

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6280206号
(P6280206)

(45) 発行日 平成30年2月14日 (2018. 2. 14)

(24) 登録日 平成30年1月26日 (2018. 1. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 M 1/00 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 F

C 1 2 M 1/00 A

請求項の数 11 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2016-506252 (P2016-506252)	(73) 特許権者	517227297
(86) (22) 出願日	平成26年4月7日 (2014. 4. 7)		ノヴォミクス・カンパニー・リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-516421 (P2016-516421A)		大韓民国・ソウル・ヨンドンポーク・タン
(43) 公表日	平成28年6月9日 (2016. 6. 9)		サンーロ・171・クムガン・ベンテリウ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/002958		ム・アイティー・タワー・タンサンードン
(87) 国際公開番号	W02014/163444		・4ーガ・306ー1、306、305、
(87) 国際公開日	平成26年10月9日 (2014. 10. 9)		304
審査請求日	平成27年12月4日 (2015. 12. 4)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	10-2013-0037334		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成25年4月5日 (2013. 4. 5)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 局所進行性胃癌に対する予後予測システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルで

GART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、F
UCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGC
D、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3
、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL
、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMP
K、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2
、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の
発現度を決定する段階と、

上記段階で決定されたRNA転写体の発現度に基づいて上記生物学的サンプルの危険度点
数 (RS、Risk Score) 及びRS百分率 (RS (%)) を計算し、上記RS (
%) によって予後を予測する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後を予測する
方法。

【請求項2】

RS及びRS (%) は、下記数式1及び2によって計算する、請求項1に記載の方法：
[数式1]

$$RS = HR_1 * normLogTransValue_1 + HR_2 * normLogTra nsValue_2 + \dots + HR_n * normLogTransValue_n$$

[数式 2]

$RS(\%) = 100 \times (\text{生物学的サンプルの } RS - \text{母集団の } RS \text{ 最小値}) / (\text{母集団の } RS \text{ 最高値} - \text{母集団の } RS \text{ 最小値})$

上記式中、

HR_n は、 n 番目 RNA 転写体の危険係数 (hazard ratio) を示し、上記 HR_n が 1 未満の場合、 $-1/HR_n$ に変換して使用し、

$normLogTransValue_n$ は、 n 番目 RNA 転写体の発現と関連した値であり、この値は、当該遺伝子の全体値を対象として中間値を中心にスケールを変化させた値であり、

上記母集団は、TNM 病期分類でリンパ節転移がない T1N0 期、T2N0 期、T3N0 期または T4N0 期の局所進行性胃癌を有する一定数の集団を意味し、一定数は、RS 最高値と最小値を算出することができる程度の任意の整数である。

10

【請求項 3】

上記方法が TNM 病期分類でリンパ節転移がない T1N0 期、T2N0 期、T3N0 期または T4N0 期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記方法は、全体生存率 (Overall Survival、OS) の観点から生物学的サンプルの RS (%) が 50% 以上を有する場合、高危険群、25% 以上～50% 未満の場合、中間危険群、25% 未満の場合、低危険群と予測するものである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルで

GART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4 及び RRM1 の RNA 転写体の発現水準を測定する段階と、

30

上記転写体の発現増加は、肯定的な臨床結果可能性の増加と予測する段階を含む、胃癌として診断された対象で予後を予測する方法。

【請求項 6】

上記方法がアレイ基盤方法である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

上記臨床結果が全体生存率 (Overall Survival、OS) の観点から表現されるものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

上記方法が TNM 病期分類でリンパ節転移がない T1N0 期、T2N0 期、T3N0 期または T4N0 期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するものである、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 9】

胃癌の予後予測を実行するプログラムを記録したコンピュータで読み取り可能な記録媒体において、患者から得た核酸試料で

GART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMP

50

K、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現度を決定する段階と、

上記段階で決定されたRNAの発現度に基づいて上記試料の危険度点数(RS、Risk Score)及びRS百分率(RS(%))を計算し、全体生存率(Overall Survival、OS)の観点から上記RS(%)の設定値の範囲が50%以上を有する場合、高危険群患者、25%以上～50%未満の場合、中間危険群患者、25%未満の場合、低危険群患者に分類する段階とをコンピュータに実行させるプログラムを記録したコンピュータで読み取り可能な記録媒体。

【請求項10】

10

上記RS及びRS(%)は、下記数式1及び2によって計算するものである、請求項9に記載の記録媒体：

〔数式1〕

$$RS = HR_1 * \text{normLogTransValue}_1 + HR_2 * \text{normLogTransValue}_2 + \dots + HR_n * \text{normLogTransValue}_n$$

〔数式2〕

$$RS(\%) = 100 \times (\text{生物学的サンプルのRS} - \text{母集団のRS最小値}) / (\text{母集団のRS最高値} - \text{母集団のRS最小値})$$

上記式中、

HR_n は、 n 番目RNA転写体の危険係数(hazard ratio)を示し、上記 HR_n が1未満の場合、 $-1/HR_n$ に変換して使用し、

20

$\text{normLogTransValue}_n$ は、RNA転写体の発現と関連した値であり、この値は、当該遺伝子の全体値を対象として中間値を中心にスケールを変化させた値であり、

上記母集団は、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌を有する一定数の集団を意味し、一定数は、RS最高値と最小値を算出することができる程度の任意の整数である。

【請求項11】

上記記録媒体は、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するものである、請求項9に記載の記録媒体。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子発現比較分析法を通じて局所進行性胃癌の予後予測が可能な新規な予後予測システムに関する。

【背景技術】

【0002】

胃腺腫(Gastric adenocarcinoma)は、2000年に700、349名の死亡において二番目の原因であって、世界で最も一般的に診断された四番目の癌である。いくつかの力学的及び組織病理学的特徴を有する単一異質的疾患として見なしている。胃癌治療は、主に患者を手術だけで、または手術と化学療法で治療すべきかを決定するTNM(tumor、node、metastasis)病期決定のような臨床的パラメータに基づく。胃癌は、乳房癌と大腸癌などとは異なって、TNM病期システムによって1期から4期まで明確に差異がある。すなわち、1期の場合には、5年生存率が90%以上であり、4期の場合には、20%以下であって、大きい差異を示す。したがって、TNM病期システムの予後予測力に非常に優れていることが分かる[参考文献、7th edition of the AJCC cancer staging Manual:stomach. Ann Surg Oncol 2010;17:3077-3079]。上記病期システムによって、胃癌は、通常、早期胃癌(Early Gastr

40

50

ic Cancer)、局所進行性 (Locally Advanced Gastric Cancer)、局所浸潤性 (Locally Advanced Invasive Gastric Cancer) 及び転移胃癌 (Metastatic Gastric Cancer) などに分けることができる。

【0003】

たとえ手術が実施可能な胃癌の主要治療ではあるが、進行性の場合、再発率が高い。再発を予防し、胃癌患者の予後を改善するために、化学療法と化学放射線療法を含む集学的治療が導入された。しかし、これら治療方法が患者にとって一般的な臨床結果を改善することがあるが、腫瘍の臨床病理学的異質性と、同じ病期にある患者の異なる結果は、アジュバント化学療法の任務を予測するのに限界があり、個別患者に対する最適接近が不足な状態である。

10

【0004】

腫瘍浸潤及びリンパ節転移の深さは、胃癌で2個の主要予後因子である。胃癌患者の50%以上が診断時にリンパ節転移を伴っており、30%未満が5年生存率を有する悪い予後を示す。したがって、胃癌患者からリンパ節転移の正確な分類は、根治胃切除術後の後続治療の決定に根本的に重要である。しかし、リンパ節状態だけでは、手術後の予後結果の異質性及び化学療法薬剤の任務を説明しない。しかも、同じリンパ節病期を含む同じ病期を有する患者も、同じ予後結果を示さない。したがって、固有の臨床的異質性に原因がある腫瘍間の明確な生物学的差異が、胃癌の新しい治療戦略開発のための最も重要な段階である。

20

【0005】

胃癌患者の予後結果に影響を与える生物学的特徴に対する理解は、胃癌が力学及び組織病理学で差異を有する異質的疾患であるから非常に難しい。胃癌の予後結果は、たとえば拡散タイプ及び腸内タイプのように胃癌亜流型を含んで多くの他の予後因子があるが、主に病期によって影響を受ける。しかし、同じ病期であるとしても、異質的な予後結果を有し、これら異質性の大部分が完全に説明されない。同じ病期内で予後結果の差異に原因がある遺伝的特徴の同定は、患者の治療方案を選択するのに非常に重要である。しかし、既に開発された遺伝的特徴の大部分は、再現可能性の不足と治療方案の選択に利用されることができ、情報の不足に起因して臨床で利用されなかった。これら予後の導入を苦しめる他の重要な因子は、これら予後のうちいずれも胃癌患者の予後結果を定義するにあたって、病期を統制できるものがないということである。したがって、同じ病期の患者において予後予測因子の導入が必然的に必要である。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】7th edition of the AJCC cancer staging Manual: stomach. Ann Surg Oncol 2010; 17: 3077-3079

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0007】

本発明の目的は、局所進行性胃癌、特にN0病期 (N0 regional lymph node metastasis) で胃癌患者の臨床結果に影響を与える重要な生物学的特徴を糾明し、遺伝子発現危険度点数 (Risk Score、RS) に基づく新しい予後予測システムを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記目的を達成するために、本発明は、対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルでGART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCAL、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD

50

、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現度を決定する段階と、上記段階で決定されたRNA転写体の発現度に基づいて上記生物学的サンプルの危険度点数(RS、Risk Score)及びRS百分率(RS(%))を計算し、上記RS(%)によって予後を判断する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後を予測する方法を提供する。

【0009】

本発明は、また、対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルでGART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現水準を測定する段階と、上記転写体の発現増加は、肯定的な臨床結果可能性の増加と判断する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後を予測する方法を提供する。

【0010】

上記予後予測方法は、TNM病期分類でT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するものであることができる。

【0011】

本発明は、また、胃癌の予後予測を実行するプログラムを記録したコンピュータで読み取り可能な記録媒体において、患者から得た核酸試料でGART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現度を決定する段階と、上記段階で決定されたRNAの発現度に基づいて上記試料の危険度点数(RS、Risk Score)及びRS百分率(RS(%))を計算し、全体生存率(Overall Survival, OS)の観点から上記RS(%)の設定値の範囲が50%以上を有する場合、高危険群患者、25%以上～50%未満の場合、中間危険群患者、25%未満の場合、低危険群患者に分類する段階とをコンピュータに実行させるプログラムを記録したコンピュータで読み取り可能な記録媒体を提供する。

【0012】

上記記録媒体は、TNM病期分類でT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するものであることができる。

【0013】

上記RS及びRS(%)は、下記数式1及び2によって計算することができる：

【0014】

[数式1]

$$RS = HR_1 * normLogTransValue_1 + HR_2 * normLogTransValue_2 + \dots + HR_n * normLogTransValue_n$$

【0015】

10

20

30

40

50

[数式 2]

$RS(\%) = 100 \times (\text{生物学的サンプルの } RS - \text{母集団の } RS \text{ 最小値}) / (\text{母集団の } RS \text{ 最高値} - \text{母集団の } RS \text{ 最小値})$

【0016】

上記式中、 HR_n は、 n 番目の RNA 転写体の危険係数 (hazard ratio) を示し、上記 HR_n が 1 未満の場合、 $-1/HR_n$ に変換して使用し、

$normLogTransValue_n$ は、RNA 転写体の発現と関連した値であり、この値は、当該遺伝子の全体値を対象として中間値を中心としてスケールを変化させた値であり、

上記母集団は、TNM 病期分類でリンパ節転移がない T1N0 期、T2N0 期、T3N0 期または T4N0 期の局所進行性胃癌を有する一定数の集団を意味し、一定数は、RS 最高値と最小値を算出することができる程度の任意の整数である。

10

【発明の効果】

【0017】

本発明は、TNM 病期のうち N0 期の胃癌患者群に対する全体生存率の観点から予測モデルを作った後、統計的に有意な生存に影響を及ぼす RNA 転写体の発現度を決定し、これから危険度評価システムを作って予後指標値を算出する方式で胃癌手術による切除後の臨床結果を予測することができる。

【0018】

また、本発明は、遺伝子の生物学的機能による遺伝子集合システムを利用することによって、胃癌自体の生物学的機能による遺伝子群の分析が可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図 1a】図 1a～図 1d は、分散濾過後にプローブを使用した unsupervised hierarchical clustering analysis によって作った 2 個の主要クラスターの予後結果を示す図であって、A) は、分散濾過後、unsupervised hierarchical clustering analysis に使用されたプローブの数とクラスタリング分析で生じた 2 個の主要クラスターを使用した log rank test 分析での予後 p 値である。各クラスターは、フィルタリング基準に基づいて命名した。M 以後、一番目の数字は、各プローブの平均値に対するフォールド (fold) の差を表示したものであり、二番目の数字は、一番目の数字で表示されたフォールド差と比べて高いかまたは低い発現を示すプローブの数を表示したものである。例えば、M2_3 は、平均値に対して 2 倍以上の高いかまたは低い発現を示す少なくとも 3 個のサンプルを有するプローブを選択して、分散濾過後にそのプローブを使用して生じたクラスターである。B) は、分散濾過後に 2 個の主要クラスターの患者サンプルの分布である。log rank test で良い予後群と悪い予後群に対して注釈をつけた後、2 個の主要クラスのサンプルのクラスタリング分析である。C) は、M2_5 クラスター患者の Kaplan Meier Plot を示すものである。p 値は、log rank test 後に得たものである。D) は、M3_3 クラスター患者の Kaplan Meier Plot を示すものである。p 値は、log rank test 後に得たものである。

30

40

【図 1b】図 1a～図 1d は、分散濾過後にプローブを使用した unsupervised hierarchical clustering analysis によって作った 2 個の主要クラスターの予後結果を示す図であって、A) は、分散濾過後、unsupervised hierarchical clustering analysis に使用されたプローブの数とクラスタリング分析で生じた 2 個の主要クラスターを使用した log rank test 分析での予後 p 値である。各クラスターは、フィルタリング基準に基づいて命名した。M 以後、一番目の数字は、各プローブの平均値に対するフォールド (fold) の差を表示したものであり、二番目の数字は、一番目の数字で表示されたフォールド差と比べて高いかまたは低い発現を示すプローブの数を表示したものである。例えば、M2_3 は、平均値に対して 2 倍以上の高いかまたは低い発現を示す少なくとも 3 個のサ

50

ンプルを有するプローブを選択して、分散濾過後にそのプローブを使用して生じたクラスタである。B)は、分散濾過後に2個の主要クラスタの患者サンプルの分布である。log rank testで良い予後群と悪い予後群に対して注釈をつけた後、2個の主要クラスタのサンプルのクラスターリング分析である。C)は、M2_5クラスタ患者のKaplan Meier Plotを示すものである。p値は、log rank test後に得たものである。D)は、M3_3クラスタ患者のKaplan Meier Plotを示すものである。p値は、log rank test後に得たのである。

【図1c】図1a～図1dは、分散濾過後にプローブを使用したunsupervised hierarchical clustering analysisによって作った2個の主要クラスタの予後結果を示す図であって、A)は、分散濾過後、unsupervised hierarchical clustering analysisに使用されたプローブの数とクラスターリング分析で生じた2個の主要クラスタを使用したlog rank test分析での予後p値である。各クラスタは、フィルタリング基準に基づいて命名した。M以後、一番目の数字は、各プローブの平均値に対するフォールド(fold)の差を表示したものであり、二番目の数字は、一番目の数字で表示されたフォールド差と比べて高いかまたは低い発現を示すプローブの数を表示したものである。例えば、M2_3は、平均値に対して2倍以上の高いかまたは低い発現を示す少なくとも3個のサンプルを有するプローブを選択して、分散濾過後にそのプローブを使用して生じたクラスタである。B)は、分散濾過後に2個の主要クラスタの患者サンプルの分布である。log rank testで良い予後群と悪い予後群に対して注釈をつけた後、2個の主要クラスタのサンプルのクラスターリング分析である。C)は、M2_5クラスタ患者のKaplan Meier Plotを示すものである。p値は、log rank test後に得たものである。D)は、M3_3クラスタ患者のKaplan Meier Plotを示すものである。p値は、log rank test後に得たのである。

【図1d】図1a～図1dは、分散濾過後にプローブを使用したunsupervised hierarchical clustering analysisによって作った2個の主要クラスタの予後結果を示す図であって、A)は、分散濾過後、unsupervised hierarchical clustering analysisに使用されたプローブの数とクラスターリング分析で生じた2個の主要クラスタを使用したlog rank test分析での予後p値である。各クラスタは、フィルタリング基準に基づいて命名した。M以後、一番目の数字は、各プローブの平均値に対するフォールド(fold)の差を表示したものであり、二番目の数字は、一番目の数字で表示されたフォールド差と比べて高いかまたは低い発現を示すプローブの数を表示したものである。例えば、M2_3は、平均値に対して2倍以上の高いかまたは低い発現を示す少なくとも3個のサンプルを有するプローブを選択して、分散濾過後にそのプローブを使用して生じたクラスタである。B)は、分散濾過後に2個の主要クラスタの患者サンプルの分布である。log rank testで良い予後群と悪い予後群に対して注釈をつけた後、2個の主要クラスタのサンプルのクラスターリング分析である。C)は、M2_5クラスタ患者のKaplan Meier Plotを示すものである。p値は、log rank test後に得たものである。D)は、M3_3クラスタ患者のKaplan Meier Plotを示すものである。p値は、log rank test後に得たのである。

【図2】図2は、分散濾過後、unsupervised hierarchical clustering analysisによって作った2個の主要代表クラスタを示す図である。M2_5に対するクラスターリング分析は、平均値に対して2倍以上の増加または減少を示す少なくとも5個のサンプルを有するプローブをフィルタリングした後、濾過された1556個のプローブで作ったものである。M3_3に対するクラスターリング分析は、平均値に対して3倍以上の増加または減少を示す少なくとも3個のサンプルを有するプローブをフィルタリングした後、濾過された706個のプローブで作ったものである。

【図3】図3は、unsupervised clustering analysis後、2個の主要クラスの比較時に有意的な差異を示す遺伝子及び生物学的特徴を示す図で

10

20

30

40

50

あって、A) は、M2_5のクラスタリング分析によって作った2個の主要クラスの比較で統計的有意 ($p < 0.001$ 及び2倍差、554個のプロープ) を示すプロープを使用した条件付きクラスタリングのヒットマップを示すものである。B) は、M3_3のクラスタリング分析によって作った2個の主要クラスの比較で統計的有意 ($p < 0.001$ 及び2倍差、453個のプロープ) を示すプロープを使用した条件付きクラスタリングのヒットマップを示すものである。

【図4a】図4a及び図4bは、Biocarta経路データベースでM2_5の2個の主要分類群のGSEA結果 (A) であり、Biocarta経路データベースでM3_3の2個の主要分類群のGSEA結果 (B) である。

【図4b】図4a及び図4bは、Biocarta経路データベースでM2_5の2個の主要分類群のGSEA結果 (A) であり、Biocarta経路データベースでM3_3の2個の主要分類群のGSEA結果 (B) である。

【図5a】図5a～図5fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M2_5の各分類群の平均発現水準を示す。

【図5b】図5a～図5fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M2_5の各分類群の平均発現水準を示す。

【図5c】図5a～図5fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M2_5の各分類群の平均発現水準を示す。

【図5d】図5a～図5fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M2_5の各分類群の平均発現水準を示す。

【図5e】図5a～図5fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M2_5の各分類群の平均発現水準を示す。

【図5f】図5a～図5fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M2_5の各分類群の平均発現水準を示す。

【図6a】図6a～図6fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M3_3の各分類群の平均発現水準を示す。

【図6b】図6a～図6fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M3_3の各分類群の平均発現水準を示す。

【図6c】図6a～図6fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M3_3の各分類群の平均発現水準を示す。

【図6d】図6a～図6fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M3_3の各分類群の平均発現水準を示す。

【図6e】図6a～図6fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M3_3の各分類群の平均発現水準を示す。

【図6f】図6a～図6fは、GSEA結果で ($p < 0.001$) 有意的な増加を示す遺伝子の発現を示す図である。ヒットマップは、M3_3の各分類群の平均発現水準を示す。

【図7a】図7a～図7iは、M3_3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プロープは、M3_3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的

10

20

30

40

50

に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC) を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7i に記載されたA～C) は、Training data (YUSHデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D～F) は、検証データ (MDACC data) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G～I) は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7b】図7a～図7i は、M3__3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3__3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC) を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7i に記載されたA～C) は、Training data (YUSHデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D～F) は、検証データ (MDACC data) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G～I) は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7c】図7a～図7i は、M3__3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3__3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC) を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7i に記載されたA～C) は、Training data (YUSHデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D～F) は、検証データ (MDACC data) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G～I) は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7d】図7a～図7i は、M3__3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3__3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC) を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7i に記載されたA～C) は、Training data (YUSHデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D～F) は、検証データ (MDACC data) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G～I) は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7e】図7a～図7i は、M3__3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3__3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC) を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7i に記載されたA～C) は、Training data (YUSHデータ) の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D～F) は、検証データ (MDACC data) の予測された結果のKaplan Meier P

lotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7f】図7a～図7iは、M3_3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3_3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D-F)は、
10
検証データ(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7g】図7a～図7iは、M3_3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3_3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)
20
の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D-F)は、検証データ(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7h】図7a～図7iは、M3_3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3_3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7
30
a～図7iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D-F)は、検証データ(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図7i】図7a～図7iは、M3_3の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示す図である。プローブは、M3_3クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証
40
を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図7a～図7iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すのである。D-F)は、検証データ(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図8a】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、
50

LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data (YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data (MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図8b】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data (YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data (MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

10

【図8c】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data (YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data (MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

20

30

【図8d】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data (YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data (MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ (YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

40

【図8e】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる ($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム (CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data (YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data (MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ (YUS

50

Hデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

【図8f】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

10

【図8g】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

20

【図8h】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

30

【図8i】図8a～図8iは、M2_5の分類群によるNO胃癌患者の予後予測を示すのである。プローブはM2_5クラスタによって定義された2個のクラスの比較で有意的に異なる($p < 0.001$)。この分析のために3個の異なる予測アルゴリズム(CCP、LDA、及びNC)を使用した。各モデルの予測エラーを推定するために単一残留交差検証を使用した。予後的差異は、log rank testを使用して推定した。図8a～図8iに記載されたA-C)は、Training data(YUSHデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。D-F)は、Validation data(MDACC data)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。G-I)は、全体サンプルデータ(YUSHデータ及びMDACCデータ)の予測された結果のKaplan Meier Plotを示すものである。

40

【図9a】図9a及び図9bは、NO胃癌患者の予後結果でCGAPによってあらかじめ定められた機能的遺伝子分類の影響を示す図であって、図9a及び図9bに記載されたA)は、YUSH、MDACC及び全体データセットでCGAPによって機能的に分類された遺伝子の予後結果である。unsupervised hierarchical

50

clustering analysisは、CGAPの機能的遺伝子分類で当該遺伝子を利用して行った。主要クラスタの予後的差異は、log rank testによって比較した。log rank testのp値は、ログp値に変化させ、棒グラフで示す。B)は、各機能的遺伝子分類で主要クラスタの差を示す生物学的特徴である。GSEAを行い、GSEAの統計的有意をログp値で示す。

【図9b】図9a及び図9bは、NO胃癌患者の予後結果でCGAPによってあらかじめ定められた機能的遺伝子分類の影響を示す図であって、図9a及び図9bに記載されたA)は、YUSH、MDACC及び全体データセットでCGAPによって機能的に分類された遺伝子の予後結果である。unsupervised hierarchical clustering analysisは、CGAPの機能的遺伝子分類で当該遺伝子を利用して行った。主要クラスタの予後的差異は、log rank testによって比較した。log rank testのp値は、ログp値に変化させ、棒グラフで示す。B)は、各機能的遺伝子分類で主要クラスタの差を示す生物学的特徴である。GSEAを行い、GSEAの統計的有意をログp値で示す。

【図10a】図10a～図10cは、危険度評点システムの百分率の形成を示す図である。図10a～図10cに記載されたA)は、予測モデルとCGAPの機能的遺伝子分類によって定義された死亡率のヒットマップを示すものである。すべてのサンプルは、分類群またはクラスタによって定義された各分類群の死亡率で注釈をつけて、予後結果で患者分布と機能的生物学の各分類の影響をチェックするために、unsupervised clustering analysisを行った。B)は、全体サンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。C)は、YUSHサンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。D)は、MDACCサンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。E-G)は、3個の異なるデータセット(YUSH、MDACC及び全体サンプルデータセット)で%危険度点数として定義された3個の異なる危険群(High、Intermediate and Low Risk Group)のKaplan Meier Plotを示すのである。3個の異なる危険群間の予後的差異の有意性は、log rank testによって定義した。

【図10b】図10a～図10cは、危険度評点システムの百分率の形成を示す図である。図10a～図10cに記載されたA)は、予測モデルとCGAPの機能的遺伝子分類によって定義された死亡率のヒットマップを示すものである。すべてのサンプルは、分類群またはクラスタによって定義された各分類群の死亡率で注釈をつけて、予後結果で患者分布と機能的生物学の各分類の影響をチェックするために、unsupervised clustering analysisを行った。B)は、全体サンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。C)は、YUSHサンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。D)は、MDACCサンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。E-G)は、3個の異なるデータセット(YUSH、MDACC及び全体サンプルデータセット)で%危険度点数として定義された3個の異なる危険群(High、Intermediate and Low Risk Group)のKaplan Meier Plotを示すのである。3個の異なる危険群間の予後的差異の有意性は、log rank testによって定義した。

【図10c】図10a～図10cは、危険度評点システムの百分率の形成を示す図である。図10a～図10cに記載されたA)は、予測モデルとCGAPの機能的遺伝子分類によって定義された死亡率のヒットマップを示すものである。すべてのサンプルは、分類群またはクラスタによって定義された各分類群の死亡率で注釈をつけて、予後結果で患者分布と機能的生物学の各分類の影響をチェックするために、unsupervised clustering analysisを行った。B)は、全体サンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。C)は、YUSHサンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。D)は、MDACCサンプルデータセットで各患者の危険度点数の百分率である。E-G)は、3個の異なるデータセット(YUSH、MDACC及び全体サンプルデータセット)で%危険度点数として定義された3個の異なる危険群(H

10

20

30

40

50

igh、Intermediate and Low Risk Group) のKaplan Meier Plotを示すのである。3個の異なる危険群間の予後的差異の有意性は、log rank testによって定義した。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明の構成を具体的に説明する。

本発明者は、リンパ節転移がない相対的に初期病期で胃癌患者の予後的差異に原因がある主要生物学的特徴を定義するために、リンパ節転移がない患者から全体ゲノム遺伝子発現プロファイルを作った。このために、フィルタリング基準を変えながら連続分散濾過後に unsupervised hierarchical clustering analysis 方法を適用した。予後結果は、クラスタリング分析によって定義された2個の主要分類群に対して log rank test を使用して推定した。各癌患者の全体生物学的特徴を示す遺伝子を利用した自律分析であるから、それぞれ異なる予後群を示す生物学的特徴は、予後的差異に原因がある主要生物学的特徴であり、治療方案の開発のための潜在的標的に利用されることができる。

【0021】

分析結果、NO病期の胃癌患者の予後的差異に主に原因がある2個の異なる生物学的特徴（細胞増殖及び免疫反応）が同定され、これら2個の生物学的特徴は、分散濾過に基づく分類群またはCGAPの機能的遺伝子分類と関係なく、一般的にかなり保存されている。細胞増殖及び免疫活性化の生物学的特徴を示すこれら分類群の検証は、独立データセットで行い、log rank test で Training data set と類似の予後結果を示す。単一残留交差検証法で訂正予後比を実験した結果、分類群のタイプと予後予測アルゴリズムによって85～96%の範囲を示す。良い予後群で細胞増殖関連遺伝子の発現が増加した結果は、正常細胞と比べて大部分の癌細胞でさらに高い増殖率を有しているため、予想しない結果であった。しかし、初期胃癌の細胞増殖は、進行性病期の胃癌より格別に強力であり、細胞特徴が幹細胞特徴の獲得及び転移潜在力が変化中であると推測される。高い細胞増殖率を有する患者の良い予後結果を説明することができる他の要因として、化学療法薬剤の責任をあげることができる。化学療法薬剤治療を受けた患者で細胞増殖特徴の高い発現を有する患者は、予想したとおり、良い反応を示す。しかし、化学療法薬剤治療を受けない患者は、化学療法薬剤治療を受けた患者と類似の細胞増殖特徴の高い発現を有するときのみ、良い予後結果を示すので、MDACC検証データセットの予後結果は、このような考えを裏付けない。したがって、高い増殖特徴発現を有する良い予後結果に対する理由は、化学療法薬剤の感受性だけでなく、高い細胞増殖生物学を反映する生理的差異にある。

【0022】

リンパ節浸潤がない胃癌患者の良い予後に対する免疫活性化特徴の影響に対する発見は、免疫活性化、特に癌患者の治療でCTLの活性化状態の重要な役目を立証したものである。免疫反応の有意的な役目は、胃癌でダウストリーム非センチネルリンパ節転移と関連したセンチネルリンパ節で高いFoxp3陽性調節T細胞密度を提供する胃癌で既に報告されたことがある。腫瘍進行調節で免疫活性化の重要な役目は、いくつかの論文で報告されたことがあり、一般的に多くの癌腫で異なる治療方案として受け入れられている。致死量の放射線の照射とワクチン処理による活性免疫治療、GMCSFを分泌するように製作された自家腫瘍細胞及び細胞毒性Tリンパ球-結合抗原-4 (CTLA-4) の抗体遮断は、腫瘍新生血管形成を標的化して腫瘍脈管構造を崩壊させた。免疫耐性、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞に対する主要メカニズムとして腫瘍捕獲 (co-opt) 特定免疫チェックポイント経路は既に知られている。T細胞反応の劇的な拡大及び品質は、T細胞受容体による抗原認知を通じて開始され、共同刺激及び抑制信号間の均衡によって調節される。共同調節受容体の作用剤及び抑制信号の拮抗剤は、両方共に抗原特異T細胞反応を増幅させ、免疫チェックポイントの遮断は、ヒト癌の治療時に抗腫瘍免疫反応の潜在力を示す。特に、CTLA-4は、重要な免疫-チェックポイント受容体であり、T細胞活性化

の大きさを下向き調節する。CTLA-4抗体は、免疫治療剤として米国FDAで承認を受け、拮抗的CTLA4抗体を利用した臨床研究は、進行性黒色腫患者で生存長所を立証した。したがって、拮抗的CTLA4抗体を胃癌患者治療に導入することは、初期NO患者で悪い予後結果を有する患者のための他の治療方案であることができる。本発明で明らかにした遺伝的特徴は、治療方案のための正しい患者を選択するためのガイド役目をすることができる。

【0023】

本発明者は、主に細胞増殖と関連した特徴と免疫反応と関連した特徴で構成された2個の異なる生物学的特徴がNO病期の胃癌患者の予後結果に原因がある主要生物学的特徴であることを立証した。これら発見に基づいて、本発明者は、胃癌患者で免疫治療の導入とこれら治療のための患者選択時に免疫治療のための最大利点を得るためには、遺伝的特徴に基づかなければならないことを提案する。

10

【0024】

したがって、本発明は、対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルでGART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CNCB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRPI、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現度を決定する段階と、上記段階で決定されたRNA転写体の発現度に基づいて上記生物学的サンプルの危険度点数(RS、Risk Score)及びRS百分率(RS(%))を計算し、上記RS(%)によって予後を判断する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後を予測する方法を提供する。

20

【0025】

本発明による予後を予測する方法は、胃癌患者の臨床結果を支配する2つの主要生物学的特徴である免疫活性化及び細胞増殖に関連した遺伝子のうちCGAP(Cancer Genome Anatomy Project)で発見される機能的に分類された遺伝子群(functional categorized gene group)でCox回帰分析で統計的有意($p < 0.001$)を有する遺伝子を予後と関連した遺伝子対象に選定し、上記遺伝子の危険係数(hazard ratio)を遺伝子の発現値に乗算し、下記数式1及び2によって危険度点数(RS、Risk Score)及びRS百分率(RS(%))を求めた後、全体生存率(Overall Survival、OS)の観点から上記RS(%)が50%以上を有するサンプルを高危険群、25%以上～50%未満の場合、中間危険群、25%未満の場合、低危険群に分類することによって、胃癌として診断された対象で予後を予測することができることを特徴とする。

30

【0026】

上記RS及びRS(%)は、下記数式1及び2によって計算することができる：

【0027】

40

[数式1]

$$RS = HR_1 * \text{normLogTransValue}_1 + HR_2 * \text{normLogTransValue}_2 + \dots + HR_n * \text{normLogTransValue}_n$$

【0028】

[数式2]

$$RS(\%) = 100 \times (\text{生物学的サンプルのRS} - \text{母集団のRS最小値}) / (\text{母集団のRS最高値} - \text{母集団のRS最小値})$$

【0029】

上記式中、 HR_n は、n番目RNA転写体の危険係数(hazard ratio)を示し、上記 HR_n が1未満の場合、 $-1/HR_n$ に変換して使用し、

50

$\text{normLogTransValue}_n$ は、RNA転写体の発現と関連した値であり、この値は、当該遺伝子の全体値を対象として中間値を中心にスケールを変化させた値であり、

上記母集団は、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌を有する一定数の集団を意味し、一定数は、RS最高値と最小値を算出することができる程度の任意の定数である。

【0030】

上記母集団の数は、特に制限されず、一具体例では、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌組織158個を母集団として使用した。

10

【0031】

上記式中、用語、危険係数(Hazard ratio:HR)とは、癌の進行、再発、または療法反応に対する寄与度を反映する係数を意味する。危険係数は、多様な統計的技法によって導出されることができる。上記危険係数、HR値は、多様な統計的モデルで決定することができ、例えば、多変量Cox比例危険回帰分析で決定することができる。一具体例で、HR値をRS数式に使用するにあたって、HR値が1より大きい場合は同一である場合、HR値をそのまま使用し、HR値が1より小さい場合、 $-1/HR$ 値を使用することができる。

【0032】

また、上記式中、用語、RNA転写体の発現値というのは、個別遺伝子、すなわちRNA転写体の発現と関連した値を意味する。上記値は、公知された多様な統計的手段を使用して決定することができる。例えば、発現値は、Cox回帰分析によって測定されたp値を $\log_2$ 関数値に変形した後、四分位数標準化(quantile normalization)後の値を使用することができる。上記数式1で使用された発現値は、当該遺伝子の全体値を対象として中間値を中心にスケールを変化させた値を使用した。

20

【0033】

一具体例によれば、RSは、次のように決定することができる：

$$\begin{aligned} RS = & -GART \times 3.584 + PTN \times 3.631 - PCNA \times 2.7027 + GLI \\ & 3 \times 4.073 + SMARCD3 \times 2.266 - SULT1A3 \times 3.278 + ILK \times \\ & 2.251 - FUCA1 \times 2.80899 + PKD1 \times 2.827 - TOP2A \times 1.7 \\ & 668 + ABL1 \times 2.784 - CKS2 \times 1.9685 + FZD1 \times 4.302 - TI \\ & AL1 \times 4.2553 + SGCD \times 2.494 - PIGF \times 2.6525 - CCNB1 \times \\ & 2.4272 - CSK \times 3.2573 + CRYAB \times 1.524 + TPM1 \times 2.975 \\ & - RFC4 \times 2.817 + GUCY1B3 \times 2.801 - TYMS \times 2.0617 - FE \\ & N1 \times 2.3148 + GNAI1 \times 2.758 + CSRP1 \times 1.642 - UNG \times 2. \\ & 695 + AXL \times 2.018 + MAP1 \times B1.705 + VCL \times 2.478 + ITGA \\ & 5 \times 1.642 - LIG1 \times 2.841 - HPRT1 \times 2.95 - GRB2 \times 3.636 \\ & - HMMR \times 1.98 - MCM4 \times 2.02 + SRF \times 2.287 + DMPK \times 1.92 \\ & 5 - ACP5 \times 2.551 - CD38 \times 2.16 - PRIM1 \times 3.003 - CCNF \times \\ & 2.024 + GLRB \times 2.138 - IFNAR2 \times 3.717 + HSPA2 \times 1.73 \\ & 4 - CLN3 \times 2.445 - BUB1 \times 1.74 + CALM1 \times 2.839 - CDC2 \times \\ & 1.562 + ATF4 \times 5.677 - RRM1 \times 3.717 \end{aligned}$$

30

40

【0034】

上記数式1によって計算されたRSは、上記数式2によってRS(%)で示すことができる。

上記で決定された値を母集団で該当する順位に変換して全体生存率(Overall Survival, OS)の観点から上記RS(%)が50%以上を有するサンプルを高危険群、25%以上～50%未満の場合、中間危険群、25%未満の場合、低危険群に分類する。高危険群は、悪い予後、低危険群は、良い予後であると判断することができる。すなわち、RS(%)値が50%以上を有するサンプルを、高危険群は3年以上、6年以上

50

、10年以上の期間の間に全体生存率が低いことを意味し、25%未満の低危険群は、3年以上、6年以上、10年以上の間に全体生存率が高いことを意味する。上記用語、良い予後は、臨床結果の肯定的臨床結果可能性の増加で表現されることができ、悪い予後は、臨床結果の肯定的臨床結果可能性の減少で表現されることができる。

【0035】

上記方法は、TNM病期のうちN0期の胃癌患者群、例えば、T1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するのに有用であることができる。

【0036】

本発明の予後予測方法に使用された上記遺伝子は、免疫反応と細胞増殖に関与する遺伝子セットに分けることができ、良い予後群では、統計的に有意に発現が増加する。

10

【0037】

免疫反応に関与する遺伝子セット：GART、PTN、SULT1A3、FUCA1、PKD1、ABL1、TIAL1、SGCD、PIGF、CSK、CRYAB、TPM1、GUCY1B3、GNAI1、CSRP1、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、CD38、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、ATF4及びRRM1

細胞増殖／DNA復旧に関与する遺伝子セット：PCNA、GLI3、SMARCD3、ILK、TOP2A、CKS2、FZD1、CCNB1、RFC4、TYMS、FEN1、UNG、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、PRIM1、CCNF、CALM1及びCDC2

20

【0038】

上記免疫反応に関与する遺伝子セットは、主に抗原プロセッシングと提示（MHC経路）及びIFNガンマ信号伝達経路と、その他、Th1／Th2分化（TH1TH2経路）、標的細胞に対するCTL媒介免疫反応（CTL経路）、NK細胞でNO2依存性IL12経路（NO2IL12経路）、T細胞活性化でTobの役目（TOB1経路）、Th1発達時にIL12及びStat4依存的信号伝達経路（IL12経路）及びT細胞毒性細胞表面分子（T細胞毒性経路）と関連がある。

【0039】

上記細胞増殖／DNA復旧に関与する遺伝子セットは、癌感受性（ATR BRCA経路）でBRCA1、BRCA2及びATRの役目、DNA損傷（cdc25経路）に対する反応でcdc25及びchk1調節経路、サイクリン及び細胞周期調節（細胞周期経路）、サイクリンE破壊経路（FBW7経路）、細胞周期：G1／Sチェックポイント（G1経路）、細胞周期：G2／Mチェックポイント（G2経路）、CDK調節（MCM経路）、細胞周期進行中にp27リン酸化調節（P27経路）、細胞周期を調節するSonic Hedgehog（SHH）受容体Ptc1（PTC1経路）、DNA損傷に対する反応でRB腫瘍抑制子／チェックポイント信号伝達（RB経路）、及びE2F1破壊経路（SKP2E2F経路）と関連がある。

30

【0040】

本発明は、また、対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルで

40

GART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRP1、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現水準を測定する段階と、

上記転写体の発現増加は、肯定的な臨床結果可能性の増加と判断する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後を予測する方法を提供する。

50

【0041】

上記方法は、アレイ基盤方法であることができる。

【0042】

上記発現水準が1つ以上のRNA転写体の発現水準に対して標準化されるものであることができる。

【0043】

上記臨床結果が全体生存率（Overall Survival、OS）の観点から表現されるものであることができる。

【0044】

上記方法は、RNA転写体全体の発現水準を測定し、発現増加を分析して、肯定的な臨床結果可能性の増加または減少を判断して予後を予測することができる。

10

【0045】

上記方法は、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するのに有用であることができる。

【0046】

本発明は、また、患者から得た核酸試料で

GART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCAL、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRPI、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現度を決定する段階と、

20

上記段階で決定されたRNAの発現度に基づいて上記試料の危険度点数（RS、Risk Score）及びRS百分率（RS（％））を計算し、全体生存率（Overall Survival、OS）の観点から上記RS（％）の設定値の範囲が50％以上を有する場合、高危険群患者、25％以上～50％未満の場合、中間危険群患者、25％未満の場合、低危険群患者に分類する段階とをコンピュータに実行させるプログラムを記録したコンピュータで読み取り可能な記録媒体を提供する。

30

【0047】

上記記録媒体は、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するのに有用な媒体を提供することができる。

【0048】

上記RS及びRS（％）は、上記数式1及び2によって計算することができる。

【0049】

上記記録媒体は、全体生存率（Overall Survival、OS）の観点からRS（％）の設定値の範囲が50％以上を有する場合、高危険群、25％以上～50％未満の場合、中間危険群、25％未満の場合、低危険群と判断することができる。すなわち、RS（％）値が50％以上を有するサンプルを、高危険群は3年以上、6年以上、10年以上の期間の間に全体生存率が低いと判断し、25％未満の低危険群は、3年以上、6年以上、10年以上の間に全体生存率が高いと判断する。上記用語、良い予後は、臨床結果の肯定的臨床結果可能性の増加で表現されることができ、悪い予後は、臨床結果の肯定的臨床結果可能性の減少で表現されることができ。

40

【0050】

別途定義が無い限り、本願に使用された技術及び科学用語は、当業者の水準で一般的に理解するような意味がある。本発明は、いずれの方式でも、説明された方法及び材料に制限されない。本発明の目的上、下記用語が以下で定義される。

50

【0051】

用語、「マイクロアレイ (micro array)」は、基質上の混成化可能なアレイ構成要素、好ましくは、ポリヌクレオチドプローブの規則的な配置を言う。

【0052】

用語、「ポリヌクレオチド」は、一般的に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを言い、例えば変形または非変形RNAまたはDNAであることができる。本明細書で、「ポリヌクレオチド」は、具体的にcDNAを含む。

【0053】

用語、「オリゴヌクレオチド」は、非制限的に一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖または二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド及び二本鎖DNAを含む、比較的短いポリヌクレオチドを言う。オリゴヌクレオチド、例えば一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドは、例えば商業的に入手可能な自動化オリゴヌクレオチド合成器を使用する化学的方法によって合成されることがある。しかし、オリゴヌクレオチドは、試験管内の再組換えDNA-媒介技術を含む各種他の方法によって及び細胞及び有機体中でのDNA発現によって製造されることができる。

【0054】

用語、「差等的に発現された遺伝子」または「差等的な遺伝子発現」は、正常または対照用対象体の発現に比べて胃癌のような癌を病む対象体のうちさらに高いかまたは低い水準に活性化される遺伝子を言う。また、同一の疾病の異なる病期でさらに高いかまたは低い水準に活性化される遺伝子を含む。差等的に発現される遺伝子は、核酸水準またはタンパク質水準で活性化または抑制されるか、異なるスプライシングを受けて、異なるポリペプチド産物を引き起こす場合であることができる。このような差異は、例えばポリペプチドのmRNA水準、表面発現、分泌または他の分配における変化によって立証されることができる。本発明の目的上、「差等的な遺伝子発現」は、正常及び疾病にかかった対象体で、または疾病にかかった対象体の多様な病期で与えられた遺伝子の発現の間に約1.5倍以上、約4倍以上、約6倍以上、約10倍以上の差異があるときに存在するものと見なされる。

【0055】

遺伝子転写体または遺伝子発現生成物に関する用語「標準化された」は、基準遺伝子セットの転写体/生成物の平均水準に対する転写体または遺伝子発現生成物の水準を言い、ここで、レファレンス遺伝子は、患者、組織または治療にわたってこれらの最小限の変動に基づいて選択されるか（「ハウスキーピング遺伝子 (housekeeping genes)」）、またはレファレンス遺伝子は、試験された遺伝子全体を言う。後者の場合、一般的に「全体標準化 (global normalization)」と言及され、試験された遺伝子の総数が比較的大きい、好ましくは、50超過であることが重要である。具体的に、RNA転写体に関する用語「標準化された」は、基準遺伝子セットの転写水準の平均に対する転写水準を言う。

【0056】

用語、「発現閾値」及び「定義された発現閾値」は、混用して使用し、この水準以上では、遺伝子または遺伝子生成物が患者反応に対する予測マーカーとして使用される当該遺伝子または遺伝子生成物の水準を言う。閾値は、代表的に臨床的研究から実験的に定義される。発現閾値は、最大敏感性、または最大選択性（例えば1つの薬物に対する反応者だけを選択するように）、または最小誤差で選択されることができる。

【0057】

用語、「遺伝子増幅」は、特定細胞または細胞株で遺伝子または遺伝子断片の多数個の複製物が形成される過程を言う。複製された領域（増幅されたDNAの伸長）は、「アンプリコン」と言及されることがある。生産されたmRNAの量、すなわち遺伝子発現度は、また、特定遺伝子の作られた複製数に比例して増加する。

【0058】

本明細書で、「予後」は、本願で癌による死亡または胃癌のような新生物性疾患の進行（

10

20

30

40

50

再発、転移性拡散及び耐薬物性を含む)の可能性の予測を言うのに使用される。用語「予測」は、本願で患者が主要腫瘍の手術除去後に癌再発なしに特定の期間の間に生存するようになる可能性を言うのに使用される。このような予測は、任意の特定患者に対して最も適切な治療技法を選択することによって、治療を決定するのに臨床的に使用されることができる。このような予測は、患者が治療摂生、例えば手術施術に対して有利に反応しやすいか、または手術終了後に患者の長期間生存が可能であるかを予測するのにあたって、貴重な手段になる。用語、「予後指標」は、「危険度点数」と混合されて使用されることができる。

【0059】

他に指示しない限り、分子生物学(再組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学及び生化学の従来技術を使用して本発明を行うことができる。

【0060】

1. 遺伝子発現プロファイル作成 (Profiling)
遺伝子発現プロファイル作成方法は、ポリヌクレオチドの混成化分析に基づく方法、ポリヌクレオチドの配列化に基づく方法、及びプロテオミクス基盤方法を含む。例えばmRNA発現の定量化のための方法は、ノーザンブロッティング (northern blotting) 及びインサイチュ ハイブリダイゼーション (in situ hybridization); RNAse保護検定試験; 及びPCR基盤方法、例えば逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) などを含む。または、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖またはDNA-タンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖を認識することができる抗体が使用されることができる。配列化基盤遺伝子発現分析で代表的な方法は、遺伝子発現の連続分析 (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) 及び大量並行シグネチャー配列化 (massively parallel signature sequencing, MPSS) による遺伝子発現分析を含む。

【0061】

2. マイクロアレイ
新鮮なまたはパラフィンに包埋された腫瘍組織で癌関連遺伝子の発現プロファイルを測定することができる。この方法では、関心を有する配列 (cDNA及びオリゴヌクレオチド含み) をマイクロチップ基板上にプレーティングまたは配列させる。配列された配列を引き続いて関心を有する細胞または組織からの特定DNAプローブと混成化させる。RT-PCR方法と同様に、mRNAの供給源は、通常、ヒトの腫瘍または腫瘍細胞株、及び対応する正常組織または細胞株から単離された全体RNAである。したがって、RNAは、各種主要腫瘍または腫瘍細胞株から単離されることができる。マイクロアレイ技術は、cDNAクローンのPCR増幅された挿入物を緻密なアレイで基板上に提供する。好ましくは、10,000以上のヌクレオチド配列を基板に加える。10,000エレメントそれぞれでマイクロチップ上に固定化された微細配列された遺伝子が厳格な条件下での混成化に適している。蛍光的に標識されたcDNAプローブが関心を有する組織から抽出されたRNAの逆転写によって蛍光ヌクレオチドの混入を通じて生成されることができる。チップに加えられた標識されたcDNAプローブは、アレイ上のDNA各スポットに特異性を有するように混成化される。非特異的に結合されたプローブを除去するための厳格な洗浄後、チップを同一焦点レーザー顕微鏡によってまたは他の検出方法、例えばCCDカメラによって走査する。各配列されたエレメントの混成化に対する定量化は、対応するmRNA過多の評価を可能にする。二重色蛍光の場合、2個のRNA供給源から生成された別途に標識されたcDNAプローブがアレイに各対別に混成化される。したがって、各明示された遺伝子に対応する2個の供給源からの転写体の相対的過多が同時に決定される。小型化規模の混成化が多い数の遺伝子に対する発現パターンの便利で且つ迅速な評価を提供する。このような方法は、稀な転写体 (これは、細胞当たり少数個の複製物に発現される) を検出するのに、及び発現度において少なくとも略2倍の差異で再現可能に検出するのに必要な感受性を有するものと現われた。マイクロアレイ分析は、商業的に入手可能な装備

10

20

30

40

50

によって製造業社のプロトコルによって、例えばアフィメトリクスジーンチップ (Affymetrix GeneChip) 技術またはインサイト (Incyte's) マイクロアレイ技術を使用して行われることができる。

【0062】

3. mRNA単離、精製及び増幅の一般的な説明

パラフィンに包埋された組織を使用して遺伝子発現プロファイルを作成する技術は、前述した通りである。最終的に得られたデータを分析して観察された腫瘍サンプルで確認された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて患者に利用することができる最上の治療選択事項を判別する。

【0063】

本発明の重要な面は、胃癌組織による特定遺伝子の測定された発現を使用して予後情報を提供するものである。このような目的のために、検定試験されたRNAの量、使用されたRNA品質における変動、及び他の因子、例えば機械及び作業者の差異における差異に対して補正する (標準化) ことが必須である。したがって、検定試験は、通常、GAPD及びACTBのような公知されたハウスキーピング遺伝子から転写されたものを含む、基準RNAの使用を測定して混入させる。遺伝子発現データを標準化するための正確な方法は、文献 [“User Bulletin #2” for the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems; 1997)] に提供される。または、標準化は、検定試験された遺伝子またはこれらの多くのサブセット全部の平均または中間信号 (Ct) を基準とすることができる (全体標準化接近法)。下記実施例に説明された研究では、中心標準化戦略を使用した。これは、標準化のために臨床的成果との相関性不足に基づいて選択されたスクリーニングされた遺伝子のサブセットを利用した。

【0064】

用語、「トレーニングセット (Training set)」というのは、予後に統計的に有意なRNA転写体を抽出した対象サンプルを意味する。

【0065】

用語、「検証セット (Validation set)」または「テストセット (Test set)」というのは、上記抽出された変数が実際に予後の良し悪しを判断することができる正確度をテストするセットを意味する。このような方法を使用する理由は、特定サンプル群だけで効果的に予後判断能力があるものではなく、独立的サンプルでも効能があることを判断するためである。

【0066】

4. 再発に対する危険度点数及びこれらの応用

胃癌再発の可能性に対する癌予後方法を区分づける演算の特徴は、1) 再発可能性を測定するのに使用された独特の試験mRNAsセット (または対応する遺伝子発現生成物)、2) 発現データを式で合わせるのに使用された特定加重値、及び3) 患者を異なる水準の危険を有する群、例えば低、中間及び高危険群に分けるのに使用された閾値を含む。この演算は、数値的な危険度点数 (RS) 及びRS (%) を算出する。

【0067】

試験は、明示されたmRNAまたはこれらの発現生成物の水準を測定するための実験室検定試験を必要とするが、新鮮な組織であるかまたは冷凍された組織、または既に必ず患者から収集され保管されている固定されてパラフィンに埋め込まれた腫瘍生検の試験片を非常に少量で利用することができる。したがって、試験は、非侵入性であることができる。例えばコア生検または微細針吸引を通じて収獲された腫瘍組織のいくつかの異なる方法と併用性であってもよい。

【0068】

この方法によれば、癌危険度点数 (RS) は、

(a) 上記対象体から得た癌細胞を含む生物学的サンプルで遺伝子またはタンパク質発現プロファイルを作成し;

(b) 多数個の個別遺伝子の発現度、すなわち、mRNA水準を定量化して各遺伝子に対する発現値を定め；

(c) それぞれ癌－関連生物学的関数によって及び（または）同時発現によって連結された遺伝子に対する発現値を含む、遺伝子発現値のサブセットを生成させ；

(d) 1サブセット内の各遺伝子の発現度に上記サブセット内での当該癌再発反応に対する相対的寄与度を反映する係数を乗算し、乗算した値を加算し、上記サブセットに対する値を算出し；

(e) 各サブセットの値に当該癌再発反応に対する寄与度を反映する係数を乗算し；

(f) 上記係数を乗算した各サブセットに対する値の和を求め、

危険度点数（RS）及びRS（％）を得ることによって決定され、ここで、癌再発と線形相関関係を示さない各サブセットの寄与度は、ただ所定の閾値以上だけで含まれ、

明示された遺伝子の増加された発現が癌再発危険を減少させるサブセットには、負の値を付与し、明示された遺伝子の発現が癌再発危険を増加させるサブセットには、正の値を付与する。

【0069】

具体的な実施態様で、RS及びRS（％）は、

(a) GART、PTN、PCNA、GLI3、SMARCD3、SULT1A3、ILK、FUCA1、PKD1、TOP2A、ABL1、CKS2、FZD1、TIAL1、SGCD、PIGF、CCNB1、CSK、CRYAB、TPM1、RFC4、GUCY1B3、TYMS、FEN1、GNAI1、CSRPI、UNG、AXL、MAP1B、VCL、ITGA5、LIG1、HPRT1、GRB2、HMMR、MCM4、SRF、DMPK、ACP5、CD38、PRIM1、CCNF、GLRB、IFNAR2、HSPA2、CLN3、BUB1、CALM1、CDC2、ATF4及びRRM1のRNA転写体の発現度を測定し、

(b) 下記数式1及び2によって危険度点数（RS）及びRS（％）を計算することによって決定される：

【0070】

[数式1]

$$RS = HR_1 * normLogTransValue_1 + HR_2 * normLogTransValue_2 + \dots + HR_n * normLogTransValue_n$$

【0071】

[数式2]

$$RS(\%) = 100 \times (\text{生物学的サンプルのRS} - \text{母集団のRS最小値}) / (\text{母集団のRS最高値} - \text{母集団のRS最小値})$$

【0072】

上記式中、

HR_n は、 n 番目RNA転写体の危険係数（hazard ratio）を示し、上記 HR_n が1未満の場合、 $-1/HR_n$ に変換して使用し、

$normLogTransValue_n$ は、RNA転写体の発現と関連した値であり、この値は、当該遺伝子の全体値を対象として中間値を中心にスケールを変化させた値であり、

上記母集団は、TNM病期分類でリンパ節転移がないT1N0期、T2N0期、T3N0期またはT4N0期の局所進行性胃癌を有する一定数の集団を意味し、一定数は、RS最高値と最小値を算出することができる程度の任意の定数である。

【0073】

ここで、RS（％）値が50％以上なら、悪い予後であり、25％未満なら、良い予後であると判断する。

【発明の実施のための形態】

【0074】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。但し、下記実施例は、本発明を例示する

10

20

30

40

50

ものに過ぎず、本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

【0075】

〈製造例〉 予後予測対象の選定及び実験設計

予後予測対象を選定するために、1999年から2006年まで延世大学セブランス病院で一次治療で胃切除術を受けた胃腺腫患者（YUSH、n=78）から腫瘍標本及び臨床データを得た。すべてのサンプルは、患者から詳細に記載された同意書を受けた後、収集し、研究は、延世大学セブランス病院の調査倫理委員会の承認を受けた。臨床データは、溯及して得た。全体生存期間は、手術から死亡に至る時間と定め、データは、患自が最後の接触時に生きているとき、検閲を受けたものと見なした。YUSHデータは、予後結果に主に原因がある生物学的特徴を糾明し、トレーニングデータセット（Training data set）を利用して予後予測モデルを開発するのに使用した。

10

【0076】

予後予測モデル及び危険度評点システムの検証のために、本発明では、MDアンダーソン癌センターで作った遺伝子発現プロファイルを使用した。腫瘍標本及び臨床データは、1999年から2006年まで延世大学セブランス病院、高麗大学九老病院及び高神大学医科大学で一次治療で胃切除術を受けた胃腺腫患者から得た。すべてのサンプルは、患者から詳細に記載された同意書を受けた後、収集し、研究は、MDエンドス癌センターの調査倫理委員会の承認を受けた。

【0077】

（遺伝子発現データ）

20

YUSHデータセットで78個のサンプルに対する実験及び分析は、延世大学セブランス病院で行った。遺伝子発現プロファイルは、48803個の遺伝子特徴を含むIllumina human bead arrays（Human HT-12、v3.0、Illumina、San Diego、CA）と標識されたcRNAsを混成化させて作った。全体RNAは、mirVanaTM RNA分離標識化キット（Ambion、Inc.）を使用して新鮮な冷凍組織から抽出した。製造メーカ（Illumina）のマニュアルによって500ngの全体RNAを標識化及び混成化のために使用した。上記ビーズチップは、Illumina Bead Array Scannerでスキャンした後、マイクロアレイデータは、R言語環境（Bolstad BM、2003）でマイクロアレイデータ（LIMMA）パッケージのための線形モデルで四分位数標準化方法によって標準化した。一次マイクロアレイデータは、NCBI遺伝子発現オムニバス（GEO）公開データベース（microarray platform GEO0000、microarray data GEO0000）で利用することができる。MDACCデータセットで80個サンプルに対する実験及び分析は、YUSHデータセットで行われたことと同様の過程でMDアンダーソン癌センターのシステム生物学部で行った。MDACCデータセットに対する一次マイクロアレイデータは、NCBI遺伝子発現オムニバス（GEO）公開データベース（microarray platform GEO0000、microarray data GEO0000）で利用することができる。

30

【0078】

（マイクロアレイデータ分析）

40

クラスタ分析は、クラスタ及びトリビュ（<http://rana.lbl.gov/EigenSoftware.htm>）で行った。クラスタ分析のために、ログベース2変換されたデータは、各遺伝子発現値に対して中間値を記載した。患者の間に異なる発現水準を有する遺伝子を作るために、フィルタリング基準を替えながら連続遺伝子濾過を作った。unsupervised clustering analysisは、連続分散濾過後に行い、2個の主要クラスタで構成された2個のクラスの予後的差異は、log rank test及びKaplan Meier Plotによって試験した。

【0079】

マイクロアレイデータセット分析のために、BRB Array Tools Version 4.1（<http://linus.nic.nih.gov/BRB-Array>

50

ayTools.html)を使用した。主要データ分析前及び四分位数標準化後に、データセットに対してログベース2変換を適用した。比較された2個のクラス間に有意的に相異に発現された遺伝子を同定するために、2個サンプルのt-テストを適用した。主要生物学的機能及び遺伝的経路を特性糾明するために、Biocartaデータベースで羅列された281個の経路に対してGSEA (gene set enrichment analysis)を行った。

【0080】

予後予測モデルを作るために、YUSHデータをトレーニングセットとして使用し、MDACCデータセットを検証セットとして使用した。独立的な患者データセットのクラスを予測するために、既に関連された3個の異なる予測アルゴリズム基盤予測モード (Linear Discriminant Analysis (LDA)、Compound Covariate Predictor (CCP) 及びNearest Centroid (NC)) を適用した。2個のサンプルテストによって評価される時のように、上記モデルを0.001有意水準で遺伝子の間で差等的に発現されるものに結合させた。各モデルの予測エラーを推定するために、単一残留交差検証 (Leave-one-out cross-validation、LOOCV) を使用した。単一残留交差検証トレーニングセットのために、遺伝子選別を含んで全体モデルビルドプロセスを繰り返した。また、交差検証エラー率推定値 (cross-validated error rate estimate) が有意的に1未満であることが任意予測から期待されることができるとかを評価した。予測モデルの予後力を評価するために、予測モデルのための検証データセットを使用し、Kaplan Meier Plot及びlog rank testを使用してその結果を評価した。

【0081】

分類された患者群の予後差を評価するために、Kaplan Meier Plot及びlog rank testを使用した。

【0082】

共変量として独立予後因子関連生存と、遺伝子特徴、腫瘍病期及び病理学的特徴を評価するために、多変量Cox比例危険回帰分析を使用した。

【0083】

(予後危険度評点システムの開発)

腫瘍発生及び転移に主に原因がある遺伝子に基づく危険度評点システムを作るために、CGAPで注釈がついた遺伝子から機能的に分類された遺伝子の予後の影響を行った。危険度評点システムは、CGAPで注釈がついた遺伝子を利用して作成し、Cox-回帰分析 ($p < 0.001$) で有意的な予後値を有する。危険度点数は、発現値の中間値に危険係数 (hazard ratio、HR) を乗算し、その値の総和を計算して作成した。HR値が1未満の場合、 $-1/HR$ に変換した。危険度点数の百分率 (percentile Risk Score) は、次の式によって計算した：

【0084】

$RS(\%) = 100 \times (\text{サンプルのRS} - \text{母集団のRS最小値}) / (\text{母集団のRS最高値} - \text{母集団のRS最小値})$

【0085】

50%以上のRS(%)を有するサンプルは、高危険群に分類し、25%以上のRS百分率及び50%未満のRS(%)を有するサンプルは、中間危険群に分類した。最後に、25%未満のRS(%)を有するサンプルは、低危険群に分類した。

【0086】

〈実施例1〉NO胃癌患者の遺伝子発現プロファイル調査

フィルタリング基準を替えながら行う連続分散濾過は、独特の2つの主要クラスタを有する15個のクラスタを発生した。分散濾過した後、多数の遺伝子は、5612個のプロープから701個のプロープに至るまで多様であり、log rank testでp値は、分散濾過基準によって最大0.291 (M2_1：中間値と比べて2倍以上の増加また

10

20

30

40

50

は減少を示すプローブを少なくとも1個有する遺伝子を選択して分散濾過した後、5612個のプローブを有するクラスタ)で最小0.0181(M3__3:中間値と比べて3倍以上の増加または減少を示すプローブを少なくとも3個有する遺伝子を選択して分散濾過した後、706個のプローブを有するクラスタ)まで多様であった。15個のクラスタのうち、11個のクラスタは、unsupervised hierarchical clustering analysisでlog rank testで統計的に有意な予後的差異を示す2つの主要クラスを発生した(図1a及び表1)。

【0087】

【表1】

分散濾過後のプローブの数と、分散濾過後にunsupervised hierarchical clustering analysisによって作った2個の主要クラスタのlog rank testのp値

CLUSTER	Probe number	P-value
M2_1	5612	0.291
M2_2	3724	0.114
M2.5_1	3301	0.0279
M2_3	2718	0.0346
M2_4	2043	0.0782
M2.5_2	2029	0.0279
M3_1	1956	0.0782
M2_5	1556	0.0279
M2.5_3	1354	0.0208
M2_6	1266	0.0279
M3_2	1143	0.0208
M2_7	1026	0.0346
M2.5_4	931	0.026
M3_3	706	0.0181
M2.5_5	701	0.0279

【0088】

予後結果で統計的有意を示す11個のクラスタを使用して患者サンプルパターン分析を行った結果、unsupervised clustering analysisによって発生した2個のクラスの構成は、フィルタリング基準に関係なく、非常に類似なパターンを示し、サンプル構成の2個の異なるパターンを示し、しかも、各クラスの1個または2個のサンプルは、フィルタリング基準による分類において差異を示す(図1b)。したがって、サンプル構成の2個の異なるパターンを示す2個のクラスタを選択した(図2)。

【0089】

M2__5(中間値と比べて2倍以上の増加または減少を示すプローブを少なくとも5個有する遺伝子を選択して分散濾過した後、1556個のプローブを有するクラスタ)の良い予後群は、ただ1名の死亡患者を有するが(4%死亡率)、悪い予後群は、15名の死亡患者(28%死亡率)(log rank test $p=0.0279$ 、図1c)を有する。M3__3の良い予後群は、ただ2名の死亡患者(6%死亡率)を有するが、悪い予後群は、14名の死亡患者(29.8%死亡率)を有する(log rank test $p=0.0181$ 、図1d)。

【0090】

〈実施例2〉2個の主要クラスタの生物学的特徴

予後結果でこのような差異を示す2個のクラスの主要遺伝的特徴を定義するために、2個

10

20

30

40

50

のサンプルに対するt-テストを行った。unsupervised clustering analysis後、M2_5の2個の主要クラスタを示す2個のクラスの比較は、2886個の有意的に異なるプローブを生成した ($p < 0.001$)。

【0091】

図3のAは、M2_5の2個のクラスの比較において統計的有意 ($p < 0.001$) を有する2倍以上の差異を示すプローブを利用した条件付きクラスターリング分析のヒットマップを示すものである。免疫反応に関連した多い遺伝子 (IFNG、GZMA、GZMB、CD8A、STAT1、JAK2、HLADPA1) が、良い反応群で発現が非常に増加した。

【0092】

Biocarta経路データベースでこれら2個のクラスのGSEAを行ったとき、最も有意的に向上した経路は、統計的有意 ($p = 0.00001$) を有する抗原プロセッシング及び提示 (Antigen Processing and presentation) (MHC経路) とIFNガンマ信号伝達経路 (IFNG経路) であった。これら2個の主要信号伝達経路を除いて、Th1/Th2分化 (TH1TH2経路)、標的細胞に対するCTL媒介免疫反応 (CTL経路)、NK細胞でNO2依存性IL12経路 (NO2IL12経路)、T細胞活性化でTobの役目 (TOB1経路)、Th1発達時にIL12及びStat4依存的信号伝達経路 (IL12経路) 及びT細胞毒性細胞表面分子 (T細胞毒性経路) は、免疫反応に関連した信号伝達経路であり、Biocarta経路データベースのGSEAで有意的に向上している (図4a)。有意的に向上した各経路の遺伝子成分は、良い予後群で免疫活性化に関連した遺伝子の一方向性活性化を示す (図5a～図5f)。

【0093】

unsupervised clustering analysis後、M3_3の2個の主要クラスタを示す2個のクラスの比較は、2680個の有意的に異なるプローブを生成した ($p < 0.001$)。

【0094】

図3のBは、M3_3の2個のクラスの比較で統計的有意 ($p < 0.001$) を有する3倍以上の差異を示すプローブを利用した条件付きクラスターリング分析のヒットマップを示すものである。細胞増殖 (CCNE1、CCNA2、CDCA5、AURKA、E2F7、CDC25A) に関連した遺伝子とDNA復旧に関連した遺伝子 (TOP2A) が良い反応群で発現が非常に増加した。

【0095】

Biocarta経路データベースでこれら2個のクラスのGSEAを行った結果、最も有意的に向上した経路は、癌感受性 (ATR BRCA経路) でBRCA1、BRCA2及びATRの役目、DNA損傷 (cdc25経路) に対する反応でcdc25及びchk1調節経路、サイクリン及び細胞周期調節 (細胞周期経路)、サイクリンE破壊経路 (FBW7経路)、細胞周期：G1/Sチェックポイント (G1経路)、細胞周期：G2/Mチェックポイント (G2経路)、CDK調節 (MCM経路)、細胞周期進行中にp27リン酸化調節 (P27経路)、細胞周期を調節するSonic Hedgehog (SHH) 受容体Ptcl (PTC1経路)、DNA損傷に対する反応でRB腫瘍抑制子/チェックポイント信号伝達 (RB経路)、及びE2F1破壊経路 (SKP2E2F経路) である (図4b、 $p = 0.00001$)。

【0096】

有意的に向上した各経路の遺伝子成分は、良い予後群で細胞増殖に関連した遺伝子の一方向性活性化を示す (図6a～図6f)。

【0097】

〈実施例3〉 予後予測モデルの生成

予後予測モデルを作るために、3個の異なる予後予測アルゴリズム、すなわちCompound Covariate Prediction (CCP)、Linear Disc

10

20

30

40

50

riminant Analysis (LDA)、Nearest Centroid (NC)を使用した。分類群予測のために、0.001有意水準で2個のクラス間に有意的に異なる遺伝子を使用し、単一残留交差検証法を使用して訂正予測比を計算した。

【0098】

M3__3分類群に対するTraining data set (YUSHデータセット)で2個の予測された群間の予後的差異は、統計的に有意し(log rank test、CCP: $p=0.00933$ 、LDA: $p=0.0137$ 及びNC: $p=0.00217$)、M3__3の分類群のための訂正予測比は、85%~92%(CCP: 86%、LDA: 85%及びNC: 92%)まで多様であった(図7a~図7c)。

【0099】

MDACCデータセットは、分類群の検証のために使用した。MDACCテストデータセット患者(80名の患者)の予測結果は、予後結果でTraining YUSH data setと類似なパターンを示す。予後的差異は、統計的に有意し(log rank test、CCP: $p=0.00645$ 、LDA: $p=0.00372$ 及びNC: $p=0.0247$)、良い予後に分類された群は、CCPの場合、3.3%死亡率(30名の患者のうち1名の患者が死亡する)、LDAの場合、3.2%死亡率(31名の患者のうち2名の患者が死亡する)、NCの場合、6.45%死亡率(31名の患者のうち2名の患者が死亡する)を有する良い予後結果を示す。また、悪い予後群に分類された群は、CCPの場合、30%の死亡率(50名の患者のうち15名の患者が死亡する)、LDAの場合、30.6%死亡率(49名の患者のうち15名の患者が死亡する)、NCの場合、28.6%死亡率(49名の患者のうち14名の患者が死亡する)を有する悪い予後結果を示す(図7d~図7f)。

【0100】

全体サンプルの予測された結果は、log rank testのp値が、CCP及びLDAの場合、0.000111を有し、NCの場合、0.000012を有し、3個の異なるアルゴリズム全体に対して2個の主要クラス間の非常に強力な予後的差異を示す(図7g~図7i)。

【0101】

たとえ訂正分類比(correct classification rate)は、M3__3分類群(CCP92%、LDA90%及びNC95%)より非常に高かったが、M2__5に対するテストデータセットで予測された結果は、統計的に有意しなかった(log rank test、CCP: $p=0.0948$ 、LDA: $p=0.056$ 及びNC: $p=0.06$) (図8a~図8c)。

【0102】

MDACCテストデータセット患者の予測された結果は、より強力な統計的有意を有する予後結果でTraining YUSH data setと類似なパターンを示している。予後的差異は、統計的に有意し(log rank test、CCP: $p=0.0155$ 、LDA: $p=0.0155$ 及びNC: $p=0.0214$)、良い予後に分類された群は、CCP、LDA、及びNCの場合3.8%死亡率(26名の患者のうち1名の患者が死亡する)を有する良い予後結果を示す。また、悪い予後群に分類された群は、CCP、LDA及びNCの場合、27.8%死亡率(54名の患者のうち15名の患者が死亡する)を有する悪い予後結果を示す(図8d~図8f)。全体サンプルの予測された結果は、log rank testでp値がCCPの場合、0.00377、LDAの場合、0.00203、NCの場合、0.00284を有し、3個の異なるアルゴリズム全体で非常に強力な予後結果を示す(図8g~図8i)。

【0103】

〈実施例4〉NO胃癌患者の予後に影響を与えるCGAPから機能的遺伝子分類NIHでCGAPから遺伝子注釈は、主に腫瘍生成、腫瘍進行及び癌転移に影響を与える機能的遺伝子分類を特徴としている。したがって、これら機能的遺伝子分類に基づく予後特性糾明は、これら接近法が癌の或る病期の予後に主に原因となる主要生物学的特徴を示

10

20

30

40

50

すときに非常に有益である。したがって、本発明者は、YUSH ($n=78$) 及びMDACC ($n=80$) 及び加算した全体患者データセット ($n=158$) から2個のデータセットから各遺伝子分類の影響を試験した。

【0104】

機能的遺伝子分類を持って実施したunsupervised hierarchical clustering analysisによって生成された主要クラスターの予後結果は、2個の異なるデータセットの間に多様であった。新生血管生成は、YUSHデータからCGAPで統計的有意を示す ($\log \text{rank test } p=0.0215$) 唯一の機能的分類であるのに対し、MDACCデータセットは、新生血管生成 ($p=0.0337$)、DNA損傷 ($p=0.0188$)、DNA複製 ($p=0.0402$)、転移 ($p=0.0235$)、信号伝達 ($p=0.0176$) 及び転写因子 ($p=0.0000706$) において統計的有意を示す。加算した患者データセットは、細胞死滅及び発生を除いて、大部分、機能的遺伝子分類において有意を示す (図9a)。

10

【0105】

全体サンプルの機能的遺伝子分類のプロープを使用してunsupervised hierarchical clustering analysisによって定義された2個のクラスに対してBioCarta経路データベースのGSEAを行った結果、機能的遺伝子分類は、有意的に異なる遺伝子セット分類の2つの異なるパターンを示す。大部分の細胞増殖に関連した遺伝子セット (DNA複製のCDK調節、E2F1破壊経路、細胞周期: G1/Sチェックポイント、細胞周期: G2/Mチェックポイント、DNA損傷に対する反応でCDC25及びchk1調節経路) は、DNA複製、DNA損傷、遺伝子調節、代謝及び転写因子の機能的遺伝子分類のプロープによって作られた2個のクラスの比較において有意的に向上した。転移、免疫、新生血管生成、細胞信号伝達、信号伝達及び細胞周期の機能的遺伝子分類は、免疫反応 (T細胞活性化でTobの役目、TCR活性化、T細胞受容体及びCD3複合体の開始でLck及びFynチロシンキナーゼ、Tヘルパー細胞表面分子、NK細胞及びB細胞受容体複合体でNO2依存的IL12経路)、特にT細胞関連免疫反応に関連した遺伝子セットで最も有意的な差異を示す。M2_5及びM3_3クラスターを使用して作った2個のクラスの予後的差異に影響を与える生物学的特徴に原因となる2つの主要生物学的特徴を想起させる (図9b)。

20

【0106】

〈実施例5〉 予後危険度評点システムの生成

unsupervised clustering analysis後各クラスで作った死亡率と2個の分類群M3_3及びM2_5の予測された結果で患者を配列するとき、或る患者は、分類群及び機能的遺伝子分類で定義されたクラスターのタイプによって異なるクラスに分類されることを知見した。したがって、特徴または分類群の特定タイプに基づく分類及び予後予測は、たとえ定義されたクラスがlog rank testの予後比較において統計的有意を示すとしても、完全に予後結果を示すものではなかった (図10a)。主に胃癌患者の複雑な生物学的特徴に起因し、胃癌患者の予後結果に影響を与える生物学的または生理学的特徴のすべての側面を考慮することが重要であることを暗示する。

30

40

【0107】

したがって、次に各機能的遺伝子分類の予後結果の差異に原因となる主要生物学的特徴を反映するために、機能的遺伝子分類で予後的差異に原因となる遺伝子を調査した。Cox回帰分析で統計的有意 ($p<0.001$) を有する51個の遺伝子を選別し、予後危険度評点システムの百分率を作るのに使用した (表2)。予後プロープは、CGAPで注釈がついたプロープからCox回帰分析 ($p<0.001$) によって選択された。

【0108】

【表 2】

危険度評点システムの百分率の生成に使用されるプローブリスト

Unique id	Gene symbol	p-value	Hazard Ratio	UG cluster	CGAP
ILMN_1679476	GART	4.00E-07	0.279	Hs.473648	Gene Regulation; TRF
ILMN_1813753	PTN	1.00E-06	3.631	Hs.371249	Immunology
ILMN_1694177	PCNA	7.40E-06	0.37	Hs.147433	Cell Cycle; Gene Regulation; TRF
ILMN_1771962	GLI3	1.34E-05	4.073	Hs.21509	Develoment
ILMN_2309180	SMARCD3	1.77E-05	2.266	Hs.647067	Develoment
ILMN_1670517	SULT1A3	2.56E-05	0.305	Hs.460558	Immunology
ILMN_2358980	ILK	3.31E-05	2.251	Hs.706355	Cell Cycle; Cell Signaling; Signal transduction
ILMN_1752728	FUCA1	3.52E-05	0.356	Hs.370858	Immunology
ILMN_1669645	PKD1	3.55E-05	2.827	Hs.75813	Cell Signaling;
ILMN_1686097	TOP2A	5.14E-05	0.566	Hs.156346	DNA Damage; DNA Replication
ILMN_1713732	ABL1	5.25E-05	2.784	Hs.431048	Cell Signaling; Signal transduction
ILMN_2072296	CKS2	5.78E-05	0.508	Hs.83758	Cell Cycle; Cell Signaling; Signal transduction
ILMN_2222065	FZD1	5.85E-05	4.302	Hs.94234	Develoment
ILMN_1796855	TIAL1	5.95E-05	0.235	Hs.501203	Gene Regulation; TRF
ILMN_1763457	SGCD	6.15E-05	2.494	Hs.387207	Immunology
ILMN_1808938	PIGF	7.05E-05	0.377	Hs.468415	Immunology
ILMN_1712803	CCNB1	7.57E-05	0.412	Hs.23960	Cell Cycle
ILMN_1754121	CSK	8.92E-05	0.307	Hs.77793	Signal transduction
ILMN_1729216	CRYAB	9.60E-05	1.524	Hs.53454	Immunology
ILMN_2278152	TPM1	0.000104	2.975	Hs.133892	Immunology
ILMN_1724489	RF4	0.000117	0.355	Hs.714318	DNA Damage
ILMN_1782567	GUCY1B3	0.000121	2.801	Hs.77890	Signal transduction
ILMN_1806040	TYMS	0.000187	0.485	Hs.592338	Metabolism
ILMN_2160929	FEN1	0.000189	0.432	Hs.409065	DNA Replication
ILMN_1742044	GNAI1	0.000194	2.758	Hs.134587	Cell Signaling; Signal transduction
ILMN_1811921	CSRP1	0.000196	1.642	Hs.108080	Immunology
ILMN_1683120	UNG	0.000199	0.371	Hs.191334	DNA Damage
ILMN_1701877	AXL	0.000229	2.018	Hs.590970	Immunology
ILMN_2377900	MAP1B	0.000238	1.705	Hs.335079	Cell Signaling; Immunology; Metastasis
ILMN_1795429	VCL	0.000249	2.478	Hs.643896	Cell Signaling; Metastasis
ILMN_1792679	ITGA5	0.00027	1.642	Hs.505654	Cell Signaling; Immunology; Metastasis
ILMN_1706779	UG1	0.000274	0.352	Hs.1770	DNA Damage; Immunology
ILMN_2056975	HPRT1	0.000293	0.339	Hs.412707	Immunology
ILMN_1742521	GRB2	0.000295	0.275	Hs.444356	Angiogenesis; Cell Signaling; Signal transduction
ILMN_2409220	HMMR	0.000304	0.505	Hs.728200	Cell Signaling; Metastasis
ILMN_1737205	MCM4	0.000311	0.495	Hs.460184	Cell Cycle
ILMN_1803398	SRF	0.00035	2.287	Hs.520140	Cell Cycle; Cell Signaling; Develoment; Gene Regulation; TRF
ILMN_1689828	DMPK	0.00036	1.925		Cell Cycle; Cell Signaling;
ILMN_2078599	ACP5	0.000365	0.392	Hs.1211	Cell Cycle; Cell Signaling; Immunology
ILMN_2233783	CD38	0.000391	0.464	Hs.479214	Angiogenesis; Metastasis
ILMN_1694502	PRIM1	0.000392	0.333	Hs.534339	DNA Damage
ILMN_1773119	CCNF	0.000507	0.494	Hs.1973	Cell Cycle
ILMN_1669631	GLRB	0.000689	2.138	Hs.32973	Immunology
ILMN_1765146	IFNAR2	0.00071	0.269	Hs.708195	Immunology
ILMN_2153916	HSPA2	0.000723	1.734	Hs.432648	Immunology
ILMN_1669281	CLN3	0.000802	0.409	Hs.534667	Immunology
ILMN_2202948	BUB1	0.00084	0.575	Hs.469649	Immunology
ILMN_1778242	CALM1	0.000851	2.839	Hs.282410	Cell Cycle; Cell Signaling; Signal transduction
ILMN_1747911	CDC2	0.000889	0.64		Cell Cycle
ILMN_1672128	ATF4	0.000969	5.677	Hs.496487	Develoment; TRF
ILMN_1771593	RRM1	0.000994	0.269	Hs.445705	Immunology

【0109】

全体患者（n = 158）において21名の患者は、50%以上の危険度点数を示す危険度評点システムの百分率に基づいて高危険群と指定した。高危険群患者に対する死亡率は、全体サンプルで61.9%を示し、極めて高く、2個のデータセット患者は、非常に類似な臨床結果を示す（YUSH：54.5%死亡率、MDACC：70%死亡率）。

【0110】

70名の患者を中間危険群（25%以上～50%未満の危険度点数）と指定し、中間危険群に対する死亡率は、20%であった。YUSHデータセットに対する臨床結果は、YU

10

20

30

40

50

SH患者に対する25%の死亡率を示すMDACCデータ患者より若干悪いのに対し、MDACCデータ患者に対しては、16%の死亡率を示した。総67名の患者は、低危険群と指定し、全体サンプルデータで7.45%の死亡率を示した。YUSHデータ患者は、9%の死亡率を有するMDACCデータ患者と比べて若干さらに良い予後を示す5.7%の死亡率を示した（図10b～図10d）。

【0111】

予後的差異は、明白に3個の異なる危険群は、全体データセットでlog rank testでp値が 1.36×10^{-7} と非常に強力な統計的有意を示す。YUSHデータセットは、log rank testでp値が0.00254を示し、MDACCデータセットは、log rank testでp値が 1.11×10^{-5} を示した（図10e～図10f）。

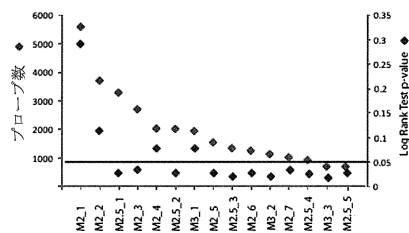
【産業上の利用可能性】

【0112】

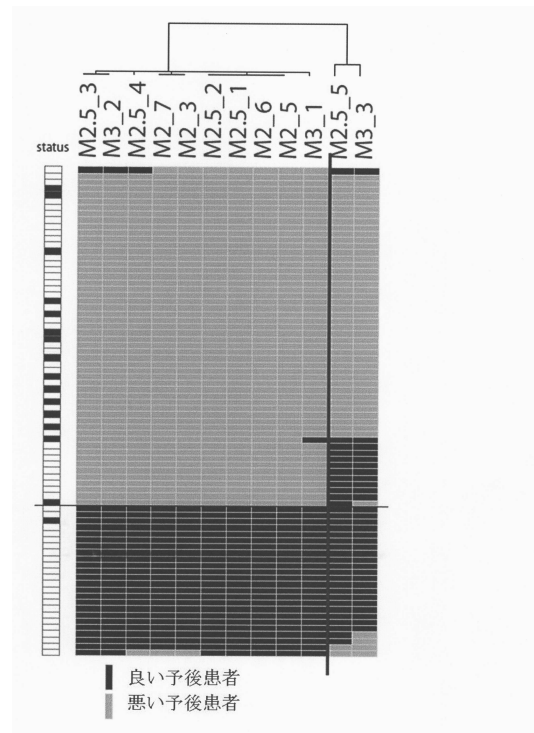
本発明は、胃癌再発予後予測分野において診断キットとして使用することができる。

10

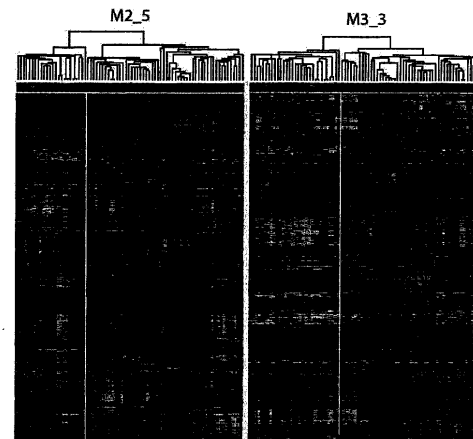
【図1a】



【図1b】



【図 2】



M3_3

生存確率

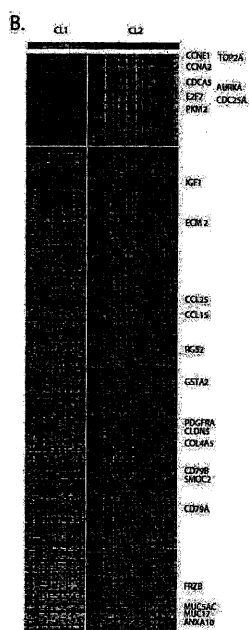
CL1

CL2

$P=0.0181$

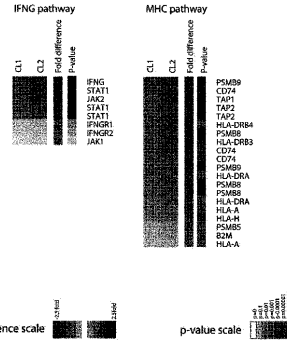
生存 (月)

【図 3 B】



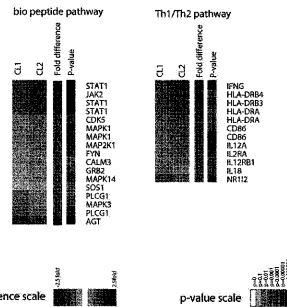
【図 5 a】

[Fig. 5a]



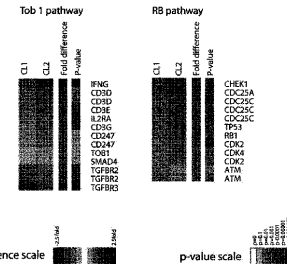
【図 5 b】

[Fig. 5b]



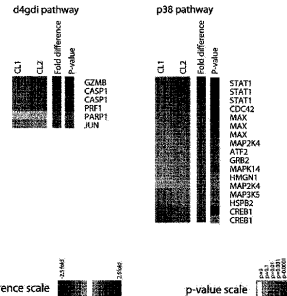
【図 5 e】

[Fig. 5e]

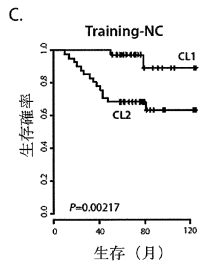


【図 5 f】

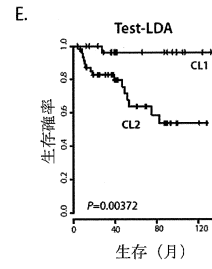
[Fig. 5f]



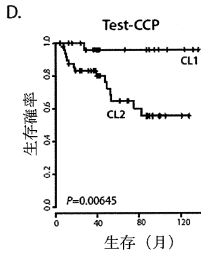
【図 7 c】



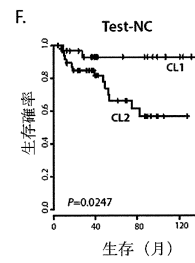
【図 7 e】



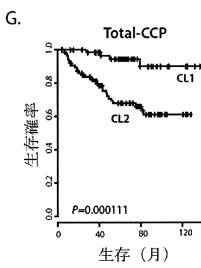
【図 7 d】



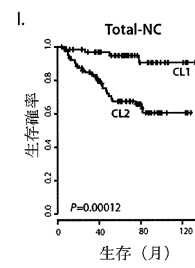
【図 7 f】



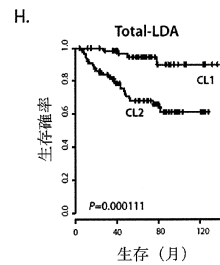
【図 7 g】



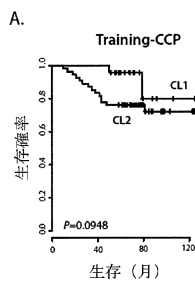
【図 7 i】



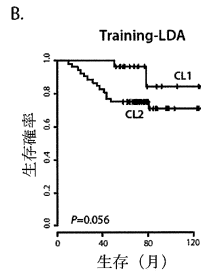
【図 7 h】



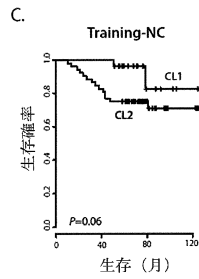
【図 8 a】



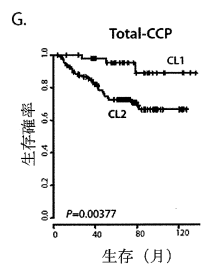
【図 8 b】



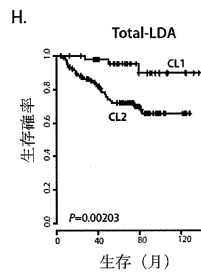
【図 8 c】



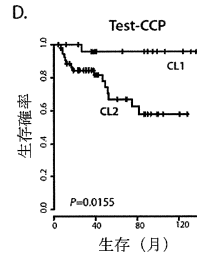
【図 8 g】



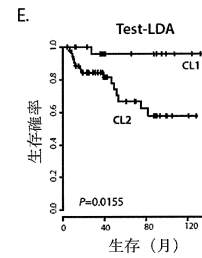
【図 8 h】



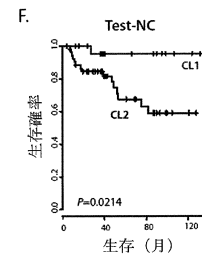
【図 8 d】



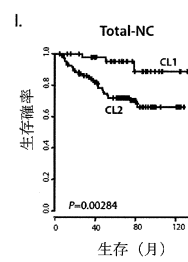
【図 8 e】



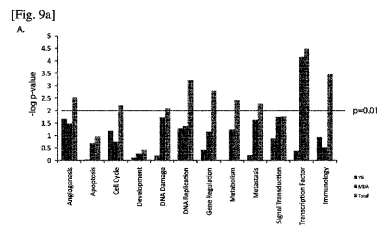
【図 8 f】



【図 8 i】

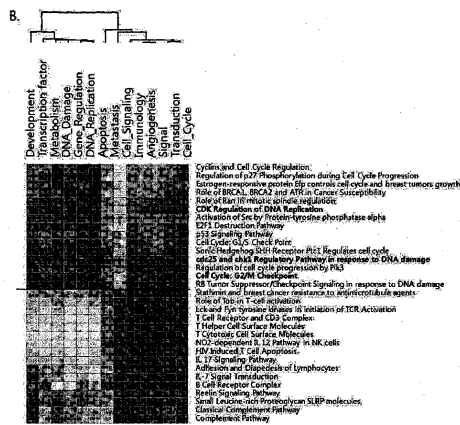


【図 9 a】

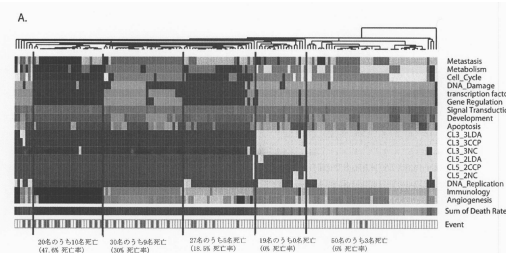


【図 9 b】

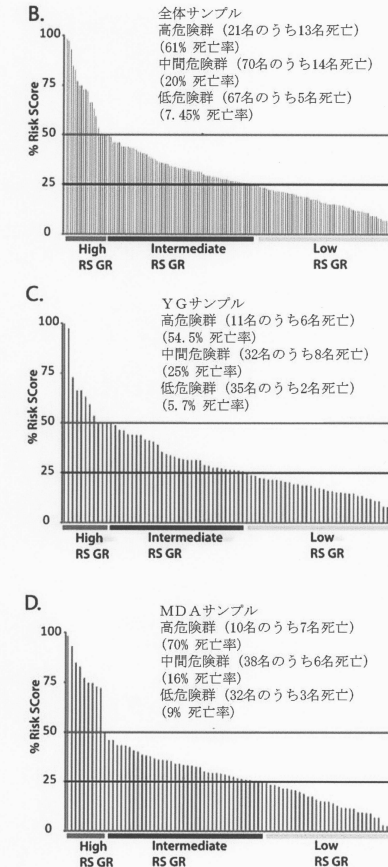
[Fig. 9b]



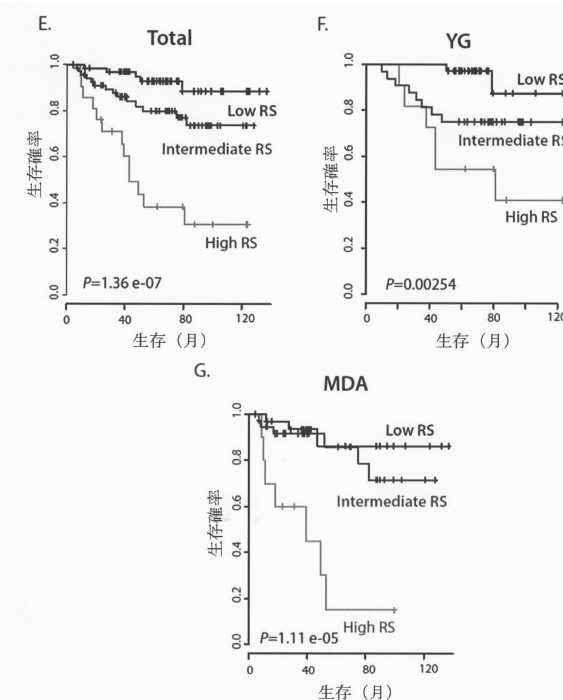
【図 10 a】



【図 10 b】



【図 10 c】



フロントページの続き

- (72)発明者 ヨン－ミン・フ
大韓民国・ソウル・137-930・ソチョグ・シンバンポ－ロ・270・140-902
- (72)発明者 スン・フン・ノ
大韓民国・ソウル・158-755・ヤンチョン－グ・モクドンドン－ロ・350・518-306
- (72)発明者 ジェ－ホ・チョン
大韓民国・ソウル・135-280・ガンナム－グ・サムソン－ロ・150・ミド・アパート・103-808
- (72)発明者 ジン・サック・ス
大韓民国・ソウル・137-910・ソチョグ・ヒョリョン－ロ・68－ギル・81・102-1002
- (72)発明者 ウン・スン・パク
大韓民国・ソウル・138-891・ソンパーグ・ジャムシル－ロ・62・333-2302

審査官 中村 勇介

- (56)参考文献 特表2010-539973 (JP, A)
特表2006-526998 (JP, A)
再公表特許第2010/064702 (JP, A1)
韓国公開特許第10-2012-0065959 (KR, A)
Kyu Eun Lee, Hyuk-Joon Lee, Prognostic Significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in Gastric Cancer, Jpn J Clin Oncol, 日本, 2003年 4月, Vol.33 No.4, Page.173-179
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)