

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3699399号
(P3699399)

(45) 発行日 平成17年9月28日(2005.9.28)

(24) 登録日 平成17年7月15日(2005.7.15)

(51) Int.Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/574

GO 1 N 33/574

D

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48

P

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

D

// GO 1 N 21/27

GO 1 N 21/27

A

請求項の数 6 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2001-552086 (P2001-552086)
 (86) (22) 出願日 平成13年1月12日(2001.1.12)
 (65) 公表番号 特表2003-519795 (P2003-519795A)
 (43) 公表日 平成15年6月24日(2003.6.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/001113
 (87) 国際公開番号 W02001/051924
 (87) 国際公開日 平成13年7月19日(2001.7.19)
 審査請求日 平成14年7月11日(2002.7.11)
 (31) 優先権主張番号 60/176,514
 (32) 優先日 平成12年1月12日(2000.1.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/176,515
 (32) 優先日 平成12年1月12日(2000.1.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500555848
 ヴェンタナ メディカル システムズ イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 85737
 ツーソン イノベーション パーク
 ドライブ 1910
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (72) 発明者 バッカス、 サラ エス.
 アメリカ合衆国 イリノイ州 60521
 ヒンスデール インディアン トレール
 1222
 審査官 山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療への応答を決定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下からなる、個体への化学療法または化学防御薬の投与に対する効果の測定方法。

(a) 老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーに対して指向する検出可能な標識抗体を用い、化学療法または化学防御薬に個体を曝露する前に個体から採取した第1の組織または細胞サンプル、および、化学療法または化学防御薬に個体を曝露した後に個体から採取した第2の組織または細胞サンプルを、免疫組織化学的に染色すること；

(b) 工程(a)にあるように染色された細胞の光学密度を測定することであって、ここで染色細胞は、色素に吸収される波長を有する光を照射される；

(c) 老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーの発現が、化学療法または化学防御薬に曝露した後の、増強の有無を測定すること。

【請求項2】

検出可能な標識がクロマゲンまたはフルオロフォアである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

生物学的マーカーが p 2 1、p 2 7、p 1 6、T G F - β 、または S A - β - G a l である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

生物学的マーカータンパク質の量が E L I S A アッセイにより決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

染色細胞の光学密度が画像解析により実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

染色された生物学的サンプルの光学密度からなるシグナルを、異なる吸収および透過特性を有する光学フィルターを用いて加工される複数のシグナルに分離することにより、各シグナルを生物学的サンプルの細胞を染色するために用いられる複数の色素の 1 つに特異的であるようにして画像解析を実施する、請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、各々 2000 年 1 月 12 日出願の米国仮特許出願第 60 / 176514 号および第 60 / 176515 号の継続であり、その開示は各々出展明示により本明細書の一部とする。

10

【0002】

(発明の背景)

1. 発明の分野

本発明は個体における癌治療への応答を決定または予測する方法に関する。とりわけ本発明は画像解析を用いて老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーの発現レベルを検出することにより、化学療法および化学防御薬での処置を必要とするヒトにおいて、このような薬物の効果を評価する方法に関する。より具体的には本発明は、化学療法および化学防御薬に曝露する前および後に個体から取り出した組織および細胞サン

20

【0003】

2. 発明の背景

癌治療の主たる目標は、無秩序に成長する悪性細胞を選択的に死滅させるかまたは阻害し、その上、正常細胞には有害な影響を及ぼさないことである。伝統的な化学療法薬は、好ましくは正常細胞よりも悪性細胞により強度な親和性を有するか、または高率な代謝活性を基盤とする悪性細胞に少なくとも優先的に影響する、高度な細胞毒性物質である。しかし、これらの物質はしばしば正常細胞を害する。

【0004】

30

抗癌剤、モノクローナル抗体、または化学防御薬を使用する場合、成長停止、末端分化および癌細胞または前癌細胞の細胞死が意図される (Mendelsohn、Semin. Cancer Biol. 1: 339 - 44 (1990); Hancockら、Cancer Res. 51: 4575 - 80 (1991); Arteagaら、Cancer Res. 54: 3758 - 65 (1994); Pietrasら、Oncogene 9: 1829 - 38 (1994); Bacusら、Anal. Quant. Cytol. Histol. 19: 316 - 28 (1997); Bacusら、Breast J. (1999); Baselgaら、Proceedings of AACR NCI EORTC International Conference, Abstract 98 (1999); Cobleighら、J. Clin. Oncol. 17: 2639 - 48 (1999); DiGiovanna、PPO Updates: Princ. Practice Oncol. 13: 1 - 9 (1999); Hortobagyi、J. Clin. Oncol. 17: 25 - 29 (1999); Shak、Semin. Oncol. 26: 71 - 77 (1999); Sliwkowskiら、Semin. Oncol. 26: 60 - 70 (1999); Vincentら、Cancer Chemother. Pharmacol. 45: 231 - 38 (2000))。薬物誘起による成長停止または細胞死は、しばしば、プログラム細胞死または末端分化 (有糸核分裂細胞死とは対照的である) に付随する形態学および生化学的变化により特徴づけられる。

40

【0005】

化学療法薬は、細胞死を招くのに十分な高量で投与できるが、このような用量は概して腫

50

瘍細胞のみならず正常細胞に有害な影響を及ぼす。分化物質、および低用量の化学療法の薬剤および作用薬は、しばしば細胞死よりむしろ成長停止につながる；このような停止は続いてアポトーシスおよびセル死に至るか、またはいったん化学療法薬を中止しても増殖を続けうる。細胞毒性および化学療法薬の投与か、または電離放射線により、一時的な成長停止、すなわち p 5 3 および p 5 3 制御サイクリン依存性キナーゼインヒビター（例えば p 1 6、p 2 7 および p 1 9）または成長インヒビター（例えば T G F - β 、I L - 4、および I L - 6）の機能に大きく依存する状態を誘起することもできる。化学療法薬を除去すると、薬物処置に供した細胞は結局再度分割を再開し、増殖を続けるか、または死ぬ。ある薬物処置した腫瘍細胞では、成長停止の延長が起こり、薬物の中断で細胞分割の再開に失敗する。

10

【 0 0 0 6 】

正常な細胞では、末端増殖停止により、末端分化または複製老化に至りうる。老化は正常細胞の増殖期間を制限する生理学的過程である。ヒト細胞において慣用される老化のマーカーは、老化付随 β ガラクトシダーゼ (S A - β - G a l) の発現である。このタンパク質はインビトロでの老化細胞培養における老化およびインビボでの細胞と関連している。DNA 損傷薬または γ 線照射で処置することにより、正常細胞の末端増殖停止を迅速に誘起することができ、老化の形態学的特徴および S A - β - G a l の誘導を伴う。老化の加速は、発癌の衝撃に対する細胞の保護的応答である可能性がある。正常細胞の別の損傷応答、例えば静止およびアポトーシスに類似して、老化様末端増殖停止はタンパク質、例えば野生型 p 5 3 の機能および p 2 1^{W A F 1}、p 1 6、p 1 9 および p 2 7 のようなタンパク質の上方制御に関係する (K w o k および S u t h e r l a n d、J . N a t l . C a n c e r I n s t . 8 1 : 1 0 2 0 - 2 4 (1 9 8 9) ; K w o k および S u t h e r l a n d、I n t . J . C a n c e r 4 9 : 7 3 - 7 6 (1 9 9 1) ; K a s t a n a、C a n c e r R e s . 5 1 : 6 3 0 4 - 1 1 (1 9 9 1) ; L a n e、N a t u r e 3 5 8 : 1 5 - 1 6 (1 9 9 2) ; K u e r b i t z ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 9 : 7 4 9 1 - 9 5 (1 9 9 2) ; G u ら、N a t u r e 3 6 6 : 7 0 7 - 1 0 (1 9 9 3) ; H a l e v y ら、S c i e n c e 2 6 7 : 1 0 1 8 - 2 1 (1 9 9 5) ; S h e r r および R o b e r t s、G e n e s D e v . 9 : 1 1 4 9 - 6 3 (1 9 9 5) ; L u o ら、N a t u r e 3 7 5 : 1 5 9 - 6 1 (1 9 9 5) ; D i m r i ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 2 : 9 3 6 3 - 6 7 (1 9 9 5) ; B a c u s ら、O n c o g e n e 1 2 : 2 5 3 5 - 4 7 (1 9 9 6) ; L i u ら、C a n c e r R e s . 5 6 : 3 1 - 3 5 (1 9 9 6) ; W a n g ら、O n c o g e n e 1 7 : 1 9 2 3 - 3 0 (1 9 9 8) ; C h a n g ら、O n c o g e n e 1 8 : 4 8 0 8 - 1 8 (1 9 9 9) ; H o n g ら、C a n c e r R e s . 5 9 : 2 8 4 7 - 5 2 (1 9 9 9) ; S i o n o v および H a u p t、O n c o g e n e 1 8 : 6 1 4 5 - 5 7 (1 9 9 9) ; W o u t e r s ら、O n c o g e n e 1 8 : 6 5 4 0 - 4 5 (1 9 9 9))。

20

30

【 0 0 0 7 】

腫瘍細胞は老化および末端増殖停止に至る能力を保持しているようである。細胞分化に影響する異なるクラスの薬剤、および抗癌剤による腫瘍細胞の処置は、容易に老化の形態学的、酵素的およびその他の変化を引き起こす（例えば p 5 3、p 2 1、p 2 7、p 1 6、T G F - β 、I L - 4、I L - 6、および S A - β - G a l の上方制御）。この老化様表現型 (S L P) は、安定した成長停止形態になるだろう細胞を、薬物曝露から回復して増殖を続ける細胞から区別する。このように、老化様末端増殖停止の誘導により、腫瘍細胞における処置の応答の重要な決定が為される。

40

【 0 0 0 8 】

アポトーシスは一般に種々の生理学的または病理学的刺激に対する活性な自殺応答であると考えられている。最近の研究では、X 線照射およびいくつかの化学療法薬（例えばアルキル化剤およびトポイソメラーゼ I インヒビター）などを含む種々の DNA 損傷物質が壊死を引き起こし、またアポトーシスに至る経路を開始することが示されている。これら

50

の物質によりアポトーシスが引き起こされる正確なメカニズムは未だ解っていない。しかしながら、抑制遺伝子 p 5 3 の発現がこの過程に関与している (Kwok および Sutherland、J. Natl. Cancer Inst. 81: 1020 - 24 (1989); Kwok および Sutherland、Int. J. Cancer 49: 73 - 76 (1991); Lane、Nature 358: 15 - 16 (1992); Kuerbitzら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 7491 - 95 (1992); Luoら、Nature 375: 159 - 61 (1995); Liuら、Cancer Res. 56: 31 - 35 (1996); Mellinghoff および Sawyers、PPO Updates 14: 1 - 11 (2000))。加えて、カスパーゼ (例えばカスパーゼ 9 またはカスパーゼ 3) またはそのシャペロン分子 (例えば熱ショックタンパク質 60) の上方制御がアポトーシスに付随している。

10

【0009】

アポトーシスを起こしている細胞では、DNA 損傷刺激が細胞内 p 5 3 タンパク質レベルの上昇につながりうる。野生型 p 5 3 のレベル上昇は順次、細胞サイクルを G₁ で阻害し、従って損傷細胞が DNA 修復されることが可能になる。しかし、もし損傷細胞に DNA 修復が起こらなければ、p 5 3 がプログラム細胞死の引き金となり得る。プログラム細胞死の引き金を引く能力が、化学療法薬への曝露に続く腫瘍細胞死の誘導に寄与する。

【0010】

p 5 3 のレベル上昇はまた、MDM - 2 オンコジーン、Bax、および WAF 1 / CIP 1 遺伝子をはじめとする、野生型 p 5 3 結合配列を含有する多くの遺伝子を活性化につながりうる。WAF 1 / CIP 1 遺伝子は、サイクリン Cdk 複合体と会合する 21000 の M_r を有するタンパク質をコードし、これらの複合体と会合するキナーゼ活性を阻害することができる。WAF (p 21 または CIP) 阻害の主要な標的は、サイクリン E - Cdk 2 キナーゼ複合体であり、その活性は G₀ から S 相の細胞サイクル進行に必要である。WAF 1 / CIP 1 遺伝子は、野生型 p 5 3 を有する細胞で G₁ 停止またはアポトーシスの引き金を引く DNA 損傷物質に応答して転写的に活性化されるが、p 5 3 遺伝子が欠失または変異を含んでいる腫瘍細胞では活性化されない。しかし WAF 1 / CIP 1 はまた、p 5 3 非依存性メカニズムにより、分化する細胞または細胞サイクル停止でも上方制御されることも示されている。

20

【0011】

このように、化学療法および化学防御の薬剤および作用薬の効果を検出するために用いることができる、老化、アポトーシスおよび末端増殖停止の種々の細胞性マーカーがある。これらのマーカーは、インビボで腫瘍細胞に及ぼす抗癌効果に影響する、いずれかの特定の化学療法および化学防御の薬剤および作用薬、またはそれらの組み合わせの、有効または無効を評価することに用いることができる。

30

【0012】

伝統的な抗癌方法と対照的に、外科的介入の補助として、およびその後に化学療法薬処置が行われる場合、癌患者の最初の処置であるネオアジュバント (または 1 次) 化学療法は薬物投与からなる。このようなやり方の 1 つの利点は、原発腫瘍が 3 cm 以上である場合、このやり方により大部分の患者において保存的外科的方法 (例えば乳癌患者における乳房切除とは対照的に) の使用が可能になる。別の利点は、多くの癌では全例の約 3 分の 2 で部分的および / または完全な反応が得られることである。大部分の患者が化学療法の 2 から 3 サイクルの後に反応するので、最終的には用いる化学療法計画のインビボ有効性をモニター観察することが可能であり、これは化学療法治療に反応しないこれらの癌を適時に同定するのに重要である。適時に非反応性の腫瘍を同定することにより、臨床医が順次、癌患者が不必要な副作用に冒されるのを制限し、別の処置を始めることが可能になる。

40

【0013】

特定の癌の処置における化学療法薬の効果は予測できない。この非予測性の観点から、治療を開始する前に 1 つまたはそれ以上の選択した物質が抗腫瘍薬として活性であるかどうか決定すること、または個々の患者の一連の処置の正確な予知を提供することはできな

50

った。個々の患者において提示された治療物質（または物質の組み合わせ）の効果を決定できるのが非常に望ましい。時間的および経費的の双方で効率がよく、癌患者の外傷性が最低限である、化学療法プログラムの効果を評価する方法が、技術的に求められている。

【0014】

（発明の要約）

本発明は個体における癌治療の応答を決定する方法を提供する。本発明は具体的には、老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーの発現レベルを検出することにより、化学療法および化学防御薬の処置を必要とするヒトにおいてこのような物質の効果を評価する方法を提供する。本発明の方法では、化学療法および化学防御薬に曝露する前および後に個体から取り出した組織および細胞サンプルにおいて、1つまたは複数の老化、アポトーシスまたは末端分化マーカーの量を定量する。好ましい実施形態では、該マーカーの量は、患者の腫瘍から得られた免疫組織化学的染色組織または細胞サンプルの画像解析を用いて決定される。

10

【0015】

本発明の方法の1つの実施形態では、個体を化学療法および化学防御薬に曝露する前に個体から第1の組織または細胞サンプルを収集し、個体を化学療法および化学防御薬に曝露した後に個体から第2の組織または細胞サンプルを収集し、老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーに対して指向する検出可能な標識抗体を用いて第1および第2の組織または細胞サンプルを免疫組織化学的に染色し、第1および第2の組織または細胞サンプルにおけるマーカーの量を決定し、化学療法または化学防御薬に曝露した後、老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーの発現が増加したかどうかを決定することにより、個体における化学療法または化学防御薬に対する応答を決定する。好ましい実施形態では、検出可能な標識はクロマゲンまたはフルオロフォアである。

20

【0016】

本発明の具体的な好ましい実施形態は、以下の特定の好ましい実施形態のより詳細な記載および請求の範囲より明らかになる。

【0017】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明の方法は個体における癌治療への応答を決定するのに有用である。具体的には、本発明はこのような処置を必要とする個体を化学療法または化学防御薬で処置する効果の評価方法を提供し、該方法では化学療法または化学防御薬に曝露する前および後に個体から取り出した、免疫組織化学的に染色した組織または細胞における老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーの発現レベルを定量する。好ましい実施形態では、コンピューター使用画像解析システムを用いて発現レベルを定量する。

30

【0018】

本発明の1つの実施形態では、個体を化学療法および化学防御薬に曝露する前の個体から第1の組織または細胞サンプルを収集し、個体を化学療法および化学防御薬に曝露した後の個体から第2の組織または細胞サンプルを収集し、第1および第2の組織または細胞サンプルを老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカーに対して指向する検出可能な標識抗体を用いて免疫組織化学的に染色し、第1および第2の組織または細胞サンプルにおける老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する1つまたは複数の生物学的マーカーの発現量を決定し、化学療法または化学防御薬に曝露した後、老化、アポトーシスまたは末端分化に付随する生物学的マーカー（群）の発現が増加したかどうかを決定することにより、個体における化学療法または化学防御薬に対する応答を決定する。

40

【0019】

好ましい実施形態では、細胞性老化、アポトーシスおよび末端分化において発現が誘導される、または増加する生物学的マーカーには、非限定例としてはp21、p27、p16、TGF- β 、IL-4、IL-6およびSA- β -Galなどがあり、一般的小および包括的に老化様表現型（SLP）として知られている。この老化様表現型（SLP）を用い

50

て限定的な増殖能力を有する細胞と、薬物に曝露された後増殖を続ける細胞を区別でき、これは老化様末端増殖停止がヒト癌の処置の応答を決定するのに重要であることを示唆している。

【0020】

細胞毒性薬物で処理した細胞では、SLP誘導および細胞死は併発性および独立性の応答であるようだ。このように、 $SA-\beta-Gal^+$ 細胞および $SA-\beta-Gal^-$ 細胞は共に、薬物処理中または薬物を中止した後数日中に分裂死する類似の可能性を有する。しかしながら、細胞死の急速な過程が一度完了すると、SLPを用いて、成長遅延および非クローン形成性細胞を、回復性および増殖性細胞から区別できる。従って化学防御または化学療法薬を用いる処理の全体的な結果を、細胞死（有糸分裂細胞死またはアポトーシス）および老化様末端増殖停止の誘導に寄与する因子の組み合わせにより決定する。

10

【0021】

中程度の用量のドキソルビシンに曝露してSLPを誘導する。しかしながら、患者を別の物質、例えばタキソールまたはタキソテルで処置する場合、アポトーシス並びにp53およびp21の上方制御がより顕著になる。オンコジーンレセプターHER-2/neuのモノクローナル抗体であるハーセプチン（商標）で患者を処置する場合も、同様である。従って、SLP誘導は細胞増殖抑制性の分化物質、例えばレチノイドおよびその他の化学防御薬の処置結果の第1決定因子になり得る。加えて、画像解析を用いて、キナーゼインヒビターで処置する前および後に、組織において活性化される経路（例えばリン酸化MAPキナーゼおよびAkt）に関与するタンパク質の発現を定量することにより治療応答を調べることができる。

20

【0022】

臨床上的癌におけるSLPマーカー例えば $\beta-Gal$ 、p53、およびp21を分析することにより、異なる治療形態に応答する腫瘍をモニター観察するための重要な診断の手掛かりを提供でき、分析は老化に付随する種々の因子に関する染色を換算することにより行われ、顕微鏡基盤の画像解析により定量できる。

【0023】

本発明の方法の具体的な実施形態では、推定抗癌剤で処置する前および後に個体から細胞を取り出し、パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定する。次いで細胞サンプルを有機溶媒、例えばアセトン、ホルマリン、またはメタノールと反応させ、細胞に免疫組織学的色素が浸透できるようにする。固定方法は当業者に公知である。

30

【0024】

p53、p21、p16、p27、またはp21-WAF1タンパク質の存在および分布が決定される場合、適当な抗体系、例えばサンドイッチ系を用い、目的のタンパク質に特異的に結合する1次抗体および1次抗体に結合する2次抗体を用いてタンパク質を同定する。次いで適当な色素を用いて抗体系を可視化する（Bacusら、Breast J. (1999)）。一般に、これらの標的タンパク質に特異的に結合する抗体およびその他の分子は当業界で公知であり、老化、アポトーシスまたは末端分化の該生物学的マーカーのいずれかに特異的に結合するいずれかの抗体またはその他の分子もしくは分子の集合を用いて本発明の方法を実行することができる。

40

【0025】

p53、p21およびp16に結合する1次抗体の例としてはモノクローナル抗体Ab-2（Oncogene Sciences, Cambridge, マサチューセッツ）などがある。同様に、p21タンパク質に結合する抗体の実例にはモノクローナル抗体Ab-1（Oncogene Sciences）などがある。これらの1次抗体のいずれかと共に用いることができる2次抗体の実例にはウサギ抗マウスIgG（Jackson Labs, West Grove, ペンシルバニア）がある。抗体に曝露した後、酵素複合体、例えばABC複合体（Vector Labs, Burlington, カリフォルニア）を加えて抗体サンドイッチ系を完成し、染色および対比染色をし易くする。画像解析技術を用いて定量を完了する。

50

【0026】

本発明の方法の好ましい実施形態および癌治療への応答を定量化するための以前に研究された方法に勝るその利点は図1から3および実施例1から6を参照することにより最もよく理解される。以下の実施例は本発明の具体的な実施形態および種々のその使用を説明する。これらは単に説明目的で提示するものであり、本発明を限定するために示されたものではない。

【0027】

(実施例1)

β - ガラクトシダーゼ (β - Gal) 染色

細胞をPBSで洗浄し、2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒド中(または3%ホルムアルデヒド単独中)室温で3から5分間固定し、洗浄し、新鮮な老化付随β - Gal (SA - β - Gal) 染色溶液(1mg/ml 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルβ - D - ガラクトシド(X - Gal)、20mg/ml ジメチルホルムアミド; 40mM クエン酸/リン酸ナトリウム、pH 6.0; 5mM フェロシアン化カリウム; 5mM フェリシアンカリウム; 150mM NaCl; 2mM MgCl₂)中37でインキュベートした。2から4時間後、染色は明確になり、12から16時間後には最大染色に到達した。リソソームβ - Galを検出するために、pH 4.0でクエン酸/リン酸ナトリウムを用いて染色溶液を調製した(Baselgaら、Proceedings of AACR NCI EORTC International Conference, Abstract 98(1999))。

【0028】

(実施例2)

コンピューター使用画像解析によるタンパク質発現の定量

老化またはアポトーシスに付随するタンパク質の発現を適当な1次抗体(例えばp53にはAb - 2、または、WAF1、HSP60、またはカスパーゼ3にはAb - 1)、2次抗体(例えばウサギ抗マウスIgG)、および3次ABC複合体を用いて画像解析することにより定量する。

【0029】

適当な条件下、切片をジアミノベニジジン(DAB)色素と反応させることにより3次ABC複合体を可視化する。第2の工程では、組織を別の光学的増強因子、好ましくはエチルグリーンで対比染色する。得られた調製物は核に局在する(そしてp53、p21、p16、WAF1、HSP60またはカスパーゼ3タンパク質の発現レベルを示す)、様々な程度の褐色のジアミノベジジン(DAB)沈着物を伴う緑色の核を有する。ペルオキシダーゼおよびエチルグリーンを用いる染色技術を例示するが、その他の染色および光学的増強因子もまた適している(例えば、特異的クロマゲン、例えばファストレッドまたはファストグリーンと結合するアルカリ性ホスファターゼ)。スペクトル研究により、イムノペルオキシダーゼ技術のDAB沈着物からエチルグリーン染色により良好なスペクトル分離が提供され、2つの異なる波長でフィルターを通すことにより画像の異なる特徴を容易に識別できることが示された。これにより画像が、1つは全ての細胞核が光学的に増強されており(エチルグリーンまたはファストグリーン)、1つはレセプター染色(DAB)されているこれらの組織部分のみが光学的に増強されている、2つの別個の画像にデジタル化できる。好ましい実施形態では、画像を600ナノメートル(赤色)フィルターにより分離して対比染色部分の画像を作り、500ナノメートル(緑色)フィルターによりDAB沈着物で染色する組織部分の画像を作ることができる。

【0030】

さらにこれらの部分を区別するために、画像を可視化する技術者が検討中の部分に境界を設定できる相互の閾値設定技術を用いることができる。境界を設定する場合、光学密度において閾値以下の画像の全部分を排除することにより画像を作製する。第1の画像用に閾値を設定し、第2の画像用に第2の閾値を設定する。

【0031】

次に画像処理方法は赤色フィルターで検討中の組織のマスク画像を作製することからなる。このマスク画像を保存し、次いで同一画像の緑色フィルター版を用いることにより、発現されたタンパク質定量のための別の画像が得られる。フィルターを組み合わせるにより、組織成分がD A Bで染色されている（これは暗色になっている）これらの組織マスクの部分、および緑色の対比染色のみを有する（これは明色になっている）これらの組織成分が光学的に増強される。次いで染色され、マスク内である画像のこれら部分のみを用いて画像解析を行うことができる。

【0032】

次いで標的タンパク質の量を2つの画像間の差異の統計分析により定量する。また、染色された全組織部分の比率またはパーセンテージを、第2の画像の抗体閾値レベルを超えて染色された部分として容易に算出できる。

10

【0033】

赤色および緑色フィルターは本発明の実施に適している。S A - β - G a l 用には緑色フィルター（500nm）を用いて、赤色エオシンで染色された全細胞質部分を決定し、赤色フィルターを用いて決定された、S A - β - G a l（600nm）に関して染色された青色部分と比較する。これを行うことにより対比染色された2つの部分を区別する便利で優れた方法が示される。1つの特定の部分または特徴をもう1つの細胞の特徴よりも光学的に増強するために用いることができる種々の別の染色方法または光学的増強方法およびフィルターリング方法があることは認識されている（例えばファストグリーンおよびエオシン）。本明細書で提供される具体的な実施例は、発現されたp53、W A F 1タンパク質、およびS A - β - G a lを含有する細胞核を可視化するための別の同等物を示唆する。

20

【0034】

p53タンパク質またはW A F 1タンパク質を含有する核の可視化に続いて、処置後の患者に由来する組織中のこのような細胞のパーセンテージを未処置組織中のこのような細胞のパーセンテージと比較できる。

【0035】

これらの比較より、癌に対する推定される治療または化学防御薬の潜在効果を決定できる。具体的には、サンプルの処理部分のp53、W A F 1、S A - β - G a l、H S P 60、またはカスパーゼ3を発現する細胞のパーセンテージがサンプルの未処理部分の細胞のパーセンテージよりも大きい場合、次いで処置に用いられる治療物質が癌の処置に潜在的に有効な物質であると予測される。逆に、サンプルの処理部分および未処理部分の双方でS A - β - G a l、p53、W A F 1、H S P 60またはカスパーゼ3を発現する細胞のパーセンテージが実質的に等しい場合、またはサンプルの処理部分でタンパク質があまり発現されない場合、次いで推定治療薬が癌の処置に有効であるとは予測されない。

30

【0036】

米国特許第5252487号および5288477号はDNAおよびタンパク質を定量する1つの方法を開示し、これは出展明示により本明細書の一部とする。

【0037】

（実施例3）

40

乳癌培養細胞株におけるドキソルビシンに対する応答

乳癌由来のヒト培養細胞株において中程度の用量のドキソルビシンおよびタキソールで処理することにより細胞変化を誘起する。M C F 7細胞を50nMドキソルビシンまたはタキソール（例えばD o l b e a r e ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 80:5573-77（1983）に記載されるように、フローサイトメトリーにより測定される成長停止および細胞死が誘起される用量）で2から3日間処理し、次いで薬物を中止した後10から11日のS A - β - G a l発現に関して染色した。サブG₁分画およびS A - β - G a l⁺表現型の形成におけるこの処理の結果を図1Aから1Bおよび2Aから2Cに示す。タキソール誘起のアポトーシスはフローサイトメトリーヒストグラムの低二倍体ピークにより明白であるが、ドキソルビシン処理（およびモノクローナル

50

抗体ハーセプチン（商標）による処理）により老化に至り、老化の形態学的特徴を有する $SA-\beta-Gal^+$ 細胞に見られるように G_1 、 G_2 および G_2M で遮断する（図2Aから2C並びに表IおよびII）。

【0038】

（実施例4）

ハーセプチン（商標）による処理後の $SA-\beta-Gal$ 発現の定量

凍結腫瘍切片を固定し、次いで $SA-\beta-Gal$ 発現に関して染色した。明視野顕微鏡および画像解析を用いて $SA-\beta-Gal^+$ 細胞を定量した。ハーセプチン（商標）のみを投与した患者から組織を入手した。ハーセプチン（商標）治療を開始する前に転移性疾患から第1の穿刺生検材料を入手した。1日に患者は $4\text{ mg} / 1\text{ g} \cdot \text{v}$ ハーセプチン（商標）を10分間投与された。2日目に、患者が2回目のハーセプチン（商標）処理を受けた24時間後、第2の生検材料を採取した。第3の生検材料は14日目、患者が3回目のハーセプチン（商標）投与を受けた24時間後に採取した。 $SA-\beta-Gal$ 定量の結果を図3Aから3Cおよび表IIに示す。

10

【0039】

（実施例5）

ドキソルビシン処理後の $p21^{WAF1}$ 発現の定量

MCF7細胞をドキソルビシンで3日間処理し、次いで $p53$ および $p21^{CIP1/WAF1}$ 発現に関して染色した。細胞を培養し、染色し、適当な抗体を用いて $SA-\beta-Gal$ に関して記載したように分析した。 $p53$ および $p21^{CIP1/WAF1}$ 定量の結果を表IIIに示す。

20

【0040】

（実施例6）

化学療法後の個体における $p21^{WAF1}$ 発現の定量

20人の乳癌患者からの組織サンプルをネオアジュバント化学療法の前および後の画像解析により $p21$ 発現に関して分析した。Imperial Cancer Research Fund（ICRF；オックスフォード大学、英国）により実験を実施した。この分析結果により処置の前および後に収集された組織サンプルにおいて著明な差異が認められる（表IV）。

【0041】

30

前記の開示は本発明の特定の具体的な実施形態を強調しており、それと等価の修飾または変更は添付の請求の範囲に示す本発明の精神および範囲に包含されることが理解されるだろう。

【0042】

【表1】

表I

$SA-\beta-Gal$ 細胞を発現する細胞のパーセンテージ

細胞	Φ	ドキソルビシン	タキソール
MCF7	2%	24%	13%

40

【0043】

【表2】

表 I I

ハーセプチン処置後に患者組織においてSA- β -Galを発現する細胞のパーセンテージ

経過時間	パーセント
0 日	0 %
2 日	1. 5 %
1 4 日	2 6 %

10

【 0 0 4 4 】

【 表 3 】

表 I I I

ドキシソルピシンで3日間処置したMCF7細胞におけるp53およびp21^{CIP1/WAF1}の発現

処置	p53で染色した細胞 (細胞の%)	p21 ^{CIP1/WAF1} で染色した 細胞 (細胞の%)
Φ	14.43 $\pm$ 6	10.61 $\pm$ 4
DOX	23.93 $\pm$ 7	50.81 $\pm$ 6

20

【 0 0 4 5 】

【 表 4 】

表 I V

ネオアジュバント化学療法の前および後に画像解析で分析した20人の乳癌患者

	P 2 1	P 2 1 +
処置前	1 6	4
処置後	7	1 3

30

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 A から 1 B は未処理 (A) またはドキシソルピシンで処理 (B) し、次いでSA- β -Gal活性に関して染色したMCF7細胞の分析結果を示す。

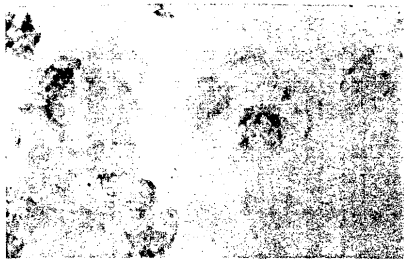
【 図 2 】 図 2 A から 2 C は未処理 (A) またはドキシソルピシンで処理 (B) するか、またはタキソールで処理 (C) したMCF7細胞のフローサイトメトリー分析結果を示す。

【 図 3 】 図 3 A から 3 C はハーセプチン (商標) (オンコジーンタンパク質HER-2/neuに対する抗体) で処置した後、個体から取り出した腫瘍サンプルの分析の結果を図解する。腫瘍組織はヘモトキシシンおよびエオシン (A) 、 SA- β -Gal (ハーセプチン (商標)) での処置後24時間 ; C) 、またはハーセプチン (商標) で処置後14日にSA- β -Galのいずれかで染色した。

40

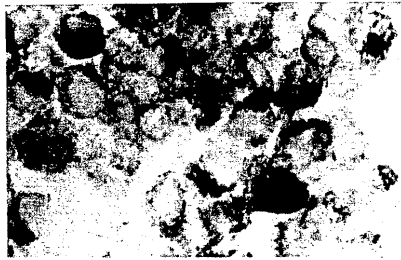
【図 1 A】

FIG. 1A



【図 1 B】

FIG. 1B



【図 2】

FIG. 2A

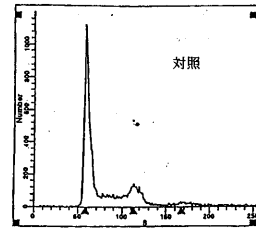


FIG. 2B

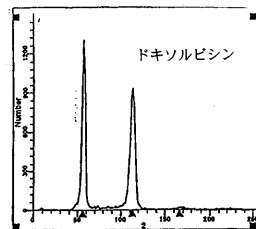
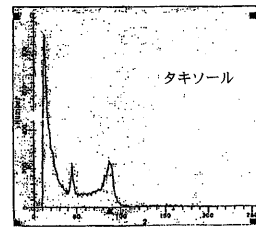


FIG. 2C



【図 3 A】

FIG. 3A



【図 3 C】

FIG. 3C



【図 3 B】

FIG. 3B



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第93/03741(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷,DB名)
G01N 33/48-98

专利名称(译)	确定对癌症治疗的反应的方法		
公开(公告)号	JP3699399B2	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	JP2001552086	申请日	2001-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司		
当前申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司		
[标]发明人	バックスサラエス		
发明人	バックス、 サラ エス.		
IPC分类号	G01N33/48 G01N21/27 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/5011 G01N33/57484 G01N2333/495 G01N2333/82 G01N2800/52 Y10T436/101666 Y10T436/105831 Y10T436/13		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/48.P G01N33/53.D G01N21/27.A		
代理人(译)	三好秀		
优先权	60/176514 2000-01-12 US 60/176515 2000-01-12 US		
其他公开文献	JP2003519795A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用图像分析确定个体对癌症治疗的响应的方法。

図1

SA-β-Gal細胞を発現する細胞のパーセンテージ

細胞	Φ	ドキソルビシン	タキソール
MCF7	2%	24%	13%