

平成 21 年度シーズ発掘試験（発掘型）研究報告書

報告日：平成 22 年 4 月 27 日

技術分野	0102	医学・医療
------	------	-------

課題名：Cyclin E と LMP2 を用いた子宮平滑筋肉腫の新規術前診断法の開発

研究期間：平成 21 年 7 月 16 日～平成 22 年 3 月 31 日

1. 担当コーディネータ

氏名（役職）	杉原 伸宏（講師）		印
所属機関名	信州大学産学官連携推進本部		
連絡先	所在地	〒390-8621 長野県松本市旭三丁目 1 番 1 号	
	TEL/FAX	0263-37-3424 / 0263-37-3425	
	E-mail	sugihara@shinshu-u.ac.jp	

2. 代表研究者（代表研究者のみ記入してください。）

氏名（役職）	林 琢磨（准教授）		印
所属機関名	信州大学大学院医学系研究科		
連絡先	所在地	〒390-8621 松本市旭 3-1-1	
	TEL/FAX	0263-37-2611 / 0263-37-2613	
	E-mail	takumah@shinshu-u.ac.jp	

3. 共同研究者（JST と委託研究契約を締結した共同研究機関の場合のみ記入してください。）

氏名（役職）			
所属機関名			
連絡先	所在地		
	TEL/FAX		
	E-mail		

4. 試験研究の結果報告

(1) 試験内容

(実施計画 1). 子宮平滑筋肉腫のみにおいて、特異的な Cyclin E の強度の核内発現と LMP2 の著しい発現低下が確認されている。本課題では、手術提出組織および外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者より得られたバイオプシー生検とする症例サンプルに対して、これまでに成果が得られている抗 LMP2 抗体に加えて、抗 Cyclin E 抗体を用いた免疫組織染色を多数実施し、抗 Cyclin E 抗体と抗 LMP2 抗体を用いた免疫組織化学染色法による子宮平滑筋肉腫の新規術前診断法を確立させる。

(実施内容 1-1). 提携先の医療機関との共同研究のもと、病理ファイルより選別された手術提出組織：正常子宮平滑筋 45 症例、子宮平滑筋腫 41 症例、子宮平滑筋肉腫 47 症例における Cyclin E と LMP2 の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法によって検証した。その結果、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫では LMP2 の発現が鮮明に認められたが、子宮平滑筋肉腫では LMP2 の発現が認められなかった。一方、Cyclin E の発現においては、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫の組織では Cyclin E の発現が認められなかったが、子宮平滑筋肉腫の組織では著しい LMP2 の核内発現が認められた。これまでの研究成果より、Cyclin E も、LMP2 同様に子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫の鑑別マーカーとして有効と判断される。

現在、提携先の医療機関において検証可能な全ての症例について、Cyclin E と LMP2 の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法により検証を行った。その結果、抗 Cyclin E 抗体と抗 LMP2 抗体を用いた免疫組織化学染色法は、子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫の鑑別に有効であると判断された(添付資料 1 参照)。

(実施内容 1-2). 外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者より得られたバイオプシー生検を用いた症例サンプルによる検証：信州大学医学部附属病院産婦人科の外来にて、子宮平滑筋肉腫を疑われる患者より得られたバイオプシー生検 4 症例における Cyclin E と LMP2 の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法によって検証した。その結果、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫では LMP2 の発現が鮮明に認められたが、子宮平滑筋肉腫では LMP2 の発現が認められなかった。一方、Cyclin E の発現においては、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫の組織では Cyclin E の発現が認められなかったが、子宮平滑筋肉腫の組織では著しい Cyclin E の核内発現が認められた。したがって、Cyclin E と LMP2 とのコンビネーションによる免疫組織化学染色法は、バイオプシー生検を用いた術前診断に有効な情報を医療スタッフ及び患者側に与えられる可能性が認められた。

信州大学医学部附属病院産婦人科の外来にて、子宮平滑筋肉腫(LMS)を疑われる患者より得られたバイオプシー生検 4 症例について、Cyclin E と LMP2 の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法により検証を行うことが出来た(添付資料 2 参照)。しかしながら、バイオプシー生検 4 症例は、Cyclin E と LMP2 とのコンビネーションによる免疫組織化学染色法を用いた術前診断の有効性・信頼性を確立させるには充分とは言い難い。そこで、「実施計画 2」で記述されているように、外来にて積極的にバイオプシー生検の採取を行っている他の医療機関との共同研究開発を遂行することが必須と思われる。

(実施計画 2). 本研究課題の目的である本技術を用いた術前診断法の有効性・信頼性を確認するためには、共同研究開発を実施する提携医療機関を増やすことで、さらに多くのバイオプシー生検を検討することが必須である。

(実施内容 2). 子宮平滑筋腫および子宮平滑筋肉腫は、子宮体部の平滑筋層に発症し、子宮体腔側に突出することが少ない。したがって、外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者において、腫瘍が子宮体腔側

あるいは子宮頸部側に隆起している場合、外来でバイオプシー生検を行う。つまり、外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者よりバイオプシー生検を採取される症例は、必ずしも多くない。したがって、本技術を用いた術前診断の信頼性を検証するため、腫瘍が認められる箇所限定せずに、独自で開発された手法を用いて外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者よりバイオプシー生検の採取を積極的に行っている大阪市立大学医学部附属病院産婦人科(石河 修 教授)と共同研究の契約を締結した。既に、大阪市立大学医学部附属病院産婦人科の外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者より得られたバイオプシー生検を用いた症例サンプルにおける Cyclin E と LMP2 の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法によって検証を行っている。現在、信州大学医学部と大阪市立大学医学部との間で、免疫組織化学染色の結果について検討を行っており、順次解析結果を適切な機会に報告を行っていく予定である。

(実施計画 3)．免疫組織染色でのバックグラウンドが低くクリアな結果が得られ、抗原に対して強い親和性を有する抗体の安定した供給性のため、抗 Cyclin E ウサギモノクローナル抗体を産生するウサギハイブリドーマの確立を目標とする。

(実施内容 3)．現在、目的のモノクローナル抗体(ウサギハイブリドーマの選定)を得るために必要な抗原 GST-Cyclin E の精製を行っている。具体的には、(1) GST 融合蛋白質を発現する pGEX4T1 ベクターにヒト Cyclin E 遺伝子を挿入し、GST-Cyclin E 発現ベクター(pGEX4T1-Cyclin E)を構築した。(2) 大腸菌 BL21pLys に pGEX4T1-Cyclin E を移入し、GST-Cyclin E 融合蛋白質を大腸菌 BL21pLys 内で大量に発現させている。(3) GST-Cyclin E 融合蛋白質を含んでいる大腸菌の破濁溶液から、GST アガロースを支持体としたカラムを用いて GST-Cyclin E 融合蛋白質の精製を行っている。上記の(1)と(2)の行程は、本申請者の研究グループ内で行っている。(3)の行程は、委託業者である(株)ベックス(東京都板橋区)にて行われている。目的のモノクローナル抗体を得るために必要な抗原 GST-Cyclin E 融合蛋白質の量は、5 μ g であり、現在の収量は、約 2.3 μ g である。平成 22 年度内に、目的のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマの選定を完了するように本事業の遂行を行っている。

(その他の実施内容)．LMP2 は子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫とを識別すべく新規鑑別マーカーに成り得ると考え国内外(ドイツ、フランス、米国、日本)の特許の申請を行っている。さらに、SIGMA-Aldrich Israel 社(Rehovot, Israel)が当該の新規技術の有用性、将来性を認めるところとなり、2008 年 01 月 02 日付けで信州大学との間で、下記国際特許に基づいたヒト子宮平滑筋肉腫の診断試薬を視野として試薬の共同開発を行う契約を結んだ(契約期間：20 年間)。

現在まで、信州大学と SIGMA-Aldrich Israel 社との共同研究開発によって、ヒト組織を用いた免疫組織化学染色専用の以下に示す 2 種類の抗体の開発が行われ、SIGMA-Aldrich 社より販売に向けて準備されている。私達の研究グループと SIGMA-Aldrich Israel 社との共同研究開発によって開発された下記 2 種類抗体は、他社より販売されている抗 LMP2 抗体よりも、抗原への特異的認識性が高いと判断されている(添付資料 3 参照)。

抗ヒト LMP2 モノクローナル抗体 produced in mouse, Lot# 120709, Clone# LMP2-12.3

抗ヒト LMP2 モノクローナル抗体 produced in mouse, Clone# LMP15 purified IgG + 5 mM Na₃

さらに、SIGMA-Aldrich Japan 本社にて、信州大学(私達の研究チーム)は、SIGMA-Aldrich Israel 社と取得済みの国際特許に基づいたヒト子宮平滑筋肉腫の診断試薬の共同開発の可能性について話し合いを行っている(10 月 30 日 2009 年)。

(2) 得られた成果

- ◆研究データ（数値、図解、写真、グラフなども記載してください。）、試作物の写真など、成果を具体的に整理して記述してください。

添付資料1から3を参照

- ◆得られた研究成果から、実用化の見通し（試験前と後での見通しの変化、明確になった技術的課題および問題点、明確になった課題および問題点解決へ向けての見通し）について

外来で子宮平滑筋肉腫を疑われる患者より得られたバイオプシー生検を用いた症例サンプル：信州大学医学部附属病院産婦人科の外来にて、子宮平滑筋肉腫を疑われる患者より得られたバイオプシー生検4症例における Cyclin E と LMP2 の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法によって検証した。その結果、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫では LMP2 の発現が鮮明に認められたが、子宮平滑筋肉腫では LMP2 の発現が認められなかった。一方、Cyclin E の発現においては、正常子宮平滑筋および子宮平滑筋腫の組織では Cyclin E の発現が認められなかったが、子宮平滑筋肉腫の組織では著しい LMP2 の発現が認められた。したがって、Cyclin E と LMP2 とのコンビネーションによる免疫組織化学染色法は、バイオプシー生検を用いた術前診断に有効な情報を医療スタッフ及び患者側に与えられる可能性が認められた。しかしながら、バイオプシー生検4症例は、Cyclin E と LMP2 とのコンビネーションによる免疫組織化学染色法を用いた術前診断の有効性・信頼性を確立させるには充分とは言い難い。そこで、「実施計画2」で記述されているように、外来にて積極的にバイオプシー生検の採取を行っている他の医療機関との共同研究開発が必須と思われる。

- ◆外部発表、特許等については、下記、「表」と「①～⑦」を記載してください。

外部発表・特許出願等

* 今回の研究課題成果についてののみ、平成21年度中に掲載・発表・出願等したものをカウントしています。

項	目	数
① 発表論文	国内論文数	2
	海外論文数	1
② 口頭発表	国内発表数	4
	海外発表数	1
③ マッチングイベントへの参加（発表）	参加（発表）数	3
④ 展示会出展	出展数	1
⑤ 特許出願	国内出願数	1
	外国出願数	3
⑥ 掲載/放映 (採択記事は除く)	雑誌掲載数	1
	新聞掲載数	1
	テレビ放映数	0
⑦ 他事業への展開	採択数	NA

①発表論文

国内論文数

林 琢磨：ヒト子宮平滑筋肉腫のバイオマーカーの発見。松医会報 秋号 89：35-37、2009.

林 琢磨：「Priority の重要性：ヒト子宮平滑筋肉腫のバイオマーカーの発見と新規診断法の確立」
癌と人 ((財)大阪癌研究会) 36：57-58、2009.

海外論文数

Hayashi T, Horiuchi A, Kobayashi Y, Hiraoka N, Sudo T, Kanai Y, Aburatani H, Nishimura R, Sano K, Tonegawa S and Konishi I.: Tumor immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape-in case of uterine leiomyosarcoma-. *Current Res. Immunol.* 2009. 33-46.

②口頭発表 (代表研究者以外の方が発表した場合のみ、発表者氏名と所属を記載しています。)

国内発表数

Hayashi T：子宮平滑筋肉腫の血行性転移の分子生物学的解析：LMP2 の発現の関与について。シンポジウム：がん転移治療の最前線～臨床・創薬～、第 18 回日本がん転移学会学術集会総会、July 23-24, 2009, 旭川, Japan

Hayashi T：LMP2とCyclin Eをバイオマーカーとした子宮平滑筋肉腫に対する新規診断法。創薬イノベーションフォーラム 2009 (主催 ダイアログ株式会社)、December 15, 2009, 東京

Kano H*, Horiuchi A, Konishi I, **Hayashi T**: Detection of somatic mutation on IFN- γ signaling pathway in Uterine Leiomyosarcoma. 第68回日本癌学会 (Workshop)、October 1-3, 2009, 横浜.

*Kano H(信州大学大学院医学系研究科免疫制御、岡谷市立病院小児科)

Hayashi T: Established LMP2-Biomarker for Development of Diagnosis and Anti-tumor Drug against Uterine Leiomyosarcoma. 第 68 回日本癌学会 (Workshop)、October 1-3, 2009, 横浜.

海外発表数

招待講演, Takuma Hayashi (Symposiste, International Symposium): Symposium Section; Validated Animal Models in Anticancer Drug Development. Presentation Title; LMP2-Deficient Mice as Animal Model of Spontaneous Uterine Leiomyosarcoma for Development of Diagnosis and Anti-tumor Drug World Cancer Congress 2009, June 22-15, 2009, Beijing, China. シンポジウム(国際会議)

③マッチングイベントへの参加 (発表)

(代表研究者以外の方が発表 (説明) した場合のみ、発表 (説明) 者氏名と所属を記載しています。)

林 琢磨：LMP2 と Cyclin E を用いた子宮平滑筋肉腫の新規術前診断法の開発、ライフサイエンス、JST 関連の新技术発表会(依頼講演)：独立行政法人科学技術振興機構(JST)により主催、平成 22 年 1 月 29 日、独立行政法人科学技術振興機構 JST ホール (東京・市ヶ谷)

林 琢磨：Cyclin E と LMP2 を用いた子宮平滑筋肉腫の新規術前診断法の開発(大学・TLO ゾーン出展)、

新技術発表会(依頼講演)：イノベーション ジャパン 2009 - 大学見本市、独立行政法人科学技術振興機構(JST)と独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)により主催、平成21年9月16日-18日、東京国際フォーラム(東京・有楽町)

林 琢磨： LMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の検出、CPhI(国際医薬品原料・中間体展) Japan 2009：ユニテッドビジネスメディア社によって企画・開催、平成21年4月22日、東京ビッグサイト(東京・江東区有明)

④展示会出展(③マッチングイベントを除く)

(代表研究者以外の方が説明した場合のみ、説明者氏名と所属を記載しています。)

林 琢磨： Cyclin EとLMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の新規術前診断法の開発(大学・TLOゾーン出展)、一般発表：イノベーション ジャパン 2009 - 大学見本市、独立行政法人科学技術振興機構(JST)と独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)により主催、平成21年9月16日-18日、東京国際フォーラム(東京・有楽町)

⑤特許出願：(4)に記載。

⑥掲載・放映

LMP2が予後の悪い子宮平滑筋肉腫の鑑別マーカーに：日経メディカル ジャナル[子宮癌、診断(癌)]
7月27日2009年(編集：横山 勇生=日経メディカル別冊)

<http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/search/cancer/news/200907/511663.html>

子宮平滑筋肉腫で診断基準、林・信大准教授に貢献賞・市村学術賞(くらし応援)。信濃毎日新聞
5月15日2008年

⑦他事業への展開

事業名：内閣府：最先端・次世代研究支援プログラム

題名：「新規診断法・治療法の開発に向けて：微小環境における婦人科悪性腫瘍の生物学的応答性の検討」

実施期間：平成22年度(申請中)

本事業参加者名：堀内 晶子、塩沢 丹里(信州大学医学部産科婦人科講座)
佐野 健司(信州大学医学部附属病院臨床検査部)
永瀬 智、八重樫 伸生(他)(東北大学医学部産科婦人科講座)
市川 友季、石河 修(大阪市立大学医学部産科婦人科講座)
鈴木 彩子、小西 郁生(他)(京都大学大学院医学系研究科産科婦人科講座)
小橋 雄一、森泉 俊之(株式会社ベックス)
加納 洋、林 琢磨(信州大学大学院医学系研究科免疫制御学)
Drs. Gal Gur、Dorit Zharhary、Charles Hexter(SIGMA-ALDRICH Israel社)

申請課題の事業概要：

子宮平滑筋肉腫：子宮平滑筋肉腫は、極めて予後不良の悪性腫瘍である。40歳以上の女性に40%罹患率で発症する良性腫瘍・子宮平滑筋腫は、子宮平滑筋肉腫との区別が非常に難しい。術前診断が子宮平滑筋腫とされた症例中、病理検査の結果、子宮平滑筋肉腫が約4%認められる。子宮内膜癌では、女性ホルモン高値、高血圧、糖尿病などが、リスクファクターであるが、子宮平滑筋肉腫では、ホルモン状態と発症との相関性は無く、リスクファクターは解っておらず、他の癌ほど子宮平滑筋肉腫の研究は発展していない。子宮平滑筋肉腫の治療では、通常外科的処置後に放射線照射治療が行われる

が、化学療法もホルモン療法も、著しい延命効果は認められない。そこで、子宮平滑筋肉腫細胞において特異的に発現している異常遺伝子を検出して、その遺伝子産物を標的とした新規診断法・治療法が検討される必要がある。

研究テーマ：

- (1) がん微小環境に対する子宮平滑筋肉腫の『LMP2 の発現有無に着目した生物学的特性：血管新生能とエストジェン受容体の発現低下』を捕らえて、その特性を標的とした抗腫瘍剤の開発へと還元する。
 - (2) LMP2、Cyclin E、PGK1 を鑑別マーカーとした子宮平滑筋肉腫の術前診断を確立させる。
 - (3) 子宮平滑筋における腫瘍形成の機序を解明するために、LMP2 欠損マウスと他の遺伝子欠損マウスを用いて分子生物学的、組織学的解析を行う。
- つまり、子宮平滑筋肉腫の新規術前診断法・治療法を確立させるため、子宮平滑筋肉腫の発症原因を解析することは急務である。

卵巣癌： 卵巣がんの組織型は多様であり、その発生も、単一の機序では説明できない。したがって、卵巣がんの発生と、強い関連性を示す単一の要因はなく、卵巣がんの発生には、複数の要因が関与していると考えられている。卵巣がんの確立したリスク要因は、卵巣がんの家族歴のみとされ、大部分の卵巣がんは散発性であるが、家族性腫瘍として、乳がんと同じく、BRCA1、BRCA2 遺伝子の変異が知られている。他に、リスク要因として出産歴がないことが指摘されている。問題点として、卵巣は腹部に発症し、腫瘍ができてからはほとんど自覚症状を認めないため、2/3 以上は転移した状態ではじめて病院を訪れる。卵巣がんにも最もよくおこる転移は、腹膜播種であり、卵巣の周りにおこりやすいが、横隔膜にもよく認められる。さらに、リンパ節転移もよく認められ、腹部大動脈の周りや骨盤内のリンパ節さらに胸部や首のリンパ節にも広がっていく。転移のない卵巣がんは手術だけで治癒可能であるが、III 期あるいは IV 期の場合は、手術と抗がん剤による治療を行う必要がある。卵巣癌患者における最大の予後不良の原因は、腹腔内播種性転移であり、我々はこれまで播種性転移の過程を微小環境の観点から検討してきた。その結果、S100A4 発現は卵巣癌播種性転移にきわめて重要なシグナルを司ることが判明した。さらに、私達は、卵巣癌において S100A4 発現が予後不良因子である事を明らかにし、S100A4 抑制が新規の分子標的治療となる可能性を見出した。このことから、卵巣癌患者の予後を向上のために、本研究では S100A4 発現亢進機序の解明、および S100A4 を抑制する治療法を開発することを目的とする。

研究テーマ：

- (1) 卵巣癌細胞における S100A4 発現増強および核内移行機序の解明： S100A4 発現亢進機序の解析をおこなう。
- (2) S100A4 発現抑制物質の探索： S100A4 阻害剤の探索の試みとして、ハイスループットスクリーニング (High throughput screening) 法を用いて約 1 万種類のコンパウンド (未精製薬剤) のストックから、S100A4 発現抑制活性のある薬剤のスクリーニングを試みる。
- (3) 新規に同定した化合物の機能解析と臨床応用に向けた検討：
この化合物の抗腫瘍能と抗癌剤感受性に対する作用および毒性を *in vitro* およびマウスを用いた実験系にて包括的に検討し、卵巣癌治療薬としての臨床応用の可能性を検討する。

(3) 今後の展開

◆終了後 1 年以内に、具体的な活動 (アクション) を行う予定

論文投稿 (発表)、口頭発表、展示会出展、特許出願、他事業への応募、他：

林 琢磨、堀内 晶子、佐野 健司、塩沢 丹里、小西 郁生：子宮平滑筋肉腫と子宮平滑筋腫に対する新規鑑別診断法の確立に向けて。松医会報 春号 90：印刷中

Hayashi T, Horiuchi A, Kobayashi Y, Hiraoka N, Kanai Y, Aburatani H, Tonegawa S, Sano K, and Konishi I.: Tumor immunoediting: Insights from tumorigenesis of uterine leiomyosarcoma. *Current Res. Immunol.* 2010; Impress. (Hayashi T. corresponding author)

招待講演, **Takuma Hayashi** (Symposiste, International Symposium): Symposium Section; Cancer Pathology and Imaging: From Biochemical Analysis to Diagnostic Tool. Presentation Title:

Establishment of diagnostic biomarker against uterine leiomyosarcoma for Development of Diagnosis and Anti-tumor Drug. 3rd World Cancer Congress 2010, June 21-24, 2010, Singapore, Singapore. シンポジウム(国際会議)

◆終了後1年にかぎらず、本結果(研究成果)の“今後の実用化に向けた活動(アクション)”について:

① 本結果(研究成果)をどうしていきたいか、コメントしてください。

女性の晩婚化・高齢初産婦の増加といったライフスタイルの変化によって、40歳代女性の妊孕性温存希望が強くなっている。これまで、30歳代までに妊娠、出産した女性は40歳代で子宮筋腫にかかった場合、子宮摘出術を施行されることが多かった。しかし、今日、子宮筋腫の治療方針は患者の社会背景を考慮して子宮をできるだけ温存する方法を考えなければならない。多くの子宮筋腫患者の中から、子宮温存の是非を決定する際の最大重要点は悪性腫瘍の可能性を術前に鑑別することである。本技術によって子宮筋腫と子宮平滑筋肉腫を正確に鑑別する方法が確立されれば最近急増している子宮温存希望患者に大きな恩恵が期待される。したがって、大阪市立大学医学部附属病院産婦人科の外来でLMSを疑われる患者より得られたバイオプシー生検を用いた症例サンプルにおけるCyclin EとLMP2の発現状況を個々の抗原を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色法によって検証を行うことの意義は大きい。実用化に向けて研究データを更に蓄積していくことを念頭に本プロジェクトを遂行したい。

② 本結果(研究成果)と企業、他の研究機関などとの関係

LMP2は子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫とを識別すべく新規鑑別マーカーに成り得ると考え国内外の特許を取得した。さらに、SIGMA-Aldrich Israel社(Rehovot, Israel)が当該の新規技術の有用性、将来性を認めるところとなり、2008年01月02日付けで信州大学との間で、下記国際特許に基づいたヒト子宮平滑筋肉腫の診断試薬を視野として試薬の共同開発を行う契約を結んだ(契約期間:20年間)。現在まで、信州大学とSIGMA-Aldrich Israel社との共同開発によって、ヒト組織を用いた免疫組織化学染色専用の以下に示す2種類の抗体の開発が行われ、SIGMA-Aldrich社より販売に向けて準備されている。

抗ヒトLMP2モノクローナル抗体 produced in mouse, Lot# 120709, Clone# LMP2-12.3

抗ヒトLMP2モノクローナル抗体 produced in mouse, Clone# LMP15 purified IgG + 5 mM Na₃

さらに、SIGMA-Aldrich Japan本社にて、信州大学(私達の研究チーム)は、SIGMA-Aldrich Israel社と取得済みの国際特許に基づいたヒト子宮平滑筋肉腫の診断試薬の共同開発の可能性について話し合いを行っている(10月30日2009年)。

抗Cyclin Eウサギモノクローナル抗体を産生するウサギハイブリドーマの確立に関しては、(株)ベックス(東京都板橋区)と共同開発を行っている。現在まで、目的のモノクローナル抗体を得るために必要な抗原GST-Cyclin E融合蛋白質の精製を行っている。目的のヒト組織を用いた免疫組織化学染色専用の抗ヒトCyclin Eモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが確立された際、同抗体を(株)ベックスあるいは他の企業より販売を行いたい。

現在、本技術で得られた染色強度を客観的に判断可能とするために、(株)インテックシステム研究社(東京都板橋区)との共同開発による染色強度の数値化について検討を行っている。鑑別マーカーでの病理診断では病理医の主観性に頼る傾向が強く、客観性に欠けている。(株)インテックシステム研究所

は、現行の病理医の手作業（バイオマーカー陽性細胞の判定・選別とカウント）の自動化に取り組む。最終目標として、病理診断に必須な病理組織を画像化させて、各医療機関で遂行されている電子カルテへの連動を行っていききたい。

(4) 知的財産権について

① 試験の結果得られた知的財産権について、下記、表へ記入してください。

* 今回の研究課題成果についてのみ、出願、出願予定のものを記載しています。

出願状況	出 願
発明等の名称	LMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の検出
出願日	2006年11月30日
出願番号	PCT/JP2006/324403（特願2005-347227）
出願人	国立大学法人信州大学
発明者（所属・役職）	林琢磨（信州大学大学院医学系研究科・准教授）、小林幸弘（信州大学医学部附属病院臨床検査部・主任）、佐野健司（信州大学医学部附属病院臨床検査部・講師）、堀内晶子（信州大学医学部産婦人科・講師）、小西郁生（京都大学大学院医学系研究科産婦人科・教授）

題目：ヒト子宮平滑筋肉腫の新規鑑別マーカー：イムノプロテアソーム LMP2（日本 平成 17 年 11 月 30 日 特願 2005-347227、発明代表者：林 琢磨）国際出願番号 (PCT/JP2006/324403)
 (独) 科学技術振興機構 (JST)：産学連携・技術移転事業特許出願支援制度：国際特許出願 PTC 出願 指定国移行（新規）（代表：林 琢磨）JST 整理番号：S2006-0097PCT
 発明者：林 琢磨、小林 幸弘、佐野 健司、堀内 晶子、小西 郁生
 出願者：小宮山 淳 信州大学 学長

ヨーロッパ特許への出願（ドイツ、フランス）

Title: LMP2 for use as a marker in detecting uterine leiomyosarcoma

Europe No. 06834158.5 (Filing Date June 24 2008) Debit Note No. 08/18729

米国特許への出願

Title: Detection of uterine leiomyosarcoma using LMP2

Application No. 12095585 (Filing Date May 30 2008) EFS No. 3380866

Ref. 327127US-3524-229052-0-PCT

日本国内への出願

題目：LMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の検出（日本 平成 17 年 11 月 30 日 特願 2005-347227、

発明代表者：林 琢磨）国際出願番号 (PCT/JP2006/324403)、日本国内出願番号 特願 2007-548042

②本試験終了後 1～3 年間についての、知財権確保について、計画・方針・展望

現在、私達の研究グループは、抗 Cyclin E ウサギモノクローナル抗体を産生するウサギハイブリドーマの確立に向けて、(株)ベックス(東京都板橋区)と共同開発を行っている。現在まで、目的のモノクロ

一ナル抗体を得るために必要な抗原 GST-Cyclin E 融合蛋白質の精製を行っている。目的のヒト組織を用いた免疫組織化学染色専用の抗ヒト Cyclin E モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが確立された際、当該のハイブリドーマの特許権に関して、信州大学と(株)ベックスとで話し合いを行う予定である。

(5) 今後のフォローアップ等について（コーディネータ記載）

① 本試験終了後1年後までに行う活動（アクション）について

本課題で有効性が立証された Cyclin E 抗体を用いた子宮平滑筋肉腫診断法は、代表研究者らによって先行して研究が実施された“LMP2 抗体での診断方法（PCT/JP2006/324403、指定国移行中）”と組み合わせ、将来的に、簡便な子宮平滑筋肉腫の免疫組織染色診断法が確立できる。そのためには、代表研究者も既に取り組んでいるように、共同研究等によるバイオプシー生検の症例数の増加が急務である。そこで、喫緊の活動として共同研究先との連携をフォローアップしている。

また、LMP2 及び Cyclin E の高感度抗体の作成も必須であるため、既に SIGMA-Aldrich Israel 社等との連携もフォローアップしている。

これらを含め、既に多機関との共同研究体制が確立されている本研究については、大型の競争的資金を導入して、効率的かつ多数のデータ蓄積が必要である。そこで、内閣府：最先端・次世代研究支援プログラム（題名：新規診断法・治療法の開発に向けて：微小環境における婦人科悪性腫瘍の生物学的応答性の検討）等への申請と、採択された後の研究マネジメント体制の構築をフォローアップする。

② 本試験終了後3年後までに行う活動（アクション）について

本研究は、厚生労働省の認証を見据えた全国規模での展開を予定していることから、将来的な実用化の可能性は非常に高い。そこで、内閣府：最先端・次世代研究支援プログラム等の大型競争的資金の導入と、その研究マネジメントをフォローし、企業化に向けた知的財産の権利化、販路開拓、保険収載等を支援する。さらに海外市場も視野にいれた戦略を共同研究先と連携して構築する。

③ 本試験終了後3年後以降（長期的）に行う活動（アクション）について

導入した大型競争的資金の研究マネジメントをフォローアップすると同時に、知的財産の権利化、販路開拓、保険収載等を支援することにより、企業化を達成する。