

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/119132

発行日 平成29年3月23日 (2017. 3. 23)

(43) 国際公開日 平成27年8月13日 (2015. 8. 13)

(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	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 Z N A P	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 6 3
GO 1 N 33/573 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 D	
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/573 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

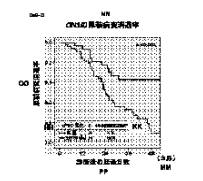
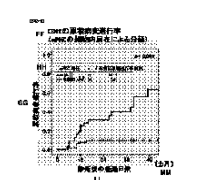
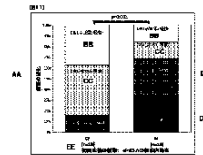
出願番号 特願2015-560997 (P2015-560997)	(71) 出願人 505155528 公立大学法人横浜市立大学 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 2 2 番 2 号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/053041	
(22) 国際出願日 平成27年2月4日 (2015. 2. 4)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-19201 (P2014-19201)	(74) 代理人 110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(32) 優先日 平成26年2月4日 (2014. 2. 4)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 大野 茂男 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内
	(72) 発明者 水島 大一 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内
	(72) 発明者 平原 史樹 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前がん病変の進行を予測する方法

(57) 【要約】

子宮頸がん等のがんの前がん病変が将来増悪するかどうかを予測できる新規な手段が開示されている。本発明の前がん病変の進行を予測する方法は、被検者から分離された試料におけるaPKC / タンパク質の発現を調べることを含む。aPKC / タンパク質の発現量が高い場合及び/又はaPKC / タンパク質が核に局在している場合に、前がん病変が増悪する可能性が高い又は改善する可能性が低いと予測される。aPKC / タンパク質の発現の解析は、好ましくは、抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を用いた免疫染色により行われる。



AA Change in lesion
BB Normal control
CC unchanged
DD overexposed
EE Results of detection of biopsy localization of aPKC in cell
FF Cumulative lesion progression rate of CIN1 (diseffusion based on description of aPKC in cell)
GG Cumulative lesion progression rate
HH Localization of aPKC
II Intensity
JJ Intensity
KK Pearson correlation coefficient regression rate
LL Squared partial regression
MM Month
NN Cumulative lesion regression rate of CIN1
OO Cumulative lesion regression rate
PP Cumulative lesion regression rate

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検者から分離された試料におけるaPKC / タンパク質の発現を調べることを含む、前がん病変の進行を予測する方法であって、aPKC / タンパク質の発現量が高い場合及び / 又はaPKC / タンパク質が核に局在している場合に、前がん病変が増悪する可能性が高い又は改善する可能性が低いと予測される、方法。

【請求項 2】

抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を用いた試料の免疫染色によりaPKC / タンパク質の発現を調べる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

aPKC / タンパク質の細胞内分布を調べることを含む、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記試料が組織試料である、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記前がん病変が子宮頸がんの前がん病変である、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記前がん病変が子宮頸部上皮内腫瘍グレード 1 である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記前がん病変が子宮頸部上皮内腫瘍グレード 2 であり、aPKC / タンパク質の細胞内分布を調べることによりaPKC / タンパク質の発現を調べる、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記試料におけるp16タンパク質の発現を調べることをさらに含む、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ヒトパピローマウイルス16型及び / 又は18型に感染しているか否かの検査と組み合わせて行なわれる、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を含む、前がん病変の進行を予測するための診断剤。

【請求項 11】

前記前がん病変は子宮頸がんの前がん病変である、請求項 10 記載の診断剤。

【請求項 12】

前記前がん病変は子宮頸部上皮内腫瘍グレード 1 又はグレード 2 である、請求項 11 記載の診断剤。

【請求項 13】

p16タンパク質に対する抗体又はその抗原結合性断片と組み合わせて用いられる、請求項 10 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の診断剤。

【請求項 14】

抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を含む、前がん病変の進行を予測するための診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前がん病変の進行を予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

子宮頸部上皮内腫瘍 (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) とは、子宮頸部上皮で発生したがんの前駆病変である。CINの診断は病理組織のHE染色 (ヘマトキシリンエオジン染色) で行われており、異形度が軽度で形態が正常上皮に近いCIN 1、異形度が強

10

20

30

40

50

く形態が浸潤癌に近いCIN3、その中間的な異形度のCIN2の3段階に分類されている。

【0003】

子宮頸がん及びCINはヒトパピローマウイルス（HPV）が原因である。ただし、HPV感染は発がん（CINの発生）に必要ではあるが十分ではない。HPVに感染した女性のうち、子宮頸部の浸潤癌にまで進行するのは、約1000人に1人だけである。発がん性のHPVに感染しても、多くの場合自然に排除される。一部は感染が持続し、前がん病変に進む場合があるが、CINを発症してもがんに進まずに軽快する場合もある。

【0004】

子宮がん検診などで高リスクと判断された場合に、生検による診断が行われる。生検で病変が認められない場合の多くは通常のがん検診に戻り、CIN3と診断された場合は手術の適応となる。CIN1又はCIN2と診断された場合は経過観察となり、必要に応じて数か月後に再度生検を行ない病変の進行を評価する。CIN2が長期持続している場合も手術の適応となる。手術は子宮頸部円錐切除であり、子宮は温存されるが、術後の子宮頸管狭窄・出血・早産率の上昇などの術後合併症を生じる可能性がある。

10

【0005】

CINのグレードは症例により増悪して浸潤癌になる場合も、軽快して正常にもどる場合もあるため、リスクを分類して各症例のリスクに合わせた診療内容を立てることが理想である。確かに、これまでの診断方法（子宮頸部組織のヘマトキシリンエオジン（HE）染色の病理学的診断）では、CINグレードを分類することができたが、同じCINグレードの症例であっても病変が将来増悪する場合も軽快する場合もあり、それはHE染色では予測できなかった。

20

【0006】

そこで、これまでCINのグレードの増悪や軽快を予測する診断補助法が開発されてきた。現在までに実用化されている方法は、子宮頸部上皮内病変の発生および増悪にはHPVが関連することを利用し、子宮頸部より採取した体液や組織からHPVの感染を検出する方法（ロッシュ・ダイアグノスティクス社、商品名：アンプリコアHPV；積水メディカル社、商品名：Clinichip；キアゲン社、商品名：Hybrid Capture IIなど）や、HPV E7蛋白に反応して過剰発現するp16蛋白質を検出する方法（Roche社、商品名：CINtec p16 Histology）である。しかしながら、HPV関連の補助診断だけでは増悪を予測する精度が充分ではない。

30

【0007】

一方、atypical Protein Kinase C / （aPKC / ）とは、細胞の極性を制御するタンパク質の一つであり、正常な組織形態の構築および維持に重要な役割を果たしている。細胞極性の異常はがんの特徴の一つであり、様々ながんでaPKC / が発現異常をきたしていることが報告されている。子宮頸がんに関しては、これまでに、浸潤がんにおいてaPKC / の局在異常と発現異常が予後不良因子であることが報告されている（非特許文献1）。

【0008】

しかしながら、子宮頸がんを含め、がんの前駆状態におけるaPKC / の動態についてはこれまでに報告がなく、前がん病変におけるaPKC / の病的意義も知られていない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】水島大一ら、「細胞極性制御因子atypical protein kinase C / の過剰発現および核局在は子宮頸癌の予後不良因子である」、日本産科婦人科学会雑誌 2013年65巻2号704項、平成25年2月1日発行

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、子宮頸がん等のがんの前がん病変が将来増悪するかどうかを予測でき

50

る新規な手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本願発明者らは、CIN症例において前がん病変部におけるaPKC / タンパク質の発現とその後の該病変部の進行との関係を鋭意に調べた結果、前がん病変部の初回生検組織においてaPKC / タンパク質の発現量が高い若しくはaPKC / タンパク質が核に局在する症例は、経過観察後にCINのグレードが有意に増悪することを見出し、従って前がん病変部のaPKC / タンパク質の発現量や細胞内分布を調べることで前がん病変の進行を予測できることを見出し、本願発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明は、被検者から分離された試料におけるaPKC / タンパク質の発現を調べることを含む、前がん病変の進行を予測する方法であって、aPKC / タンパク質の発現量が高い場合及び/又はaPKC / タンパク質が核に局在している場合に、前がん病変が増悪する可能性が高い又は改善する可能性が低いと予測される、方法を提供する。また、本発明は、抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を含む、前がん病変の進行を予測するための診断剤を提供する。さらに、本発明は、抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を含む、前がん病変の進行を予測するための診断キットを提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、前がん病変の進行を予見する補助診断の手段が新たに提供される。がん検診等でがんのリスクが高いと判定され、精密検査の対象となった患者の前がん病変部生検組織におけるaPKC / タンパク質の発現量や細胞内分布を調べることで、当該患者の前がん病変が将来的に増悪する可能性が高いかどうかを予測することができる。増悪する可能性が高い、ないしは改善する可能性が低いと予測される場合、経過観察中の外来通院間隔を早め、早期に手術治療を施す等の対応をすることができる。増悪する可能性が低いしは改善する可能性が高いと予測される場合には、経過観察中の外来通院間隔を延長したり、あるいは期間を延長して経過観察を続けることにより、自然治癒の可能性が高い症例の手術治療を回避することができる。本発明は、医療機関における前がん病変の進行予測の大きな補助となる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】抗aPKC / 抗体で免疫染色したCIN1生検組織の顕微鏡像である。aPKC / の細胞内分布が細胞質局在型であったもの及び核局在型であったものそれぞれについて、aPKC / シグナル強度が1+、2+、3+であった顕微鏡像の代表例を示した。参考として、一次抗体を用いずに染色をした正常子宮頸部上皮組織で、シグナル強度が陰性である陰性コントロールの顕微鏡像も併せて示した。スケールバーは100 μm。

【図2】初回生検がCIN1であった38症例について、初回生検組織の免疫染色のaPKC / シグナル強度と経過観察後の病変のグレードとの関連性をまとめたグラフである。

【図3 - 1】初回生検がCIN1であった38症例について、初回生検組織の免疫染色のaPKC / 細胞内分布と経過観察後の病変のグレードとの関連性をまとめたグラフである。

【図3 - 2】aPKC / の細胞内分布とCIN1病変の進行率との関係を示すグラフである。CIN1の病変の進行は「CIN1がCIN2以上の病変へ進行すること」と定義した。

【図3 - 3】aPKC / の細胞内分布とCIN1病変の消退率との関係を示すグラフである。CIN1の病変の消退は「CIN1が組織学的に正常上皮にもどること」と定義した。

【図4】初回生検がCIN1であった38症例について、初回生検組織のp16染色結果と経過観察後の病変のグレードとの関連性をまとめたグラフである。

【図5】初回生検がCIN1であった38症例について、初回生検組織のaPKC / 細胞内分布及びp16染色結果を組み合わせ経過観察後の病変のグレードとの関連性を評価した結果である。* p = 0.32、** p = 0.015。

【図6】CIN1症例のうちのハイリスクHPV陽性群（HPV16/18症例を除く）とハイリスクHPV

10

20

30

40

50

陰性群のそれぞれについて、aPKC / の細胞内分布とCIN1病変の進行率との関係を示したグラフである。

【図7】CIN1症例のうちのハイリスクHPV陽性群（HPV16/18症例を除く）とハイリスクHPV陰性群のそれぞれについて、aPKC / の細胞内分布とCIN1病変の消退率との関係を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

「前がん病変」とは、悪性腫瘍すなわちがんとなる恐れのある非浸潤性の病変をいう。形態学的には異形成病変、すなわち細胞の全体の大きさや形状、核や細胞質の染色性などにおいて正常と異なる形質をもつ細胞の出現を伴う増殖性の病変であり、そのほか腺腫も含まれることが知られている。本発明においても、「前がん病変」には、上記した増殖性の異形成病変及び腺腫が包含される。

10

【0016】

例えば、子宮頸がんの場合、本願で対象とする「前がん病変」とは、浸潤がんに進展する前の子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）であり、CIN1～CIN3が包含される。特に限定されないが、本発明の診断剤及び方法はCIN1～CIN2、とりわけCIN1症例に対して好ましく実施することができる。子宮頸がん以外のがんの前がん病変についても同様であり、がんの治療・予防分野で一般に前がん状態と認識されている病変のあらゆるグレードが包含され、とりわけ初期のグレードの前がん病変に対して本発明を好ましく実施することができる。

20

【0017】

本発明では、被検者から分離された試料におけるaPKC / タンパク質の発現を調べる。「タンパク質の発現を調べる（解析する）」との表現には、タンパク質の発現量を定量的又は半定量的に測定すること、及びタンパク質の細胞内分布を調べることの両者が包含される。前がん病変の進行予測は、aPKC / タンパク質の発現量のみに基づいて実施することもできるし、またaPKC / タンパク質の細胞内分布のみに基づいて実施することもできるので、本発明では少なくともいずれか一方の解析を行えばよいが、本発明では特にaPKC / の細胞内分布の解析を行なうことが好ましい。

【0018】

本発明で対象となる被検者は、通常、がん検診等でがんのリスクが高いと判定され、精密検査の対象となった者であり、典型的には、前がん病変を有する者である。

30

【0019】

本発明でaPKC / タンパク質の発現解析に供される試料は、前がん病変部に由来する細胞試料又は組織試料であり、好ましくは組織試料である。典型例として、がん検診等でがんの疑いありと判定された被検者の生検組織試料を挙げることができる。子宮頸がんの前がん病変について進行を予測する場合には、子宮頸部上皮組織試料や擦過細胞試料が用いられる。

【0020】

aPKC / タンパク質の発現の解析は、aPKC / タンパク質を特異的に認識する抗体（抗aPKC / 抗体）又はその抗原結合性断片を用いた免疫学的解析、より具体的には免疫染色により実施することが好ましい。aPKC / タンパク質に対する抗体又はその抗原結合性断片を用いた試料の免疫染色によれば、シグナルの分布によってaPKC / タンパク質の細胞内分布を調べることができるほか、シグナル強度によってaPKC / タンパク質発現量を半定量的に調べることができる。本発明においては、aPKC / の発現量の測定は半定量的な測定でよい。

40

【0021】

もっとも、aPKC / タンパク質の発現解析、特に発現量の測定は、抗体を用いて抗aPKC / タンパク質自体を検出する手法に限定されず、aPKC / 遺伝子のmRNAの発現量をaPKC / タンパク質の発現量として測定してもよい。本発明では、aPKC / タンパク質の発現量の測定には、aPKC / 遺伝子のmRNAの発現量の測定も包含される。mRNAの発現量の測定方法は周知であり、リアルタイムPCR、ノーザンブロットや、組織試料の場合に

50

はin situ RT-PCR等の手法を用いることができる。また、抗体を用いてタンパク質の発現量を調べる手法としては、免疫染色の他、前がん病変部試料からタンパク質を抽出して行なわれる固相ELISA等の手法も挙げることができる。

【0022】

抗aPKC / 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、aPKC / の発現解析の再現性等の観点からはモノクローナル抗体が好ましい。また、抗aPKC / 抗体は、対応抗原であるaPKC / との結合性を維持した抗体断片（抗原結合性断片）の形態で使用することもできる。

【0023】

PKCの他のアイソフォームと区別してaPKC / を認識できる抗体は公知であり、市販もされている（例えば、BDバイオサイエンス社のカタログ番号610176のマウス抗PKC モノクローナル抗体）。本発明では、そのような公知の抗体を用いることができる。あるいは、抗体の作製方法は周知の常法であるので、抗aPKC / 抗体を調製して用いることもできる。プロテインキナーゼCの中で最もaPKC / に構造が類似しているのはaPKC であるが、aPKC / の第404番～第587番アミノ酸の領域を認識する抗体はaPKC を認識しないことが知られている。上記した市販のマウス抗PKC モノクローナル抗体は、aPKC / の第404番～第587番アミノ酸の領域を免疫原として用いて調製された、同領域を認識する抗体である。従って、ヒトaPKC の第404番～第587番アミノ酸の領域からなる断片を免疫原として用いれば、aPKC / を特異的に認識する抗体を調製することができる。なお、「第404番～第587番アミノ酸の領域を認識する抗体」には、当該領域のうちの一部の領域を

10

20

【0024】

配列表の配列番号1及び2に示した配列は、NCBIのGenBankにNM_002740.5のアクセッション番号で登録されているヒトPKC の塩基配列およびアミノ酸配列である。免疫原として用いるaPKC / タンパク質の断片は、このような配列情報に基づき、化学合成、遺伝子工学的手法等の常法により作製することができる。

【0025】

化学合成法の実例としては、例えばFmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等を挙げることができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。化学合成の場合は、アミノ酸配列のみに基づいて所望のポリペプチドを合成できる。

30

【0026】

遺伝子工学的手法によるポリペプチドの作製方法も周知である。aPKC / の第404番～第587番アミノ酸の領域からなる断片は、具体的には、例えば次の通りの方法で作製することができる。まず、ヒトcDNAライブラリーからaPKC / の第404番～第587番アミノ酸の領域をコードするcDNA断片を単離、増幅する。これを適当なベクターに組み込み、適当な発現系にてポリペプチドを発現させ、このポリペプチドを回収することで、上記の領域をコードするポリペプチド断片を得ることができる。用いるベクターや各種の発現系（細菌発現系、酵母細胞発現系、哺乳動物細胞発現系、昆虫細胞発現系、無細胞発現系など）も周知であり、種々のベクターや宿主細胞、試薬類、キットが市販されているため、当業者であれば適宜選択して使用することができる。ヒト由来培養細胞も市販・分譲されており、入手は容易である。

40

【0027】

抗aPKC / ポリクローナル抗体は、例えば、上記したようなaPKC / タンパク質の適当な断片を適宜アジュバントと共に動物（ヒトを除く）に免疫し、該動物から採取した血液から抗血清を得て、該抗血清中のポリクローナル抗体を精製することで得ることができる。免疫は、被免疫動物中での抗体価を上昇させるため、通常数週間かけて複数回行なう。抗血清中の抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、アフィニティーカラム精製等により行なうことができる。

【0028】

50

抗aPKC / モノクローナル抗体は、例えば、周知のハイブリドーマ法により作製することができる。具体的には、aPKC / タンパク質の適当な断片を適宜アジュバントと共に動物（ヒトを除く）に免疫し、該動物から脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞を採取し、これをミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、aPKC / タンパク質と結合する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、これを増殖させて培養上清から抗aPKC / モノクローナル抗体を得ることができる。スクリーニング工程では、aPKC とは結合しないことをさらに確認してもよい。

【0029】

「抗原結合性断片」は、もとの抗体の対応抗原に対する結合性（抗原抗体反応性）を維持している限り、いかなる抗体断片であってもよい。具体例としては、Fab、F(ab')₂、scFv等を挙げることができるが、これらに限定されない。FabやF(ab')₂は、周知の通り、モノクローナル抗体をパパインやペプシンのようなタンパク分解酵素で処理することにより得ることができる。scFv (single chain fragment of variable region、単鎖抗体) の作製方法も周知であり、例えば、上記の通りに作製したハイブリドーマのmRNAを抽出し、一本鎖cDNAを調製し、免疫グロブリンH鎖及びL鎖に特異的なプライマーを用いてPCRを行なって免疫グロブリンH鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を増幅し、これらをリンカーで連結し、適切な制限酵素部位を付与してプラスミドベクターに導入し、該ベクターで大腸菌を形質転換してscFvを発現させ、これを大腸菌から回収することにより、scFvを得ることができる。

10

【0030】

細胞試料や組織試料の免疫染色の手法自体は周知の常法であり、抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片を一次抗体として用いて常法通り実施すればよい。免疫染色法は、一次抗体を標識して抗原の検出を行なう直接法と、非標識の一次抗体に対して標識した二次抗体を反応させ抗原の検出を行なう間接法に大別される。本発明で組織試料中のaPKC / タンパク質の免疫染色を行なう場合、直接法でも間接法でもよいが、一般に間接法の方が検出感度が高く、本発明でも間接法を好ましく採用できる。なお、本発明において、「免疫染色」との語には、発色以外のシグナルを用いる手法も包含される。

20

【0031】

抗体に結合させる標識物質は特に限定されず、一般的な免疫染色において使用されている標識物質と同様のものを用いることができる。具体例としては、酵素、蛍光色素、金粒子、放射性物質などが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ（セイヨウワサビペルオキシダーゼ等）、ガラクトシダーゼ等、公知のものを用いることができる。酵素を標識物質として用いる場合、該酵素に対応した発色基質、蛍光基質又は発光基質等の基質を該酵素と反応させ、その結果発生する発色、蛍光、発光等のシグナルを検出すればよい。本発明では、シグナル検出の簡便さ等の観点から、酵素標識及び発色基質を用いることが好ましい。発色は光学顕微鏡により容易に観察できる。

30

【0032】

酵素標識としてペルオキシダーゼを用いる場合、発色基質としてはDAB（3,3'-ジアミノベンジジン、茶褐色に発色）、AEC（アミノ-9-エチルカルボゾール、赤色に発色）等を用いることができる。酵素標識としてアルカリホスファターゼを用いる場合、発色基質としてはNF（ニューフクシン、赤色に発色）、FR（ファーストレッド、赤色に発色）等を用いることができる。もっともこれらの具体例には限定されない。

40

【0033】

また、抗体をビオチン又はハプテンで標識して用いることも可能である。その場合、酵素、蛍光物質、放射性物質等を結合したストレプトアビジン又はハプテン抗体等を組織標本に反応させ、シグナルの検出を行なえばよい。

【0034】

本発明においてaPKC / タンパク質を免疫染色する場合、一般的な免疫染色法と同様に、細胞の構造を正確に認識する目的で標本の後染色が行われる。後染色にはヘマトキシリン（核を青色に染色）やメチル緑（核を青緑色に染色）等の色素を使用することができる。免疫染色の検出を発色により行なう場合には、免疫染色の発色と後染色の色の組み合

50

わせに留意して色素を選択する。

【0035】

被検者から分離された前がん病変部試料でaPKC / タンパク質の発現量を調べた結果、発現量が高かった場合には、その前がん病変は増悪する可能性が高い、ないしは改善する可能性が低いと予測することができる。発現量が高いか否かは、例えば、前がん病変が結果的に（数か月程度以上の経過観察の結果として）増悪しなかったこと（変化なし又は軽快）が判明している症例の、当該前がん病変部におけるaPKC / タンパク質の発現量の平均的なレベルと対比して、それよりも発現量が高いか否かを判断すればよい。発現量の測定を免疫染色のシグナル強度に基づいて半定量的に行なう場合には、発現量の高低を判定する際に参考となるよう、シグナル強度を0（発現なし）、1+、2+、3+等のように少数の段階に分類した場合の各グレードの典型的な画像（図1参照）を参考画像として予め準備しておき、被検者由来の前がん病変部試料の免疫染色結果をこれらの参考画像と対比して、いずれのグレードに属するかを決定してよい。そのような参考画像は、例えば、本発明の方法を実施するための診断剤ないしはキットの添付文書等を含めて提供することができる。そのように複数の参考画像が提供される場合、免疫染色のシグナル強度がどのグレード以上であると増悪する可能性が高いかという基準も併せて提供され得る。シグナル強度を4段階に分類して評価する場合、2+以上であれば発現量が高いと判断することができる。

10

【0036】

また、前がん病変部において、aPKC / タンパク質の核への局在が生じている場合には、その前がん病変は増悪する可能性が高い、ないしは改善する可能性が低いと予測することができる。皮膚、食道、子宮頸部等の表皮は扁平上皮であるが、正常な扁平上皮細胞ではaPKC / タンパク質は細胞質に局在している。従って、扁平上皮がんの前がん病変組織においては、核において細胞質と同程度以上にaPKC / タンパク質が検出される場合には、核に局在していると判断してよい。胃や腸等の消化管の粘膜上皮は円柱上皮であり、正常な円柱上皮ではaPKC / タンパク質は細胞接着部位に局在するが、円柱上皮に由来する腺がんの前がん病変組織においても同様に、核においてaPKC / タンパク質が一定以上の強度で検出される場合には核に局在していると判断してよい。被検者から分離された前がん病変部試料の免疫染色結果からaPKC / の細胞内分布を判定する際に参考となるよう、例えば、細胞質に局在し核への分布は見られない免疫染色像、細胞質と核の両者に分布している免疫染色像（分布が細胞質>核、細胞質=核、細胞質<核など、さらに細かく分けてもよい）、及び核に局在し細胞質への分布は見られない免疫染色像の典型例（図1参照）を参考画像として予め準備しておき、被検者由来の前がん病変部試料の免疫染色結果をこれらの参考画像と対比してaPKC / の細胞内分布を判定してよい。腺がんの前がん病変部の場合でも同様に、細胞接着部位に局在し核への分布は見られない免疫染色像、核への分布も確認される免疫染色像などを参考画像として予め準備しておき、参考画像との対比によりaPKC / の細胞内分布を判定することができる。そのような参考画像は、例えば、本発明の方法を実施するための診断剤ないしはキットの添付文書等を含めて提供することができる。

20

30

【0037】

本発明による前がん病変の進行予測は、公知の進行予測法と組み合わせて実施してよい。子宮頸がんの前がん病変の進行予測では、p16タンパク質発現に基づく進行予測法や、HPVの型に基づく進行予測法が公知であるが、本発明により子宮頸がんの前がん病変の進行予測を行なう場合、例えばp16タンパク質の発現を調べることによる進行予測を好ましく併用することができる。p16タンパク質は、HPV E7タンパク質に反応して過剰発現するタンパク質であり、子宮頸部上皮組織においてp16タンパク質の過剰発現が見られる場合に前がん病変が増悪する可能性が高いないしは改善する可能性が低いと予測される。p16の発現を調べるための抗p16一次抗体を含む試薬が市販されており（Roche社、商品名：CINtec p16 Histology）、そのような市販品を用いてp16タンパク質による進行予測を実施することができる。当該市販の試薬では、抗p16抗体による免疫染色の結果、子宮頸部組織

40

50

の基底細胞層から傍基底細胞層へと連続した染色性を示した場合にp16タンパク質過剰発現陽性とされ、細胞単体又は小さな細胞集塊としての非連続的な染色性は過剰発現陰性とされる。p16による予測をaPKC / の細胞内分布に基づく予測と組み合わせて進行予測を行なうと、aPKC / 細胞質局在型の増悪低リスク症例について、さらに増悪リスクの予測を細分化することができる。具体的には、aPKC / 細胞質局在型でかつp16陽性の場合には増悪する可能性が低く、aPKC / 細胞質局在型でかつp16陰性の場合には増悪する可能性が極めて低いと予測することができる。

【0038】

HPV型判別と組み合わせて子宮頸がんの前がん病変の進行予測を実施する場合には、例えば、増悪リスクが特に高いとされているHPV16/18の感染の有無とaPKC / の局在パターンとを組み合わせて進行予測する方法が想定される。一般的なHPV型判定検査では主に13種類の型(16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、68型)がハイリスクとされ、中でも16型及び18型が特にハイリスクとされる。16型及び18型以外のハイリスクHPVについては、感染の有無による増悪予測の精度は必ずしも高くなく、本発明による進行予測を組み合わせることが特に有用であると考えられる。すなわち、HPV型のうちでも16型と18型に着目し、HPV16/18感染ありの患者については増悪する可能性が高いと予想し、HPV16/18感染なしの患者については、aPKC / 核局在であれば増悪する可能性が高く、aPKC / 細胞質局在であれば増悪する可能性が低い、と予測することで、HPV型判定のみに基づく増悪予測よりもさらに精度の高い予測が可能になる。

10

20

【0039】

抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片は、前がん病変が増悪する可能性を予測するための診断剤として用いることができる。該診断剤は、抗aPKC / 抗体又はその抗原結合性断片の他、該抗体又はその抗原結合性断片の安定化等に有用な他の成分をさらに含む得る。また、該診断剤は、他の試薬類等(例えば、標識二次抗体、標識が酵素の場合には発色基質等の基質、など)と適宜に組み合わせて、前がん病変が増悪する可能性を予測するための診断キットとして提供することができる。また、診断剤及び診断キットには、例えば、試料の免疫染色結果を対比するための上記した参考画像を掲載した文書が添付されていてよい。

30

【実施例】

【0040】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0041】

<材料及び方法>

2008年～2011年の間に横浜市大附属病院において生検により診断された子宮頸部上皮内腫瘍グレード1(cervical intraepithelial neoplasia grade 1, CIN1)症例のうち、経過観察(4～6ヶ月)の後に再生検でCIN病変のグレードが評価され、病変の進行もしくは消退が評価された38～86症例を対象とした。各症例の初回生検検体を抗aPKC / 抗体で免疫染色し、得られた結果をその後の病変の進退と対比して、両者の関連性を調べた。

40

【0042】

常法によりホルマリン固定パラフィン包埋した検体を2µmに薄切した。この切片を以下の手順で処理し、標本作製した。

- (1) 脱パラフィン(Xylen, 5分間×2回)、脱水(Ethanol, 5分間×2回)
- (2) 水 5分間
- (3) 10mMクエン酸バッファー(pH6.0)に浸漬してオートクレーブ(121℃, 15分間)
- (4) 自然冷却, 20分間
- (5) PBS 5分間
- (6) 0.3% 過酸化水素/脱イオン水に浸漬(室温, 30分間)
- (7) PBS 5分間(PBSで5分間に2回洗浄)

50

- (8) ニチレイヒストファイン ブロッキング (10% 正常ウサギ血清/PBS、ニチレイ社)
30分間、室温 ~ 37
- (9) 一次抗体 aPKC / mAb (BD Bioscience cat.610176 Mouse anti PKC を250倍希釈
で使用) + ウサギ血清 (体積10%) + PBS
16時間以上、4
- (10) PBS 5分間 × 3回
- (11) ニチレイヒストファイン ビオチン化抗マウスIgG二次抗体 30分間
- (12) PBS 5分間 × 3回
- (13) ニチレイ ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン 15分間
- (14) PBS 5分間、3回
- (15) Diaminobenthidine (DAB) 反応2分
- (16) ヘマトキシリン1秒
- (17) 流水で10分洗浄
- (18) 脱水 (Ethanol, 5分間 × 3回)
- (19) 透徹 (Xylen, 5分間 × 2回)

10

20

30

40

【0043】

上記の通りに作製した初回生検検体の標本を顕微鏡下で観察した。aPKC / のシグナル強度 (茶色の濃さ) は半定量的に4分類 (陰性、1+、2+、3+) した後、1+以下であった低発現型と2+以上であった高発現型に分類し、細胞内分布については細胞質局在型と核局在型に分類 (核と細胞質に同程度に分布している場合は核局在型として分類) して、病変の進退との関連性を評価した。統計学的解析はマン・ホイットニー検定により行なった。すなわち、各症例の経過観察後の病変を無し (正常化) = 0、CIN1 = 1、CIN2 = 2、CIN3 = 3とスコアリングし、マン・ホイットニー検定により2群間の比較を行ない、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【0044】

さらに、初回生検でCIN1と診断された計86症例について、aPKC / 細胞内局在群と核局在群に分け、診断後の4年間における各群の累積病変進行率及び累積病変消退率を Kaplan-Meier法により解析した。群間の差はログランク検定により評価した。

【0045】

< 結果 1 >

aPKC / の細胞内分布が細胞質局在型であったもの及び核局在型であったもののそれぞれについて、aPKC / シグナル強度が1+ ~ 3+であったCIN1症例の代表的な顕微鏡像を図1に示した。細胞質局在型 (中段) では、核はヘマトキシリンで青色に染色され、細胞質にあるaPKC / タンパク質がDABにより茶色に染色されている。核局在型 (下段) では、シグナル強度1+では核が青色と茶色の両方で同程度に染色されているが、2+以上では茶色の染色が青色よりも濃くなり、3+では核は青色が確認できない程度に濃い茶色に染色されている。なお、対象とした38症例でaPKC / シグナル強度が陰性の症例は存在しなかった。

【0046】

< 結果 2 >

初回生検標本のaPKC / シグナル強度を半定量的に分類した結果、1+ (低発現型) が18例、2+ ~ 3+ (高発現型) が20例であった。各症例の経過観察後の病変の転帰は下記表1の通りであった。

【0047】

【表 1】

初回生検のaPKC λ / ι のシグナル強度	CIN1病変の転帰 (経過観察後のグレード評価結果)				合計
	CIN3 (増悪)	CIN2 (増悪)	CIN1 (不変)	病変なし (軽快)	
1+	2例	1例	6例	9例	18例
2+又は3+	4例	9例	6例	1例	20例

【0048】

表1の結果をグラフ化したものを図2に示す。初回生検でCIN1と判定された症例のうち、aPKC λ / ι のシグナル強度が1+であった低発現型の18症例では、その後CIN2~CIN3に増悪した症例が3例(増悪率17%)であった。これに対し、シグナル強度が2+又は3+であった高発現型の20症例では、その後CIN2~CIN3に増悪した症例が13症例(増悪率65%)であり、低発現型と比べて有意に(p=0.0015)増悪していた。この結果は、前がん病変部におけるaPKC λ / ι の発現量が高い場合にはその後有意に病変が増悪することを示している。

10

【0049】

また、初回生検標本のaPKC λ / ι の細胞内局在を分類した結果、CP(細胞質に局在)に分類された症例が19例、N(核に局在、又は核と細胞質に同程度に分布)に分類された症例が19例であった。各症例の経過観察後の病変の転帰は下記表2の通りであった。

20

【0050】

【表 2】

初回生検のaPKC λ / ι の細胞内局在	CIN1病変の転帰 (経過観察後のグレード評価結果)				合計
	CIN3 (増悪)	CIN2 (増悪)	CIN1 (不変)	病変なし (軽快)	
細胞質局在型(CP)	0例	3例	9例	7例	19例
核局在型(N)	6例	7例	3例	3例	19例

30

【0051】

表2の結果をグラフ化したものを図3-1に示す。初回生検でaPKC λ / ι が細胞質に局在していた19症例では、その後CIN2~CIN3に増悪した症例が3例のみ(増悪率15%)であった。一方、核局在型の19症例ではその後増悪した症例が13例(増悪率68%)であり、細胞質局在型症例と比べて有意に(p=0.001)増悪していた。この結果は、前がん病変部におけるaPKC λ / ι の細胞内分布が核局在型であった場合にはその後有意に病変が増悪することを示している。

【0052】

86症例についての累積病変進行率(増悪率)の解析結果を図3-2に示す。4年間の累積進行率は核局在群では63.1%、細胞質局在群では9.4%であり、aPKC λ / ι 核局在型症例では病変が進行しやすいことが本解析においても確認された。また、4年間の積病変消退率の解析結果を図3-3に示す。CIN1病変消退率(CIN1の消退=「CIN1が組織学的に正常上皮に戻る」と定義)として見たときも、核局在症例では病変が消退しにくく、aPKC λ / ι の核局在は病変増悪因子であることが確認された。

40

【0053】

<結果3>

市販のp16染色キット(CINtec p16 Histology、ロシュ社)をキット添付のプロトコールに従って使用し、初回生検標本のp16の発現量を調べてp16陰性又はp16陽性に分類した。その結果、p16陰性が11例、p16陽性が27例であった。各症例の経過観察後の病変の転帰は下記表3の通りであった。

50

【 0 0 5 4 】

【 表 3 】

初回生検のp16の発現	CIN1病変の転帰 (経過観察後のグレード評価結果)				合計
	CIN3 (増悪)	CIN2 (増悪)	CIN1 (不変)	病変なし (軽快)	
陰性	2例	1例	5例	3例	11例
陽性	4例	9例	7例	7例	27例

10

【 0 0 5 5 】

表3の結果をグラフ化したものを図4に示す。初回生検でp16陰性であった症例では、その後CIN2～CIN3に増悪した症例が3例（増悪率27%）であり、一方でp16陽性であった症例ではその後増悪した症例が13例（増悪率48%）であった。増悪率に有意差は認められなかったが（ $p=0.61$ ）、p16陽性であった症例はその後増悪する傾向にあるといえる。

【 0 0 5 6 】

< 結果 4 >

結果2及び3の結果から、aPKC / の細胞内分布とp16評価を組み合わせることで初回生検標本を分類し、経過観察後の各症例の病変の転帰との関連を調べた。結果を表4及び図5に示す。

20

【 0 0 5 7 】

【 表 4 】

初回生検の評価結果	CIN1病変の転帰 (経過観察後のグレード評価結果)				合計
	CIN3 (増悪)	CIN2 (増悪)	CIN1 (不変)	病変なし (軽快)	
p16陰性 aPKC細胞質局在	0例	0例	4例	3例	7例
p16陽性 aPKC細胞質局在	0例	3例	5例	4例	12例
p16陰性もしくは陽性 aPKC核局在	6例	7例	3例	3例	19例

30

【 0 0 5 8 】

初回生検でCIN1であった38症例のうち、

aPKC / 細胞質局在かつp16陰性の症例は増悪率0%、

aPKC / 細胞質局在かつp16陽性の症例は増悪率25%、

aPKC / 核局在の症例は増悪率68%、

という結果であった。aPKC / が細胞質局在型であった症例については、p16評価を併用するとさらにリスク分類を細分化することができる。

40

【 0 0 5 9 】

< 結果 5 >

HPV感染は子宮頸がんの発がんに必要な因子である。HPVの型により子宮頸がん発症リスクは異なる。一般的なHPV型判定検査では主に13種類の型（16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、68型）がハイリスクとされ、中でも16型及び18型が特にハイリスクとされる。病変進行のリスク因子（p16の発現に加えさらにHPV感染とaPKC / 局在パターン）と病変の進行の関連を調べるため、aPKC / 、HPV感染及びp16を説明変数としてCIN1病変の進行について多変量解析（多変量Cox回帰比例ハザード分析）を行なった。HPVのタイピングは、子宮頸部のぬぐい液から解析する場合は積

50

水メディカル社のClinichip(登録商標)を使用して行なった。ホルマリン固定パラフィン包埋からDNAを抽出する場合は、PCRで特異的な部位を増幅し、増幅産物を制限酵素で切断し、その分解産物の大きさからHPVの型を解析する方法(Nagano H, Yoshikawa H, Kawana T, et al. Association of multiple human papillomavirus types with vulvar neoplasias. J Obstet Gynaecol Res 1996; 22: 1-8.)を用いた。HPV感染については、16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、68型をハイリスクHPVと定義した。HPVの分類は、ハイリスク型陰性、16/18以外のハイリスク型、16/18型、及び不明(解析するサンプルが現存しないか、HPVの検出検査のために必要な検体量が確保できない検体)の4つのサブグループに分類した。

【0060】

CIN1病変の増悪と各説明変数の関連をコックス回帰比例ハザード分析により評価した結果を表5に示す。aPKC / が細胞質に局在するCIN1症例の病変が進行する割合を1とすると、aPKC / が核に局在する症例で病変が進行する割合は3.59であった(p=0.02)。同様に、HPV16/18型陽性の症例はHPV陰性の症例と比較して、病変が増悪しやすかった。aPKC / の核局在とHPV16/18型は、それぞれ独立に、CIN1病変が進行するリスク因子であることが明らかとなった。

【0061】

【表5】

CIN1が増悪する因子の解析(多変量Cox回帰比例ハザード分析)

変数	病変の進行	
	ハザード比(95%CI)	p
aPKC λ / ι 局在		
細胞質局在	1.00	
核局在	3.59 (1.24-10.4)	0.02
HPVタイプング		
陰性	1.00	
16/18以外のハイリスク型	2.91 (0.44-19.1)	0.27
16/18型	7.73 (1.33-44.9)	0.02
不明	1.31 (0.15-11.3)	0.81
p16発現(CINtec(登録商標))		
陰性	1.00	
陽性	0.85 (0.20-3.64)	0.83

【0062】

CIN1症例の中でHPV16/18型以外のハイリスクHPV陽性症例群とハイリスクHPV陰性症例群の2つのサブグループとに分けて解析をした。各サブグループ内で累積病変進行率を Kaplan-Meier法及びログランク検定にて解析した結果を図6に示す。いずれのHPV感染サブグループ内でも、aPKC / の核局在は細胞質局在と比較して病変進行リスクが有意に高いことが明らかとなった。ハイリスクHPV陽性(16/18型以外)の症例でも、aPKC / が細胞質局在の場合は4年後も病変の増悪が認められず(図6左)、またハイリスクHPV陰性でもaPKC / が核局在だと病変の増悪が認められた(図6右)。従って本発明の方法の適用により、例えば16/18型以外のハイリスクHPV陽性症例の中でも、病変が増悪する可能性が高い症例と低い症例を精度よく予測することができる。

【0063】

CIN1病変の消退と各説明変数の関連をコックス回帰比例ハザード分析により評価した結果を表6に示す。aPKC / の核局在とHPV16/18型は、それぞれ独立に、CIN1病変の消退を予測する因子であることが明らかとなった。aPKC / が細胞質に局在するCIN1症例の

病変が消退する割合を1とすると、aPKC / が核に局在する症例で病変が消退する割合は0.41であった (p=0.02)。同様に、HPV16/18型陽性の症例はHPV陰性の症例と比較して、病変が消退しにくいことが明らかとなった。

【 0 0 6 4 】

【表 6】

CIN1が消退する因子の解析 (多変量Cox回帰比例ハザード分析)

変数	病変の消退	
	ハザード比 (95%CI)	p
aPKC λ / ι 局在		
細胞質局在	1.00	
核局在	0.41 (0.19-0.78)	0.01
HPVタイピング		
陰性	1.00	
16/18以外のハイリスク型	0.97 (0.43-2.21)	0.94
16/18型	0.28 (0.09-0.90)	0.03
不明	1.73 (0.87-3.43)	0.12
p16発現 (CINtec(登録商標))		
陰性	1.00	
陽性	0.77 (0.32-1.21)	0.16

10

20

【 0 0 6 5 】

CIN1症例をハイリスクHPV陽性症例群 (HPV16/18型を除く) とハイリスクHPV陰性症例群とに分けて累積病変消退率をカプラン - マイヤー法及びログランク検定にて解析した結果を図7に示す。いずれのHPV感染サブグループでも、aPKC / の核局在は細胞質局在と比較して病変が有意に消退しにくいことが明らかとなった。

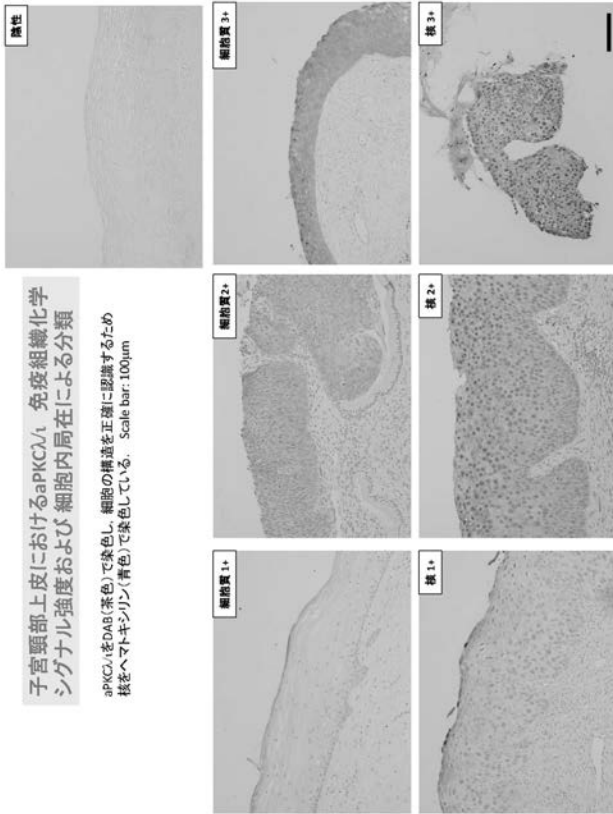
【 0 0 6 6 】

< CIN2症例を対象とした解析結果 >

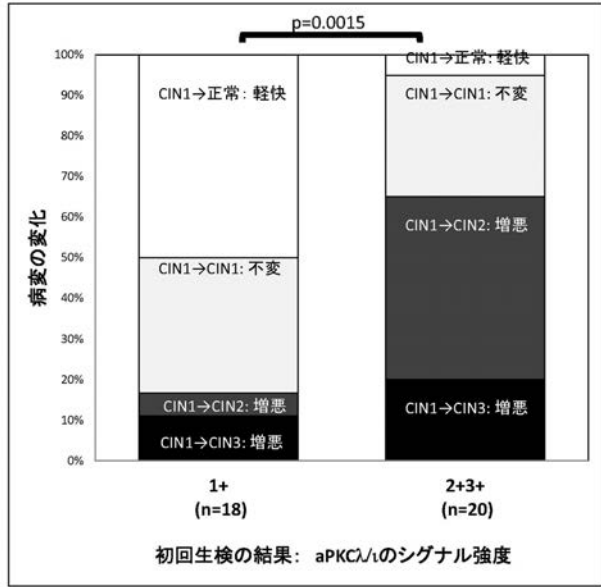
30

初回生検での診断結果がCIN2であった約40症例を対象とし、初回生検組織のaPKC / の発現解析結果とその後の病変の転帰との関連を調べた。その結果、核局在型症例ではCIN1 ~ 病変なしに改善した割合が26%であるのに対し、細胞質局在型症例では改善率は60%であった。病変の転帰に有意差は認められなかったものの (p=0.46)、CIN2の核局在型症例では細胞質局在型症例よりも病変が改善し難い傾向が認められた。

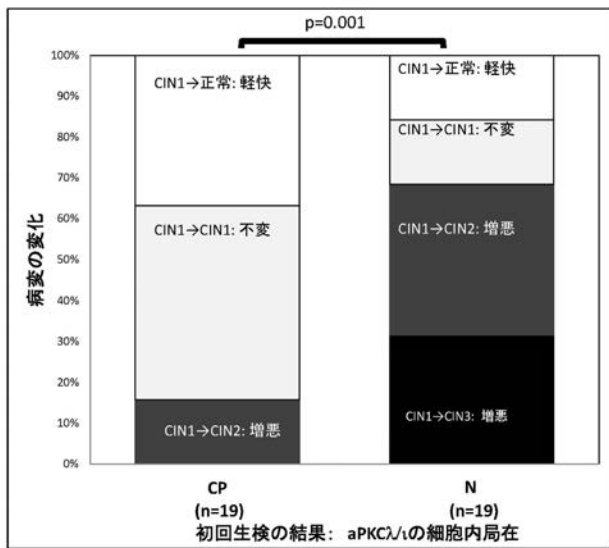
【 図 1 】



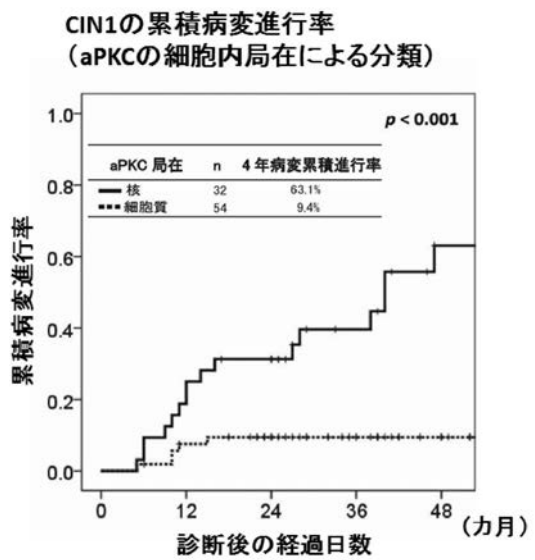
【 図 2 】



【 図 3 - 1 】

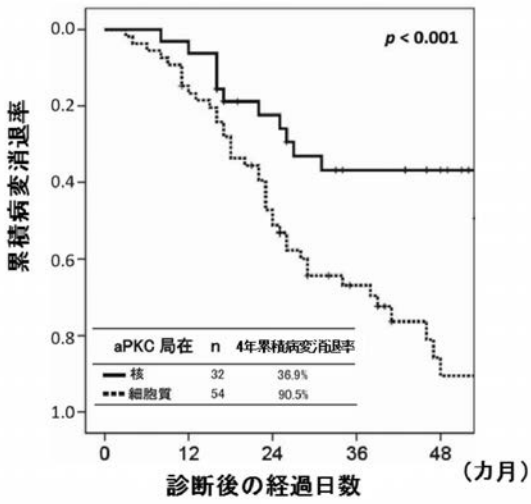


【 図 3 - 2 】

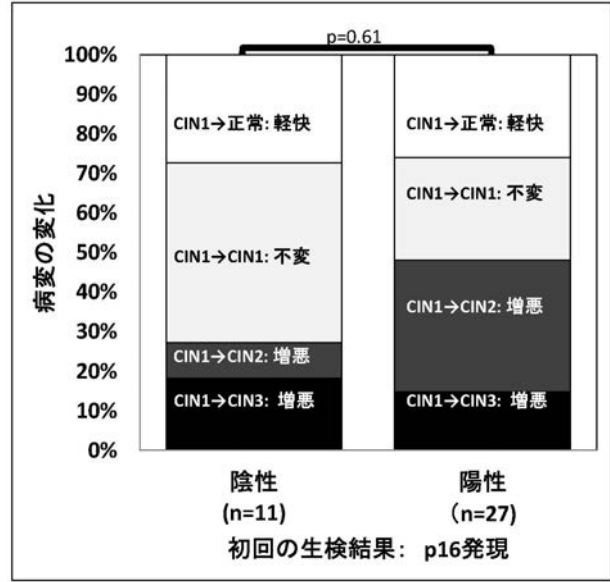


【 図 3 - 3 】

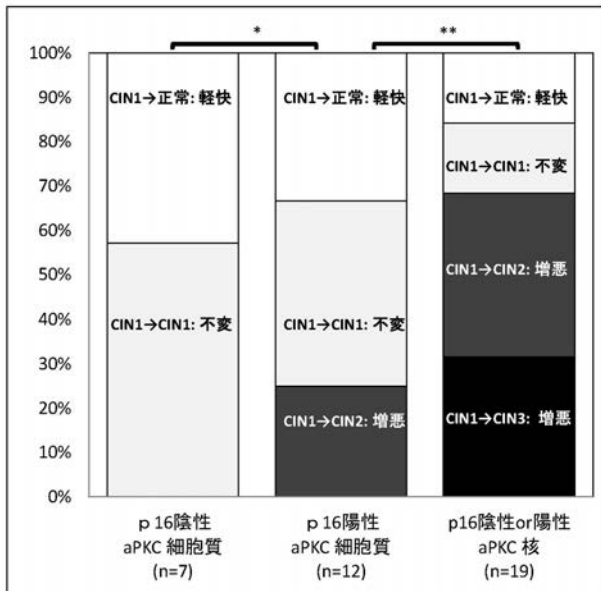
CIN1の累積病変消退率



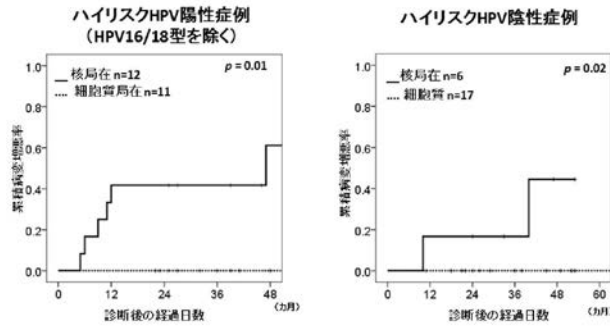
【 図 4 】



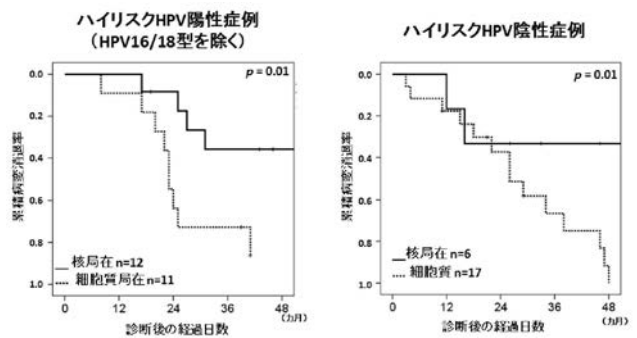
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2015119132000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/053041
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n 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, C12Q1/68, G01N33/48, 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (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.
Y	Taichi MIZUSHIMA et al., "Saibo Kyokusei Seigyo Inshi atypical protein kinaseCA/1 no Kajo Hatsugen Oyobi Kaku Kyokuzai wa Shikyukeigan no Yogo Furo Inshi de aru", Acta Obstetrica et Gynaecologia Japonica, 01 February 2013 (01.02.2013), vol.65, no.2, page 704	1-14
Y	Liu Xiaojiao et al., Disruption of precise regulation of α PKC expression and cellular localization is associated with cervical cancer progression, Archives of gynecology and obstetrics, 2013.08, Vol. 288, No. 2, pp. 401-8, Electronic Publication Date: 27 Feb 2013 Abstract, Fig. 5	1-14
<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 06 April 2015 (06.04.15)		Date of mailing of the international search report 21 April 2015 (21.04.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/053041

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-505247 A (Medical Research Council), 19 February 2004 (19.02.2004), abstract; claims 6, 11 & US 2003/0219726 A1 & WO 2002/008764 A1 & EP 1305631 A1	8, 9, 13
A	Shoichiro TSUGANE et al., "Biomarkers in predicting cancer risk and their application for cancer prevention", Cell technology, 22 August 2007 (22.08.2007), vol.26, no.9, pages 1009 to 1013	1-14
A	JP 2012-526286 A (OncoHealth Corp.), 25 October 2012 (25.10.2012), entire text; all drawings & US 2010/0120019 A1 & US 2012/0052486 A1 & WO 2010/129821 A1 & EP 2427763 A1 & CN 102449479 A	1-14
A	WO 2013/039394 A1 (SELF-SCREEN B.V.), 21 March 2013 (21.03.2013), entire text; all drawings & JP 2014-526907 A & EP 2756099 A1 & AU 2012309226 A & CA 2848654	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 3 0 4 1									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
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. G01N33/574, C12Q1/68, G01N33/48, 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 <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>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015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	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015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/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
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	水島大一等, 細胞極性制御因子 atypical protein kinaseC λ / ι の過剰発現および核局在は子宮頸癌の予後不良因子である, 日本産科婦人科学会雑誌, 2013.02.01, Vol.65 No.2 Page.704	1-14									
Y	Liu Xiaojiao et al., Disruption of precise regulation of α PKC expression and cellular localization is associated with cervical cancer progression, Archives of gynecology and obstetrics, 2013.08, Vol. 288, No. 2, pp. 401-8, Electronic Publication Date: 27 Feb 2013 Abstract, Fig.5	1-14									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 06.04.2015		国際調査報告の発送日 21.04.2015									
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) 三木 隆	2 J 3 3 1 2								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 2 5 2								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/053041
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	JP 2004-505247 A (メディカル リサーチ カウンシル) 2004.02.19, [要約] [請求項6] [請求項11] & US 2003/0219726 A1 & WO 2002/008764 A1 & EP 1305631 A1	8, 9, 13
A	津金昌一郎等, バイオマーカーが医療・創薬戦略を変える 癌予防の ためのバイオマーカー, 細胞工学, 2007.08.22, Vol.26 No.9 Page.1009-1013	1-14
A	JP 2012-526286 A (オンコヘルス コーポレーション) 2012.10.25, 全文・全図 & US 2010/0120019 A1 & US 2012/0052486 A1 & WO 2010/129821 A1 & EP 2427763 A1 & CN 102449479 A	1-14
A	WO 2013/039394 A1 (SELF-SCREEN B.V.) 2013.03.21, 全文・全図 & JP 2014-526907 A & EP 2756099 A1 & AU 2012309226 A & CA 2848654	1-14

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)	C 1 2 Q	1/68	A
			C 1 2 N	15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(72) 発明者 宮城 悦子
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目 9 番の 1 公立大学法人横浜市立大学内

(72) 発明者 佐藤 美紀子
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目 9 番の 1 公立大学法人横浜市立大学内

(72) 発明者 中谷 雅明
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目 9 番の 1 公立大学法人横浜市立大学内

F ターム (参考) 2G045 AA24 AA26 BA13 BA14 CB01 CB02 DA36 FA16 FB01 FB03
FB12 GB02 GB03 GB04 GC12 GC15
4B024 AA11 CA01 HA08 HA12
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ42 QR08 QR32 QR35 QR55 QR62
QS25 QX01

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。