



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102803968 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201180006719. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 01. 21

G01N 33/574 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 16/32 (2006. 01)

012082/2010 2010. 01. 22 JP

G01N 33/15 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/051104 2011. 01. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/090166 JA 2011. 07. 28

(71) 申请人 北京博尔迈生物技术有限公司

地址 北京市昌平区生命园路 29 号创新大厦
A202 室

申请人 株式会社医学生物学研究所

(72) 发明人 O·吾守尔 岸义朗

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 曾祯 段承恩

权利要求书 1 页 说明书 15 页

序列表 3 页 附图 9 页

(54) 发明名称

食道癌标志物

(57) 摘要

对于各种标志物候选进行针对人癌病理切片和正常组织切片的免疫组织染色, 结果发现, 在自行开发的针对 80 种转运蛋白的抗原特异性抗体中, 针对 SLC38A4 蛋白质的抗体与食道癌组织特异性地反应, 特别是在处于早期的高分化阶段的食道癌组织中显示高反应性。

1. 食道癌的检查方法,其中,包括:检测从被检体分离出的细胞或组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达的工序。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,使用抗体来检测 SLC38A4 蛋白质的表达。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,抗体是识别包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的区域的抗体。
4. 根据权利要求 1~3 的任一项所述方法,其中,食道癌是早期的食道癌。
5. 食道癌检测用组合物,其中,包含抗 SLC38A4 蛋白质抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的组合物,其中,抗体是识别包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的区域的抗体。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的组合物,其中,食道癌是早期的食道癌。
8. 权利要求 5 所述的组合物的制造方法,其中,包括以下工序:
 - (a) 免疫 SLC38A4 蛋白质或者其有免疫原性的一部分的工序,以及
 - (b) 分离和 / 或纯化与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体的工序。
9. 权利要求 6 所述组合物的制造方法,其中,包括以下工序:
 - (a) 免疫包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的肽的工序,以及
 - (b) 分离和 / 或纯化与包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的区域结合的抗体的工序。
10. 根据权利要求 9 或 10 所述的制造方法,其中,组合物是早期的食道癌的检测用组合物。
11. 食道癌检测用试剂盒,其中,包含权利要求 5~7 所述的组合物。
12. 食道癌治疗药的筛选方法,其中,包括以下工序:
 - (a) 提供 SLC38A4 蛋白质或其一部分的工序,
 - (b) 使候选化合物与 SLC38A4 蛋白质或其一部分接触的工序,以及
 - (c) 选择与 SLC38A4 蛋白质或其一部分结合的化合物的工序。
13. 食道癌治疗药的筛选方法,其中,包括以下工序:
 - (a) 对食道癌模型动物(除人以外)施与候选化合物或者对照的工序,
 - (b) 采集该模型动物的食道部的组织的工序,以及
 - (c) 检测采集的组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达,与对照比较,选择降低 SLC38A4 蛋白质的表达的化合物的工序。
14. 根据权利要求 12 或 13 所述的筛选方法,其中,治疗药是早期的食道癌的治疗药。

食道癌标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及：以 SLC38A4(别名：SANT4) 蛋白质的表达为指标的食道癌的检查方法, 包含抗 SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌检测用组合物, 该食道癌检测用组合物的制造方法, 包含抗 SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌检测用试剂盒, 以及利用 SLC38A4 蛋白质的食道癌治疗药的筛选方法。

背景技术

[0002] 食道癌是发生于食道的上皮性来源的肿瘤。在组织学上主要分类为食道粘膜上皮癌变的鳞状上皮细胞癌和食道腺癌变的腺癌。在日本, 鳞状上皮细胞癌占食道癌整体的 90%, 余下的 5% 为腺癌。从此可知, 日本人的食道癌基本是鳞状上皮细胞癌。而且, 多发于 60 多岁的男性, 男女比为 3 ~ 5:1。因为作为食道形态学上的特征没有外膜(浆膜), 增殖的癌细胞容易向周围浸润, 也容易转移到淋巴结, 所以癌变的进展快。加上由于缺乏主观症状, 因而早期发现容易延迟。食道癌的预后在包括胃癌、大肠癌在内的消化系统癌中极差, 食道癌整体的 5 年存活率为 14% 左右。虽然致癌因子不明, 但禁烟可降低食道鳞状上皮细胞癌的发病率, 由此启示吸烟和食道鳞状上皮细胞癌有关联。

[0003] 食道癌的诊断利用体检发现、影像学诊断、以及肿瘤标志物。体检发现在早期癌中几乎不存在。在晚期癌中有时发现右侧或者左侧锁骨上部的淋巴结肿大。在被确诊为食道癌后的患者中, 74% 在确诊时刻有包括食道不舒服在内的吞咽困难, 14% 有吞咽疼痛。

[0004] 在影像学诊断中, 可以利用硫酸钡 X 射线拍照来简便地观察食道的变窄和 / 或变形。但是, 这种检查方法难以检测早期癌。在早期癌的发现中最有用的是内镜。然而, 在通常的内镜观察中也常常难以发现停留在粘膜面上的浅表癌。为此, 利用卢戈溶液 (Lugol solution) 来进行染色(色素内镜检查)。卢戈溶液将正常的粘膜鳞状上皮中富含的糖原染色。如果由于粘膜的癌化以及非典型上皮化而糖原量显著减少, 则病变部位不被卢戈溶液染色而形成白色的不染色带。但是卢戈溶液不染色带不是对癌特异性的, 在食道炎、萎缩部位也呈阳性。还可使用碘蓝染色, 这种情况下, 正常粘膜形成不染色带而癌病变被染成蓝色。在该染色中, 癌病变露出表面是不可缺少的条件, 皮内癌则不显阳性。无论哪种情况, 利用与内镜相结合进行的活体检查的病理学诊断成为食道癌的确诊。在确定为食道癌的情况下, 为了判断其浸润深度(进展期), 实施超声波内镜检查和 / 或 CT(计算机断层成像)。从而可以检测出有没有向食道癌的周围组织的浸润和 / 或向淋巴结、远端器官的转移, 从而诊断食道癌的进展期。PET 检查被认为对难以利用 CT 判断的转移灶的评价是有用的。

[0005] 对于利用肿瘤标志物的诊断, 如上所述, 因为在日本 90% 以上的食道癌是鳞状上皮细胞癌, 所以作为子宫颈、食道的鳞状上皮细胞癌的指标的 SCC(鳞状上皮细胞癌相关抗原) 较经常被利用。单独利用 SCC 的术前诊断率是 30% 左右。作为除 SCC 以外的肿瘤标志物, 使用 CEA、CYFRA21-1 等。但是, 在使用这些标记物的情况下, 随着癌的进展率的发展而阳性率较高, 但在早期癌的情况下诊断率低下。关于自身抗体, p53 抗体虽然具有在比较早期的病例中阳性率较高的特征, 但阳性率仍然只有 20-30% 左右。

[0006] 另一方面,转运蛋白的异常表达增强被指出可以成为癌变的指标之一(专利文献 1~3,非专利文献 1)。作为癌变细胞的特征可列举显著的增殖和/或转移,但因为实现这些增殖和/或转移需要大量的营养源,所以癌细胞有时会增加葡萄糖、氨基酸的转运蛋白的表达量。例如,已知 L 型氨基酸转运蛋白 LAT1 在人的各种癌组织(前列腺癌、大肠癌、膀胱癌、Barrett 食道腺癌、口腔鳞状上皮细胞癌、肝癌)中高表达(非专利文献 2)。然而,包括 LAT1 在内至今已报告的转运蛋白都在正常细胞中少量表达,很难说是癌特异性的转运蛋白(非专利文献 3 和 4)。

[0007] 如上所述,到目前为止,并没有发现对食道癌特异性高的标志物或对早期食道癌显示高的阳性率的标志物。食道癌不仅缺乏主观症状,而且有在发病后容易转移、预后差的特征。因此,需要鉴定对食道癌特异性高、而且能实现食道癌的早期发现的肿瘤标志物。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献 1:日本特愿平 11-248546 号公报

[0011] 专利文献 2:日本特愿 2004-76282 号公报

[0012] 专利文献 3:日本特愿平 10-126648 号公报

[0013] 专利文献:国际公开 2008/096416 号小册子

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献 1:Imai H, et al. Histopathology. 2009 Jun;54(7):804-13.

[0016] 非专利文献 2:Kondoh N, et al. Int J Oncol. 2007 Jul;31(1):81-7.

[0017] 非专利文献 3:del Amo EM, et al. Eur J Pharm Sci. 2008 Oct 2;35(3):161-74. Epub 2008 Jul 5.

[0018] 非专利文献 4:Mackenzie B, Erickson JD. Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):784-95. Epub 2003 Jul 4. Review.

[0019] 非专利文献 5:Sugawara M, et al. Biochim Biophys Acta. 2000 Dec 20;1509(1-2):7-13.

[0020] 非专利文献 6:Hatanaka T, et al. Biochim Biophys Acta. 2001 Feb 9;1510(1-2):10-7.

[0021] 非专利文献 7:Gu S, et al. Genomics. 2001 Jun 15;74(3):262-72.

[0022] 非专利文献 8:Sundberg BE, et al. J Mol Neurosci. 2008 Jun;35(2):179-93. Epub 2008 Apr 17.

[0023] 非专利文献 9:Desforgues M, et al. J Physiol. 2009 Jan 15;587(Pt 1):61-72. Epub 2008 Nov 17.

[0024] 非专利文献 10:Gao H, et al. Biol Reprod. 2009 Jun;80(6):1196-208. Epub 2009 Jan 28.

[0025] 非专利文献 11:Desforgues M, et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Jan;290(1):C305-12. Epub 2005 Sep 7.

[0026] 非专利文献 12:Song B, et al. World J Gastroenterol. 2005 Mar 14;11(10):1463-72.

发明内容

[0027] 发明所要解决的课题

[0028] 本发明是鉴于如上状况而做出的,其目的是提供对食道癌特异性高、且能够实现食道癌的早期发现的肿瘤标志物。进而本发明的目的是提供:以该肿瘤标志物为靶标的食道癌(特别优选是早期食道癌)的检查方法,包含用于检测该肿瘤标志物的分子的食道癌检测用组合物,该组合物的制造方法,包含该组合物的食道癌检测用试剂盒,以及利用了该肿瘤标志物的食道癌治疗药的筛选方法。

[0029] 用于解决课题的方法

[0030] SLC38A4 蛋白质(别名:SNAT4)属于钠离子依赖型的氨基酸转运蛋白(非专利文献4),其基因首先在2000年从大鼠的肌肉中被克隆化,对于人在2001年由来源于肝脏的培养细胞中被克隆化(非专利文献5~7)。SLC38A4 蛋白质在结构上被分类为谷氨酰胺转运蛋白超家族,但实际上对谷氨酰胺的亲水性低,其转运能力远低于其他谷氨酰胺转运蛋白。另一方面,主要输送L-丙氨酸和天冬酰胺(非专利文献4)。

[0031] 关于SLC38A4 在成体内的定位,在mRNA水平通过RNA印迹法从大鼠的肌肉和肝脏中检测出,在人组织中肝脏含量最高(非专利文献6~8)。通过RT-PCR法从除肝脏以外的骨骼肌、脑、肺、心脏、小肠、肾脏、胰、胎盘、子宫中扩增出基因(非专利文献9和10)。关于SLC38A4 的蛋白质水平的定位信息,通过蛋白质印迹法在肝脏和胎盘中检测出,通过免疫组织染色在胎盘中检测出(非专利文献9和11)。关于与癌的关系,在肝细胞癌的细胞株JHH4中确认了mRNA的表达,但与正常肝脏组织为相同水平,表达增强没有在实验上被确认(专利文献2)。此外,在小鼠中,针对高转移性的株化肝细胞癌Hca-F和低转移性肝细胞癌Hca-P的利用了基因芯片的基因表达分析的结果,报告了SLC38A4 基因在Hca-F中较高表达,但与肝癌转移的因果关系不明(非专利文献12)。这样,关于SLC38A4 的表达与食道或食道癌的关系,至今未知。

[0032] 本发明者们鉴于上述背景,为了探索癌特异性标志物,对于各种标志物候选,进行了针对人癌病理切片和正常组织切片的免疫组织染色,结果发现,在自行开发的针对80种转运蛋白的抗原特异性抗体中,针对SLC38A4 蛋白质的抗体对食道癌组织(特别是早期的食道癌组织)特异性且强烈地反应。而且,本发明者们基于SLC38A4 蛋白质在食道癌中高表达、在正常组织中几乎检测不到这样的知识,发现可以以SLC38A4 蛋白质的表达为指标来检查食道癌,利用抗SLC38A4 蛋白质抗体的免疫学方法在食道癌的检查中是有用的。进而,本发明者们发现,可以利用SLC38A4 蛋白质来进行食道癌治疗药的筛选。

[0033] 即,本发明涉及:以SLC38A4 蛋白质的表达为指标检查食道癌(特别优选为早期的食道癌)的方法,包含抗SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌检测用组合物,该组合物的制造方法,包含抗SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌检测用试剂盒,以及利用SLC38A4 蛋白质的食道癌治疗药的筛选方法。更具体地,本发明提供以下(1)~(14)。

[0034] (1) 食道癌的检查方法,其中,包括:检测从被检体分离出的细胞或组织中的SLC38A4 蛋白质的表达的工序。

[0035] (2) 根据(1)所述的方法,其中,使用抗体来检测SLC38A4 蛋白质的表达。

[0036] (3) 根据(2)所述的方法,其中,抗体是识别包含SLC38A4 蛋白质中的序列号2所记载的氨基酸序列的区域的抗体。

- [0037] (4) 根据 (1) ~ (3) 的任一项所述方法,其中,食道癌是早期的食道癌。
- [0038] (5) 食道癌检测用组合物,其中,包含抗 SLC38A4 蛋白质抗体。
- [0039] (6) 根据 (5) 所述的组合物,其中,抗体是识别包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的区域的抗体。
- [0040] (7) 根据 (5) 或 (6) 所述的组合物,其中,食道癌是早期的食道癌。
- [0041] (8) (5) 所述的组合物的制造方法,其中,包括以下工序:
- [0042] (a) 免疫 SLC38A4 蛋白质或者其有免疫原性的一部分的工序,以及
- [0043] (b) 分离和 / 或纯化与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体的工序。
- [0044] (9) (6) 所述组合物的制造方法,其中,包括以下工序:
- [0045] (a) 免疫包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的肽的工序,以及
- [0046] (b) 分离和 / 或纯化与包含 SLC38A4 蛋白质中的序列号 2 所记载的氨基酸序列的区域结合的抗体的工序。
- [0047] (10) 根据 (9) 或 (10) 所述的制造方法,其中,组合物是早期的食道癌的检测用组合物。
- [0048] (11) 食道癌检测用试剂盒,其中,包含 (5) ~ (7) 所述的组合物。
- [0049] (12) 食道癌治疗药的筛选方法,其中,包括以下工序:
- [0050] (a) 提供 SLC38A4 蛋白质或其一部分的工序,
- [0051] (b) 使候选化合物与 SLC38A4 蛋白质或其一部分接触的工序,以及
- [0052] (c) 选择与 SLC38A4 蛋白质或其一部分结合的化合物的工序。
- [0053] (13) 食道癌治疗药的筛选方法,其中,包括以下工序:
- [0054] (a) 对食道癌模型动物(除人以外)施与候选化合物或者对照的工序,
- [0055] (b) 采集该模型动物的食道部的组织的工序,以及
- [0056] (c) 检测采集的组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达,与对照比较,选择降低 SLC38A4 蛋白质的表达的化合物的工序。
- [0057] (14) 根据 (12) 或 (13) 所述的筛选方法,其中,治疗药是早期的食道癌的治疗药。
- [0058] 发明的效果
- [0059] 在本发明中,判明了 SLC38A4 蛋白质的表达在食道癌中特异性地被检测出,特别是在处于早期的高分化阶段的食道癌中以高阳性率被检测出。因此,根据以 SLC38A4 蛋白质的表达为指标的本发明的食道癌的检查方法,可以以高精度早期地检测出食道癌。由此,可以在食道癌的进展的早期阶段进行食道癌的治疗,可以对患者的治疗和患者的预后的改善做出较大的贡献。此外,根据利用 SLC38A4 蛋白质的本发明的食道癌治疗药的筛选方法,可以有效地鉴定治疗药候选化合物。包含抗 SLC38A4 蛋白质抗体的本发明的食道癌检测用组合物、食道癌检测试剂盒在上述本发明中的食道癌的检查、食道癌的治疗药的筛选中极为有用。

附图说明

[0060] 图 1 是显示来源于人的 SLC38A4 蛋白质的氨基酸全长序列和人工合成而用作免疫原的氨基酸序列(方框内:第 29 位~第 47 位)的图。

[0061] 图 2 是显示将对兔免疫之后得到的抗血清、抗原亲和性纯化抗体和正常兔血清的

抗体效价通过抗原固相 ELISA 进行分析而得的结果的图。X 轴表示抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$), Y 轴表示吸光度 (OD450)。

[0062] 图 3 是显示使用强制表达 SLC38A4 的细胞, 通过流式细胞仪评价抗 SLC38A4 蛋白质抗体的性能的结果的图。X 轴表示作为目标基因表达的指标的绿色荧光蛋白质 Azami-Green 的荧光量。Y 轴表示 PE 标记的二抗的反应性。

[0063] 图 4 是显示使用强制表达 SLC38A4 的细胞, 通过细胞免疫染色评价抗 SLC38A4 蛋白质抗体的性能的结果的显微镜照片。左图显示对不表达 SLC38A4 蛋白质的 293T 细胞的反应性, 右图显示对瞬时表达 SLC38A4 蛋白质的 293T 细胞的反应性。

[0064] 图 5 是显示使用食道癌患者样本, 通过免疫组织染色确认抗 SLC38A4 蛋白质抗体的染色性的结果的显微镜照片。使用典型的 2 例。左图是使用患者的正常部位的结果, 右图是使用患者的包含癌部的组织的结果。

[0065] 图 6 是显示使用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌样本的各等级的阳性率的图。

[0066] 图 7 是显示使用 WHO 病理分类的 I 级和 I - II 级的食道癌样本, 利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体进行免疫组织染色的结果的显微镜照片。图中显示 I 级的典型的 4 例。

[0067] 图 8 是显示使用 WHO 病理分类的 II 级和 II - III 级的食道癌样本, 利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体进行免疫组织染色的结果的显微镜照片。图中显示 II 级的典型的 4 例。

[0068] 图 9 是显示使用 WHO 病理分类的 III 级的食道癌样本, 利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体进行免疫组织染色的结果的显微镜照片。图中显示 III 级的典型的 4 例。

[0069] 图 10 是显示利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌样本的各等级的组织染色的得分的图。

[0070] 图 11 是显示使用抗 SLC38A4 蛋白质抗体对除食道癌以外的消化系统癌样本 6 例 (胃腺癌、大肠腺癌、直肠癌、胰腺癌、肝细胞癌、肾癌) 进行免疫组织染色的结果的显微镜照片。图中显示各癌样本的组织染色的典型例。

具体实施方式

[0071] < 食道癌的检查方法 >

[0072] 本发明提供食道癌的检查方法, 其中, 包括: 检测从被检体分离出的细胞或组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达的工序。

[0073] 在本发明中, “细胞或组织”是指在本发明的检查方法中检测 SLC38A4 蛋白质的表达时成为样品 (对象) 的细胞或组织。对从生物体分离出的状态的细胞或组织应用本发明。“从被检体分离出”是指通过从生物体摘出细胞或组织, 从而使该细胞或组织与其来源的生物体完全隔离的状态。作为摘出细胞或组织的被检体, 不限于癌患者, 也可以以健康人 (包含可能患癌者) 为对象。将在活组织检查 (Biopsy) 中采集的、被检体的脏器和 / 或组织的一部分供给被发明的检查方法。

[0074] 病理组织通常存在于生物体中的状态、即与周围的细胞结合状态下 (作为组织片) 制备, 在本发明的方法中使用, 但也可以在将病理组织从周围的细胞中分离出之后在本发明的方法中使用。

[0075] 在以将 SLC38A4 蛋白质的表达的检测结果用于食道癌的诊断为目的的情况下, 作为病理组织, 优选使用通过其他诊断法判断为是癌的组织、判断为是癌的概率高的组织、或

者有可能是癌的组织。所使用的组织优选为通过其他诊断法判断为是癌的组织、或者判断为是癌的概率高的组织。这里,作为其他诊断法,可列举例如,使用 X 射线造影检查、内镜检查、超声波检查、CT 检查、MRI 检查、PET 检查、肿瘤标志物的诊断法等。通常,使用通过以上诊断法中的一种以上而怀疑是癌的组织。

[0076] 在本发明中,检测表达的“SLC38A4 蛋白质”典型地是包含序列号 1 所记载的氨基酸序列的蛋白质。但是,蛋白质的氨基酸序列可能由于其编码基因的突变等而在自然界中(即,非人工地)突变。因此,在本发明中,这样的 SLC38A4 蛋白质的天然突变体也可以成为检测对象。

[0077] 在本发明中,“检测 SLC38A4 蛋白质的表达”包含 SLC38A4 蛋白质的表达的有无的检测和表达程度的检测两方面。SLC38A4 蛋白质的表达量可以作为绝对量或者相对量来掌握。在掌握相对量的情况下,例如,可以与准备的标准样品的 SLC38A4 蛋白质的表达量比较来判断。“标准样品”是事先确定了是否表达 SLC38A4 蛋白质的样品。例如,可以将已经确定为存在食道癌的部位病理组织作为本发明的标准样品。此外,未罹患癌的组织(正常组织)也可以作为本发明的标准样品。

[0078] 本发明中的 SLC38A4 蛋白质的表达的检测优选通过免疫学方法来进行。作为免疫学方法,可列举例如,免疫组织化学染色法、ELISA 法、放射免疫测定、FCM、免疫沉淀法、免疫印迹等。在免疫学方法中,使用抗 SLC38A4 蛋白质抗体,使该抗体与 SLC38A4 蛋白质接触,以该抗体对 SLC38A4 蛋白质的结合性(结合量)为指标,检测 SLC38A4 蛋白质。这里“接触”是指在抗 SLC38A4 蛋白质抗体能够识别 SLC38A4 蛋白质的生理条件下放置该抗体和 SLC38A4 蛋白质。例如,在使用该抗体进行细胞表面上的 SLC38A4 蛋白质的染色的情况下,是指将从被检体分离出的细胞或组织浸润到含有抗体的溶液中,或者将含有抗体的溶液充分滴加或者喷雾到该细胞或组织中,放置在该抗体能够识别存在于细胞或组织中的 SLC38A4 的生理条件下。根据免疫学检测法,可以迅速且灵敏度良好地检测,操作也简便。本发明的检测方法在对患者身体的负担小的方面也是有利的。

[0079] 作为本发明的检测方法中使用的抗 SLC38A4 蛋白质抗体,只要具有对 SLC38A4 蛋白质的特异性结合即可,对其种类和/或来源没有特别限制。优选为识别 SLC38A4 蛋白质(序列号 1)的第 29 位~第 47 位的氨基酸序列“GIGNSEKAAMSSQFANEDT”(序列号 2)的抗体。

[0080] 如果作为抗 SLC38A4 蛋白质抗体,使用结合有标记物质的抗体,则可以通过检测该标记而直接测定与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体量,是简便的。但另一方面,这种方法也存在准备结合有标记物质的抗体麻烦,而且检测灵敏度一般较低这样的问题。因此在本发明中,优选利用结合有标记物质的二抗的方法,和/或利用二抗与标记物质结合而得的聚合物的方法等间接检测方法。这里“二抗”是针对抗 SLC38A4 蛋白质抗体显示特异结合性的抗体。例如,在作为兔抗体来制备抗 SLC38A4 蛋白质抗体的情况下,作为二抗可以使用抗兔 IgG 抗体。针对来源于兔、山羊、小鼠等各种生物种的抗体,市售有能够使用的二抗,可以根据抗 SLC38A4 蛋白质抗体的来源生物种不同来选择适当的二抗,在本发明中使用。还可以使用结合有标记物质的蛋白 A、蛋白 G 等来代替二抗。

[0081] 作为标记物质,可列举过氧化物酶、 β -D-半乳糖苷酶、微过氧化物酶、辣根过氧化物酶(HRP)、异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸罗丹明(RITC)、碱性磷酸酶、生物素和放射

性物质等。在本发明中,如果使用生物素作为标记物质,使其与抗生物素蛋白过氧化物酶反应,则可以以高灵敏度检测与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体。

[0082] 生物体组织的免疫组织化学染色一般通过以下步骤 (1) ~ (10) 来进行。其中,关于生物体组织的免疫组织化学染色法可以参照各种文献和成书(例如,“酵素抗体法,改订第三版”,渡边圭一,中根一穗编辑,学际企画)。

[0083] (1) 固定·石蜡包埋

[0084] 将通过外科从生物体采集的组织样本用福尔马林或低聚甲醛、无水乙醇等固定。然后用石蜡包埋。一般在醇脱水后用二甲苯处理,最后用石蜡包埋。将石蜡包埋后的标本切成所需的厚度(例如,3 ~ 5 μm 厚)的薄切片,使其在载玻片上伸展。此外,有时也可以使用醇固定标本、干燥密封的标本、冻结标本等代替石蜡包埋标本。

[0085] (2) 脱石蜡

[0086] 一般用二甲苯、酒精和纯化水依次处理。

[0087] (3) 前处理(抗原修复)

[0088] 根据需要为了抗原修复而进行酶处理、加热处理和/或加压处理等。

[0089] (4) 内源性过氧化物酶除去

[0090] 在作为染色时的标记物质使用过氧化物酶的情况下,预先用过氧化氢水处理以除去内源性过氧化物酶活性。

[0091] (5) 非特异性反应的抑制

[0092] 将切片用牛血清白蛋白溶液(例如,1%溶液)处理几分钟~几十分钟以抑制非特异性反应。此外,如果使用含有牛血清白蛋白的抗体溶液进行接下来的一抗反应,则可以省略该工序。

[0093] (6) 抗体反应

[0094] 将稀释到适当浓度的抗体滴加到载玻片上的切片上,然后反应几十分钟~几小时。反应结束后,用磷酸缓冲液等适当的缓冲液清洗。

[0095] (7) 标记试剂的添加

[0096] 作为标记物质经常使用过氧化物酶。在上述抗体反应中,也可以使用结合有过氧化物酶的抗 SLC38A4 蛋白质抗体,在不标记抗 SLC38A4 蛋白质抗体的情况下,还可以使用结合有过氧化物酶的二抗、结合有过氧化物酶的蛋白 G、蛋白 A 等。例如,在使用二抗的情况下,将结合有过氧化物酶的二抗滴加到载玻片上的切片上,然后反应几十分钟~几小时。反应结束后,用磷酸缓冲液等适当缓冲液清洗。

[0097] (8) 显色反应

[0098] 在 Tris 缓冲液中溶解 DAB(3,3'-二氨基联苯胺)。然后添加过氧化氢水。使这样调制的显色用溶液浸透切片几分钟(例如5分钟),使其显色。显色之后,将切片用自来水充分清洗,以除去 DAB。

[0099] (9) 核染色

[0100] 使 Mayer 苏木精反应几秒~几十秒钟进行核染色。用流水清洗而显色(通常几分钟)。

[0101] (10) 脱水、清晰化、密封

[0102] 在用醇脱水后,用二甲苯进行清晰化处理,最后用合成树脂或甘油、封片剂等密

封。

[0103] 细胞或组织为癌的概率和 / 或组织中的癌化部位,与免疫染色的染色强度和 / 或通过免疫染色而被染色的细胞的比例有强的相关性。因此,在本发明中,通过检测 SLC38A4 蛋白质的表达可以进行从被检体分离出的细胞或组织为癌的概率的评价、和 / 或组织中的癌化部位的特定。由此,可以在视觉上确认食道癌存在的部位和状况(包括转移部位和 / 或转移的状况、向新的组织浸润的癌细胞的存在方式等)。特别是由于 SLC38A4 蛋白质的表达在处于早期的高分化阶段的食道癌中以高阳性率被检测出,因而根据本发明的方法,可判定病理组织的阶段(高分化阶段)。与等级发展的晚期癌相比,高分化阶段的癌细胞与正常鳞状上皮细胞在细胞形态上类似点较多,难以实现癌与正常的区分,但利用了抗 SLC38A4 蛋白质抗体的本发明的组织染色,在通过目视与正常难以区别的早期癌的检测中极为有用。在本发明中,“早期的食道癌”具体是未达到 III 级的阶段的食道癌,优选为 I 级或 II 级的食道癌。以癌患者为对象实施上述方法得到的信息,可以在该患者的病情的评价或掌握、治疗效果的评价等中利用。例如,如果与治疗并行地实施本发明的方法,则可以以作为结果得到的信息为基础评价治疗效果。具体地说,可以通过在施与药剂之后实施本发明的方法来研究病理组织中的染色性的变化,由染色部位的增减的变化来判定治疗效果。这样可以利用本发明的方法作为治疗效果监视器。另一方面,以除了患者以外的人、即未认定为癌的人为对象获得的信息,可以在食道癌的罹患的有无的判定评价等中利用。如果基于本发明的方法,则可以基于染色性这样的客观性优异的指标来进行癌的诊断。

[0104] 被检体中的癌的诊断通常是由医生(包括受到医生指示的人。下同。)来进行,通过本发明的方法获得的、关于病理组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达量的数据对医生的诊断发挥作用。因此,本发明的方法也可以说是收集、提示对医生的诊断发挥作用的数据的方法。

[0105] < 食道癌检测用组合物及其制造方法 >

[0106] 本发明提供食道癌检测用组合物,其中,包含抗 SLC38A4 蛋白质抗体。抗 SLC38A4 蛋白质抗体只要具有对 SLC38A4 蛋白质的特异结合性即可,对其种类和 / 或来源没有特别限制。在本发明的食道癌检测用组合物中使用的抗体,可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。此外,在本发明的食道癌检测用组合物中使用的抗体可以是抗体的功能性片段和 / 或功能性片段的多聚体的形态(例如,二聚体、三聚体、四聚体、多聚体)。作为这样的功能性片段和 / 或其多聚体,可列举例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、sc(Fv)₂、dsFv 和双价抗体(diabody)等。这里“Fab”是指包含一条轻链和重链的一部分的免疫球蛋白的一价的抗原结合片段。可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化、以及通过重组方法得到。“Fab'”包含抗体的铰链区的一个或 2 个以上半胱氨酸,由于在重链 CH1 结构域的羧基末端添加了少量残基而与 Fab 不同。“F(ab')₂”是包含两条轻链和两条重链的部分的免疫球蛋白的二价的抗原结合片段。“Fv”是具有完整的抗原识别和结合部位的最小的抗体片段。Fv 是由重链可变区和轻链可变区通过非共价键牢固地连接而成的二聚体。“scFv”包含抗体的重链可变区和轻链可变区,这些区域存在于单一的多肽链中。“sc(Fv)₂”是两个重链可变区和两个轻链可变区通过接头(linker)结合成单链而得的。“dsFv”是二硫键稳定化的 Fv。“双价抗体”是具有两个抗原结合位点的小的抗体片段,该片段包含在同一多肽链中与轻链可变区结合的重链可变区,各区域与其他链的互补区域形成配对。

[0107] 作为抗 SLC38A4 蛋白质抗体,优选为识别 SLC38A4 蛋白质(序列号 1)的第 29 位~第 47 位的氨基酸序列“GIGNSEKAAMSSQFANEDT”(序列号 2)的抗体。

[0108] 本发明的食道癌检测用组合物的制造方法包括:免疫 SLC38A4 蛋白质或者其有免疫原性的一部分的工序,以及分离和/或纯化与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体的工序。进一步可以包括混合作为组合物允许的其他成分的工序。

[0109] 本发明的食道癌检测用组合物中使用的抗体制备方法在本领域是已知的,例如记载于 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)。抗体可以利用通常的免疫学方法、以及噬菌体表面展示法来制备。

[0110] 多克隆抗体的制备可以按照以下步骤进行。首先制备抗原(例如,序列号 1 所记载的 SLC38A4 蛋白质的全长或其一部分),然后使用该抗原对兔等动物进行免疫。作为抗原的 SLC38A4 蛋白质可以通过从生物体样品中分离·纯化来制备。另外,也可以使用作为重组蛋白质制备的 SLC38A4 蛋白质作为抗原。重组蛋白质如下制备:将编码 SLC38A4 蛋白质的基因或其一部分以能够表达的状态插入载体中,将该载体导入适当宿主,再对宿主体中表达的蛋白质进行分离·纯化。还可以将 SLC38A4 蛋白质、优选为包含第 29 位~第 47 位的氨基酸序列“GIGNSEKAAMSSQFANEDT”(序列号 2)的肽区域制备成与 GST、 β -半乳糖苷酶、麦芽糖结合蛋白质、组氨酸(His)标签等的融合蛋白质,使用该融合蛋白质作为抗原。这样的融合蛋白质可以通过通用的方法简便地分离·纯化。

[0111] 根据需要重复免疫,在抗体的效价充分上升的时刻采血,通过离心处理等获取血清。获得的血清可以通过利用蛋白 G、蛋白 A 等的亲和层析制成 IgG 级分。可以通过利用 SLC38A4 蛋白质或其一部分的亲和纯化,从抗血清、IgG 级分中进一步分离·纯化与作为免疫原的 SLC38A4 蛋白质或其一部分结合的抗体。

[0112] 在本发明的食道癌检测用组合物中使用的多克隆抗体特别优选为免疫包含 SLC38A4 蛋白质的第 29 位~第 47 位的氨基酸序列“GIGNSEKAAMSSQFANEDT”(序列号 2)的肽,作为与该肽结合的抗体分离·纯化而得的多克隆抗体。

[0113] 另一方面,单克隆抗体可以按照以下的步骤制备。首先按照与上述同样的步骤实施免疫操作。根据需要重复免疫,在抗体效价充分上升的时刻从免疫动物摘取抗体产生细胞。接着将所得的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合而获得杂交瘤。接着选择产生对目标蛋白质具有高特异性的抗体的克隆。可以在将杂交瘤单克隆化之后,通过纯化所选择的克隆的培养液,获得目标抗体。另一方面,也可以使杂交瘤增殖至所需数目以上,然后将其移植到动物(例如小鼠)的腹腔内使其在腹水内增殖,然后对腹水进行纯化,从而获取目标抗体。在上述培养液的纯化或腹水的纯化中,优选使用利用了蛋白 G、蛋白 A 的亲和层析。另外也可以使用使抗原固相化了的亲和层析。另外还可以使用离子交换层析、凝胶过滤层析、硫酸铵分级和离心分离等方法。这些方法可以单独使用或任意组合使用。

[0114] 以这样获得的抗体或其基因为基础,可以制备 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、sv(Fv)₂、dsFv 和双价抗体等抗体的功能性片段和/或其多聚体(例如,二聚体、三聚体、四聚体和多聚体)。

[0115] 如上所述,在直接检测与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体量的情况下,所得的抗 SLC38A4 蛋白质抗体可以直接通过酶、荧光等标记使用。另一方面,在实施利用二抗等检测

与 SLC38A4 蛋白质结合的抗体量的间接检测方法时,也可以不标记抗 SLC38A4 蛋白质抗体(一抗),而对识别该抗体的二抗进行标记。

[0116] 作为本发明的食道癌检测用组合物,除了含有抗 SLC38A4 蛋白质抗体以外,还可以含有作为组合物允许的其他成分。作为这样的其他成分,可列举例如,担载体、赋形剂、崩解剂、缓冲剂、乳化剂、悬浮剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、生理食盐、标记化合物、二抗等。作为赋形剂,可以使用乳糖、淀粉、山梨糖醇、D-甘露糖醇、白糖等。作为崩解剂,可以使用淀粉、羧甲基纤维素、碳酸钙等。作为缓冲剂,可以使用磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐等。作为乳化剂,可以用阿拉伯树胶、海藻酸钠、黄耆胶等。作为悬浮剂,可以使用甘油单硬脂酸酯、单硬脂酸铝、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟甲基纤维素、十二烷基硫酸钠等。作为稳定剂,可以使用丙二醇、二乙胺基亚硫酸盐、抗坏血酸等。作为保存剂,可以使用苯酚、苯扎氯胺、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯等。作为防腐剂,可以使用苯扎氯胺、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。

[0117] < 食道癌检测用试剂盒 >

[0118] 本发明还提供包含上述的食道癌检测用组合物的食道癌检测用试剂盒。本发明的试剂盒中,除了食道癌检测用组合物(抗体标准品)之外,可以组合标记的检测所需的底物、阳性对照和 / 或阴性对照、或者在试剂的稀释和 / 或洗涤中使用的缓冲液等。在以未标记的抗体为抗体标准品的情况下,本发明的试剂盒可以组合将与该抗体结合的物质(例如,二抗、蛋白 G、蛋白 A 等)标记化而得的物质。而且,本发明的试剂盒可以包含该试剂盒的使用说明书。本发明的试剂盒例如在食道癌的诊断中是有用的。

[0119] [食道癌治疗药的筛选]

[0120] 本发明还提供食道癌治疗药的筛选方法。其一种方式是以 SLC38A4 蛋白质为靶标的筛选方法,是包括以下工序的方法:提供 SLC38A4 蛋白质或其一部分的工序,使候选化合物与 SLC38A4 蛋白质或其一部分接触的工序,以及选择与 SLC38A4 蛋白质或其一部分结合的化合物的工序。通过该方法,可以得到与 SLC38A4 蛋白质结合的化合物,进行食道癌治疗药的筛选。作为候选化合物,可以使用化学合成或天然的低分子化合物、天然或合成的蛋白质、肽、抗体(包含本发明的抗体)、细胞提取液、培养上清等。在作为候选化合物使用抗体的情况下,可以通过 EIA、ELISA 等来测定候选化合物的结合活性。使用通过组合化学技术的高通量法来筛选与蛋白质结合的人工合成的化合物也是本领域技术人员公知的技术(Verdine GL. Nature (ENGLAND) 1996 Nov 7;384:11-13、Hogan JC Jr. Nature (ENGLAND) 1996 Nov 7;384:17-19)。这样获得的化合物也可以在食道癌的靶向筛选中使用。

[0121] 另一方式是以 SLC38A4 蛋白质的表达为指标的筛选方法,是包括以下工序的方法:对食道癌模型动物(除人以外)施与候选化合物或者对照的工序,分离该模型动物的食道部的组织的工序,以及检测分离的组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达,与对照比较,选择降低 SLC38A4 蛋白质的表达的化合物的工序。本方法可以和上述的以 SLC38A4 蛋白质为靶标的筛选方法结合实施,也可以独立实施。

[0122] 在本方法中,首先准备食道癌动物模型、例如,可以在 ALDH2 敲除小鼠的皮下等注射乙醇或乙醛,诱发鳞状上皮细胞癌,获得食道癌的动物模型(例如,参照日本特开 2005-110601 号公报)。此外也可以通过将人食道癌细胞移植入免疫缺陷小鼠中来制作食

道癌动物模型。

[0123] 接着,对该模型动物施与候选化合物或对照。作为候选化合物,可以使用化学合成或天然的低分子化合物、天然或合成的蛋白质、肽、抗体(包含本发明的抗体)、细胞提取液、培养上清等。作为对照,可以使用阳性对照和/或阴性对照。这里,作为阴性对照,通常使用生理盐水等。也可以是已判明没有治疗效果的物质。作为阳性对照,使用已判明有治疗效果的物质等。施与的方法是本领域技术人员公知的,可以从经口、静脉注射、皮内或皮下等中适宜选择。

[0124] 接着,分离模型动物的食道部的组织。被分离的组织在供给免疫染色的情况下,如上所述,可以进行固定·石蜡包埋等处理。

[0125] 最后,检测分离的组织中的 SLC38A4 蛋白质的表达,选择出与对照相比降低 SLC38A4 蛋白质的表达的化合物。在通过免疫染色来检测 SLC38A4 蛋白质的表达的情况下,通过比较阳性对照施与组的染色图像与候选化合物施与组的染色图像,选出候选化合物施与组的染色为更阴性(例如,染色强度弱,或者强染色的癌细胞的比例少)的化合物。作为对照的染色图像,也可以准备阳性对照施与组的染色图像(有治疗效果的物质的施与组的染色图像:标准染色图像)代替阴性对照施与组的染色图像,选择同以上地带来阴性的染色图像的化合物。

[0126] 实施例

[0127] 以下通过实施例更详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0128] (1) 抗体的制作

[0129] 根据 SLC38A4 蛋白质的氨基酸序列信息,通过计算机进行二级结构预测,综合了其于溶剂的接触率、柔软性、表面露出、抗原性、亲水性和极性的全部因素,结果判断第 29 位~第 47 位的氨基酸序列“GIGNSEKAAMSSQFANEDT”(序列号 2) 的位置抗原性最高(图 1)。人工合成包含第 29 位~第 47 位的氨基酸序列的肽使其与 KLH 结合,然后与弗氏完全佐剂混合,每隔一周 6 次对两只以上的兔进行免疫。使用固相化有抗原肽的琼脂糖珠柱从免疫后得到的抗血清中纯化出抗原特异性的 IgG。对于纯化 IgG,使用固相化有抗原肽的 96 孔板进行 ELISA,在抗原浓度 0.4 μ g/ml 时其效价(吸光度 OD450)为 1.0 以上的情况下,用于以后的实验。本实施例中获得的抗原特异性的 IgG 级分的效价为 1.2(图 2)。

[0130] (2) 抗体的性能确认

[0131] 所得的抗体优选在对强制表达 SLC38A4 蛋白质的全长的 293T 培养细胞的细胞染色和流式细胞仪(FCM)中显示反应性。表达载体使用了 pcDNA3.1(invitrogen 公司)。在 SLC38A4 基因的下游装载作为核糖体进入位点的 IRES 序列并在该 IRES 序列的紧下游装载绿色荧光蛋白质 Azami-Green(Amalgam 公司)的基因。将该表达载体利用脂质体转染试剂(invitrogen 公司)瞬时导入 293T 细胞中,Azami-Green 荧光发光的细胞被判定为导入了 SLC38A4 基因的细胞。

[0132] 首先,为了在基因导入后的 293T 细胞(1×10^5 个细胞)的细胞膜上开孔,用 4% 的低聚甲醛/磷酸缓冲液(PBS)在 4°C 固定 15 分钟,然后室温下用 0.1% 的 TritonX-100/PBS 处理 15 分钟。接着,在室温下使 1 μ g/ml 的抗体溶液(在 100 μ l 的含有 1% 的 BSA 和 0.1% TritonX-100 的 PBS 中稀释)和细胞反应 1 小时,然后作为二抗使 PE 标记的抗兔 IgG 抗体(BECKMANCOULTER 公司制,200 倍稀释。稀释液和一抗稀释液相同)反应。当抗体与抗

原表达细胞反应时,因 Azami-Green(绿色)而发光的细胞同时因 PE(红光)而发光(即,在 FCM 数据中散点向右上移动)。将染色细胞用散点图展开,结果在使用作为阴性对照使用的兔 IgG 的情况下散点不向右上移动,另一方面,在使用作为阳性对照的 myc 标签抗体 (MBL 制:PL14) 的情况下,和使用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的情况下,散点向右上移动(图 3)。另外,将作为对照的导入了模拟基因的 293T 细胞、和导入了 SLC38A4/SNAT4 基因的 293T 细胞与上述同样地进行处理后,使用 UV 荧光显微镜 (OLYMPUS 公司 OLYMPUS IX71 荧光显微镜系统) 进行观察。其结果是,在对照细胞中几乎看不到荧光(红色),而在导入了 SLC38A4/SNAT4 基因的 293T 细胞中检测到荧光(红色)(图 4)。从图 2~4 的结果判断,制备的抗体特异性地识别 SLC38A4 蛋白质。

[0133] (3) 利用抗体的组织切片(石蜡包埋)染色

[0134] 为了使样本统一来源于亚洲人,所有的组织切片(进行了石蜡包埋)从上海的 Outdo 公司(中国)购买。首先,使用食道正常部(左)和食道鳞状上皮细胞癌部(右)各 2 例进行了染色性的确认。由该染色性,基于 WHO 的肿瘤分类 (Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System Edited by Stanley R. Hamilton Lauri A. Aaltonen IARC Press Lyon, 2000, p16) 评价了食道鳞状上皮细胞癌的进展率。在该评价中,将 WHO 的肿瘤分类中的“高分化 (well differentiated)”作为 I 级,“中分化 (moderately differentiated)”作为 II 级,“低分化 (poorly differentiated)”作为 III 级(以下相同)。患者号 Com01-D7 和 Com01-D8 均为 WHO 病理分类 I 级的食道鳞状上皮细胞癌。为了将组织切片进行脱石蜡处理,将在二甲苯中 5 分钟的处理进行 3 次、将在 100%乙醇中 5 分钟的处理进行 2 次、将在 95%乙醇中 5 分钟的处理进行 1 次、将在 90%乙醇中 5 分钟的处理进行 1 次、将在 80%乙醇中 5 分钟的处理进行 1 次、将在 70%乙醇中 5 分钟的处理进行 1 次、然后将在 PBS 中 5 分钟的处理进行 3 次(所有处理均在室温下进行)。接着,为了进行抗原修复,将组织切片浸泡在含有 0.05%的 Tween20 的 10mM 柠檬酸缓冲液 (pH 值 6) 中,用高压釜在 125°C 处理 5 分钟。为了消除内源性的过氧化物酶活性,在含有 3%的过氧化氢水的 PBS 中在室温下处理 10 分钟,然后用含有 5%的正常山羊血清和 0.5%的 BSA 的 PBS(封闭溶液)在室温下处理 30 分钟。用布擦去过量的溶液,添加适量的用封闭溶液稀释到 1 μ g / ml 的抗 SLC38A4 蛋白质抗体(充分浸泡组织切片的程度),在室温下反应 2 小时。用含有 0.05%的 Tween20 的 PBS 在室温下洗涤 3 次,每次 5 分钟,然后作为二抗添加适量的 Histostar (Ms+Rb) (MBL 公司)的原液(充分浸泡组织切片的程度),在室温下反应 60 分钟。用含有 0.05%的 Tween20 的 PBS 在室温下洗涤 3 次,每次 5 分钟,然后与 DAB 底物液 (MBL 公司)反应 10 分钟。通过用水洗涤组织切片来停止反应。苏木精染色后,用乙醇和二甲苯进行脱水处理,用标本制作液(松浪硝子)制成标本。用明视场显微镜下 (OLYMPUS IX71) 进行镜检和记录,结果确认了抗 SLC38A4 蛋白质抗体不与正常食道部反应,而与食道鳞状上皮细胞癌反应(图 5)。

[0135] 接着,通过与上述同样的方法使用表 1、表 2 中记载的 96 例食道癌患者样本(在 WHO 的病理分类中为高分化型的 I 级 27 例,介于高分化和中分化之间 I—II 级 4 例,中分化的 II 级 36 例,介于中分化和低分化之间 II—III 级 3 例,低分化的 III 级 26 例)进行组织染色。

[0136] 表 1

[0137]

患者号	性别	年龄	组织型	WHO 病理分类	组织染色得分
Com01-D7	男	52	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
Com01-D8	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1A1	男	71	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1A2	男	68	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1A3	女	59	食道鳞状上皮细胞癌	I	+ -
1A4	男	67	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1A5	男	54	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1B1	男	75	食道鳞状上皮细胞癌	I	+ -
1B2	男	55	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1B3	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1B4	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1B5	男	64	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1B6	男	80	食道鳞状上皮细胞癌	I	+ -
1C1	男	60	食道鳞状上皮细胞癌	I	++
1C2	女	72	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1C3	女	65	食道鳞状上皮细胞癌	I	-
1C4	男	56	食道鳞状上皮细胞癌	I	-
1C5	女	71	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1C6	男	52	食道鳞状上皮细胞癌	I	+ -
1C7	男	43	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1D1	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1D2	男	57	食道鳞状上皮细胞癌	I	-
1D3	男	65	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1D4	女	56	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1E2	男	57	食道鳞状上皮细胞癌	I	+ -
1E3	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	I	-
1E4	男	63	食道鳞状上皮细胞癌	I	+
1A7	男	48	食道鳞状上皮细胞癌	I-II	+ -
1D6	男	48	食道鳞状上皮细胞癌	I-II	-
1D7	男	55	食道鳞状上皮细胞癌	I-II	+ -
2A4	女	61	食道鳞状上皮细胞癌	I-II	+ -

[0138]

*WHO 病理分类

**组织染色得分

I 级: 高分化阶段
 II 级: 中分化阶段
 III 级: 低分化阶段

++ : 强阳性
 + : 阳性
 + - : 弱阳性
 - : 阴性

[0139] 表 2

患者号	性别	年龄	组织型	WHO 病理分类	组织染色得分
1A6	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
1E1	女	56	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2A1	男	60	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
2A3	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2A5	男	59	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2A6	女	61	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
2A7	男	64	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2B1	男	49	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2B2	男	75	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2B3	男	60	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2B4	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2B5	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2B6	男	68	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
2B7	男	53	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
2C1	男	64	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
2C2	男	56	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2C3	男	58	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2C4	男	63	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2C5	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2C6	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2C7	男	70	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
2D1	男	49	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2D2	男	68	食道鳞状上皮细胞癌	II	++
2D3	男	58	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2D4	男	68	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2D5	男	68	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2D6	男	71	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
2D7	男	63	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2E1	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2E2	男	59	食道鳞状上皮细胞癌	II	++
2E3	男	60	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
2E4	男	54	食道鳞状上皮细胞癌	II	+
3A2	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
3A4	男	63	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
3A5	男	67	食道鳞状上皮细胞癌	II	-
3D5	男	71	食道鳞状上皮细胞癌	II	+/-
3E2	男	48	食道鳞状上皮细胞癌	II-III	+
3E3	男	49	食道鳞状上皮细胞癌	II-III	-
3E4	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	II-III	-
2A2	男	60	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3A1	男	59	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3A3	男	62	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3A8	男	59	食道鳞状上皮细胞癌	III	+
3A7	男	68	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3B1	男	52	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3B2	男	54	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3B3	男	64	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3B4	女	53	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3B5	男	75	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3B6	男	69	食道鳞状上皮细胞癌	III	+
3B7	男	65	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C1	男	70	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C2	男	66	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C3	女	64	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C4	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C5	男	57	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C6	男	51	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3C7	男	61	食道鳞状上皮细胞癌	III	+/-
3D1	男	56	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3D2	女	62	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3D3	男	60	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3D4	男	52	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3D6	男	57	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3D7	男	56	食道鳞状上皮细胞癌	III	-
3E1	男	80	食道鳞状上皮细胞癌	III	+

[0140]

[0141] 其中,染色的程度根据其染色强度和分布分为4个阶段。即,被检癌组织整体非常强地染色的情况为强阳性(++),被检癌组织整体染色的情况为阳性(+),被检癌组织整体的一部分染色或整体弱地染色的情况为弱阳性(+/-),另外被检癌组织完全不染色的情况为

阴性(-)。其结果是,在被调查的来自食道鳞状上皮细胞癌患者的活检被检组织样本中,强阳性为 10 例,阳性为 24 例,弱阳性为 18 例,阴性为 44 例,将强阳性至弱阳性全部加和而得的阳性例合计为 52 例,相当于全体的 54%。此外,根据 WHO 病理分类级别将结果分类,则判断在被分类为 I 级和 I - II 级的 31 例中 26 例为阳性(阳性率 83.9%)(图 6 和图 7),被分类为 II 级和 II - III 级的 39 例中 22 例为阳性(阳性率 56.4%)(图 6 和图 8),被分类为 III 级的 26 例中 4 例为阳性(阳性率 15.4%)(图 6 和图 9)。由该结果判明,在处于更早期的高分化阶段的食道癌中,利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的阳性率高(图 6)。此外,将各等级中的阳性例按照染色强度分类,则在 I 级中,强阳性为 25.8%,阳性为 32.3%,弱阳性为 25.8%,在 II 级中,强阳性为 5.1%,阳性为 30.8%,弱阳性为 20.5%,另外在 III 级中,强阳性为 0%,阳性为 7.7%,弱阳性为 7.7%,发现了等级越低则组织染色中的染色强度越高的倾向(图 10)。由此认为,利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的食道癌组织染色对在视觉上难以与正常区分的早期癌的检测是极为有用的。

[0142] 另外,为了评价在其他消化系统癌中利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的染色性,对胃腺癌、大肠腺癌、直肠腺癌、胰腺癌、肝细胞癌和肾癌按照上述图 5 的方法进行组织染色(各癌种各 4 例)。这些样本全部购自上海 OutDo 公司。其结果是在这 6 种癌中没有确认染色性(图 11)。显示利用抗 SLC38A4 蛋白质抗体的染色是对食管鳞状上皮细胞癌特异性的反应。产业上可利用性

[0143] 如以上所说明的那样,根据本发明,可以以 SLC38A4 蛋白质的表达为指标高精度且早期地检测食道癌。由此,可以在食道癌的发展的早期阶段进行食道癌的治疗,提高患者的治疗成功率,并且可以谋求患者的预后的改善。此外,根据本发明,可以以 SLC38A4 蛋白质为靶标,并且以 SLC38A4 蛋白质的表达为指标,有效地进行食道癌的治疗药的筛选。这样,本发明可以对食道癌的诊断、治疗及治疗药的开发等做出较大贡献。

[0001]

序列表

<110> 北京博尔迈生物技术有限公司
 株式会社医学生物学研究所
 <120> 食道癌标志物
 <130> IBPF11-502W0
 <150> JP 2010-012082
 <151> 2010 1 22
 <160> 2
 <170> PatentIn 版本 3.1
 <210> 1
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> I
 Met Asp Pro Met Glu Leu Arg Asn Val Asn Ile Glu Pro Asp Asp Glu
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Gly Glu Ser Ala Pro Asp Ser Tyr Ile Gly Ile Gly Asn
 20 25 30
 Ser Glu Lys Ala Ala Met Ser Ser Gln Phe Ala Asn Glu Asp Thr Glu
 35 40 45
 Ser Gln Lys Phe Leu Thr Asn Gly Phe Leu Gly Lys Lys Lys Leu Ala
 50 55 60
 Asp Tyr Ala Asp Glu His His Pro Gly Thr Thr Ser Phe Gly Met Ser
 65 70 75 80
 Ser Phe Asn Leu Ser Asn Ala Ile Met Gly Ser Gly Ile Leu Gly Leu
 85 90 95
 Ser Tyr Ala Met Ala Asn Thr Gly Ile Ile Leu Phe Ile Ile Met Leu
 100 105 110
 Leu Ala Val Ala Ile Leu Ser Leu Tyr Ser Val His Leu Leu Leu Lys
 115 120 125
 Thr Ala Lys Glu Gly Gly Ser Leu Ile Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Lys
 130 135 140
 Ala Phe Gly Trp Pro Gly Lys Ile Gly Ala Phe Val Ser Ile Thr Met
 145 150 155 160
 Gln Asn Ile Gly Ala Met Ser Ser Tyr Leu Phe Ile Ile Lys Tyr Glu
 165 170 175
 Leu Pro Glu Val Ile Arg Ala Phe Met Gly Leu Glu Glu Asn Thr Gly
 180 185 190
 Glu Trp Tyr Leu Asn Gly Asn Tyr Leu Ile Ile Phe Val Ser Val Gly
 195 200 205
 Ile Ile Leu Pro Leu Ser Leu Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Leu Gly Tyr
 210 215 220
 Thr Ser Gly Phe Ser Leu Thr Cys Met Val Phe Phe Val Ser Val Val

[0002]

225 230 235 240
 Ile Tyr Lys Lys Phe Gln Ile Pro Cys Pro Leu Pro Val Leu Asp His
 245 250 255
 Ser Val Gly Asn Leu Ser Phe Asn Asn Thr Leu Pro Met His Val Val
 260 265 270
 Met Leu Pro Asn Asn Ser Glu Ser Ser Asp Val Asn Phe Met Met Asp
 275 280 285
 Tyr Thr His Arg Asn Pro Ala Gly Leu Asp Glu Asn Gln Ala Lys Gly
 290 295 300
 Ser Leu His Asp Ser Gly Val Glu Tyr Glu Ala His Ser Asp Asp Lys
 305 310 315 320
 Cys Glu Pro Lys Tyr Phe Val Phe Asn Ser Arg Thr Ala Tyr Ala Ile
 325 330 335
 Pro Ile Leu Val Phe Ala Phe Val Cys His Pro Glu Val Leu Pro Ile
 340 345 350
 Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Arg Ser Arg Arg Lys Met Gln Thr Val Ser
 355 360 365
 Asn Ile Ser Ile Thr Gly Met Leu Val Met Tyr Leu Leu Ala Ala Leu
 370 375 380
 Phe Gly Tyr Leu Thr Phe Tyr Gly Glu Val Glu Asp Glu Leu Leu His
 385 390 395 400
 Ala Tyr Ser Lys Val Tyr Thr Leu Asp Ile Pro Leu Leu Met Val Arg
 405 410 415
 Leu Ala Val Leu Val Ala Val Thr Leu Thr Val Pro Ile Val Leu Phe
 420 425 430
 Pro Ile Arg Thr Ser Val Ile Thr Leu Leu Phe Pro Lys Arg Pro Phe
 435 440 445
 Ser Trp Ile Arg His Phe Leu Ile Ala Ala Val Leu Ile Ala Leu Asn
 450 455 460
 Asn Val Leu Val Ile Leu Val Pro Thr Ile Lys Tyr Ile Phe Gly Phe
 465 470 475 480
 Ile Gly Ala Ser Ser Ala Thr Met Leu Ile Phe Ile Leu Pro Ala Val
 485 490 495
 Phe Tyr Leu Lys Leu Val Lys Lys Glu Thr Phe Arg Ser Pro Gln Lys
 500 505 510
 Val Gly Ala Leu Ile Phe Leu Val Val Gly Ile Phe Phe Met Ile Gly
 515 520 525
 Ser Met Ala Leu Ile Ile Ile Asp Trp Ile Tyr Asp Pro Pro Asn Ser
 530 535 540
 Lys His His
 545

<210> 2

[0003]

<211> 19

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Gly Ile Gly Asn Ser Glu Lys Ala Ala Met Ser Ser Gln Phe Ala Asn

1

5

10

15

Glu Asp Thr

29aa 47aa

```

MDPMELRNVNIEPDDFSSSGESAPDSYTGIGNSEKAAMSSQFANEDTESQK
FLTNGPLGKKKLADYADEHHPGTTSTFGMSSFNLSNAIMGSGILGLSYAMAN
TGIILPFIIMLLAVAILSLYSVHLLKTAKEGGSLIYEKLGKAFGWPGKGTG
AFVSIITMONTIGAMSSYLFIIKYELPEVIRAFMGLEENTGEWYLNIGNYLIIF
VSVGIIILPLSLLKNLGYLGYTSGFSLTCMVFFVSVVIYKKFQIPCPPLVLD
HSVGNLSFNNTLPMHVVM LFNNSSESDVNFMMDYTHRNPAGLDENQAKGSL
HDSGVEYEAHSDDKCEPKYFVFNSTRAYAIPILVFAFVCHPEVLPYSELK
DRSRKMQTVSNI SITGMLVMYLLAALFGYLTFFYGEVEDELLHAYSKVYTL
DIPLLMVR LAVLVAVTLTVPIVLPFIRTSVITLLFPKRPF SWIRHFLIAAV
LIALNNVLVILVPTIKYIFGFIGASSATMLIFILPAVFYLLKLVKKETFRSP
QKVGALIFLVVGIFFMIGSMALIIIDWIYDPNSKHH
    
```

547

图 1

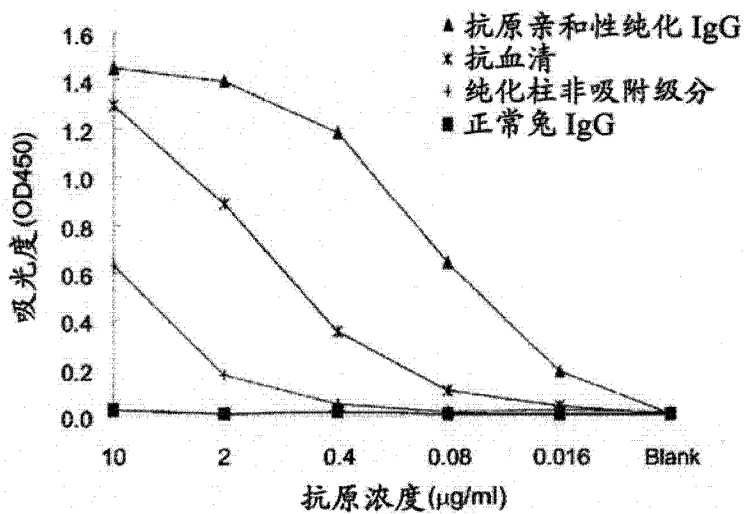


图 2

细胞: 强制表达带有 myc 标签的 SLC38A4 的 293T 细胞

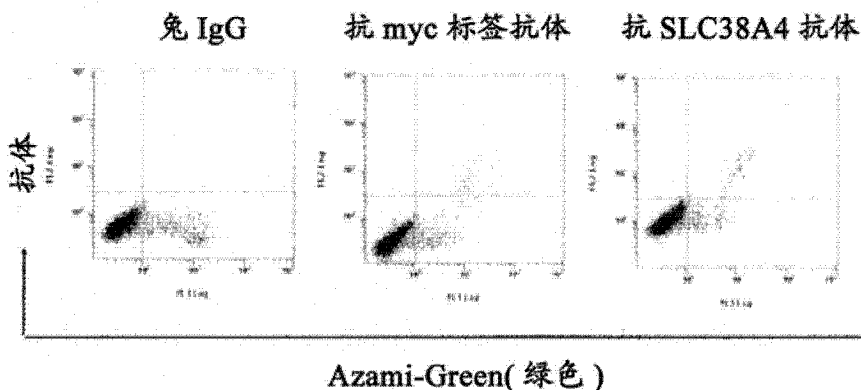


图 3

细胞: 导入有模拟基因的 293T 细胞: 导入有 SLC38A4 基因的 293T
抗体: 抗 SLC38A4 抗体 抗体: 抗 SLC38A4 抗体

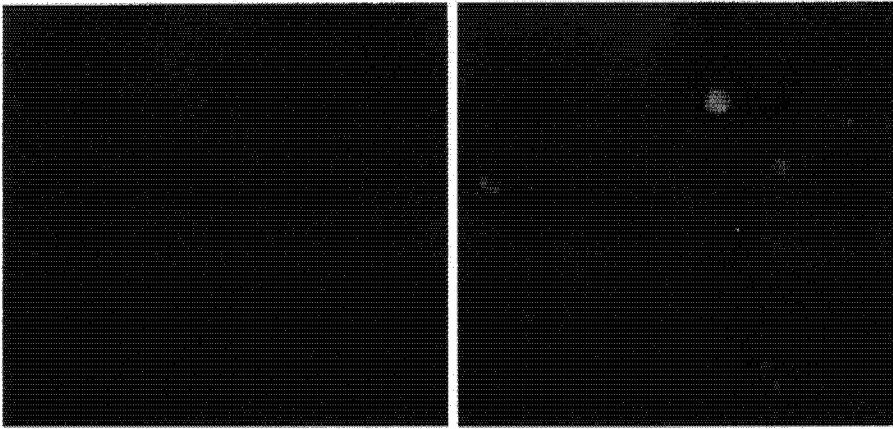


图 4

食道鳞状上皮细胞癌组织



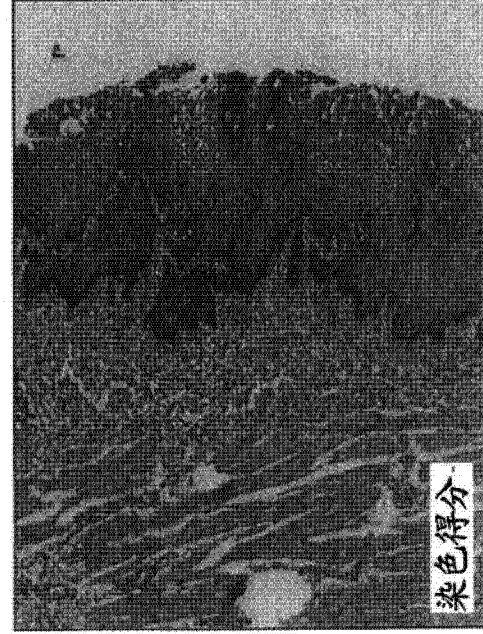
食道鳞状上皮细胞癌组织



食道癌患者的正常食道鳞状上皮组织



食道癌患者的正常食道鳞状上皮组织



患者号
Com01-D7

患者号
Com01-D8

图 5

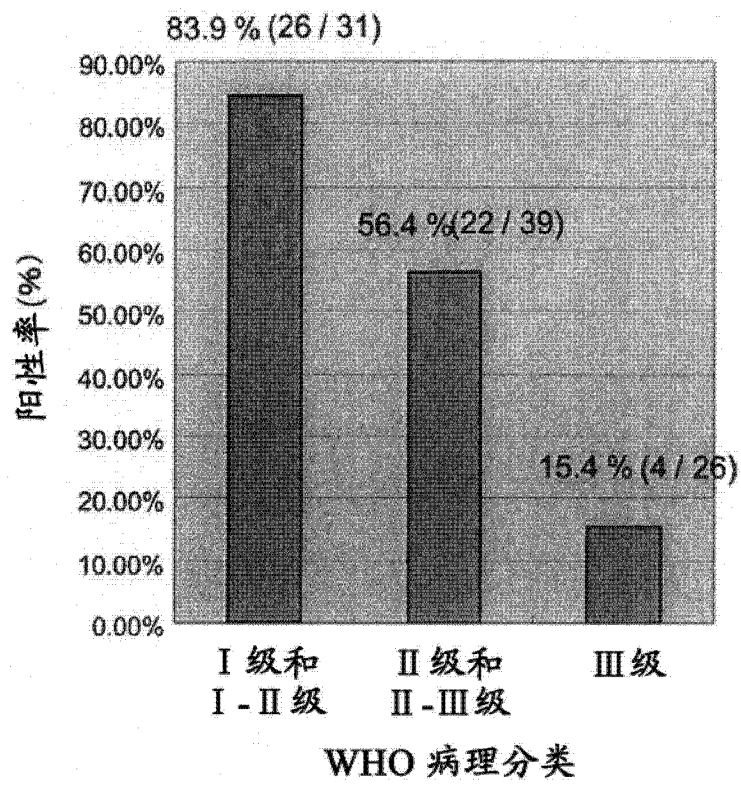


图 6

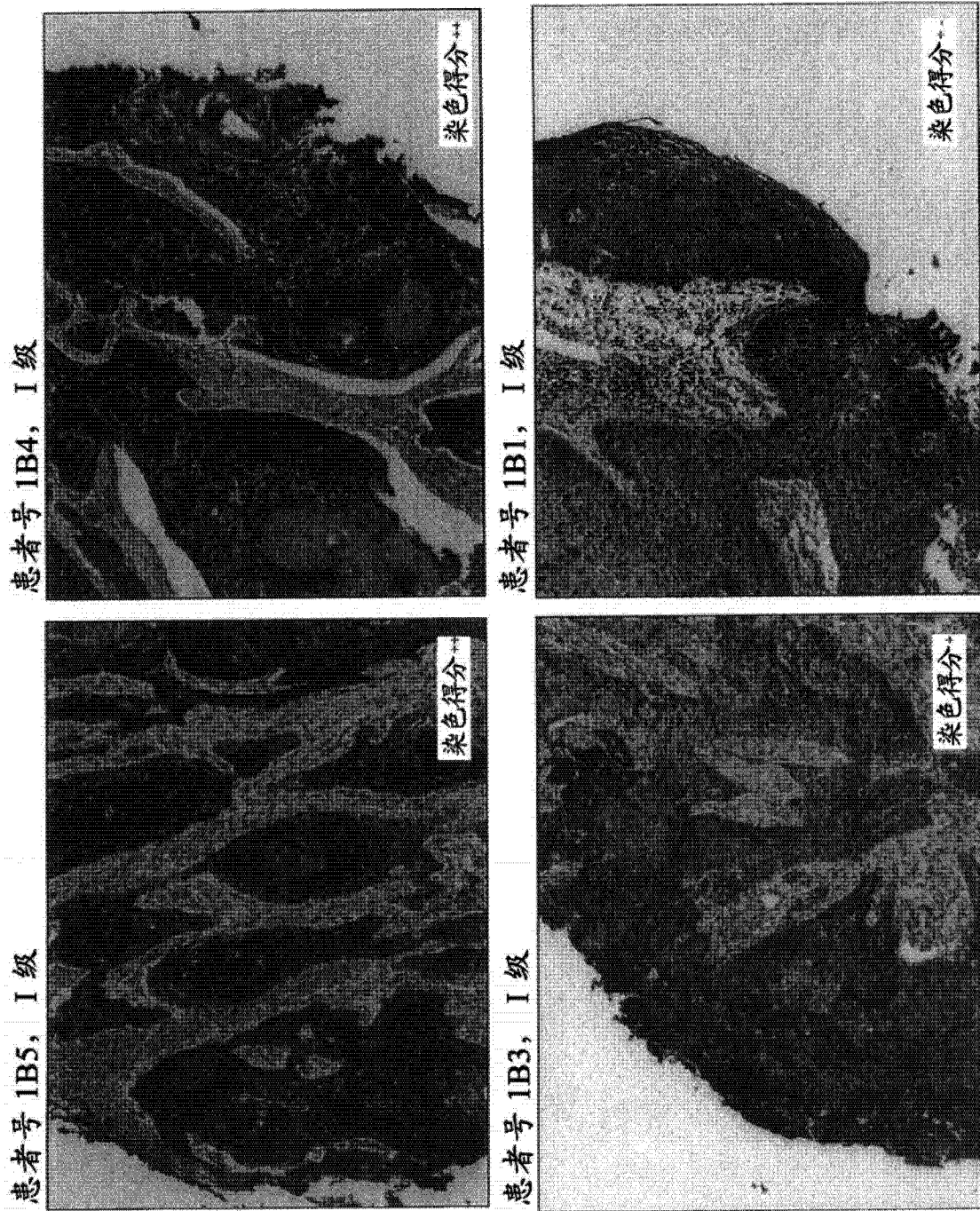


图 7

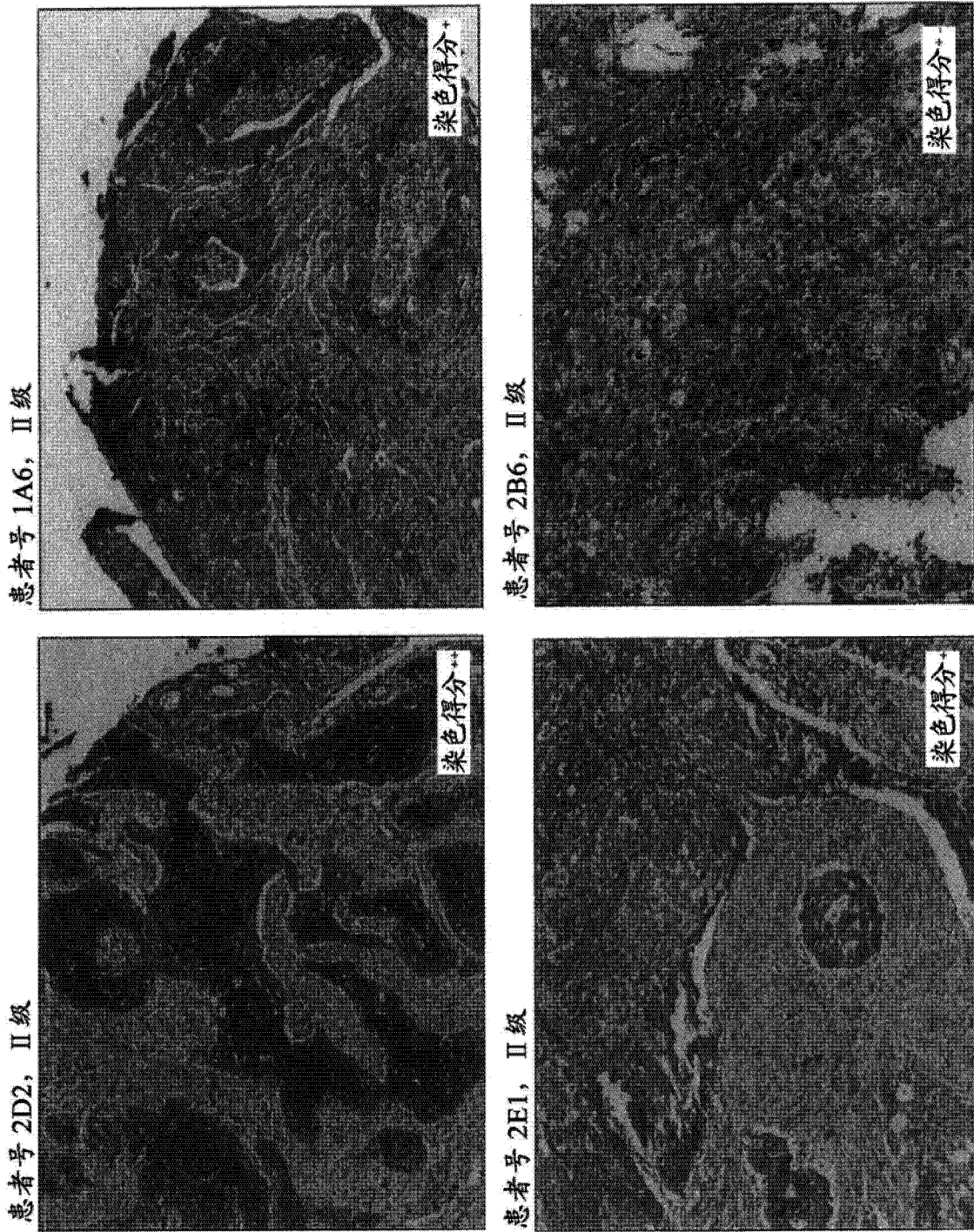


图 8

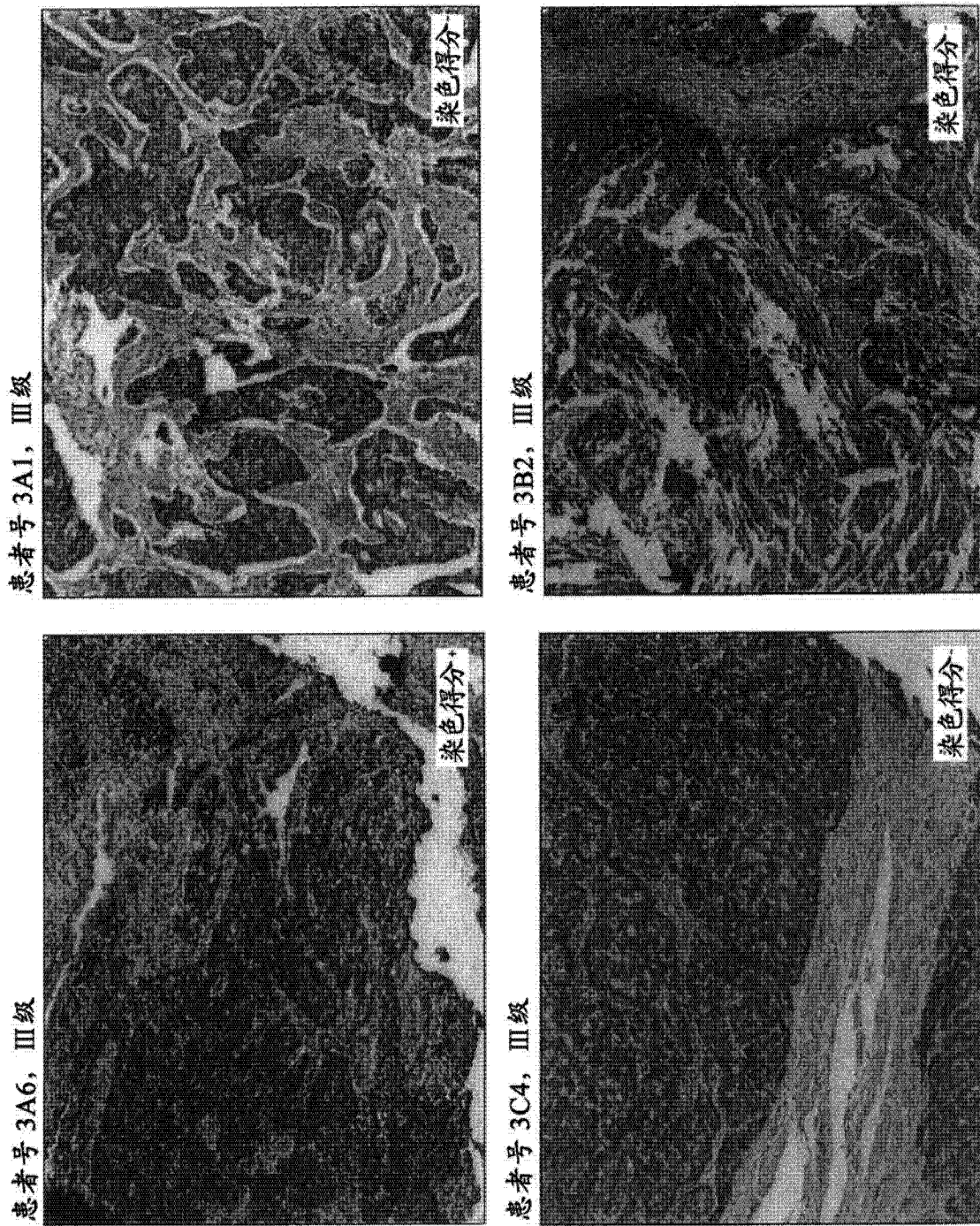
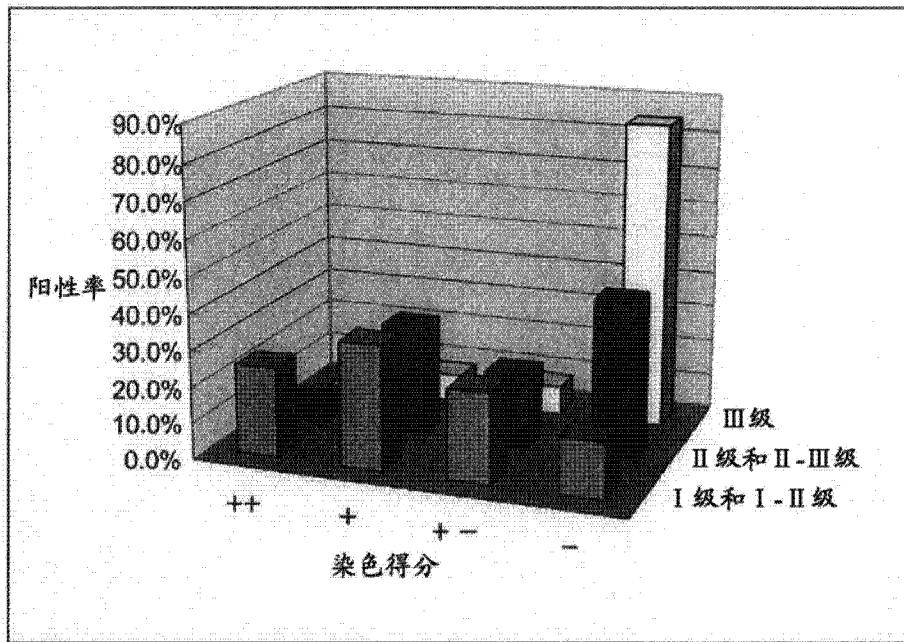


图 9



I级和I-II级			II级和II-III级			III级		
染色得分	共 31 例	阳性率	染色得分	共 39 例	阳性率	染色得分	共 26 例	阳性率
++	8	25.8%	++	2	5.1%	++	0	0.0%
+	10	32.3%	+	12	30.8%	+	2	7.7%
+-	8	25.8%	+-	8	20.5%	+-	2	7.7%
-	5	16.1%	-	17	43.6%	-	22	84.6%

图 10

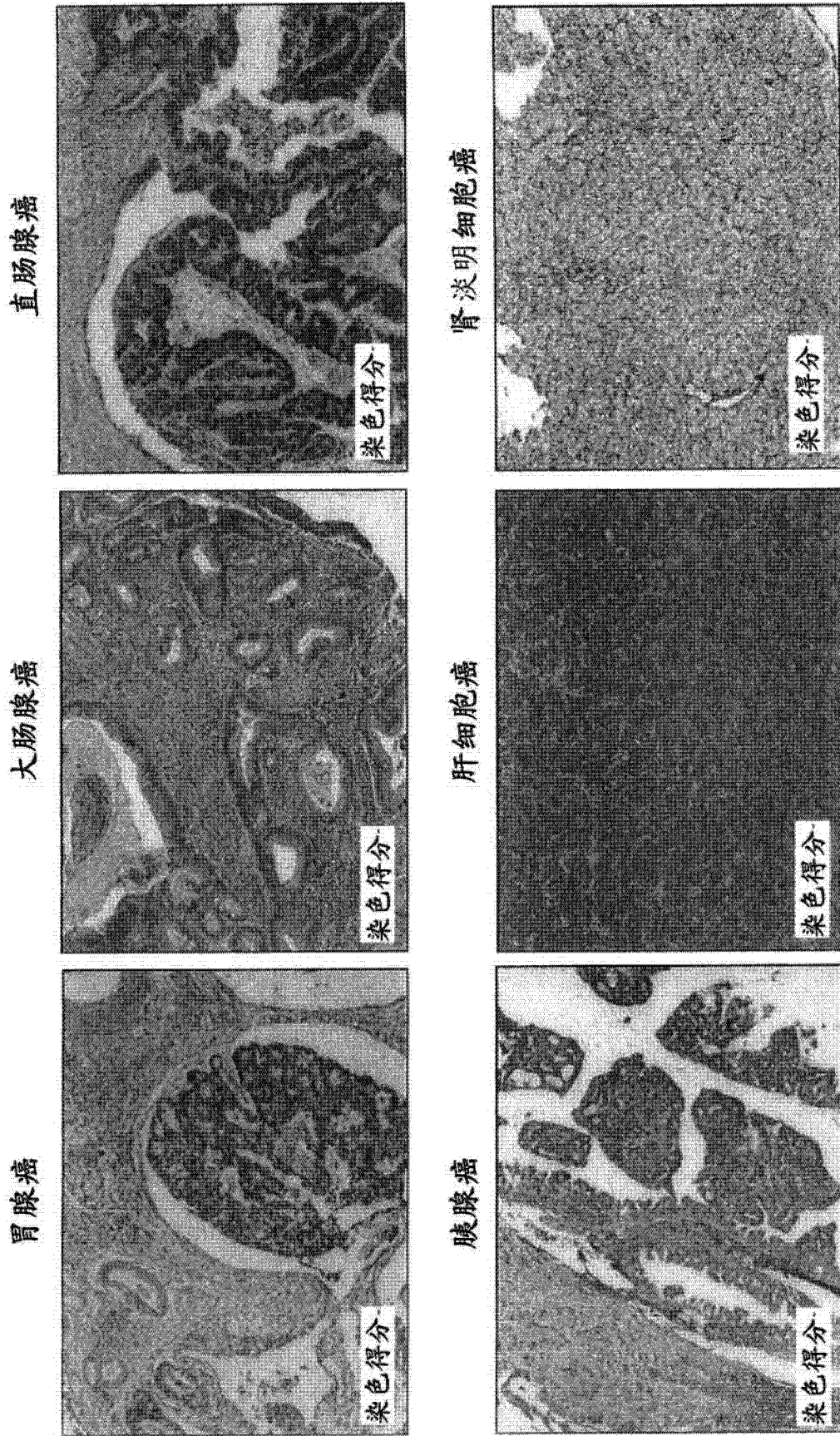


图 11