

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5371017号
(P5371017)

(45) 発行日 平成25年12月18日(2013.12.18)

(24) 登録日 平成25年9月27日(2013.9.27)

| (51) Int.Cl. | | | F I | | |
|----------------|---------------|------------------|---------|--------|---|
| GO 1 N | 33/574 | (2006.01) | GO 1 N | 33/574 | A |
| C 1 2 Q | 1/02 | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/02 | |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/68 | A |

請求項の数 21 (全 28 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|--------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2010-532758 (P2010-532758) | (73) 特許権者 | 301032942 |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年10月10日(2008.10.10) | | 独立行政法人放射線医学総合研究所 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2008/068920 | | 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 |
| (87) 国際公開番号 | W02010/041349 | (74) 代理人 | 110000855 |
| (87) 国際公開日 | 平成22年4月15日(2010.4.15) | | 特許業務法人浅村特許事務所 |
| 審査請求日 | 平成23年10月5日(2011.10.5) | (74) 代理人 | 100066692 |
| | | | 弁理士 浅村 皓 |
| | | (74) 代理人 | 100072040 |
| | | | 弁理士 浅村 肇 |
| | | (74) 代理人 | 100114719 |
| | | | 弁理士 金森 久司 |
| | | (74) 代理人 | 100088926 |
| | | | 弁理士 長沼 暉夫 |
| | | (74) 代理人 | 100102897 |
| | | | 弁理士 池田 幸弘 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断のためのマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Villin1 に対する抗体を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための組成物。

【請求項2】

前記診断が、パパニコロー染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性の患者を対象とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記診断が、ヒトパピローマウイルス感染が陰性の患者を対象とする、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

前記ヒトパピローマウイルスが、6型、11型、16型、18型、52型及び58型の何れかである、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記ヒトパピローマウイルスが、16型である、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記診断が、p16^{INK4a}が陰性の患者を対象とする、請求項1から5の何れか一項に記載の組成物。

【請求項7】

p53 癌抑制遺伝子に変異を検査する方法と組み合わせて子宮頸部腺癌を診断又は子宮

頸癌の予後を診断するための請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

ヒトパピローマウイルス感染検査及びp16^{INK4a}検査と組み合わせて子宮頸癌の予後を診断するための請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

ヒトパピローマウイルス感染検査、p16^{INK4a}検査、及び p 5 3 癌抑制遺伝子検査と組み合わせて、子宮頸癌の予後を診断するための請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記Villin 1 に対する抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物。

10

【請求項 11】

前記抗体が検出可能な標識を含む、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

Villin 1 に対する抗体を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するためのキット。

【請求項 13】

患者の子宮頸部から採取した細胞を、Villin 1 に対する抗体と接触させ、該抗体と結合したVillin 1 を検出する工程を含む、子宮頸部腺癌又は子宮頸癌の予後の検査方法。

20

【請求項 14】

前記細胞が、パパニコロウ染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性の患者から採取された細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞が、ヒトパピローマウイルス感染が陰性の患者から採取された細胞である、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記ヒトパピローマウイルスが、6 型、11 型、16 型、18 型、52 型及び58 型の何れかである、請求項 13 から 15 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記ヒトパピローマウイルスが、16 型である、請求項 16 に記載の方法。

30

【請求項 18】

前記細胞が、p16^{INK4a}が陰性の患者から採取された細胞である、請求項 13 から 17 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 13 から 18 の何れか 1 項に記載の方法を、p 5 3 癌抑制遺伝子の変異を検査する方法と組み合わせて、子宮頸部腺癌を検査又は子宮頸癌の予後を検査する方法。

【請求項 20】

請求項 13 から 18 の何れか 1 項に記載の方法を、ヒトパピローマウイルス感染検査及びp16^{INK4a}検査と組み合わせる、子宮頸癌の予後を検査する方法。

40

【請求項 21】

請求項 13 から 18 の何れか 1 項に記載の方法を、ヒトパピローマウイルス感染検査、p16^{INK4a}検査、及び p 5 3 癌抑制遺伝子検査と組み合わせる、子宮頸癌の予後を検査する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断のためのマーカーとしてのVillin1に対する抗体の使用に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

子宮頸癌は、子宮癌の1種であり、女性の悪性腫瘍の中で2番目に多い疾患である（非特許文献1）。子宮頸癌は、子宮頸部扁平上皮癌と、子宮頸部腺癌に分類され、子宮頸部腺癌は、腺様分化を伴う子宮頸部癌であり、腺上皮を母細胞とする純粋な腺癌の他、腺扁平上皮癌を含み、総てのタイプの上皮に由来し得る（非特許文献1）。子宮頸部腺扁平上皮癌は、腺上皮を母細胞とする癌細胞と扁平上皮を母細胞とする癌細胞から成る子宮頸部腺癌であり、全子宮頸癌の5~10%を占める（非特許文献2）。

【 0 0 0 3 】

子宮頸癌は、2000年の全世界での患者数は470,600人であり、233,400人が死に至っている（非特許文献3）。子宮頸癌全体の罹患率及び死亡率は過去30年に亘り大幅に下降しているが、この罹患率の減少は近年停滞傾向を示しており、子宮頸部腺癌の患者数がゆっくりと増加してきている（非特許文献4）。

10

【 0 0 0 4 】

子宮頸癌の診断のための検査としては、細胞診検査、各種腫瘍マーカーについての血液検査、組織生検、画像検査等が行われており、中でも、パパニコロー染色によるスメアスクリーニングと、ヒトパピローマウイルス検査が広く行われている（例えば、非特許文献5及び6~15参照）。

【 0 0 0 5 】

パパニコロー染色によるスメアスクリーニング検査は子宮頸部扁平上皮癌では非常に有効である。しかし、子宮頸部腺癌では偽陰性となり、子宮頸部腺癌の指標とはならない（例えば、非特許文献5参照）。このため、子宮頸部腺癌の検査には不適切である。

20

【 0 0 0 6 】

また、子宮頸部の腺癌は、初期の子宮内膜腺癌と組織学的外観が類似しており、子宮頸部腺癌の多くのサブタイプは子宮内膜分化を示す。この類似の組織学的外観のために、従来の組織生検では、腫瘍の原発組織が不明瞭な場合には子宮内膜腺癌と子宮頸部腺癌を区別することは困難であった（非特許文献1参照）。

【 0 0 0 7 】

免疫組織化学染色を用いた子宮頸部腺癌を含む癌のバイオマーカーの候補として、MIB1、bcl-2、p16^{INK4a}、CEA、ER、vimentin及びp53が検討されている（例えば、非特許文献6~11参照）。

30

【 0 0 0 8 】

p16^{INK4a}については、局所的な子宮頸部腺癌や侵襲的な子宮頸部腺癌で染まるが、扁平上皮の異形成や扁平上皮癌などでも染まり、子宮頸部腺癌に対する特異性について疑問がある、とする報告がある（非特許文献8）。実際、後述する通り、本発明者の検討結果によれば、p16^{INK4a}は、子宮頸部扁平上皮癌に対しては特異性が高いものの、子宮頸部腺癌に対しては、特異性は不十分である。なお、p16^{INK4a}の免疫組織化学染色はHPV感染の間接的な解析にも使われている（非特許文献10）。

【 0 0 0 9 】

SCC 抗原、CYFRA21-1及びCA125などは、臨床上、婦人科腫瘍一般の治療後の経過をモニターするためのマーカーとして血清検査で用いられているが、治療前の子宮頸部腺癌の診断マーカーとしては用いられていない（非特許文献11）。

40

【 0 0 1 0 】

癌性ヒトパピローマウイルス（HPV）の感染は子宮頸癌の原因と考えられており、6型、11型、16型、18型、52型及び58型を含む多くの型で子宮頸癌との関連性を示す報告がある（非特許文献12等）。また、子宮頸部扁平上皮癌は、子宮頸部腺癌と比べ、癌性HPVのタイプに明らかな違いが見られ、欧米諸国では、タイプ16と18のHPVが、ウイルス誘発性子宮頸部腺癌の92%で感染し、特にタイプ18のHPVの感染が多く見られたとの報告がなされている（非特許文献1）。HPVのタイプを決定する点での有用性から、最近では、HPVの遺伝子型を同定する24-plex PathogenMip（非特許文献13）や多数のHPVのタイプを同定できるHPVリニアアレイ法（非特許文献14）がハイスループッ

50

トの解析方法として開発されている。

もっとも、後述する本発明者の検討結果によれば、HPV感染は、子宮頸部扁平上皮癌に比べ子宮頸部腺癌との相関性は低く、HPV感染検査は、子宮頸部腺癌のスクリーニング方法として、特異性の点で十分ではない。

上記治療前診断に加え、子宮頸癌、特に子宮頸部腺癌では、癌病変の予後を予測する診断方法に対する要求がある（非特許文献1）。

これに関し、幾つかの研究では初期の子宮頸部腺癌が子宮頸部扁平上皮癌よりも予後が不良であることを提案している（非特許文献16）。また、組織学的分類が、子宮頸癌患者の生存率と関連しており、子宮頸癌患者の予後診断と成り得るとする報告がある（非特許文献17）。また、HPV感染が、子宮頸癌の重症度に関する重要な指標に成り得るとする報告（非特許文献18）や、子宮頸癌の患者の中でも、HPV感染陰性患者の方が、HPV感染陽性患者より、有意に生存期間が短いという報告もある（非特許文献19）。更に、純粋な子宮頸部腺癌よりも子宮頸部腺扁平上皮癌の方が予後は不良であるとの報告もある（非特許文献20、21）。一方、組織学的分類が子宮頸癌患者の予後に影響を及ぼすことを実証する証明は見出されなかった、とする報告もある（非特許文献4）。

【0011】

【非特許文献1】Herzog TJ, Monk BJ. Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Dec;197(6):566-71.

【非特許文献2】Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? *Cancer* 1995;76:1948-55.

【非特許文献3】Thomas G. Cervical cancer: treatment challenges in the developing world. *Radiother Oncol.* 2006 May;79(2):139-41.

【非特許文献4】dos Reis R, Frumovitz M, Milam MR, Capp E, Sun CC, Coleman RL, Ramirez PT. Adenosquamous carcinoma versus adenocarcinoma in early-stage cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy: an outcomes analysis. *Gynecol Oncol.* 2007 Dec;107(3):458-63.

【非特許文献5】Pak SC, Martens M, Bekkers R, Crandon AJ, Land R, Nicklin JL, Perrin LC, Obermair A. Pap smear screening history of women with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2007 Dec;47(6):504-7.

【非特許文献6】Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol.* 2003 Feb;27(2):187-93.

【非特許文献7】Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, Ashfaq R. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):668-73.

【非特許文献8】Liang J, Mittal KR, Wei JJ, Yee H, Chiriboga L, Shukla P. Utility of p16INK4a, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silverberg scoring system for endocervical glandular lesions. *Int J Gynecol Pathol.* 2007 Jan;26(1):71-5.

【非特許文献9】McCluggage WG, Sumathi VP, McBride HA, Patterson A. A panel of immunohistochemical stains, including carcinoembryonic antigen, vimentin, and estrogen receptor, aids the distinction between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2002 Jan;21(1):11-5

【非特許文献10】Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, Linkov I, Asher M, Sollow RA. Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. *Mod Pathol.* 2006 Aug;19(8):1091-100.

10

20

30

40

50

【非特許文献 1 1】Gadducci A, Tana R, Fanucchi A, Genazzani AR. Biochemical prognostic factors and risk of relapses in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S23-6.

【非特許文献 1 2】Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12-9.

【非特許文献 1 3】Akhras MS, Thiyagarajan S, Villablanca AC, Davis RW, Nyren P, Pourmand N. PathogenMip assay: a multiplex pathogen detection assay. *PLoS ONE*. 2007 Feb 21;2(2):e223.

【非特許文献 1 4】Woo YL, Damay I, Stanley M, Crawford R, Sterling J. The use of HPV Linear Array Assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. *J Virol Methods*. 2007 Jun;142(1-2):226-30.

【非特許文献 1 5】Malinowski DP. Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease. *Biotechniques*. 2005 Apr;Suppl:17-23.

【非特許文献 1 6】Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States--a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol*. 2000 Aug;78(2):97-105.

【非特許文献 1 7】Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Yamada H, Fujimoto S. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002 Dec;81(12):1144-51.

【非特許文献 1 8】Spandidos DA, Dokianakis DN, Kallergi G, Aggelakis E. Molecular basis of gynecological cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:56-64.

【非特許文献 1 9】Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 15;14(2):366-9.

【非特許文献 2 0】Lea JS, Coleman RL, Garner EO, Duska LR, Miller DS, Schorge JO. Adenosquamous histology predicts poor outcome in low-risk stage IB1 cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2003; 91:558-62.

【非特許文献 2 1】Look KY, Brunetto VL, Clarke-Pearson DL, et al. An analysis of cell type in patients with surgically staged stage IB carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1996;63:304-11.

【非特許文献 2 2】Iwakawa M, Ohno T, Imadome K, Nakawatari M, Ishikawa K, Sakai M, Katoh S, Ishikawa H, Tsujii H, Imai T. The radiation-induced cell-death signaling pathway is activated by concurrent use of cisplatin in sequential biopsy specimens from patients with cervical cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jun;6(6):905-11.

【非特許文献 2 3】Ohno T, Nakano T, Niibe Y, Tsujii H, Oka K. Bax protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer*. 1998 Jul 1;83(1):103-10.

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、上記の本願の出願当時における技術水準において、Villin1（以下、VIL1と略記する）に対する抗体に着目し、子宮頸癌患者の生検試料を使って鋭意検討を重ねた結果、当該抗体が、子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断マーカーとして有効で

10

20

30

40

50

あることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち、本発明の一の実施形態によれば、患者から採取した試料を、VIL1に対する抗体と接触させる工程を含む、子宮頸部腺癌又は子宮頸癌の予後の検査方法、或いは、患者の子宮頸部から採取した細胞を、VIL1に対する抗体と接触させ、当該細胞のVIL1の発現量に基づき、子宮頸部腺癌の存在又は予後を判断する工程を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断する方法が提供される。

【0014】

本発明の方法では、試料は、好ましくは患者の子宮頸部から採取した組織である。また、本発明の方法は、他の診断方法と組合せることでより効果的に子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断することができる。例えば、パパニコロー染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性の患者、ヒトパピローマウイルス感染が陰性の患者、又はp16^{INK4a}が陰性の患者を対象とすることが有益である。また、本発明の方法は、p53癌抑制遺伝子に変異を検出する方法と組合せて子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断することも有益である。

10

【0015】

本発明の他の実施形態によれば、VIL1に対する抗体を含む子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための組成物が提供される。

【0016】

本発明の更に他の実施形態によれば、VIL1に対する抗体を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するためのキットが提供される。また、本発明の更に他の実施形態によれば、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するためのマーカーとしてのVIL1に対する抗体のインビトロでの使用が提供される。

20

【0017】

本発明の更に他の実施形態によれば、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための組成物を調製するためのVIL1に対する抗体の使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、子宮頸癌患者82人のKaplan-Meier生存曲線の図である。無病生存率の値が小さくなるほど予後が悪いことを示す。図1Aは、VIL1染色陽性及び陰性の2群における生存曲線である。図1Bは、VIL1染色陽性、HPV感染陰性、且つp16^{INK4a}染色陰性の群と、その他の2群における生存曲線である。図1Cは、VIL1染色陽性、HPV感染陰性、p16^{INK4a}染色陰性、且つp53に変異がある群と、その他の2群における生存曲線である。

30

【図2】図2は、子宮頸癌患者93症例のゲノムDNAにおけるVIL1遺伝子の定量PCRの結果より、コピー数相対値を病理組織分類別に2群比較した図である。SCCは扁平上皮癌であり、ADは腺癌、及び、腺扁平上皮癌の症例群である。

【図3】図3は、本発明の一の実施形態によるアビジン - ビオチン系免疫組織化学染色の結果であり、褐色に染色されている部分が、VIL1存在が認められた部分である。図3Aは、対照としたヒト小腸正常組織像であり、図3Bは、正常ヒト子宮体部の組織像であり、図3Cは、正常ヒト子宮頸部の組織像であり、図3Dは、子宮頸部腺癌の組織像であり、図3Eは、子宮頸部扁平上皮癌の組織像である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

上記の通り、本発明は、VIL1に対する抗体の、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための使用に関するものである。以下、具体的に説明する。

【0020】

1. VIL1

VIL1は、カルシウム制御性のアクチン結合タンパクで、ピリン/ゲルソリンファミリーに属するタンパクである。VIL1は、小腸の吸収細胞や近位尿細管の上皮細胞に特異的に発現し、刷毛縁を形成する細胞骨格タンパクである。VIL1は、大きなコアとなるドメイン

50

を中心に、N末端側、C末端側、および小さなヘッドピースからなる。

【 0 0 2 1 】

ヒトVIL1遺伝子は、2 q 3 5 に位置し、ヒトVIL1のアミノ酸配列及びそれをコードするc D N Aの核酸配列は、NCBI Sequence Viewer v2.0から入手又は推測可能である。

【 0 0 2 2 】

VIL1は、アフィニティークロマトグラフィー等の慣用技術を用いてタンパク抽出することによって、腫瘍組織から単離することができる。また、その配列決定方法も当業者に周知である。

【 0 0 2 3 】

2 . 抗体

本発明で用いられる一次抗体は、VIL1に対して結合するものであればよく、ポリクロナール抗体でもモノクロナール抗体でもよい。

【 0 0 2 4 】

本発明で用いることができる抗体は、下記表に表されるように多数、販売されているので、市販品を用いるのが便利である。

【 0 0 2 5 】

【表 1 - 1】

| 輸入元 | メーカー | 品名 | 抗原/物質名 | 種由来 | 由来詳細 | 免疫動物 | 抗体クラス | 精製度 |
|------------|--------------------------|---|--|---------|---|-------------|-------------------|---|
| コスモバイオ株式会社 | Abcam | Villin antibody [1D2C3] | VIL, Villin1 | Chicken | Full length native protein (purified) (Chicken) | Mouse Mono | IgG1 _K | Ig fraction-Protein G |
| コスモバイオ株式会社 | Abcam | Villin antibody [CWWB1] | VIL, Villin1 | Human | Full length protein (Human) | Mouse Mono | IgG1 | Protein G purified |
| | Abcam | Villin antibody [SPM226], prediluted | VIL, Villin1 | Human | Full length protein (Human) | Mouse Mono | IgG1 _K | Protein G purified |
| | Abcam | Villin antibody | VIL, Villin1 | Rabbit | Synthetic peptide corresponding to C-terminal of human villin | Rabbit Poly | IgG | Protein A purified |
| | Abcam | Villin antibody, prediluted | VIL, Villin1 | Rabbit | Synthetic peptide corresponding to C-terminal of human villin | Rabbit Poly | IgG | Immunogen affinity purified |
| | abD serotec | MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN | VILLIN | Chicken | | Mouse Mono | IgG1 | Purified IgG prepared by affinity chromatography on Protein A |
| フナコシ | Abnova Corporation | VIL1 MaxPab(R) polyclonal antibody (B01) | VIL1 (-, 1 a.a. ~ 421 a.a) full-length human protein | Human | Mouse polyclonal antibody raised against a full-length human VIL1 protein | Mouse Poly | | |
| フナコシ | Abnova Corporation | VIL1 monoclonal antibody (M02), clone 3G6 | VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag | Human | Mouse monoclonal antibody raised against a partial recombinant VIL1 | Mouse Mono | IgG2b | |
| フナコシ | Abnova Corporation | VIL1 polyclonal antibody (A01) | VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag | Human | Mouse polyclonal antibody raised against a partial recombinant VIL1 | Mouse Poly | | |
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | Villin | Human | Full length protein (Human) | Mouse Mono | IgG1 | Protein G purified |
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | Synthetic peptide corresponding to human Villin | Human | | Mouse Mono | | affinity purified IgG |

10

20

30

40

【表 1 - 2】

| | | | | | | | | |
|-----------|--------------------------|---|--|---------|--|-------------|-------------------|--|
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | Purified chicken villin | Chicken | | Mouse Mono | IgG1 | |
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | Human villin protein | Human | | Rabbit Poly | IgG | epitope affinity purified IgG |
| | Acris Antibodies GmbH | Monoclonal Antibody to Human Villin | Human Villin Protein | Human | | Mouse Mono | IgG1 | Protein G chromatography |
| | Acris Antibodies GmbH | Monoclonal Antibody to Villin | Purified chicken Villin | Chicken | | Mouse Mono | IgG1 | Protein A affinity chromatography |
| | Ana Spec | Anti-Villin | human Villin protein | Human | | Mouse Mono | IgG1 _K | purified from ascites fluid by Protein G |
| シグマアルドリッヒ | Atlas Antibodies | Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab1 | Villin-1 recombinant protein epitope signature tag (PrEST) | Human | | Rabbit Poly | IgG | Affinity purified using the PrEST-antigen as affinity ligand |
| シグマアルドリッヒ | Atlas Antibodies | Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab2 | Villin-1 recombinant protein epitope signature tag (PrEST) | Human | | Rabbit Poly | IgG | Affinity purified using the PrEST-antigen as affinity ligand |
| | BD Biosciences | BD Transduction Laboratories™ Villin | Cow Villin aa. 1-827 | Cow | | Mouse Mono | IgG1 | purified from tissue culture supernatant or ascites by affinity chromatography |
| | BECKMAN COULTER | VILLIN | villin | Human | | Monoclonal | | |
| | BIOCARRE MEDICAL | Villin, Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody | Villin | | | Mouse Mono | IgG1 _K | |
| | CELL MARQUEE | Villin(CWW B1) | Villin | | | Mouse | IgG1 | |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

| | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---|--|---------|---|-------------|--------------------------|---|----|
| CSTジャパン株式会社 | Cell Signaling Technology | Villin-1 (R814) Antibody | villin-1 | Human | Polyclonal antibodies are produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to the carboxy terminus of human villin-1 | Rabbit Poly | IgG, HRP-linked Antibody | purified using protein A and peptide affinity chromatography | 10 |
| CSTジャパン株式会社 | Cell Signaling Technology | Villin-1 Antibody | villin-1 | Human | Polyclonal antibodies are produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to human villin-1 | Rabbit Poly | IgG, HRP-linked Antibody | purified using protein A and peptide affinity chromatography | 20 |
| フナコシ | GeneTe x | VIL1 [3G6] antibody | VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein | Human | | Mouse Mono | IgG2b | Protein A affinity purified | 20 |
| | GeneTe x | VIL1 antibody | VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag | | | Mouse Poly | | Unpurified | 30 |
| | GenWay Biotech, Inc. | MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN Antibody, Mouse IgG Monoclonal Antibody | Purified chicken villin | Chicken | | Mouse Mono | IgG1 | Purified IgG prepared by affinity chromatography on Protein A | 30 |
| コスモバイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse Monoclonal Antibody | Native protein(Villin (VIL1)) | | Native protein | Mouse Mono | IgG1 | Protein A column | 40 |
| コスモバイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse anti-Human Monoclonal Antibody | Human Villin protein(VIL1) | Human | | Mouse Mono | IgG1 | Affinity Purified | 40 |

【表 1 - 4】

| | | | | | | | | | |
|------------------|---------------------------|---|--|---------|--|------------|--------------------|-------------------|----|
| コスモ・バイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody | Purified chicken villin(VIL1) | Chicken | Purified protein | Mouse Mono | IgG1 _K | Purified | |
| コスモ・バイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody | Purified chicken villin (VIL1) | Chicken | Purified protein | Mouse Mono | IgG1 | Affinity Purified | 10 |
| | MILLIPORE | Anti-Villin, clone 12 | Villin purified from chicken intestine (VIL1) | Chicken | | Mouse Mono | IgG1 | | |
| | MILLIPORE | Anti-Villin, clone ID2C3 | Purified chicken villin(VIL1) | Chicken | | Mouse Mono | IgG1 | | |
| フナコシ | Novus Biologicals | VIL1 antibody, Mouse Monoclonal anti-VIL1 (3G6) | VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag | Human | | Mouse Mono | IgG2b _K | IgG purified | 20 |
| フナコシ | Novus Biologicals | VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1 | VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag | Human | | Mouse Poly | | | |
| フナコシ | Novus Biologicals | VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1 - villin 1, MaxPab Antibody | VIL1 (-, 1 a.a. ~ 421 a.a) full-length human protein | Human | | Mouse Poly | | | 30 |
| フナコシ | RayBiotech, inc. | MOUSE ANTI VILLIN, With HRP-conjugated secondary antibody | Villin | Birds | | Mouse Mono | | | 40 |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (1D2C3) Antibody | Vil1 | Chicken | purified full length native Villin of chicken origin | Mouse Mono | | | |

【表 1 - 5】

| | | | | | | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|----------------------|---------|--|-------------|-------------------|---|
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (C-19) Antibody | villin | Human | C-terminus | Goat Poly | IgG | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (CWVB1) Antibody | VIL1 | Human | full length Villin of human origin | Mouse Mono | IgG1 | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (BDID2C3) Antibody | VIL1 | Chicken | purified full length native Villin of chicken origin | Mouse Mono | IgG1 | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (H-60) Antibody | VIL1 | Human | raised against amino acids 721-780 mapping near the C-terminus of Villin of human origin | | IgG | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (K-11) Antibody | VIL1 | Human | raised against a peptide mapping at the C-terminus of Villin of human origin | Goat Poly | IgG | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (SPM226) Antibody | VIL1 | Human | raised against recombinant Villin of human origin | Mouse Mono | IgG1 | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (V-20) Antibody | VIL1 | Human | raised against a peptide mapping near the N-terminus of Villin of human origin | Goat Poly | IgG | |
| | SPRING BIOSCIENCE | Anti Villin | Villin | Human | | Mouse | IgG1 _K | |
| | SPRING BIOSCIENCE | Anti Villin | Villin | Human | | Rabbit | | |
| | Thermo SCIENTIFIC | Villin Ab-1 (Clone CWVB1) | Human Villin protein | Human | | Mouse Mono | IgG1 | |
| | USBiological | Villin 1 Pab Rb xHu | villin-1 | Human | Synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to the carboxy terminus of human villin-1 | Rabbit Poly | IgG | Purified by Protein A and immunoaffinity chromatography |
| | USBiological | Villin Mab Mo xHu | Human Villin protein | Human | | Mouse Mono | IgG1 | Purified by Protein G affinity chromatography |

10

20

30

40

【表 1 - 6】

| | YLEM S.R.L | Anti Villin | Villin | | | Mouse | IgG1 | |
|--|--------------------|--|--|--|--------------------------------------|-------|------|--|
| | Abnova Corporation | VIL1 Recombinant Protein (P01) | VIL1(AAH17 303, 1 a.a. - 422 a.a.) full-length recombinant protein with GST | | Length with Tag: 653 aa with GST Tag | | | |
| | Abnova Corporation | VIL1 Recombinant Protein (Q01) | VIL1(NP_009 058, 1 a.a. - 78 a.a.) partial recombinant protein with GST | | Length with Tag: 311 aa with GST Tag | | | |
| | Novus Biologicals | VIL1 Partial Recombinant Protein, VIL1 Partial Recombinant Protein (Q01) | VIL1(NP_009 058, 1 a.a. - 78 a.a.) partial recombinant protein with GST | | | | | |
| | Novus Biologicals | VIL1 Recombinant Protein | VIL1(AAH17 303, 1 a.a. - 422 a.a.) full-length recombinant protein with GST | | | | | |

10

20

【 0 0 2 6 】

30

【表 2 - 1】

| 輸入元 | メーカー | 品名 | クローン | 交差する動物種 | 標識物 | 適用 | 保存温度 | |
|-------------|--------------------------|---|--------|---------------------------------|-----------|--|----------------|--|
| コスモ・バイオ株式会社 | Abcam | Villin antibody [1D2C3] | 1D2C3 | Human, Chicken | Unlabeled | IHC paraffin embedding section, IHC frozen section | 4°C | Villin is a very specific marker for gastrointestinal tumors and adenocarcinomas of the pancreas. Other subsets of tumors stained with Villin are Merkel cell, lung (with rootlets), ovarian and kidney. It does not stain breast cancer |
| コスモ・バイオ株式会社 | Abcam | Villin antibody [CWWB1] | CWWB1 | Human | Unlabeled | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | Abcam | Villin antibody [SPM226], prediluted | SPM226 | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | Abcam | Villin antibody | | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | Abcam | Villin antibody, prediluted | | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | abD serotec | MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN | ID2C3 | Human, Chicken, Pig | | Immunohistology - Frozen, Western Blotting | | |
| フナコシ | Abnova Corporation | VIL1 MaxPab(R) polyclonal antibody (B01) | | Human | Unlabeled | WB | -20°C or lower | |
| フナコシ | Abnova Corporation | VIL1 monoclonal antibody (M02), clone 3G6 | 3G6 | Human | Unlabeled | ELISA | -20°C | |
| フナコシ | Abnova Corporation | VIL1 polyclonal antibody (A01) | | Human, Other species not tested | Unlabeled | ELISA, WB(Recombinant protein) | -20°C or lower | |
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | CWWB1 | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | SPM226 | Human | | IHC(Paraffin), Immunoprecipitation | 4°C | |

10

20

30

40

【表 2 - 2】

| | | | | | | | | |
|-----------|--------------------------|---|-------|---------------------------------|--|--|--------------|--|
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | ID2C3 | Human, Chicken, Porcine | | IHC(frozen),WB | 4°C | |
| | ABR-Affinity Bioreagents | Villin | | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | Acris Antibodies GmbH | Monoclonal Antibody to Human Villin | CWWB1 | Human | | IHC(Paraffin) | 2-8°C, -20°C | |
| | Acris Antibodies GmbH | Monoclonal Antibody to Villin | ID2C3 | Human, Chicken, Porcine | | IHC(frozen),WB | 2-8°C, -20°C | |
| | Ana Spec | Anti-Villin | | Human | | IHC | 2-8°C | |
| シグマアルドリッヒ | Atlas Antibodies | Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab1 | | Human, Other species not tested | | IHC(formalin-fixed, paraffin-embedded sections), Immunoblotting, Protein array | -20°C | |
| シグマアルドリッヒ | Atlas Antibodies | Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab2 | | Human, Other species not tested | | IHC(formalin-fixed, paraffin-embedded sections), Immunoblotting, Protein array | -20°C | |
| | BD Biosciences | BD Transduction Laboratories™ Villin | 12 | Human | | IHC, IF, WB | -20°C | |
| | BECKMAN COULTER | VILLIN | ID2C3 | Human | | Flow Cytometry | | |
| | BIOCARRE MEDICAL | Villin, Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody | 1D2C3 | Human | | IHC(Paraffin) | 2-8°C | Villin can be very useful in differentiating colon adenocarcinoma from breast carcinoma and from lung adenocarcinoma |
| | CELL MARQUEE | Villin(CWWB1) | CWWB1 | Human | | IHC paraffin embedding section, IHC frozen section | 4°C | |

10

20

30

40

【表 2 - 3】

| | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---|-------|---------------------------------|--|-------------------------------------|----------------|--|
| CSTジャパン株式会社 | Cell Signaling Technology | Villin-1 (R814) Antibody | | Human, Mouse, Rat | | WB, Immunofluorescence(IF-IC) | -20°C | |
| CSTジャパン株式会社 | Cell Signaling Technology | Villin-1 Antibody | | Human | | WB | -20°C | |
| フナコシ | GeneTex | VIL1 [3G6] antibody | 3G6 | Human, Other species not tested | | ELISA | -20°C or lower | |
| | GeneTex | VIL1 antibody | | Human, Other species not tested | | ELISA, WB | | |
| | GenWay Biotech, Inc. | MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN Antibody, Mouse IgG Monoclonal Antibody | ID2C3 | Human, Birds, Pig, ChickenN.B | | IHC(frozen),WB | 4°C or -20°C | |
| コスモバイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse Monoclonal Antibody | | Human, Chicken, Pig | | IHC, WB, Flow Cytometry | 4°C or -20°C | |
| コスモバイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse anti-Human Monoclonal Antibody | | Human | | IHC, IHC paraffin embedding section | | |
| コスモバイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody | | Human, Chicken, Porcine | | IHC | | |
| コスモバイオ株式会社、フナコシ | LIFESPAN BIOSCIENCES INC. | Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody | | Human, Chicken, Porcine | | IHC, WB, IHC frozen section | | |
| | MILLIPORE | Anti-Villin, clone 12 | 12 | Human, Chicken | | WB, Immunocytochemistry | | |
| | MILLIPORE | Anti-Villin, clone ID2C3 | ID2C3 | Human, Chicken, Pig | | IHC | | |

10

20

30

40

【表 2 - 4】

| | | | | | | | | |
|------|--------------------------|---|---------|---------------------------------|--------------|--|----------------|----|
| フナコシ | Novus Biologics | VIL1 antibody, Mouse Monoclonal anti-VIL1 (3G6) | 3G6 | Human, Other species not tested | Unconjugated | ELISA(Antibody reactive against recombinant protein) | -20°C or -80°C | |
| フナコシ | Novus Biologics | VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1 | | Human, Other species not tested | Unconjugated | ELISA, WB(The quality control of this antibody is limited to Western blot on the immunizing protein) | -20°C or -80°C | 10 |
| フナコシ | Novus Biologics | VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1 - villin 1, MaxPab Antibody | | Human | Unconjugated | ELISA, WB(Antibody Reactive Against Tissue Lysate and Transfected Lysate) | -20°C or -80°C | 20 |
| フナコシ | RayBiotech, inc. | MOUSE ANTI VILLIN, With HRP-conjugated secondary antibody | | | Unlabeled | | | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (1D2C3) Antibody | 1D2C3 | Human, Chicken | | WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA | 4°C | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (C-19) Antibody | C-19 | Human, Mouse, Rat, Cow | | WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA | 4°C | 30 |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (CWVB1) Antibody | CWVB1 | Human | | WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA | 4°C or freeze | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (BDID2C3) Antibody | BDID2C3 | Human, Chicken, Mouse | | WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA | 4°C | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (H-60) Antibody | H-60 | Human, Mouse, Rat | | WB, IP, IF, solid phase ELISA | 4°C | 40 |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (K-11) Antibody | K-11 | Human, Mouse, Rat | | WB, IF, solid phase ELISA | 4°C | |

【表 2 - 5】

| | | | | | | | | |
|--|--------------------------|--|--------|-------------------|--|--|----------------|----|
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (SPM226) Antibody | SPM226 | Human | | IF, IHC(Paraffin) | 4°C or freeze | |
| | Santa Cruz Biotechnology | Villin (V-20) Antibody | V-20 | Human, Mouse, Rat | | WB, IF, solid phase ELISA | 4°C | |
| | SPRING BIOSCIENCE | Anti Villin | SPM226 | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | 10 |
| | SPRING BIOSCIENCE | Anti Villin | | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | Thermo SCIENTIFIC | Villin Ab-1 (Clone CWWB1) | CWWB1 | Human | | IHC(formalin-fixed, paraffin-embedded sections) | 2-8°C | |
| | USBiological | Villin 1 Pab Rb xHu | | Human | | IHC, IF, WB | 4°C or -20°C | 20 |
| | USBiological | Villin Mab Mo xHu | 3F392 | Human | | IHC | 4°C or -20°C | 20 |
| | YLEM S.R.L. | Anti Villin | CWWB1 | Human | | IHC(Paraffin) | 4°C | |
| | Abnova Corporation | VIL1 Recombinant Protein (P01) | | | | ELISA, WB(Recombinant protein), Antibody Production, Array | -80°C | |
| | Abnova Corporation | VIL1 Recombinant Protein (Q01) | | | | ELISA, WB(Recombinant protein), Antibody Production, Array | -80°C | 30 |
| | Novus Biologicals | VIL1 Partial Recombinant Protein, VIL1 Partial Recombinant Protein (Q01) | | | | ELISA, WB. Other unit sizes are available | -20°C or -80°C | 40 |
| | Novus Biologicals | VIL1 Recombinant Protein | | | | ELISA, WB. Other unit sizes are available | -80°C | 40 |

【 0 0 2 7 】

ポリクロナール抗体及びモノクロナール抗体の調製は、製品の添付書類、販売元のホームページ該当サイト等に従って行えばよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の方法は例えば間接法により実施することができる。この方法による場合、通常本発明のVIL1に対する抗体を一次抗体として用い、一次抗体に対する抗体を二次抗体とし

て用いる。

【0029】

試料は、例えば、0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行い、0.5%過酸化水素水にて、内因性ペルオキシダーゼの除去を行ったのち、再度、0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行い、次いで、二次抗体を得た動物種と同種の血清を用いて、例えば、2-10%正常血清を含む0.1M リン酸バッファー液と、30-60分間インキュベーションを行い、バックグラウンド染色の原因となる非特異的反応を抑制しておくことよい。次いで、抗体希釈液、例えば、0.1M リン酸バッファー液で適切な濃度に調整しておいた一次抗体を試料に加え、例えば、24-76時間インキュベートする。なお、このまま、直接的に抗体反応として検出する方法、例えば、蛍光物質を直接結合する方法もあるが、間接法の方が応用範囲の広く、高感度の検出が可能となる。

10

【0030】

間接法では、次いで、二次抗体を試料に加えてVIL1を可視化する。可視化する方法としては、二次抗体に蛍光標識を用いる方法、二次抗体に酵素を結合させ、発色基質を沈着させる酵素法、ビオチン化二次抗体を用いて、そこに標識済みのアビジン-ビオチン複合体を検出させるABC法などがある。これらの標識化の技術は当業者に周知であり、例えば、製品の添付書類、販売元のホームページ該当サイト等に詳細に記載されている。ABC法は、一次抗体で、インキュベートした後、例えば、0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行い、ビオチン化二次抗体で、更に2-24時間インキュベートする。これを、再度0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行ったのち、アビジン-ビオチン複合体で1-2時間インキュベートする。それをDAB(ジアミノベンジジン)反応液で発色させる。DAB反応液は、例えば、トリスバッファー液で調整し、過酸化水素水を加えて用いる。また、アンモニウムニッケルサルフェートを加える事もある。

20

【0031】

3. 診断対象疾患

本発明においては、VIL1に対する抗体を、子宮頸癌の存在又は予後の診断に用いる。特に、本発明で用いられるVIL1に対する抗体は、子宮頸部腺癌に対して特異性が高く、子宮頸癌の予後と特に高い相関性を有するため、これらの診断で特に有益である。

【0032】

また、本発明のVIL1に対する抗体を用いる診断方法は、他の特定の診断方法と組合せることでより効果的に子宮頸部腺癌の存在又は子宮頸癌の予後を診断することができる。

30

例えば、パパニコロ染色による子宮頸部癌の細胞診は、子宮頸部扁平上皮癌では有効であるが、子宮頸部腺癌では偽陰性となる(非特許文献1)。このため、パパニコロ染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性と判断された患者を対象として本発明の方法を実施することは、効率的に子宮頸部腺癌を検出する上で有益である。

【0033】

また、欧米諸国では、16型及び18型等のヒトパピローマウイルスの感染は、そのウイルスの型(タイプ)により、子宮頸部腺癌を推定診断できるとの報告があるが、本発明者の検討結果によれば、日本人子宮頸部扁平上皮癌の患者では高い感染頻度を示したものの、日本人子宮頸部腺癌では、その感染頻度は低く、関連性を示さなかった。そのため、日本人子宮頸部腺癌に対しては、ヒトパピローマウイルスタイピングが、補助診断とならない危険性がある。よって、これらヒトパピローマウイルス感染のない患者を対象として本発明の方法を実施することは、子宮頸部腺癌を検出する効率的な検査法となる。

40

【0034】

また、欧米諸国においては、今後、パピローマウイルスワクチンの使用が予定されており、その効果により、ヒトパピローマウイルスの感染が原因の子宮頸部腺癌は激減すると期待されている。よって、今後は、ヒトパピローマウイルスの感染が原因でない子宮頸部腺癌が、大きな問題となることが予測される(非特許文献1)。

例えば、ヒトパピローマウイルスは、6型、11型、16型、18型52型及び58型を含む多くの型が子宮頸部腺癌の原因と考えられており、これらヒトパピローマウイルス

50

の診断で陰性の患者に対して、本発明の方法を実施することで、上記問題に対応することが可能とする。

【0035】

同様に、本発明の方法で検出される子宮頸部腺癌の中には、p16^{INK4a}の検査で陰性と判断された患者も含まれており、汎用される、p16^{INK4a}の検査で陰性と診断された患者に、本発明の方法を実施することで、子宮頸部腺癌の検出率を向上させることができる。

【0036】

更に本発明者は、今回、子宮頸癌の予後に関し、VIL1を、HPV及び/又はp16^{INK4a}と組み合わせることが有用であることを見出した。具体的には、VIL1のみをマーカーとして用い、VIL1が陽性とされた患者の健存率と、VIL1とHPV及び/又はp16^{INK4a}とを組み合わせ 10
てマーカーとして用い、VIL1が陽性で、HPV感染が陰性及び/又はp16^{INK4a}が陰性の患者の健存率を比較したところ、前者に比べ後方で健存率がより悪化していることを見出した(図1A及びB)。また、VIL1が陽性で、HPV感染及びp16^{INK4a}が陰性で、且つp53に変異が見られる患者では、VIL1が陽性で、且つHPV感染及びp16^{INK4a}が陰性の患者よりさらに健存率は悪化していた(図1C)。

【0037】

このため、HPV、p16^{INK4a}、及びp53の少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくはHPV及びp16^{INK4a}、特に好ましくはHPV、p16^{INK4a}、及びp53を、VIL1と組み合わせること 20
で、子宮頸癌の予後を正確に予測する上で有益である。

【0038】

4. 分析及び診断手法

本発明の診断方法は、患者の子宮頸部から採取した細胞のVIL1発現量に基づき、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断する方法であり、本発明では、患者の子宮頸部から採取した細胞をVIL1に対する抗体と接触させ、抗体に結合したVIL1の量を測定する工程を含む。

【0039】

抗体に結合したVIL1の量、即ち患者の子宮頸部から採取した細胞のVIL1発現量は、例えば、上記で説明した標識の組織化学的染色における発色の有無及び程度に基づき決定することができる。また、例えば、ELISA方法、フローサイトメトリーによる自動分析、ウェ 30
スタンプロット法等によって実施することもできる。

【0040】

また、本発明の方法による子宮頸部腺癌の診断及び子宮頸癌の予後の診断は、用いる分析法に応じて行えばよい。組織化学的染色方法では、例えば、以下の基準によって上記診断を行うことができる。

【0041】

0: 染まらない。

1: 腫瘍細胞のごく一部の細胞膜が染まる。

2: 細胞質と細胞膜の両方、又は細胞質若しくは細胞膜のどちらかが、いくつもの腫瘍細胞で染まっている。

総合判定: 0は陰性、1及び2が陽性。

【実施例】

【0042】

以下、本発明を実施例に基づき更に詳細に説明する。但し、以下の実施例は本発明の技術的範囲に何らの影響を及ぼすものではない。

【0043】

1. 試料

放射線医学総合研究所で子宮頸部、子宮体部又は膣を発生部位とする子宮癌患者と診断され治療を行っている日本人の患者の中から、機関の審査委員会による同意書に同意し、臨床記録と生検組織の研究使用許可へのインフォームドコンセントを行った患者122人を対象とした。患者の平均年齢は60歳である。全症例中、子宮頸部扁平上皮癌は74例、子 50

宮頸部腺癌は31例、子宮体部腺癌は5例であった。

【0044】

122人のうち、44人（子宮頸部扁平上皮癌は31例、子宮頸部腺癌は11例、子宮体部腺癌は2例）は全骨盤に30.6Gyの放射線療法を受け、更に、 ^{192}Ir 高線量率腔内近接照射とともに中央遮蔽での骨盤照射を50.6Gyで実施した患者である。他の54症例（子宮頸部扁平上皮癌は33例、子宮頸部腺癌は12例、子宮体部腺癌は1例、その他の症例は8例）は、同様の放射線療法を受け、更に、1週間隔で40mg/m²のシスプラチンを5回に分けて投与した患者である。他の24症例（子宮頸部扁平上皮癌は6例、子宮頸部腺癌は15例、子宮体部腺癌は2例、その他の症例は1例）は71.2 GyEの炭素線療法を受けた患者である。

【0045】

全対象患者うち、110人は2年以上、腫瘍の再発転移について追跡した。

23人は遠隔転移を認め（M1）、6人は大きな腫瘍で侵襲的な局所腫瘍（T4）であったので、予後解析対象から除外した。除外した患者の内訳は、子宮頸部扁平上皮癌は19例、子宮頸部腺癌は5例、子宮体部腺癌は0例、その他の症例は3例である。1例は遠隔転移を認め（M1）、且つ大きな侵襲的腫瘍（T4）である。

【0046】

すべての生検試料は放射線療法前に子宮頸部より採取されたものである。生検試料は10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋を行った。ゲノムDNAはRNAlaterに浸けた生検試料より抽出した（非特許文献22参照）。

【0047】

2. 統計解析方法

フィッシャーの正確確率検定を、VIL1免疫組織化学法の発現、HPV感染、病理分類、p53変異、及びp16^{INK4a}免疫組織化学法の発現のそれぞれの検討因子間における相関関係を解析するのに用いた。P値が0.05よりも小さければ、有意の差が「ある」とした。予後検定は、二年間の追跡調査中の再発、転移及び腫瘍死を評価項目とし、再発転移のない無病生存について、経時的に、Kaplan-Meier法にて生存曲線を描き、ログランク検定で有意差を計算した。

【0048】

3. 定量PCR法

3-1. 操作手順

VIL1遺伝子をプライマーとして用い、腫瘍DNAと参照DNAについてPCRを行った。93症例の子宮頸癌患者のゲノムDNAをRNAlater中の生検サンプルからGenomic-tip (100/G) (QIAGEN)にて抽出精製した。参照DNAとして市販のHuman genomic DNA from females (Promega)を使用した。PCR反応液には30ngのゲノムDNAを用いた。プライマーはProbeFinder Software (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)でデザインし、ハイブリダイゼーションプロブはUniversal Probe Library (Roche)から適当なものを選択した。用いたプライマーの塩基配列は、下記の表に記載の通りである。

【0049】

10

20

30

【表 3】

プライマー配列

| 遺伝子名 | 方向* | プライマー配列 (5' > 3') | プローブ†† | 生産物の大きさ (bp) | |
|------|-----|------------------------|--------|-----------------|----|
| VIL1 | F | ggtgaagcagggacacga | #72 | 78 | 10 |
| | R | ttggtgttactccacttgaagg | | | |

略語:

F: フォワード

R: リバース

*: プライマー配列の方向

†: Universal ProbeLibrary のプローブID番号

20

【 0 0 5 0 】

PCR試薬はLightCycler480 Probes Master (Roche) を使用し、定量PCR装置はLightCycler480 (Roche) を使用した。PCR反応条件は95 °Cで10分間1本鎖に変性させた後、95 °Cで20秒、55又は60 °Cで30秒、72 °Cで30秒温度を変化させるサイクルを40~45回行って目的の遺伝子を増幅させた。

【 0 0 5 1 】

3 - 2 . 結果

ゲノムDNAのVIL1コピー数を参照DNAのVIL1コピー数で除し、相対値を求めた。VIL1コピー数相対値解析では扁平上皮癌と腺癌症例の間で、VIL1のコピー数に有意差を認めた ($P=0.049$) (図 2)。

30

【 0 0 5 2 】

4 . 免疫組織化学染色

4 - 1 . 染色手順及び判断基準

VIL1及びp16^{INK4a}について、自動染色機Ventana Discovery System (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) を使用し、ストレプトアビジン-ビオチン免疫ペルオキシダーゼ染色を行った (非特許文献 2 3 参照)。一次抗体であるVIL1マウスモノクローナル抗体 (CELL MARQUE, CA) と抗ヒトp16^{INK4a}マウスモノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific, IPR, UK) はantibody dilution buffer (Ventana) で100倍希釈にして使用した。二次抗体には、VIL1、p16^{INK4a}とも、Discovery Universal Secondary Antibody (Ventana) を用いた。陰性コントロールには、一次抗体を加えない希釈液のみを使用した。

40

【 0 0 5 3 】

免疫組織化学染色による評価は、VIL1、及びp16^{INK4a}の各染色パターンによりそれぞれ以下の基準により行った。

【 0 0 5 4 】

1) VIL1

0: 染まらない。

1: 腫瘍細胞のごく一部の細胞膜が染まる。

2: 細胞質及び細胞膜の両方が、又は細胞質若しくは細胞膜どちらかが幾つもの腫瘍細胞で染まっている。

50

総合判定：0は陰性、1と2を陽性とした。

【 0 0 5 5 】

2) p16^{INK4a}

0：細胞核と細胞質が染まっているものが1%に満たない。

1：細胞核と細胞質が染まっているものが1～10%で、染まりは弱く、散在している。

2：染まっているのが10～30%で染まりが強い。

3：染まっているものが30%よりも多く、標本のいくつもの領域で存在し、染まりも強い。

総合判定：スコア0、1、2は陰性で3を陽性とした。

【 0 0 5 6 】

4 - 2 . 結果

1) VIL1

上記免疫組織化学染色では、VIL1は正常な小腸上皮(図3A)に見られ、正常な子宮体部や子宮頸部では、その発現が観察されなかった(図3B及び図3C)。122症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本について免疫組織化学染色を実施した。子宮頸部腺癌(図3D)の症例(13/31)においてVIL1染色陽性となり、総ての扁平上皮癌症例(81/81)においてVIL1染色陰性となった(図3E)。VIL1免疫染色陽性試料において子宮頸部扁平上皮癌と子宮頸部腺癌との間で有意差が見られた($P < 0.0001$)。VIL1陽性腫瘍は総て子宮頸部腺癌であった。子宮頸部腺癌の診断マーカーとしての検出感度は41%であり、選択性は100%であった。

【 0 0 5 7 】

2) p16^{INK4a}

p16^{INK4a}の染色では、評価可能な114例中97例(85%)が陽性であった。子宮頸部扁平上皮癌では、ほとんどの症例(95%)でp16^{INK4a}は陽性であり、対照的に、子宮頸部腺癌では52%の症例でp16^{INK4a}は陰性であった。

【 0 0 5 8 】

5 . ヒトパピローマウイルス (HPV) 遺伝子型タイピング

5 - 1 . HPV linear array assayによるHPV感染の検出

Linear Array HPV Genotyping test (LA HPV GT, Roche) のビオチン化PGMYオリゴヌクレオチドプライマーでHPV遺伝子の標的DNAをPCRにて増幅した。ビオチン化された増幅産物を用いて、Linear Array Detection Kit (LA DK, Roche) を使用し、発色同定により検出した。発色同定はメンブレン上に固相化した37種類のHPV型特異的プローブとビオチン化増幅産物のハイブリダイゼーションを行い、メンブレン上にビオチン化増幅産物を固相化し、続いてストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼを添加してビオチンと反応させた後、さらに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを添加し、青色の発色反応を行った。

【 0 0 5 9 】

5 - 2 . 結果

122人の女性のうち95人(78%)でHPV陽性の癌であった。HPVタイプ16が最も高い頻度で検出された。子宮頸部扁平上皮癌患者79人のうち72人がHPV陽性症例であるのに対して、子宮頸部腺癌患者37人のうち19人がHPV陽性症例であり、子宮頸部腺癌患者よりも子宮頸部扁平上皮癌患者でHPV陽性症例が極めて多かった($P < 0.0001$)。VIL1免疫染色陽性サンプル14症例のうち9例(64%)はHPV陰性であり、HPV感染陰性とVIL1染色陽性の間に相関関係が認められた($P=0.0002$)。

【 0 0 6 0 】

6 . p53変異

6 - 1 . 高精度融解分析法による癌抑制遺伝子p53の変異検出

高精度融解分析法を用いて122症例のDNA試料におけるp53遺伝子のエキソン5～8の変異検出スクリーニングを行った。p53遺伝子のエキソン5～8はPCRにて増幅した。鋳型DNAは対象試料中のDNAのみのもので、これを等量の参照DNAと混ぜたものを用いた。20ulのPCR

10

20

30

40

50

反応液には1xLightCycler480 High Resolution Melting Master (Roche)、それぞれ2.5mMエキソン5、2.5mMエキソン8、3.0mMエキソン6及び3.0mMエキソン7のMgCl₂水溶液、0.2uMのforwardプライマー(配列は表2参照)、0.2uMのreverseプライマー(配列は表2参照)、10ngの鋳型DNAが含まれている。PCR反応装置は、LightCycler 480 thermal cycler (Roche)を使用した。反応条件は95℃で5分間変性させた後、95℃で10秒、60又は63℃で15秒、72℃で10秒の3ステップを45サイクル行い、続けて4.8℃/sの割合で、65℃から95℃の融解解離曲線解析を行った。融解曲線のデータはLightCycler 480 Gene Scanning software (Roche)により、解析を行った。

【0061】

6 - 2 . 結果

122症例のうち15例でp53癌抑制遺伝子に変異があった。VIL1免疫染色陽性試料では、高い頻度すなわち35%が、p53変異をもち(P=0.0147)、p53に変異をもつVIL1陽性症例は総てHPV感染陰性であった。従って、子宮頸部腺癌の一部に、VIL1陽性で、HPV感染陰性、かつp53に変異を持つ、特殊な発癌機構を持つサブタイプがあることが想定された。

【0062】

7 . VIL1の予後診断マーカーとしての評価

治療後2年以上、経過観察が可能であった82人の子宮頸癌患者(子宮頸部扁平上皮癌患者は50例、子宮頸部腺癌患者は25例)について、治療前に生検試料を採取して免疫組織化学染色を実施し、治療後最長で約5年に亘って予後を観察してVIL1の予後診断マーカーとしての評価を行ったところ、VIL1が予後関連因子として有用であることが解った(P=0.0122)。図1A-Cに示すKaplan-Meier生存曲線から解るように、VIL1染色陽性腫瘍であると2年健存率は悪く(P=0.033)(図1A)、子宮頸癌の予後とVIL1が関連することが解った。また、VIL1染色陽性でHPV感染陰性、p16^{INK4a}陰性腫瘍では、さらに2年健存率は悪く(P=0.005)(図1B)、VIL1染色陽性でHPV感染陰性、p16^{INK4a}陰性、p53に変異が見られる腫瘍では、よりさらに2年健存率は悪かった(P=0.0023)(図1C)。

【0063】

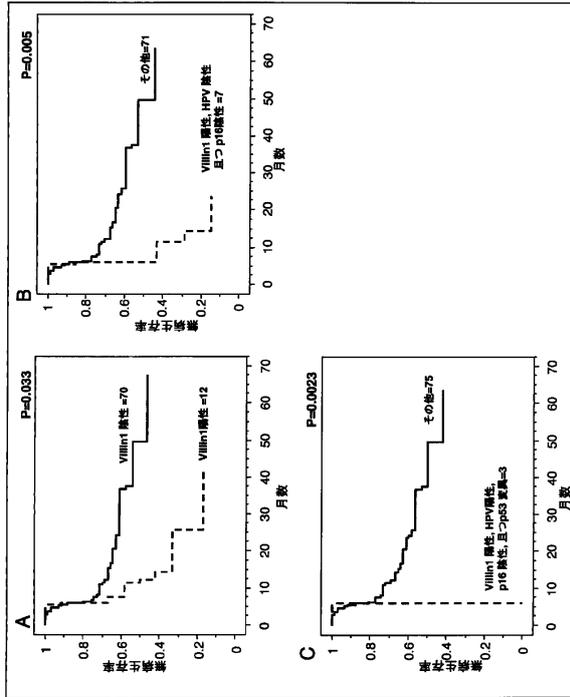
以上の結果は、VIL1の子宮頸癌の予後診断因子としての有用性を実証すると共に、HPV感染の有無、p16^{INK4a}の免疫染色法による発現の有無、及びp53の変異の有無の少なくとも1つをVIL1と組み合わせることで、子宮頸癌の予後診断の精度が向上することを実証する。

10

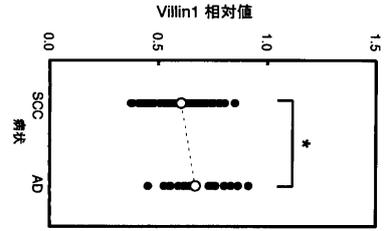
20

30

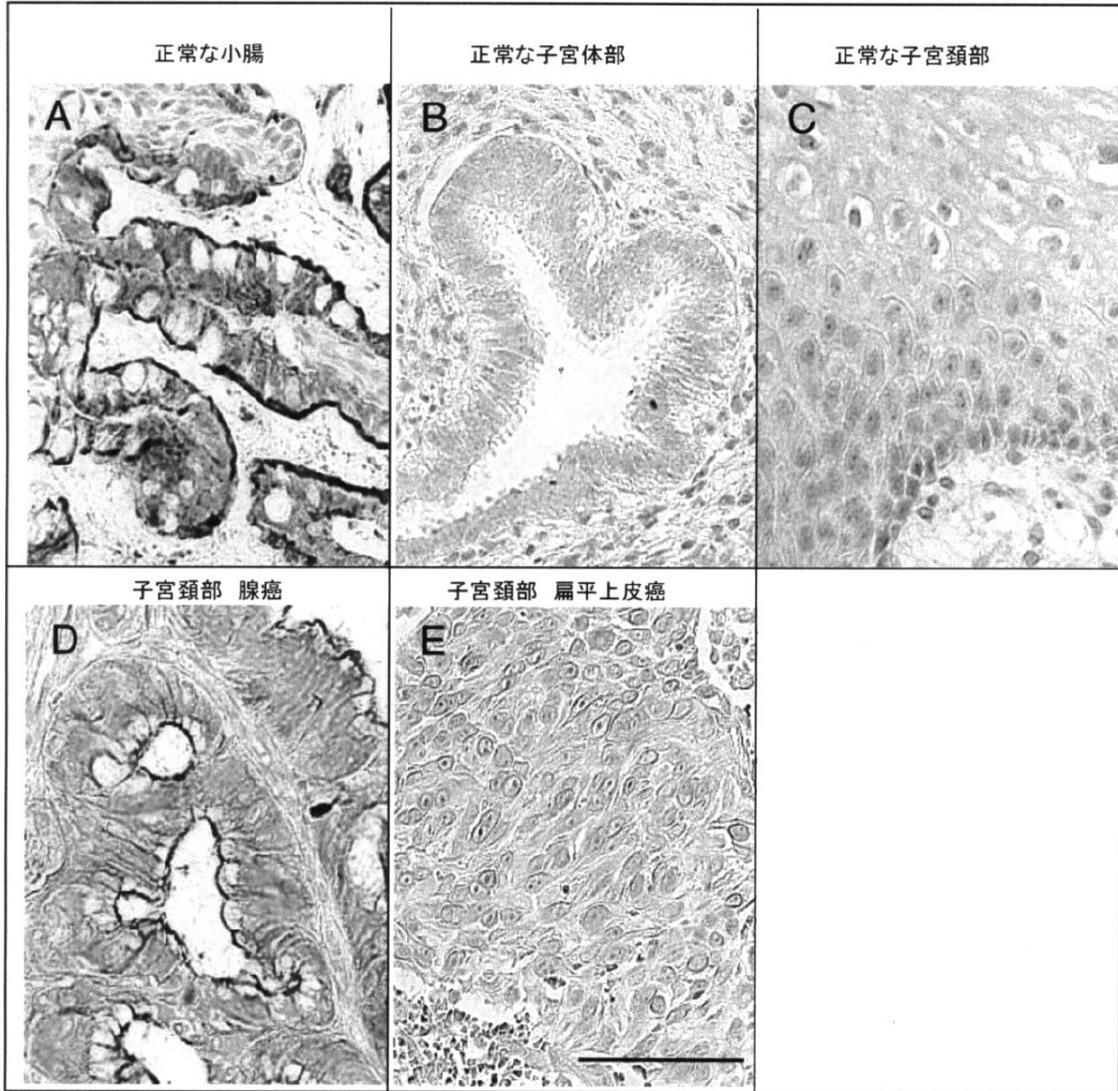
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100097870
弁理士 梶原 齋子
- (74)代理人 100140556
弁理士 新村 守男
- (74)代理人 100143258
弁理士 長瀬 裕子
- (74)代理人 100124969
弁理士 井上 洋一
- (74)代理人 100132492
弁理士 弓削 麻理
- (74)代理人 100163485
弁理士 渡邊 義敬
- (74)代理人 100112243
弁理士 下村 克彦
- (72)発明者 今井 高志
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- (72)発明者 岩川 真由美
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- (72)発明者 加藤 真吾
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- (72)発明者 大野 達也
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特表2007-537197 (J P , A)
S Robine, C Huet, R Moll, C Sahuquillo-Merino, E Coudrier, AZweibaum, and D Louvard, Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?, Proc Natl Acad Sci USA, 1985, Vol.82, No.24, Page.8488-8492
進士誠一, 田尻孝, 田中宣威, 古川清憲, 鈴木英之, 瀬谷知子, 菅隼人, 鶴田宏之, 松本智司, 寺西宣央, 張一光, 石渡俊行, 内藤善哉, 大腸低分化腺癌におけるCK20/CK7/Villin の発現, 第64回日本癌学会学術総会, 2005, Page.397
井上準人, 松井啓夫, 天野英樹, 原英則, 吉村博邦, 蔣世旭, 龍華慎一郎, 片桐真人, 益田典幸, 肺癌患者血清中に認められたvillin1 に対する自己抗体の有用性について, 第48回日本肺癌学会総会, 2007, Page.532
丸尾猛, 吉田茂樹, 子宮頸がん腫瘍マーカー, 産婦人科治療, 1999, Vol.79, No.6, Page.653-660
石川光也, 藤井多久磨, 福地剛, 久布白兼行, 塚崎克己, 向井万起男, 野沢志朗, HPV 感染を指標とした子宮頸部腺癌におけるp16INK4a 蛋白質の過剰発現に関する検討, 第61回日本癌学会総会, 2002, Page.383-384
野末彰子, 西出健, 新井ゆう子, 山田和美, 宮川創平, 3 . 細胞診陰性であった浸潤性子宮頸部腺癌の症例, 第22回茨城医学会産婦人科分科会、第128回日産婦学会茨城地方部会例会, 2001, Page.86

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4
C 1 2 Q 1 / 0 2
C 1 2 Q 1 / 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
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 I)