

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年6月30日(30.06.2011)

(10) 国際公開番号
WO 2011/078223 A1

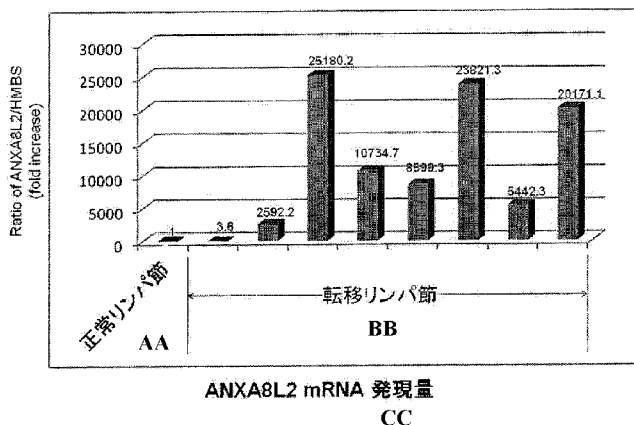
- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01) 国立大学法人愛媛大学医学部附属病院内 Ehime (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/073129 (74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2010年12月22日(22.12.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2009-292611 2009年12月24日(24.12.2009) JP (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IL, 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.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人愛媛大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION EHIME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市道後樋又10番13号 Ehime (JP). (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中城公一 (NAKASHIRO Koichi) [JP/JP]; 〒7910295 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学大学院医学系研究科内 Ehime (JP). 浜川裕之 (HAMAKAWA Hiroyuki) [JP/JP]; 〒7910295 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学大学院医学系研究科内 Ehime (JP). 合田啓之 (GODA Hiroyuki) [JP/JP]; 〒7910295 愛媛県東温市志津川

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING CERVICAL LYMPH NODE METASTASIS, AND TUMOR MARKER FOR HEAD AND NECK CANCER

(54) 発明の名称: 頸部リンパ節転移分析方法及び頭頸部癌の腫瘍マーカー

[図1]



AA Normal lymph node
 BB Metastasized lymph node
 CC Expression level of ANXA8L2 mRNA

(57) Abstract: Provided are a method for analyzing the metastasis of head and neck cancer to the cervical lymph node, and a tumor marker for head and neck cancer used therein. Specifically, provided is a method for: measuring the expression level of one or more genes selected from a group comprising genes represented by SEQ ID NO: 1 to 36 in the sequence listing in a cervical lymph node sample; and analyzing the metastasis of head and neck cancer to the cervical lymph node, which involves comparing the aforementioned expression level with a reference value. Also provided are one or more genes selected from a group comprising genes represented by SEQ ID NO: 1 to 36 in the sequence listing, and a tumor marker for head and neck cancer used in the aforementioned method for analyzing cervical lymph node metastasis, which comprises an expression product of the aforementioned genes and/or the expression level thereof.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2011/078223 A1



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

頭頸部癌の頸部リンパ節転移の分析方法、及び、それに用いる頭頸部癌の腫瘍マーカーの提供。頸部リンパ節試料における、配列表の配列番号 1 ~ 36 で表される遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定すること、及び、前記発現量を基準値と比較することを含む頸部リンパ節への頭頸部癌の転移を分析する方法。配列表の配列番号 1 ~ 36 で表される遺伝子からなる群から選択される 1 若しくは複数の遺伝子、又は、それ若しくはそれらの発現産物及び又は発現量からなり、前記頸部リンパ節転移分析方法に用いる頭頸部癌の腫瘍マーカー。

明 細 書

発明の名称：

頸部リンパ節転移分析方法及び頭頸部癌の腫瘍マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、頸部リンパ節転移分析方法及び頭頸部癌の腫瘍マーカーに関する。

背景技術

[0002] 頭頸部癌の治療において大きな問題の一つにリンパ節転移の制御が挙げられる。頸部リンパ節転移の有無、さらに転移リンパ節の個数は患者の予後を大きく左右するため、頸部リンパ節の転移様相の正確な把握は治療上必要不可欠である。しかしながら、触診や画像診断（CT, MRI, Echo, PET-CT）などの方法では潜在的なリンパ節転移（約5mm未満）の検出には限界がある。そこで、より正確なリンパ節転移診断としてセンチネルリンパ節生検が行われている（非特許文献1～3）。センチネルリンパ節生検は1992年にMortonらが悪性黒色腫に対してその有用性を報告して以来（非特許文献4）、種々の癌腫に対しても臨床応用がなされており、頭頸部癌に対してもその有用性が既に報告されている（非特許文献2及び3）。

[0003] また、これまでのリンパ節微小転移診断に関する研究の結果、最大径が200 μ m以上の転移巣が存在すればH&E染色で検出可能であること、サイトケラチン免疫染色を併用することによりさらに少数の腫瘍細胞でも確認できること、リアルタイム定量化RT-PCR法による遺伝子診断では1から数個の腫瘍細胞が検出可能で、検出のための標的遺伝子としてはSquamous Cell Carcinoma Antigen（SCCA）遺伝子が有用であることが明らかにされている（非特許文献5～8）。さらに、頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移がPVA（pemphigus vulgaris antigen）遺伝子の発現量に基づきQRT-PCR法を用いて判断できることが開示されている（非特許文献9）。

[0004] また、頭頸部癌の腫瘍マーカーとしては、これまで幾つかの遺伝子が開示

されている（特許文献1及び2）。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2007-52号公報
特許文献2：特開2009-34071号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：佐藤一彦、平山星夫 他：腋窩郭清指標としての錫コロイドを用いた sentinel lymph node biopsy：医学のあゆみ 192:147-150, 2000.
非特許文献2：松塚 崇、鹿野真人 他：センチネルリンパ節生検による頸部リンパ節転移予測：頭頸部腫瘍 27:192-197, 2001.
非特許文献3：木原圭一、甲能直幸 他：口腔癌 NO 症例におけるセンチネルリンパ節の検討：頭頸部腫瘍28:108-113, 2002.
非特許文献4：Morton D, Wen DR, et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma: Arch Surg 127:392-399, 1992.
非特許文献5：Hamakawa H, Fukuzumi M, et al: Genetic detection of micrometastases based on SCC antigen mRNA in cervical lymph nodes of head and neck cancer: Clin Exp Metastasis 17:593-599, 1999.
非特許文献6：Hamakawa H, Takemura K, et al: Histological study on pN upgrading of oral cancer: Virchows Arch 437:116-121, 2000.
非特許文献7：大西詔子：リアルタイム定量化 PCR 法を用いた口腔癌頸部リンパ節微小転移の遺伝子診断：愛媛医学21:183-191, 2002.
非特許文献8：中城公一、新谷 悟、大西詔子、寺門永顕、浜川裕之：口腔悪性腫瘍におけるセンチネルリンパ節微小転移の術中迅速診断：頭頸部腫瘍 29:64-69, 2003.
非特許文献9：Ferris L. Robert et al., Cancer Res., vol. 65 (6) 2147-2156, 2005.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、頸部リンパ節の転移の正確な把握に有用なさらなる分析方法やそれに用いる頭頸部癌の腫瘍マーカーが望まれている。そこで、本発明は、頭頸部癌の頸部リンパ節転移の分析方法、及び、それに用いる頭頸部癌の腫瘍マーカーを提供する。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、頸部リンパ節への頭頸部癌の転移を分析する方法であって、頸部リンパ節試料における、配列表の配列番号1～36で表される遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定すること、及び、前記発現量を基準値と比較することを含む頸部リンパ節転移分析方法に関する。

[0009] また、本発明は、その態様として、配列表の配列番号1～36で表される遺伝子からなる群から選択される1若しくは複数の遺伝子、又は、それ若しくはそれらの発現産物及び又は発現量からなり、本発明の頸部リンパ節転移分析方法に用いる頭頸部癌の腫瘍マーカーに関する。

発明の効果

[0010] 本発明は、頭頸部癌の頸部リンパ節への転移の可能性を分析できるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] 図1は、頭頸部癌転移リンパ節及び正常リンパ節において、配列表の配列番号6で表される遺伝子の発現量（ANXA8L2 mRNA発現量）を測定した一例を示すグラフである。

[図2] 図2は、頭頸部癌転移リンパ節及び正常リンパ節において、配列表の配列番号9で表される遺伝子の発現量（DSG3 mRNA発現量）を測定した一例を示すグラフである。

[図3] 図3は、頭頸部癌転移リンパ節及び正常リンパ節において、配列表の配

列番号 13 で表される遺伝子の発現量 (S100P mRNA 発現量) を測定した一例を示すグラフである。

[図4] 図4は、頭頸部癌転移リンパ節及び正常リンパ節において、配列表の配列番号 23 で表される遺伝子の発現量 (MMP1 mRNA 発現量) を測定した一例を示すグラフである。

[図5] 図5は、CK19 mRNA 陰性頭頸部癌転移リンパ節 8 検体について、ANXA8L 及びDSG3 遺伝子の mRNA を RT-PCR 法で検出した結果の一例を示すグラフである。

[図6] 図6は、転移陰性 7 検体及び転移陽性 12 検体について、ANXA8L、及びDSG3 遺伝子の mRNA を RT-PCR 法で検出した結果の一例を示すグラフである。

[図7] 図7は、転移陰性 7 検体及び転移陽性 12 検体について、KRT-1、KRT-6A、MMP1、S100P、ARSI 遺伝子の mRNA を RT-PCR 法で検出した結果の一例を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、頭頸部扁平上皮癌転移頸部リンパ節と非担癌患者由来頸部リンパ節 (いずれもヒト頸部リンパ節) の全遺伝子発現量を比較し、転移リンパ節においてのみ共通して発現亢進が認められ、かつ唾液腺において発現が検出されない遺伝子として同定された下記表 1 に示す 36 種類の遺伝子が、頭頸部癌の頸部リンパ節への転移の可能性を示す腫瘍マーカーとして使用できるという知見に基づく。

[0013] 本明細書において「非担癌患者由来頸部リンパ節」とは、頸部の手術を受けた良性疾患 (癌ではない) の患者から提供を受けた頸部リンパ節をいう。非担癌患者由来頸部リンパ節は、癌が転移していない頸部リンパ節 (すなわち、正常頸部リンパ節) の遺伝子発現状態を示すことができる。したがって、頭頸部癌が転移した頸部リンパ節において、非担癌患者由来頸部リンパ節における発現量よりも多い発現量を示す遺伝子は、頭頸部癌の頸部リンパ節への転移の可能性を示す腫瘍マーカーとして使用できる。下記表 1 に示す 36

種類の遺伝子は、この条件を満たす。

[0014] また、「唾液腺」の細胞は、しばしば頸部リンパ節に存在することがある細胞である。よって、唾液腺にて発現が検出される遺伝子は、癌転移頸部リンパ節においてのみ共通して発現亢進を示す遺伝子の偽陽性の原因となるおそれがある。下記表 1 に示す 36 種類の遺伝子は、唾液腺において発現が検出されないため、これらの遺伝子は前述の偽陽性のリスクが低減された腫瘍マーカーとして使用できる。これらの中でも、転移の検出感度及び偽陽性低減の観点から、腫瘍マーカーとして使用する遺伝子としては、ANXA8L2、DSG3、KRT1、KRT6A、ARSI、MMP1 及び S100P が好ましく、ANXA8L2、KRT1、KRT6A、ARSI、MMP1 及び S100P がより好ましく、ANXA8L2 がさらに好ましい。なお、前記 DSG3 遺伝子は、PVA 遺伝子とも呼ばれる（以下同様）。

[0015]

[表1]

遺伝子 番号	Gene Symbol	Gene_Name	RefSeq_NM	UniGene	染色体 番号	配列 番号	変化 倍率
1	KRT6C	keratin 6C	NM_173086	Hs.446417	12	1	3,283
2	KRT6A	keratin 6A	NM_005554	Hs.367762	12	2	2,805
3	SPRR1B	small proline-rich protein 1B (cornifin)	NM_003125	Hs.1076	1	3	2,493
4	KRT1	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	Hs.80828	12	4	2,288
5	SPRR2E	small proline-rich protein 2E	NM_001024209.2	null	1	5	1,410
6	ANXA8L2	annexin A8-like 2	NM_001630	Hs.546760	10	6	754.7
7	LGALS7	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	Hs.99923	19	7	610.7
8	null	null	null	null	1	8	571
9	DSG3 (PVA)	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	NM_001944	Hs.1925	18	9	444.6
10	SPRR2F	small proline-rich protein 2F	NM_001014450.1	null	1	10	365.2
11	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	NM_005130	Hs.1690	4	11	271.4
12	null	null	null	null	10	12	246.2
13	S100P	S100 calcium binding protein P	NM_005980	Hs.2962	4	13	225.6
14	A2ML1	alpha-2-macroglobulin-like 1	NM_144670	Hs.334306	12	14	166.5
15	BNC1	basonuclin 1	NM_001717	Hs.459153	15	15	106.6
16	ANXA8L2	annexin A8-like 2	NM_001630	Hs.546760	10	16	91.76
17	KLK8	kallikrein-related peptidase 8	NM_007196	null	19	17	88.9
18	SCEL	sciellin	NM_144777	Hs.115166	13	18	79.3
19	NCK1	NCK adaptor protein 1	NM_006153	Hs.477693	3	19	70.35
20	IL20RB	interleukin 20 receptor beta	NM_144717	Hs.61232	3	20	70.35
21	ECM1	extracellular matrix protein 1	NM_022664	Hs.81071	1	21	44.99
22	CAPNS2	calpain, small subunit 2	NM_032330	Hs.534503	16	22	43.84
23	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	NM_002421	Hs.83169	11	23	43.25
24	XG	Xg blood group (pseudoautosomal boundary- divided on the X chromosome)	NM_175569	Hs.179675	X	24	30.96
25	VSNL1	visinin-like 1	NM_003385	Hs.444212	2	25	29.07
26	LRRRC15	leucine rich repeat containing 15	NM_130830	null	3	26	26.89
27	WDR66	WD repeat domain 66	NM_144668	Hs.507125	12	27	25.15
28	TGM1	transglutaminase 1 (K polypeptide epidermal type I, protein-glutamine-gamma- glutamyltransferase)	NM_000359	Hs.508950	14	28	23.45
29	LY6K	lymphocyte antigen 6 complex, locus K	NM_017527	Hs.69517	8	29	21.01
30	LOX	lysyl oxidase	NM_002317	Hs.102267	5	30	20.55
31	CDA	cytidine deaminase	NM_001785	Hs.466910	1	31	16.85
32	ARSI	arylsulfatase I	NM_001012301.2	Hs.444709	5	32	12.17
33	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	NM_020351	null	3	33	8.95
34	THBS2	thrombospondin 2	NM_003247	Hs.371147	6	34	6.497
35	SULF1	sulfatase 1	NM_015170	Hs.409602	8	35	5.871
36	RNASE7	ribonuclease, RNase A family, 7	NM_032572.3	Hs.525206	14	36	4.014

[0016] [頸部リンパ節転移を分析する方法]

すなわち、本発明は、1つの態様として、頸部リンパ節への頭頸部癌の転移を分析する方法（以下、「本発明の分析方法」ともいう）であって、頸部リンパ節試料における配列表の配列番号1～36で表される遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定すること、及び、前記発現量を基準値と比較することを含む頸部リンパ節転移分析方法に関する。

- [0017] 本発明の分析方法の一実施形態として、頸部リンパ節試料における、配列表の配列番号 1～8 及び 10～36 で表される遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定すること、及び、前記発現量を基準値と比較することを含む、頸部リンパ節転移分析方法が挙げられる。
- [0018] 本明細書において「頭頸部癌」とは、脳と眼を除いた首から上にできる癌をいい、一般的に、口腔癌、鼻副鼻腔癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、頭部腫瘍、耳の癌を含む。また、本明細書において「腫瘍マーカー」とは、癌細胞の目印（マーカー）となる物質であって、癌の診断や治療の判断基準として役立つ物質の総称をいう。
- [0019] 本明細書において「遺伝子の発現量を測定すること」とは、遺伝子の発現産物の量を測定することをいう。本明細書において「発現産物」は、細胞から抽出されるトータルRNAに含まれるRNA成分を含み、遺伝子の転写産物（mRNA）を含みうる。遺伝子の発現量の測定方法は、特に制限されず、例えば、定量PCR法やDNAマイクロアレイ法によって行うことができる。遺伝子の発現量は、内部標準に対する相対的なものであってもよく、比較対象試料（例えば、正常細胞試料）に対する相対的なものであってもよい。測定対象の遺伝子は、特に言及が無い場合は、上記表 1 の遺伝子（配列表の配列番号 1～36 で表される遺伝子）をいう。
- [0020] 本明細書において「頸部リンパ節試料」とは、頭頸部癌の転移の有無を分析する対象となるリンパ節をいい、例えば、センチネルリンパ節、並びに、頭頸部癌が存在する又は存在した周辺のその他の頸部リンパ節、及び、頸部郭清により摘出されるリンパ節を含みうる。遺伝子の発現量を測定する場合には、分析精度向上の点から、対象から回収されたリンパ節全体からトータルRNAを回収してcDNA又はcRNAを調製し、それらを用いて定量PCR法やDNAマイクロアレイ法を行うことが好ましい。
- [0021] 本明細書において「発現量を基準値と比較すること」とは、分析試料における発現量と予め設定しうる基準値とを比較することをいう。一実施形態において、基準値は、正常頸部リンパ節における発現量とすることができる。

この形態において、試料の発現量が該基準値よりも好ましくは3倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは30倍以上、さらにより好ましくは100倍以上高い場合に、該試料の頸部リンパ節に頭頸部癌の転移している可能性が高いとすることができる。その他の実施形態において、基準値は、正常頸部リンパ節における発現量の好ましくは3倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは30倍以上、さらにより好ましくは100倍以上の量とすることができる。この形態において、前記試料の発現量が基準値よりも高い場合に前記試料の頸部リンパ節に頭頸部癌の転移している可能性が高いとすることができる。

- [0022] 本明細書において「正常頸部リンパ節」は、ヒト正常個体の頸部リンパ節を含みうるが、完全な健常人のリンパ節の摘出は倫理的に困難である。したがって、本明細書において「正常頸部リンパ節」は、頸部の手術を受けた良性疾患（癌ではない）の患者から提供を受けた頸部リンパ節である「非担癌患者由来頸部リンパ節」を含みうる。
- [0023] 本発明の分析方法において、発現量を測定・比較する遺伝子の数は、1種類でもよいが、分析の精度の点からは、2種類以上が好ましく、5種類以上がより好ましく、10種類以上がさらに好ましく、20種類以上がさらにより好ましい。
- [0024] 現在、頭頸部癌の治療方法においては、頸部郭清、すなわち、頸部に存在するリンパ節（約30個）を全て摘出することが一般的に行われる。本発明の分析方法をこれらの摘出された頸部リンパ節に適用することにより、頸部に何個のリンパ節転移が存在したかを明らかにすることができ、その個数によって今後の治療方針を検討・決定することができる。
- [0025] また、いきなり頸部郭清を行なうのではなく、センチネルリンパ節（1-2個）を摘出し、転移の有無を確認し、転移がなければ頸部郭清を行わず、転移があれば頸部郭清を行う方法（センチネルリンパ節生検）に対しても、本発明の分析方法を適用できる。なお、本発明の分析方法は、一実施形態において、医療目的でヒトのリンパ節への頭頸部癌の転移を判断すること、並

びに、医療目的でヒトのリンパ節への頭頸部癌転移の有無に基づき処方や治療・手術計画について判断することを含まない。また、本発明の分析方法は、その他の実施形態において、医療目的でヒトのリンパ節への頭頸部癌の転移を判断すること、並びに、医療目的でヒトのリンパ節への頭頸部癌転移の有無に基づき処方や治療・手術計画について判断することを含んでもよい。

[0026] [頭頸部癌の腫瘍マーカー]

本発明は、その他の態様として、配列表の配列番号1～36で表される遺伝子からなる群から選択される1若しくは複数の遺伝子、又は、それ若しくはそれらの発現産物及び又は発現量からなる頭頸部癌の腫瘍マーカー（以下、「本発明の頭頸部癌の腫瘍マーカー」ともいう）に関する。前記発現産物は、遺伝子のDNAを鋳型として転写されるRNA鎖、すなわち、RNAポリメラーゼにより合成されるRNA鎖、及び、転写後細胞内で修飾されたRNA鎖を含みうる。前記発現産物に含まれるRNA鎖は、特に制限されず、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）、リボソームRNA（rRNA）、運搬RNA（tRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、核小体低分子RNA（snoRNA）、及びその他のタンパク質を指令しないRNA等が挙げられる。これらのRNA鎖は、転写後、細胞内でプロセッシングされたものも含む。また、本明細書において、「遺伝子」とは、生体機能と関連するDNAの任意の断片をいう。なお、配列表のポリヌクレオチドがRNAを表す場合、t（チミン）塩基は、u（ウラシル）塩基に読み替えるものとする。

[0027] 本発明の頭頸部癌の腫瘍マーカーは、頸部リンパ節における頭頸部癌の転移の指標とすることができる。すなわち、本発明の頭頸部癌の腫瘍マーカーが頸部リンパ節において発現亢進している場合には、該リンパ節に転移が起こっている可能性が高くなる。したがって、一実施形態において、本発明の頭頸部癌の腫瘍マーカーは、頭頸部癌の配列表の配列番号1～36で表される遺伝子からなる群から選択される遺伝子の転写産物からなり、本発明の分析方法に用いるための頭頸部癌の腫瘍マーカーである。また、その他の実施

形態において、本発明の頭頸部癌の腫瘍マーカーは、頭頸部癌の配列表の配列番号 1～8 及び 10～36 で表される遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の転写産物からなり、本発明の分析方法に用いるための頭頸部癌の腫瘍マーカーである。

[0028] 本発明は、さらなる態様として、本発明の腫瘍マーカーの使用であって、頸部リンパ節又は頭頸部リンパ節試料における頭頸部癌の転移を分析若しくは判定又は判断することにおける本発明の腫瘍マーカーの腫瘍に関する。その一実施形態として、本発明の分析方法における本発明の腫瘍マーカーの使用が挙げられる。

[0029] 以下、実施例を用いて本発明をさらに説明する。

実施例

[0030] (実施例 1)

[試料]

頭頸部扁平上皮癌患者由来の転移リンパ節 (7 例) を試料とした。また、比較対象試料として非担癌患者由来のリンパ節 (1 例) 及び唾液腺 (5 例) を用いた。なお、検体の本研究への使用については、患者本人及び家族へ十分な説明を行った上で、文書による同意を得た。

[0031] [解析]

各試料を機械的にホモジナイズした後、Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いてトータル RNA を抽出、精製した。トータル RNA 1 μ g をケミルミネッセント RT-IVT ラベリングキット (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて増幅し、digoxigenin (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 標識 cRNA を合成した。合成 cRNA をヒトゲノムサーベイマイクロアレイ (Applied Biosystems) にハイブリダイゼーションさせたのち、ケミルミネッセントディテクションキット (Applied Biosystems) を用いて洗浄、発色後、Applied Biosystems 1700 マイクロアレイアナライザー (Applied Biosystems) を用いて 29,098 遺伝子の発現定量を行った。各症例の遺伝子発現量の比較は Gene Spring GX7.3 (Agilent Technologies, Sa

ntaClara, CA) を用いて解析した。

[0032] [腫瘍マーカーの同定]

頭頸部扁平上皮癌転移リンパ節7検体と非担癌患者由来リンパ節1検体の全遺伝子発現量を比較した。非転移リンパ節と比較して、転移リンパ節においてのみ共通して3倍以上の発現亢進が認められ、かつ唾液腺において発現が検出されない遺伝子を腫瘍マーカーとして36種類同定した(上記表1、配列表の配列番号1~36で表される遺伝子)。各遺伝子における発現亢進の度合いを上記表1において「変化倍率」として示す。同定されたRefSeqあるいはUniGeneに登録されていない新規遺伝子が2種類認められ(配列表の配列番号8及び12で表される遺伝子)、また癌との関連が報告されている遺伝子が12種類含まれていた。

[0033] [腫瘍マーカーの使用]

配列表の配列番号6、9、13、及び23の遺伝子(それぞれ、ANXA8L2、DSG3(PVA)、S100P、MMP1遺伝子)のmRNAの発現量を、新たな9サンプルの頭頸部扁平上皮癌転移リンパ節について測定し、その発現量を正常リンパ節(非担癌患者由来のリンパ節)における発現量と比較した。発現量の測定は、リアルタイム定量化RT-PCR法にて行った。すなわち、各リンパ節組織由来TOTAL RNA 100 ngを鋳型とし、それぞれのmRNAを特異的なプライマーを用いてLight Cycler (Roche Diagnostics)にて逆転写及び増幅した。同時に、TaqMan(登録商標)プローブ(Applied Biosystems)又はSYBR(登録商標)Green I(Takara, Otsu, Japan)を用いて増幅産物量を検出することにより各遺伝子の発現量を定量した。

[0034] その結果を図1~4に示す。これらの図に示すとおり、前記4つの遺伝子は、全ての頭頸部扁平上皮癌転移リンパ節サンプルにおいて正常リンパ節サンプルにおける発現量を超える発現量を示し、また、前記4つの遺伝子は、1サンプルを除く全ての頭頸部扁平上皮癌転移リンパ節サンプルにおいて正常リンパ節サンプルにおける発現量の3倍を超える発現量を示した。

[0035] (実施例 2)

[試料]

Cytokeratin 19 (CK19) mRNAを検出対象とした従来のがん転移遺伝子検査では転移が陰性と判断されたが、顕微鏡による病理組織検査によって頭頸部癌が転移していたことが判明したリンパ節 8 検体を試料として用いた。なお、検体の本研究への使用については、患者本人及び家族へ十分な説明を行った上で、文書による同意を得た。

[0036] [腫瘍マーカーの使用]

配列表の配列番号 6 及び 9 の遺伝子（それぞれ、ANXA8L2 及び DSG3 (PVA) 遺伝子）の mRNA の発現量を、前記試料について測定し、その発現量を正常リンパ節（非担癌患者由来のリンパ節）における発現量と比較した。発現量の測定は、前記実施例 1 と同様にリアルタイム定量化 RT-PCR 法にて行った。

[0037] その結果を図 5 に示す。図 5 に示す通り、ANXA8L2 遺伝子については、全ての検体で発現が検出された。また、DSG3 (PVA) 遺伝子は、2 検体（25%）を除き、発現が検出された。

[0038] (実施例 3)

[試料]

実施例 1 及び 2 とは異なる新たな頭頸部扁平上皮癌患者由来の転移リンパ節（12 例）を試料とし、また、比較対象試料として新たな非担癌患者由来のリンパ節（7 例）を用いた。なお、検体の本研究への使用については、患者本人及び家族へ十分な説明を行った上で、文書による同意を得た。

[0039] [腫瘍マーカーの使用]

配列表の配列番号 6、9、4、2、23、13、及び 32 の遺伝子（それぞれ、ANXA8L、DSG3 (PVA)、KRT-1、KRT-6A、MMP1、S100P、及び ARSI 遺伝子）の mRNA の発現量を、前記試料について測定し、その発現量を比較対象試料における発現量と比較した。発現量の測定は、前記実施例 1 と同様にリアルタイム定量化 RT-PCR 法に

て行った。

[0040] その結果を図6及び7に示す。図6に示す通り、ANXA8L2及びDSG3（PVA）遺伝子については、正常リンパ節で全く発現が認められなかった。また、図7に示すとおり、KRT-1、KRT-6A、MMP1、S100P、及びARSI遺伝子についても、転移リンパ節において、正常リンパ節に比べて有意に発現が上昇していた。

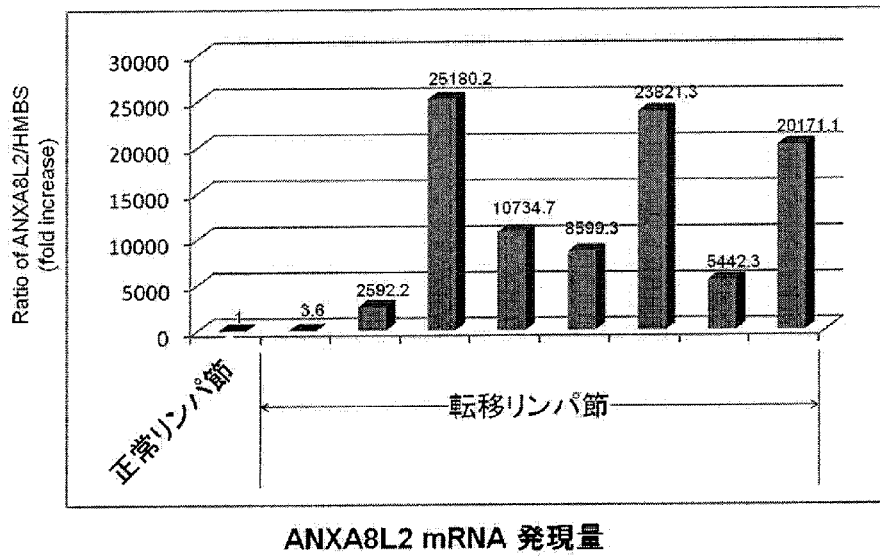
産業上の利用可能性

[0041] 本発明は、例えば、頭頸部癌の治療の分野で有用である。

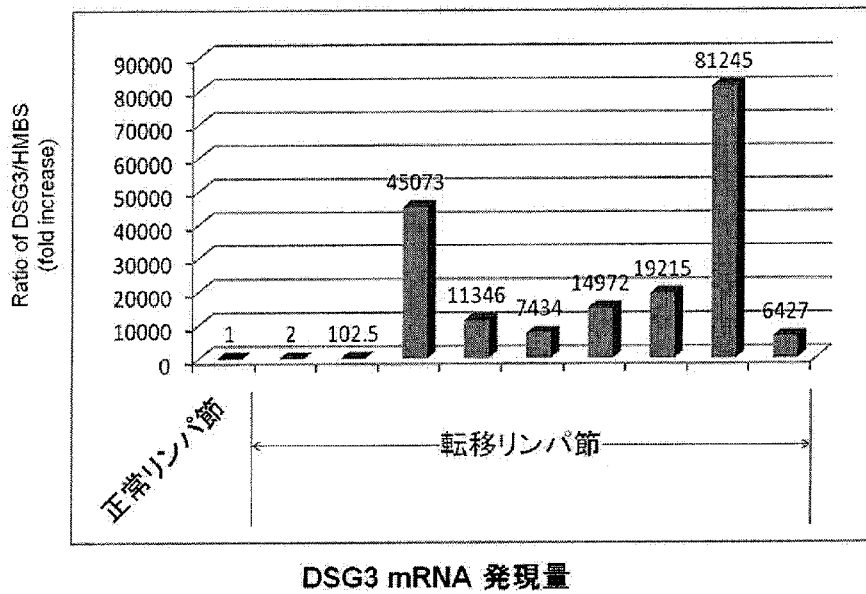
請求の範囲

- [請求項1] 頸部リンパ節への頭頸部癌の転移を分析する方法であって、
頸部リンパ節試料における、配列表の配列番号1～8及び10～36
で表される遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子
の発現量を測定すること、及び、
前記発現量を基準値と比較することを含む、頸部リンパ節転移分析方
法。
- [請求項2] 基準値が正常頸部リンパ節における発現量であって、前記試料の発現
量が基準値よりも3倍以上高い場合に前記試料頸部リンパ節に頭頸部
癌の転移している可能性が高いとする基準値である、請求項1記載の
頸部リンパ節転移分析方法。
- [請求項3] 基準値が正常頸部リンパ節における発現量の3倍以上の量であって、
前記試料の発現量が基準値よりも高い場合に前記試料頸部リンパ節に
頭頸部癌の転移している可能性が高いとする基準値である、請求項1
記載の頸部リンパ節転移分析方法。
- [請求項4] 前記遺伝子が、配列表の配列番号6で表されるANXA8L2遺伝子
である、請求項1から3のいずれかに記載の頸部リンパ節転移分析方
法。
- [請求項5] 配列表の配列番号1～8及び10～36で表される遺伝子からなる群
から選択される1若しくは複数の遺伝子、又は、それ若しくはそれら
の発現産物及び又は発現量からなり、請求項1から3のいずれかに記
載の頸部リンパ節転移分析方法に用いる、頭頸部癌の腫瘍マーカー。

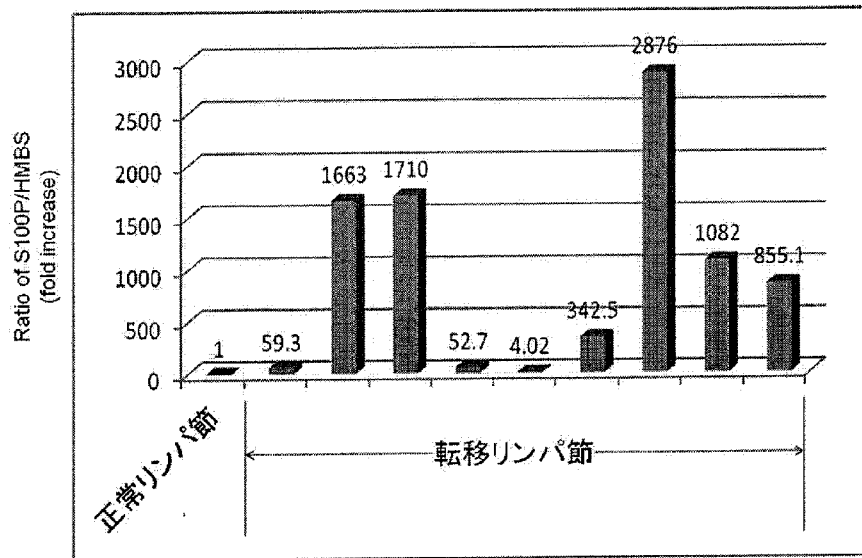
[図1]



[図2]

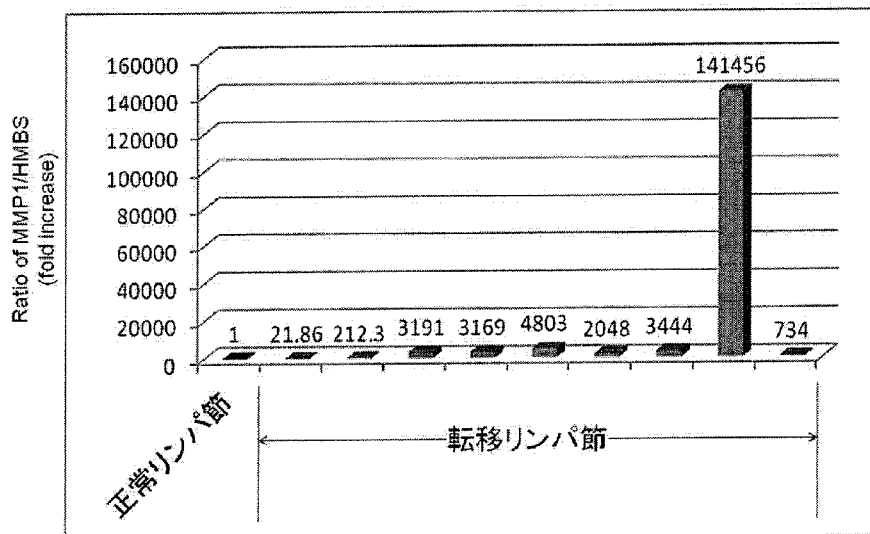


[図3]



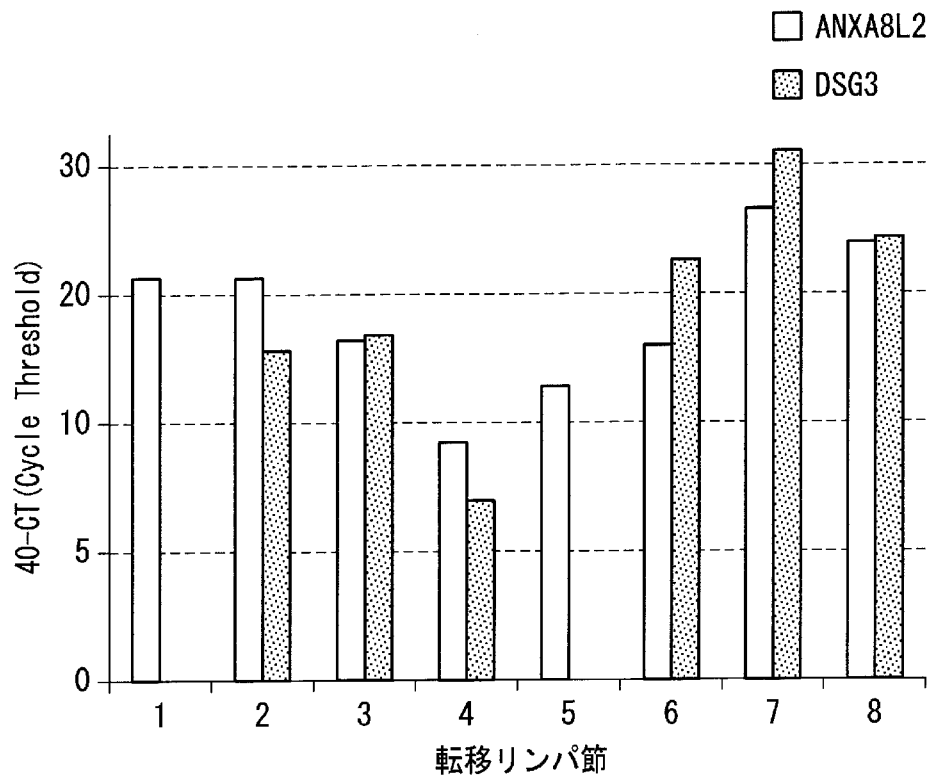
S100P mRNA 発現量

[図4]

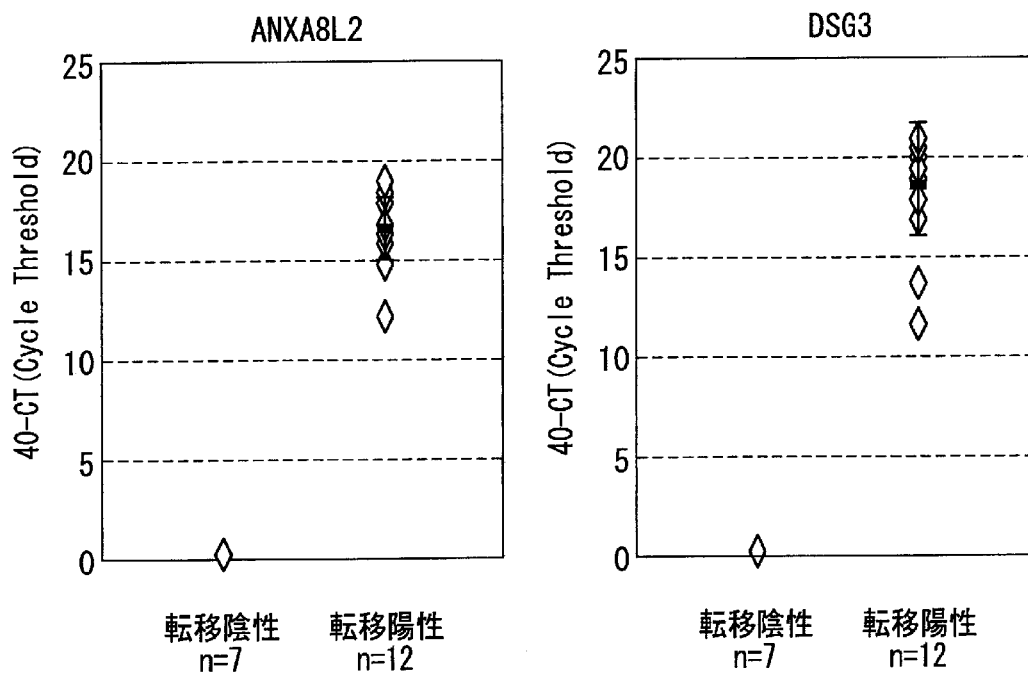


MMP1 mRNA 発現量

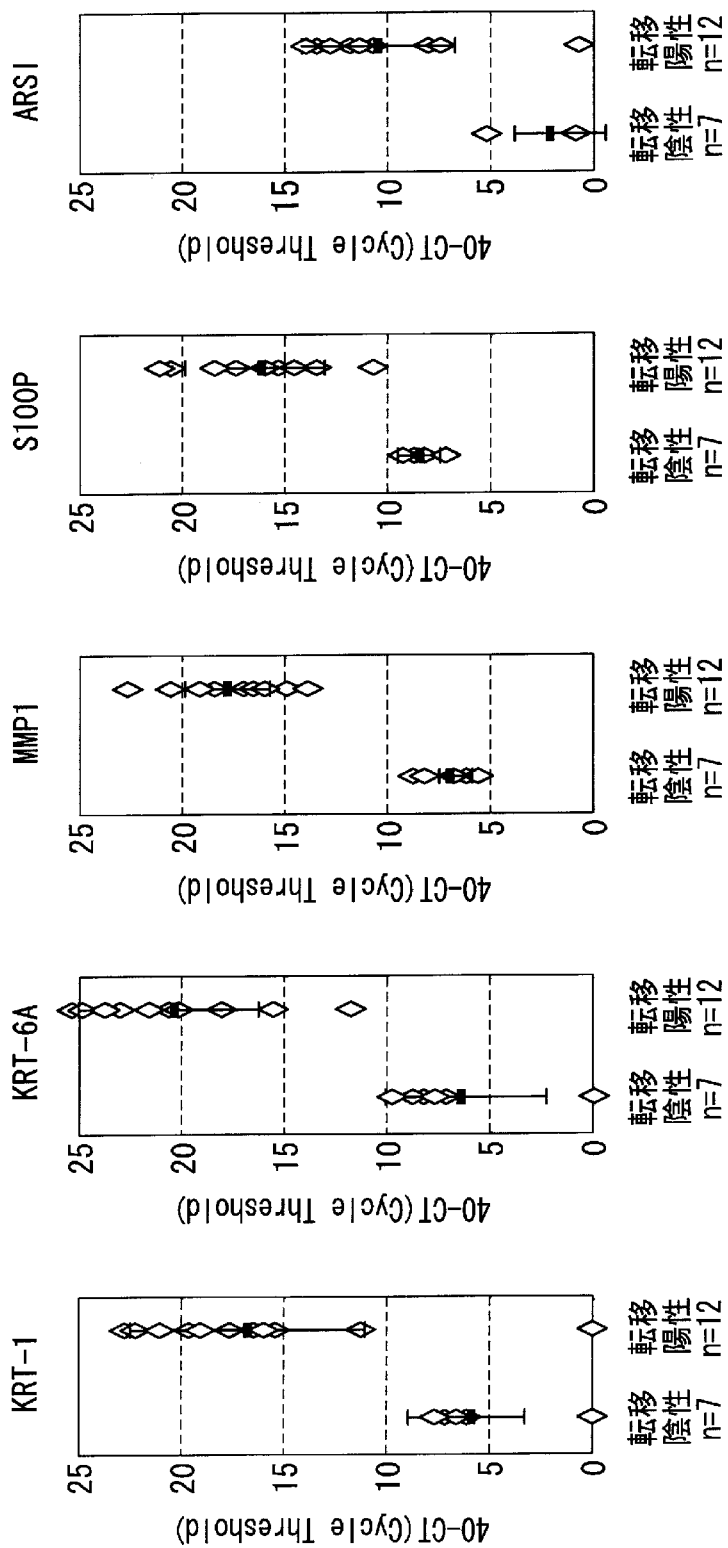
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i		
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) C12Q1/68, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-52 A (Ehime University), 11 January 2007 (11.01.2007), particularly, paragraphs [0014], [0036] to [0039] (Family: none)	1-5
Y	Hiroyuki HAMAKAWA, "Carcinoma of oral cavity. New diagnosis and treatment", Rinsho to Kenkyu, 2005.07, vol.82, no.7, pages 1201 to 1205, particularly, V. Kokugan Chiryo no Kobetsuka	1-5
Y	Hiroyuki HAMAKAWA, Genetic Diagnosis of Oral Cancer (From Diagnosis to Therapy, J. Hard Tissue Biology, 2005, Vol.14, No.2, p.163-165, entire text	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 14 February, 2011 (14.02.11)		Date of mailing of the international search report 22 February, 2011 (22.02.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073129

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hiroyuki HAMAKAWA, "Genetic Diagnosis for Micrometastasis of Oral Cancer", Journal of The Japanese Stomatological Society, 2001.05, vol.50, no.3, pages 145 to 154, particularly, 2. Lymph-setsu Bisho Ten'i no Idenshi Shindan	1-5
Y	Hiroyuki GODA et al., "Kokugan Sentinel Lymph-setsu Seiken eno OSNA-ho no Oyo to Mondaiten", Dai 45 Kai Japan Society of Clinical Oncology Sokai Shorokugo, 20 September 2007 (20.09.2007), vol.42, no.2, page 436 OS036-5, entire text	1-5
Y	WO 2008/044504 A1 (Niigata University), 17 April 2008 (17.04.2008), particularly, paragraphs [0013], [0061]; examples & US 2010/0068709 A & EP 2083087 A1 & WO 2008/044504 A1 & CN 101522912 A	1-5
Y	Robert L. FERRIS et al., Molecular Staging of Cervical Lymph Nodes in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Cancer Res, 2005, Vol.65, No.6, p.2147-2156, particularly, Abstract	1-5
Y	JP 2008-505644 A (UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION), 28 February 2008 (28.02.2008), particularly, paragraph [0007]; example 3 & US 2006/0019290 A1 & EP 1774030 A & WO 2006/017151 A2	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	JP 2007-52 A (国立大学法人愛媛大学) 2007.01.11, 特に、段落 0014, 0036-0039 等 (ファミリーなし)	1-5	
Y	浜川裕之, 口腔癌—新しい診断と治療—, 臨床と研究, 2005.07, Vol.82, No.7, p.1201-1205, 特に、V.口腔癌治療の個別化、等	1-5	
Y	Hiroyuki HAMAKAWA, Genetic Diagnosis of Oral Cancer (From Diagnosis to Therapy, J. Hard Tissue Biology, 2005, Vol.14, No.2, p.163-165, 全文	1-5	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 14.02.2011		国際調査報告の発送日 22.02.2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 北村 悠美子	4 N 4 5 0 1
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	浜川裕之, 口腔癌の微小転移に関する遺伝子診断, 日本口腔科学会雑誌, 2001.05, Vol.50, No.3, p.145-154, 特に、2.リンパ節微小転移の遺伝子診断、等	1-5
Y	合田啓之 他, 口腔癌センチネルリンパ節生検へのOSNA法の応用と問題点, 第45回日本癌治療学会総会抄録号, 2007.09.20, Vol.42, No.2, p.436 OS036-5, 全文	1-5
Y	WO 2008/044504 A1 (国立大学法人新潟大学) 2008.04.17, 特に、0013, 0061, 実施例等 & US 2010/0068709 A & EP 2083087 A1 & WO 2008/044504 A1 & CN 101522912 A	1-5
Y	Robert L. FERRIS et al., Molecular Staging of Cervical Lymph Nodes in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Cancer Res, 2005, Vol.65, No.6, p.2147-2156, 特に、Abstract 等	1-5
Y	JP 2008-505644 A (ユニバーシティ オブ ピッツバーグ オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケーション) 2008.02.28, 特に、段落 0007, 実施例 3 等 & US 2006/0019290 A1 & EP 1774030 A & WO 2006/017151 A2	1-5