

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5145549号
(P5145549)

(45) 発行日 平成25年2月20日(2013.2.20)

(24) 登録日 平成24年12月7日(2012.12.7)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 Z N A A
G O 1 N	33/574	(2006.01)	G O 1 N	33/574 A
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N	33/50 Z

請求項の数 2 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2006-218276 (P2006-218276)</p> <p>(22) 出願日 平成18年8月10日 (2006. 8. 10)</p> <p>(65) 公開番号 特開2008-35836 (P2008-35836A)</p> <p>(43) 公開日 平成20年2月21日 (2008. 2. 21)</p> <p>審査請求日 平成21年7月21日 (2009. 7. 21)</p>	<p>(73) 特許権者 305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190</p> <p>(72) 発明者 小泉 桂一 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内</p> <p>(72) 発明者 北條 莊三 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内</p> <p>(72) 発明者 常山 幸一 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内</p> <p>(72) 発明者 塚田 一博 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷 キャンパス内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】腫瘍マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ケモカインCXCL16の発現量を指標とする大腸がんの予後の状況を検査する方法。

【請求項2】

抗ケモカインCXCL16抗体を用いてケモカインCXCL16を検出する請求項1の検査する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ケモカインCXCL16の発現量を指標としてがんの予後の状況を判検査する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ケモカインは、細胞遊走を誘導する分子群であり、N末端保存されている2つのシステインの位置から、CXC、CCなど4グループに分類されている。

ケモカインとがんに係るものとして、CXCR4/CXCL12、CCR7/CCL21などががんの転移に関与していることが報告されている(非特許文献1)。

CXCL16は、スカベンジャー受容体活性とリンパ球遊走活性を有する特異的な膜結合型ケモカインである。このCXCL16の発現とがんとの関係について、CXCL16はヒト直腸がん

とが報告されている。(非特許文献2)

腫瘍マーカーには糖タンパク質、ホルモン、酵素など多くの種類があり、CEA(がん胎児性抗原)、CA19-9、CA50、Span-1、Dupan-2などが臨床応用されている。しかし、例えば、大腸がんのマーカーとして汎用されるCEAやCA19-9などは、肝炎や膵炎といった消化器系の炎症でも高値を示すなどするため、さらなるがんマーカーの探索が行われている。

また、一つの腫瘍マーカーだけでがんの有無や悪性度を判定することは実際上不可能であり、他種のマーカーとの併用およびレントゲン、CT、MRI等による診断との組み合わせが重要となる。

すなわち、がん特異性およびがんの悪性度、転移性、大きさ、予後に相関する新規の腫瘍マーカーが多数開発されればされるほど、がんの診断は正確性を増すといえる。

【0003】

【非特許文献1】医学のあゆみ、別冊(4月)、141-144(2006)

【非特許文献2】Int. J. Mol. Med, 14(1), 65-69(2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、新規な腫瘍マーカー、特にがんマーカーを提供することであり、ケモカインCXCL16(以下、CXCL16)の発現量を指標としてがんの予後の状況を検査する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、大腸がん組織標本におけるCXCL16発現と予後に対する検討を行い、CXCL16が腫瘍マーカー、特にがんマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。以下、知見を列挙する。

(1) 5種類のヒト大腸がん培養細胞におけるCXCL16発現を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction: RT-PCR)および酵素免疫測定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA)で検索した結果、全てにおいてCXCL16が発現している。

(2) 外科的切除症例の大腸がん組織におけるCXCL16 mRNAの発現は、非がん粘膜に対して大腸がん**に強く発現している。**

(3) CXCL16の発現と周囲浸潤細胞に関して免疫組織染色により検討を行った結果、CXCL16の発現は、58例中43例(74%)に認められた。しかし、非がん粘膜においてはCXCL16の発現を確認できたのはわずかに2例であり、大腸がん特異的に発現していると考えられた。

(4) 前がん病変のアデノーマにおいてもCXCL16が発現している。

(5) CXCL16陽性群と陰性群とに分け、がん周囲の浸潤CD4T細胞とCD8T細胞をカウントしたところ、陽性群において有意な増加を認めた。最終的に両群間の予後を比較するとCXCL16陽性群は予後良好であった。

(6) ヒト肺がん、乳がんの細胞株においてもCXCL16は高発現していることが確認した。

【発明の効果】

【0006】

CXCL16は、大腸がんをはじめ、ヒト肺がん、乳がん等に高発現し、また、体液中で測定されることから、その発現量を指標とすることで、がんの発症の有無、進行の程度または予後の状況を判定するための新規なマーカーとして使用できる

特に、大腸がんにおけるがん部と非がん粘膜部位での発現の差を指標に見出されたCXCL16は、免疫染色においても、おいてもCXCL16は高発現がん部に限局した染色性を示し、その発現とリンパ球浸潤との相関性が認められ、その強発現群が予後良好であり、予後マーカーとしての有用性が高い。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下、本発明についてさらに詳しく説明する。

・抗CXCL16抗体の作製

抗CXCL16抗体は、CXCL16の検出・測定に使用可能な限りにおいて、特にその構造・種類等は限定されるものではない。抗CXCL16抗体は、CXCL16の精製タンパク質、その組換えタンパク質（融合タンパク質等）、またはそのフラグメント（合成ペプチド等）などを免疫原（抗原）として用いることにより、公知の方法によりポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。公知の方法としては、Harlowらの「Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988)」、岩崎らの「単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA 講談社(1991)」、
10 「タンパク質実験ハンドブック 羊土社2003年8月15日発行」などの文献に記載の方法が例示されるが、特にこれらの方法に限定されるものではなく、これらの方法の改変法を含めた公知の抗体作製法の中から使用目的などに応じて適切な方法を選択すればよい。

【0008】

ポリクローナル抗体を作製する場合は、例えば、抗原で動物を免疫した後、その動物の血液から血清を得て、抗体価検定を行い、最終的に抗血清からポリクローナル抗体を調製または精製すればよい。免疫に使用する動物としては、ウサギ、マウス、ラット等が例示されるが、その他の実験動物を用いてもよく、特に限定されるものではない。

【0009】

上記抗原には、ヒト、マウス等のCXCL16の精製タンパク質、その組換えタンパク質（融合タンパク質等）、その抗原決定基（エピトープ）を含むフラグメント（合成ペプチド等）、その他のCXCL16タンパク質の誘導体や変異体、それらのアナログ、またはそれらを発現する細胞などを使用することができる。

【0010】

モノクローナル抗体を作製する場合は、例えば、上記抗原でマウスを免疫した後、そのマウス脾臓リンパ球とマウス由来のミエローマ細胞とを融合させて得られた抗体産生ハイブリドーマにより、モノクローナル抗体を精製すればよい。この場合も、免疫に使用する動物としては、マウスのほか、ラット、ウサギその他の実験動物を用いてもよく、特に限定されるものではない。

【0011】

ハイブリドーマの生産方法は、従来公知の方法、例えば、ハイブリドーマ法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256, 495-497(1975)）、トリオーマ法、ヒトB-細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, Immunology Today 4, 72(1983)）、EBV-ハイブリドーマ法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc., 77-96(1985)）、等が利用できるが、特に限定されるものではない。

また、モノクローナル抗体は、ファージディスプレイを用いて作製してもよい（Griffiths, A.D. and Duncan, A.R., Curr. Opin. Biotechnol., 9, 102-108(1998)他）。

【0012】

・CXCL16の検出方法

抗CXCL16抗体を使用したCXCL16の検出方法としては、ウエスタンブロット法（イムノブロット法）、ELISA法、サンドイッチELISA法などを挙げることができる。サンドイッチELISA法は、例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いて血液など体液中のCXCL16を定量化することができる。

【0013】

また、その他の公知の蛋白検出法によりCXCL16の検出・測定を行ってもよく、抗体をペルオキシダーゼ等の酵素により標識して目的のCXCL16を検出するELISA法のほか、抗体を蛍光分子や放射性同位元素などにより標識してCXCL16を検出してもよく、例えば、二次抗体に蛍光標識したものを使用する蛍光免疫染色法などを使用できる。

。

10

20

30

40

50

【0014】

検体（被検物）には、体液（血液、滑液、リンパ液、その他、尿、汗、消化液、およびこれらの成分を含む）のほかに、がん組織などの組織を検体に用いてCXCL16の検出・測定を行うことも可能であるが、この場合は、免疫組織化学法などを用いることにより、組織切片におけるCXCL16を検出できる。

【0015】

また、組織を検体に用いる場合は、CXCL16蛋白を直接検出する方法のほかに、CXCL16のmRNAを検出・測定することにより、CXCL16蛋白の発現の有無を間接的に検出してもよい。mRNAの検出には、核酸プローブを使用したインサイチュ・ハイブリダイゼーション(in situ hybridization)法などが使用できる。

10

【0016】

・本発明の利用態様

前述のように、本発明は、CXCL16を検出することにより、がんの検査・診断に利用できる。

CXCL16を用いてがん診断、特に血液によるがんの存在診断が実現すれば、治療後再発の超早期診断の新戦略となる。従って、病院の臨床検査部門、外部の臨床検査機関、医薬品および医学系研究所などにおいて、本発明は、腫瘍の検査・診断、手術後の再発・転移の確認などに利用できる。

【0017】

本発明の「がんの検査・診断方法」において、検査・診断対象となるがんの種類は、メラノーマ（黒色腫）、肺がん、扁平上皮がん（皮膚がん、子宮頸部がん、頭頸部がん、食道がん等）、血液性悪性腫瘍、消化器がん（大腸がん、膵がん、肝がん、胃がん等）、神経芽細胞腫、脳腫瘍、乳がん、精巣がん、前立腺がん、卵巣がんなどを挙げることができる。

20

【0018】

本発明を制がん剤のスクリーニング方法に応用することも可能である。制がん剤のスクリーニング方法に応用する場合は、制がん剤の候補物質をがん細胞またはがん組織に投与し、その後、本発明の方法によりCXCL16を検出等することで候補物質の抗がん作用を評価する。特に、ヒトがん細胞を移植した免疫不全マウス等のがんモデル動物を用いた実験において、当該動物を採血しCXCL16を検出するかさらにその発現量を測定することで、簡易迅速に候補物質の抗がん作用を評価できる。このように、本発明の検査・診断法は、ヒト（患者）に対して実施する場合のほか、実験動物に使用する場合も含まれる。

30

【実施例】

【0019】

以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

実施例1

[ヒト大腸がん組織・大腸がん細胞株でのCXCL16の発現（遺伝子レベル）]

QIA shredder (QIAGEN; USA) および RNeasy Mini Kit (QIAGEN; USA) を用いて、ヒト大腸がん組織、ヒト正常大腸粘膜組織およびヒト大腸がん細胞株 (Colo205、LS174T、SW480、T84) から全RNAを抽出し、Oligo(dT)12-18 Primer (Invitrogen; USA) および SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen; USA) を用いて相補的DNA (cDNA) を作製した。PCRには TaKaRa Ex TaqTM (TaKaRa; 日本)、ヒト・グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プライマーおよびヒトケモインCXCL16プライマーを用い、thermocycler (Bio-Rad; USA) により変性 (94 °C、30秒)、アニーリング (60 °C、60秒)、伸長 (72 °C、90秒) をプライマー特異的に行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により分離、エチジウムブロマイド染色により検出した。アガロースゲルの濃度は1.5%、泳動バ

40

50

ッファーにはTAE buffer (2M-Tris、2M酢酸、0.05M-EDTA、pH8.0)を用いた。Real-time PCRには、SYBR Premix Ex Taq (Takara;日本)および7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems;USA)を用いた。その結果、遺伝子レベルでのCXCL16の発現が確認された。(図1)

【0020】

実施例2

[ヒト大腸がん組織・大腸がん細胞株でのCXCL16の発現(タンパク質レベル)]
4種類のヒト大腸がん培養細胞株(Colo205, LS174T, SW480およびT84)について、各細胞の培養上清を用い、ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法(Human CXCL16 EKISA Development Kit 900-K230, PEPROTECH)によりCXCL16の発現量を測定した。その結果、Colo205;232pg/ml、SW480:300pg/ml、LS174T:1084pg/ml、T84:1193pg/mlであった。

10

【0021】

実施例3

[ケモカインとしての機能性の確認]

大腸がん培養細胞株から産生されるCXCL16がケモカインとしての機能性を有しているかを調べるため、遊走活性試験(chemotaxis assay)を行った。CXCL16の受容体であるCXCR6の発現細胞の遊走細胞数を計測することにより遊走活性を評価した。LS174T細胞の培養上清を用い、遊走したCXCR6発現細胞数を測定した。この培養上清は、対象の培養液と比較し、およそ1.5倍の遊走活性を示した。また、CXCL16中和抗体を添加することにより、この遊走活性は認められなくなった。以上より、大腸がん細胞株が産生するCXCL16は、ケモカイン活性を有することを確認した。

20

【0022】

実施例4

[がん組織と非がん組織でのCXCL16 mRNAの発現]

外科的に切除された大腸がん手術標本3例から、大腸がん組織および非がん部大腸粘膜(正常大腸粘膜)のRNAを抽出し、それぞれにおけるCXCL16の発現を調べた。実施例1と同様のRT-PCR法を用いた。その結果CXCL16 mRNAは、がん組織において正常組織より強く発現していることが確認された(図2)。

30

【0023】

実施例5

[外科的切除標本を用いた免疫組織染色法による大腸がんにおけるCXCL16の発現]
外科的切除標本(1998年~2001年)を用い免疫組織染色法により大腸がんにおけるCXCL16の発現を検討した。大腸がん組織におけるCXCL16の発現は、58例中43例(74%)に認められた。また周囲の正常粘膜細胞でCXCL16の発現が確認できたのはわずか2例であった。

【0024】

40

実施例6

外科的切除標本(1998年~2001年)中に腺腫病変を数例認めた。それらを免疫組織染色したところ、がん組織と同様にCXCL16の発現が確認できた。なお、大腸腺腫は大腸がんの前がん病変である。

【0025】

実施例7

[がん周囲の浸潤CD4T細胞とCD8T細胞]

免疫組織染色法にて大腸がん症例をCXCL16陽性群43例とCXCL16陰性群15例とに分けがん組織周囲浸潤細胞で検討を行った。CD4+細胞およびCD8+細胞を免疫組織染色にて判別し、光学顕微鏡にてがん組織と正常組織境界又はがん先進部における

50

それぞれの浸潤細胞数を手動的に計測した。1症例につき200倍視野で5視野計測し、その平均を浸潤細胞数とした。

CD4⁺細胞は、CXCL16陽性群71.9、陰性群44.2、CD8⁺細胞は、陽性群58.2 陰性群29.3と両細胞ともに、陽性群は浸潤細胞数が増加していた。

【0026】

実施例8

[統計学的検討]

CXCL16発現陽性群43例と発現陰性群15例に分け、年齢、性別および病理学的因子(腫瘍局在、組織型、壁深達度、静脈浸潤、リンパ管浸潤、リンパ節転移、肝転移およびDukes分類)に関し統計学的検討を行ったが、何れの因子に関しても両群間に有意差は認めなかった。しかしながら、それぞれの予後を検討すると、CXCL16陽性群は有意に予後良好な結果であった。(Log-rank test $p = 0.041$) (図3)。

10

【0027】

実施例9

[乳がん細胞株および肺がん細胞株での検討]

肺がん細胞3種(A549、Lu99、SBC5)、乳がん細胞5種(MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、SK-BR-3、ZR-75-1)を用い、実施例1と同様に、RT-PCR法でCXCL16の発現を調べた。その結果、いずれのがん細胞株においても、CXCL16が発現していた。

20

【産業上の利用可能性】

【0028】

以上のように、本発明は、(1)血清診断による腫瘍の検出確率の向上、(2)手術後の再発・転移の追跡確認、(3)制がん剤の開発などに利用することができ、産業上の有用性を有するものである。

【図面の簡単な説明】

【0029】

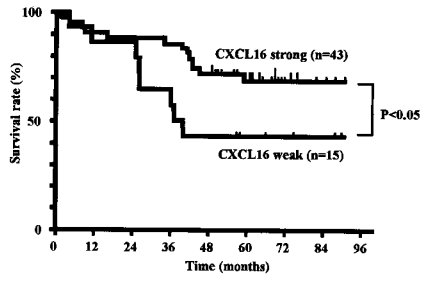
【図1】大腸がん細胞株でのCXCL16 mRNAの発現

【図2】がん組織と非がん組織でのCXCL16 mRNAの発現

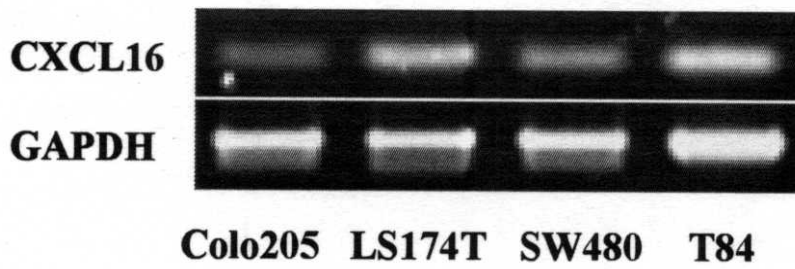
【図3】CXCL16陽性群と陰性群の予後

30

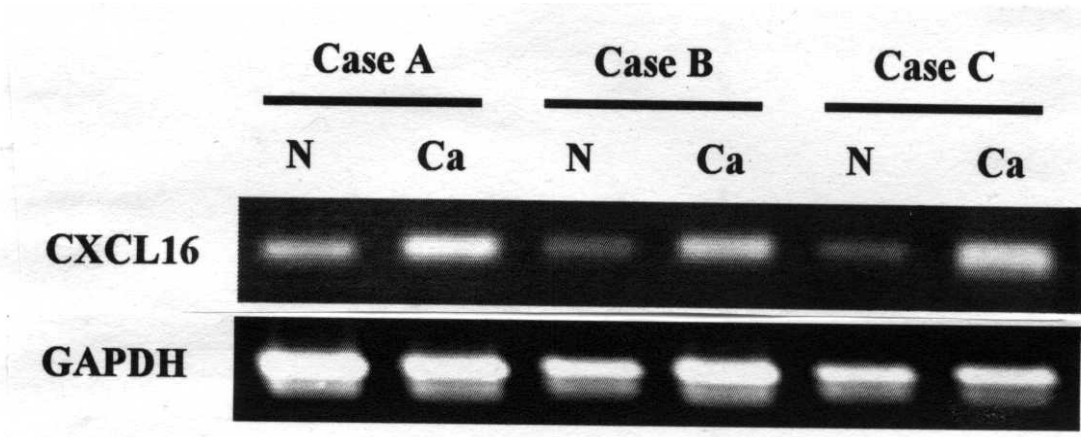
【 図 3 】



【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

フロントページの続き

(72)発明者 済木 育夫

富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内

審査官 引地 進

(56)参考文献 J Neurochem, (2005), vol.93, no.5, p.1293-1303
Proc Amer Assoc Cancer Res,, (2006 Apr), vol.47, p.67
Proc Amer Assoc Cancer Res,, (2005), vol.46, p.1415
Life Sci, (2006 Mar), vol.78, no.16, p.1784-1793

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

PubMed

BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)