

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-508032

(P2019-508032A)

(43) 公表日 平成31年3月28日(2019.3.28)

(51) Int.Cl.

**C 12 Q** 1/04 (2006.01)  
**G 01 N** 33/50 (2006.01)  
**C 12 Q** 1/68 (2018.01)  
**A 61 P** 35/00 (2006.01)  
**A 61 P** 35/04 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/04  
G 01 N 33/50  
C 12 Q 1/68  
A 61 P 35/00  
A 61 P 35/04

テーマコード(参考)

2 G 04 5  
4 B 06 3  
4 C 08 6  
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2018-539138 (P2018-539138)

(86) (22) 出願日

平成29年1月27日 (2017.1.27)

(85) 翻訳文提出日

平成30年9月26日 (2018.9.26)

(86) 国際出願番号

PCT/EP2017/051789

(87) 国際公開番号

W02017/129753

(87) 国際公開日

平成29年8月3日 (2017.8.3)

(31) 優先権主張番号

16152883.1

(32) 優先日

平成28年1月27日 (2016.1.27)

(33) 優先権主張国

欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 597159765

フランホーファーゲゼルシャフト ツー  
ル フォルデルング テル アンゲヴァン  
テン フォルシュング エー. フアー.  
ドイツ国, デー-80686 ミュンヘン  
, ハンサシュトラーセ 27ツェー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】がん性疾患をステージング、タイピングおよび処置するための手段および方法

## (57) 【要約】

本発明は、がん、特に、メラノーマを診断、ステージングおよび処置するための方法に関する。特に、本発明は、リンパ節などの遠隔臓器へのホーミング後に得られる、1つまたは複数の播種性がん細胞(DCC)のDNAの体細胞変化を検出すること；および検出された体細胞変化に基づいてDCCの体細胞進化を決定することを含み、体細胞進化ががん性疾患のステージ/タイプを示す、がん性疾患のステージ/タイプを決定するための方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのための方法であって、以下のステップ：

(a) 1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数の播種性がん細胞(DCC)のDNAの体細胞変化を検出するステップ；および

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ

を含み、DCCの体細胞進化が、がん性疾患のステージ／タイプを示し、がん性疾患がメラノーマである、前記方法。

10

**【請求項 2】**

がん性疾患を処置するための方法であって、以下のステップ：

(a) 対象の1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ；および

(c) ステップ(b)で決定されたDCCの体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ／タイプを決定するステップ

を含み、前記がん性疾患のステージ／タイプが、前記がん性疾患の療法を開始する、継続する、または中止するために使用され、前記がん性疾患がメラノーマである、前記方法。

20

**【請求項 3】**

対象におけるがん性疾患を処置するのに使用するための医薬組成物であって、処置が、前記がん性疾患のステージ／タイプに基づいて開始され、継続され、または中止され、前記がん性疾患の前記ステージ／タイプが、

(a) 対象の1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ；および

(c) ステップ(b)で決定されたDCCの体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ／タイプを決定するステップ

30

によって決定され、前記がん性疾患がメラノーマである、医薬組成物。

**【請求項 4】**

前記DCCがセンチネルリンパ節から得られる、請求項1もしくは2に記載の方法または請求項3に記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

DCC密度(DCCD)の決定をさらに含み、前記DCCDが、前記DCCを得るために使用される前記リンパ節中の細胞100万個あたりのDCCの数であり、前記DCCDが、前記がん性疾患のステージ／タイプを示す、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法、または請求項3もしくは4に記載の医薬組成物。

40

**【請求項 6】**

約50個より多く約100個までのDCCDが、転移の発生を示す、請求項5に記載の方法、または請求項5に記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

前記体細胞変化が、BRAF変異、染色体9p11-13の喪失、染色体9p21-24の喪失、染色体7q21-36の獲得、およびNRAS変異からなる群から選択される少なくとも1つの体細胞変化を含む、請求項1、2および4～6のいずれか一項に記載の方法、または請求項3～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

BRAF変異、染色体9p11-13の喪失、染色体9p21-24の喪失、染色体7q21-36の獲得、および／またはNRAS変異が、DCCが転移に発達すると予想さ

50

れることを示す、請求項 1、2 および 4～7 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 3～7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

ステップ( a )が、前記 D C C の増殖を評価するステップをさらに含み、前記 D C C の増殖の増加が、前記 D C C が転移に発達すると予想されることを示す、請求項 1、2 および 4～8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 3～8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記 D C C が B R A F 変異を有することがわかっている場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、開始または継続されるべきであり、前記 D C C が B R A F 変異を有さないことがわかった場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、中止されるべきである、請求項 2 および 4～9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 3～9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 11】

B R A F 変異を有する細胞に対する処置が、B R A F 阻害剤の投与を含む、請求項 10 に記載の方法、または請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記 B R A F 阻害剤が、ソラフェニブまたはベムラフェニブである、請求項 11 に記載の方法、または請求項 11 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 13】

前記 D C C が N R A S 変異を有することがわかった場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、開始または継続されるべきであり、前記 D C C が N R A S 変異を有さないことがわかった場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、中止されるべきである、請求項 2 および 4～10 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 3～10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がんを診断、ステージングおよび処置するための方法に関する。特に、本発明は、リンパ節などの遠隔臓器へのホーミング後に得られる、1つまたは複数の播種性がん細胞(D C C)のDNAの体細胞変化を検出すること；および検出された体細胞変化に基づいてD C Cの体細胞進化を決定することを含み、体細胞進化ががん性疾患のステージ/タイプを示す、がん性疾患のステージ/タイプを決定するための方法を提供する。

30

【背景技術】

【0002】

がんのステージング/タイピングは、がんが拡散によって発達した程度を決定するプロセスである。現在の実務は、がんにI～IVの数字を割り当てることであり、Iは単離されたがんであり、IVは評価が測定するものの限界まで拡散したがんである。通常、ステージIVは、がんの遠隔拡散を示す。ステージは一般的には、腫瘍のサイズ、それが隣接する臓器に侵入しているかどうか、どれくらい多くの所属(隣接)リンパ節にそれが拡散しているか(もしあれば)、およびそれがより遠くの位置に出現しているか(転移している)どうかを考慮に入れる。

40

【0003】

決定されたがんのステージは、一般的には、がんの療法、例えば、外科療法または薬物療法のための好適な戦略を見出すために使用される。しかしながら、療法、特に、薬物療法は、特に、耐性のため、上手くいかないことが多い。

【0004】

これに関して、多くの事例において我々ががんを治癒できないことは、療法耐性バリアントの選択と直接関連する。がんの薬物耐性における洞察は、がん細胞の総数が耐性の可

50

能性と相関する、進行転移患者を研究することによって得られたものである；Holohan et al. (2013) *Nature reviews Cancer* 13, 714を参照されたい。結果として、「治癒的」外科手術（すなわち、（ネオ）アジュvant療法設定）後の最小全身がんは、処置がはるかに容易であるべきである。最初の手術後および転移の兆候前、すなわち、原発腫瘍（P T）手術後に取り残される播種性がん細胞（D C C）および／または循環腫瘍細胞（C T C）によって定義される、臨床的に検出不可能な微小残存病変（M R D）の間の時間ウィンドウが、致死的転移を防止するのに特に好適であり得る（Aguirre-Ghiso et al. (2013) *Nature Med.* 19(3): 276-7; Polzer and Klein (2013) *Nature Med.* 19(3):274-5）。しかしながら、唯一の状況知識が、M R Dに関して利用可能であり、結果として、（ネオ）アジュvant療法、すなわち、非転移がんにおける外科手術の前後の全身性薬物の投与は、約20%の患者における転帰を改善するに過ぎない（Cole et al. (2001) *Lancet* 358:277-286; Gianni et al. (2011) *Lancet Oncol.* 12:236-244）。さらに、転移の兆候を示す患者における実証された効能を示す標的療法をアジュvant療法設定において適用した場合、成功率は失望するほど低かった（Polzer and Klein (2013) *Nature Med.* 19(3): 274-5）。この臨床状況は、早期全身がんの我々の現在の理解が転移を上手く防止するには不十分であることを示している。

10

20

30

40

**【0005】**  
早期播種性がん細胞およびM R Dの特徴的生物学に関する第1の直接的証拠は、転移の兆候の前後に乳がん患者の骨髄から単離されたD C Cの分析に由来するものであった。遺伝子データは、2つのステージの転移性拡散に由来するD C Cが異なることを示し（Klein et al. (2002) *Lancet* 360:683-689）Schmidt-Kittler et al. (2003) *PNAS* 100:7737-7742）、それらが早期に播種され、原発腫瘍と同時に進化したことが示唆された（Klein (2009), *Nat Rev Cancer* 9:302-312）。その後、トランスジェニックマウスマodelにおける研究（Eyles et al. (2010) *J Clin Invest.* 120:2030-2039; Husemann et al. (2008) *Cancer Cell* 13:58-68; Rhim et al. (2012) *Cell* 148:349-361）および前悪性病変または*in situ*の癌を有する患者における研究（Banys et al. (2012) *Breast Cancer Res Treat.* 131:801-808; Husemann et al. (2008) *Cancer Cell* 13:58-68; Sanger et al. (2011) *Int J Cancer* 129:2522-2526）は、この概念を補強した。早期および後期播種モデルの両方に関する証拠が入手可能であるが、決定的なものではない。原発不明がん（C U P）、すなわち、原発腫瘍がない転移は、がん患者の約5%を占め、大きな進行した原発腫瘍が転移にとって必要ではないことを証明している。同様に、疫学的データは、診断の数年前のがん細胞の播種および転移の開始を支持する（Engel et al. (2003) *Eur J Cancer* 39:1794-1806）。一致した原発腫瘍および転移の比較配列決定研究などの遺伝子データは、両方のシナリオに関する例を提供する（Klein (2013) *Nature* 501:365-372）。しかしながら、いくつかの系列の全身療法にわたる医原性選択はがん集団を有意にシフトさせ得るため、配列決定研究は誤解されやすいか、または決定的なものではない場合がある。まとめると、臨床データおよび患者由来*ex vivo*データは、早期播種および異所性進行を支援すると考えられるが、多くの実験モデルは、後に生じる、完全に悪性の転移細胞を仮定し、使用する。これに関して、多くの報告は、血液試料に由来する患者材料を使用するが、リンパ節に由来する試料は、例えば、国際公開第02/37113号パンフレットに記載のように、あまり好ましい起源ではないと考えられる。血漿または血液試料の優先性は、E r b B 2遺伝子のコピー数およびその発現プロファイルに基づいて腫瘍を診断するための方法に関する、欧州特許出願公開第2503009号明細書にも開示されている。実験は、専ら、患者の血清または血漿試料を使用して行われる。現在の臨床業務は後期播種および腫瘍内進行モデル（同時進行モデルとは反対である）に基づくものであるため、同時進行モデルの考慮は、がんのステージ／タイプの改善された、より正確な決定および改善されたがん療法、特に、アジュvant療法のための、新規診断ツールの必要性を根本的に包含する。

50

**【発明の概要】**

**【0006】**

このようにして、本発明の基本となる技術的課題は、がん性疾患のステージ／タイプの早期決定のための正確な方法ならびにがん性疾患を処置するための対応する改善された手段および方法の提供である。

【0007】

解決法は、以下に定義され、特許請求の範囲で特徴付けられる実施形態によって提供される。

【0008】

したがって、本発明は、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのための方法であって、以下のステップ：

(a) 1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数の播種性がん細胞(DCC)のDNAの体細胞変化を検出するステップ；および

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ

を含み、DCCの体細胞進化が、がん性疾患のステージ／タイプを示す、前記方法に関する。

【0009】

特に好ましい実施形態では、ステージング／タイピングされるがん性疾患は、メラノーマである。このようにして、本発明は、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのための方法であって、以下のステップ：

(a) 1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数の播種性がん細胞(DCC)のDNAの体細胞変化を検出するステップ；および

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ

を含み、DCCの体細胞進化が、がん性疾患のステージ／タイプを示し、がん性疾患がメラノーマである、前記方法に関する。

【0010】

例示的な添付の実施例は、DCCが、リンパ節内での転移性進行にとって重要である変化を獲得することを証明する。これは、原発腫瘍とDCCとの同時進行が起こる(DCCの腫瘍内進行によって反対される)ことを示している。原発腫瘍とDCCとの同時進行とは、原発がんの分析を、DCCが転移に進行するかどうかを評価するために使用することができないことを意味する。原発腫瘍とDCCとの同時進行はまた、DCCの転移への進行を、原発がんの切除によって防止することができないことも意味する。さらに、同時進行とは、原発がんの分析を、転移がある特定の療法に応答するかどうかを決定するために使用することができないことを意味する。

【0011】

本発明の文脈において、驚くべきことに、転移への進行の前に、DCCが転移性シグネチャー(すなわち、DCCが転移に進行することを示す特定の遺伝子変化)を示すことが見出された。本発明によれば、この転移性シグネチャーを有利に使用して、DCCが転移を形成するかどうかを評価することができる。さらに、この転移性シグネチャーを使用して、転移がある特定の療法に応答するかどうかを評価することができる。

【0012】

このようにして、本発明は、1つまたは複数のDCCの転移性シグネチャーを同定するため(すなわち、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのため)の方法であって、以下のステップ：

(a) 1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；および

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの転移性シグネチャー(すなわち、体細胞進化)を決定するステップ

を含む、前記方法に関する。

【0013】

10

20

30

40

50

この方法では、DCCの転移性シグネチャーは、がん性疾患のステージ／タイプを示す。

【0014】

特に好ましい実施形態では、がん性疾患は、メラノーマである。

【0015】

本発明によれば、がん性疾患のステージ／タイプを使用して、がん性疾患（好ましくは、メラノーマ）がある特定の療法に応答するかどうかを評価することができる。したがって、本発明の方法は、ある特定の療法を開始する、継続する、または中止するべきかどうかを決定するのに有用である。

【0016】

このようにして、本発明の別の実施形態は、がん性疾患を処置するための方法であって、以下のステップ：

(a) 対象の1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ；および

(c) ステップ(b)で決定されたDCCの体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ／タイプを決定するステップ

を含み、がん性疾患のステージ／タイプが、前記がん性疾患の療法を開始する、継続する、または中止するために使用される、前記方法に関する。

10

20

30

【0017】

特定の好ましい実施形態では、がん性疾患は、メラノーマである。

【0018】

本発明はまた、対象におけるがん性疾患を処置するのに使用するための医薬組成物であって、処置が、前記がん性疾患のステージ／タイプに基づいて開始される、継続される、または中止され、前記がん性疾患の前記ステージ／タイプが、

(a) 対象の1つまたは複数のリンパ節から得られた1つまたは複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；

(b) ステップ(a)で検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ；および

(c) ステップ(b)で決定されたDCCの体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ／タイプを決定するステップ

によって決定される、医薬組成物にも関する。

30

【0019】

特に好ましい実施形態では、がん性疾患は、メラノーマである。

【0020】

前記医薬組成物は、化学療法薬を含む組成物または免疫療法のための薬物を含む組成物などの、がん性疾患の処置のための任意の型の薬剤であってもよい。

【0021】

本発明の一実施形態は、DCC密度(DCCD)の決定をさらに含み、DCCDが、DCCを得るために使用されるリンパ節中の細胞100万個あたりのDCCの数であり、DCCDが、がん性疾患のステージ／タイプを示す、本発明の方法または医薬組成物に関する。添付の実施例は、100を超えるDCCDを有するリンパ節に由来するDCCが、特に、メラノーマに関する異種移植実験において、コロニーに増殖し、腫瘍に発達することができることを示す。したがって、本発明の一態様は、100を超えるDCCDが、特に、メラノーマの場合、転移の発生を示す、本明細書に提供される方法、または本明細書に提供される医薬組成物に関する。

40

【0022】

さらに、驚くべきことに、免疫学的变化（すなわち、鈍くなったT細胞応答および転移に進行するDCCを示すT細胞消耗の兆候）が、局所的に観察され、局所腫瘍細胞量に依

50

存することが見出された。この情報を使用して、微小環境を標的とする療法、特に、免疫系の細胞を標的とする療法が有効であるかどうかを決定することができる。これは、原発腫瘍の組織源ならびに播種および転移の標的部位が異なるためである。このようにして、原発腫瘍の微小環境（例えば、免疫細胞）の分析は、播種および転移の標的部位での微小環境が影響されるかどうか、またはDCCおよび転移の微小環境を標的とする特定の療法が有効であるかどうかを評価するのにあまり適していない可能性がある。むしろ、本明細書に示されるように、リンパ節中の微小環境は、原発腫瘍の外部のがん性疾患のステージ／タイプを示す。このようにして、驚くべきことに、添付の実施例でさらに証明されるように、特に、メラノーマの場合、2000を超えるDCCDが、がん性疾患、特に、メラノーマのさらに進行したステージ／タイプを示すことが見出された。具体的には、添付の実施例は、抗原を受けたCD8<sup>+</sup>T細胞の数が、腫瘍細胞増殖および転移形成と関連するT細胞活性化を示すDCCDの増大と共に増加することを示す。特に、PD-1高発現CD8<sup>+</sup>T細胞は、リンパ節中で有意に富化され、約2000、すなわち、100を超えるDCCDよりも20倍高い値のDCCDは、転移の発生を示す。PD-1が高いCD8<sup>+</sup>T細胞は、最終的に消耗したT細胞であると考えられる。これらの細胞は、消耗したT細胞の別のマーカーであるTim-3を同時発現し、サイトカイン産生の能力が減じている。消耗したT細胞は、階層的様式でエフェクター機能を喪失する：IL-2産生、高い増殖能力および細胞溶解活性が最初に失われ、次いで、サイトカイン産生が減じられる。転移性メラノーマ患者の腫瘍組織から単離されたPD-1発現CD8<sup>+</sup>T細胞は、腫瘍反応性であることが示された。MDSC（骨髄由来免疫抑制細胞）の増加は、PD-1高発現CD8<sup>+</sup>T細胞の増加と同時であった。MDSCは、免疫抑制性免疫細胞であり、MDSCの高い浸潤を示すがん組織は、患者の予後不良および療法に対する耐性と関連する。また、MDSCのパーセンテージは、約2000のDCCDを有する患者において増加するが、細胞溶解性CD56dim NK細胞のパーセンテージは、高いDCCDを有するリンパ節中で減少する。CD56dim NK細胞は、高い細胞溶解機能を有し、したがって、腫瘍細胞を殺傷することができる。総合すると、添付の実施例は、播種の標的臓器中の局所免疫微小環境の変化が、DCCDが指標測定値を与える、転移性増殖と関連することを示す。DCCDは、単独で、または免疫微小環境の変化に関する情報と共に、がん性疾患のステージ／タイプを示す、および／または前記がん性疾患の療法を開始する、継続する、または中止するために使用される。このようにして、一実施形態では、本発明の方法または医薬組成物は、DCC密度（DCCD）の決定をさらに含み、ここで、DCCDは、DCCを得るために使用されるリンパ節中の細胞100万個あたりのDCCの数であり、DCCDは、がん性疾患のステージ／タイプを示し、100を超えるDCCDは、転移の発生を示し、および／または2000を超えるDCCDは、免疫系が転移性増殖を阻害することができないことを示す。このようにして、特に、メラノーマにおいて、DCCDが2000を超える場合、処置は、免疫細胞および転移性増殖を阻害するその能力に具体的に対処する免疫療法をさらに含んでもよい。

#### 【0023】

上記に示されたように、添付の実施例は、転移性シグネチャー（すなわち、体細胞変化的型）に応じて、患者由来DCCがマウスにおいて腫瘍を形成することができることを示す。特に、腫瘍を形成することができたDCCは全て、BRAF変異、染色体9p11-13の喪失、染色体9p21-24の喪失、染色体7q21-36の獲得、またはNRAS変異のいずれかを有していた。これに関して、9p11-13および／または9p21-24の欠失が、1より多い体細胞変化を有する細胞の約90%において観察される。総合すると、試料の約20%において、9p11の喪失が9p24の喪失と共に観察された。約50%は9p11および／または9p24の喪失と共に、さらなる変化（BRAF、NRASまたは染色体7q21上の獲得）を有する。約20%のみが、9p11および／または9p24の喪失+染色体7q21上の獲得と共に、BRAFまたはNRASの変異を有する。

#### 【0024】

10

20

30

40

50

したがって、本発明の一態様は、体細胞変化が、B R A F 変異、染色体 9 p 1 1 - 1 3 の喪失、染色体 9 p 2 1 - 2 4 の喪失、染色体 7 q 2 1 - 3 6 の獲得、およびN R A S 変異からなる群から選択される少なくとも 1 つの体細胞変化を含む、本発明の方法、または本発明の医薬組成物に関する。本発明によれば、体細胞変化はまた、B R A F 変異、染色体 9 p 1 1 - 1 3 の喪失、染色体 9 p 2 1 - 2 4 の喪失、染色体 7 q 2 1 - 3 6 の獲得、およびN R A S 変異からなる群から選択される少なくとも 2 つ、3 つ、4 つまたは全部の体細胞変化を含んでもよい。本発明の方法において、または本発明の医薬組成物の文脈において、B R A F 変異、染色体 9 p 1 1 - 1 3 の喪失、染色体 9 p 2 1 - 2 4 の喪失、染色体 7 q 2 1 - 3 6 の獲得、および / またはN R A S 変異は、D C C が転移に発達すると予想されることを示す。

10

#### 【 0 0 2 5 】

しかしながら、本発明によれば、D C C の増殖活性を使用して、これらの細胞が転移に発達すると予想されるかどうかを決定することもできる。このようにして、本発明の別の実施形態は、ステップ( a )がD C C の増殖を評価することをさらに含み、ステップ( b )において、D C C の増殖の増加が、D C C が転移に発達すると予想されることを示す、本発明の方法、または本発明の医薬組成物に関する。増殖を、例えば、増殖マーカーK i - 6 7 などの増殖マーカーの量を分析することによって測定することができる。K i - 6 7 陽性細胞の頻度を、例えば、免疫組織化学、免疫蛍光によって、マーカーについて陽性に染色する細胞のパーセンテージを評価することによって決定することができる。このパーセンテージは、細胞周期における細胞の見積もり、すなわち、増殖中の細胞のパーセンテージを提供する。

20

#### 【 0 0 2 6 】

上記に示されたように、がん性疾患のステージ / タイプを使用して、がん性疾患（好ましくは、メラノーマ）がある特定の療法に応答するかどうかを評価することができる。特に、D C C 内の遺伝子変化の存在または非存在もまた、ある特定の処置を開始する、継続する、または中止するべきかどうかを示す。特に、本発明の一実施形態は、D C C がB R A F 変異を有することがわかっている場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、開始または継続されるべきである、本発明の方法、または本発明の医薬組成物に関する。しかしながら、D C C がB R A F 変異を有さないことがわかった場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、患者にとって有害であり得る。同様に、D C C がN R A S 変異を有することがわかっている場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、開始または継続されるべきである。しかしながら、D C C がN R A S 変異を有さないことがわかっている場合、前記変異を有する細胞に対する処置は、患者にとって有害であり得る。P D - 1 遮断剤（P M I D : 2 5 7 9 7 5 1 6 ）に応答しない、すなわち、機能を取り戻すと考えられる、P D - 1 高発現 T 細胞が、D C C を有するリンパ節中で数が増加することがわかっている場合、療法応答が治療的なP D - 1 もしくはP D - L 1 遮断剤の下で観察されないか、または療法が患者にとって有害でさえあり得る（すなわち、抗がん応答がない自己免疫）。

30

#### 【 0 0 2 7 】

以下でより詳細に説明されるように、本発明の方法および医薬組成物において、がん性疾患のタイプは、疾患が原発疾患部位からリンパ節および / または他の組織、例えば、骨髄への細胞の播種を含む限り、特に限定されない。がん性疾患は、メラノーマであるのが好ましい。

40

#### 【 0 0 2 8 】

したがって、本発明は、がん性疾患のステージングおよび / またはタイピングのための方法、がん性疾患を処置するための方法ならびにがん性疾患、特に、がんの処置における使用のための医薬組成物に関する。これに関して、がん性疾患、特に、がんのステージ / タイプを、対象の組織試料から得られた、特に、対象の 1 または複数のリンパ節、特に、流入領域および / もしくは所属リンパ節ならびに / またはセンチネルリンパ節から得られた播種性がん細胞（D C C ）のD N A の、体細胞変化、特に、遺伝子および / またはエピジェネティック変化を検出することによって決定することができることが驚くべきことに

50

、また、予想外にも見出された。

【0029】

また、循環腫瘍細胞（C T C）のDNAの、体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化を検出することによる、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのための方法も本明細書で提供される。したがって、本発明は、がん性疾患、特に、がんのステージ／タイプが、対象の血液から得られた、特に、対象から得られた血液試料から得られた、またはin vivoのC T C捕捉デバイスを使用して得られた1または複数のC T CのDNAの、体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化を検出することによって決定される、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのための方法、がん性疾患を処置するための方法ならびにがん性疾患、特に、がんの処置における使用のための医薬組成物を提供する。すなわち、本明細書に提供される実施形態を、別途指摘しない限り、DCCの代わりに、またはDCCに加えて、C T Cに適用することもできる。当業者であれば、DCCに関する本明細書に提供される教示を、それに応じてC T Cに適合させる方法に容易に気付く。

10

【0030】

本発明者らは、がん、特に、メラノーマにおける真皮浸潤の深さおよび特徴的な異所性分子進化と比較して、メラノーマの転移性播種の時点を決定した；特に、実施例1および図1を参照されたい。より具体的には、大きいメラノーマは非浸潤性でもあり得るため、メラノーマの真皮浸潤の深さと比較した（総サイズとの比較ではない）、メラノーマの転移性播種の時点を分析した。リンパ節への播種は、真皮内拡張前に約0.4mm（95%CI 0.04～0.75mm）で選択的に生じた。播種性がん細胞（DCC）は、原発腫瘍の厚さに関係なく、リンパ系コロニー形成前の典型的なドライバー変化を欠いていた；特に、実施例5ならびに図2、3および4を参照されたい。しかしながら、BRAFまたはNRASにおけるドライバー変異およびシグネチャー染色体再配置は、コロニー形成性DCCおよび／またはDCCに由来する異種移植片中に有意に富化されるようになり、患者を死のハイリスクにさらした。このようにして、がん性疾患、特に、がんにおいては、DCCは原発腫瘍を早期のままにし、同時に、異なる部位で進化する；特に、実施例6および図5を参照されたい。したがって、細胞が進化する様々な部位、すなわち、例えば、リンパ節のような、DCCが移住する部位、または細胞、特に、原発腫瘍に由来するC T Cが循環する部位、例えば、血液から得られる、原発腫瘍に由来する細胞、特に、DCCからの情報を使用することによって、がん性疾患、特に、がんのステージングおよび／またはタイピングを改善することができる、特に、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのより正確な方法を提供することができる。これに関して、本発明者らは驚くべきことに、それぞれ、前記DCCまたはCTCのDNA中で検出される体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化に基づいて決定された、それぞれ、前記DCCまたはCTCの体細胞進化を、がん性疾患、特に、がんをステージング／タイピングするために使用することができることを見出した。これらの驚くべき、かつ予想外の知見は、本発明、特に、がん性疾患、特に、がんの新規モデルに基づくものである、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのためのより正確な手段および方法をもたらした。

20

【0031】

上記でさらに概略されたように、がん性疾患のステージは、通常、例えば、TNMステージングシステムを使用して決定される。悪性腫瘍のTNM分類（TNM）は、患者のがんのステージを記述するためのコードを与えるがんステージング表記法であり、Tは、元の（原発）腫瘍のサイズ、およびそれが近隣組織に浸潤しているかどうかを記述し、Nは、関与する近隣（所属）リンパ節を記述し、Mは、遠隔転移（身体のある部分から別の部分へのがんの拡散）を記述する。特に腫瘍に関して、すなわち、パラメータTに関して、いくつかのステージが存在する：T<sub>x</sub>：腫瘍を評価することができない、T<sub>is</sub>：in situの癌腫、T<sub>0</sub>：腫瘍の兆候なし、およびT<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>：原発腫瘍のサイズおよび／または伸長。本発明者らによって見出されたように、がん性疾患、特に、が

30

40

50

ん、例えば、メラノーマの上記ステージは、多くの事例において、がん性疾患の療法のための好適な戦略を決定するには不十分である。したがって、細胞、特に、対象の1または複数のリンパ節、特に、流入領域および/または所属リンパ節および/またはセンチネルリンパ節から得られるDCCだけでなく、入手可能な場合、骨髓または脳DCCの分子状態に関する情報を与える液体などのリンパ節以外の他の臓器に由来するDCCの体細胞進化も使用する、新規モデルが見出された。細胞の体細胞進化を、対象の血液から得られるCTCを使用して決定することもできる。したがって、原発腫瘍の表現型評価に主に依存するがん性疾患の古典的ステージング/タイピングとは対照的に、本発明の新規性および進歩性のある方法は、がん性疾患、特に、がんのステージ/タイプの指標として、細胞、特に、DCCおよび/またはCTCの体細胞進化を使用する。

10

### 【0032】

DCCは、外科手術前の原発腫瘍部位から播種し、リンパまたは血行により拡散した細胞である。それらを、メラノーマの場合、リンパ系細胞または骨髓中に見出される細胞の表面上には見出されない、上皮細胞マーカーまたはメラニン生成細胞マーカーを使用して検出することができる。例えば、EpCAMおよび/またはサイトケラチンは、特に、癌腫の場合、DCCの検出において標的化することができる細胞マーカーである(Klein (2009), Nat Rev Cancer 9:302-312)。標的化細胞マーカーを、細胞内に、および/または細胞の表面に発現させる、および/または配置させることができる。好ましくは、メラノーマに由来するDCCを、標的化細胞マーカーとして、gp100および/またはMCS (メラノーマ関連硫酸コンドロイチンプロテオグリカン)および/またはMelan

20

A (MART-1)、および/またはCD146を使用することによって検出することができる。DCCを、例えば、骨髓吸引液またはリンパ節から検出および単離することができる。単一細胞懸濁液に分離および/またはプロセッシングした後、DCCDを、免疫細胞学によって決定することができる。特に、単一細胞懸濁液を、EpCAM (Guzvic et al. (2014) Cancer Res. 74:7383-7394)、サイトケラチン (Schardt et al. (2005) Cancer Cell 8:227-239)、gp100またはMCS (Ulmer et al. (2014) PLoS Med. 11:e1001604)などの前記標的化細胞マーカーに対する抗体を用いて染色することができる。染色された細胞(好ましくは、リンパ節細胞)100万個あたりの標的化細胞マーカーについて陽性の細胞数は、DCC密度(DCCD)を定義する。

30

### 【0033】

CTCは、これも外科手術前の原発腫瘍部位に由来するが、血液系中で循環する細胞である。原発腫瘍手術後、それらは潜在的な、または明白な転移性コロニーに由来するものであってよい。それらを、標的化細胞マーカーとしてEpCAMを使用して検出および単離することができるが、この標的化細胞マーカーに限定されない。富化および検出マーカーは、他の間葉系臓器(骨髓、リンパ節)における検出のために使用されるものと同様であり、例えば、上皮マーカーおよびメラノーマにおける記載のメラニン生成細胞マーカーのためのEpCAMおよびサイトケラチンが挙げられる。CTCを、当業界で周知の方法、特に、FDAに認可されたCell Search(登録商標)システム(Veridex LLC)、DEPArray(商標)技術またはフローサイトメトリーを使用して血液(例えば、白血球除去輸血産物に由来する)から得ることができるが(Fischer et al. (2013) PNAS 110:16580-16585)、CTCの単離は、これらのシステムに限定されず(Polzer et al. (2014) EMBO Mol Med. 6:1371-138)、Cell SieveまたはParser sortixなどの様々な新規デバイスを含んでもよい。in vivoでのCTC捕捉デバイスを使用することもできる。そのようなデバイスの例は、Gillupi、Cell Collector (Gorges et al. (2015) ClinCancer Res. 1416-2015, Epub ahead of print)、がん細胞結合ナノ粒子(Galanzha et al. (2011) Cytometry 79:814-824)または医療用ワイヤ(Saucedo-Zeni et al. (2012) Int J Oncol. 41:1241-1250)であるが、これらのものに限定されない。そのようなデバイスまたは粒子を、対象/患者に埋め込む、または注入して、対象/患者の体内のCTCを捕捉および富化する。次いで、CTCを、ex vivoまたはin vivoで、CTC捕捉デバイスまたは粒子から回収す

40

50

ることができる。

#### 【0034】

これに関して、本明細書で使用される用語「体細胞進化」は、一生涯の間の、細胞、特に、がん性疾患細胞、特に、DCCの変化の蓄積、およびこれらの細胞の適合性に対するこれらの変化の効果に関する。がん細胞の体細胞進化は、自発的な、または誘導された遺伝子／エピジェネティック変化ならびに適合性、増殖速度、アポトーシス速度などに従つて細胞を選択する、クローニング性増殖中のその後の自然の選択に起因する。さらに、がん療法は、感受性がん細胞を殺傷するが、耐性細胞を残す、人工選択の形態として作用する。腫瘍はこれらの耐性細胞から再増殖することが多く、患者は再発し、以前に使用されていた療法は最早有効ではないであろう。このようにして、体細胞進化は、がん性疾患の発生および／またはがん性疾患の療法の間の進行中のプロセスである。これに関して、がん性疾患における体細胞進化と関連する複数のレベルの遺伝的異質性が存在する。本発明の方法において、体細胞進化は、エピジェネティックおよび／または遺伝子変化を含む、体細胞変化に基づいて決定される。したがって、エピジェネティックおよび／または遺伝子変化を含む体細胞変化の数および／または性質に基づいて、細胞、特に、DCCの体細胞進化を決定することができる。

10

#### 【0035】

本明細書で使用される用語「体細胞変化」は、細胞、特に、DCC中に含まれる、核酸、特に、DNAの任意の変化を含む。変化は、例えば、対象から得られた試料、例えば、本発明の方法において分析しようとする試料以外の他の組織に由来する細胞を含む、および／もしくは対象の幹細胞を含む対象から得られた参考試料中の所与の時点での状態、またはDNAの特定の断片、例えば、配列データベースもしくはメチル化パターンなどの既知のパターンのエピジェネティック変化から取られたDNA配列に関する参照として一般的に取られる状態のような、参考状態からの逸脱を意味する。したがって、観察された状態と、参考状態とを比較することによって、体細胞変化を検出することができる。次いで、任意の観察された逸脱を、体細胞変化として分類することができる。第2の段階では、前記変化を、実際の体細胞変化または使用される検出方法、例えば、配列決定方法によって導入された誤差として分類することができる。これに関して、本発明は、体細胞変化の誤差のない検出にとって特に有用な手段および方法を開示する。そのような方法は、本発明の方法において好ましく使用される。本発明の意味の範囲内の体細胞変化は、エピジェネティックおよび／または遺伝子変化を含む。遺伝子変化は、DNAの配列、すなわち、DNAに含まれるヌクレオチドの連続のレベルでの変化、および分析しようとする試料中に含まれるDNAの断片の相対的存在量の変化を含む。したがって、本発明の意味の範囲内の遺伝子変化は、特に、単一ヌクレオチド変化(SNV)、配列変異、マイクロサテライトシフトおよび不安定性、ヘテロ接合性の喪失(LOH)、コピー数変化、染色体構造異常および／または異数性を含む核型変化を含んでもよい。エピジェネティック変化は、DNA配列のレベルではないDNAの化学的变化およびDNA構造の形成、プロセッシングなどに含まれる外部因子の変化を含む。したがって、本発明の意味の範囲内のエピジェネティック変化は、特に、メチル化、特に、CG対のメチル化、DNA修復タンパク質の欠損、および／またはメチル化、アセチル化、SUMO化、活性化もしくは不活性ヒストンマークのようなヒストン構築もしくは構造の変化および／または例えば、ユークロマチンもしくはヘテロクロマチンなどのクロマチン構築の変化を含んでもよい。

20

#### 【0036】

本発明の一態様では、体細胞変化、特に、遺伝子変化は、1または複数のドライバー変異および／またはパッセンジャー変異を含む。用語「ドライバー変異」とは、生存または再生を増加させることによって、その微小環境中のクローニングに選択的利益を与える変異を指す。ドライバー変異は、クローニング性増殖を引き起こす傾向がある。したがって、本発明の方法において決定される体細胞変化、特に、遺伝子変化は、1または複数のドライバー変異を含んでもよい。これに関して、細胞性、特に、DCC進行の1つの共通の特徴は、体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化を有するクローニングの増

30

40

50

殖である。これは、一般的には、対応する組織中の他の細胞に対する競合的利益（再生または生存利益）を有する増殖中のクローニングに起因する。増殖中のクローニングは、そのゲノム中に、1より多い体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化を有することが多いため、これらの変化のどれが、再生または生存利益を引き起こし、他の変化がクローニング性増殖上での単にヒッチハイカーまたはパッセンジャー変異であるかは明らかでないことが多い。しかし、いくつかのドライバー変異は投票会で公知である。例えば、ドライバー変異は、特に、公知のがん遺伝子における変異であってよい。がん遺伝子は、がん性疾患、特に、がんの発生と関連することが知られている。このようにして、本発明の意味の範囲内のドライバー変異としては、限定されるものではないが、公知のがん遺伝子における変異が挙げられる。例えば、神経芽腫のRASウイルスがん遺伝子ホモログ（N R A S）またはB R A Fをコードする遺伝子が、公知のがん遺伝子である。さらなる公知のがん遺伝子は、Forbes et al. (2014) Nucleic Acid Res. 43, D805-811によるC O S M I C データベースなどのデータベース、またはVogelstein et al. (2013) Science 339(6127):1546-58、Akagi et al. (2004) Nucleic Acid Res. 32, D523-7もしくはHuret et al. (2000) Nucleic Acid Res. 28(1):349-51による報告中に報告されている。そのようなデータベースは、がん遺伝子および公知のドライバー変異について定期的にアップデートされている。したがって、その中で報告されるドライバー変異はいずれも、本発明の方法において検出することができる。これに関して、がん遺伝子中の、体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化を検出するために本発明において使用される方法は、複数のがん遺伝子における体細胞変化の同時的検出にとって好適である。本発明の方法において検出することができる特定のドライバー変異は、特に、エクソン3の変異 c 181C > Aを含む、N R A Sをコードする遺伝子におけるドライバー変異を含む。したがって、本発明は、がん性疾患のステージングおよび／またはタイピングのための方法であって、組織試料、特に、1または複数のリンパ節から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；および1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップを含み、DCCの体細胞進化が、がん性疾患のステージ／タイプを示し、体細胞変化の検出が、配列番号1の2986位のヌクレオチドの検出を含み、配列番号1の2986位のシトシンが非疾患ステージ／タイプを示し、配列番号1の2986位のアデニンが疾患ステージ／タイプを示す、前記方法に関する。さらに、配列番号1の2987位のグアニンまたは配列番号1の2987位のチミンは、疾患ステージを示す。本発明はさらに、がん性疾患を処置するための方法であって、組織試料、特に、対象の1または複数のリンパ節から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ；および1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたがん性疾患の体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ／タイプを決定するステップを含み、がん性疾患のステージ／タイプが、前記がん性疾患の療法を開始する、継続する、または中止するために使用され、体細胞変化の検出が、配列番号1の2986位のヌクレオチドの検出を含み、配列番号1の2986位のシトシンが、療法を中止するために使用され、配列番号1の2986位のアデニンが、がん性疾患の療法を開始する、または継続するために使用される、前記方法に関する。さらに、配列番号1の2987位のグアニンまたは配列番号1の2987位のチミンは、がん性疾患の療法を開始する、または継続するために使用される。

### 【0037】

本発明はさらに、対象におけるがん性疾患の処置における使用のための医薬組成物であって、がん性疾患のステージ／タイプに基づいて処置が開始、継続または中止され、がん性疾患のステージ／タイプが、組織試料、特に、対象の1または複数のリンパ節から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出すること；1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定すること；および1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたがん

10

20

30

40

50

性疾患の体細胞進化に基づいてがん性疾患のステージ / タイプを決定することによって決定され、体細胞変化の検出が、配列番号 1 の 2986 位のヌクレオチドの検出を含み、配列番号 1 の 2986 位のシトシンが、処置を中止するために使用され、配列番号 1 の 2986 位のアデニンが、処置を継続する、または開始するために使用される、医薬組成物に関する。さらに、配列番号 1 の 2987 位のグアニンまたは配列番号 1 の 2987 位のチミンは、がん性疾患の処置を継続する、または開始するために使用される。体細胞変化の検出は、1 または複数のがん遺伝子の遺伝子および / またはエピジェネティック変化の検出を含んでもよい。

### 【0038】

上記に概略されたように、遺伝子および / またはエピジェネティック変化を含む、体細胞変化の検出は、公知のがん遺伝子における体細胞変化の検出を含んでもよい。N R A S について上記されたように、公知のドライバー変異を、細胞増殖の指令に関与するタンパク質をコードする別の公知のがん遺伝子である B R A F 中で検出することもできる。そのようなものとして、いくつかの遺伝子変化、特に、(ドライバー) 变異は、がんの発生と関連する、構成的に活性な形態の B R A F を引き起こすことが当業界で記載されている。疾患におけるその役割を考慮して、天然および変異形態に対するいくつかの B R A F 阻害剤が記載されている；例えば、Wan et al. (2004) Cell 116 (6): 855-67 ; Tsai et al. (2008) PNAS 105 (8): 3041-6 ; およびBollag et al. (2010) Nature 467 (7315): 596-9 を参照されたい。例えば、ソラフェニブは、原発性腎臓がん（進行性腎細胞癌）、進行性原発性肝臓がん（肝細胞癌）、および放射性ヨウ素耐性進行性甲状腺癌の処置のために認可された低分子キナーゼ阻害剤である。ソラフェニブは、特に、野生型および変異型 B R A F を阻害する。さらなる例示的な B R A F 阻害剤は、侵攻型のメラノーマの原因となる V 600 E 変異型 B R A F タンパク質の選択的阻害剤であるベムラフェニブである。それはまた、V 600 K 変異型 B R A F タンパク質の有効な阻害剤であることも示されている。野生型 B R A F を有するメラノーマ患者では、ベムラフェニブは、腫瘍増殖を促進する；Hatzivassiliou et al. (2010) Nature 464 (7287): 431-5 またはHalaban et al. (2010) Pigment Cell Melanoma Res. 23(2): 190-200 を参照されたい。しかしながら、古典的なメラノーマの診断は、B R A F がん遺伝子に関する患者の変異状態の決定を含まない。さらに、驚くべきことに、本発明者らによって見出されたように、原発腫瘍および D C C における細胞の同時進化の本明細書に記載される新しいモデルは、原発腫瘍における変異状態の検出がメラノーマ患者の最も好適な療法の決定にとって不十分であることを示している。したがって、本明細書で提供されるより正確ながんステージング / タイピングの方法は、B R A F がん遺伝子の変異状態を検出するステップを含んでもよい。したがって、本発明は、がん性疾患のステージングおよび / またはタイピングのための方法であって、組織試料、特に、1 または複数のリンパ節から得られた 1 または複数の D C C の D N A の体細胞変化を検出するステップ；および 1 または複数の D C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて、D C C の体細胞進化を決定するステップを含み、D C C の体細胞進化が、がん性疾患のステージ / タイプを示し、体細胞変化の検出が、配列番号 2 の 171428 位～171430 位のヌクレオチドトリプレットの検出を含み、配列番号 2 の 171428 位のグアニン、171429 位のチロシンおよび 171430 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、非疾患ステージ / タイプを示し、配列番号 2 の 171428 位のグアニン、171429 位のアデニンおよび 171430 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、疾患ステージ / タイプを示す、前記方法に関する。さらに、配列番号 2 の 171428 位のアデニン、171429 位のアデニンおよび 171430 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットならびに配列番号 2 の 171428 位のアデニン、171429 位のグアニンおよび 171430 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットは、疾患ステージ / タイプを示す。本発明はさらに、がん性疾患を処置するための方法であって、組織試料、特に、1 または複数のリンパ節から得られた 1 または複数の D C C の D N A の体細胞変化を検出するステップ；1 または複数の D C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて、D C C の体細胞進化を決定するステップ；および 1 または複数の D

10

20

30

40

50

C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたがん性疾患の体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ / タイプを決定するステップを含み、がん性疾患のステージ / タイプが、前記がん性疾患の療法を開始する、継続する、または中止するために使用され、体細胞変化の検出が、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位 ~ 1 7 1 4 3 0 位のヌクレオチドトリプレットの検出を含み、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のグアニン、1 7 1 4 2 9 位のチロシンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、処置を中止するために使用され、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のグアニン、1 7 1 4 2 9 位のアデニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、処置を継続する、または開始するために使用される、前記方法に関する。さらに、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のアデニン、1 7 1 4 2 9 位のアデニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットならびに配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のアデニン、1 7 1 4 2 9 位のグアニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットは、処置を開始する、または継続するために使用される。処置は、B R A F の阻害剤の使用を含むのが好ましい。したがって、処置は、好ましくは、ソラフェニブまたはベムラフェニブの使用を含む。さらに、がん性疾患はメラノーマであるのが好ましい。本発明はさらに、対象におけるがん性疾患の処置における使用のための医薬組成物であって、がん性疾患のステージ / タイプに基づいて処置が開始、継続、または中止され、がん性疾患のステージ / タイプが、組織試料、特に、対象の 1 または複数のリンパ節から得られた 1 または複数の D C C の D N A の体細胞変化を検出すること；1 または複数の D C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて、D C C の体細胞進化を決定すること；および 1 または複数の D C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたがん性疾患の体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ / タイプを決定することによって決定され、体細胞変化の検出が、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位 ~ 1 7 1 4 3 0 位のヌクレオチドトリプレットの検出を含み、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のグアニン、1 7 1 4 2 9 位のチロシンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、処置を中止するために使用され、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のグアニン、1 7 1 4 2 9 位のアデニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、処置を継続する、または開始するために使用される、医薬組成物に関する。さらに、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のアデニン、1 7 1 4 2 9 位のアデニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットならびに配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のアデニン、1 7 1 4 2 9 位のグアニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットは、処置を開始する、または継続するために使用される。医薬組成物は、B R A F の阻害剤を含むのが好ましい。したがって、医薬組成物は、ソラフェニブまたはベムラフェニブを含むのが好ましい。さらに、がん性疾患は肝臓がん、腎臓がんまたはメラノーマであるのが好ましい。がん性疾患は、メラノーマであるのがより好ましい。したがって、本発明は、特に、対象におけるがん性疾患の処置における使用のための、B R A F 阻害剤、好ましくは、ソラフェニブまたはベムラフェニブを含む医薬組成物であって、がん性疾患のステージ / タイプに基づいて処置が開始、継続または中止され、がん性疾患のステージ / タイプが、組織試料、特に、対象の 1 または複数のリンパ節から得られた 1 または複数の D C C の D N A の体細胞変化を検出すること；1 または複数の D C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて、D C C の体細胞進化を決定すること；および 1 または複数の D C C の D N A 中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたがん性疾患の体細胞進化に基づいて、がん性疾患のステージ / タイプを決定することによって決定され、体細胞変化の検出が、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位 ~ 1 7 1 4 3 0 位のヌクレオチドトリプレットの検出を含み、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のグアニン、1 7 1 4 2 9 位のチロシンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、処置を中止するために使用され、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のグアニン、1 7 1 4 2 9 位のアデニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットが、処置を継続する、または開始するために使用される、医薬組成物に関する。さらに、配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のアデニン、1 7 1 4 2 9 位のアデニンおよび 1 7 1 4 3 0 位のグアニンのヌクレオチドトリプレットならびに配列番号 2 の 1 7 1 4 2 8 位のアデニン

10

20

30

40

50

ン、171429位のグアニンおよび171430位のグアニンのヌクレオチドトリプレットは、処置を開始する、または継続するために使用される。がん性疾患は、好ましくは、肝臓がん、腎臓がんまたはメラノーマである。より好ましくは、がん性疾患は、メラノーマである。

#### 【0039】

上記によれば、本発明は、がん性疾患、特に、がんを処置する手段および方法を提供する。したがって、本発明は、特に、がん性疾患、特に、がんを処置する方法であって、がん性疾患、特に、がんを有すると疑われる、または有する患者に由来する試料を取得および分析することを含み、分析が試料中に含まれるDCCのDNAの配列決定を含み；DNAの体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化の存在または非存在を検出することを含み、体細胞変化の存在が、有効量の医薬組成物を患者に投与する必要があることを示す、方法に関する。本発明はさらに、がん性疾患を診断する方法であって、がん性疾患、特に、がんを有すると疑われる患者に由来する試料を取得および分析することを含み、分析が試料中に含まれるDCCのDNAの配列決定を含み；DNAの体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化の存在または非存在を検出することを含み、体細胞変化の存在が、患者ががん性疾患有するか、または有する可能性があることを示し、体細胞変化の非存在が、患者ががん性疾患有さない、または有する可能性がないことを示す、方法に関する。

#### 【0040】

本発明の方法において決定される、体細胞変化、特に、遺伝子変化はまた、1または複数のパッセンジャー変異を含んでもよい。パッセンジャー変異は、一般的には、クローンの適合性に対する効果がないか、またはわずかな効果しかないが、それがドライバー変異と同じゲノム中で生じるため、クローン性増殖と関連し得る変異である。これに関して、パッセンジャー変異は、特定の組織内では細胞の適合性に対する効果がないか、またはわずかな効果しかないが、同じ変異は別の組織内では細胞の適合性に対する劇的な効果を有してもよいということを認識することが重要である。しかしながら、本発明の意味の範囲内では、パッセンジャー変異は、ドライバー変異が生じた、または将来生じる可能性があるゲノム中に見出される確率が高いことが知られる変異であってもよい。

#### 【0041】

本発明の方法において決定される、体細胞変化、特に、遺伝子またはエピジェネティック変化はまた、1または複数のコピー数変化を含んでもよい。コピー数変化は、DNAの1または複数の部分のコピー数の異常な、またはある特定の遺伝子については、正常な変化を有する細胞をもたらすゲノムのDNAの変化である。コピー数変化は、欠失した（正常数よりも少ない）または増加した（正常数より多い）ゲノムの部分に対応してもよい。

#### 【0042】

それぞれの変化は、約1キロベース（1,000ヌクレオチド塩基）～数メガベース（1,000,000ヌクレオチド塩基）の範囲のサイズであってもよい、ゲノム領域の欠失または増加、特に、複製に対応してもよい。コピー数変化は、疾患に対する感受性または耐性と関連している。例えば、遺伝子コピー数を、がんと関連する細胞、例えば、DCC中で上昇させることができる。したがって、コピー数変化を、本発明の方法において決定して、細胞、特に、DCCの体細胞進化を決定することもできる。次いで、体細胞進化を使用して、がん性疾患、特に、がんのステージ／タイプを決定することができる。本発明の方法において決定される特定のコピー数変化は、染色体9p11-13の喪失、染色体9p21-24の喪失および／または染色体7q21の獲得を含む。したがって、本発明は、DNAの体細胞変化が、染色体9p11-13の喪失、染色体9p21-24の喪失および染色体7q21の獲得から選択される少なくとも1つの変化を含む、本発明の方法または医薬組成物に関する。

#### 【0043】

本発明の方法において検出される、体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化の性質／型に加えて、またはそれとは別に、体細胞変化、特に、遺伝子お

10

20

30

40

50

および／またはエピジェネティック変化の数を決定して、細胞、特に、DCCの体細胞進化を決定することもできる。これに関して、一般的には、蓄積された体細胞変化の数が多くなるほど、細胞、特に、DCCの体細胞進化はより進行すると推測することができる。上記のように、ドライバー変異が存在するが、その存在は、がん性疾患、特に、がんの進行したステージ／タイプを示し、蓄積した体細胞変化の全体数は、閾値に達してもよく、これは、がん性疾患、特に、がんの進行したステージを示す；例えば、Shain et al. (2015) N Engl J Med 373; 20:1926を参照されたい。

#### 【0044】

対象のリンパ節に含まれる、またはがん細胞が浸潤した他の組織（早期）、例えば、骨髓もしくは脳に由来する細胞集団、特に、DCCの全体的体細胞進化を決定するための追加のパラメータを使用することにより、本発明の方法の精度をさらに増加させることができる。これに関して、驚くべきことに、特定の細胞密度で、細胞、特に、DCCが、単離された細胞よりもむしろ細胞の小巣に組織化されるDCCをもたらす、細胞間接触を形成することが見出された。さらに、驚くべきことに、異種移植実験において、細胞、特に、DCCが特定の閾値を超える細胞密度で存在する患者のリンパ節に由来する、前記細胞、特に、DCCを移植されたマウスのみが、移植マウスにおいて腫瘍を生じることが見出された；図5Cを参照されたい。これらの実験から、対応する組織試料、例えば、リンパ節に由来する試料または骨髄試料中で観察されるDCCの全細胞数が、本発明の方法の精度をさらに増加させるための追加のパラメータとして役立ち得ると推定された。これらの実験に基づいて、閾値は、細胞がそのゲノム中に重要なドライバー変異を蓄積した確率が高いことを示し、がん性疾患、特に、がんの進行したステージ／タイプは、対応する組織試料中の細胞100万個あたり約50個以上、好ましくは、60、70、80、90個以上、最も好ましくは、100個の細胞の範囲にあると決定される。したがって、約50～約100、好ましくは、約60～約100、好ましくは、約70～約100、好ましくは、約80～約100、最も好ましくは、約90～約100のDCCDは、がん性疾患、特に、がんの進行したステージ／タイプを示す。上記によれば、患者から得られた組織試料中に見出される細胞数に基づいて、得られた試料中の全細胞数について、または得られた試料中に見出される別の細胞集団について、細胞密度を算出することができる。これに関して、患者から得られた組織試料に含まれるDCC細胞集団を、マーカー、例えば、EpCAMおよび／またはサイトケラチンを使用して検出するのが好ましい。患者から得られたメラノーマ組織試料に含まれるDCC細胞集団は、好ましくは、マーカーとしてgp100を使用して検出される。しかしながら、当業者であれば理解できるように、がん性疾患の進行したステージ／タイプに対応する代替的な閾値を引き起こし得る代替的なDCCマーカーを使用してもよい。したがって、がん性疾患、特に、がんのステージ／タイプの指標として使用される、組織試料、特に、患者から得られたリンパ節試料または骨髄試料中の決定されたDCCDは、細胞密度を決定するために使用される方法に基づいて変化してもよいことが認識されるべきである。これに関して、DCCがgp100陽性である場合、gp100が、得られた試料中に含まれるDCCの数を決定するためのマーカーとして使用されるのが好ましい。したがって、患者の1または複数のリンパ節から得られた1または複数のDCCに含まれる、体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化の決定に加えて、本発明の方法は、DCCを取得するために使用されたリンパ節、特に、患者から得られたリンパ節中でDCCDを決定するステップを含むのが好ましい。

#### 【0045】

がん性疾患のステージ／タイプがCTCの体細胞進化に基づいて決定される場合、本発明の方法は、精度を改善するためにCTCDを決定するステップをさらに含んでもよい。したがって、患者に由来する、特に、血液試料またはin vivoのCTC捕捉デバイスから回収される、1または複数のCTCに含まれる体細胞変化、特に、遺伝子および／またはエピジェネティック変化の決定に加えて、CTC密度(CTCD)を決定するステップを含むのが好ましい。これに関して、CTCDは、患者から得られた血液試料中、ま

10

20

30

40

50

たは *in vivo* の捕捉デバイスの場合、濾過された血液量（代用物としての血液量もしくは濾過時間）に対する CTC 数に関するいくつかのパラメータによる、細胞 100 万個あたりの CTC の数である。例えば、限定されるものではないが、マーカーとしての M-CSF または EpcAM の使用を含む、使用される CTC の検出方法に基づいて決定することができる特定の閾値で、がん性疾患の進行したステージ / タイプを決定することができる。

#### 【0046】

本発明の方法において、1 または複数の細胞、特に、1 または複数の DCC は、好ましくは、1 または複数のリンパ節から得られる。リンパ節は、腋窩および胃を含む身体中に広く分布し、リンパ管によって連結された、リンパ系の卵形の臓器である。リンパ節は、B、T、および他の免疫細胞の主要部位である。リンパ節は、免疫系の適切な機能にとって重要であり、外来粒子およびがん細胞に対するフィルターとして作用する。リンパ節は、臨床的有意性を有することが知られている。それらは、咽喉感染からがんまでの様々な感染および疾患において炎症するか、または肥大するようになる。1 または複数のリンパ節は所属リンパ節であるのがさらに好ましく、所属リンパ節は、疾患を発症する状態にある部位、特に、がん性疾患、特に、がんを発症しやすい部位またはがん性疾患、特に、がんを発症した部位に近いリンパ節である。特に、がんの文脈では、所属リンパ節は、がんの部位、例えば、腫瘍に解剖学的に近いリンパ節である。より好ましくは、本発明の方法において使用される 1 または複数のリンパ節は、流入領域リンパ節である。流入領域リンパ節は、細胞が移住するリンパ節である。疾患部位または疾患を生じやすい部位の流入領域リンパ節は、前記部位から移住する細胞によって浸潤される最初のリンパ節であることが多い。そのようなリンパ節は、センチネルリンパ節とも呼ばれる、すなわち、がん性疾患、特に、がんから流出する仮説的な最初のリンパ節またはリンパ節群である。確立されたがん性播種の場合、センチネルリンパ節は、腫瘍からがん細胞を転移させることによって主に到達される標的臓器である。このようにして、センチネルリンパ節は播種前に検出されたため、それらを全体的にがんがないようにすることができます。したがって、最も好ましくは、本発明の方法において使用される DCC は、対象ががん性疾患、特に、がんを発症しやすいかどうかを決定するため、またはがん性疾患、特に、がんのステージ / タイプを決定するために 1 または複数のセンチネルリンパ節に由来する。

#### 【0047】

当業者であれば、対象、特に、ヒト対象からリンパ節を取得する方法をよく知っている。本明細書で使用される用語「1 または複数のリンパ節から得られた試料」とは、試料ががん性組織、特に、DCC を含有するかどうかを決定するため、および / または前記細胞の体細胞進化を決定するために対象から取り出される細胞、組織または液体の試料を指す。一部の実施形態では、対象が早期診断および / または素因のためにがんを有すると疑われるため、そのような試料を取得する。次いで、当業界で公知の方法を使用して、がん、がん幹細胞、および / またはがん幹細胞遺伝子シグネチャー発現の存在または非存在について、試料を検査することもできる。例えば、本発明の方法において使用されるリンパ節試料を、リンパ節生検、例えば、当業界で記載されている針生検または直視下生検によって取得することができる；例えば、Chang KL et al. (2009) Modern Surgical Pathology . 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009:chap 41 を参照されたい。

#### 【0048】

本明細書で使用される用語「対象」とは、特定の処置のレシピエントである、限定されるものではないが、ヒト、非ヒト靈長類、げっ歯類などを含む、任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。典型的には、用語「対象」および「患者」は、ヒト対象を参照して本明細書で互換的に使用される。したがって、好ましくは、1 または複数の DCC を、ヒト対象、より好ましくは、ヒト患者から取得し、対象 / 患者は、がんを有すると疑われてもよいか、またはがん性疾患、特に、がんに罹りやすくてもよい。

#### 【0049】

本明細書で使用される用語「がんを有すると疑われる対象」または「がん性疾患に罹り

10

20

30

40

50

「やすい患者」とは、がんを示す1もしくは複数の症状（例えば、顕著なしこりもしくは塊）を呈するか、またはがんについてスクリーニングされる（例えば、日常的な健康診断の間に）対象／患者を指す。がんを有すると疑われる対象またはがん性疾患、特に、がんに罹りやすい患者はまた、1または複数のリスク因子を有してもよい。「がんを有すると疑われる対象」または「がん性疾患に罹りやすい患者」は、初期診断を受けたが、がんのステージは不明である個体を包含する。この用語は、かつてがんを有していた人々（例えば、寛解状態にある個体）をさらに含む。この用語はまた、特定のがんを発症する1または複数のリスク因子を有する対象も指す。リスク因子としては、限定されるものではないが、性別、年齢、遺伝的素因、環境的曝露、過去のがん事例、既存の非がん疾患、および生活スタイルが挙げられる。

10

#### 【0050】

本発明の方法は、がん性疾患、特に、がんをステージングする、および／もしくはタイピングする、ならびに／またはその転帰を予測する、ならびに／またはそれを処置するためのものである。本発明の方法において、がん性疾患のタイプは、その疾患が原発疾患部位からリンパ節および／または他の組織、例えば、骨髄への細胞の播種を含む限り、特に限定されない。一般的には、播種は、原発疾患部位から、続発部位、例えば、リンパ節または骨髄または血液への体液の能動的移住または受動的輸送による移住のプロセスに関する。したがって、本発明の方法は、がん性疾患、特に、細胞の播種を含む、好ましくは、リンパ行性播種を含むがん性疾患のステージング／タイピングのためのものである。このようにして、本発明の方法は、好ましくは、固体がんをステージングおよび／もしくはタイピングする、ならびに／またはその転帰を予測する、ならびに／またはそれを処置するためのものである。本明細書で使用される場合、「固体がん」は、制御されていない様式で増殖する、または増殖してがん組織を形成する、1または複数の細胞を指す。本明細書で使用される用語「固体がん」は、限定されるものではないが、「癌腫」、「腺癌」および「肉腫」を含む。「肉腫」は、結合組織、軟骨、骨、筋肉などのがんである。「癌腫」は、上皮（内）層細胞のがんである。「腺癌」とは、腺起源の細胞に由来する癌腫を指す。用語「がん」および「腫瘍」は、本明細書を通して互換的に使用される。

20

#### 【0051】

固体がんは、身体の任意の組織の近くで生じてもよく、本発明の方法を、これらのがんのいずれかをステージングおよび／もしくはタイピングする、ならびに／またはその転帰を予測する、ならびに／またはそれを処置するために使用することができる。本発明に従ってステージングおよび／もしくはタイピングすることができる、ならびに／またはその転帰を予測することができる、ならびに／または処置することができる例示的な「固体がん」としては、聴神経腫、腺嚢癌腫、副腎皮質がん、胞巣状軟部肉腫、肛門がん、血管肉腫、基底細胞癌（b c c）、膀胱がん、骨肉腫、大腸がん、脳幹グリオーマ、乳がん、C N Sがん、カルチノイドがん、子宮頸がん、小児脳腫瘍、小児軟部組織肉腫、軟骨肉腫、綿毛癌、結腸直腸がん、隆起性皮膚線維肉腫、線維形成性小円細胞がん、腺管癌、内分泌がん、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、ユーイング肉腫、肝外胆管がん、眼がん、眼：メラノーマ、網膜芽腫、卵管がん、線維肉腫、胆嚢がん、胃がん、消化管がん、消化管力ルチノイドがん、泌尿生殖器がん、生殖細胞がん、妊娠性綿毛性疾患、グリオーマ、婦人科がん、頭頸部がん、肝細胞がん、遺伝性乳がん、ヒトパピローマウイルス、下咽頭がん、眼内メラノーマ、カポジ肉腫、腎臓がん、喉頭がん、平滑筋肉腫、口唇がん、脂肪肉腫、肝臓がん、肺がん、男性乳がん、腎臓の悪性横紋筋様がん、髓芽腫、メラノーマ、メルケル細胞がん、中皮腫、転移がん、口腔がん、多発性内分泌腺腫、鼻腔がん、鼻咽頭がん、腎芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経線維腫症、非メラノーマ皮膚がん、非小細胞肺がん（n s c l c）、眼がん、食道がん、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、脾臓がん、副鼻腔がん、副甲状腺がん、耳下腺がん、陰茎がん、末梢神経外胚葉がん、下垂体がん、前立腺がん、希少がんおよび関連する障害、腎細胞癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫、皮膚がん、小細胞肺がん（s c l c）、小腸がん、軟部組織肉腫、脊髄がん、扁平上皮癌（s c c）、胃がん、滑膜肉腫、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、移行上皮がん（膀胱がん）。

30

40

50

膀)、移行上皮がん(腎臓-骨盤-/-尿管)、絨毛がん、尿道がん、泌尿系がん、ウロプラキン、子宮肉腫、子宮がん、膀がん、外陰がん、およびウィルムスがんが挙げられる。ステージングおよび/もしくはタイピングすることができる、ならびに/またはその転帰を予測することができる、ならびに/または処置することができるがんは、メラノーマであるのが好ましい。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、メラノーマのステージングおよび/またはタイピングのための方法であって、1または複数のリンパ節から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；および1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップを含み、DCCの体細胞進化が、メラノーマのステージ/タイプを示す、前記方法に関する。さらなる実施形態では、本発明は、メラノーマを処置するための方法であって、患者のリンパ節から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定するステップ；および1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたメラノーマの体細胞進化に基づいて、前記患者のメラノーマのステージ/タイプを決定するステップを含み、メラノーマのステージ/タイプが、メラノーマ療法を開始する、継続する、または中止するために使用される、前記方法に関する。さらに、本発明は、患者におけるメラノーマの処置における使用のための、治療的介入、好ましくは、医薬組成物であって、メラノーマのステージ/タイプに基づいて、処置が開始、継続または中止され、メラノーマの前記ステージ/タイプが、前記患者のリンパ節または液体(好ましくは、リンパ節に由来する、より好ましくは、センチネルリンパ節に由来する)から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出すること；1または複数のDCCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、DCCの体細胞進化を決定すること；および前記患者のリンパ節または液体から得られた1または複数のDCCのDNAの体細胞変化を検出することによって決定されたメラノーマの体細胞進化に基づいて、前記患者のメラノーマのステージ/タイプを決定することによって決定される、治療的介入に関する。

### 【0052】

さらに好ましい実施形態では、本発明は、メラノーマのステージングおよび/またはタイピングのための方法であって、血液から得られた1または複数のCTCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；および1または複数のCTCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、CTCの体細胞進化を決定するステップを含み、CTCの体細胞進化が、メラノーマのステージ/タイプを示す、前記方法に関する。本明細書で上記されたように、血液からCTCを取得するために、in vivoのCTC捕捉デバイスを使用することができる。さらなる実施形態では、本発明は、メラノーマを処置するための方法であって、患者の血液から得られた1または複数のCTCのDNAの体細胞変化を検出するステップ；1または複数のCTCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、CTCの体細胞進化を決定するステップ；および1または複数のCTCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて決定されたメラノーマの体細胞進化に基づいて、前記患者のメラノーマのステージ/タイプを決定するステップを含み、メラノーマのステージ/タイプが、メラノーマ療法を開始、継続または中止するために使用される、前記方法に関する。さらに、本発明は、患者におけるメラノーマの処置における使用のための医薬組成物であって、処置がメラノーマのステージ/タイプに基づいて開始、継続または中止され、メラノーマの前記ステージ/タイプが、前記患者の血液から得られた1または複数のCTCのDNAの体細胞変化を検出すること；1または複数のCTCのDNA中の検出された体細胞変化に基づいて、CTCの体細胞進化を決定すること；および前記患者の血液から得られた1または複数のCTCのDNAの体細胞変化を検出することによって決定されたメラノーマの体細胞進化に基づいて、前記患者のメラノーマのステージ/タイプを決定することによって決定される、医薬組成物に関する。

### 【0053】

本発明の方法は、それぞれ、組織試料、特に、リンパ節試料もしくは骨髄試料または血

10

20

30

40

50

液から得られた、1または複数のDCCまたはCTCのDNAの体細胞変化を検出するステップを含む。これに関して、当業者は、DNAの体細胞変化を検出するのに好適な方法をよく知っている。上記でさらに説明されたように、体細胞変化は、エピジェネティックおよび/または遺伝子変化を含んでもよい。

#### 【0054】

エピジェネティック変化に関して、当業者は、参考試料に関して、または当業界で公知の参考標準に関してエピジェネティック変化を検出することができる方法をよく知っている。上記で説明されたように、1または複数のDCCのDNA中で検出されるエピジェネティック変化は、メチル化、特に、CpGのメチル化、DNA修復タンパク質の欠損、および/またはメチル化、アセチル化、SUMO化、活性化もしくは不活性ヒストンマークのようなヒストン構築もしくは構造の変化および/または例えば、ユークロマチンもしくはヘテロクロマチンなどのクロマチン構築の変化を含んでもよい。したがって、本発明の方法に、DNAメチル化分析のステップを含有させることができる。エピジェネティック機構は、正常な発生、加齢および様々な疾患状態の間に重要な役割を果たすことが知られている。腫瘍抑制遺伝子のプロモーター領域に位置するCpG島の高メチル化は、がんにおける遺伝子不活性化のためのよくある機構としてしっかりと確立されている(Hansen et al. 2011. Nat. Genet. 43, 768-775)。シトシンの5'炭素のメチル化は、一次DNA配列には影響しないが、遺伝子発現の調節において重要な役割を果たす二次相互作用に影響するエピジェネティック変化の形態である。異常なDNAメチル化は、転写、続いて、遺伝子発現を抑制し得る。本発明の方法におけるようなメチル化分析は、標的DNAの選択的変化を含んでもよい。そのような変化は、メチル化依存的制限酵素(MDRE)またはメチル化感受性制限酵素(MSRE)、好ましくは、MDREの附加を含んでもよい。標的DNAの選択的変化はまた、メチル化または非メチル化ヌクレオチド間を選択的に区別することができる化学剤の附加を含んでもよい。特に、本発明の方法において用いられるメチル化分析は、メチル化シトシンを選択的に同定することができ、当業界で公知の方法、例えば、国際公開第2015/118077号パンフレットまたは国際公開第2000/017390号パンフレットに記載の方法を使用して後に読み出すことができる。例えば、亜硫酸水素塩による処理は、非メチル化シトシン(C)をウラシル(U)に変換するが、メチル化シトシンは変換されないことが知られている(Frommer et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1827-1831)。亜硫酸水素塩による処理後のDNAの配列決定を使用して、メチル化ヌクレオチド、特に、シトシンを同定することができる。MDREによる処理は、DNA断片のメチル化依存的制限をもたらすが、MSREによる処理は、制限のメチル化依存的阻害をもたらす。MseI制限に加えたMDRE/MSRE制限後のDNAの配列決定を使用して、メチル化ヌクレオチド、特に、シトシンを同定することができる。

#### 【0055】

さらに、またはあるいは、クロマチン中で組織化されたDNA中のエピジェネティック変化の検出のための最も一般的に使用される技術の1つ、すなわち、クロマチン免疫沈降(ChIP)およびChIP-チップ、ChIP-PET、ChIP-Seq、MeDIP、DamIDなどの関連技術を使用することができる; Minard et al. (2009) Genesis 47(8), pp.559-72およびその中の参考文献を参照されたい。例えば、DNAのメチル化を、MeDIP、MeDIP-チップまたはMeDIP-seqを使用してゲノムワイドに検出することができる。例示的なプロトコールは、精製されたDNAを超音波処理にかけて、それを無作為な断片に剪断するステップを含む。得られる断片は、300~1000塩基対(bp)の長さ、好ましくは、400~600bpの範囲であってよい。次いで、DNA断片を変性させて、一本鎖DNAを産生する。変性後、DNAを、当業界で入手可能な5'-メチルシトシン(5-mC)抗体と共にインキュベートする。次いで、古典的な免疫沈降技術を適用する: 抗マウスIgGにコンジュゲートされた磁気ビーズを使用して、抗5mC抗体に結合させ、上清中の未結合のDNAを除去する。DNAを精製するために、プロテイナーゼKを添加して、抗体を消化し、DNAを遊離させ、DNAの検出の

10

20

30

40

50

ために収集および調製することができる。その後、遺伝子変化の検出のために以下にさらに記載される方法を使用して、DNA検出を行う。さらなる実験プロトコールは、Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. (August 2005) Nat. Genet. 37 (8): 853-62; Pomraning KR, Smith KM, Freitag M (March 2009) Methods 47 (3): 142-50; Wilson IM, et al. (2005) Cell Cycle 5 (2): 155-8; およびZhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. (September 2006) Cell 126 (6): 1189-201によって記載されている。例示的なMeDIP - チッププロトコールについては、以下のステップを適用する：上記の超音波処理ステップ後に得られた入力DNAの画分を、シアニン-5(Cy5；赤)デオキシ-シトシン-ミリン酸で標識するが、免疫沈降ステップ後に富化された、メチル化DNAを、シアニン-3(Cy3；緑)で標識する。標識されたDNA試料を、2チャネルの高密度ゲノムマイクロアレイ上で同時ハイブリダイズして、存在および相対量について精査する。この比較の目的は、ハイブリダイゼーションレベルにおける有意差を示す配列を同定することであり、それによって、目的の配列が富化される、すなわち、メチル化されることを確認する。多くのアレイ技術と同様に、ノイズなどのハイブリダイゼーションの問題について補正するためのシグナルプロセッシングにおいて必要とされる追加の標準的なステップが存在する。さらに、またはあるいは、MeDIP-seq手法、すなわち、MeDIPと、454またはIllumina配列決定などの次世代ショートリード配列決定技術との共役を適用することができる。メチル化DNA断片の高効率配列決定は、多数のショートリード（技術に応じて、36～50bpまたは400bp）をもたらす。アラインメントに関するエラー確率をモデル化するための塩基およびマッピング品質と共に、Bayesian手法を使用するMapping and Assembly with Quality(Maq)などのアラインメントソフトウェアを使用して、ショートリードを参照ゲノムに対して整列させる。次いで、リードを伸長させて、超音波処理ステップに由来する約400～700bpの断片を表すことができる。これらの伸長されたリードの網羅率は、領域のメチル化レベルを見積もるために使用することができる。またENSEMBLなどのゲノムブラウザも、データを可視化するのに使用することができる。データの品質および精度を評価するための手法の検証を、特に、定量的PCRを使用して行うことができる。非メチル化対照配列に対して、MeDIP試料に由来する配列を比較することによって、これを行う。次いで、試料をゲル上で泳動し、バンド強度を比較する。相対強度は、富化を見出すための指針として役立つ。

#### 【0056】

ChIP技術を使用して、ヒストン改変またはDNAに結合した他のタンパク質に関する改変などの、他のエピジェネティック変化を検出することもできる。そのような技術は、当業界で公知であり、「Chromatin Immunoprecipitation Assays - Methods and Protocols」by Philippe Collas, Humana Press (2009)などの様々な標準的な参考書に広く記載されている。しかしながら、当業者は、他の技術を適用して、DNAのエピジェネティック変化を検出することもできることをよく知っている。したがって、本発明の方法では、そのような改変、特に、エピジェネティック変化を検出するのに好適な任意の技術を適用することができる。

#### 【0057】

しかしながら、本発明の文脈では、遺伝子変化を検出するための方法と適合する、特に、遺伝子変化とエピジェネティック変化との同時的検出を可能にする、エピジェネティック変化を検出するための方法を使用するのが好ましい。そのような方法は、例えば、国際公開第2015/118077号パンフレットまたは国際公開第2000/017390号パンフレットに記載されている。しかしながら、エピジェネティック変化を検出するためにDNA配列情報に依拠する代替的な方法は、当業者には公知である。例えば、Illumina(登録商標)によって上市された次世代配列決定技術は、当業者には公知であり、特に、次世代配列決定、特に、メチル化配列決定などのさらなる技術などのさらなる技術と組み合わせて、メチル化などのエピジェネティック変化を検出する；ならびに/またはクロマチン免疫沈降(ChIP)および/もしくは次世代配列決定と組み合わせたC

10

20

30

40

50

h I P、特に、C h I P - S e q（例えば、Illumina（登録商標）配列決定装置のために利用可能なプロトコールを使用する）などの技術と組み合わせて、タンパク質-D N A相互作用を検出するのに好適である。

#### 【0058】

エピジェネティックおよび／または遺伝子変化の単離された、および／または同時的な検出にとって好適な方法の好ましい例は、D N Aを含む試料、特に、1または複数のD C CまたはC T Cを含む、1もしくは複数のリンパ節に由来する試料または骨髄試料を提供するステップ；エピジェネティックに改変された核酸、特に、メチル化核酸を選択的に認識する薬剤、例えば、亜硫酸水素塩を前記D N Aに添加するステップ；類似する長さのD N A断片を取得するのに好適な条件下で、突出部の末端ヌクレオチドがリン酸化される5'突出部を提供することができるか、または突出部の末端ヌクレオチドが前記D N A断片上でヒドロキシル化される、3'突出部を提供することができる、制限エンドヌクレアーゼで前記D N Aを消化するステップ；第1のオリゴヌクレオチドの第1の配列が、それぞれ、前記D N A断片の5'または3'突出部と相補的であり、前記第1のオリゴヌクレオチドの第2の配列が、第2のオリゴヌクレオチドの第1の配列と相補的であり、前記第2のオリゴヌクレオチドが第2および第3の配列を含み、前記第2のオリゴヌクレオチドの前記第2の配列が無作為配列を含む、前記第1のオリゴヌクレオチドを前記D N A断片にアニーリングさせるステップ；前記第2のオリゴヌクレオチドを前記D N A断片にライゲートするステップ；生成された突出部を埋めるステップ；前記第2のオリゴヌクレオチドの前記第3の配列に結合する配列を含む第3のオリゴヌクレオチドを使用して、前記D N A断片を増幅するステップ；前記増幅されたD N A断片を配列決定するステップ；ならびにメチル化核酸残基を同定するステップであって、亜硫酸水素塩がエピジェネティックに改変された核酸を選択的に認識する薬剤として使用される場合、シトシン（C）が前記D N A試料中のメチル化残基に対応し、ウラシル（U）が前記D N A試料中の非メチル化残基に対応する、ステップを含む方法である。メチル化以外の他のエピジェネティック改変を検出するための代替的な薬剤、すなわち、エピジェネティックに改変された核酸を特異的に認識する薬剤は、当業者には公知である。上記方法の最後のステップで得られた配列情報を使用して、遺伝子変化を同時に検出することができる。得られた配列情報を、例えば、全ゲノム配列決定、全エキソーム配列決定、全レギュローム配列決定、配列決定に基づくメチル化分析、配列決定に基づく切断点検出、C h I P配列決定、または標的配列決定およびその变形のようなD N A配列分析のための方法において使用することができる。  
10  
20  
30  
30

#### 【0059】

上記で説明されたように、本発明の方法は、それぞれ、組織または体液試料、特に、それぞれ、リンパ節試料もしくは骨髄試料もしくは液体（D C Cの場合）、または血液（C T Cの場合）から得られた、1または複数のD C CまたはC T CのD N Aの体細胞変化を検出するステップを含む。これに関して、当業者は、D N Aの体細胞変化、特に、遺伝子変化を検出するのに好適な方法をよく知っている。好適な方法の概説は、Schwartz et al. (2013) JMB 425(21), pp-3914-8によって与えられている。基本的には、ヒトゲノム研究計画の完了と共に、遺伝子変化を比較することができる参照配列が確立された。すなわち、D N Aの配列決定に統一して、得られる配列を、当業界で公知の参照配列と比較することができる。D N Aを配列決定するための方法に関して、任意の方法を、本発明の文脈内で使用することができる。しかしながら、迅速で、効率的で、信頼性が高く、低い入力量のみを必要とする方法を使用するのが好ましい。これは、ただ1つの単一細胞が、それぞれ、組織もしくは体液試料、特に、リンパ節試料もしくは骨髄試料もしくは液体試料、または血液中に存在し得るがん拡散の早期においてD C CまたはC T Cを検出するために特に重要である。このようにして、遺伝子変化を検出するために、例えば、Mardis (2008) Annu Rev Genomics Hum Genet 9, 387-402に記載されたような、少量の入力D N Aの配列決定にとって特に好適である当業界で公知の配列決定方法を使用することができる。好ましくは、例えば、国際公開第2015/118077号パンフレットまたは国際公開第2000/017390号パンフレットに記載されたような、少量の入力D N Aのエラーの  
40  
50

ない配列決定方法が使用される。したがって、本発明において使用される好ましい方法は、エンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼによって作出される突出部を特異的に認識するオリゴヌクレオチドおよび増幅のためのさらなるオリゴヌクレオチドの使用を含む、DNA配列決定法である。オリゴヌクレオチドは、例えば、エンドヌクレアーゼによって生成される断片を識別するため、およびエラーのない配列決定のための内部配列決定参照を生成するためにバーコード配列を含んでもよい。DNA配列決定のための例示的な、好ましい方法は、DNAを含む試料、特に、1または複数のDCCまたはCTCを含む、1または複数のリンパ節もしくは骨髄試料または液体もしくは血液試料に由来する試料を提供するステップ；類似する長さのDNA断片を取得するのに好適な条件下で、突出部の末端ヌクレオチドがリン酸化される5'突出部を提供することができるか、または突出部の末端ヌクレオチドが前記DNA断片上でヒドロキシル化される、3'突出部を提供することができる、制限エンドヌクレアーゼで前記DNAを消化するステップ；第1のオリゴヌクレオチドの第1の配列が、それぞれ、前記DNA断片の5'または3'突出部と相補的であり、前記第1のオリゴヌクレオチドの第2の配列が、第2のオリゴヌクレオチドの第1の配列と相補的であり、前記第2のオリゴヌクレオチドが第2および第3の配列を含み、前記第2のオリゴヌクレオチドの前記第2の配列が無作為配列を含む、前記第1のオリゴヌクレオチドを前記DNA断片にアニーリングさせるステップ；前記第2のオリゴヌクレオチドを前記DNA断片にライゲートするステップ；生成された突出部を埋めるステップ；前記第2のオリゴヌクレオチドの前記第3の配列に結合する配列を含む第3のオリゴヌクレオチドを使用して、前記DNA断片を増幅するステップ；ならびに前記増幅されたDNA断片を配列決定するステップを含む。

10

20

30

40

## 【0060】

1もしくは複数のリンパ節もしくは骨髄試料の1もしくは複数のDCCのDNAまたは血液に由来する1もしくは複数のCTCのDNAの、体細胞変化、特に、遺伝子および/またはエピジェネティック変化を検出した後、本発明の方法は、検出された体細胞変化に基づいて体細胞進化を決定するステップを含む。上記のように、体細胞進化は、好ましくは、DCCD/CTCDなどのさらなるパラメータを含む、細胞、特に、DCCまたはCTCの一生涯の間に蓄積された体細胞変化に基づいて決定される。このようにして、検出された体細胞変化、特に、遺伝子および/またはエピジェネティック変化に基づいて、体細胞進化を決定し、がん性疾患、特に、がんのステージ/タイプを決定し、処置方法を調整することなどができる。当業者であれば、例えば、文字、数字などを使用して、がん性疾患の決定されたステージ/タイプを表現する方法を理解するであろう。

## 【0061】

別途定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似するか、または等価である方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先するものとする。さらに、材料、方法、および実施例は、例示に過ぎず、限定を意図するものではない。

## 【0062】

本発明の方法および技術は、一般的には、別途指摘しない限り、当業界で周知であり、本明細書を通して引用および考察される様々な一般的でより具体的な参考文献に記載された従来の方法に従って実施される。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates (1992)、およびHarlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を参考されたい。

## 【0063】

本発明は、図面および上記説明において詳細に実証および説明されるが、そのような実

50

例および説明は、実例的または例示的であると考えるべきであり、限定的であると考えるべきではない。当業者であれば、以下の特許請求の範囲の範囲および趣旨の中で変更および改変を行うことができると理解されるであろう。特に、本発明は、上記および下記の異なる実施形態に由来する特徴の任意の組合せと共にさらなる実施形態を包含する。

#### 【0064】

本発明はまた、図面中に個別に示される全てのさらなる特徴を包含するが、それらは前記または下記説明に記載されていなくてもよい。また、図面および説明に記載された実施形態の単一の選択肢およびその特徴の単一の選択肢を、本発明の他の態様の主題から放棄することができる。

#### 【0065】

さらに、特許請求の範囲における単語「含む」は、他の要素またはステップを排除せず、不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」は、複数を排除しない。單一ユニットは、特許請求の範囲に記載されるいくつかの特徴の機能を満たしてもよい。また、属性または値と関連する「本質的に」、「約」、「およそ」などの用語は、特に、それぞれ、正確にその属性または正確にその値を定義する。特許請求の範囲における任意の参照サンプルは、その範囲を限定すると解釈されるべきではない。

#### 【0066】

また、本発明を、以下の図面によって例示する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0067】

【図1-1】図1は、腫瘍の厚さの関数としてのメラノーマ細胞の播種を示す図である。(A)段階的関数：腫瘍の厚さの関数としての播種の推定累積確率(Turnbul) ( $n = 1027$ 人の患者)。連続直線：長期的播種を含まない患者の画分を含むWeibull分布(下側の破線の95%CI)。上側の破線：63.5%のメラノーマのみがリンパ系に播種する(95%CI 53.5 ~ 73.4%)。この値の50%(31.75%)は、播種するメラノーマの厚さの中央値(0.40mm、95%CI 0.04 ~ 0.75mm)を提供する(直線の破線)。(B)組織病理学的および免疫細胞学的なリンパ節の半分の比較分析。DCCD 100、100 < DCCD 1000およびDCCD > 1000の免疫細胞学的スコアを示す代表例が示される。試料LN72およびLN89は、メランAに対して染色され、LN10、LN135およびLN168はS100に対して染色される。LN154は、H&E染色における高色素性メラノーマを示す。

【図1-2】(C) Turnbul推定による定着(DCCD > 100)を示すDCC陽性患者( $n = 525$ )のパーセンテージ(段階的直線)。定着のパーセンテージ(連続曲線、95%CI破線曲線)は、累積Weibull分布関数によって記載される(中央値8.9mm；95%CI 6.8 ~ 14.3mm)。(D)まだ起こっていない、これらの腫瘍に関する事象(播種、定着)に関する単位厚さあたりの瞬間リスクを記載する、播種および定着に関するハザード関数。

【図1-3】(E) T-ステージ(T1: 1mm; T2: 1.01 ~ 2.0mm; T3: 2.01 ~ 4.0mm; T4: > 4mmの厚さ)によるメラノーマ患者( $n = 1027$ )の生存分析。

【図2】SLN由来gp100陽性細胞が複数のCNAを示すことを示す図である。患者集合に由来する90のDCCを、CGHおよび突然変異分析に関するQC基準(本文を参照)に従って選択した(以下を参照されたい)。ヒストグラムは、細胞あたりのゲノム獲得(明灰色)または喪失(暗灰色)を記載し、悪性起源を確認する。識別子は、細胞IDを示す。

【図3-1】図3は、DCCと原発腫瘍の遺伝子比較を示す図である。(A)染色体異常に関する原発腫瘍とDCCの対のクラスター分析(獲得=+1；喪失=-1)。10の最も可変性の領域のみが含まれる。最下行の識別子は、患者ID、試料型(PT、原発腫瘍；DCC、播種性がん細胞)および試料指數を示す；横線の標識は、染色体領域を示す。黒四角および白四角は、原発腫瘍のいくつかの領域が利用可能であったPT-DCC対の

10

20

30

40

50

例を示す。PT - 厚さが変化するDCCとPTの対の例は、四角で示される。

【図3-2】(B) 染色体異常に関するPTとDCCの対の比較。異常頻度についてPT( $n = 23$ )とDCC( $n = 24$ )の対の間で有意に異なる(FDRにより調整されたp値 $0.05$ )18の染色体領域が示される。獲得および喪失を、パーセントで与える。(C) 単一細胞WGAは野生型および変異型対立遺伝子を確実に捕捉する。エクソン15の変異c1799T>A(BRAF)およびエクソン2の変異c1811C>A(NRAS)が、BRAF(細胞株70-61およびMe1H0)またはNRAS(細胞株102-4)変異を有する細胞株の全ての単一細胞(レーン1~15)において検出された。それぞれの細胞株のwt対mt対立遺伝子の対立遺伝子比は、プールされたDNAによって提供される。この比はほとんどの単一細胞において保存されることに留意されたい。

【図3-3】(D) 対形成したPT-DCC試料( $n = 32$ 人の患者)に関するBRAFおよびNRASの変異分析。異なる変異(NRASまたはBRAFのいずれか)は、mut1およびmut2で示される。Fisherの直接確率検定のp値は、PTとDCCの間のBRAF変異状態の差異を示す。(E) DCC間で同種(変異を有する全細胞)および異種BRAF NRAS変異状態を有する患者のパーセンテージ。DCCを、2つのマーカー、gp100またはMCSpを使用して検出した。(F) 対形成したPT-DCC-転移のトリプレット、PT-転移の対またはDCC-転移の対のBRAFおよびNRASのがん遺伝子変異。四角は、領域(PTおよび転移)または個々の細胞(DCC)を示す。四角は、領域(PT)、個々の細胞(DCC)または個々の転移(Meit)を示す。黒四角は、変異が検出されたことを示し、白四角は、野生型配列を示す。

【図4-1】図4は、播種時のDCCの分子分析を示す図である。(A) 上:DCCを、その一致したPTの厚さに従って2つの群に分割することができるゲノム異常について、24未満のDCCDを有する試料を試験した。低い、および高いPTの厚さ群を規定する限界PT厚さの関数としての最も低い(染色体遺伝子座にわたって)FDRにより調整されたp値が示される。低いp値( $-10g_{10}(p)$ の高い値に対応する)は、薄い、および厚いPTを有する患者に由来するDCC間の異常頻度に有意差がある厚さの限界を示す。5%有意性は、 $-10g_{10}(0.05) = 1.30$ によって示される。赤色の点は、31全部の細胞を指す。青色の雲は、サブサンプリングに基づくロバスト性推定値を表す(補足方法)。中央:限界PT厚さの関数としての上2つの遺伝子座18q21-q23( $p = 0.051 [1.8\text{mm}]$ および $0.10 [1.7\text{mm}]$ )および1q24-q44( $p = 0.26 [0.8\text{mm}]$ )に関する個々の調整されたp値。下:試料のPT厚さに従って列挙された両遺伝子座に関する細胞あたりの異常状態(獲得=+1、喪失=-1)。

【図4-2】(B) 18q21-q23の喪失( $n = 5$ )または喪失なし( $n = 56$ )を示すDCCを有する患者のカプラン-マイヤーの生存分析。(C) 上:DCCを分析した、薄い( $< 1.8\text{mm}$ )および厚い( $> 1.8\text{mm}$ )腫瘍の厚さ。薄い-厚いの分割を、図4Aによって決定されたようにPT厚さ $1.8\text{mm}$ に従って実施した。下:それぞれ、薄い、および厚い腫瘍に由来するDCCにおける細胞あたりの染色体異常の数。

【図5-1】図5は、DCCにおける定着関連変化を示す図である。(A) DCCを患者のDCCDに従って2つの群に分割することができるゲノム異常について、試料を試験した。低い、および高いDCCD患者群を規定する限界DCCDの関数としての最も低い(染色体遺伝子座にわたって)FDRにより調整されたp値が示される。低いp値は、低い、および高いDCCDを有する患者に由来するDCC間の異常頻度に有意差があるDCCD限界を示す。赤色の点は90全部の細胞を指す。青色の雲は、ロバスト性推定値である。(B) 限界DCCDの関数としての少なくとも1つのDCCDに関する5%の有意性( $-10g_{10}(0.05) = 1.30$ によって示される)を達成する全ての遺伝子座に関する個々の調整されたp値(BRAFに関する最も低い $p = 0.0002$ )。さらに、NRASが示される(最も低い $p = 0.29$ )。

【図5-2】(C) 患者DCCDの増加に従って列挙された、全てのパネルBの遺伝子座+BRAFおよびNRAS変異状態に関する細胞あたりの異常状態(獲得=+1、喪失=-1)

10

20

30

40

50

- 1 )。B R A F およびN R A S 異常状態について、+ 1 は変異を示す。

【図5 - 3】( D )センチネルリンパ節におけるD C C の増殖。G 0 、G 1 、G 2 期および分裂期(左から右に向かって)におけるM e l a n A + 細胞の免疫蛍光。核、M e l a n A およびK i - 6 7 が示される。

【図6 - 1】図6は、定着の前後でのD C C の腫瘍形成能力および患者の生存を示す図である。( A )左から右に向かって、患者-S L N : D C C 由来スフィアに由来する単離されたM C S P + D C C ; 患者D C C 由来異種移植片(D C C - P D X )のH & E 染色；D C C - P D X ( 7 人はD C C をs . c . 注射された)。( B )同じ患者からN S G マウスへのM C S P + D C C とD C C 由来スフィアの対の比較移植。左：無腫瘍マウスのカプラン-マイヤー分析( $p < 0 . 0 0 0 1$ 、ログランク検定)。右：注射部位あたりの、注射されたM C S P + D C C およびD C C 由来スフィアの数( $p = 0 . 8 6$ 、マン-ホイットニ-U 検定)。黒丸は、腫瘍形成を示す。( C )N S G マウスに移植された、M C S P + D C C ( D C C D > 1 0 0 : n = 2 4 注射部位)またはD C C 由来スフィア(D C C D > 1 0 0 : n = 1 2 注射部位；D C C D = 1 0 0 : n = 1 4 注射部位)の数。それぞれの丸は、1つの注射部位を表す。黒丸は、腫瘍形成(生着)を示す。 $p$  値(F i s h e r の直接確率検定)は、D C C D > 1 0 0 ( プールされた細胞およびスフィア、n = 3 6 ) 対D C C D = 1 0 0 ( スフィア、n = 1 4 ) を示す試料に関する生着率の有意差を示す。

【図6 - 2】( D )患者由来D C C およびその対応する異種移植片の定着シグネチャー(図5 A ~ C で同定された遺伝子座)、B R A F およびN R A S 変異状態。( E )左：少なくとも1つの定着シグネチャー変化を示す(n = 4 0 )もしくは示さない(w t 、n = 2 1 ) D C C を有する患者のカプラン-マイヤー生存分析、または右：B R A F 変異(B R A F m u t 、n = 1 5 )もしくは野生型配列(w t 、n = 4 6 )を示すD C C を有する患者のカプラン-マイヤー生存分析。

【図7】局所疾患から転移疾患へのメラノーマの進行のモデルを示す図である。組織学的外見、患者由来播種推定値、増殖速度およびB R A F 変異状態を、スキームに統合する。データは、本研究および参考文献(Dong (2003) Cancer research 63, 3883-3885 ; Gimotty (2005) Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 23, 8048-8056 ; Verlinden (2014) Medicine 93, e285)から取られる。

【図8 - 1】図8は、血液、リンパ節または骨髄から単離された3 0 の対照細胞のC G H プロファイルを示す図である。細胞を、g p 1 0 0 陽性細胞として同一に単離し、増幅した。全染色体を記載する。いくつかの事例では、本発明者らは、ハイブリダイゼーションの成功を示すために性別不一致の対照D N A を使用した。色付きのバーは、X 染色体の相対的獲得または喪失を示し(赤色、試験細胞中で不足；緑色、試験細胞中で過剰)、バーはイデオグラムの隣に示される。灰色のバーで示される染色体領域(セントロメア領域)は、反復領域を含有するため、分析から排除される。全ての細胞が、正常なゲノムを示した。

【図8 - 2】上記と同様である。

【図8 - 3】上記と同様である。

【図8 - 4】上記と同様である。

【図8 - 5】上記と同様である。

【図8 - 6】上記と同様である。

【図8 - 7】上記と同様である。

【図8 - 8】上記と同様である。

【図8 - 9】上記と同様である。

【図8 - 1 0】上記と同様である。

【図8 - 1 1】上記と同様である。

【図8 - 1 2】上記と同様である。

【図8 - 1 3】上記と同様である。

【図8 - 1 4】上記と同様である。

10

20

30

40

50

【図 8 - 15】上記と同様である。  
 【図 8 - 16】上記と同様である。  
 【図 8 - 17】上記と同様である。  
 【図 8 - 18】上記と同様である。  
 【図 8 - 19】上記と同様である。  
 【図 8 - 20】上記と同様である。  
 【図 8 - 21】上記と同様である。  
 【図 8 - 22】上記と同様である。

【図 9】分析された患者試料の概要を示す図である。本発明者らの研究は、最も早期の疾患ステージにあるメラノーマ患者に焦点を合わせたものである；したがって、臨床的に節陰性疾患を有する非転移（M0）患者のみを含有させた。分子分析のために、試料を、入手可能性またはDNAの品質に従って含有させた。さらなるゲノムまたは機能的分析のための患者／細胞の選択のための本発明者らの基準は、以下のものを含んでいた： 1) 患者がそのSLN中にgp100<sup>+</sup>細胞を有する。 2) gp100+DCCが単離される。 3) DCC由来DNAがCGH分析のための品質管理を通過する（Polzer et al. 2014を参照されたい）。 4) 原発腫瘍（PT）のパラフィンブロックを、外部の皮膚科医から受け取ることができる（ほぼ全ての患者が大学病院の外部で手術されるため、原発腫瘍の獲得は非常に困難であることに留意されたい）。 5) PTの十分な材料が放置され、診断のために完全に使用されていない。 6) 多くのパラフィン包埋組織に由来するDNAが品質管理を通過する。 7) 短期培養または異種移植を可能にする十分なSLN材料。 8) フォローアップが利用可能であり、十分な長さのものである。

【図10】パラフィン包埋されたメラノーマの顕微解剖を示す図である。上：原発メラノーマの領域を含有するH&E皮膚染色。下：レーザー顕微解剖後の同じ領域。メラノーマの切り出された領域に留意されたい。

【図11】DCCおよび原発腫瘍の遺伝子比較を示す図である。染色体異常に関する原発腫瘍（PT）と播種性がん細胞（DCC）との対のクラスター分析（獲得 = +1；喪失 = -1）。全ての可変領域が含まれる。識別子は、患者ID、試料型および試料指數を示す。黒四角および白四角は、原発腫瘍のいくつかの領域が入手可能であったPT-DCC対を示す。

【図12】原発腫瘍とDCCとの対のBRAFおよびNRASにおけるがん遺伝子変異を示す図である。四角は、領域（PT）または個々の細胞（DCC）を示す。黒四角は、変異が検出されたことを示し、白四角は、野生型配列を示す。青四角および赤四角は、それぞれ、NRAS mut Q61KおよびNRAS mut Q61Rを示す。灰色線の四角は、配列を取得することができなかった試料を示す。

【図13-1】図13(A)上：DCCD < 19を有する患者に由来するDCC（n = 30）を、観察されたPT厚さに従って2つの群に分離する遺伝子座を同定する最も低いFDRにより調整されたp値。中央：上2つの遺伝子座18q21-q23（p = 0.065 [1.8mm] および 0.13 [1.7mm]）および1q24-q44（p = 0.29 [0.8mm]）に関する調整されたp値。5%有意性レベルは、-log<sub>10</sub>(0.05) = 1.3によって示される。下：PT厚さに従って列挙された両遺伝子座に関する細胞あたりの異常状態（獲得 = 1、喪失 = -1）。

【図13-2】図13(B)(A)と同じであるが、DCCD < 32（n = 32）に関するものである。上2つの遺伝子座：18q21-q23（p = 0.083 [1.8mm] および p = 0.15 [1.7mm]）および10q23-q26（p = 0.19 [2.3、2.4mm]）。

【図13-3】図13(C)(A)と同じであるが、DCCD < 95（n = 40）に関するものである。上2つの遺伝子座：11q14-q23（p = 0.082 [2.3、2.4mm]）および1q24-q44（p = 0.16）[0.8mm]。

【図14-1】図14は、メラノーマ細胞株に由来する単一細胞およびスフィアの異種移植を示す図である。（A）マトリゲルを含む、もしくは含まない3~5個のスフィアの群

またはマトリゲルを含む5個の単一細胞の群を、NSGマウスにs.c.移植した。腫瘍増殖を示す注射部位のパーセンテージを決定した。(B)3~5個のスフィア+マトリゲルの群または5個の単一細胞+マトリゲルの群をs.c.注射したマウスを、弱く触診し、s.c.で増殖している腫瘍の最初の触診の時点を文書化した。p値は、統計的有意性(ログランク検定)を示す。注射部位の数を、図面中に記載する。(C)STR分析によるスフィア/異種移植片の患者起源の確認。全部で4/7の異種移植片を示す。LN154に由来する異種移植片を間違ってFFPE固定し、その後分析することができなかった。D21S11、D16S538およびvWA遺伝子座でのトリならびにクアトロ対立遺伝子パターンは、これらの遺伝子座での反復数を示す。n.d.=検出不可能である。

【図14-2】表1は、メラノーマ患者のベースラインの特徴を示す。10

【図15-1】図15は、リンパ節の定着がCD8<sup>+</sup>T細胞の機能的損傷と関連することを示す図である。(A)リンパ節をフローサイトメトリーによって分析し、メラノーマのリンパ節中の抗原を受けた(CD45RA-CCR7+/-)CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージを、LNのDCCDの関数として決定した。抗原を受けたCD8<sup>+</sup>T細胞の数は、DCCDの増大と共に増加する(対数尺度で記載される)。

【図15-2】(B)リンパ節をフローサイトメトリーによって分析し、メラノーマ患者のリンパ節中のPD-1およびTim-3を発現するCD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージを、リンパ節のDCCDの関数として決定した。健康な対照(がんを有さない患者)に由来するリンパ節を、対照として使用した。y軸のカットオフを、対照リンパ節中のPD-1高発現CD8<sup>+</sup>T細胞の最も高いパーセンテージに従って設定した。DCCD 2000で、有意に増加した数の試料が、健康な対照よりも、高いパーセンテージのPD-1高発現CD8<sup>+</sup>T細胞を示した(y軸カットオフ; p < 0.004、Fisherの直接確率検定)。フローサイトメトードットプロットは、DCCD < 2000およびDCCD 2000を示すリンパ節中のPD-1およびTim-3発現の代表例を示す。(C)リンパ節の単一細胞懸濁液を、PMA/イオノマイシンで刺激し、TNFおよびINFgを発現するPD-1高およびPD-1中間発現CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージならびにTNFおよびINFgに関するその対応する中央蛍光強度(MFI)を、フローサイトメトリーによって決定した。PD-1高細胞は、IFNgおよびTNF産生細胞のパーセンテージの減少ならびに両サイトカインに関するMFIの減少を示す。刺激されていないCD8<sup>+</sup>T細胞を、対照として使用したところ、TNFおよびIFNg産生について陰性であることがわかった。(D)IFNgまたはTNFスコアは、PD-1中間CD8<sup>+</sup>T細胞に対するサイトカイン産生PD-1高のパーセンテージの比を掛けた、PD-1高CD8<sup>+</sup>T細胞に対するPD-1中間+陰性CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージの比と、PD-1中間発現細胞の中央蛍光強度に対するサイトカイン発現PD-1高CD8<sup>+</sup>T細胞の中央サイトカイン蛍光強度の比とを組み合わせたものである。IFNgスコア = 比% CD8<sup>+</sup> PD-1 int + neg / % PD-1 high × % IFNg PD-1 high / % IFNg PD-1 int 細胞 × 比MFI IFNg + PD-1 high 細胞 / MFI IFNg + PD-1 の細胞 int CD8<sup>+</sup> T細胞。スコアが小さくなるほど、IFNgまたはTNF分泌が減少したより多くのPD-1高CD8<sup>+</sup>T細胞が存在する。健康な対照(がんを有さない患者)に由来するリンパ節を、対照として使用した。30

【図15-3】(B)は、上記と同様である。

【図16-1】図16は、定着がMDSの増加および細胞溶解性NK細胞数の減少と関連することを示す図である。(A)メラノーマ患者のリンパ節(n=39)中のMDSのパーセンテージを、対応するDCCDに関してフローサイトメトリーによって決定した(対数尺度で)。健康な対照(がんを有さない2人の患者)に由来するリンパ節を含有させる。対照リンパ節の数が少なすぎるため、y軸カットオフを、0のDCCDを示すリンパ節中のMDSの最も高いパーセンテージに従って設定した(DCCD + 1 = 1に関する対数尺度で)。DCCD 2000で、有意に増加した試料数は、0のDCCDを示すリンパ節中のMDSのパーセンテージがより高いことを示していた(y軸カットオフ; p < 0.007、Fisherの直接確率検定)。(B)1人の患者のいくつかのリンパ

10

20

30

40

50

節におけるNK細胞の分析。それぞれのリンパ節の対応するDCCDを記載し、細胞溶解性CD<sub>56</sub><sup>d i m</sup>細胞に対するCD<sub>56</sub><sup>b r i g h t</sup>のパーセンテージの比を示す。比の低下は、非細胞溶解性CD<sub>56</sub><sup>b r i g h t</sup>NK細胞に対する細胞溶解性CD<sub>56</sub><sup>d i m</sup>細胞のパーセンテージの減少を示す。

【図16-2】上記と同様である。

【発明を実施するための形態】

【0068】

本発明のより良い理解およびその多くの利点を提供する以下の例示的な非限定例によって、本発明をさらに説明する。以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含まれる。当業者であれば、以下の実施例で開示される技術は、本発明の実施において良好に機能するために本発明において使用される技術であり、このようにして、その実施のための好ましい様式を構成すると考えることができることを理解するべきである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して、開示される特定の実施形態において多くの変更を加え、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、似たような、または類似する結果を依然として得ることができることを理解するべきである。10

【0069】

特許出願、製造業者のマニュアルおよび科学的刊行物を含むいくつかの文献が本明細書で引用される。これらの文献の開示は、本発明の特許性と関連すると考えられないが、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。より具体的には、全ての参考文献は、あたかもそれぞれ個々の文献が具体的かつ個別に参照により組み込まれると示されたのと同程度に参照により組み込まれる。20

【実施例】

【0070】

[実施例1]

#### 細胞が播種し、コロニーを形成する時の腫瘍の厚さ

触診および超音波によって評価された臨床的に節陰性の疾患を有する患者において、どの腫瘍厚さのメラノーマがセンチネルリンパ節(SLN)に播種するかを調査した。センチネルリンパ節中の単一のメラノーマ細胞のための高感度かつ定量的なgp100に基づく検出方法(Ulmer et al. (2005), Clin Cancer Res. 11, 5425-5432)を、1027人のメラノーマ患者上での前向き研究に適用した(Ulmer et al. (2014) PLoS Med. 11:e101604)。これらのうち、51%がgp100陽性細胞を有していた(Ulmer et al. (2014) PLoS Med. 11:e101604)が、70の対照試料のうち単一のgp100陽性細胞ではなかった(患者あたりのスクリーニングされた細胞の平均数は $2.3 \times 10^6$ 個)。比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)分析の際に、リンパ節に由来する無作為に選択されたgp100陽性細胞の98%が、コピー数変化を有することが見出された(Ulmer et al. (2014) PLoS Med. 11:e101604)。対照のために、30の単一の白血球を単離し、いかなる異常も示さない対照細胞を用いてCGH分析を実施した( $p < 0.0001$ ; Fisherの直接確率検定; 図8)。30

【0071】

原発腫瘍の厚さと、播種性がん細胞密度(DCCD; 分離したリンパ節中の細胞100万個あたりのgp100陽性細胞の数と定義される)との間には弱い正の相関があった(Spearmanの $= 0.18$ 、 $p < 0.0001$ 、 $n = 1027$ )。gp100陽性リンパ節を有する患者のパーセンテージは、T1(1mm)からT4(>4mm)腫瘍までごくわずかに増加した(T1: 45.8%、T2: 47.4%、T3: 54.9%、T4: 59.4%)が、これは、播種が優先的に早期に起こることを示唆している。Turnbull法およびWeibull関数を使用して(補足情報を参照されたい)、播種時の厚さを決定した。これらの分析により、リンパ系播種が全患者の63.5%に限定されること、および50%の事例において、がん細胞の拡散が、腫瘍が0.4mm(95%CI 0.04~0.75mm)の厚さに達する前に起こったことが示された(図1A)。まとめると、これらのデータは、約1/3のメラノーマが0.4mm未満の腫瘍厚さで40

10

20

20

30

40

50

リンパ系に播種し、約 1 / 3 が 0 . 4 mm 以上の厚さで播種し、約 1 / 3 がリンパ系に拡散することができないことを示している。

#### 【 0 0 7 2 】

次いで、どの腫瘍厚さで、播種したメラノーマ細胞が S L N 中でコロニーに増殖したかを調査した。早期播種（最初の到達）と比較した、定着を表す D C C D を確立するために、患者のリンパ節を二等分したものと比較した。全ての事例において、リンパ節を分割し、半分を組織病理学（構築を保持する）によって分析し、他方を分離後の g p 1 0 0 免疫細胞学（構築を破壊するが、定量化を可能にする；詳細については、Ulmer et al. (2014) PLoS Med. 11:e1001604 を参照されたい）によって分析した。次いで、D C C D を、対応する切片の組織形態学的外見と比較した。メラノーマ細胞が全てにおいて検出された場合、D C C D 1 0 0 を有する試料は、外部リンパ洞中のスポットされた単一細胞または細胞の小巣を示したが、D C C D > 1 0 0 で、メラノーマ細胞は通常、リンパ節の内部領域に拡張した（図 1 B）。このようにして、定着は、おそらく約 1 0 0 の D C C D で起こったが、より低い D C C D を有する試料は、コロニー増殖前にメラノーマ細胞を含む。コロニー形成のための定義として 1 0 0 の D C C D を使用して、定着したリンパ節を有する患者の腫瘍厚さの中央値は、播種時のものよりも 2 2 倍高いことがわかった（D C C D 1 0 0；図 1 C；8 . 9 mm；9 5 % C I 6 . 8 ~ 1 4 . 3 mm）。de novo での腫瘍播種のリスクは、腫瘍が増殖するにつれて着実に低下したが、de novo での定着のリスクは増大した（図 1 D）。

10

#### 【 0 0 7 3 】

20

#### [ 実施例 2 ]

##### 播種および生存

薄い T 1 腫瘍と厚い T 4 腫瘍との間の播種率のわずかな差異（1 3 . 6 %）が生存とどのように関連しているかを探査するために、5 年以上のフォローアップを有する 3 7 0 人（3 6 %）の患者について、どれくらい多くの患者が、4 9 ヶ月の中央フォローアップ期間（3 ~ 1 2 3 ヶ月）中に死亡したかを決定した。T 1 ステージのメラノーマの 3 8 / 8 3（4 6 %）がセンチネルリンパ節中に D C C を有していたが、ただ 1 人の患者が死亡し、以前の研究と一致していた（Balch et al. (2009), JCO 27, 6199-6206）；Leiter et al. (2004) JCO 22, 3660-3667）。対照的に、T 4 メラノーマを有する 4 7 / 1 3 3（3 5 %）人の患者が死亡した（図 1 E；9 年生存率は、T 1 については 8 8 . 9 % であり、T 4 については 4 5 . 9 % であった；p < 0 . 0 0 0 1、ログランク検定）。このようにして、播種と死亡に関して T 1 メラノーマと T 4 メラノーマの間に相違がある。

30

#### 【 0 0 7 4 】

30

この相違に対処するために、6 1 人の患者のサブセットにおける播種性メラノーマ細胞のゲノム進化を評価した。最も早期の疾患ステージにあるメラノーマ患者に焦点を合わせるために、臨床的に節陰性の疾患（触診および超音波によってリンパ節の関与がない）を有し、遠隔転移がない患者のみを含有させた。これらの患者から、分子分析のための試料を、入手可能性または D N A の品質に従って採取した。具体的には、ゲノムおよび機能分析にかける患者および細胞の選択基準は、( i ) g p 1 0 0 + D C C の単離の成功および全ゲノム増幅、( i i ) 包括的ゲノム分析（Polzer et al. (2014) EMBO Mol Med. 6:137 1-138）のための品質管理を通過した D C C 由来 D N A、ならびに( i i i ) 生存分析のための十分なフォローアップ時間であった。これらの患者の臨床ベースライン特性を、表 1 に提供する（臨床試料獲得に関するさらなる詳細については、図 9 を参照されたい）。これらの患者から、9 0 個の個々の細胞を取得し、その悪性起源を C G H によって確認した（図 2）。これらの D C C は、細胞あたり 1 から 5 2 までの大きな範囲のコピー数変化を示した（中央値 = 1 4；四分位範囲 = 1 4 . 8）。細胞あたりのゲノム獲得（中央値 = 9；範囲 = 0 ~ 3 9）は、喪失（中央値 3 . 5；範囲 = 0 ~ 2 1）よりも高頻度であることがわかった。

40

#### 【 0 0 7 5 】

40

#### [ 実施例 3 ]

50

### 原発腫瘍およびDCCの遺伝子系列

T1メラノーマとT4メラノーマとの転帰と関連する差異に対処するための標準的な手法は、原発腫瘍組織を使用する。原発腫瘍およびDCCは大まかには同一であると考えられるため、転移を開始するDCCの分子的特徴を原発腫瘍内で同定することができると仮定する。この仮定を試験するために、原発腫瘍およびその一致したDCCのゲノムプロファイルを調査した。

#### 【0076】

原発腫瘍を、レーザー顕微解剖（図10）によって単離し、可能な場合はいつでも、いくつかの領域を分析した。しかしながら、腎臓がんなどの他のがんと比較して（Gerlinger et al., (2012) *The New England journal of medicine* 366:883-892）、早期のメラノーマは非常に小さく、多くの場合、異なる領域に由来するサブクローンの評価を不可能にする。顕微解剖された原発腫瘍試料（n=23、19人の患者）およびマイクロマニピュレーターにより単離された単一のDCC（n=24、19人の患者）を、CGHによって分析した。メラノーマの厚さに関係なく、原発腫瘍と、一致したDCCとの間には顕著な差異があった。予想外にも、異なる個体に由来する原発腫瘍は、原発腫瘍とその一致したDCCの個々の対よりも一緒にになってより近くでクラスター化した（図3Aおよび図11）。原発腫瘍は、DCCよりも有意により多くの欠失を含有していた（図3B；p=0.003、マン-ホイットニーU検定）が、獲得の対応する差異は明らかに有意ではなかった（p=0.66、マン-ホイットニーU検定）。同じ原発腫瘍に由来するいくつかの領域が利用可能であった場合、ゲノム不均一性が見られたが、その対になったDCCとは別に一緒にになって依然としてクラスター化した（例えば、図3および図11中のT28、T30）。これらのデータは、ほとんどの欠失が起こる前にDCCが播種すること、および皮膚中で増殖する非関連メラノーマが同様の染色体喪失に集中することを示している。

10

20

30

#### 【0077】

BRAFおよびNRAS変異はメラノーマにおいて高頻度（それぞれ、平均で40%および21%の事例において）であるため（Platz et al., (2008) *Mol Oncol* 1:395-405）、これらの変異が原発腫瘍からDCCに伝達されるかどうかを調査した。両対立遺伝子（野生型および変異体）を、ヘテロ接合性BRAFおよびNRAS変異を有する単一の細胞から確実に回収することができた（図3C）。患者試料対において、BRAFは、DCC（15%；p=0.012、Fisherの直接確率検定；n=32人の患者；図3Dおよび図12）よりも原発腫瘍（34%）において高頻度に変異したが、NRAS変異については、有意差は観察されなかった（15%の原発腫瘍変異および11%のDCC；p=0.58；n=29人の患者）。これらの2つのがん遺伝子について、47%の事例において野生型の共有、16%の事例において変異状態の共有、および37%の事例において異なる変異状態（図3D）が見出された。原発腫瘍変異を有する患者のうち、一致したDCCのほとんどはこれらの変異を共有していないかった（BRAFについては3/11およびNRASについては3/6において共有されていた）が、これは、それらが原発部位内での固定前に播種していたことを示している。

40

#### 【0078】

BRAFおよびNRAS変異は、メラノーマを発生させ（Shain, et al., (2015) *The New England Journal of Medicine* 373, 1926-1936）、結果として、完全にクローニングであることが示唆されている。したがって、本発明者らは、BRAFまたはNRAS変異体gp100<sup>+</sup>DCCを有する患者に由来する個々のDCCを配列決定し、1より多いDCCを単離し、全ての同胞種細胞が変異を有するかどうかを試験した。本発明者らは、gp100<sup>+</sup>DCCが、それぞれ、BRAFおよびNRAS変異について45%および80%において異種性であることを見出した（図3E）。検出マーカーgp100の選択効果を除外するために、本発明者らはさらなるMCSP<sup>+</sup>メラノーマDCCを分析し、同様の結果を得た。これらの知見を、対照細胞と比較したところ（図3C）、予想された対立遺伝子変異体は有意数のgp100<sup>+</sup>DCC（BRAF（n=43個の細胞）：片側Fisherの直接確率検定p=0.02；NRAS（n=44）：p<0.0001）およびM

50

$C S P^+ D C C$  ( $B R A F$  ( $n = 61$ ) :  $p = 0.003$ ;  $N R A S$  ( $n = 30$ ) :  $p = 0.02$ )において検出されないことがわかった。最後に、原発腫瘍 -  $D C C$  - 転移トリプレットまたは原発腫瘍 - 転移の対または $D C C$  - 転移の対の変異状態を比較した場合、 $B R A F / N R A S$  変異を有する、および有さない $D C C$  が明らかな転移を形成することができることが見出された(図3F)。

#### 【0079】

まとめるに、コピー数変化と標的変異分析の両方により、原発メラノーマとその対になった $D C C$  が遺伝的に大きく異なり、早期の進化的分岐を暗示することが示された。

#### 【0080】

#### [実施例4]

10

##### 早期リンパ系到達時の $D C C$ の分子的特徴

厚いメラノーマに由来する $D C C$  は、薄いメラノーマに由来する $D C C$  中には存在しない、高いTステージの予後関連性の原因となる特徴的变化を有することができた。したがって、到達時間を表すものとしての明らかなリンパ節定着およびそのゲノムプロファイルを調査する前に、焦点を $D C C$  に設定した。

#### 【0081】

コロニー形成は、 $D C C D > 100$ で明確に見えるようになった(図1B)。到達時間、すなわち、明確にコロニー形成前を表す $D C C D$ を決定するために、100未満の $D C C D$  値を有する全ての患者試料を試験して、「厚い」(試験した閾値によって定義される)に由来する $D C C$  に特徴的な遺伝子変化を同定することができる厚さ閾値を定義した。換言すれば、1~99の範囲の試験した $D C C D$ で利用可能な全試料について、起源を特徴とする2つの群に $D C C$  を分割することができるゲノム異常に關して検索したところ、任意の腫瘍厚さについて統計的差異( $p > 0.05$ 、Fisherの直接確率検定)を見出すことができなかつた。 $24$  の $D C C D$  および $1.8\text{ mm}$  の厚さ(図4A、上)について最も低い $p$  値( $p = 0.051$ ;  $18q21-23$  の喪失; 図4A、図13)が得られたが、これは、最大 $24$  の $D C C D$  が、早期に到達する $D C C$  を規定し、 $1.8\text{ mm}$  が、メラノーマ細胞が原発部位内で $18q21-23$  の喪失を獲得した厚さを示唆している。しかしながら、生存率は $18q21-23$  の喪失と相關していなかつた(図4B)が、これは、この変化が生存率に対するTステージの影響と関連しないことを示している。また、コピー数変化(CNA)の数が、厚いおよび薄いメラノーマから到達する $D C C$  間で異なることもわかつた(図4C)。

20

#### 【0082】

#### [実施例5]

30

##### 定着する $D C C$ の分子的特徴

これらのデータは、播種が後に起こり、高い腫瘍厚さで獲得された遺伝子異常が $D C C$  をより転移性にするモデルと一致させるのが難しい。したがって、SLNに早期に播種する $D C C$  は遺伝的に「未熟」であり、転移性コロニー形成中にさらなる遺伝子変化を獲得する可能性を考慮した。このようにして、センチネルリンパ節中で未熟な $D C C$  からコロニー形成性 $D C C$  への移行を示す遺伝子変化を調査した。 $D C C D$   $D C C$  をその遺伝子変化に従って2つの群に分類することができることが分析された。最も高い有意性( $p < 0.001$ 、Fisherの直接確率検定)は、 $77 D C C D$   $95$ (図5A)について達成され、 $100$  の $D C C D$  に近く、定着は組織病理学的分析において明らかとなつた(図1B)。 $D C C$  は、メラノーマ抑制遺伝子 $p16$ (図5B)を含む、 $B R A F$  変異、染色体 $9p11-13$  の喪失および染色体 $9p21-24$  の喪失を含む3つの遺伝子変化を獲得した。顕著には、 $B R A F$  変異は $D C C D < 95$ を有する細胞の $1/43$ (2%)および $D C C D = 95$ の場合の細胞の $20/47$ (42%)において観察された(図5C;  $p < 0.0001$ )。2つのさらなる有意な分割が観察された： $D C C D = 3$ で、染色体 $Xq25-28$  を含み、 $D C C D = 19$ で、 $7q21-36$ を含む。 $Xq25-28$  は、 $D C C D < 3$ を有する患者に由来する $D C C$  中で、非指向的様式で、すなわち、獲得または喪失で頻繁に変化した(図5C)が、 $D C C D = 19$ を有する試料は、METがん遺

40

50

伝子を有する 7 q 2 1 - 3 6 の増幅（獲得）（図 5 B、C）を富化した。

#### 【0083】

遺伝子変化の獲得は細胞分裂中に起こることが多いため、D C C D 1 0 0 および D C C D > 1 0 0 を有する患者に由来するセンチネルリンパ節 D C C 中で、すなわち、コロニー形成の前後で、増殖マーカー K i - 6 7 に関する標識化指数を比較した（図 5 D）。M I B - 1（抗 K i - 6 7）および H M B 4 5（抗 g p 1 0 0）の二重染色は成功しなかつたため、g p 1 0 0 を、メラノーマ関連マーカー M e l a n A で置き換えた（Ulmer et al. (2005), Clin Cancer Res. 11, 5425-5432）。K i - 6 7 発現を、合計で 9 3 7 の細胞の評価を含む、D C C D 1 0 0 を有する 3 7 のリンパ節（A 群）および D C C D > 1 0 0 を有する 2 1 のリンパ節（B 群）において評価した。A 群では、1 1 . 4 % の細胞が明確に有糸分裂性であったが、B 群では、2 2 . 0 % が分裂していた（p = 0 . 0 0 0 5；F i s h e r の直接確率検定、図 5 D）。このようにして、1 1 % の基本増殖率は、最初は遺伝子変化の獲得を可能にし、その後、増殖を加速する。  
10

#### 【0084】

##### [実施例 6]

###### 定着関連変化、異種移植および患者生存

リンパ節コロニーを形成するがん細胞は、変化の特徴的シグネチャーを示した。D C C が腫瘍を発生させる能力を有するかどうかを試験するために、それらを N S G マウスに移植した。希少なメラノーマ細胞の異種移植のための第 1 の条件を評価した（Quintana (2008) Nature 456, 593-598）。細胞株の細胞および患者の D C C については、2 つの手法を比較した：メラノスフィア条件下での簡単な培養後の D C C 群の直接移植および D C C - スフィアの移植。メラノスフィアは、単一細胞群よりも頻繁に、免疫欠損 N S G マウスにおいて腫瘍を形成した（p < 0 . 0 0 0 1、ログランク検定；図 6 A、B および図 14）。適用された条件は、わずか 1 個の移植されたスフィア（図 6 B）または 7 の群サイズの D C C （図 6 C）からの増殖を支援した。したがって、S L N からの D C C の腫瘍を発生させる能力を、D C C D 1 0 0 から D C C D > 1 0 0 を有するものまでと比較した場合、D C C D 1 0 0 を有する試料に由来するスフィアまたは D C C D > 1 0 0 を有する試料に由来する単一の D C C のスフィアまたは群を移植した。注入部位あたりのスフィアの数は、D C C D 1 0 0 と > 1 0 0 の両方について類似していた（p = 0 . 2 7、マン - ホイットニー U 検定；図 6 C）。顯著には、D C C D > 1 0 0 は異種移植の成功を予測する（9 / 3 6 の移植が 4 / 7 の患者において腫瘍を生じた；図 6 C）が、D C C D 1 0 0 を有する試料は腫瘍を決して確立しない（0 / 5 の患者において 0 / 1 4 の注射部位）ことが見出された。遺伝子フィンガープリントにより、全事例において患者起源が確認された（図 14）。さらに、全ての患者由来異種移植片において、B R A F 変異、9 p 1 1 - 1 3 もしくは 9 p 2 1 - 2 4 の喪失、または 7 q 2 1 - 3 6 の獲得が存在していた（図 6 D）。1 つの事例において、増殖の成功は N R A S 変異の存在と関連していた。  
20  
30

#### 【0085】

最後に、S L N におけるコロニー形成またはマウスにおける腫瘍形成と関連する遺伝子異常が、臨床転帰と関連するかどうかを調査した。このために、本発明者らは、単一の D C C における B R A F 変異、9 p 1 1 - 1 3 / 9 p 2 1 - 2 4 の喪失、7 q 2 1 - 3 6 の獲得、または N R A S 変異が、死亡のリスクを増大させるかどうかを試験した。実際、定着と生着シグネチャーとのこの組合せは、メラノーマで死亡する患者の 8 / 9 (8 9 %) に存在し（p = 0 . 0 4 8、ログランク検定；図 6 E）、B R A F 変異が最も関連する単一指標であった（p = 0 . 0 3 1）。  
40

#### 【0086】

##### [実施例 7]

###### 免疫細胞微小環境の定着関連変化

リンパ節懸濁液のフローサイトメトリー分析により、抗原を受けた C D 8 リンパ球のパーセンテージと、D C C D との相関（Spearman の  $\rho = 0 . 5 8$ 、 $p < 0 . 0 0 2$ ）が示され、これは、これは、腫瘍細胞と関連する C D 8 T 細胞応答の存在を示している（図 1  
50

5 A)。しかしながら、対応するリンパ節の D C C D に関する C D 8 T 細胞の表現型の詳細分析により、D C C D 2 0 0 0 で P D - 1 高発現 C D 8 T 細胞のパーセンテージの有意な増加が示された(図 15 B; p < 0.0004, F i s h e r の直接確率検定、n = 50、メラノーマ患者由来リンパ節、n = 6、健康な対照に由来する対照リンパ節)。P D - 1 は、T 細胞活性化に応答して T 細胞上で誘導されるが、一度、免疫応答が抗原を排除したら、下方調節される。抗原が消滅しない場合、慢性ウイルス感染と同様、P D - 1 は下方調節されず、T 細胞は段階的様式でエフェクター機能を失う: I L - 2 産生、高い増殖能力および細胞溶解活性が最初に失われ、次いで、サイトカイン産生が減じられる。これに関して、高レベルの P D - 1 を発現する C D 8 T 細胞は、最終的に消耗した T 細胞と考えられる。これらの細胞は、消耗した T 細胞の別のマーカーである T i m - 3 (図 15 B) を同時に発現し、サイトカイン産生の能力が減じられている。さらに、I F N g および T N F を産生することができる細胞のパーセンテージは、P D - 1 を中間に発現する集団と比較して P D - 1 高発現集団において低下していたが、これは、P D - 1 高発現細胞が消耗した C D 8 T 細胞であることを示している(図 15 C)。26人のメラノーマ患者に由来する50のリンパ節および6人の非腫瘍患者に由来する6のリンパ節の分析により、I F N g および T N F に関するスコアが D C C D 2 0 0 0 で有意に減少することが示された(図 5 D; 両方とも p < 0.0001, F i s h e r の直接確率検定)。I F N g または T N F スコアは、P D - 1 中間 C D 8 T 細胞に対するサイトカイン産生 P D - 1 高 C D 8 T 細胞のパーセンテージの比を掛けた、P D - 1 高 C D 8 T 細胞に対する P D - 1 中間および陰性 C D 8 T 細胞のパーセンテージの比と、P D - 1 中間発現細胞の中央蛍光強度に対するサイトカイン発現 P D - 1 高 C D 8 T 細胞の中央サイトカイン蛍光強度の比とを組み合わせたものである。スコアの低下は、消耗した C D 8 T 細胞数の増加および結果として、C D 8 T 細胞機能の喪失を示す。D C C D < 2 0 0 0 を有する同じ患者のいくつかのリンパ節は消耗した C D 8 T 細胞のこの増加を示さなかつたため、P D - 1 高 C D 8 T 細胞の存在は、リンパ節中の D C C の局所数と直接関連していた(図 15 E)。C D 8 T 細胞機能の喪失に加えて、抗腫瘍免疫応答の局所機能損傷は、動員レベルで、免疫抑制性未熟 M D S C (図 16 A) および細胞溶解性 N K 細胞機能の喪失(図 16 B)を反映していた。具体的には、D C C D 2 0 0 0 を有するリンパ節において、有意に増加したパーセンテージの未熟 M D S C が観察された(図 16 A; p < 0.007, F i s h e r の直接確率検定、n = 39、メラノーマ患者由来リンパ節、n = 2、健康な対照に由来する対照リンパ節)。C D 8 T 細胞機能の喪失に関しては、非細胞溶解性 C D 5 6 b r i g h t の細胞溶解性 C D 5 6 d i m 細胞に対する比の低下によって明らかな細胞溶解性 N K 細胞機能の喪失は、1人の患者のいくつかのリンパ節の対照比較によって示されたように、対応するリンパ節における局所 D C C D と直接関連していた。まとめると、これらのデータは、C D 8 T 細胞および N K 細胞機能の観察された変化ならびに M D S C の動員が局所腫瘍細胞量に対する局所反応と似ていることを示している。

#### 【 0 0 8 7 】

##### 方法

##### 患者

本発明者らは、厚さとメラノーマ拡散との関係を説明するために、センチネルリンパ節生検を受けた臨床的に節陰性の(触診および超音波によって評価される)メラノーマを有する T u b i n g e n 出身の 1 0 2 7 人のメラノーマ患者からのデータを使用した(Ulmer (2014) PLoS Med 11, e1001604)。分子試験および B R A F / N R A S 変異生存分析は、T u b i n g e n および R e g e n s b u r g で募集された患者を含んでいた。書面によるインフォームドコンセントを、全患者から取得した。試験は、U n i v e r s i t i e s T u b i n g e n (倫理投票番号 5 / 9 9 ) および R e g e n s b u r g (07-079) の倫理委員会によって認可された。

#### 【 0 0 8 8 】

微小環境変化の評価のために、完全なリンパ節郭清を受けた R e g e n s b u r g 出身

10

20

30

40

50

患者からデータを取得した。

【0089】

細胞株

メラノーマ細胞株 A 375 および MelHo を使用した (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures から取得した)。MelHo は、患者の起源が不明なため、誤って同定された細胞株に関する ICLAC データベースに列挙されているが、この細胞株はエクソン 15 の変異 c 1799T > A (BRAF) について異種であるため、これを使用した。細胞株の起源を、ショートタンデムリピート (STR) 分析 (Cell-ID (商標)、Promega) によって検証した。細胞株 70-61 および 102-4 は、DCC 由来異種移植片から開発され、それぞれ、Sanger の配列決定 (Sequiseve、Vatersstetten, Germany) により決定された場合、エクソン 15 変異 c 1799T > A (BRAF) およびエクソン 3 変異 c 181C > A (NRAS) が変異している。その患者起源を、ショートタンデムリピート (STR) 分析 (Cell-ID (商標)、Promega) により検証し、そのメラノーマ起源をヒト病理医によって検証し、その異常遺伝子型を CGH によって検証した。A 375 および MelHo を、DMEM、10% FCS、0.5 × Pen/Strep 中で維持し、102-4 および 70-61 を RPMI、10% FCS、0.5 × Pen/Strep 中で維持した。全細胞株を、マイコプラズマについて日常的に試験し、陰性であることがわかった。

10

20

30

40

50

【0090】

対照

対照リンパ節 (n = 70) を、60人の非メラノーマ患者から取得し（非悪性状態に由来する 47 の皮膚 - 流入領域リンパ節、非メラノーマ皮膚がん患者に由来する 6 のセンチネルリンパ節、および非小細胞肺がん患者に由来する 17 のリンパ節）、分離し、染色し、メラノーマ由来リンパ節と同一に評価した。 $2 \times 10^6$  個のリンパ球をスクリーニングした後、対照リンパ節状態を観察者に示し、メラノーマ患者試料と違って、完了まで試料のスクリーニングを継続した。

【0091】

リンパ節分離および免疫細胞学的分析

非固定リンパ節組織を使用してセンチネルリンパ節生検後に定量的免疫細胞学的分析を記載のように実施した (Ulmer (2014) PLoS Med 11, e1001604 and Ulmer (2005) Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 11, 5425-5432)。簡単に述べると、リンパ系組織を 1 mm の小片に切断し、回転ナイフ (DAKO Medi machine、DAKO) により単一細胞懸濁液に機械的に分離し、HBSS (Life Technologies, Heidelberg, Germany) を用いて洗浄し、60% Percoll 溶液 (Amersham, Uppsala, Sweden) から構成される密度勾配上で遠心分離した。細胞を、Neubauer 計測チャンバを使用して計数した。次いで、スライドあたり、中間期に由来する  $10^6$  個の細胞を、1 mL の PBS の容量中、接着スライド (Menzel、Braunschweig, Germany) 上に与えた。1 時間沈降させた後、スライドを一晩乾燥させた。一次抗体としての gp 100 に対する一次抗体 (HMB45、DAKO) および基質としての 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 / NBT (DAKO) を使用するアルカリホスファターゼ / 抗アルカリホスファターゼ法を用いて免疫細胞学的染色を実行したところ、青色の反応生成物が得られた。リンパ節が少なくとも 1 個の gp 100 陽性細胞を含有していた場合、それを gp 100 陽性と定義した。リンパ球 100 万個あたりの陽性細胞の数を記録した。全ゲノム增幅のための細胞単離まで、PBS 中、4 度最大 4 日間、陽性試料を保存した。生きている DCC の単離のために、単一細胞を、製造業者の推奨に従って抗ヒト M-CSF (メラノーマ硫酸コンドロイチンプロテオグリカン、クローン 9.2.27、BD Pharmingen) で染色し、間接免疫蛍光 (

ヤギ抗マウス - Cy3、Jackson)によって検出した。洗浄後、MCSPI+細胞を、マイクロマニピュレーター(Eppendorf PatchMan NP2)を使用して単離し、移植した。

#### 【0092】

##### 微小環境変化のフローサイトメトリー評価

分離したリンパ節の単一細胞を、生きた／死んだ細胞の識別のために生存染料eFluor 780(ebioscience)で染色した。非特異的結合を減少させるために、単一細胞懸濁液をPBS/10%AB-血清(Bio-Rad)と共に4で10分インキュベートした後、4で30分、蛍光標識された抗体で染色し、PBS/2%FCS/0.01%NaN<sub>3</sub>で2回洗浄し、Fixation Buffer(Biolegend)で固定した。細胞を、FACSDIVA 5.03ソフトウェアを装備したLSR II装置(BD Bioscience)上で分析し、データを、FlowJo 8.8.6(Treestar)を用いて分析した。細胞を、以下の抗体(Biolegend)を使用して染色した。MDSCの同定のため:CD45(HI30)、CD3(HIT3a)、CD19(HIB19)、CD56(HDC56)、HLA-DR(L243)、CD33(WM53)、CD11b(ICRF44)。NK細胞の同定のため:CD45(HI30)、CD3(Sk7)、CD56(HDC56)、CD161(HP-3610)。CD8 T細胞の同定のため:CD45(HI30)、CD3(Sk7)、CD8(HIT8a)、CD45RA(HI100)、CCR7(G043H7)、PD-1(EH12.2H7)、Tim-3(F38-2E3)、TNF(Mab11)、IFNg(4S.B3)。

#### 【0093】

IFNgおよびTNF産生の測定のために、分離したリンパ節の単一細胞を、1×Brefeldin A(Biolegend)の存在下、PMA(10ng/ml、Sigma)およびイオノフォア(1μg/ml、Sigma)で4時間刺激した。分離したリンパ節の単一細胞を、生きた／死んだ細胞の識別のために生存染料eFluor 780(ebioscience)を用いて染色した。非特異的結合を減少させるために、単一細胞懸濁液を、PBS/10%AB-血清(Bio-Rad)と共に4で10分インキュベートした後、4で30分、蛍光標識された抗体で染色し、PBS/2%FCS/0.01%NaN<sub>3</sub>で2回洗浄し、それぞれ、Fixation Buffer(Biolegend)およびPerm Wash Buffer(Biolegend)で固定および透過処理した。非特異的結合を減少させるために、単一細胞懸濁液をPBS/10%AB-血清と共に4で10分、再度インキュベートした後、4で30分、Perm Wash Buffer中のIFNgおよびTNFについて蛍光標識された抗体で染色し、Perm Wash Bufferで2回洗浄した。

#### 【0094】

##### 単一細胞移植とスフィア移植との比較

分離したセンチネルリンパ節の単一細胞を、6cmのポリ-HEMA(12mg/ml、Sigma-Aldrich)被覆細胞培養プレート(Sigma-Aldrich)中に、200,000個の生細胞/mlの密度で播種した。細胞を、0.5×Pen/Strep(PAN Biotech GmbH)、0.5%BSA(VWR-Biochemical)、10μg/mlインスリン(Sigma-Aldrich)、10nM HEPES(Sigma-Aldrich)、1xB27(Life Technology GmbH)、10ng/mlEGF(Sigma-Aldrich)および10ng/mlbFGF(Sigma-Aldrich)、4μg/mlヘパリン(Sigma-Aldrich)、5ng/mlGRO-(R&D Systems)、20ng/mlHIL-6(S.Rose-Johnにより進呈された)および0.2%メチルセルロース(Sigma-Aldrich)を添加した、無血清DMEM/Ham's F12基本培地(PAN Biotech GmbH)中で増殖させた。培養物を37および5%CO<sub>2</sub>および7%O<sub>2</sub>でインキュベートした。スフィアの増殖を、毎週

モニタリングした。メラノーマ細胞株（D M E M、10% F C S、0.5×P e n / S t r e p 中で維持したM e l H o、A 3 7 5）からスフィアを生成するために、単一細胞を、ポリ-H E M A被覆細胞培養プレート上、センチネルリンパ節細胞と同じであるが、H I L - 6 およびG R O - を含まない培地中に、1 0 , 0 0 0 個の生細胞 / m L の密度で播種した。スフィアを手動で単離した。

#### 【0095】

##### 異種移植

分離したセンチネルリンパ節に由来するスフィアまたはM C S P<sup>+</sup>細胞を、マイクロピペットまたはマイクロマニピュレーターを使用して収集し、マイクロウェル（容量10～15 μl、T e r a s a k i）中にプールした。マイクロウェルを、R Tで一晩、12 mg / m Lのポリ-H E M A（S i g m a - A l d r i c h）で予備コーティングした。単一細胞を、以前に公開されたように（Quintana (2008) N a t u r e 456, 593-598）、30 μlの最終容量および25%高濃度マトリゲル（B D B i o s c i e n c e s）の中で移植した。細胞を、N O D . C g - P r k d c s c i d I L 2 r<sup>m W j 1 / s z</sup> (N S G、6～8週齢、オスおよびメス）中に、インスリン注射筒（M i c r o f i n e、29 G、U - 5 0、B D B i o s c i e n c e s）を用いて皮下注射した。マウスを、J a c k s o n L a b o r a t o r y から購入し、特定の病原体を含まない条件下で、酸性水および食餌を自由裁量で、U n i v e r s i t y o f R e g e n s b u r g、G e r m a n y の研究動物施設で維持した。全ての認可された実験動物手順を、ドイツ連邦および州の規則に従って行った。マウスを、注射部位で毎週触診した。異種移植のメラノーマ起源を、ヒト病理医によって検証し、患者起源をショートタンデムリピート（S T R）分析（C e l l - I D（商標）、P r o m e g a）を使用して認証した。試料の全ゲノム増殖（Klein et. al. 1999）のため、M s e Iによる制限消化を含むS T R分析の前に、S T R遺伝子座T H 0 1、D 2 1 S 1 1、D 5 S 8 1 8、D 1 3 S 3 1 7、D 1 6 S 5 3 8 およびv W Aのみを、検出のために使用することができる。増幅された断片を、3 1 0 0 - A v a n t G e n e t i c A n a l y z e r (A p p l i e d B i o s y s t e m s)を使用して検出した。断片サイズを、P r o m e g aにより提供されるC e l l (商標) I D A l l e l i c L a d d e r およびC e l l (商標) I D B i n s 1 . 0 を使用して手動で決定した。

#### 【0096】

##### D C C の K i - 6 7 標識

免疫蛍光染色のために、細胞を、4で一晩、M e l a n A / M A R T - 1 (E p i t o m i c s)のウサギモノクローナル抗体、希釈率1 : 1 0 0 およびK i - 6 7 (D A K OのM I B - 1マウスモノクローナル抗体、1 : 5 0)に対する一次抗体と共にインキュベートした。二次抗体として、本発明者らは、A l e x a F l u o r 5 5 5 (I n v i t r o g e n、ロバ抗ウサギ抗体)およびA l e x a F l u o r 4 8 8 (I n v i t r o g e n、ロバ抗マウス抗体)を使用した。核をD A P I (青色)で、M e l a n AをA l e x a F l u o r 5 5 5 (赤色)で、K i - 6 7をA l e x a F l u o r 4 8 8 (緑色)で染色した。対抗染色を、封入剤（V e c t o r、V e c t a s h i e l d）中の4' d - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I) で実施した。

#### 【0097】

##### 原発腫瘍領域のD N A抽出および顕微解剖

病理医（P . R .）による腫瘍領域の強調後、パラフィン包埋された腫瘍ブロックからD N Aを抽出した。P A L M M i c r o b e a mシス템（B e r n r i e d）を、顕微解剖および捕捉のために使用した。D N Aを、以前に記載されたように（Klein (2002) Lancet 360, 683-689 ; Klein (2002) J Exp Med 196, 359-368）、プロセッシングした。

#### 【0098】

##### 全ゲノム増幅および単一細胞比較ゲノムハイブリダイゼーション

全ゲノム増幅（W G A）を、Klein (2002) Lancet 360, 683-689 ; Klein (2002) J Exp 50

Med 196, 359-368およびKlein (1999) PNAS 96, 4494-4499によって以前に記載されたように実施した。この方法は、キット (Amplicon、Silicon Biosystems) として現在商業的に入手可能である。

#### 【0099】

##### 単一細胞比較ゲノムハイブリダイゼーション

単一細胞CGHを、Czyz (2014) PLoS one 9, e85907; Klein (2002) Lancet 360, 683-689; Klein (2002) J Exp Med 196, 359-368によって以前に記載されたように実施した。ほとんどの試料について、本発明者らは、染色体CGHが単一細胞について確立された非常にロバストな方法であるため、それを使用した。本発明者らは、両方の方法を慎重に比較した。本発明者らは、同じ試料に適用した場合、アレイCGHと染色体CGHとの間に良好な一致を見出した (Czyz et al., 2014を参照されたい)。aCGHはより多くの変化 (主に<10Mbの異常について) を検出することができるが、aCGHおよびcCGHに関する全体的な写真は非常に類似している。本発明者らがaCGHを使用した事例については、解像度をcCGHのものに調整した。

10

#### 【0100】

##### BRAFおよびNRASの変異分析

NRASおよびBRAF遺伝子中の変異を、WGA試料からの遺伝子特異的増幅の後にSangerの配列決定 (Sequiseerve、Vaterstetten、Germany) を使用して検出した。BRAFエクソン15分析のためのプライマーは以下の通りであった：コドン600の変異 (V600E、以前はV599Eと呼ばれていた；V600K、V600R) を包含する、フォワード5'-TCCAGACAACTGTTCAAACTGおよびリバース5'-CTCTTCATAAATGCTTGCTCTG。サイクリング温度は、94 (2分)、60 (30秒) および72 (2分) で1サイクル；94 (15秒)、60 (30秒) および72 (20秒) で14サイクル；94 (15秒)、60 (30秒) および72 (30秒) で24サイクルならびに72 (2分) で追加の最終伸長ステップに設定した。NRASエクソン3コドン61分析のためのPCRプライマーは、コドン61の共通変異：Q61KおよびQ61Rを包含する、フォワード5'-GGCAAATACACAGAGGAAAGCおよびリバース5'-ACCCTCAGGATTCTTACAGAであった。PCRサイクラーを、94 (2分)、63 (30秒) および72 (2分) で1サイクル；94 (15秒)、63 (30秒) および72 (30秒) で24サイクルならびに72 (2分) で追加の最終伸長ステップに設定した。PCR産物を、配列決定のためにSequiseerve、Vatterstettenに送った。変異アッセイを、既知のエクソン15変異c1799T>A (BRAF) およびエクソン3変異c181C>A (NRAS) を含む細胞株の単一細胞またはゲノムDNAを使用して確立した。変異体BRAF対立遺伝子は、全ての分析された単一細胞にわたって検出された配列の62% (70-61)、84% (Me1Ho)において検出され、バルクゲノムDNA中では61% (70-61) および86% (Me1Ho)において検出された。変異NRAS対立遺伝子は、全ての単一細胞の59% およびバルクゲノムDNAの46%に存在していた。原発腫瘍のいくつかの領域を顕微解剖するか、またはいくつかのDCCを単離した場合、領域またはDCCの1つがBRAFまたはNRAS変異を有していた場合、原発腫瘍またはDCCを陽性と呼んだ。

20

30

40

#### 【0101】

##### 統計分析

別途記述しない限り、統計的有意性を、 $p < 0.05$ について仮定し、全ての検定を両側で実施した。

#### 【0102】

##### 腫瘍細胞が播種する時の厚さ

Turnbullの方法を使用して、本発明者らは、全メラノーマの42.3%が0.4mmの厚さに達する前に播種していたと決定した (図1B)。腫瘍の厚さに關係なく、

50

播種はメラノーマの 63.5% に限定されていた。100%未満の上限を有する改変 Weibull モデル（図 1B）は、63.5%（95%CI は 53.5 ~ 73.4%）の漸近線を予測し、播種する腫瘍の 50% が 0.4 mm（95%CI は 0.04 ~ 0.75 mm）の前に拡散していたことを示した。

#### 【0103】

腫瘍の厚さの関数としての播種および定着腫瘍の比率を決定するために、間隔打ち切りデータに関する Turnbull (42) の反復法に従って最大尤度によってデータを非パラメータ的に適合させた。どの腫瘍の厚さで事象が起こったか、または起こるであろうかは未知であるため、全データを左側または右側で打ち切る。播種について、得られた推定値を、播種しない患者の画分を用いる Weibull 分布によって最大尤度法を用いて適合させて、播種する腫瘍の漸近比率および播種する腫瘍の厚さ中央値に関する解釈可能なパラメータ推定値を得る。

10

#### 【0104】

##### DCC が定着する時の腫瘍の厚さ

525人のDCC陽性患者のうち、DCCD > 100 を有する試料数は、8.9 mm の中央値（95%CI は 6.8 ~ 14.3 mm）を有する、すなわち、播種時の厚さ中央値よりも 2.2 倍高い中央値を有する Weibull の累積分布関数として、腫瘍の厚さと共に増加した（図 1C）。定着について、得られた推定値を、Weibull 分布によって適合させる。Weibull 分布に関する明示式を使用して、ハザード比を算出した。ハザード関数は、事象がまだ起こっていない腫瘍に関する、事象（播種、定着）に関する単位厚さあたりの瞬間リスクを記載するものである。例えば、mmあたり 1 のハザード比（mmあたり 0.2）は、腫瘍が、事象が起こるためにには平均で 1 mm（それぞれ、5 mm）増殖する必要があることを示している。

20

#### 【0105】

##### 原発腫瘍および DCC の比較

原発腫瘍と DCC との間の獲得および喪失の頻度統計値を、マン - ホイットニー U 検定を用いて決定した。原発腫瘍と DCC の対における BRAF / NRAS 変異に関する統計的有意性を、Fisher の直接確率検定を用いて決定した。

30

#### 【0106】

##### 変異パターンの同定

原発腫瘍と DCC との間、薄いメラノーマと厚いメラノーマおよび低い DCCD と高い DCCD を有する患者に由来する DCC、ならびに BRAF / NRAS 変異を有する、および有さない患者に由来する DCC を識別する変異パターンを、Fisher の直接確率検定によって同定した。十分なクラス識別を可能にする十分に高い交差サンプル標準偏差 (> 0.25) を有する遺伝子座のみを考慮した。図 2A において、原発腫瘍 / DCC クラス標識を担わない試料間の最大分散に関して 10 の最も可変的な遺伝子座のみを含有させた。複数試験補正を、Benjamini および Hochberg (FDR) に従って誘導した。

#### 【0107】

##### 識別変異の同定

重要な変化が原発腫瘍内で獲得された可能性がある厚さを同定するために、本発明者らは、DCCD 100 を有する試料の DCC を、観察された異なる厚さ値に従って 2 つの群に分割し、これらの群にわたって非無作為な分布を明確に示す、すなわち、低い Fisher の検定の p 値をもたらすゲノム変化を同定した。低い p 値と関連する DCCD 閾値および厚さ閾値は、原発腫瘍サイズおよびリンパ節への直接播種を容易にするゲノム変化を示し得る。

40

#### 【0108】

本発明者らは、100 未満の全ての DCCD 閾値を試験して、定着前の DCC の集団を定義し、DCCD 限界 19、24、32 および 95 に関する特定の厚さ閾値の統計的差異に関する証拠を発見した；しかしながら、いずれも 5 % 有意性に達しなかった。

50

**【 0 1 0 9 】**

同様の手法を採用して、センチネルリンパ節における早期 D C C からコロニー形成性 D C C への移行を示す限界 D C C D 閾値および遺伝子変化を決定した。本発明者らは、どの D C C D で、それらが D C C を 2 つの群に分割するかを全ての遺伝子領域について求めた。次いで、この D C C D は、特定の変化を含む、および含まない D C C を分離し、疾患進行にとって重要な変化が獲得された細胞の数を示す。

**【 0 1 1 0 】**

試料サイズに関する結果のロバスト性を、分析から 2 つの細胞を体系的に排除することによって見積もった（全事例の一覧を用いるサブサンプリング）。対応する調整された p 値分布を、カーネル密度平滑化し、2 D でプロットした。階層的クラスター分析を、ユークリッド距離および完全連結を使用して実施した。分析を、R (<http://www.R-project.org>) または JMP (<http://www.jmp.com>) を使用して行った。  
10

**【 0 1 1 1 】****生存分析**

異種移植片の全生存統計値および無腫瘍時間を、ログランク検定 (JMP、Windows 用 IBM SPSS Statistics 20 または OSX 用 GraphPad Prism 6.0 ソフトウェア) を使用して算出した。

**【 0 1 1 2 】****結果**

本研究は、早期全身がんの拡散における異所性進化を説明する説得力のある分子モデルを提供する。ヒトのがんの転移性播種が起こる腫瘍の程度が初めて報告される；それは、腫瘍の増殖速度から推察されるよりもむしろ、D C C の高感度の直接検出に基づくものである (Engel (2003) European journal of cancer 39, 1794-1806; Friberg (1997) Journal of surgical oncology 65, 284-297; および Yachida (2010) Nature 467, 1114-1117)。播種性メラノーマの厚さ中央値は、0.4 mm (95% CI は 0.04 ~ 0.75 mm) であり、以前に考えられていたものよりもはるかに早かった。しかしながら、T1 メラノーマの 9 年死亡率は 11% であり、これは、このステージでの播種率 (46%) よりもはるかに低かったが、T4 メラノーマにおける播種率および死亡率は類似していた (59% 対 54%)。この観察は、播種は早期に起こり得るが、致死性の転移性疾患を生成するにはさらなる因子が必要であることを示している。  
20

**【 0 1 1 3 】**

薄いメラノーマの播種率と死亡率との相違に対処するために、腫瘍の厚さとは無関係に C N A について明確に異なる、原発腫瘍および一致した D C C を比較した。原発腫瘍は、染色体物質の示差的喪失を示したが、これは、これらの喪失が起こる前に D C C が播種したこと強く示唆している。この結論は、使用される技術、すなわち、次世代配列決定 (NGS) と比較した C G H の潜在的な限界によって影響されなかった。広範囲の対照 (図 3C および図 8) が、適用された単一細胞技術が、無作為対立遺伝子脱落の傾向がある単一細胞のための NGS 手法 (Lohr (2014) Nature biotechnology 32, 479-484; Ni (2013) PNAS 110, 21083-21088) よりもはるかに高い信頼性およびロバスト性を有する臨床試料 (Polzer (2014) EMBO molecular medicine 6, 1371-1386) から細胞の核型および遺伝子型を取り戻すことを証明する。このようにして、特定の C N A および特定の変異 (以下で考察される B R A F など) の前に播種したメラノーマ細胞が、いくつかの異常 (共有または非共有の) が本発明者らの手法によって依然として検出されないという見解とは主に関係なく獲得されることが示された。C N A とは対照的に良性病変においてもよく検出される点変異 (Bauer (2006) Dermatologic therapy 19, 40-49; Shain (2015) The New England journal of medicine 373, 1926-1936) とは反対に、C N A はがん性進行を最もよく反映するため (Hafner (2010) PNAS 107, 20780-20785; Klein (2013) Nature 501, 365-372; Shain (2015) The New England journal of medicine 373, 1926-1936)、それらを分析した。この理由から、この研究は、B R A F または N R A S を除く非 C N A 変化の獲得と比較した播種に対処しなかった。  
30  
40  
50

## 【0114】

メラノーマの体細胞進行において早期に生じるがん細胞拡散の結論もまた、DCCとより類似するが、顕微解剖試料の分析による検出を逃れる原発腫瘍中に少量のサブクローンが存在する可能性と一致する。そのようなサブクローンは、存在する場合、分析される優勢なクローンと比較してゲノム的に未熟である；次いで、そのようなサブクローンの存在および播種（高いTステージで生じる場合であっても）は、ゲノム的に未熟な細胞が、同時に存在する成熟細胞よりも拡散に対する高い傾向を示すことを示すであろう。しかしながら、400 μmでの実証された早期播種と共に、メラノーマは腫瘍形成において早期に、また、ゲノム成熟において早期に播種することが多い可能性が高い。

## 【0115】

早期に播種するがん細胞よりも転移のより成功した創始細胞であり得る、後期に播種する遺伝的により成熟した細胞が検出されるかどうかを試験した。このために、厚いメラノーマを有する患者に由来するコロニー形成の前に、DCCを分析した。それらを、薄いメラノーマに由来する予め定着するDCCと比較したが、CNAの差異を同定することはできなかった。また、CNAの数は、薄いメラノーマと厚いメラノーマに由来する予め定着するDCCの間で異ならなかった。

## 【0116】

これは、DCCが、リンパ節内で重要な変化を獲得するという結論を導いた。実際、77～95のDCCCDを超える増殖は、p16の領域を含む、染色体9p上の喪失、およびBRAF変異の獲得と関連していた。その点の前に、DCCCD = 19では、METがん遺伝子を含む、染色体7qの獲得に関する富化があった。約100のDCCCDは、リンパ節におけるコロニー形成および平均Ki-67増殖指数の11%（DCCCD 100）から22%（DCCCD > 100）への有意な増加とさらに関連しており、基本増殖を確認し、有利な変化の獲得を示した。興味深いことに、定着前の11%の平均増殖指数は、9～13%の範囲であることが以前に見出された腫瘍形成性垂直増殖期（VGP）への移行時のT1メラノーマのものと類似する（Gimotty (2005) Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23, 8048-8056）。このようにして、早期リンパ節-DCCは、非休止状態であり、進行を可能にする増殖速度を示す。

## 【0117】

総合すると、早期の予め定着するDCCと、成熟した定着するDCCとの間で顕著な差異が同定された。生存データおよび異種移植は、DCCが重要な定着を可能にする変化の獲得後にのみ、転移を形成するという結論を支持する。したがって、転移は、早期DCCとはゲノム的に異なるであろう。これらの知見は、様々ながんに由来する原発腫瘍と対応する転移を比較する最大の配列決定試験によって十分に裏付けられている（Brastianos (2015) Cancer discovery）。86の事例（メラノーマを含む）の全てにおいて、原発腫瘍と転移は大きい程度で異なっており、原発部位と遠隔部位の両方に対して個別の変異を獲得していた。線形進行から予想されるように、転移創始クローンを原発腫瘍内で同定することができた例は見出されなかった。メラノーマに限定された別の研究もまた分岐進化を支持するが、しかしながら、後期播種モデル（Sanborn (2015) PNAS 112, 10995-11000）をレスキューする試みにおいて原発病変中で配列決定されなかった祖先変異を仮定した（「推定した」）。がん系統発生に関する数的モデルは、それぞれの変異が最大で1回生成されると記述する（Ma (2008) PNAS 105, 14254-14261）、「無限部位仮定」（Deshwar (2015) Genome biology 16, 35 ; Jiao (2014) BMC bioinformatics 15, 35 ; Strino (2013) Nucleic acids research 41, e165）を適用していることに留意すべきである。しかしながら、例えば、非関連患者のメラノーマが40%の事例において古典的なBRAF-V660E変異に収束するため、種のゲノム進化へのその元々の適用（Ma (2008) PNAS 105, 14254-14261）とは反対に、この仮定は、がんにおいては正当化されない。したがって、同じがんの2つのクローンがBRAF V600E変異を独立に獲得することを推測的に排除することは不合理である。本明細書で提供される単一細胞分析は、巨大腫瘍の配列

10

20

30

40

50

決定試験から推定される分岐進化の現在のモデルが、無限部位モデルに依拠するため、がん進化の複雑性を過小評価することを示している。

【0118】

B R A F 変異は、センチネルリンパ節中のコロニー形成時に D C C 中に見出されるが、以前は稀であった。良性母斑は 70 ~ 88 % において B R A F 変異細胞を有するが (Pollock (2003) *Nature genetics* 33, 19-20; Shain (2015) *The New England journal of medicine* 373, 1926-1936) 、 B R A F 変異（または一般的には、 M A P K 経路変異）がメラノーマを開始させ、直線的に伝達されるかどうかは不明である。いくつかの理由が、多くのメラノーマに関するこのシナリオに対して異議を唱えている。第 1 に、原発腫瘍は、一般的には良性母斑よりも低い率の B R A F 変異を示し（40 % 対 80 %）(Platz (2008) *Molecular oncology* 1, 395-405; Pollock (2003) *Nature genetics* 33, 19-20) 、これは、悪性腫瘍への異なる経路を示している；第 2 に、0 ~ 10 % の *in situ* および早期放射状増殖期 (R G P) のメラノーマは、 B R A F 変異を有する (Dong (2003) *Cancer research* 63, 3883-3885; Verlinden (2014) *Medicine* 93, e285) 。そのような病変におけるより高い率の B R A F 変異は、近隣の進行性メラノーマを有する試料を使用する研究において見られるに過ぎない (Omholt (2003) *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 6483-6488; Shain (2015) *The New England journal of medicine* 373, 1926-1936) が、 *in situ* のメラノーマが浸潤性増殖の前に切除された場合ではなく (Dong (2003) *Cancer research* 63, 3883-3885; Verlinden (2014) *Medicine* 93, e285) 、これは、前者において汚染が生じた可能性を示唆している。第 4 に、 B R A F 変異メラノーマ D C C を有する患者間で、この変異を有さないがん細胞を容易に同定することができ、同様に原発病変におけるこの変化に関する完全なクローン性に反証するものである。  
10  
20

【0119】

本明細書で提示される遺伝的知見は、患者データと一貫し、これは、播種が V G P の開始時（深さ 0.04 ~ 0.75 mm）に起こることが多いことを示唆している。V G P メラノーマが真皮中で拡張する（すなわち、腫瘍形成性になる）場合、それらは B R A F 変異を獲得し (Dong (2003) *Cancer research* 63, 3883-3885; Verlinden (2014) *Medicine* 93, e285) 、その増殖率を増加させることが多く、20 % を超える K i - 67 の頻度は転帰不良のマーカーである (Gimotty (2005) *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 8048-8056) 。S L N およびおそらく他の転移部位における D C C は、定着の間にこのプロセスを繰り返す。本明細書で提示される遺伝子データおよび数的進行モデルは、増殖表現型の獲得後、播種が次第になくなることを示している。播種に関するハザード比は、腫瘍の厚さの増加と共に減少し、原発腫瘍における B R A F および N R A S 変異は一致した D C C によって稀に共有されたが、これは、 B R A F / N R A S 変異クローンが播種する可能性が低いことを示している。まとめると、早期病変からの播種、原発メラノーマ進行における B R A F 変異の公開されたデータおよびリンパ節定着の間の特異的变化の選択は全て、原発および続発部位（図 7）でのメラノーマ細胞の「V o g e l g r a m」 (Fearon (1990) *Cell* 61, 759-767) による大まかに同時の継代のモデルと一貫する。メラノーマ細胞は、それらが真皮に浸潤する時に間質区画から播種するように合図を受け（図 7）、遠隔部位に留まった後に進化し続けると推測することは魅力的である。最後に、変異がコロニー形成の間に与える強力な選択利益に加えて、 B R A F 変異に関する原発腫瘍と D C C との初期の相違は、本発明者らおよび他の研究 (Colombino (2012) *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 2522-2529; Saint-Jean (2013) *J Invest Dermatol*; Yancovitz (2012) *PLoS one* 7, e29336; Verlinden (2014) *Medicine* 93, e285) における原発腫瘍と転移との間の B R A F 変異に関する観察された相違ならびに早期 R G P メラノーマと比較した転移における B R A F 変異の頻度の増加の両方を説明する。  
30  
40  
50

【0120】

高いTステージがメラノーマにおけるリスク因子である理由を、依然としてより詳細に探索すべきである。腫瘍の厚さと定着（播種とは反対）との相関は、リードタイムを反映する（厚いメラノーマを有する患者におけるDCCは、薄いメラノーマからのDCCよりも、リンパ節内で増殖するのに多くの時間がかかる）か、または原発腫瘍が分泌された因子によって定着を容易にすることを示唆する（Peinado (2012) *Nature medicine* 18, 883-891）。そのような因子は、DCCに対して直接的に、または微小環境を局所的もしくは全身的に変化させることによって間接的に、用量依存的様式で作用してもよい。T1メラノーマが外科手術によってほぼ治癒するという事実（Balch (2009) *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 6199-6206）は、増殖刺激因子が厚いメラノーマによってより豊富に分泌され、次いで、コロニー形成にとって必要とされる遺伝子変化の獲得を促進することを強く支持する。このシナリオの正式な証拠は、支持因子によって誘発される未熟がん細胞から成熟がん細胞へのゲノムの *in vitro* での進行を可能にするモデルシステムを必要とする。そのようなモデルは、現在利用可能ではない。いくらかの患者において観察された数年にわたる刺激されていない、結果として遅い *in vivo* での進行は、後期再発の原因となることがある（Ossowski (2010) *Pigment cell & melanoma research* 23, 41-56）、リードタイム効果に対して少なくとも部分的に異議を唱えるものである。

10

#### 【0121】

原発腫瘍からの十分な支援シグナルの欠如は、本研究がNSGマウスにおける予め定着する細胞の生着を観察することができなかった理由を説明することができる。予め定着するDCCは、早期メラノーマ除去後にマウスまたはヒトにおいて発育することは稀である。他方で、定着するDCCは約60%の事例において生着し、これは原発メラノーマに由来する腫瘍細胞に関する16%～75%の報告された生着率と一致する（Boiko (2010) *Nature* 466, 133-137; Quintana (2008) *Nature* 456, 593-598）。DCCは、一般的には、20～50週で播種して異種移植片を形成し、これは、細胞株の細胞または原発腫瘍細胞がそうするのにかかるよりもはるかに長い（Quintana (2008) *Nature* 456, 593-598）。これは、非遺伝的なものを含むさらなる差異が、原発腫瘍細胞と、新しく獲得された定着能力を有するDCCとの間に存在することを示唆する。

20

#### 【0122】

リンパ節の免疫細胞微小環境の分析は、抗腫瘍応答の実行を完全に損ない、そうでなければ転移性増殖をおそらく制限し得る、腫瘍監視の失敗をもたらす、CD8 T細胞およびNK細胞機能の喪失ならびに免疫抑制性未熟MDSCの動員を示した。腫瘍監視の機能的損傷は、DCCCD > 2000で起こり、DCCCD > 100での遺伝子異常の獲得の次に起こる。さらに、それはリンパ節中の局所腫瘍細胞量、すなわち、DCCDに依存し、したがって、原発腫瘍における対応するパラメータからではなく、播種の標的臓器から推定することができるに過ぎない。

30

#### 【0123】

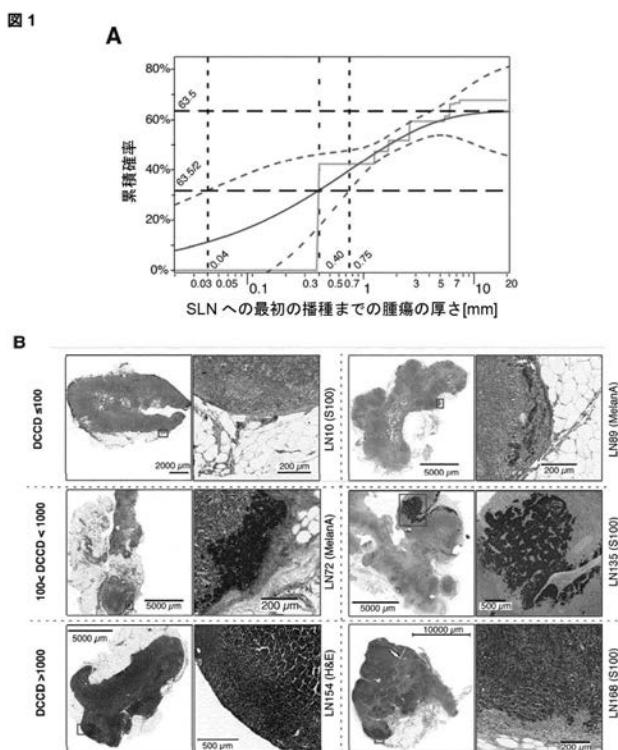
本明細書で提示される知見は、アジュバント療法の開発に関する含蓄を有する。第1に、古典的手法は進行性がん細胞に特徴的な分子（例えば、低いおよび高いTステージを比較することによる）、次いで、標的進行関連変化を決定するためのものであったが、これは、早期全身性疾患とは無関係であり、したがって、よくても非生産的であり得る。むしろ、全身的に拡散したがん細胞が既に形成されたかどうかを決定することが決定的に関連するようになり得る。イエスの場合、コロニー形成を支援する遺伝子変化が原発腫瘍と共に共有され、標的化することができるより多くの機会がある。第2に、予め定着するDCCは典型的な薬物標的を欠くため、定着前に転移種を根絶するためには、新規薬物が必要である。最後に、分子進化は、潜在疾患活性をモニタリングするための新規手段を必要とする。DCCにおける定着関連変化が、フォローアップ中にメラノーマで死亡する9人の患者のうちの1人を除く全員において認められることから、転移の兆候前のこの定着シグネチャーの診断は、アジュバント療法の選択およびタイミングのための新しい機会を提供することができる。BRAF変異を欠く患者にBRAF変異を標的とする薬剤を投与すること

40

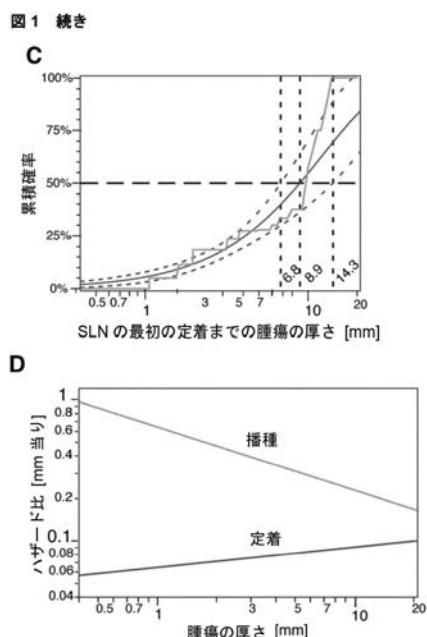
50

は、利益を欠くだけでなく、MAPK経路を刺激して腫瘍増殖を促進する可能性があった（Poulikakos (2010) Nature 464, 427-430）。したがって、ステージIICおよびステージIIICの患者における野生型DCCではなくBRAF変異原発腫瘍を有する患者における予期せぬ疾患促進のリスクは、以前に考えられていたものよりも高い。他方で、免疫チェックポイント遮断療法の成功のための新抗原多様性の最近理解された重要性を考慮すると（Snyder (2014) The New England journal of medicine 371, 2189-2199）、DCCの継続進化は、DCCにおけるこれらの変異および抗原の同定が、致死的転移を可能にする、および防止するために必須であると主張する。免疫チェックポイント遮断および他の免疫療法に関して、局所定着に対する腫瘍監視機構の局所損傷の依存性は、治療決定および患者階層化におけるその実現を必要とする。

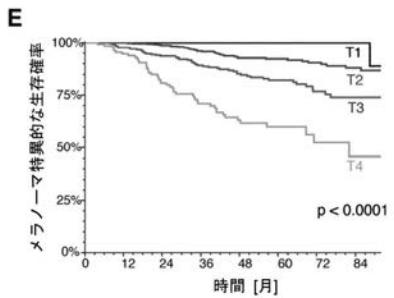
【図1-1】



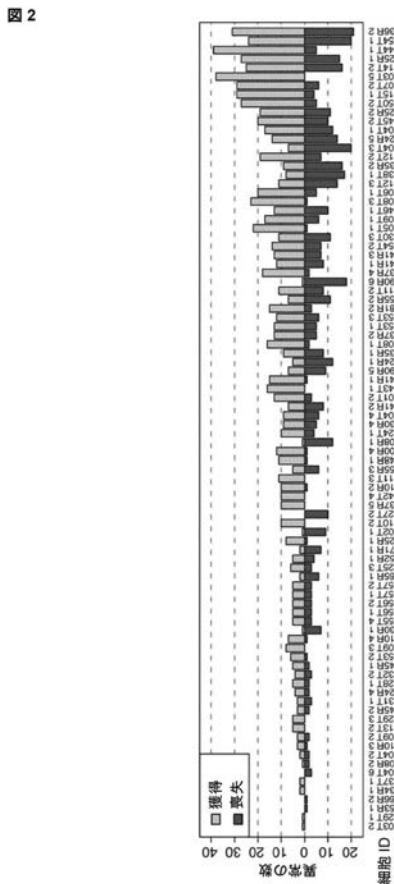
【図1-2】



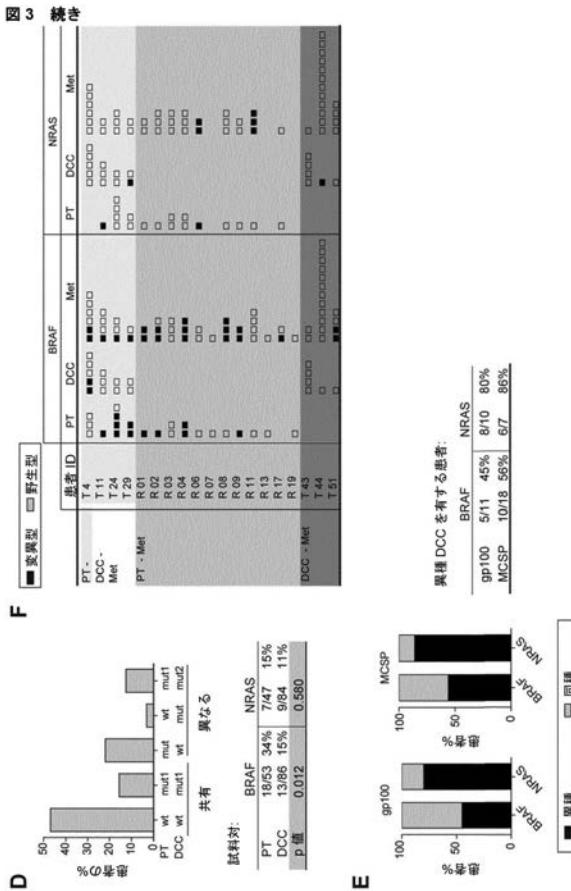
【図1-3】



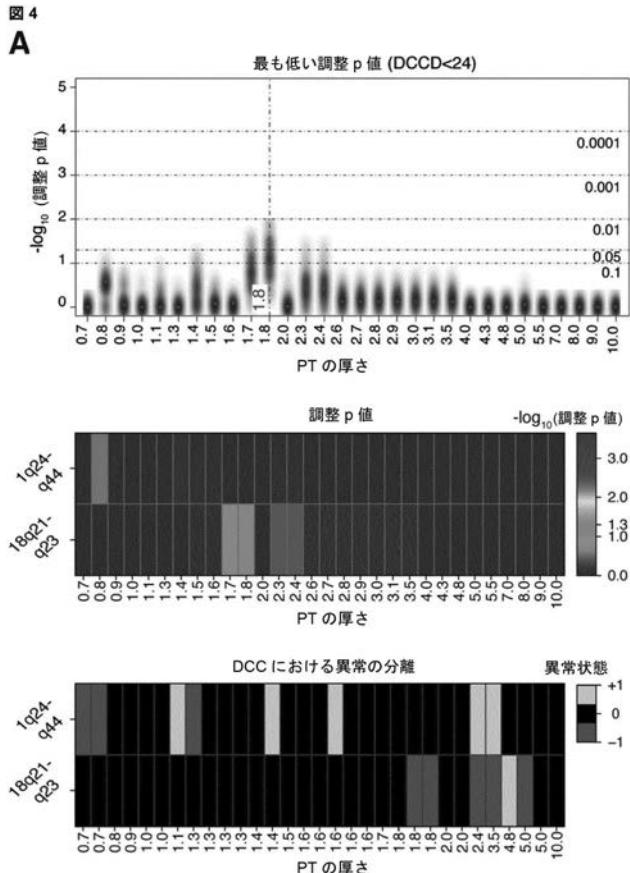
【図2】



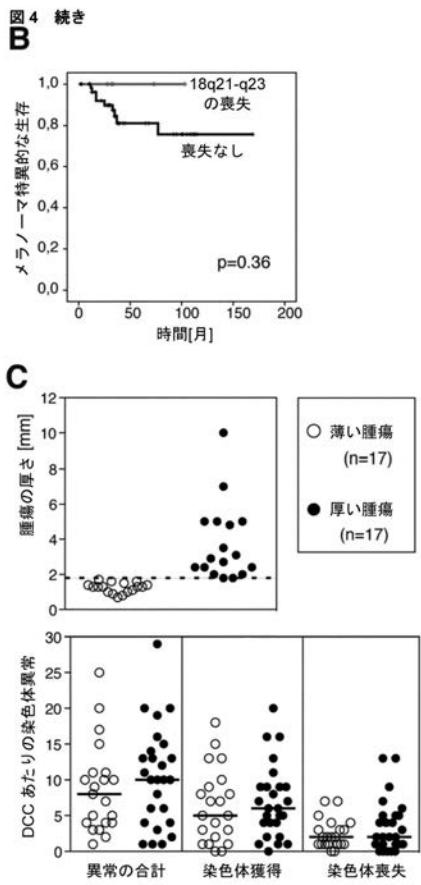
【図3-3】



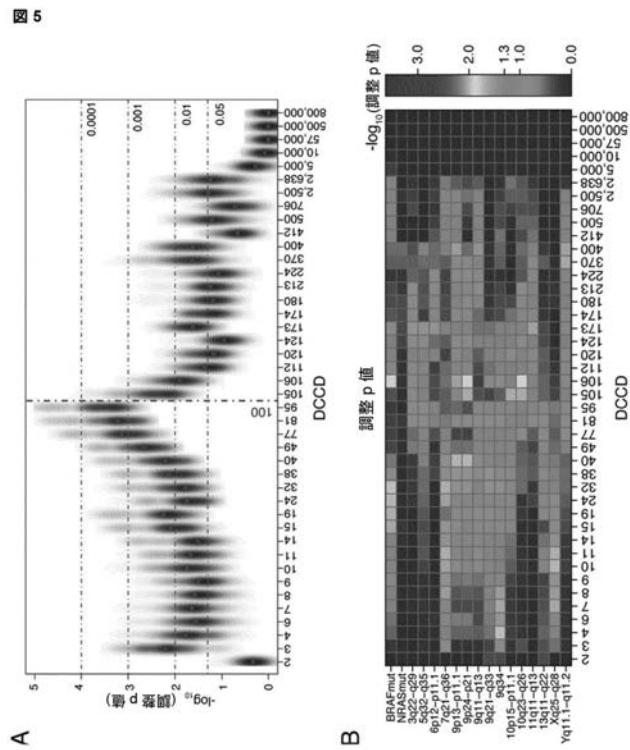
【図4-1】



【図4-2】

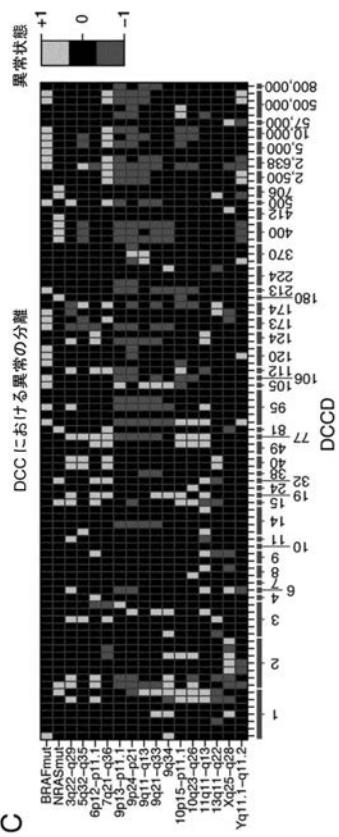


【図5-1】



【図5-2】

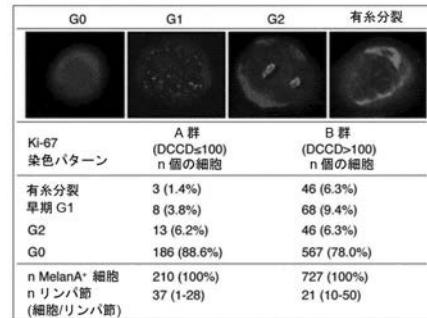
図5 続き



【図5-3】

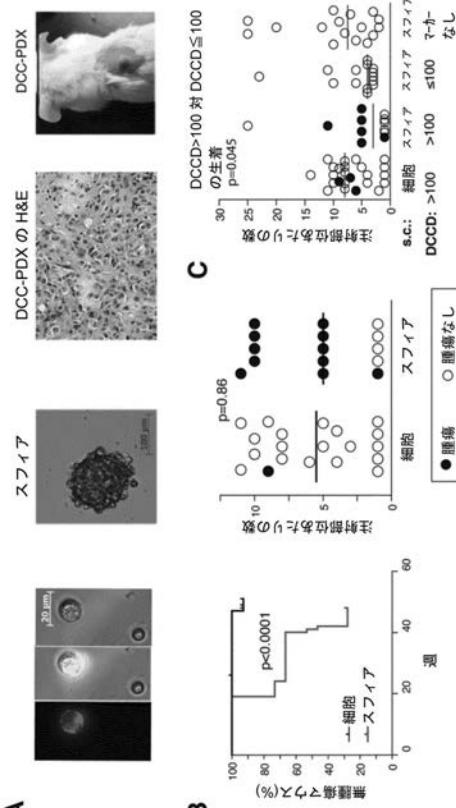
図5 続き

D



【図6-1】

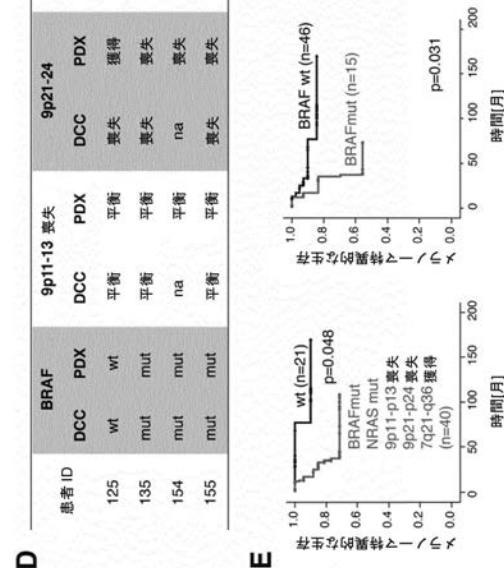
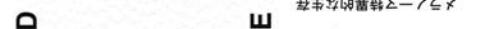
図6



【図6-2】

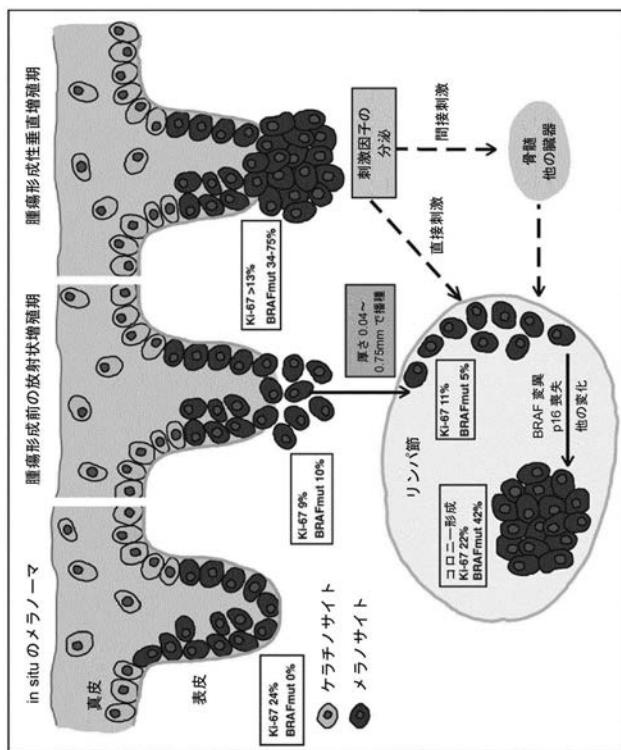
図6 続き

患者ID	BRAF		9p11-13 壊失		9p21-24		7q21-36		NRAS	
	DCC	PDX	DCC	PDX	DCC	PDX	DCC	PDX	DCC	PDX
125	wt	wt	平衡	平衡	獲得	獲得	喪失	喪失	mut	mut
135	mut	mut	平衡	平衡	喪失	喪失	獲得	獲得	wt	wt
154	mut	mut	na	na	na	na	喪失	喪失	wt	wt
155	mut	mut	平衡	平衡	喪失	喪失	獲得	獲得	wt	wt



【図7】

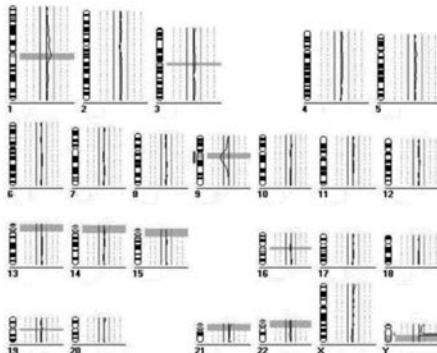
図7



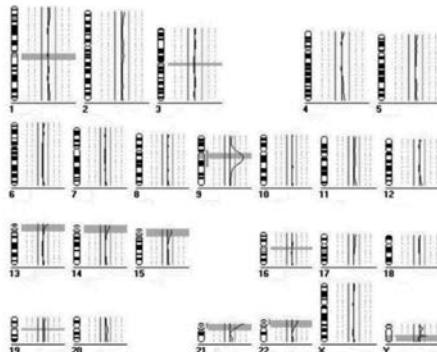
【図8-1】

図8

2316 KMN1



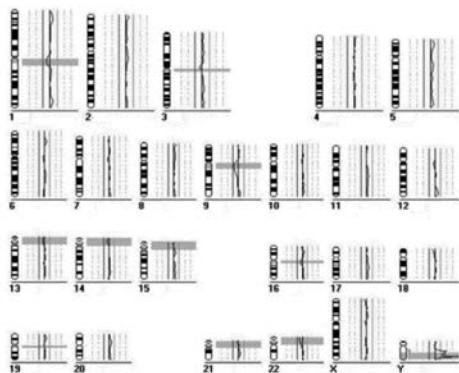
2349 KMN1



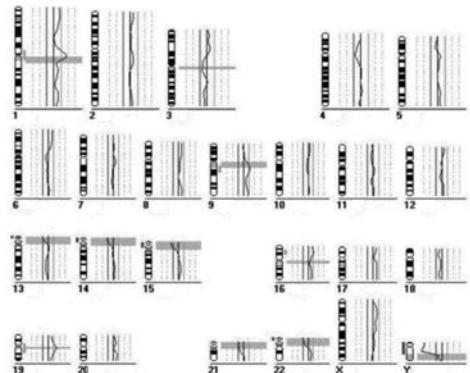
【図8-2】

図8 続き

2337 KMN1



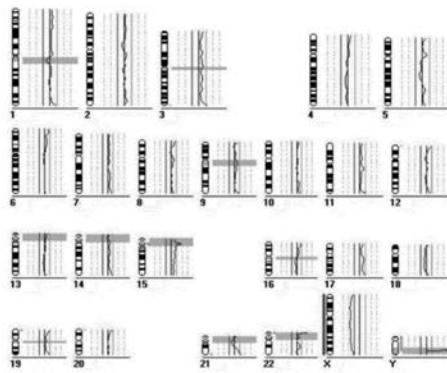
2349 KMN2



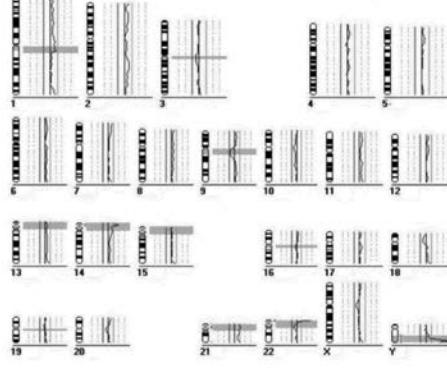
【図8-3】

図8 続き

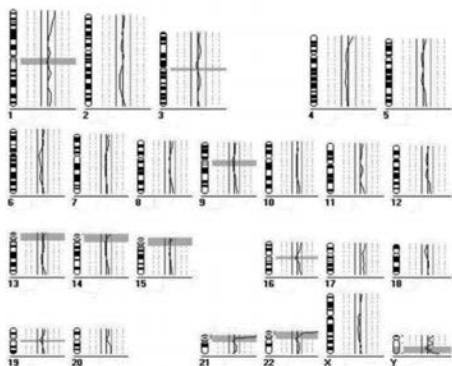
2436 KMN1



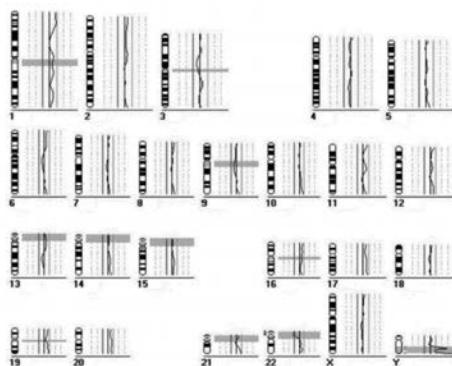
2436 LKN1



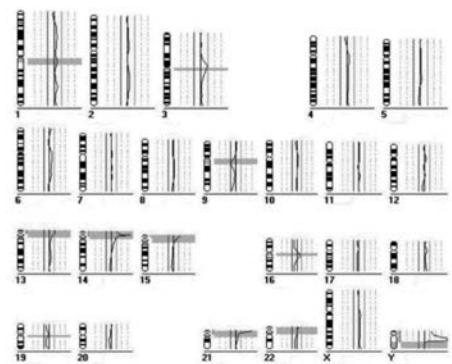
## 【図8-4】

図8 続き  
2436 KMN2

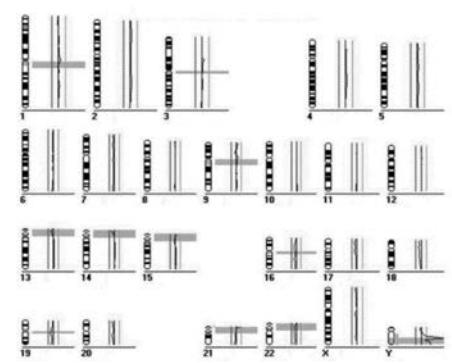
2501 KMN1



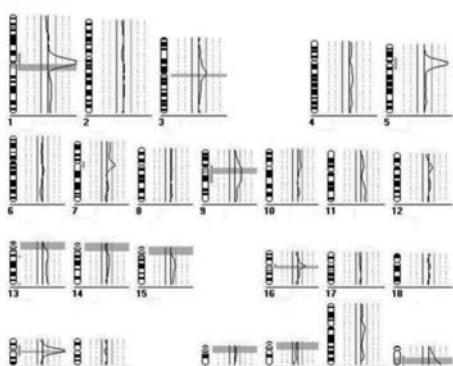
## 【図8-6】

図8 続き  
3596 KMN1

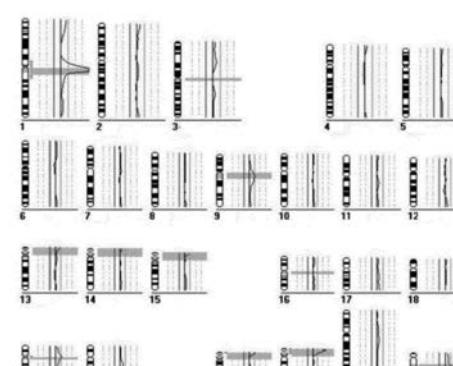
778 NZ1



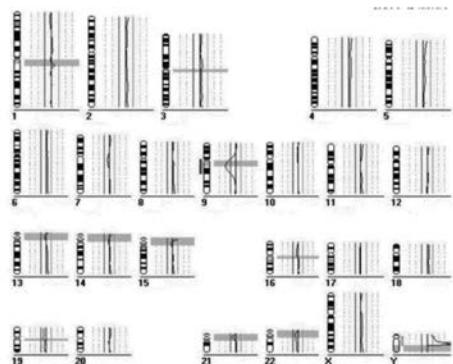
## 【図8-5】

図8 続き  
3214 LKN1

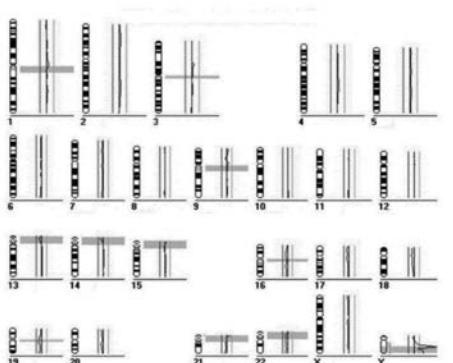
3425 KMN1



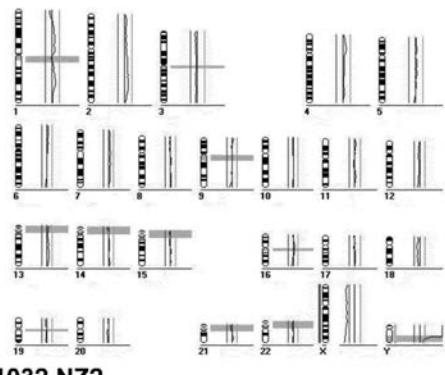
## 【図8-7】

図8 続き  
3641 KMN2

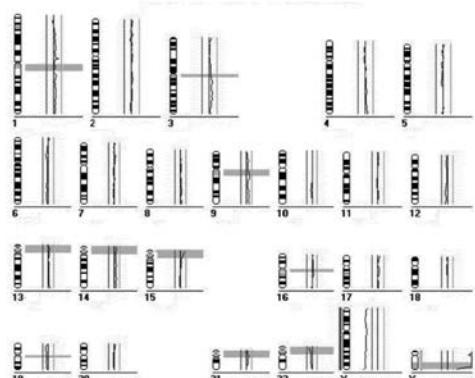
778 NZ2



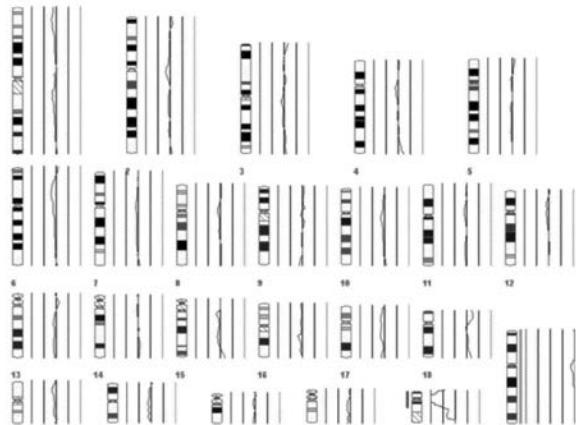
## 【図 8 - 8】

図 8 続き  
1032 NZ1

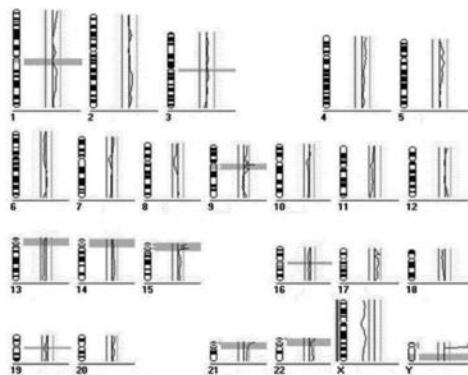
1032 NZ2



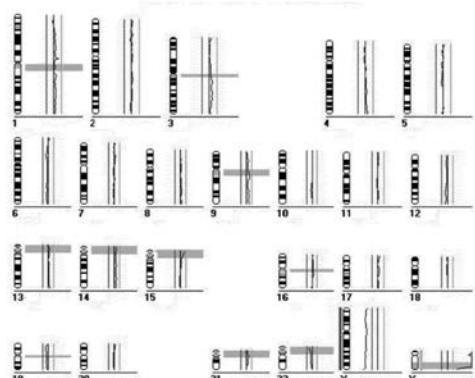
## 【図 8 - 10】

図 8 続き  
LK 16 N2

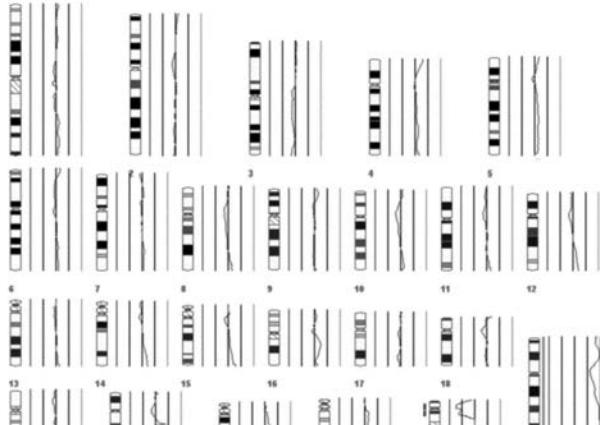
## 【図 8 - 9】

図 8 続き  
1077 NZ2

1077 NZ1

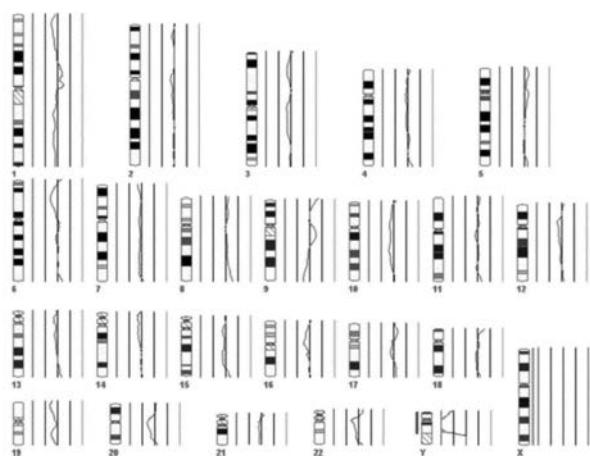


## 【図 8 - 11】

図 8 続き  
LK 16 N1

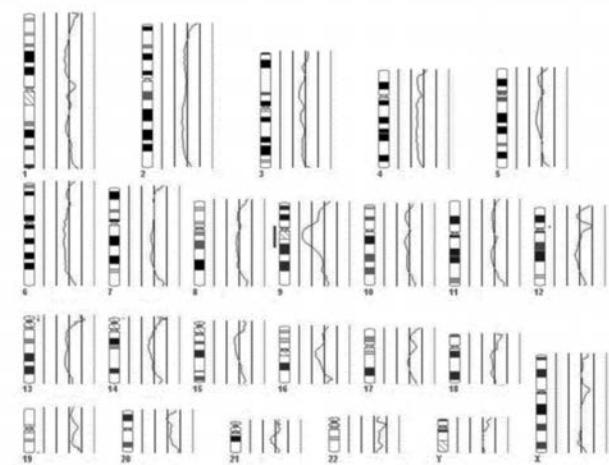
【図 8 - 1 2】

図 8 続き  
**LK 16 N3**



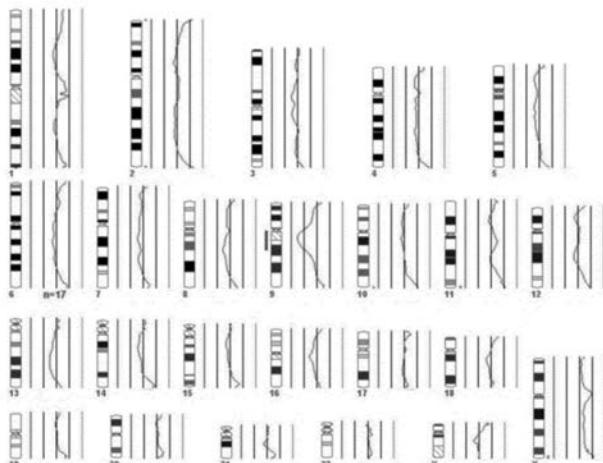
【図 8 - 1 3】

図 8 続き  
**RPC 94 N**



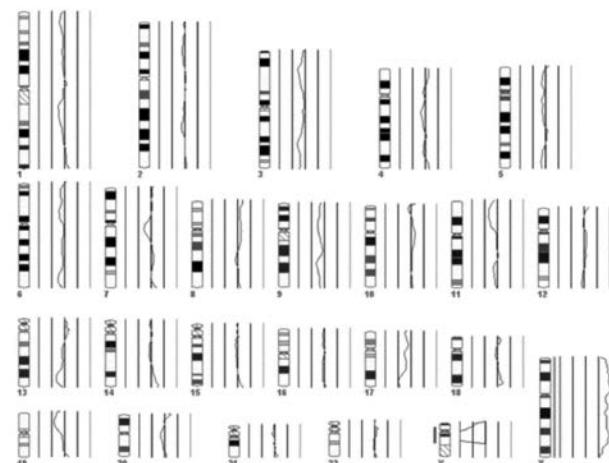
【図 8 - 1 4】

図 8 続き  
**114 N**



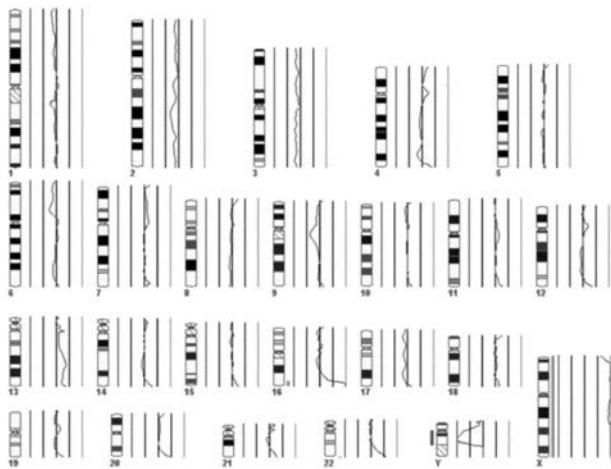
【図 8 - 1 5】

図 8 続き  
**856-3b**



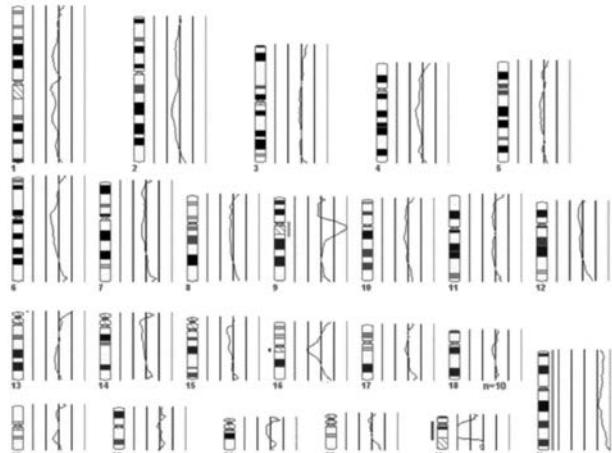
【図 8 - 1 6】

図8 続き

**983-9SMb16**

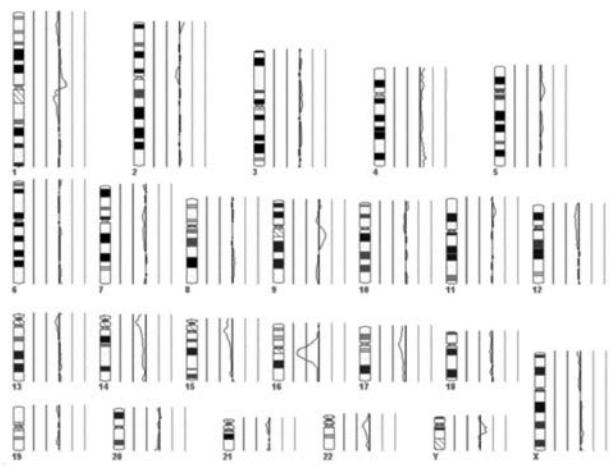
【図 8 - 1 7】

図8 続き

**741-9SMb**

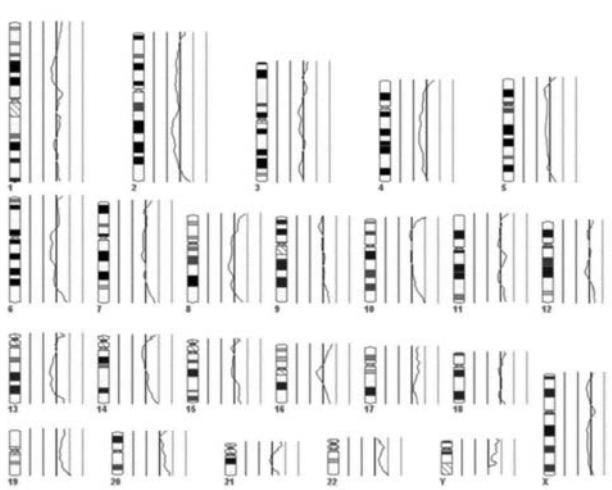
【図 8 - 1 8】

図8 続き

**PBL SC 1**

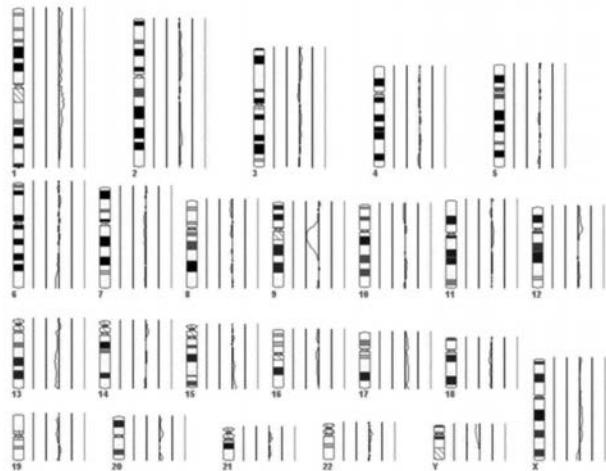
【図 8 - 1 9】

図8 続き

**PBL SC 2**

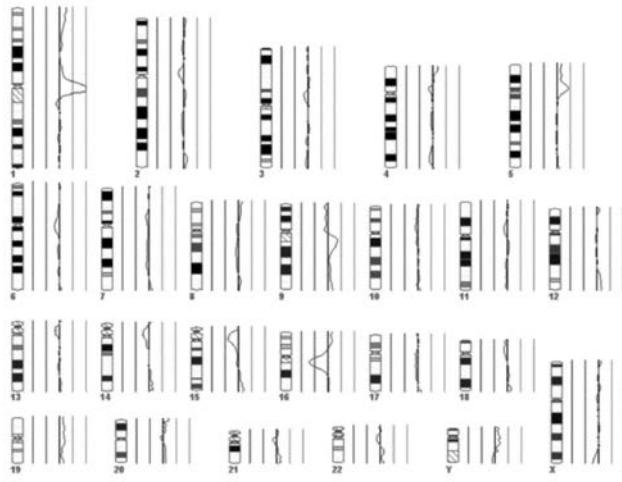
【図 8 - 20】

図8 続き

**PBL SC 3**

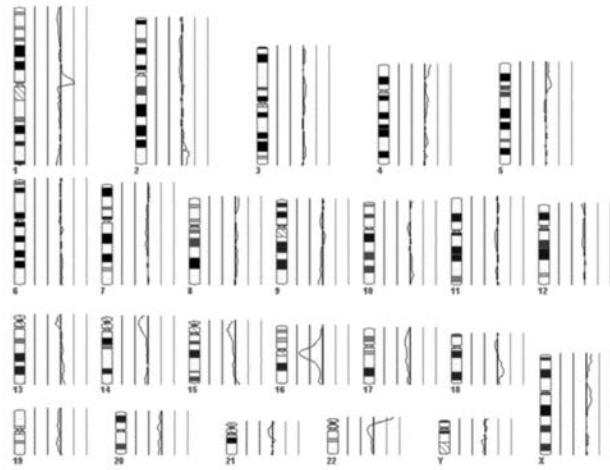
【図 8 - 21】

図8 続き

**PBL SC 4**

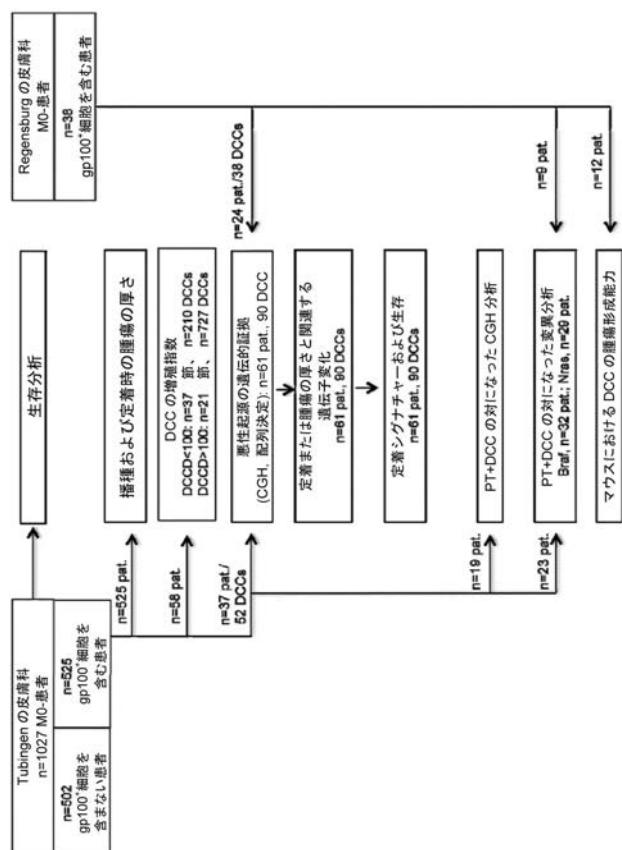
【図 8 - 22】

図8 続き

**PBL SC 5**

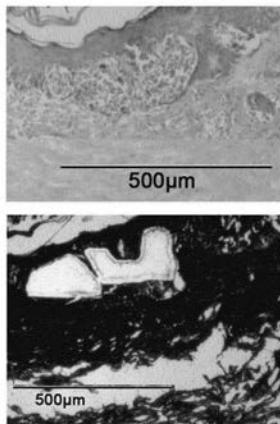
【図 9】

図9



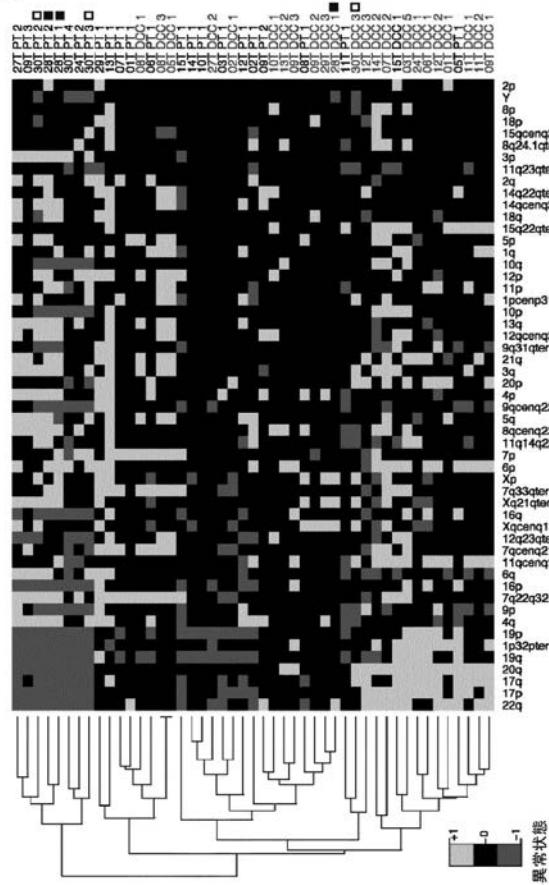
【図 10】

図 10



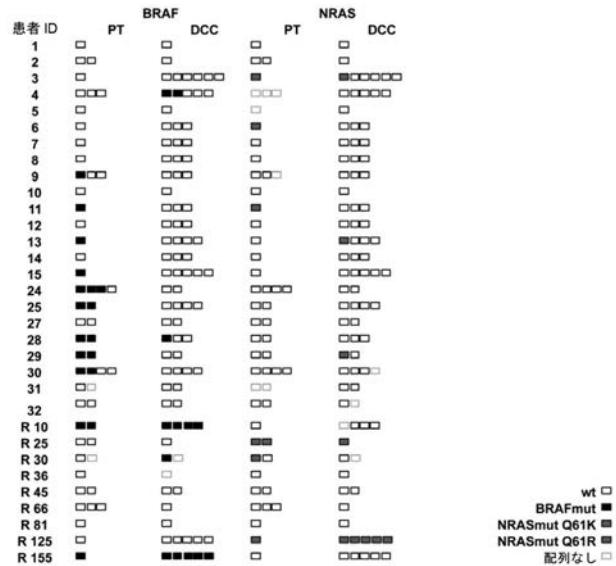
【図 11】

図 11



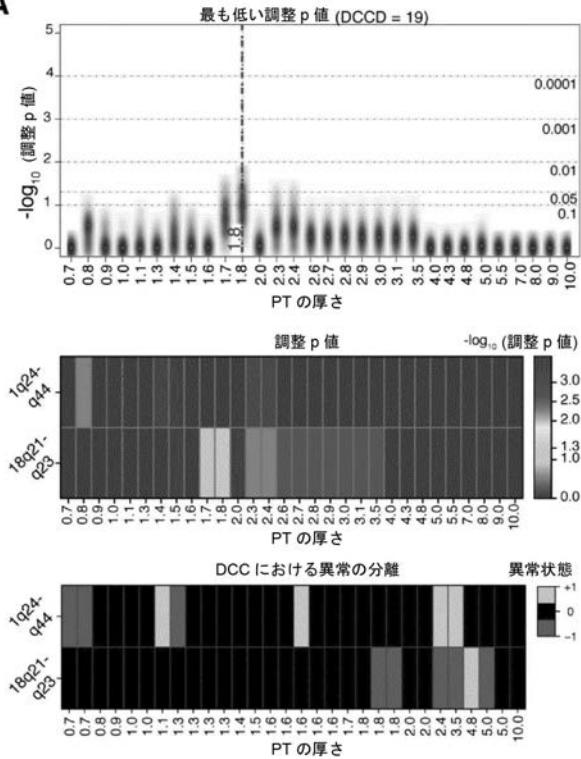
【図 12】

図 12



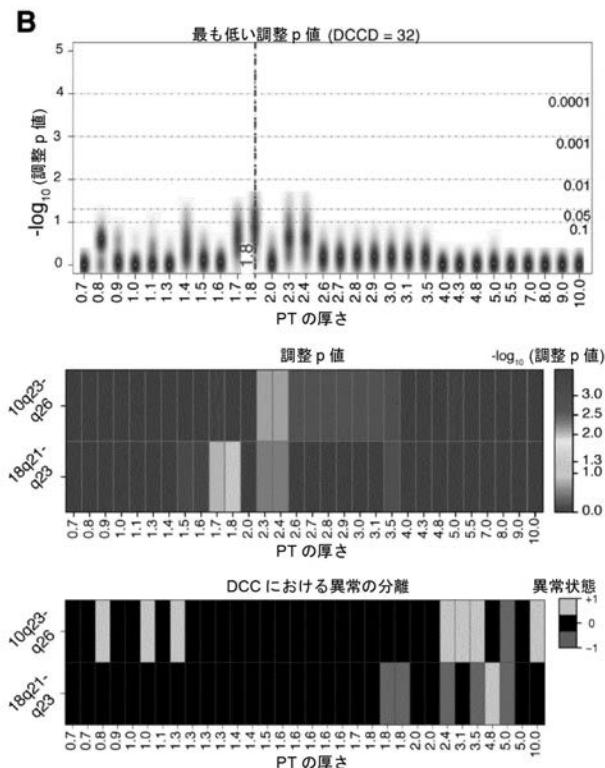
【図 13-1】

図 13

**A**

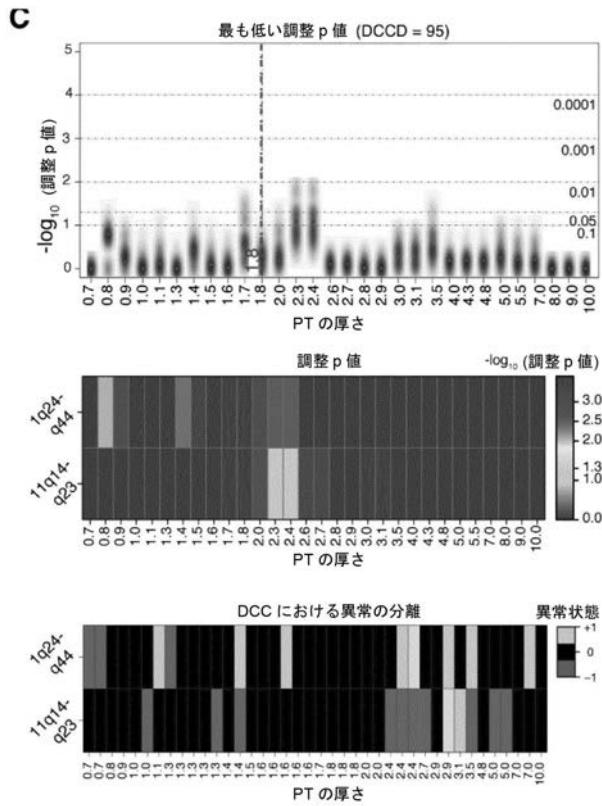
【図 13 - 2】

図13 続き



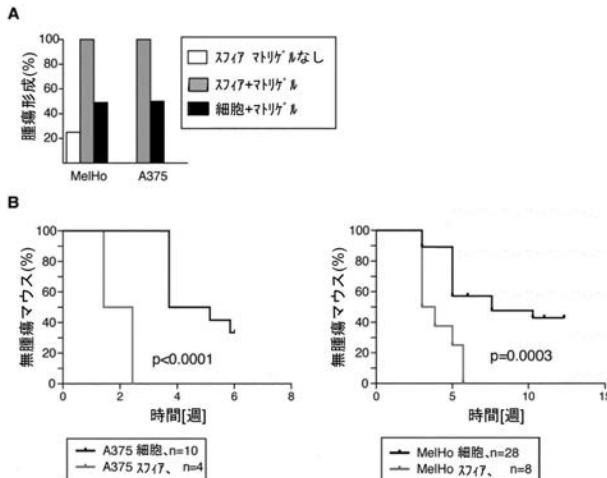
【図 13 - 3】

図13 続き



【図 14 - 1】

図14



【図 14 - 2】

表1

メラノーマ患者のベースライン特徴

	患者数	ハーベンテージ [%]	中央値	範囲	四分位範囲
性別					
女性	25	41			
男性	36	59			
年齢[歳]			61	20 - 78	47.5 - 70
プレスローの厚さ [mm]			2.35	0.6 - 10.0	1.3 - 4.08
腫瘍形成					
なし	39	63.9			
あり	19	31.2			
特定されず	3	4.9			
局在化					
四肢	32	52.5			
胴体または頭部	29	47.5			
筋状態					
組織病理学					
陰性	37	60.7			
陽性	24	39.3			
DCCD			1 -		
臨床ステージ			32	800000	3 - 177
IA	4	6.5			
IB	15	24.6			
IIB	7	11.5			
IIC	5	8.2			
IIIA	11	18.0			
IIIB	13	21.3			
IIIC	4	6.5			

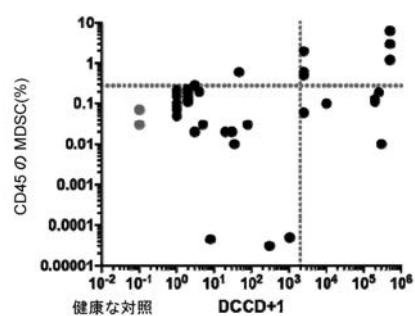
C

患者 ID	試料	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D16S538	vWA
LN125	DCC	7	29, 30	10, 13	11, 12	9, 13	11, 14, 21
	PDX	7	29, 30	10, 13	11, 12	9, 13	11, 14
LN135	DCC	8, 9	29, 30, 32, 2, 33, 2	12, 13	9, 11	12, 13	12, 14, 15
	PDX	8, 9	29, 30, 32, 2, 33, 2	13	9, 11	12, 13	12, 14, 15
LN154	DCC	7, 9	28, 29	11, 12	11, 12	n.d.	12, 13, 17, 21
	マトリクル	7, 9	28, 29, 30, 2, 31, 2	11, 12	11, 12	11, 12	13, 17, 21
	PDX	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LN155	DCC	7, 9	29, 32, 2	12, 13	11, 12	9, 10, 11	14, 17, 21
	マトリクル	7, 9	29, 32, 2	12, 13	11, 12	9, 10, 11	14, 17, 21
	PDX	7, 9	29, 32, 2	12, 13	11, 12	9, 10, 11	14, 17, 21

【図 15 - 1】

図 15

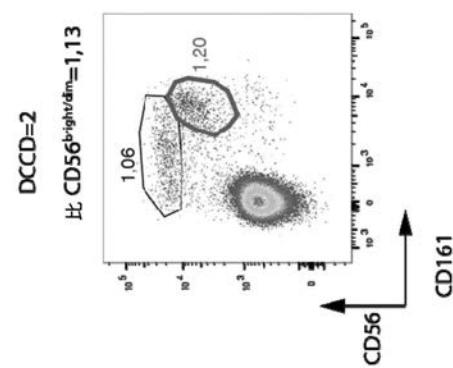
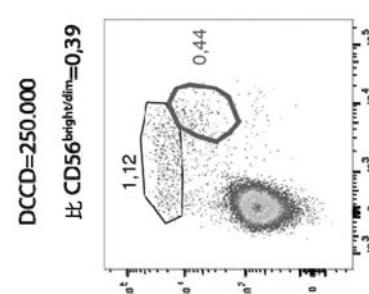
A



【図 15 - 2】

図 15

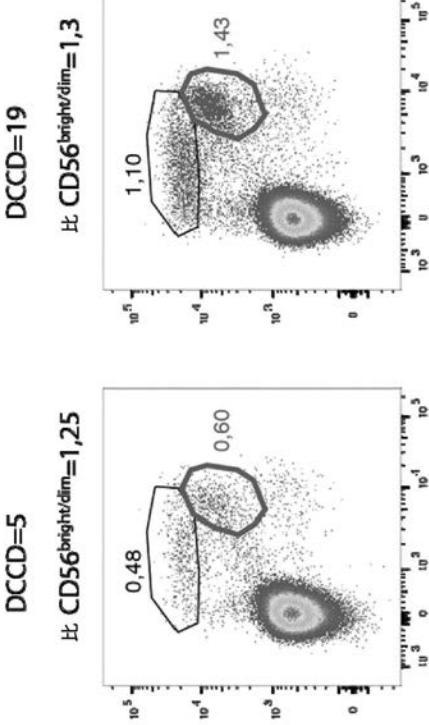
B



【図 15 - 3】

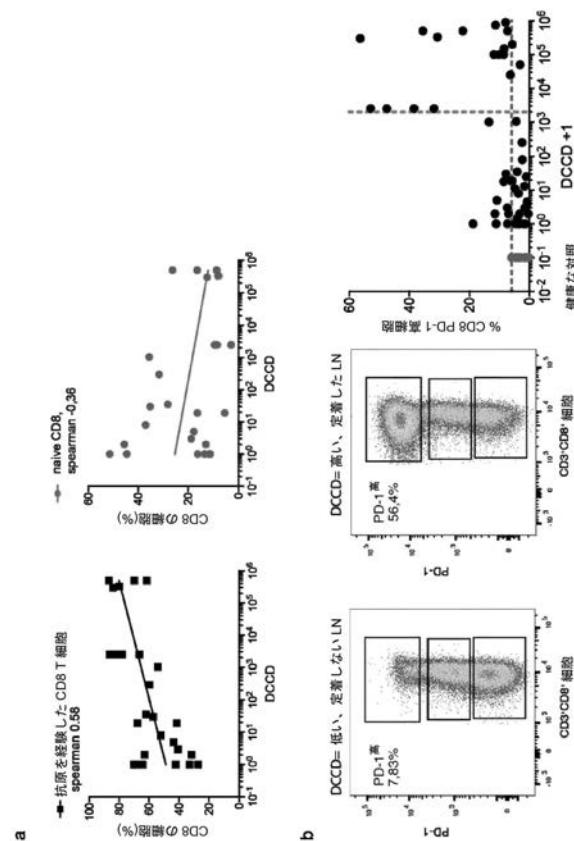
図 15

B 続き



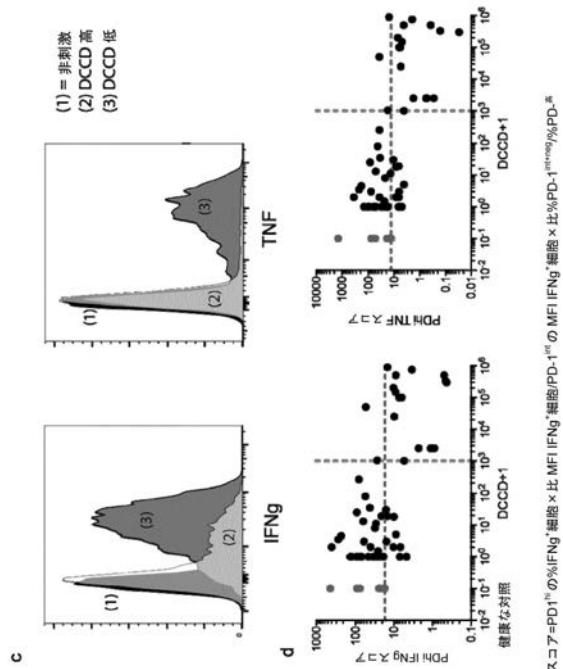
【図 16 - 1】

図 16



## 【図 16 - 2】

図 16 続き

スコア=PD1<sup>1</sup>の%IFN $\gamma$ 細胞×比MFI IFN $\gamma$ 細胞/PD1<sup>1</sup>のMFI IFN $\gamma$ 細胞×比%PD1<sup>1</sup>(%)%PD-A

## 【配列表】

2019508032000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/051789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12Q1/68  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/37113 A2 (GIESING MICHAEL [DE]; GRILL HANSJOERG [DE]; BOECKMANN BEATRIX [DE]; SU) 10 May 2002 (2002-05-10) page 6, line 10 - line 15; claims 1,29 page 2 -----	1-6
X	WO 2015/023553 A2 (BIONUMERIK PHARMACEUTICALS INC [US]) 19 February 2015 (2015-02-19) page 46, last paragraph - page 48 -----	1-6
X	EP 2 503 009 A1 (ZOLLO MASSIMO [IT]) 26 September 2012 (2012-09-26) page 2, line 32 - line 40 -----	1-6
X	US 2013/149704 A1 (JEWELL SUSAN [US] ET AL) 13 June 2013 (2013-06-13) paragraph [0218] ----- -/-	7-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

29 March 2017

07/04/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabriels, Jan

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/051789
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/009632 A2 (UNIV UTAH RES FOUND [US]; NEKLASON DEBORAH W [US]; BURT RANDALL W [US]) 17 January 2013 (2013-01-17) paragraph [0003] - paragraph [0004] paragraph [0009] - paragraph [0010] -----	7-13
X	VAN A TRINH ET AL: "Chemoprevention for Brain Metastases", CURRENT ONCOLOGY REPORTS, CURRENT SCIENCE INC, NEW YORK, vol. 14, no. 1, 18 October 2011 (2011-10-18), pages 63-69, XP035007068, ISSN: 1534-6269, DOI: 10.1007/S11912-011-0200-1 page 66 -----	7-13
A	ANJA ULMER ET AL: "Quantitative Measurement of Melanoma Spread in Sentinel Lymph Nodes and Survival", PLOS MEDICINE, vol. 11, no. 2, 18 February 2014 (2014-02-18), page e1001604, XP055286022, DOI: 10.1371/journal.pmed.1001604 the whole document -----	5,6
A	CRESPI B ET AL: "Evolutionary biology of cancer", TRENDS IN ECOLOGY AND EVOLUTION, NORTH-HOLLAND, AMSTERDAM, NL, vol. 20, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 545-552, XP027774576, ISSN: 0169-5347 [retrieved on 2005-10-01] the whole document -----	1
A	BEATE RINNER ET AL: "Molecular evidence for the bi-clonal origin of neuroendocrine tumor derived metastases", BMC GENOMICS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 13, no. 1, 5 November 2012 (2012-11-05), page 594, XP021120042, ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-13-594 the whole document ----- -----	1
1		-/-

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/EP2017/051789
---

**C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DON X. NGUYEN ET AL: "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization", NATURE REVIEWS. CANCER, vol. 9, no. 4, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 274-284, XP055359862, GB ISSN: 1474-175X, DOI: 10.1038/nrc2622 the whole document -----	1

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/051789

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0237113	A2	10-05-2002	AU WO	1600902 A 0237113 A2	15-05-2002 10-05-2002	
WO 2015023553	A2	19-02-2015	EP WO	3033150 A1 2015023551 A1 2015023552 A1 2015023553 A2	22-06-2016 19-02-2015 19-02-2015 19-02-2015	
EP 2503009	A1	26-09-2012		NONE		
US 2013149704	A1	13-06-2013	EP JP US US WO	2788768 A1 2015500035 A 2013149704 A1 2017067126 A1 2013086478 A1	15-10-2014 05-01-2015 13-06-2013 09-03-2017 13-06-2013	
WO 2013009632	A2	17-01-2013	US WO	2014227692 A1 2013009632 A2	14-08-2014 17-01-2013	

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/13 (2015.01)	A 6 1 K 35/13	
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 K 31/44	
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 K 31/437	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許序注：以下のものは登録商標)

1. WINDOWS

(71)出願人	513072271 ユニベルシテート・レーゲンスブルク UNIVERSITAET REGENSBURG ドイツ連邦共和国、93053 レーゲンスブルク、ユニベルシテートシュトラーゼ 31 Universitaetsstrasse 31, 93053 Regensburg, Germany
(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(74)代理人	100186897 弁理士 平川 さやか
(74)代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(72)発明者	クライン,クリストフ ドイツ国 レーゲンスブルク 93049,アイヒエンシュトラーゼ 12エー
(72)発明者	シャイトラー,セバスチャン ドイツ国 レーゲンスブルク 93051,マルティングライフシュトラーゼ 1
(72)発明者	ヴェルナークライン,メラニー ドイツ国 レーゲンスブルク 93049,アイヒエンシュトラーゼ 12エー
(72)発明者	ホフマン,マルティン ドイツ国 レーゲンスブルク 93059,アルテ ニュルンベルガー シュトラーゼ 30
(72)発明者	ホダック,イサベル ドイツ国 ミュンヘン 80993,ヤコブハーゲンバッハーシュトラーゼ 10シー
F ターム(参考)	2G045 AA24 AA26 BA13 BB24 CA18 CB01 CB02 CB09 CB26 DA13 DA36 FA11 FA37 FB02 FB03 FB12 GC15 JA01 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QR72 QR77 QS07 QS12 QX01 4C086 AA01 AA02 BC17 CB05 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26 ZC75 4C087 AA01 AA03 BB63 MA02 NA14 ZB26 ZC75