



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I521207 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：103146429 (22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 31 日

(51)Int. Cl. : G01N33/574 (2006.01) C07K16/24 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：王照元 WANG, JAW-YUAN (TW)；郭柏麟 KUO, PO-LIN (TW)；甘蓉瑜 KAN, JUNG-YU (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

Be´ atrice Cambien et al, CCL5 Neutralization Restricts Cancer Growth and Potentiates the Targeting of PDGFRb in Colorectal Carcinoma, December 2011, VoL. 6 , Issue 12 , e2884, p1-11.

Li-Yuan Chang et al, Tumor-Derived Chemokine CCL5 Enhances TGF-b-Mediated Killing of CD8p T Cells in Colon Cancer by T-Regulatory Cells, Cancer Res; 72(5), March 1 2012, 1092-1102.

Feride Kroepil et al, Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters, BMC Cancer 2013, 13:145.

Yimin Zhang et al , Role of CCL5 in invasion, proliferation and proportion of CD44+/CD24- phenotype of MCF-7 cells and correlation of CCL5 and CCR5 expression with breast cancer progression, ONCOLOGY REPORTS 21: 1113-1121, 2009.

Gali Soria et al, Inflammatory mediators in breast cancer: Coordinated expression of TNFa & IL-1b with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to mesenchymal transition, BMC Cancer 2011, 11:130.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：9 共 64 頁

(54)名稱

大腸癌之檢測方法及其應用

METHOD AND FOR THE DETERMINATION OF COLON CANCER AND APPLICATION THEREFOR

(57)摘要

本發明提出一種評估抗體治療大腸癌效能的方法，其中所述抗體係抗受大腸癌細胞浸潤的腫瘤相關樹突細胞所分泌的人類趨化因子(C-C 基序)配體 5。該方法包括下列步驟：將該抗體與該大腸癌細胞混合；以及評估該大腸癌細胞的訊息傳遞的表現，其中該訊息傳遞包括轉移相關肺腺癌轉錄因子 1 和鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子的其中之一。

A method for evaluating a therapeutic efficacy of a antibody for colon cancer is claimed in the this invention, wherein the antibody is prepared against human chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) secreted by colon tumor-infiltrating tumor-associated dendritic cells. The method comprises steps of: mixing the antibody with colon cancer cells; and evaluating an efficacy of a signal transduction, including one of the combination of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1) and basic helix-loop-helix transcription factor (Snail).

指定代表圖：

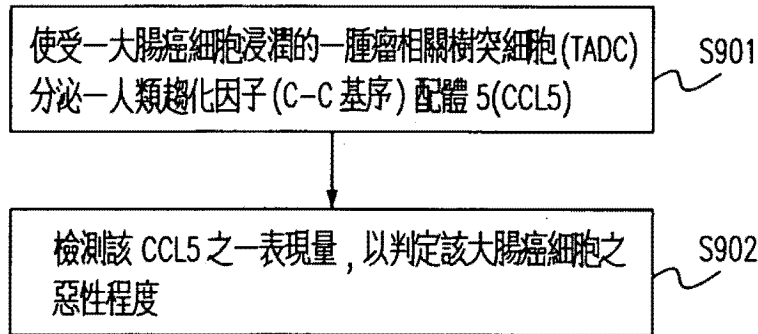


圖 9

發明摘要

※ 申請案號：103146429

601N 33/574 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

※ 申請日：103.12.31

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

大腸癌之檢測方法及其應用

Method and for the determination of colon cancer and application therefor

【中文】

本發明提出一種評估抗體治療大腸癌效能的方法，其中所述抗體係抗受大腸癌細胞浸潤的腫瘤相關樹突細胞所分泌的人類趨化因子（C-C基序）配體5。該方法包括下列步驟：將該抗體與該大腸癌細胞混合；以及評估該大腸癌細胞的訊息傳遞的表現，其中該訊息傳遞包括轉移相關肺腺癌轉錄因子1和鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子的其中之一。

【英文】

A method for evaluating a therapeutic efficacy of a antibody for colon cancer is claimed in the this invention, wherein the antibody is prepared against human chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) secreted by colon tumor-infiltrating tumor-associated dendritic cells. The method comprises steps of: mixing the antibody with colon cancer cells; and evaluating an efficacy of a signal transduction, including one of the combination of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1) and basic helix-loop-helix transcription factor (Snail).

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖9。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

大腸癌之檢測方法及其應用

Method and for the determination of colon cancer and application therefor

【技術領域】

【0001】 本發明主要揭露一種抗人類趨化因子(C-C基序)配體5的抗體(CCL5-antibody)的用途，特別是在大腸癌之檢測及治療的應用。

【先前技術】

【0002】 腫瘤的微環境包括基質細胞、免疫細胞(包含淋巴細胞、巨噬細胞和樹突細胞)、細胞外基質的組成、生長因子、細胞激素/化學激素及代謝產物(Peltekova et al., 2014)，且對於腫瘤的發展及治癌藥物的化學抗性扮演一個很重要的角色(Kato et al., 2013)。

【0003】 目前已知腫瘤的微環境與癌症的生成與進展密切相關。腫瘤周圍細胞可提供腫瘤進展的基礎支架或促進因子。

【0004】 人類化學激素(C-C基序)受質5(CCL5)，已知可以調節活化正常T細胞表現與分泌(RANTES)，亦被認為是多種慢性發炎性疾病的重要促進者，而且此惡性程度可歸咎於招募發炎細胞(Mackay, 2001)。CCL5被認為會在多種癌症中過度表現，且與癌症擴散過程之中多個重要步驟有關，包括在活化CC趨化因子受體(CC chemokine receptor) 1型、3型和5型之後，進而發生再生、遷移、入侵、血管增生和轉移增生。

【0005】 除了癌細胞生長與發展之外，CCL5亦與抵抗傳統化療藥物(比如cisplatin和 tamoxifen)有關。高水平的CCL5已被認為是癌症的生物

指標，並可指導預後及治療方針。

【0006】 上皮細胞轉型成間質細胞 (EMT) 係癌症發展的重要因子，因其增強了腫瘤細胞的轉移能力。

【0007】 Snail 是一鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子 (basic helix-loop-helix transcription factor)，其藉由降低附著連接蛋白，比如鈣黏著素 E (E-cadherin) 的表現而調節 EMT。愈來愈多的證據顯示，在多個人類腫瘤組織之中，Snail 的活性是提昇的，且其表現與入侵、轉移與不良預後有關。

【0008】 長段非編碼 RNA (超過 200 個核苷酸的轉錄子)，被認為與基因表現和基因體組成的調節有關，或特定於細胞核之中功能性區域的一結構骨架。

【0009】 轉移相關肺腺癌轉錄因子 1 (MALAT-1) 屬於長段非編碼 RNA，其被認為是轉移和活動的調節子。MALAT-1 的訊息傳遞表現與多種人類實體腫瘤的轉移高度相關，其包括肺癌、肝癌、前列腺癌、膀胱癌和大腸癌。MALAT-1 亦參與了癌症轉移的部分步驟，包括細胞活力和 EMT，並可藉由增加 EMT 轉錄因子 ZEB 和 Slug 的表現而鼓舞上皮細胞轉型成間質表型細胞。

【0010】 然而，目前尚未完全釐清何種分子會參與大腸癌及腫瘤相關樹突細胞之間的交互作用。

【發明內容】

【0011】 本發明主要目的在於提供藉由測定大腸癌細胞的訊息核糖核酸 (mRNA) 和蛋白質表現量的其中之一從而檢測癌症之方法。

【0012】 本發明一實施例在於提出一種評估一抗體治療大腸癌效能

的方法，其中該抗體係抗受一大腸癌細胞浸潤的一腫瘤相關樹突細胞（TADC）所分泌的一人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）。該方法包括下列步驟：將該抗體與該大腸癌細胞混合；以及評估該大腸癌細胞的一訊息傳遞的表現，其中該訊息傳遞包括轉移相關肺腺癌轉錄因子1（MALAT-1）和鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子（Snail）的其中之一。

【0013】 本發明另一實施例在於提出一種抗人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）的抗體，其可用於減緩一大腸癌細胞的細胞遷移。

【0014】 本發明另一實施例在於提出一種抗人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）的抗體，其可用於減緩一大腸癌細胞的入侵。

【0015】 本發明另一實施例在於提出一種抗人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）的抗體，其可用於減緩一大腸癌細胞的上皮細胞轉型成間質細胞。

【0016】 本發明另一實施例在於提出一種大腸癌之檢測方法。該檢測方法包括下列步驟：使受一大腸癌細胞浸潤的一腫瘤相關樹突細胞（TADC）分泌一人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）；以及檢測該CCL5之一表現量，以判定該大腸癌細胞之惡性程度。

【0017】 本發明另一實施例在於提出一種治療大腸癌之醫藥組合物。該醫藥組合物包括抗人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）的一抗體。

【圖式簡單說明】

【0018】

圖1A顯示傷口癒合檢測法的實驗結果；

圖1B-1和圖1B-2顯示通透性嵌套系統的實驗結果；

圖1C-1和圖1C-2顯示細胞入侵的實驗結果；

圖1D顯示上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果；

圖2A顯示腫瘤相關樹突細胞中CCL5 mRNA的表現；

圖2B顯示腫瘤相關樹突細胞中CCL5蛋白質的表現；

圖2C顯示大腸癌細胞經傷口癒合檢測法的實驗結果；

圖2D-1和圖2D-2顯示大腸癌細胞經通透性嵌套系統的實驗結果；

圖2E-1和圖2E-2顯示大腸癌細胞經上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果；

圖 2F 顯示 CCL5 的濃度變化對於上皮細胞指標以及纖維母細胞指標的影響；

圖3A-1和圖3A-2顯示經抗體阻斷CCL5之後，大腸癌細胞的細胞遷移的實驗結果；

圖3B-1和圖3B-2顯示經抗體阻斷CCL5之後，大腸癌細胞的細胞入侵的實驗結果；

圖3C顯示經抗體阻斷CCL5之後，大腸癌細胞的上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果；

圖4A、圖4B和圖4C顯示大腸癌細胞的Snail的表現量；

圖4D-1、圖4D-2、圖4D-3和圖4D-4顯示抑制Snail的表現後，大腸癌細胞的細胞遷移的實驗結果；

圖4E-1、圖4E-2、圖4E-3和圖4E-4顯示抑制Snail的表現後，大腸癌細胞的細胞入侵的實驗結果；

圖4F-1和圖4F-2顯示抑制Snail的表現後，大腸癌細胞的上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果；

圖5A顯示大腸癌細胞的MALAT-1的微陣列表現量；

圖5B-1和圖5B-2顯示大腸癌細胞的MALAT-1的即時聚合酶鏈式反應表現量；

圖5C-1和圖5C-2顯示大腸癌細胞的MALAT-1的表現量；

圖5D-1和圖5D-2顯示抑制CCL5的表現後，大腸癌細胞的MALAT-1的表現量；

圖6A顯示MALAT-1小干擾RNA的作用效率；

圖6B-1、圖6B-2、圖6B-3和圖6B-4顯示抑制MALAT-1的表現後，大腸癌細胞的細胞遷移的實驗結果；

圖6C-1、圖6C-2、圖6C-3和圖6C-4顯示抑制MALAT-1的表現後，大腸癌細胞的細胞入侵的實驗結果；

圖6D-1和圖6D-2顯示抑制MALAT-1的表現後，大腸癌細胞的Snail和E-cadherin的表現；

圖7A顯示大腸癌病患的CD11c⁺樹突細胞中CCL5的分佈表現；

圖7B顯示大腸癌病患的血清中CCL5的分佈表現；

圖8顯示評估一抗體治療大腸癌效能的方法的一實施例；以及

圖9顯示一種大腸癌之檢測方法的一實施例。

【實施方式】

【0019】 【實施例一】

【0020】 請參閱圖1A、1B-1、1B-2、1C-1、1C-2和1D。圖1A顯示傷

口癒合檢測法的實驗結果。圖1B-1和圖1B-2顯示通透性嵌套系統的實驗結果。圖1C-1和圖1C-2顯示細胞入侵的實驗結果。圖1D顯示上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果。本實施例欲證明是否腫瘤相關樹突細胞會促進大腸癌的發展。發明人經傷口癒合檢測法後發現，腫瘤相關樹突細胞環境的培養基會促進大腸癌細胞的遷移(請參圖1A)；另外，在通透性嵌套(transwell)系統(請參圖1B-1和圖1B-2)，入侵(請參圖1C-1和圖1C-2)和上皮細胞轉型成間質細胞的過程可有同樣結果；即上皮細胞的指標，比如鈣黏著素E (E-cadherin) 和緊密連接蛋白3 (Claudin-3)；以及纖維母細胞的指標，比如鈣黏著素N (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)和平滑肌 α -肌動蛋白 (α -smooth muscle actin, SMA)的不同表現(請參圖1D)。

【0021】 在本實施例之中，特定時間下用人類大腸癌細胞株SW480的腫瘤相關樹突細胞環境的培養基 (SW480-TADC-CM) 去處理SW480細胞，以及用人類大腸癌細胞株SW620的腫瘤相關樹突細胞環境的培養基 (SW620-TADC-CM) 去處理SW620細胞，處理72小時後進行傷口癒合檢測法以及處理24小時後進行上皮細胞轉型成間質細胞過程檢測法。

【0022】 利用QCM™ 24小孔細胞遷移及入侵檢測法來觀察SW480及SW620細胞遷移及入侵的能力。

【0023】 在癌細胞48小時的遷移及入侵實驗中，以體積百分濃度20的SW480腫瘤相關樹突細胞環境的培養基處理SW480細胞 (SW480-TADC)、SW620腫瘤相關樹突細胞環境的培養基處理SW620細胞 (SW620-TADC) 及單核細胞衍生出之樹突細胞環境的培養基 (mdDC-CM)，作為控制組，以上培養基皆作為化學激素之來源。

【0024】 每一個值皆為3次實驗後取平均數在加減標準誤差。在經過學生t統計法(Student's t test)分析後，星號代表在兩個測試組中具有顯著差異(P值小於0.05)。

【0025】 【實施例二】

【0026】 請參閱圖2A、2B、2C、2D-1、2D-2、2E-1、2E-2和2F。圖2A顯示腫瘤相關樹突細胞中CCL5 mRNA的表現。圖2B顯示腫瘤相關樹突細胞中CCL5蛋白質的表現。圖2C顯示大腸癌細胞經傷口癒合檢測法的實驗結果。圖2D-1和圖2D-2顯示大腸癌細胞經通透性嵌套系統的實驗結果。圖2E-1和圖2E-2顯示大腸癌細胞經上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果。本實施例欲確認CCL5是否會參與在腫瘤相關樹突細胞所調節的癌症的惡性發展。大腸癌細胞會增加腫瘤相關樹突細胞中CCL5 mRNA(請參圖2A)及蛋白質(請參圖2B)的表現。CCL5會增加細胞的遷移，其可見於在傷口癒合檢測法(請參圖2C)及通透性嵌套系統(請參圖2B)。CCL5會增加SW480和SW620細胞的入侵(請參圖2D-1和圖2D-2)及上皮細胞轉型成間質細胞的過程(請參圖2E-1和圖2E-2)。圖2F顯示了CCL5的濃度變化對於以下指標的影響：鈣黏著素E (E-cadherin)、緊密連接蛋白3 (Claudin-3)、鈣黏著素N (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)以及平滑肌 α -肌動蛋白 (α -smooth muscle actin, SMA)。

【0027】 利用CD14⁺單核細胞培養在SW480或SW620環境的培養基(體積百分濃度為20)再加入巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF) (20 ng/ml)及白細胞介素-4 (IL-4) (20 ng/ml)5天就可產生出單核細胞衍生出之樹突細胞、SW480及SW620腫瘤相關樹突細胞。mRNA及蛋白質的表現量由即時聚合酶鏈式反應 (qRT-PCR) 及酵素免疫分析法 (ELISA) 來評估。SW480

及SW620癌細胞的遷移能力是用傷口癒合檢測法來評估。SW480及SW620細胞的入侵及遷移能力是由上述方式來評估。

【0028】 CCL5 (0.1和1 ng/ml)在癌細胞遷移及入侵(48小時)實驗中作為化學激素。每一個值皆為3次實驗後取平均數在加減標準誤差。在經過學生t統計法(Student's t test)分析後，星號代表在與控制組比較後具有顯著差異(P值小於0.05)。

【0029】 【實施例三】

【0030】 請參閱圖3A-1、3A-2、3B-1、3B-2和3C。圖3A-1和圖3A-2顯示經抗體阻斷CCL5之後，大腸癌細胞的細胞遷移的實驗結果。圖3B-1和圖3B-2顯示經抗體阻斷CCL5之後，大腸癌細胞的細胞入侵的實驗結果；圖3C顯示經抗體阻斷CCL5之後，大腸癌細胞的上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果。本實施例利用特定的抗體去中和 (neutralize) CCL5，可降低由腫瘤相關樹突細胞環境的培養基所促進的癌症發展。利用市售抗CCL5的抗體 (Abcam/ UK；請參序列表) 去阻斷CCL5可以降低腫瘤相關樹突細胞環境的培養基對於細胞遷移(請參圖3A-1和圖3A-2)、入侵(請參圖3B-1和圖3B-2)和上皮細胞轉型成間質細胞過程的影響(請參圖3C)。

【0031】 利用單核細胞衍生出之樹突細胞環境的培養基 (mdDC-CM)或腫瘤相關樹突細胞環境的培養基(TADC-CM)加上抗CCL5的抗體 (CCL5 ab.) 或免疫球蛋白G (IgG) 去處理SW480和SW620細胞。將大腸癌細胞種於上方的槽內再處理抗CCL5的抗體(2 μ g/ml)或免疫球蛋白G(2 μ g/ml)，腫瘤相關樹突細胞環境的培養基(體積百分濃度20)則加在下方的孔盤內做為吸引因子，共48小時。有遷移及入侵的細胞由上述方法測量

之。

【0032】 每一個值皆為3次實驗後取平均數在加減標準誤差。在經過學生t統計法(Student's t test)分析後，星號代表在兩個測試組中具有顯著差異(P值小於0.05)。

【0033】 【實施例四】

【0034】 請參閱圖4A、4B、4C、4D-1、4D-2、4D-3、4D-4、4E-1、4E-2、4E-3和4E-4。圖4A、圖4B和圖4C顯示大腸癌細胞的Snail的表現量。圖4D-1、圖4D-2、圖4D-3和圖4D-4顯示抑制Snail的表現後，大腸癌細胞的細胞遷移的實驗結果。圖4E-1、圖4E-2、圖4E-3和圖4E-4顯示抑制Snail的表現後，大腸癌細胞的細胞入侵的實驗結果。圖4F-1和圖4F-2顯示抑制Snail的表現後，大腸癌細胞的上皮細胞轉型成間質細胞的實驗結果。本實施例欲證明Snail在腫瘤相關樹突細胞所促進癌症發展的過程中是一個很重要的調節者。腫瘤相關樹突細胞環境的培養基會增加Snail的表現量(請參圖4A)。CCL5會增加Snail的表現量(請參圖4B)。抑制CCL5的表現可阻斷腫瘤相關樹突細胞環境的培養基所導致Snail的表現量上升(請參圖4C)。抑制Snail的表現可降低腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5所促進的細胞遷移(請參圖4D-1、圖4D-2、圖4D-3和圖4D-4)、入侵(請參圖4E-1、圖4E-2、圖4E-3和圖4E-4)及上皮細胞轉型成間質細胞的過程(請參圖4F-1和圖4F-2)。

【0035】 SW480及SW620細胞處理CCL5、單核細胞衍生出之樹突細胞環境的培養基或腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及抗CCL5的抗體(2 µg/ml)或免疫球蛋白G(2 µg/ml)24小時，接著利用免疫點墨法去評估Snail的

表現量。細胞利用轉染技術送入控制組或Snail的小干擾訊息核糖核酸(Snail siRNA)，接著再加入單核細胞衍生出之樹突細胞環境的培養基或腫瘤相關樹突細胞環境的培養基。大腸癌細胞的遷移及入侵能力則由上述方法予以測量。

【0036】 每一個值皆為3次實驗後取平均數在加減標準誤差。在經過學生t統計法(Student's t test)分析後，星號代表在兩個測試組中具有顯著差異(P值小於0.05)。

【0037】 【實施例五】

【0038】 請參閱圖5A、5B-1、5B-2、5C-1、5C-2、5D-1和5D-2。圖5A顯示大腸癌細胞的MALAT-1的微陣列表現量。圖5B-1和圖5B-2顯示大腸癌細胞的MALAT-1的即時聚合酶鏈式反應表現量。圖5C-1和圖5C-2顯示大腸癌細胞的MALAT-1的表現量。圖5D-1和圖5D-2顯示抑制CCL5的表現後，大腸癌細胞的MALAT-1的表現量。本實施例主要說明了腫瘤相關樹突細胞所分泌CCL5會增加大腸癌細胞中長段非編碼RNA MALAT-1的表現量上升。CCL5會提升MALAT-1的表現量可由微陣列(請參圖5A)及即時聚合酶鏈式反應(請參圖5B-1和圖5B-2)來測量。SW480及SW620腫瘤相關樹突細胞環境的培養基會增加SW480及SW620細胞中MALAT-1的表現量(請參圖5C-1和圖5C-2)。抑制CCL5的表現可阻斷腫瘤相關樹突細胞環境的培養基所導致MALAT-1的表現量上升(請參圖5D-1和圖5D-2)。

【0039】 細胞處理腫瘤相關樹突細胞環境的培養基或CCL5及抗CCL5的抗體(2 $\mu\text{g/ml}$)或免疫球蛋白G(2 $\mu\text{g/ml}$)6小時，接著利用即時聚合酶鏈式反應測量MALAT-1的表現量。

【0040】 每一個值皆為三次實驗後取平均數在加減標準誤差。在經過學生t統計法(Student's t test)分析後，星號代表在兩個測試組中具有顯著差異(P值小於0.05)。

【0041】 【實施例六】

【0042】 請參閱圖6A、6B-1、6B-2、6B-3、6B-4、6C-1、6C-2、6C-3、6C-4、6D-1和6D-2。圖6A顯示MALAT-1小干擾RNA的作用效率。圖6B-1、圖6B-2、圖6B-3和圖6B-4顯示抑制MALAT-1的表現後，大腸癌細胞的細胞遷移的實驗結果。圖6C-1、圖6C-2、圖6C-3和圖6C-4顯示抑制MALAT-1的表現後，大腸癌細胞的細胞入侵的實驗結果。圖6D-1和圖6D-2顯示抑制MALAT-1的表現後，大腸癌細胞的Snail和E-cadherin的表現。本實施例探討MALAT-1如何調節Snail的表現。MALAT-1小干擾RNA的作用效率(請參圖6A)。抑制MALAT-1的表現可降低腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5所促進的細胞遷移(請參圖6B)、入侵(請參圖6C-1、圖6C-2、圖6C-3和圖6C-4)，及降低大腸癌細胞中Snail和E-cadherin的表現量(請參圖6D-1和圖6D-2)。

【0043】 細胞利用轉染技術送入MALAT-1的小干擾RNA (MALAT-1 siRNA)，細胞的生物活性及E-cadherin的表現量則由上述方法測量之。

【0044】 每一個值皆為三次實驗後取平均數在加減標準誤差。在經過學生t統計法(Student's t test)分析後，星號代表在兩個測試組中具有顯著差異(P值小於0.05)。

【0045】 【實施例七】

【0046】 請參閱圖7A和。圖7A顯示大腸癌病患的CD11c⁺樹突細胞中

CCL5的分佈表現。圖7B顯示大腸癌病患的血清中CCL5的分佈表現。本實施例證實了大腸癌病患的CD11c⁺樹突細胞中CCL5的含量是很高的。在腫瘤切片中有很多會表現大量CCL5的CD11c⁺樹突細胞（請參圖7A）。腫瘤與非腫瘤區域(樣本數為10)被切下及染色，並且利用共軛焦顯微鏡(10倍及40倍)去分析。利用大腸癌病患的血清來評估CCL5的含量(請參圖7B)。

【0047】 利用酵素免疫分析法來測量大腸癌病患(樣本數為60)及健康捐贈者(樣本數為15)的血清中CCL5的含量。

【0048】 【實施例八】

【0049】 請參閱圖8，其顯示評估一抗體治療大腸癌效能的方法的一實施例。在步驟S801之中，限定該抗體係抗受一大腸癌細胞浸潤的一腫瘤相關樹突細胞(TADC)所分泌的一人類趨化因子(C-C基序)配體5(CCL5)；在步驟S802之中，將該抗體與該大腸癌細胞混合；以及在步驟S803之中，評估該大腸癌細胞的一訊息傳遞的表現，其中該訊息傳遞包括轉移相關肺腺癌轉錄因子1(MALAT-1)和鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子(Snail)的其中之一。

【0050】 【實施例九】

【0051】 請參閱圖9，其顯示一種大腸癌之檢測方法的一實施例。在步驟S901之中，使受一大腸癌細胞浸潤的一腫瘤相關樹突細胞(TADC)分泌一人類趨化因子(C-C基序)配體5(CCL5)；以及在步驟S902之中，檢測該CCL5之一表現量，以判定該大腸癌細胞之惡性程度。

【0052】 【結果與討論】

【0053】 腫瘤相關樹突細胞會促進大腸癌細胞的遷移、入侵及上皮細胞轉型成間質細胞的過程

【0054】 爲了了解腫瘤相關樹突細胞對於大腸癌發展的重要性，在一實施例中，發明人利用腫瘤相關樹突細胞環境的培養基去探討對於大腸癌細胞的遷移、入侵及上皮細胞轉型成間質細胞的過程有何影響。經傷口癒合檢測法後發現，SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞環境的培養基(20%)會提升大腸癌細胞SW480及SW620之遷移。除此之外，SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞環境的培養基也會提升SW480及SW620細胞之入侵的能力。再者，SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞環境的培養基會使SW480及SW620細胞走向上皮細胞轉型成間質細胞的過程，該過程包括上皮細胞的指標(鈣黏著素E (E-cadherin) 和緊密連接蛋白3 (Claudin-3))表現量下降，以及纖維母細胞的指標(鈣黏著素N (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 和平滑肌 α -肌動蛋白 (α -smooth muscle actin, SMA))表現量上升。

【0055】 CCL5在腫瘤相關樹突細胞所調控的癌症發展中扮演重要的角色

【0056】 爲了找出是哪種因子參與在腫瘤相關樹突細胞調節大腸癌發展的過程，在一實施例之中，利用微陣列來評估SW480之腫瘤相關樹突細胞的基因檔案。結果顯示，SW480之腫瘤相關樹突細胞中有幾個可溶性因子表現量會提升相較於單核細胞衍生出之樹突細胞。在表現量有上升的基因當中，即時聚合酶鏈式反應實驗結果顯示過敏性細胞激素在SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞中表現量分別上升8.18和21.02倍。酶聯免疫吸附試驗結果顯示CCL5的蛋白質表現量在SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞中也有上升的趨勢。

【0057】 接著，評估CCL5蛋白質對於SW480及SW620細胞遷移、入

侵及上皮細胞轉型成間質細胞過程的影響。CCL5會提升SW480及SW620細胞遷移及入侵的能力。此外，CCL5會降低E-cadherin、claudin-3的表現及提升N-cadherin、 α -smooth muscle actin的表現。結果指出：CCL5會促進SW480及SW620細胞上皮細胞轉型成間質細胞的過程。

【0058】 爲了釐清CCL5所扮演的角色，在一實施例中，發明人利用具有專一性的中和抗體去阻斷CCL5所造成的影響，然後去評估腫瘤相關樹突細胞環境的培養基對於SW480及SW620癌症發展的影響。實驗結果指出，在抗CCL5的抗體處理下，SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞環境的培養基對於大腸癌細胞SW480及SW620之遷移的影響就被中和了。

【0059】 同樣地，中和抗CCL5的抗體也會降低SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞環境的培養基對於大腸癌細胞SW480及SW620之入侵及上皮細胞轉型成間質細胞過程的影響。

【0060】 **Snail會參與在腫瘤相關樹突細胞所衍生出的CCL5所調控癌症發展的過程**

【0061】 由於Snail在癌症演化中是一個很重要的調節者，因此發明人推測Snail會參與在腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5所調節的大腸癌發展過程中。實驗結果指出，腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5會提升SW480及SW620細胞中Snail的表現量。

【0062】 除此之外，利用中和抗體去阻斷CCL5也會降低表現量有上升的Snail，指出CCL5在腫瘤相關樹突細胞所調節Snail的表現量上升過程中扮演很重要的角色。

【0063】 爲了探討Snail在腫瘤相關樹突細胞及CCL5所促進細胞的遷

移及入侵過程中是否是一個很重要的調節者，在一實施例中，利用小干擾RNA (siRNA) 的轉染技術去抑制Snail的表現。抑制Snail表現的效率則透過即時聚合酶鏈式反應及西方點墨法去評估。

【0064】 結果顯示，Snail可以在SW480及SW620細胞中有效率地被抑制，並且在Snail被抑制後也可降低腫瘤相關樹突細胞及CCL5所促進細胞的遷移及入侵。Snail被抑制後也可回復腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5處理下大腸癌細胞中E-cadherin的表現。

【0065】 在大腸癌中CCL5所造成的影響包括使MALAT-1的表現量上升

【0066】 爲了釐清CCL5所調節癌症發展的分子機制，在一實施例中，發明人利用微陣列來評估在CCL5的處理下SW480細胞之基因檔案。實驗結果指出在CCL5處理下SW480細胞的MALAT-1表現量上升3.53倍。即時聚合酶鏈式反應實驗結果顯示，在CCL5處理下會使MALAT-1表現量上升，此與用腫瘤相關樹突細胞環境的培養基處理大腸細胞是相似的結果。

【0067】 相似的結果同樣可在SW480及SW620之腫瘤相關樹突細胞環境的培養基處理SW480及SW620細胞下看到。利用中和抗體去抑制CCL5的表現也可同時降低表現量上升的MALAT-1，指出CCL5在腫瘤相關樹突細胞所調節的MALAT-1表現量上升中扮演很重要的角色。

【0068】 MALAT-1是Snail的上游調控者

【0069】 爲了去了解在大腸癌中MALAT-1對於腫瘤相關樹突細胞所衍生出的CCL5會造成何種影響，在一實施例中，發明人利用小干擾RNA的轉染技術去降低Snail的表現，然後去評估腫瘤相關樹突細胞環境的培養基

或CCL5會對於癌症的發展產生什麼影響。利用轉染技術將MALAT-1的小干擾RNA送入SW480及SW620細胞中來降低MALAT-1的表現量。在SW480及SW620細胞中皆可觀察到抑制MALAT-1的表現量可減少腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5調節的遷移及入侵。此外，有轉染MALAT-1小干擾RNA的SW480及SW620細胞可完全抵消由SW480、SW620腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5所造成的Snail的表現。

【0070】 相似的結果也可在有表現MALAT-1小干擾RNA的SW480及SW620細胞中觀察到，MALAT-1小干擾RNA會防止因腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5的作用所導致的E-cadherin表現量下降。

【0071】 腫瘤浸潤的樹突細胞會增進大腸癌細胞的轉移及入侵能力

【0072】 由於旁分泌而來的CCL5，TADC增加了大腸癌細胞的遷移、入侵和EMT之表現。這顯示出源自TADC的CCL5或可促進大腸癌發展。

【0073】 實驗顯示，病患體內升高水平的CCL5不僅源自癌症細胞，亦可來自腫瘤相關樹突細胞（TADC）。TADC分泌高水平的CCL5，並以此與癌症細胞溝通，而且隨後增加了癌症細胞的遷移、入侵和EMT之表現。再者，中和CCL5可減少TADC促進子（promoter）在癌症進展中的活性，包括細胞遷移、入侵和EMT。

【0074】 CCL5可作為預防大腸癌進展的另一治療標的

【0075】 實驗數據顯示，相較於非腫瘤區域，人類大腸癌組織中的CD11c⁺樹突細胞亦產生大量的CCL5。從實驗細胞的研究和臨床病患的切片皆強烈顯示，CCL5是一重要的作用物，其可透過TADC而增加大腸癌的發展。在本案，發明人提出經TADC-CM或CCL5處理後的SW480和SW620細

胞皆呈現了巨幅增加的Snail的表現。TADC-CM或CCL5的誘發效應源自於抑制表型標記物E-cadherin的表現。

【0076】 進而言之，利用siRNA的選擇性抑制Snail亦可降低TADC-CM或CCL5對於細胞遷移和入侵的效應，這便暗示了由TADC所引發的大腸癌表型轉形包括了由CCL5中介，對於Snail上行調節以及隨後的E-cadherin下行調節。

【0077】 發明人發現SW480和SW620細胞經TADC-CM或CCL5處理之後將導致MALAT-1和Snail表現增加。利用特定siRNA抑制MALAT-1的表現暗示了MALAT-1是Snail的上游分子。

【0078】 再者，敲落(knockdown)MALAT-1降低了TADC-CM和CCL5對於大腸癌細胞SW480及SW620的細胞遷移、入侵和EMT的效應，這便暗示了活化MALAT-1一事在大腸癌生長及轉移的重要性。

【0079】 TADC提昇大腸癌進展，其中源於TADC的CCL5造成表型轉形並促進癌症進程。CCL5促進MALAT-1的表現並隨後增加Snail的表現，此促進了大腸癌的進展。樹突細胞與癌症之間存在交互作用。使用抗CCL5策略(比如抗人類趨化因子(C-C基序)配體5(CCL5)的抗體等醫藥組合物)以鎖定侵犯性大腸癌，去抑制CCL5或CCL5相關的訊息傳遞可望成爲一個新的大腸癌病患的治療標靶。

【0080】 總之，本案發明人探討腫瘤相關樹突細胞所分泌的過敏細胞激素會促進大腸癌細胞的遷移、入侵及上皮細胞轉型成間質細胞的過程。利用會大量表現在大腸癌腫瘤相關樹突細胞周圍的人類化學激素(C-C基序)受質5(CCL5)，去模仿在腫瘤相關樹突細胞環境的培養基所促進大腸癌細胞

的遷移、入侵及上皮細胞轉型成間質細胞的過程。

【0081】 另外，在人類大腸癌切片發現腫瘤浸潤的CD11c⁺樹突細胞會分泌出CCL5。腫瘤相關樹突細胞所分泌的CCL5不僅會促進大腸癌的發展，也伴隨會提升非編碼RNA的轉移相關肺腺癌轉錄因子1(MALAT-1)的表現，接著MALAT-1會再提升下游Snail的表現。

【0082】 因此，阻斷MALAT-1，進而顯著降低Snail的表現，降低腫瘤相關樹突細胞環境的培養基及CCL5所調節的遷移、入侵。這顯示MALAT-1/Snail的機制在腫瘤相關樹突細胞所調節的癌症發展當中扮演一個很重要的角色。

【參考文獻】

- ✓ Kato H, Wang D, Daikoku T, Sun H, Dey SK, Dubois RN. 2013. CXCR2-expressing myeloid-derived suppressor cells are essential to promote colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 24(5):631-644.
- ✓ Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. 2001. *Nat Immunol* 2(2):95-101.
- ✓ Peltekova VD, Lemire M, Qazi AM, Zaidi SH, Trinh QM, Bielecki R, Rogers M, Hodgson L, Wang M, D'Souza DJ, Zandi S, Chong T, Kwan JY, Kozak K, De Borja R, Timms L, Rangrej J, Volar M, Chan-Seng-Yue M, Beck T, Ash C, Lee S, Wang J, Boutros PC, Stein LD, Dick JE, Gryfe R, McPherson JD, Zanke BW, Pollett A, Gallinger S, Hudson TJ. Identification of genes expressed by immune cells of the colon that are regulated by colorectal cancer-associated variants. 2014. *Int J Cancer* 134(10):2330-2341.

【符號說明】**【0083】**

mdDC-CM單核細胞衍生出之樹突細胞環境的培養基

TADC-CM腫瘤相關樹突細胞環境的培養基

SW480 SW620 人類大腸癌細胞株

N-cadherin鈣黏著素N

E-cadherin鈣黏著素E

SMA 平滑肌 α -肌動蛋白

Vimentin 波形蛋白

Claudin-3 緊密連接蛋白3

PAPDH 甘油醛3-磷酸脫氫酶

SW480-TADC-CM 人類大腸癌細胞株SW480的腫瘤相關樹突細胞環境的
培養基

SW620-TADC-CM 人類大腸癌細胞株SW620的腫瘤相關樹突細胞環境的
培養基

SW620-TADC-CM+IgG 人類大腸癌細胞株SW620的腫瘤相關樹突細胞環境
的培養基加免疫球蛋白G

SW620-TADC-CM+CCL5 ab. 人類大腸癌細胞株SW620的腫瘤相關樹突
細胞環境的培養基加抗CCL5的抗體

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】(請換頁單獨記載)

<110> 高雄醫學大學

<120> 大腸癌之檢測方法及其應用

<211> 91

<212> PRT

<213> Human

<223> CCL5 抗體之抗原

<400> 1

MKVSAAALAVILIATALCAPASASPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYF
YTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS 91

申請專利範圍

1. 一種評估一抗體治療大腸癌效能的方法，其中該抗體係抗受一大腸癌細胞浸潤的一腫瘤相關樹突細胞（TADC）所分泌的一人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5），包括下列步驟：
將該抗體與該大腸癌細胞混合；以及
評估該大腸癌細胞的一訊息傳遞的表現，其中該訊息傳遞包括轉移相關肺腺癌轉錄因子1（MALAT-1）和鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子（Snail）的至少其中之一，且該抗體阻斷MALAT-1及Snail的表現量上升。
2. 如申請專利範圍第1項所述之方法，更包括下列步驟：評估該大腸癌細胞的細胞遷移的表現。
3. 如申請專利範圍第2項所述之方法，更包括下列步驟：評估該大腸癌細胞的入侵的表現。
4. 如申請專利範圍第3項所述之方法，更包括下列步驟：評估該大腸癌細胞的上皮細胞轉型成間質細胞的表現。
5. 一種大腸癌之檢測方法，包括下列步驟：
使受一大腸癌細胞浸潤的一腫瘤相關樹突細胞（TADC）分泌一人類趨化因子（C-C基序）配體5（CCL5）；以及
檢測該CCL5之一表現量，以判定該大腸癌細胞之惡性程度，其中該CCL5之該表現量與該大腸癌細胞之惡性程度成正比。
6. 如申請專利範圍第5項所述之檢測方法，其中該表現量選自該CCL5的訊息核糖核酸（mRNA）和蛋白質表現量的其中之一。

圖式

公告本

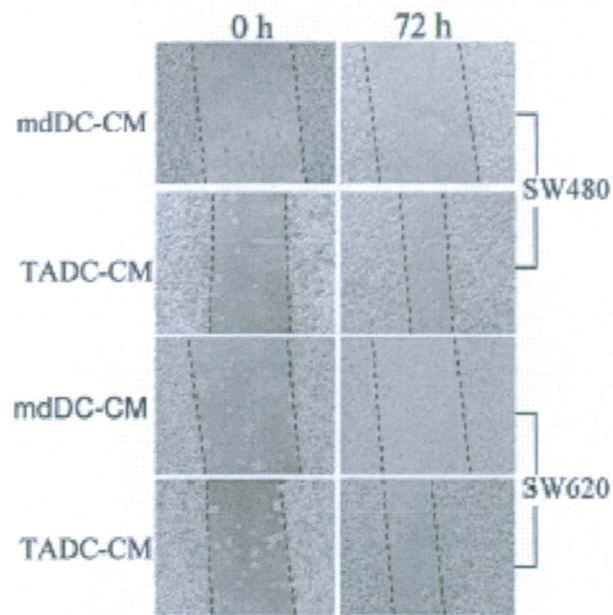


圖 1A

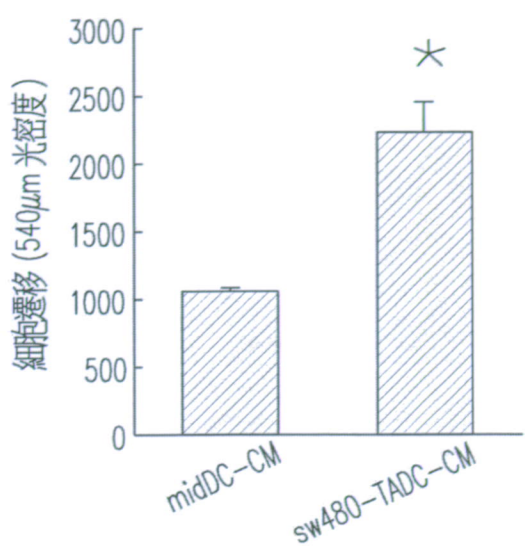


圖 1B-1

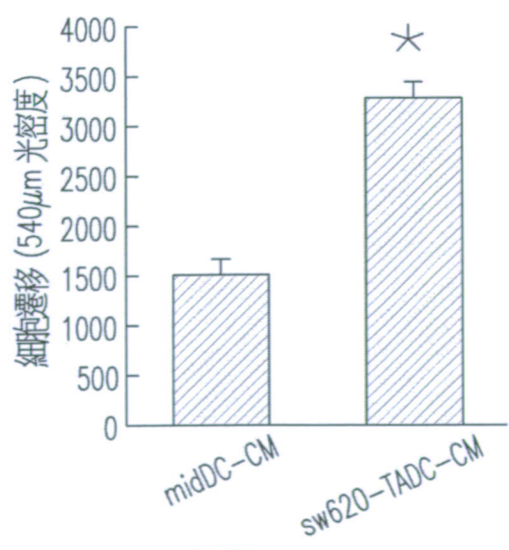


圖 1B-2

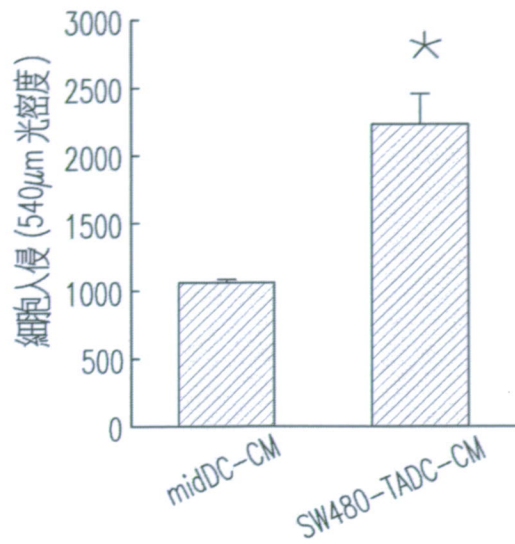


圖 1C-1

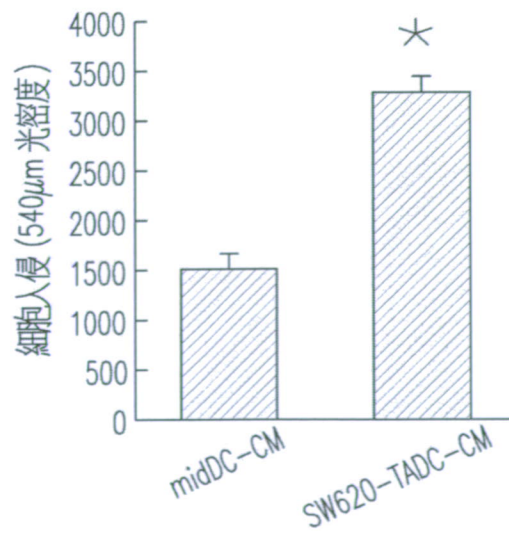


圖 1C-2

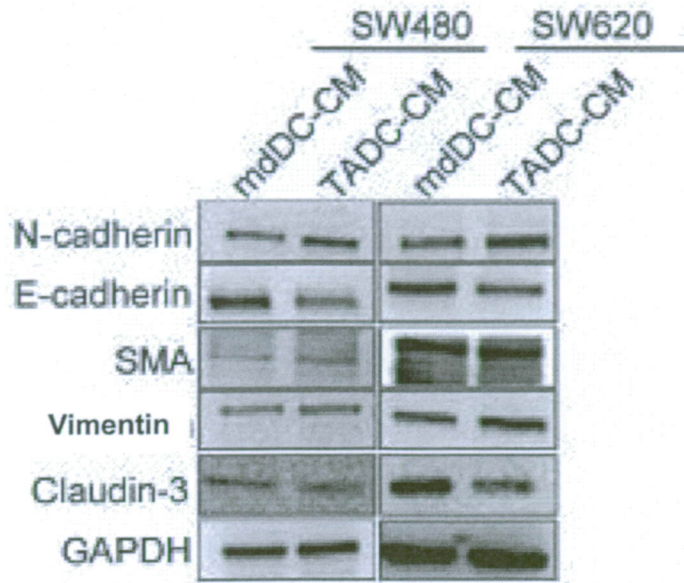


圖 1D

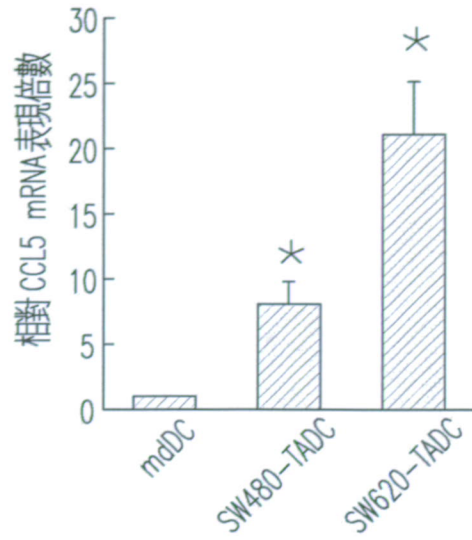


圖 2A

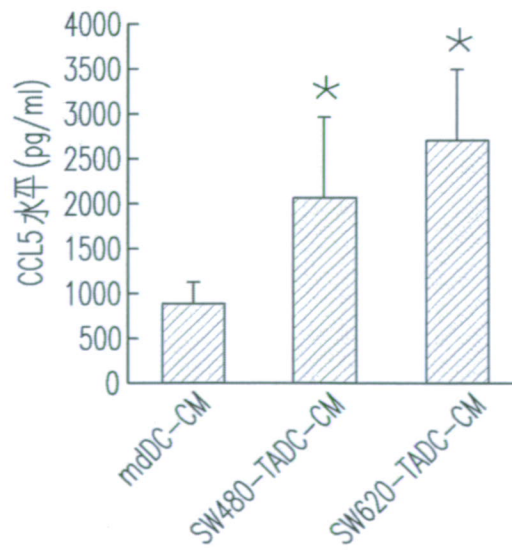


圖 2B

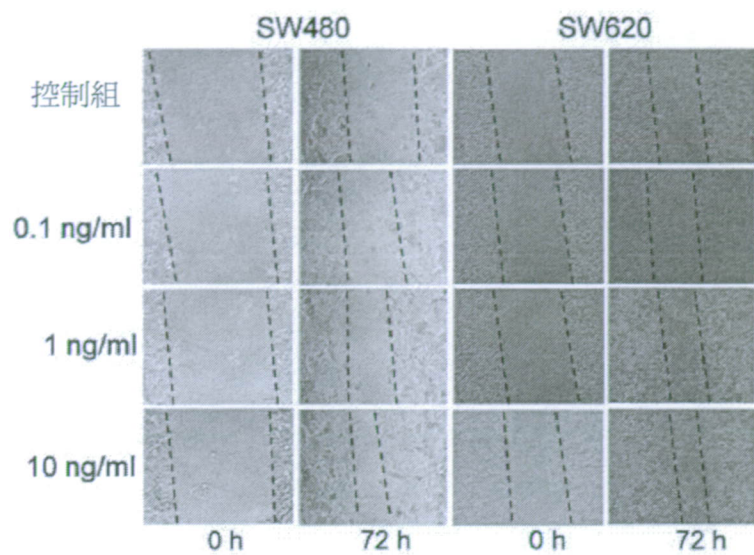


圖 2C

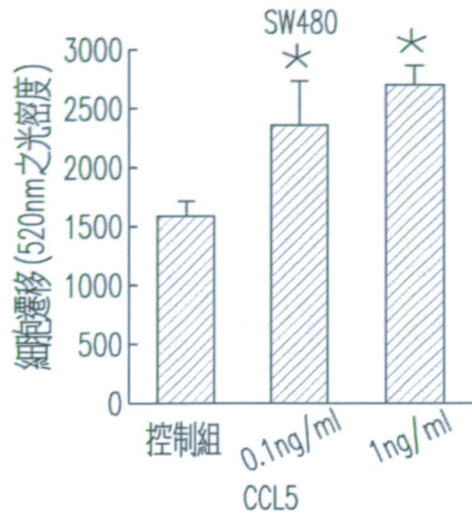


圖 2D-1

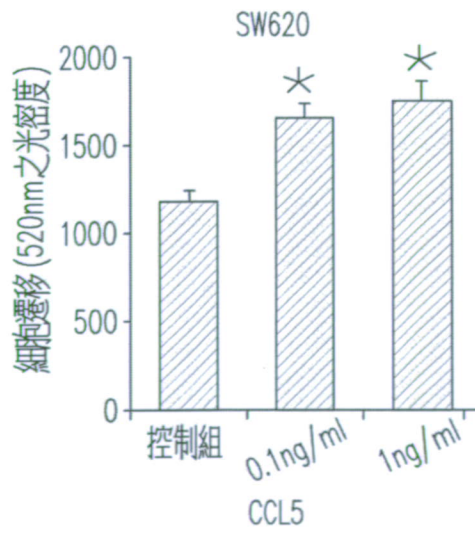


圖 2D-2

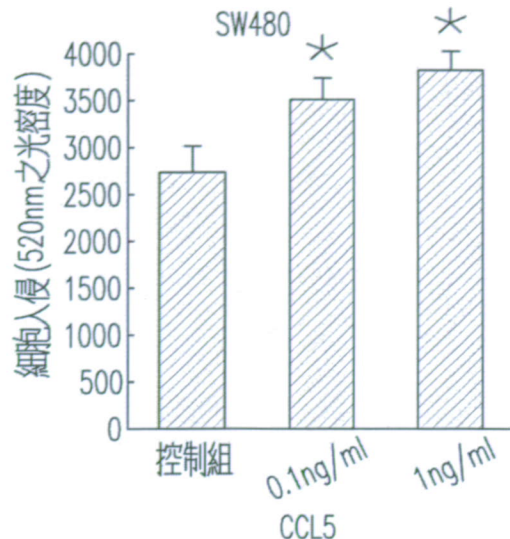


圖 2E-1

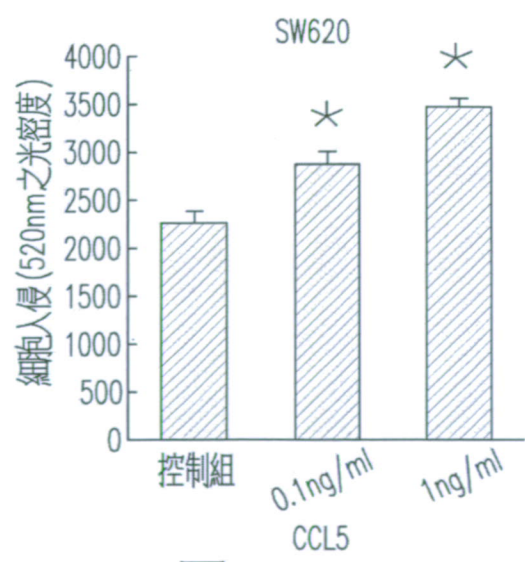


圖 2E-2

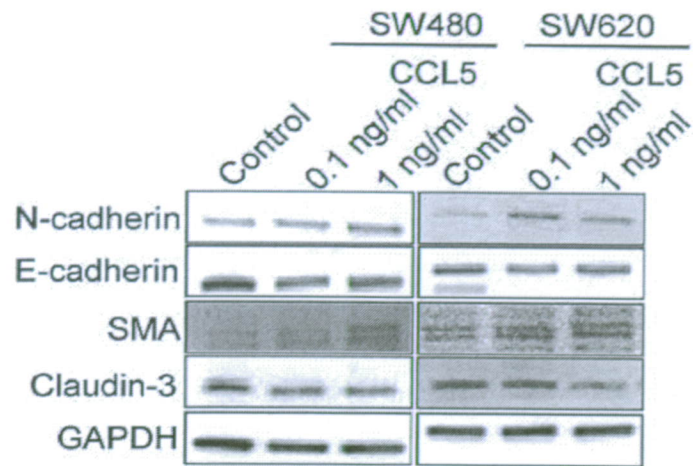


圖 2F

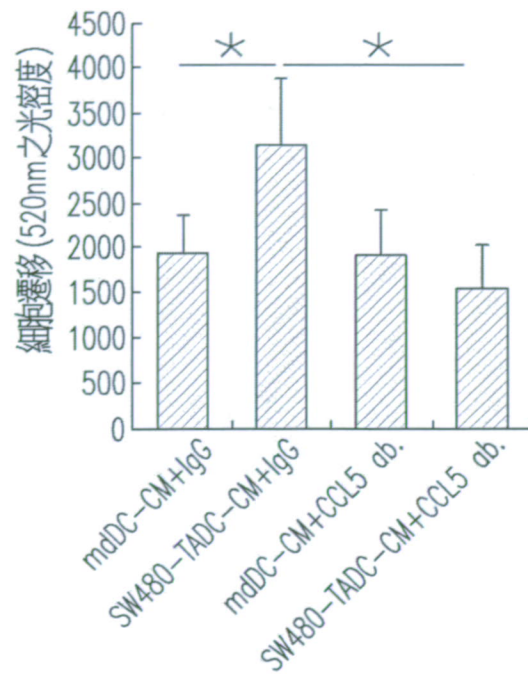


圖 3A-1

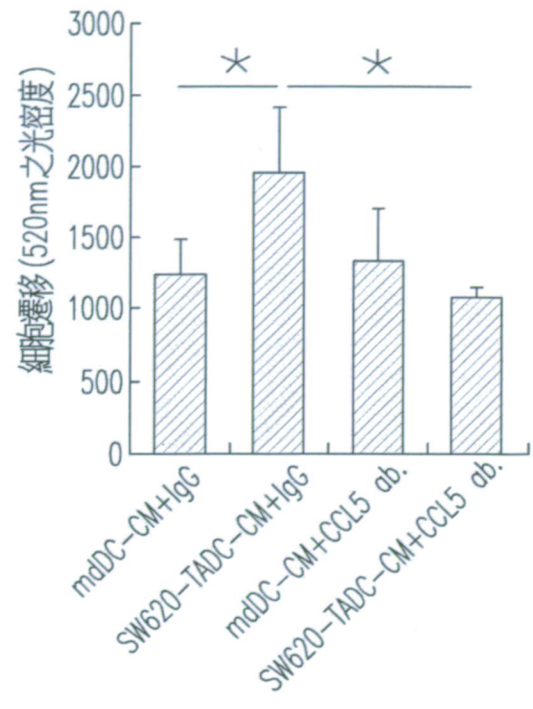


圖 3A-2

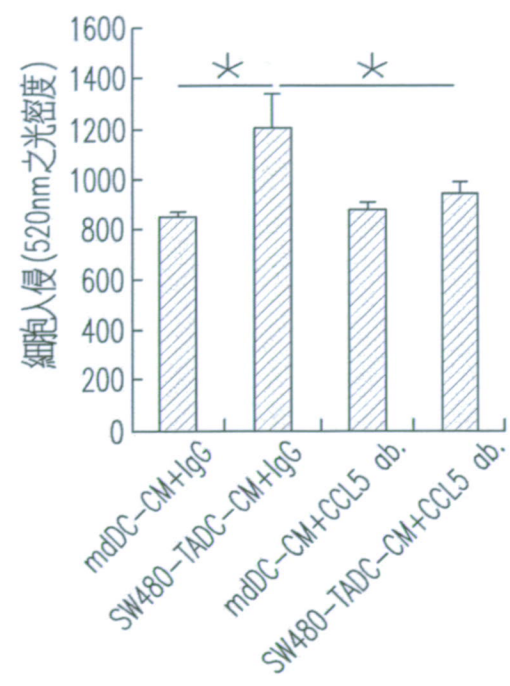


圖 3B-1

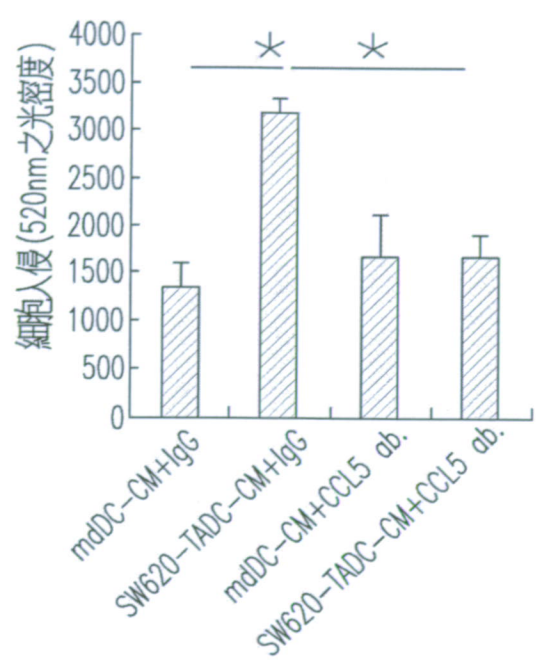


圖 3B-2



圖 3C



圖 4A

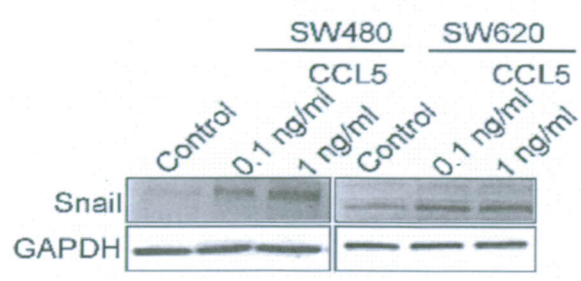


圖 4B

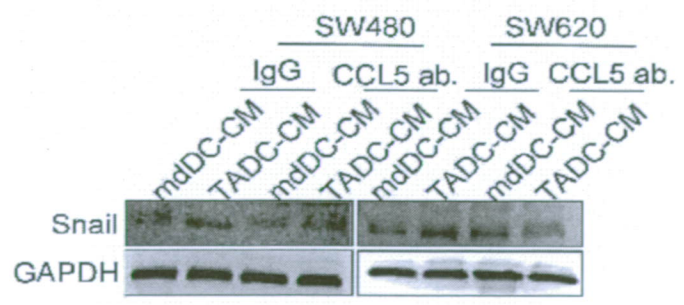


圖 4C

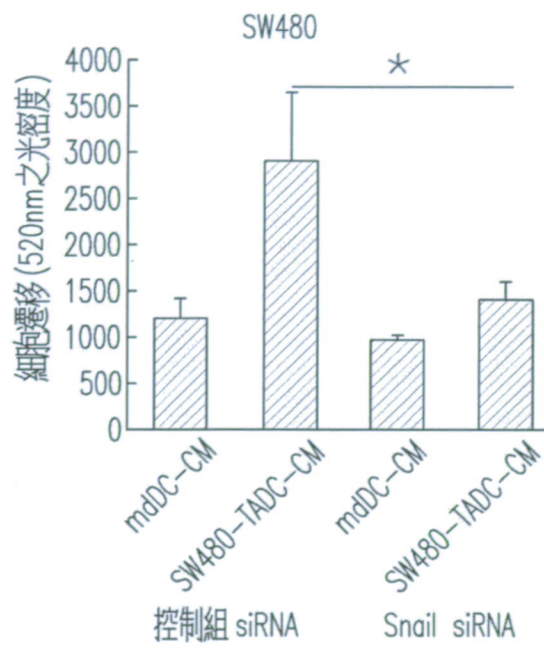


圖 4D-1

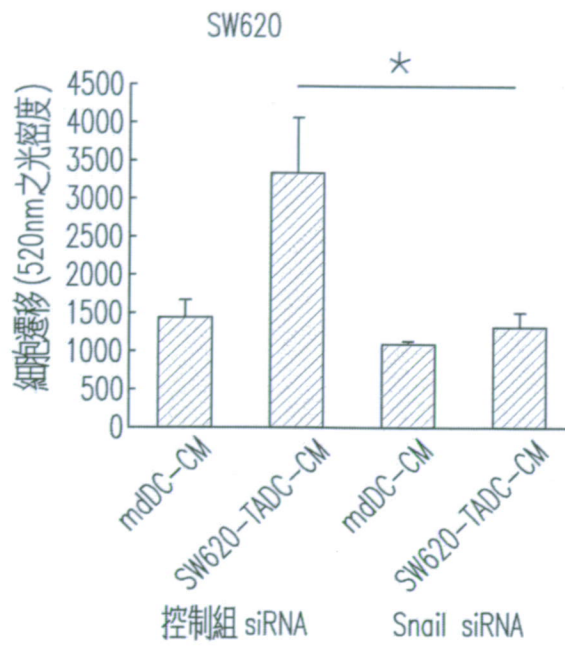


圖 4D-2

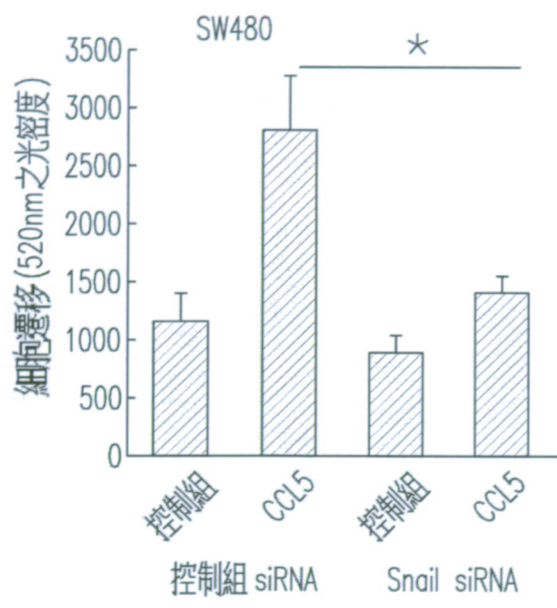


圖 4D-3

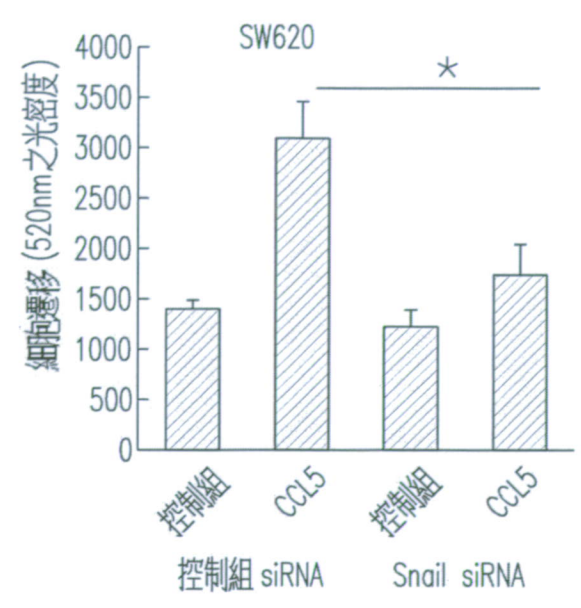


圖 4D-4

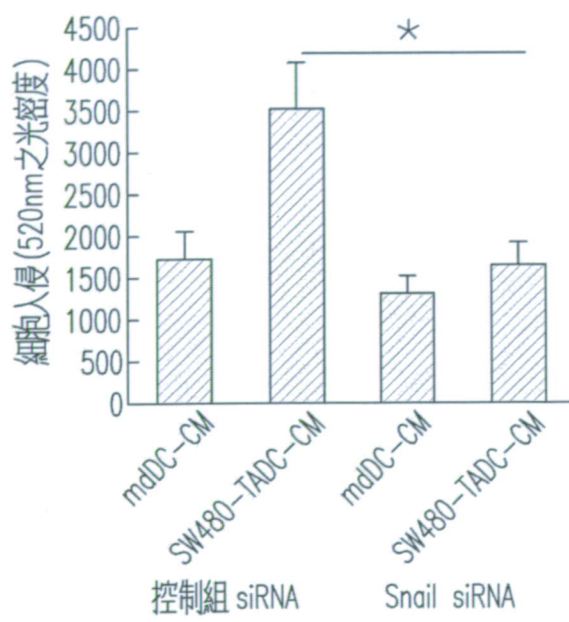


圖 4E-1

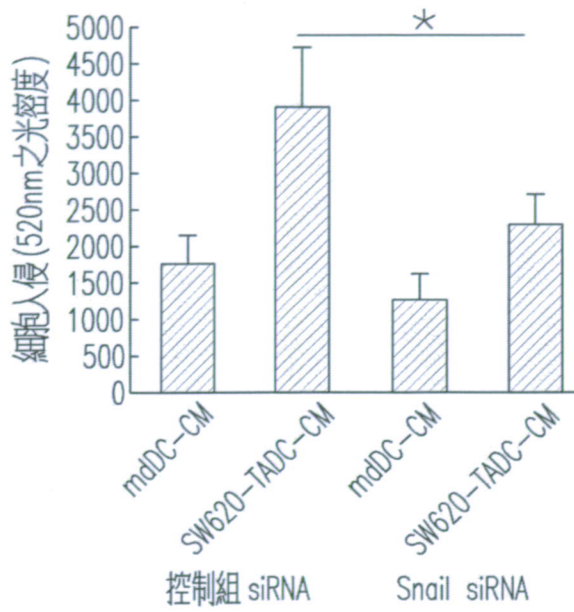


圖 4E-2

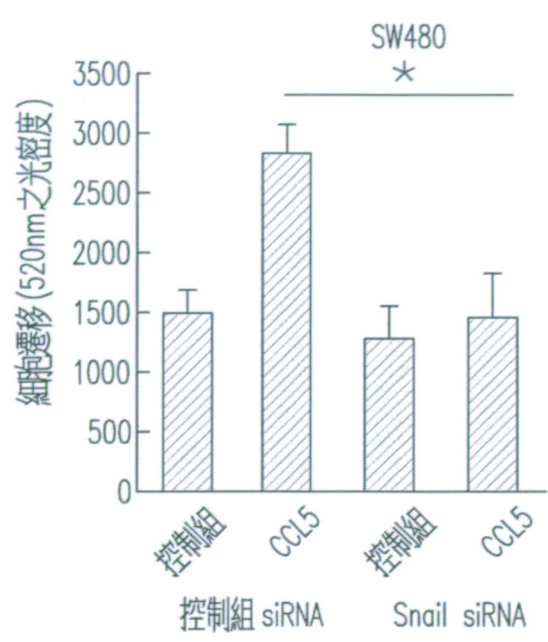


圖 4E-3

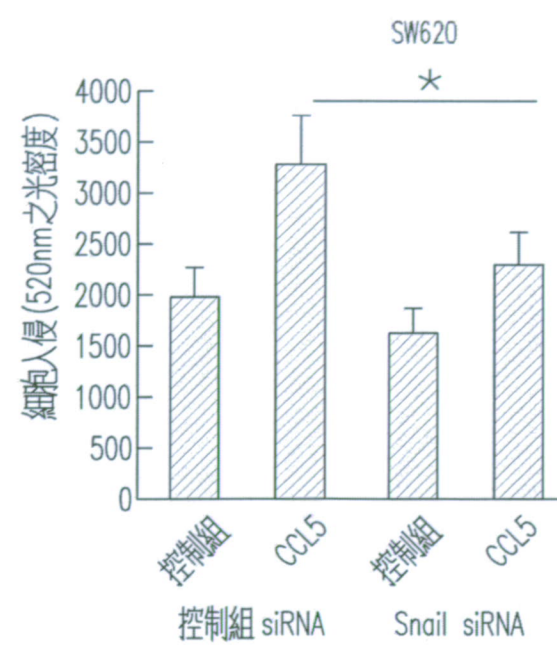


圖 4E-4

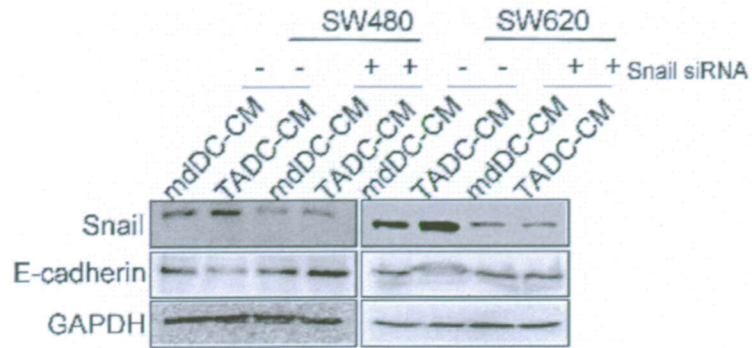


圖 4F-1

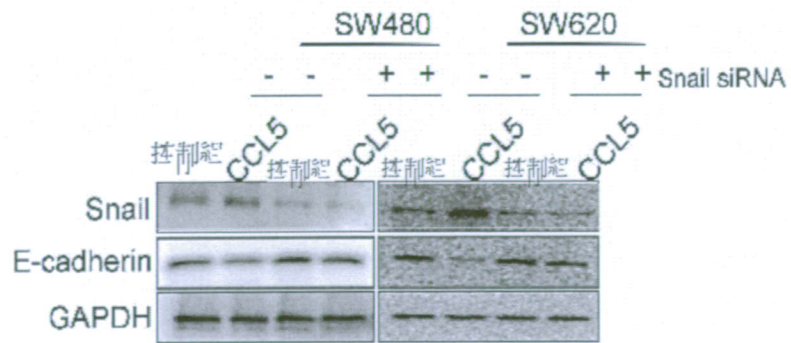


圖 4F-2

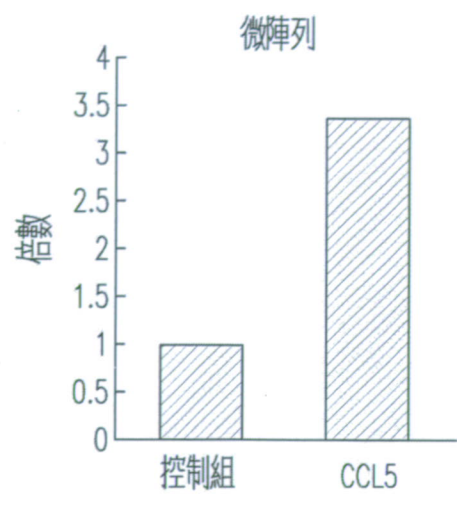


圖 5A

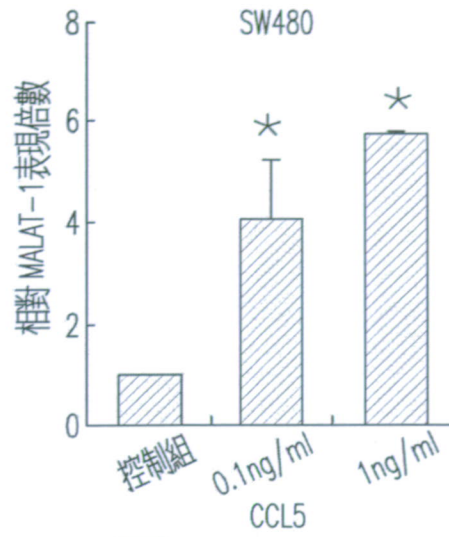


圖 5B-1

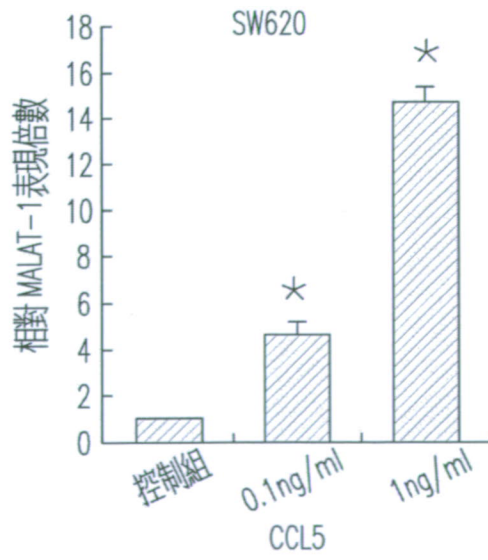


圖 5B-2

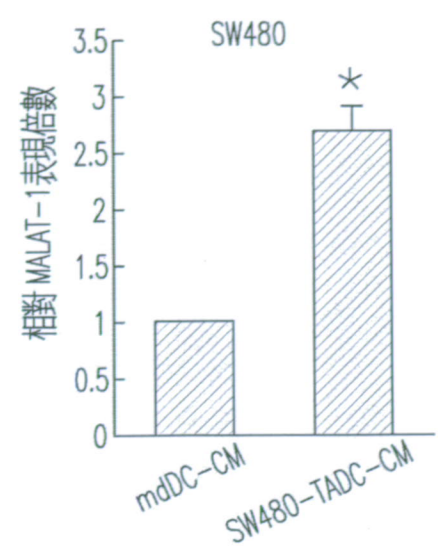


圖 5C-1

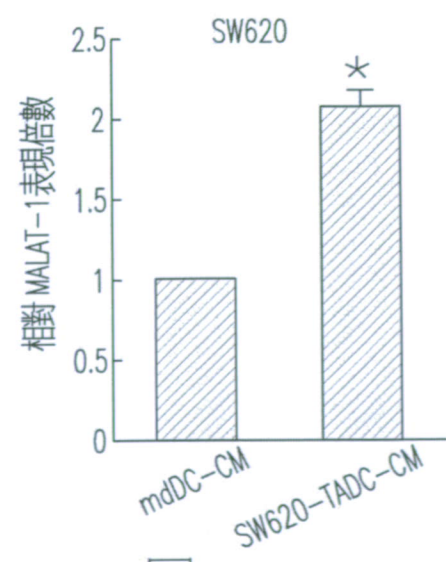


圖 5C-2

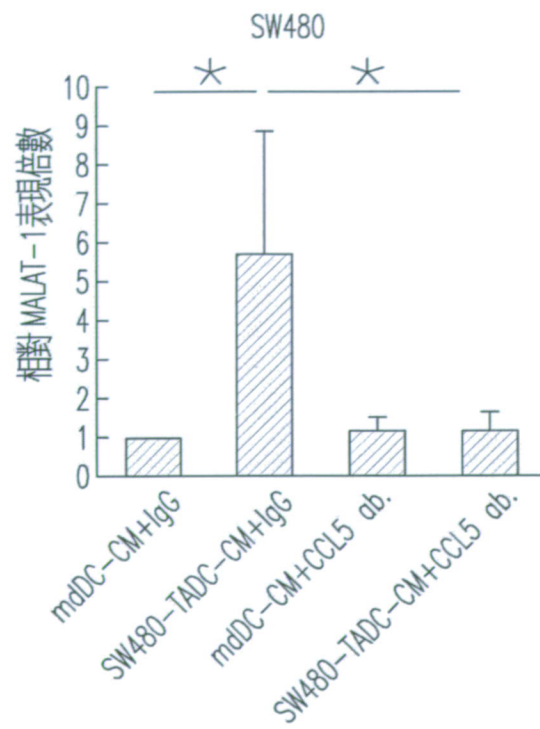


圖 5D-1

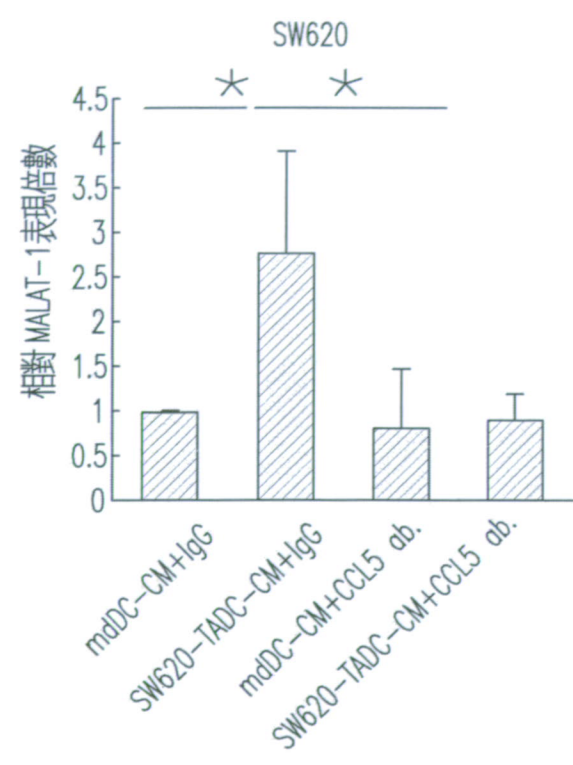


圖 5D-2

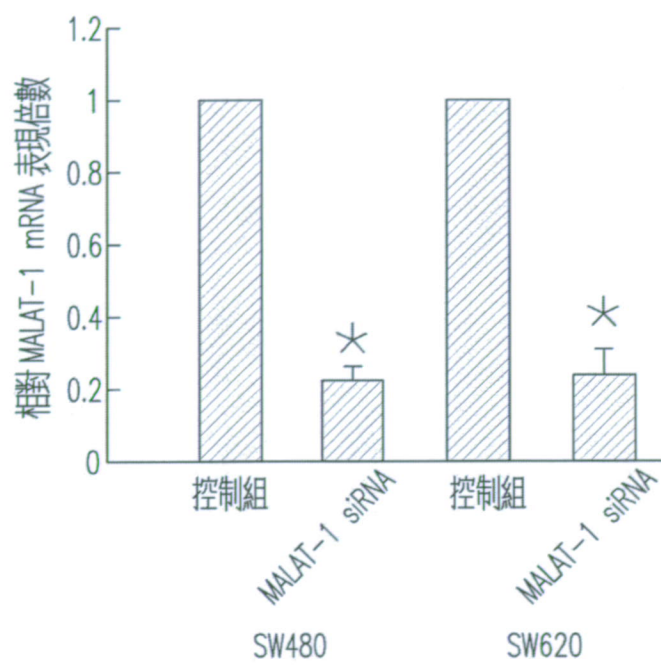


圖 6A

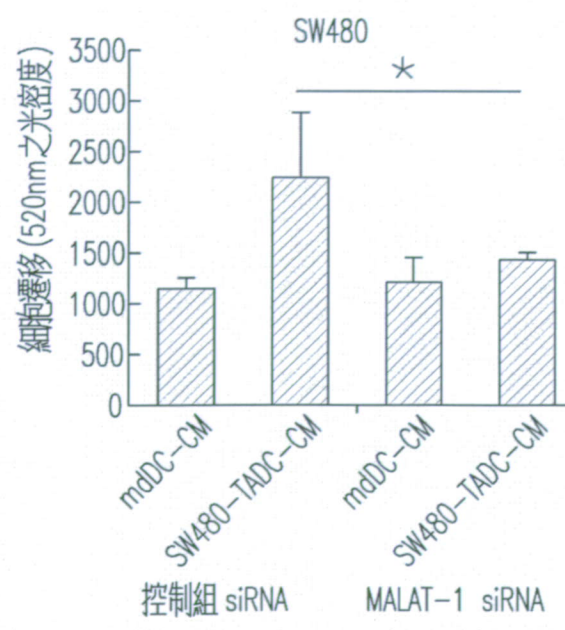


圖 6B-1

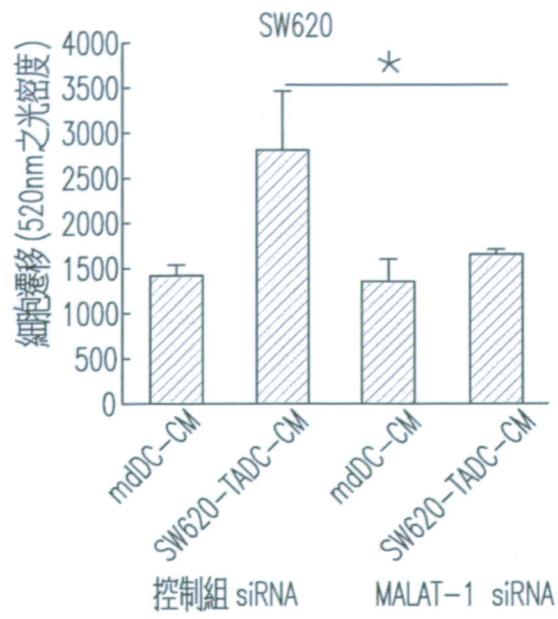


圖 6B-2

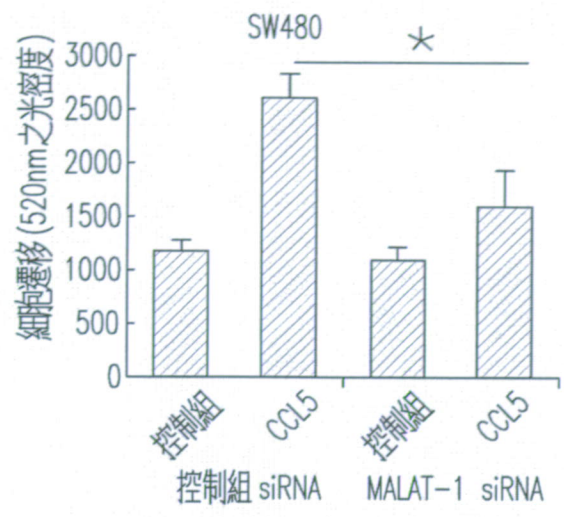


圖 6B-3

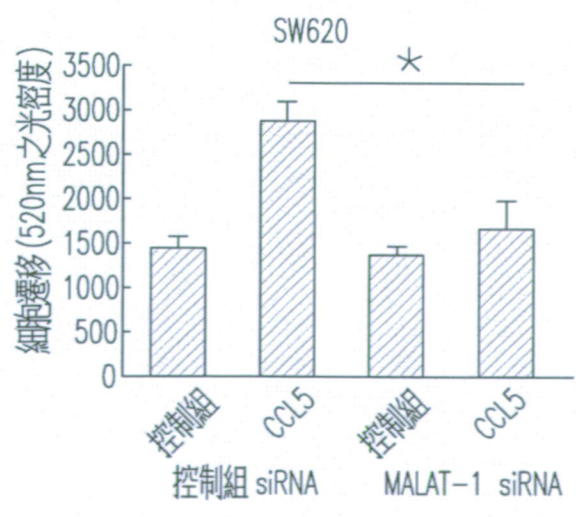


圖 6B-4

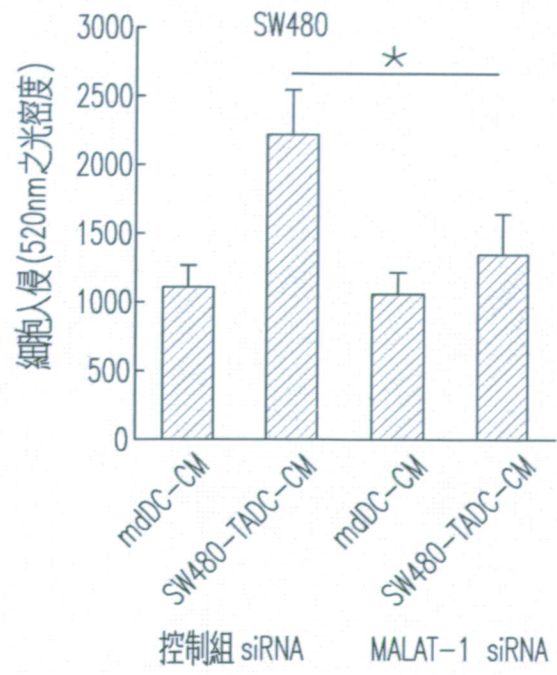


圖 6C-1

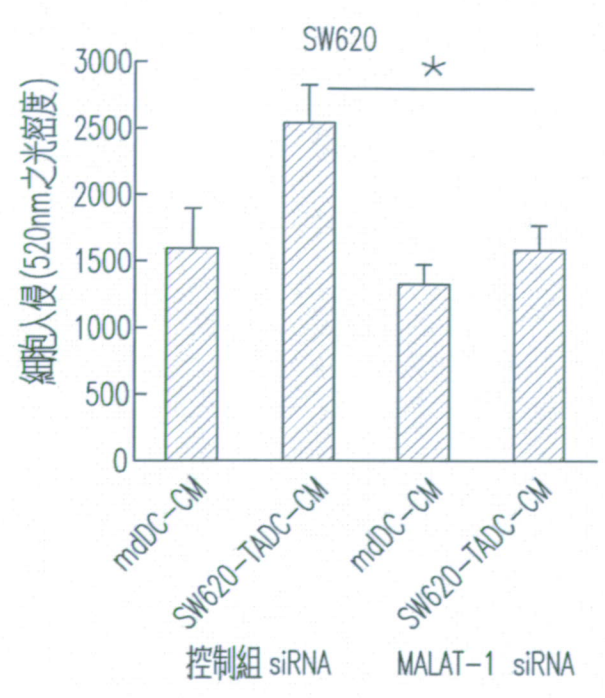


圖 6C-2

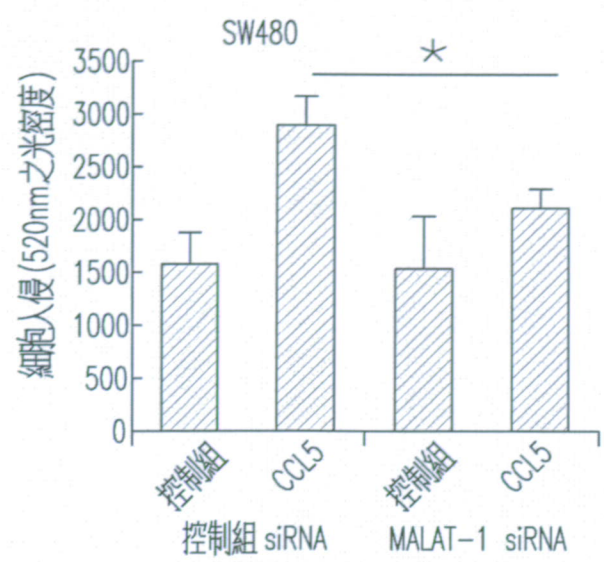


圖 6C-3

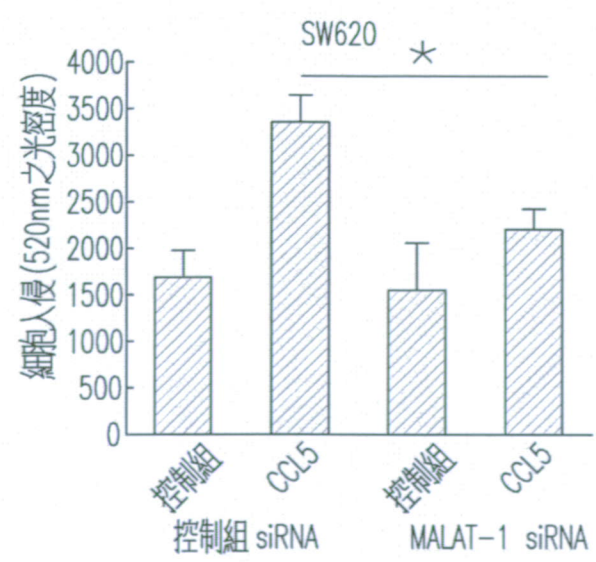


圖 6C-4

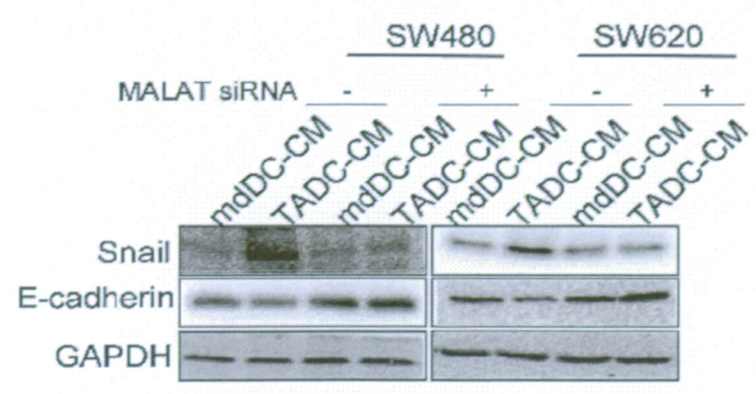


圖 6D-1

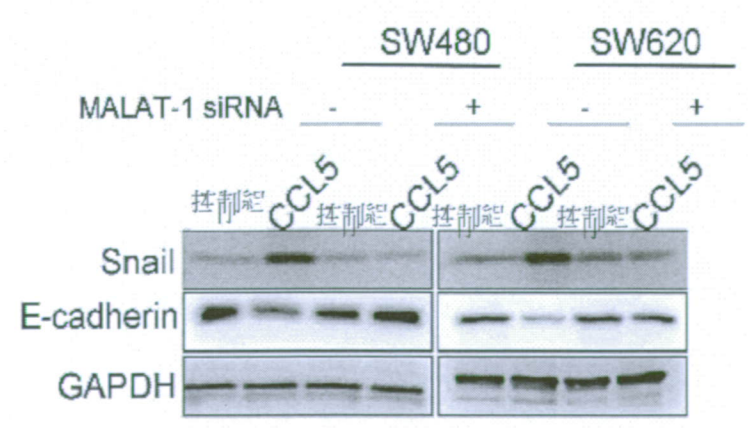


圖 6D-2

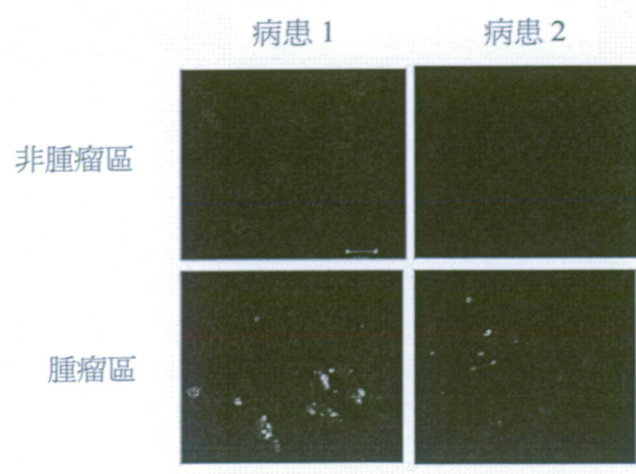


圖 7A

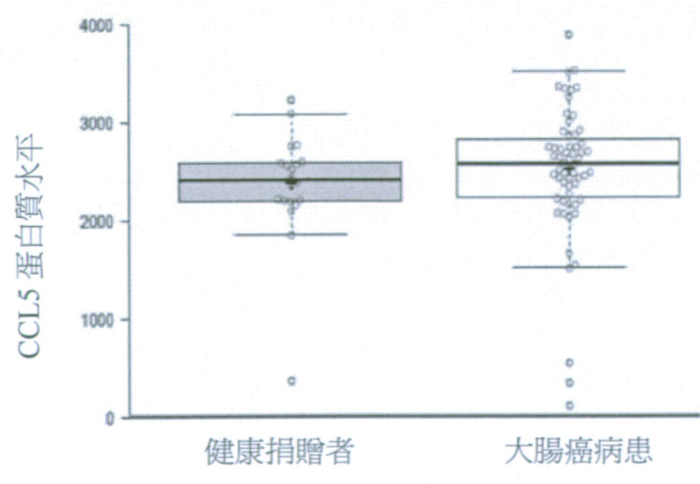


圖 7B

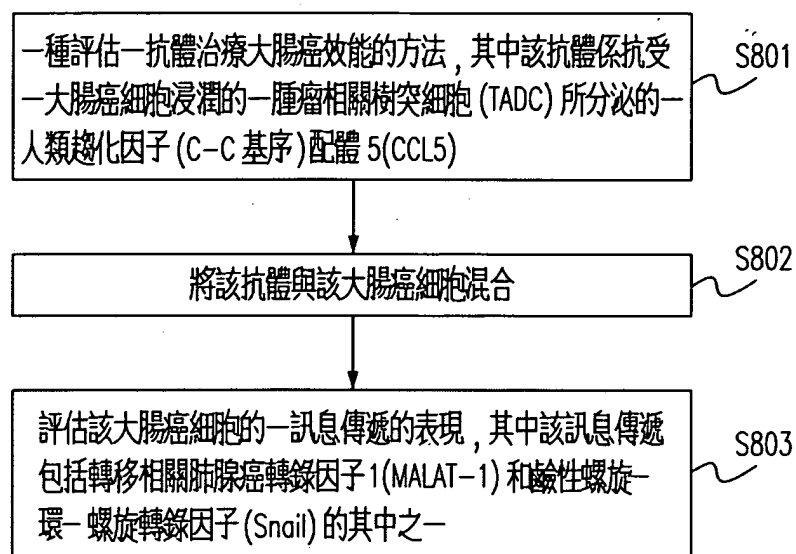


圖 8

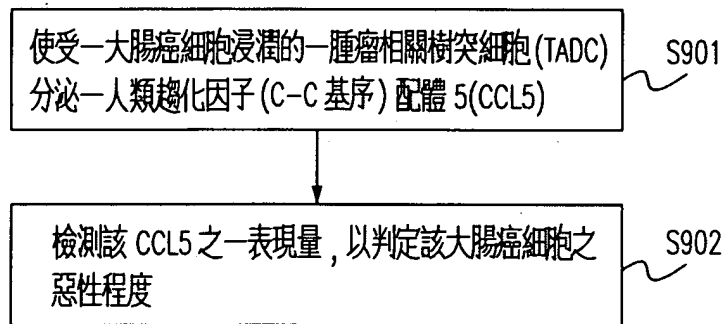


圖 9