

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5630757号
(P5630757)

(45) 発行日 平成26年11月26日(2014.11.26)

(24) 登録日 平成26年10月17日(2014.10.17)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34	
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48	A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	V
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	B
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
請求項の数 17 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-520609 (P2012-520609)	(73) 特許権者	304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
(86) (22) 出願日	平成22年3月4日(2010.3.4)	(73) 特許権者	000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(65) 公表番号	特表2013-509565 (P2013-509565A)	(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(43) 公表日	平成25年3月14日(2013.3.14)	(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/054062	(72) 発明者	山下 克子 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内
(87) 国際公開番号	W02011/052244		
(87) 国際公開日	平成23年5月5日(2011.5.5)		
審査請求日	平成25年1月11日(2013.1.11)		
(31) 優先権主張番号	特願2009-250066 (P2009-250066)		
(32) 優先日	平成21年10月30日(2009.10.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 P S A の分析方法、及び前記分析方法を用いた前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと、
P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法。

【請求項2】

(s) P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階、

(a) - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと前記シアリダーゼ処理試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び

(b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階を含む、請求項1に記載の P S A の分析方法。

【請求項3】

前記レクチンに親和性のある P S A 量の判定が、
分別されたレクチンに親和性のある P S A 量の測定による判定、
分別前の試料中の P S A 量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のある P S A 量の測定による判定、又は

分別前の試料中の P S A 量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のない P S A 量の測

定による判定

である請求項 2 に記載の P S A の分析方法。

【請求項 4】

前記 P S A 量の測定が、トータル P S A 又はフリー P S A の測定である、請求項 3 に記載の P S A の分析方法。

【請求項 5】

前記レクチンが、キカラスウリレクチン - I I 又はノダフジレクチンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の P S A の分析方法。

【請求項 6】

前記レクチンが、更にフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の P S A の分析方法。

10

【請求項 7】

前記試料が、前立腺癌の疑いのある患者から得られた試料である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の P S A の分析方法。

【請求項 8】

前立腺癌の診断用である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の P S A の分析方法。

【請求項 9】

- N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法。

20

【請求項 10】

(s) P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階、

(a) - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、前記シアリダーゼ処理試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び

(b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階を含む、請求項 9 に記載の P S A の分析方法。

30

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の P S A の分析方法により、試料中のレクチンに親和性のある P S A の量を分析することを特徴とする、前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法。

【請求項 12】

- N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びシアリダーゼを含む、P S A の分析キット。

【請求項 13】

抗 P S A 抗体を更に含む、請求項 12 に記載の P S A の分析キット。

【請求項 14】

前記レクチンが、キカラスウリレクチン - I I 又はノダフジレクチンである、請求項 12 又は 13 に記載の P S A の分析キット。

40

【請求項 15】

前記レクチンが、更にフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである、請求項 12 又は 13 に記載の P S A の分析キット。

【請求項 16】

フコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを更に含む、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の P S A の分析キット。

【請求項 17】

前記フコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンが、キカラスウ

50

リレクチン - I I又はハリエニシダアグルチニン - Iである、請求項 1 6 に記載の P S A の分析キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、P S Aの分析方法及びそれを用いた前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法、並びにP S Aの分析キットに関する。本発明によれば、前立腺癌の癌細胞から分泌されるP S Aに特異的に発現する糖鎖に結合するレクチンを用いることにより、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができる。特に、前立腺癌の癌細胞から分泌されるP S Aに特異的に発現する糖鎖に結合するレクチン、及びシアリダーゼを用いることにより、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができる。

10

更に、本発明は、生体由来の試料中のフコース転移酵素 1 又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 4 の発現を分析することを特徴とする、前立腺癌の検出方法に関する。本発明によれば、前立腺癌と健常人又は前立腺肥大症とを鑑別することができる。

【背景技術】

【0002】

前立腺癌は、主に 6 0 歳以上の男性に発病し、欧米諸国では、男性の癌において肺癌に次ぐ死亡原因となっている。前立腺癌の発生率は、1 9 7 5 年以降増加しているが、その理由の 1 つは、前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen: 以下、P S A と称する) による診断方法の普及によるものである。この P S A の測定により、従来の直腸指診では困難であった早期の癌が発見されるようになった。

20

【0003】

P S A は、前立腺の腺細胞から前立腺の腺腔内に分泌されるタンパク質であり、前立腺に特異的に発現するタンパク質であるが、前立腺癌に特異的に発現するタンパク質ではない。従って、前立腺癌以外の前立腺肥大症及び前立腺炎などの疾患でも上昇することが知られている。

現在、広く使用されている P S A 測定法は、1 - アンチキモトリプシンと結合した結合型 P S A (以下、P S A - A C T と称することがある) 及び遊離型 P S A (以下、フリー P S A と称することがある) を測定するトータル P S A の測定法であり、トータル P S A の測定値が 1 0 n g / m L 以上の場合、5 0 % 以上のヒトに前立腺癌が発見されるが、4 ~ 1 0 n g / m L のヒトで 2 5 %、2 ~ 4 n g / m L でも 1 5 % のヒトに前立腺癌の発生が見られる。特に、トータル P S A 値が 4 ~ 1 0 n g / m L の領域をグレーゾーンと呼んでいるが、前立腺肥大症の患者でも、このグレーゾーンのトータル P S A 値を示す患者が多く、前立腺癌と前立腺肥大症の患者を鑑別することのできる P S A の分析方法の開発が期待されている。

30

【0004】

前記のグレーゾーンのトータル P S A 値を示す患者において、前立腺肥大症と前立腺癌を鑑別するために、トータル P S A に対するフリー P S A の割合を測定することが行われている。前立腺癌患者では、トータル P S A に対するフリー P S A の割合が減少していることが報告されており、遊離型 P S A のみを測定するフリー P S A の測定法によりフリー P S A 値を測定し、トータル P S A 値に対するフリー P S A 値 (以下、「フリー P S A / トータル P S A 比」と称することがある) を求めると、この値が 2 5 % 以下を示す場合、前立腺癌の可能性が高いといわれている。しかしながら、グレーゾーンの検体において、前記フリー P S A / トータル P S A 比が 0 ~ 1 0 % の範囲の場合、前立腺癌の可能性は 5 6 % であるが、1 0 ~ 1 5 % では 2 8 %、1 5 ~ 2 0 % では 2 0 %、2 0 ~ 2 5 % では 1 6 % であり、フリー P S A / トータル P S A 比を用いても、前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別することは容易ではない。

40

【0005】

トータル P S A が 1 0 n g / m L 以上の患者、及びトータル P S A が 4 ~ 1 0 n g / m L のグレーゾーンで、且つフリー P S A / トータル P S A 比が 2 5 % 以下を示す患者の場

50

合、前立腺癌の確定診断のため、前立腺の生検を行う。しかしながら、特に後者においては、前立腺癌が発見される割合は、30%程度であり、患者に過度の負担を強いており、この点からも、簡便に前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別する方法が開発されることが求められている。

【0006】

PSAは1本のアスパラギン結合型糖鎖（以下、N-グリカン鎖と称することがある）を持つ糖タンパク質であるが、前立腺癌患者のPSAは、高分岐化複合型糖鎖を持つことが知られており、また前立腺癌の患者に特異的な糖鎖を有しているのではないかと考えられていた。例えば、前立腺癌由来のLNCaP細胞から分泌されるPSAのN-グリカン鎖を、質量分析機で分析したところ、正常精漿中のPSAと比べてN-アセチルヘキサミン（HexNAc）及びフコースの含量が多く、シアル酸を欠如していることが報告されている（非特許文献1）。しかしながら、このLNCaP細胞のPSAは、その糖鎖は、シアル酸を欠如していることなどから、生体内の前立腺癌患者の血清中のPSAの糖鎖と異なっており、特殊なPSAであると考えられた。

【0007】

また、大山らは前立腺癌患者血清中のPSAのN-グリカン鎖にシアル酸（2,3）ガラクトース残基（Sialic acid alpha 2,3 Gal-R）を見出し、前立腺肥大症の患者と比較して、前立腺癌の患者のPSAで、このシアル酸（2,3）ガラクトース残基が多いことを報告した（特許文献1及び非特許文献2）。そして、前記シアル酸（2,3）ガラクトース残基に特異的に結合するイヌエンジュレクチン（*M. amurensis* agglutinin; 以下、MAAと称する）と前立腺癌患者のPSAを結合させ、MAAと結合したフリーPSAの比率を測定することにより、前立腺癌と前立腺肥大症を鑑別することができることを見出した（特許文献1及び非特許文献2）。しかしながら、前記シアル酸（2,3）ガラクトース残基は、PSA以外に1-アンチキモトリプシンにも発現しており、従ってMAAは、1-アンチキモトリプシンにも親和性があるため、1-アンチキモトリプシンとPSAが結合している場合、すなわち、PSA-ACTではシアル酸（2,3）ガラクトース残基を有するPSAとシアル酸（2,3）ガラクトース残基を持たないPSAとを分離することができない。従って、トータルPSAの測定法では、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者を鑑別することはできず、フリーPSAを測定する必要がある。

【0008】

更に、タジリらは、2人の前立腺癌患者の血清中のPSAのN-グリカン鎖を、正常の精漿中PSAのN-グリカン鎖と質量分析により比較検討し、前立腺癌の患者のPSAがシアル化及びフコース化されていることを報告している（非特許文献3）。しかしながら、前記シアル酸（2,3）ガラクトース残基以外に、実際に前立腺癌患者のPSAと前立腺肥大症のPSAを鑑別することのできる糖鎖は、報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2002-55108号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】「グライコバイオロジー（*Glycobiology*）」2003年（米国）第13巻、p. 457~470

【非特許文献2】「グライコバイオロジー（*Glycobiology*）」2004年（米国）第14巻、p. 671~679

【非特許文献3】「グライコバイオロジー（*Glycobiology*）」2008年（米国）第18巻、p. 2~8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、特願 2009-023597 (未公開) において、以下の発明を開示した。

本発明者らは、前記特許文献 1 に記載のレクチンである MAA のカラムを用いて健常人の PSA 及び前立腺癌患者の PSA とを分別し、MAA に親和性のある PSA の測定を試みた。しかしながら、MAA カラムを用いて PSA 分別した場合、シアル酸 (2, 3) ガラクトース残基を有しない正常な PSA の回収率は 70% であり、PSA が非特異的に結合しているものと考えられた。また、前立腺癌患者の PSA の回収率は 40% であり、MAA に対する非特異的な結合に加えて、シアル酸 (2, 3) ガラクトース残基を有する PSA が、MAA から溶出されないことも考えられた。従って、MAA カラムを用いた場合、シアル酸 (2, 3) ガラクトース残基を有する PSA の量を正確に測定できないことがわかった。

10

レクチンは、現在市販されているものだけでも 100 種類以上あるが、本発明者らは、糖結合特異性の異なる複数の植物レクチンを組み合わせ、前立腺癌患者の PSA に発現している糖鎖の同定を進め、前立腺癌患者の PSA と前立腺肥大症の PSA とを鑑別することについて鋭意研究したところ、キカラスウリレクチン - II (Trichosanthes japonica Agglutinin-II; 以下、TJA - II と称することがある) 又はノダフジレクチン (Wisteria floribunda; 以下、WFA と称することがある) に親和性のある PSA が、前立腺癌患者の血液中に存在していることを見出し、そして前記 TJA - II 又は WFA を用いることにより、前立腺癌患者の PSA と前立腺肥大症の PSA とを鑑別することができることを見出した。すなわち、前立腺癌患者の PSA の多くが、 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R) 及び/又はフコース (1, 2) ガラクトース残基 (Fuc 1 2 Gal 1 R) を有していることを見出した。

20

本発明者らは、更に前立腺癌患者の PSA に発現している糖鎖の研究を進め、シアル酸 (2, 6) $-N-$ アセチルガラクトサミン残基のシアル酸も切断するシアリダーゼにより、前立腺癌患者 PSA のシアル酸を除去することにより、TJA - II 又は WFA と結合する PSA が増加し、更に、効率よく前立腺癌患者の PSA と前立腺肥大症の PSA とを鑑別することができることを見出した。すなわち、前立腺癌患者の PSA の多くが、シアル酸 (2, 6) $-N-$ アセチルガラクトサミン残基 (Sia 2 6 GalNAc 1 R) を有しており、シアリダーゼによりシアル酸を除去することにより、 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R) が露出し、TJA - II 又は WFA と効率よく結合することを見出した。

30

本発明は、このような知見に基づくものである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

従って、本明細書は、 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと、PSA を含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある PSA の量を判定することを特徴とする、PSA の分析方法を開示する。

本発明による PSA の分析方法の好ましい態様においては、(a) 前記 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと PSA を含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある PSA と前記レクチンに親和性のない PSA とを分別する段階、及び (b) 前記試料中のレクチンに親和性のある PSA の量を判定する段階を含む。

40

本発明は、 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと、PSA を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある PSA の量を判定することを特徴とする、PSA の分析方法にも関する。

本発明による PSA の分析方法の好ましい態様においては、(s) PSA を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階、(a) $-N-$ アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと前記シアリダーゼ処理試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある PSA と前記レクチンに親和性のない

50

P S A とを分別する段階、及び (b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階、を含む。

また、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンに親和性のある P S A 量の判定が、分別されたレクチンに親和性のある P S A 量の測定による判定、分別前の試料中の P S A 量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のある P S A 量の測定による判定、又は分別前の試料中の P S A 量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のない P S A 量の測定による判定である。

また、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前記 P S A 量の測定が、トータル P S A 又はフリー P S A の測定である。

また、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンが、キカラスウリレクチン - I I 又はノダフジレクチンである。

また、本発明による P S A の分析方法の別の好ましい態様においては、前記レクチンが、更にフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである。

更に、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前記試料が、前立腺癌の疑いのある患者から得られた試料である。

更に、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前立腺癌の診断用である。

【 0 0 1 3 】

本明細書は、フコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法を開示する。

本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、(a) 前記フコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと P S A を含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び (b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階、を含む。

更に、本明細書は、- N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法を開示する。

本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、(a) 前記 - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び (b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階、を含む。

更に、本発明は、- N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法に関する。

本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、(s) P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階、(a) - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、前記シアリダーゼ処理試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び (b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階、を含む。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、前記 P S A の分析方法により、試料中のレクチンに親和性のある P S A の量を分析することを特徴とする、前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法にも関する。

また、本発明は、- N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンを含む

10

20

30

40

50

、P S Aの分析キットにも関する。

本発明によるP S Aの分析キットの好ましい態様においては、シアリダーゼを更に含む。

また、本発明によるP S Aの分析キットの好ましい態様においては、抗P S A抗体を更に含む。

また、本発明によるP S Aの分析キットの好ましい態様においては、前記レクチンが、キカラスウリレクチン - I I又はノダフジレクチンである。

更に、本発明によるP S Aの分析キットの別の好ましい態様においては、前記レクチンが、更にフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである。

【 0 0 1 5 】

本発明は、フコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含む、P S Aの分析キットに関する。

本発明によるP S Aの分析キットの好ましい態様においては、 - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース (1 , 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含む。

また、本発明によるP S Aの分析キットの好ましい態様においては、シアリダーゼを更に含む。

【 0 0 1 6 】

本発明は、生体由来の試料中のフコース転移酵素 1 又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 4 の発現を分析することを特徴とする、前立腺癌の検出方法に関する。

本発明による前立腺癌の検出方法の好ましい態様においては、フコース転移酵素 1 又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 4 の m R N A の発現量を分析することを特徴とする。

本発明による前立腺癌の検出方法の好ましい態様においては、フコース転移酵素 1 又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 4 に特異的に結合する抗体を用いることを特徴とする。

本発明はフコース転移酵素 1 又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 4 の m R N A の塩基配列に特異的なプライマーセット及び / 又はプローブを含むことを特徴とする、前立腺癌の検出用キットに関する。

また、本発明はフコース転移酵素 1 又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 4 に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、前立腺癌の検出用キットに関する。

【発明の効果】

【 0 0 1 7 】

本発明のP S Aの分析方法、及び前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法、並びにP S Aの分析キットによれば、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができる。また、本発明に用いることのできるレクチンであるT J A - I I及びW F A、並びにU E A - Iと結合したP S Aは、ほぼ100%の回収率で回収することが可能であり、前立腺癌が分泌する前立腺癌由来の - N - アセチルガラクトサミン残基を有するP S Aの量を正確に測定することが可能である。更に、T J A - I I及びW F Aカラム並びにU E A - Iカラムは再生することが可能であり、再利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

【図1】精製したT J A - I Iを電気泳動した写真である。Mは分子量マーカを示し、レーン1は、還元したT J A - I Iを、レーン2は非還元のT J A - I Iを示している。

【図2】前立腺癌患者及び前立腺肥大症患者の、T J A - I Iカラムによる分別前の血清試料のP S A量(A)とT J A - I I結合画分中のP S A量(B)を示したグラフである。黒丸()が前立腺癌患者を、白丸()が前立腺肥大症患者を示している。

【図3】前立腺癌患者(PC:)及び前立腺肥大症患者(BHP:)のP S Aの、T J A - I I結合率を示したグラフである。

10

20

30

40

50

【図4】正常フリーPSA(A)及び前立腺癌患者の血清(B)をMAAカラムにより分画し、トータルPSAの測定を行った結果を示したグラフである。

【図5】前立腺癌患者及び前立腺肥大症患者の血清中のPSAのシアリダーゼ処理前(A)及びシアリダーゼ処理した後(B)の、TJA-IIへの結合率を示したグラフである。黒丸()が前立腺癌患者を、白丸()が前立腺肥大症患者を示している。

【図6】前立腺肥大症患者の血清中PSA(BPH serum PSA)と、前立腺癌患者の血清中PSA(PC serum PSA)の糖鎖を示した図である。

【図7】前立腺の正常組織及び癌組織におけるFUT1及び4GALNT4のmRNA発現を示した図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0019】

[1] PSAの分析方法

本発明のPSAの分析方法は、 -N-アセチルガラクトサミン残基 に親和性のあるレクチンと、PSAを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することを特徴とする。より具体的には、本発明のPSAの分析方法の別の態様においては、 -N-アセチルガラクトサミン残基 に親和性のあるレクチンと、PSAを含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することを特徴とする。或いは、本発明のPSAの分析方法の別の態様においては、フコース(1,2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、PSAを含む可能性のある試料とを接

20

【0020】

本発明に用いることのできるレクチンは、非還元末端に結合した -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R)と親和性のあるレクチンを挙げるができる。この場合、非還元末端の -N-アセチルガラクトサミン残基 は、 -N-アセチルガラクトサミン が、シアル酸や硫酸基で置換されていないことが必須である。前記 -N-アセチルガラクトサミン残基 に親和性のあるレクチンは、特に限定されるものではないが、TJA-II又はWFAを挙げるができる。

【0021】

また、本発明に用いることのできるレクチンとしては、フコース(1,2)ガラクトース残基(Fuc 1 2 Gal 1 R)と親和性のあるレクチンを挙げるができる。フコース(1,2)ガラクトース残基は、 -フコース がガラクトースに1,2結合した構造を有する末端糖鎖である。フコース(1,2)ガラクトース残基と親和性の或るレクチンとしては、特に限定されるものではないが、UEA-I又はTJA-IIを挙げることができる。

30

更に、本発明に用いることのできるレクチンとしては、非還元末端に結合した -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R)及びフコース(1,2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを挙げるができる。前立腺癌患者のPSA中には、 -N-アセチルガラクトサミン残基 、又はフコース(1,2)ガラクトース残基を単独で発現したPSAが存在する可能性がある。また、前立腺癌患者によっては、そのPSAに -N-アセチルガラクトサミン残基 、又はフコース(1,2)ガラクトース残基のいずれかが、優位に発現している可能性も高い。従って、本発明のPSAの分析方法においては、非還元末端に結合した -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R)及びフコース(1,2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを用いることが好ましい。前記非還元末端に結合した -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R)及びフコース(1,2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンとしては、特に限定されるものではないが、TJA-IIを挙げることができる。

40

【0022】

TJA-IIは、キカラスウリの塊根から抽出及び精製されるレクチンであり、非還元状態の電気泳動による分子量は64kDaであるが、S-S結合した2量体であり、還元

50

状態の電気泳動による分子量は32 kDa及び29 kDaを示す。TJA-IIは、
 - N - アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R)、及びフコース (1, 2)
 ガラクトース残基 (Fuc 1 2 Gal 1 R) に強い親和性を示す。

【0023】

WFAは、ノダフジの種子から抽出及び精製されるレクチンであり、
 - N - アセチル
 ガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R) そのものに強い親和性を示す。また、GalNAc 1 4 Gal 残基、及びGalNAc 1 4 GlcNAc 残基にも強い親和性を示す。

【0024】

UEA-I (*Ulex europaeus agglutinin-1*) は、ハリエニシダ (*Ulex europaeus*) から調製されるレクチンで、分子量は約26,700である。
 - L - Fucに糖特異性を持っており、フコース (1, 2) ガラクトース残基 (Fuc 1 2 Gal 1 4 GlcNAc R) に強い親和性を示す。

【0025】

本発明のPSAの分析方法において、前記 - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン、フコース (1, 2) ガラクトース残基に親和性のあるレクチン、並びに - N - アセチルガラクトサミン残基及びフコース (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンは、1つ又は2つ以上組み合わせても使用することができる。

【0026】

本発明に用いるレクチンは、市販されているものを用いることもできるが、定法に従って精製することも可能である。植物体 (例えば、葉、茎、花、根、又は種子など) を、細切、又は破砕し、緩衝液に溶解させる。遠心分離によって上清を回収し、硫酸塩析、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、透析、又は凍結乾燥等を用いて精製することができる。具体的には、TJA-IIの精製は、山下らの報告 (Yamashita et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 25441-25422, 1992) に従って精製することが可能である。また、WFAは、豊島らの報告 (Toyoshima et al., *Biochemistry*, 10, 4457-4463, 1971) に従って、精製することが可能である。また、UEA-Iは、Hindsgaulらの報告 (Hindsgaul et al., *Carbohydr. Res.*, 109, 109-142, 1982) に従って、精製することができる。

【0027】

本発明に用いることのできるシアリダーゼは、シアル酸の (2 6) 結合を切断することができるものであるならば、特に限定されることはない。前立腺癌患者のPSAにおいては、シアル酸は (2 6) 結合により、
 - N - アセチルガラクトサミン残基に、結合している。従って、シアル酸の (2 6) 結合を切断することにより、
 - N - アセチルガラクトサミン残基が露出し、
 - N - アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc 1 R) と親和性のあるレクチンと結合することができる。

シアル酸の結合には、(2 3) 結合、(2 6) 結合、及び (2 8) 結合があるが、本発明に用いることのできるシアリダーゼは、(2 6) 結合のみを切断するものでもよく、(2 6) 結合を含むいくつかの結合を切断するものでもよい。例えば、アリスロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*) 由来のシアリダーゼは、(2 3) 結合、(2 6) 結合、及び (2 8) 結合を切断することができ、本発明のPSAの分析方法に用いることができる。

【0028】

シアリダーゼは、ノイラミニダーゼとも呼ばれ、哺乳動物もシアリダーゼを有しているが、細菌、ウイルス、及び原虫由来のシアリダーゼの研究が進んでいる。シアリダーゼとしては、アリスロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*)、クロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、インフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルスなどの由来の

10

20

30

40

50

シアリダーゼが知られているが、これらのうち、シアル酸の（２６）結合を切断することができるシアリダーゼとして、アリスロバクター・ウレアファシエンス、及びクロストリジウム・パーフリンゲンス由来のシアリダーゼを挙げる事ができる。

【００２９】

本明細書に記載のＰＳＡの分析方法は、前記レクチンとＰＳＡを含む可能性のある試料とを接触させ、レクチンに親和性のあるＰＳＡの量を判定する限り、特に限定されるものではないが、（Ａ）レクチンにより、レクチンに親和性のあるＰＳＡと前記レクチンに親和性のないＰＳＡとを分別し、レクチンに親和性のあるＰＳＡの量を判定する分析方法（以下、分析方法（Ａ）と称することがある）、及び（Ｂ）レクチンと、レクチンに親和性のあるＰＳＡとが結合した状態でレクチンに親和性のあるＰＳＡの量を判定する分析方法（以下、分析方法（Ｂ）と称することがある）を挙げる事ができる。本発明のＰＳＡ分析方法として、（ｓＡ）前記分析方法（Ａ）において、試料として、ＰＳＡを含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料を用いる分析方法（以下、分析方法（ｓＡ）と称することがある）、及び（ｓＢ）前記分析方法（Ｂ）において、試料として、ＰＳＡを含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加することによって得られたシアリダーゼ処理試料を用いる、分析方法（以下、分析方法（ｓＢ）と称することがある）を挙げる事ができる。分析方法（ｓＡ）は分析方法（Ａ）に、分析方法（ｓＢ）は分析方法（Ｂ）に、それぞれ含まれるものである。

10

【００３０】

《分析方法（Ａ）》

20

前記分析方法（Ａ）は、

（ａ）本発明のレクチンとして例えば - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと、ＰＳＡを含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるＰＳＡと前記レクチンに親和性のないＰＳＡとを分別する段階（以下、「分別段階（ａ）」と称することがある）、及び

（ｂ）前記試料中のレクチンに親和性のあるＰＳＡの量を判定する段階（以下、「判定段階（ｂ）」と称することがある）

を含む。

【００３１】

《分析方法（ｓＡ）》

30

本発明の分析方法（ｓＡ）は、分析方法（Ａ）に含まれるものであり、前記分析方法（Ａ）における分別段階（ａ）の前に、（ｓ）ＰＳＡを含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階（以下、「シアリダーゼ処理段階（ｓ）」と称することがある）を含むものである。

すなわち、前記分析方法（ｓＡ）は、（ｓ）ＰＳＡを含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階、（ａ） - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと前記シアリダーゼ処理試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるＰＳＡと前記レクチンに親和性のないＰＳＡとを分別する段階、及び（ｂ）前記レクチンに親和性のあるＰＳＡの量を判定する段階を含む。

【００３２】

40

前記シアリダーゼ処理段階（ｓ）においては、ＰＳＡを含む可能性のある試料を、希釈せずに、又は適当な緩衝液で希釈し、そしてその試料に、シアル酸の（２６）結合を切断することができるシアリダーゼを添加する。これによって、ＰＳＡからシアル酸を除去し、ＰＳＡの - N - アセチルガラクトサミン残基を露出させる事ができる。

試料を希釈する緩衝液は、シアリダーゼの活性を維持できるものであれば、限定されないが、例えば、前記レクチンカラムの平衡化に用いる 0.1% 牛血清アルブミン（ＢＳＡ）含有リン酸緩衝液、又は 0.1% 牛血清アルブミン（ＢＳＡ）含有トリス塩酸緩衝液などを利用することができる。

シアリダーゼの使用量は、特に限定されるものではなく、シアリダーゼの種類によって、適宜決定することができる。例えば、アリスロバクター・ウレアファシエンス由来のシ

50

アルダーゼを用いる場合、2 ~ 1000 mU、好ましくは10 ~ 500 mU、より好ましくは20 ~ 100 mUのシアリダーゼを用いることにより、PSAのシアル酸の(26)結合を切断することができる。

シアリダーゼの処理(反応)時間は、特に限定されるものではなく、シアリダーゼの種類によって、適宜決定することができるが、10分~24時間であり、好ましくは、15分~2時間であり、より好ましくは、30分~1時間である。また、反応温度も、特に限定されるものではなく、シアリダーゼの種類によって、適宜決定することができるが、好ましくは25 ~ 40 である。

【0033】

前記シアリダーゼ処理段階(s)において得られたシアリダーゼ処理試料は、そのまま、又は更に希釈して、分別段階(a)に用いることができ、それに続いて、前記判定段階(b)を行うことができる。

10

【0034】

前記分別段階(a)においてレクチンに親和性のあるPSAとレクチンに親和性のないPSAとを分別する方法は、レクチンとPSAの親和性を利用する方法であれば、特に限定されるものではないが、例えば、担体にレクチンを結合させ、担体に結合したレクチン(以下、「レクチンアフィニティーカラム」と称することがある)にPSAを含む可能性のある試料を接触させ、レクチンに結合したPSAとレクチンに結合しないPSAを分離することによって行うことができる。

【0035】

20

担体としては、レクチンを結合させることのできるものであれば、限定されるものではないが、例えば、セファロース、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリアクリレート、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、スチレンとジビニルベンゼンのコポリマー、ポリアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリ塩化ビニル、ポリメチルアクリレート、ポリスチレン及びポリスチレン・コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、コラーゲン、アルギン酸カルシウム、ラテックス、ポリスルホン、シリカ、ジルコニア、アルミナ、チタニア、セラミックスを挙げることができる。担体の形状も特に限定されるものではないが、粒子状のビーズ、プレート、及びゲルなどの形状の担体を用いることができる。例えば、レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとの分別に、レクチンアフィニティーカラムを用いる場合は、担体はゲルの形状が好ましい。

30

【0036】

レクチンアフィニティーカラムは、定法に従って作製することが可能である。例えば、CNBr-活性化セファロース4Bを用い、メーカーの推奨するプロトコールに従って、カップリングを行い、レクチンカラムを作製することが可能である。セファロースゲルへのレクチンの結合量は、2 mg/mL ~ 10 mg/mLが好ましい。

【0037】

レクチンアフィニティーカラムを用いて、前記レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとを分別する方法は、通常のレクチンアフィニティーカラムを用いた糖タンパク質の分離方法に従って行うことができる。

40

レクチンアフィニティーカラムは、PSAを含む可能性のある試料をアプライする前に、緩衝液で平衡化させる。平衡化緩衝液としては、例えば、0.1%牛血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝液、又は0.1%牛血清アルブミン(BSA)含有トリス塩酸緩衝液を用いることができる。

カラムを平衡化した後に、PSAを含む可能性のある試料を添加し、一定時間静置し、レクチンとPSAとを接触させる。接触時間は、特に限定されるものではなく、レクチンの種類とPSAの親和性によって、適宜決定することができるが、結合の速度と効率を考慮すると、通常15分~30分で行うことが多い。

レクチンとPSAとを接触させる温度も、特に限定されるものではなく、レクチンの種

50

類とP S Aとの親和性によって、適宜決定することができるが、0 ~ 40で行うことが可能であり、好ましくは0 ~ 30である。0未満では、カラムが凍結してしまうことがあり、40を超えるとレクチンに親和性のないタンパク質の非特異結合が起こることがある。例えば、T J A - I IとP S Aを接触させる温度も特に限定されるものではないが、通常、4 ~ 10で接触させるのが好ましい。また、W F AとP S Aとを接触させる温度も特に限定されるものではないが、通常、4 ~ 10で接触させるのが好ましい。

【0038】

次に、レクチンに親和性のある結合画分（以下、「結合画分」と称することがある）と、レクチンに親和性のない非結合画分（以下、「非結合画分」と称することがある）を分別する。

10

レクチンへの非結合画分は、洗浄用緩衝液をカラムに添加し、素通り画分を回収することによって得ることができる。洗浄用緩衝液は、レクチンとP S Aの結合を解離させずに、非結合成分を流出させることのできる緩衝液であれば、限定されるものではないが、例えば、前記平衡化に用いた緩衝液を使用することができる。洗浄用緩衝液の容量は、レクチンの種類とP S Aとの親和性に応じて、適宜決定することができるが、好ましくはカラム容量の3 ~ 7倍であり、より好ましくは5倍程度である。

レクチンへの結合画分は、溶出用緩衝液をカラムに添加し、溶出画分を回収することによって得ることができる。溶出用緩衝液は、ハプテン糖を含んでおり、それによりレクチンに結合したP S Aをレクチンから分離させることができる。ハプテン糖はレクチンの特異性によって適宜選択することが可能であるが、T J A - I Iの場合は、ラクトースなどをハプテン糖として用いることができ、例えば10 mMラクトース、0.1%牛血清アルブミン（B S A）含有リン酸緩衝液を用いて、溶出画分を回収することができる。また、W F Aの場合は、G a l N A cなどをハプテン糖として用いることができ、例えば10 mM G a l N A c、0.1%牛血清アルブミン（B S A）含有リン酸緩衝液を用いて、溶出画分を回収することができる。溶出用緩衝液の容量は、適宜選択することが可能であるが、好ましくはカラム容量の3 ~ 7倍であり、より好ましくは5倍程度である。溶出の温度も特に限定されるものではないが、0 ~ 40、好ましくは2 ~ 25、より好ましくは4 ~ 20で行うことができる。0未満では、カラムが凍結してしまうことがあり、40を超えるとレクチンに親和性のないタンパク質の非特異結合が起こることがある。例えば、T J A - I IからP S Aを溶出させる温度は、特に限定されるものではないが、室温で溶出させるのが好ましい。また、W F AからP S Aを溶出させる温度も、特に限定されるものではないが、室温で溶出させるのが好ましい。

20

30

【0039】

前記判定段階（b）における、レクチンに親和性のあるP S Aの量の判定は、

- （1）分別されたレクチンに親和性のあるP S A量の測定による判定、
 - （2）分別前の試料中のP S A量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるP S A量の測定による判定、又は
 - （3）分別前の試料中のP S A量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないP S A量の測定による判定
- を挙げることができる。

40

【0040】

前記分別されたレクチンに親和性のあるP S A量の測定による判定（1）は、前記レクチンへの結合画分中のP S A量を定量的又は半定量的に測定することによって行うことができる。すなわち、患者の血液中に含まれているレクチンに親和性のあるP S Aの絶対量を測定することによって、判定を行うものである。

【0041】

前記分別前の試料中のP S A量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるP S A量の測定による判定（2）は、分別前の試料中のP S A量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のP S A量の合計量）と前記レクチンへの結合画分中の

50

P S A量とを比較することによって行うことができる。具体的には、分別前の試料中のP S A量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のP S A量の合計量）に対する、前記レクチンへの結合画分中のP S A量の割合を計算することによって、レクチンに親和性のあるP S Aの量を判定することが可能であり、例えば、以下のいずれかの式によって求めることができる。

$$\text{P S Aの結合率} = (\text{結合画分中のP S A量} / \text{結合画分及び非結合画分のP S Aの合計量}) \times 100\%$$

$$\text{P S Aの結合率} = (\text{結合画分中のP S A量} / \text{分別前の試料中のP S A量}) \times 100\%$$

【0042】

また、分別前の試料中のP S A量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないP S A量の測定による判定（3）は、分別前の試料中のP S A量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のP S A量の合計量）と前記レクチンへの非結合画分中のP S A量とを比較することによって行うことができる。具体的には、分別前の試料中のP S A量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のP S A量の合計量）から、前記レクチンへの非結合画分中のP S A量を減算することによって、レクチンに親和性のあるP S Aの量を判定することが可能である。例えば、以下のいずれかの式によって求めることができる。

$$\text{レクチン親和性P S A量} = \text{分別前の試料中のP S A量} - \text{非結合画分中のP S A量}$$

$$\text{レクチン親和性P S A量} = \text{結合画分及び非結合画分のP S Aの合計量} - \text{非結合画分中のP S A量}$$

【0043】

前記（1）及び（2）の判定では、レクチンに結合したP S Aをレクチンから分離してその量を測定するが、前記（3）の判定のうち、分別前の試料中のP S A量と非結合画分中のP S A量とからの判定では、レクチンに結合したP S A量を測定しないため、レクチンに結合したP S Aを分離せずに判定することもできる。

また、分取した結合画分及び非結合画分のP S A量は、すべての画分についてP S A量の測定を行うことが好ましいが、予めP S Aが含まれる分取画分を調べておき、その画分について測定を行い、P S Aの分析を行うことも可能である。

【0044】

前記判定段階（b）において、レクチンに親和性のあるP S A量を判定するためのP S Aの測定方法としては、P S Aを定量的又は半定量的に判定することのできる方法であれば、特に限定されるものではないが、トータルP S Aの測定方法又はフリーP S Aの測定方法を用いることができる。トータルP S Aの測定方法又はフリーP S Aの測定方法は、定法に従い、抗体又はその断片を用いる免疫学的手法（例えば、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、免疫組織染色法、又はウエスタンブロット等）によって測定することができ、P S A測定キットとして市販されているものを使用することも可能である。

【0045】

トータルP S Aの測定方法に免疫学的分析方法を用いる場合には、P S A - A C T及びフリーP S Aの両方のP S Aに結合することのできるモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いる。一方、フリーP S Aの測定方法に免疫学的分析方法を用いる場合には、フリーP S Aのみに結合することのできるモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いる。モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、免疫抗原としてP S A - A C T又はフリーP S Aを用いること以外は、公知の方法によって作製することが可能であり、例えば、モノクローナル抗体は、K o e h l e rとM i l l s t e i nの方法（Nature 256 : 495-497, 1975）に従って、作製することができる。また、ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギの皮内に、P S A - A C T又はフリーP S Aを単独もしくはB S A、K L Hなどと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で採血し、そのまま抗血清として、又は抗体を公知の方法で精製して使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

後述の実施例の解析により、本発明の P S A の分析方法に用いることのできる T J A - I I 又は W F A を用いたレクチンアフィニティーカラムは、試料中の P S A を約 1 0 0 % (少なくとも、97%以上)回収することが可能であることが分かった。これに対して、特許文献 1 に記載の M A A の場合は、溶出液として乳糖含有リン酸緩衝液を用いた回収率は 3 0 ~ 7 0 % であり、溶出液を、0.1 M 酢酸液に変更しても、回収率は改善されなかった。

【 0 0 4 7 】

《分析方法 (B) 》

前記分析方法 (B) は、レクチンにより直接レクチンに親和性のある P S A を検出する方法であるが、具体的には、電気泳動によるレクチンプロット、又はドットプロットによるレクチンプロットを挙げることができる。どちらのレクチンプロットも、定法に従って行うことができるが、電気泳動によるレクチンプロットの場合、P S A を含む可能性のある試料を電気泳動し、ニトロセルロース膜、P V D F 膜に P S A を転写し、サンプルメンブレンとして用いる。ドットプロットによるレクチンプロットの場合、ドットプロット装置により、P S A を含む可能性のある試料をニトロセルロース膜、又は P V D F 膜などに吸着させ、サンプルメンブレンとして用いる。サンプルメンブレンは、ブロッキングバッファーでブロッキングを行い、ビオチン標識したレクチン、例えばビオチン標識 W F A 又はビオチン標識 T J A - I I を含む溶液中で接触させる。その後、発色酵素、又は発光酵素、例えば H R P で標識されたアビジンと接触させ、発色液又は発光液を接触させ、得られたシグナルを検出する。

【 0 0 4 8 】

更に、レクチンにより直接レクチンに親和性のある P S A を検出する方法 (B) としては、イムノプロット及び酵素免疫法を一部変更して行うことができる。具体的には、前記 P S A に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を、ニトロセルロース膜など、又は E L I S A プレートなどに固相化し、ブロッキングバッファーでブロッキングを行う。P S A を含む可能性のある試料をニトロセルロース膜、又は E L I S A プレートなどに接触させ、次にビオチン標識したレクチン、例えばビオチン標識 W F A 又はビオチン標識 T J A - I I を接触させる。その後、発色酵素、又は発光酵素、例えば H R P で標識されたアビジンを結合させ、発色液又は発光液によりシグナルを検出することができる。

【 0 0 4 9 】

《分析方法 (s B) 》

本発明の分析方法 (s B) は、分析方法 (B) に含まれるものであり、前記電気泳動によるレクチンプロット、又はドットプロットによるレクチンプロットの前に、(s) P S A を含む可能性のある試料にシアリダーゼを添加し、シアリダーゼ処理試料を得る段階 (すなわち、シアリダーゼ処理段階 (s)) を含むものである。シアリダーゼ処理段階 (s) は、前記分析方法 (s A) に記載の段階と同じように行うことができ、得られたシアリダーゼ処理試料は、そのまま、又は更に希釈して、レクチンプロットに用いることができる。

【 0 0 5 0 】

本発明の P S A の分析方法に用いる被検試料としては、P S A を含む生体試料若しくは生体由来試料か、又は P S A を含む可能性のある生体試料若しくは生体由来試料を挙げることができ、例えば、尿、血液、血清、血漿、髄液、唾液、細胞、組織、若しくは器官、又はそれらの調整物 (例えば、生検標本、特には、前立腺の生検標本)等を挙げることができ、血液、血清、血漿、又は前立腺の生検標本が好ましく、特には血液、血清、又は血漿が好ましい。健常人及び前立腺肥大症患者の血液、血清、又は血漿中には、- N - アセチルガラクトサミン残基及び / 又は フコース (1 , 2) ガラクトース残基を有する P S A は、ほとんど存在しておらず、前立腺癌患者においては、病期の初期から血液中に放出されるために、前立腺癌を検出するための被検試料として適当であるからである。

【 0 0 5 1 】

前記尿、血液、血清、血漿、髄液、唾液などの液性の試料は、前記分析方法（A）又は分析方法（B）において、それぞれの分析方法に応じて適当な緩衝液により希釈して使用することができる。また、細胞、組織、又は器官などの固形の試料は、固形の試料の体積の2～10倍程度の適当な緩衝液でホモジェナイズして、懸濁液又はその上清を、前記分析方法（A）又は分析方法（B）において、そのまま、又は更に希釈して使用することができる。

例えば、前記分析方法（A）において、レクチンアフィニティーカラムを用いる場合、前記液体試料、又は固形の試料の懸濁液若しくはその上清は、適当な緩衝液により希釈して用いることができる。希釈倍率は、レクチンとPSAとの結合が阻害されなければ、特に限定されないが、好ましくは2～400倍であり、より好ましくは2～300倍であり、最も好ましくは4～200倍である。また、レクチンアフィニティーカラムにアプライする試料の容量は、カラムのベッドボリュームの40%以下が好ましく、30%以下がより好ましく、20%以下が、最も好ましい。例えば1mLのベッドボリュームのレクチンアフィニティーカラムを用いる場合、400μL以下が好ましく、300μL以下がより好ましく、200μL以下が最も好ましい。

【0052】

[2] 前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法

前記PSAの分析方法により、試料中のレクチンに親和性のあるPSAの量を分析することにより、前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別することができる。

前記PSAの分析方法により、レクチンに親和性のあるPSAの量を測定し、前立腺肥大症又は健常人から採取した血液等中のレクチンに親和性のあるPSAの量と比較することにより、前記患者が前立腺癌であるか否かを判定することができる。より具体的には、前立腺肥大症又は健常人の試料中に存在するレクチンに親和性のあるPSAと比べて、前記患者の試料中に存在するレクチンに親和性のあるPSAが有意に多い場合に前記患者は前立腺癌であると判定することができる。

前記分析方法（A）（分析方法（sA）を含む）においては、 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基及びブコース（1,2）ガラクトース残基を認識するTJA-IIへの結合率と、 $-N-$ アセチルガラクトサミン残基のみを認識するWFAへの結合率が異なっている。従って、使用するレクチンの測定値によって、前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別することのできるカットオフ値を、それぞれ決定することが好ましい。カットオフ値は、前立腺癌患者の100%を陽性と判定でき、前立腺肥大症患者の100%を陰性と判定できる値が最も好ましい。もし、分析した前立腺癌と前立腺肥大症の母集団が増加することによって、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者との間の測定値が、オーバーラップした場合は、前立腺癌患者が100%陽性と判断される値をカットオフ値として選択することが好ましいが、オーバーラップした範囲の任意の値をカットオフ値とすることも可能である。具体的には、後述の実施例のTJA-II結合画分中のPSA量を測定した場合、前立腺癌患者の検出のためのカットオフ値は、前立腺癌患者のPSAを検出することのできる値であれば、限定されないが、例えば200pg/mLを超え、240pg/mL未満に設定することが可能であり、好ましくは、220pg/mLである。

また、後述の実施例のレクチンへのPSAの結合率は、下記の式で得ることのできる百分率から決定することができる。

$$PSAの結合率 = (結合画分中のPSA量 / 分別前の試料中のPSA量) \times 100\%$$

PSAの結合率のカットオフ値も、前立腺癌患者の100%を陽性と判定でき、前立腺肥大症患者の100%を陰性と判定できる値が最も好ましい。もし、分析した前立腺癌と前立腺肥大症の母集団の増加によって、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者との間で、レクチンへのPSAの結合率が、オーバーラップする場合は、前立腺癌患者が100%陽性と判断される値が好ましいが、オーバーラップした範囲の任意の値をカットオフ値とすることも可能である。具体的には、後述の実施例のPSAのTJA-II結合率のカットオフ値は前立腺癌を検出することのできる値であれば、限定されないが、例えば1.8%を超え、3%未満に設定することが可能であり、好ましくは2.4%である。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

[3] 前立腺癌の診断キット

本発明の診断キットは、 α -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンを含む。また、本発明の診断キットは、フコース（1, 2）ガラクトース残基と親和性のあるレクチンを含むこともできる。更に、本発明の診断キットは、 α -N-アセチルガラクトサミン残基（GalNAc 1 R）及びフコース（1, 2）ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含むこともできる。本発明の診断キットに含まれるレクチンは、上記担体に結合させた状態のものも含まれる。

【 0 0 5 4 】

本発明の診断キットは、前記 α -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン、フコース（1, 2）ガラクトース残基に親和性のあるレクチン、並びに α -N-アセチルガラクトサミン残基及びフコース（1, 2）ガラクトース残基と親和性を有するレクチンは、1つ又は2つ以上組み合わせることができる。

10

【 0 0 5 5 】

α -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンとしては、特に限定されるものではないが、TJA-III及びWFAを挙げることができる。また、フコース（1, 2）ガラクトース残基と親和性のあるレクチンとしては、特に限定されるものではないが、UEA-1及びTJA-IIIを挙げることができる。更に、 α -N-アセチルガラクトサミン残基（GalNAc 1 R）及びフコース（1, 2）ガラクトース残基と親和性を有するレクチンとしては、TJA-IIIを挙げることができる。

20

【 0 0 5 6 】

本発明の診断キットは、シアリダーゼを含むこともできる。シアル酸の（2, 6）結合を切断することができるシアリダーゼであれば、特に限定されるものではないが、アリスロバクター・ウレアファシエンス、及びクロストリジウム・パーフリングENS由来のシアリダーゼを挙げることができる。

【 0 0 5 7 】

本発明の診断キットは、更に抗PSA抗体（例えば、PSA-Act又はフリーPSAに特異的に結合する抗体）又はその断片を含むことができる。前記抗体としては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれを用いることもできる。前記抗体断片としては、PSA-Act又はフリーPSAへの特異的結合能を保持する限り、特に限定されるものではなく、例えば、Fab、Fab'、(Fab')₂、又はFvを用いることができる。

30

【 0 0 5 8 】

前記レクチン及び抗PSA抗体を含む、本発明の診断キットは、用いる免疫学的手法に応じて、所望の形態で前記抗PSA抗体、又はその断片を含むことができる。

例えば、標識化抗体を用いる免疫学的手法、例えば、酵素免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、又は放射免疫測定法などの場合には、標識物質で標識した標識化抗体又は標識化抗体断片の形態で含むことができる。標識物質の具体例としては、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、又はグルコースオキシダーゼ等を、蛍光物質としてフルオレセインイソシアネート又は希土類金属キレート等を、放射性同位体として³H、¹⁴C、又は¹²⁵I等を、その他、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質等を挙げることができる。酵素又は化学発光物質等の場合には、それ自体単独では測定可能なシグナルをもたらすことはできないことから、それぞれ対応する適当な基質等を選択して含むことが好ましい。

40

【 0 0 5 9 】

《作用》

グレーゾーンのPSA値（トータルPSA値が4~10ng/mL）を示す患者においては、前記のように血清試料のフリーPSA/トータルPSA比（F/T値）の測定が行われている。表1に示すように、前立腺肥大症患者9例中7例において、F/T値が25%以下を示しており、これらの患者は、確定診断のための生検の対象となるが、実際には

50

前立腺肥大症であり、患者にとって過度の負担となっている。

本発明に用いることのできるTJA-I Iは糖鎖の非還元末端に存在するフコース (1, 2)ガラクトース残基及び -N-アセチルガラクトサミン残基を認識するレクチンである。WFAは糖鎖の非還元末端に存在する -N-アセチルガラクトサミン残基を認識するレクチンである。また、UEA-Iは糖鎖の非還元末端に存在するフコース (1, 2)ガラクトース残基を認識するレクチンである。本明細書によって、前立腺癌患者の体内にTJA-I I、WFA又はUEA-Iと結合するPSAが存在することが示され、すなわち、図6に示すように、癌化に伴ってPSA糖鎖に、これらの糖鎖構造が出現することが、初めて示されたものである。

更に、後述の実施例3に示すように、前立腺癌患者の血清PSAを、シアル酸 (2, 6)結合を切断することのできるシアリダーゼで処理することにより、TJA-I Iと結合することのできるPSAの量が増加することを見出した。このことは、シアリダーゼ処理により、シアル酸 (2, 6)結合が切断され、シアル酸が結合していた -N-アセチルガラクトサミン残基が露出することを示している。すなわち、図6に示すように、前立腺癌の患者の血清中に含まれるPSAが、シアル酸 (2, 6) -N-アセチルガラクトサミン残基(Sia₂₋₆GalNAc₁R)を、有していることを初めて見出したものである。

前記のように前立腺癌由来のLNCaP細胞のPSAは、非還元末端側にHexNAc₁-HexNAc残基を持つことが報告されている(非特許文献1)。HexNAcには、 -N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)及び -N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が含まれるが、質量分析では分子量が同一となり、区別することができない。また、非特許文献1に記載のLNCaP細胞から分泌されるPSAは、その糖鎖は、シアル酸を欠如していることなどから、前立腺癌患者の生体のPSAを反映していないと考えられていた。従って、本明細書において、TJA-I Iカラム、WFAカラム及びUEA-Iカラムを用いることによって、前立腺癌患者の血清PSAにおける非還元末端 -N-アセチルガラクトサミン、及びフコース (1, 2)ガラクトース残基を初めて同定できたものである。

癌化に伴うPSA糖鎖構造の変化、すなわちフコース (1, 2)ガラクトース残基、 -N-アセチルガラクトサミン残基、シアル酸 (2, 6) -N-アセチルガラクトサミン残基の出現は、前立腺癌の発症によって、糖鎖の合成に関わる糖転移酵素活性量の変化が背景にあるものと考えられる。

【0060】

また、特許文献1及び非特許文献2に記載のように、前立腺癌における糖鎖の構造変化をNeuAc₂₋₃Gal₁₋₄GlcNAcを特異的に認識するMAAで検出しようとする場合に、一定の割合の血中PSAは、血清 1-アンチキモトリプシンと結合したPSA-ACTの状態が存在している。MAAは 1-アンチキモトリプシンとも結合するため、PSAの糖鎖構造が異なっても、 1-アンチキモトリプシンと結合したPSAは分別することができない。従って、MAAでPSAを分別した場合は、フリーPSAを測定する必要がある。

一方、本発明で用いることのできるTJA-I IはPSA糖鎖の非還元末端に存在するフコース (1, 2)ガラクトース残基又は -N-アセチルガラクトサミン残基を認識し、WFAはPSA糖鎖の非還元末端に存在する -N-アセチルガラクトサミン残基を認識するが、これらの糖鎖構造は血清 1-アンチキモトリプシン上には存在しないため、トータルPSA測定キットを用いて定量することが可能である。一般的にフリーPSA量はトータルPSA量の20%以下であり、本発明の分析方法においてはトータルPSA測定キットを用いることのできるため、非特許文献2及び特許文献1に記載の発明と比較して感度の上で有利である。

【0061】

[4] 糖転移酵素の分析による前立腺癌の検出方法

後述の実施例5に示すように、前立腺癌患者のPSAにおけるフコース (1, 2)ガ

10

20

30

40

50

ラクトース残基 (F u c 1 2 G a l 1 R) の増加には、フコース転移酵素、すなわちフコース転移酵素1 (以下、F U T 1 と称することがある) の前立腺癌における発現の増加が強く関与している。また、前立腺癌患者の P S A における - N - アセチルガラクトサミン残基 (G a l N A c 1 R) 、及びシアル酸 (2 , 6) - N - アセチルガラクトサミン残基 (S i a 2 6 G a l N A c 1 R) の増加は、 - N - アセチルガラクトサミン転移酵素、すなわち - N - アセチルガラクトサミン転移酵素4 (以下、 4 G A L N T 4 と称することがある) の前立腺癌における発現の増加によるものであると考えられる。従って、前立腺癌患者由来の試料の F U T 1 及び 4 G A L N T 4 から選択される少なくとも1つの糖転移酵素を分析することによって、前立腺癌患者と、正常人又は前立腺肥大症患者とを鑑別することが可能である。以下に、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 を、それぞれフコース転移酵素又は - N - アセチルガラクトサミン転移酵素の例として、本発明の前立腺癌の検出法について説明する。

10

【 0 0 6 2 】

本発明の検出方法において、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 を分析する方法としては、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 を定量的又は半定量的に決定することができるか、あるいは、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 の存在の有無を判定することができる限り、特に限定されるものではなく、例えば、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 の m R N A 量を測定する分子生物学的分析方法 (例えば、サザンプロット法、ノザンプロット法、及び P C R 法等) 、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 に対する抗体又はその断片を用いる免疫学的手法 (例えば、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、免疫組織染色法、又はウエスタンプロット等) 、又は生化学的手法 (例えば、酵素学的測定法) などを用いることができる。

20

【 0 0 6 3 】

《分子生物学的分析方法》

F U T 1 又は 4 G A L N T 4 の分子生物学的分析方法としては、試料中の遺伝子、例えば m R N A 又はそれから得られた c D N A などと、それらのヌクレオチドにハイブリダイズすることのできるプライマーやプローブとを用い、ハイブリダイズの原理を用いた方法で分析するものであれば、特に限定されるものではないが、例えば、サザンプロット法、ノザンプロット法、及び P C R 法を挙げることができるが、特にリアルタイム P C R 法が正確で且つ簡便であり、好ましい。

30

【 0 0 6 4 】

リアルタイム P C R 法としては、フォワードプライマー及びリバープライマーからなるプライマーセットを用い、二本鎖 D N A に結合することで蛍光を発する化合物であるインターカレーター、例えば、S Y B R Green I を P C R の反応系に加えるインターカレーター法、並びに前記プライマーセットと、5 ' 末端をレポーター色素で、3 ' 末端をクエンチャー色素で修飾したプローブ (T a q M a n プローブ) とを P C R の反応系に加える T a q M a n 法等を挙げることができる。このようなリアルタイム P C R 法自体は周知であり、そのためのキット及び装置も市販されているので、前記プライマーセット、又はプライマーセット及びプローブを合成すれば、市販のキット及び装置を用いて容易に実施することができる。

40

【 0 0 6 5 】

前記フォワードプライマー及びリバープライマー、並びにプローブは、F U T 1 又は 4 G A L N T 4 をコードするヌクレオチドの塩基配列に基づいて作成することができる。具体的には、F U T 1 のフォワードプライマー及びリバープライマー、並びにプローブは、配列番号1で表される F U T 1 をコードする c D N A の塩基配列 (G e n B a n k a c c e s s i o n n o . N M _ 0 0 0 1 4 8) から、適当な塩基配列を選択し、作製することができ、例えば、フォワードプライマーとして 5 ' - A A C G C C T C C T C T T C C T G T C - 3 ' (配列番号3) を、リバープライマーとして 5 ' - T G G G G T A G A C A G T C C A G G T G - 3 ' (配列番号4) を挙げることができる。また、4 G A L N T 4 のフォワードプライマー及びリバープライマー、並びにプローブは、配

50

列番号2で表される 4 G A L N T 4 をコードする c D N A の塩基配列 (G e n B a n k a c c e s s i o n n o . N M _ 1 7 8 5 3 7) から、適当な塩基配列を選択し、作製することができ、例えば、フォワードプライマーとして 5 ' - A C T G G G A G C T C C T G G A C A - 3 ' (配列番号 1 1) を、リバースプライマーとして 5 ' - T G G T G A T A G A A A T T C C G C A G T - 3 ' (配列番号 1 2) を挙げるができる。

プライマーの長さは、特に限定する必要はないが、好ましくは、15mer ~ 35mer であり、より好ましくは、16mer ~ 30mer であり、最も好ましくは、19mer ~ 25mer である。プローブの長さは、特に限定する必要はないが、好ましくは、12mer ~ 30mer であり、より好ましくは、13mer ~ 29mer であり、最も好ましくは、14mer ~ 18mer である。

【0066】

前記PCR法、特にリアルタイムPCR法は、
 (1) 生体由来の試料からmRNAを抽出する工程、
 (2) 抽出されたmRNAを鋳型として、逆転写酵素によりcDNAを合成する工程、
 (3) プライマーセット、又はプライマーセット及びプローブを用いてDNAを増幅する工程、及び
 (4) 増幅されたDNAを検出する工程、
 を含むことができる。

【0067】

前立腺癌が疑われる患者の生体由来の試料中におけるFUT1のmRNAの発現量を、測定し、健常者生体由来試料中のFUT1の発現量と比較することにより、前記患者が前立腺癌であるか否かを判定することができる。より具体的には、健常者のFUT1の発現量と比べて、前記患者のFUT1の発現量が有意に多い場合に前記患者は前立腺癌であると判定することができる。また、4GALNT4についても、同様に健常者と比較することにより、前立腺癌の判定が可能である。

例えば、後述の実施例におけるリアルタイムPCRの場合、FUT1又は4GALNT4の健常者の平均値を求め、標準偏差(SD)を求めめる。癌患者の検出のためのカットオフ値は、前立腺癌を検出することのできる値であれば、限定されない。例えば、平均値を超える検体を陽性と判定することも可能であるし、平均値±SD、平均値±2SD、又は平均値±3SDをカットオフ値とすることもできる。

【0068】

《免疫学的分析方法》

FUT1の分析方法として、免疫学的分析方法を用いる場合には、FUT1に結合するモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いることができる。また、4GALNT4の分析方法として、免疫学的分析方法を用いる場合には、4GALNT4に結合するモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いることができる。

【0069】

モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、免疫抗原としてFUT1又は4GALNT4を用いること以外は、公知の方法によって作成することが可能であり、例えば、モノクローナル抗体は、Koe h l e r と M i l s t e i n の方法 (N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 , 1 9 7 5) に従って、作製することができる。また、ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギの皮内に、FUT1又は4GALNT4のタンパク質を単独もしくはBSA、KLHなどと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で採血し、そのまま抗血清として、又は抗体を公知の方法で精製して使用することができる。

【0070】

免疫学的分析方法として、酵素免疫測定方法、特にサンドイッチ法を用いる場合には、以下のように行うことが可能である。例として、4GALNT4に対する抗体を用いる場合について説明する。

まず、マイクロプレートやビーズなどの不溶性担体に、4 GALNT4 に結合する抗体（捕捉抗体、又は一次抗体）を固相化する。次に、捕捉抗体や不溶性担体への非特異的な吸着を防ぐために、適当なブロッキング剤（例えば、牛血清アルブミンやゼラチン等）で不溶性担体のブロッキングを行う。捕捉抗体が固相化されたプレートやビーズに、4 GALNT4 が含まれる被検試料を一次反応液と一緒に加え、捕捉抗体と4 GALNT4 を接触させ、結合させる（一次反応工程）。この後、捕捉抗体に結合しなかった抗原や夾雑物を適当な洗浄液（例えば、界面活性剤を含むリン酸緩衝液）で洗浄する。次に、捕捉された4 GALNT4 と結合する抗体と西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）などの酵素とが結合した標識抗体（2次抗体）を添加し、捕捉された抗原に標識抗体を結合させる（二次反応工程）。この反応により、捕捉抗体 - 4 GALNT4 - 標識抗体の免疫複合体がマイクロプレート等の担体上に形成される。結合しなかった標識抗体を洗浄液で洗浄し、標識抗体の酵素に対する発色基質や発光基質を添加し、酵素と基質を反応させることによりシグナルを検出する。また、2次抗体を直接標識せずに、2次抗体に結合する抗体を標識しシグナルを検出することも可能である。

10

抗体を標識する酵素としては、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、及びルシフェラーゼなどを挙げることができる。また酵素以外にも、標識物質として、アクリジニウム誘導体などの発光物質、ユーロピウムなどの蛍光物質、 I^{125} などの放射性物質などを使用することができる。また、標識物質に合わせて基質や発光誘導物質を適宜選択することができる。更に、本発明における標識抗体は、検出マーカーとしてハプテンや低分子量のペプチド、レクチンなどの抗原抗体反応のシグナルの検出に利用できる物質を結合させた抗体も含むことができる。

20

【0071】

更に被検試料として前立腺の生検試料を用いる場合には、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色法により、前立腺でのFUT1又は4 GALNT4 の発現を確認することにより、前立腺癌であるか否かを判定することができる。

【0072】

また、被検試料として血液等を用いる場合、前立腺癌の疑いのある患者から血液を採取し、全血のままか、あるいは血清又は血漿とし、その中のFUT1又は4 GALNT4 の量を測定し、健常者から採取した血液等中のFUT1又は4 GALNT4 の量と比較することにより、前記患者が前立腺癌であるか否かを判定することができる。より具体的には、健常者のFUT1又は4 GALNT4 の量と比べて、前記患者のFUT1又は4 GALNT4 の量が有意に多い場合に前記患者は前立腺癌であると判定することができる。

30

例えば、サンドイッチ法によるELISAの場合、FUT1又は4 GALNT4 の健常者の平均値を求め、標準偏差（SD）を求める。前立腺癌患者の検出のためのカットオフ値は、前立腺癌患者を検出することのできる値であれば、限定されない。例えば、平均値を超える検体を陽性と判定することも可能であるし、平均値 \pm SD、平均値 \pm 2SD、又は平均値 \pm 3SDをカットオフ値とすることもできる。

【0073】

《生化学的分析方法》

FUT1又は4 GALNT4 の分析方法として、酵素学的測定法を用いる場合は、例えば、Larsenら〔Larsen RD, Ernst LK, Nair RP, Lowe JB. Proc. Natl Acad Sci USA, 87, 6674-6678 (1990)〕又はGotohら〔Gotoh M, Sato T, Kiyohara K, Kameyama A, Kikuchi N, Kwon YD, Ishizuka Y, Iwai T, Nakanishi H, Narimatsu H. FEBS Lett., 562, 134-140 (2004)〕の方法に従って、FUT1又は4 GALNT4 酵素活性を測定することにより、FUT1又は4 GALNT4 の量又は存在の有無を分析することが可能である。

40

【0074】

本発明の糖転移酵素の分析による前立腺癌の検出方法において、FUT1又は4 GALNT4 の分析に用いる被検試料としては、FUT1又は4 GALNT4 を含有する可

50

能性のある生体試料又は生体由来試料を挙げることができ、例えば、尿、血液、血清、血漿、髄液、唾液等の体液試料、細胞、組織、若しくは器官、又はそれらの調整物（例えば、生検標本、特に、前立腺の生検標本）等を挙げる事ができ、血液、血清、血漿、又は前立腺の生検標本が好ましく、特に血液、血清、又は血漿（以下、血液等と称することがある）が好ましい。健常者又は前立腺肥大症患者の組織、血液、血清、又は血漿中には、FUT1又は4GALNT4は、ほとんど存在しておらず、前立腺癌を検出するための被検試料として適当であるからである。

【0075】

〔5〕糖転移酵素の分析による前立腺癌の検出キット

本発明の分子生物学的分析による前立腺癌の検出用キットは、FUT1又は4GALNT4をコードするヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするプライマーセット、又はプライマーセット及びプローブを含むことができる。本発明の検出用キットにおいてフォワードプライマー、リバースプライマー、及びプローブは、混合物として含まれてもよく、個別の試薬として含まれてもよい。また、本発明のキットは、プライマー及びプローブの他に、リアルタイムPCR法を行うのに必要な試薬及び/又は酵素を更に含むこともできる。更に、本発明のキットは、前立腺癌の検出又は測定用、前立腺癌と健常人又は前立腺肥大症との鑑別用であることを明記した使用説明書を含むことができる。また、これらの記載は、容器に付されていてもよい。

10

【0076】

本発明の免疫学的分析による前立腺癌の検出用キットは、用いる免疫学的手法に応じて、所望の形態でFUT1又は4GALNT4に特異的に結合する抗体、またはその断片を含むことができる。前記抗体としては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれを用いることもできる。前記抗体断片としては、FUT1又は4GALNT4への特異的結合能を有する限り、特に限定されるものではなく、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFvを用いることができる。

20

例えば、標識化抗体を用いる免疫学的手法、例えば、酵素免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、又は放射免疫測定法などの場合には、標識物質で標識した標識化抗体又は標識化抗体断片の形態で含むことができる。標識物質の具体例としては、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、又はグルコースオキシダーゼ等を、蛍光物質としてフルオレセインイソチアネート又は希土類金属キレート等を、放射性同位体として³H、¹⁴C、又は¹²⁵I等を、その他、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質等を挙げる事ができる。酵素又は化学発光物質等の場合には、それ自体単独では測定可能なシグナルをもたらすことはできないことから、それぞれ対応する適当な基質等を選択して含むことが好ましい。

30

更に、本発明のキットは、前立腺癌の検出又は測定用、前立腺癌と健常人又は前立腺肥大症との鑑別用であることを明記した使用説明書を含むことができる。また、これらの記載は、容器に付されていてもよい。

【実施例】

【0077】

以下に実施例及び比較例を示し本発明の具体的な説明を行うが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

40

【0078】

《TJA-II精製例》

キカラスウリ (*Trichosanthes japonica*) の根塊 20 g より、既報 (Yamashita et al., J. Biol. Chem., 267, 25441-25422, 1992) に従って、TJA-II を精製した。具体的には、キカラスウリの塊根を細かく細断し、ワーリングブレンダーを用いて、0.15 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 16 mL でホモジェナイズした。1000 × g で 30 分遠心し、得られた上清の 35 ~ 55 % 飽和の硫酸分画沈殿物を水に溶解し、蒸留水で透析した。凍結乾燥後、435 mg の 35 ~ 55 % 飽和の硫酸沈殿物を 6 mL の PBS に溶解し、PBS で平衡化した porcine stomach mucin セファロース 4

50

B (1 0 m g / m L ゲル) カラム 1 0 m L にアプライした。カラムを洗浄した後、 0 . 1 M ラクトースを含む P B S で溶出し、 T J A - I I を得た。

【 0 0 7 9 】

《カラム作製例》

精製した T J A - I I を用いて、セファロースカラムにカップリングさせ、 T J A - I I カラム及び W F A カラムを作製した。具体的には、 C N B r - S e p h a r o s e (G E h e a l t h c a r e 社製) を用い、メーカーの推奨する添付のプロトコルに従い、ゲル容積 1 m L あたり 3 m g の密度で T J A - I I 結合させ、 T J A - I I カラムを作製した。

また、 W F A (E Y ラボラトリー社製) 及び C N B r - S e p h a r o s e (G E h e a l t h c a r e 社製) を用いて、同様に W F A カラムを作製した。

10

【 0 0 8 0 】

《実施例 1 : T J A - I I を用いた P S A の分析》

本実施例では、前記カラム作製例において作製した T J A - I I カラムを用いて、前立腺癌と診断された 1 5 人の患者及び前立腺肥大症と診断されたトータル P S A が 4 . 0 n g / m L 以上の 9 人の患者について、本発明の P S A の分析方法により P S A の量を測定した。

4 の条件下で、 T J A - I I カラム (1 m L 容量) を 0 . 1 % 牛血清アルブミン (B S A) 含有リン酸緩衝液で平衡化した。血清試料 1 μ L ~ 5 0 μ L をリン酸緩衝液で希釈し、 2 0 0 μ L として、カラムにアプライし、 3 0 分保持した。その後、 5 倍容量の洗浄用緩衝液 (0 . 1 % B S A 含有リン酸緩衝液) でカラムを洗浄し、各 1 m L ずつ分画して T J A - I I 非結合画分を得た。カラムを室温に戻した後、 5 倍容量の溶出緩衝液 (1 0 m M ラクトース、 0 . 1 % B S A 含有リン酸緩衝液) で、 1 m L ずつ分画して溶出し、 T J A - I I 結合画分を得た。 T J A - I I カラムによる分別前の血清試料、 T J A - I I 非結合画分、及び T J A - I I 結合画分について、トータル P S A 量を、アクセスハイブリテックトータル P S A (ベックマンコールター社製) を用いて測定した。 T J A - I I カラムからの P S A 回収率は常に 9 7 % ~ 1 0 0 % であった。表 1 に分別前の血清試料の P S A 量、 T J A - I I 結合画分の P S A 量、及び P S A の T J A - I I 結合率を示す。なお、 T J A - I I 結合率は次の式により計算した。

20

T J A - I I 結合率 = (T J A - I I 結合画分中の P S A 量 / T J A - I I 非結合画分及び T J A - I I 結合画分中の P S A 量) \times 1 0 0 %

30

また、分別前の血清試料のフリー P S A を、アクセスハイブリテックフリー P S A (ベックマンコールター社製) を用いて測定した。前記トータル P S A の量及びフリー P S A の量から、フリー P S A / トータル P S A 比を計算した。結果を表 1、図 2 及び図 3 に示す。なお、癌患者の、年齢、病期 (ステージ)、グリソンスコアは表 2 に示した。病期 (ステージ) は、前立腺癌の進展度を示したものである。また、グリソンスコアは、前立腺癌の悪性度を、病理学上の分類によって 5 段階に分けたものである。「 1 」が最もおとなしい癌で、「 5 」が最も悪い癌を意味するが、前立腺癌の多くは、複数の、悪性度の異なる成分を有しているため、最も多い成分と次に多い成分を足し算してスコア化したものが、グリソンスコアである。例えば、最も多い成分が「 3 」で次に多い成分が「 4 」の場合、グリソンスコアは「 3 」 + 「 4 」 = 「 7 」となる。グリソンスコアが「 6 」以下は悪性度の低いもの、「 7 」は中程度の悪性度、「 8 」 ~ 「 1 0 」は悪性度の高い癌と考えられている。

40

【 0 0 8 1 】

【表 1】

検体	分別前の 血清試料のPSA量 (ng/mL)	TJA-II結合 画分中のPSA量 (ng/mL)	TJA-II非結合 画分中のPSA量 (ng/mL)	TJA-II結合率 (%)	フリーPSA/トータルPSA比
前立腺肥大症 1	17.00	0.20	16.3	1.2	19.0
前立腺肥大症 2	10.40	<0.005	10.1	<0.05	5.0
前立腺肥大症 3	10.20	0.02	9.87	0.2	79.0
前立腺肥大症 4	6.80	0.04	6.56	0.6	76.0
前立腺肥大症 5	8.30	0.12	7.93	1.5	22.0
前立腺肥大症 6	9.60	0.17	9.14	1.8	7.0
前立腺肥大症 7	8.00	<0.005	7.75	<0.05	6.0
前立腺肥大症 8	9.20	0.09	8.83	1.0	16.0
前立腺肥大症 9	8.20	<0.005	7.95	<0.05	12.0
前立腺癌 1	892.20	128.00	808.30	6.4	4.5
前立腺癌 2	101.00	6.60	92.92	5.0	11.9
前立腺癌 3	69.90	2.40	65.70	3.0	4.9
前立腺癌 4	944.80	9.50	873.95	4.5	16.8
前立腺癌 5	180.00	6.30	162.00	7.0	7.8
前立腺癌 6	3597.00	388.50	3100.60	10.8	3.9
前立腺癌 7	68.00	5.58	60.38	8.2	13.0
前立腺癌 8	4.30	0.90	3.27	21.0	NT
前立腺癌 9	6.00	0.84	4.98	14.0	NT
前立腺癌10	10.00	0.46	9.24	4.6	NT
前立腺癌11	4.50	1.04	3.32	23.0	NT
前立腺癌12	53.80	4.30	47.88	8.0	17.0
前立腺癌13	4.70	0.24	4.32	5.0	13.5
前立腺癌14	21.20	0.85	19.71	4.0	10.0
前立腺癌15	12.10	0.61	11.13	5.0	10.0

10

20

30

【 0 0 8 2 】

【表 2】

検体	年齢	病期 (ステージ)	グリソンスコア
前立腺肥大症 1	74	—	—
前立腺肥大症 2	75	—	—
前立腺肥大症 3	65	—	—
前立腺肥大症 4	70	—	—
前立腺肥大症 5	65	—	—
前立腺肥大症 6	52	—	—
前立腺肥大症 7	71	—	—
前立腺肥大症 8	71	—	—
前立腺肥大症 9	52	—	—
前立腺癌 1	83	3 c	7
前立腺癌 2	77	3 b	9
前立腺癌 3	66	3 b	9
前立腺癌 4	64	3 b	9
前立腺癌 5	81	4	9
前立腺癌 6	81	3 c	7
前立腺癌 7	83	3 b	9
前立腺癌 8	unknown	ND	ND
前立腺癌 9	unknown	ND	ND
前立腺癌 10	unknown	ND	ND
前立腺癌 11	unknown	ND	ND
前立腺癌 12	74	3 b	9
前立腺癌 13	59	1 c	7
前立腺癌 14	64	1 c	7
前立腺癌 15	64	2 a	9

10

20

30

【 0 0 8 3 】

図 2 及び図 3 に示すように、T J A - I I 結合画分中の P S A 量、及び T J A - I I 結合率は、いずれも前立腺癌患者と前立腺肥大症患者との間で重複することなく、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者を鑑別することができることを示している。暫定的に、T J A - I I 結合画分中の P S A 量のカットオフ値を 2 5 0 p g / m L、T J A - I I 結合率のカットオフ値を 2 % とすると、1 0 0 % の精度で前立腺肥大症患者と前立腺癌患者を区別することが可能である。異なる臨床ステージ、グリソンスコアにおいても、T J A - I I 結合率と T J A - I I 結合 P S A 量には有意な差が認められなかった。

40

【 0 0 8 4 】

《 実施例 2 》

本実施例では、前記カラム製造例で製造した W F A カラムを用いて、前立腺癌と診断された 3 人の患者について、本発明の P S A の分析方法により P S A の量を測定した。

50

具体的には、T J A - I I カラムと溶出液（10 mM ラクトース、0.1% B S A 含有リン酸緩衝液）に代えて、W F A カラムと溶出緩衝液（10 mM G a l N A c、0.1% B S A 含有リン酸緩衝液）を用いたことを除いては、前記実施例 1 の操作を繰り返し、前立腺癌患者の 3 人の血清試料を分析し、W F A 結合画分中の P S A 量及び W F A 結合率を得た。W F A 結合率の結果を表 3 に示す。

なお、W F A 結合率は次の式により計算した。

$$W F A \text{ 結合率} = (W F A \text{ 結合画分中の P S A 量} / W F A \text{ 非結合画分及び W F A 結合画分中の P S A 量}) \times 100 \%$$

また、比較のために T J A - I I 結合率を表 3 に示す。

【 0 0 8 5 】

【表 3】

検体	分別前の血清試料のPSA量 (ng/mL)	WFA結合画分中のPSA量 (ng/mL)	WFA非結合画分中のPSA量 (ng/mL)	WFA結合率 (%)	TJA-II結合率 (%)
前立腺癌 6	3597.00	327.98	3161.11	9.4	10.8
前立腺癌 12	53.80	3.91	48.27	7.5	8.0
前立腺癌 15	12.10	0.49	11.50	4.2	5.0

【 0 0 8 6 】

W F A カラムからの P S A 回収率は、90% ~ 98% であった。また、W F A の結合率は、T J A - I I 結合率とほぼ相関しており、W F A は - N - アセチルガラクトサミン残基を有する P S A と結合して、前立腺癌患者の P S A を分別することが可能である。

但し、W F A 結合率は、T J A - I I 結合率よりやや低く、84.0% ~ 93.8% である。このことは、前立腺癌患者の血液中には、T J A - I I のみに親和性のある P S A が存在する可能性を示している。すなわち、- N - アセチルガラクトサミン残基（G a l N A c 1 R）を有さず、フコース（1, 2）ガラクトース残基（F u c 1 2 G a l 1 R）のみを有している P S A が存在する可能性を示唆している。

【 0 0 8 7 】

《実施例 3》

本実施例では、前立腺癌の患者の血清をシアリダーゼ処理することにより、T J A - I I カラムと結合する P S A が、増加することを確認した。

まず、前立腺癌と診断された患者の血清及び前立腺肥大症と診断された患者の血清を、それぞれ 20 検体を用いたことを除いては、実施例 1 の操作を繰り返し、それぞれの P S A の T J A - I I 結合率を調べた。結果を図 5 A に示す。前立腺癌では、約 2% 以上の T J A - I I 結合率を示し、前立腺肥大症では、約 2% 未満の T J A - I I 結合率を示した。

次に、前立腺癌と診断された患者の血清及び前立腺肥大症と診断された患者の血清をそれぞれ 5 検体用いて、シアリダーゼ処理を行った。具体的には、血清試料 1 μ L ~ 50 μ L を、0.1% B S A 含有リン酸緩衝液で希釈し、200 μ L とした。得られた希釈試料に、アリスロバクター・ウレアファシエンス由来のシアリダーゼを 50 m U 添加し、37 °C で 1 時間反応させた。得られたシアリダーゼ処理試料を用いたことを除いては、実施例 1 の操作を繰り返した。結果を図 5 B に示す。

図 5 の矢印は、前立腺癌と診断された患者の 5 つの血清において、シアリダーゼ処理によって、P S A の T J A - I I 結合率が上昇したことを示している。一方、前立腺肥大症と診断された患者の血清では、P S A の T J A - I I 結合率の上昇は見られなかった。

【 0 0 8 8 】

更に、サルモネラ・チフィムリウム由来のシアル酸（2, 3）特異的シアリダーゼを用いて、同様の操作を繰り返した。しかしながら、サルモネラ・チフィムリウム由来のシアリダーゼでは、前立腺癌と診断された患者の血清においても、P S A の T J A - I I 結

10

20

30

40

50

合率は上昇しなかった。

これらの結果は、以下のことを示している。アリスロバクター・ウレアファシエンス由来のシアリダーゼは、主としてシアル酸 (2, 6) 及びシアル酸 (2, 3) 結合を切断する。一方、サルモネラ・チフィウム由来のシアリダーゼは、シアル酸 (2, 3) 結合を切断する。すなわち、前立腺癌患者の血清中のPSAのシアル酸は、シアル酸 (2, 3) 結合でなく、シアル酸 (2, 6) 結合により、-N-アセチルガラクトサミン残基に結合しているものと考えられる(図6)。

【0089】

《実施例4》

本実施例では、前立腺肥大症の患者血清中のPSA、前立腺癌の患者血清中のPSA、及び精漿中のPSAについて、TJA-IICラム、UEA-IICラム、又はWFAカラムへのそれぞれのPSAの結合率を調べた。TJA-IICラムへの結合率については、シアリダーゼ処理を行った検体と、シアリダーゼ処理を行わない検体について、結合率を調べた。

TJA-IICラムへの結合率の測定は、実施例1に記載の方法に従った。WFAカラムへの結合率の測定は、実施例2に記載の操作に従った。シアリダーゼ処理を行った検体のTJA-IICラムへの結合率の測定は、実施例3に記載の操作に従った。

また、UEA-IICラムへの結合率の測定は、以下のように行った。ハリエニシダアグルチニン-I (Ulex europaeus agglutinin-1: UEA-I) の結合したアガロース (UEA-Iアガロース: ジオイルミルズ) を用いて、UEA-Iに結合するPSAの量を測定した。具体的には、TJA-IICラムと溶出液 (10 mM ラクトース、0.1% BSA 含有リン酸緩衝液) に代えて、UEA-Iアガロースと溶出緩衝液 (50 mM fucose、0.1% BSA 含有リン酸緩衝液) を用いたことを除いては、前記実施例1の操作を繰り返し、UEA-I結合率を測定した。結果を表4に示す。

【0090】

【表4】

レクチン	認識糖鎖	前立腺肥大症の患者血清のPSA	前立腺癌の患者血清のPSA	精漿中PSA
TJA-II	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4(3)GlcNAc 及び GalNAc β 1 \rightarrow	2.0%	16%	2%
TJA-II (シアリダーゼ処理)		2.0%	59%	8.4%
UEA-I	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc	<1%	5%	<1%
WFA	GalNAc β 1 \rightarrow	<1%	11%	<1%

【0091】

前立腺肥大症の患者血清中のPSAは、TJA-IICラム、UEA-IICラム、又はWFAカラムにほとんど結合しない。一方、前立腺癌患者血清中のPSAは、TJA-IICラムに16%のPSAが結合し、UEA-IICラムに5%のPSAが結合し、WFAカラムに11%のPSAが結合する。これらのデータは、前立腺癌患者血清中のPSAは、非還元末端 -N-アセチルガラクトサミン、及びフコース (1, 2) ガラクトース残基を有していることを示している。

更に、前立腺癌患者血清中のPSAをアリスロバクター・ウレアファシエンス由来のシアリダーゼで処理することにより、TJA-IICラムへの結合率が、11%から59%に上昇した。このデータは、前立腺癌患者血清中のPSAが、シアル酸 (2, 6) -N-アセチルガラクトサミン残基を有していることを示している。

【0092】

《比較例1》

本比較例では、特許文献1に記載のレクチンであるM A Aを用いて、前立腺癌患者のP S Aの分別及び測定を行った。

M A Aの精製は、既報(Kawaguchi et al., J. Biol. Chem., 249, 2786-2792, 1974)の方法に従った。具体的には、イヌエンジュマメ(Maackia amurensis)の種子50gを数百mLのP B Sでホモジナイザーにより細くなるまでホモジナイズし、更に一晚攪拌後、9000rpm30分遠心分離にて沈殿物を除いた。この抽出液(210mL)の50~80%の硫酸分画画分をP B Sに透析し、遠心操作で沈殿を除いた後、一部(30mL)をチログロブリンセファロース(19mg/mL、15mL)に添加し、P B Sで洗浄後、0.1Mラクトース、0.075M NaCl含有0.15Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.5)で溶出する。レクチン活性の高い部分をプールし濃縮後、50mMリン酸緩衝液(pH4.5)に透析にて置換する。遠心操作で沈殿を除去後、50mMリン酸緩衝液(pH4.5)で平衡化したS PセファデックスC-50(100mL)に添加し、非吸着画分を集め濃縮し、精製M A Aを得た。

【0093】

精製したM A Aを用いて、セファロースカラムを作製した。C N B r - S e p h a r o s e (G E h e a l t h c a r e社製)を用い、メーカーの推奨する添付のプロトコルに従い、ゲル容積1mLあたり3mgの密度でM A Aを結合させ、M A Aカラムを作製した。

【0094】

まず、M A Aカラムのシアル酸(2,3)ガラクトース残基との結合特性を確認するため、シアル酸(2,3)ガラクトースを3残基有するオリゴ糖を用いて結合を確認した。4の条件下で、M A Aカラム(1mL容量)を0.1%牛血清アルブミン(B S A)及び0.02%T w e e n含有リン酸緩衝液で平衡化した。シアル酸(2,3)ガラクトースを3残基有する複合型3本鎖オリゴ糖を含む試料をカラムにアプライし、30分保持した。その後、5倍容量の洗浄用緩衝液(0.1%B S A、0.02%T w e e n含有リン酸緩衝液)でカラムを洗浄し、各1mLずつ分画してM A A非結合分画を得た。カラムを室温に戻した後、5倍容量の溶出緩衝液(400mMラクトース、0.1%B S A、0.02%T w e e n含有リン酸緩衝液)で、1mLずつ分画して溶出し、M A A結合画分を得た。前記シアル酸(2,3)ガラクトースを3残基有するオリゴ糖は、カラムに結合せず、95%以上がM A A非結合分画に回収された。

【0095】

次に、このM A Aカラムを用いて、前立腺癌患者のP S AのM A Aカラムへの結合を調べた。4の条件下で、M A Aカラム(1mL容量)を0.1%牛血清アルブミン(B S A)及び0.02%T w e e n含有リン酸緩衝液で平衡化した。血清試料10μLをリン酸緩衝液で希釈し、200μLとして、カラムにアプライし、30分保持した。その後、5倍容量の洗浄用緩衝液(0.1%B S A、0.02%T w e e n含有リン酸緩衝液)でカラムを洗浄し、各1mLずつ分画して5つのM A A非結合分画を得た。カラムを室温に戻した後、5倍容量の溶出緩衝液(400mMラクトース、0.1%B S A、0.02%T w e e n含有リン酸緩衝液)で、1mLずつ分画して溶出し、5つのM A A結合画分を得た。それぞれの画分について、トータルP S A量を、アクセスハイブリテックトータルP S A(ベックマンコールター社製)を用いて測定した。対照として、精製した正常フリーP S A5ngを用いて、同じ操作を繰り返し、トータルP S A量を測定した。前立腺癌患者のP S Aの結果を図4(B)に、正常フリーP S Aの結果を図4(A)に示す。

【0096】

正常フリーP S Aは、ほとんどが2番目のM A A非結合分画に検出された。しかしながら、すべての画分のP S Aの量を合計した正常フリーP S A量は、M A Aカラムにアプライした、5ngの正常フリーP S Aに対して、3.5ngであり、回収率は70%であり、30%がカラムに結合したままであると考えられた。

一方、前立腺癌患者のP S Aは、2番目のM A A非結合分画に検出される未吸着のP S A、3番目のM A A非結合分画の肩の部分に検出されるわずかに吸着するP S A、及び4

10

20

30

40

50

0.0 mM ラクトースで溶出される吸着 PSA に分かれた。すべての画分の PSA 量を合計すると 4 ng/mL であり、分別前の血清試料の PSA 量である 10 ng/mL に対して、40% 程度しか回収されなかった。この回収率は、溶出溶液として、0.1 M 酢酸溶液を用いても改善されなかった。更に、用いた前立腺癌患者の PSA は、フリー PSA / トータル PSA 比が 3.6 であり、96.4% の PSA が α -アンチキモトリプシンと結合した PSA- α CT の状態で存在している。 α -アンチキモトリプシンは、1 分子あたりシアル酸 (2, 3) ガラクトース残基を 1 残基有しているため、PSA- α CT は、MAA カラムと結合するはずであるが、多くの PSA が 2 番目の MAA 非結合分画に検出される未吸着の PSA、及び 3 番目の MAA 非結合分画の肩の部分に検出されるわずかに吸着する PSA として検出された。

10

【0097】

すなわち、シアル酸 (2, 3) ガラクトースを 3 残基有するオリゴ糖が、MAA カラムに結合しないこと、及び PSA- α CT のうち結合しないものが存在することは、MAA レクチンカラムに対する PSA の結合が弱いことを示している。しかしながら、PSA の MAA への結合が弱いにもかかわらず、PSA の回収率は悪く、ハプテン糖による溶出が困難であり、MAA で再現性よく正確に測定することは、困難であると考えられた。

【0098】

《実施例 5》

本実施例では、前立腺癌患者の PSA に α -N-アセチルガラクトサミン残基を付加する α -N-アセチルガラクトサミン転移酵素、フコース残基を付加するフコース転移酵素及びシアル酸を付加するシアル酸転移酵素を特定し、それらの転移酵素の前立腺癌組織における発現を確認した。

20

【0099】

まず、ヒト前立腺癌由来細胞及び正常ヒト前立腺組織における、フコース転移酵素 1 (FUT1)、及びフコース転移酵素 2 (FUT2)、 α -N-アセチルガラクトサミン転移酵素 2 (4GALNT2)、 α -N-アセチルガラクトサミン転移酵素 3 (4GALNT3) 及び α -N-アセチルガラクトサミン転移酵素 4 (4GALNT4)、並びにシアル酸転移酵素 1 (以下、ST6GAL1 と称する) 及びシアル酸転移酵素 2 (以下、ST6GAL2 と称する) の mRNA の発現を、リアルタイムポリメラーゼ重合反応 (以下、リアルタイム PCR と称する) 法によって調べた。ヒト前立腺癌由来細胞として、DU145 (RCB2143; 理研バイオリソースセンターから提供) 及び PC-3 (JCRB9110; ヘルスサイエンスリサーチリソースバンクより提供) を用いた。RNA later (Ambion 社) を用いて保存した、正常前立腺組織、並びに前記 DU145 細胞及び PC-3 細胞から、ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてトータル RNA を調整し、クロロホルム・イソプロピルアルコール抽出を行った。抽出した RNA は、エタノール沈殿の後、ジエチルカーボネート処理した蒸留水に溶解した。RNA は、Superscript III (インビトロジェン社) を用い、オリゴ(dT)プライマーで逆転写反応を行い cDNA を得た。リアルタイム PCR は、Power SYBR (登録商標) Green PCR master mix (ライフテクノロジー社)、及びそれぞれの糖転移酵素の遺伝子特異的なプライマーを用いて、Dice (登録商標) real time system (TP800, タカラ) により行った。

30

40

【0100】

用いたそれぞれの糖転移酵素のプライマーは、以下のとおりである。

FUT1: 5' - AACGCCTCCTCTTCCTGTC - 3' (配列番号 3)、及び
5' - TGGGGTAGACAGTCCAGGTG - 3' (配列番号 4) (GenBank accession no. NM_000148);

FUT2: 5' - CCTCAACATCAAAGGCACCTG - 3' (配列番号 5)、及び
5' - GGCCTATTGCATTGATCGTC - 3' (配列番号 6) (GenBank accession no. NM_000511);

B4GALNT2: 5' - GATTTTTCCAAACCCCTGGAT - 3' (配列番号 7)

50

)'、及び5'-GAAGTTGACCCACGCCACTG-3'(配列番号8)(GenBank accession no. NM_153446);
 B4GALNT3:5'-AGGTCACGCGAGTCTTCTTG-3'(配列番号9)、及び5'-ACAATGCGCTGTAGCTGGTA-3'(配列番号10)(GenBank accession no. NM_173593);
 B4GALNT4:5'-ACTGGGAGCTCCTGGACA-3'(配列番号11)、及び5'-TGGTGATAGAAATTC CGCAGT-3'(配列番号12)(GenBank accession no. NM_178537);
 ST6GAL1:5'-TCAGCGGGATCTCTGAAGTC-3'(配列番号13)、及び5'-AAACCTCAGGACTGCGTCA-3'(配列番号14)(GenBank accession no. NM_003033);
 ST6GAL2:5'-TCCTTGGGCGAGGAAATAG-3'(配列番号15)、及び5'-CCCAACATCTTTCTCATAAACCAC-3'(配列番号16)(GenBank accession no. NM_006927)。

内部標準のプライマーとして、GAPDH:5'-ATCCACATCGCTCAGACAC-3'(配列番号17)、及び5'-GCCCAATACGACCAAAATCC-3'(配列番号18)(GenBank accession no. NM_002046)を用いてmRNAの発現の補正を行った。

リアルタイムPCRのプログラムは、95℃、10秒、60℃、40秒を40サイクル繰り返した。それぞれのプライマーセットにより単一のシャープなピークが得られ、特異的なPCR産物が増幅されており、プライマーダイマーも見られなかった。すべてのサンプルは、3重で試験された。結果を表5に示す。

【0101】

【表5】

糖転移酵素	正常組織 1	正常組織 2	PC3	DU145
FUT1	0.71	0.61	1.4	3.3
FUT2	<0.5	<0.5	1	1.3
B4GALNT2	<0.005	<0.05	<0.005	0.01
B4GALNT3	<0.5	<0.5	<0.5	2.9
B4GALNT4	0.4	0.81	3.9	4
ST6GAL1	0.3	1.0	0.26	0.22
ST6GAL2	<0.02	<0.02	0.04	<0.02

【0102】

表5から明らかのように、FUT1及びB4GALNT4は、正常組織と比較して、前立腺癌由来細胞におけるmRNAの発現は、顕著に高かった。また、FUT2、B4GALNT2、及びB4GALNT3は、正常組織では内部標準のGAPDHと同じ程度であったが、前立腺癌由来細胞において、発現が高い細胞が見られた。一方、前立腺癌由来細胞におけるST6GAL1のmRNAのレベルは、正常組織とほとんど差が見られなかった。

【0103】

次に、FUT1及びB4GALNT4のmRNAについて、前立腺の正常組織及び癌組織での発現を比較した。FUT1及びB4GALNT4の前記のプライマー、並びに前立腺の正常組織2検体及び癌組織2検体を用い、前記のリアルタイムPCRの操作を繰り返した。結果を図7に示す。

FUT1及びB4GALNT4のmRNAの発現は、正常組織と比較すると、癌組織において約7倍から20倍増加していた。これらの結果は、前立腺癌患者のPSAにおいて

、 4 G A L N T 4 が - N - アセチルガラクトサミン残基 (G a l N A c 1 R) 及びシアル酸 (2 , 6) - N - アセチルガラクトサミン残基 (S i a 2 6 G a l N A c 1 R) の増加に關与していること、並びに F U T 1 がフコース (1 , 2) ガラクトース残基 (F u c 1 2 G a l 1 R) の増加に關与していることを示している。

【産業上の利用可能性】

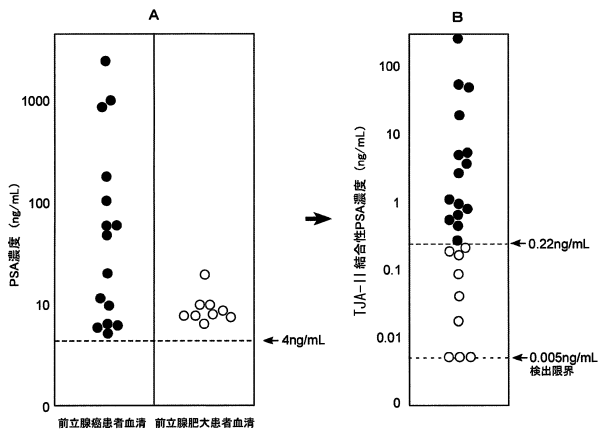
【 0 1 0 4 】

本発明の P S A の分析方法及び P S A の分析キットは、前立腺癌と前立腺肥大症の患者を確実に鑑別することが可能である。従って、健康診断において、前立腺癌を早期に発見することができる。また、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができるため、確定診断のために行う前立腺の生検の対象者を減少させることができ、患者の負担を軽減させることができる。

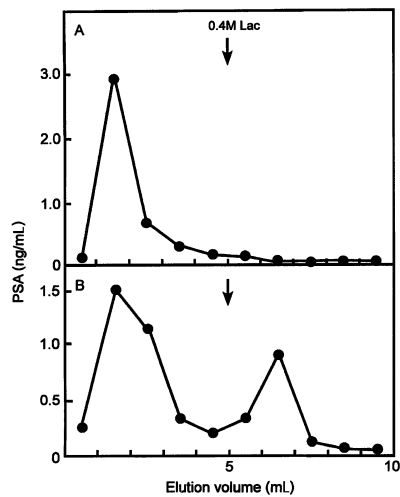
10

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

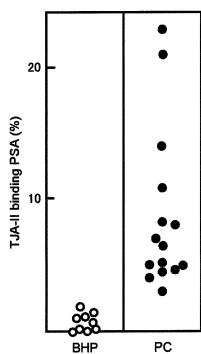
【 図 2 】



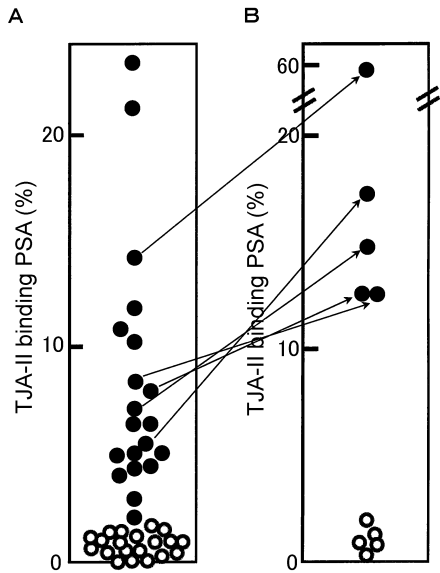
【 図 4 】



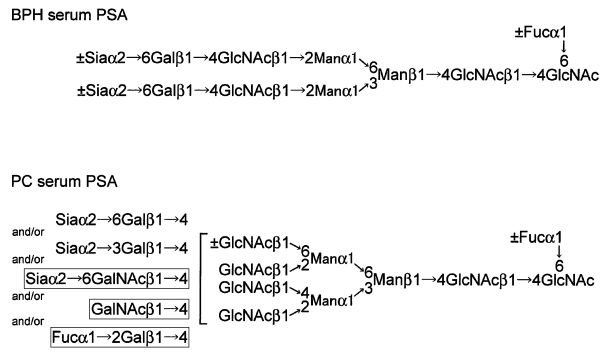
【 図 3 】



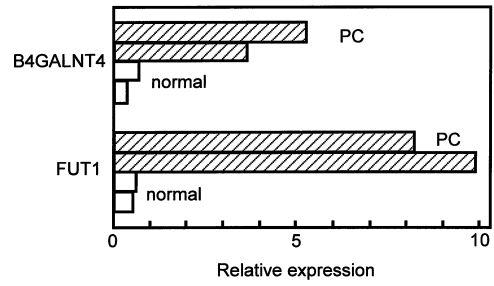
【 図 5 】



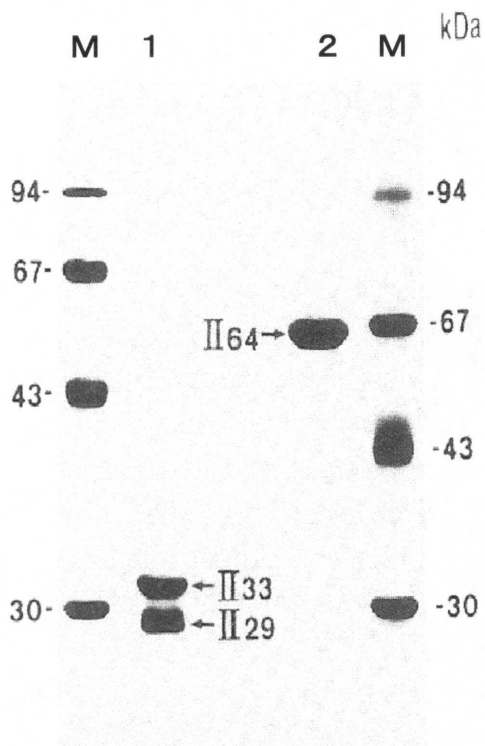
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 1 】



【 配列表 】

0005630757000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A

(72)発明者 福島 慶子
神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 第29回日本分子腫瘍マーカー研究会プログラム・講演抄録,2009,p.84-5
FEBS Lett.,2004,562(1-3),p.134-40
Transfus.Clin.Biol.,1994,1(2),p.91-7

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1 / 3 4
G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8
C A p l u s / M E D L I N / B I O S I S (S T N)
W P I
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)
P u b M e d