

(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  
2014年3月6日(06.03.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/034798 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/574 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/713 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
A61K 45/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/073194
- (22) 国際出願日: 2013年8月29日(29.08.2013)
- (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 2012-189224 2012年8月29日(29.08.2012) JP
- (71) 出願人: 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAP-  
PORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0608556  
北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番  
地85 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 田村 保明(TAMURA Yasuaki); 〒0608556  
北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道  
公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 久木  
田 和晴(KUKITA Kazuharu); 〒0608556 北海道札幌  
市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学  
法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 廣橋 良彦  
(HIROHASHI Yoshihiko); 〒0608556 北海道札幌市  
中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人  
札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 鳥越 俊彦(TORI-  
GOE Toshihiko); 〒0608556 北海道札幌市中央区南  
1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科  
大学内 Hokkaido (JP). 佐藤 昇志(SATO Noriyuki);  
〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁  
目 北海道公立大学法人札幌医科大学内  
Hokkaido (JP). 九富 五郎(KUTOMI Goro); 〒  
0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目  
北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido  
(JP). 梶原 敏充(KAJIWARA Toshimitsu); 〒  
0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目  
北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido  
(JP). 田中 努(TANAKA Tsutomu); 〒0608556 北海

道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立  
大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

- (74) 代理人: 勝沼 宏仁, 外(KATSUNUMA Hirohito et  
al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1丁目6番  
6号 日本生命丸の内ビル 協和特許法律事務  
所 Tokyo (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, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH,  
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.
- (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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ  
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関  
する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 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))



WO 2014/034798 A1

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF CANCER, DIAGNOSTIC DRUG AND DIAGNOSTIC KIT FOR CANCER, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF CANCER

(54) 発明の名称: 癌の検出方法、診断薬および診断キット並びに癌治療用医薬組成物

(57) Abstract: [Problem] The purpose of the present invention is to provide a method for detection of cancer in which samples are easily acquired and measured. [Solution] This method for detection of cancer comprises the detection of ERO1-L $\alpha$  proteins in a specimen obtained from a subject, wherein the presence of ERO1-L $\alpha$  proteins in the specimen indicates the presence of cancer in the subject.

(57) 要約: [課題] 本発明は、サンプルの入手や測定が容易な癌の検出方法の提供を目的とする。[解決手段] 本発明は、被検体から得られた試料中の ERO1-L $\alpha$  タンパク質を検出することを含んでなる、癌の検出方法であって、試料中の ERO1-L $\alpha$  タンパク質の存在が、被検体中の癌の存在を示す方法である。

## 明 細 書

発明の名称：

癌の検出方法、診断薬および診断キット並びに癌治療用医薬組成物

### 関連出願の参照

[0001] 本願は、先行する日本国特許出願である特願2012-189224（出願日：2012年8月29日）の優先権の利益を享受するものであり、その開示内容全体は引用することにより本明細書の一部とされる。

### 技術分野

[0002] 本発明は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を指標にした癌の検出方法に関する。本発明はまた、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出手段を含んでなる癌の診断薬および診断キットに関する。本発明はさらに、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤を含んでなる癌治療用医薬組成物に関する。

### 背景技術

[0003] 膵臓癌は、予後不良な癌として知られ、極めて治療が困難な癌の一つである。特徴的な症状や自覚症状が現れにくく、多くは進行が進んでから発見されることが多い。従って、早期に発見するための手法の開発が望まれる。また、膵臓癌は、外科的切除により治療が試みられるが手術は侵襲性が高い。従って、外科的手術の代替法の確立が望まれる。

[0004] また、大腸癌は、便潜血検査などにより早期発見が可能であり、早期発見により手術により根治ができる可能性の高い癌である。手術後に再発した場合も、早期発見と早期の切除により根治が期待できる場合がある。しかし、発見が遅れ、切除困難な転移が起こった場合には、抗癌剤治療または放射線治療などが試みられる。しかし、これらの治療は必ずしも有効でない場合があり、治療法の選択やその有効性の評価が極めて重要である。従って、最適な治療法を選択する際の指標の確立が望まれる。

[0005] ところで、Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1 Like  $\alpha$  (ERO1-L $\alpha$ ) タンパク質が、特に低酸素環境下で誘導されるタンパク質として見出

されている（非特許文献1）。ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、ジスルフィド結合の形成を触媒することが知られ、従ってタンパク質のフォールディングに不可欠な役割を果たしている（非特許文献2）。しかしながら、ERO1-L $\alpha$ タンパク質と、癌、特に膵臓癌との具体的関係は不明であった。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Dalit May et al., *Oncogene* (2005) 24: 1011-1020  
非特許文献2: Yanyan Chu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009) 389: 645-650

### 発明の概要

- [0007] 本発明は、サンプルの入手や測定が容易な癌の検出方法、診断薬および診断キットを提供することを目的とする。本発明はさらに、副作用が低減された癌の治療のための医薬組成物を提供することを目的とする。
- [0008] 本発明者らは、ERO1-L $\alpha$ タンパク質が癌細胞特異的に発現していること、特に膵臓癌および大腸癌で高発現していることを見出した。本発明者らはまた、ERO1-L $\alpha$ タンパク質が高発現している癌患者では、外科的手術後の予後が不良であることを見出した。本発明者らはさらに、ERO1-L $\alpha$ タンパク質が高発現している癌細胞において、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンすると癌の形成が抑制されることを見出した。本発明者らはさらにまた、細胞内タンパク質として知られるERO1-L $\alpha$ タンパク質が、意外にも細胞外に分泌されていることを見出した。本発明はこれらの知見に基づく発明である。
- [0009] すなわち、本発明では、以下の発明が提供される。
- (1) 被検体から得られた試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することを含んでなる、癌の検出方法であって、試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、被検体中の癌の存在を示す、方法。
  - (2) 癌が、膵臓癌または大腸癌である、上記(1)に記載の方法。
  - (3) 試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、ERO1-L $\alpha$ タンパ

ク質を標的とした治療に対して感受性を有する癌の存在を示す、上記（１）または（２）に記載の方法。

（４）試料中のE R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質の存在が、予後不良の癌の存在を示す、上記（１）～（３）のいずれかに記載の方法。

（５）試料が被検体から得られた細胞外液である、上記（１）～（４）のいずれかに記載の方法。

（６）E R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質の検出手段を含んでなる、癌の診断薬または診断キット。

（７）癌が、膵臓癌または大腸癌である、上記（５）に記載の診断薬または診断キット。

（８）癌が、E R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する癌である、上記（６）または（７）に記載の診断薬または診断キット。

（９）癌が、予後不良の癌である、上記（６）～（８）のいずれかに記載の診断薬または診断キット。

（１０）検出手段がE R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質に対する抗体である、上記（６）～（９）のいずれかに記載の診断薬または診断キット。

（１１）E R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤を含んでなる、癌治療用医薬組成物。

（１２）癌が、膵臓癌または大腸癌である、上記（１１）に記載の医薬組成物。

（１３）E R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤が、E R O 1 - L  $\alpha$ に対するs i R N Aまたはs h R N Aである、上記（１１）または（１２）に記載の医薬組成物。

[0010] 本発明の癌の検出方法は、血液や体液などの細胞外液をサンプルとして用いることができるので、サンプルの入手容易性および測定容易性の観点で有利である。本発明の癌の検出方法はまた、癌の治療方法の有効性に関する示唆が得られる点で有利である。本発明の医薬組成物の有効成分が標的とする

ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、癌細胞でのみ高発現を示すため、本発明の医薬組成物は、副作用低減の観点で有利である。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、正常なヒト組織から作製された市販のcDNAライブラリを用いてERO1-L $\alpha$ および $\beta$ の発現をPCRにより確認した結果を示す図である。

[図2]図2は、癌細胞株から抽出して得られたmRNAを用いてERO1-L $\alpha$ および $\beta$ の発現をRT-PCR法により確認した結果を示す図である。

[図3]図3は、癌患者の膵臓組織の切片におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を示す免疫組織化学染色像である。

[図4]図4は、各種組織切片におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を示す免疫組織化学染色像である。図4Aは、正常な膵臓組織、図4Bは、正常な小腸組織、図4Cは、正常な直腸組織および直腸癌の組織の組織切片におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を示す。

[図5]図5は、各組織におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を、ウェスタンブロット法により確認した結果を示す図である。

[図6]図6は、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現のshRNAによるノックダウンの結果を示すウェスタンブロットの結果である。

[図7]図7は、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現を低下させると腫瘍形成能が低下することを示す図である。図7Aは、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現が低下したPanc1細胞が、ヌードマウスの体内では癌を形成できなくなることを示す図である。図7Bは、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現を低下させたマウス乳癌細胞4T1細胞のBALB/c雌マウスに導入した際の腫瘍形成能の低下を示す図である（WT：ノックダウン処理を行わなかった4T1細胞、SCR：負の対照としてスクランブルshRNAを導入した4T1細胞、K.D.：ERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンした4T1細胞）。

[図8]図8は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質のノックダウンクローンにおける、MHCクラスI分子の発現量の低下を示す図である。

[図9]図9は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質のノックダウンクローンにおける、特異的細胞傷害性T細胞への応答の低下（図9A）および肺への転移数（図9B）を示す図である（WT：ノックダウン処理を行わなかった4T1細胞、SCR：負の対照としてスクランブルshRNAを導入した4T1細胞、KD：ERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンした4T1細胞）。

[図10]図10は、癌患者におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量の分布を示す図である。

[図11]図11は、癌患者におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量と癌の再発リスクとの関係を示す図である。

[図12]図12は、ERO1-L $\alpha$ の発現が高い癌患者と低い癌患者の生存曲線を示す図である。図12Aは、膵臓癌患者における生存曲線を示し、図12Bは、乳癌患者における無病生存率を示し、図12Cは、乳癌患者における全体生存率を示す図である。

[図13]図13は、mycタグERO1-L $\alpha$ タンパク質を強制発現させた大腸癌細胞SW480細胞が、培養上清にERO1-L $\alpha$ タンパク質を分泌することを示す図である。図13Aでは、培養上清をmyc抗体で免疫沈降して得られたERO1-L $\alpha$ タンパク質をウェスタンブロット法により検出し、図13Bでは、培養上清を抗ERO1-L $\alpha$ 抗体で免疫沈降して得られたERO1-L $\alpha$ タンパク質をウェスタンブロット法により検出している。図13Cは、各種細胞の培養上清中のERO1-L $\alpha$ タンパク質のELISAによる定量結果を示す図である。

[図14]図14は、癌患者の血清中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の濃度を示す図である。図14Bは、図14Aで示される進行性消化器癌患者を膵臓癌患者と大腸癌患者に分けたときの結果を示す図である。

[図15]図15は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現がVEGF-Aの分泌量と関連することを示す図である（Scr：負の対照としてスクランブルshRNAを導入した4T1細胞、KD：ERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンした4T1細胞）。

[図16]図16は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質が癌幹細胞に特に強く発現することを示す図である。

### 発明の具体的な説明

[0012] 後記実施例で示されるように、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は正常組織では発現せず癌特異的に発現する。従って、本発明の検出方法では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質が被検体の試料で検出された場合には、被検体に癌が存在する可能性が高いと判定することができる。すなわち、本発明の検出方法は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在を指標として、被検体に癌が存在するか否かを判定する方法である。

[0013] このように本発明の検出方法では被検体に癌が存在すると判定することができるが、被検体が癌患者であるか否かは医師等の判断により決定される。従って、本発明の検出方法は、癌の診断を補助する方法として用いることができる。すなわち、本発明によれば、被検体から得られた試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することを含んでなる、癌の診断のためのERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出方法であって、試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、被検体中の癌の存在を示す方法が提供される。本発明の検出方法による結果に基づいて診断を行う際には、医師等は、例えば、癌マーカーを測定する方法および生検による方法などの当業者に周知の検査方法および／または診断方法を用いることができる。さらに、本発明の検出方法では癌細胞を検出することができる。すなわち、本発明によれば、被検体から得られた試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することを含んでなる、癌細胞の検出方法であって、試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、被検体中の癌細胞の存在を示す、癌細胞の検出方法が提供される。

[0014] 後記実施例で示されるように、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は細胞内にて発現するタンパク質であり癌組織内にて検出されるが、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌からはERO1-L $\alpha$ タンパク質が細胞外に分泌される。従って、本発明の検出方法では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を被検体から得られた細胞外液で検出することができる。すなわち、本発明では、検出対象

となる試料は、癌組織または癌であると疑われる組織としてもよく、また、被検体から得られた細胞外液としてもよい。

[0015] 本明細書では、細胞外液とは、血液、リンパ液および組織液などの体液を意味し、体腔内にたまった体腔液も細胞外液に含まれる。本発明では、血液の代わりに、血清または血漿などの血液の液体成分を用いてもよい。従って、「血液」には血清や血漿などの血液の液体成分も含まれる。

[0016] 本発明の検出方法の指標となるERO1-L $\alpha$ タンパク質は、細胞内タンパク質であり、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)を酸化する。PDIは酸化により活性化し、標的タンパク質にジスルフィド結合を形成させ、これにより、タンパク質のフォールディングおよび品質管理に関与するとされている(非特許文献2)。ERO1-L $\alpha$ タンパク質のアミノ酸配列およびERO1-L $\alpha$ 遺伝子の塩基配列は周知であり、例えば、ヒトERO1-L $\alpha$ (hERO1-L $\alpha$ )の塩基配列およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1および2に示される通りである。

[0017] 後記実施例に示される通り、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、乳癌、大腸癌(直腸癌および結腸癌)および膵臓癌で高発現し、大腸癌(直腸癌および結腸癌)および膵臓癌で特に高い発現を示す。従って、本発明では、検出、診断および治療の対象となる癌は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌、より好ましくは、乳癌、膵臓癌および大腸癌などのERO1-L $\alpha$ タンパク質を高発現する癌、さらに好ましくは、膵臓癌および大腸癌である。そして、大腸癌(直腸癌および結腸癌)および膵臓癌などのERO1-L $\alpha$ タンパク質を高発現する癌からはERO1-L $\alpha$ タンパク質が分泌される。従って、本発明の検出方法の検出対象となる癌は、特に限定されないが、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌、より好ましくはERO1-L $\alpha$ タンパク質を高発現する癌、例えば、乳癌、大腸癌および膵臓癌などの固形癌、さらに好ましくは膵臓癌である。

[0018] ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、細胞外に分泌されて細胞外液中に混入するが、体内を循環中に細胞外液中で代謝または分解されることがある。従って



、本発明の検出方法では、細胞外液中でERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出する際には、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の代謝物および／または分解物（例えば、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の断片）を細胞から分泌されたERO1-L $\alpha$ タンパク質として検出してもよい。

[0019] 本発明の検出方法の対象となる被検体は、哺乳類動物、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。被検体は、必ずしも癌が疑われる被検体である必要はないが、例えば、癌が疑われる被検体（例えば、ヒト）とすることが好ましく、乳癌、膵臓癌または大腸癌であることが疑われる被検体（例えば、ヒト）とすることがより好ましく、膵臓癌であることが疑われる被検体（例えば、ヒト）とすることがさらに好ましい。本発明の検出方法では、予後不良な癌の存在が示され、また、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現および／または機能を阻害する治療法に対して感受性を有する癌の存在が示されるので、被検体は癌と診断された被検体（例えば、癌患者）であってもよい。癌であると疑われる被検体または癌と診断された被検体を対象とする場合には、測定する試料は、細胞外液としてもよいし、癌であると疑われる組織または癌組織としてもよい。

[0020] 後記実施例に示されるように、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌を有する患者は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現しない癌を有する患者に比べて、治療後の予後が不良であった。具体的には、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌を有すると、外科的治療後の患者における再発までの期間が短くなる、または、再発率が高まるなど、癌の再発のリスクが高まる。従って、本発明の検出方法では、被検体の試料中でERO1-L $\alpha$ タンパク質が検出された場合には、予後不良の癌が存在することが示される。例えば、本発明の検出方法を癌と診断された被検体を実施する場合に、被検体の試料中でERO1-L $\alpha$ タンパク質が検出されたときは、癌が予後不良の癌であることが示される。また、癌においてERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンしたときには、癌の転移性が低下した。従って、本発明によれば、被検体の試料中でERO1-L $\alpha$ タンパク質が検出されたときは、癌が転移性であるこ

とが示され得る。

[0021] また、後記実施例に示されるように、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量が高い癌を有する患者は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量が低い癌を有する患者に比べて、治療後の予後が不良であった。具体的には、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量が高い癌を有すると、外科的治療後の患者における再発までの期間が短くなる、または、再発率が高まるなど、癌の再発のリスクが高まる。従って、本発明の検出方法では、被検体の試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量が、健常者または予後が良好であった患者の試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量よりも増加している場合には、予後不良の癌が存在することが示される。

[0022] また、後記実施例に示されるように、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌において、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を抑制すると、癌の発達が阻害された。本発明の検出方法によれば、被検体の試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌の存在を示す。そして、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌は、上述の通り、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制などのERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療法に感受性を有する。従って、本発明の検出方法では、被検体の試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質が検出された場合には、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する癌が存在することが示される。本発明の検出方法を癌と診断された被検体を実施する場合に、被検体の試料中でERO1-L $\alpha$ タンパク質が検出されたときは、癌が、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する癌であることが示される。

[0023] なお、本明細書では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療は、特に限定されないが、例えば、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を抑制すること、または、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の活性を阻害することなど、癌細胞内でERO1-L $\alpha$ タンパク質の働きを抑えることにより行う治療を意味する。

- [0024] このように、本発明によれば、被検体の試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することにより、被検体が癌を有しているか否か、癌治療の予後が良好であるか否か、癌がERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有するか否かを判定することができる。
- [0025] 被検体の試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出できる限り限定されるものではないが、例えば、簡便性、感度および特異性の観点から、ERO1-L $\alpha$ タンパク質に対する抗体（抗ERO1-L $\alpha$ タンパク質抗体）を用いて行うことが好ましい。抗体を用いたタンパク質の検出法としては、特に限定されないが、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）などの当業者に周知の方法が挙げられ、ELISAは診断薬にも利用されている。また、抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、抗原特異性の高さの観点からはモノクローナル抗体であることが好ましい。
- [0026] 本発明によれば、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出手段を含んでなる、癌の診断薬および診断キットが提供される。本発明の診断薬および診断キットは本発明の検出方法に関する記載に従って実施することができる。すなわち、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出手段はERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出できる適切な材料（ERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出剤）である限り限定されるものではないが、上記のように抗ERO1-L $\alpha$ タンパク質抗体を用いることができる。
- [0027] 前述のように、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は細胞外液中に分泌される。従って、本発明の診断キットは、細胞外液（例えば、血液）検査用の診断キットとしてもよく、その場合、診断薬の他に細胞外液（例えば、血液）採取のための器具および／または容器を含んでいてもよい。本発明の細胞外液検査用の診断キットでERO1-L $\alpha$ タンパク質が検出された場合には、癌、特に膵臓癌または大腸癌を疑うことができ、癌が予後不良であると疑うことができ、および／または、癌がERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する可能性が高いと判断することができる。

- [0028] 癌が既に同定されている場合には、本発明の診断薬または診断キットは、診断の正確性を高める観点で、患者から採取した癌組織を診断するための診断薬または診断キットとすることが好ましい。このとき、正常組織と比較して癌組織でのERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現がより高いことが示された場合には、癌が予後不良であると疑うことができ、および／または、癌がERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する可能性が高いと判断することができる。
- [0029] 従って、本発明の診断薬または診断キットは、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現および／または機能を阻害する薬剤や治療方法の有効性を予測するための、コンパニオン診断薬または診断キットとして用いることもできる。
- [0030] 本発明の診断薬および診断キットの診断対象となる癌は、特に限定されないが、癌、好ましくは、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌、より好ましくは、膵臓癌および大腸癌などのERO1-L $\alpha$ タンパク質を高発現する固形癌、さらに好ましくは膵臓癌である。
- [0031] 本発明の検出方法は、本発明の診断薬または診断キットを用いて行ってもよい。すなわち、本発明によれば、本発明の診断薬または診断キットを用いて、被検体から得られた試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することを含んでなる、本発明の検出方法が提供される。
- [0032] 後記実施例によれば、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌においてERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を抑制した場合には、癌はほとんど増殖しなくなった。従って、本発明によれば、癌、好ましくは、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌、より好ましくは、乳癌、膵臓癌および大腸癌などのERO1-L $\alpha$ タンパク質を高発現する癌の治療に用いるための、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤を含んでなる医薬組成物が提供される。後記実施例によればまた、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌においてERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を抑制した場合には、癌の転移が抑制された。従って、本発明によれば、癌の転移（例えば、癌の肺への転移）を抑制するための、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤を含んでなる医薬組成物が提

供される。後記実施例によればさらに、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は癌幹細胞で高発現を示した。従って、本発明の医薬組成物は、癌幹細胞に対するものであり得る。

[0033] ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤としては、特に限定されないが、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子を標的としたshRNAおよびsiRNAなどが挙げられる。

[0034] siRNAとは、RNA干渉(RNAi)を誘導することができる二本鎖RNA(核酸)、特に限定されないが、20~30bp、好ましくは、21~23bp、25bp、27bpからなる二本鎖RNAであって、標的遺伝子の配列と相同な配列を有する二本鎖RNAである。このような二本鎖RNAは、当業者であれば、周知の方法を用いて、ERO1-L $\alpha$ の遺伝子配列を元に設計し製造することができる。本発明では、特に限定されないが、例えば、siRNAとして、配列番号13および14の塩基配列を有する核酸をアニールして得られるsiRNAを用いることができる。また、本発明では、配列番号13および14の塩基配列として、3'末端に2つのTを有する核酸を用いたが、この2つのTは、そのうちの一つまたは両方をUに代えて用いてもよい。

[0035] shRNAとは、生体内でDicerにより分解を受けてsiRNAを生成することができるRNAである。shRNAは、二本鎖のステムとヘアピンループを含むステムループ構造を有する。このヘアピンループ部分の配列は特に限定されないが、5~12塩基の配列とすることができる(Kawasaki H. et. al., Nucleic Acid Res. (2003) 31: 700-707、Paddison P. J. et. al., Genes and Dev. (2002) 16: 948-958、Lee N. S., Nat. Biotech. (2002) 20: 500-505およびSui G., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2002) 99: 5515-5520)。このようなshRNAは、当業者に周知の方法によりERO1-L $\alpha$ の遺伝子配列を元に設計し製造することができる。本発明では、特に限定されないが、例えば、shRNAとして、実施例で用いた配列番号11または12のshRNAを用いることができる。

[0036] 本発明の医薬組成物は、賦形剤、補助剤および／または添加剤を含んでいてもよい。本発明の医薬組成物はまた、1以上の他の抗癌剤をさらに含んでいてもよい。

[0037] 本発明によればまた、治療上有効量のERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現抑制剤を、それを必要とする哺乳類（例えば、ヒト）、例えば、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌を有する哺乳類（例えば、ヒト）に投与することを含んでなる、癌の治療法が提供される。

[0038] 本発明の癌の治療法は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌を有する哺乳類（例えば、ヒト）に対してERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現または機能を阻害することにより行われ得る。従って、本発明の癌の治療法は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する哺乳類（例えば、ヒト）を、本発明の検出方法に基づいて同定した後に行うことが好ましい。従って、本発明の癌の治療法は、哺乳類（例えば、ヒト）の試料中にERO1-L $\alpha$ タンパク質が存在するか否かを決定すること、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在を指標として癌を診断すること、および治療上の有効量のERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現抑制剤を該哺乳類に投与することを含んでなる、癌の治療法とすることができる。

## 実施例

### [0039] 実施例1：ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現の組織特異性

本実施例では、様々なヒト組織におけるERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現を確認した。

[0040] ヒトの各組織のcDNAとしては、BDバイオサイエンシズ社から購入したmultiple tissue cDNA panelsのcDNAを用い、PCR法により正常組織におけるERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現を確認した。

[0041] PCRは、ERO1-L $\alpha$ の検出用プライマーとしては、5'-GCCCGTTTTATGCTTGATGT-3'（配列番号：5）および5'-AACTGGGTATGGTGGCAGAC-3'（配列番号：6）を用い、ERO1-L $\beta$ の検出用プライマーとしては、5'-ATCCATGTTT

GCAGGTGACA-3' (配列番号: 7) および 5' -ATTTTCCTGTCGGGTGAGTTG-3' (配列番号: 8) を用い、インターナルコントロールとしてのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH) の検出用プライマーとしては、5' -GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' (配列番号: 9) および 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (配列番号: 10) を用いた。

[0042] PCR反応では、1  $\mu$ L の cDNA、各 50 pmol のプライマーおよび KOD Plus DNAポリメラーゼ (TOYOBO社製) を含むPCR反応液 50  $\mu$ L を用い、92°C で2分加熱した後に、92°C 1分、62°C 1分および72°C 1分のサイクルを30サイクル行った。

[0043] PCR産物は、1%アガロースゲル電気泳動の後にエチジウムブロマイド染色を行い、UV光により検出した。また、PCR産物の塩基配列は、ABI Genetic analyzer PRISM 310および AmpliCycle sequencing kit (パーキンエルマー社製) を用いて決定した。

[0044] その結果、ERO1-L $\beta$ は、リンパ球、肝臓、脾臓、膵臓および精巣などの正常組織にて発現が認められたが、ERO1-L $\alpha$ は、正常組織での発現はほとんど認められなかった (図1)。

[0045] 次に、ERO1-L $\alpha$ の癌細胞株における発現を確認した。

[0046] ヒト膵臓癌細胞株である、Panc1、HPAF2、HPACおよびBxPC3は、ATCC社から購入した。その他、ヒト白血病細胞株T2A24 (ATCC社から購入)、ヒト乳癌細胞株MCF7 (ATCC社から購入)、ヒト肺腺癌細胞株LHK2 (札幌医科大学で樹立された肺癌細胞株)、ヒト結腸癌細胞株HCT15 (ATCC社から購入)、ヒト大腸癌細胞株SW480 (ATCC社から購入)、ヒト腎臓癌細胞株Caki1 (ATCC社から購入)、ヒト乳癌細胞株HMC1 (ATCC社から購入) およびヒト腎臓癌細胞株SMKTR (札幌医科大学で樹立された腎臓癌細胞株) を用いて、各種癌細胞株でのERO1-L $\alpha$ の発現を確認した。

[0047] これらの細胞からISOGEN試薬（ニッポンジーン社製）を用いて全RNAを抽出し、Superscript IIIおよびオリゴ（dT）プライマー（Life Technologies社製）を用いて製造者マニュアルに従ってcDNAを合成した。PCR反応は、正常組織における条件と同一の条件で行った。

[0048] その結果、ERO1-L $\alpha$ は、HCT15細胞、SW480細胞、Caki1細胞、HPAF2細胞、HPAC細胞、およびBxPC3細胞において比較的高い発現が認められた（図2）。

[0049] このように、ERO1-L $\alpha$ は、正常組織では発現がほとんど認められなかったが、癌細胞株では発現が認められた。

[0050] 実施例2：癌組織におけるERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現

本実施例では、癌組織におけるERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現を組織切片の免疫染色により確認した。

[0051] ヒトの癌患者の各種組織におけるERO1-L $\alpha$ の発現を調べた。組織としては、乳癌組織検体、胃癌組織検体、結腸直腸癌組織および膵臓癌組織を対象とした。組織は、10%ホルマリンにより固定し、パラフィン包埋してから、ミクロトームを用いて20 $\mu$ m厚の組織切片とした。その後、組織切片に対して、脱パラフィン処理および121 $^{\circ}$ C10分間のオートクレーブ処理を行った。さらに、抗ERO1-L $\alpha$ 抗体（Abnova社製、製品番号：H00030001-M01）、二次抗体としてペルオキシダーゼコンジュゲート羊抗マウス抗体（DAKO社製、製品番号：K4000）およびDAB（DAKO社製、製品番号K3468）を用いて常法に従って免疫組織化学染色を行った。その後、光学顕微鏡を用いて染色した各種組織切片を観察した。

[0052] 観察の際、各組織のERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量は4段階で評価した。4段階評価は以下の指標に基づいて行った。すなわち、図3AのようにERO1-L $\alpha$ がほとんど発現しないものは（-）とし、図3Bのようにわずかに発現が認められるものを（+）とし、図3Cのように部分的に高い発



現が認められるものを（++）とし、図3Dのように全体的に高い発現が認められるものを（+++）とした。

[0053] 各癌組織でのERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を上記指標に基づいて評価し、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現レベルと癌の種類との関係を調べたところ、結果は表1に示される通りであった。

[0054] [表1]

ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現レベル	乳癌 (n=48)	胃癌 (n=48)	直腸結腸癌 (n=24)	膵臓癌 (n=51)
(-)	56.3%	68.4%	20.8%	7.8%
(+)	18.7%	15.8%	37.5%	5.9%
(++)	16.7%	15.8%	37.5%	21.6%
(+++)	8.3%	0%	4.2%	64.7%

[0055] 表1に示されるように、ERO1-L $\alpha$ は、直腸結腸癌および膵臓癌において高い発現を示し、特に、膵臓癌では検体のうち約86%が（++）または（+++）の高発現を示した。一方で、乳癌や胃癌では（-）または（+）の発現レベルに留まるものが大半を占めた。このことから、ERO1-L $\alpha$ の発現は、膵臓癌および直腸結腸癌（大腸癌）に特徴的であることが明らかとなった。ERO1-L $\alpha$ は、乳癌や胃癌の一部でも高発現を認めた（表1）。

[0056] 実施例3：正常な膵臓組織におけるERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現

本実施例では、正常な膵臓組織におけるERO1-L $\alpha$ の発現を免疫組織化学染色法とウェスタンブロット法により確認した。

[0057] 正常なヒト膵臓、小腸および大腸、並びに大腸癌組織の正常な部分を対象とし、これらの組織切片におけるERO1-L $\alpha$ の発現解析は、実施例2に記載の免疫組織化学染色法により確認した。

[0058] その結果、正常なヒト膵臓および小腸では、ERO1-L $\alpha$ の発現は認められなかった（図4AおよびB）。また、正常な大腸でもERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現は認められなかったが、大腸癌の組織では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の高い発現が認められた（図4C）。

[0059] 次に、ヒト臍臓、胃および末梢血単核球（PBMC）中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現をウェスタンブロット法により確認した。正の対照としては、mycタグを付したERO1-L $\alpha$ （配列番号：3および4）を発現する293T細胞を用いた。この細胞株は、80%コンフルエントの293T細胞（ATCC社から購入）にヒトERO1-L $\alpha$ 遺伝子の5'末端にmyc遺伝子をインフレームで連結した遺伝子を挿入した発現ベクター（ピューロマイシン耐性遺伝子を発現する）を、Lipofectamine 2000 Reagent（インビトロジェン社製）を用いて製造者マニュアルに従ってトランスフェクションし、48時間後に2 $\mu$ g/mLピューロマイシン（シグマアルドリッチ社製）を添加して安定クローンとして樹立した株である。なお、KG-1細胞（ATCC社から購入）は、ヒト急性骨髄性白血病細胞として知られる細胞株であり、KG-1/H-2K<sup>b</sup>細胞は、本発明者らがKG-1細胞にマウスのMHCクラスI分子であるH-2K<sup>b</sup>遺伝子を導入して樹立した細胞株である。

[0060] 各組織を氷冷したPBSで洗浄し、次いで、細胞を溶解させるために、細胞溶解バッファー（50mM Tris-HCl（pH8.0）、150mM NaCl、1% NP-40、およびComplete Protease Inhibitor Cocktail（ロッシュ社製））中で、氷上でインキュベートした。その後、15,000rpm、4°Cの条件で溶解したサンプルは20分間遠心分離を行った。得られた全細胞抽出液は、常法に従ってSDSサンプルバッファー中で5分間煮沸し、10%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜（Immobilon-P社製）に転写した。タンパク質を転写したPVDF膜は、ブロッキングバッファー（5%脱脂粉乳を含むPBS）で室温で1時間ブロッキングし、その後、ウサギ抗ERO1-L $\alpha$ モノクローナル抗体（Abnova社製）またはマウス抗 $\beta$ -アクチンモノクローナル抗体AC-15（シグマアルドリッチ社製）を用いて60分間インキュベートした。その後、PVDF膜は、洗浄バッファー（0.1% Twee

n-20を含むPBS)で3回洗浄し、ペルオキシダーゼラベルしたヤギ抗マウスIgG抗体(KPL社製)を用いて2時間インキュベートした。最後に、シグナルをenhanced chemiluminescence (ECL) detectionシステム(Amersham Life Science社製)を用いて製造者マニュアルに従って検出した。

[0061] すると、膵臓、胃およびPBMCのいずれにおいても、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現は認められなかった(図5)。一方、正の対照として用いたmycタグを有するERO1-L $\alpha$ を発現する293T細胞では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の高い発現が認められた(図5)。

[0062] このように、組織切片における免疫組織化学染色法によっても、組織から抽出した全タンパク質を用いたウェスタンブロット法によっても、正常な組織ではERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を確認することはできなかった。

[0063] 実施例1および2の結果を総合すると、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、ヒト癌患者の組織(特に膵臓および直腸結腸)において高い発現を示したが、正常な組織(特に膵臓、胃、小腸を含む多くの組織)においてはほとんど発現していないことが明らかとなった。

[0064] 実施例4A: ERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンと腫瘍形成の関係

実施例1~3により、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、癌組織(特に膵臓や直腸結腸)でのみ高い発現を示し、癌でない正常組織での発現は認められなかった。本実施例では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質が癌治療の標的となり得るかを調べるため、癌モデルマウスを用いてERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウン実験を行った。

[0065] まず、配列番号11または12の塩基配列を有するERO1-L $\alpha$ 遺伝子ノックダウン用のshRNAを転写するDNAをRNAi-Ready pSIREN-RetroQベクター(インビトロジェン社製)のBamHIとEcoRIの制限酵素部位に挿入した。具体的には、配列番号11または12の塩基配列を有する一本鎖DNAの5'末端にgatccからなるBamHIの制限酵素切断配列を連結し、3'末端にttttttctagagか

らなるターミネータおよびEcoRIの制限酵素切断配列を連結して得られた一本鎖DNAと、これに相補的な配列を有する一本鎖DNAとを100°Cで20分加熱し、その後、室温に戻しながらアニールして得たDNAをRNAi-Ready pSIREN-RetroQベクター（インビトロジェン社製）のBamHIとEcoRIの制限酵素部位に挿入した。これらのshRNA発現ベクターは、80%コンフルエントにしたPanc1細胞にLipofectamine 2000 Reagent（インビトロジェン社製）を用いて製造者マニュアルに従ってトランスフェクションし、48時間後に2μg/mLピューロマイシン（シグマアルドリッチ社製）を添加して、安定クローンを樹立した。得られたERO1-L $\alpha$ ノックダウンクローン3種（sh1-3、sh3-4およびsh3-6）のERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現をウェスタンブロット法により確認した。sh1-3は、配列番号11の塩基配列を組み込んだshRNA発現ベクターを用いてERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンしたクローンであり、sh3-4およびsh3-6は、配列番号12の塩基配列を組み込んだshRNA発現ベクターを用いてERO1-L $\alpha$ 遺伝子をノックダウンしたクローンであった。なお、ウェスタンブロット法は、実施例3に記載の方法に従って行った。

[0066] その結果、いずれのクローンにおいても、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が大きく抑制されていることが分かった（図6）。

[0067] 得られたERO1-L $\alpha$ ノックダウンクローン3種のうち、sh1-3またはsh3-4を導入した2種、panc1細胞、スクランブルshRNAを発現するpanc1細胞をそれぞれ $1 \times 10^6$ 細胞ヌードマウスの腹腔内に注射してその後の腫瘍形成を調べた。実験は、1群あたり5匹のマウスを用いて行った。

[0068] その結果、panc1細胞またはコントロールshRNAのクローンを注射したマウスは、腫瘍を形成したが、ERO1-L $\alpha$ ノックダウンクローンであるsh1-3およびsh3-4は、腫瘍形成能がほとんど認められなかった（図7A）。

[0069] また、配列番号13および配列番号14の塩基配列を有するRNAをアニールして得られるsiRNAを用いて、大腸癌細胞株SW480でERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現をノックダウンする実験を行った。その結果、このsiRNAを用いた場合でも、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現のノックダウンが確認できた（データ省略）。なお、このsiRNAの3'末端のオーバーハングは、TTをUUに変えてもノックダウンの効果に差は無いことが知られている。また、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現をノックダウンした大腸癌細胞株SW480細胞において、細胞表面に提示されるMHCクラスI分子の量を、W6/32-FITC抗体を用いたフローサイトメーターを用いて調べた。すると、MHCクラスI分子の発現量は40%低下した（図8）。さらに、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現のノックダウンとT細胞応答との関係を調べるために、siRNAを導入した上記SW480細胞と細胞傷害性T細胞（cep55 specific CTL）とを24時間共培養し、細胞傷害性T細胞からのインターフェロン $\gamma$ （INF- $\gamma$ ）の産生量をELISA法を用いて測定した。すると、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現をノックダウンした細胞では特異的細胞傷害性T細胞の応答が低下した（図9A）。このように、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現をノックダウンした細胞で、MHCクラスI分子の細胞表面での発現が低下したことから、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が低下すると癌免疫機能が低下する可能性が示唆されたが、この結果に反して、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現のノックダウンクローン（sh1-1、sh3-4およびsh3-6）では腫瘍形成能が抑えられたことは驚きであった。

[0070] これらの結果から、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現は、腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

[0071] 実施例4B：ERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンと腫瘍形成の関係

本実施例では、BALB/c雌マウスを用い、4T1マウス乳癌細胞を乳腺に移植する以外は実施例4Aと同じ条件で、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンの効果を確認した。

[0072] 具体的には、5～6週齢のBALB/c雌マウスをJackson Laboratory社

から購入し、特定病原体フリーの施設において飼育して、6週齢において実験に使用した。1群あたり5匹のマウスを使用し、マウスには、 $1 \times 10^5$ 個の4T1細胞またはERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウン細胞を右乳腺に注入した。4T1細胞はATCC社から購入し、10%FCSを添加したRPMI-1640培地で培養した。また、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンクローンは、4T1細胞にERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウン用のshRNAレトロウイルスベクター (OriGene社製、TR502816) をLipo-fectamine RNAi/Max (Life technologies社製) を用いて導入して樹立した。細胞は、低酸素条件下 (1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>および94%N<sub>2</sub>) で少なくとも3日間培養した。

[0073] その後、腫瘍の大きさを測定し、42日目の平均腫瘍直径をMann-WhitneyのU検定により統計的に分析した。また、42日目には、肺への転移数も測定した。

[0074] その結果、未処理の4T1細胞 (WT) およびコントロールshRNAを導入した4T1細胞 (SCR) と比べて、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンクローンを導入したマウス (K. D.) では、腫瘍細胞の増殖が有意に低減した (図7B)。また、肺への転移数を測定した結果、未処理の4T1細胞 (WT) およびコントロールshRNAを導入した4T1細胞 (SCR) と比べて、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンクローンを導入したマウス (K. D.) では、腫瘍細胞の肺への転移が顕著に低減した (図9B)。この結果から、腫瘍の治療にERO1-L $\alpha$ 遺伝子の発現抑制剤を用いることができること、および、腫瘍患者の転移の予測にERO1-L $\alpha$ 遺伝子を用いることができることが示された。

[0075] このように、実施例4Bの結果からも、実施例4A同様に、腫瘍の増殖がERO1-L $\alpha$ 遺伝子のノックダウンにより低減できることが確認できた。また、実施例4Bの結果からは、ERO1-L $\alpha$ 遺伝子が腫瘍の転移に関与していることも明らかとなった。

[0076] 実施例5：大腸癌患者における予後とERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現

実施例4で、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが示された。そこで、本実施例では、実際の直腸結腸癌患者におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現と予後の関連について調べた。

[0077] 2005年～2008年の間に札幌医科大学で手術を行った85人の直腸結腸癌患者におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を免疫組織化学染色法により確認した。まず、本実施例では、評価対象の組織は、各癌患者から得た直腸結腸癌の組織とした。組織は、10%ホルマリンにより固定し、パラフィン包埋してから、ミクロトームを用いて20 $\mu$ m厚の組織切片を作製した。脱パラフィン処理を行い、121 $^{\circ}$ Cで10分間オートクレーブ処理を行ってから、抗ERO1-L $\alpha$ 抗体(Abnova社製、製品番号:H00030001-M01)および二次抗体としてペルオキシダーゼコンジュゲート羊抗マウス抗体(DAKO社製、製品番号:K4000)およびDAB(DAKO社製、製品番号K3468)を用いて常法に従って免疫組織化学染色を行った。その後、光学顕微鏡を用いて染色した各種組織切片を観察した。

[0078] 観察の際、各組織のERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量は4段階で評価した。すなわち、ERO1-L $\alpha$ がほとんど発現しないものはスコア0、わずかに発現が認められるものはスコア1、部分的に高い発現が認められるものはスコア2、全体的に高い発現が認められるものはスコア3と評価した(図10)。

[0079] 次に、患者が直腸結腸癌を再発するまでの期間を各患者に調べ、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現と関連付けた。すると、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を過剰発現する患者群(スコア3)では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が低い患者群(スコア0～2)と比較して、再発までの期間が有意に短かった(図11)。具体的には、表2に示されるように、再発までの期間は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を過剰発現する患者群(スコア3)では平均2.35年であり、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が低い患者群(スコア0～2)の期間の約8割であった。また、無再発生存率(release free

e survival) は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を過剰発現する患者群（スコア3）では、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が低い患者群（スコア0～2）に対して67.86%に低下していた。

[0080] この結果から、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量と大腸癌の再発率および再発までの期間は関連し、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現量を調べることにより大腸癌の再発率および再発までの期間を評価することが可能であることが示された。

[0081] [表2]

表2：スコア間での無再発生存率と再発までの期間の比較

	3年無再発生存率 (%)	再発までの期間 (年)
スコア0および1	90.00	2.81
スコア2	92.59	2.87
スコア3	67.86	2.35

[0082] さらに、再発しなかった例と再発した例とで各スコアの占める割合を調べると、再発しなかった71例中スコア3の症例は19例（71例中26.8%）であったのに対して、再発した14例中ではスコア3の症例は9例（14例中64.3%）であった。このことから、ERO1-L $\alpha$ の発現量が高いほど、再発リスクが高まることが示唆された（表3および4）。

[0083] [表3]

表3：再発しなかった例における症例数の分布

スコア	症例数
スコア0	10
スコア1	17
スコア2	25
スコア3	19
合計	71



[表4]

表4：再発した例における症例数の分布

スコア	症例数
スコア 0	0
スコア 1	3
スコア 2	2
スコア 3	9
合計	14

[0084] さらに、実施例2の表1に示される膵臓癌患者51名に関して、カプランマイヤー曲線を作成した。すると、表1で(−)または(+)に分類された低発現の群(7名)では、(++)または(+++)に分類された高発現の群(44名)に比べ、生存日数が長くなる傾向が見られた(図12A)。生存中央値を比較すると、低発現群では1517日であり、高発現群は527日であり、高発現群と低発現群の生存中央値の差は統計的に有意であった( $P=0.0019$ )。

[0085] 次に、同様の解析を浸潤性乳癌患者71名に対して行った。浸潤性乳癌患者71名におけるERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を、85人の直腸結腸癌患者に行った方法で、免疫組織化学染色法により確認した。その結果、71名の浸潤性乳癌患者のうち、38例(53.5%)ではERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現は見られず、残りの33例(46.5%)ではERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が観察された(データ省略)。ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現は、エストロゲン受容体(ER)の発現と逆相関し( $P=0.021$ )、核異型度とは正の相関を示した( $P=0.001$ )。また、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現は、患者の年齢、組織診断、腫瘍サイズまたはリンパ節転移とは相関は見られなかった。

[0086] 次に、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現が見られなかった乳癌患者(ER

O1-L $\alpha$  (-) ) と ERO1-L $\alpha$  タンパク質が見られた乳癌患者 ( ERO1-L $\alpha$  (+) ) とで無病生存率および全体的生存率を比較した。その結果、 ERO1-L $\alpha$  タンパク質が見られた乳癌患者 ( ERO1-L $\alpha$  (+) ) では、 ERO1-L $\alpha$  タンパク質の発現が見られなかった乳癌患者 ( ERO1-L $\alpha$  (-) ) と比較して、有意に短い無病生存 ( P = 0.01 ) および全体生存 ( P = 0.04 ) を示した ( 図 12 B および C ) 。このように、乳癌患者においても、直腸結腸癌患者や膵臓癌患者と同様に ERO1-L $\alpha$  タンパク質の発現と予後に関係することが示された。

[0087] このことから、 ERO1-L $\alpha$  タンパク質が発現する癌を有する患者では、予後が不良であることが示唆された。

[0088] 実施例 6 A : ERO1-L $\alpha$  タンパク質の細胞外への分泌

さらに、本発明者らは、 ERO1-L $\alpha$  タンパク質は、細胞外に分泌されることを発見した。

[0089] まず、 myc タグを付した ERO1-L $\alpha$  遺伝子を導入した p I R E S - p u r o 発現ベクターを調製した。得られた発現ベクターは、 L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 R e a g e n t (インビトロジェン社製) を用いて製造者マニュアルに従って大腸癌細胞株 SW480 細胞にトランスフェクションし、48時間後に、細胞の培養上清を回収した。次に、得られた培養上清中の ERO1-L $\alpha$  タンパク質を抗 myc 抗体を用いて免疫沈降し、その後、ウェスタンブロット法により ERO1-L $\alpha$  遺伝子の存在を確認した。正の対照として、 ERO1-L $\alpha$  遺伝子を導入した SW480 細胞および ERO1-L $\alpha$  遺伝子を発現する 293T を用い、これらの細胞溶解物は実施例 3 に記載の方法を用いて得た。

[0090] その結果、抗 myc 抗体を用いて免疫沈降した細胞の培養上清中に、 ERO1-L $\alpha$  タンパク質の 62 k D a のバンドを認めた ( 図 13 A ) 。さらに追試を行った。具体的には、 SW480 細胞と ERO1-L $\alpha$  を過剰発現させた SW480 細胞の培養上清を取得し、抗 ERO1-L $\alpha$  抗体により免疫沈降した後に、抗 ERO1-L $\alpha$  抗体を用いたウェスタンブロットにより培

養上清へのERO1-L $\alpha$ の分泌の有無を確認した。すると、ERO1-L $\alpha$ を過剰発現させたSW480細胞は、細胞の培養上清中にERO1-L $\alpha$ タンパク質が分泌することが確かめられた(図13B)。panc1細胞でも同様であった(図13C)。

[0091] このことから、ERO1-L $\alpha$ タンパク質は、細胞外に分泌されることが明らかとなった。

[0092] 生体内では細胞外に分泌されたタンパク質は組織液と一緒にリンパ液に流入し、最終的には血液に流入する。従って、被検体から得られた細胞外液中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在を調べることにより、細胞外に分泌されたERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することができる。

[0093] 正常組織ではERO1-L $\alpha$ タンパク質はほとんど産生されず、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を細胞外に分泌するのは、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する組織、すなわち、癌(例えば、膵臓癌または大腸癌)である。従って、被検体から得られた細胞外液中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在を調べることにより、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌の存在を推定できる。

[0094] ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌は、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現を抑制することで、増殖が困難となる。癌患者の細胞外液中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在を確認することにより、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を発現する癌の存在、および、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の阻害剤などが抗癌剤としての有効性を評価し得る。この結果は、血清中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在を調べることにより、ERO1-L $\alpha$ タンパク質の阻害剤などの抗癌剤としての有効性が評価可能であることを示すものである。

[0095] 実施例6B：患者血清中でのERO1-L $\alpha$ の検出

実施例6Aでは、ERO1-L $\alpha$ が細胞外に分泌されることが示された。本実施例では癌患者の血清を用いてERO1-L $\alpha$ を検出した。

[0096] まず、進行消化器癌患者16人および健常者5人から得られた血清中のERO1-L $\alpha$ をELISAにより検出した。ELISAは、サンドイッチ法

を用い、E R O 1 - L  $\alpha$ は抗E R O 1 - L  $\alpha$ モノクローナル抗体で支持体に吸着させ、抗E R O 1 - L  $\alpha$ ウサギポリクローナル抗体で検出した。

[0097] その結果、癌患者では、健常人と比べて血清中のE R O 1 - L  $\alpha$ 濃度が有意に高かった（図14A）。

[0098] さらに、進行消化器癌患者16人を膵臓癌患者4人と大腸癌患者12人とに分けて比較した。その結果、膵臓癌患者では4例全例で血清中のE R O 1 - L  $\alpha$ 濃度が極めて高い値を示し、大腸癌患者では約半数が高い値を示した（図14B）。この結果は、実施例2の表1で示されるE R O 1 - L  $\alpha$ タンパク質を高発現する試料の割合とほぼ一致した。すなわち、表1に示されるように、（++）および（+++）の発現レベルを示した試料の割合は、直腸結腸癌では約40%程度であるのに対して、膵臓癌では約85%であり、図14Bの結果とほぼ一致していた。

[0099] 実施例7：E R O 1 - L  $\alpha$ とV E G F - Aの産生との関係

本実施例では、マウス乳癌細胞4T1と実施例7で得られたE R O 1 - L  $\alpha$ 遺伝子のノックダウンクローンから産生されるV E G F - Aの量を測定し、比較した。

[0100] 具体的には、 $10 \times 10^4$ 細胞/ウェルの実施例7で得られたE R O 1 - L  $\alpha$ 遺伝子のノックダウンクローンおよびコントロールs h R N Aを導入した4T1細胞をそれぞれ平底96穴プレートに播種した。24時間後、上清を回収して希釈し、E L I S AによりV E G F - Aの産生量を測定した。E L I S Aは、R & Dシステムズ社製のV E G F - A測定用キットを用いて行った。吸光は450nmで測定した。

[0101] その結果、E R O 1 - L  $\alpha$ 遺伝子のノックダウンクローン（K D）では、コントロールs h R N Aを導入した4T1細胞（S c r）と比べて、V E G F - Aの培養上清への産生量が低下していた（図15）。E R O 1 - L  $\alpha$ は、腫瘍におけるV E G F - Aの産生に関与していると考えられる。なお、V E G F - Aは、腫瘍における血管新生などに関わるが、分子内ジスルフィド結合を有するホモダイマーを形成し、その分子内ジスルフィド結合はV E G

F-Aが適切にフォールディングし、機能する上で重要である。

[0102] 実施例1～7の結果によれば、ERO1-L $\alpha$ は、腫瘍の増殖に関わるが、本実施例では、ERO1-L $\alpha$ はVEGF-Aの産生にも関与していることが明らかとなった。このことからERO1-L $\alpha$ は最終的には腫瘍における血管新生に関与している可能性が示唆された。

[0103] 実施例8：癌幹細胞におけるERO1-L $\alpha$ の発現

本実施例では、サイドポピュレーション法により癌幹細胞と非癌幹細胞とを分画してERO1-L $\alpha$ の発現を比較した。

[0104] 具体的には、ヒト大腸癌細胞株SW480を用いて、Hoechst 33342蛍光色素(Lonza)染色を行った。そこにABCG-2トランスポーター阻害剤であるベラパミル(50 $\mu$ mol/L、シグマアルドリッチ社製)を用いて37 $^{\circ}$ Cで30分間処理したものと、処理しないものをそれぞれフローサイトメーターを用いて測定し、比較検討した。ベラパミル処理後消失する細胞分画をサイドポピュレーション(SP)とし、それ以外の分画をメインポピュレーション(MP)として、フローサイトメーターにより分取した。本実施例では、SP画分を癌幹細胞分画とし、MP画分を非癌幹細胞分画として用いた。

[0105] それぞれの細胞中で発現するERO1-L $\alpha$ のタンパク質を抗ERO1-L $\alpha$ 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。すると、図16に示されるように、ERO1-L $\alpha$ は癌幹細胞画分でより多く発現していた。

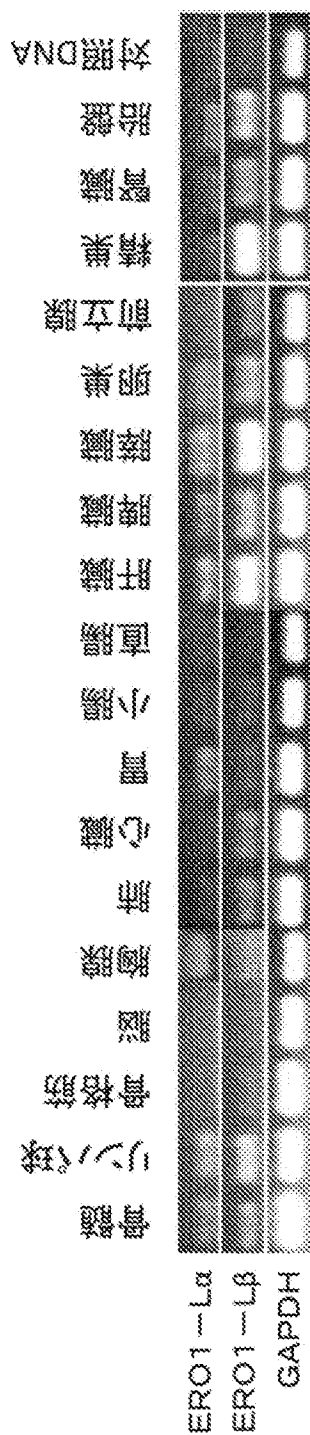
[0106] 実施例1～7の結果によれば、血清中でのERO1-L $\alpha$ の検出は、癌の悪性度を評価する上で重要なマーカーとして用いることができるが、本実施例の結果により、悪性の癌への癌幹細胞の関与も示唆された。特に、ERO1-L $\alpha$ の発現抑制剤は、癌幹細胞にも効くと考えられた。

## 請求の範囲

- [請求項1] 被検体から得られた試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質を検出することを含んでなる、癌の検出方法であって、試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、被検体中の癌の存在を示す、方法。
- [請求項2] 癌が、膵臓癌または大腸癌である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する癌の存在を示す、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 試料中のERO1-L $\alpha$ タンパク質の存在が、予後不良の癌の存在を示す、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 試料が被検体から得られた細胞外液である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] ERO1-L $\alpha$ タンパク質の検出手段を含んでなる、癌の診断薬または診断キット。
- [請求項7] 癌が、膵臓癌または大腸癌である、請求項5に記載の診断薬または診断キット。
- [請求項8] 癌が、ERO1-L $\alpha$ タンパク質を標的とした治療に対して感受性を有する癌である、請求項6または7に記載の診断薬または診断キット。
- [請求項9] 癌が、予後不良の癌である、請求項6～8のいずれか一項に記載の診断薬または診断キット。
- [請求項10] 検出手段がERO1-L $\alpha$ タンパク質に対する抗体である、請求項6～9のいずれか一項に記載の診断薬または診断キット。
- [請求項11] ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤を含んでなる、癌治療用医薬組成物。
- [請求項12] 癌が、膵臓癌または大腸癌である、請求項11に記載の医薬組成物。
- [請求項13] ERO1-L $\alpha$ タンパク質の発現抑制剤が、ERO1-L $\alpha$ に対す

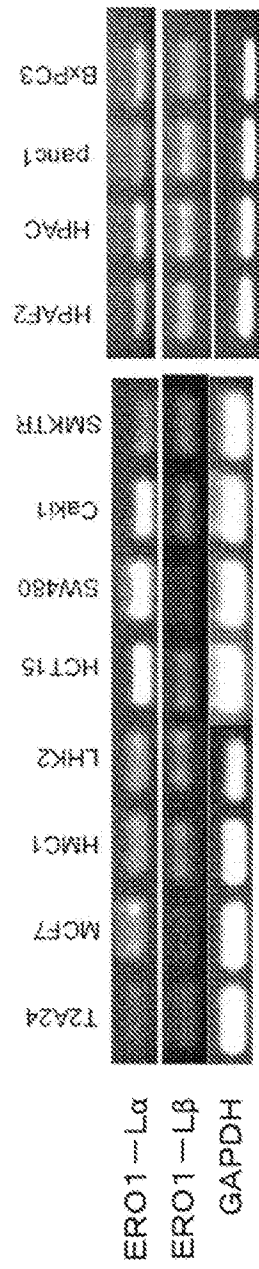
る s i R N A または s h R N A である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の医薬組成物。

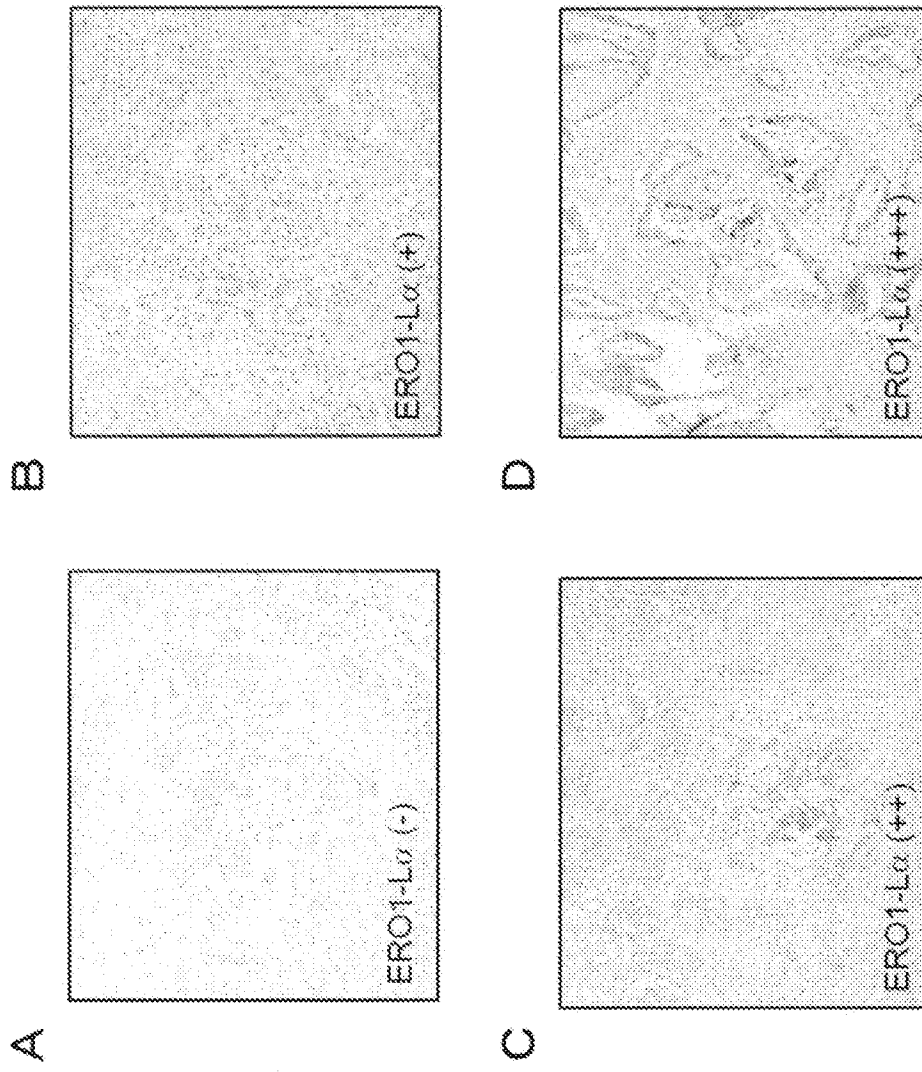
[図1]



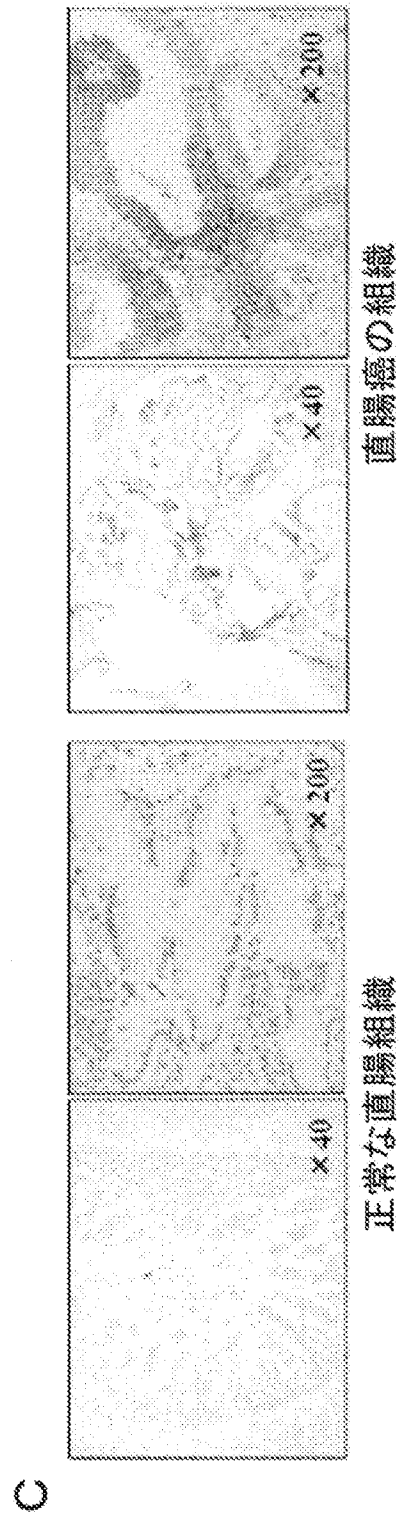
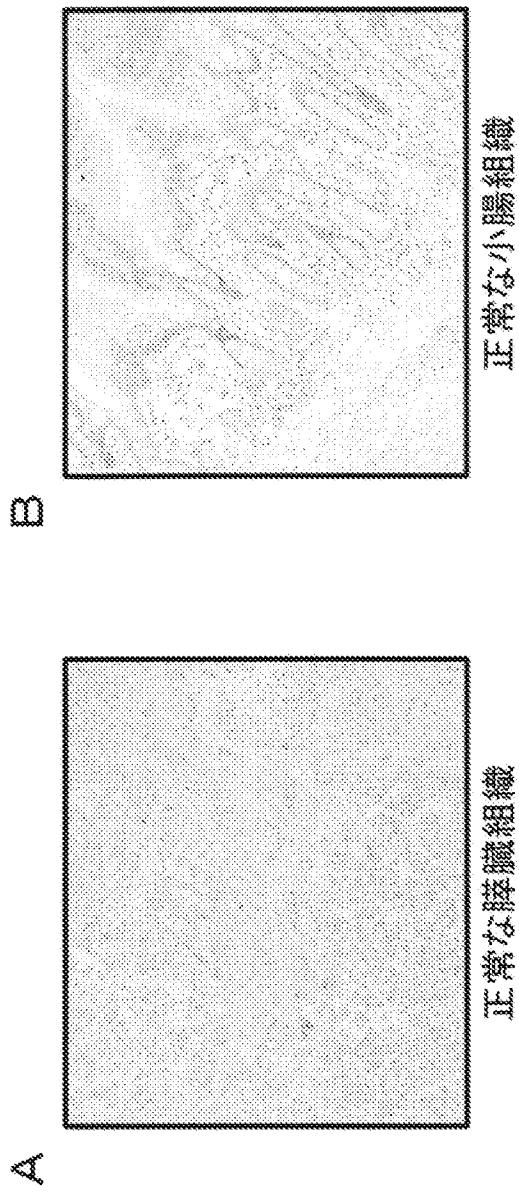


[図2]

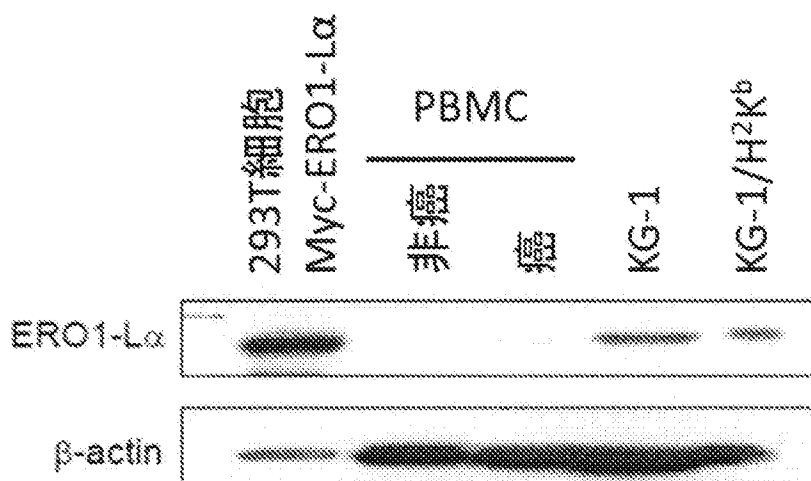
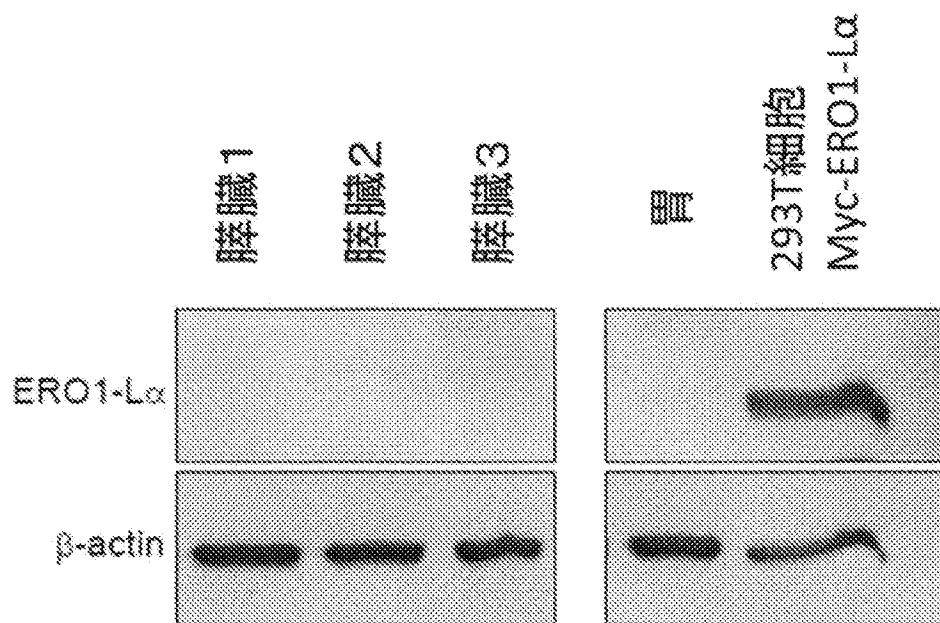


[3]

[図4]



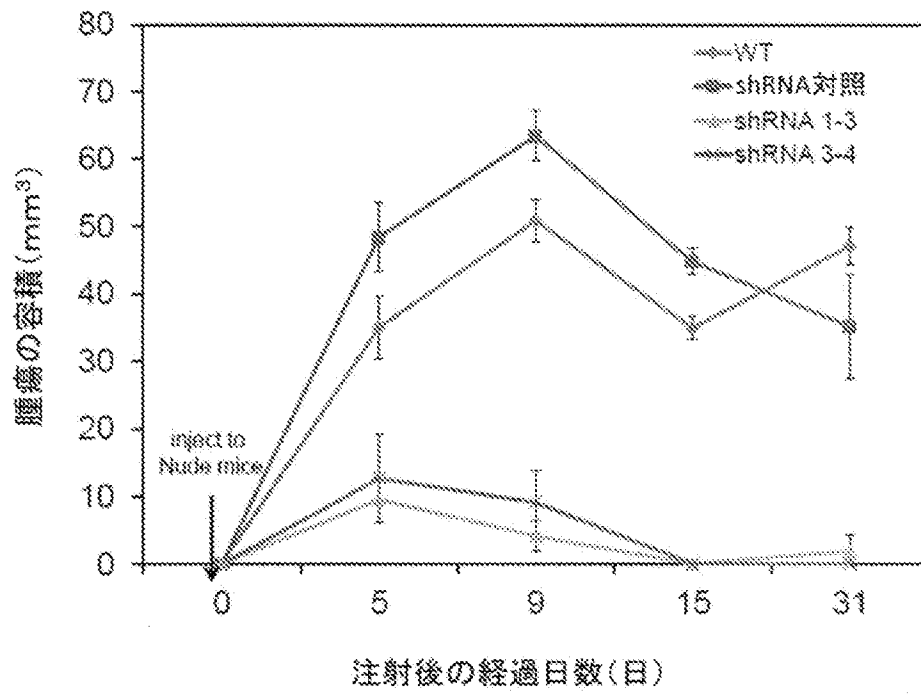
[図5]



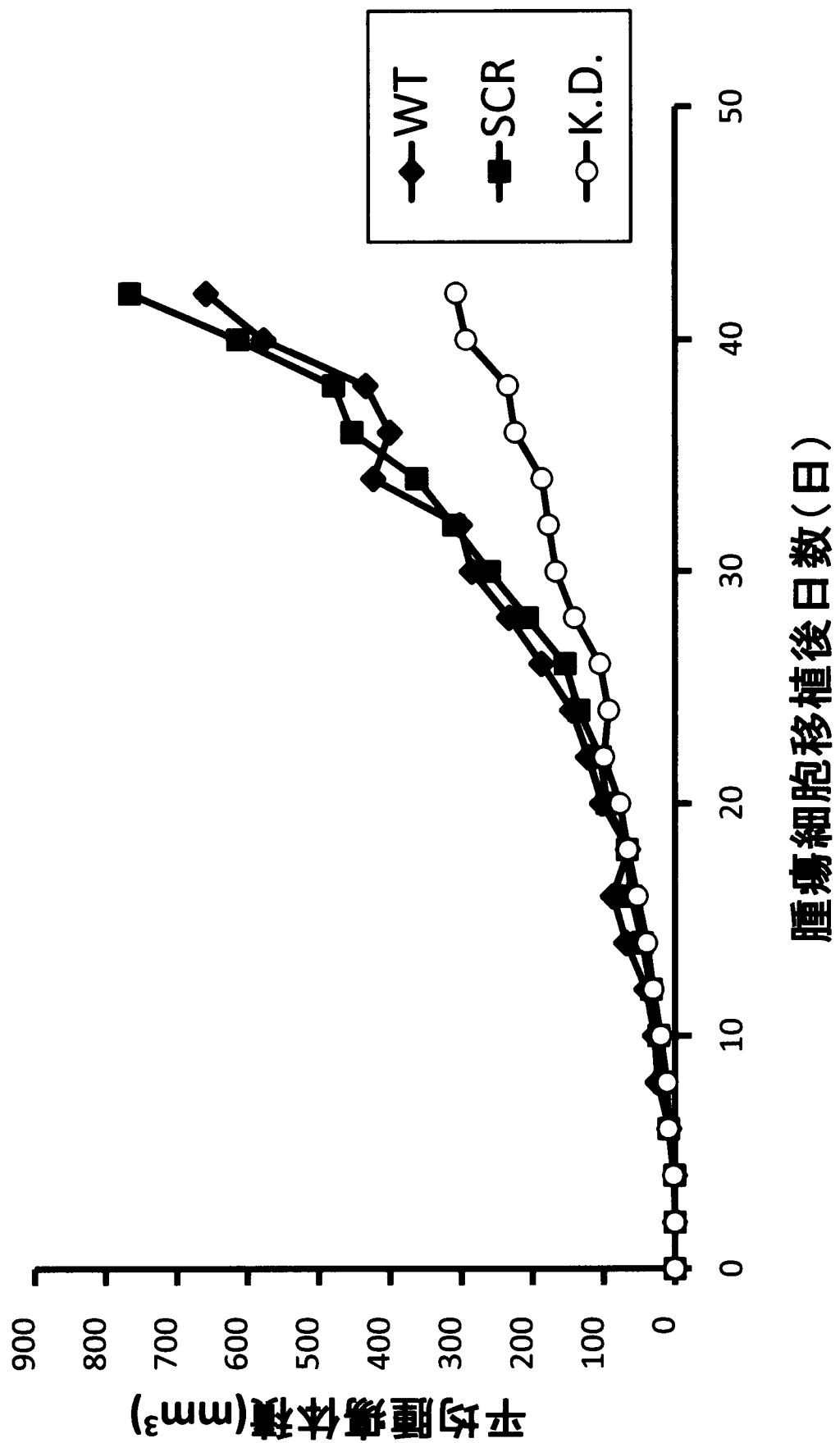
[図6]



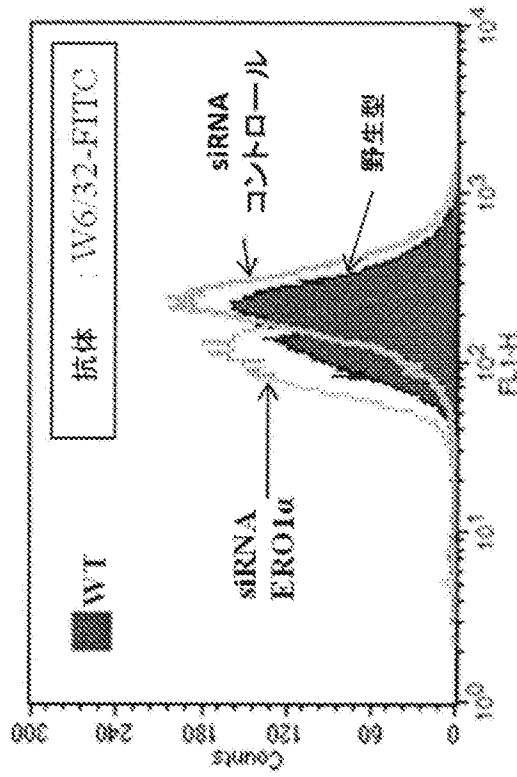
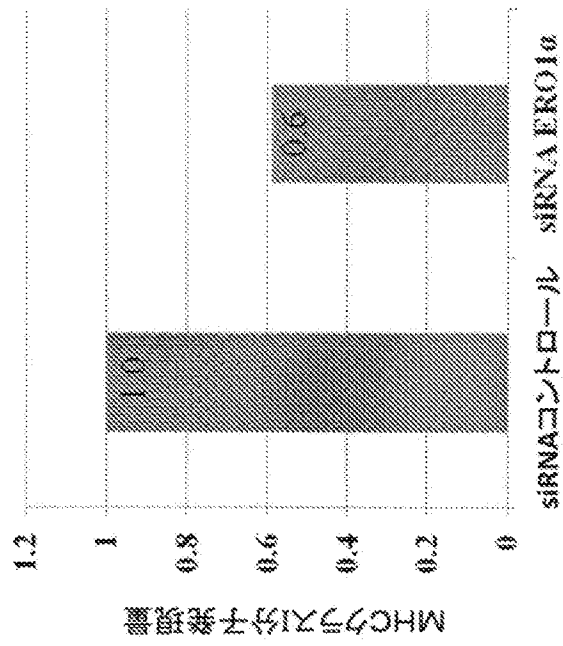
[図7A]



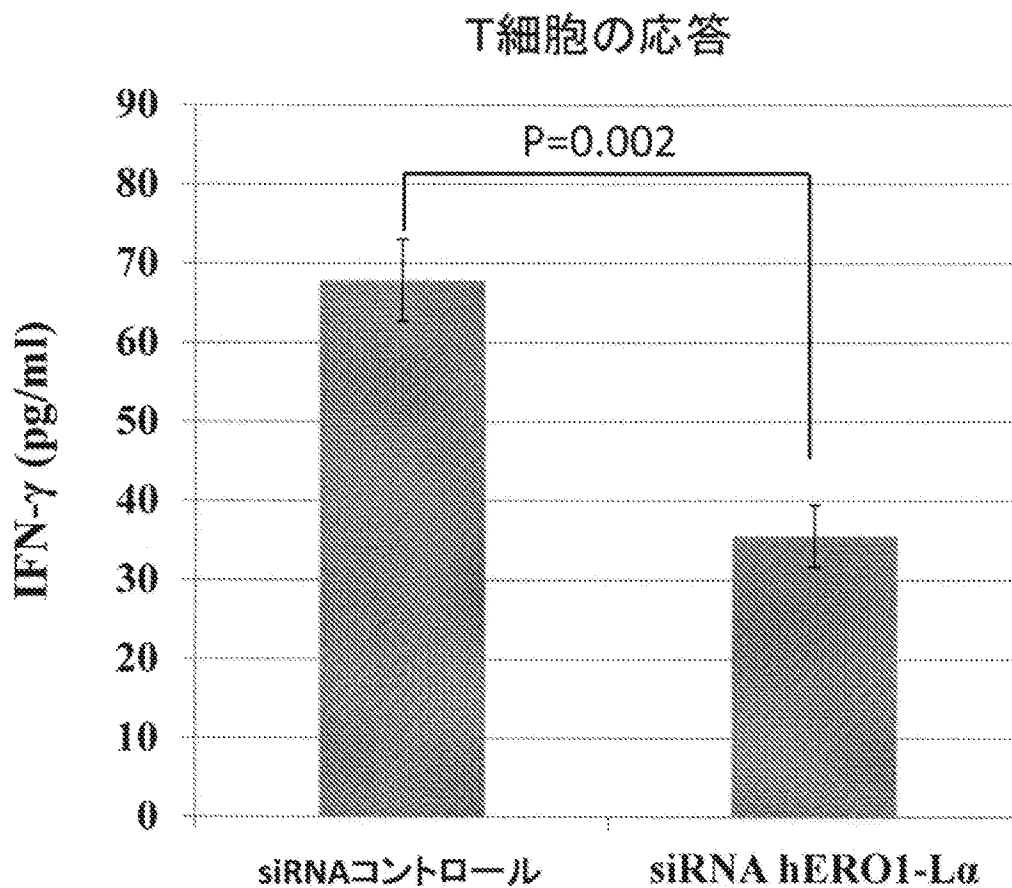
[図7B]



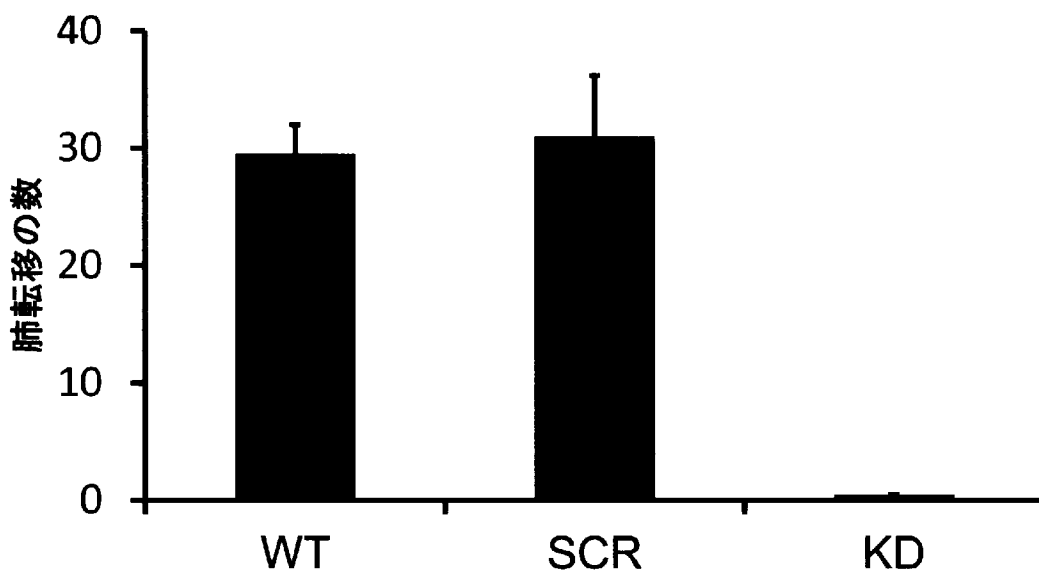
[図8]



[図9A]

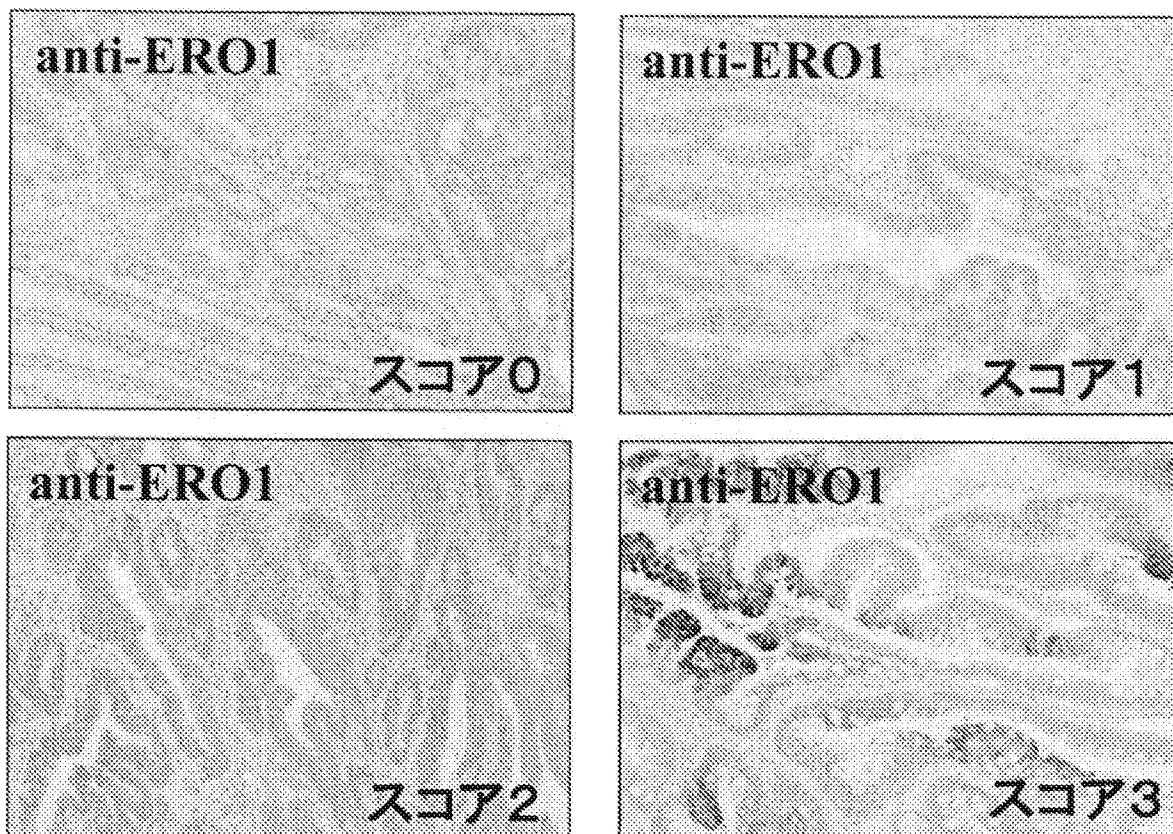


[図9B]



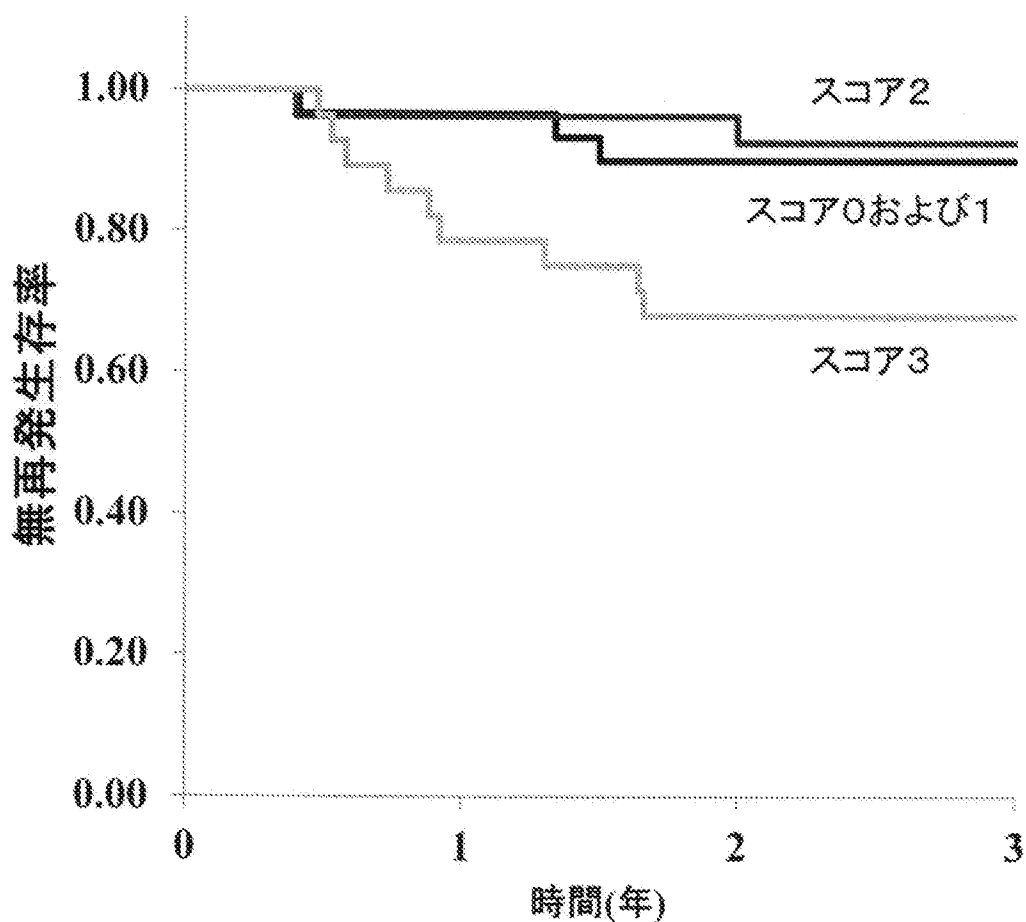


[図10]

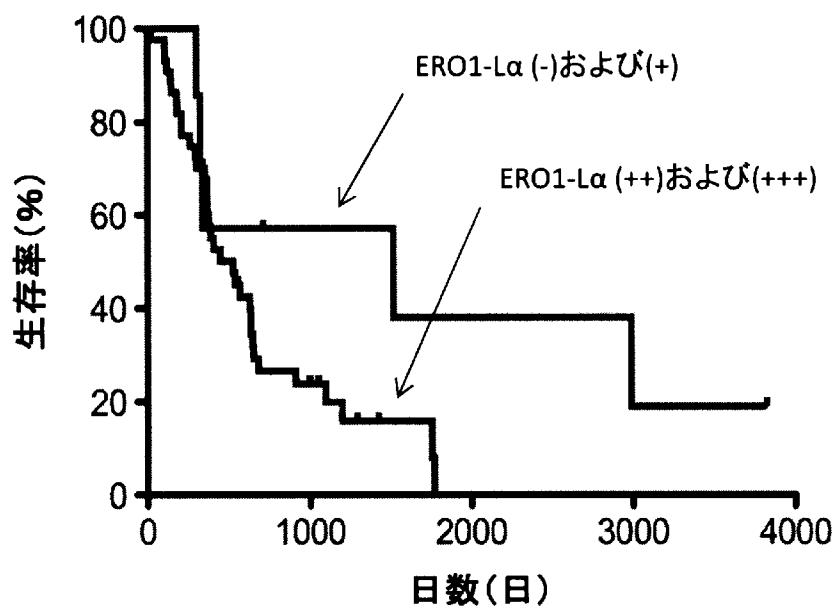


ERO1	染色の程度
スコア3	染色面積が30~80%でありかつドットがあるか、 または、染色面積が80%以上
スコア2	染色面積が30%未満かつドットあり、 または、染色面積が30%~80%ドットなし
スコア1	30%未満ドットなし
スコア0	染色が見られない

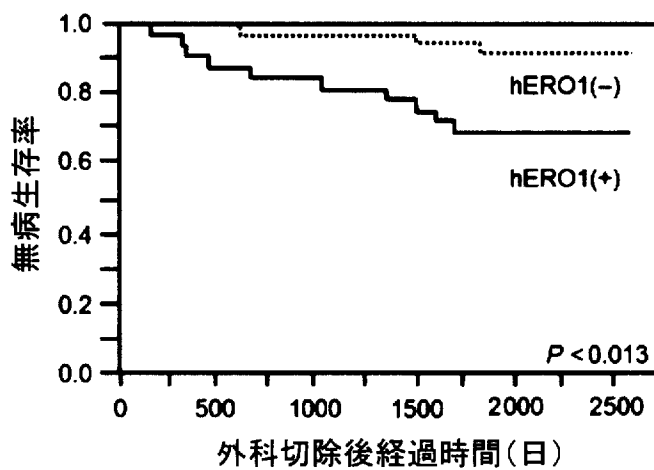
[図11]



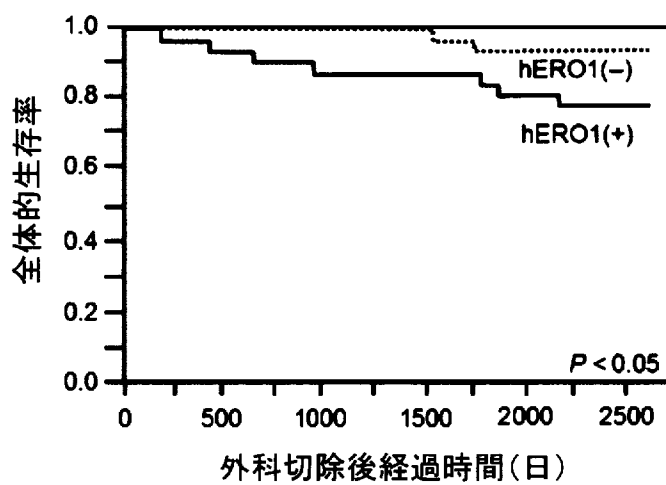
[図12A]



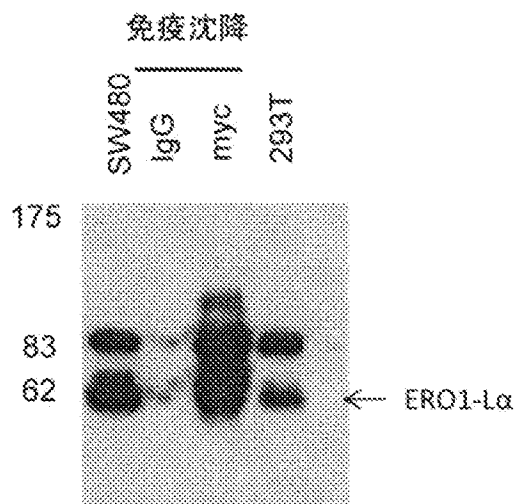
[圖12B]



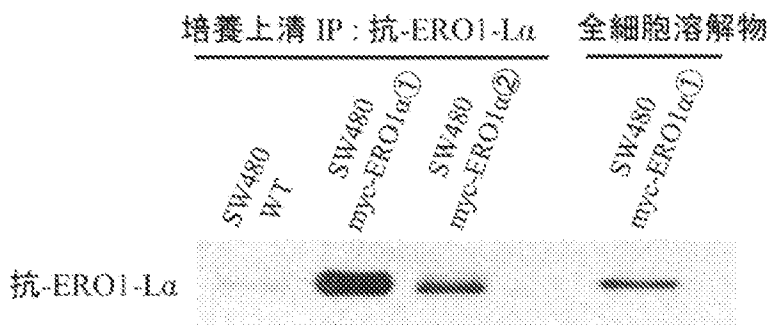
[圖12C]



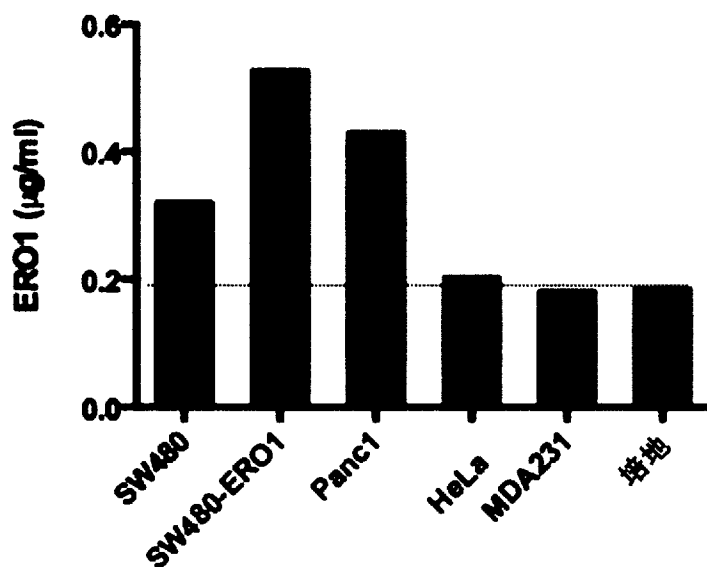
[圖13A]



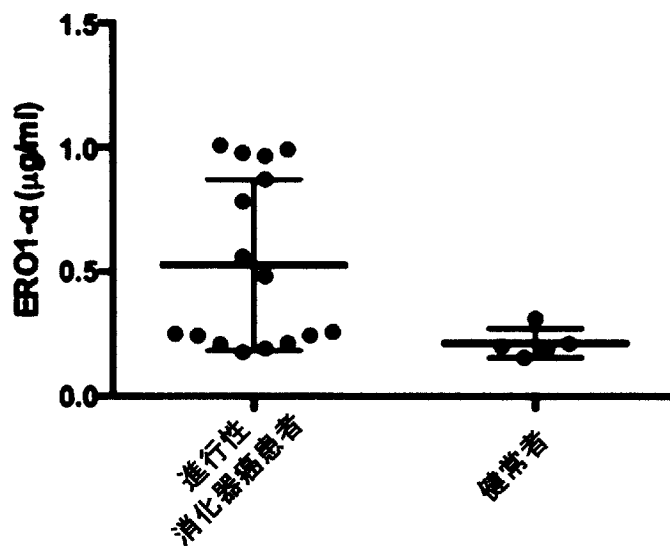
[圖13B]



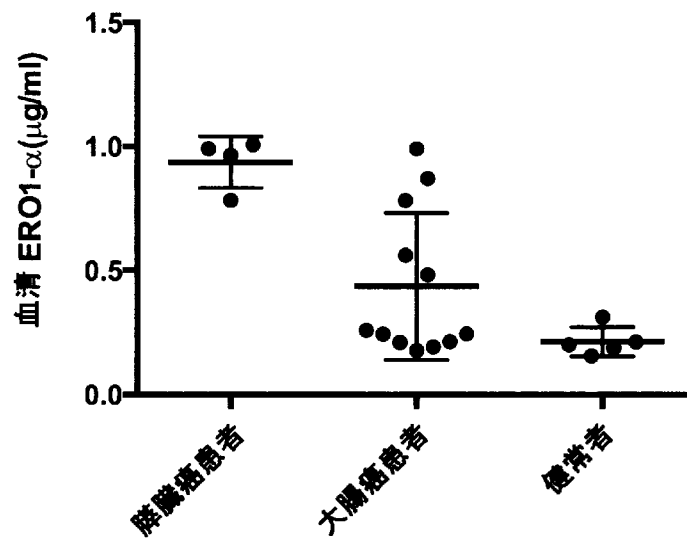
[圖13C]



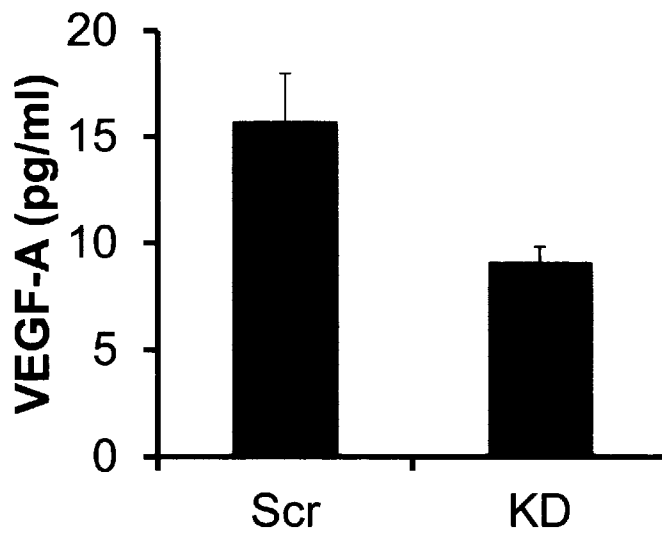
[圖14A]



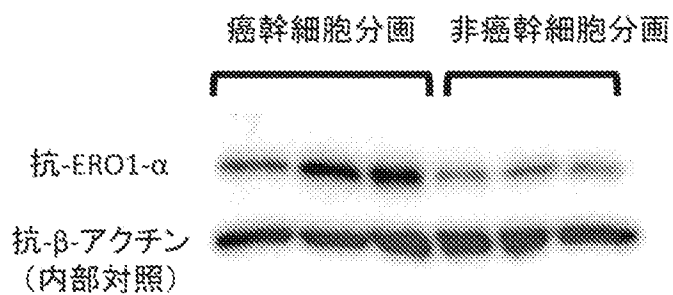
[図14B]



[図15]



[図16]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2013/073194

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N33/574(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,  
A61P35/00(2006.01)i, G01N33/53(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)  
G01N33/574, A61K31/713, A61K45/00, A61P35/00, G01N33/53

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Kazuharu KUKITA, "human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 like $\alpha$ (hERO1-L $\alpha$ ) no Gan Men'eki Ryoho ni Taisuru Koka Yosoku Inshi to shite no Kanosei", Journal of Japan Surgical Society, 05 March 2012 (05.03.2012)(received date), vol.113/special extra issue(2), 727	1-12/13
Y	JP 2008-110950 A (Japan Health Sciences Foundation), 15 May 2008 (15.05.2008), claim 14 (Family: none)	13
Y	WO 2006/080564 A1 (Haplopharma Inc.), 03 August 2006 (03.08.2006), claim 6 & US 2009/0035861 A1 & EP 1849865 A1	13

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 November, 2013 (22.11.13)	Date of mailing of the international search report 03 December, 2013 (03.12.13)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. G01N33/574, A61K31/713, A61K45/00, A61P35/00, G01N33/53</p>											
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年	
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
<p>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）</p> <p>MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y</td> <td>久木田和晴, human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 like <math>\alpha</math> (hER01-L<math>\alpha</math>) の癌免疫療法に対する効果予測因子としての可能性, 日本外科学会雑誌, 2012.03.05 (受入日), Vol. 113/臨時増刊号(2), 727</td> <td>1-12/13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2008-110950 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2008.05.15, 【請求項14】 (ファミリーなし)</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>			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	X/Y	久木田和晴, human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 like $\alpha$ (hER01-L $\alpha$ ) の癌免疫療法に対する効果予測因子としての可能性, 日本外科学会雑誌, 2012.03.05 (受入日), Vol. 113/臨時増刊号(2), 727	1-12/13	Y	JP 2008-110950 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2008.05.15, 【請求項14】 (ファミリーなし)	13
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									
X/Y	久木田和晴, human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 like $\alpha$ (hER01-L $\alpha$ ) の癌免疫療法に対する効果予測因子としての可能性, 日本外科学会雑誌, 2012.03.05 (受入日), Vol. 113/臨時増刊号(2), 727	1-12/13									
Y	JP 2008-110950 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2008.05.15, 【請求項14】 (ファミリーなし)	13									
<p><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。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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）</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>22.11.2013</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>03.12.2013</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>吉田 将志</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3252</p>	<table border="1"> <tr> <td>2 J</td> <td>4 6 3 6</td> </tr> </table>	2 J	4 6 3 6							
2 J	4 6 3 6										

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	WO 2006/080564 A1 (株式会社ハプロファーマ) 2006.08.03, 請求の 範囲 6 & US 2009/0035861 A1 & EP 1849865 A1	13