

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-155506

(P2018-155506A)

(43) 公開日 平成30年10月4日(2018.10.4)

| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)  | GO 1 N 33/53  | P 4 H O 4 5 |
| <b>GO 1 N 33/574</b> (2006.01) | GO 1 N 33/574 |             |
| <b>CO 7 K 14/52</b> (2006.01)  | CO 7 K 14/52  |             |

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁)

|           |                            |          |  |
|-----------|----------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2017-50329 (P2017-50329) | (71) 出願人 | 504160781<br>国立大学法人金沢大学<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地 |
| (22) 出願日  | 平成29年3月15日 (2017.3.15)     | (74) 代理人 | 100091096<br>弁理士 平木 祐輔                   |
|           |                            | (74) 代理人 | 100118773<br>弁理士 藤田 節                    |
|           |                            | (74) 代理人 | 100111741<br>弁理士 田中 夏夫                   |
|           |                            | (72) 発明者 | 酒井 佳夫<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内       |
|           |                            | (72) 発明者 | 金子 周一<br>石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内       |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中ケモカインをマーカーとして用いた大腸癌の検出

(57) 【要約】

【課題】大腸癌に特異的な腫瘍マーカーを用いて大腸癌を検出する方法及び該方法を行うための検査試薬の提供。

【解決手段】被験体より採取した血液中のMIP-1 及び/又はEotaxinを測定することを含む、大腸癌を検出する方法、並びに該方法に用いる検査試薬であって、抗MIP-1 抗体及び/又は抗Eotaxin抗体を含む検査試薬。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体より採取した血液中のMIP-1 及び / 又はEotaxinを測定することを含む、大腸癌を検出する方法。

**【請求項 2】**

被験体より採取した血液中のMIP-1 及びEotaxinを測定することを含む、請求項 1 記載の大腸癌を検出する方法。

**【請求項 3】**

被験体の血液中のMIP-1 濃度が健常人の血液中のMIP-1 濃度よりも高いか、あるいは被験体の血液中のEotaxin濃度が健常人の血液中のEotaxin濃度よりも高い場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、請求項 1 又は 2 記載の大腸癌を検出する方法。

10

**【請求項 4】**

被験体の血液中のMIP-1 濃度が健常人の血液中のMIP-1 濃度よりも高く、かつ被験体の血液中のEotaxin濃度が健常人の血液中のEotaxin濃度よりも高い場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、請求項 1 又は 2 記載の大腸癌を検出する方法。

**【請求項 5】**

被験体の血液中のMIP-1 濃度が35pg/mL以上であるか、又はEotaxin濃度が150pg/mL以上である場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、請求項 1 又は 2 記載の大腸癌を検出する方法。

**【請求項 6】**

被験体の血液中のMIP-1 濃度が35pg/mL以上であり、かつEotaxin濃度が150pg/mL以上である場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、請求項 1 又は 2 記載の大腸癌を検出する方法。

20

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の大腸癌を検出する方法に用いる検査試薬であって、抗MIP-1 抗体及び / 又は抗Eotaxin抗体を含む検査試薬。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、大腸癌を検出する癌の検査に関する。

30

**【背景技術】****【0002】**

大腸癌は日本人で部位別のがん死亡数（男女計）順位が3番目の消化器系悪性腫瘍であり、厚生労働省調べでは年間4万1千人の患者が死亡する。胃癌・大腸癌ともに早期発見し治療を行えば完治しうるが、早期病変であるほど臨床症状を呈さず、進行した状態で発見され予後不良の転帰をとる症例も認められる。早期発見の契機として、検診の際の内視鏡・画像検査にて偶然に発見される場合や、癌とは直接的に関連しない症状を精査する過程で発見される場合も多い。

**【0003】**

現在のところ、大腸癌の検査として、便中の血液を調べる便潜血検査が主に用いられている。また、血中の大腸癌検出のための腫瘍マーカーとしては、CEA（癌胎児性抗原）やCA19-9が用いられている（非特許文献1を参照）。便鮮血検査は、侵襲性が低い簡便な検査であるが、痔で陽性になるなど、感度、特異性は高くない。また、CEAの感度は約40%であり、CA19-9の感度は約20%と必ずしも高くない。どちらのマーカーも進行癌になると感度が高くなるが、早期癌では必ずしも有用ではない。

40

**【0004】**

このように、現在のところ、消化器癌の早期発見に有用な血液診断マーカーは存在しない。消化器癌の存在を出来るだけ早い段階で診断できるシステムを確立することは極めて重要である。

**【先行技術文献】**

50

## 【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】大腸がん、国立がん研究センター がん情報サービス 各種がん 103 第2版 2012年3月

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は大腸癌に特異的な腫瘍マーカーを用いて大腸癌を検出する方法及び該方法を行うための検査試薬の提供を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、大腸癌患者の血液中で上昇する液性因子の同定について鋭意検討を行った。その結果、ケモカインの1種であるMIP-1 及びEotaxin(エオタキシン)が大腸癌患者の血液中で有意に濃度が上昇し、大腸癌検出のための有用な腫瘍マーカーとなり得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 被験体より採取した血液中のMIP-1 及び/又はEotaxinを測定することを含む、大腸癌を検出する方法。

[2] 被験体より採取した血液中のMIP-1 及びEotaxinを測定することを含む、[1]の大腸癌を検出する方法。

[3] 被験体の血液中のMIP-1 濃度が健常人の血液中のMIP-1 濃度よりも高いか、あるいは被験体の血液中のEotaxin濃度が健常人の血液中のEotaxin濃度よりも高い場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、[1]又は[2]の大腸癌を検出する方法。

[4] 被験体の血液中のMIP-1 濃度が健常人の血液中のMIP-1 濃度よりも高く、かつ被験体の血液中のEotaxin濃度が健常人の血液中のEotaxin濃度よりも高い場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、[1]又は[2]の大腸癌を検出する方法。

[5] 被験体の血液中のMIP-1 濃度が35pg/mL以上であるか、又はEotaxin濃度が150pg/mL以上である場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、[1]又は[2]の大腸癌を検出する方法。

[6] 被験体の血液中のMIP-1 濃度が35pg/mL以上であり、かつEotaxin濃度が150pg/mL以上である場合に、被験体が大腸癌に罹患していると判断する、[1]又は[2]の大腸癌を検出する方法。

[7] [1]~[6]のいずれかの大腸癌を検出する方法に用いる検査試薬であって、抗MIP-1 抗体及び/又は抗Eotaxin抗体を含む検査試薬。

## 【発明の効果】

【0009】

ケモカインの1種であるMIP-1 及びEotaxinの血中濃度は大腸癌患者で有意に増加し、特定の値をカットオフ値とすることにより、大腸癌を高い感度及び特異性で検出することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】血中MIP-1 とEotaxinを測定した大腸癌患者と健常者の分類を示す図である。

【図2】大腸癌患者と健常人の血清中MIP-1 濃度(右)とEotaxin濃度(左)を示す図である。

【図3-1】血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が亢進する遺伝子を示す図である。

【図3-2】血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が抑制される遺伝子を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) MIP-1 (Macrophage inflammatory protein -1) 及び / 又はEotaxin (エオタキシン) をマーカーとして用いての大腸癌の検出

本発明は、ケモカインの1種であるMIP-1 (Macrophage inflammatory protein -1) 及び / 又はEotaxin (エオタキシン) をマーカーとして用いて、大腸癌を検出する方法である。

## 【0012】

また、本発明は、ケモカインの1種であるMIP-1 (Macrophage inflammatory protein -1) 及び / 又はEotaxinをマーカーとして用いて、大腸癌を検出するための補助的データを取得する方法である。

10

## 【0013】

ケモカインは、Gタンパク質共益受容体を介してその作用を発現する塩基性タンパク質である。ケモカインは、構造によりいくつかのグループに分けられる。本発明において、マーカーとして用いるMIP-1 は、1次構造においてN末端側の2つのシステイン残基(C)が連続しているという特徴を有するCCケモカインに属し、CCL (CC Chemokine Ligand) 3とも呼ばれる。EotaxinはMIP-1 と同様に、CCケモカインに属し、CCL11とも呼ばれる。

## 【0014】

本発明では、血液中のMIP-1 及び / 又はEotaxinを測定する。検体としては、血清又は血漿を用いればよい。

20

## 【0015】

MIP-1 とEotaxinの測定方法は限定されないが、好ましくは抗MIP-1 抗体又は抗Eotaxin抗体を用いた免疫学的方法により測定する。免疫学的方法としては、例えば、固相免疫測定法 (RIA、EIA、FIA、CLIA等)、ドット・プロット法、ラテックス凝集法 (LA : Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay)、イムノクロマト法などが挙げられる。

## 【0016】

この中でも、定量性の観点からEIA(Enzyme Immunoassay)法の1種であるELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法が好ましい。ELISA法では、抗MIP-1 抗体又は抗Eotaxin抗体を固相化したマイクロタイタープレートに検体を添加し、抗原・抗体反応を行わせ、さらに酵素標識した抗MIP-1 抗体又は抗Eotaxin抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して検体中のMIP-1 及び / 又はEotaxinを検出すると共に、その測定値から検体中のMIP-1 又はEotaxin濃度を算出することができる。また、蛍光標識した抗MIP-1 抗体又は抗Eotaxin抗体を用いて、抗原・抗体反応をさせた後に蛍光を測定してもよい。抗原抗体反応は4 ~ 45、より好ましくは20 ~ 40、さらに好ましくは25 ~ 38で行うことができ、また、反応時間は、10分 ~ 18時間、より好ましくは10分 ~ 1時間、さらに好ましくは30分 ~ 1時間程度である。

30

## 【0017】

免疫学的手法において用いられる抗MIP-1 抗体又は抗Eotaxin抗体は、MIP-1 又はEotaxinを検出し得る抗体であればよい。抗MIP-1 抗体又は抗Eotaxin抗体は、モノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体のFab、F(ab')<sub>2</sub>等の結合活性断片を用いることもできる。

40

## 【0018】

本発明は抗MIP-1 抗体及び / 又は抗Eotaxin抗体を含む、大腸癌検出用検査試薬又はキットをも包含する。

## 【0019】

本発明においては、健常人から採取した検体を陰性対象として同時に測定してもよい。この場合、被験体が大腸癌に罹患している場合、被験体の検体中のMIP-1 及び / 又はEotaxin濃度が健常人に比べて上昇するので、被験体におけるMIP-1 及び / 又はEotaxinの濃

50

度が健常人よりも多い場合、MIP-1 及び / 又はEotaxinは陽性と判断され、被験体が大腸癌に罹患していると判断することができる。例えば、被験体の検体中のMIP-1 及び / 又はEotaxin濃度が健常人の検体中の濃度の1.3倍以上、好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2.0倍以上の場合に被験体は大腸癌に罹患していると判断することができる。

【 0 0 2 0 】

また、あらかじめ健常人の検体中のMIP-1 及び / 又はEotaxinを測定しておき、該測定値に基づいてMIP-1 及び / 又はEotaxinの濃度測定値についてカットオフ値(閾値)を定めておいてもよい。該カットオフ値を基準としカットオフ値以上か、又はカットオフ値を超えた場合に、大腸癌に罹患していると判断することができる。

【 0 0 2 1 】

カットオフ値は、例えば、ROC ( receiver operating characteristic curve : 受信者動作特性曲線 ) 解析により定めることができる。また、ROC解析により本発明の方法による診断精度 ( 感度及び特異性 ) を決定することができる。ROC解析は、試料として大腸癌患者から採取した試料と健常人から採取した試料についてMIP-1 及び / 又はEotaxinを測定し、各カットオフ値での感度 ( sensitivity ) 及び特異性 ( specificity ) を算出し、横軸を特異性とし、縦軸を感度とした座標上にプロットする。本発明の方法の測定結果についてROC解析により診断精度を解析した場合の、曲線下面積 ( AUC : area under the curve ) は0.9以上と高く、感度は80%以上、好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上であり、特異性は75%以上、好ましくは80%以上である。本発明の方法により、非常に高い精度で癌を検出することができる。

【 0 0 2 2 】

例えば、血液中のMIP-1 濃度のカットオフ値として、33~37pg/mLと設定することができる、好ましくは34~36pg/mL、さらに好ましくは35pg/mLと設定することができる。また、血液中のEotaxin濃度のカットオフ値として148~152pg/mL、好ましくは149~151pg/mL、さらに好ましくは150pg/mLと設定することができる。このカットオフ値は、好ましくはELISAで測定したときの値である。

【 0 0 2 3 】

MIP-1 単独又はEotaxin単独をマーカーとして用いても大腸癌を検出することができるが、好ましくはMIP-1 とEotaxinの両方をマーカーとして用いる。この場合、被験体の検体中のMIP-1 とEotaxinの両方が健常人よりも高い場合、あるいは両方がカットオフ値を超えている場合に、該被験体は大腸癌に罹患していると判断することができる。

【 0 0 2 4 】

( 2 ) 血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が亢進し、又は抑制される遺伝子

血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が亢進又は抑制される遺伝子の存在が確認されており、それらの遺伝子の発現の亢進または抑制を指標にして大腸癌を検出することができる。

【 0 0 2 5 】

血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が亢進する遺伝子として図3 - 1の「亢進」の右端の欄に記載された遺伝子が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

また、血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が抑制される遺伝子として図3 - 2の「抑制」の右端の欄に記載された遺伝子が挙げられる。

図3 - 1及び3 - 2においては、遺伝子を機能ごとに分けて挙げている。

【 0 0 2 7 】

以下に遺伝子を列挙する。

血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が亢進する遺伝子

1 Immune response\_Phagocytosis

ITGB2, Syk, IL-15, RhoA, Myosin I, C/EBP, Dectin-1, Fc gamma RII beta, ILT4, MSN (moesin), ERM proteins, SHPS-1, Fc epsilon RI gamma, MSR1, MANR, Lyn, PLC-gamma

10

20

30

40

50

2, IL-15RA, Btk, ILT2, Hck, TLR4, MARCO, MARCKS, MLCK, PLC-gamma, gp91-phox, p40-phox, PAK1, p67-phox, FGR, Fc alpha receptor, Fc gamma RII alpha

## 2 Cell adhesion\_Platelet aggregation

ITGB2, Syk, GAB2, PLA2, RhoA, Thrombospondin 1, G-protein beta/gamma, COX-1 (PTGS1), Fc epsilon RI gamma, c-Src, ENP1, THAS, cPLA2, PTAFR, Lyn, PLC-gamma 2, PKA-reg (cAMPdependent), GP-IX, P2Y12, Gab, G-protein alpha-i family, G-protein alpha-i2, P2X1, MLCK, PLC-gamma, CD36, VAV-2

## 3 Cell adhesion\_Amyloid proteins

RhoA, FZD1, Nicastrin, NOTCH2, APLP2 active fragment, G-protein beta/gamma, Jagged1, Nidogen, p120-catenin, Tcf(Lef), c-Src, Presenilin 2, FZD2, FZD5, Notch, Presenilin 1, Alpha-catenin, APLP2 precursor, Cathepsin D, MALS, Frizzled, ADAM9, PKC, PAK1, Plakoglobin, Presenilin

10

## 4 Immune response\_Antigen presentation

CIITA, ICAM1, MHC class II beta chain, CD1b, HLADPA1, CD1d, HLA-DQA1, JAK2, HA2Z, Fc epsilon RI gamma, IP-30, HLA-DM, HLA-DRB1, CD1a, Cathepsin S, LFA-3, MHC class II, HLA-DQB1, HLA-DRA1, HLA-DPB1, HLA-DRB4, CD86, CD74, RING6

20

## 5 Proliferation\_Positive regulation cell proliferation

p21, HGF, RhoG, Beta-arrestin1, GAB2, Fra-1, RhoA, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, JAK2, MTG16 (CBFA2T3), c-Src, VEGF-A, RasGRP4, PKA-reg (cAMP-dependent), G-protein alpha-15, TCIRG1 (Atp6i), CCR1, G-protein alpha-i family, M-CSF receptor, G-protein alpha-i2, CSDA, MLCK, c-Fes, FLT3, PAK1

## 6 Chemotaxis

ITGB2, Syk, C5aR, Fra-1, GRO-2, Prokineticin 2, PD-ECGF (TdrPase), IL-1 beta, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, PLAUR (uPAR), MIG, Integrin, VEGF-A, PTAFR, CCR1, G-protein alpha-i family, Galpha(q)-specific peptide GPCRs, PLD1

30

## 7 Inflammation\_IFN-gamma signaling

CIITA, p21, ITGB2, IL-15, IL-18, ICAM1, PKC-delta, K12, JAK2, MIG, c-Src, PLC-gamma 2, TLR4, PLC-gamma, Fc alpha receptor

## 8 Apoptosis\_Anti-apoptosis mediated by external signals via NF-kB

IL-15, MyD88, G-protein beta/gamma, TNF-R2, VEGF-A, CD30(TNFRSF8), CSF2RA, PKA-reg (cAMP-dependent), IL-15RA, G-protein alpha-i family, TLR4, Bcl-3, TL1A(TNFSF15), APRIL(TNFSF13), BAFF(TNFSF13B)

40

## 9 Inflammation\_Neutrophil activation

ITGB2, C5aR, PLA2, ICAM1, GRO-2, RhoA, PKC-delta, G-protein beta/gamma, TNF-R2, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, Syntaxin 7, cPLA2, Btk, G-protein alpha-15, G-protein alpha-i family, G-protein alpha-i2, PA24A, gp91-phox, ALOX5, p40-phox, PAK1, p67-phox, PLD1

## 10 Inflammation\_IL-4 signaling

HLADPA1, HLA-DQA1, JAK2, MHC class II, Bax, HLA-DQB1, HLADRA1, HLA-DPB1, HLA-DRB4, CD86, CD74, c-Fes, CD13, IL13RA1, Fc gamma RII alpha

50

血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が抑制される遺伝子

1 Proteolysisi ECM remodelin

Collagen XIV, Tenascin-C, NEPH2, MMP-16, Protein C inhibitor, Serpin B12, COL18A1, Kallikrein 2, Trypsin II, Aggrecanase-1

2 Neurophysiological process\_Transmission of nerve impulse

L-type Ca(II) channel, alpha 1C subunit, GABA-A receptor gamma-2 subunit, KCC2, mGluR3, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, mGluR1, Galpha(q)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Ionotropic glutamate receptor, Galpha(i)-specific metabotropic glutamate GPCRs, GluR6, Galpha(i)-specific amine GPCRs, CHT1, RIN, G-protein alpha-s, Kainate receptor 10

3 Reproduction\_Gonadotropin regulation

L-type Ca(II) channel, alpha 1C subunit, GABA-A receptor gamma-2 subunit, mGluR3, mGluR1, Galpha(q)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Ionotropic glutamate receptor, Galpha(i)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Secretogranin 1, Protein kinase G1, Adenylate cyclase, G-protein alpha-s, Protein kinase G, Kainate receptor

4 Development\_Blood vessel morphogenesis 20

PDE, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, PDE7A, Endomucin, Galpha(q)-specific amine GPCRs, Galpha(i)-specific amine GPCRs, Protein kinase G1, Galpha(q)-specific peptide GPCRs, COL18A1, Tissue kallikreins, Neuropilin-1, G-protein alpha-s, Protein kinase G, Transferrin

5 Reproduction\_Spermatogenesis, motility and copulation

PDGF receptor, MFGE8, IGF-1 receptor, Ropporin, MSK1, S5AR2, BBS2, Tissue kallikreins, BMP2, Kallikrein 2, SOX5, CREM (activators), ZFP37, PDGF-R-alpha

6 Proteolysis\_Connective tissue degradation 30

Trypsin, Tenascin-C, MMP-16, Protein C inhibitor, Serpin B12, Tissue kallikreins, Kallikrein 2, Trypsin II, Aggrecanase-1

7 Development\_Neurogenesis in general

WNT4, RET, CHRM, Neuromodulin, WNT7A, WNT, Galpha(q)-specific amine GPCRs, Galpha(i)-specific amine GPCRs, HDAC7, ACM3, SOX8, SOX14

8 Development\_Cartilage development

TR-alpha, Noggin, COL1A2, BMP2, SOX5, Aggrecanase-1 40

9 Reproduction\_Male sex differentiation

AP-2A, PDGF receptor, Olfactory receptor, RET, IGF-1 receptor, MSK1, S5AR2, HSF2, BMP2, SOX5, CREM (activators), ZFP37, PDGF-R-alpha

10 Reproduction\_GnRH signaling pathway

GABA-A receptor gamma-2 subunit, mGluR3, mGluR1, Galpha(q)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Ionotropic glutamate receptor, Galpha(i)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Protein kinase G1, G-protein alpha-s, Protein kinase G, Kainate receptor

【 0 0 2 9 】

本発明は、血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が亢進する遺伝子のCD4陽性細胞における発現の亢進を指標にして大腸癌を検出する方法、および血中Eotaxin濃度の増加に相関してCD4陽性細胞において発現が抑制される遺伝子の発現のCD4陽性細胞における抑制を指標にして大腸癌を検出する方法も包含する。

【実施例】

【0030】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0031】

[実施例1] 血中ケモカイン濃度と大腸癌発症との関連の解析

大腸癌患者5名、健常者7名について、血中ケモカイン濃度と大腸癌発症との関連を網羅的に解析した。

【0032】

血中ケモカイン濃度はHuman Cytokine 27-Plex Panel (Invitrogen) (ケモカイン測定キット)を用いて測定した。

【0033】

図1に血中MIP-1 とEotaxinを測定した大腸癌患者と健常者の分類を示す。

図2に大腸癌患者(Co)と健常人(N)の血清中MIP-1 濃度(右)とEotaxin濃度(左)を示す。

【0034】

図2に示すように、血中MIP-1 及びEotaxinは大腸癌患者と健常人で分布の重なりがなかった。この結果は、血中MIP-1 又はEotaxinをマーカーとして用いた場合に、大腸癌患者と健常人を区別し、大腸癌を検出し得ることを示す。カットオフ値は、MIP-1 及びEotaxinでそれぞれ35pg/mL及び150pg/mLであった。

【0035】

[実施例2] 血中ケモカイン濃度と相関してCD4陽性細胞において発現が亢進し、あるいは抑制される遺伝子の解析

方法

各被検者の末梢血から、MACS磁気分離システム(ミルテニバイオテク社)を用いて、CD4陽性細胞をソーティング回収した。得られたCD4陽性細胞からRNAを抽出してマイクロアレイ法(Whole Human Genome DNA microarray 4x44K, アジレント社)を用いて遺伝子発現解析をした。

【0036】

結果を図3-1及び3-2に示す。図3-1の「亢進」の右端の欄に記載された遺伝子は、血中ケモカイン濃度と相関してCD4陽性細胞において発現が亢進する遺伝子であり、図3-2の「抑制」の右端の欄に記載された遺伝子は、血中ケモカイン濃度と相関してCD4陽性細胞において発現が抑制される遺伝子である。

【産業上の利用可能性】

【0037】

MIP-1 及び/又はEotaxinをマーカーとして用いることにより大腸癌を検出することができる。

10

20

30

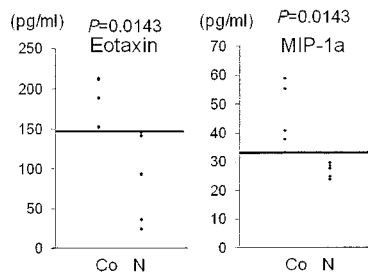
40



【 図 1 】

| シンボル | DNA<br>マイクロアレイ | サイトカイン/<br>ケモカイン | 年齢 | 性 | ステージ      | 転移 |
|------|----------------|------------------|----|---|-----------|----|
| Co-1 | ○              |                  | 84 | F | Stage IV  | +  |
| Co-2 | ○              | ○                | 61 | M | Stage III | +  |
| Co-3 | ○              | ○                | 83 | F | Stage IV  | +  |
| Co-4 | ○              | ○                | 81 | M | Stage II  | -  |
| Co-5 | ○              | ○                | 72 | M | Stage IV  | +  |
| N-1  | ○              |                  | 66 | M |           |    |
| N-2  | ○              | ○                | 63 | F |           |    |
| N-3  | ○              | ○                | 58 | F |           |    |
| N-4  | ○              | ○                | 55 | F |           |    |
| N-5  | ○              | ○                | 62 | F |           |    |
| N-6  | ○              | ○                | 65 | M |           |    |
| N-7  | ○              |                  | 63 | M |           |    |

【 図 2 】



【 図 3 - 2 】

| 抑制 |  |   |
|----|--|---|
| 1  | Proteolysis_ECM remodeling                               | Collagen XIV, Tenascin-C, NEPH2, MMP-16, Protein C inhibitor, Serpin B12, COL18A1, Kallikrein 2, Trypsin II, Aggrecanase-1  |
| 2  | Neurophysiological process_Transmission of nerve impulse | L-type Ca(II) channel, alpha 1C subunit, GABA-A receptor gamma-2 subunit, KCCE2, mGluR3, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, mGluR1, Galpha(q)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Ionotropic glutamate receptor, Galpha(i)-specific metabotropic glutamate GPCRs, GluR6, Galpha(i)-specific amine GPCRs, CHT1, RIN, G-protein alpha-s, Kainate receptor |
| 3  | Reproduction_Gonadotropin regulation                     | L-type Ca(II) channel, alpha 1C subunit, GABA-A receptor gamma-2 subunit, mGluR3, mGluR1, Galpha(q)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Ionotropic glutamate receptor, Galpha(i)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Secretogranin 1, Protein kinase G1, Adenylate cyclase, G-protein alpha-s, Protein kinase G, Kainate receptor                   |
| 4  | Development_Blood vessel morphogenesis                   | PDE, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, PDE7A, Endomucin, Galpha(q)-specific amine GPCRs, Galpha(i)-specific amine GPCRs, Protein kinase G1, Galpha(q)-specific peptide GPCRs, COL18A1, Tissue kallikreins, Neuropilin-1, G-protein alpha-s, Protein kinase G, Transferrin   |
| 5  | Reproduction_Spermatogenesis, motility and copulation    | PDGF receptor, MFGE8, IGF-1 receptor, Ropporin, MSK1, S5AR2, BBS2, Tissue kallikreins, BMP2, Kallikrein 2, SOX5, CREM (activators), ZFP37, PDGF-R-alpha   |
| 6  | Proteolysis_Connective tissue degradation                | Trypsin, Tenascin-C, MMP-16, Protein C inhibitor, Serpin B12, Tissue kallikreins, Kallikrein 2, Trypsin II, Aggrecanase-1   |
| 7  | Development_Neurogenesis in general                      | WNT4, RET, CHRM, Neuromodulin, WNT7A, WNT, Galpha(q)-specific amine GPCRs, Galpha(i)-specific amine GPCRs, HDAC7, ACM3, SOX8, SOX14   |
| 8  | Development_Cartilage development                        | TR-alpha, Noggin, COL1A2, BMP2, SOX5, Aggrecanase-1   |
| 9  | Reproduction_Male sex differentiation                    | AP-2A, PDGF receptor, Olfactory receptor, RET, IGF-1 receptor, MSK1, S5AR2, HSF2, BMP2, SOX5, CREM (activators), ZFP37, PDGF-R-alpha  |
| 10 | Reproduction_GnRH signaling pathway                      | GABA-A receptor gamma-2 subunit, mGluR3, mGluR1, Galpha(q)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Ionotropic glutamate receptor, Galpha(i)-specific metabotropic glutamate GPCRs, Protein kinase G1, G-protein alpha-s, Protein kinase G, Kainate receptor  |

【 図 3 - 1 】

| 亢進 |   |  |
|----|---|--|
| 1  | Immune response_Phagocytosis                                    | ITGB2, Syk, IL-15, RhoA, Myosin I, C/EBP, Dectin-1, Fc gamma RII beta, ILT4, MSN (moesin), ERM proteins, SHPS-1, Fc epsilon R1 gamma, MSR1, MANR, Lyn, PLC-gamma 2, IL-15RA, Btk, ILT2, Hck, TLR4, MARCO, MARCKS, MLCK, PLC-gamma, gp91-phox, p40-phox, PAK1, p67-phox, FGR, Fc alpha receptor, Fc gamma RII alpha |
| 2  | Cell adhesion_Platelet aggregation                              | ITGB2, Syk, GAB2, PLA2, RhoA, Thrombospondin 1, G-protein beta/gamma, COX-1 (PTGS1), Fc epsilon R1 gamma, c-Src, ENP1, THAS, cPLA2, PTAFR, Lyn, PLC-gamma 2, PKA-reg (cAMPdependent), GP-IX, P2Y12, Gab, G-protein alpha-i family, G-protein alpha-i2, P2X1, MLCK, PLC-gamma, CD36, VAV-2                          |
| 3  | Cell adhesion_Amyloid proteins                                  | RhoA, FZD1, Nicastrin, NOTCH2, APLP2 active fragment, G-protein beta/gamma, Jagged1, Nidogen, p120-catenin, Tcf(Lef), c-Src, Presenilin 2, FZD2, FZD5, Notch, Presenilin 1, Alpha-catenin, APLP2 precursor, Cathepsin D, MALS, Frizzled, ADAM9, PKC, PAK1, Plakoglobin, Presenilin                                 |
| 4  | Immune response_Antigen presentation                            | CIITA, ICAM1, MHC class II beta chain, CD1b, HLADPA1, CD1d, HLA-DOA1, JAK2, HA2Z, Fc epsilon R1 gamma, IP-30, HLA-DM, HLA-DRB1, CD1a, Cathepsin S, LFA-3, MHC class II, HLA-DQB1, HLA-DRA1, HLA-DPB1, HLA-DRB4, CD86, CD74, RING6  |
| 5  | Proliferation_Positive regulation cell proliferation            | p21, HGF, RhoG, Beta-arrestin1, GAB2, Fra-1, RhoA, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, JAK2, MTG16 (CBFA2T3), c-Src, VEGF-A, RasGRP4, PKA-reg (cAMP-dependent), G-protein alpha-15, TCIRG1 (Atp6i), CCR1, G-protein alpha-i family, M-CSF receptor, G-protein alpha-i2, CSDA, MLCK, c-Fes, FLT3, PAK1                |
| 6  | Chemotaxis  | ITGB2, Syk, C5aR, Fra-1, GRO-2, Prokineticin 2, PD-ECGF (TdrPass), IL-1 beta, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, PLAUR (uPAR), MIG, Integrin, VEGF-A, PTAFR, CCR1, G-protein alpha-i family, Galpha(q)-specific peptide GPCRs, PLD1   |
| 7  | Inflammation_IFN-gamma signaling                                | CIITA, p21, ITGB2, IL-15, IL-18, ICAM1, PKC-delta, K12, JAK2, MIG, c-Src, PLC-gamma 2, TLR4, PLC-gamma, Fc alpha receptor  |
| 8  | Apoptosis_Anti-apoptosis mediated by external signals via NF-kB | IL-15, MyD88, G-protein beta/gamma, TNF-R2, VEGF-A, CD30(TNFRSF8), CSF2RA, PKA-reg (cAMP-dependent), IL-15RA, G-protein alpha-i family, TLR4, Bcl-3, TL1A(TNFSF15), APRIL(TNFSF13), BAFF(TNFSF13B)   |
| 9  | Inflammation_Neutrophil activation                              | ITGB2, C5aR, PLA2, ICAM1, GRO-2, RhoA, PKC-delta, G-protein beta/gamma, TNF-R2, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, Syntaxin 7, cPLA2, Btk, G-protein alpha-15, G-protein alpha-i family, G-protein alpha-i2, PA2A4, gp91-phox, ALOX5, p40-phox, PAK1, p67-phox, PLD1  |
| 10 | Inflammation_IL-4 signaling                                     | HLADPA1, HLA-DOA1, JAK2, MHC class II, Bax, HLA-DQB1, HLADRA1, HLA-DPB1, HLA-DRB4, CD86, CD74, c-Fes, CD13, IL13RA1, Fc gamma RII alpha  |

---

フロントページの続き

- (72)発明者 小村 卓也  
石川県金沢市下石引町1番1号 独立行政法人国立病院機構金沢医療センター内
- (72)発明者 松井 茂之  
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 三宅 顕光  
愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
- Fターム(参考) 4H045 AA30 CA40 DA01 EA50