

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年12月3日(03.12.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/182580 A1

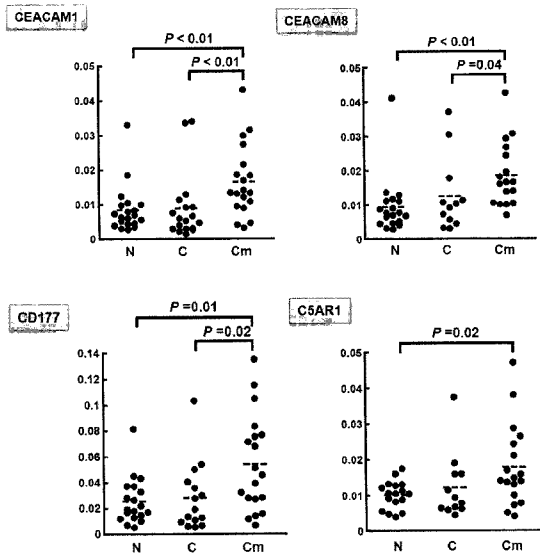
- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/065029
- (22) 国際出願日: 2015年5月26日(26.05.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-110293 2014年5月28日(28.05.2014) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi). 久米 秀明 (KUME, Hideaki).
- (74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: COLORECTAL CANCER METASTASIS DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: 大腸がんの転移検出方法

[図2]
図 2



N: 健常者群、C: 転移巣のない大腸がん患者群、Cm: 転移巣のある原発性大腸がん患者群

AA (Mann-Whitney U test)

C Colorectal cancer patient group without metastatic lesions
 Cm Primary colorectal cancer patient group with metastatic lesions
 N Healthy group
 AA (Mann-Whitney U test)

(57) Abstract: A colorectal cancer metastasis detection method characterized by measuring the amount of at least one type of protein selected from a group comprising CEACAM8, CEACAM1, CD177, and C5AR1 and using this measurement value as an indicator, in a body fluid sample obtained from a subject. As a result of this method, a determination can be made as to whether or not there is a high likelihood of a sample provider having metastatic colorectal cancer or whether or not colorectal cancer has metastasized. This method is useful because, as a result, the sample provider can take measures to prevent progress of the colorectal cancer.

(57) 要約: 被験者に由来する体液試料において、CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の量を測定し、その測定値を指標にすることを特徴とする、大腸がんの転移検出方法。本発明の方法により、サンプル提供者が転移のある大腸がんの可能性が高いか否か、あるいは大腸がんが転移しているか否かを判定することができる。これにより、サンプル提供者は大腸がんの進行を阻止する手段を講じることができるため、有用である。

WO 2015/182580 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
ML, MR, NE, SN, TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：大腸がんの転移検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、大腸がんの転移検出方法に関する。さらに詳しくは、サンプル中の特定のマーカの量を測定することで、転移のある大腸がんを検出する方法、及び該方法に用いるキットに関する。

背景技術

[0002] 大腸がん患者の30～40%においては再発や転移が見られる。大腸がんの転移としては、肝臓への転移によるものが最も多い。大腸がんのスクリーニングには便潜血検査が主に使われている。この検査が陽性であった場合、その多くは内視鏡検査を行い、組織を採取して確定診断を行う。一方で、そのような組織診断は作業が煩雑であることから簡易な検査方法として、あるいは、切除術を受けた大腸がん患者の術後管理においては組織採取ができないことから、生体試料を用いたがんマーカー測定を行うことが主流となっている。

[0003] 特許文献1では、大腸がんの患者の血液で発現量が変化したRNAが挙げられており、そのうちのひとつとしてCD177に由来のRNAが開示されている。特許文献2では、大腸組織由来のサンプルの位置などの情報を基に発現遺伝子を解析した結果、CEACAM1が大腸の右側腫瘍及び左側腫瘍でその発現が低下していることが報告されている。

[0004] また、非特許文献1には、CEACAM1の遺伝子の発現パターンと大腸がんの進行について報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2012/156529号公報
特許文献2：特開2007-224009号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1 : Pathol. Oncol. Res. (2011) 17:67-74

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 大腸がんの転移症例に対して行われる化学療法や分子標的治療法は、その抑制効果、或いは延命効果が必ずしも十分とは言えないのが現状である。また、手術後の患者には転移の有無に関わらず抗がん剤投与をするなど、患者に経済的・精神的な負担を強いている問題がある。一方、大腸がんの転移に対して特異性を有するマーカーは臨床において使用されていない。そこで、転移のある大腸がんを事前に予測できるようなマーカーが求められている。

[0008] 本発明の課題は、大腸がんの転移を簡便にかつ精度よく検出するための方法、及び該方法に用いるキットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の〔1〕～〔6〕に関する。

〔1〕 被験者に由来する体液試料において、CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の量を測定し、その測定値を指標にすることを特徴とする、大腸がんの転移検出方法。

〔2〕 CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の量を測定する工程と、

前記工程における測定値と基準値とを対比する工程

とを含み、前記測定値が基準値よりも大きいと認められる場合が大腸がんの転移の存在の指標となる、大腸がんの転移検出方法。

〔3〕 治療後の被験者に由来する体液試料中のCEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の量を測定する工程と、

前記工程における測定値と、治療前の測定値とを対比する工程と、

を含み、治療後における測定値が治療前における測定値より小さいと認めら

れる場合に、前記治療が転移のある大腸がんの治療効果を有すると評価する工程を含む、転移のある大腸がんの治療の評価方法。

〔4〕 CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質に対する抗体又はその断片を含有してなる、大腸がんの転移を検出するためのキット。

〔5〕 CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質の転移のある大腸がんのマーカースとしての使用。

〔6〕 CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質を、被験者に由来する体液試料中から検出することを特徴とする、大腸がんの転移又は大腸がんの転移の疑いの情報を提供する方法。

発明の効果

[0010] 本発明の方法もしくはキットにより、大腸がんの転移の有無を簡便にかつ精度よく判断することができる。また、本発明の方法もしくはキットにより、大腸がんの転移を特異的に検出することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、大腸がんのマーカ候補を示す図である。

[図2]図2は、健常者群、転移のない大腸がん患者群、及び転移のある大腸がん患者群それぞれの個体について、抽出された膜小胞画分における各マーカの発現量を確認した結果を示す図である。

[図3]図3は、健常者群、転移のない大腸がん患者群、及び転移のある大腸がん患者群それぞれの個体検体について、エクソソームに由来する各マーカの発現量を確認した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の方法は、被験者における大腸がんの転移を検出するための方法であって、体液試料中の特定のマーカの量を測定することで、転移のある大腸がん罹患している可能性を判断することを特徴とする。従って、本発明

は、大腸がんの転移検出用の情報を提供する方法でもある。具体的には、被験者に由来する体液試料において、後述の特定のマーカーの量を測定する工程と、前記工程における測定値を基準値と対比して、ここで、前記被験者における測定値が基準値よりも大きいと認められる場合に、被験者が大腸がんが転移している、もしくは転移のある大腸がん罹患していると判断する工程を含む。

[0013] 本発明における測定対象のタンパク質としては、CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1が挙げられる。

[0014] 本明細書におけるCEACAM8とは、ヒト由来のCEACAM8 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8) タンパク質 (GenBank アクセションNo. P31997) のことであり、野生型については配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する349残基のポリペプチドであるが、この変異体又は、野生型及び／又は変異型のタンパク質の断片であってもよい。

[0015] 本明細書におけるCEACAM1とは、ヒト由来のCEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) タンパク質 (GenBank アクセションNo. P13688) のことであり、野生型については配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する526残基のポリペプチドであるが、この変異体又は、野生型及び／又は変異型のタンパク質の断片であってもよい。

[0016] 本明細書におけるCD177とは、ヒト由来のCD177タンパク質 (GenBank アクセションNo. Q8N6Q3) のことであり、野生型については配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する437残基のポリペプチドであるが、この変異体又は、野生型及び／又は変異型のタンパク質の断片であってもよい。

[0017] 本明細書におけるC5AR1とは、ヒト由来のC5AR1タンパク質 (G

enBank アクセションNo. P21730) のことであり、野生型については配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する350残基のポリペプチドであるが、この変異体又は、野生型及び／又は変異型のタンパク質の断片であってもよい。

[0018] これらのタンパク質はいずれのタンパク質もその存在自体は公知であったが、転移のある大腸がん患者の体液試料中において、健常者や転移のない大腸がん患者よりも多く存在することを本発明者らが初めて見出して、本発明を完成するに至った（以降、これら4種類のタンパク質をまとめて、本発明のマーカールと記載することもある）。なお、前述のとおり本発明のマーカールのなかでも、CEACAM1やCD177については、大腸がんとの関係についての報告があるが、エクソソーム由来の試料で検出可能であることや、転移の有無との関連までは検証されていない。また、特許文献2においては、大腸がん罹患している場合にはCEACAM1の発現量が低下することが報告されており、本発明者らの発見とはその傾向は異なっている。さらに、非特許文献1によれば、大腸がん患者の各ステージにおけるCEACAM1の発現パターンには有意差がないと報告されている。

[0019] 本発明のマーカールを、転移のある大腸がんのマーカールタンパク質として同定した方法は、後述の実施例にて詳述するが、以下に簡単に説明する。先ず、大腸の良性腫瘍と大腸がんの患者群（転移の有無については区別しない）の腫瘍組織から調製した膜画分を用いて、公知のプロテオミクス手法により変動シグナルを生じるタンパク質を分離・同定し、候補タンパク質として選択した。次に、これらのタンパク質については以下の検証を行った。具体的には、大腸がんの患者群を転移の有無により2群に分けて、健常者群、転移のない大腸がん患者群、転移のある大腸がん患者群の各群の体液試料を用いて、前記候補タンパク質の量の群間比較を行った結果、本発明のマーカールを同定した。なお、大腸がんの患者群における転移の有無の判断は、画像診断により行った。

[0020] 本明細書において、「大腸がんが転移している又は大腸がんの転移」とは

、大腸がんの原発細胞が移動し、身体他の部分に到達してがんを形成する、あるいは形成し得る状態にあることを意味する。また、本明細書において「転移のある大腸がん」とは、大腸がんの原発細胞が身体他の部分において転移巣を形成している、あるいはその可能性がある原発性の大腸がんのことである。このとき、転移の程度又は転移巣の状態は特に限定されない。また「転移のない大腸がん」とは、転移巣の形成が見られない大腸がんをさす。

[0021] 本発明の方法には、具体的には、タンパク質量の測定工程（工程A）及び大腸がんの転移決定工程（工程B）が含まれる。以下に、本発明における各工程について詳細に説明する。

[0022] 工程Aとは、被験者に由来する体液試料において、CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びCD5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質量を測定する工程をさす。

[0023] 本明細書で用いられる「体液試料」としては、例えば、血液、尿、唾液、乳汁、鼻汁、脳脊髄液などが例示されるが、好ましくは、血液である。本明細書中「血液」としては、全血、血清、及び血漿を用いることができる。なお、体液試料の採取方法や調製方法は特に限定はなく、公知の方法に従って行うことができる。

[0024] 本発明のマーカーは、体液試料から調製されるエクソソームあるいは膜小胞画分からも検出されることから、これらを調製してから測定対象として用いることができる。膜小胞画分及びエクソソームのいずれも体液試料を超遠心法などにより凝集することで得られることが知られている。また、エクソソームは小胞顆粒であり、特異的に発現している抗原（例えば、CD9、CD63、CD147、EPCAMなど）が知られているので、これらに特異的に結合できる抗体を用いて免疫沈降させることで捕捉できることが知られている（例えば、国際公報2013/099925号）。

[0025] 本発明のマーカーの測定は、公知の方法に従って行うことができる。具体的には、例えば、質量分析方法や測定対象のマーカーを特異的に認識できる

抗体を用いる方法が好適例として挙げられる。

[0026] 質量分析法としては、MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）型質量分析装置、ESI（エレクトロスプレーイオン化法）型質量分析装置等を用いる質量分析方法が挙げられ、タンパク質の一部のペプチドから定量する方法であってもよい。なかでも、ESI型質量分析装置を用いるLC-MS法が好ましい。

[0027] 抗体を用いる方法（免疫学的測定法）としては、例えば、ウェスタンブロット法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA、EIA）、発光免疫測定法、蛍光免疫測定法（エクソスクリーン法等）が挙げられる。かかる方法において用いる抗体は、本発明のマーカ―を良好な感度及び特異性で検出又は捕捉することができるという特徴を有する。このような抗体は、当業者に周知の方法により作製することができ、例えば、モノクローナル抗体又はその断片を好適に用いることができる。また、前記モノクローナル抗体又はその断片は、通常公知の方法に従って、標識化や固相化して用いることができる。なお、本明細書において、「モノクローナル抗体の断片」としては、前記のモノクローナル抗体の一部であって、当該モノクローナル抗体と同様に目的のタンパク質に対して特異的な結合性を有する断片を意味する。具体的には、Fab、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体（scFv）、ジスルフィド安定化抗体（dsFv）、2量化体V領域断片（Diabody）、CDRを含むペプチド等を挙げることができる。

[0028] かくして、マーカ―量を測定することができる。得られた測定値を用いて、以下の工程Bを行う。

[0029] 工程Bとは、工程Aで得られたマーカ―の量に基づいてインビトロで大腸がんの転移を決定（又は評価）する工程である。決定方法の一例として、被験者のマーカ―の量が基準値と比較して統計学的に有意に多いときに、大腸がんが転移している、もしくは転移のある大腸がん罹患していると決定（又は評価）する方法が挙げられる。本明細書中「決定」とは、本発明の検出方法において得られた測定結果に基づいて、大腸がんの転移、もしくは転移

のある大腸がんの罹患を評価することを指し、評価には、医師による判定を含まないことを意図している。

[0030] 「基準値」とは、例えば、健常者におけるマーカー量の測定値とすることができる。好ましくは、複数の転移のある大腸がん患者由来であることが確認された試料（陽性試料）に含まれるマーカー量と、複数の健常者由来（もしくは転移のない大腸がん患者由来）であることが確認された試料（陰性試料）に含まれるマーカー量とを測定して対比し、その結果に基づき最も高確率に陽性試料と陰性試料とを区別できる値とする。

[0031] 「健常者」とは、少なくとも大腸がん（転移の有無をとわない）に罹患していない個体、好ましくは健康な個体をいう。さらに、健常者は、被験者と同一の生物種であることを要する。例えば、検出に供する被験者がヒト（被検者）の場合には、健常者もヒト（本明細書では、以降「健常者」とする）でなければならぬ。健常者の身体的条件は、被験者のそれと同一又は近似することが好ましい。身体的条件とは、例えば、ヒトの場合であれば、人種、性別、年齢、身長、体重等が該当する。

[0032] 健常者由来の体液試料としては、被験者由来の体液試料と同種の試料であることが好ましく、例えば、被験者由来の体液試料が血液である場合、健常者由来の体液試料も血液が好ましい。

[0033] 健常者の体液試料におけるマーカーの量は、前記工程で説明をした被験者の体液試料におけるマーカーの量の測定方法と同様の方法で測定することが好ましい。健常者の体液試料におけるマーカーの量は、被験者の体液試料におけるマーカーの量を測定する都度、新たに測定することもできるが、予め測定しておいたマーカーの量を利用することもできる。特に、健常者の様々な身体的条件におけるマーカーの量を予め測定しておき、その値をコンピューターに入力してデータベース化しておけば、被験者の身体的条件を当該コンピューターに入力することで、その被験者との比較に最適な身体的条件を有する健常者のマーカーの量を即座に利用できるのも便利である。

[0034] 「統計学的に有意」とは、例えば、得られた値の危険率（有意水準）が5

%、1%又は0.1%より小さい場合が挙げられる。それ故、測定値について「統計学的に有意に大きい」とは、被験者と健常者のそれぞれから得られたマーカーの量的差異を統計学的に処理したときに両者間に有意差があり、かつ被験者の前記マーカーの量が健常者のそれと比較して相対的に多いことをいう。例えば、体液試料中のマーカーの量に関して、被験者が健常者の2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは4倍以上、最も好ましくは5倍以上多い場合が該当する。量的差異が3倍以上であれば信頼度は高く、統計学的にも有意に多いといえる。統計学的処理の検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定しない。例えば、スチューデントt検定法、多重比較検定法を用いることができる。

[0035] 被験者の体液中のマーカーの量が基準値よりも統計学的に有意に多い場合、その被験者は大腸がんが転移している、もしくは転移のある大腸がん罹患していると評価する。本発明において対象となる大腸がんの病期は、特に限定はなく、早期癌から末期癌に及ぶ。

[0036] このように、本発明の大腸がんの転移検出方法は、体液試料中のマーカーを、質量分析装置を用いて測定する態様及び抗体を用いて免疫学的に測定する態様を含む。本発明の方法によって、被験者が転移のある大腸がん罹患しているか否か、あるいは、大腸がんの転移の有無を決定又は評価することができるだけでなく、転移のある大腸がん患者と健常者の識別、あるいは、転移のある大腸がん患者と転移のない大腸がん患者の識別を可能にする。

[0037] また、前記解析において、例えば、被験者が転移のある大腸がん患者であると判断された場合においては、健常者のマーカー量を被験者の治療前のマーカー量に設定し、治療後のマーカー量を被験者のマーカー量として対比することで、治療後のマーカー量が減少していることが示された場合は、当該治療が転移のある大腸がんの治療に有効である可能性が高いと判断することができる。従って、本発明はまた、がん治療を受ける前と受けた後において、本発明のマーカー量を測定し、治療後の値が治療前のそれより小さい場合に、当該治療が効果を有すると判断することを特徴とする評価方法を提供す

ることができる。ここでの「転移のある大腸がん」の治療の評価とは、原発巣である大腸がんの治療に加えて、転移先のがんの治療を評価することも含む。

[0038] 本発明の別の態様では、大腸がんの転移（転移のある大腸がん）を検出するためのキット（以下、「大腸がん転移検出用キット」ともいう）が提供される。「大腸がん転移検出用キット」とは、転移のある大腸がんの罹患の有無、罹患の程度若しくは改善の有無や改善の程度、あるいは大腸がんの転移の有無を評価するために、また大腸がんの転移の予防、改善又は治療に有用な候補物質をスクリーニングするために、直接又は間接的に利用されるものをいう。

[0039] 本態様のキットは、その構成物として、大腸がんの罹患に関連して体液試料中、好ましくは、血液、血清、血漿、膜小胞画分、あるいはエクソソームにおいて発現が変動する本発明のマーカースを特異的に認識し、また結合可能な物質が包含される。具体的には、例えば、抗体若しくはその断片又はそれらの化学修飾誘導体が含まれる。これらの抗体は、固相担体に結合されていてもよい。その他、例えば、標識二次抗体、さらには標識の検出に必要な基質、担体、洗浄バッファー、試料希釈液、酵素基質、反応停止液、精製された標準物質としてのタンパク質、使用説明書等を含んでいてもよい。なお、本発明のマーカースを認識できる抗体又はその断片としては、前述の通りである。

[0040] これらのキットは、体液試料中の本発明のマーカースのタンパク質量を測定する際に抗体を用いる方法（例えば、ウェスタンブロット法、ELISA法、エクソスクリーン法等）であれば、用いることができる。なお、体液試料がエクソソームである場合、本発明のマーカースのタンパク質量が定量されるのであれば、エクソソームに由来しないタンパク質量も前記抗体により同時に検出されることがあってもよい。

[0041] 本発明のキットを用いて、例えば、健常者と被験者の血液サンプル中に存在する本発明のマーカースのタンパク質量を測定して、両者の発現量に有意差

が生じた場合には、被験者における大腸がんの転移の決定及び／又は診断を行うことができる。

実施例

[0042] 以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、実施例は本発明をより良く理解するために例示するものであって、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されることを意図するものではない。

[0043] 実施例1（組織を用いたバイオマーカー候補膜タンパク質の選定）

大腸の良性腫瘍と大腸がん患者組織（「転移なし」及び「転移あり」を含む）から、常法に従って調製した膜画分について *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* 法（以下、「iTRAQ（登録商標、Applied Biosystems）法」という）によるプロテオーム解析を行った。ここで見られた変動シグナルからタンパク質を同定し、さらなる検証のため、より定量精度の高い *Selected Reaction Monitoring* 法（以下、「SRM法」という）によるプロテオーム解析を行った（結果は表示せず）。なお、このSRM法を行うに当たっては、iTRAQ法によるプロテオーム解析で同定された配列の安定同位体標識ペプチド（グライナー社から購入、以下、「SIペプチド」という）を混和させ、内部標準として用いることによって定量精度を向上させた。

[0044] 実施例2（混合血液中の膜小胞画分における候補タンパク質発現の確認）

続いて、健常者4名の血清を混合した検体、転移のない大腸がん患者4名の血清を混合した検体、及び転移のある大腸がん患者4名の血清を混合した検体、の計3検体について膜小胞画分を調製し、実施例1において選択された候補タンパク質の発現量を調べた。なお、大腸がんの転移の有無は、病理所見及び開腹所見によって確認した。

[0045] 膜小胞画分の調製は、次の方法で行った。具体的には、血清100 μ LにPBS 50 μ Lを加え、2,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで30分間遠心後、0.22 μ mのspinカラムを用いてフィルター濾過した。その後、100,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで90分間超遠心後、沈殿物を

PBSで洗浄し、再び100,000×g、4℃で90分間超遠心を行った。さらに、その沈殿物を50mM DTTを含むPBSで洗浄し、100,000×g、4℃で90分間超遠心後の沈殿物を膜小胞画分として得た。

[0046] 得られた膜小胞画分は、界面活性剤（デオキシコール酸及びラウロイルサルコシン酸）を含むPhase Transfer Surfactant 溶液（以下、「PTS溶液」という）で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加えて酸性条件にすること（相間移動溶解法（PTS法）という）で質量分析の際に悪影響となる界面活性剤を除いた。トリプシン消化したサンプルに、実施例1で用いたSIペプチドを内部標準ペプチドとして添加後、TSQ vantage質量分析計（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、SRM法で測定し、プロテオーム解析を行った。

[0047] その結果、健常者及び転移のない大腸がん患者に比べて、転移のある大腸がん患者で増加したタンパク質として9種類、健常者に比べてがん患者（転移あり、転移なしを含む）で増加したタンパク質として1種類、健常者に比べてがん患者（転移あり、転移なしを含む）で減少したタンパク質として1種類を抽出することができた（図1）。

[0048] 実施例3（個別検体での血液中の膜小胞画分における候補タンパク質発現の確認）

実施例2で抽出された候補タンパク質について、個別の血清サンプルを用いて検証と、さらなる絞り込みを行った。試験には、健常者20名、転移の認められないStage1又はStage2の大腸がん患者18名、及び転移のあるStage4の大腸がん患者19名の血清を用いた

[0049] 具体的には、実施例2と同様にして膜小胞画分を調製し、血清40 μ Lに相当する膜画分を界面活性剤（デオキシコール酸及びラウロイルサルコシン酸）を含むPTS溶液で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加えて界面活性剤を除いた。ここに、SIペプチドを添加してSRM法によるプロテオーム解析を行った。なお、ここで用いたSIペプチドは、アミノ酸配列情報をもとに、それぞれのタンパク質に特異的なペプチド配列（トリプシン消化断片）の安定

同位体標識ペプチド（グライナー社から購入）を用いた。また、個別検体では混合検体の結果と同様の変化を示さなかった候補や、一部検体でのみ検出された候補を除外した。結果を図2に示す。図中の有意差検定は、Mann-Whitney U test検定に従って行った。

[0050] 図2より、CEACAM1、CEACAM8、CD177、及びC5AR1が、健常者に比べて、転移のある大腸がん患者で有意な増加が見られた。これは、血液中の膜小胞画分中に存在するCEACAM1、CEACAM8、CD177、及びC5AR1を測定することによって、転移のある大腸がんを検出することが可能であることを示している。さらに、CEACAM1、CEACAM8、CD177、及びC5AR1は、転移の認められない大腸がん患者に比べても、転移のある大腸がん患者で増加する傾向を示し、なかでも、CEACAM1、CEACAM8、及びCD177が有意な増加を示した。このことから、血液中の膜小胞画分中に存在するCEACAM1、CEACAM8、CD177、及びC5AR1の量を測定することによって、転移のある大腸がんと転移のない大腸がんを区別して、転移のある大腸がんを検出できることが示唆される。

[0051] 実施例4（エクソソームにおけるにおける候補タンパク質発現の確認）

エクソソームのマーカータンパク質としてCD63を採用し、抗CD63抗体を用いた免疫沈降法により血清からエクソソームを調製し、それに候補タンパク質が発現していないかを調べた。試験には、健常者2名、転移の認められないStage1又はStage2の大腸がん患者2名、及び転移のあるStage4の大腸がん患者2名の血清を供した。なお、抗CD63抗体としては、Anti CD63 for Exosome Isolation（コスモバイオ社）を用いた。

[0052] 先ず、抗体を用いた血清膜小胞画分の調製は次のとおりに行った。血清100 μ LにPBS 100 μ Lを加えた後、磁気ビーズに抗CD63抗体を共有結合させたレジンを加え、一晩4 $^{\circ}$ Cで反応させた。PBSで数回洗浄することで非特異的な結合物を除き、エクソソームを調製した。

[0053] 次に、得られたエクソソームを界面活性剤（デオキシコール酸及びラウロイルサルコシン酸）を含むPTS溶液で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加えて界面活性剤を除いた。トリプシン消化したサンプルに、実施例3で用いたCEACAM1、CEACAM8、CD177、及びC5AR1のSIペプチドを内部標準ペプチドとして添加後、TSQ vantage質量分析計を用いてSRM法で測定、プロテオーム解析を行った。この時、超遠心法により調製した膜小胞画分も同時に測定を行い、比較対照とした。結果を図3に示す。なお、図3中、CD63-IP-SRMは、抗CD63抗体で免疫沈降したエクソソームをSRM法により処理したサンプルであり、Centrifugation-SRMは、超遠心によるSRM法により処理した各サンプルを示す。

[0054] 図3より、エクソソームにおいてもCEACAM1、CEACAM8、CD177、及びC5AR1は発現しており、それらの量は、超遠心法で調製した膜小胞画分のそれらの量と同じような傾向を示していた。健常者と転移の認められる大腸がん患者との間で明確な差があり、同様に、転移の認められない大腸がん患者と転移の認められる大腸がん患者との間でも明確な差が認められることが示された。このことは、血清エクソソーム上のこれらのタンパク質を定量することによって、転移のある大腸がんを検出できることを示している。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明の方法により、サンプル提供者が転移のある大腸がんの可能性が高いか否か、あるいは大腸がんが転移しているか否かを判定することができる。これにより、サンプル提供者は大腸がんの進行を阻止する手段を講じることができるため、有用である。

配列表フリーテキスト

[0056] 配列表の配列番号1は、CEACAM8タンパク質のアミノ酸配列である。
配列表の配列番号2は、CEACAM1タンパク質のアミノ酸配列である。
配列表の配列番号3は、CD177タンパク質のアミノ酸配列である。
配列表の配列番号4は、C5AR1タンパク質のアミノ酸配列である。

請求の範囲

- [請求項1] 被験者に由来する体液試料において、CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質の量を測定し、その測定値を指標にすることを特徴とする、大腸がんの転移検出方法。
- [請求項2] 前記測定値を基準値と対比して、その値が基準値よりも大きいと認められる場合を大腸がんの転移の存在の指標とする請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記体液試料が血液試料である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記体液試料が膜小胞画分である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項5] 前記タンパク質がエクソソームに由来するものである、請求項1～4いずれか記載の方法。
- [請求項6] 前記測定を質量分析法により行う、請求項1～5いずれか記載の方法。
- [請求項7] 前記質量分析法がESI型LC-MS法である請求項6記載の方法。
- [請求項8] 前記測定が抗体を用いて行う、請求項1～5いずれか記載の方法。
- [請求項9] 前記抗体を使用する方法がELISA法である請求項8記載の方法。
- [請求項10] CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質に対する抗体又はその断片を含有してなる、大腸がんの転移を検出するためのキット。
- [請求項11] CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質の転移のある大腸がんのマーカとしての使用。
- [請求項12] CEACAM8、CEACAM1、CD177、及びC5AR1からなる群から選択される1つ又は2つ以上のタンパク質を、被験者に由来する体液試料中から検出することを特徴とする、大腸がんの転移又は大腸がんの転移の疑いの情報を提供する方法。

[図1]

図 1

<健常者及び転移巣のない大腸がん患者に比べて、転移巣のある大腸がん患者で増加したタンパク質>

Accession	Description	GN
P21589	5'-nucleotidase	NT5E (CD73)
Q07075	Glutamyl aminopeptidase	ENPEP (CD249)
P08473	Neprilysin	MME (CD10)
P31997	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	CEACAM8
P13688	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM1
Q8N6Q3	CD177 antigen	CD177
P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	SLC2A1 (GLUT1)
P02786	Transferrin receptor protein 1	TFRC
P21730	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor	C5AR1

<健常者に比べて大腸がん患者（転移巣あり、転移巣なしを含む）で増加したタンパク質>

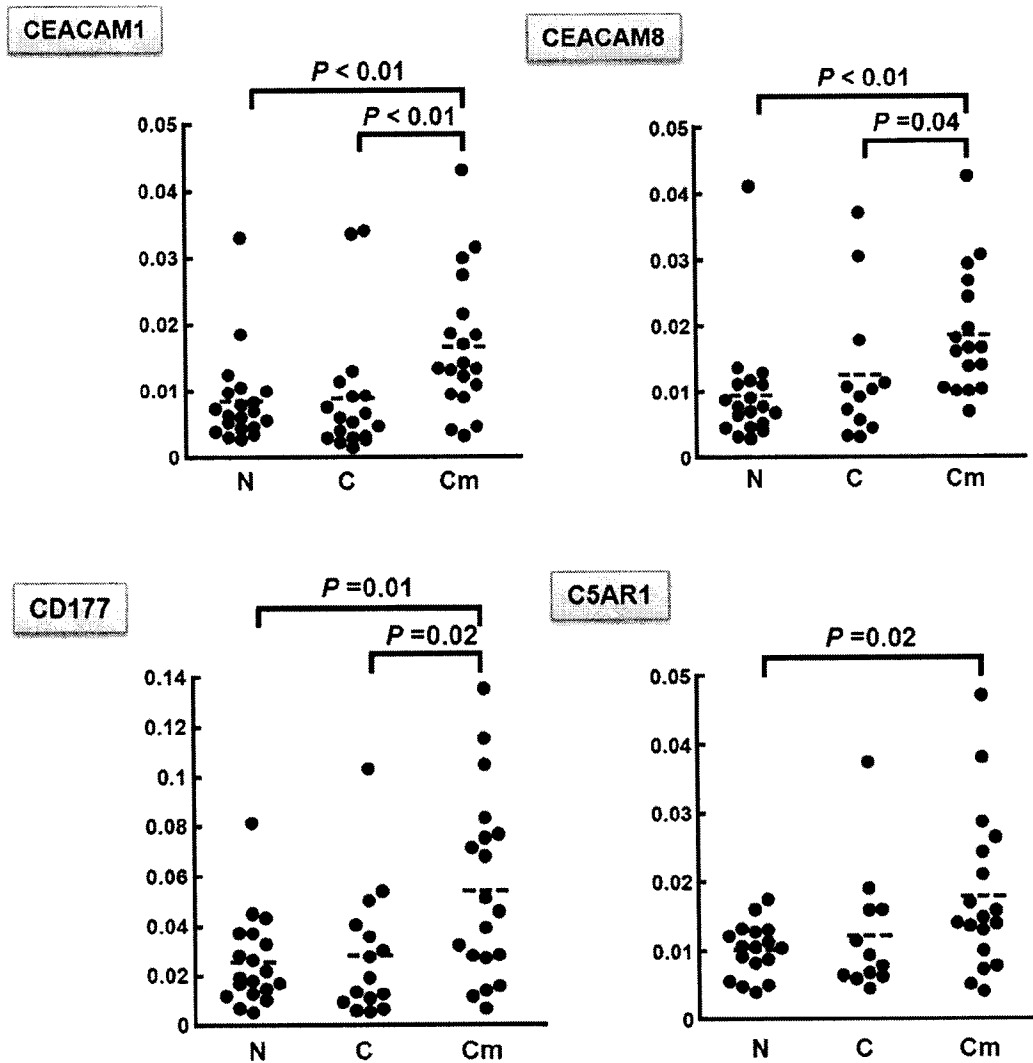
Accession	Description	GN
P36269	Gamma-glutamyltransferase 5	GGT5

<健常者に比べて大腸がん患者（転移巣あり、転移巣なしを含む）で減少したタンパク質>

Accession	Description	GN
P04792	Heat shock protein beta-1	HSPB1

[図2]

図 2

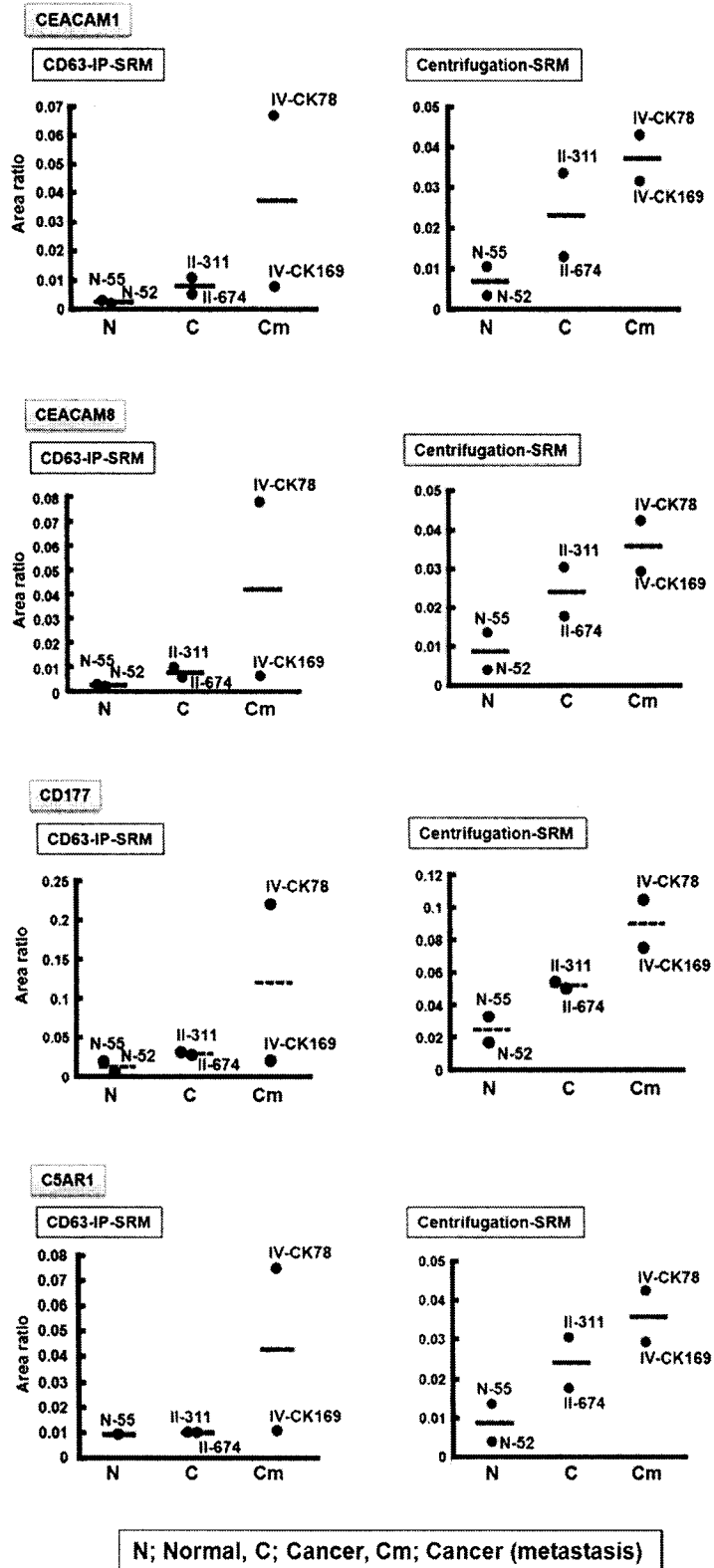


N: 健常者群、C: 転移巣のない大腸がん患者群、Cm: 転移巣のある原発性大腸がん患者群

(Mann-Whitney U test)

[図3]

図 3



N : 健常者群、C : 転移巣のない大腸がん患者群、Cm : 転移巣のある原発性大腸がん患者群
 CD63-IP-SRM : 抗CD63抗体で免疫沈降したエクソソームをSRM法により処理したサンプル
 Centrifugation-SRM : 超遠心によるSRM法により処理したサンプル

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/574, G01N27/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Junji IEDA et al., CEACAM1 isoform balance is associated with the malignancy of colorectal cancer, Wakayama Igaku, 2012.12.31, Vol.63, No.4, P.146-150	1-12
A	JP 2012-047565 A (Shimadzu Corp.), 08 March 2012 (08.03.2012), claim 1 (Family: none)	1-12
A	Takahito KITAJIMA et al., "Daichogan ni Okeru Kessei MCP4 no Rinsho Byorigakuteki Igi", Journal of Japan Surgical Society, 05 March 2013 (05.03.2013), vol.114, special extra issue (2), page 609	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 July 2015 (14.07.15)

Date of mailing of the international search report
11 August 2015 (11.08.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takeshi TOMONAGA, Hideaki KUME, "Shitsuryo Bunseki no Shokaki Shikkan no Shinryo · Kenkyu eno Oyo Dai 6 Kai Jitsuyoka o Mezashita Biomarker Tansaku ~Daichogan Soshikimaku Tanpakushitsu no Proteome Kaiseki~", Molecular Gastrointestinal Medicine, 01 June 2013 (01.06.2013), vol.10, no.2, pages 197 to 201	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065029

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 12 have a common technical feature [a marker for metastasized colorectal cancer].

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Accordingly, claims are classified into four inventions each of which has a special technical feature indicated below. (Continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/065029

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(Invention 1) claims 1-12 (partial)

Inventions relating to the parts where CEACAM8 is used as a marker for metastasized colorectal cancer.

(Invention 2) claims 1-12 (partial)

Inventions relating to the parts where CEACAM1 is used as a marker for metastasized colorectal cancer.

(Invention 3) claims 1-12 (partial)

Inventions relating to the parts where CD177 is used as a marker for metastasized colorectal cancer.

(Invention 4) claims 1-12 (partial)

Inventions relating to the parts where C5AR1 is used as a marker for metastasized colorectal cancer.

Document 1: JP 2012-047565 A (Shimadzu Corp.), 08 March 2012 (08.03.2012), claim 1 (Family: none)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574, G01N27/62		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	家田淳司ほか, CEACAM1 isoform balance is associated with the malignancy of colorectal cancer, 和歌山医学, 2012.12.31, Vol.63, No.4, P.146-150	1-12
A	JP 2012-047565 A (株式会社島津製作所) 2012.03.08, 請求項1 (ファミリーなし)	1-12
A	北嶋貴仁ほか, 大腸癌における血清MCP4の臨床病理学的意義, 日本外科学会雑誌, 2013.03.05, Vol.114, 臨時増刊号(2), P.609	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14.07.2015	国際調査報告の発送日 11.08.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3906

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	朝長毅, 久米秀明, 質量分析の消化器疾患の診療・研究への応用 第6回 実用化をめざしたバイオマーカー探索～大腸癌組織膜蛋白質のプロテオーム解析～, 分子消化器病, 2013.06.01, Vol.10, No.2, P.197-201	1-12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-12は、[転移のある大腸癌のマーカー]という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する4の発明に区分される。

（続きは、特別ページを参照。）

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

第Ⅲ欄の続き。

(発明1) 請求項1-12 (部分的)

転移のある大腸癌のマーカーとしてCEACAM8を用いる部分に係る発明。

(発明2) 請求項1-12 (部分的)

転移のある大腸癌のマーカーとしてCEACAM1を用いる部分に係る発明。

(発明3) 請求項1-12 (部分的)

転移のある大腸癌のマーカーとしてCD177を用いる部分に係る発明。

(発明4) 請求項1-12 (部分的)

転移のある大腸癌のマーカーとしてC5AR1を用いる部分に係る発明。

文献1 : JP 2012-047565 A (株式会社島津製作所) 2012.03.08, 請求項1 (ファミリーなし)