

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/136684 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G06F 19/20 (2011.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055124
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 22 日(22.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-038578 2015 年 2 月 27 日(27.02.2015) JP
- (71) 出願人: シスメックス株式会社(SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 吉田 雄一郎(YOSHIDA, Yuichiro); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロアジア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR ASSISTING IN PROGNOSTIC DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER, RECORDING MEDIUM AND DETERMINING APPARATUS

(54) 発明の名称: 大腸癌の予後診断を補助する方法、記録媒体および判定装置

(57) Abstract: The present invention measures an SCEL gene expression amount in a biological specimen taken from a colorectal cancer patient and assists in the prognostic diagnosis of colorectal cancer on the basis of the measured SCEL gene expression amount.

(57) 要約: 大腸癌患者から採取された生体試料における、SCEL 遺伝子の発現量を測定し、測定した発現量に基づいて、大腸癌の予後診断を補助する。



WO 2016/136684 A1

明 細 書

発明の名称：

大腸癌の予後診断を補助する方法、記録媒体および判定装置

技術分野

[0001] 本発明は、大腸癌の予後診断を補助する方法に関する。特に、大腸癌患者の組織から得た核酸について、SCEL遺伝子の発現量データを取得し、取得した発現量データに基づいて、患者の大腸癌の予後診断を補助する方法、記録媒体および判定装置に関する。

背景技術

[0002] 大腸癌は、盲腸、結腸、直腸に発生する癌腫の総称である。多くの癌と同様に、大腸癌においても早期の発見がその治療にとって重要である。癌の治療においては、強力な副作用を有する抗癌剤が使用される場合があり、この場合には患者は大きな負担を強いられる。このような患者の負担を低減するために、医師が患者にとって最適な治療法を選択することは重要であり、そのためには、医師は、患者の癌の進行度、悪性度、症状などを的確に把握することが必要である。

[0003] また、患者の予後を正確に予測することは、患者の予後におけるQOL (Quality of Life) の向上のために重要である。近年、大腸癌の病理学的予後因子として、簇出(budding)の出現の有無が注目されている。非特許文献1は、簇出が直腸および結腸粘液癌の予後因子として有用であり得ることを報告している。

先行技術文献

特許文献

[0004] 非特許文献1：Okuyama T.ら, Budding (sprouting) as a useful prognostic marker in colorectal mucinous carcinoma, Jpn J Clin Oncol, 2002;32(10)412-416

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記の従来法では病理医が顕微鏡での観察によって行うため、診断結果が主観的となる。本発明者は、簇出は1～4個の癌細胞を含む巣であるため、顕微鏡による観察では見落とされる危険性がある。また、従来法による予後判定は高度な専門知識が要求されるため予後判断が難しいという課題を見出した。

本発明は、より客観的な大腸癌の予後診断の補助方法、記録媒体および判定装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、SCEL遺伝子の発現が簇出の有無と相関することを見出し、本発明を完成させた。

[0007] 本発明によれば、大腸癌患者から採取された生体試料における、SCEL遺伝子の発現量を測定する工程と、測定した発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定する工程と、を含む大腸癌の予後診断を補助する方法が提供される。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、医師等による大腸癌の予後の診断を補助する中間的な情報を取得することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]診断補助装置の一例を示した概略図である。

[図2]診断補助装置のソフトウェアの機能構成を示すブロック図である。

[図3]診断補助装置のハードウェアの構成を示すブロック図である。

[図4]診断補助装置の動作の一例を示すフローチャートである。

[図5]診断補助装置の動作の一例を示すフローチャートである。

[図6]BSSと簇出グレードとの相関を示す箱ひげ図である。

[図7]実施例1(トレーニングセット)の症例におけるROC曲線である。

[図8]実施例1(トレーニングセット)の症例における高リスク群(予後不良)と

低リスク群(予後良好)との生存期間比較の結果を示すKaplan-Meier曲線である。

[図9]実施例2(バリデーションセット)の症例におけるROC曲線である。

[図10]実施例2(バリデーションセット)の症例における高リスク群(予後不良)と低リスク群(予後良好)との無病生存期間比較の結果を示すKaplan-Meier曲線である。

[図11]実施例3の症例におけるROC曲線である。

[図12]実施例3の症例における高リスク群(予後不良)と低リスク群(予後良好)との無再発生存期間比較の結果を示すKaplan-Meier曲線である。

[図13]実施例4の症例におけるROC曲線である。

[図14]実施例4の症例における高リスク群(予後不良)と低リスク群(予後良好)との無再発生存率比較の結果を示すKaplan-Meier曲線である。

発明を実施するための形態

[0010] 本実施形態の大腸癌の予後判定方法(以下、「判定方法」と記す場合がある。)では、まず、大腸癌患者から採取された生体試料における、SCEL遺伝子の発現量を測定する工程を行う。

[0011] 「生体試料」としては、大腸癌患者の腫瘍細胞由来の核酸(例えばmRNA)を含むもの

あれば特に限定されないが、例えば臨床検体を用いることができる。臨床検体として具体的には、手術又は生検により採取した組織、血液、血清などが挙げられる。好ましくは、臨床検体は、手術又は生検により採取した腫瘍組織、特に癌先進部周辺の組織であり得る。

[0012] SCEL (sciellin)遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号1として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_01160706の下公知ある。

[0013] 別の実施態様においては、測定工程において、SCEL遺伝子に加えて、さらにMGAT3遺伝子、SLC4A11遺伝子、MSLN遺伝子、FOXO1遺伝子、RUNX2遺伝子およびWNT11遺伝子から選択される少なくとも1つの発現量が測定され得る。

- [0014] MGAT3 (mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase) 遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号 2 として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_001098270の下公知である。
- [0015] SLC4A11 (solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 11) 遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号 3 として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_001174089の下公知である。
- [0016] MSLN (mesothelin) 遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号 4 として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_001177355の下公知である。
- [0017] FOXC1 (forkhead box C1) 遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号 5 として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_001453の下公知である。
- [0018] RUNX2 (runt-related transcription factor 2) 遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号 6 として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_001015051の下公知である。
- [0019] WNT11 (wingless-type MMTV integration site family, member 11) 遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号 7 として表す。この塩基配列は、ヒトゲノムデータベースGenBankにおいてアクセッション番号NM_004626の下公知である。
- [0020] 簇出は、癌先進部付近の間質に存在する 1 ～ 4 個の癌細胞を含む巣である。日本癌治療学会「がん診療ガイドライン」によれば、大腸癌について言及する場合、簇出は、癌細胞が癌組織から遊離して増殖したものであり、大腸癌のリンパ節転移リスク因子として知られている。簇出のグレードは、簇出が最も高度な領域を選択し、20×10倍視野で癌発育先進部を観察し、簇出の個数をカウントすることによって評価される。カウントされた簇出数が5個

以上(Grade 2及び3)の個体は、4個未満(Grade 1)の個体と比較して、リンパ節転移率が有意に上昇する。

[0021] 本発明者は、今回、上記の7つの遺伝子の発現量が、簇出を有する癌先進部において有意に上昇することを初めて見出した。したがって、上記の7つの遺伝子は、大腸癌の予後判定において有用な遺伝子マーカーとなり得る。遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法に従って測定および数値化することが可能であるため、これらの遺伝子の発現量を測定することで客観的に大腸癌の予後を判定できる。

[0022] 「遺伝子の転写産物」とは、遺伝子が転写されることにより得られる産物のことである。具体的には、メッセンジャーRNA (mRNA)、mRNAの前駆体が例示される。

また、「遺伝子の発現量」とは、上記の生体試料中の遺伝子の転写産物の存在量またはそれを反映する物質の量のことである。よって、本実施形態においては、mRNAの量、またはmRNAから得られる相補デオキシリボ核酸(cDNA)もしくは相補RNA(cRNA)の量測定され得る。通常、生体試料中のmRNAは微量であるので、そこから逆転写およびインビトロ転写(IVT)により得られるcDNAまたはcRNAの量を測定することが好ましい。

[0023] 生体試料から遺伝子の転写産物を抽出する方法としては、当該技術において知られるRNA抽出法を挙げることができる。例えば、生体試料を遠心分離して、RNAを含む細胞を沈殿させ、前記細胞を物理的手法、化学的手法または酵素的手法によって破壊し、細胞破片を除去することによりRNA抽出物を得ることができる。RNAの抽出は、市販のRNA抽出キットなどを用いて行うこともできる。

[0024] 上記のようにして得られた遺伝子の転写産物の抽出物から、遺伝子の発現量の測定時に混入していないことが好ましい生体試料由来の混入成分(例えば、生体試料が血液である場合はグロビンのmRNAなど)を除去するための処理を行うこともできる。

[0025] 遺伝子の発現量の測定は、定量性のある方法であれば特に限定されない。

例えば、DNA、RNA、人工核酸などをプローブとして用いるマイクロアレイ（以下、単に「マイクロアレイ」ともいう）、定量PCR（例えば定量RT-PCRなど）を用いて行なうことができる。好ましい実施形態においては、マイクロアレイを用いる方法が用いられ得る。

マイクロアレイを用いて遺伝子の発現量を測定する場合、例えば、基板上に固定された20～25 mer程度の核酸プローブに、遺伝子の転写産物の抽出物または遺伝子の転写産物から作製したcDNAもしくはcRNAを接触させ、ハイブリッドの形成の有無を蛍光、発色、電流などの指標の変化を測定することにより、目的の遺伝子の発現量を測定できる。

上記の核酸プローブは、1つの遺伝子の転写産物に対して少なくとも1つ用いられればよく、遺伝子の転写産物の長さなどに応じて、複数のプローブを用いることもできる。プローブの配列は、測定しようとする遺伝子の転写産物の配列に応じて当業者が適宜決定できる。例えば、本実施形態においては、このようなプローブとして、配列番号8～84で表されるポリヌクレオチドが用いられ得る。

マイクロアレイを用いる遺伝子の発現量の測定方法としては、例えば、Affymetrix社により提供されるGeneChip（登録商標）システムを用いることができる。

[0026] マイクロアレイを用いる場合、遺伝子の転写産物またはそのcDNAもしくはcRNAは、核酸プローブとのハイブリッド形成を容易にするために、断片化してよい。断片化は、当該技術において公知の方法により行うことができる。例えば、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼなどの核酸分解酵素を用いて行うことができる。

[0027] マイクロアレイにおいて核酸プローブと接触させる遺伝子の転写産物またはそのcDNA
しくはcRNAは、通常、5～20 μ g程度であればよい。接触条件は、通常、45℃にて16時間
度である。

[0028] 核酸プローブと接触させてハイブリッドを形成した遺伝子の転写産物またはそのcDNAもしくはcRNAは、そのハイブリッド形成の有無およびハイブリッド形成した量について、蛍光物質、色素またはハイブリッド形成したことによるマイクロアレイ上を流れる電流量の変化などに基づいて検出することができる。

ハイブリッドの形成を、蛍光物質または色素の検出により測定する場合、遺伝子の転写産物またはそのcDNAもしくはcRNAが、蛍光物質または色素の検出のための標識物質で標識されていることが好ましい。このような標識物質は、当該技術において通常用いられるものを用いることができる。通常、ビオチン化ヌクレオチドまたはビオチン化リボヌクレオチドを、cDNAまたはcRNAを合成するときのヌクレオチドまたはリボヌクレオチド基質として混合しておくことにより、得られるcDNAまたはcRNAをビオチンで標識することができる。cDNAまたはcRNAがビオチン標識されていると、マイクロアレイ上で、ビオチンに対する結合パートナーであるアビジンまたはストレプトアビジンが結合できる。アビジンまたはストレプトアビジンが、適切な蛍光物質または色素と結合していることにより、ハイブリッドの形成が検出できる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、グリーン蛍光タンパク質（GFP）、ルシフェリン、フィコエリスリンなどが挙げられる。通常、フィコエリスリン-ストレプトアビジンのコンジュゲートが市販されているので、これを用いることが簡便である。

また、アビジンまたはストレプトアビジンに対する標識抗体を、アビジンまたはストレプトアビジンと接触させ、標識抗体の蛍光物質または色素を検出することもできる。

[0029] この工程で得られる遺伝子の発現量は、生体試料中の各遺伝子の転写産物の存在量を相対的に表す値であれば、特に限定されない。上記のマイクロアレイにより測定を行う場合、発現量は、蛍光強度、発色強度、電流量などに基づくマイクロアレイから得られるシグナルであり得る。

これらのシグナルは、マイクロアレイ用の測定装置を用いて測定できる。

[0030] 次いで、判定工程において、測定工程において得られた遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定する。好ましくは、判定工程は、遺伝子の発現量またはその対数と、所定の基準値とを比較する工程を含む。遺伝子の発現量としては、上述した測定方法で取得できる値をそのまま用いることができる。たとえば、マイクロアレイで発現量を測定する場合、遺伝子の発現量として蛍光強度の値を用いることができる。定量RT-PCRで発現量を測定する場合、PCRサイクル数、PCRサイクル数から算出されるmRNAコピー数などの値を用いることができる。

遺伝子の発現量の対数の底は特に限定されず、2や10が用いられ得る。

複数の遺伝子の発現量に基づいて判定工程を実行する場合は、遺伝子の発現量の平均値、遺伝子の発現量の中央値、遺伝子の発現量の対数の平均値、当該対数の中央値、遺伝子の発現量を標準化した値の平均値、当該標準化した値の中央値などを用いることができる。上記比較工程においてはこれらの値と所定の基準値が比較される。

所定の基準値以上である場合には、予後は良好でないと判定され得る。基準値未満である場合には、予後は良好であると判定され得る。

[0031] 「基準値」は、遺伝子の発現量のデータの蓄積から適宜設定することができる。具体的には、予後が良好でない患者と予後が良好である患者とを精度良く分類することができる閾値であり得る。たとえば、基準値は、予後が既知である複数の患者の遺伝子の発現量を測定し、予後が良好でない患者群と予後が良好である患者群を最も精度良く分類することができる値となる。本実施形態の方法により予後が未知である患者の遺伝子の発現量を測定し、基準値と比較することによって予後が良好か、良好でないかを判定することができる。

[0032] 本実施形態において、基準値は、複数の検体についてマイクロアレイによって測定された遺伝子の発現量の対数(底=2)の平均値を用いてROC解析を行い、得られたROC曲線に基づいて設定された閾値であり得る。本実施形態においては、予後判定の対象となる個体に由来する検体についてマイクロアレイ

によって測定された遺伝子の発現量の対数(底=2)の平均値が上記の閾値である場合、当該個体の大腸癌の予後は良好ではないと判定され得る。一方、上記の閾値未満である場合、当該個体の大腸癌の予後は良好であると判定され得る。

[0033] 本発明には、患者の大腸癌の予後判定をコンピュータに実行させるためのプログラム製品も含まれる。このようなプログラム製品としては、インターネット等を介してダウンロード可能なプログラムや、当該プログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体などが例示される。

[0034] たとえば、以下のような工程をコンピュータに実行させるためのプログラムが例示される。

大腸癌患者から採取された生体試料における、遺伝子の発現量に関連する情報を測定装置から取得する工程；取得した情報に基づいて、前記患者の大腸癌の予後を判定する工程。

[0035] 以下に、本実施形態の方法を実施するのに好適な装置の一形態を、図面を参照して説明する。しかし、本発明はこの実施形態のみに限定されるものではない。図1は、患者の大腸癌の予後判定に用いる診断補助装置の一例を示した概略図である。図1に示された診断補助装置10は、測定装置20と、前記測定装置20と接続された判定装置30とを含んでいる。

[0036] 本実施形態においては、測定装置20は、マイクロアレイ用の測定装置であり得る。この測定装置20は、遺伝子の発現量そのものおよびマイクロアレイの蛍光の色相や蛍光強度のような遺伝子の発現量に関連する情報を取得することができる。大腸癌患者から採取された生体試料を測定装置20にセットすると、測定装置20は、前記生体試料における遺伝子の発現量に関連する情報を取得し、得られた情報を判定装置30に提供することができる。

[0037] 判定装置30は、コンピュータ本体300と、キーボードやマウスからなる入力部301と、LCDやCRTからなり検体情報や判定結果などを表示する表示部302とを含む。判定装置30は、測定装置20から、それぞれ遺伝子の発現量に関連する情報を取得する。そして、判定装置30は、これ

らの情報に基づいて、被検者の大腸癌の予後を判定するプログラムを実行する。入力部301から、後述する「1遺伝子判定を行なう」、「3遺伝子判定を行なう」等を入力することができる。

なお、判定装置30は、図1に示されるように測定装置20とは別個の機器であってもよいし、測定装置20を内包する機器であってもよい。後者の場合、判定装置30は、それ自体で診断補助装置10であり得る。

[0038] 図2は、判定装置30のコンピュータ本体300のソフトウェアを機能ブロックで示すブロック図である。図2に示されるように、コンピュータは、取得部321と、記憶部322と、算出部323と、判定部324と、出力部325とを備える。取得部321は、測定装置20と、ネットワークを介して通信可能に接続されている。判定部324には、入力部301を介して大腸癌の予後判定の実施に必要な情報、具体的には1遺伝子判定を行なうか否かに関する情報および／または3遺伝子判定を行なうか否かに関する情報を入力することができる。

[0039] 取得部321は、測定装置20から提供された情報を取得する。記憶部322は、判定に必要な基準値および遺伝子の発現量を算出するための式や処理プログラムなどを記憶する。算出部323は、取得部321で取得された情報を用い、記憶された式にしたがって、遺伝子の発現量を算出する。判定部324は、取得部321によって取得されたか、または算出部323によって算出された遺伝子の発現量が、記憶部322に記憶された基準値以上であるか否かを判定する。出力部325は、判定部324による判定結果を、被検者の大腸癌の予後判定結果として表示部302へ出力する。

[0040] 図3は、図2に示すコンピュータ本体300のハードウェア構成を示すブロック図である。図3に示されるように、コンピュータ本体300は、CPU(Central Processing Unit)310と、ROM(Read Only Memory)311と、RAM(Random Access Memory)312と、ハードディスク313と、入出力インターフェイス314と、読出装置315と、通信インターフェイス316と、画像出力インターフェイス317とを備えている。CPU310、

ROM 311、RAM 312、ハードディスク 313、入出力インターフェイス 314、読出装置 315、通信インターフェイス 316 および画像出力インターフェイス 317 は、バス 318 によってデータ通信可能に接続されている。

[0041] CPU 310 は、ROM 311 に記憶されているプログラムおよび RAM 312 にロードされたプログラムを実行することが可能である。CPU 310 がプログラムを実行することにより、図 2 に示す各機能が実行される。これにより、判定装置 30 が、被検者の大腸癌の予後を判定するための判定装置として機能する。

[0042] ROM 311 は、マスク ROM、PROM、EPROM、EEPROM などによって構成されている。ROM 311 には、前述のように CPU 310 によって実行されるプログラムおよびこれに用いるデータが記録されている。

[0043] RAM 312 は、SRAM、DRAM などによって構成されている。RAM 312 は、ROM 311 およびハードディスク 313 に記録されているプログラムの読み出しに用いられる。RAM 312 はまた、これらのプログラムを実行するときに、CPU 310 の作業領域として利用される。

[0044] ハードディスク 313 は、CPU 310 に実行させるためのオペレーティングシステム、アプリケーションプログラム(被検者の大腸癌の予後を判定するためのプログラム)などのプログラムおよび当該プログラムの実行に用いるデータがインストールされている。

[0045] 読出装置 315 は、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROM ドライブ、DVD-ROM ドライブなどによって構成されている。読出装置 315 は、可搬型記録媒体 40 に記録されたプログラムまたはデータを読み出すことができる。

[0046] 入出力インターフェイス 314 は、例えば、USB、IEEE 1394、RS-232C などのシリアルインターフェイスと、SCSI、IDE、IEEE 1284 などのパラレルインターフェイスと、D/A 変換器、A/D

変換器などからなるアナログインターフェイスとから構成されている。入出力インターフェイス 314 には、キーボード、マウスなどの入力部 301 が接続されている。操作者は、当該入力部 301 により、コンピュータ本体 300 に各種の指令を入力することが可能である。

[0047] 通信インターフェイス 316 は、例えば、Ethernet(登録商標)インターフェイスなどである。コンピュータ本体 300 は、通信インターフェイス 316 により、プリンタなどへの印刷データの送信も可能である。

[0048] 画像出力インターフェイス 317 は、LCD、CRTなどで構成される表示部 302 に接続されている。これにより、表示部 302 は、CPU 310 から与えられた画像データに応じた映像信号を出力することができる。表示部 302 は、入力された映像信号にしたがって画像(画面)を表示する。

[0049] 次に、診断補助装置 10 による、被検者の大腸癌の予後判定の処理手順を説明する。

図 4 は、大腸癌の予後判定のフローチャートの一例である。ここでは、被検者由来の生体試料を用いて得られた蛍光情報から蛍光強度を算出し、得られた蛍光強度から遺伝子の発現量を算出し、得られた発現量が基準値以上であるか否かの判定を行う場合を例として挙げて説明する。しかし、本発明は、この実施形態のみに限定されるものではない。

[0050] まず、ステップ S1-1 において、診断補助装置 10 の取得部 321 は、測定装置 20 から SCEL 遺伝子、MGAT3 遺伝子、SLC4A11 遺伝子、MSLN 遺伝子、FOXO1 遺伝子、RUNX2 遺伝子および WNT11 遺伝子の発現量に関連する蛍光情報を取得する。

[0051] 次に、ステップ S1-2 において、算出部 323 は、取得した蛍光情報から蛍光強度を算出し、記憶部 322 に送信する。そして、ステップ S1-3 において、算出部 323 は、記憶された蛍光強度に基づき、記憶された式にしたがって、遺伝子の発現量を算出する。

[0052] その後、ステップ S1-4 において、判定部 324 は、ステップ S1-3 で算出された発現量が、記憶部 322 に記憶された基準値以上であるか否か

の判定を行う。ここで、発現量が基準値以上であるとき、ルーチンはステップS 1－5に進行する。そして、判定部3 2 4は被検者の大腸癌の予後が良好でないことを示す判定結果を出力部3 2 5に送信する。一方、発現量が基準値未満であるとき、ルーチンはステップS 1－6に進行する。そして、判定部3 2 4は被検者の大腸癌の予後が良好であることを示す判定結果を出力部3 2 5に送信する。

[0053] 最後に、ステップS 1－7において、出力部3 2 5は、被検者の大腸癌の予後判定結果を出力し、表示部3 0 2に表示させる。これにより、診断補助装置1 0は、被検者の大腸癌の予後が良好であるのか、または良好でないのかについて診断することを補助する情報を医師などに提供することができる。

[0054] この実施形態において、予後判定に用いる遺伝子は、SCEL遺伝子のみであってもよいし、MGAT3遺伝子、SLC4A11遺伝子、MSLN遺伝子、FOXO1遺伝子、RUNX2遺伝子およびWNT11遺伝子から選択される少なくとも1つの遺伝子をさらに加えた2つ以上であってもよい。

[0055] また、別の実施形態では、予後判定に用いる遺伝子をユーザが選択できるようにしてもよい。図5を例として、このような処理手順について説明する。ここでは、SCEL遺伝子のみを用いるか(1遺伝子判定)、SCEL遺伝子、MGAT3遺伝子およびSLC4A11遺伝子を用いるか(3遺伝子判定)、あるいは、SCEL遺伝子、MGAT3遺伝子、SLC4A11遺伝子、MSLN遺伝子、FOXO1遺伝子、RUNX2遺伝子およびWNT11遺伝子を用いるか(7遺伝子判定)をユーザが選択できる。

[0056] まず、ステップS 2－1において、入力部3 0 1から「1遺伝子判定を行なう」と入力された場合には、ルーチンはS 2－3に進行する。そして、判定装置3 0の取得部3 2 1は、測定装置2 0からSCEL遺伝子の発現量に関連する蛍光情報を取得する(1遺伝子判定)。

[0057] 一方、「1遺伝子判定を行なう」と入力されていない場合には、ルーチンはS 2－2に進行する。そして、ステップS 2－2において、入力部3 0 1から「3遺伝子判定を行なう」と入力された場合には、ルーチンはS 2－4

に進行する。その後、診断補助装置 10 の取得部 321 は、測定装置 20 から SCEL 遺伝子、MGAT3 遺伝子および SLC4A11 遺伝子の発現量に関連する蛍光情報を取得する（3 遺伝子判定）。

[0058] ステップ S 2-2 において、「3 遺伝子判定を行なう」と入力されていない場合には、ルーチンは S 2-5 に進行する。そして、診断補助装置 10 の取得部 321 は、測定装置 20 から SCEL 遺伝子、MGAT3 遺伝子、SLC4A11 遺伝子、MSLN 遺伝子、FOXO1 遺伝子、RUNX2 遺伝子および WNT11 遺伝子の発現量に関連する蛍光情報を取得する（7 遺伝子判定）。

[0059] 次に、ステップ S 2-6 において、算出部 323 は、取得した蛍光情報から蛍光強度を算出し、記憶部 322 に送信する。そして、ステップ S 2-7 において、算出部 323 は、記憶された蛍光強度に基づき、記憶された式にしたがって、遺伝子の発現量を算出する。

[0060] その後、ステップ S 2-8 において、判定部 324 は、ステップ S 2-7 で算出された発現量が、記憶部 322 に記憶された基準値以上であるか否かの判定を行う。ここで、発現量が基準値以上であるとき、ルーチンはステップ S 2-9 に進行する。そして、判定部 324 は被検者の大腸癌の予後が良好でないことを示す判定結果を出力部 325 に送信する。一方、発現量が基準値未満であるとき、ルーチンはステップ S 2-10 に進行する。そして、判定部 324 は被検者の大腸癌の予後が良好であることを示す判定結果を出力部 325 に送信する。

[0061] 最後に、ステップ S 2-11 において、出力部 325 は、被検者の大腸癌の予後判定結果を出力し、表示部 302 に表示させる。これにより、診断補助装置 10 は、被検者の大腸癌の予後が良好であるのか、または良好でないのかについて診断することを補助する情報を医師などに提供することができる。

[0062] 本発明には、被検者の大腸癌の予後判定に適する判定装置も含まれる。

[0063] なお、記憶部 322 は、以下の工程を判定装置 30 に実行させるためのプログラムを記録している： 大腸癌患者から採取された生体試料における遺

伝子の発現量に関連する情報を測定装置から取得する工程；取得した情報に基づいて、前記患者の大腸癌の予後を判定する工程。

[0064] 本実施形態においては、マイクロアレイにより測定した遺伝子の発現量に関する情報を取得し、取得した情報に基づいて、被検者の大腸癌の予後が判定され得る。例えば、被検者の大腸癌の予後が良好である、または、良好でない、との判定結果を提供することができる。上記の判定結果を医師等に提供することによって、大腸癌の予後についての医師等による診断を補助することができる。

実施例

[0065] 実施例 1：7 遺伝子を用いる大腸癌の予後判定(トレーニングセット)

(1) マーカーの探索

簇出マーカーの探索は以下の手順に沿って行った。具体的には、まず、簇出がみられる大腸癌組織3検体の先進部および基底部の合計2カ所ずつについて、(1)マイクロアレイ(Affymetrix製)測定における発現値の平均が200以上である23,509遺伝子を選択した。次いで、(2) 3検体における先進部および基底部間の発現比の最低値が2以上である73遺伝子(簇出がある先進部の方が基底部よりもおよそ2倍発現量が多い遺伝子)を選択した。その後、(3) 先進部および組織全体間の発現比が1以上である34遺伝子(簇出がある先進部の方が、組織全体より発現量が多い遺伝子)を選択した。

[0066] そして、(4) 前記3検体を含む大腸がん組織85検体を用いて、上記の34遺伝子のうち、簇出陽性検体(グレード3)：26例と陰性検体(グレード1)：44例との間のT検定で、有意差($p < 0.05$)があり、且つ簇出陽性検体において発現が上昇している7遺伝子を選択した。選択された7つの遺伝子およびそれらの発現量測定に用いたプローブセットのIDを下記の表1に示す。また、各プローブの塩基配列(いずれもアンチセンス鎖)を配列番号8～84で表す。

[0067]

以上のBSSを示す検体と閾値未満のBSSを示す検体とでは、生存可能性(Probability)の観点から有意差($p = 0.0479$)

が認められた。以上より、SCEL遺伝子、MGAT3遺伝子、SLC4A11遺伝子、MSLN遺伝子、FOXO1遺伝子、RUNX2遺伝子およびWNT11遺伝子の7つの遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌患者の予後が高リスクであるか、または低リスクであるかについて判定することができることが示唆された。

[0072] 実施例2：7遺伝子を用いる大腸癌の予後判定(バリデーションセット)

上記7つの遺伝子の大腸癌予後マーカーとしての有用性について、公開されている大腸癌の遺伝子発現量データを用いて、さらに検証した。データは公共データベースであるGene Expression Omnibus (GEO) のGSE39582 (461検体)を用いた (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE39582>)。

実施例1と同様にしてROC解析を行い、閾値(7.686, $AUC = 0.5752$)を設定し、上記閾値以上のBSSを示す検体と、上記閾値未満のBSSを示す検体とで生存期間を比較した。結果を図9および10に示す。図10に示されるように、閾値以上のBSSを示す検体と、閾値未満のBSSを示す検体とでは、無病生存率(Disease Free Survival)の観点から有意差($p = 0.000473$)が認められた。この結果は、実施例1の結果を再現している。よって、上記の7つの遺伝子が大腸癌の予後マーカーとして有用であることが確認された。

[0073] 実施例3：3遺伝子を用いる大腸癌の予後判定

本発明者は、SCEL遺伝子、MGAT3遺伝子およびSLC4A11遺伝子の3遺伝子について、実施例2と同じデータベースを用いて、実施例2と同様の実験を行った。具体的には、実施例2と同様にしてROC解析を行い、閾値(6.112, $AUC = 0.5828$)を設定し、上記閾値以上のBSS (3遺伝子測定の場合のBSSの具体的な計算式を下記に示す)を示す検体と、上記閾値未満のBSSを示す検体とで無再発生存期間(r.f.s. delay、日数)を比較した。結果を図11および12に示す。図12に示されるように、閾値以上のBSSを示す検体と、

閾値未満のBSSを示す検体とでは、生存可能性の観点から有意差($p = 0.000684$)が認められた。よって、上記の3つの遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定することができることが示された。

[0074] [数2]

$$\begin{aligned} \text{Budding Signature Score} = & \\ & \{ \log_2(\text{SCEL 遺伝子の Data の正規化値}) + \log_2(\text{MGAT3 遺伝子の Data の正規化値}) + \\ & \log_2(\text{SLC6A11 遺伝子の Data の正規化値}) \} \times 3 \end{aligned}$$

[0075] 実施例4：SCEL遺伝子を用いる大腸癌の予後判定

SCEL遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後判定を行うことが可能か否かについて検証した。すなわち、SCEL遺伝子について、実施例2と同じデータベースを用いて、実施例2と同様の実験を行った。具体的には、実施例2と同様にしてROC解析を行い、閾値(5.300, AUC = 0.6003)を設定し、上記閾値以上のBSS(3遺伝子測定の場合のBSSの具体的な計算式を下記に示す)を示す検体と、上記閾値未満のBSSを示す検体とで無再発生存期間(日数)を比較した。結果を図13および14に示す。図14に示されるように、閾値以上のBSSを示す検体と、閾値未満のBSSを示す検体とでは、生存可能性の観点から有意差($p = 0.000702$)が認められた。よって、SCEL遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定することができることが示された。

[0076] [数3]

$$\text{Budding Signature Score} = \log_2(\text{SCEL 遺伝子の Data の正規化値})$$

符号の説明

[0077]	10	診断補助装置
	20	測定装置
	30	判定装置
	40	記録媒体
	300	コンピュータ本体
	301	入力部
	302	表示部
	310	CPU

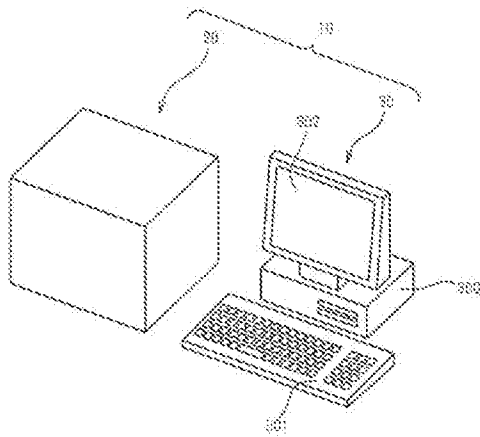
3 1 1	R O M
3 1 2	R A M
3 1 3	ハードディスク
3 1 4	入出力インターフェイス
3 1 5	読出装置
3 1 6	通信インターフェイス
3 1 7	画像出力インターフェイス
3 1 8	バス
3 2 1	取得部
3 2 2	記憶部
3 2 3	算出部
3 2 4	判定部
3 2 5	出力部

請求の範囲

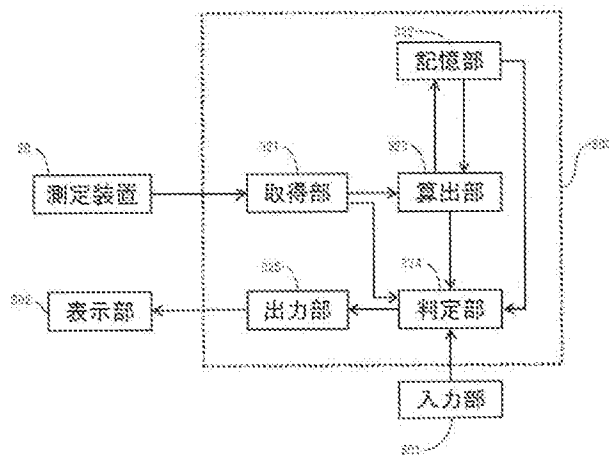
- [請求項1] 大腸癌患者から採取された生体試料における、SCEL遺伝子の発現量を測定する工程と、 前記発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定する工程と、を含む大腸癌の予後診断を補助する方法。
- [請求項2] 前記判定工程において、
前記発現量又はその対数を所定の基準値と比較し、
前記発現量又はその対数が前記基準値以上の場合は予後が良好でないと判定され、前記発現量又はその対数が前記基準値未満の場合は予後が良好であると判定する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記測定工程において、MGAT3遺伝子、SLC4A11遺伝子、MSLN遺伝子、FOXCl遺伝子、RUNX2遺伝子及びWNT11遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子の発現量をさらに測定し、
前記判定工程において、前記測定工程で測定された遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定する、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記測定工程において、MGAT3遺伝子およびSLC4A11遺伝子の発現量をさらに測定し、
前記判定工程において、前記測定工程で測定された遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定する、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記測定工程において、さらにMSLN遺伝子の発現量、FOXCl遺伝子の発現量、RUNX2遺伝子の発現量及びWNT11遺伝子の発現量を測定し、
前記判定工程において、前記測定工程で測定された遺伝子の発現量に基づいて、大腸癌の予後を判定する、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記判定工程において、
前記測定工程で測定された遺伝子の発現量の対数を算出し、
前記対数と所定の基準値とを比較し、
前記対数が前記基準値以上の場合は予後が良好でないと判定され、
前記対数が前記基準値未満の場合は予後が良好であると判定する、請求項1に記載の方法。

- [請求項7] 前記判定工程において、
 前記測定工程で測定された遺伝子の発現量の平均値またはその対数
 を算出し、
 前記平均値または対数と所定の基準値とを比較し、
 前記平均値または対数が前記基準値以上の場合は予後が良好でない
 と判定され、前記平均値または対数が前記基準値未満の場合は予後が
 良好であると判定する、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] コンピュータに、
 大腸癌患者から採取された生体試料における、SCEL遺伝子の発現量
 に関連する情報を測定装置から取得する工程と、
 取得した情報に基づいて、前記患者の大腸癌の予後を判定する工程
 と、
 を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能
 な記録媒体。
- [請求項9] プロセッサとメモリとを含むコンピュータを少なくとも備え、
 前記メモリには、
 大腸癌患者から採取された生体試料における、SCEL遺伝子の発現量
 に関連する情報を測定装置から取得する工程と、
 取得した情報に基づいて、前記患者の大腸癌の予後を判定する工程
 と、
 を前記コンピュータに実行させるためのプログラムが記録されている
 、大腸癌の予後を判定する判定装置。

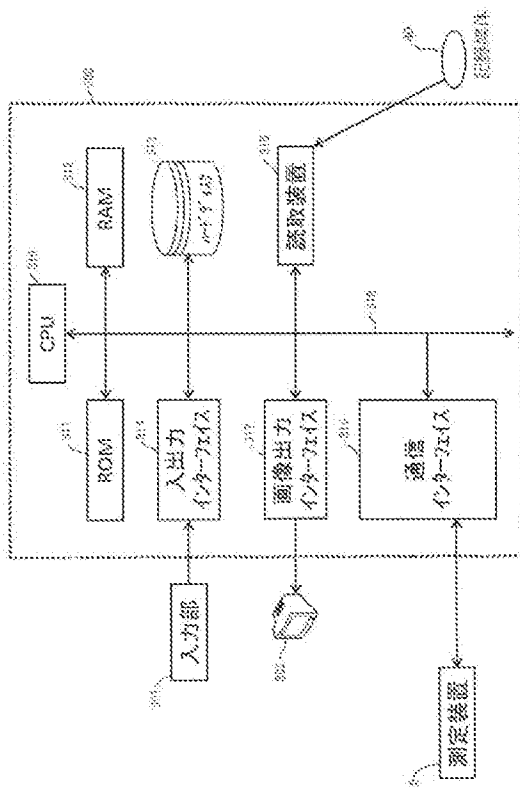
[図1]



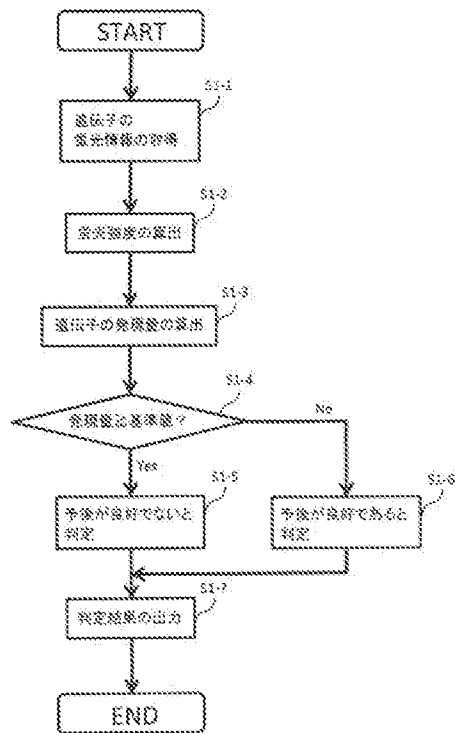
[図2]



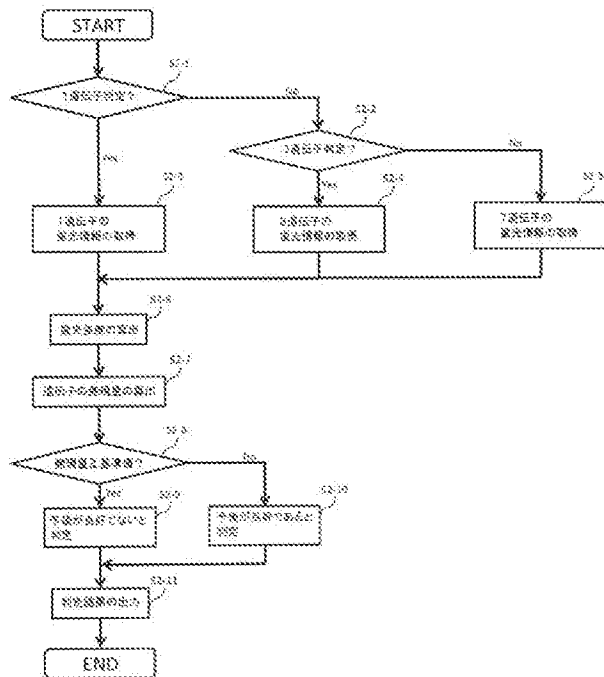
[図3]



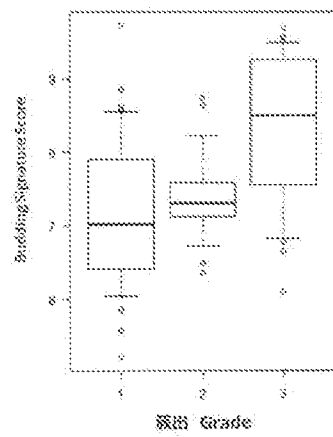
[図4]



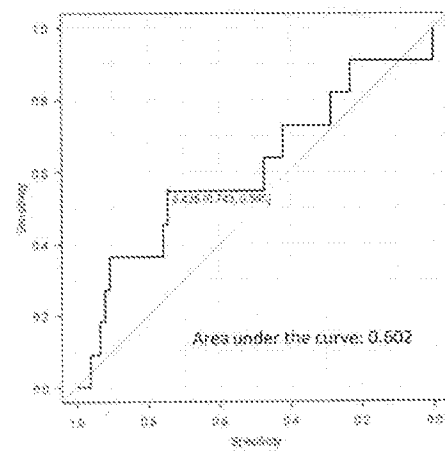
[図5]



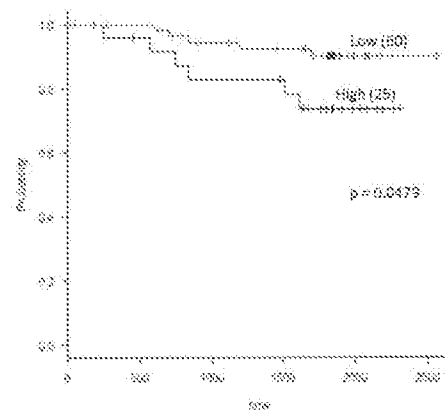
[図6]



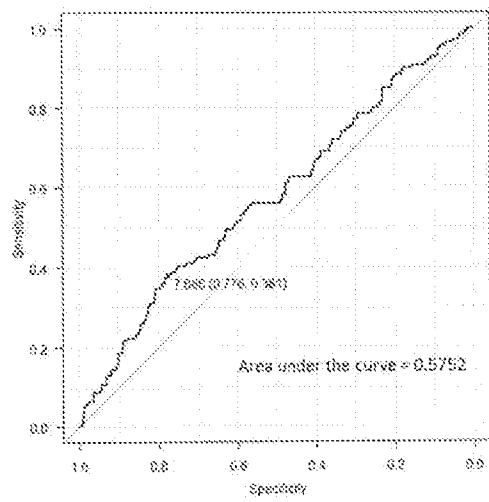
[図7]



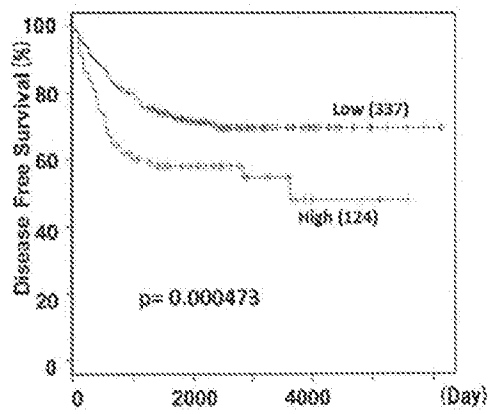
[図8]



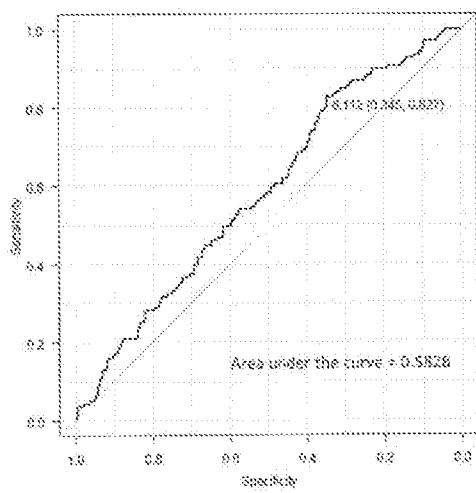
[図9]



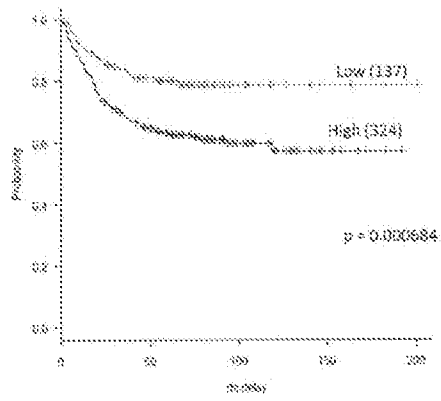
[図10]



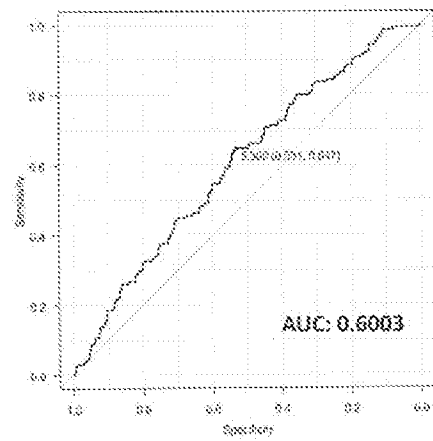
[図11]



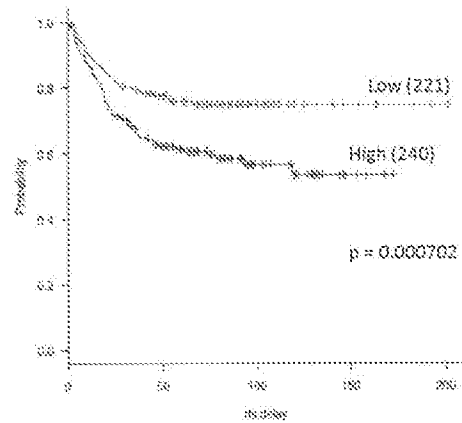
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G06F19/20(2011.01)i

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)

C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574, G06F19/20

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/017537 A2 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE, INC.), 05 February 2015 (05.02.2015), claims; table 3B (Family: none)	1 2-9
Y	JP 2015-503923 A (Oslo Universitetssykehus HF), 05 February 2015 (05.02.2015), claims; examples & WO 2013/104990 A1 claims & US 2014/0342361 A1 & EP 2802673 A1	2-7

☒ 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
10 May 2016 (10.05.16)

Date of mailing of the international search report
17 May 2016 (17.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055124

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/072828 A1 (DNA Chip Research Inc.), 19 September 2002 (19.09.2002), claim 21 & US 2005/0260572 A1 claim 21 & JP 2006-271385 A	8
Y	JP 2008-017832 A (Sysmex Corp.), 31 January 2008 (31.01.2008), claim 10 & US 2007/0287157 A1 claim 10 & EP 1867735 A1 & CN 101089197 A	9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G06F19/20(2011.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574, G06F19/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2015/017537 A2 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE, INC.) 2015.02.05, 請求の範囲, Table3B など, (ファミリーなし)	1 2-9
Y	JP 2015-503923 A (オスロ ユニヴェルシテーツスィケフース ハーエフ) 2015.02.05, 請求の範囲, 実施例など, & WO 2013/104990 A1, claims, & US 2014/0342361 A1 & EP 2802673 A1	2-7

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

1 0 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4 B

9 4 5 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2002/072828 A1 (株式会社ディーエヌエイチップ研究所) 2002.09.19, 請求項 2 1 など, & US 2005/0260572 A1, claim21, & JP 2006-271385 A	8
Y	JP 2008-017832 A (シスメックス株式会社) 2008.01.31, 請求項 1 0 など, & US 2007/0287157 A1, claim10, & EP 1867735 A1 & CN 101089197 A	9