

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4594575号  
(P4594575)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D

請求項の数 17 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2001-515976 (P2001-515976)	(73) 特許権者	501230085
(86) (22) 出願日	平成12年8月4日(2000.8.4)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ ミシガン
(65) 公表番号	特表2003-535309 (P2003-535309A)		アメリカ合衆国48109 -0510
(43) 公表日	平成15年11月25日(2003.11.25)		ミシガン州、アン アーバー、 ピー. オ ー. ボックス 0510
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/021514	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開番号	W02001/011372		弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成13年2月15日(2001.2.15)	(74) 代理人	100072040
審査請求日	平成18年11月1日(2006.11.1)		弁理士 浅村 肇
(31) 優先権主張番号	09/370,337	(74) 代理人	100088926
(32) 優先日	平成11年8月6日(1999.8.6)		弁理士 長沼 暉夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんのマーカーとして使用されるアネキシン類及び自己抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 被検者から得た生物学的サンプル中のアネキシンI及びアネキシンIIから選択されるアネキシンタンパク質を定量的に検出し、そして

(b) 対照サンプルと比較して被検者のサンプル中に検出されるアネキシンタンパク質の濃度増加が肺がん、乳がん、もしくは食道がん患者の指標となるので、被検者のサンプル中に検出されたタンパク質濃度を対照サンプル中に検出されたタンパク質濃度と比較すること、からなる

肺がん、乳がん、もしくは食道がん患者の指標を検出する方法。

【請求項 2】

アネキシンタンパク質を免疫検定法で検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

免疫検定法が免疫沈降法である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプルが肺組織サンプルである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

がんが肺がんである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 免疫特異的に抗原抗体結合反応が生じるような条件下で被検者から得た生物学的サンプルとアネキシンI及びアネキシンIIから選択されるアネキシンタンパク質抗原を含む

10

20

サンプルを接触させ、そして

(b) 自己抗体の存在が被検者に肺がん、乳がん、もしくは食道がんが存在することを示すので、被検者の生物学的サンプルにおいてアネキシンタンパク質に対する抗体の免疫特異的な結合を検出すること、からなる、

肺がん、乳がん、もしくは食道がん患者の自己抗体の存在の検出方法。

【請求項 7】

被検者の生物学的サンプル中の自己抗体検出の段階に、被検者の生物学的サンプル中に存在する抗体に結合する標識2次抗体を使用することからなる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) 1以上のアネキシンタンパク質を膜あるいは基質の上に固定し、

(b) その膜あるいは基質を被検者の生物学的サンプルと接触させ、そして

(c) 自己抗体の存在が肺がん、乳がん、もしくは食道がんの存在を示すので、被検者の生物学的サンプル中の1以上のアネキシンタンパク質に特異的な自己抗体の存在を検出すること、からなる免疫検出法によって生物学的サンプル中の自己抗体の存在を測定する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

がんが肺がんである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

生物学的サンプル中のアネキシンI及びアネキシンIIから選択されるアネキシンタンパク質の存在を検出するための抗アネキシン抗体を含む、被検者における肺がん、乳がん、もしくは食道がんの診断及び予後診断のためのキット。

【請求項 11】

抗アネキシン抗体が標識されている、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

標識が放射能、蛍光、カロリメーターまたは酵素標識である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

免疫特異的に抗アネキシン抗体に結合する標識2次抗体をさらに含む請求項 10 に記載のキット。

【請求項 14】

サンプル中のアネキシンI又はアネキシンIIの自己抗体の存在を検出するためのアネキシンI又はアネキシンIIタンパク質を含む、被検者の肺がん、乳がん、もしくは食道がんの診断及び予後診断のためのキット。

【請求項 15】

アネキシンI又はアネキシンIIタンパク質が標識されている請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

アネキシンI又はアネキシンIIタンパク質が固相に固定されている請求項 14 に記載のキット。

【請求項 17】

アネキシンI抗原又はアネキシンII抗原に結合するアネキシンI又はアネキシンIIの自己抗体の検出のためのアネキシンI又はアネキシンIIタンパク質をさらに含む請求項 14 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、被検者の血清中に存在する特異なアネキシンタンパク質抗原に対する血清自己抗体の存在を検出することによって、被検者におけるがんの診断、予後あるいはがんに対する罹患性についてスクリーニングする方法に関するものである。また、本発明は、被検者から得た生物学的サンプル中のアネキシンタンパク質発現程度の増加を検出することに

10

20

30

40

50

より、被検者におけるがんの診断及び予後をスクリーニングする方法を提供する。本発明の方法は、がんになるリスクを持つ被検者を発見するために使用することもできる。本発明の方法は、アネキシンタンパク質発現またはアネキシン由来ペプチドまたは抗原の発現の存在とそのレベル、及び/または循環する特異アネキシンタンパク質抗原に対する自己抗体の存在とそのレベル、を測定するための被検者由来生物学的サンプルの使用を含んでいる。さらに、本発明は上記スクリーニング方法を実施するためのキットを提供する。そのキットはアネキシンタンパク質の上昇したレベルについて被検者をスクリーニングするために使用することができ、あるいはがんの診断、予測または予後の指標としてアネキシンタンパク質に対する自己抗体の検出のために使用することができる。本発明は、アネキシンタンパク質のレベルの上昇、及びアネキシンタンパク質に反応する循環自己抗体レベルの上昇が被検者の血清中に認められた実例によって示されている。

10

## 【0002】

(背景技術)

種々のがん患者の体液中に、多数の細胞性タンパク質が増加して存在することが示されている。がん患者においてそのようなタンパク質のレベル上昇は、がんに対する診断及び予後判定のためのアッセイに使用し得る。例えば、前立腺特異抗原 (PSA) の上昇した血清レベルは、しばしばヒト前立腺がん存在の指標として使用されている。

## 【0003】

自己免疫疾患及び心血管系疾患のような病気では、場合によっては疾患が明らかな症状を示す以前に、正常または修飾された細胞性タンパク質に対する自己抗体が患者により生産されていることが知られている。種々のがん患者において多くの細胞内及び表面抗原に対する抗体の同定に示されるように、ヒトにおけるがんに対する液性免疫応答の証拠が増えている (Gourevitch et al., 1995, Br.J.Cancer 72:934-938; Yamamoto et al., 1996, Int.J.Cancer, 69:283-289; Stockert et al., 1998, J.Exp.Med. 187:1349-1354; Gure et al., 1998, Cancer Res. 58:1034-1041)。例えば、体細胞のp53遺伝子の変化は、影響を受けた患者の30-40%に液性応答を引き起こす (Soussi, 1996, Immunol.Today 17:354-356)。ある例では、抗p53抗体の検出はがんの診断に先行する (Lubin et al., 1995, Nat.Med. 7:701-702; Cawley et al., 1998, Gastroenterology 115:19-27)。United States Patent No. 5,405,749は、がんによる網膜疾患自己抗原のスクリーニング法及び自己抗原に対する自己抗体に関する患者血清の試験方法を公開している。さらに、腫瘍細胞骨格タンパク質の相対的合成速度の増加が、白血病細胞の表面及び変異原及びEpstein-Barrウイルスにより形質転換したリンパ球の表面において観察された (Bachvaroff, R.J. et al., 1980, Proc.Natl Acad. Sci. 77:4979-4983)。

20

30

## 【0004】

確認され、液性応答を引き起こすがん由来の抗原のほとんどは、変異遺伝子の産物ではない。種々の抗原及び腫瘍に過剰発現している遺伝子産物を含んでいる (Old and Chen, 1998, J.Exp.Med. 187:1163-1167)。何故あるタイプの腫瘍患者の一部のみが個別抗原に対して液性応答をするのか明らかではない。免疫応答に影響を与える因子には主要組織適合複合体分子の個体間のばらつきが含まれるであろう。タンパク質が、翻訳後の修飾、類似の腫瘍の間でも違いがありうる過程、を経た後に免疫原になる可能性もある。

40

## 【0005】

肺がんは米国では最も多いがんであり、米国におけるがんによる死亡の4分の1以上 (28%) を占めている (Travis et al., 1996, Cancer 77:2464-2470)。c-myc増幅、Ki-rasまたはp53変異などの多くの分子変化は腫瘍の反応に影響を及ぼすことを明らかにした (Mao et al., 1994, Cancer Res 54:1634-1637, Mills et al., 1995, J.Natl.Cancer Inst. 87:1056-1060, Gao et al., 1997, Carcinogenesis 18:473-478)。c-myc (Ben-Mahres et al., 1990, Int.J.Cancer 46:35-38), c-myb (Sorokine et al., 1991, Int.J.Cancer 47:665-669), c-erbB-2 (Pupa et al., 1993, Cancer Res 53:5864-5866), ras (Takahashi et al., 1995, Clin. Cancer 1:107)及びp53 (Peyrat et al., 1995, Lancet 345:621-622; Iizasa et al., 1998, Cancer Immunol.Immunother. 46:345-349) のような、が

50

ん遺伝子及びがん抑制遺伝子産物に対する血清自己抗体は種々の悪性疾患患者について報告されている。L-mycがん遺伝子産物に対する自己抗体は肺がん患者の10%の血清で報告されている (Yamamoto et al., 1996, Int.J.Cancer 69:283-289)。また、p53に対する血清自己抗体は非小細胞性肺がん患者 (NSCLC) の血清に検出されている (Iizasa et al., 1998, Cancer Immunol. Immunother. 46:345-349)。抗p53自己抗体の血清力価上昇がNSCLC患者の約20%に存在したし、またこの自己抗体の存在はp53変異及び p53過剰発現を反映している (Yamamoto et al., 1996, Int.J.Cancer 69:283-289)。

#### 【 0 0 0 6 】

細胞抗原に対する自己抗体の検出及び自己抗体を誘導するタンパク質の同定は種々の方法を用いて実施されてきた。例えば、増殖性細胞核抗原 (PCNA) は、最初紅斑性ろうそう患者から得られた核抗原に結合する抗体として記述された (Miyachi, K., Fritzler, M.J. and Tan, E.M., 1978, J. Immunol 121:2228-2234)。次いで、核染色で示される分裂促進因子で刺激されたリンパ球とは逆に、休止リンパ球は抗体と反応しないことが観察された。このことが結局、紅斑性ろうそうにおいてこの自己抗体によって認識された、PCNAと呼ばれるタンパク質の同定につながる (Tan, E.M., Ogata, K, and Takasaki, Y., 1987, J. Rheumatol., 13:89-96)。その他の例としては、p53の研究で行われたように、候補タンパク質を単離し、そして患者において抗体を誘導することができるかどうかを検討した (Crawford, L.V., Firm, D.C., Bulbrook, R.D., 1984, Int.J.Cancer 30:403-408)。更にSEREXと呼ばれる技術は腫瘍抗原を同定するための組換えcDNA発現ライブラリーの血清学的解析による。(Old, L, ら. 1998, J. Exp. Med. 187:1163-1167)。このように、多くの研究に追従し、それに拮抗して自己抗体が産生される可能性のあるタンパクが探索されている。

#### 【 0 0 0 7 】

アネキシンは高度に進化した及び進化していない真核生物の異なる組織と細胞型に偏在して発現するカルシウム依存性リン脂質結合タンパクの族である (Benz, J. and Hofmann, A., 1997, Biol.Chem 378:177-183)。少なくとも12種のアネキシタンパクが同定されている。アネキシン族のタンパクに対して示唆されている多くの役割の中で、制御されたエクソサイトーシスに参与するタンパクに影響を与えるという可能性が高い (Donnelly, SR and Moss SE, Cell, 1997, Mol. Life Sci. 53:533-538)。典型的なアネキシタンパクは二つの異なる特徴をもっている。(i) リン脂質に対するCa<sup>2+</sup>依存性結合、及び(ii) その族の既知の物質の中で4回あるいは8回繰り返される約70種の保存されたアミノ酸の配列単位の存在。アネキシンの免疫細胞化学的研究によってそれらはカルシウムをキレート化する細胞内オルガネラの近傍の、原形質膜のすぐ近くに存在することが示されている (Gerke, V and Moss, SE, 1997, Biochimica et Biophysica Acta 1357:129-154)。アネキシンに関連した物理的性質にはフォスホリパーゼA<sub>2</sub>、抗凝固活性、細胞骨格タンパクに対する結合、細胞膜と小胞の集合およびカルシウム選択性チャンネル活性の阻害がある。多発性硬化症及び実験的神経炎を含む多くの疾患に関連してアネキシンの濃度の増加が認められてきた。

#### 【 0 0 0 8 】

(発明の開示)

被験者の生体標本中アネキシン自己抗体濃度の上昇を検出することによって、癌の診断及び予後判定の評価、癌の素因を持つ被験者の識別、及び癌治療を受けている患者のモニタリングに対するスクリーニング法を提供することが本発明の目的である。本発明はまた癌の診断上のもしくは予後判定の指標としてアネキシタンパクの過剰産生及び/もしくはアネキシタンパク群の過剰産生を検出する方法を提供する。

#### 【 0 0 0 9 】

本発明は癌もしくは前癌病変のある被験者の血清中アネキシタンパク抗原に対する自己抗体を検出することによる癌の診断上の評価及び予後判定に関連する。アネキシタンパクに対する自己抗体の血清中濃度の増加を確認することにより癌のスクリーニング、診断及び予後のための新しい方法を構築する。

#### 【 0 0 1 0 】

本発明はアネキシタンパク抗原に対する血清自己抗体の存在を確認するために計画された免疫検定法におけるアネキシタンパク抗原の利用法を提供する。このような免疫検定は癌の診断及び予後に利用することが可能である。本発明によって、被験者の血清中アネキシタン自己抗体濃度の測定は癌の早期診断に用いることができる。さらに、血清自己抗体濃度のモニタリングは疾患の進行を段階づけるために予後的に利用することが可能である。

【0011】

本発明はさらに被験者の標本中アネキシタンパク濃度を測定するために開発された検定法に関連する。このような検定法にはアネキシタンパクが抗アネキシタン特異性抗体との相互作用によって検出される免疫検定法がある。例えば、アネキシタン抗体もしくは抗体の断片が被験者の標本中アネキシタンパクの存在及び含有量を量的に確認するために利用される可能性がある。

10

【0012】

本発明はまたアネキシタンパク抗原の発現レベルの増加を特徴とする疾患をもつ患者を免疫する抗原としてのアネキシタンパクの利用法に関連している。このような抗原に対する免疫学的反応を刺激することによって、とりわけ腫瘍細胞の成長を阻害もしくは腫瘍細胞の死滅を促進するような、腫瘍細胞に対する更に効果的な攻撃を誘発することを意図している。個々の癌に関連するアネキシタンパク抗原に対する自己抗体の同定によって疾患の免疫療法の基礎が得られる。

20

【0013】

本発明は更に癌もしくは癌発生の素因をもつ患者を診断するための臨床的装置に都合よく利用できるパック入りの診断用キットを提供する。そのキットはまた癌の治療に用いられる薬剤の有効性をモニターするために利用することが可能である。本発明の具体例として、そのキットには標本中のアネキシタン抗原に対する自己抗体濃度の確認及び/もしくは測定用の成分が含まれる。第二の具体例として本発明のキットには生体標本中のアネキシタン抗原を検出及び/もしくは測定する成分が含まれる。

【0014】

本発明は肺腺癌もしくは肺扁平上皮細胞癌の被験者から採取された腫瘍組織標本中でアネキシタンI及びIIの発現レベルが増加するという発見に基づいている。更に、肺腺癌及び扁平上皮細胞癌の被験者の血清中においてアネキシタンI及びIIに拮抗する自己抗体の増加が認められた。癌の被験者から採取された標本中においてアネキシタンパク及びアネキシタン自己抗体の濃度が増加するという結果によって、癌の様々な治療法の有効性をモニタリングする方法と同様に診断及び予後判定法の開発の基礎が得られる。

30

【0015】

(発明を実施するための最良の態様)

本発明は非常に望ましい目的、すなわち癌の被験者の診断上の及び予後判定の評価法を提供すること、また癌発生の素因を示す被験者の識別法を提供すること、を達成する。本発明の検定法には、被験者の血清もしくは他の生体標本中のアネキシタンパク産生のレベルの上昇、あるいはアネキシタン自己抗体の存在を確認するために計画された方法が含まれる。本発明の目的のために、アネキシタンパクは一続きの約70のアミノ酸が少なくとも4回繰り返されている標準的なモチーフが特徴である(Wallner, B.P. ら1986, Nature 320: 77-80; Weber, K. 及び Johnson, N., 1986, FEBS Lett. 203:95-98; Saris, C.J.M. ら1986, Cell 46:201-212; Huang K.S. ら1986, Cell 46:191-199)。

40

【0016】

特に、本発明には次の事柄を含む被験者の癌の診断及び予後判定の方法が含まれる。

(a) 被験者から採取された生体標本中のアネキシタンパクの定量的測定、および

(b) 被験者の標本中に検出されたタンパク濃度を対照標本中に検出されたタンパク濃度と比較すること。

ここでは対照の検体と比較した時、被験者の標本中に検出されたアネキシタンパク濃度の上昇が癌のもしくは癌の危険性の増大した被験者の指標である。アネキシタンパクの

50

検出に加えて、アネキシン誘導ペプチド、抗原もしくは特異的に修飾されたアネキシンタンパクを癌の診断及び/もしくは予後判定のために測定してもよい。

【0017】

アネキシンタンパクを含有する可能性のある広範囲の種類タンパク混合物を調製しタンパク発現のレベルを測定してもよい。好ましい具体例として、癌の疑いのある被験者もしくは癌の素因のある被験者の標本が、肺組織標本に限るわけではないが、アネキシンタンパク産生のレベルの上昇をスクリーニングするために用いられる可能性がある。

【0018】

本発明には次のような癌の被験者の診断及び予後判定のための方法が含まれる。

(a) 免疫特異性抗原抗体結合反応がおこる可能性のある条件下で被験者から採取した抗体を含有する生体標本をアネキシンタンパク抗原を含有する標本に接触させること、および

(b) アネキシンタンパクに対する被験者の生体標本中に存在する自己抗体の免疫特異性結合の存在を確認すること。

ここでは自己抗体の免疫特異性結合の存在が被験者の癌の存在を示す。

【0019】

本発明の特定の具体例として、アネキシンタンパクは、アネキシンIとIIおよびそれらから誘導されたペプチドに限ったことではないが、感受性の高いまた急速な免疫吸着検定法あるいは他の方法によって、このようなタンパク抗原に対する循環自己抗体の存在について被験者の血清をスクリーニングするために精製され利用される。

【0020】

本発明はまた上記の方法を実施するためのキットを提供する。例えば、その方法は抗アネキシン抗体のようなアネキシンタンパクを検出するための少なくとも一種の試薬を含むパック入りの診断用キットを利用することによって実施できる。標本を採取した被験者のアネキシン自己抗体の検出のために診断用キットはアネキシンタンパクもしくは抗原タンパク断片のどちらかを含有する。

【0021】

本発明はアネキシンI及びIIタンパク濃度が癌の被験者から採取された肺腺癌および肺扁平上皮癌で増加するという発見に基づいている。さらに、アネキシンタンパクに拮抗して反応する循環自己抗体濃度の増加が肺腺癌及び肺扁平上皮細胞癌の被験者の血清中に認められた。

【0022】

#### 5.1. アネキシン産生の検出のための検定法

本発明のように、被験者から採取された標本中のアネキシンタンパク濃度の測定を癌のような疾患の早期診断に利用することができる。さらに、アネキシンタンパク濃度のモニタリング及び定量はその疾患の進行を段階づけるために、また癌患者の治療のために用いられる薬剤の有効性を評価するために予後的に利用できる。

【0023】

被験者から採取された標本中のアネキシンタンパクの検出は多くの方法のいずれかによって実施することが可能である。被験者の生体標本中のアネキシンタンパクの検出のための好ましい診断法には、たとえば、アネキシンタンパクがアネキシン特異性抗体との相互作用によって検出される免疫検定法がある。本発明に有用な抗体はアネキシンもしくはそのアネキシン断片の存在を定量的にあるいは定性的に検出するために用いることができる。さらに、例えばアネキシンタンパクに特異的に結合するポリペプチドのような、抗体以外の試薬がアネキシンタンパク発現のレベルを測定するための検定法に利用することが可能である。いずれかの方法で、アネキシンタンパクの検出は、例えば、フォスフォリパーゼA、及び抗凝固活性のようなアネキシンタンパクに関連した生物学的性質のレベルを検出及び測定することによって行なうことが可能である。

【0024】

本発明の実施に有用な免疫検定法には、ウェスタンブロット法のような手法をもちいた検

10

20

30

40

50

定システムに限ったことではなく、少数例をあげればラジオイムノアッセイ、ELISA(免疫吸着検定に関連した酵素)、「サンドイッチ」免疫検定法、免疫沈降検定法、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散検定法、凝集検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、タンパクA免疫検定法がある。

【0025】

肺組織もしくは他の生体組織のような、アネキシンタンパクを含有する可能性のある生体標本は個々の癌もしくは癌の危険性をもった疑いのある被験者から採取する。全体の組織あるいは細胞の部分標本は専門家には周知のいろいろ異なった反応混液のいずれか一種類を用いて可溶化する。例えば、組織は脱イオン水で希釈した(1リットル当たり)8M尿素、20ml Nonidet P-40界面活性剤、20ml両性電解質(pH 3.5-10)、20ml 2-メルカプトエタノール、及び0.2mMフェニルメチルスルフォニルフルオライド(PMSF)を含有する溶解緩衝液の追加により可溶化することができる。

10

【0026】

アネキシンタンパクの発現を検出するための免疫検定法には代表的なものとして、免疫特異性抗原抗体結合反応が起こる可能性のあるような条件下で抗アネキシン抗体を用いて被験者から採取された組織標本のような生体標本への接触、および抗体による免疫特異性結合量の検出あるいは測定が含まれる。特定の側面としては、例えば、抗体のこのような結合はアネキシンタンパク産生の増加が罹患の指標である場合に、アネキシンタンパク産生の存在及び増加を確認するために利用できる。生体標本中のアネキシンタンパク濃度は同年令及び同性の正常な個体と癌のないもしくは前癌状態の様々な被験者に対して設けられた基準値と比較する。

20

【0027】

本発明の具体例として、組織抽出液のような生体標本を標本内のあらゆるタンパクを固定化する目的で、ニトロセルロースのような固相支持物質に接触させる。その後支持物質は適当な緩衝液で洗浄し、続いて検出できるようにラベルされたアネキシン特異性抗体で処理する。固相支持物質はその後結合していない抗体を除去するために緩衝液で2回洗浄する。固相の支持物質に結合した抗体量はその後周知の方法に従って測定する。専門家であれば日常の実験法を用いて個々の測定のための任意の検定条件を設定できるであろう。

【0028】

アネキシンタンパクが検出できるようにラベルすることが可能な一つの方法は、酵素免疫検定法(EIA)に用いられる方法のように、酵素に抗体が結合することによる(Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)" 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7 Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller, A.R 1978, J.Clin.Pathol. 31:507-520; Butler, J.E., 1981, Meth.Enzymol.73:482-523)。抗体に結合した酵素は、例えば分光光度計、蛍光計または視覚的手段によって検出できる化学成分を産出するような方法で、おそらく色素産生性の基質である適当な基質に反応する。抗体を検出できるように標識するために用いることができる酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含むが、それに限定されるものではない。検出は、酵素に対する発色基質を採用する比色法によっても行うことができる。

30

【0029】

アネキシン抗体の検出は、他のさまざまな方法によっても行うことができる。例えば、抗体または抗体のフラグメントを放射性物質で標識することにより、放射免疫測定法(RIA)を用いてアネキシン蛋白の発現を検出することが可能である(例えば、Weintraub, B. Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March 1986参照)。放射性同位体は、計数器またはシンチレーション計数器を用いるような方法もしくはオートラジオグラフィによって検出することができる。

40

【0030】

抗体は蛍光性化合物でも標識することができる。このうち最もよく用いられる蛍光性標識化合物は、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリンおよび

50

フルオレサミンである。同様に、生物発光化合物も、アネキシン抗体の標識に用いられる。生物発光蛋白の有無は、発光の有無を検出することにより測定できる。標識を目的とした重要な生物発光化合物には、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンがある。

#### 【0031】

本発明の特有の具体的实例として、生物学的試料中のアネキシン蛋白の濃度を、二次元ゲル電気泳動により分析することができる。二次元ゲル電気泳動の方法は、技術に熟練を要することが知られている。組織試料のような生物学的試料を、一次元目において、電荷に基き蛋白を分離する等電点電気泳動による分離を行うために電気泳動ゲルに添加する。多数の一次元目ゲル調製品が利用できるが、それには両性担体に基く分離のためのチューブゲルまたは固定化勾配に基く分離のためのゲルストリップなどがある。一次元目の分離の後、蛋白を二次元目のゲルに移し、平衡化处理を行った後、分子量に基き蛋白を分離するSDS PAGEを用いて分離を行う。異なる被験者由来の生物学的試料を比較するときは、複数のゲルを個々の生物学的試料（正常コントロールからの試料を含む）から調製する。

10

#### 【0032】

分離後、蛋白を二次元ゲルから一般にウエスタンプロッキングに用いるメンブレン上に移す。ウエスタンプロッキングおよびその後の蛋白視覚化の手法も、良く知られた技術である（Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" 2<sup>nd</sup> Edition, Volume 3, 1989, Cold Spring Harbor）。標準的な手順を用いるか、もしくはその手順が特定のタイプの蛋白、例えば高度に塩基性または酸性、または脂溶性などのタイプを同定する技術において知られているような変更を加えることができる（例えば、Ausubel et al., 1999年、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons Inc., N.Y. 参照）。アネキシン蛋白に結合する抗体を、インキュベーションの段階で、ウエスタンプロット分析の手法に従って利用する。一次抗体に特異的な二次抗体をウエスタンプロット分析の手法で利用して、一次抗体と反応した蛋白を視覚化する。

20

#### 【0033】

生物学的試料中のアネキシン蛋白濃度の測定は、治療中に用いた抗癌剤の有効性の可能性をモニターするために用いることもできる。例えば、アネキシン蛋白産生レベルは、治療前および治療中に測定することができる。薬剤の有効性は、治療期間全体にわたりアネキシンの発現量を比較することにより追跡できる。効果を発現する薬剤は、その薬剤を用いた治療が進行するにつれて、アネキシン蛋白産生レベルを低下させる薬剤である。

30

#### 【0034】

本発明は、例として、肺腺癌および扁平上皮細胞肺癌に罹患した患者由来の組織試料中でアネキシン蛋白濃度の上昇が検出されたところで立証されている。特に、アネキシンIおよびIIの濃度の上昇は、肺癌患者由来の試料中で検出された。生物学的試料中のアネキシン蛋白の検出および/または定量法は、アネキシン蛋白が過剰発現するある種の癌または他の増殖性疾患を発現するリスクがある被験者のスクリーニングに用いることができる。さらに、蛋白のアネキシンファミリーの異なるメンバーの血清または生物学的液体中に生じるパターンの定量的差を、癌または癌のリスクのスクリーニング、診断または予後の指標として利用することができる。

40

#### 【0035】

##### 5.2 抗アネキシン自己抗体検出のための測定法

本発明は、被験者の体内に循環しているアネキシン自己抗体の検出に基き癌のような疾患の診断および予測法を提供する。本法は、癌を有する被験者ならびに年齢と性別をマッチさせた癌のないコントロールから得た生物学的試料を用いることにより確認されている。自己抗体が含まれている可能性がある生物学的試料、例えば血清などを、特定の癌が疑われる被験者または癌を発現する素因があることが疑われる被験者から採取する。同じ体液を、癌のないコントロールの被験者から採取する。

#### 【0036】

本発明に従って、アネキシン蛋白抗体に対して反応する自己抗体の測定を、癌のような疾患の早期診断に用いることができる。さらに、自己抗体レベルのモニタリングは、疾患進

50



行の段階を予測するのに用いることができる。患者の血清試料中の自己抗体は、多くの方法により検出することができる。このような方法には、ほんの一例として、ウエスタンブロット、放射免疫測定法、ELISA（酵素免疫測定法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降測定法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散測定法、凝集測定法、補体結合測定法、免疫放射定量測定法、蛍光免疫測定法、蛋白A免疫測定法などのような技術を用いたアッセイシステムが挙げられるが、これに限定されるものではない。

#### 【0037】

このような免疫測定法は、免疫特異性抗原 - 抗体結合反応が生じ、自己抗体による免疫特異性結合の検出または定量を行うことができるという条件下で、アネキシン蛋白抗原含有試料の被験者由来の血清試料と接触させる方法により行う。特異的な面において、このよ

10

#### 【0038】

免疫測定法は、種々の方法で行うことができる。このような測定を行うひとつの方法には、例えば、アネキシン蛋白を固体の支持体に固定し、そこに特異的に結合する抗アネキシン抗体を検出する方法などがある。本発明の測定法で利用されるアネキシン蛋白は、よく知られた技術である遺伝子組換えDNA技術により調製することができる。例えば、アネキシン蛋白またはその抗原フラグメントをコードするDNA分子を、遺伝子工学を用いて適切

20

#### 【0039】

本発明は、例として、癌患者の血清中で検出されるいくつかのアネキシン蛋白抗原に対し

30

#### 【0040】

##### 5.3 免疫療法

本発明は、アネキシン蛋白抗原の産生を特徴とする疾患に罹患した患者を免疫する抗原としてのアネキシン蛋白の利用とも関連している。このような抗原に対して免疫学的反応を刺激することは、腫瘍細胞により効果的な攻撃を惹起すること、とりわけ腫瘍細胞増殖阻害、または腫瘍細胞死滅促進のような攻撃を惹起することを意図している。特定の癌と関連するアネキシン蛋白抗原に対する自己抗体を同定することは、疾患の免疫療法の根拠となる。

40

#### 【0041】

患者は、アネキシン蛋白抗原で免疫されて、腫瘍細胞死滅促進または腫瘍細胞増殖阻害のような免疫反応が惹起される。アネキシン蛋白抗原は、上述の蛋白精製法を用いて調製することができる。

#### 【0042】

本発明の具体化において、自己抗体を発現した癌を有する患者に対する精製アネキシン蛋白抗原を構成する免疫原を、免疫反応を惹起するために用いる。投与については、蛋白抗原に対する免疫反応を増大させるために、アネキシン蛋白抗原は適切なアジュバントを用

50

いて製剤化しなければならない。適切なアジュバントには、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチン、プルロン酸ポリオール、多価陰イオン、ペプチド、油乳剤のような界面活性物質があり、BCG (bacilli Calmett-Guerin) および (Corynebacterium parvum) のように有用なヒトアジュバントとなり得るものが含まれるが、これに限定されるものではない。上記由来の製剤を投与するために多くの方法を用いることができ、こうした方法には経口、経皮、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下投与などが含まれるが、これに限定されるものではない。

【 0 0 4 3 】

#### 5 . 4 キット

本発明は、さらに上述の測定法を実施するためのキットもある。本稿で述べる測定法は、例えば、少なくともアネキシンペプチド (アネキシン自己抗体検出用)、またはアネキシン抗体試薬 (アネキシン蛋白検出用) からなる予めパッケージ化された診断キットを用いることにより実施することができ、これは、例えば臨床において癌のような疾患を診断するために、便利に使用することができる。

【 0 0 4 4 】

これに限定されるものではないが、具体化の第一シリーズとして、本発明によるキットは、アネキシン抗原を指向するヒトIgG抗体を検出および/または測定するための成分からなる。1例として、抗体が酵素免疫測定法 (ELISA) により検出および/または測定される場所では、このような成分は標的抗原からなり、少なくともひとつ、できれば多数の異なるアネキシン抗原またはそのエピトープの形をしており、固相と結合しており、標的抗原と結合するヒト抗体を検出するための手段である。このような検出手段は、例えば、ヒトIgGの不変の領域を指向する抗体 (例えば、ウサギ抗ヒトIgG抗体) であり、これ自身を検出できるよう標識する (例えば放射能、蛍光、色または酵素の標識) か、もしくは標識した二次抗体により検出することができる (例えば、ヤギ抗ウサギ抗体)。

【 0 0 4 5 】

これに限定されるものではないが、具体化の第二シリーズとして、本発明によるキットは、被験者の生物学的試料中のアネキシン抗原を検出および/または測定する成分からなる。例えば、アネキシン蛋白を酵素結合免疫測定法 (ELISA) により検出および/または測定する場所では、このような成分はアネキシン蛋白のエピトープを指向する抗体からなり、これは生物学的試料中のアネキシン発現レベルを検出および/または定量するために用いることができる。抗体自身は、検出できるよう放射能、蛍光、色または酵素の標識で標識することができる。あるいは、キットに標識された二次抗体を含めることもできる。

【 0 0 4 6 】

6 . 例 : アネキシン (ANNEXIN) 蛋白質に特異的な自己抗体の検出および癌患者からのサンプルにおけるアネキシン蛋白質発現のレベルの増大

本発明の方法を用い、癌患者から得た血清をアネキシン蛋白質についてスクリーニングした。

癌患者からの血清サンプルはアネキシン蛋白質に対して反応性であることが判明した。加えて、癌患者からの組織サンプル中にアネキシン蛋白質産生のレベルが増大していることが判明した。

【 0 0 4 7 】

#### 6 . 1 . 材料および方法

##### 6 . 1 . 1 . 試薬

ダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM, L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウムおよびピリドキシンヒドロクロリドを含む)、ダルベッコのリン酸緩衝塩類液 (PBS)、子牛胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンを含む全ての細胞培養試薬はGIBCO-O-BRL (グランド アイランド、N.Y.) から得た。マウスモノクロナル抗アネキシンIおよびII抗体はICN (コスタメサ、C.A.) から得た。マウスモノクロナル抗ヒトIgM抗体はシグマケミカル社 (St. Louis, MO) から購入した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合マウス抗ヒトIgG1, IgG2, Ig

10

20

30

40

50

G3およびIgG4抗体はZymed社(サンフランシスコ、CA)から購入した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合羊抗ヒトIgGおよび抗マウスIgGモノクロナル抗体、ECL(Enhanced Chemiluminescence)キットおよびハイパーフィルム(Hyperfilm)MPはアメルシャム(アーリントンハイッツ、IL)から得た。イモビロン(Immobilon)-P PVDF(ポリビニリデンフルオライド)膜はミリポア社(ベッドフォード、Mass)から購入した。第一次元電気泳動に用いるアクリルアミド、尿素、アンモニウムパーサルフェイトおよびPDA(ピペラジンアクリルアミド)は全てバイオラッド(Bio-Rad)(ロックビルセンター、N.Y.)から購入した。第二次元電気泳動で用いるアクリルアミドはセルバ(Serva)社(クレッセントケミカル、ハウボウグ、N.Y.)から購入した。キャリアアンホライト(ampholyte)(pH4-8)およびNP-40は両方ともガラード(Gallard)/シュレジンガー(Schlessinger)社(カールプレイス、N.Y.)から購入した。その他の全ての試薬および薬品はフィッシャーまたはシグマ社のいずれかから得、得られうる最高純度のものであった。

#### 【0048】

##### 6.1.2. 細胞培養および抽出液の調製

A549ヒトアデノカルチノーマ細胞系を、6%CO<sub>2</sub>加湿インキュベータ中、10%子牛胎児血清、100U/mlペニシリンペニシリンおよび100U/mlストレプトマイシンを加えたDMEM中で37°Cで培養した。細胞は70-80%の集合となった後、毎週継代培養した。

#### 【0049】

新しい腫瘍組織は肺癌患者から診断時に(すなわち、バイオプシー組織)採取した。実験プロトコールはヒト患者を含む認可研究についてのミシガン大学協会検討委員会によって認可された。インフォームドコンセントは研究前に患者(またはその家族)から得た。腫瘍組織は摘出後直ちに-80°Cに凍結し、その後少量の腫瘍組織を可溶化緩衝液中で可溶化し、使用するまで-80°Cに保存した。培養細胞を、8M尿素、2%NP-40、2%キャリアアンホライト(pH4-8)、2%メカプトエタノールおよび10mM PMSFからなる200μlの可溶化緩衝液を添加して溶解し、細胞スクレイパーを用いて採取した。さらに100μlの可溶化緩衝液を加えた後、細胞抽出液を含む溶液をマイクロフュージチューブに移し、使用するまで-80°Cに保存した。

#### 【0050】

##### 6.1.3.2-D PAGEおよびウエスタンブロットティング

培養細胞または固形腫瘍の両方の抽出液から得た蛋白質を、先に述べたように若干修飾して、次元別に分離した(ストララー他、1989、蛋白質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動、「Protein Structure: A Practical Approach」T.E.クレイトン(ed.)IRL出版、オックスフォード、U.K., pp65-92)。簡潔に言えば、可溶化緩衝液中における細胞溶解に次いで、およそ2.5×10<sup>6</sup>細胞から得た培養細胞または可溶化腫瘍組織の35μlアリコットを等電点電気泳動ゲル上に置く。pH4-8キャリアアンホライトを用いて、700Vで16時間、次いで1000Vでさらに2時間、等電点電気泳動を行った。

#### 【0051】

第一次元のチューブゲルを、第二次元のサンプル緩衝液(10%グリセロール、2%SDS、1%ジチオスレイトールおよびプロモフェノールブルーを含有する、125mM Tris(pH6.8))において平衡後、第二次元ゲルを含むカセットに加えた。第二次元の分離には、11%-14%のアクリルアミド勾配を用い、色素の前面がゲルの反対側に到達するまでサンプルを電気泳動にかけた。分離した蛋白質をイモビロン-P PVDF膜に移した。ゲル中の蛋白質のパターンは銀染色により、イモビロン-P膜に関しては、膜のクーマッシーブルー染色により、視覚化した。

#### 【0052】

ハイブリダイゼーションのために調製したきれいな膜はブロッキング緩衝液(1.8%の

10

20

30

40

50

脱脂ドライミルクおよび0.1%トウイーン20を含むTris緩衝塩類液(TBS)を包含する)で2時間インキュベートし、次いで、洗浄し、そして患者から得た血清、または正常な対照血清(300 $\mu$ lの血清、1:100希釈)のいずれかと室温で1時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液で3回洗浄した後、膜をセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合羊抗ヒトIgG抗体(1:1000希釈で)と室温で30分間インキュベートした。膜を0.1%トウイーン20を含有するTBSで5回洗浄し、TBS中で一度、ECL中で暫時インキュベートし、hyperfilm(登録商標)に10-30分間曝した。患者血清とハイブリダイゼーション後、視覚化したパターンを、蛋白質との関係を測定するため、同じサンプルからのクーマッシュブルー染色プロット、ならびに自己抗原の特異性を測定するため、対照血清または他の固形腫瘍を有する患者からの血清について同じサンプルから得たプロットのハイブリダイゼーションから得たパターンの両方と、直接比較した。別途に、膜を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合羊抗ヒトIgM抗体とインキュベートし、抗ヒトIgG抗体とのインキュベーションと同様に処理した。

10

### 【0053】

患者血清では視覚化されたが、対照血清では視覚化されなかった肺アデノカルチノーマ細胞系の溶解物および腫瘍の両方における蛋白質スポットをさらに特徴づけた。A549細胞溶解物を2-D PAGEにかけ、その後、分離した蛋白質をイモビロノンP膜に移し、次いでクーマッシュブルーで染色した。興味ある蛋白質スポット膜から削り取り、N-末端アミノ酸配列決定および質量分析にかけた。得られた配列およびペプチド質量は蛋白質同定のためのデータベースサーチに用いた。

20

### 【0054】

#### 6.1.4 免疫プロット法によるアネキシン(Annexin)I及びIIの検出

2つの抗体、抗-アネキシン(Annexin)I及びIIモノクローナル抗体を用いた。これらの一次抗体は免疫プロットアッセイにおいて、1:5000に希釈して使用し、患者の血清をインキュベートしたものを処理した。

### 【0055】

#### 6.2 結果

#### 6.2.1 ウェスタンブロット分析によって検出された、肺癌蛋白質を有する肺癌患者の血清の反応性

A549細胞蛋白質を2-D PAGEによって分離し、インモビロノン-P(Immobilon-P) PVDF膜の上に移した。ウェスタンブロット分析のために、各々の膜は1つの血清サンプルで処理した。血清を含むサンプルは、肺腺癌の患者18人、扁平上皮細胞肺癌の患者11人、小細胞肺癌の患者4人、大細胞肺癌の患者2人、分類されていない肺癌の患者19人;その他の癌患者37人(乳癌11人、黒色腫瘍7人、肝臓癌11人及び食道癌8人)の診断時に入手し、また、以前に癌又は自己免疫疾患の病歴のない、健康な被験者15人からも入手した。

30

### 【0056】

銀で着色した、A549の2-Dゲルの見本が図1に示されている。一次抗体としての患者の血清と、二次抗体としての羊抗-ヒトIgGとを用いた、膜のハイブリダイゼーションは、肺癌患者の血清中で様々な反応パターンを示した。同一のハイブリダイゼーションを繰り返したところ、同様のパターンが結果として得られた。総体的に、いくつかの反応性スポットが、ほとんどの血清で観察された。反応性スポットのいくつかは、コントロールの血清でも観察され、従って、これらは非特異的反応性を示すものであると考えられた。その他のスポットは、肺癌患者の血清に限定された。後者の中で最も注目できるものは、A1で示されている、隣接する蛋白質のスポットのグループにおける強烈な反応性であり、pIが6.3~6.8、分子量が37kDaのものであって(図2)、18人の肺腺癌患者のうちの8人、11人の扁平上皮細胞肺癌患者のうちの4人、4人の小細胞肺癌患者のうちの1人及び19人の分類されていない肺癌患者のうちの2人の血清において観察され、これは、健康な人の血清とハイブリダイズしたA549膜には存在しないものであった。A2で示されている、隣接する蛋白質のスポットの第2のグループ(図3)は、p

40

50

I が 7.2 ~ 7.8、分子量が約 36 kDa のものであって、18 人の肺腺癌患者のうち  
の 7 人、11 人の扁平上皮細胞肺癌患者のうち 3 人、4 人の小細胞肺癌患者のうち 2  
人及び 19 人の分類されていない肺癌患者のうち 6 人の血清において観察されたが、こ  
れは、健康な人の血清中には存在しないものであった。全体として、18 人の肺腺癌患者  
のうち 11 人、11 人の扁平上皮細胞肺癌患者のうち 6 人、及び 4 人の小細胞肺癌患  
者のうち 3 人の血清が A1 及び / 又は A2 に反応性を示した。

【0057】

#### 6.2.2 肺癌蛋白質に対する IgM の免疫反応

A1 及び / 又は A2 蛋白質に対して、IgG に基づく免疫反応を示した血清が、IgM に  
基づく免疫反応をもまた示したかどうかを調べるために、A1 及び / 又は A2 に対して I  
gG に基づく免疫反応を示した肺腺癌患者 3 人の血清と、2 つのネガティブコントロール  
とをこの分析において用いた。膜含有 A549 溶解物を患者及びコントロールの血清とハイ  
ブリダイズし、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ - 接合羊抗 - ヒト IgM 抗  
体とともにインキュベートした。A1 及び / 又は A2 に対して IgG に基づく反応性を示  
した患者の血清のみが、これら 2 つの隣接してセットされた蛋白質に対して、IgM に基  
づく反応性を示した (図 3)。

10

【0058】

#### 6.2.3 肺癌蛋白質に対する IgG サブタイプの免疫反応

A1 及び / 又は A2 蛋白質に対して IgG に基づく免疫反応を示した IgG サブタイプの  
血清を調べるために、A1 及び / 又は A2 蛋白質に対して IgG 免疫反応を示した肺腺癌  
患者 3 人の血清と、2 つのネガティブコントロールとをこの分析において用いた。膜含有  
A549 溶解物を患者及びコントロールの血清とハイブリダイズし、続いてホースラディ  
ッシュペルオキシダーゼ - 接合マウス抗 - ヒト IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG  
4 抗体とともにインキュベートした。A1 及び / 又は A2 に対して IgG に基づく反応性  
を示した患者の血清のみが、これら 2 つの隣接してセットされた蛋白質に対して、IgG  
1 に基づく反応性を示した (図 4)。

20

【0059】

#### 6.2.4. 肺癌に対する A1 および A2 IgG 抗体の特異性

膜含有 A549 溶解物を、メラノーマ、乳癌、肝癌または食道癌患者の血清とハイブリザイ  
ズした。いずれの血清も A2 に対して IgG に基づく免疫反応性を示さず、A1 蛋白質は食道癌患  
者 (5/8) および乳癌患者 (1/11) に存在し、メラノーマ患者 (0/7) および肝癌患者 (0/  
11) には存在しなかった。

30

【0060】

#### 6.2.5. 肺癌患者血清と アネキシン I および II との反応性

A1 および A2 蛋白質を同定するため、追加の膜を A549 肺アデノカルシノーマ細胞溶解物から  
調製し、蛋白質をクーマシーブルー染色により視覚化した。A1 および A2 スポットを膜から  
切り出し、溶出しトリプシン消化に付した。ペプチド断片をマススペクトルにより分析し  
た。4 つの隣接するセクションである、A1a、A1b (A1a の直ぐ左側、即ちより酸性)、A1c  
(A1b の直ぐ左側、即ちより酸性) および A1d (A1c の直ぐ左側、即ちより酸性) をプロッ  
トから切り出した。これら 4 つの領域は全部で免疫反応性の全 A1 領域を含んでいた。これ  
ら 4 つのセクション由来のペプチドのマススペクトル分析により、アネキシン I およびア  
ネキシン II 変異体がセクション A1a を除いてより優勢なアネキシン I アイソフォームである  
ことが分かり、セクション A1a は何らの結果も示さなかった。A2 蛋白質については、2 つ  
のセクションである、A2a および A2b (A1b の直ぐ左側、即ちより酸性) をプロットから切  
り出した。これらのセクション由来のペプチドのマススペクトル分析により、アネキシン  
II 変異体 (A2a) およびアネキシン II 変異体 (A2b) がより優勢なアネキシン II アイソフォ  
ームであった。追加的に、A1 および A2 スポットを膜から切り出し、直接 N 末端配列決定に  
付した。アネキシンはアセチル化により N 末端がブロックされているため、如何なる結果  
も得られなかった。

40

【0061】

50

### 6.2.6. アネキシンIおよびIIアイソフォームの更なる確認

スポットA1およびA2がそれぞれアネキシンI混合物あるいはアネキシンII混合物からなることを確認するため、A549アデノカルシノーマセルラインから調製した膜を、アネキシンIと反応する市販されているマウスモノクローナル抗体あるいはマウスモノクローナルアネキシンII抗体とハイブリサイズさせた。得られた免疫反応性パターンを、同じタイプの細胞溶解物のクーマシーブルー染色プロットおよび肺癌患者の血清との免疫反応性のパターンと比べた。抗アネキシンI抗体および抗アネキシンII抗体は、肺癌患者血清でそれぞれ視覚化したA1およびA2スポット中の蛋白質と免疫反応した(図6)。印象的には、幾つかの付加的な低分子免疫反応スポットが、用いた両者のモノクローナル抗アネキシンI抗体および抗アネキシンII抗体のハイブリダイゼーションの結果として観察された。これらのスポットは、テストしたいずれの患者血清とも免疫反応性を示さなかった。

10

#### 【0062】

本発明は、実施例に記載した態様の範囲に限定されるものではなく、実施例は本発明の一つの局面を説明するためのものであり、機能的に等価の如何なる組成物および方法も本発明の範囲内である。実際、本明細書に記載し示したものに加えて各種の修正はこれまでの記載から当業者には明らかであろう。そのような修正はクレーム範囲内のものである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 A549細胞溶解物の二次元ゲル電気泳動法。ゲルはタンパクを視覚化するために銀色に染色した。

【図2】 肺癌の患者の血清で処理されたA549細胞溶解物の二次元ゲル分離のウェスタンプロット法。p16.3~6.8及び分子量37kDaのA1を示した一群の連続的なタンパクのスポットにおいて反応性が観察された。

20

【図3】 肺癌タンパクに拮抗するIgM免疫反応性。肺癌患者の血清で処理されたA549溶解物の二次元ゲル分離のウェスタンプロット法。続いて膜はセイヨウワサビ過酸化酵素結合ヒツジ抗ヒトIgM抗体と共にインキュベートした。

【図4】 肺癌患者の血清に拮抗するIgGサブタイプ免疫反応性。肺癌患者の血清で処理されたA549溶解物の二次元ゲル分離のウェスタンプロット法。続いて膜はセイヨウワサビ過酸化酵素結合マウス抗ヒトIgG1、IgG2、IgG3あるいはIgG4抗体と融合させた。

【図5】 肺癌患者の血清に対するA1およびA2 IgG抗体の特異性。A549溶解物を含む膜は黒色腫、乳癌、肝癌もしくは食道癌の患者の血清と融合させた。食道癌の患者の血清(5/8)、乳癌の患者の血清(1/11)で認められ、黒色腫の患者の血清(0/7)及び肝癌の患者の血清(0/11)では認められなかったA2、A1タンパクに拮抗するIgGによる免疫反応性はどの血清でも見られなかった。

30

【図6】 抗アネキシンI、及び抗アネキシンII抗体はそれぞれA1及びA2スポットのタンパクに拮抗する免疫反応性をもつ。

【 図 1 】

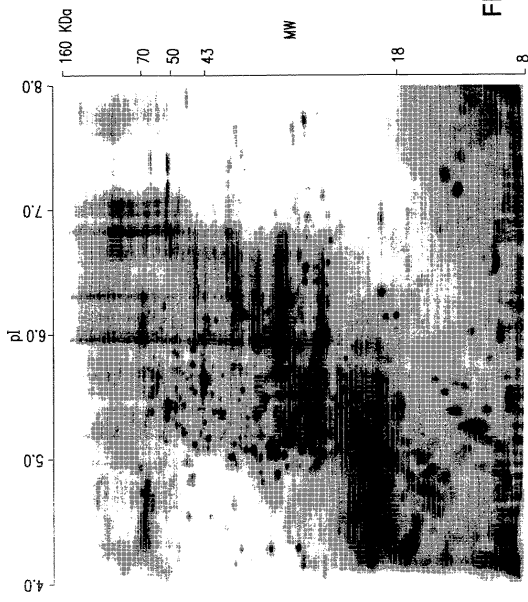


FIG.1

【 図 2 】

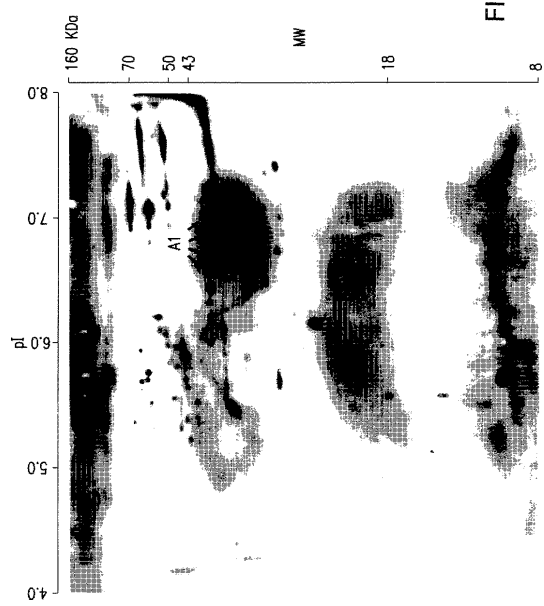


FIG.2

【 図 3 】

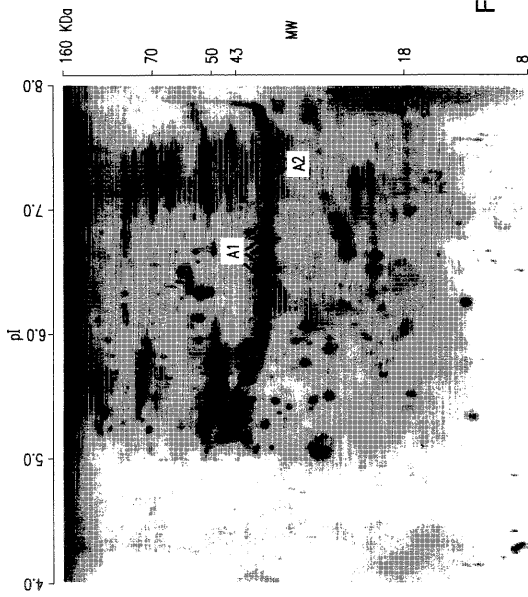


FIG.3

【 図 4 A 】



FIG.4A

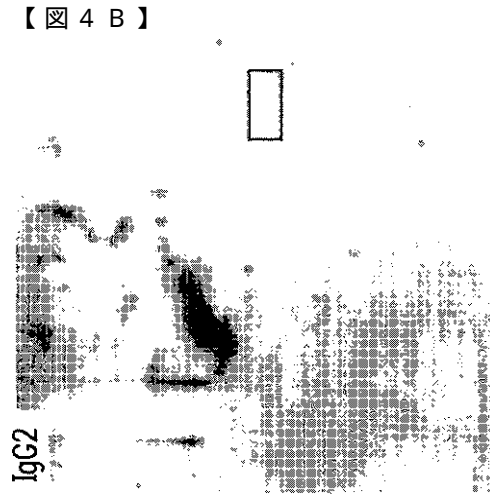


FIG.4B

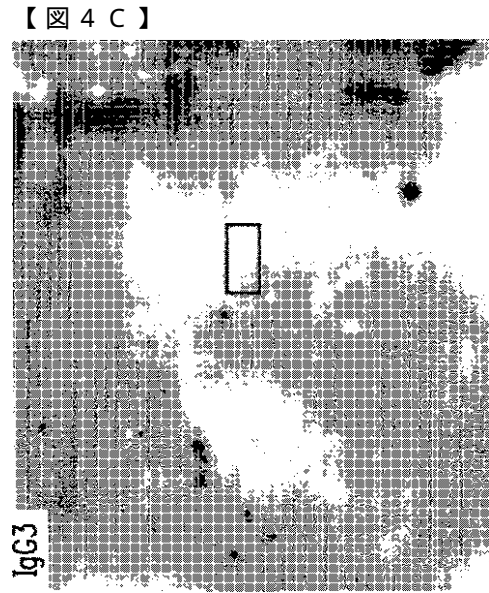


FIG.4C

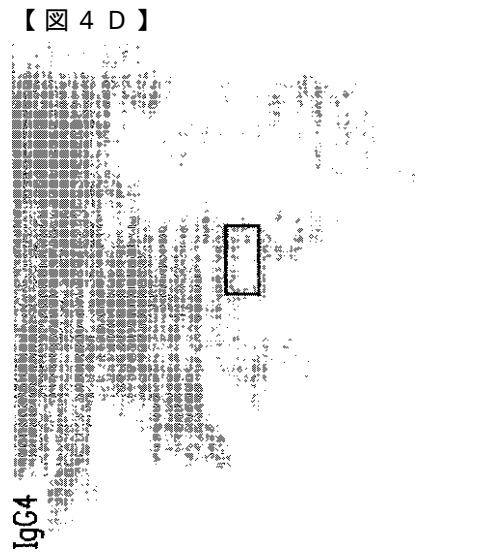
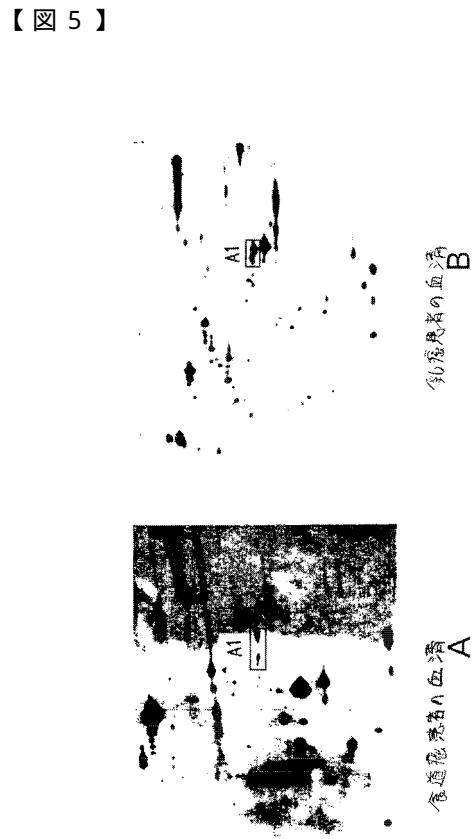
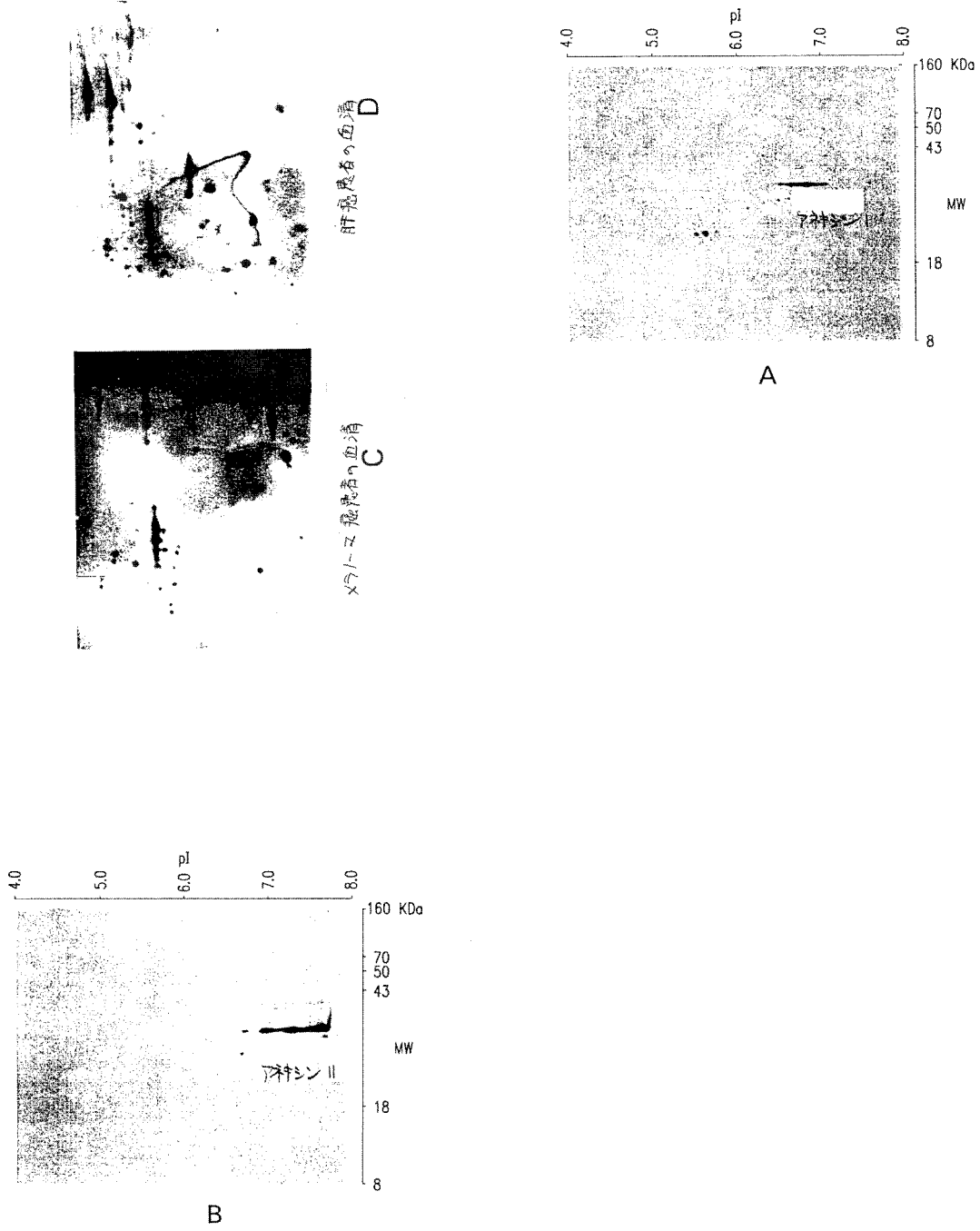


FIG.4D





【 図 6 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 ハナシュ、サミール、エム  
アメリカ合衆国 ミシガン、アン アーバー、 ウォルデンウッド ロード 3870
- (72)発明者 ミセク、デイヴィッド  
アメリカ合衆国 ミシガン、アン アーバー、 デイトン ドライブ 2848
- (72)発明者 ヒンダーラー、ロバート  
アメリカ合衆国 ミシガン、フリント、 ラムズゲイト 1215
- (72)発明者 ビアー、デイヴィッド  
アメリカ合衆国 ミシガン、チェルシー、 キャバノー レイク ロード 15911
- (72)発明者 プライコリー、フランク  
アメリカ合衆国 ミシガン、アン アーバー、 クラム サークル 1781

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開平04-228090(JP,A)  
国際公開第99/018435(WO,A1)  
特開平02-000496(JP,A)  
特開平07-072147(JP,A)  
DAVIS R. G. et al., Detection of secreted and intracellular annexin II by a radioimmunoassay, J. immunol. methods, 1995年, Vol.188, P.91-95  
BASTIAN B. C. et al., Autoantibodies to annexins: diagnostic marker for cutaneous disorders?, J. Dermatol. Sci., 1994年, Vol.8, P.194-202

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
CAPlus(STN)