明　細　書

発明の名称 ：

前立腺癌の進行度の評価のための分析方法、前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、および検査キット

技術分野

[0001] 本発明は、前立腺癌の進行度の評価のための分析方法、前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、前立腺癌の進行度を評価するための検査キット、および前立腺癌を検出するための検査キットに関するものである。

背景技術

[0002] 前立腺特異抗原（ＰＳＡ）は、カリクレイン－３としても知られているが、１９６９年に発見され（非特許文献１）、１９９４年に食品医薬品局（ＦＤＡ）がＰＳＡテストを承認して以降、前立腺癌の最適な診断ツールとして認識されてきた（非特許文献２）。実際、米国において、１年間に、４４００万人いる５０歳以上の男性のうちの少なくとも７０％がＰＳＡテストを受けている。しかしながら、２０１１年１０月に、米国予防医学作業部会（ＵＳＰＳＴＦ）は、前立腺癌の臨床結果についての統計上の証拠を公表し、健康な男性に対するＰＳＡテストをこれ以上続けないよう主張した（非特許文献３）。この結論は、単純に、前立腺癌患者の全生存率に対するＰＳＡテストの利益が、侵襲性の前立腺生検の事例数および医療費を拡大するリスクを冒してまで行うほどではない、という考えに基づくものであった。前立腺癌による１つの死を防ぐために、５２０万米ドルがＰＳＡスクリーニングに費やされているであろうと見積もられた（非特許文献４）。

[0003] ＰＳＡ以外の前立腺癌バイオマーカーの候補が、現在までに探索されてきた。例えば、非特許文献５には、前立腺疾患の患者から前立腺組織を採取して免疫染色を行う研究によると、前立腺上皮内腫瘍（ＰＩＮ）患者および前立腺癌患者において、ニューロペプチドＹ（ＮＰＹ）およびマクロファージ阻害性サイトカイン－１（ＭＩＣ－１）の前立腺組織における発現が多いこ

とが記載されている。また、特許文献１には、ＮＰＹをコードするｍＲＮＡの量が、正常な前立腺組織と比較して前立腺腫瘍組織では多いことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：日本国公表特許公報「特表２００５－５２３７２７号公報（２００５年８月１１日公表）」

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ablin, R. J., Pfeiffer, L., Gonder, M. J., and Soanes, W. A. (1969), Experimental medicine and surgery 27, 406-410.

非特許文献2：Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., and Andriole, G. L. (1991), The New England journal of medicine 324, 1156-1161.

非特許文献3：Chou, R., Croswell, J. M., Dana, T., Bougatsos, C., Blazina, I., Fu, R., Gleitsmann, K., Koenig, H. C., Lam, C., Maltz, A., Rugge, J. B., and Lin, K. (2011), Annals of internal medicine 155, 762-771.

非特許文献4：Brett, A. S., and Ablin, R. J. (2011), The New England journal of medicine 365, 1949-1951.

非特許文献5：Krishan K. Rasiah, James G. Kench, Margaret Gardiner-Garden, Andrew V. Biankin, David Golovsky, Phillip C. Brenner, Raji Kooner, Gordon F. O’Neill, Jennifer J. Turner, Warick Delprado, C. Soon Lee, David A. Brown, Samuel N. Breit, John J. Grygiel, Lisa G. Horvath, Phillip D. Stricker, Robert L. Sutherland, and Susan M. Henshall, (2006), Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(4), 711-716.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上述のように、ＰＳＡが前立腺癌のバイオマーカーとして臨床で使用されている。しかしながら、前立腺癌の過剰診断による上述のリスクを低減するために、ＰＳＡの特異度の低さを効果的に補完し得る検出方法の開発が強く望まれている。

[0007] また、前立腺癌の進行度の評価は、従来、侵襲性の高い生検を行った後、病理的な検鏡像から主観的に判断するほかない。血液検査段階などの早期において前立腺癌の進行度が評価できれば、患者の負担を大きく低減し、客観的な基準を用いて迅速な治療方針の決定を行うことができる。そのため、早期に行うことができる、前立腺癌の進行度の評価方法の開発も望まれている。

[0008] なお、非特許文献５は、前立腺組織におけるＮＰＹの発現量について述べたものであり、その他の試料（血液および尿など）における存在量については何も示されていない。組織における発現量が、その他に由来する試料における存在量と相関していないことは、種々のタンパク質について知られているところである。さらに、非特許文献５では、前立腺組織におけるＮＰＹの発現量は前立腺癌の進行度と相関していないことが示されている。また、特許文献１は、ＮＰＹのペプチド量と前立腺癌の進行度との関係についての記載したものではない。さらに、非特許文献５および特許文献１の何れにも、感度および特異度についての検証データはない。

[0009] 本発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、前立腺癌の進行度の評価のための分析方法、前立腺癌の進行度の評価方法、および、ＰＳＡの特異度の低さを効果的に補完し得る前立腺癌の検出方法などを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量を測定する工程を含む。

[0011] 本発明に係る前立腺癌の検出方法は、生体から採取した血液または尿に由

来する試料において、ニューロペプチドＹの量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含む。

[0012] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量を測定する工程を含む。

[0013] 本発明に係る検査キットの一態様は、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するためのペプチドプローブを含む。

[0014] 本発明に係る検査キットの別の一態様は、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体を含み、生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含む。

[0015] 本発明に係る検査キットのさらに別の一態様は、前立腺癌を検出するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、および、前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含む。

[0016] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2013-061094号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0017] 本発明は、前立腺癌の進行度の評価のための分析方法、前立腺癌の進行度の評価方法、および、ＰＳＡの特異度の低さを効果的に補完し得る前立腺癌の検出方法などを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]実施例における、RefinerMS softwareの全体的なワークフローを示す図である。

[図2]実施例における、ＱＵＥＳＴ－ＭＳ技術の概要およびＱＵＥＳＴ－ＭＳ技術による精製の結果を示す図である。

[図3]実施例における、Expressionistプロテオームサーバーにおける Absent/Present Search法による前立腺癌のバイオマーカーのスクリーニングの結果を示す。

[図4]実施例における、ＮＰＹのついての免疫組織化学的な染色解析の結果を示す図である。

[図5]実施例における、バイオマーカーの確認実験において用いたＮＰＹについてのＭＲＭ条件の最適化を示す図である。

[図6]実施例における、ＭＲＭに基づくＮＰＹ測定の量的再現性の評価を示す図である。

[図7]実施例における、ＮＰＹ（ＭＲＭクロマトグラムの面積）、ＰＳＡ（病院におけるＥＬＩＳＡによって測定された値）、またはＮＰＹ＋ＰＳＡ（ロジスティック曲線回帰スコア）のそれぞれについてのＲＯＣ曲線の比較を示す図である。

[図8]実施例における、ＲＯＣ曲線解析による診断潜在性の評価を示す図である。

[図9]実施例における、手術前および手術後のサンプルにおける血漿ＮＰＹレベルの結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] 本願発明者らは、今回、バイオマーカーの探索において有用なＱＵＥＳＴ－ＭＳ（Quick Enrichment of Small Targets for Mass Spectrometry）技術を独自に開発した。そして、前立腺癌のバイオマーカーを同定するために、ＱＵＥＳＴ－ＭＳ技術を適用した。その結果、ニューロペプチドＹ（ＮＰＹ）が前立腺癌の進行度と高度な関連性を有していること、および、ＮＰＹがＰＳＡの特異度の低さを効果的に補完し得ることを見出し、本発明を完成さ

せるに至った。

[0020] 〔１．前立腺癌の進行度の評価のための分析方法および前立腺癌の進行度の評価方法〕

本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、生体から採取した血液由来または尿由来の試料において、ニューロペプチドＹ（ＮＰＹ）の量を測定する工程を含んでいる。

[0021] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液由来または尿由来の試料において、ＮＰＹの量を測定する工程を含んでいる。

[0022] 本発明に係る分析方法および評価方法は、好ましくは、ＮＰＹの量を測定する工程に加え、さらに、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡ、およびＰＣＡ３（prostate cancer antigen 3；prostate cancer gene 3）ＲＮＡのうちの少なくとも１つの量を測定する工程を含んでいる。本発明に係る分析方法および評価方法は、より好ましくは、ＮＰＹの量を測定する工程に加え、さらに、ＰＳＡの量を測定する工程を含んでいる。

[0023] なお、本発明において測定され得るポリペプチド（ＮＰＹおよびＰＳＡ）をまとめて、以下「前立腺癌マーカーペプチド」と称する。また、本発明において測定され得るＲＮＡ（ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡおよびＰＣＡ３ ＲＮＡ）をまとめて、以下「前立腺癌マーカーＲＮＡ」と称する。また、「前立腺癌マーカーペプチド」および「前立腺癌マーカーＲＮＡ」をまとめて、以下「前立腺癌マーカー」と称する。

[0024] 「前立腺癌マーカーペプチド」には、上記ポリペプチドの全長だけでなく、そのフラグメントも包含され、また、上記ポリペプチドの前駆体も包含される。すなわち、例えば、「ＮＰＹの量を測定する」とは、全長のＮＰＹポリペプチド、ＮＰＹポリペプチドのフラグメント、およびＮＰＹポリペプチドの前駆体のうちの少なくとも１つを測定することを意味する。量が測定されるＮＰＹは、例えば、NPY_{1-97}、NPY_{1-28}、NPY_{29-97}、NPY_{68-97}、NPY_{29-67}またはNPY_{29-64}であり得る。また、これらの分解物で

あり得る。また、ＮＰＹ$_{31-47}$、ＮＰＹ$_{54-61}$、ＮＰＹ$_{68-80}$もしくはＮＰＹ$_{81-88}$、またはこれらの何れか部分を含む全長ＮＰＹもしくはＮＰＹフラグメントであり得る。

[0025] 「前立腺癌マーカーＲＮＡ」には、上記ＲＮＡの全長だけでなく、そのフラグメントも包含され、また、上記はＲＮＡの前駆体も包含される。なお、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧは、ＴＭＰＲＳＳ２遺伝子とＥＲＧ遺伝子との融合ｍＲＮＡである。ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧにおけるＴＭＰＲＳＳ２とＥＲＧとの融合様式は、特に限定されず、例えば、文献：Jianghua Wang, Yi Cai, Chengxi Ren, and Michael Ittmann, Cancer Res 2006; 66: 8347-8351.に記載されているものが挙げられる。ＰＣＡ３ ＲＮＡは、ＰＣＡ３遺伝子の転写産物であり、ｎｏｎ－ｃｏｄｉｎｇ ＲＮＡである。

[0026] 上述の前立腺癌マーカーペプチドは、特に、前立腺癌患者由来の血清において、健常人由来の血清に比してより多く検出される。そのため、特に血清中の前立腺癌マーカーペプチドの存在量を測定して健常人における存在量と比較することによって、前立腺癌を検出し得る。また、上述の前立腺癌マーカーＲＮＡは、特に、前立腺癌患者由来の尿において、健常人由来の尿に比してより多く検出される。そのため、特に尿中の前立腺癌マーカーＲＮＡの存在量を測定して健常人における存在量と比較することによって、前立腺癌を検出し得る。

[0027] さらに、ＮＰＹについては、前立腺癌における特異度が優れており、また、その量が前立腺癌の進行度と高度に相関している（後述の実施例参照）ため、とりわけ、前立腺癌の進行度を評価するためのバイオマーカーとして特に好ましい。

[0028] ここで、「前立腺癌」とは、腺癌（前立腺腺癌）を包含する前立腺に発生する悪性腫瘍を指す。

[0029] 「進行度」とは、Gleason Score（ＧＳ）、ＴＮＭ分類、または血清ＰＳＡ値などの基準に基づく進行度を指す。なお、本発明において、「進行度」には、癌である場合にその進行具合を評価するだけでなく、癌でないとの評価

も包含され得る。「前立腺癌の進行度の評価」は、前立腺癌に罹患している被験体についてその進行度を評価することだけでなく、被験体が前立腺癌に罹患していないと評価することも包含され得る。すなわち、「前立腺癌の進行度の評価」には、「前立腺癌に罹患していない」という評価も含まれ得る。

[0030] 「感度」とは、特定の疾患を発症している集団に対して検査を行ったときの陽性（異常被験体値）を示す割合（真の陽性の割合）を指す。また、「特異度」とは、特定の疾患を罹患していない集団に対して検査を行ったときの陰性（正常値）を示す割合（真の陰性の割合）を指す。また、「陽性的中率」は、検査において陽性を示した被験体のうち、実際に疾患を罹患している個体の割合を指す。また、「陰性的中率」は、検査において陰性を示した被験体のうち、実際に疾患を罹患していない個体の割合を意味している。

[0031] 本発明に係る分析方法および評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料においてＮＰＹの量を測定する工程を含めばよく、その他の具体的な工程、ならびに使用する器具および装置は特に限定されるものではない。

[0032] 本明細書において、「前立腺癌マーカーの量を測定する」とは、生体試料またはこれを精製して得られる試料における前立腺癌マーカーの存在量または濃度を測定することを意図している。「前立腺癌マーカーの量」は、絶対量（絶対質量または絶対濃度）あってもよいし、相対量（相対質量または相対濃度）であってもよい。また、例えば、質量分析におけるピーク面積、または発光測定における発光強度などでもあってもよいし、所定の基準に対して何倍であるかを示す値であってもよい。

[0033] 本発明において用いる「試料」は、生体（被検体）から採取した血液または尿に由来する試料である。血液に由来する試料としては、例えば、全血液、血清、血漿などが挙げられる。ＮＰＹの量を測定する場合およびＰＳＡの量を測定する場合には、「試料」としては、中でも、全血液、血清および血漿が好ましく、血清および血漿がより好ましい。ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧの

ｍＲＮＡの量を測定する場合およびＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定する場合には、「試料」としては、中でも、尿が好ましい。

[0034] また、被験体は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルなどであり、好ましくはヒトである。採血部位としては、例えば、肘窩皮静脈、橈側皮静脈、および尺側皮静脈などが挙げられる。なお、複数種の前立腺癌マーカーの量を測定する場合、同一試料を用いて測定してもよいし、互いに異なる試料を用いて測定してもよい。

[0035] また、被験体は、前立腺癌に罹患していることが予めわかっていてもよいし、あるいは、前立腺癌に罹患しているか否かわかっていなくてもよい。前立腺癌に罹患していることがわかっている場合、その被験体の前立腺癌がどの程度進行しているか評価することができる。また、前立腺癌に罹患しているか否かわかっていない場合、その被験体が前立腺癌に罹患しているか否か、および罹患している場合に前立腺癌がどの程度進行しているか評価することができる。

[0036] 本発明の評価方法の一例として、被験体由来の生体試料中におけるＮＰＹの量を測定し、対照被験体（健常人および各進行度の前立腺癌患者）由来の生体試料中におけるＮＰＹの量を測定し、両者を比較することによって、前立腺癌の進行度を評価することができる。具体的には、被験体由来の試料におけるＮＰＹの量と、各対照被験体由来の試料におけるＮＰＹの量とを比較して、統計学的に、この被験体が前立腺癌に罹患しているか、および前立腺癌に罹患している場合にはどの程度の進行度であるかを評価することができる。対照被験体由来の試料におけるＮＰＹの量は予め測定したものを用いることが可能である。あるいは、予め対照被験体由来の生体試料におけるＮＰＹの量を測定して、これに基づいて各進行度における量の範囲を定めておき、被験体由来の生体試料においてＮＰＹの量がある進行度の量の範囲内にある場合に、その進行度であると判定することも可能である。

[0037] また、対照被験体として、健常人および各進行度の前立腺癌患者とは別に、良性前立腺肥大症（ＢＰＨ）患者を加えることによって、より高精度で進

行度を判定することができる。本発明に係る分析方法および評価方法では、特に、偽陽性となりやすいＢＰＨと前立腺癌とを、より高精度で区別することができる。

[0038] なお、対照被験体は、進行度が異なる２以上の前立腺癌患者を少なくとも含んでいればよく、健常人およびＢＰＨ患者を含んでいない場合もあり得る。

[0039] 被検体のＮＰＹの量と対照被験体のＮＰＹの量とを比較する場合、その有意差は、例えば、ｔ検定、Ｆ検定、カイ二乗検定、またはMann-Whitney's U testなどの統計学的手法によって判断できる。

[0040] さらに、ＮＰＹと上述した他の前立腺癌マーカーとを組み合わせて評価を行うことによって、前立腺癌の進行度についてより正確な評価を行うことが可能となる。

[0041] 一例として、ＮＰＹとＰＳＡとを組み合わせて評価を行う場合、例えば、測定したＮＰＹの量およびＰＳＡの量を用いて、ロジスティック回帰スコアを算出する。算出方法は、例えば、文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), Biometrics 62, 221-229.に記載の方法を用いればよい。このロジスティック回帰スコアに基づいて前立腺癌の進行度を算出する。ＮＰＹとＰＳＡとの組み合わせは、感度および特異度の何れもが特に良好であり、前立腺癌の進行度についてさらに正確な評価を行うことが可能となる。

[0042] また、ロジスティック回帰法は、ＮＰＹとＰＳＡとの組み合わせ以外にも、ＮＰＹと少なくとも１つの他の前立腺癌マーカーとの組み合わせに対して、用いることができる。

[0043] 前立腺癌マーカーペプチドの量を測定する方法は、前立腺癌マーカーペプチドの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、各前立腺癌マーカーペプチドに対して特異的な抗体を用いる免疫学的手法を用いた方法、各前立腺癌マーカーペプチドに対して特異的なペプチドプローブを用いる方法、液体カラムクロマトグラフィー法および質量分析法などを用いることができる。抗体を用いる方法としては、

例えば、ＥＬＩＳＡ法、定量ウェスタンブロッティング法、ラジオイムノアッセイ法、イムノクロマトグラフィー法、および免疫沈降法などが挙げられる。ＥＬＩＳＡ法の種類としては、特に限定されないが、いわゆる抗原測定系（生物試料中に含まれる抗原量の測定）である、直接吸着法によるＥＬＩＳＡ、競合法によるＥＬＩＳＡ、サンドイッチ法によるＥＬＩＳＡ、およびマイクロ流路式またはマイクロビーズなどを利用した、微量試料の測定に特化したＥＬＩＳＡなどが挙げられる。

[0044] 各前立腺癌マーカーペプチドに特異的な抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。例えば、ヒトのＮＰＹおよびＰＳＡのアミノ酸配列はUniProtなどの公共データベースより入手可能である。例えば、データベースUniProtにおいて、ヒトのＮＰＹの登録番号はP01303であり、ヒトのＰＳＡの登録番号はP07288である。これらの情報に基づけば、当業者は容易に各前立腺癌マーカーペプチドに特異的な抗体を作製するための抗原として適切なアミノ酸配列を決定することができる。

[0045] 本発明において「抗体」とは、免疫グロブリンのすべてのクラスおよびサブクラス、ならびに抗体の機能的断片を含む形態であることを意図している。当該抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の何れの天然型抗体も含む概念であり、その他に、遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体、ならびに当該抗体の機能的断片を含む。「抗体の機能的断片」とは、前述の抗体の一部分の領域を有し、かつ抗原結合能を有しているもの（結合性断片と同義）を指す。天然型抗体は、特に限定はされないが、ヒト、マウス、ラット、サル、ヤギ、ウサギ、ラクダ、ラマ、ウシおよびニワトリなどを含む、あらゆる生物種に由来し得る。遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体としては、特に限定はされないが、天然型抗体を遺伝子改変して得られるヒト化抗体および霊長類化抗体などのキメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、変異導入抗体およびグラフト結合抗体（例えば、他のタンパク質および放射性標識などがコンジュゲートまたは融合している抗体）が挙げられ、既に

遺伝子組換え技術を用いて製造された抗体に対して、上述のように天然型抗体を遺伝子改変する場合と同様の改変を施した抗体も含まれる。また、抗体の機能的断片としては、具体的には例えばＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ（variable fragment ofantibody）、ｓＦｖ、ｄｓＦｖ（disulphide stabilized Fv）およびｄＡｂ（single domain antibody）などが挙げられる。

[0046] さらに、本発明において結合性断片は、対象とするポリペプチドに対して反応性を維持する範囲において変異導入された抗体断片も結合性断片の概念として含んでいる。前述の変異導入は、当業者によって適宜選択される、遺伝子改変技術などの公知の技術を用いて行われる。

[0047] 上述の抗体の検出は、検出可能なシグナルを誘引できるレポーター分子で標識した二次抗体と複合体を形成させることによって行い得る。あるいは、上述の抗体がレポーター分子で予め標識されていてもよい。レポーター分子は、例えば、酵素、発蛍光団含有分子、または放射性核種含有分子である。このようなレポーター分子は、様々なものが公知であり、適宜選択すればよい。

[0048] レポーター分子として酵素を用いる場合、酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどを用いることができる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物などの架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を用いることができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジシンなどを用いることができる。また、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、パラニトルフェノールなどを用いることができる。放射性核種としては、^{125}Ｉまたは^{3}Ｈなどを用いることができる。蛍光色素としては、フルオロレッセンスイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）またはテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）などを用いることができる。

[0049] 二次抗体を固相化した金コロイドの凝集で検出するイムノクロマトグラフィーなどの簡便な測定系を用いることもできる。

[0050] また、ペプチドプローブを用いた方法では、例えば、上述のレポーター分子が標識されたペプチドプローブを用いることができる。

[0051] このように、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定においては、発色もしくは蛍光測定を包含する発光測定法、または放射測定法などを用いることができる。

[0052] 質量分析法は、公知の質量分析装置を用いて行えばよい。質量分析装置を用いた質量分析法は、感度および精度に優れているため、正確な判定を行うことができる。さらに、多成分同時分析が可能なマルチチャネル型の質量分析装置を用いることによって、２以上の前立腺癌マーカーペプチドの量を一度に測定することが可能となる。さらには、前立腺癌以外の他の疾患に関するバイオマーカーも同時に測定することが可能となり、一度に様々な疾患についての検出を試みることが可能となる。また、より精度よく検出をおこなうためには、タンデム質量分析装置（ＭＳ／ＭＳ）を用いることが好ましい。本発明の検出方法において用いられる質量分析装置としては定量可能であれば特に限定されず、四重極型および飛行時間型など従来公知の型の質量分析装置を用いることが可能である。

[0053] 前立腺癌マーカーペプチドの量を測定する方法は、中でも、質量分析法または発光測定法が好ましい。

[0054] 前立腺癌マーカーペプチドの量の測定に用いられる試料は、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定を行う前に、逆相抽出に２回以上供することによって、ＮＰＹを含む画分として濃縮して、この画分についてＮＰＹの量の測定を行うことが好ましい。これにより、大きなタンパク質（例えば、＞２０ｋＤａ）が効率的に除去され、ＮＰＹの量の測定の精度が高まる。ＮＰＹを含む画分として回収する画分は、ＮＰＹを含む限りその分子量の範囲に限定されず、例えば、分子量が２０ｋＤａ未満のペプチドを含むような画分を回収すればよい。また、ＮＰＹ以外の前立腺癌マーカーペプチドの量も測定する

場合には、その分子量に合わせて回収する画分を決定すればよい。逆相抽出は、例えば、後述の実施例に記載されているＱＵＥＳＴ－ＭＳ技術を用いることが好ましい。

[0055] また、質量分析法を用いて測定を行う場合、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定に用いられる試料は、生体から採取した後、前立腺癌マーカーペプチドの量の測定を行う前に、変性処理を行うことが好ましい。変性処理としては、例えば、カオトロピック塩の添加、酸変性、加熱処理、および界面活性剤の添加などが挙げられる。変性剤としては、例えば、尿素、およびグアニジン塩酸などが挙げられる。次いで、還元およびアルキル化を行うことが好ましい。還元およびアルキル化は公知の方法を用いればよい。これらの変性、還元およびアルキル化の処理によって、ペプチド中のシステインのジスルフィド結合が切断およびブロッキングされる。そのため、質量分析の前に行う消化処理において、トリプシンなどの消化酵素による消化を十分に行うことができる。

[0056] なお、複数の前立腺癌マーカーペプチドの量を測定する場合、その種類によって測定する方法が異なっていてもよいし、同じであってもよい。

[0057] 前立腺癌マーカーＲＮＡの量を測定する方法は、前立腺癌マーカーＲＮＡの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、ＰＣＲ法などの核酸増幅法を用いてＲＮＡを増幅する手法などを用いることができる。核酸増幅法を用いる方法としては、例えば、逆転写ＰＣＲ法、リアルタイムＰＣＲ、および定量ＲＴ－ＰＣＲなどが挙げられる。直接的にＲＮＡを検出する方法としてはノーザンブロット法などが挙げられる。なお、前立腺癌マーカーＲＮＡの量を測定する際に、生体試料に含まれるＲＮＡを鋳型にしてｃＤＮＡを調製してもよい。

[0058] ヒトのＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧおよびＰＣＡ３の塩基配列はＮＣＢＩなどの公共データベースより入手可能である。例えば、データベースＮＣＢＩにおいて、ヒトのＴＭＰＲＳＳ２の登録番号はNM_005656であり、ヒトのＥＲＧの登録番号はNM_004449であり、ヒトのＰＣＡ３の登録番号はNR_015342であ

る。また、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧにおけるＴＭＰＲＳＳ２とＥＲＧとの融合様式の例は、例えば、文献：Jianghua Wang, Yi Cai, Chengxi Ren, and Michael Ittmann, Cancer Res 2006; 66: 8347-8351.に記載されている。これらの情報に基づけば、当業者は容易にＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡまたはＰＣＡ３ ＲＮＡを増幅するための適切なプライマーを設計することができる。また、これらの情報に基づけば、当業者は容易にＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡまたはＰＣＡ３ ＲＮＡをノーザンブロット法などによって検出するための適切な核酸プローブを設計することができる。

[0059] なお、複数の前立腺癌マーカーＲＮＡの量を測定する場合、その種類によって測定する方法が異なっていてもよいし、同じであってもよい。

[0060] 〔２．前立腺癌の検出方法〕

本発明に係る前立腺癌の検出方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ＮＰＹの量およびＰＳＡの量を測定する工程を含んでいる。

[0061] 本発明の検出方法の一例として、被験体由来の生体試料中におけるＮＰＹの量およびＰＳＡの量を測定し、対照被験体（健常人）由来の生体試料中におけるこのＮＰＹの量およびＰＳＡの量を測定し、両者を比較することによって、前立腺癌を検出することができる。具体的には、例えば、測定したＮＰＹの量およびＰＳＡの量を用いて、ロジスティック回帰スコアを被験体および対照被験体のそれぞれについて算出する。算出方法は、例えば、文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), Biometrics 62, 221-229.に記載の方法を用いればよい。このロジスティック回帰スコアについて両者の間で有意な相違が見られた場合には、この被験体が前立腺癌に罹患しているか、または前立腺癌に罹患している可能性が高いと判定することができる。対照被験体由来の試料におけるＮＰＹの量および／またはＰＳＡの量は予め測定したものを用いることが可能である。あるいは、予め対照被験体由来の生体試料におけるＮＰＹの量およびＰＳＡの量を測定し、ロジスティック回帰スコアを算出して、これに基づいてロジスティック回帰スコアの正常値

範囲を定めておき、被験体由来の生体試料においてロジスティック回帰スコアがその正常値範囲から外れた場合に、前立腺癌に罹患していると判定することも可能である。

[0062] また、対照被験体として、健常人とは別に、ＢＰＨ患者を加えることによって、より高精度で前立腺癌に罹患しているか否かについて判定することができる。本発明に係る前立腺癌の検出方法は、特に、偽陽性となりやすいＢＰＨと前立腺癌とを、より高精度で区別することができる。

[0063] 被検体のロジスティック回帰スコアと対照被験体のロジスティック回帰スコアとを比較する場合、その有意差は、例えば、ｔ検定、Ｆ検定、カイ二乗検定、またはMann-Whitney's U testなどの統計学的手法によって判断できる。

[0064] ＮＰＹの量およびＰＳＡの量を測定する方法は、これらの存在量を定量的もしくは半定量的に決定できる限り、特に限定されるものではなく、例えば、上記〔１．前立腺癌の進行度の評価のための分析方法および前立腺癌の進行度の評価方法〕の欄において記載された方法を用いればよい。

[0065] 本発明に係る前立腺癌の検出方法は、ＰＳＡの特異度の低さを、ＮＰＹによって効果的に補完している（後述の実施例も参照）。その際、ＰＳＡの感度をあまり低下させることがない。すなわち、感度および特異度の何れもが良好であり、前立腺癌をより正確に検出することが可能となる。特に特異度の向上は、過剰診断および不要な生検を減らすことができ、ひいては男性の身体的および精神的ストレスの緩和につながる。

[0066] 〔３．検査キット〕

本発明に係る検査キットの一態様は、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるＮＰＹの量を測定するためのペプチドプローブを含んでいる。本発明に係る検査キットは、好ましくは、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるＰＳＡの量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核

酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含んでいる。

[0067] 本発明に係る検査キットの別の一態様は、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体を含み、生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含んでいる。

[0068] ペプチドプローブとは、ＮＰＹまたはＰＳＡと特異的に結合するペプチド性のプローブを指す。具体的には例えば、ＮＰＹまたはＰＳＡと特異的に結合するペプチド配列が挙げられる。キットに含まれるペプチドプローブは、天然アミノ酸の他に、非天然型アミノ酸を含んで構成されていてもよい。

[0069] 核酸プローブとは、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡまたはＰＣＡ３ ＲＮＡと特異的に結合する核酸プローブを指し、より具体的にはTaqManプローブおよびInvaderプローブなどが挙げられる。核酸プライマーとは、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡもしくはＰＣＡ３ ＲＮＡまたはこれを逆転写したｃＤＮＡを特異的に増幅することができる核酸プライマーを指し、より具体的には核酸増幅法で用いるプライマーが挙げられる。

[0070] 抗体、ペプチドプローブ、核酸プローブおよび核酸プライマーは、上述した公共データベースから入手したアミノ酸配列または塩基配列の情報に基づいて、当業者が容易に設計可能である。

[0071] 前立腺癌の進行度を評価するための検査キットは、さらに、必要に応じて、抗体またはペプチドプローブを免疫学的に検出するための各種試薬（二次抗体、レポーター分子、およびバッファーなど）および器具（プレートおよびピペットなど）、核酸プローブを検出するための各種試薬（バッファーなど）および器具（プレートおよびピペットなど）、核酸増幅法に用いる各種

試薬（ポリメラーゼ、各ｄＮＴＰおよびバッファーなど）および器具（チューブおよびピペットなど）、検査キットの使用説明書、測定の時に用いられる対照用となる試料、測定結果を解析するときに用いられる対照用のデータ、などのうちの少なくとも１つを備えていてもよい。なお、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットの使用説明書には、上記〔１．前立腺癌の進行度の評価のための分析方法および前立腺癌の進行度の評価方法〕の欄で説明した、本発明に係る分析方法および／または評価方法の内容が記録されている。

[0072] 本発明に係る検査キットのさらに別の一態様は、前立腺癌を検出するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、および、前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含んでいる。

[0073] 前立腺癌を検出するための検査キットは、さらに、必要に応じて、抗体またはペプチドプローブを免疫学的に検出するための各種試薬（二次抗体、レポーター分子、およびバッファーなど）および器具（プレートおよびピペットなど）、検査キットの使用説明書、測定の時に用いられる対照用となる試料、測定結果を解析するときに用いられる対照用のデータ、などのうちの少なくとも１つを備えていてもよい。なお、前立腺癌を検出するための検査キットの使用説明書には、上記〔２．前立腺癌の検出方法〕の欄で説明した、本発明に係る検出方法の内容が記録されている。

[0074] 特に限定されないが、前立腺癌の進行度を評価するための検出キットおよび前立腺癌を検出するための検査キットは、例えば、ＥＬＩＳＡ法またはイムノクロマトグラフィー法に基づく検査キットであることが好ましい。

[0075] 〔４．その他〕

上記〔１．前立腺癌の進行度の評価のための分析方法および前立腺癌の進行度の評価方法〕の欄で説明した分析方法もしくは評価方法、または上記〔２．前立腺癌の検出方法〕の欄で説明した検出方法を行うことによって得ら

れた結果は、医師による診断を行う際の診断資料の１つとして利用することができる。また、上記〔１．前立腺癌の進行度の評価のための分析方法および前立腺癌の進行度の評価方法〕の欄で説明した分析方法もしくは評価方法、または上記〔２．前立腺癌の検出方法〕の欄で説明した検出方法を行うことによって、前立腺癌の有している可能性ありという結果が得られた被験体については、必要に応じて医師による診断の結果を伴った上で、治療を行うことができる。ここで、治療の一例としては、医師、場合によっては医師以外の専門家が行う、化学療法、放射線治療、および外科手術などを挙げることができる。特に、本発明に係る分析方法および評価方法では、前立腺癌の進行度を評価することができるため、その進行度に応じた適切な治療法を迅速に決定することができる。

[0076] より具体的には、例えば、本発明に係る方法を行うことによって得られた結果に基づき医師が「前立腺癌の進行度が高い」と判断した場合には、他の検査方法（直腸診検査、超音波検査、ＭＲＩ検査など）による所見、被験体の年齢および家族歴なども考慮した上で、前立腺生検を行うことができる。通常、前立腺生検を行った結果に基づき前立腺癌の有無の確定診断がなされ、治療方針が立てられる。医師が「前立腺癌の進行度が高い」と判断するに際しては、予め所定の基準値を設けておき、被験体の測定値がその基準値以上となった場合に「前立腺癌の進行度が高い」と判断することができる。

[0077] 一方、本発明に係る方法を行うことによって得られた結果に基づき医師が「前立腺癌ではない」あるいは「前立腺癌の進行度が低い」と判断した場合には、その後定期的にＮＰＹおよびＰＳＡなどの前立腺癌マーカーの測定を行い、経過を観察することができる。なお、前立腺癌の進行度の評価は「高い」「低い」の２つに限られず、より段階的に設けることもできる。

[0078] 後述の実施例で示されるように、フィブロネクチンおよび電子移動フラボタンパク質－ユビキノンデヒドロゲナーゼも、前立腺癌の候補バイオマーカーとして同定された。そのため、フィブロネクチンおよび電子移動フラボタンパク質－ユビキノンデヒドロゲナーゼは何れも、ＮＰＹおよび／またはＰ

ＳＡと組み合わせて用いることによって、前立腺癌の進行度の評価および前立腺癌の検出を行い得る。評価方法および検出方法は、上述と同様に行えばよい。

[0079] 〔５．まとめ〕

このように、本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量を測定する工程を含むものである。

[0080] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡ、およびＰＣＡ３ ＲＮＡのうちの少なくとも１つの量を測定する工程をさらに含むことが好ましい。

[0081] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原の量を測定する工程をさらに含むことがより好ましい。

[0082] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、質量分析法または発光測定法によってニューロペプチドＹの量を測定する場合がある。

[0083] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法において、上記試料は全血液、血清または血漿であることが好ましい。

[0084] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価のための分析方法は、上記ニューロペプチドＹの量を測定する工程において、上記試料を逆相抽出に２回以上供してニューロペプチドＹを含む画分を取得して、得られた画分についてニューロペプチドＹの量を測定する場合がある。

[0085] 本発明に係る前立腺癌の検出方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含む。

[0086] 本発明に係る前立腺癌の進行度の評価方法は、生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量を測定する工程を含む。

[0087] 本発明に係る検査キットの一態様は、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するためのペプチドプローブを含む。

[0088] 本発明に係る検査キットの上記一態様は、生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含むことが好ましい。

[0089] 本発明に係る検査キットの別の一態様は、前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体を含み、生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含む。

[0090] 本発明に係る検査キットのさらに別の一態様は、前立腺癌を検出するための検査キットであって、生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、および、前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含む。

[0091] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記

載された文献の全てが参考として援用される。

実施例

[0092] 〔実験手順〕

（試薬）

トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、ヨードアセトアミドおよび重炭酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich社から購入した。尿素は、GE Healthcare社から購入した。Trypsin Goldは、Promega社から入手した。トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）は、株式会社島津製作所から購入した。

[0093] （血漿サンプル）

バイオマーカーのスクリーニングのためのＥＤＴＡ－血漿サンプル（ｎ＝１１６、表１）を、高知大学医学部附属病院で採取した。なお、採血部位は腕静脈であった。

[0094] [表1]

群	n	平均年齢	性別
健康対照者	24	69.1	男性
BPH*	19	68.9	男性
PCa** (GS*** 5-6)	20	65.3	男性
PCa** (GS*** 7)	28	69.7	男性
PCa** (GS*** 8-10)	25	68.1	男性
Total	116	68.2	男性

*良性前立腺肥大症 **前立腺癌 ***Gleason score

[0095] バイオマーカーの確認実験のために、対照として、２６人の健康な人からの血漿サンプルを、がん研究会有明病院（ＪＦＣＲ）のがんスクリーニングセンターで採取した。また、確認実験のために、１９人の良性前立腺肥大症（ＢＰＨ）患者からの血漿サンプル、および６５人の前立腺癌患者からの血漿サンプルを、高知大学医学部附属病院、京都大学医学部附属病院、および岩手医科大学附属病院で採取した（表２）。なお、採血部位は腕静脈であった。

[0096]

[表2]

群	n	平均年齢	性別
健康対照者	26	69.1	男性
BPH*	19	68.9	男性
PCa** (GS*** 5-6)	17	65.9	男性
PCa** (GS*** 7)	30	64.2	男性
PCa** (GS*** 8-10)	18	66.1	男性
Total	110	64.0	男性

*良性前立腺肥大症 **前立腺癌 ***Gleason score

[0097] 上述の全ての患者に対して実験手順を完璧に説明し、同意書を記載してもらっている。以下の実験は、それぞれの施設内倫理委員会による承認を得ている；理化学研究所倫理委員会、高知大学医学部、ＪＦＣＲ、京都大学、および岩手医科大学の施設内審査委員会。

[0098] （ＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製）

９６穴ポリプロピレン製プレート上で、２０μＬの血漿サンプルを８０μＬの１０Ｍ 尿素 ｉｎ ５０ｍＭ 重炭酸アンモニウムと混合した。次いで、サンプルを、５ｍＭ ＴＣＥＰを用いて３７℃で１５分間還元し、２５ｍＭ ヨードアセトアミドを用いて室温で１５分間アルキル化した。さらにサンプルを５０ｍＭ 重炭酸アンモニウムで４倍希釈し、平衡化したOasis HLB 96-well μElution Plate (2 mg sorbent per well、30 μm particle size、Waters社製）にロードした。なお、固相抽出プレート上での全ての操作は、特注の９６穴シリンジロボットを用いて行った。

[0099] Oasis Plateを５００μＬの７０％ アセトニトリルで予め湿潤させ、次いで５００μＬの０．１％ ＴＦＡ ｉｎ ２％ アセトニトリルで、２５０μＬ／分の速度で平衡化した。１００μＬ／分の速度でサンプルをロードした後、プレートを５００μＬの０．１％ ＴＦＡ ｉｎ ２％ アセトニトリルを用いて２５０μＬ／分の速度で２回洗浄した。１００μＬの４０％ アセトニトリルを用いて、１００μＬ／分の速度でタンパク質を溶出し、続いて２回目のOasis Plate精製の前に０．１％ ＴＦＡで５倍希釈した。希釈したサンプルを上述した１回目の精製と同じ条件で処理した。

[0100] 溶出液を真空遠心脱水装置を用いて凍結乾燥し、８ｎｇ／μＬのTrypsin G

old（Promega社製）ｉｎ ５０ｍＭ 重炭酸アンモニウムを用いて、３７℃で６時間消化した。５０μＬの１．２％ ＴＦＡ ｉｎ ４％ アセトニトリルを添加して、消化反応を停止させた。

[0101] （ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ分析）

上述のＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製後、１μＬのサンプルを、Ultimate 3000 nano-flow HPLC（Thermo Fisher Scientific社製）に装備されている質量分析装置（LTQ-Orbitrap-Velosmass spectrometer, Thermo Fisher Scientific社製）を用いて分析した。０．１％ ギ酸を溶媒Ａ、０．１％ ギ酸 ｉｎ アセトニトリルを溶媒Ｂとして用い、C18 Chip-column（75 μm×200 mm, 日京テクノス株式会社製）でペプチドを分離した。その際の流速は２５０ｎＬ／分とし、溶媒Ｂの勾配は、２～３０％，９５分間、３０～９５％，１５分間とした。溶出したペプチドを２０００Ｖのスプレー電圧でイオン化し、ＭＳデータをデータ依存型フラグメント法で取得した。測定スキャン（survey scan）は、ｍ／ｚ４００～１６００、分解度６０，０００、ＡＧＣターゲット値１．０×１０^{6}イオンカウントで行った。各測定スキャンにおける上位２０の強度の前駆イオンを、リニアイオントラップでＡＧＣターゲット値５０００イオンカウントのノーマルＣＩＤスキャンモードを用いた低分解能ＭＳ／ＭＳ取得に供した。

[0102] （Expressionist RefinerMSにおけるラベルフリー定量）

LTQ Orbitrap-Velos質量分析装置からの生データを、Expressionist RefinerMS module（Genedata AG社製）にロードした。Expressionist RefinerMS moduleは、その後のデータ処理およびラベルフリー定量分析について、社内サーバーシステムで行うものである。RefinerMS softwareの全体的なワークフローは図１に示すとおりである。２Ｄ ＭＳクロマトグラム面（x = m/z 、y = RT）上の１０個のデータポイント毎にSpectrum Gridをセッティングし、次いで第１のChemical Noise SubtractionをRT Window = 500 scansおよびQuantile = 80を用いて行った。第２のChemical Noise Subtractionにおいて３ＲＴスキャン毎にMoving average estimatorによってクロマトグラムを滑らか

にした後、１０００未満の強度のシグナルを排除した。第３および第４のChemical Noise Subtractionに、それぞれ、minimum RT length = 8 scansのRT Structure Removalおよびminimum m/z length = 4 pointsのm/z Structure Removalを用いて、データを適用した。Chromatogram Gridをノイズ減算データ上の１０スキャン毎にセットし、次のパラメーターを用いてChromatogram RT Alignmentを行った：m/z Window = 10 points、RT Window = 10 scans、Gap Penalty = 1、RT Search Interval = 2 minutes、Alignment Scheme = pairwise alignment based tree。続いで、一時的平均化クロマトグラムにおけるピークを、次のパラメーターを用いて、Summed Peak Detection Activityによって検出した：Summation Window = 2minutes、Overlap = 50、Minimum Peak Size = 10 scans、Maximum Merge Distance = 4data points、Gap/Peak Ratio = 10、Method = curvature-based peak detection、PeakRefinement Threshold = 5、Consistency Filter Threshold = 0.6。最後に、Summed Isotope Clustering Activityが、１つの分子に由来する同位体ピークを同位体クラスターにグループ化した。このときのパラメーターは次のとおりである：Minimum Charge = 1、Maximum Charge = 8、Maximum Missing Peaks = 0、First Allowed Gap Position = 3、Ionization = protonation、RT Tolerance = 0.1 minute、m/z Tolerance = 0.05 Da、Minimum Cluster Size Ratio = 0.5。

[0103] （Expressionist Analystにおけるバイオマーカーの抽出）

新規なバイオマーカーセットの特異度を最大化すべきであるため、重複のない１５３，０５７個の検出されたペプチドをAbsent/Present Searchアルゴリズムによってフィルタリングした。Absent/Present Searchアルゴリズムは、２つの群（健康対照者＋ＢＰＨ 対 前立腺癌）間で全か無かである特徴を示しているペプチドを抽出するものである。４３人の対照の間で多くても１人、かつ、７３人の前立腺癌患者の間で少なくとも１１人において検出されたペプチドを選択して、さらなる確認実験に供した。

[0104] （タンパク質の同定）

SEQUESTデータベースサーチを、Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Fischer Scientific社製) を用いて行った。ＭＳ／ＭＳデータをヒトタンパク質データベースSwissProt 2012_09 (20,235 sequences) に対して検索した。検索パラメーターは次のとおりである：Enzyme Name = Trypsin、Precursor Mass Tolerance = 3 ppm、Fragment Mass Tolerance = 0.8 Da、Dynamic Modification = Oxidation (M)、Static Modification = Carbamidomethyl (C)。SEQUEST Decoy Database SearchにおいてＦＤＲ (false discoveryrate) が１％未満であるペプチド同定を受け入れた。Raw dataはPRIDEデータベースに公開される (http://www.ebi.ac.uk/pride/) 。

[0105] （ＮＰＹについてのＭＲＭ (multiple reaction monitoring) ）

終濃度１ｆｍｏｌ／μＬのＢＳＡトリプシン消化物を内部対照として添加したことを除いて、上述のように血漿サンプルをＱＵＥＳＴ－ＭＳ法に供し、次いで、Agilent 1200 nano-flow HPLC system (Agilent Technologies社製) に付属の4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex社製) を用いて分析した。０．１％ ギ酸を溶媒Ａ、０．１％ ギ酸 ｉｎ アセトニトリルを溶媒Ｂとして用い、C18 Chip-column (75 μm×200 mm, 日京テクノス株式会社製) でペプチドを分離した。流速は２５０ｎＬ／分とし、溶媒Ｂの勾配は、２～３０％，１０分間、３０～９５％，５分間の２段階直線勾配とした。ＮＰＹおよびＢＳＡ (KYA technologies社製) に特異的なＭＲＭトランジションを、Analyst 1.5 software (AB Sciex社製) のＭＲＭモードによって同時にモニターした。装置の設定は次のとおりである：Ionization spray voltage = 2200 V、Curtain gas (N_2) = 12 psi、CAD = 4、Declustering potential = 70 V、Entrance potential = 10 V、Q1 resolution = HIGH、Q3 resolution = LOW、Pause in between = 2 msec。得られたＭＲＭクロマトグラムをMultiQuant 2.02 software (AB Sciex社製) を用いて解析した。各トランジションのマスクロマトグラムを、1 pt windowで滑らかにし、ピーク面積を定量した。１２個のＮＰＹのトランジションについて衝突エネルギーを最適化した後、NPY_{81-88}ペプチドに相当するQ1/Q3 = 466.23/272.20のみを用いて実

質的に定量を行った。このトランジションが最も高い感度を示したからである。そして、ＮＰＹ$_{81-88}$のピークの面積を、同様に測定したＢＳＡペプチドを用いて、次のとおりに標準化した：Normalized NPY = Area (NPY$_{81-88}$, Q1/Q3 = 466.2/272.2) / Area (BSA$_{66-75}$, Q1/Q3 = 582.3/951.5) × 10000。

[0106] （銀染色および画像解析）

ＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製の効果を評価するために、精製したサンプルの１／５を１６％Tris-tricine SDS-PAGEゲル（Life Technologies社製）で分離した。SilverQuest Silver Staining kit（Life Technologies社製）を用いて、使用説明書に従って、ゲルを染色した。染色したゲルをGS-800 Calibrated Densitometer（Bio-Rad Laboratories社製）を用いてスキャンし、Image J softwareによって解析した。

[0107] （免疫組織化学的染色）

Ventana automated immunohistochemical systems（Ventana Medical Systems社製）を用いて、免疫組織化学的実験を行った。８人の前立腺癌患者から採取された外科検体または生検検体のスライス切片（ホルマリンで固定してパラフィンに埋入されている）を用いた。８人の前立腺癌患者には、前立腺上皮内腫瘍（ＰＩＮ）の病変を有している３人が含まれていた。スライス切片を、１：４００希釈したポリクローナル抗ＮＰＹ抗体（Abcam社製）溶液と共に１６分間インキュベートした。自動化されたプロトコールは、ビオチン標識二次抗体およびヘマトキシリン対比染色したジアミノベンジジン基質を用いる、間接的ビオチン－アビジンシステムに基づいた。結合の特異性を、一次抗体としてウサギ非免疫血清を用いたネガティブ染色によって確認した。

[0108] 〔結果〕

（ＱＵＥＳＴ－ＭＳ技術による低分子量ポリペプチドの濃縮）

正確なバイオマーカーのスクリーニングおよび血液中の小さい標的ポリペプチドによる均一な臨床応用のためには、高感度、高再現性、高ハイスループット、低コスト、および操作容易性を示す前分析的な精製方法が必要であ

る。これらの基準を満たすために、本願発明者らは、血漿中の２０ｋＤａ未満のタンパク質についての簡単かつ効果的な濃縮方法を確立し（図２の（ａ））、quick enrichment of small targets for mass spectrometry（ＱＵＥＳＴ－ＭＳ）と名付けた。ＱＵＥＳＴ－ＭＳ法は、粗血漿からの変性、還元、アルキル化、および続くタンデム逆相抽出（９６サンプルあたり１．５時間しか要しなかった）から構成される。

[0109] 乾燥させたＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製サンプルは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＥＬＩＳＡなどのタンパク質アッセイ用に直接用いることができる。同ＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製サンプルは、トリプシン処理後に質量分析に供することもできる。

[0110] Oasis HLB plateによる１～４回目の逆相抽出後の、低分子量タンパク質の濃縮効果を可視化するために、各段階における粗血漿および精製タンパク質を１６％ Tris-tricineゲルで分離し、銀染色を行った。その結果を図２の（ｂ）に示す。このゲルの定量デンシトメトリー解析の結果を図２の（ｃ）に示す。染色したゲルの５つのレーンの定量密度クロマトグラムは、固相抽出ステップごとの、＞２０ｋＤａのタンパク質の効果的な除去を示した。特に、Oasis HLB plateによる２回目の逆相抽出によって、２０ｋＤａ未満の低分子量タンパク質の割合が９０％を超えた。このような小さいタンパク質の容易できれいな分離の原理は、孔径（８ｎｍ）より大きい巨大なタンパク質を流出させること、および、中程度の大きさのタンパク質（２０～１００ｋＤａ）がOasisポリマービーズ上の疎水性残基に対する過剰の吸収強度によって溶出するのを回避することに基づいている。逆相抽出を３回以上繰り返すと低分子量タンパク質の精製度は高まるが、スループットおよびコストにおける優位性の観点から、バイオマーカーのさらなる探索および確認実験には２回精製したサンプルを用いた。

[0111] （前立腺癌に対する低分子量バイオマーカーのスクリーニング）

施設間におけるサンプリングのあらゆる偏りを避けるために、バイオマーカーのスクリーニング段階で分析した１１６個の血漿サンプル（表１）を、

１つの病院で採取し、厳格に管理された標準的な操作手順を用いた。２０μＬの各血漿サンプルを、ＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製の前に、１回凍結融解した。１１６個の精製サンプルのＬＣ／ＭＳ／ＭＳ分析から、１５３，０５７個の重複のないペプチドを検出し、上述のようにExpressionist RefinerMS moduleにおいて定量した。特に、この低分子量プロテオームのカタログは、４つのＰＳＡ由来ペプチドを含んでいた：I_{25}VGGWECEK$_{33}$（m/z = 539.25, z = +2）、H_{34}SQPWQVLVASR$_{45}$（m/z = 469.92, z = +3）、A_{48}VCGGVLVHPQWVLTAAHCIR$_{68}$（m/z = 782.08, z = +3）、およびL_{126}SEPAELTDAVK$_{137}$（m/z = 636.84, z = +2）。これらのペプチドは、対照群（健康対照者＋ＢＰＨ患者）では、それぞれ４、３、４、５のケースで検出された。一方、前立腺癌患者群では、それぞれ１５、１３、１０、１１のケースで検出された。病院によって提供されるＰＳＡテストの値に従うと、ＰＳＡに対する本願発明者らの方法の検出限界値は、約１０ｎｇ／ｍＬと見積もることができた。この結果は、サンプルの平均に基づく一般的な比較テスト（ｔ検定、およびＡＮＯＶＡなど）が特異的マーカーの抽出に適切ではないことを示唆するものであった。対照群における低濃度の腫瘍マーカーの有効値は、かなり少ないはずだからである。一般に、理想的な腫瘍マーカーの検出頻度は、対照のサンプルでは０に近く、これはｔ検定またはＡＮＯＶＡの適用から除外され得る。

[0112] 次いで、新規なバイオマーカーのセットの特異度を最大化するために、Absent/PresentSearchアルゴリズムを用いた。その結果、４３人の対照（２４人の健康対照者＋１９人のＢＰＨ患者）において０または１のケースで検出され、かつ、７３人の前立腺癌患者において少なくとも１１のケースで検出された１８９個のペプチドを同定した。図３の（ａ）において、１５３，０５７個の全ペプチドのうちの１８９個のペプチドが前立腺癌特異的な検出パターンを示しており、これらは対照群において０または１のケースでしか検出されなかった。なお、１８９個のペプチドの定量的情報は２次元平面上の黒いドットまたは線で示されている。Ｘ軸は１１０人の個人を示し、Ｙ軸はＬＣ／ＭＳ／ＭＳにおけるピーク強度を示している。図３の（ｂ）は、検出頻

度に基づく１８９個の候補バイオマーカーペプチドの分類を示している。例えば、６２個のペプチドは１１個の前立腺癌サンプルで検出され、１個の対照サンプル（健康対照またはＢＰＨ）で検出されている。

[0113] 上述の抽出されたペプチドは、ＰＳＡと比較して前立腺癌患者の診断において、同等以上に高感度である上、偽陽性の割合が低い、候補バイオマーカーとみなすことができた。一方、SEQUESTデータベースサーチ解析（ＦＤＲ＜０．０１）を用いて、１１６個のスクリーニングサンプルから１１２６個の重複のない血漿タンパク質を同定した。タンパク質同定データセットに対して１８９個の候補バイオマーカーをマッチングしたところ、表３に記載されている３つのペプチドを首尾よく同定した。ｍＲＮＡの発現が大脳神経系および前立腺特異的である観点から、ニューロペプチドＹ（ＮＰＹ）を続く確認実験に用いた。

[0114] [表3]

UniProt accession number	UniProt ID	タンパク質名	配列*	Absent/Present Search における検出頻度	
				対照**	PCa***
P01303	NPY_HUMAN	Pro-neuropeptide Y	S^{68}SPETLISDLLMR^{80}	0	11
P02751	FINC_HUMAN	Fibronectin	Q^{1041}YNVGPSVSK^{1050}	1	11
Q16134	ETFD_HUMAN	Electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	G^{213}IATNDVGIQK^{223}	1	11

*配列中の数字はアミノ酸番号を示す

**健康対照者またはＢＰＨ患者の間で検出されたケース数

***前立腺癌患者の間で検出されたケース数

[0115] （前立腺癌組織におけるＮＰＹの発現）

図４にＮＰＹについての免疫組織化学的な染色の結果を示す。図４の（ａ）および（ｂ）は、前立腺癌におけるＮＰＹの代表的な免疫染色パターンを示しており、Gleason Scoreはそれぞれ、３＋４（ａ）および４＋５（ｂ）である。抗ＮＰＹ抗体を用いた免疫反応性を前立腺癌組織で観察したところ、前立腺癌細胞の細胞質では免疫反応性は非常に強かったが、非癌の前立腺上皮では免疫反応性は弱かった（図４の（ｂ）の右側）。図４の（ｃ）は、抗ＮＰＹ抗体を用いた細胞質の免疫反応性がハイグレードの前立腺上皮内腫瘍

（ＰＩＮ）の前駆細胞においても観察されたことを示している。これらの結果は、前立腺における腫瘍性病変が高いＮＰＹ発現を示すことを示唆するものであった。

[0116] （ＮＰＹについてのＭＲＭに基づく反復解析）

異なる病院または分析方法によるばらつきを評価するために、独立したサンプルセットおよび別の質量分析定量法ＭＲＭを用いて、ＮＰＹについての確認実験をさらに行った。ここでは、健康対照として高知大学医学部附属病院サンプルの代わりにＪＦＣＲからのサンプルを用い、前立腺疾患のサンプルとして京都大学および岩手医科大学からのサンプルを用いた（表２）。１１０個のＱＵＥＳＴ－ＭＳ精製したサンプルを、ＮＰＹ由来の４つの異なるペプチドをターゲットとして、4000 QTRAP質量分析装置で分析した。ＭＲＭ測定の前に、まず、４つのＮＰＹペプチドそれぞれに対する３つのトランジションの中から、最も高いＭＲＭクロマトグラムピーク強度を与え得る最適なトランジションおよび衝突エネルギー（ＣＥ）を探した。その結果を、図５の（ａ）および（ｂ）に示す。NPY_{81-88}に対応するトランジションQ1/Q3 = 466.2/272.2が、ＣＥ＝１７ｅＶにおいて、ＮＰＹに関して最も感度が良いレポーターイオン対であることがわかった。なお、図５の（ａ）において、Ｑ１またはＱ３の右側の数字はそれぞれ、四重極１または３におけるｍ／ｚのセッティングを示している。

[0117] さらに１０ｆｍｏｌの消化ＢＳＡを各サンプルに添加し、分析間のばらつきを標準化するための内部対照として用いた。次いで、ＭＲＭに基づくＮＰＹ測定の量的再現性を、６つの異なる時点における３つの血漿サンプルを分析することによって評価した。その結果を図６に示す。図６において、エラーバーは３つの独立した測定の標準偏差を示している。図６に示すように、変動係数（ＣＶ）は一貫して３．５％より小さかった。上述の最適化したＭＲＭ条件を用いて、血漿のＮＰＹを１１０のケースで定量し、その結果を図７の（ａ）のボックスプロットに示している。また、図７の（ｂ）に、ＥＬＩＳＡによって定量したＰＳＡの濃度を示す。これらの結果から、特にＢＰ

Ｈ患者とGleason Score（ＧＳ）５－６の前立腺癌患者との間で、ＰＳＡテスト（ｐ＝０．２７４６，ｔ検定）と比較して、ＮＰＹはより高い診断特異度があることが示された（ｐ＝０．０３９６，ｔ検定）。この結果は、バイオマーカーのスクリーニング実験におけるＮＰＹのAbsent/Present Search分析でのＮＰＹの前立腺癌特異的な検出を裏付けるものであった。

[0118] なお、図７において、破線は対照群（Ｎ＋ＢＰＨ）と前立腺癌群との境界を示している。この境界は後述の図８に示されるＲＯＣ曲線解析によって算出されたものである。大きく外れた値はプロットの上の領域に各濃度を併記して示した。

[0119] ＮＰＹは高い特異度を有していたが、感度をさらに向上させるために、ロジスティック回帰法を用いて、ＮＰＹおよびＰＳＡのコンビネーションによる診断システムを確立することを試みた（図７の（ｃ））。ＲＯＣ曲線の曲線下の面積（ＡＵＣ）が最大となるように、ロジスティック回帰スコアを算出した（文献：Pepe, M. S., Cai, T., and Longton, G. (2006), Biometrics 62, 221-229.に従った）。図８の（ａ）～（ｃ）に、１１０の血漿サンプルのＮＰＹ（ＭＲＭクロマトグラムの面積）、ＰＳＡ（病院におけるＥＬＩＳＡによって測定された値）、またはＮＰＹ＋ＰＳＡ（ロジスティック曲線回帰スコア）のそれぞれを用いて作成した３つのＲＯＣ曲線の比較を示す。なお、図８において、「x=」で表される接点は、各マーカーによって与えられる最適な限界値を示す。また、「Sens」は感度、「Spec」は特異度、「PV+」は陽性的中率、「PV-」は陰性的中率を表す。

[0120] ４５人の対照（２５人に健康対照者および２０人のＢＰＨ患者）と６５人の前立腺癌患者との区別におけるＰＳＡの感度および特異度は、それぞれ、８７．７％および６６．７％であった。一方、ＮＰＹとＰＳＡとの組み合わせにおける感度および特異度は、それぞれ、８１．５％および８２．２％であった。この結果は、ＰＳＡテストの感度の高さを顕著には失うことなく、ＰＳＡテストの特異度の低さをＮＰＹが補完し得ることを明確に示すものであった。これは、過剰診断および不要な生検を減らすことができ、ひいては

男性の身体的および精神的ストレスの緩和につながるものである。

[0121] また、ＮＰＹは前立腺癌の進行度と相関性が高く、ＮＰＹ単独で、またはＮＰＹとＰＳＡとの組み合わせで、進行度をより正確に評価し得ることが示された。

[0122] さらに、治療応答の評価に対するＮＰＹの有効性を実証するために、４人の前立腺癌患者から採取した手術前および手術後のサンプルを分析した。図９に３回のＭＲＭ分析の結果を示す。図９において日数は経尿道前立腺切除手術（ＴＵＲＰ）からの経過時間を表す。エラーバーは３回の独立した測定の標準偏差を表す。図９に示すように、手術の５～７日後、３人の患者（患者２～４）では、血漿ＮＰＹレベルの減少を示した（*ｐ＜０．０５，スチューデントｔ検定）。特に、患者４におけるＮＰＹレベルは、手術の５日後、カットオフ値（５１８９．０）未満まで減少した。一方、患者１では手術の１ヶ月後、ＮＰＹレベルのわずかな変化しかみられなかった。患者１における長期間の高いＮＰＹ濃度は、臨床的証拠はないが、再発または微小転移巣の存在を反映したのではないかと考えられた。

産業上の利用可能性

[0123] 本発明は、前立腺癌の進行度の評価および前立腺癌の検出に利用することができる。そのため、本発明は、診断医療分野および保健医学分野に広く利用することができる。

[0124] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量を測定する工程を含む、前立腺癌の進行度の評価のための分析方法。

[請求項2] 生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡ、およびＰＣＡ３ ＲＮＡのうちの少なくとも１つの量を測定する工程をさらに含む、請求項１に記載の分析方法。

[請求項3] 生体から採取した血液または尿に由来する試料において、前立腺特異抗原の量を測定する工程をさらに含む、請求項１に記載の分析方法。

[請求項4] 質量分析法または発光測定法によってニューロペプチドＹの量を測定する、請求項１～３の何れか１項に記載の分析方法。

[請求項5] 上記試料は全血液、血清または血漿である、請求項１～４の何れか１項に記載の分析方法。

[請求項6] 上記ニューロペプチドＹの量を測定する工程において、上記試料を逆相抽出に２回以上供してニューロペプチドＹを含む画分を取得して、得られた画分についてニューロペプチドＹの量を測定する、請求項１～５の何れか１項に記載の分析方法。

[請求項7] 生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量および前立腺特異抗原の量を測定する工程を含む、前立腺癌の検出方法。

[請求項8] 生体から採取した血液または尿に由来する試料において、ニューロペプチドＹの量を測定する工程を含む、前立腺癌の進行度の評価方法。

[請求項9] 前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、

生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するためのペプチドプローブを含む、検査キット

。

[請求項10] 生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含む、請求項９に記載の検査キット。

[請求項11] 前立腺癌の進行度を評価するための検査キットであって、

生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体を含み、

生体から採取した血液または尿に由来する試料における前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、ＴＭＰＲＳＳ２：ＥＲＧのｍＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、および、ＰＣＡ３ ＲＮＡの量を測定するための核酸プローブまたは核酸プライマー、のうちの少なくとも１つをさらに含む、検査キット。

[請求項12] 前立腺癌を検出するための検査キットであって、

生体から採取した血液または尿に由来する試料におけるニューロペプチドＹの量を測定するための抗体またはペプチドプローブ、および、前立腺特異抗原の量を測定するための抗体またはペプチドプローブを含む、検査キット。