20 December 2007 (20-12-2007)
		US7592174B2	22 September 2009 (22-09-2009)
		US2007238127A1	11 October 2007 (11-10-2007)
		US7622255B2	24 November 2009 (24-11-2009)
		US7803783B2	28 September 2010 (28-09-2010)
		US2004171559A1	02 September 2004 (02-09-2004)
		WO03102215A2	11 December 2003 (11-12-2003)
		WO03102215A3	21 May 2004 (21-05-2004)
WO2004053069A2	24 June 2004 (24-06-2004)		
WO2004053069A3	26 August 2004 (26-08-2004)		
WO2007141029A1	13 December 2007 (13-12-2007)	EP1865001A1	12 December 2007 (12-12-2007)
		EP2041181A1	01 April 2009 (01-04-2009)
		US2010226922A1	09 September 2010 (09-09-2010)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ラルハン , ランジュ
 カナダ国 エル4ジェイ 6ティ-2 オンタリオ , ソーンヒル , コンリー ストリート 3
 8 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA53 CA09 CA12 CA20 HA08 HA11
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR42 QR55 QR62
 QS25 QS36 QX02
 4C085 AA13 AA14 CC02 EE01 GG02 GG03 GG05 GG06

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013505429A5	公开(公告)日	2013-11-14
申请号	JP2012529080	申请日	2010-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	西奈山医院		
申请(专利权)人(译)	西奈山医院		
[标]发明人	ウォルフィッシュポール ラルハンランジュ		
发明人	ウォルフィッシュ, ポール ラルハン, ランジュ		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57407 C07K16/30 C07K2317/73 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/57492 G01N2333/47 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/574.A C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M A61K39/395.T A61K39/395.E A61P35/00 C12N15/00. A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024 /HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/CC02 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG05 4C085/GG06		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/244173 2009-09-21 US		
其他公开文献	JP6048660B2 JP2013505429A		

摘要(译)

描述了用于检测，诊断和监测受试者中甲状腺癌的方法，包括测量来自包括Ep-ICD和β-连环蛋白的主题标记物的样品。本发明还提供了用于实施本发明方法的试剂盒和组合物。