

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4887505号
(P4887505)

(45) 発行日 平成24年2月29日(2012.2.29)

(24) 登録日 平成23年12月22日(2011.12.22)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
G O 1 N	33/574	(2006.01)	G O 1 N	33/574	A
C O 7 K	16/30	(2006.01)	C O 7 K	16/30	

請求項の数 7 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2007-526861 (P2007-526861)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月14日(2006.4.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/307949
 (87) 国際公開番号 W02006/112400
 (87) 国際公開日 平成18年10月26日(2006.10.26)
 審査請求日 平成21年3月31日(2009.3.31)
 (31) 優先権主張番号 特願2005-119289 (P2005-119289)
 (32) 優先日 平成17年4月18日(2005.4.18)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504300181
 国立大学法人浜松医科大学
 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号
 (74) 代理人 100110249
 弁理士 下田 昭
 (74) 代理人 100113022
 弁理士 赤尾 謙一郎
 (72) 発明者 北川 雅敏
 静岡県浜松市半田山4-17-12
 (72) 発明者 高 芸
 静岡県浜松市半田山4-4-34-202
 (72) 発明者 北川 恭子
 静岡県浜松市半田山4-17-12

審査官 吉森 晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の転移性及び浸潤能の検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検査対象の細胞又は組織におけるGタンパク共役型受容体GPR48の発現を検出することからなる癌の転移性の検査方法。

【請求項2】

検査対象の細胞又は組織におけるGタンパク共役型受容体GPR48の発現を検出することからなる癌の浸潤能の検査方法。

【請求項3】

前記検出の方法が、抗原抗体反応、RT-PCR、cDNAマイクロアレイ、ノーザンブロットティング、マススペクトロメトリー解析、又はプロテインチップ解析によるものである請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記細胞又は組織が、癌の疑いのある患者からの生検試料又は外科的手法によって癌の疑いのある患者から採取された細胞又は組織である請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

Gタンパク共役型受容体GPR48の細胞外ドメインに相当するペプチドに対する抗体を用いて、前記細胞のこの抗体に対する反応性を調べることから成る請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

Gタンパク共役型受容体GPR48の配列中の適当な2つのプライマーを用いたRT-PCR法により、前記細胞におけるGPR48の発現量を調べることから成る請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

Gタンパク共役型受容体GPR48の細胞外ドメインに相当するペプチドに対する抗体を主成分とする癌の転移性及び浸潤能を検査するための検査薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、癌、特に予後不良の癌の検査方法に関し、より詳細には、癌、特に予後不良の癌の疑いのある患者の細胞及び組織における転移浸潤能に關与する遺伝子の発現を調べることにより、癌の転移性及び浸潤性を検査する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

癌の治療では、外科手術、放射線治療、免疫療法、化学療法等の治療法が行われており、それらの進歩により癌の治癒率は上昇している。しかしこれらの治療法は原発癌に限られ、転移性の高い癌は予後不良で治癒率は総じて低い。また、従来の転移浸潤に代表される予後の診断法は、信頼性、感度、簡便性が不足している。

一方、大腸癌、乳癌、胃癌、肺癌等の癌において、細胞周期制御因子であるCDK阻害タンパク質p27^{Kip1}の発現量低下が見出され、p27^{Kip1}の発現量が低下している癌では予後が悪いという報告がある(非特許文献1~3)。しかしp27^{Kip1}の発現量低下で何故予後が悪いのかは不明であった。

20

なお本発明者らにより予後不良の癌及び癌細胞の転移浸潤性に關連することが解明されたGPR48は、7回貫通ドメインを有するタンパク質のスーパーファミリーに属するロイシンリッチリピートを含むGタンパク質結合レセプターであることは知られていたが、その機能は不明であった(非特許文献4,5)。

【0003】

【非特許文献1】Nature Medicine 1997 Feb;3(2):222-5.

【非特許文献2】Nature Medicine 1997 Feb;3(2):227-30.

【非特許文献3】Nature Medicine 1997 Feb;3(2):231-4

【非特許文献4】Mol Endocrinol. 2004 Sep;18(9):2241-54. Epub 2004 Jun 10.

【非特許文献5】Mol Endocrinol. 1998 Dec;12(12):1830-45.

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、p27^{Kip1}の発現量が低下している癌では予後が悪い(非特許文献1~3)ことの原因を解明するために、p27^{Kip1}の発現量低下によっておこる遺伝子発現を解析し、予後不良化の原因を解明すれば、癌の診断に応用できると考えた。

即ち、本発明は、癌、特に予後不良の癌を検査するための方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

40

【0005】

本発明者らは、p27^{Kip1}の発現量が低下したモデルを作成し、変動している遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。即ち、ヒト大腸癌細胞株HCT116のp27^{Kip1}遺伝子をジーンターゲット法により片側ノックアウトした細胞(HCT-hp27-hKO)を作成し、p27^{Kip1}の発現量が低下していることを確認してモデル細胞とした。親株のHCT116に比べHCT-hp27-hKOで発現変動している遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、HCT-hp27-hKOにおいてGタンパク共役型受容体GPR48遺伝子(AF257182)の発現が有意に亢進していることが明らかになった。

本発明者らは、更にGPR48と転移との関係を解明する研究を行った結果、GPR48が癌細胞の浸潤能を亢進させる機能を持つことを見出し、本発明を完成させるに至った。

50

【0006】

即ち、本発明は、検査対象の細胞又は組織におけるGタンパク共役型受容体GPR48の発現を検出することからなる癌の転移性の検査方法であり、検査対象の細胞又は組織におけるGタンパク共役型受容体GPR48の発現を検出することからなる癌の浸潤能の検査方法である。

また、本発明は、癌患者の癌部組織検体を用いてGPR48の発現量を定量的RT-PCR又は抗GPR48抗体を用いた免疫組織染色や酵素免疫抗体法等の免疫学的方法により転移の可能性を診断する方法である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明は、Gタンパク共役型受容体GPR48が癌細胞の浸潤能を促進する機能を持ち、癌の浸潤転移の指標となることを見出したことに基づく、GPR48の発現を検出することからなる癌の転移性及び浸潤能の検査方法である。

検査の対象となる癌は如何なる癌でもよく、例えば、大腸癌、乳癌、胃癌、肺癌、胆道癌（胆管細胞癌、胆嚢癌）、膵癌、食道癌、肝細胞癌、喉頭癌、咽頭癌、甲状腺癌、子宮癌、卵巣癌、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱癌、悪性黒色腫、脳腫瘍などが挙げられる。

検査対象の細胞又は組織は、被検者から採取した細胞又は組織であることが好ましく、癌の疑いのある患者からの生検試料又は外科的手法によって癌の疑いのある患者から採取された細胞又は組織であることがより好ましい。

【0008】

GPR48の発現を検出する方法に特に制限は無いが、抗原抗体反応、RT-PCR、cDNAマイクロアレイ、ノーザンブロッティング、マススペクトロメトリー解析、プロテインチップ解析等が挙げられる。これらは各分野の常法に従って行えばよい。

【0009】

RT-PCRとしては、通常のRT-PCR又はリアルタイムRT-PCRでもよい。

ヒトGPR48（配列番号1）から、常法に従ってヒトGPR48 mRNAを特異的に増幅するプライマーを設計する。プライマーの配列はヒトGPR48 mRNA中の配列で特異的な増幅を示すものあれば特に制限するものではない。Gタンパク共役型受容体GPR48の配列中の適当な2つのプライマーを用いたRT-PCR法により、前記細胞におけるGPR48の発現量を調べることができる。

【0010】

抗原抗体反応を検知する方法に特に制限はないが、免疫組織染色（蛍光染色含む）、FACS（フローサイトメトリー）、イムノプロット法、ドットプロット法、ELISA等を用いることができる。

ヒトGPR48（配列番号2）の細胞外ドメインに相当するペプチドを抗原として抗体を作成することが好ましい。この細胞外ドメインは、ヒトGPR48（配列番号2）のアミノ酸No.1~542であり、この細胞外ドメイン全体あるいはその部分に対する抗体であればよい。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。この抗体は、この抗体を主成分とする癌の検査薬、特に予後不良の癌の検査薬として利用できる。

検査方法の例を挙げると、本発明の抗体を、検体中に存在するGPR48と反応させ、更にこの抗体を認識するプローブを反応させる。このプローブとしては、抗ヒトIgG抗体、プロテインG、プロテインA、プロテインLなどが挙げられる。このプローブには通常標識を付す。この標識としては、放射性同位元素（¹²⁵I）、酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ）、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。酵素抗体を用いた場合には、基質を反応させてその変化（着色等）を観察すればよい。

【0011】

cDNAマイクロアレイの場合には、ヒトGPR48（配列番号1）由来のmRNAに対応する多数のプローブ（DNA）を固定したDNAチップを用意する。一方、検査対象の細胞又は組織からRNA分画又はmRNAを調製し、これと相補的なDNAを蛍光色素で標識して合成する。これを上記DNAチップに対合させて蛍光を測定することにより、

10

20

30

40

50

GPR48の発現を検出することができる。

ノーザンブロッティングの場合には、検体からRNA分画あるいはmRNAを調整した後、電気泳動により分画したRNAを、ゲルからニトロセルロース膜等に固定する。これにヒトGPR48（配列番号1）から作成した標識DNA（プローブ）に対合させて、発現するmRNAを検出して、GPR48の発現を知ることができる。

マススペクトロメトリー（質量分析）解析には、検体からタンパク質を抽出し、質量分析機で分析し、GPR48のアミノ酸配列を持つ断片の量を測定することによりGPR48の発現を知ることができる。

プロテインチップ解析の場合には、検体からタンパク質を抽出し、GPR48の抗体等を固定したチップと反応させ、洗浄後、発色させプロテインチップ解析装置により量を測定することによりGPR48の発現を知ることができる。

10

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【0012】

本実施例及び参考例において、定量的RT-PCR(QRT-PCR)法は以下の手順で行った。

培養細胞（又は凍結検体）にIsogen（和光社製）試薬を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし遠心し、エタノール沈殿し、RNAを抽出した。このRNAを鋳型にして、ランダムオリゴプライマーを用いてSuperScript Reverse Transcriptase（Invitrogen社製）でcDNAを合成した。

次にGPR48の発現量を定量するため、CAGTACCCAGTGAAGCCATT（配列番号3）及びTGTTGTCATCCAGCCACAGA（配列番号4）をヒトGPR48のプライマーセットとし、定量的RT-PCR（Cyber Green法）を行った。タックマン法等他のQRT-PCR法を用いてもよい。

20

耐熱性ポリメラーゼを含む反応液にプライマーセットと検体のcDNAを加え、リアルタイムPCR機（ロッシュ社製、Light Cycler）にセットし、94 15秒の熱変性のあと、54 20秒及び72 20秒のサイクル増幅を行うことによりGPR48mRNA量を定量した。

【0013】

また、本実施例及び参考例において、細胞の浸潤能は下記の方法で調べた。

マトリゲル浸潤チャンパー（Matrigel invasion chamber、BD Bioscience社製、24-well plate size）を用い、マトリゲル(matrigel)でコーティングされたPET膜（PET membrane、ポアサイズ8.0- μm ）のchamberの上にこれらの細胞を 5×10^4 cells/wellの数で播いた。チャンパーの下のウェル（well）中には、ケモアトラクタント（chemo-attractant）として $10 \mu\text{g/ml}$ フィブロネクチン（fibronectin、Roche製）を含んだ培地 $750 \mu\text{l}$ をいれた。36時間後、37 $^{\circ}\text{C}$ のCO₂インキュベーターから出して、綿棒でチャンパーの上の細胞を取り除き、マトリゲルを通り抜け、チャンパーの下へ浸潤した細胞をDiff-Quik kit（International Reagents Corporation社製）で染色し、顕微鏡で100倍拡大の条件で観察し、全視野の細胞を数えた。3回実験を行い、毎回の実験で1サンプルについて、3ウェルずつ実験を行った。

30

【0014】

参考例 1

GPR48の癌細胞における機能を調べるためにGPR48発現プラスミド（pcDNA4-HisMax-hGPR48）又は空ベクター（pcDNA4-HisMax）をヒト大腸癌細胞HCT116にトランスフェクトし、導入された細胞をZeocinで選択し、安定発現細胞株（GPR48-19、GPR48-33、Vector 2及びVector 6）を得た。これらの細胞におけるGPR48発現を、定量的RT-PCR法により調べた。その結果を図1に示す。pcDNA4-HisMax-hGPR48が導入されたGPR48-19、GPR48-33においてGPR48mRNAが高発現していることが確認された。

40

次に、培養細胞の浸潤能を調べた。図2は、浸潤した細胞を染色した写真である。図3はその結果をグラフで表し、統計処理したものを示す。*印は、0.01以下の危険率で有意にGPR48-19、GPR48-33が対照のベクターより浸潤能が高いことを示す。

その結果、GPR48mRNAを高発現しているGPR48-19、GPR48-33細胞は対照群のVector 2、Vector 6より明らかに浸潤能が高いことがわかった。

50

即ち、GPR48は癌細胞の浸潤を促進するといえる。

【実施例 1】

【0015】

本実施例では、定量的RT-PCR法によるヒト大腸癌検体におけるGPR48の発現解析を行った。

インフォームドコンセントを取った29例のヒト大腸癌検体について、定量的RT-PCR法によってGPR48の発現解析を行った。図4に29例の癌部及び正常部におけるGPR48mRNAの発現量を示す。

14例は癌部と正常部で発現に大きな差がなかった。一方*印で示したCase No 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 26, 27, 28の15例は正常部に比較して癌部で2倍以上GPR48mRNAの発現量が亢進していた。

10

【実施例 2】

【0016】

ヒト大腸癌検体のGPR48の発現量を調べ、病理所見との相関性を調べた。その結果を表1に示す。なお、表中のP値(危険率)は、統計処理後の危険率(例えば、この値が0.02だと2%)で有意であるとされる。一般に0.05以下が有意性があり、低いほど有意性が高い(信頼性が高い、危険率が低い)とされる。

【表 1】

病理所見	例数	GPR48 発現量 (癌部/正常部)	P 値	
年齢				
≤ 65	14	2.659		
> 65	15	4.129	0.15	10
性別				
男性	19	2.854		
女性	10	4.534	0.16	
癌の大きさ (cm)				
≤ 5	14	4.248		
> 5	15	2.597	0.18	20
分化度				
高分化	22	2.383		
中程度	7	6.283	0.004	
血管浸潤				
無	14	3.369		
有	15	3.417	0.972	
リンパ管浸潤				
無	18	2.199		30
有	11	5.348	0.020	
リンパ節転移				
無	19	2.111		
有	10	5.603	0.013	

その結果、分化度（中程度）、リンパ管浸潤（有）及びリンパ節転移（有）とGPR48の発現亢進が有意な相関を示した。GPR48は癌細胞の浸潤を促進する機能を持っていること（参考例 1）を考え合わせると、GPR48の発現亢進はヒトの癌の転移浸潤性の亢進を導いていると考えられる。

【実施例 3】

【0017】

本実施例では、免疫組織学的解析によるヒト大腸癌検体におけるGPR48の発現解析を行った。

ヒトGPR48（配列番号 2）の細胞外部位のアミノ酸339から350の配列をもつペプチド（CQEQLMLRTLDL）を化学合成し、KLHと結合させた後ウサギに4回免疫した。抗体価が上がったのを確認し、全採血して抗血清を得た。抗原であるこのペプチドを共有結合させたレジ

40

50

ンを作成し、これに抗血清を吸着させて洗浄後、低pH溶出液により溶出させて中和して、精製抗ヒトGPR48抗体とした。GPR48発現ベクター(pcDNA4-HisMax-hGPR48)をトランスフェクションした293細胞又はHCT116細胞の抽出液をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離し、ウエスタンブロット解析した。その結果、分子量104kDにヒトGPR48のバンドが検出された。

同時に免疫蛍光染色を行いGPR48の発現に対応した反応性を確認し、本抗体がGPR48に対する特異抗体であることを確認した。

免疫組織学的染色はHistofine SAB キット(ニチレイ社)を用いて行った。具体的には、パラフィン包埋した組織の切片を脱パラフィン後、10 mMのクエン酸緩衝液中マイクロウェーブオープンで処理し、0.3%過酸化水素で内因性パーオキシダーゼを消去した。次に200分の1に希釈した精製抗GPR48抗体で浸し、4 で一夜反応させた。続いてビオチン結合2次抗体(抗ウサギIgG)と反応させ、その後ストレプトアビジン結合西洋わさびパーオキシダーゼと反応させ、洗浄後ジアミノベンチジンを含む発色液に漬けて発色させた。さらにヘマトキシリンで核を青に染め、カバー硝子でマウントし、顕微鏡観察した。

【0018】

この免疫組織学的染色法を用いて、実施例1と同じ大腸癌検体を解析した染色例を図5に示す。

強陽性例では癌細胞が強く褐色に染色され、正常細胞はほとんど染色されなかった。一方、陰性例では癌細胞、正常細胞ともに弱く染色されるにとどまった。Case No 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 28について解析した結果、Case No 1, 2, 3, 4, 7, 11, 12, 15, 24, 28の癌部で中～強陽性を示し、それ以外のCase No 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, では弱陽性から陰性であった。

この免疫組織学的染色の結果は、表2に示すように、実施例1のGPR48mRNAの発現量の測定結果と一致した。

【表2】

Case No.	定量的 RT-PCR 法 GPRmRNA (癌部 / 正常部)	免疫組織染色 GPR タンパク質
1	5.94	+++
2	3.70	++
3	4.30	++
4	3.18	++
6	1.03	+
7	0.88	+
8	1.28	-
9	1.32	+
10	1.34	+
11	1.00	-
12	1.10	-
13	1.58	+
14	1.20	-
15	3.22	+++
16	1.41	-
24	8.83	++++
28	4.35	+++

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】 GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞におけるGPR48mRNAの発現量を示す図である。

【図2】 GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞において細胞が浸潤していることを示す写真である。各写真の横幅は0.34mmである。灰色の点はマトリゲルでコーティングされたPET membraneのポア（穴）、黒色の点は浸潤して通り抜けた細胞を示す。（1）はHCT116細胞にpcDNA4-His Maxベクターを導入した対照群の浸潤細胞を示し、（2）はHCT116細胞にpcDNA4-His Max-GPR48を導入したGPR48高発現細胞の浸潤細胞を示す。

【図3】 GPR48発現プラスミドを導入したヒト大腸癌細胞において浸潤した細胞数を示す図である。縦軸は、マトリゲルでコーティングされたPET membrane（ポアサイズ8.0-μm）のポア（穴）を浸潤して通り抜けた細胞の数(1チャンバーあたりの浸潤細胞の総数)を示す。

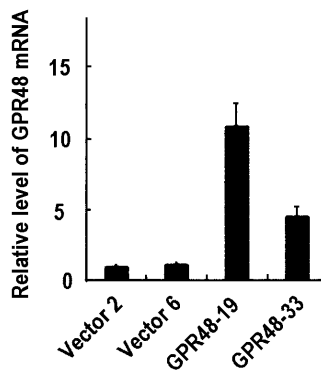
10

【図4】 ヒト大腸癌検体におけるGPR48の発現解析（定量的RT-PCR）を示す図である。横軸は各検体のGPR48の発現量をGAPDHの発現量で割って補正した値を示す。

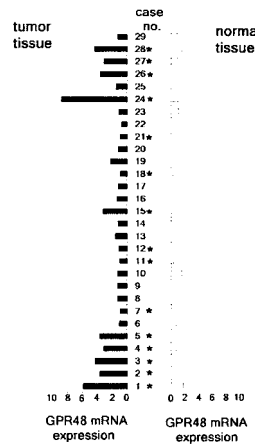
【図5】 ヒト大腸癌検体におけるGPR48の発現解析（免疫組織染色）を示す図である。図中、黒丸（カラーでは青色で、ヘマトキシリン-エオジン染色によるものである）は核を示す。陽性例で、核の周りの細胞質で灰色（黒に近い灰色、カラーでは濃い茶色）に染まっている部分がGPR48であり、癌部を示す。その間の染まっていない部分（白色）は間質細胞（正常）である。陰性例は、灰色（カラーでは茶色）で示されるGPR48の反応が非常に弱い。

20

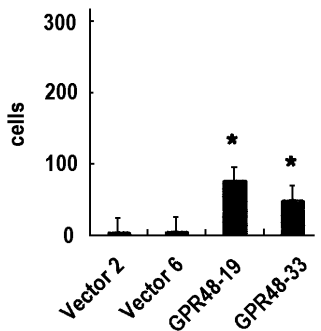
【図1】



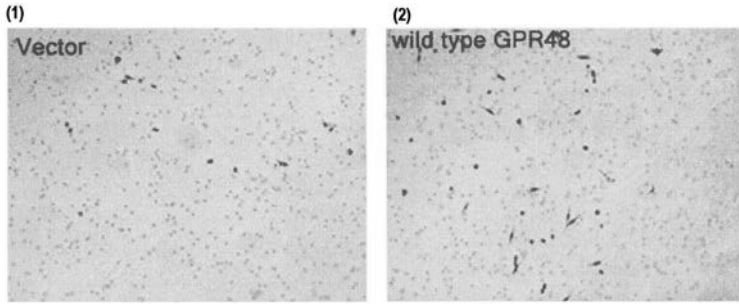
【図4】



【図3】

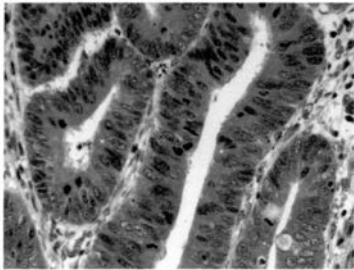


【 図 2 】

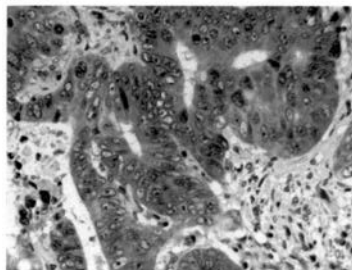


【 図 5 】

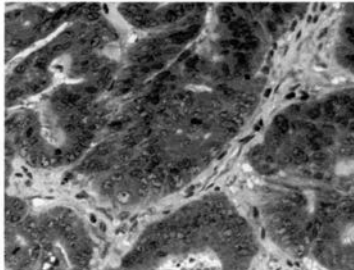
GPR48 強陽性例
No.1



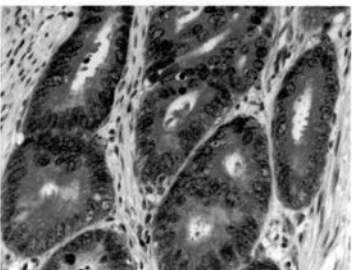
No.15



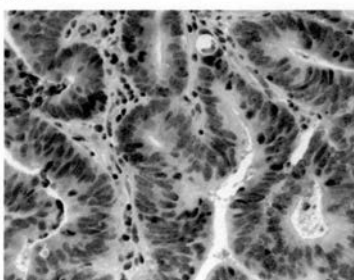
No.24



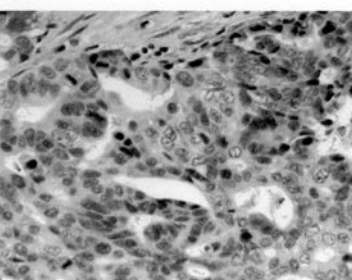
No.28



GPR48 陰性例
No.11



No.12



【 配列表 】

0004887505000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第01/092297(WO, A1)
国際公開第01/053337(WO, A1)
文部科学省特定領域研究「がん」研究報告集録平成15年度<2003年度>, 2005年 1月28日, p.195-196
Mol. Endocrinol., 2004年, Vol.18, No.9, p.2241-2254
Mol. Endocrinol., 1998年, Vol.12, No.12, p.1830-1845

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
SwissProt/PIR/GeneSeq