

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7617029号
(P7617029)

(45)発行日 令和7年1月17日(2025.1.17)

(24)登録日 令和7年1月8日(2025.1.8)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6886(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886	Z Z N A
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
G 0 1 N	33/574(2006.01)	G 0 1 N	33/574	Z
請求項の数 5 (全125頁)				
(21)出願番号	特願2021-566070(P2021-566070)	(73)特許権者	517449556	
(86)(22)出願日	令和2年5月6日(2020.5.6)		オックスフォード バイオダイナミックス	
(65)公表番号	特表2022-532108(P2022-532108		ピーエルシー	
	A)		イギリス国、オーエックス4 2ダブリ	
(43)公表日	令和4年7月13日(2022.7.13)		ュビー、オックスフォード、オックスフ	
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/051105		oord ビジネス パーク、ビルディング	
(87)国際公開番号	WO2020/225551		3 1 4 0	
(87)国際公開日	令和2年11月12日(2020.11.12)	(74)代理人	110001896	
審査請求日	令和5年5月2日(2023.5.2)		弁理士法人朝日奈特許事務所	
(31)優先権主張番号	1906487.2	(72)発明者	ハンター、ユアン	
(32)優先日	令和1年5月8日(2019.5.8)		イギリス国、オーエックス4 2ダブリ	
(33)優先権主張国・地域又は機関			ュビー、オックスフォード、オックスフ	
	英国(GB)		oord ビジネス パーク、ビルディング	
(31)優先権主張番号	1914729.7		3 1 4 0、ケア・オブ オックスフォード	
(32)優先日	令和1年10月11日(2019.10.11)		ピーエルシー	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 前立腺がんおよびリンパ腫の染色体コンフォメーションマーカー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

個体における前立腺がんの予後を特定するためのプロセスであって、前記予後を特定するために染色体相互作用 (a) ~ (f) のすべての存在または不存在を前記個体において検出することを含み、

前記染色体相互作用の存在または不存在が、

(i) 染色体相互作用で一緒になった前記個体の染色体領域を架橋する工程と、

(ii) 前記架橋された領域を切断にさらす工程と、

(iii) 前記架橋され切断されたDNA末端をライゲートして、ライゲートされた核酸を形成する工程と、

(iv) 各染色体相互作用に対応するライゲートされた核酸の存在または不存在を検出する工程

を含む方法により検出され；

前記染色体相互作用が、

(a) 位置番号53608013~53608044の領域と位置番号53628991~53629022の領域との間のMIR98遺伝子のX染色体上に形成される染色体相互作用、および

(b) 位置番号90073586~90073617の領域と位置番号90140806~90140837の領域との間のDAPK1遺伝子の第九染色体上に形成される染色体相互作用、および

(c) 位置番号 1 1 9 9 1 2 4 6 2 ~ 1 1 9 9 1 2 4 9 3 の領域と位置番号 1 1 9 9 5 9 7 5 4 ~ 1 1 9 9 5 9 7 8 5 の領域との間の H S D 3 B 2 遺伝子の第一染色体上に形成される染色体相互作用、および

(d) 位置番号 3 9 8 9 5 6 7 8 ~ 3 9 8 9 5 7 0 9 の領域と位置番号 3 9 9 9 1 8 7 4 ~ 3 9 9 9 1 9 0 5 の領域との間の E G R 遺伝子の第二十一染色体上に形成される染色体相互作用、および

(e) 位置番号 5 6 1 8 8 0 3 8 ~ 5 6 1 8 8 0 6 9 の領域と位置番号 5 6 2 4 5 2 8 3 ~ 5 6 2 4 5 3 1 4 の領域との間の S R D 5 A 3 遺伝子の第四染色体上に形成される染色体相互作用、および

(f) 位置番号 1 0 2 6 6 1 7 0 4 ~ 1 0 2 6 6 1 7 3 5 の領域と位置番号 1 0 2 6 6 7 6 1 2 ~ 1 0 2 6 6 7 6 4 3 の領域との間の M M P 1 遺伝子の第十一染色体上に形成される染色体相互作用

である、プロセス。

【請求項 2】

前記染色体相互作用の存在または不存在の検出が、前記ライゲートされた核酸を増幅することができるプライマーおよび P C R 反応中にライゲートされた部位に結合するプローブを使用する定量 P C R (q P C R) による前記ライゲートされた核酸の特異的検出を含み、前記プローブが、染色体相互作用で一緒になった染色体領域の各々からの配列に相補的な配列を含む、請求項 1 記載のプロセス。

【請求項 3】

前記プローブが、

前記プローブの 5 ' 末端に共有結合したフルオロフォア、または

前記プローブの 3 ' 末端に共有結合した消光剤

を含む、請求項 2 記載のプロセス。

【請求項 4】

前記フルオロフォアが、H E X、T e x a s R e d および F A M から選択される、請求項 3 記載のプロセス。

【請求項 5】

前記プローブが、1 0 から 4 0 のヌクレオチド塩基の長さの核酸配列を含む、請求項 2 記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は疾患プロセスに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

がんの疾患プロセスの規制および原因となる側面は複雑であり、利用可能な D N A およびタンパク質の分類方法を使用して容易に解明することはできない。

【0 0 0 3】

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L) は、抗体産生に関与する白血球の一種である B 細胞のがんである。これは成人の間で最も一般的なタイプの非ホジキンリンパ腫であり、米国および英国では年間 1 0 万人当たり 7 ~ 8 例の発症率がある。しかし、疾患プロセスの帰結についての理解は不十分である。

【0 0 0 4】

前立腺がんは、前立腺の細胞の異常で制御されていない成長によって引き起こされる。前立腺がんの生存率は 1 0 年ごとに改善しているが、当該疾患は依然として大部分が不治であると考えられている。米国がん協会 (American Cancer Society) によると、前立腺がんのすべてのステージを合わせて、1 年の相対生存率は 2 0 % であり、5 年の相対生存率は 7 % である。

【発明の概要】

【0005】

本発明者らは、前立腺がん、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）およびリンパ腫の染色体コンフォメーションシグネチャによって定義される患者のサブグループを特定している。

【0006】

本発明によれば、集団内のサブグループを表す染色体状態を検出するためのプロセスが提供され、当該プロセスは、その染色体状態に関連する染色体相互作用がゲノムの定義された領域内に存在するか否かを判定する工程を含み；かつ

ー 上記染色体相互作用は、随意に、どの染色体相互作用が集団のサブグループに対応する染色体状態に関連するかを判定する方法によって特定されており、当該方法は、染色体の異なる状態を有するサブグループ由来の核酸の第1のセットをインデックス核酸の第2のセットと接触させる工程、および相補的配列のハイブリダイズを可能にする工程を含み、核酸の第1および第2のセットにおける核酸は、染色体相互作用で一緒になった両方の染色体領域由来の配列を含むライゲートされた産物を表し、核酸の第1のセットと第2のセットとの間のハイブリダイゼーションのパターンにより、どの染色体相互作用がサブグループに特異的であるかの判定が可能になり；および

ー サブグループは前立腺がんの予後に関連し、染色体相互作用は、

（i）表6に挙げられる領域または遺伝子のいずれかに存在する、および／または

（ii）表6に示される任意のプロープによって表される染色体相互作用のいずれかに対応する、および／または

（iii）（i）または（ii）を含むまたは（i）または（ii）に隣接する4,000塩基領域に存在する；

または、

ー サブグループはDLBCLの予後に関連し、染色体相互作用は、

a）表5に挙げられる領域または遺伝子のいずれかに存在する、および／または

b）表5に示される任意のプロープによって表される染色体相互作用のいずれかに対応する、および／または

c）（a）または（b）を含むまたは（a）または（b）に隣接する4,000塩基領域に存在する；

または、

ー サブグループはリンパ腫の予後に関連し、染色体相互作用は、

（iv）表8に挙げられる領域または遺伝子のいずれかに存在する、および／または

（v）表8に示される染色体相互作用のいずれかに対応する、および／または

（vi）（iv）または（v）を含むまたは（iv）または（v）に隣接する4,000塩基領域に存在する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】前立腺がんの研究の主成分分析（PCA）を示す。

【図2】2つのPCA予後分類子のVENN比較を示す。

【図3】DLBCLのPCA分析を示す。

【図4】DLBCLの7つのBTKマーカー（OBD RD051）に関するPCAを示す。

【図5】染色体相互作用の分類がどのように実行され得るかの例を示す。

【図6】本発明の方法で使うことができるイヌリンパ腫研究からのマーカーを示す。図6はマーカー減少を示している。38個のサンプルの70%が、トレーニングセット（28）として使用され、マーカー選択に使用された。残りの10個は試験セットとして使用された。複数のトレーニングおよび試験のセットが使用された。単変量解析、フィッシャーの直接確率検定（列DおよびEの結果）、および多変量分析ペナルティ付きロジスティックモデリング（GLMNET、列BおよびCの結果）。マーカー2～18はリンパ腫マーカーであり、19～23は対照である。リンパ腫に存在するすべてのループである上

10

20

30

40

50

位11が分類のために選択された。

【図7】ヒト遺伝子に対するイヌマーカーを示す。表は、最も近いマッピングゲノム領域を有するヒトゲノム(Hg38)にマッピングされた上位11のイヌマーカーを示している。隣接するネットワークは、11個のマーカー(暗色)、明るい色のノードおよびNCIデータベースを使用したリンカータンパク質を使用して構築されている。

【図8】ヒト遺伝子に対するイヌマーカーを示す。前と同様であるが、ネットワークに対する経路エンリッチメントを伴う。11個のイヌマッピング遺伝子座のみがエンリッチメントに使用され、ライゲートされたモードはエンリッチメントから省略された。明るい色のノードは、KEGG CML経路に属している。

【図9】トレーニングセット1および試験セット1のXGBoost11マークモデルを示す。

10

【図10】トレーニングセット2および試験セット2のXGBoost11マークモデルを示す。

【図11】トレーニングセット3および試験セット3のXGBoost11マークモデルを示す。

【図12】トレーニングセット1のロジスティックPCAを示す。

【図13】トレーニングセット1および試験セット1のロジスティックPCAを示す。ロジスティックPCAモデルは、試験セット1(三角形)を予測するために使用された。より暗色の三角形は試験セット由来のリンパ腫(ラベル付き)であり、より明るい色の三角形は試験セット由来の対照である。トレーニングのリンパ腫サンプルはより暗色のものであり、対照はより明るい色のものである。

20

【図14】トレーニングセット1および試験セット1のROCおよびAUCを示す。

【図15】NFKB1での患者のPFS EpiSwitch(商標)の呼び出しおよびループダイナミックを示す。EpiSwitch(商標)10マーカーヒトモデルを使用するABCまたはGCBと呼び出しされた118人の患者、この呼び出しおよびループのダイナミクスを使用するPFSモデリング、ループを有するGCBは死亡せず、これは、ヒトモデルが疾患予後に好適にはたらくことを示している。

【図16】NFATC1での118人の患者のPFS EpiSwitch(商標)の呼び出しおよびループダイナミックを示す。以前と同様であるが、NFATC1に関して、再び、これは、マーカーを10のヒトマーカーの1つとして使用する予後のヒトモデルが分類に非常に良好であることを示している。

30

【図17】前立腺がん(PCa)の診断および予後のバイオマーカーを同定、評価、および検証するための3段階のアプローチを示す。

【図18】2つの群を含む78のサンプルに適用された5つのマーカーに対するPCAを示す。第1の群は、49個の既知のサンプル(24個のPCaおよび25個の健常対照(Cntrl))であり、24個のPCaサンプルおよび5個の健常Cntrlサンプルを含む29個のサンプルの第2の群と組み合わせられる。

【図19】分類子を開発するためのワークフローを示す。

【図20】分類子に関連する遺伝子群を示す。

【図21】EpiSwitch DLBCL-CCSおよびFluidigmサブタイプ呼び出しの重なりと発見(Discovery)コホートに適用した場合のROC曲線を示す。A. 既知のサブタイプのサンプルに対してEpiSwitch DLBCL-CCSおよびFluidigmのアッセイによって行われたサブタイプ呼び出し。60個のサンプルのうち60個が、両方のアッセイによって同定して呼び出しされた。B. 発見コホートに適用された場合のDLBCL-CCSに対する受信者動作曲線(ROC)。C. DLBCL-CCSによってABCまたはGCBと呼び出しされたサンプルの(無増悪生存による) Kaplan-Meier法。ABCと呼び出しされたサンプルは、GCBと呼び出しされたサンプルよりも著しく乏しい長期生存を示した。

40

【図22】EpiSwitchおよびFluidigmのアッセイによるタイプIIIIサンプルにおけるDLBCLサブタイプの割り当てを示す。

50

【図23】長期生存でのEpiSwitchおよびFluidigmを使用したタイプI E IサンプルにおけるベースラインDLBCLサブタイプ呼び出しの比較を示す。ABC、GCBによって分類された、またはFluidigmアッセイ(A)もしくはEpiSwitch DLBCL-CCS(B)によって未分類の58人のDLBCL患者のカプラン・マイヤー生存曲線。Fluidigmは、15個のサンプルをABCに、22個をGCBに、および21個をUNCに分類した。EpiSwitchは、34個をABCに、および24個をGCBとして分類した。

【図24】検証(Validation)コホートにおけるEpiSwitchおよびFluidigmの分類による平均生存期間を示す。

【図25】DLBCLサブタイプの可能性のある初期評価を示す。

【図26】発見コホートにおけるEpiSwitchによるベースラインABC/GCBサブタイプ呼び出しでのDLBCL患者のPCAを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

発明の態様

本発明は、前立腺がんの予後の判定、特に前立腺がんが侵襲性であるか緩慢性であるかの判定に関する。この判定は、本明細書、例えば表6に開示される関連マーカーのいずれか、またはマーカーの好ましい組み合わせ、または本明細書に開示される定義された特異的な領域のマーカーを分類することによって行われる。したがって、本発明は、前立腺がんを有する患者を分類して、前立腺がんが侵襲性であるか緩慢性であるかを特定する方法

【0009】

本発明はまた、DLBCLにおける予後の判定、特に予後が生存に関して良好であるか不良であるかの判定に関する。この判定は、本明細書、例えば表5に開示される関連マーカーのいずれか、またはマーカーの好ましい組み合わせ、または本明細書に開示される定義された特異的な領域のマーカーを分類することによって行われる。したがって、本発明は、DLBCLを有する患者を分類して、患者が生存に関して良好または不良の予後を有するかどうかを特定する、例えば、疾患の予想される発症率および／または死亡までの時間を判定する方法に関する。

【0010】

本質的に、本発明の方法において、前立腺がんまたはDLBCLの亜集団はマーカーの分類によって特定される。したがって、本発明は、例えば、これらの疾病における予後に関連するエピジェネティックマーカーのパネルに関する。本発明は、それゆえ、患者のニーズを正確に反映する個別化された治療を患者に施すことを可能にする。

【0011】

本発明はまた、表8または9によって定義される染色体相互作用の分類に基づくリンパ腫の予後の判定に関する。

【0012】

表5～7は、好ましくは、ヒトの予後の判定に関する。表8および9は、好ましくは、イヌの予後の判定に関する。

【0013】

本明細書で言及される任意の治療薬、例えば薬物が、当該方法の結果に基づいて個体に投与され得る。

【0014】

表および図面にはマーカーセットが開示されている。一実施形態では、任意の開示されたマーカーセットからの少なくとも10のマーカーが本発明で使用される。別の実施形態では、任意の開示されたマーカーセットからのマーカーの少なくとも20%が本発明で使用される。

【0015】

発明のプロセス

10

20

30

40

50

本発明のプロセスは、予後に関連する染色体相互作用を検出するための分類システムを含む。この分類は、染色体相互作用で一緒になった染色体の架橋領域に基づく本明細書で言及される E p i S w i t c h (商標) システムを使用して実施され得、染色体 DNA を切断し、その後、架橋実体に存在する核酸をライゲートして、染色体相互作用を形成した両方の領域から配列を有するライゲートされた核酸を誘導する。このライゲートされた核酸の検出は、特定の染色体相互作用の有無の判定を可能にする。

【0016】

染色体相互作用は、第1および第2の核酸の集団が使用される上記の方法を使用して同定され得る。これらの核酸は、E p i S w i t c h (商標) の技術を使用して生成することもできる。

【0017】

本発明に関連するエピジェネティックな相互作用

本明細書で使用されるように、「エピジェネティック」および「染色体」相互作用という用語は、典型的に、染色体の遠位領域間の相互作用を指し、上記相互作用は動的であり、染色体の領域の状態に応じて変化、形成または破壊する。

【0018】

本発明の特定のプロセスでは、染色体相互作用は、典型的に、最初に相互作用の一部である染色体の両方の領域からの配列を含むライゲートされた核酸を生成することによって検出される。そのようなプロセスでは、領域は、任意の適切な手段によって架橋することができる。好ましい態様では、相互作用は、ホルムアルデヒドを使用して架橋されるが、任意のアルデヒド、または D-ビオチノイル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはジゴキシゲニン-3-O-メチルカルボニル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルによっても架橋され得る。パラホルムアルデヒドは、4 オングストローム離れた DNA 鎖を架橋することができる。好ましくは、染色体相互作用は同じ染色体上にあり、随意に 2 ~ 10 オングストローム離れている。

【0019】

染色体相互作用は、例えば、生理学的状態の変化に応答して転写または抑圧されている場合、染色体の領域の状態を反映し得る。本明細書で定義されるサブグループに特異的な染色体相互作用は安定していることがわかっており、したがって、2つのサブグループ間の差を測定する信頼性の高い手段が提供される。

【0020】

さらに、特性(予後など)に特異的な染色体相互作用は、通常、例えば、メチル化やヒストンタンパク質の結合の変化などの他のエピジェネティックマーカーと比較して、生物学的プロセスの初期に発生する。したがって、本発明のプロセスは、生物学的プロセスの初期段階を検出することができる。これにより、早期介入(例えば治療)が可能になり、これは結果としてより効果的になり得る。染色体相互作用はまた、個体の現在の状態を反映しているため、予後の変化を評価するために使用することができる。さらに、同じサブグループ内の個体間には関連する染色体相互作用にほとんど変化がない。染色体相互作用の検出は、遺伝子ごとに最大 50 の異なる考えられ得る相互作用で非常に有益であるため、本発明のプロセスでは、500,000 の異なる相互作用を照合することができる。

【0021】

好ましいマーカーセット

本明細書において、「マーカー」または「バイオマーカー」という用語は、本発明において検出(分類)することができる特異的な染色体相互作用を指す。特異的なマーカーが本明細書に開示されており、それらはいずれも本発明で使用され得る。マーカーのさらなるセットが、例えば、本明細書に開示される組み合わせまたは数で使用され得る。本明細書の表に開示されている特異的なマーカーが好ましいだけでなく、本明細書の表に言及されている遺伝子および領域に存在するマーカーも好ましい。これらは、任意の適切な方法、例えば、qPCR法を含む、本明細書に開示されるPCRまたはプローブベースの方法によって分類され得る。マーカーは、本明細書では、位置によって、またはプローブおよ

10

20

30

40

50

び／またはプライマー配列によって定義される。

【0022】

エピジェネティックな相互作用の位置および原因

エピジェネティックな染色体相互作用は重複し、関連する遺伝子または記述されていない遺伝子をコードすることが示されている染色体の領域を含み得るが、等しく遺伝子間領域に存在し得る。本発明者らが、すべての領域におけるエピジェネティックな相互作用が、染色体遺伝子座の状態を判定する上で等しく重要であることを発見したことにさらに留意されたい。これらの相互作用は、必ずしも遺伝子座に位置する特定の遺伝子のコード領域に存在するとは限らず、遺伝子間領域に存在し得る。

【0023】

本発明で検出される染色体相互作用は、環境要因、DNAメチル化、非コードアンチセンスRNA転写物、非変異原性発癌物質、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、および特異的な局所DNA相互作用による、基礎となるDNA配列に対する変化によって引き起こされ得る。染色体相互作用につながる変化は、基礎となる核酸配列に対する変化によって引き起こされ得、それら自体は遺伝子産物または遺伝子発現のモードに直接影響しない。そのような変化は、例えば、遺伝子内および／または遺伝子外のSNP、遺伝子融合および／または遺伝子間DNA、マイクロRNA、および非コードRNAの欠失であり得る。例えば、SNPのおよそ20%が非コード領域に存在することが知られているため、記載されるプロセスは非コード状況でも有益である。一態様では、相互作用を形成するために一緒になる染色体の領域は、同じ染色体上で5kb、3kb、1kb、500塩基対または200塩基対未満離れている。

【0024】

検出される染色体相互作用は、好ましくは、表5に言及されている遺伝子のいずれか内に存在する。しかし、それはまた、遺伝子上流または下流、例えば、遺伝子またはコード配列から最大50,000、最大30,000、最大20,000、最大10,000、または最大5000塩基上流または下流であり得る。

【0025】

検出される染色体相互作用は、好ましくは、表6に言及されている遺伝子のいずれか内に存在する。しかし、それはまた、遺伝子上流または下流、例えば、遺伝子またはコード配列から最大50,000、最大30,000、最大20,000、最大10,000、または最大5000塩基上流または下流であり得る。

【0026】

検出される染色体相互作用は、好ましくは、表9に言及されている遺伝子のいずれか内に存在する。しかし、それはまた、遺伝子上流または下流、例えば、遺伝子またはコード配列から最大50,000、最大30,000、最大20,000、最大10,000、または最大5000塩基上流または下流であり得る。

【0027】

サブグループ、時点および個別化された治療

本発明の目的は予後を判定することである。これは、1つまたは複数の定義された時点、例えば、少なくとも1、2、5、8または10の異なる時点で行われ得る。少なくとも1、2、5または8の時点間の期間は、少なくとも5、10、20、50、80または100日であり得る。

【0028】

本明細書で使用されるように、「サブグループ」は、好ましくは集団サブグループ（集団内のサブグループ）、より好ましくは特定の真核生物などの特定の動物の集団内のサブグループ、または哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト、非ヒト霊長類、またはげっ歯類、例えばマウスまたはラット）を指す。最も好ましくは、「サブグループ」は、ヒト集団内のサブグループを指す。サブグループは、犬などのイヌのサブグループであり得る。

【0029】

本発明は、集団内の特定のサブグループを検出および処置することを含む。本発明者ら

10

20

30

40

50

は、染色体相互作用が、所与の集団内のサブセット（例えば、少なくとも2つのサブセット）間で異なることを発見した。これらの違いを識別することで、医師は、プロセスで記載されているように、患者を集団の1つのサブセットの一部として分類することができる。したがって、本発明は、エピジェネティックな染色体相互作用に基づいて患者用に薬剤を個人化するプロセスを医師に提供する。

【0030】

一態様では、本発明は、個体が、速いまたは遅い「発症者」である、および／または侵襲性または緩慢性の疾患を患っている、かどうかを試験することに関する。

【0031】

本発明はまた、個体の予想される生存時間を判定し得る。

【0032】

そのような試験は、その後の患者の治療方法、例えば、薬物の種類および／またはその用量および／またはその投与頻度を選択するために使用され得る。

【0033】

ライゲートされた核酸の生成

本発明の特定の態様は、ライゲートされた核酸、特にライゲートされたDNAを利用する。これらは、染色体相互作用で一緒になる領域の両方からの配列を含み、したがって相互作用に関する情報を提供する。本明細書に記載されるEpiSwitch（商標）法は、染色体相互作用を検出するためにそのようなライゲートされた核酸の生成を使用する。

【0034】

したがって、本発明のプロセスは、以下の工程（これらの工程を含む方法を含む）によってライゲートされた核酸（例えばDNA）を生成する工程を含み得る：

(i) 好ましくはインビトロで、染色体遺伝子座に存在するエピジェネティックな染色体相互作用を架橋する工程；

(ii) 随意に、架橋されたDNAを上記染色体遺伝子座から単離する工程；

(iii) 上記架橋されたDNAを、例えば、少なくとも1回切断する酵素（特に、上記染色体遺伝子座内で少なくとも1回切断する酵素）を用いる制限分解によって切断にさらす工程；

(iv) （特にDNAループを形成するために）上記架橋された切断したDNA末端をライゲートする工程；および

(v) 随意に、特異的な染色体相互作用の存在を同定するために、特にPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの技術を使用して、上記ライゲートされたDNAおよび／または上記DNAループの存在を同定する工程。

【0035】

これらの工程は、本明細書に言及される任意の態様に関する染色体相互作用を検出するために実行され得る。これらの工程はまた、本明細書に言及される第1および／または核酸の第2のセットを生成するために実行され得る。

【0036】

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）は、ライゲートされた核酸を検出または識別するために使用され得、例えば、生成されるPCR産物のサイズが、存在する特異的な染色体相互作用を示唆し得るため、遺伝子座の状態を同定するために使用され得る。好ましい態様では、表5に示される少なくとも1つ、2つ、または3つのプライマーまたはプライマー対が、PCR反応において使用される。他の態様では、少なくとも1、10、20、30、50もしくは80のプライマーまたはプライマー対、または表6に示されるプライマーまたはプライマー対が、PCR反応において使用される。当業者は、対象の染色体遺伝子座内のDNAを切断するために使用することができる多数の制限酵素を認識する。使用される特定の酵素が、研究される遺伝子座およびそこに位置するDNAの配列に依存することは明らかであろう。本発明に記載されるようにDNAを切断するために使用することがで

10

20

30

40

50

きる制限酵素の非限定的な例は、Taq Iである。

【0037】

EpiSwitch（商標）の技術

EpiSwitch（商標）の技術はまた、表現型に特異的なエピジェネティックな染色体コンフォメーションシグネチャの検出におけるマイクロアレイEpiSwitch（商標）マーカーデータの使用に関する。本明細書に記載される方法でライゲートされた核酸を利用するEpiSwitch（商標）などの態様には、いくつかの利点がある。それらは、例えば、本発明の核酸の第1のセットからの核酸配列が核酸の第2のセットとハイブリダイズするかまたはハイブリダイズしないために、低レベルの確率的ノイズを有する。これにより、エピジェネティックレベルで複雑なメカニズムを測定する比較的簡単な方法を可能にするバイナリ結果が提供される。EpiSwitch（商標）の技術はまた、処理時間が速く、コストも低い。一態様では、処理時間は3時間から6時間である。

10

【0038】

サンプルおよびサンプル処理

本発明のプロセスは、通常、サンプル上で実行される。サンプルは、定義された時点で、例えば、本明細書で定義された任意の時点で取得され得る。サンプルは、通常、個体からのDNAを含む。それは、通常、細胞を含む。一態様では、サンプルは、低侵襲的手段によって得られ、例えば、血液サンプルであり得る。DNAが抽出され、標準的な制限酵素で切断され得る。これにより、どの染色体コンフォメーションが保持され、EpiSwitch（商標）プラットフォームで検出されるかを予め判定することができる。水平伝播を含む、組織と血液との間の染色体相互作用の同期により、血液サンプルを使用して、疾患に関連する組織などの組織内の染色体相互作用を検出することができる。癌などの特定の疾病に関して、突然変異による遺伝的ノイズが関連組織における染色体相互作用の「シグナル」に影響を与えかねないため、血液を使用することに利点がある。

20

【0039】

本発明の核酸の性質

本発明は、本発明のプロセスで使用または生成されるものとして本明細書に記載されているライゲートされた核酸などの特定の核酸に関する。これらは、本明細書に言及される第1および第2の核酸と同じであり得るか、またはそれらの特性のいずれかを有し得る。本発明の核酸は、典型的に、2つの部分を含み、その各々は、染色体相互作用で一緒になる染色体の2つの領域のうちの1つからの配列を含む。典型的に、各部分は、少なくとも8、10、15、20、30または40ヌクレオチドの長さ、例えば10～40ヌクレオチドの長さである。好ましい核酸は、表のいずれかに言及される遺伝子のいずれかからの配列を含む。典型的に、好ましい核酸は、表5に言及される特異的なプローブ配列を含むか、またはそのような配列の断片および／または相同体を含む。典型的に、好ましい核酸は、表6に言及される特異的なプローブ配列を含み得るか、またはそのような配列の断片および／または相同体を含み得る。

30

【0040】

好ましくは、核酸はDNAである。特異的な配列が提供される場合、本発明が、特定の態様で必要とされるように相補的配列を使用し得ることが理解される。好ましくは、核酸はDNAである。特異的な配列が提供される場合、本発明が、特定の態様で必要とされるように相補的配列を使用し得ることが理解される。

40

【0041】

表5に示されるプライマーはまた、本明細書に記載されるように本発明において使用され得る。一態様では、表5に示される配列、または表5に示される任意の配列の断片および／または相同体のいずれかを含むプライマーが使用される。表6に示されるプライマーはまた、本明細書に言及されるように本発明において使用され得る。一態様では、表6に示される配列、または表6に示される任意の配列の断片および／または相同体のいずれかを含むプライマーが使用される。表8に示されるプライマーはまた、本明細書に記載されるように本発明において使用され得る。一態様では、表8に示される配列、または表8に

50

示される任意の配列の断片および／または相同体のいずれかを含むプライマーが使用される。

【0042】

核酸の第2のセット「インデックス」配列

核酸配列の第2のセットは、インデックス配列のセットであるという機能を有し、本質的に、サブグループの特異的配列を同定するのに適した核酸配列のセットである。それらは「バックグラウンド」染色体相互作用を表すことができ、何らかの方法で選択され得るか、または選択され得ない。それらは概して、考えられるすべての染色体相互作用のサブセットである。

【0043】

核酸の第2のセットは、任意の適切なプロセスによって導き出され得る。それらは、計算によって導き出すことができるか、または個体の染色体相互作用に基づき得る。それらは典型的に、核酸の第1のセットよりも大きな集団群を表す。1つの特定の態様では、核酸の第2のセットは、特異的なセットの遺伝子における考えられるすべてのエピジェネティックな染色体相互作用を表す。別の特定の態様では、核酸の第2のセットは、本明細書に記載される集団に存在する考えられるすべてのエピジェネティックな染色体相互作用の大部分を表す。1つの特定の態様では、核酸の第2のセットは、少なくとも20、50、100または500の遺伝子、例えば20～100または50～500の遺伝子におけるエピジェネティックな染色体相互作用の少なくとも50%または少なくとも80%を表す。

【0044】

核酸の第2のセットは、典型的に、集団における表現型を変更、調節、または何らかの方法で媒介する、少なくとも100の考えられるエピジェネティックな染色体相互作用を表す。核酸の第2のセットは、種における病状（典型的に診断または予後に関連する）に影響を与える染色体相互作用を表し得る。核酸の第2のセットは、典型的に、予後のサブグループに関連するおよび関連しないという両方のエピジェネティックな相互作用を表す配列を含む。

【0045】

1つの特定の態様では、核酸の第2のセットは、少なくとも部分的に集団における自然起源の配列に由来し、典型的に、インシリコのプロセスによって得られる。上記核酸は、自然起源の核酸に存在する核酸の対応する部分と比較して、単一または複数の突然変異をさらに含み得る。突然変異には、1つまたは複数のヌクレオチド塩基対の欠失、置換、および／または付加が含まれる。1つの特定の態様では、核酸の第2のセットは、自然起源の種に存在する核酸の対応する部分に対して少なくとも70%の配列同一性を有する相同体および／またはオルソログを表す配列を含み得る。別の特定の態様では、自然起源の種に存在する核酸の対応する部分に対する少なくとも80%の配列同一性または少なくとも90%の配列同一性が提供される。

【0046】

核酸の第2のセットの特性

1つの特定の態様では、核酸の第2のセットには少なくとも100の異なる核酸配列、好ましくは少なくとも1000、2000または5000の異なる核酸配列があり、最大で100、000、1,000,000または10,000,000の異なる核酸配列がある。典型的な数は、1,000～100,000の異なる核酸配列など、100～1,000,000である。これらのすべてまたは少なくとも90%または少なくとも50%は異なる染色体相互作用に対応する。

【0047】

1つの特定の態様では、核酸の第2のセットは、少なくとも20の異なる遺伝子座または遺伝子、好ましくは少なくとも40の異なる遺伝子座または遺伝子、より好ましくは、100～10,000の異なる遺伝子座または遺伝子など、少なくとも100、少なくとも500、少なくとも1000または少なくとも5000の異なる遺伝子座または遺伝子における染色体相互作用を表す。第2のセットの核酸の長さは、サブグループに特異的な

10

20

30

40

50

染色体相互作用の同定を可能にするために、ワトソン・クリック塩基対に従って第1のセットの核酸に特異的にハイブリダイズするのに適している。典型的には、核酸の第2のセットは、染色体相互作用で一緒になる2つの染色体領域に配列で対応する2つの部分を含む。核酸の第2のセットは、典型的に、少なくとも10塩基（ヌクレオチド）長、好ましくは20塩基長、好ましくはまた30塩基長である核酸配列を含む。別の態様では、核酸配列は、長さにおいて最大で500塩基対、好ましくは最大で100塩基対、好ましくはまた最大で50塩基対であり得る。好ましい態様では、核酸の第2のセットは、17塩基対～25塩基対の間の核酸配列を含む。一態様では、核酸配列の第2のセットの少なくとも100%、80%または50%が、上記のような長さを有する。好ましくは、異なる核酸は、重複する配列を有さず、例えば、核酸の少なくとも100%、90%、80%、または50%は、少なくとも5つの連続するヌクレオチドにわたって同じ配列を有さない。

10

【0048】

核酸の第2のセットが「インデックス」として作用することを考慮すると、第2の核酸の同一のセットが、種々の特性に対するサブグループを表す第1の核酸の種々のセットと共に使用され得る、すなわち、核酸の第2のセットは、種々の特性に関連する染色体相互作用を同定するために使用することができる核酸の「普遍的」集合を表し得る。

【0049】

核酸の第1のセット

核酸の第1のセットは、典型的に、予後に関連するサブグループからのものである。第1の核酸は、本明細書に言及される核酸の第2のセットの特徴および特性のいずれかを有し得る。核酸の第1のセットは、通常、本明細書に記載される処置および処理、特にEpiSwitch（商標）の架橋および切断工程を受けた個体からのサンプルに由来する。典型的に、核酸の第1のセットは、個体から採取されたサンプルに存在する染色体相互作用のすべてまたは少なくとも80%または50%を表す。

20

【0050】

典型的に、核酸の第1のセットは、核酸の第2のセットによって表される染色体相互作用と比較して、核酸の第2のセットによって表される遺伝子座または遺伝子にわたる染色体相互作用のより小さな集団を表す、すなわち、核酸の第2のセットは、定義されたセットの遺伝子座または遺伝子における相互作用のバックグラウンドまたはインデックスのセットを表している。

30

【0051】

核酸のライブラリ

本明細書に言及される核酸集団のタイプはいずれも、「第1」または「第2」の核酸などの、そのタイプの少なくとも200、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも5000、または少なくとも10000の異なる核酸を含むライブラリの形態で存在し得る。このようなライブラリは、アレイに結合されている形態であり得る。ライブラリは、表5または6に示されるプローブまたはプライマー対のいくつかまたはすべてを含み得る。ライブラリは、本明細書に開示される表のいずれかからのプローブ配列のすべてを含み得る。

【0052】

ハイブリダイゼーション

本発明は、核酸の第1のセットおよび核酸の第2のセットからの完全にまたは部分的に相補的な核酸配列がハイブリダイズすることを可能にするための手段を必要とする。一態様では、核酸の第1のセットのすべてが、単一のアッセイにおいて、すなわち単一のハイブリダイゼーション工程において、核酸の第2のセットのすべてと接触させられる。しかし、任意の適切なアッセイを使用することができる。

40

【0053】

標識核酸およびハイブリダイゼーションのパターン

本明細書に言及される核酸は、好ましくは、成功したハイブリダイゼーションの検出を支援するフルオロフォア（蛍光分子）または放射性標識などの独立した標識を使用して標

50

識化され得る。特定の標識はUV光の下で検出することができる。ハイブリダイゼーションのパターンは、例えば本明細書に記載されるアレイ上で、2つのサブグループ間のエピジェネティックな染色体相互作用の差を表し、したがって、エピジェネティックな染色体相互作用を比較するプロセスおよびどのエピジェネティックな染色体相互作用が本発明の集団におけるサブグループに特異的であるかの判定を提供する。

【0054】

「ハイブリダイゼーションのパターン」という用語は、核酸の第1のセットと核酸の第2のセットとの間のハイブリダイゼーションの有無、すなわち、第1のセットからのどの特異的な核酸が第2のセットからのどの特異的な核酸とハイブリダイズするかを広くカバーし、そのため、任意の特定のアッセイもしくは技術、または「パターン」を検出することができる表面もしくはアレイを有する必要性に限定されない。

10

【0055】

特定の特徴を有するサブグループの選択

本発明は、個体の予後に関連する特徴の有無を判定するために、染色体相互作用、典型的には5～20または5～500のそのような相互作用、好ましくは20～300または50～100の相互作用の有無を検出する工程を含むプロセスを提供する。好ましくは、染色体相互作用は、本明細書に言及される遺伝子のいずれかにおけるものである。一態様では、分類されている染色体相互作用は、表5の核酸によって表されるものである。別の態様では、染色体相互作用は表6に表されるものである。さらなる態様では、分類されている染色体相互作用は、表8の核酸によって表されるものである。表における「検出されたループ」というタイトルの列は、どのサブグループが各プローブによって検出されるかを示している。検出は、そのサブグループ内の染色体相互作用の有無の検出であり得、これは「1」と「-1」で示すものである。

20

【0056】

試験される個体

試験される個体が由来する種の例は、本明細書に言及されている。加えて、本発明のプロセスで試験される個体は、何らかの方法で選択され得る。個体は、本明細書に言及される任意の疾病に感受性であり得、および／または言及される任意の治療を必要としている可能性がある。個体は、本明細書に言及される任意の治療を受けている可能性がある。特に、個体は、前立腺がんまたはDLBCLを患っている、または患っている疑いがある。個体は、リンパ腫を患っているか、患っている疑いがある。

30

【0057】

前立腺がんに対する好ましい遺伝子領域、遺伝子座、遺伝子および染色体相互作用

本発明のすべての態様に関して、好ましい遺伝子領域、遺伝子座、遺伝子、および染色体相互作用は、表、例えば表6に言及されている。典型的には、本発明のプロセスでは、染色体相互作用は、表6にリストされた関連遺伝子の少なくとも1、2、3、4または5から検出される。好ましくは、表6のプローブ配列によって表される関連する特異的な染色体相互作用の少なくとも1、2、3、4または5の存在または不在が検出される。染色体相互作用は、本明細書に言及される遺伝子のいずれかの上流または下流、例えばコード配列から、例えば50 kb上流または20 kb下流であり得る。

40

【0058】

本発明のすべての態様に関して、好ましい遺伝子領域、遺伝子座、遺伝子、および染色体相互作用が表25に言及されている。典型的には、本発明のプロセスでは、染色体相互作用は、表25にリストされた関連遺伝子の少なくとも2、4、8、10、14またはすべてから検出される。好ましくは、表25に示される関連する特異的な染色体相互作用の少なくとも2、4、8、10、14またはすべての存在または不在が検出される。染色体相互作用は、本明細書に言及される遺伝子のいずれかの上流または下流、例えばコード配列から、例えば50 kb上流または20 kb下流であり得る。

【0059】

一実施形態では、本明細書に開示され、以下の遺伝子の組み合わせによって表される（

50

同定される) 特異的なマーカーの組み合わせが分類される: E T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3 および C A S P 2。これは診断を判定するためであってもよい。好ましくは、これらのマーカーの少なくとも2つまたは3つが分類される。

【0060】

別の実施形態では、以下の遺伝子の組み合わせによって表される(同定される)本明細書に開示される特異的なマーカーの組み合わせが分類される: B M P 6、E R G、M S R 1、M U C 1、A C A T 1 および D A P K 1。これは予後を判定するためであってもよい(ネステッドP C Rマーカーによる、高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1)。好ましくは、これらのマーカーの少なくとも2つまたは3つが分類される。

【0061】

さらなる実施形態では、以下の遺伝子の組み合わせによって表される(同定される)本明細書に開示される特異的なマーカーの組み合わせが分類される: H S D 3 B 2、V E G F C、A P A F 1、M U C 1、A C A T 1 および D A P K 1。これは予後を判断するためであってもよい(高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2)。好ましくは、これらのマーカーの少なくとも2つまたは3つが分類される。

【0062】

D L B C Lに対する好ましい遺伝子領域、遺伝子座、遺伝子、および染色体相互作用

典型的には、少なくとも10、20、30、50または80の染色体相互作用は、本明細書の表、または本明細書に開示された表の一部に開示された遺伝子または領域のいずれかから分類される。好ましくは、少なくとも10、20、30、50または80の染色体相互作用は、表5に開示された遺伝子または領域のいずれかから分類される。

【0063】

好ましくは、表7のマーカーのうちの少なくとも2、3、5、8が分類される。

【0064】

好ましくは、表5のプローブ配列によって表される少なくとも10、20、30、50または80の染色体相互作用の存在または不在が検出される。染色体相互作用は、本明細書に言及される遺伝子のいずれかの上流または下流、例えばコード配列から、例えば50 k b上流または20 k b下流であり得る。

【0065】

好ましくは、表5に示される第1の10のマーカーの少なくとも1、2、5、8またはすべてが分類される。一実施形態では、表5からの少なくとも1、2、3または6のマーカーが分類され、その各々は、S T A T 3、T N F R S F 1 3 B、A N X A 1 1、M A P 3 K 7、M E F 2 B および I F N A R 1 から選択される異なる遺伝子に対応している。

【0066】

リンパ腫に対する好ましい遺伝子領域、遺伝子座、遺伝子および染色体相互作用

典型的には、少なくとも10、20、30または50の染色体相互作用は、本明細書の表、または本明細書に開示された表の一部に開示された遺伝子または領域のいずれかから分類される。好ましくは、少なくとも10、20、30または50の染色体相互作用は、表8に開示された遺伝子または領域のいずれかから分類される。

【0067】

好ましくは、表9のマーカーのうちの少なくとも5、10または15が分類される。

【0068】

染色体相互作用は、本明細書に言及される遺伝子のいずれかの上流または下流、例えばコード配列から、例えば50 k b上流または20 k b下流であり得る。

【0069】

一実施形態では、図6に示される第1の11のマーカーのうちの少なくとも1つが分類される。別の実施形態では、表8からの少なくとも1、2、3または6のマーカーが分類され、その各々は、以下から選択される異なる遺伝子に対応している: S T A T 3、T N F R S F 1 3 B、A N X A 1 1、M A P 3 K 7、M E F 2 B および I F N A R 1。

【0070】

10

20

30

40

50

染色体相互作用の種類

一態様では、遺伝子座（染色体相互作用が検出される遺伝子および／または場所を含む）は、CTCF結合部位を含み得る。これは、転写抑制因子CTCFに結合することができる任意の配列である。その配列は、遺伝子座に1、2、または3のコピーで存在し得る配列CCCTCからなり得るか、またはそれを含み得る。CTCF結合部位配列は、配列CCGCGNGGNGGCAG（IUPAC表記）を含み得る。CTCF結合部位は、染色体相互作用の少なくとも100、500、1000または4000塩基内、または表5または6に示される染色体領域のいずれか内にあり得る。CTCF結合部位は、染色体相互作用の少なくとも100、500、1000または4000塩基内、または表5または6に示される染色体領域のいずれか内にあり得る。

10

【0071】

一態様では、検出される染色体相互作用は、表5または6に示される遺伝子領域のいずれかに存在する。ライゲートされた核酸がそのプロセスで検出された場合、表5または6のプロブ配列のいずれかに示される配列が検出され得る。

【0072】

したがって、典型的に、プロブの両方の領域からの（すなわち、染色体相互作用の両方の部位からの）配列が検出され得る。好ましい態様では、任意の表に示されるプロブと同じまたは相補的な配列を含むか、またはそれからなるプロブがそのプロセスで使用される。いくつかの態様では、表に示されるプロブ配列のいずれかに相同である配列を含むプロブが使用される。

20

【0073】

本明細書で提供される表

表5および6は、プロブ（EpiSwitch（商標）マーカー）データおよび予後に関連する染色体相互作用を表す遺伝子データを示している。プロブ配列は、染色体相互作用で一緒になった遺伝子領域の両方の部位から生成されたライゲートされた産物を検出するために使用することができる配列を示す、すなわち、プロブは、ライゲートされた産物における配列に相補的な配列を含む。第1の2セットの開始－終了位置はプロブ位置を示し、第2の2セットの開始－終了位置は関連する4kb領域を示す。以下の情報がプロブデータの表に提供されている：

30

－ HyperG_Stats：超幾何学的エンリッチメントのパラメータに基づいて遺伝子座内でその数の有意なEpiSwitch（商標）マーカーを見つける確率に対するp値

－ 総プロブ数：遺伝子座で試験されたEpiSwitch（商標）コンフォメーションの総数

－ 有意なプロブ数：遺伝子座で統計的に有意であることがわかったEpiSwitch（商標）コンフォメーションの数

－ FDR_HyperG：マルチ試験（Fimmunoresposiveness Discovery Rate）で修正された超幾何学的p値

－ パーセント有意性：遺伝子座で試験されたマーカーの数に対する有意なEpiSwitch（商標）マーカーのパーセンテージ

40

－ logFC：エピジェネティック比（FC）の2を底とする対数

－ AveExpr：すべてのアレイおよびチャンネルにわたるプロブに対する平均log2式

－ T：モデルトされたt統計

－ p値：生のp値

－ adj. p値：調整されたp値またはq値

－ B-B統計（ロッドまたはB）は、その遺伝子が差次的に発現される対数オッズである。

－ FC－非ログ倍率変化

－ FC_1－ゼロを中心とした非ログ倍率変化

50

－ LS －バイナリ値、これは FC_1 値に関連する。－ 1.1 未満の FC_1 値、これは－ 1 に設定され、 FC_1 値が 1.1 を超える場合は、これは 1 に設定される。これらの値の間の値は 0 である。

【0074】

表5および6は、関連する染色体相互作用が発生することがわかっている遺伝子を示している。遺伝子座の表における p 値は $HyperG\ Stats$ と同じである（超幾何学的エンリッチメントのパラメータに基づいて遺伝子座内でその数の有意な $EpiSwitch$ （商標）を見つける確率に対する p 値）。 LS 列は、その特定のサブグループとの関連する相互作用の有無（予後状態）を示している。

【0075】

表5に関して、 $DLBCL$ は 1 で示される予後マーカーを指し、健康（ $healthy$ ）は－ 1 で示される健康対照を指す。

【0076】

プローブは、 $Taq1$ 部位から $30bp$ 離れるように設計されている。 PCR の場合、 PCR プライマーは典型的に、ライゲートされた産物を検出するように設計されているが、 $Taq1$ 部位からの位置は様々である。

【0077】

プローブ位置：

$Start1$ －フラグメント1上の $Taq1$ 部位の上流の 30 の塩基

$End1$ －フラグメント1上の $Taq1$ 制限部位

$Start2$ －フラグメント2上の $Taq1$ 制限部位

$End2$ －フラグメント2上の $Taq1$ 部位の下流の 30 の塩基

【0078】

$4kb$ 配列位置：

$Start1$ －フラグメント1上の $Taq1$ 部位の上流の 4000 の塩基

$End1$ －フラグメント1上の $Taq1$ 制限部位

$Start2$ －フラグメント2上の $Taq1$ 制限部位

$End2$ －フラグメント2上の $Taq1$ 部位の下流の 4000 の塩基

【0079】

ラッソまたは弾性ネット正則化全体を適合させる手順に関連する $GLMNET$ 値（ラムダを 0.5 （弾性ネット）に設定）。

【0080】

本明細書の表では、前立腺がんの侵襲性のサブグループは、以下の説明を伴うクラス3の患者を指す：

- － PSA レベルが $20ng/ml$ を超える、
- － グリーソンスコアが 8 から 10 の間である、および
- － T ステージが $T2c$ 、 $T3$ または $T4$ である。

【0081】

本明細書の表では、前立腺がんの緩慢性のサブグループは、以下の説明を伴うクラス1の患者を指す：

- － PSA レベルが $1ml$ あたり $10ng$ 未満である、
- － グリーソンスコアが 6 以下である、および
- － T ステージが $T1$ から $T2a$ の間である。

【0082】

表7は、 $DLBCL$ に対する好ましいマーカーを示している。表8および9は、リンパ腫に対する好ましいマーカーを示している。

【0083】

表5～7は、ヒトの分類に好ましい。表8および9は、イヌ、例えば犬の分類に好ましい。

【0084】

10

20

30

40

50

マーカーおよびマーカーのパネルを同定するために採用されるアプローチ

本明細書に記載される本発明は、表現型に密接にリンクした、染色体コンフォメーションプロファイルおよびそれ自体の調節モダリティとしての3Dアーキテクチャに関する。バイオマーカーの発見は、表現型の違いを表す臨床サンプルの代表的なコホートでのパターン認識とスクリーニングによるアノテーションに基づいていた。コード部分および非コード部分にわたって、および、例えば、オープンリーディングフレーム内（イントロン）またはオープンリーディングフレーム外の非コード部位に係留する、統計的に播種する一貫した条件付きの播種する染色体コンフォメーションの同定のための既知の遺伝子の非コード5'および3'の大きな揺れにわたって、ゲノムの有意な部分をアノテートし、スクリーニングした。

10

【0085】

最良のマーカーの選択の際には、マーカーリードに対する統計データおよびp値に主導される。特定の遺伝子への参照は、位置参照を容易にするために使用され、最も近い遺伝子は通常、参照に使用される。遺伝子からのシス位置および関連する近傍の染色体コンフォメーションが、その特定の遺伝子の発現への調節の特異的な要素に寄与し得る可能性を排除することは不可能である。マーカーの選択または検証の時点で、染色体コンフォメーションの名称で位置座標として参照される遺伝子に発現パラメータは必要とされない。シグネチャ内の、選択され、検証された染色体コンフォメーションは、参照で使用する遺伝子の発現プロファイルに関係なく、それ自体で層別化エンティティを播種している。アンカー部位でのSNP、遺伝子転写プロファイルの変化、H3K27acのレベルでの変化など、関連する規制モダリティについてさらなる研究が行われてもよい。

20

【0086】

臨床表現型の違いとその層別化の問題を、表現型に対する基本的な生物学とエピジェネティクスの制御に基づいて、例えば規制のネットワークのフレームワークから取り上げる。したがって、層別化を支援するために、ネットワークの変化をキャプチャすることができ、これは、例えば、最小限のノイズで試験コホートを層別化するための最適数のマーカーの評価を含むマーカー減少のための機械学習アルゴリズムに従うことによって、いくつかのバイオマーカーのシグネチャを介して行われることが好ましい。これは通常、ケースバイケースで3〜17のマーカーで終了する。パネルに対するマーカーの選択は、交差検証の統計的パフォーマンスによって行われ得る（例えば、参照名に使用される隣接遺伝子の機能的関連性によってではない）。

30

【0087】

マーカーのパネル（隣接遺伝子の名称付き）は、ゲノムの有意な部分にわたる14,000〜60,000のアノテートされたEpiswitch部位にわたって統計的播種力を分析する偏りのない方法で、ゲノムの有意な部分にわたるスクリーニングからのクラスタ化された選択の産物である。これは、層別化の問題に対する既知の機能的価値のある遺伝子上の染色体コンフォメーションの調整されたキャプチャとして認識されるべきではない。染色体相互作用の部位の総数は120万であるため、組み合わせの潜在的な数は120万の120万乗になる。それにもかかわらず、追従したアプローチは、関連する染色体相互作用の同定を可能にする。

40

【0088】

この用途によって提供される特異的なマーカーは、疾病に統計的に（有意に）関連付けられて、選択されている。これは、関連する表のp値が実証するものである。各マーカーは、関連する疾病で現れるネットワークの調節解除の一部としての生物学的エピジェネティックな事象を表すものと見られ得る。実際には、これらのマーカーが、対照と比較して、患者の群に普及していることを意味している。例として、平均で、個々のマーカーは典型的に、試験される患者の80%および試験される対照の10%に存在し得る。

【0089】

すべてのマーカーの単純な追加が、調節解除のいくつかの間のネットワークの相互関係を表すわけではない。ここでは、標準の多変量バイオマーカー分析GLMNET（Rパッ

50

ページ)が導入される。GLMNETパッケージは、マーカーのいくつかの間の相互依存性を同定する助けとなり、これは、疾患の表現型につながる調節解除を達成する上での共同の役割を反映している。GLMNETスコアが最も高いマーカーをモデル化して、その後、試験することで、患者コホートを正確に同定するマーカーの最小数だけでなく、対照群での低い有病率のバックグラウンドの統計学的ノイズが要因で、患者の対照群での最も少ない偽陽性をもたらす最小数の同定ももたらされる。典型的に、選択されたマーカーの群(組み合わせ)(3~10など)は、検出の感度および特異度の両方の間で最適なバランスを提供し、これは、疾病に対して選択されたすべての統計的に有意なマーカーの個々の特性からの多変量解析に関連して生じる。

【0090】

本明細書の表は、長距離相互作用部位間の接合部をオーバーラップするアレイ分析用のアレイプローブ(60mer)の参照名、染色体番号、および並置される2つの染色体フラグメントの開始と終了を示している。表はまた、マーカーの各々に関する(2つの異なる蛍光色で標識された)対照サンプルに対する疾患の競合ハイブリダイゼーションにおける標準アレイの読み出し値を示している。標準の読み出し値として、各マーカープローブに示されている:

- 平均発現シグナル
 - 対照と疾患サンプルに対する蛍光色検出の有意差に関するt検定
 - マーカー読み出しの有意性のp値
 - 調整p値(大きなデータセット用のボンフェローニ補正を使用)、B-バックグラウンドシグナル、FC-対照サンプルにおける色検出のための倍率変化
 - FC_1-症例(疾患または疾患タイプ)サンプルにおける第2の色検出のための倍率変化、LS(ループステータス)-競合ハイブリダイゼーションにおける2色の閾値間の一般的な蛍光シグナル、-1は、シグナルが、CGHアレイのプローブに対して試験されたときに、対応する蛍光色の患者サンプルに一般的であることを意味している。
 - 当座の遺伝子座
 - 総プローブ数-アレイ上の異なる位置プローブがその遺伝子座にわたって試験された数
 - 有意なプローブ数-症例サンプルと対照サンプルを区別する上で有意であることが判明したものの数
 - 超幾何学的統計(Hypergeometric Stat)は、疾患検出のための有意なプローブによる遺伝子座のエンリッチメントの統計である
 - FDR HyperGは、FDRによって大規模なデータセットに対して調整されたものと同じ統計である(標準手順)
 - その遺伝子座で有意であることが判明したプローブのパーセンテージ
 - log FCは、そのプローブに対するアレイ読み出し値の倍率変化の対数である。
- 有意なプローブの高度なエンリッチメントを有する遺伝子座に着目することで、例えばネットワークの調節解除の最良なカバレッジをマーカーに提供する疾患に関連付けられた複数の入力を持つ規制ハブを表す上位のプローブの選択の助けとなる。

【0091】

サンプル調製および染色体相互作用の検出のための好ましい態様

サンプルを調製する方法および染色体コンフォメーションを検出する方法が、本明細書に記載されている。これらの方法の最適化された(従来とは異なる)バージョンは、例えばこのセクションで説明されているように使用することができる。

【0092】

典型的に、サンプルは少なくとも 2×10^5 の細胞を含む。サンプルは最大 5×10^5 の細胞を含んでよい。一態様では、サンプルは 2×10^5 から 5×10^5 の細胞を含む。

【0093】

染色体遺伝子座に存在するエピジェネティックな染色体相互作用の架橋が、本明細書に

10

20

30

40

50

記載されている。これは細胞溶解が起こる前に実施され得る。細胞溶解は、4～6分間または約5分間など、3～7分間実施され得る。いくつかの態様では、細胞溶解は、少なくとも5分間および10分間未満実施される。

【0094】

制限酵素によるDNAの消化が本明細書に記載されている。典型的に、DNA制限は、約20分など、約10～30分の期間、約65℃など、約55℃から約70℃で実施される。

【0095】

好ましくは、頻繁にカッター制限酵素が使用され、結果として4000塩基対までの平均フラグメントサイズを有するライゲートされたDNAのフラグメントがもたらされる。随意に、制限酵素により、結果として、ライゲートされたDNAのフラグメントは、約256塩基対などの約200～300塩基対の平均フラグメントサイズを有する。一態様では、典型的なフラグメントサイズは、400～2,000または500～1,000塩基対など、200塩基対～4,000塩基対である。

【0096】

EpiSwitch法の一態様では、DNA制限消化工程とDNAライゲート工程との間でDNA沈殿工程は実施されない。

【0097】

DNAライゲートは本明細書に記載されている。典型的に、DNAライゲートは、約10分間など、5～30分間実施される。

【0098】

サンプル中のタンパク質は、例えばプロテイナーゼ、随意にプロテイナーゼKを使用して、酵素的に消化され得る。タンパク質は、約30分～1時間、例えば約45分間酵素的に消化され得る。タンパク質の消化、例えばプロテイナーゼK消化後の一態様では、架橋反転またはフェノールDNA抽出工程はない。

【0099】

一態様では、PCR検出は、好ましくは、ライゲートされた核酸の存在／不在に対するバイナリ読み出し値を用いて、ライゲートされた核酸の単一のコピーを検出することができる。

【0100】

図5は、染色体相互作用を検出する好ましい方法を示している。

【0101】

本発明のプロセスおよび使用

本発明のプロセスは、様々な方法で説明することができる。これは、ライゲートされた核酸を作製する方法として説明することができ、当該方法は、(i)染色体相互作用で一緒になった染色体領域をインビトロで架橋する工程、(ii)上記架橋されたDNAを切断または制限消化切断にさらず工程、および(iii)上記架橋された切断したDNA末端をライゲートして、ライゲートされた核酸を形成する工程を含み、ライゲートされた核酸の検出は、遺伝子座での染色体状態を判定するために使用され得、好ましくは、

— 遺伝子座は、表5に言及される遺伝子座、領域、または遺伝子のいずれかであり得る、および／または

— 染色体相互作用は、本明細書に言及されるまたは表5に開示されるプローブのいずれかに対応する染色体相互作用のいずれかであり得る、および／または

— ライゲートされた産物は、(i)表5に開示されるプローブ配列のいずれかと同一または相同である配列または(ii)(ii)に相補的な配列を有するかまたは含み得る。

【0102】

本発明のプロセスは、集団内の異なるサブグループを表す染色体状態を検出するためのプロセスとして説明することができ、当該プロセスは、染色体相互作用がゲノムの定義されたエピジェネティックに活性な領域内に存在するか存在しないかを判定することを含み、好ましくは、

10

20

30

40

50

- － サブグループは予後の有無によって定義される、および／または
- － 染色体状態は、表 5 に言及される任意の遺伝子座、領域、または遺伝子であり得る、および／または
- － 染色体相互作用は、表 5 に言及されるものまたは表 5 に開示されるプローブのいずれかに対応するもののいずれかであり得る。

【0103】

本発明のプロセスは、ライゲートされた核酸を作製する方法として説明することができ、当該方法は、(i) 染色体相互作用で一緒になった染色体領域をインビトロで架橋する工程、(ii) 上記架橋された DNA を切断または制限消化切断にさらす工程、および (iii) 上記架橋された切断した DNA 末端をライゲートして、ライゲートされた核酸を形成する工程を含み、ライゲートされた核酸の検出は、遺伝子座での染色体状態を判定するために使用され得、好ましくは、

- － 遺伝子座は、表 6 に言及される遺伝子座、領域、または遺伝子のいずれかであり得る、および／または
- － 染色体相互作用は、本明細書に言及されるまたは表 6 に開示されるプローブのいずれかに対応する染色体相互作用のいずれかであり得る、および／または
- － ライゲートされた産物は、(i) 表 6 に開示されるプローブ配列のいずれかと同一または相同である配列または (ii) (ii) に相補的な配列を有するかまたは含み得る。

【0104】

本発明のプロセスは、集団内の異なるサブグループを表す染色体状態を検出するためのプロセスとして説明することができ、当該プロセスは、染色体相互作用がゲノムの定義されたエピジェネティックに活性な領域内に存在するか存在しないかを判定することを含み、好ましくは、

- － サブグループは予後の有無によって定義される、および／または
- － 染色体状態は、表 6 に言及される任意の遺伝子座、領域、または遺伝子であり得る、および／または
- － 染色体相互作用は、表 6 に言及されるものまたは表 6 に開示されるプローブのいずれかに対応するもののいずれかであり得る。

【0105】

本発明は、表 5 に言及される任意の遺伝子座、遺伝子または領域での染色体相互作用の検出を含む。本発明は、染色体相互作用を検出するための本明細書に言及される核酸およびプローブの使用、例えば、染色体相互作用を検出するための少なくとも 1、5、10、20 または 50 のそのような核酸またはプローブの使用を含む。核酸またはプローブは、好ましくは、少なくとも 1、5、10、20 または 50 の異なる遺伝子座または遺伝子における染色体相互作用を検出する。本発明は、表 5 にリストされたプライマーまたはプライマー対のいずれかを使用する、または本明細書に記載されるこれらのプライマーの変異体（プライマー配列を含むか、またはプライマー配列のフラグメントおよび／または相同体を含む配列）を使用する染色体相互作用の検出を含む。

【0106】

本発明は、表 6 に言及される任意の遺伝子座、遺伝子または領域での染色体相互作用の検出を含む。本発明は、染色体相互作用を検出するための本明細書に言及される核酸およびプローブの使用を含む。本発明は、表 6 にリストされたプライマーまたはプライマー対のいずれかを使用する、または本明細書に記載されるこれらのプライマーの変異体（プライマー配列を含むか、またはプライマー配列のフラグメントおよび／または相同体を含む配列）を使用する染色体相互作用の検出を含む。

【0107】

染色体相互作用が、定義された遺伝子、領域、または位置内で生じるかどうかを分析する場合、相互作用で一緒になった染色体の両方の部分が、定義された遺伝子、領域、または位置内にあるか、またはいくつかの態様では、染色体の 1 つの部分のみが、定義された遺伝子、領域、または位置内にある。

10

20

30

40

50

【0108】

同様に、表8および9の染色体相互作用は、本発明のプロセスおよび方法において使用され得る。

【0109】

新しい処置を特定するための本発明の方法の使用

染色体相互作用の知識は、疾病に対する新しい処置を特定するために使用することができる。本発明は、例えば、前立腺がんまたはDLBCの治療に関連する、新しい治療薬を特定または設計するために本明細書で定義された染色体相互作用の方法および使用を提供する。

【0110】

相同体

ポリヌクレオチド／核酸（例えばDNA）配列の相同体は、本明細書で参照される。そのような相同体は、典型的に、例えば、少なくとも10、15、20、30、100またはそれ以上の連続したヌクレオチドの領域、または染色体相互作用に参与する染色体の領域に由来する核酸の部分にわたって、少なくとも70%の相同性、好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の相同性を有する。相同性は、ヌクレオチド同一性（「ハード相同性」と呼ばれることもある）に基づいて計算され得る。

【0111】

したがって、特定の態様では、ポリヌクレオチド／核酸（例えばDNA）配列の相同体は、パーセンテージ配列同一性を参照することによって本明細書で言及される。典型的に、そのような相同体は、例えば、少なくとも10、15、20、30、100またはそれ以上の連続したヌクレオチドの領域、または染色体相互作用に参与する染色体の領域に由来する核酸の部分にわたって、少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0112】

例えば、UWCGパッケージは、相同性および／または%配列同一性（例えば、そのデフォルト設定で使用される）を計算するために使用することができるBESTFITプログラムを提供する（Devereux et al(1984)Nucleic Acids Research 12,p387-395）。PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは、例えば、Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36: 290-300 ; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215: 403-10に記載されるように、相同性および／または%配列同一性を計算する、および／または配列を整列させる（（典型的にそれらのデフォルト設定で）同等または対応する配列を同定するなど）ために使用することができる。

【0113】

BLAST解析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公開されている。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列内の同じ長さの単語と整列したときに一部の正の値の閾値スコアTに一致するかまたはそれを満たす照合配列内の長さWの短い単語を同定することによって高スコアの配列ペア（HSP）を同定することを含む。Tは近隣単語スコア閾値と呼ばれる（上記のAltschul et al）。これらの初期の近隣単語ヒットは、それらを含むHSPを見つけるために検索を開始するためのシードとして機能する。単語ヒットは、累積アラインメントスコアを増やすことができる限り、各配列に沿って両方向に拡張される。各方向の単語ヒットの拡張は、次の場合に停止される：累積アラインメントスコアがその最大達成値から数量Xだけ低下する；1つまたは複数の負のスコアの残基アラインメントの累積により、累積アラインメントスコアがゼロ以下になる；またはいずれかの配列の終わりに到達する。BLASTアルゴリズムパラメータW5 TおよびXは、アラインメントの感度および速度を判定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、11の語長（W）、50のBLOSUM62スコアリングマトリックス（Heniko

10

20

30

40

50

ff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919を参照) アラインメント (B)、10の期待値 (E)、 $M = 5$ 、 $N = 4$ 、および両方のストランドの比較を使用する。

【0114】

B L A S Tアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する (例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787を参照)。B L A S Tアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小合計確率 ($P(N)$) であり、これは、2つのポリヌクレオチド配列間の一致が偶然に生じる確率の指標を提供する。例えば、第1の配列と第2の配列との比較における最小合計確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、配列は別の配列と類似していると見なされる。

【0115】

相同配列は、典型的に、(ヌクレオチドの置換、欠失、または挿入であり得る) 10、15、または20塩基未満など、1、2、3、4またはそれ以上の塩基だけ異なる。これらの変化は、相同性および/または%配列同一性の計算に関連して、上述の領域のいずれかにわたって測定され得る。

【0116】

「プライマー対」の相同性は、例えば、後に別のプライマー対と比較する (これも単一の配列として見なされる) 目的で、(2つの配列が一緒に結合されているかのように) 2つの配列を単一の配列と見なすことによって計算することができる。

【0117】

アレイ

核酸の第2のセットはアレイに結合され得、一態様では、アレイに結合される少なくとも15, 000、45, 000、100, 000または250, 000の異なる第2の核酸があり、これらは好ましくは、少なくとも300、900、2000または5000の遺伝子座を表している。一態様では、第2の核酸の1つ、または複数、またはすべての異なる集団は、アレイの1つを超える別個の領域に結合され、事実上、アレイ上で繰り返され、エラー検出を可能にする。アレイは、Agilent SurePrint G3 Custom CGHマイクロアレイプラットフォームに基づき得る。アレイへの第1の核酸の結合の検出は、デュアルカラーシステムによって実施され得る。

【0118】

治療薬 (例えば、個体の分類に基づいて選択されるか、または本発明による試験に基づいて選択される)

治療薬は本明細書に言及されている。本発明は、特定の個体、例えば本発明のプロセスによって同定された個体の病状を予防または処置するためのそのような薬剤を提供する。これは、治療上有効な量の薬剤を必要としている個体に投与することを含み得る。本発明は、特定の個体の疾病を予防または処置するための医薬品の製造における薬剤の使用を提供する。

【0119】

薬剤の配合は薬剤の性質に依存する。薬剤は、薬剤および薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む医薬組成物の形態で提供される。適切な担体および希釈剤には、等張食塩水、例えばリン酸緩衝生理食塩水が含まれる。典型的な経口剤形には、錠剤、カプセル、液体溶液および液体懸濁液が含まれる。薬剤は、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、または経口投与用に製剤され得る。

【0120】

薬剤の用量は、以下の様々なパラメータに従って、特に使用される物質に従って判定され得る; 治療を受ける個体の年齢、体重、疾病; 投与経路; および必要なレジメン。医師は、任意の特定の薬剤に必要な投与経路および投与量を判定することができる。しかし、適切な用量は、例えば、1日1回から3回摂取される、1~40mg/kgの体重など、0.1~100mg/kgの体重であり得る。

【0121】

治療薬は、本明細書に開示される任意のそのような薬剤であり得るか、または本明細書の任意の表（表5または6を含む）において開示される任意のタンパク質または遺伝子を含む、本明細書に開示される任意の「標的」を標的とし得る。組み合わせて開示される任意の薬剤が、個別に投与するためにも開示されると見なされるべきであることが理解される。

【0122】

前立腺がん治療

疾患進行の段階に応じて前立腺がん治療が推奨される。放射線療法、ホルモン療法および化学療法は、前立腺がん治療でしばしば使用される3つのオプションである。単一の治療または治療の組み合わせが使用され得る。

10

【0123】

化学療法

化学療法は、身体他の臓器に浸潤した前立腺がん（転移性前立腺がん）の治療にしばしば使用される。化学療法は、癌細胞の増殖の過程を妨げることによって癌細胞を破壊する。化学療法は、前立腺がんを治療するものではないが、前立腺がんを抑制下で維持し、症状を軽減し、それゆえ日常生活への影響を少なくする。

【0124】

放射線療法

この治療法は、限局性および局所進行性の前立腺がんを治療するために使用され得る。放射線療法は、転移性前立腺がんの進行を遅らせ、症状を緩和するためにも使用することができる。患者は、化学療法を受ける前にホルモン療法を受けて、治療が成功する可能性を高め得る。再発の可能性を減らすために、放射線療法の後にホルモン療法も推奨され得る。

20

【0125】

ホルモン療法

ホルモン療法は、しばしば、放射線療法と組み合わせて使用される。通常、手術または放射線療法を受けることに適合し、その意思のある男性の限局性前立腺がんの治療には、ホルモン療法は単独で使用されるべきではない。ホルモン療法は、進行性前立腺がんの進行を遅らせ、症状を緩和するために使用することができる。ホルモンは前立腺における細胞の増殖を制御する。特に、前立腺がんは増殖するためにホルモンテストステロンを必要とする。ホルモン療法の目的は、テストステロンの産生を停止するか、または患者の身体のテストステロンの使用を停止させることによって、テストステロンの効果をブロックすることである。

30

【0126】

前立腺がん治療に使用され得る他の治療法

- ・ 前立腺全摘除術
- ・ 高密度焦点式超音波療法
- ・ 寒冷療法
- ・ 密封小線源治療
- ・ 待機療法
- ・ 経尿道的前立腺切除術
- ・ 進行性前立腺がんの治療
- ・ ステロイド

40

【0127】

DLBC L 療法

DLBC L の治療には以下の4つの治療法が使用され得る：

- － 化学療法
- － 放射線療法
- － モノクローナル抗体療法

50

ー ステロイド療法

【0128】

上記治療法はいずれもリンパ腫の治療にも使用され得る。

【0129】

本明細書に言及される物質の形態

本明細書に言及される、核酸または治療薬などの物質はいずれも、精製または単離された形態であり得る。それらは自然界に見られるものとは異なる形態であり得、例えば、それらは自然界に生じない他の物質と組み合わせて存在し得る。核酸（本明細書で定義される配列の部分を含む）は、自然界に見られるものとは異なる配列を有し得、例えば、相同性に関するセクションに記載されるように配列において少なくとも1、2、3、4またはそれ以上のヌクレオチド変化を有する。核酸は5'または3'末端に異種配列を有し得る。核酸は自然界に見られるものと化学的に異なり得、例えば、それらは何らかの方法で修飾され得るが、それでもワトソン・クリック塩基対が可能であることが好ましい。適切な場合に、核酸は二本鎖または一本鎖の形態で提供される。本発明は、本明細書に言及される特異的な核酸配列のすべてを一本鎖または二本鎖の形態で提供し、したがって、開示される任意の配列に対する相補鎖を含む。

【0130】

本発明は、予後に関連する染色体相互作用の検出を含む、本発明の任意のプロセスを実行するためのキットを提供する。そのようなキットは、本発明のプロセスによって産生されたライゲートされた核酸を検出することができる薬剤などの、関連する染色体相互作用を検出することができる特異的結合剤を含むことができる。キットに存在する好ましい薬剤には、例えば本明細書に記載されるように、PCR反応においてライゲートされた核酸を増幅することができる、ライゲートされた核酸またはプライマー対にハイブリダイズすることができるプローブが含まれる。

【0131】

本発明は、関連する染色体相互作用を検出することができるデバイスを提供する。デバイスは、好ましくは、本明細書に記載される任意のそのような薬剤、プローブまたはプライマー対などの、染色体相互作用を検出することができる任意の特異的結合剤、プローブまたはプライマー対を含む。

【0132】

検出方法

一態様では、染色体相互作用に関連するライゲートされた配列の定量的検出が、PCR反応中の活性化で検出可能であるプローブを使用して実行され、上記ライゲートされた配列は、エピジェネティックな染色体相互作用で一緒になる2つの染色体領域からの配列を含み、上記方法は、PCR反応中にライゲートされた配列をプローブと接触させる工程、およびプローブの活性化の程度を検出する工程を含み、上記プローブはライゲートされた部位に結合する。当該方法では、典型的に、二重標識蛍光加水分解プローブを使用してMIQEに準拠した方法で特定の相互作用を検出することができる。

【0133】

プローブは概して、非アクティブおよびアクティブ状態の検出可能なラベルで標識されているため、活性化された場合にのみ検出される。活性化の程度は、PCR反応に存在するテンプレート（ライゲートされた産物）の程度に関連する。検出は、PCRのすべてまたは一部の間、例えば、PCRのサイクルの少なくとも50%または80%の間に実行され得る。

【0134】

プローブは、オリゴヌクレオチドの一端に共有結合したフルオロフォア、およびヌクレオチドの他端に結合した消光剤を含むことができ、その結果、フルオロフォアの蛍光は消光剤によってクエンチされる。一態様では、フルオロフォアはオリゴヌクレオチドの5'末端に結合され、消光剤はオリゴヌクレオチドの3'末端に共有結合される。本発明の方法で 사용할ことができるフルオロフォアには、FAM、TET、JOE、Yakima Y

10

20

30

40

50

ellow、HEX、Cyanine 3、ATTO 550、TAMRA、ROX、Texas Red、Cyanine 3.5、LC 610、LC 640、ATTO 647N、Cyanine 5、Cyanine 5.5、およびATTO 680が含まれる。適切なフルオロフォアと共に使用することができる消光剤には、TAM、BHQ1、DAB、Eclip、BHQ2、およびBBQ650が含まれ、随意に、上記フルオロフォアは、HEX、Texas RedおよびFAMから選択される。フルオロフォアと消光剤の好ましい組み合わせには、FAMとBHQ1、およびTexas RedとBHQ2が含まれる。

【0135】

qPCRアッセイでのプローブの使用

本発明の加水分解プローブは、典型的に、濃度が一致したネガティブコントロールで温度勾配が最適化されている。好ましくは、一段階のPCR反応が最適化される。より好ましくは、標準曲線が計算される。ライゲートされた配列の接合部にわたって結合する特異的なプローブを使用することの利点は、ネステッドPCRアプローチを使用せずにライゲートされた配列に対する特異度を達成することができることである。本明細書に記載される方法は、低コピー数の標的の正確かつ精密な定量化を可能にする。温度勾配の最適化の前に、標的のライゲートされた配列は精製することができ、例えば、ゲル精製することができる。標的のライゲートされた配列は配列決定することができる。好ましくは、PCR反応は、約10ng、または5~15ng、または10~20ng、または10~50ng、または10~200ngのテンプレートDNAを使用して実施される。フォワードおよびリバースプライマーは、一方のプライマーが、ライゲートされたDNA配列で表される染色体領域のうちの1つの配列に結合し、もう一方のプライマーが、例えば、配列に相補的であることによって、ライゲートされたDNA配列で表される他の染色体領域に結合するように設計されている。

【0136】

ライゲートされたDNA標的の選択

本発明は、プライマーを、ライゲートされた配列に結合および増幅するそれらの能力に基づいて選択すること、およびそれが結合する標的配列のプローブ配列に基づく特性、特に標的配列の曲率を選択することを含む、本明細書で定義されるPCR法で使用するためのプライマーおよびプローブを選択する工程を含む。

【0137】

プローブは典型的に、制限部位にまたがる並置された制限フラグメントであるライゲートされた配列に結合するように設計／選択される。本発明の一態様では、特定の染色体相互作用に関連するライゲートされる可能性のある配列の予測される曲率が、例えば、本明細書で参照される特定のアルゴリズムを使用して計算される。曲率は、例えば、らせん回転あたり10.5°など、らせん回転あたりの度数として表すことができる。ライゲートされた配列は、ライゲートされた配列が、らせん回転あたり少なくとも5°、典型的に、らせん回転あたり少なくとも10°、15°または20°、例えばらせん回転あたり5°~20°の曲率傾向ピークスコアを有する場合に標的化のために選択される。好ましくは、らせん回転あたりの曲率傾向ピークスコアは、ライゲートされた部位の上流および／または下流の20~400の塩基など、少なくとも20、50、100、200または400の塩基に対して計算される。したがって、一態様では、ライゲートされた産物における標的配列は、これらのレベルの曲率のいずれかを有する。標的配列は、最低の熱力学的構造の自由エネルギーに基づいて選択することもできる。

【0138】

特定の態様

一態様では、染色体内部相互作用のみが分類／検出され、（異なる染色体間の）染色体外部相互作用は分類／検出されない。

【0139】

特定の態様では、特定の染色体相互作用、例えば、（例えば、本明細書で言及される任

10

20

30

40

50

意のプローブまたはプライマー対によって定義されるような) 本明細書で言及される任意の特異的な相互作用は分類されない。いくつかの態様では、染色体相互作用は、本明細書に言及される遺伝子のいずれにおいても分類されない。

【0140】

本明細書で提供されたデータは、マーカーが、関連する疾患状況の症例と非症例を区別することができる「普及 (disseminating)」しているものであることを示している。したがって、本発明を実施するときに、当業者は、個体が存在するのがどのサブグループなのかを相互作用の検出によって判定することができるであろう。一実施形態では、(不在または存在のいずれかによって) 関連する疾患状況に関連付けられている形態での試験されたマーカーの少なくとも70%の検出の閾値が、個体が関連するサブグループに存在するかどうかを判定するために使用され得る。

10

【0141】

スクリーニング方法

本発明は、どの染色体相互作用が集団の予後のサブグループに対応する染色体状態に関連するかを判定する方法を提供し、当該方法は、染色体の異なる状態を有するサブグループからの核酸の第1のセットをインデックス核酸の第2のセットと接触させる工程、および相補的配列がハイブリダイズすることを可能にする工程を含み、第1および核酸の第2のセットにおける核酸は、染色体相互作用で一緒になった両方の染色体領域からの配列を含むライゲートされた産物を表し、核酸の第1のセットと核酸の第2のセットとの間のハイブリダイゼーションのパターンによって、どの染色体相互作用が予後のサブグループに特異的であるかを判定することが可能になる。サブグループは、例えば、特定の疾病または治療を参照した、本明細書で定義される特異的なサブグループのいずれかであり得る。

20

【0142】

公報

本明細書で言及されるすべての公報の内容は、引用により本明細書に組み込まれ、本発明に関連する特徴をさらに定義するために使用され得る。

【0143】

具体的な態様

EpiSwitch (商標) プラットフォーム技術により、遺伝子座での正常な状態と異常な状態との間の規制変化のエピジェネティックな規制シグネチャを検出する。EpiSwitch (商標) プラットフォームは、染色体コンフォメーションシグネチャとしても知られるヒト染色体の高次構造の制御に関連付けられた遺伝子制御の基本的なエピジェネティックレベルを同定およびモニターする。染色体シグネチャは、遺伝子調節解除のカスケードにおける別個の主要な工程である。これらは、DNAメチル化やRNAプロファイリングなどの、後期エピジェネティックおよび遺伝子発現バイオマーカーを利用するバイオマーカープラットフォームに対する固有の一連の利点を備えた高次バイオマーカーである。

30

【0144】

EpiSwitch (商標) アレイアッセイ

カスタムEpiSwitch (商標) アレイスクリーニングプラットフォームには、15K、45K、100K、および250Kの固有の染色体コンフォメーションの4つの密度があり、各キメラフラグメントはアレイ上で4回繰り返され、有効密度を、それぞれ60K、180K、400K、および100万にする。

40

【0145】

カスタム設計されたEpiSwitch (商標) アレイ

15KのEpiSwitch (商標) アレイは、EpiSwitch (商標) Biomarker 発見技術で照合された約300の遺伝子座を含むゲノム全体をスクリーニングすることができる。EpiSwitch (商標) アレイは、Agilent SurePrint G3 Custom CGHマイクロアレイプラットフォーム上に構築され、この技術は、4つの密度、60K、180K、400K、および100万のプローブを提供

50

する。各 *EpiSwitch* (商標) プローブが4つ組として表示されるため、アレイあたりの密度は15 K、45 K、100 K、および250 Kまで減少し、それゆえ、再現性の統計的評価が可能になる。遺伝子座ごとに照合される潜在的な *EpiSwitch* (商標) マーカーの平均数は50であり、調査することができる遺伝子座の数は300、900、2000、および5000である。

【0146】

EpiSwitch (商標) カスタムアレイパイプライン

EpiSwitch (商標) アレイは、*EpiSwitch* (商標) ライブラリの生成後、Cy5において標識されたサンプルの1つのセット、およびCy3において標識された比較／分析されるべきサンプル(対照)のもう1つのセットを備えたデュアルカラーシステムである。アレイはAgilent SureScan Scannerを使用してスキャンされ、結果として生じる特徴がAgilent Feature Extractionソフトウェアを使用して抽出される。その後、データはRでの*EpiSwitch* (商標) アレイ処理スクリプトを使用して処理される。アレイは、R:Limma*での*Bioconductor*における標準デュアルカラーパッケージを使用して処理される。アレイの正規化は、Limma*での*normalizedWithinArrays*機能を使用して実行われ、これは、オンチップのAgilent陽性対照および*EpiSwitch* (商標) 陽性対照に対して行われる。Limma*を使用して分析するために、データはAgilent Flag呼び出しに基づいてフィルタリングされ、Agilent対照プローブは取り外され、テクニカルレプリケートプローブは平均化される。プローブは、比較されている2つのシナリオ間の違いに基づいてモデル化され、偽発見率を使用して修正される。 ≤ -1.1 または ≥ 1.1 であり、 $p \leq 0.1$ FDRのp値をパスする変動係数(CV) $\leq 30\%$ のプローブが、さらなるスクリーニングに使用される。プローブセットを減らすために、RでのFactorMineRパッケージを使用してさらなる複数因子分析が実施される。

【0147】

*注: LIMMAは、マイクロアレイ実験で差次的発現を評価するための線形モデルおよび経験ベイズプロセスである。Limmaは、マイクロアレイまたはRNA-Seqから生じる遺伝子発現データを分析するためのRパッケージである。

【0148】

プローブのプールは、最初に、調整されたp値、FCおよびCV $< 30\%$ (任意のカットオフポイント) パラメータに基づいて選択され、最終的にピッキングが行われる。さらなる分析および最終的なリストは、最初の2つのパラメータ(調整されたp値; FC)のみに基づいて作成される。

【0149】

統計パイプライン

EpiSwitch (商標) スクリーニングアレイは、*EpiSwitch* (商標) PCRプラットフォームに変換するための高価値の*EpiSwitch* (商標) マーカーを選択するために、Rでの*EpiSwitch* (商標) 分析パッケージを使用して処理される。

【0150】

工程1

プローブを、修正された線形回帰モデルの積である、それらの修正されたp値(偽発見率、FDR)に基づいて選択する。p値 ≤ 0.1 未満のプローブを選択し、その後、エピジェネティック比(ER)によってさらに減少させ、さらなる分析に選択するためにプローブERは ≤ -1.1 または ≥ 1.1 でなければならない。最終的なフィルタは変動係数(CV)であり、プローブは ≤ 0.3 未満でなければならない。

【0151】

工程2

統計リストからの上位40のマーカーを、PCR変換に対するマーカーとして選択する

ためのそれらの E R に基づいて選択する。負の E R 負荷が最も高い上位 20 のマーカーおよび正の E R 負荷が最も高い上位 20 のマーカーがリストを形成する。

【0152】

工程 3

工程 1 から結果として得たマーカー、統計的に有意なプローブは、超幾何学的エンリッチメント (H E) を使用したエンリッチメント分析の基礎を形成する。この分析によって、有意なプローブリストからのマーカー減少が可能になり、工程 2 からのマーカーとともに、E p i S w i t c h (商標) P C R プラットフォームに変換されたプローブのリストが形成される。

【0153】

統計プローブは、どの遺伝的位置が統計的に有意なプローブのエンリッチメントを有しているかを判断するために H E によって処理され、これは、どの遺伝的位置がエピジェネティックな違いのハブであるかを示している。

【0154】

補正された p 値に基づく最も有意なエンリッチメント遺伝子座がプローブリストの作成のために選択される。0.3 または 0.2 の p 値未満の遺伝的位置が選択される。工程 2 からのマーカーを用いる、これらの遺伝子位置にマッピングされる統計プローブは、E p i S w i t c h (商標) P C R 変換に対する高価値マーカーを形成する。

【0155】

アレイの設計および処理

アレイ設計

1. 遺伝子座を、S I I ソフトウェア (現在は v 3.2) を使用して次のように処理する。

- a. これらの特異的な遺伝子座でゲノムの配列を引き出す (50 kb 上流および 20 kb 下流の遺伝子配列)。
- b. この領域内の配列が C C に関与する確率を定義する。
- c. 特異的な R E を使用して配列をカットする。
- d. どの制限フラグメントが特定の配向で相互作用する傾向にあるかを判定する。
- e. 異なる C C が一緒に相互作用する可能性をランク付けする。

2. アレイサイズを判定し、したがって利用可能なプローブ位置の数 (x) を判定する。

3. $x / 4$ の相互作用を引き出す。

4. 各相互作用に対して、パート 1 から制限部位までの 30 bp およびパート 2 の制限部位までの 30 bp の配列を定義する。それらの領域が反復ではないことを確認し、反復である場合は、除外して次の相互作用をリスト上に書き取る。両方の 30 bp を結合してプローブを定義する。

5. $x / 4$ プローブ + 定義された対照プローブのリストを作成し、4 回複製して、アレイ上に作成されるべきリストを作成する。

6. カスタム C G H アレイ用の A g i l e n t S u r e 設計のウェブサイトにプローブのリストをアップロードする。

7. プローブ群を使用して、A g i l e n t カスタム C G H アレイを設計する。

【0156】

アレイ処理

1. テンプレート作成に E p i S w i t c h (商標) 標準操作手順 (S O P) を使用してサンプルを処理する。

2. アレイ処理ラボによってエタノール沈殿でクリーンアップする。

3. A g i l e n t S u r e T a g 完全 DNA ラベリングキット - A g i l e n t O l i g o n u c l e o t i d e A r r a y - b a s e d C G H f o r G e n o m i c D N A A n a l y s i s E n z y m a t i c l a b e l l i n g f o r B l o d , C e l l s o r T i s s u e s に従ってサンプルを処理する。

4. A g i l e n t 特徴抽出ソフトウェアを用いる A g i l e n t C スキャナーを使

10

20

30

40

50

用してスキャンする。

【0157】

E p i S w i t c h (商標) バイオマーカーのシグネチャは、複雑な疾患表現型の層別化において高いロバスト性、感度、および特異度を実証する。この技術は、エビジェネティクスの科学における最新のブレイクスルー、非常に有益なクラスのエピジェネティックバイオマーカーとしての染色体コンフォメーションシグネチャのモニタリングおよび評価を利用する。学術環境で展開されている現在の研究方法論では、C C Sを検出するために、細胞材料の生化学的処理に3〜7日を要する。これらの手順は、感度および再現性が制限されており、さらに、設計段階でE p i S w i t c h (商標) 分析パッケージによって提供される標的化された洞察の恩恵を有していない。

10

【0158】

E p i S w i t c h (商標) アレイのインシリコのマーカー同定

ゲノム全体のC C S部位は、関連するすべての層別リードバイオマーカーの同定のために試験コホートからの臨床サンプル上のE p i S w i t c h (商標) アレイによって直接評価される。E p i S w i t c h (商標) アレイプラットフォームは、その高いスループット能力、および多数の遺伝子座を迅速にスクリーニングするその能力が要因で、マーカーの同定に使用される。使用したアレイはA g i l e n tカスタムC G Hアレイであったが、これにより、インシリコのソフトウェアで同定されたマーカーを照合することが可能になる。

【0159】

E p i S w i t c h (商標) P C R

その後、E p i S w i t c h (商標) アレイによって同定された潜在的なマーカーが、E p i S w i t c h (商標) P C RまたはDNAシーケンサー（すなわち、R o c h e 4 5 4、N a n o p o r e M i n I O Nなど）のいずれかによって検証される。統計的に有意で、最良の再現性を示す上位のP C Rマーカーが、最終的なE p i S w i t c h (商標) シグネチャセットへのさらなる減少のために選択され、独立したサンプルのコホートで検証される。E p i S w i t c h (商標) P C Rは、確立された標準化された操作手順プロトコルに従って、訓練を受けた技術者が実施することができる。すべてのプロトコルおよび試薬の製造は、研究の質およびプロトコルを転送する機能を確かなものとするために、I S O 1 3 4 8 5および9 0 0 1 認定の下で実施される。E p i S w i t c h (商標) P C RおよびE p i S w i t c h (商標) アレイバイオマーカープラットフォームは、全血および細胞株の両方の分析と互換性がある。試験は、少量の血液を使用して非常に少ないコピー数で異常を検出するのに十分な感度がある。

20

30

【0160】

本発明の実施形態を示すパラグラフ

1. 集団内のサブグループを表す染色体状態を検出するためのプロセスであって、当該プロセスが、その染色体状態に関連する染色体相互作用がゲノムの定義された領域内に存在するか否かを判定する工程を含み；かつ

— 上記染色体相互作用は、随意に、どの染色体相互作用が集団のサブグループに対応する染色体状態に関連するかを判定する方法によって特定されており、当該方法は、染色体の異なる状態を有するサブグループからの核酸の第1のセットをインデックス核酸の第2のセットと接触させる工程、および相補的配列のハイブリダイズを可能にする工程を含み、第1および核酸の第2のセットにおける核酸は、染色体相互作用で一緒になった両方の染色体領域からの配列を含むライゲートされた産物を表し、核酸の第1のセットと核酸の第2のセットとの間のハイブリダイゼーションのパターンにより、どの染色体相互作用がサブグループに特異的であるかの判定が可能になり、および

40

— サブグループは前立腺がんの予後に関連し、染色体相互作用は、

(i) 表6にリストされた領域または遺伝子のいずれかに存在する、および／または

(ii) 表6に示された任意のプローブによって表された染色体相互作用のいずれかに対応する、および／または

50

(iii) (i) または (ii) を含むまたはそれに隣接する 4, 0 0 0 塩基領域に存在するか、または、

— サブグループは D L B C L の予後に関連し、染色体相互作用は、

a) 表 5 にリストされた領域または遺伝子のいずれかに存在する、および／または

b) 表 5 に示された任意のプローブによって表された染色体相互作用のいずれかに対応する、および／または

c) (a) または (b) を含むまたはそれに隣接する 4, 0 0 0 塩基領域に存在する、プロセス。

【0161】

2. — 上記前立腺がんの予後が、癌が侵襲性であるかまたは緩慢性であるかに関連する、および／または

— 上記 D L B C L の予後が生存に関連する

パラグラフ 1 に記載のプロセス。

【0162】

3. サブグループが前立腺がんに関連し、染色体相互作用の具体的な組み合わせが、

(i) 表 6 のプローブによって表される染色体相互作用のすべてを含むこと、および／または

(ii) 表 6 のプローブによって表される染色体相互作用の少なくとも 1、2、3、または 4 を含むこと、および／または

(iii) 表 6 にリストされる領域または遺伝子の少なくとも 1、2、3、または 4 に一緒に存在するもの、および／または

(iv) 分類される染色体相互作用の少なくとも 1、2、3、または 4 が、表 6 のプローブによって表される染色体相互作用を含むまたはそれに隣接する 4, 0 0 0 塩基領域に存在するもの

に分類される、パラグラフ 1 または 2 に記載のプロセス。

【0163】

4. サブグループが D L B C L に関連し、染色体相互作用の特異的な組み合わせが、

(i) 表 5 のプローブによって表される染色体相互作用のすべてを含むこと、および／または

(ii) 表 5 のプローブによって表される染色体相互作用の少なくとも 1 0、2 0、3 0、5 0、または 8 0 を含むこと、および／または

(iii) 表 5 にリストされる領域または遺伝子の少なくとも 1 0、2 0、3 0、または 5 0 に一緒に存在するもの、および／または

(iv) 分類される染色体相互作用の少なくとも 1 0、2 0、3 0、5 0、または 8 0 が、表 5 のプローブによって表される染色体相互作用を含むまたはそれに隣接する 4, 0 0 0 塩基領域に存在するもの

に分類される、パラグラフ 1 または 2 に記載のプロセス。

【0164】

5. サブグループが D L B C L に関連し、染色体相互作用の特異的な組み合わせが、

(i) 表 7 に示される染色体相互作用のすべてを含むこと、および／または

(ii) 表 7 に示される染色体相互作用の少なくとも 1、2、5 または 8 を含むこと

に分類される、パラグラフ 1 または 2 に記載のプロセス。

【0165】

6. 少なくとも 1 0、2 0、3 0、4 0 または 5 0 の染色体相互作用が分類され、好ましくは少なくとも 1 0 の染色体相互作用が分類される

パラグラフ 1 ～ 5 のいずれか 1 つに記載のプロセス。

【0166】

7. 染色体相互作用が、

— 個体からのサンプルにおいて、および／または

— 染色体相互作用の部位での DNA ループの有無を検出することによって、および／ま

10

20

30

40

50

たは

- － 染色体コンフォメーションと一緒にいる染色体の遠位領域の有無を検出することによって、および／または
 - － ライゲートされた核酸の存在を検出することによって分類され、ライゲートされた核酸は、上記分類中に生成され、その配列が染色体相互作用において一緒になる染色体の領域に各々対応する2つの領域を含み、ライゲートされた核酸の検出は、好ましくは、
 - (i) 表6に言及される特異的なプローブ配列のいずれかと少なくとも70%の同一性を有するプローブによる、および／または
 - (ii) 表6の任意のプライマー対と少なくとも70%の同一性を有するプライマー対による、前立腺がんの予後の場合に、または
 - (ii) 表5に言及される特異的なプローブ配列のいずれかと少なくとも70%の同一性を有するプローブによる、および／または
 - (b) 表5の任意のプライマー対と少なくとも70%の同一性を有するプライマー対による、DLBCLの予後の場合に行われる
- パラグラフ1～6のいずれか1つに記載のプロセス。

【0167】

- 8.－ 核酸の第2のセットが、核酸の第1のセットよりも大きな個体の群からのものである、および／または
- － 核酸の第1のセットが、少なくとも8の個体からのものである、および／または
 - － 核酸の第1のセットが、第1のサブグループからの少なくとも4の個体、および好ましくは第1のサブグループと重複しない第2のサブグループからの少なくとも4の個体からのものである、および／または
 - － プロセスが、医療処置のために個体を選択するために実行される
- パラグラフ1～7のいずれか1つに記載のプロセス。

【0168】

- 9.－ 核酸の第2のセットが、選択されていない群を表す、および／または
- － 核酸の第2のセットが、定義された位置でアレイに結合される、および／または
 - － 核酸の第2のセットが、少なくとも100の異なる遺伝子における染色体相互作用を表す、および／または
 - － 核酸の第2のセットが、少なくとも1,000の異なる染色体相互作用を表す少なくとも1,000の異なる核酸を含む、および／または
 - － 核酸の第1のセットおよび核酸の第2のセットが、長さが10から100のヌクレオチド塩基を有する少なくとも100の核酸を含む
- パラグラフ1～8のいずれか1つに記載のプロセス。

【0169】

10. 核酸の第1のセットが、
- (i) 染色体相互作用で一緒になった染色体領域を架橋する工程と、
 - (ii) 随意に酵素を用いる制限消化切断によって、上記架橋領域を切断にさす工程と、
 - (iii) 上記架橋された切断されたDNA末端をライゲートして、(特に、ライゲートされたDNAを含む) 核酸の第1のセットを形成する工程と、を含むプロセスで得られる
- パラグラフ1～9のいずれか1つに記載のプロセス。

【0170】

11. ゲノムの上記定義された領域が、
- (i) 一塩基多型(SNP)を含む、および／または
 - (ii) マイクロRNA(miRNA)を発現する、および／または
 - (iii) 非コードRNA(ncRNA)を発現する、および／または
 - (iv) 少なくとも10の連続するアミノ酸残基をコードする核酸配列を発現する、および／または
 - (v) 制御要素を表す、および／または
 - (vii) CTCF結合部位を含む
- パラグラフ1～10のいずれか1つに記載のプロセス。

【0171】

10

20

30

40

50

12. 表6に定義されるような少なくとも5つの染色体相互作用を分類する工程を含む、前立腺がんが侵襲性であるか緩慢性であるかを判定するために実行される、パラグラフ1～11のいずれか1つに記載のプロセス。

【0172】

13. 表5に定義されるような少なくとも5つの染色体相互作用を分類する工程を含む、DLBCLの予後を判定するために実行される、パラグラフ1～12のいずれか1つに記載のプロセス。

【0173】

14. — 好ましくは、上記プロセスは、候補薬剤が、異なるレベルの予後に関連付けられている染色体状態への変化を引き起こすことができるかどうかを検出するために使用され、

— 染色体相互作用が表6の任意のプロープによって表される、および／または

— 染色体相互作用が表6にリストされる任意の領域または遺伝子に存在する、

および随意に、

— 染色体相互作用が、染色体相互作用がパラグラフ1で定義されるような染色体状態に関連していることを判定する方法によって同定される、および／または

— 染色体相互作用の変化が、(i)表6に言及されるプロープ配列のいずれかと少なくとも70%の同一性を有するプロープ、および／または(ii)表6の任意のプライマー対と少なくとも70%の同一性を有するプライマー対によってモニターされる、前立腺がんに対する治療薬を特定または設計するために実行される
パラグラフ1～13のいずれか1つに記載のプロセス。

【0174】

15. — 好ましくは、上記プロセスは、候補薬剤が、異なるレベルの予後に関連付けられている染色体状態への変化を引き起こすことができるかどうかを検出するために使用され、

— 染色体相互作用が表5の任意のプロープによって表される、および／または

— 染色体相互作用が表5にリストされる任意の領域または遺伝子に存在する、

および随意に、

— 染色体相互作用が、染色体相互作用がパラグラフ1で定義されるような染色体状態に関連していることを判定する方法によって同定される、および／または

— 染色体相互作用の変化が、(i)表5に言及されるプロープ配列のいずれかと少なくとも70%の同一性を有するプロープ、および／または(ii)表5の任意のプライマー対と少なくとも70%の同一性を有するプライマー対によってモニターされる、DLBCLに対する治療薬を特定または設計するために実行される
パラグラフ1～13のいずれか1つに記載のプロセス。

【0175】

16. 染色体相互作用の検出に基づいて標的を選択する工程、および好ましくは標的のモジュレータをスクリーニングして免疫療法のための治療薬を特定する工程を含み、上記標的が随意にタンパク質である、パラグラフ14または15に記載のプロセス。

【0176】

17. 分類または検出が、ライゲートされた産物を増幅することができるプライマーおよびPCR反応中にライゲートされた部位に結合するプロープを使用する定量PCR(qPCR)によるライゲートされた産物の特異的検出を含み、上記プロープが、染色体相互作用で一緒になった染色体領域の各々からの配列に相補的な配列を含み、好ましくは、上記プロープが、

上記ライゲートされた産物に特異的に結合するオリゴヌクレオチド、および／または

オリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合したフルオロフォア、および／または

オリゴヌクレオチドの3'末端に共有結合した消光剤を含み、および

随意に、上記フルオロフォアが、HEX、Texas RedおよびFAMから選択される、および／または

10

20

30

40

50

上記プローブが、10から40のヌクレオチド塩基の長さ、好ましくは20から30のヌクレオチド塩基の長さの核酸配列を含む、パラグラフ1～16のいずれか1つに記載のプロセス。

【0177】

18. – プロセスの結果がレポートで提供される、および／または
– プロセスの結果が、患者の治療スケジュールを選択するために使用される、および好ましくは個体のための特定の治療法を選択するために使用される
パラグラフ1～17のいずれか1つに記載のプロセス。

【0178】

19. パラグラフ1～13および17のいずれか1つに記載のプロセスによって個体の前立腺がんまたはDLBCLを処置する方法で使用するための治療薬であって、個体が治療薬を必要としていると特定されている、治療薬。

【実施例】

【0179】

本発明は、以下の実施例によって例示される。

実施例1

EpiSwitch (商標) (染色体コンフォメーションシグネチャ) マーカーの使用
一次的および二次的な患部組織との高い一致および強力な検証結果を有する、非常に普及しているEpiSwitch (商標) マーカーを一貫して観察してきた。EpiSwitch (商標) バイオマーカーシグネチャは、複雑な疾患表現型の層別化において高い口バスト性、感度、および特異度を実証している。

【0180】

EpiSwitch (商標) 技術は、非常に効果的なスクリーニング手段、早期検出、コンパニオン診断、異常で応答性の高い遺伝子発現に関連付けられた主要な疾患のモニターおよび予後分析をもたらす。OBDアプローチの主な利点は、非侵襲的で、迅速であり、不安定なタンパク質/RNA分子よりもむしろ、染色体シグネチャの一部としての高度に安定したDNAベースの標的に依存していることである。

【0181】

CCSは、エピジェネティックな制御および細胞の全ゲノムにわたる遺伝情報へのアクセスの安定した制御フレームワークを形成する。CCSの変化は、その結果が明らかな異常として自ずと現れるよりかなり前の制御のモードおよび遺伝子発現の初期の変化を反映している。CCSの簡単な考え方は、DNAの異なる離れた制御部分が互いに近接して相互の機能に影響を与えるトポロジカルな配置であるということである。これらの接続は、ランダムに行われるわけではなく、高度に制御され、有意なバイオマーカーの層別化力を有する高レベルの制御メカニズムとして十分に認識されている。

【0182】

前立腺がんの予後の層別化

マーカーは、クラスI (低リスク、緩慢性)、クラスII (中程度)、およびクラスIII (侵襲性の高リスク) の遡及的アノテーションに基づいて開発された。マーカーは、健常対照に対する患者の口バストな分類を示し、クラスを区別する。サンプルは英国からのものであった。

【0183】

前立腺がん患者の血液と健常対照者の血液とを区別することができるEpiSwitch (商標) バイオマーカーの同定

最初に、カスタムEpiSwitch (商標) マイクロアレイの研究を用い、8人の前立腺がん (PCa) および8人の対照の個体を区別するために、425の遺伝子座にわたって～15,000の潜在的なCCSを同定およびスクリーニングした。統計的に有意な上位のマーカーを、ネステッドPCRアッセイに転移し、24個のPCaおよび25個の健常対照のサンプルのより大きなサンプルコホートでスクリーニングした。それぞれ、100% (95%CI – 86.2%～100%) および100% (95%CI – 86.7%

10

20

30

40

50

～100%)の感度および特異度を有するPCaおよび対照サンプルを分類したマイクロアレイから転移された上位5のCCSを使用して、分類子を開発した。

【0184】

図1は、開発サンプルコホートの49個のサンプルに対する上位5のマーカーの主成分分析を示している。

【0185】

診断分類子を使用して、83%の精度で24個のPCaおよび5個の健常対照のサンプルからなる追加の盲検化された独立したコホート(n=29)を分類した。EpiSwitch(商標)前立腺がんアッセイのさらなる開発を、95個のPCaおよび97個の対照の追加のサンプルコホート(n=192)を用いて実施した。これは、20個のサンプル(10個のPCa、10個の対照)の盲検サンプルコホートで検証された。この検証の結果は表1に示される。

【0186】

【表1】

表1. 盲検サンプルコホート(n=20)の分類の結果

		95% 信頼区間(CI)
感度	80.0%	44.4%–97.5%
特異度	80.0%	44.4%–97.5%
PPV	80.0%	44.4%–97.5%
NPV	80.0%	44.4%–97.5%

【0187】

PCAプログラムの最新のプロジェクトでは、加水分解プローブベースのリアルタイム定量PCR(qPCR)を利用したPCa診断用の代替PCRフォーマットを開発した。6マーカーモデルの性能は表2に示される。

【0188】

【表2】

表2. 6マーカーqPCRモデルの性能

		95%信頼区間(CI)
感度	90.0%	73.47%–97.89%
特異度	85.0%	62.11%–96.79%
PPV	90.0%	75.90%–96.26%
NPV	85.0%	65.60%–94.39%

【0189】

概要

さまざまな病期の米国および英国のサンプルを使用する、PCa診断プログラム中に開発されたEpiSwitch(商標)PCa診断シグネチャの3つの独立した盲検化された検証により、前立腺がんの診断に関して>80%の感度および特異度が達成される。PCaを検出するためのゴールドスタンダードの臨床アッセイである前立腺特異抗原(PSA)血液検査は、それ自体が他のさまざまな変数に依存しており、典型的に、32~68%の感度および特異度の範囲を有する。さらに、並行研究トラックにより、結果として、

P C Aと診断された個々の患者に対する臨床管理および治療選択を支援するために前立腺がんの予後を評価するE p i S w i t c h（商標）アッセイが開発された。

【0190】

追加のカスタムE p i S w i t c hマイクロアレイの研究を、8人の侵襲性の前立腺がん患者（クラス3）と8人の緩慢性P C a患者（クラス1）とを区別するために、426の遺伝子座にわたって～15,000の潜在的なC C Sを同定およびスクリーニングするために実施した。P C aクラスの説明は添付で見ることができる。統計的に有意な上位のマーカ―を、ネステッドP C Rアッセイに転移し、42個のクラス1、25個のクラス2および19個のクラス3のP C aのサンプルのより大きなサンプルコホートでスクリーニングした。

10

【0191】

統計的に有意な上位6個のマーカ―を使用して、クラス1（低リスク）およびクラス3（高リスク）のP C aを分類するための予後分類子を開発した。42個のクラス1および25個のクラス3のサンプルの独立したサンプルコホート（n=27）での分類子の性能は表3に示される。

【0192】

【表3】

表3. 6マーカ―予後分類子の性能(クラス1 vs クラス3)

		95%信頼区間(CI)
感度	80.0%	59.3%–93.17%
特異度	92.86%	80.52%–98.5%
PPV	86.96%	66.41%–97.22%
NPV	88.64%	75.44%–96.21%

20

【0193】

代替の分析では、クラス2とクラス3のP C a間で層別化されたさらなる6個のマーカ―が見つかった。2つの分類子は2つのマーカ―を共有し、各分類子も4つの固有のマーカ―を有している。

30

【0194】

図2は、2つのP C A予後分類子のV E N N比較を示す。

【0195】

クラス2 v s クラス3のP C a分類子の性能は表4に示される。

【0196】

【表4】

表4. 6マーカ―予後分類子の性能(クラス2 vs クラス3)n=44

		95%信頼区間(CI)
感度	84.0%	63.92%–95.46%
特異度	88.89%	65.29%–98.62%
PPV	91.30%	71.96%–98.93%
NPV	80.00%	56.34%–94.27%

40

【0197】

50

結論

診断および予後のバイオマーカーの開発は、複数の臨床サンプルコホートで達成した。実施したすべてのマーカーのスクリーニングおよび選択は、健常対照に対する前立腺がんのさまざまな病期（病期1～3）の患者（診断的用途）の他に、緩慢性の、低リスクのカテゴリ1の前立腺がんに対する、侵襲性の、高リスクのカテゴリ3の患者（予後的用途）、または中リスクのカテゴリ2の患者において染色体コンフォメーションシグネチャを介してモニターされた全身性の、血液ベースのエピジェネティックな変化に基づいていた。

【0198】

PCa対健常対照に関する層別化開発の結果は、試験コホートおよび一連の盲検化検証で最大>80%の感度および特異度を示した。高リスクのカテゴリ3対低リスクのカテゴリ1のPCaの層別化が、最大67個のサンプルのコホートで最大80%の感度および最大92%の特異度を示した一方で、高リスクのカテゴリ3対中リスクのカテゴリ2の層別化は、最大44個のサンプルのコホートで最大84%の感度および最大88%の特異度を示した。

【0199】

添付

低リスクーカテゴリ1

限局性前立腺がんは、以下の場合に低リスクとして分類される：

PSAレベルが1mlあたり10ng未満である、および
グリーソンスコアが6以下である、および
TステージがT1とT2aとの間である。

【0200】

中リスクーカテゴリ2

限局性前立腺がんは、以下の少なくとも1つである場合に中リスクとして分類される：

PSAレベルが10～20ng/mlである、
グリーソンスコアが7である、
TステージがT2bである。

【0201】

高リスクーカテゴリ3

限局性前立腺がんは、以下の少なくとも1つである場合に高リスクとして分類される：

PSAレベルが20ng/ml以上である、
グリーソンスコアが8から10の間である、
TステージがT2c、T3またはT4である。

【0202】

癌がT3またはT4ステージである場合、これは、前立腺の外側の線維性被覆（カプセル）を突き破ったことを意味するため、局所進行性前立腺がんとして分類される。

【0203】

実施例2．DLBCLに対するマーカーの同定

概要

これは、続く治療（すなわち、R-CHOP）の選択のための予後不良および予後良好の患者の主要な群の同定に関連している。バイオマーカーは、遡及的全生存期間に基づいて開発されてきた。通常、患者は、ABC（予後不良）またはGCB（予後良好）などの疾患サブタイプに従って、NanosttringやFluidigmのような生検ベースの遺伝子発現基準によって分類される。しかし、すべての患者をABCまたはGCB（いわゆる、タイプIII、または未分類の患者）として分類することができたわけではない。ABCまたはGCBの標準分類に関係なく、治療前のベースラインでの生存の予後に対する分類を提供するバイオマーカーを同定した。

【0204】

マーカーの同定

DLBCLは、患者の生存率に明確な違いを示し（予後不良 vs 予後良好）、サブタ

10

20

30

40

50

イブへの多数の分子の読み出しを特徴とする。さまざまなサブタイプも現在の臨床診療で異なって扱われている。これには、例えば、化学療法に対するリツキシマブおよびCHOPの併用が含まれる。さまざまなアプローチが存在する。

【0205】

現在実施されている分子の読み出しは、直接生検によって得られた生物学的材料に対して実施される、アレイによる遺伝子発現プロファイリングに基づいている。それらには、極端なタイプのABCおよびGCBに対するNanostringおよびFluidigmのアレイベースの試験が含まれる。ANCサブタイプは通常、予後不良と関連している。すべての患者がABCまたはGCBとして分類することができたわけではなく、確立された遺伝子発現プロファイルおよび生存不良の予後との任意の関連性に関して、多数の患者が未分類（またはタイプIII）のままである。他のモダリティによる転写遺伝子発現プロファイリングに関係なく、予後不良対予後良好の患者を直接分類する全身バイオマーカーを構築した。

10

【0206】

工程1：Episwitchスクリーニングアレイを使用して、DLBCLに対する生存の予後不良および予後良好を表す細胞株の群のエピジェネティックプロファイルを比較した。これにより、アレイベースのマーカーの同定、およびPCRフォーマットでの同じ標的に対して使用するネステッドPCRプライマーの設計が可能になる。

【0207】

工程2：既知の遡及的生存アノテーションを有する57～58人の未分類のDLBCL患者からのベースライン血液サンプルで読み取られた上位10のネステッドPCRベースのマーカーを使用した。表6は、マーカー、最終的なシグネチャ、および分類子モデルによるパフォーマンスに対する詳細を提供している。

20

【0208】

研究では、どのようにベースラインが、臨床生存データと比較して予後不良／良好のこれらの患者に対して呼び出しするかを示している。これはハザード比のCox推定値であり、すなわち、予後不良へのベースライン分類は、特定の値>1を有して、臨床事後アノテーションによる予後良好グループよりもむしろ、予後不良生存グループに属する確率が高いことを示している。後者は、試設計の臨床チームにとって特に価値があり、関心がある。

30

【0209】

詳細な論評

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）は、成人で最も一般的なタイプの非ホジキンリンパ腫である。これは、青年期から老年期の間でいつでも発生しかねず、米国では毎年10万人あたり7～8人が罹患しているが、発症率は年齢とともに増加する。遺伝子発現プロファイリングにより、胚中心B細胞様（GCB）および活性化B細胞様（ABC）というDLBCLの2つの主要なタイプが明らかになった。GCB DLBCLは、二次リンパ器官、例えばリンパ節から発生し、ここで、ナイーブB細胞は感染が解消された後に分裂を停止しない。ABC DLBCLは、胚中心を離れて形質細胞、すなわち形質芽細胞B細胞になる準備ができているB細胞のサブセットで始まると考えられているが、現実には、B細胞のライフサイクル全体を通じてさまざまな形態のDLBCLが発生するため、より複雑である。

40

【0210】

異なるサブタイプはさまざまな予後を有し、GCB DLBCLに関しては5年生存率は60%であるが、ABC DLBCLに関しては5年生存率はわずか35%である。サブタイプの各々は遺伝子発現の違いを特徴としている。GCB DLBCLでは、転写抑制因子BCL6はしばしば過剰発現されるが、ABC DLBCLでは、NF-κB経路はしばしば構成的に活性化されることがわかる。現在あまりよく理解されていないタイプIIIと呼び出しされるDLBCLの第3のタイプもあるが、これは2つの主要なタイプ間に位置する遺伝子発現プロファイルを有していると考えられている。

50

【0211】

現在の診断方法には、罹患したリンパ節の切除生検とそれに続く免疫組織化学的検査（IHC）が含まれる。現在、DLBCLの治療手順はサブタイプに関係なく同じである。さまざまなサブタイプの病因、治療反応、および結果は大きく異なるため、差別化された治療戦略の開発を支援するために、サブタイプを区別するためのロバストで非侵襲的なアッセイを開発する必要性がまだある。DLBCLに対する予測および予後バイオマーカーを見つけるために多くの研究が行われてきたが、サブタイプを区別するために使用することができる単一の試験に対するコンセンサスはない。

【0212】

DLBCL患者の血液中のDLBCLの異なるサブタイプを区別することができるEpiSwitch（商標）バイオマーカーを同定する

10

EpiSwitch（商標）アレイプラットフォームを使用して、DLBCL細胞株および血液サンプルを調べ、健常対照患者に存在しなかったバイオマーカーを同定してから、30のABC、30のGCB、および10の健常対照サンプルからなる70の患者コホートでこれらのバイオマーカーを確認した。

【0213】

EpiSwitch（商標）アレイ

EpiSwitch（商標）カスタムアレイは、パターン認識ソフトウェアを使用して設計されたプローブを用いて、数千の考えられ得るCCSのスクリーニングを可能にする。EpiSwitch（商標）技術によってキャプチャされたさまざまな長距離の染色体相互作用は、対象の遺伝子座に課せられたエピジェネティックな制御フレームワークを反映し、これらの遺伝子座の同時制御に寄与するシグナル伝達経路からの個々の異なる入力に対応する。全体として、異なる入力の組み合わせは遺伝子発現を調節する。具体的な生理学的条件下での異常なまたは別個の染色体コンフォメーションシグネチャの同定は、すべての入力シグナルが遺伝子発現プロファイルに統合される前に、調節解除への特異的な寄与のための重要な証拠を提供する。

20

【0214】

いくつかのソースからのデータを使用して、独自のソフトウェアでの分析のために98の遺伝子座を選択し、13,332の潜在的な染色体コンフォメーションのプローブを試験した。特異的な遺伝子座に1つまたは複数の高次のエピジェネティック染色体コンフォメーションマーカーが存在する、または高次のエピジェネティック染色体コンフォメーションマーカーが存在しない可能性があるため、1つの遺伝子座を見ることは1つのマーカーを見ることと等しいわけではない。製造後、DLBCL患者および健常対照からの細胞株および血液サンプルを、EpiSwitchプロトコルを使用して処理し、標識化し、アレイにハイブリダイズした。

30

【0215】

診断開発用のサンプル

異なるサブタイプに対応し、サブ分類の信頼性のレベルが異なる16の細胞株を使用した。最も明確なABCおよびGCBのサブタイプの細胞株を分析に使用した。さらに、4人のDLBCL患者および11人の健常対照からの血液サンプルを使用した。パート1でのバイオマーカーの同定後、30のABCおよび30のGCBの血液サンプルからなる60個のサンプルを、OBDに提供し、Fluidigm試験によって十分に特徴付け、OBDによって提供された10個の健常対照サンプルを補足した。

40

【0216】

結果

アレイ分析

マイクロアレイからの72の染色体シグネチャ部位を、以下の2つの基準に基づいてスクリーニングするように選択した。

・ABC細胞とGCB細胞との間で層別化するそれらの能力（highABC—highGCB）、および／または

50

・低いCV値（5つのアレイの中央値が分析された、高いABC対高いGCB、DLBC L1対健常対照、DLBC L2対健常対照、DLBC L3対健常対照およびDLBC L4対健常対照）

【0217】

アレイのEpiSwitch（商標）PCRプラットフォームへの変換

アレイからの対象のプローブを囲む配列の分析後、染色体シグネチャ部位を照合するために69セットのプライマーを設計した。これらを、その後、プールされたDLBC L血液サンプル上で試験し、これらのうち49がアッセイで使用するためのPCR産物に対するOBD基準を満たしていた。

【0218】

これらの49の潜在的なマーカーの各々を、その後、6つのDLBC L細胞株上で試験し、そのうちの3つはABCであり、3つはGCBであった。使用した細胞株は、複数の異なる同定方法を使用して同じ分類が見つけれられたため、最も信頼のあったもの、ABCまたはGCBであった。これにより、ABCおよびGCBの細胞のサブタイプを区別するのに最も有用なマーカーを選択することが可能になった。PCRプラットフォームで使用するために28のEpiSwitch（商標）マーカーを同定し、これらはEpiSwitch（商標）マイクロアレイの結果と一致していた。さらに、潜在的なマーカーを、4人のDLBC L患者に対しても試験し、健常対照をプールして、DLBC L患者には存在するが、健常対照には存在しないものを同定した。28のEpiSwitch（商標）マーカーのうち21は、健常対照サンプルには存在しなかったが、DLBC Lのマーカーとして、またサブ分類に使用することができるように、DLBC Lサンプルには存在していた。

【0219】

サンプル試験

EpiSwitch（商標）PCRプラットフォームにうまく変換された21のマーカーを、その後、70の患者の血液サンプルコホート間で試験した。最初に、各マーカーを、6つの新しいABCサンプル、および6つの新しいGCBサンプルで試験し、21のマーカーセットは10のマーカーに絞り込まれ、これは最大の違いを示した。これらの10のマーカーを、その後、残りの24のABC、24のGCB、および10の健常対照サンプルで試験した。

【0220】

マーカーの各々を、その後、サブグループを区別するその能力、他のマーカーとのその共線性、およびまた健常をDLBC Lと区別するその能力の分析にさらした。可能な限り最大の情報を提供したマーカーの6つのサブセットを同定し、これらは、ANXA11、IFNAR、MAP3K7、MEF2B、NFATc1、およびTNFRS13Cの遺伝子座におけるマーカーである。図3は、PCAプロット上のサンプルの異なる群を区別するこれらのマーカーの能力を示している。この6マーカーパネルは、健常対照患者をDLBC L患者と明確に区別することができ、これはDLBC Lに対する血液ベースのアッセイの重要な特徴である。

【0221】

図3は、6つのEpiSwitch（商標）マーカーバイナリデータに基づく60人のDLBC Lおよび10人の健常な患者のPCAプロットを示している。サンプルは、FluigmデータによってABCサブタイプまたはGCBサブタイプとして特徴付けられ、健常対照も示されている。

【0222】

分類：DLBC L患者コホート（60のサンプル）内のABCおよびGCBのサブタイプの同定

分類を、5倍の交差検証を用いるロジスティック回帰分類子を使用して実施し、次の結果が達成された。交差検証では次の結果が達成された：

ABCサブタイプ 83.3%（95%CI-65.3%~94.3%）

10

20

30

40

50

G C Bサブタイプ 83.3% (95% C I - 65.3% ~ 94.3%)

【0223】

さらに、結果として得た6マーカーのロジスティック分類子モデルを、60人の患者のデータセットの50の順列で試験した。データを毎回ランダム化し、精度統計をROC曲線を使用して計算した。0.802の曲線下面積(AUC)およびp値0.0000037(H_0 = 「AUCは0.5に等しい」)は、モデルが正確であり効率的に実施されていることを示している。

【0224】

結論

この研究では、困難な臨床的質問、特にDLBCLのABCサブタイプとGCBサブタイプの区別に対する返答を提供するEpiSwitch (商標) 技術の力を実証した。ハイスループットアレイ法、およびシンプルで費用効果の高いPCRプラットフォームへの変換を使用して、13,000を超える潜在的なCCSを試験し、DLBCLサブタイプを区別するための6マーカーパネルに改良した。このパネルは、DLBCL患者を健常対照と区別することができ、83.3%の確率でサブタイプを正確に予測することができた。この試験では、EpiSwitch (商標) (全血ベース)、LPS (起源の細胞、組織)、およびFluidigm (起源の細胞、組織) の間のクラス割り当てについても80%を超える一致があった。

【0225】

EpiSwitch (商標) 技術は、長距離の遺伝子間相互作用の変化、つまり染色体コンフォメーションシグネチャを検出し、これは結果として、疾患の病因に關与する重要な遺伝子のエピジェネティックな状態および発現モードの調節の変化につながる。EpiSwitch (商標) 技術に基づく診断手順は、他のラボに移すことができるシンプルで迅速な手法である。この試験は、いくつかの分子生物学反応と、それに続くネステッドPCRによる検出で構成されている。この試験は、複雑な手順を必要とせず、PCRベースのアッセイを実行する任意のラボで実施することができる。

【0226】

実施例3

イヌに関してさらなる研究を実施した。1つの目的は、リンパ腫の疑いのある初期診断を支援するためのマーカーを調査して、フォローアップ生検を実施するための要件について獣医に通知することであった。この研究では、上位75のEpiSwitchマイクロアレイのDLBCLマーカー (前に同定した) を、ヒトゲノムビルド (Grch37) から現在のイヌのゲノムに変換する。合計38のイヌのサンプル (リンパ腫の可能性のある19人の患者と19の一致した対照サンプルからなる) を、すべての75のDLBCLマーカーを使用してスクリーニングした。この研究を実行するために、以下を実施した:

- (特異的な遺伝子に関連付けられた) 75のヒトDLBCLマーカーに基づいて、犬ゲノム (Can Fam3.1) におけるオルソログを同定し、BioMartから遺伝子座を抽出した。

- EpiSwitch (商標) ソフトウェアを実行して、これらの遺伝子座における潜在的な相互作用を同定した。

- プライマー設計ソフトウェアおよびその他のフィルタを追加して、リストを調査用に75のマーカーに減らした。

研究および結果は、図6~16および表8および9に示される。

【0227】

実施例4. 前立腺がんに関するさらなる研究

前立腺がん (PCa) に対する現在の診断用血液検査は、初期段階の疾患に対しては信頼性が低く、結果として、良性疾患の男性において不必要な前立腺生検が多数発生し、PCaの男性においては陰性生検の誤った安堵が生まれる。低リスク群の5年生存率は95%超であり、ほとんどの男性が低侵襲治療の恩恵を受けるため、PCaのリスクを予測することは、治療オプションについて十分な情報に基づいた判定を下すために極めて重要で

10

20

30

40

50

ある。三次元ゲノムアーキテクチャおよび染色体構造は、腫瘍と循環細胞の両方で腫瘍形成中に初期の変化を受け、疾患用バイオマーカーとして機能することができる。

【0228】

この前向き研究では、新たに診断された治療歴のないP C a患者（ $n = 140$ ）および非癌対照（ $n = 96$ ）の全血中の425の癌関連遺伝子の遺伝子座における14, 241の染色体ループに対して染色体コンフォメーションスクリーニングを実施した。

【0229】

データは、P C a患者からの末梢血単核細胞（P B M C）が、E T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3、およびC A S P 2の遺伝子の遺伝子座で特異的な染色体コンフォメーション変化を獲得したことを示している。独立した検証コホートでの盲検化試験により、80%の感度および80%の特異度でP C a検出を得た。P C aリスク群間のさらなる分析により、高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1に対するB M P 6、E R G、M S R 1、M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1の遺伝子と、高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2に対するH S D 3 B 2、V E G F C、A P A F 1、M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1の遺伝子とからなる予後検証セットが得られ、これらは原発性前立腺腫瘍におけるコンフォメーションと高い類似性を有していた。これらのセットは、高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1を層別化する80%の感度および92%の特異度、および高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2の疾患を層別化する84%の感度および88%の特異度を達成した。

【0230】

結果は、P C a患者の血液中的の特異的な染色体コンフォメーションを実証しており、これは高い感度および特異度でのP C aの診断および予後を可能にする。これらのコンフォメーションはP B M Cと原発腫瘍との間で共有される。これらのエピジェネティックシグネチャは、血液ベースのP C aの診断および予後検査の開発につながる可能性がある。

【0231】

導入

西欧諸国では、前立腺がん（P C a）は現在、男性で最も一般的に診断されている非皮膚癌であり、癌関連死の2番目に多い原因である。30歳の男性の多くは組織学的P C aの証拠を示しており、そのほとんどは微視的なものであり、おそらく臨床症状を示すことはない。診断および予後には、前立腺特異抗原（P S A）、侵襲性針生検、グリーソンスコア、および病期が使用される。2, 299人の患者の大規模な多施設治験では、12部位の生検スキームが他のすべてのスキームより優れ、全体的なP C a検出率はわずか44.4%であった。

【0232】

広く臨床で使用されているP C aに対する唯一の利用可能な血液検査は、P S Aの循環レベル（21%の感度および91%の特異度）の測定を含むが、前立腺のサイズ、良性前立腺肥大症、および前立腺炎によってもP S Aレベルは増加し得る。現在の4.0 ng / mlのカットオフ限界では、すべてのP C a患者の20%のみが検出されている。初期のP C aでは、P S A検査は、初期の浸潤癌と潜在性の非致死性腫瘍とを区別するのに十分特異的ではなく、男性の一生にわたって無症候性のままであり得る。進行性のP C aでは、結果に対する臨床的代替エンドポイントとしてP S A動態が使用される。しかし、それらは一般的な予後を示す一方で、個体に対する特異性を欠いている。4 K血液検査（A U C 0.8）およびP H I血液検査（90%の感度、17%の特異度）を含む多数のより特異的な血液検査が、P C a検出のために行われている。P C aの重症度を確立し、患者をリスク群に層別化するために、P S Aレベル、病期、およびグリーソンスコアが使用される。現在まで、低リスクP C aと高リスクP C aを区別することを可能にする予後血液検査はない。

【0233】

p 5 3（腫瘍の最大64%）、p 2 1（最大55%）、p 7 3およびM M A C 1 / P T E Nの腫瘍抑制遺伝子の変異を含む、P C aに関連付けられた複数の遺伝的变化が存在す

るが、これらの変異は遺伝子制御に対するすべての観察された効果の説明にはならない。動的かつ多層の染色体ループ相互作用を含むエピジェネティックなメカニズムは、遺伝子発現の強力な制御因子である。染色体コンフォメーションキャプチャ（3C）技術により、これらのシグネチャを記録することが可能になる。この研究では、EpiSwitch（商標）アッセイを使用して、PCa患者の血液中的の特異的な染色体コンフォメーションをスクリーニング、定義、および評価し、診断および予後のマーカーとして機能する可能性のある遺伝子座を同定した。

【0234】

方法

2つのコホートで、合計140人のPCa患者と96人の対照をリクルートした。コホート1：泌尿器科クリニックに通うPCa診断のある男性（ $n=105$ ）またはない男性（ $n=77$ ）を、2010年10月から2013年9月まで前向きにリクルートした。コホート2：米国から患者のサンプル（19の対照および35のPCa）を入手した。リクルート時に、針および採血方法の現在の慣行を使用して、PCa患者から単一の血液サンプル（5ml）をBD Vacutainer（登録商標）プラスチックEDTAチューブに収集した。血液サンプルを受動的に凍結し、処理されるまで -80°C で保存した。前立腺腫瘍サンプルを、前立腺全摘除術を続けて受けた、前にリクルートした患者（ $n=5$ ）から得た。患者の臨床的特徴が表17に示される。

【0235】

この研究の主要エンドポイントは、対照と比較した、PCa患者からのPBMCにおける染色体コンフォメーションの変化を検出することであった。したがって、すべての治療歴のないPCa患者は、グレード、ステージ、およびPSAレベルに関係なく、この研究に適格であった。前に化学療法を受けた患者または他の癌の患者は、この研究から除外された。PCa診断を臨床ルーチンに従って確立し、患者を適切な治療に割り当てた。予後研究（副次的エンドポイント）では、患者に関連するNCCNリスク群に従って層別化した（表10）。フォローアップ研究は実施しなかった。

【0236】

黒色腫の暫定的調査結果に基づいて、事前の検出力分析を、Rパッケージpwrでpwr.t.test関数を使用して実施した。試験では、変数間の相関を検出するには群あたり15人の患者で十分であることが示唆された（ $\beta=5\%$ の確率タイプIIエラー、有意水準；95%の検出力；50%の信頼区間および40%の標準偏差）。

【0237】

EpiSwitch（商標）技術プラットフォームは、高解像度の3C結果を回帰分析および機械学習アルゴリズムと組み合わせて、疾患分類を発展させる。癌を診断することができるエピジェネティックなバイオマーカーを選択するために、健常（対照）サンプルと比較した、癌を患う患者からのサンプルを、ゲノムアーキテクチャの条件付きかつ安定したプロファイルの統計的に有意な差についてスクリーニングした。アッセイは、最初にクロマチンをホルムアルデヒドで固定してクロマチン内の会合を捕捉することにより、全血サンプルに対して実施される。その後、固定されたクロマチンをTaqI制限酵素でフラグメントに消化し、DNA鎖を結合して架橋フラグメントを優先する。架橋を逆転させ、EpiSwitch（商標）ソフトウェアによって前に確立されたプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施する。EpiSwitch（商標）を3段階のプロセスで血液サンプルに使用して、PCa患者と健常対照者との間の染色体コンフォメーションの統計的に有意な差を特定、評価、および検証した（図17）。第1の工程では、425個の手動で精選されたPCa関連遺伝子（公開データベース（www.encodeproject.org）から取得）からの配列を、クロマチン相互作用に参与する制御シグナルのこの計算による確率的同定のテンプレートとして使用した（表18）。カスタマイズされたCGH Agilentマイクロアレイ（ $8\times 60\text{k}$ ）プラットフォームを、425の遺伝子座にわたる14,241の潜在的な染色体コンフォメーションに対して技術的および生物学的反復を試験するように設計した。8のPCaおよび8の対照サンプルをアレ

イに競合的にハイブリダイズし、各遺伝子座の有無の違いを、L I M M A 線形モデリング、その後のバイナリフィルタリングおよびクラスタ分析によって定義した。これにより、最初に、P C a 患者と対照とを最適に区別する能力を有する53の染色体相互作用が明らかになった（図17）。

【0238】

第2の評価段階では、アレイ分析から選択された53のバイオマーカーがE p i S w i t c h（商標）P C Rベースの検出プローブに変換され、複数ラウンドのバイオマーカー評価に使用した。P C Rプライマーを、P C aと健常対照とを区別するそれらの能力に従って選択した（各群において $n=6$ ）。ネステッドプライマーを使用して生成されたP C R産物の同一性を、直接的な配列決定によって確認した。したがって、選択された53のバイオマーカーを、最初の統計分析後に15のマーカーに減少し、最終的に5マーカーシグネチャにした（表11）。この選択された染色体コンフォメーションシグネチャバイオマーカーのセットを、その後、既知のコホート（ $n=49$ ）で試験した。さらに、アレイマーカーリードのE p i S w i t c h（商標）P C R評価から発展された5マーカーシグネチャを、29のサンプルを初期に試験した既知の49のサンプルと組み合わせた（合計78のサンプル）独立した盲検化検証コホートで試験した。存在量レベルを判定し、潜在的な異常値を特定するために、主成分分析も使用した（図18）。

【0239】

最後の工程では、P C a診断を通知するために使用される染色体コンフォメーションシグネチャをさらに検証するために、5マーカーのセットを、盲検化された、血液サンプルの独立した（ $n=20$ ）コホートで試験した。結果を、ベイズロジスティックモデリング、 p 値帰無仮説（ $P r(N|z)$ ）分析、フィッシャーの直接確率 P 検定、およびG l m n e tを使用して分析した（表12）。5マーカーシグネチャ研究におけるサンプルコホートサイズを、P C aサンプルと健常対照とを区別するための最適なマーカーの選択を可能にするために徐々に増大させた。コホートサイズを、95のP C aおよび96の健常対照サンプルに拡大した。データの分析および提示を、C O N S O R Tの推奨事項に従って実施した。すべての測定を盲検化方式で実施した。分析手順を検証するためにS T A R D基準を使用した。予後マーカーの同定についても同様の3段階のアプローチに従った（表13）。

【0240】

配列特異的オリゴヌクレオチドを、P r i m e r 3を使用したネステッドP C Rによって潜在的なマーカーをスクリーニングするために選択した部位の周囲に設計した。すべてのP C R増幅サンプルを、L a b C h i p D N A 1 K V e r s i o n 2キット（P e r k i n E l m e r、B e a c o n s f i e l d、英国）を使用して、L a b C h i p G Xでの電気泳動によって視覚化し、内部DNAマーカーを、蛍光色素を使用して製造元のプロトコルに従いDNAチップ上に積載した。蛍光を、機器ソフトウェアを使用してゲル画像上のシミュレートされたバンドに変換されたレーザおよびエレクトロフェログラムの読み取りによって検出した。バンドが陽性に見なされると設定した閾値は、30蛍光単位以上であった。

【0241】

選択された患者（ $n=5$ ）の生検から原発腫瘍サンプルを得た。粉碎した組織サンプルを、30分間穏やかに攪拌しながら 37°C で0.125%のコラゲナーゼにおいてインキュベートした。再懸濁した細胞（250 μL ）を、その後、固定アーム遠心分離機において室温で5分間800 g で遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水（P B S）に再懸濁した。原発腫瘍および一致する血液サンプルを、一定範囲のアッセイ感度（希釈係数1:2）でカテゴリ3対1および3対2に対する6マーカーのセットの存在について分析した。正しいサイズの一致するP C Rバンドが検出された場合、1のスコアを割り当て、バンドが検出されなかった場合は0のスコアを割り当てた（表14）。

【0242】

方法で記載されているように、E p i S w i t c h（商標）技術を使用した段階的な診

10

20

30

40

50

断バイオマーカー発見プロセスを適用した。カスタマイズされたC G H A g i l e n t マイクロアレイ (8 × 6 0 k) プラットフォームを、8 のP C aおよび8 の対照サンプルにおいて (図17) 4 2 5 の遺伝子座にわたる1 4 , 2 4 1 の潜在的な染色体コンフォメーションに対して技術的および生物学的反復を試験するように設計した (図18) 。各遺伝子座の有無を、L I M M A 線形モデリング、その後のバイナリフィルタリングおよびクラスタ分析によって定義した。第2の評価段階では、ネステッドP C Rを5 3 の選択されたバイオマーカーに使用し、それらをさらに1 5 のマーカーに減少し、最終的に5 マーカースィグネチャにした (図17) 。P C aに対するこの明確な染色体コンフォメーション疾患分類シグネチャは、以下の5つのゲノム遺伝子座における染色体相互作用で構成された：E T S プロトオンコジーン1、転写因子 (E T S 1)、ミトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼキナーゼ1 4 (M A P 3 K 1 4)、溶質キャリアファミリー2 2 メンバー3 (S L C 2 2 A 3) およびカスパーゼ2 (C A S P 2) (表11) 。染色体コンフォメーションシグネチャにおけるE T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3、およびC A S P 2 の遺伝子における特異的な染色体ループのゲノム位置 (表11) を、それらの相対的な染色体にマッピングした。E T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3、およびC A S P 2 の遺伝子に対する各染色体コンフォメーションシグネチャ遺伝子座の接合部に対応する2つのゲノム部位を、1 2 8 , 2 6 0 , 6 8 2 から1 2 8 , 5 3 7 , 9 2 6 までの1 1 番染色体、4 3 , 3 0 3 , 6 0 3 から4 3 , 4 3 2 , 2 8 2 までの1 7 番染色体、1 6 0 , 7 4 4 , 2 3 3 から1 6 0 , 9 4 4 , 7 5 7 までの6 番染色体、および1 4 2 , 9 3 5 , 2 3 3 から1 4 3 , 0 0 8 , 1 6 3 までの7 番染色体にマッピングした。染色体ループを示すE T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3 およびC A S P 2 の染色体コンフォメーションシグネチャマーカーのC i r c o s プロットを作成した。5 マーカースィグネチャに対する主成分分析を使用して、存在量レベルを判定し、潜在的な異常値を同定した。この分析を2つの群を含む7 8 個のサンプルに適用した。第1の群である、4 9 個の既知のサンプル (2 4 のP C a および2 5 の健常対照) を、2 4 個のP C a サンプルおよび5 個の健常対照サンプルを含む2 9 個のサンプルの第2の群と組み合わせた (図18) 。最終的なトレーニングセットを、9 5 のP C a および9 6 の対照サンプルを使用して構築し、その後、2 0 個のサンプル (1 0 の対照および1 0 のP C a) の独立した盲検化検証コホートで試験した。5つのゲノム遺伝子座における染色体相互作用を使用したP C a 検出に対する感度および特異度は、それぞれ、8 0 % (C I 4 4 . 3 9 % ~ 9 7 . 4 8 %) および8 0 % (C I 4 4 . 3 9 % ~ 9 7 . 4 8 %) であった (表12) 。

【0243】

P C a を層別化することができるエピジェネティックなバイオマーカーを選択するために、リスク群カテゴリ1 ~ 3 (それぞれ、低、中、高、表10) に分類されたP C a 患者からのサンプルを、ゲノムアーキテクチャの条件付きかつ安定したプロファイルの統計的に有意な差に対してスクリーニングした。E p i S w i t c h (商標) を3段階のプロセスで血液サンプルに使用して、疾患のさまざまなステージにおけるP C a 患者間の染色体コンフォメーションの統計的に有意な差を同定、評価、および検証した (図17) 。第1の工程では、使用したアレイは4 2 5 の遺伝子座をカバーし、試験プローブは合計1 4 , 2 4 1 の潜在的な染色体コンフォメーションに対するものであった。高リスクP C a カテゴリ3の患者を、低リスクカテゴリ1または中リスクカテゴリ2と比較した。合計で、P C R 評価のための1 8 1 の潜在的な層別化マーカーリードをエンリッチメント統計を使用して同定した (表19) 。その後、上位7 0 のマーカーを、P C R 検出の次の段階に持ち込み、高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1の患者サンプルの層別化をさらに評価し、最終的に高カテゴリ3対低カテゴリ1に対する6 マーカースィグネチャを確立した (表13) 。最良のマーカーを、カイ二乗を使用して同定し、その後、カテゴリ1 (n = 2 1) およびカテゴリ3 (n = 1 9) の試験セットに対する分類子に組み込んだ。その後、マーカー減少に使用されなかったカテゴリ1 (n = 2 1) およびカテゴリ3 (n = 6) の独立したコホートを、第1のラウンドの盲検化検証に使用した。同様に、6 マーカースィグネチャを、2 5 個のサンプルおよび1 9 個のサンプルを含む、それぞれ、カテゴリ3およびカテゴリ2の

試験セットに関して高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2について評価した。その後、マーカー減少に使用されなかったカテゴリ2およびカテゴリ3（各群においてn=6）の独立したコホートを、第1のラウンドの盲検化検証に使用した。

【0244】

最後の工程では、P C a 予後を通知するために使用される染色体コンフォメーションシングネチャをさらに検証するために、高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1の6マーカーセットを、より大規模で、より代表的なコホートで試験した。元の盲検化コホートを、マーカー減少に使用された40個のサンプルを含む67個のサンプルに拡張した（表15）。同様に、高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2に対する6マーカーセットを、より大規模で、より代表的なコホートで試験した。元の盲検化コホートを43個のサンプルに拡張した（表16）。

【0245】

カテゴリ3対カテゴリ1の6マーカーセットを確立した。このセットには、骨形態形成タンパク質6（BMP6）、ETS転写因子ERG（ERG）、マクロファージスカベンジャー受容体1（MSR1）、ムチン1（MUC1）、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ1（ACAT1）、および細胞死関連プロテインキナーゼ1（DAPK1）遺伝子が含まれた（表13）。ヒドロキシーデルター5-ステロイドデヒドロゲナーゼ、3ベーターおよびステロイドデルターイソメラーゼ2（HSD3B2）、血管内皮増殖因子C（VEGFC）、アポトーシスペプチダーゼ活性化因子1（APAF1）、MUC1、ACAT1およびDAPK1を含む、高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2に対する6つのバイオマーカーを同定した。顕著なことに、最後の3つのバイオマーカー（MUC1、ACAT1およびDAPK1）を、カテゴリ1対3および3対2の間で共通していた（表13）。6つのゲノム遺伝子座における染色体相互作用を使用した高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1のP C aの層別化は、67個のサンプルの盲検化コホートにおいて80%（C I 59.30%~93.17%）の感度および92%（C I 80.52%~98.50%）の特異度を示した（表15）。同様に、高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2に対する6マーカーセットを、84%（C I 63.92%~95.46%）の感度および88%（C I 65.29%~98.62%）の特異度を実証する43個のサンプルのより大規模で、より代表的なコホートで試験した（表16）。

【0246】

5つの一致する末梢血および原発腫瘍のサンプルを使用して、末梢循環で同定されたエピジェネティックマーカー（表13）を腫瘍組織と比較した。結果は、カテゴリ1対3およびカテゴリ2対3の層別化シングネチャの一部として血液中で検出された多数の調節解除マーカーが腫瘍組織で検出され得ることを示した（表14）。これは、全身的に検出することができる染色体相互作用が、腫瘍形成の原発部位において同じ条件下で検出することができたことを実証している。

【0247】

前立腺がんのタイムリーな診断は死亡率を低下させるために重要である。P C a に対するスクリーニングの欧州のランダム化研究では、定期的なP S Aスクリーニングを受けた男性のP C a死亡率が大幅に低下することが示されている。しかし、総合的なスクリーニングは臨床的に有意でない疾患の過剰診断につながり、低リスク疾患と高リスク疾患とを区別することができる新しい低侵襲検査が緊急に必要とされている。

【0248】

エピジェネティック分析アプローチは、このニーズに対処するための潜在的に強力な手段を提供する。検査のバイナリの性質（染色体ループが存在するか否か）および巨大な組み合わせ力（>1010の組み合わせが、スクリーニングされた~50,000のループで可能である）により、臨床的に十分に定義された基準に正確に適合するシングネチャを作成することが可能になり得る。P C aにおいて、低リスク対高リスクの疾患を識別したり、小さいが侵襲性の腫瘍を同定したり、最も適切な治療オプションを判定したりする。さらに、エピジェネティックな変化は腫瘍形成の初期に現れることが知られており、診断お

10

20

30

40

50

よび予後の両方に有用である。

【0249】

この研究では、P C aに対する非侵襲的血液ベースのエピジェネティックシグネチャの特有のバイオマーカーとして染色体コンフォメーションを同定し、検証した。データは、P C a患者にのみ存在するE T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3、およびC A S P 2の遺伝子の遺伝子座に安定したクロマチンループが存在することを実証している(表11)。20の盲検化サンプルの独立したセットにおけるこれらのマーカーの検証は、80%の感度および80%の特異度を示し(表12)、これはP C a血液検査で注目に値する。興味深いことに、これらの遺伝子のいくつかの発現は、すでに癌の病態生理に関連している。E T S 1はE T S転写因子ファミリーのメンバーである。E T S 1を過剰発現する前立腺腫瘍は、上皮間葉転換の細胞の遊走、侵入、および誘導の増加に関連している。M A P 3 K 1 4(核因子カッパベータ(N F - k β)誘導キナーゼ(N I K)としても知られている)は、M A P 3 K群(またはM E K K)のメンバーである。生理学的に、M A P 3 K 1 4 / N I Kは、特にM A P 3 K 1 4 / N I Kが過剰発現されているときに、非標準のN F - k β シグナル伝達を活性化し、標準のN F - k β シグナル伝達を誘導することができる。腫瘍細胞の侵入を促進するようにミトコンドリアのダイナミクスを制御するためのM A P 3 K 1 4 / N I Kの新しい役割が説明されてきた。S L C 2 2 A 3(有機カチオントランスポーター3(O C T 3)としても知られている)は、膜輸送タンパク質のS L C群のメンバーである。S L C 2 2 A 3発現はP C a進行に関連している。C A S P 2は、カスパーゼ活性化および動員ドメインの群のメンバーである。生理学的に、C A S P 2はオートファジーの内因性リプレッサーとして機能することができる。同定された遺伝子のうちの2つ(S L C 2 2 A 3およびC A S P 2)は、癌の進行と逆相関することが以前に示された。重要なことに、クロマチンループの存在は遺伝子発現に不確定な影響を与えかねない。

【0250】

P C a予後マーカーをスクリーニングするために、E p i S w i t c h(商標)カスタムアレイを実施して、低リスクP C a(分類1)および高リスクP C a(分類3)の患者の末梢血からのDNAの競合的ハイブリダイゼーションを分析した。B M P 6、E R G、M S R 1、M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1を含む、高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1に対する6マーカーセットを同定した。H S D 3 B 2、V E G F C、A P A F 1、M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1を含む、高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2に対する6つのバイオマーカーを同定した。これらのバイオマーカーのうち3つ(M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1)を、これらのセット間で共有した。データは、ステージ1および3での一致したP C a患者の原発腫瘍および血液における染色体コンフォメーション間の高い一致を示している(表14)。これらの遺伝子のいくつかの予後的有意性および診断的価値は以前に示唆されている。B M P 6はP C a骨転移において重要な役割を果たしている。E T S 1に加えて、E R Gは転写因子のE T Sファミリーのもう1つのメンバーである。圧倒的な証拠は、E R Gが、転移、上皮間葉転換、エピジェネティックな再プログラミング、および炎症を含む、P C aの進行に関連するいくつかのプロセスに関与していることを示唆している。M S R 1はP C aに中程度のリスクを与え得る。M U C 1は、ムチンファミリーに属する膜結合型糖タンパク質である。進行性P C aにおけるM U C 1の高発現は、有害な臨床病理学的腫瘍の特徴および結果不良に関連している。A C A T 1の発現は、高グレードおよび進行性のP C aで上昇し、生化学的無再発生存率の低下の指標として機能する。D A P K 1は、腫瘍抑制因子として、または異なる細胞に関する発癌性分子として機能し得る。H S D 3 B 2は、ステロイドホルモン合成において重要な役割を果たしており、有害な腫瘍表現型、アンドロゲン受容体シグナル伝達の増加、および早期の生化学的再発を特徴とするP C aの関連する画分でアップレギュレーションされる。V E G F CはV E G Fファミリーのメンバーであり、その発現の増加はP C a標本におけるリンパ節転移に関連している。包括的な生化学的アプローチでは、A P A F 1はアポトソームのコアとして説明されてきた。

【0251】

これらの遺伝子座の同定にもかかわらず、P B M Cにおける癌関連のエピジェネティック変化のメカニズムは未同定のままである。しかし、相互作用は全身的に検出することができ、腫瘍形成の原発部位において同じ条件下で検出され得る（表14）。したがって、変化を測定することができるようにするには、P B M Cにおけるクロマチンコンフォメーションを外部要因、おそらく、P C a腫瘍の細胞によって生成されたものによって指示しなければならない。染色体コンフォメーションのかなりの割合が、腫瘍特異的コンフォメーションを制御する非コードRNAによって制御されることが知られている。腫瘍細胞は、隣接細胞または循環細胞によって形質膜陥入され、それらの染色体コンフォメーションを変化させ得る非コードRNAを分泌することが示されており、この場合では制御因子の可能性はある。バイオマーカーとしてのRNA検出は依然として非常に困難であるが（低い安定性、バックグラウンドドリフト、統計的層別化分析に対する継続的な基盤）、染色体コンフォメーションシグネチャは、特に核内で試験したときに、バイオマーカー標的使用に対する十分に認識された安定したバイナリの利点を提供するが、これは、血漿中に存在する循環DNAが、無傷の細胞核に存在する3Dコンフォメーションのトポロジー構造を保持しないためである。対象の遺伝子座にわたるエピジェネティックな制御の並行経路を表す、複数の染色体コンフォメーションが存在する可能性があるため、1つの遺伝子座を見ることが1つのマーカーを見ることと等しくないことに言及することが重要である。P C a診断の現在の臨床診療における重要な課題の1つは、確定診断を行うのにかかる時間である。これまでのところ、P C aに対する単一の確定的な検査はない。高レベルのP S Aは、患者を不確実性の長い旅に導き、そこで、必要に応じて、磁気共鳴画像スキャンとそれに続く生検を受ける。生検は、P S A検査よりも信頼性があるが、癌病変の欠落が依然として問題となりかねない主な手順である。ここで説明される5セットのバイオマーカーパネルは、比較的安価で十分に確立された分子生物学技術（P C R）に基づいている。サンプルは、収集が簡単で、臨床医に数時間以内に迅速に利用可能な臨床読み出しを提供する生体液に基づいている。これにより順に、時間およびコストが大幅に節約され、P C aの断定的な診断のための現在のプロトコルにおけるギャップを埋める有益な診断判定が支援される。

【0252】

P C aのリスクを予測することは、治療オプションに関する十分な情報に基づいた判定を下すために極めて重要である。低リスク群の5年生存率は95%超であり、ほとんどの男性は低侵襲治療の恩恵を受ける。現在、P C aリスクの層別化は、循環P S A、腫瘍グレード（生検から）、および腫瘍ステージ（画像所見から）の組み合わせ評価に基づいている。簡単な血液検査を使用して同様の情報を導き出す能力によって、コストの大幅な削減を可能にし、診断プロセスをスピードアップする。P C a治療で特に重要なのは、最初は低リスクとして現れるが、その後、高リスクに進行する少数の腫瘍を同定することである。したがって、このサブセットは、より迅速でより根本的な介入の恩恵を受ける。

【0253】

結論として、ここでは、P C aの存在および予後を強く示唆している患者のP B M Cの染色体コンフォメーションのサブセットを同定した。これらのシグネチャによって、P C aに対する迅速な診断および予後の血液検査が開発される大きな可能性があり、これらは現在使用されているP S A検査の特異性を大幅に上回っている。好ましいマーカーおよび組み合わせは以下を含む：

－ E T S 1、M A P 3 K 1 4、S L C 2 2 A 3、およびC A S P 2。これは、以下のネステッドP C Rマーカーによる診断である：

－ B M P 6、E R G、M S R 1、M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1。これは予後シグネチャである（ネステッドP C Rマーカーによる高リスクカテゴリ3対低リスクカテゴリ1）：

－ H S D 3 B 2、V E G F C、A P A F 1、M U C 1、A C A T 1、およびD A P K 1。これは予後である（高リスクカテゴリ3対中リスクカテゴリ2）

【0254】

実施例5．DLBCLに関するさらなる研究

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）は、不均質な血液癌であるが、胚中心B細胞様（GCB）および活性化B細胞様（ABC）の2つの主要なサブタイプに広く分類することができる。GCBおよびABCのサブタイプは臨床経過が大きく異なり、ABCの生存予後ははるかに悪い。異なるサブタイプの患者も治療的介入に対して異なる反応を示すことが観察されており、実際、ABCおよびGCBが完全に別個の疾患と見なすことができる」と主張する人もいる。治療への反応のこの変動性のために、DLBCLサブタイプを判定するためのアッセイを有することは、既存の治療法の使用への臨床的アプローチを導く上で、また新薬の開発において重要な意味がある。DLBCLをサブタイプ化するための現在のゴールドスタンダードアッセイでは、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織に関する遺伝子発現プロファイリングを使用して、「起源の細胞」、したがって疾患のサブタイプを判定する。しかし、このアプローチには、1）生検を必要とする、2）複雑で費用と時間のかかる分析アプローチを必要とする、および3）すべてのDLBCL患者を分類しないという点で、いくつかの重大な臨床的制限がある。

10

【0255】

ここでは、エピゲノムアプローチを採用し、DLBCLサブタイプを同定するための血液ベースの染色体コンフォメーションシグネチャ（CCS）を開発した。118人のDLBCL患者からの臨床サンプルを使用した反復アプローチを採用して、疾患をサブタイプ化するための6つのマーカー（DLBCL-CCS）のパネルを定義した。その後、DLBCL-CCSの性能を、FFPE組織からの従来の遺伝子発現プロファイリング（GEX）と比較した。

20

【0256】

DLBCL-CCSは、既知のステータスのサンプルでのABCおよびGCBの分類において正確であり、分類子の開発に使用される発見コホートでの100%（60／60）サンプルで同一の呼び出しを提供した。また、評価コホートでは、DLBCL-CCSは、GEX分析で定義された中間サブタイプ（タイプIII）を有するサンプルの100%（58／58）でDLBCLサブタイプの呼び出しを行うことができた。最も重要なことに、これらの患者が疾患の経過全体を通して長期的に追跡された場合、Episwitch（商標）関連の呼び出しは、ABCおよびGCBのサブタイプに対する生存率の既知のパターンでより良好に追跡した。

30

【0257】

この研究は、DLBCLサブタイプを同定するための、単純で、正確で、費用効果が高く、臨床的に採用可能な血液ベースの診断が可能であるという初期の兆候を提供する。

【0258】

背景

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）は最も一般的なタイプの血液癌であり、さまざまな方法論を使用した多くの研究により、遺伝的および生物学的に不均質であることが実証されている。2つの主要なDLBCL分子サブタイプは、胚中心B細胞様（GCB）および活性化B細胞様（ABC）であるが、分子サブタイプのより詳細な定義も提案されている。これらの2つの主要なサブタイプは、劇的に異なる疾患経過を有し、ABCサブタイプの生存予後ははるかに悪いことが観察されているため、高度な臨床的関連性がある。おそらくより重要なことに、GCBおよびABC（または非GCB）のサブタイプを治療するための新規の治療薬が臨床現場で評価されるため、および選択されていない患者の全体的な奏効率が低いという歴史的観察により、治療の開始前に患者サブタイプを同定する差し迫った必要性がある。歴史的に、DLBCLサブタイプは「起源の細胞」（COO）を同定することによって判定される。元のCOO分類は、階層的クラスタリング分析によって、活性化された末梢血B細胞または正常な胚中心B細胞とのDLBCL遺伝子発現の観察された類似性に基づいていた（3）。全ゲノム発現プロファイリング（GEP）によるこのCOO分類によって、DLBCLを活性化B細胞様（ABC）、胚中心B

40

50

細胞様 (GCB)、およびタイプIIII (未分類) サブタイプに分類し、ABC-DLBC Lは予後不良および構成的NF- κ B活性化を特徴とする。それらの将来性のある研究において、WrightらはABCとGCB-DLBC Lとの間でそれらの発現が最も判別可能である27の遺伝子を同定し、COO分類のための線形予測スコア (LPS) アルゴリズムを開発した。これらの独自の研究は、全体的に新鮮凍結 (FF) リンパ腫組織の遡及的調査に基づいている。臨床診療におけるこのCOO分類の適用に関する主な課題は、定期的なホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 診断生検に適したロバストな臨床アッセイの確立であった。いくつかの研究では、定量的ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、Affymetrix HG U133 Plus 2.0プラットフォームまたはIllumina全ゲノムDAS Lassayを用いるGEP、およびNanoStringリンパ腫サブタイプ化試験 (LST) 技術を含む、mRNA発現の定量的測定によるFFPE組織を使用したDLBC LのCOO分類の可能性も調査した。GEPによるCOO分類を要約するために、いくつかの免疫組織化学的検査 (IHC) ベースのアルゴリズムも調査されてきた。概して、これらの研究は、FFPE組織を使用したDLBC LのCOO分類の高い信頼性およびABCサブタイプとGCBサブタイプとの間の全生存期間のロバストな分離を実証したが、再現性の問題、特にアッセイ間の一致の欠如に悩まされている。さらに、任意のIHCベースの測定はベースライン組織を必要とするが、これは常に利用可能ではなく、サンプル収集からアッセイの読み出しまでの現在のターンアラウンドタイムは長く、臨床現場での実施が困難である。

【0259】

DLBC Lをサブタイプ化するために歴史的に使用されてきたアプローチの中で、COO評価のための1つの方法は、Fluidigm BioMark HDシステムを使用して定量的逆転写PCR (qRT-PCR) によるFFPE組織からの27の遺伝子の発現を測定するアッセイを使用する。この方法論には既存の手法に比べていくつかの利点があるが、そのアプローチはそれでも、1) 組織生検を必要とする、2) 高価で、非標準かつ時間のかかる検査手順に依存するという点で、その臨床応用を制限するいくつかの大きな障害に直面している。このように、血液ベースのアッセイがあることで、臨床的適用性がエンリッチメントされたDCBC Lサブタイプ化のための簡単で、信頼性が高く、費用効果の高い方法を提供することにより当該分野は前進される。

【0260】

この研究では、ゲノムアーキテクチャの変化の検出に焦点を当てることによって、DLBC L患者においてCOO分類を判定するために新しい血液ベースのアッセイを使用した。エピジェネティックな制御フレームワークの一部として、ゲノム領域は、遺伝子発現を機能的に制御する方法として、それらの三次元構造を変更することができる。この制御メカニズムの結果は、異なるゲノム遺伝子座でのクロマチンループの形成である。これらのループの有無は、染色体コンフォメーションキャプチャ (3C) を使用して経験的に測定することができる。複数のゲノム領域は、安定した条件付きの長距離の染色体相互作用の形成を通じてエピスタシスの調節に貢献する。複数のゲノム遺伝子座での染色体コンフォメーションの集成的な測定は、結果として、染色体コンフォメーションシグネチャ (CCS)、またはその外部環境へのゲノム応答を反映する分子バーコードをもたらす。CCSの検出、スクリーニング、およびモニターには、CCSを検出するための確立された、高解像度および高スループットの方法論であるEpiSwitchプラットフォームを利用した。3Cに基づいて、EpiSwitchプラットフォームは、定義された遺伝子座でのクロマチン構造の変化、および長距離の非コードのシスおよびトランス制御相互作用を評価するために発展されてきた。患者の層別化にEpiSwitchを使用する利点の中には、そのバイナリの性質、再現性、比較的低いコスト、迅速なターンアラウンドタイム (サンプルは24時間以内に処理可能)、たった少量の血液 (~50 mL) の要件、およびPCRベースの検出方法のFDA標準でのコンプライアンスがある。したがって、染色体コンフォメーションは、細胞状態の安定したバイナリの読み出しを提供し、バイオマーカーの出現するクラスを表す。

【0261】

ここでは、染色体アーキテクチャの変化の評価に基づくアプローチを使用して、DLBC L C O O サブタイプ化に対する血液ベースの診断試験を開発した。DLBC L 患者からの血液サンプルにおけるゲノムアーキテクチャの変化の調査が、組織ベースの C O O 分類アプローチに代わる方法を提案し、臨床的意思判定および試験デザインを導くための新規で、非侵襲的で、より臨床的に適用可能な方法論を提供することができると仮定した。

【0262】

この研究では、合計で既知の C O O サブタイプを有する 118 人の DLBC L 患者および 10 人の健常対照 (H C) を使用した。サンプルは、進行性非ホジキンリンパ腫におけるリツキシマブとベバシズマブの第 I I I 相の、ランダム化した、プラセボ対照試験で収集されたサンプルのサブセットであった。簡潔には、新たに CD20 陽性 DLBC L と診断された 18 歳以上の成人患者を、R-CHOP または R-CHOP とベバシズマブ (R-A-CHOP) にランダム化した。60 人の DLBC L 患者から収集された血液サンプルを、CCS バイオマーカーリードを同定、評価、および改良するための開発コホートとして使用した。このコホートからの患者をすべて、高いサブタイプ固有の LPS (線形予測スコア) を有する高い/強い GCB (30) または ABC (30) として分類した。残りの 58 個の DLBC L サンプルには中間 LPS があり、Fluidigm 検査によって ABC、GCB、または未分類と判定された (図 25)。これらの患者サンプルを、CCS バイオマーカーの発見および開発には使用しなかったが、結果の分類子を評価するために後の段階で使用した。Fluidigm 検査を、リンパ節から得られた組織を使用して行い (パンチ生検として、または手術中に除去した)、EpiSwitch 分析を、治療を受ける前に患者から収集された一致した末梢全血を使用して行った。

【0263】

患者サンプルに加えて、12 個の細胞株 (6 個の ABC および 6 個の GCB) もバイオマーカースクリーニングの初期段階で使用し、ABC および GCB の疾患サブタイプを最適に区別することができる染色体コンフォメーションのセットを同定した (表 20)。細胞株を、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (ATCC)、ドイツ微生物細胞培養コレクション (DSMZ)、および公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (JHSF) から得た。

【0264】

RNA を、治療前の FFPE 生検から単離し、精製した。DLBC L サブタイプを、Wright のアルゴリズムを DLBC L サブタイプ予測子の 27 個の遺伝子を含むカスタム Fluidigm 遺伝子発現パネルからの発現データに適応することによって判定した。15 人の非試験被験体のコホートで Fluidigm qRT-PCR を Affymetrix データと比較することによる C O O アッセイの検証によって、使用した 19 の分類遺伝子にわたる一致した新鮮凍結 (FF) サンプルおよび FFPE サンプルからの qRT-PCR 測定値間の高い相関性が明らかになった。同じ FF サンプルからの Affymetrix マイクロアレイと Fluidigm qRT-PCR 測定値間の高い相関性も発見した。Fluidigm C O O アッセイからの qRT-PCR データから計算された分類遺伝子の重みは、独立した患者コホートにおける以前のマイクロアレイデータから得られた重みと非常に一致していた。Fluidigm アッセイに由来する LPS、FFPE 腫瘍におけるデータ、およびテクニカルレジストリコホートでの一致した FF 組織における Affymetrix マイクロアレイデータに由来する LPS の間の高い相関性 (76% の一致) を観察した。

【0265】

パターン認識アルゴリズムを使用して、長距離の染色体コンフォメーションを形成する可能性のある部位に対するヒトゲノムをアノテートした。パターン認識ソフトウェアは、ベイジアンモデリングに基づいて動作し、領域が長距離のクロマチン相互作用に関与しているという確率的スコアを提供する。97 個の遺伝子座からの配列 (表 21) をパターン認識ソフトウェアを介して処理して、DLBC L サブタイプを区別することができる可能

性が最も高い13, 322の染色体相互作用のリストを生成した。最初のスクリーニングでは、アレイベースの比較を行った。60merのオリゴヌクレオチドプローブを、これらの潜在的な相互作用を照合するように設計し、カスタムアレイとしてAgilent SureDesignのウェブサイトにアップロードした。各プローブは、EpiSwitchマイクロアレイ上に四つ組で存在した。潜在的なCCSを続いて評価するために、Primer3を使用して設計された配列特異的オリゴヌクレオチドを使用してネステッドPCR (EpiSwitch PCR) を実施した。オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド特異的BLASTを使用して特異度に関して試験した。

【0266】

DLBCLにおいて調節不全であると特定された上位10のゲノム遺伝子座を、タンパク質リストとしてCytoscapeにおけるReactome Functional Interaction Networkのプラグインにアップロードして、DLBCLにおけるエピジェネティックな調節不全のネットワークを生成した。10個の遺伝子座をまた、900万を超える既知の予測されたタンパク質間相互作用を含むデータベースである、STRING (相互作用する遺伝子/タンパク質DBの取得のための検索ツール) (<https://string-db.org/>) にアップロードした。ヒトの相互作用のみに制限して、メインネットワーク (つまり、接続されていないノードを除外した) を生成した。上位の偽発見率 (FDR) を修正した機能的エンリッチメントを、遺伝子オントロジー (GO) および京都遺伝子ゲノム百科事典 (KEGG) データベースによって同定した。上位10のゲノム遺伝子座も、KEGG Pathway Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) にアップロードして、DLBCLにおける調節不全を示す特異的な生物学的経路を同定した。

【0267】

直接検定およびフィッシャー直接検定 (カテゴリ変数に関する) を使用して、判別力のあるマーカーを同定した。統計学的有意性のレベルを $p \leq 0.05$ に設定し、すべての試験を両側で行った。ランダムフォレスト分類子を使用して、DLBCLサブタイプを同定するEpiSwitchマーカーの能力を評価した。長期生存分析を、R (38) でのsurvival およびsurvminerのパッケージを使用して Kaplan-Meier 分析によって行った。平均生存時間を両側t検定を使用して計算した。

【0268】

DLBCLサブタイプを区別することができるCCSバイオマーカーパネルを発見して検証するための段階的なアプローチを採用した (図19)。EpiSwitch分類子の発見の第1の工程として、97の遺伝子座 (表21) を、染色体コンフォメーション相互作用部位の予測される存在のために選択して、アノテートし、EpiSwitch CGH Agilentアレイを使用してそれらの経験的存在のためにスクリーニングした。アノテートしたアレイの設計は、13, 322の染色体相互作用候補を表し、平均で99の別個のシス相互作用を各遺伝子座で試験した (99 ± 64 ; 平均 $\pm$ SD)。この発見アレイを使用して、2つの主要なDLBCLサブタイプを区別することができる染色体コンフォメーションのより小さなプールをスクリーニングおよび同定した。この工程で使用したサンプルは、GCBおよびABCの細胞株 (表20)、および4人の分類されたDLBCL患者 (2のGCBおよび2のABC) および4人のHCからの全血からのものであった。細胞株を、遺伝子発現分析に基づいて高ABCおよびGCBと低ABCおよびGCBにグループ分けした。アレイで使用した比較は次の通りであった: 1) DLBCL患者とプールされたHCの比較、2) プールされたDLBCLサンプルとプールされたHCサンプルの比較、3) プールされた高GCB細胞株とプールされた高ABCの比較、および4) プールされた低ABCとプールされた低GCB細胞株の比較。

【0269】

アレイ分析から、高ABC細胞株とGCB細胞株とを区別し、DLBCL患者からの血液サンプルには存在するが、HCには存在しない、1, 095の統計学的に有意な染色体相互作用を同定した。これらを、統計フィルタのセットを使用して上位293の相互作用

10

20

30

40

50

にさらに減らし、そのうち151をABCサブタイプに関連付け、143をGCBサブタイプに関連付けた。60個の分類されたDLBCL患者サンプルに対するEpiSwitch PCRプラットフォームを使用したさらなる改良のために、いずれかのサブタイプからの上位72の相互作用（ABCに関しては36の相互作用、GCBに関しては36の相互作用）を選択した。118個のDLBCLサンプルすべてに関して、初期のサブタイプ分類を、27個の遺伝子のパネルの発現から線形予測スコア（LPS）を計算するWrightアルゴリズムに基づいて割り当てた。60個のサンプルを、ABCまたはGCBのいずれかに分類し、EpiSwitch分類子の開発に使用し（「発見コホート」）、58個のサンプルは中間LPSスコアであり、これらをEpiSwitch分類子のパフォーマンスの評価に使用した（「評価コホート」）（図19）。

10

【0270】

最初のスクリーニングで同定された72の相互作用を、発見工程中のDLBCL患者サンプルと12のHCとともに60のDLBCL分類された（30のABCおよび30のGCB）患者サンプルの第2のコホートの両方を使用してより小さなプールに絞り込んだ（図19）。EpiSwitchアッセイによって行われたDLBCLサブタイプの呼び出しを、Fluidigmプラットフォームを使用して確認した。Fluidigm遺伝子発現分析を組織生検サンプルで実行した一方で、同じ患者からの全血をEpiSwitch PCRアッセイに使用した。精製の最初の工程では、最初のスクリーニングで同定された72の染色体相互作用が、DLBCLに特異的であり、HCサンプルには存在しないことをPCRによって確認した。これを、最初に6つの分類されていないDLBCLサンプルと2つのHCで試験し、結果としてDLBCLに特異的な21の相互作用を同定した。次に、EpiSwitch PCRを使用して、分類されたDLBCL患者サンプル（12のABCおよび12のGCB）からの24の血液サンプルを試験し、フィッシャー直接検定を使用してDLBCLに特異的な染色体相互作用を同定した。これによって、結果として、ABCサブタイプとGCBサブタイプとを正確に区別することができる10の判別力のある染色体コンフォメーション相互作用のセットが得られ、これらを36個のDLBCLサンプル（18のABCおよび18のGCB）の追加のセットからの血液サンプルに関してさらに評価した（図19）。

20

【0271】

10マーカーパネルの精度、パフォーマンス、およびロバスト性を試験するために、完全なサンプルコホートの80%（合計48個のサンプル：24のABCおよび24のGCB）に関する特徴選択のための直接検定を使用し、残りの20%（12のサンプル、6のABCおよび6のGCB）を最終的に選択されたCCSマーカーの後の試験に使用した。データを10回分割し、各分割の80%のトレーニングセットを使用して分割の各々に対して直接検定を実行した。その後、10分割にわたる10マーカーに対する複合p値を使用して、マーカーをランク付けした。この分析により、IFNAR1、MAP3K7、STAT3、TNFRSF13B、MEF2B、およびANXA11の遺伝子座における6つの染色体コンフォメーションを同定した。まとめると、これらの6つの相互作用により、DLBCL染色体コンフォメーションシグネチャ（DLBCL-CCS）が形成された（図20）。

30

40

【0272】

DLBCL-CCSにおける6つのマーカーを、ランダムフォレスト分類子モデルを作成するために使用し、既知の疾患サブタイプの発見コホートにおけるデータ分割の各々に対する試験セット（12のサンプル、6のABCおよび6のGCB）を分類するように適用した。主成分分析（PCA）により、DLBCL-CCS分類子はABCおよびGCBの患者を健常対照から分離することができた（図26）。DLBCL-CCSに対する複合予測確率は、ロジスティック回帰を使用して生成された各マーカーに対するオッズ比およびモデルに対するオッズ比とともに表22に示される。モデルは、0.186から0.81の範囲のABCおよびGCBに対する予測確率スコアを提供した（0=ABC、1=GCB）。正しい分類に対する確率カットオフ値を、ABCに対して0.30以下、GCB

50

Bに対して0.70以上に設定した。0.30以下のスコアは100%の真の陽性率（感度）（95%の信頼区間〔95%のCI〕88.4～100%）であり、一方で0.70以上のスコアは96.7%の真の陰性奏効率（特異度）（95%のCI 82.8～99.9%）であった。DLBCL-CCS分類子を用いると、サブタイプ化に対するFluidigm呼び出しと比較して、60人の患者のうち60人（100%）がABCまたはGCBとして正しく分類された（図21A、表22）。このサンプルコホートでのDLBCL-CCS分類子に対する受信者動作特性（ROC）曲線下のAUCは1であった（図21B）。最後に、DLBCL-CCSによって行われたDLBCLサブタイプの呼び出しを、既知の疾患サブタイプの患者の長期生存曲線と比較した。ABCとして呼び出しされた患者は、GCBとして呼び出しされた患者よりも著しく悪い生存率を示した（図21C）。

10

【0273】

次に、より中間のLPS値を有する58人のDLBCL患者のDLBCL-CCS評価コホートのパフォーマンスを評価した。DLBCL-CCSを適用して、これらの患者をDLBCLサブタイプに割り当て、読み出し値をFluidigmによって作成された読み出し値と比較した。DLBCL-CCSが58個のサンプルすべてに対してサブタイプ化の呼び出しを行い、一方でFluidigmアッセイは37個のサンプルに対してサブタイプ化の呼び出しを行い、21個を「未分類」として残した（図22）。両方のアッセイに対するサブタイプの呼び出しが利用可能である37のサンプルのうち、15のサンプル（40%）を両方のアッセイによって同様に呼び出した（8のABCおよび7のGCB）（図22）。次に、診断時に行われたサブタイプの呼び出しをタイプIII患者の長期生存曲線と比較することによって、DLBCL-CCSおよびFluidigmによって行われたDLBCLサブタイプ呼び出しのパフォーマンスを評価した。図23のカプラン・マイヤー生存曲線に示されているように、DLBCL-CCSによって行われたABC/GCB呼び出しは、DLBCLにおける既知の生存傾向に基づいて2つの集団を分離することができ、ABCサブタイプは予後不良であった。対照的に、Fluidigmによって定義されたABCおよびGCBの集団は、臨床的に観察されてきたものとは反対のものであり、ABCとして分類されたサンプルはGCBとして分類されたサンプルよりも生存期間が長かった。統計学的に有意ではないが、DLBCL-CCSによって行われたサブタイプの呼び出しは、ハザード比分析によるサブタイプ間の生存率の違いの過去の臨床観察と一致した。2つの方法間で平均生存時間の有意差が見つかった。FluidigmによってABCおよびGCBとして分類された患者の平均生存期間は、それぞれ、651日および626日であり（ $p=0.854$ ）、一方でDLBCL-CCSアッセイによってABCおよびGCBとして分類された患者の平均生存期間は、550日および801日であった（ $p=0.017$ ）（図24）。

20

30

【0274】

この研究でエピジェネティックに調節不全であることが観察された遺伝子座と、DLBCLに関連すると以前に報告された生物学的メカニズムとの間の関連性を調査するために、上位10の調節不全の遺伝子座を入力として使用して一連のネットワークおよび経路分析を実施した。まず、CytoscapeにおいてReactome Functional Interaction Networkを構築することによって、これらの遺伝子座が生物学的にどのように関連しているかを調査し、これによって、NFKB1、STAT3、およびNFATC1を中心とするネットワークを明らかにした。STRING DBを使用してネットワークを構築するために10個の遺伝子座が使用された場合にも同様の状況が浮かび上がり、最も接続されたハブはNFKB1、STAT3、MAP3K7、およびCD40を中心としていた。生物学的プロセスに関する上位のエンリッチメントされたGO用語は「転写の正の制御、DNAテンプレート」であり、分子機能に関する上位のエンリッチメントされたGO用語は「転写活性化因子の活性、RNAポリメラーゼII転写制御領域配列特異的な結合」であり、および「トール様受容体シグナル伝達経路」は最もエンリッチメントされたKEGG経路であった（表22）。上位10の遺伝子座をK

40

50

E G G トール様受容体シグナル伝達経路にマッピングすると、N F - κ B およびインターフェロン媒介性の J A K - S T A T シグナル伝達カスケードを介した炎症性サイトカインおよび共刺激分子の産生に関連する特異的なカスケードを発見した。

【0275】

異なる D L B C L サブタイプに関する疾患の進行に違いが観察されるため、A B C と G B C の疾患サブタイプを区別することができる簡単で信頼性の高い検査が臨床的に急務となっている。疾患の侵襲性を考慮すると、D L B C L は即時の治療を必要とする。2つの主要なサブタイプは異なる臨床管理パラダイムを有し、特異的なサブタイプを標的とする開発中のいくつかの治療法を用いて、迅速かつ正確な疾患診断を行うことが、臨床管理が疾患サブタイプの知識に依存する場合に重要である。D L B C L における C O O 分類の分野は、I H C ベースの方法論から D N A マイクロアレイ、並列定量的逆転写 P C R (q R T - P C R)、およびデジタル遺伝子発現にまで拡大している。現在好まれている方法は、F F P E 組織に対する G E P による C O O の同定に基づいており、臨床現場でのその幅広い採用を制限するいくつかの技術的なおよびロジスティック上の制限に悩まされている。さらに、F F P E 組織に対する G E P による C O O 分類のパフォーマンスおよび信頼性に影響を与える多くの要因が存在し、これらは、リンパ腫標本の性質／品質、データ収集のための実験方法、データの正規化および変換、使用される分類子のタイプ、およびサブタイプの割り当てに使用される確率カットオフを含む。最後に、F l u i d i g m アプローチを使用してサンプル収集から最終読み出しに移行することは、パフォーマンスの変動をもたらす可能性がある多くの工程間の複雑で時間のかかるプロセスである。これらの要因はすべて、アッセイの全体的なターンアラウンドタイムに影響を与え、既存の薬剤を使用した疾患の診断およびその治療の通知に加えて、新規の D L B C L 治療法の後期試験に対する患者の選択に臨床的にも使用することができる方法を制限する。したがって、D L B C L サブタイプを区別するための単純で、低侵襲性であり信頼性の高いアッセイが必要とされている。

【0276】

段階的な発見アプローチを使用して、D L B C L サブタイプを正確に区別することができる6マーカーのエピジェネティックバイオマーカーパネル、D L B C L - C C S を同定した。遺伝子発現シグネチャに由来するサブタイプの結果と比較すると、完全な一致があり、分類子の開発に使用されたサンプルであったため、これは予想されていた。中間 L P S を有するサンプルに適用したときの2つのアッセイ間の一致は低かった(たった40%超)。これはおそらく、分類方法が異なる D L B C L サブタイプの呼び出しに全体的な一致を欠いていることが言及されているため予測されるものであり、タイプ I I I のサンプルは、おそらく、そもそもより中間的な生物学を反映している不均質な集団である。しかし、疾患が進行するにつれて長期的に追跡されたタイプ I I I の D L B C L 患者における E p i S w i t c h アッセイの予測分類能力を評価したとき、E p i S w i t c h アッセイを使用した疾患サブタイプのベースライン予測は、未分類の疾患を有する患者で観察された生存曲線に基づいて実際の疾患サブタイプを予測するのに良好であった。ここで使用される制御3Dゲノミクスに基づくエピジェネティックな読み出しが、転写ベースのゴールドスタンダード分子アプローチよりも実際の臨床転帰と一致しているという観察結果は、D L B C L の管理における作用し得る進歩を表している。これはまた、腫瘍学的状態の表現型の違いに密接に関連する分子モダリティとして制御3Dゲノミクスのシステム生物学的評価とも一致している。D L B C L が生物学的連続体上で動作し、サブタイプ間の疾患生物学に有意な異質性があることに留意する。設計上、D L B C L - C C S を、タイプ I I I のサンプルを A B C または G C B いずれかのサブタイプに分類するように設定した。G E X 分析により、タイプ I I I のサンプルを、中間のサブタイプの生物学を有していると同定され、そのため、患者のより不均質な集団を表し得る。しかし、D L B C L - C C S が、G E X ベースのアプローチを使用するよりも臨床進行によって測定される疾患サブタイプのより良好な予測因子であること、および E p i S w i t c h アッセイがすべてのサンプルでサブタイプの呼び出しを行うことができたという事実の全体的な観察結果は

10

20

30

40

50

、このアプローチが、予後の見通しについて通知する、治療の判定を誘導し得る、および現在開発中の新規の治療薬への反応に対する予測を提供するように臨床現場で適用することができることの最初の兆候を提供している。

【0277】

ネットワーク分析では、NF- κ BおよびSTAT3シグナル伝達カスケードが、DLBCLサブタイプを区別する推定メディエータとして出現した。DLBCLにおけるNF- κ Bシグナル伝達の役割は以前に研究されており、実際、ABCサブタイプの判別機能の1つは、NF- κ B標的遺伝子の構成的発現であり、これは、これらの患者の予後不良に対して仮説が立てられているメカニズムである。さらに、構成的シグナル伝達活性化を引き起こす変異は、TNFAIP3およびMYD88を含むいくつかのNF- κ B経路遺伝子のABCサブタイプで主に観察されている。

10

【0278】

DLBCLの既知のメカニズムを検証することに加えて、ここでのネットワーク分析は、DLBCLにおける治療的介入に対する新規の潜在的なターゲットを同定した。例えば、カルシウムによって制御されたリン脂質結合タンパク質であるANXA11は、結腸直腸癌、胃癌、および卵巣癌などの他の腫瘍学的疾病に関与しており、DLBCLにおける新規の治療的介入ポイントとなり得る。

【0279】

ここで説明するDLBCLサブタイプ化へのアプローチの主な臨床的利点の1つは、簡素化された検査方法およびワークフローにある。GEPによる従来のゴールドスタンダードのサブタイプ化は、さまざまな商用プラットフォームを使用して行うことができるが、すべては概して以下の4段階のアプローチに従う（およびこれらを必要とする）：1）組織生検の取得、2）FFPE組織切片の調製、3）遺伝子発現分析、および4）サブタイプのアルゴリズムによる分類。拡大した末梢リンパ節の細針組織生検を得るには、入院患者が臨床現場を訪れ、麻酔を必要とする侵襲的な医療処置を受ける必要とする。それを得ると、パラフィン包埋のために新鮮な生検を準備する必要がある。これは多段階のプロセスであるが、概して、液体固定剤（ホルマリンなど）を検体全体に浸透させるのに十分な時間の浸漬、エタノール勾配を介する連続的な脱水、およびその後の有毒化学物質であるキシレンでの透明化を伴う。最後に、生体試料は、パラフィンワックスで浸潤され、放冷して固化させる必要があり、ミクロトームを使用してマイクロメートルの切片に切断され、実験用スライド上に取り付けられ得る。新鮮な組織からスライド上のFFPEセクションに移動させるプロセス全体には、数日かかり得る。次に、遺伝子発現分析を行うために、本質的に不安定なRNAを、スライドに取り付けられた組織切片から抽出し、アレイの製造元の仕様に従ってマイクロアレイへのハイブリダイゼーションのために調整し、このプロセスは1日を越え得る。マイクロアレイハイブリダイゼーションに続いて、相対的な遺伝子発現レベルのデジタル読み出し値が得られ、分類アルゴリズムに供給され、DLBCLサブタイプを判定する。総じて、DLBCLが疑われる患者からサブタイプの読み出しに移行するプロセスには、最大1週間以上かかる場合があり、高価なテクノロジーを使用した多くのさまざまな実験工程が含まれ、その各々が途中で実験の可変性をもたらす可能性がある。ここで説明するアプローチでは、生体液の収集からサブタイプの読み出しまでの時間と工程数が劇的に減少する。DLBCLが疑われる患者は、定期的な少量（～1 mL）の採血のために外来診療所に来院することができる。その後、新鮮な凍結血液を、この研究で同定された染色体コンフォメーションの有無の分析のために中央の認定された参考検査室に送ることができ、これは、サンプルを受け取ってから24時間以内に簡潔で定期的なPCR計測を使用して染色体コンフォメーションを検出するために、特異的なPCRプライマーセットおよび反応条件とともに入力としてさらに少量（～50 mL）の全血を使用するプロセスである。ここで説明するDLBCLサブタイプ化へのアプローチは、提案された方法論を使用したさらなる改良の可能性が存在するという追加の利点を提供する。この研究では、分類子を構成する染色体コンフォメーションを検出するために、ネステッドPCR反応のセットを使用してDLBCL-CCSの最終的な読み出しが行われ

20

30

40

50

た。このPCRベースの出力は、定量PCRを読み出しとして利用し、参考検査室および検査場所にわたる実験の再現性および信頼性を高めるように設計された、定量リアルタイムPCR実験(MIQE)ガイドラインの公開のための最小限の情報の下で動作するようにさらに改良することができる。最後に、ここで説明するアプローチは、さまざまな生理学的に不均質な形態など、疾患自体の発展する理解に適応可能である。

【0280】

結論として、ここでは、EpiSwitch CCS読み出しを使用して全血サンプルからの非侵襲的COO割り当てのためのロバストな補完的方法を開発した。DLBCL患者の大規模コホートでのこの分類アプローチの臨床的妥当性を実証した。EpiSwitchプラットフォームには、臨床的有用性を有するバイオマーカーモダリティとしていくつかの魅力的な特徴がある。CCSは、非常に高い生化学的安定性を有し、非常に少量の血液(典型的に約50μl)を使用して検出することができ、検出には確立された実験方法および標準的なPCR読み出し(MIQE準拠のqPCRを含む)を利用する。最終的に、EpiSwitchアッセイの迅速なターンアラウンドタイム(~8-16時間)は、Fluidigmプラットフォームに対する48時間以上と比べて遜色ない。

【0281】

実施例6イヌのDLBCLに関するさらなる研究

ここでは、EpiSwitch(商標)プラットフォーム技術を使用して、イヌのびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)を検出するためのバイオマーカーとして染色体コンフォメーションシグネチャ(CCS)を評価した。EpiSwitch(商標)によってヒトDLBCL患者において以前に特徴付けられた確立された全身性の液体細胞診バイオマーカーが、相同免疫病を有する犬に変換されるかどうかを調査した。ヒトから犬へのCCSのオルソログスな配列変換を、対照およびリンパ腫のイヌのコホートで最初に検証し、妥当性を確認した。

【0282】

DLBCLの犬および明らかに健康な犬から血液サンプルを得た。DLBCLと診断された犬はすべて、LICKingリンパ腫治験の一部であった。血液サンプルを、治療を開始する前、および実験的介入の+5日後、しかしドキシソルビン化学療法を開始する前に、各犬から得た。EpiSwitch技術を使用して、CCSに対する全身的なエピジェネティックバイオマーカーをモニターした。

【0283】

11マーカー分類子を、ヒトDLBCLで同定された75のEpiSwitch CCSのプールから、28匹の犬、すなわちDLBCLと診断された14匹および明らかな疾患のない14匹の対照からの全血で生成した。開発された診断マーカーの検証を、10匹の犬、すなわちDLBCLを有する5匹および5匹の対照の第2のコホートで実施した。分類子は、第2のコホートでの80%の精度、80%の感度、80%の特異度、80%の正の予測値(PPV)および80%の負の予測値(NPV)でDLBCL対非DLBCLに対する層別化をもたらした。

【0284】

確立されたEpiSwitch分類子は、通常は遺伝子マーカーに起因する特徴を備えたエピジェネティックな調節解除の強力な全身性のバイナリマーカーを含み、これらの分類マーカーのバイナリステータスは診断にとって統計学的に有意である。

【0285】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5. a

	プローブ	遺伝子座	総プローブ数
1	STAT3_17_40446029_40448202_40557923_40558616_RR	STAT3	1108
2	ANXA11_10_81889664_81892389_81927417_81929312_FR	ANXA11	136
3	CD40_20_44739847_44744687_44767157_44770555_FR	CD40	148
4	IFNAR1_21_34696683_34697716_34777569_34779811_RF	IFNAR1	80
5	MAP3K7_6_91275515_91285706_91312237_91314731_FF	MAP3K7	308
6	MEF2B_19_19271977_19273500_19302232_19303741_RF	MEF2B	448
7	MLLT3_9_20556478_20560948_20658310_20666368_FF	MLLT3	120
8	NFATc1_18_77133931_77135912_77218993_77220063_RF	NFATc1	608
9	NFKB1_4_103425293_103430397_103512508_103516923_FR	NFKB1	96
10	TNFRSF13C_22_42302849_42305750_42342568_42346797_FR	TNFRSF13C	488
11	BAX_19_49421750_49425644_49457303_49458439_RF	BAX	92
12	BCL6_3_187438677_187439687_187454088_187455426_FF	BCL6	240
13	IL22RA1_1_24467543_24471444_24512238_24513959_RF	IL22RA1	48
14	TNFRSF13C_22_42313974_42315085_42342568_42346797_RR	TNFRSF13C	488
15	FOXO1_13_41184194_41191166_41219134_41220693_FR	FOXO1	308
16	HLF_17_53402207_53403714_53420274_53422428_FF	HLF	104
17	PAK1_11_77028527_77036211_77090325_77094591_RF	PAK1	180
18	FOS_14_75744954_75746643_75795718_75799884_FF	FOS	80
19	MTHFR_1_11807586_11814341_11843522_11845650_RF	MTHFR	52
20	WNT9A_1_228068849_228075473_228135088_228140421_RR	WNT9A	40
21	NFATc1_18_77229964_77232215_77280170_77283702_FR	NFATc1	608
22	BRCA1_17_41162341_41168331_41242678_41245761_RR	BRCA1	297
23	TET2_4_106047220_106052671_106063962_106067377_FF	TET2	104
24	TNF_6_31525914_31529267_31542458_31544282_RF	TNF	68
25	NFATc1_18_77158863_77160420_77229964_77232215_FF	NFATc1	608
26	BCL6_3_187454088_187455426_187484009_187486420_FF	BCL6	240
27	MAPK13_6_36066232_36072387_36102587_36105090_FR	MAPK13	44
28	MLLT3_9_20319606_20322797_20621547_20622617_FR	MLLT3	120
29	TOP1_20_39656117_39657610_39725920_39729106_FR	TOP1	164
30	IFNAR1_21_34696683_34697716_34717312_34717993_RF	IFNAR1	80
31	SKP1_5_133465952_133470062_133512403_133513591_RR	SKP1	136
32	FZD10_12_130601147_130601992_130676699_130678204_FR	FZD10	124
33	ITGA5_12_54787051_54795949_54806686_54808428_FR	ITGA5	80
34	TNFRSF13B_17_16842268_16844133_16924802_16926550_RR	TNFRSF13B	128
35	BCL6_3_187438677_187439687_187454088_187455426_RR	BCL6	240
36	ITPR3_6_33600698_33604388_33678436_33680494_RR	ITPR3	100
37	MAP3K7_6_91275515_91285706_91312237_91314731_FF	MAP3K7	308
38	IFNAR1_21_34696683_34697716_34777569_34779811_RF	IFNAR1	80
39	NFATc1_18_77156086_77157023_77218993_77220063_RF	NFATc1	608
40	PRDM1_6_106483435_106485826_106500642_106506822_RF	PRDM1	120

10

20

30

40

50

41	IL-2RB_22_37532051_37533547_37544442_37546723_FR	IL-2RB	72
42	STAT3_17_40446029_40448202_40557923_40558616_RR	STAT3	1108
43	NFKB1_4_103405171_103418579_103512508_103516923_FR	NFKB1	96
44	CABLES1_18_20774415_20775705_20863570_20868210_RF	CABLES1	136
45	JDP2_14_75883183_75893682_75936165_75936958_FF	JDP2	80
46	NFATc1_18_77133931_77135912_77218993_77220063_RF	NFATc1	608
47	CASP3_4_185504966_185506889_185543536_185552493_FR	CASP3	88
48	REL_2_61074693_61075565_61108479_61109187_FR	REL	92
49	BTK_X_100610457_100612966_100667570_100670929_RF	BTK	404
50	BCL2A1_15_80256742_80257692_80285499_80286865_RR	BCL2A1	302
51	TNFRSF13C_22_42302849_42305750_42318166_42319783_FF	TNFRSF13C	488
52	CDKN2C_1_51402271_51403526_51439728_51440611_RR	CDKN2C	72

10

表5. b

	有意な プローブ数	HyperG_Stats	FDR_HyperG	パーセント 有意性
1	615	0.000000000125197189743782	0.0000000113929442666842	55.51
2	83	0.000391435	0.005936759	61.03
3	64	0.802231212	0.999999997	43.24
4	34	0.79036009	0.999999997	42.5
5	113	0.999793469	0.999999997	36.69
6	216	0.227265083	0.590889215	48.21
7	39	0.999297311	0.999999997	32.5
8	213	0.999999997	0.999999997	35.03
9	27	0.999920864	0.999999997	28.12
10	280	0.000000444123116904245	0.0000202076018191431	57.38
11	61	0.0000870841188293703	0.001584931	66.3
12	86	0.999659646	0.999999997	35.83
13	14	0.995140179	0.999999997	29.17
14	280	0.000000444123116904245	0.0000202076018191431	57.38
15	148	0.294116072	0.669114065	48.05
16	44	0.824486728	0.999999997	42.31
17	89	0.224299285	0.590889215	49.44
18	31	0.931715515	0.999999997	38.75
19	30	0.066847306	0.221674157	57.69
20	21	0.267230575	0.639946904	52.5
21	213	0.999999997	0.999999997	35.03
22	173	0.0000217239097176038	0.000658959	58.25
23	58	0.033733587	0.145711753	55.77
24	18	0.999770934	0.999999997	26.47
25	213	0.999999997	0.999999997	35.03

20

30

40

50

26	86	0.999659646	0.999999997	35.83
27	18	0.81000526	0.999999997	40.91
28	39	0.999297311	0.999999997	32.5
29	71	0.808882973	0.999999997	43.29
30	34	0.79036009	0.999999997	42.5
31	72	0.072624208	0.221674157	52.94
32	43	0.996927827	0.999999997	34.68
33	40	0.293962898	0.669114065	50
34	76	0.002030583	0.01918923	59.38
35	86	0.999659646	0.999999997	35.83
36	48	0.409333853	0.903779884	48
37	113	0.999793469	0.999999997	36.69
38	34	0.79036009	0.999999997	42.5
39	213	0.999999997	0.999999997	35.03
40	47	0.9542933	0.999999997	39.17
41	24	0.991079692	0.999999997	33.33
42	615	0.000000000125197189743782	0.0000000113929442666842	55.51
43	27	0.999920864	0.999999997	28.12
44	59	0.784673088	0.999999997	43.38
45	36	0.639258785	0.999999997	45
46	213	0.999999997	0.999999997	35.03
47	39	0.688804514	0.999999997	44.32
48	30	0.997411174	0.999999997	32.61
49	182	0.722716922	0.999999997	45.05
50	166	0.00150308	0.01918923	54.97
51	280	0.000000444123116904245	0.0000202076018191431	57.38
52	30	0.821366544	0.999999997	41.67

表5. c

	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値
1	0.102545415	0.102545415	2.181691533	0.06115714	0.124690581
2	0.146814815	0.146814815	3.078806942	0.015395162	0.044697142
3	0.247739738	0.247739738	4.372950932	0.002449301	0.012749359
4	0.098641538	0.098641538	1.475225491	0.178893946	0.27926686
5	0.098390923	0.098390923	2.270415909	0.053292308	0.112564482
6	0.246810388	0.246810388	5.953590771	0.000359019	0.0048119
7	0.194400918	0.194400918	2.492510608	0.037760627	0.086786653
8	0.117865744	0.117865744	1.424258285	0.19268713	0.295560888
9	0.253919456	0.253919456	1.95465634	0.086862876	0.161472968
10	0.210247736	0.210247736	2.234440593	0.056352274	0.11719604

10

20

30

40

50

11	-0.050897988	-0.050897988	-0.745725763	0.477453286	0.587468355
12	-0.030722825	-0.030722825	-1.143761644	0.28622615	0.400334573
13	-0.019224434	-0.019224434	-0.418322829	0.686861761	0.767615441
14	-0.014186527	-0.014186527	-0.069260125	0.946505227	0.961540839
15	-0.010289959	-0.010289959	-0.21611469	0.834379395	0.881581711
16	0.007162022	0.007162022	0.173838071	0.866368809	0.905364254
17	0.008581354	0.008581354	0.16838944	0.870512196	0.90817036
18	0.009594682	0.009594682	0.192008457	0.852583784	0.895087864
19	0.013062105	0.013062105	0.2898133	0.779427179	0.840001078
20	0.027459614	0.027459614	0.78838239	0.453500365	0.565397223
21	0.0309953	0.0309953	0.401906143	0.698417087	0.776651512
22	0.03119071	0.03119071	0.46421066	0.655032665	0.743235083
23	0.031952076	0.031952076	0.423263408	0.683401141	0.76482198
24	0.036397064	0.036397064	1.012029864	0.341541187	0.45879384
25	0.036449121	0.036449121	0.881245015	0.404223195	0.519301224
26	0.039792262	0.039792262	1.09873788	0.304267251	0.419987316
27	0.044981037	0.044981037	0.742965178	0.479031667	0.588704315
28	0.048157816	0.048157816	1.006274544	0.344135022	0.461283259
29	0.05692752	0.05692752	0.774540503	0.461182853	0.572336767
30	0.068999319	0.068999319	1.087503347	0.308907593	0.424307342
31	0.073674257	0.073674257	1.37062465	0.208203798	0.314180912
32	0.07496163	0.07496163	1.975529647	0.084116625	0.157842633
33	0.077618589	0.077618589	1.073493376	0.314772637	0.430505827
34	0.080234671	0.080234671	1.659676531	0.136077489	0.226348123
35	0.090602356	0.090602356	2.111185324	0.068216955	0.135104089
36	0.098319301	0.098319301	1.04377977	0.327501414	0.444140656
37	0.098390923	0.098390923	2.270415909	0.053292308	0.112564482
38	0.098641538	0.098641538	1.475225491	0.178893946	0.27926686
39	0.099162732	0.099162732	1.292936726	0.232594904	0.342880489
40	0.101277922	0.101277922	1.410506969	0.196565747	0.3002884
41	0.101676827	0.101676827	1.927111422	0.090619506	0.166768298
42	0.102545415	0.102545415	2.181691533	0.06115714	0.124690581
43	0.103364871	0.103364871	1.06297419	0.319233722	0.435153018
44	0.106978686	0.106978686	1.092750486	0.30673336	0.422367497
45	0.116604657	0.116604657	2.102936835	0.06909355	0.136425239
46	0.117865744	0.117865744	1.424258285	0.19268713	0.295560888
47	0.12582798	0.12582798	4.245528735	0.002904342	0.014151256
48	0.125971304	0.125971304	1.693676294	0.129294906	0.217785184
49	0.127634089	0.127634089	5.070996787	0.001004634	0.007593027
50	0.132678146	0.132678146	2.405792667	0.043193622	0.095959776
51	0.141794844	0.141794844	2.06833857	0.072892271	0.142181615
52	0.143309126	0.143309126	2.511399626	0.036672127	0.085032085

10

20

30

40

50

表5. d

	B	FC	FC_1	LS	検出された ループ
1	-4.804209212	1.073666112	1.073666112	1	DBLCL
2	-3.422371897	1.107122465	1.107122465	1	DBLCL
3	-1.514951748	1.18734545	1.18734545	1	DBLCL
4	-5.804534479	1.070764741	1.070764741	1	DBLCL
5	-4.669835237	1.070578751	1.070578751	1	DBLCL
6	0.493437892	1.186580836	1.186580836	1	DBLCL
7	-4.329420018	1.14424891	1.14424891	1	DBLCL
8	-5.869405345	1.085128386	1.085128386	1	DBLCL
9	-5.141601134	1.192442298	1.192442298	1	DBLCL
10	-4.724458483	1.156886824	1.156886824	1	DBLCL
11	-6.575035413	0.965335281	-1.035909513	-1	Ctrl
12	-6.200305189	0.978929707	-1.021523806	-1	Ctrl
13	-6.778021016	0.986763027	-1.01341454	-1	Ctrl
14	-6.87182168	0.990214838	-1.009881857	-1	Ctrl
15	-6.848536344	0.99289292	-1.007157952	-1	Ctrl
16	-6.85768141	1.004976678	1.004976678	1	DBLCL
17	-6.858716992	1.005965867	1.005965867	1	DBLCL
18	-6.85399155	1.00667269	1.00667269	1	DBLCL
19	-6.827923501	1.009095073	1.009095073	1	DBLCL
20	-6.54111486	1.019215847	1.019215847	1	DBLCL
21	-6.785369028	1.021716754	1.021716754	1	DBLCL
22	-6.755996218	1.021855153	1.021855153	1	DBLCL
23	-6.775754566	1.022394568	1.022394568	1	DBLCL
24	-6.338031258	1.025549454	1.025549454	1	DBLCL
25	-6.461788363	1.02558646	1.02558646	1	DBLCL
26	-6.248771887	1.027965796	1.027965796	1	DBLCL
27	-6.5771745	1.031669619	1.031669619	1	DBLCL
28	-6.343758805	1.033943833	1.033943833	1	DBLCL
29	-6.552299411	1.040248004	1.040248004	1	DBLCL
30	-6.260644426	1.048988833	1.048988833	1	DBLCL
31	-5.936215307	1.05239351	1.05239351	1	DBLCL
32	-5.111051252	1.053333021	1.053333021	1	DBLCL
33	-6.275323888	1.055274694	1.055274694	1	DBLCL
34	-5.559658058	1.05718999	1.05718999	1	DBLCL
35	-4.910091268	1.064814672	1.064814672	1	DBLCL
36	-6.305987164	1.070525603	1.070525603	1	DBLCL
37	-4.669835237	1.070578751	1.070578751	1	DBLCL

10

20

30

40

50

38	-5.804534479	1.070764741	1.070764741	1	DBLCL
39	-6.030168045	1.071151639	1.071151639	1	DBLCL
40	-5.886680521	1.072723247	1.072723247	1	DBLCL
41	-5.181746622	1.073019896	1.073019896	1	DBLCL
42	-4.804209212	1.073666112	1.073666112	1	DBLCL
43	-6.286252837	1.074276132	1.074276132	1	DBLCL
44	-6.255110449	1.076970465	1.076970465	1	DBLCL
45	-4.922419619	1.08418027	1.08418027	1	DBLCL
46	-5.869405345	1.085128386	1.085128386	1	DBLCL
47	-1.693141948	1.091133768	1.091133768	1	DBLCL
48	-5.512969318	1.091242172	1.091242172	1	DBLCL
49	-0.581917188	1.092500613	1.092500613	1	DBLCL
50	-4.462886317	1.096326979	1.096326979	1	DBLCL
51	-4.97398611	1.103276839	1.103276839	1	DBLCL
52	-4.300278466	1.104435469	1.104435469	1	DBLCL

10

20

表5. e

	プローブ配列	プローブ位置
	60 mer	Chr
1	GGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCCGACCTCAGGTGA TCCGCCCGCC	17
2	GAGGGGCCTCTGGAGGGGGCGGGTTCTCTCGATGCCTGGCCTCCACAGC ACATGTGAGCA	10
3	GAGGCTTTTATGCAGGAAAGTGTCCCAGTCGAGGGACTGGCAGCAGGGGG ACAGCAAGGG	20
4	ACCTCTCTTAATTTTCTCAGCCATTCTTTCGACCGCCTCTGCCCCGCTCTC GCTCTGCAC	21
5	TGTGAAGGGAGGGGAGGAGAAAAGAAAATCGAAACAAGCTTAGAAGCAGA CACTTGCCCA	6
6	TGGGGGAGCTCTGGGGTGGGGGTAGCGGTCGATGGGTCCTGATGCCTCTC AGAAGGCCTT	19
7	ACATTTCAAATCCTCTCTTCTAGCTACCTCGAACTTCTGAGCTCAAGCAAT CTTCCACCT	9
8	CTAGAGGAGAGAGGGATGCCAGGCTCTATCGAGTCTGAGTTCGTCCACGT GGTGGCCATC	18
9	TCTTTATGGTGTCTCTTTATATATTTACTCGAGGCTGCAGTGAGCTATAAT TGCACCACT	4
10	ACGGGCAGACAGGACCCCAGCCCATGCCTCGACCCACTCCCGGGGGGAT CGGGACACCGC	22

30

40

50

11	TCCCTGCCTCTCTGGCGCTCTCGGACCCTCGAACCCTCCCTTTGATCTAT TCCATTCTCA	19
12	AGATCCGTGTCTGCCTGCAGATACAAAATCGAGGTGGATCGCCCAGGGGC GGGCAGTCCC	3
13	GGGGGGGGGAGCGCGCCGGTCCCCGCGCTCGAAGGCTGCCCTCCTCTCT GAATTTGGGTT	1
14	ACCCAAACACGCGCAGACACCCGCACACTCGACCCACTCCCGGGGGGAT CGGGACACCGC	22
15	CACACCCGCCCTACTGGATCCAAGTCACTCGAGACAACACTGAAAACACA AAGGCATTTA	13
16	TAGACTAGCGCCAGCTTTGTGCACAAGGTCGACACCCCTCTCCCAACCC TCTGTCAGAA	17
17	AGGGTTTCACCATGTTGCCAGGCTGGTCTCGAGACCATCCTGGCTAATAC GGTGAAACCC	11
18	CAACTTCATTCCCACGGTCACTGCCATCTCGACCCACCAATAGAGCAACT CCCTGAGAGG	14
19	CCATCAGCAAAGATGAACCTGGCACCTCTCGACGCCATAAGCATGGTGAG CCAGGGTGGG	1
20	TTCCAGTTCATAAAGATTTAAACAACATTCGAGAAGAGAAAGGGGGGGAA GCTGCTAGGT	1
21	CCCCGTGCACAGATCCCACCCAGGGTCGAAGCCCTCCGGGCCCT CACGGGAGGGG	18
22	AATTGCTCCATTATGGCTCACTGCAGCCTCGAAGGTTTAGCTTATTCATTA AAATCAGTA	17
23	GCTGAAAGTTATTACTTTGTTTTTCCATCGAGGTCCCGCGCACACGCCC CCGCGCGCAC	4
24	AGCTGTTCCCTCCTTTAAGGGTGACTCCCTCGACCCCCACGTGCTGAGGGC TCCAGCCAGA	6
25	GCCATGACGGGGCTGGAGGACCAGGAGTTCGACCCTGGGTGGTGGGATC TGTGCACGGGG	18
26	GGGACTGCCCGCCCCTGGGCGATCCACCTCGATGTCCAAATGGTTCTTGC CTTCACCTCT	3
27	GGGTTTCACCGTGTTAGCCAGGATGGTCTCGAGACCAGCCTGGCCAACAT GGCAAAACCC	6
28	CTGTATTAGATTTTCACATGCATGAGACTCGAACCAGCCCCCGCAACAC ACTTTCAAGA	9
29	ACAGTCACCGCCGCTTACCTGCGCCTCCTCGACCATGAATATACTACCAA GGAAATATTT	20
30	CATGTGTTATTTCCCAATCTGGAAGACTCGACCGCCTCGCCCCGCTCT CGCTCTGCAC	21
31	TGCCCCTCAAGCCCTCAGACTACAACAATCGACAACGCGATCCACCGGGC CCGAAAGAAG	5

10

20

30

40

50

32	ACCAGGGGCCCCAAAGAGGGGGTCAGGCTCGAATCAAAGGGTTTCTGGAT CCCTAGGTGT	12
33	TCTAGAGGGGTATCCTCCCAAATCCCACTCGACCCAGCCTCTGGACCAGT GCTCCTGCCA	12
34	CCTGTGGTGCCCCATCTCACCAGGCTCTCGATGATGCCACAAGTGCCGT GCCACAGCAG	17
35	GGGTTTTGCCATGTGGGCCAGGCTGGTCTCGAGATAGGCAAAGAGAGATA GACTAACTCG	3
36	CACAGACACAACCCAGGCCTCCATCTACTCGATCACAGTACTTATCTGTC TTACGTACAC	6
37	TGTGAAGGGAGGGGAGGAGAAAAAGAAAATCGAAACAAGCTTAGAAGCAGA CACTTGCCCA	6
38	ACCTCTCTTAATTTTCTCAGCCATTCTTTGACCGCCTCTGCCCCGCTCTC GCTCTGCAC	21
39	CTAGAGGAGAGAGGGATGCCAGGCTCTATCGATGACTTTCCTCCGGGGCG CGCGGCGCTG	18
40	TCAAGAACTCATGGTTCTTAAAGATCACTCGAGGCTGCAGTGAGCTATGAT AATGCCACA	6
41	CCACCATCCACCTGGGGCTGAGGGGACCTCGAGTTTGAGCACCCCCTCCT GGGTCCTCAG	22
42	GGGTTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCCGACCTCAGGTGA TCCGCCCCGCC	17
43	ATACCAACCCCAGAAATAAAGTCATTCTCGAGGCTGCAGTGAGCTATAA TTGCACCACT	4
44	GTTCTCACCCTGATCACACCTGGTTTATCGAACTCTCTCAGGTTCACCCA GACCAAAGA	18
45	TATCTGGCTTAGGCAGAAGGTAGGGGGCTCGAGTGATTATAGAAATCCAT ATATATATTG	14
46	CTAGAGGAGAGAGGGATGCCAGGCTCTATCGAGTCTGAGTTCGTCCACGT GGTGGCCATC	18
47	AACAGCAGCATTAGATTCTCATAGGAACTCGAGTGTCATGAACAATCTTTT TCTTTAACA	4
48	CATTCTAGTGCCAGGACCCATCTCAGGTCGACCCCCTCCCAAGCCAGCC GCCGCAGCAG	2
49	CACTACTACCCAGGAAAGTGATGGGAGGTCGAGATTGCAGGAAATGGAGA GTACATGCCT	X
50	AGTGGCGCAATCTTGCTAACTGCAGCCTCGAGACCATCCTACATGGTGA AACCCCGTCT	15
51	ACGGGCAGACAGGACCCCAGCCCATGCCTCGAGCTGAAGGAACATGCTG GCAGGTAGCTC	22
52	ATATTAAATTGCTTACATAGAATGAAGGTCGAGGATAATGAAGGGAACCTG CCCTTGACAC	1

10

20

30

40

50

表5. f

	プローブ位置				4kb配列位置		
	Start1	End1	Start2	End2	Chr	Start1	End1
1	40446029	40446060	40557923	40557954	17	40446029	40450030
2	81892358	81892389	81927417	81927448	10	81888388	81892389
3	44744656	44744687	44767157	44767188	20	44740686	44744687
4	34696683	34696714	34779780	34779811	21	34696683	34700684
5	91285675	91285706	91314700	91314731	6	91281705	91285706
6	19271977	19272008	19303710	19303741	19	19271977	19275978
7	20560917	20560948	20666337	20666368	9	20556947	20560948
8	77133931	77133962	77220032	77220063	18	77133931	77137932
9	103430366	103430397	103512508	103512539	4	103426396	103430397
10	42305719	42305750	42342568	42342599	22	42301749	42305750
11	49421750	49421781	49458408	49458439	19	49421750	49425751
12	187439656	187439687	187455395	187455426	3	187435686	187439687
13	24467543	24467574	24513928	24513959	1	24467543	24471544
14	42313974	42314005	42342568	42342599	22	42313974	42317975
15	41191135	41191166	41219134	41219165	13	41187165	41191166
16	53403683	53403714	53422397	53422428	17	53399713	53403714
17	77028527	77028558	77094560	77094591	11	77028527	77032528
18	75746612	75746643	75799853	75799884	14	75742642	75746643
19	11807586	11807617	11845619	11845650	1	11807586	11811587
20	228068849	228068880	228135088	228135119	1	228068849	228072850
21	77232184	77232215	77280170	77280201	18	77228214	77232215
22	41162341	41162372	41242678	41242709	17	41162341	41166342
23	106052640	106052671	106067346	106067377	4	106048670	106052671
24	31525914	31525945	31544251	31544282	6	31525914	31529915
25	77160389	77160420	77232184	77232215	18	77156419	77160420
26	187455395	187455426	187486389	187486420	3	187451425	187455426
27	36072356	36072387	36102587	36102618	6	36068386	36072387
28	20322766	20322797	20621547	20621578	9	20318796	20322797
29	39657579	39657610	39725920	39725951	20	39653609	39657610
30	34696683	34696714	34717962	34717993	21	34696683	34700684
31	133465952	133465983	133512403	133512434	5	133465952	133469953
32	130601961	130601992	130676699	130676730	12	130597991	130601992
33	54795918	54795949	54806686	54806717	12	54791948	54795949
34	16842268	16842299	16924802	16924833	17	16842268	16846269
35	187438677	187438708	187454088	187454119	3	187438677	187442678
36	33600698	33600729	33678436	33678467	6	33600698	33604699
37	91285675	91285706	91314700	91314731	6	91281705	91285706

10

20

30

40

50

38	34696683	34696714	34779780	34779811	21	34696683	34700684
39	77156086	77156117	77220032	77220063	18	77156086	77160087
40	106483435	106483466	106506791	106506822	6	106483435	106487436
41	37533516	37533547	37544442	37544473	22	37529546	37533547
42	40446029	40446060	40557923	40557954	17	40446029	40450030
43	103418548	103418579	103512508	103512539	4	103414578	103418579
44	20774415	20774446	20868179	20868210	18	20774415	20778416
45	75893651	75893682	75936927	75936958	14	75889681	75893682
46	77133931	77133962	77220032	77220063	18	77133931	77137932
47	185506858	185506889	185543536	185543567	4	185502888	185506889
48	61075534	61075565	61108479	61108510	2	61071564	61075565
49	100610457	100610488	100670898	100670929	X	100610457	100614458
50	80256742	80256773	80285499	80285530	15	80256742	80260743
51	42305719	42305750	42319752	42319783	22	42301749	42305750
52	51402271	51402302	51439728	51439759	1	51402271	51406272

10

20

表5. g

	4kb配列位置		プローブ
	Start2	End2	
1	40557923	40561924	STAT3_17_40446029_40448202_40557923_40558616_RR
2	81927417	81931418	ANXA11_10_81889664_81892389_81927417_81929312_FR
3	44767157	44771158	CD40_20_44739847_44744687_44767157_44770555_FR
4	34775810	34779811	IFNAR1_21_34696683_34697716_34777569_34779811_RF
5	91310730	91314731	MAP3K7_6_91275515_91285706_91312237_91314731_FF
6	19299740	19303741	MEF2B_19_19271977_19273500_19302232_19303741_RF
7	20662367	20666368	MLLT3_9_20556478_20560948_20658310_20666368_FF
8	77216062	77220063	NFATc1_18_77133931_77135912_77218993_77220063_RF
9	103512508	103516509	NFKB1_4_103425293_103430397_103512508_103516923_FR
10	42342568	42346569	TNFRSF13C_22_42302849_42305750_42342568_42346797_FR
11	49454438	49458439	BAX_19_49421750_49425644_49457303_49458439_RF
12	187451425	187455426	BCL6_3_187438677_187439687_187454088_187455426_FF
13	24509958	24513959	IL22RA1_1_24467543_24471444_24512238_24513959_RF
14	42342568	42346569	TNFRSF13C_22_42313974_42315085_42342568_42346797_RR
15	41219134	41223135	FOXO1_13_41184194_41191166_41219134_41220693_FR
16	53418427	53422428	HLF_17_53402207_53403714_53420274_53422428_FF
17	77090590	77094591	PAK1_11_77028527_77036211_77090325_77094591_RF
18	75795883	75799884	FOS_14_75744954_75746643_75795718_75799884_FF
19	11841649	11845650	MTHFR_1_11807586_11814341_11843522_11845650_RF
20	228135088	228139089	WNT9A_1_228068849_228075473_228135088_228140421_RR
21	77280170	77284171	NFATc1_18_77229964_77232215_77280170_77283702_FR

30

40

50

22	41242678	41246679	BRCA1_17_41162341_41168331_41242678_41245761_RR
23	106063376	106067377	TET2_4_106047220_106052671_106063962_106067377_FF
24	31540281	31544282	TNF_6_31525914_31529267_31542458_31544282_RF
25	77228214	77232215	NFATc1_18_77158863_77160420_77229964_77232215_FF
26	187482419	187486420	BCL6_3_187454088_187455426_187484009_187486420_FF
27	36102587	36106588	MAPK13_6_36066232_36072387_36102587_36105090_FR
28	20621547	20625548	MLLT3_9_20319606_20322797_20621547_20622617_FR
29	39725920	39729921	TOP1_20_39656117_39657610_39725920_39729106_FR
30	34713992	34717993	IFNAR1_21_34696683_34697716_34717312_34717993_RF
31	133512403	133516404	SKP1_5_133465952_133470062_133512403_133513591_RR
32	130676699	130680700	FZD10_12_130601147_130601992_130676699_130678204_FR
33	54806686	54810687	ITGA5_12_54787051_54795949_54806686_54808428_FR
34	16924802	16928803	TNFRSF13B_17_16842268_16844133_16924802_16926550_RR
35	187454088	187458089	BCL6_3_187438677_187439687_187454088_187455426_RR
36	33678436	33682437	ITPR3_6_33600698_33604388_33678436_33680494_RR
37	91310730	91314731	MAP3K7_6_91275515_91285706_91312237_91314731_FF
38	34775810	34779811	IFNAR1_21_34696683_34697716_34777569_34779811_RF
39	77216062	77220063	NFATc1_18_77156086_77157023_77218993_77220063_RF
40	106502821	106506822	PRDM1_6_106483435_106485826_106500642_106506822_RF
41	37544442	37548443	IL-2RB_22_37532051_37533547_37544442_37546723_FR
42	40557923	40561924	STAT3_17_40446029_40448202_40557923_40558616_RR
43	103512508	103516509	NFKB1_4_103405171_103418579_103512508_103516923_FR
44	20864209	20868210	CABLES1_18_20774415_20775705_20863570_20868210_RF
45	75932957	75936958	JDP2_14_75883183_75893682_75936165_75936958_FF
46	77216062	77220063	NFATc1_18_77133931_77135912_77218993_77220063_RF
47	185543536	185547537	CASP3_4_185504966_185506889_185543536_185552493_FR
48	61108479	61112480	REL_2_61074693_61075565_61108479_61109187_FR
49	100666928	100670929	BTK_X_100610457_100612966_100667570_100670929_RF
50	80285499	80289500	BCL2A1_15_80256742_80257692_80285499_80286865_RR
51	42315782	42319783	TNFRSF13C_22_42302849_42305750_42318166_42319783_FF
52	51439728	51443729	CDKN2C_1_51402271_51403526_51439728_51440611_RR

10

20

30

表5. h

	内部プライマー		
	PCR-プライマー1_ID	PCR-プライマー1	PCR-プライマー2_ID
1	OBD RD048.001	GGAAGACCCCTTTGTGACCTGG	OBD RD048.003
2	OBD RD048.005	CAAGACCTCACCCAATGC	OBD RD048.007
3	OBD RD048.009	GAGGAAGGGTGTGCTTTG	OBD RD048.011
4	OBD RD048.013	TGGTCAGACGAGATGCCAAG	OBD RD048.015
5	OBD RD048.017	GTTTGGGACATCAGAAATACAG	OBD RD048.019

40

50

6	OBD RD048.021	CTAAGTCTTAAAGGGCCAGAG	OBD RD048.023
7	OBD RD048.025	CAGAGAGGATAGCCTTACAC	OBD RD048.027
8	OBD RD048.029	TGCTTCATGAAACTCAGATGG	OBD RD048.031
9	OBD RD048.033	ACAGCAGTCCAACAATAGTC	OBD RD048.035
10	OBD RD048.037	GTTGAGGCAGACAGAAGAG	OBD RD048.039
11	OBD RD048.041	TCGGAGGTTCCCTGGCTCTCTGAT	OBD RD048.043
12	OBD RD048.045	TTTCTCAATAAAGATTCTCAGAT	OBD RD048.047
13	OBD RD048.049	TAGGATTCACTGAGAAGGTCCCT	OBD RD048.051
14	OBD RD048.053	CCTCTCTCTGAGTCTTGAGTTTC	OBD RD048.055
15	OBD RD048.057	GATGGAGAAAGGAGCAAGGAACCAGG	OBD RD048.059
16	OBD RD048.061	GGCTGATGGTATGGGAATGGGTGG	OBD RD048.063
17	OBD RD048.065	ACCCAGTTACTTGTTGTATTTGC	OBD RD048.067
18	OBD RD048.069	GGCTTTCCCTTCTGTTTTGTTT	OBD RD048.071
19	OBD RD048.073	CTCTGACAAGCAACTCTGAATCC	OBD RD048.075
20	OBD RD048.077	GCTTCAAAGAGTGTGATTATGTAAAA	OBD RD048.079
21	OBD RD048.081	AATAACTGTGGCATCGGAGAGGT	OBD RD048.083
22	OBD RD048.085	AAGTCTCAATGCCACCCAGGCTG	OBD RD048.087
23	OBD RD048.089	TGTATCCCTCCTGTTATCATCCC	OBD RD048.091
24	OBD RD048.093	CAGACACCTCAGGGCTAAGAGCG	OBD RD048.095
25	OBD RD048.097	GGGAGAACCGAACCCCTGGCGGC	OBD RD048.099
26	OBD RD048.101	TACCCACCCCGACCACTCCGTA	OBD RD048.103
27	OBD RD048.105	GGAATACAAGTGTGTGCCACCAC	OBD RD048.107
28	OBD RD048.109	CTTTGGGCTTGAAGGCTTTGTTT	OBD RD048.111
29	OBD RD048.113	AGCCTCAGCCGTTTCTGGAGTCTCGG	OBD RD048.115
30	OBD RD048.117	TCTAACCCAGTTCTGCCAGTAA	OBD RD048.119
31	OBD RD048.121	CGGTTCTCACTTTCTTCTTTGTC	OBD RD048.123
32	OBD RD048.125	CAAATGAGAGCCTCCAAGACAGC	OBD RD048.127
33	OBD RD048.129	TGGTTACGCGCAAAGTAGTCACA	OBD RD048.131
34	OBD RD048.133	TCTATCACTTTCTGCGCATCAG	OBD RD048.135
35	OBD RD048.137	CCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGC	OBD RD048.139
36	OBD RD048.141	TGGATGGAACCCCTGAGCCACACAGC	OBD RD048.143
37	OBD RD048.145	GGTTAGGTCTTCTGCCTTCAAAG	OBD RD048.147
38	OBD RD048.149	CAGACGAGATGCCAAGTGCTTTA	OBD RD048.151
39	OBD RD048.153	TGCTGGAGTGAAAACGCCTCTTT	OBD RD048.155
40	OBD RD048.157	TCATAATGTCAGTGTCTGTTCA	OBD RD048.159
41	OBD RD048.161	GCTTTCTGAATCTTCCCTGGTG	OBD RD048.163
42	OBD RD048.165	CCTGCCTCAGCCGCCCGAGTAGC	OBD RD048.167
43	OBD RD048.169	CCTCCCACTTTTGATGGCACTGC	OBD RD048.171
44	OBD RD048.173	CCCACATTTCTTCTTTCTGTT	OBD RD048.175
45	OBD RD048.177	CTTCTATGGGTGATGACCTGACA	OBD RD048.179

46	OBD RD048.181	TGCTGGAGTGAAAACGCCTCTTT	OBD RD048.183
47	OBD RD048.185	CCATCGCTCACATCATTACCTGA	OBD RD048.187
48	OBD RD048.189	ACATACAGTCAGTAGGAGCCTTG	OBD RD048.191
49	OBD RD048.193	GCTCCAACACTCACATCTAACAC	OBD RD048.195
50	OBD RD048.197	GTATTTTGTTTGTTTGTTTGTTT	OBD RD048.199
51	OBD RD048.201	CTCCAAGACACCACTGCCGTTGAGGC	OBD RD048.203
52	OBD RD048.205	GCCTCATTCTGTCTCCTTTGA	OBD RD048.207

表5. i

	内部プライマー			
	PCRプライマー-2	遺伝子	マーカー	GLMNET
1	TCACCATTCGTTCAACACAC	STAT3	OBD RD048.001.003	2.08E-08
2	CAGTTGTGGAGGCTCAATAC	ANXA11	OBD RD048.005.007	0.00000056
3	GGAAGGAAAGCCAGTGAAG	CD40	OBD RD048.009.011	0.00000449
4	ACCCTAGAGTCTTGGACAG	IFNAR1	OBD RD048.013.015	0.000000838
5	ATCCCTAGGGCACTGAAC	MAP3K7	OBD RD048.017.019	0.00000156
6	CATACAAGGATGGAGTGACC	MEF2B	OBD RD048.021.023	0.00000137
7	AGTGTCTTGCCCTGTAATC	MLLT3	OBD RD048.025.027	0.0000046
8	AGCCTAAGCTGAGGAACTC	NFATc1	OBD RD048.029.031	0.00000181
9	AACTCCTAATGAGAAAGTCTGC	NFKB1	OBD RD048.033.035	0.00000178
10	GGTCGGGTAGTAGAGAGTG	TNFRSF13C	OBD RD048.037.039	0.000000402
11	GGACAGGTAACACTACGGGTCTCCC	BAX	OBD RD048.041.043	-0.000000273
12	TACCCACCCCGACCACTCCGTA	BCL6	OBD RD048.045.047	0.000000154
13	CACCTTGCGTAGAGGCAGTAGACCCC	IL22RA1	OBD RD048.049.051	-0.000000967
14	AATGTCCTCCGAGCCGCCTGCTGG	TNFRSF13C	OBD RD048.053.055	2.13E-08
15	GGTGTGAGGTAAGAAAGTCATAGCCAT	FOXO1	OBD RD048.057.059	0.00000117
16	CACAGAGCCTGCCATCCTCACAT	HLF	OBD RD048.061.063	0.000000324
17	ACTACAGGTGCCCGCCACAAGGC	PAK1	OBD RD048.065.067	-4.86E-08
18	GGGATGGAGCAGGAAGGAGAGAGAGG	FOS	OBD RD048.069.071	0.00000028
19	TATGTCTTGCCCTGTGCTGCGGCTCC	MTHFR	OBD RD048.073.075	0.000000306
20	ATCAGGTCCCGACTTCCTTGCGC	WNT9A	OBD RD048.077.079	0.00000596
21	AACACCGAGACACACCGAGTCCCTCC	NFATc1	OBD RD048.081.083	0.000000396
22	GA CTGCTCAGGGCTATCCTCTCAG	BRCA1	OBD RD048.085.087	-0.000000314
23	AGAGGTGCCAGTGGGTGGAGGCG	TET2	OBD RD048.089.091	0.000000105
24	GCTCCTCCTCCTGCTGTCGCCAG	TNF	OBD RD048.093.095	0.00000119
25	GGGCGGCTGTGAAACTGAGGTCC	NFATc1	OBD RD048.097.099	0.00000232
26	AGGAAAGGCTTCACTGAGCATCA	BCL6	OBD RD048.101.103	0.00000193
27	TTTGTATTCTTAGTAGAGACGGG	MAPK13	OBD RD048.105.107	-5.18E-08
28	GCCCGCCGCCCTGCCTTTCTGAAT	MLLT3	OBD RD048.109.111	0.00000156
29	CTCTTGTTGGACAGAAACCCTAC	TOP1	OBD RD048.113.115	4.09E-08
30	TGAGCGACCAGACCGTTGCTGTGTGC	IFNAR1	OBD RD048.117.119	0.000000517

10

20

30

40

50

31	CGCCCACTGAACTGGAAGGGTCGTG	SKP1	OBD RD048.121.123	0.000000786
32	AGAAGTGCCAGTCTACATACACC	FZD10	OBD RD048.125.127	0.00000223
33	AGGCAGACACAGAGCAGAGCAGAGGC	ITGA5	OBD RD048.129.131	0.00000124
34	GGTCTCCCCTCCTACCACACTGGCAT	TNFRSF13B	OBD RD048.133.135	0.000000638
35	TGAAGTTTGGTAAAGACCGAGTT	BCL6	OBD RD048.137.139	0.000000206
36	TGTTCTTGCTTTCCCTCCAGGTTG	ITPR3	OBD RD048.141.143	0.000000731
37	CTGTGGGTGGAAGAGGCTCAGGCATC	MAP3K7	OBD RD048.145.147	0.00000156
38	TGAGCGACCAGACCGTTGCTGTGTGC	IFNAR1	OBD RD048.149.151	0.000000838
39	TTTCTCCTCTCCCGAAGACCGCAGCC	NFATc1	OBD RD048.153.155	0.00000132
40	CTCTCTCTGTGTACCCAGGCTG	PRDM1	OBD RD048.157.159	0.00000243
41	CGTAGGCATCCGTGGGTGTGACCAGT	IL-2RB	OBD RD048.161.163	0.000000378
42	CGCCTGTAATCCCAGAACTTTGG	STAT3	OBD RD048.165.167	2.08E-08
43	GTCTCACTCTGTTGCCAGGCTG	NFKB1	OBD RD048.169.171	0.00000135
44	TTCTTGATAAAATGAATCTTCTTA	CABLES1	OBD RD048.173.175	0.000000717
45	TGGAGTTTGTGTGGGCACTGAGGCG	JDP2	OBD RD048.177.179	0.00000334
46	CCACCACCATCAGCCAGTGCCACG	NFATc1	OBD RD048.181.183	0.00000181
47	CAATGCCAGGTCTTCATACTCTA	CASP3	OBD RD048.185.187	0.00000305
48	ACCCAGCGTCGCCGTCCACCGTA	REL	OBD RD048.189.191	0.00000123
49	GGTCCACATTCTCACGAACCGCCTCC	BTk	OBD RD048.193.195	0.00000409
50	CATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTG	BCL2A1	OBD RD048.197.199	0.000000299
51	CTAAATGTGCTGTGTCTTGAGC	TNFRSF13C	OBD RD048.201.203	0.000000179
52	TGCTTCACCAGGAAGTCCACCACCCG	CDKN2C	OBD RD048.205.207	0.0000123

表5. j

	プローブ	遺伝子座	総プローブ数
53	ANXA11_10_81889664_81892389_81927417_81929312_FR	ANXA11	136
54	CD40_20_44737133_44739370_44777294_44780862_RR	CD40	148
55	CREB3L2_7_137532509_137535848_137608464_137613205_FR	CREB3L2	168
56	MyD88_3_38159544_38161117_38182050_38188284_FR	MyD88	80
57	MEF2B_19_19255724_19257122_19271977_19273500_FF	MEF2B	448
58	IL-2RB_22_37569072_37572860_37583052_37586677_RR	IL-2RB	72
59	FRAP1_1_11321482_11322337_11347781_11348658_FF	FRAP1	704
60	BCL6_3_187438677_187439687_187452395_187454091_FF	BCL6	240
61	MMP9_20_44635898_44638559_44669235_44671514_FF	MMP9	68
62	MAP3K7_6_91275515_91285706_91296544_91297579_FR	MAP3K7	308
63	MLLT3_9_20556478_20560948_20658310_20666368_FF	MLLT3	120
64	HLF_17_53404056_53408147_53420274_53422428_RF	HLF	104
65	SIRT1_10_69650583_69655218_69676432_69678199_FR	SIRT1	96
66	NFATc1_18_77124213_77127824_77280170_77283702_RF	NFATc1	608
67	TNFRSF13C_22_42302849_42305750_42342568_42346797_FR	TNFRSF13C	488

10

20

30

40

50

68	STAT3_17_40456120_40457219_40580136_40581714_RF	STAT3	1108
69	NFKB1_4_103512508_103516923_103561903_103565015_RF	NFKB1	96
70	MEF2B_19_19271977_19273500_19302232_19303741_RF	MEF2B	448
71	CD40_20_44739847_44744687_44767157_44770555_FR	CD40	148
72	MAPK10_4_87408248_87409426_87514697_87515355_RF	MAPK10	668
73	FRAP1_1_11190905_11194522_11269915_11272450_RR	FRAP1	704
74	NFKB1_4_103425293_103430397_103512508_103516923_FR	NFKB1	96
75	MAPK10_4_87373087_87377906_87514697_87515355_RF	MAPK10	668
76	JAK3_19_17889333_17890586_17934729_17936992_FR	JAK3	60
77	TNFRSF13C_22_42329800_42332095_42352233_42353781_FR	TNFRSF13C	488
78	TET2_4_106058602_106063965_106118157_106119978_RR	TET2	104
79	NAE1_16_66835284_66840537_66902726_66909724_RF	NAE1	64
80	TNFRSF13C_22_42335475_42336871_42362266_42363517_RR	TNFRSF13C	488
81	NFATc1_18_77151077_77154182_77274975_77276499_RR	NFATc1	608
82	BRCA1_17_41214832_41217070_41227254_41229572_RR	BRCA1	297
83	MLLT3_9_20377197_20385409_20556478_20560948_RF	MLLT3	120
84	PCDHGA6/B2/B4_5_140751685_140753982_140892508_140893138_FF	PCDHGA6/B2/B4	108
85	MAPK10_4_87166373_87167382_87408248_87409426_RR	MAPK10	668
86	BTK_X_100646274_100647902_100689454_100691928_RR	BTK	404
87	BTK_X_100625073_100626595_100689454_100691928_RR	BTK	404
88	BTK_X_100587279_100590348_100627655_100629872_FR	BTK	404
89	BTK_X_100627655_100629872_100647899_100654354_RR	BTK	404
90	BTK_X_100647899_100654354_100673203_100675145_RF	BTK	404
91	BTK_X_100602468_100603585_100647899_100654354_RR	BTK	404
92	BTK_X_100610457_100612966_100667570_100670929_RF	BTK	404

表5. k

	有意な プローブ数	HyperG_Stats	FDR_HyperG	パーセント 有意性
53	83	0.000391435	0.005936759	61.03
54	64	0.802231212	0.999999997	43.24
55	47	0.999999703	0.999999997	27.98
56	27	0.991982598	0.999999997	33.75
57	216	0.227265083	0.590889215	48.21
58	24	0.991079692	0.999999997	33.33
59	359	0.006468458	0.042044978	50.99
60	86	0.999659646	0.999999997	35.83
61	25	0.957692148	0.999999997	36.76
62	113	0.999793469	0.999999997	36.69

63	39	0.999297311	0.999999997	32.5
64	44	0.824486728	0.999999997	42.31
65	64	0.0000456596437717468	0.001038757	66.67
66	213	0.999999997	0.999999997	35.03
67	280	0.000000444123116904245	0.0000202076018191431	57.38
68	615	0.000000000125197189743782	0.0000000113929442666842	55.51
69	27	0.999920864	0.999999997	28.12
70	216	0.227265083	0.590889215	48.21
71	64	0.802231212	0.999999997	43.24
72	244	0.999999947	0.999999997	36.53
73	359	0.006468458	0.042044978	50.99
74	27	0.999920864	0.999999997	28.12
75	244	0.999999947	0.999999997	36.53
76	31	0.243296934	0.615000583	51.67
77	280	0.000000444123116904245	0.0000202076018191431	57.38
78	58	0.033733587	0.145711753	55.77
79	36	0.071920785	0.221674157	56.25
80	280	0.000000444123116904245	0.0000202076018191431	57.38
81	213	0.999999997	0.999999997	35.03
82	173	0.0000217239097176038	0.000658959	58.25
83	39	0.999297311	0.999999997	32.5
84	36	0.997865052	0.999999997	33.33
85	244	0.999999947	0.999999997	36.53
86	182	0.722716922	0.999999997	45.05
87	182	0.722716922	0.999999997	45.05
88	182	0.722716922	0.999999997	45.05
89	182	0.722716922	0.999999997	45.05
90	182	0.722716922	0.999999997	45.05
91	182	0.722716922	0.999999997	45.05
92	182	0.722716922	0.999999997	45.05

10

20

30

表5. I

	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値
53	0.146814815	0.146814815	3.078806942	0.015395162	0.044697142
54	0.147791337	0.147791337	1.633707333	0.141477876	0.232950641
55	0.148349454	0.148349454	3.08222473	0.015316201	0.044558199
56	0.153758518	0.153758518	1.99378109	0.081784292	0.154640968
57	0.156103192	0.156103192	4.16566548	0.003235665	0.015172146
58	0.161073376	0.161073376	2.527153349	0.035788708	0.08344291
59	0.171050829	0.171050829	3.890660293	0.004727539	0.019533312

40

50

60	0.174144322	0.174144322	2.584598623	0.0327468	0.078039912
61	0.18112944	0.18112944	2.685388848	0.028032588	0.069592429
62	0.19092131	0.19092131	3.73604023	0.005879148	0.022572713
63	0.194400918	0.194400918	2.492510608	0.037760627	0.086786653
64	0.195707712	0.195707712	2.71102351	0.026948639	0.067475149
65	0.204252124	0.204252124	3.975216299	0.004202345	0.018041687
66	0.210054656	0.210054656	2.338335953	0.047960033	0.103796265
67	0.210247736	0.210247736	2.234440593	0.056352274	0.11719604
68	0.213090816	0.213090816	2.087748617	0.07073665	0.138732545
69	0.226250319	0.226250319	2.25409429	0.054659526	0.114573853
70	0.246810388	0.246810388	5.953590771	0.000359019	0.0048119
71	0.247739738	0.247739738	4.372950932	0.002449301	0.012749359
72	0.248261394	0.248261394	6.173828851	0.000282141	0.004322646
73	0.251556432	0.251556432	4.318526719	0.00263344	0.013280362
74	0.253919456	0.253919456	1.95465634	0.086862876	0.161472968
75	0.256754187	0.256754187	5.535121315	0.000577231	0.005715942
76	0.257160612	0.257160612	3.449233265	0.008887517	0.030040982
77	0.259132781	0.259132781	4.366813249	0.002469352	0.012816471
78	0.287279843	0.287279843	2.539709619	0.035100109	0.082104681
79	0.31600033	0.31600033	3.153558526	0.013761553	0.041279885
80	0.358221647	0.358221647	3.100524122	0.014900586	0.043739937
81	0.364193755	0.364193755	3.369619436	0.009987239	0.03271603
82	0.453457772	0.453457772	3.247156175	0.011968978	0.037200176
83	0.180533568	0.180533568	5.147835975	0.000914678	0.007187473
84	0.182697701	0.182697701	5.877748203	0.00039063	0.004938906
85	-0.148364769	-0.148364769	-4.986366569	0.001115061	0.008026755
86	-0.538084185	-0.538084185	-6.494881534	0.000200669	0.003807401
87	-0.545447375	-0.545447375	-6.02027801	0.000333544	0.004684915
88	-0.554745602	-0.554745602	-8.383072026	0.0000337	0.002483007
89	0.503059535	0.503059535	6.535294395	0.000192409	0.003731412
90	0.36623319	0.36623319	5.026075307	0.001061678	0.007815282
91	0.338959712	0.338959712	4.957835746	0.001155226	0.008192382
92	0.127634089	0.127634089	5.070996787	0.001004634	0.007593027

10

20

30

40

50

表5. m

	B	FC	FC_1	LS	検出された ループ
53	-3.422371897	1.107122465	1.107122465	1	DBLCL
54	-5.595015473	1.1078721	1.1078721	1	DBLCL
55	-3.417108405	1.108300771	1.108300771	1	DBLCL
56	-5.084251662	1.112463898	1.112463898	1	DBLCL
57	-1.806028568	1.114273349	1.114273349	1	DBLCL
58	-4.275957963	1.118118718	1.118118718	1	DBLCL
59	-2.201619835	1.125878252	1.125878252	1	DBLCL
60	-4.187168091	1.128295002	1.128295002	1	DBLCL
61	-4.031097147	1.133771131	1.133771131	1	DBLCL
62	-2.428494364	1.141492444	1.141492444	1	DBLCL
63	-4.329420018	1.14424891	1.14424891	1	DBLCL
64	-3.991368624	1.145285841	1.145285841	1	DBLCL
65	-2.078878648	1.152088963	1.152088963	1	DBLCL
66	-4.56625722	1.156732005	1.156732005	1	DBLCL
67	-4.724458483	1.156886824	1.156886824	1	DBLCL
68	-4.945085913	1.159168918	1.159168918	1	DBLCL
69	-4.694639254	1.169790614	1.169790614	1	DBLCL
70	0.493437892	1.186580836	1.186580836	1	DBLCL
71	-1.514951748	1.18734545	1.18734545	1	DBLCL
72	0.744313598	1.187774853	1.187774853	1	DBLCL
73	-1.590768631	1.190490767	1.190490767	1	DBLCL
74	-5.141601134	1.192442298	1.192442298	1	DBLCL
75	-0.002180366	1.194787614	1.194787614	1	DBLCL
76	-2.856981615	1.195124248	1.195124248	1	DBLCL
77	-1.523480143	1.196759104	1.196759104	1	DBLCL
78	-4.25656399	1.220337199	1.220337199	1	DBLCL
79	-3.307417374	1.24487452	1.24487452	1	DBLCL
80	-3.388938618	1.281844844	1.281844844	1	DBLCL
81	-2.977498786	1.287162103	1.287162103	1	DBLCL
82	-3.164028291	1.369318233	1.369318233	1	DBLCL
83	-0.483711076	1.13330295	1.13330295	1	DBLCL
84	0.405473595	1.135004251	1.135004251	1	DBLCL
85	-0.691112407	0.902272569	-1.108312537	-1	Ctrl
86	1.098164859	0.688684835	-1.452043008	-1	Ctrl
87	0.570114643	0.685178898	-1.459472852	-1	Ctrl
88	2.923843236	0.680777092	-1.46890959	-1	Ctrl
89	1.14173325	1.417215879	1.417215879	1	DBLCL
90	-0.639742862	1.288982958	1.288982958	1	DBLCL
91	-0.728168867	1.26484422	1.26484422	1	DBLCL
92	-0.581917188	1.092500613	1.092500613	1	DBLCL

10

20

30

40

50

表5. n

	プローブ配列	プローブ位置
	60 mer	Chr
53	GAGGGGCCTCTGGAGGGGGCGGGTTCTCTCGATGCCTGGCCTCCACAGC ACATGTGAGCA	10
54	AATGAGGAACTAGCAGCAGGAGGCAGCATCGAAACCTGGGATGCTAGTAA CCCTACCCTG	20
55	TCCAATCACCTCCCACCAGGTCCCTCCCTCGATCCTGTGCTTTTCCTGCT GCAGGTTTCA	7
56	AGTGGCGTGATCATGGTTCCTGAAGCCTCGAAAAGAGGTTGGCTAGAAG GCCACGGGGT	3
57	GAGGACACGGCGGGGGGCCCATCACCCCTCGAACAGGAGCTGTCCCTCC CAGGAGCAGGC	19
58	GAGCCAGTTTTGCAGGACCTGGGATATTCGAGACCAGTCTGGGCAACAT AGTGAGACCC	22
59	TGGGGGTCCCGGGGAGGTGGGCGTTGCCTCGAATCTGGTCAAACCCTACC CAAACATCATC	1
60	AGATCCGTGTCTGCCTGCAGATACAAAATCGAGTTGGGCTGGGGAGAGGA GGAGATAGGT	3
61	CACTCGGGTGGCAGAGATGCGTGGAGAGTCGATGTGTCCCAAATTGATCT CACCTCCAC	20
62	TGTGAAGGGAGGGGAGGAGAAAAGAAAATCGATCATCTCACCGGCCGAAG ACGAGGAGGA	6
63	ACATTTCAAATCCTCTCTTCTAGCTACCTCGAACTTCTGAGCTCAAGCAAT CTTCCACCT	9
64	TTCTGACAGAGGGTTGGGGAGAGGGGTGTCGACCTCCTAAAGTGCTGGGA TTACAGGCGT	17
65	GGAGGATGGGGAGGGTATGTAAATATTGTGATAGAGCAAGGAAACCAGA AAGGTGTAAT	10
66	GTATGAGTGTGGGTGTGTGGATGTGGCCTCGAGATCGCGCCACTGCACTC CAGCCTGGGC	18
67	ACGGGCAGACAGGACCCCAGCCCATGCCTCGACCCACTCCCGGGGGGAT CGGGACACCGC	22
68	AGTGGTGCGATCTCAGCTTGTTGCAGCCTCGAGGAATTTCTAATGATAGAT CCAGACCTC	17
69	TCATTCTGGGGATTATCTTTTCATTTTCTCGAGGCTGCAGTGAGCTATAAT TGCACCACT	4
70	TGGGGGAGCTCTGGGGTGGGGGTAGCGGTGATGGGTCCTGATGCCTCTC AGAAGGCCTT	19
71	GAGGCTTTTATGCAGGAAAGTGTCCAGTCGAGGGACTGGCAGCAGGGGG ACAGCAAGGG	20

10

20

30

40

50

72	GAGCTGGATGCCAGGCGGGCCAATGAGGTCGATTGCAATGCAGGATCCTA TGCTGGATTC	4
73	AACAGGCAGGAGCAGCTGTTCCCTCAGCATCGAACCTATTTATTTACTTATT TTTTTGAGA	1
74	TCTTTATGGTGTCTCTTTATATATTTACTCGAGGCTGCAGTGAGCTATAAT TGCACCACT	4
75	GAGCTGGATGCCAGGCGGGCCAATGAGGTCGAACACGATATGAACAGGAC ATCTGTTACA	4
76	GGGTGGAGTCAGGGAGGGGTGGGGGACGTCGAGTCTTGCTTGACCCAG AGCAGCTCCCT	19
77	GGGTTTCACCGTGTTACTCAGGCTGGTCTCGAAGTCCTGGGCTCAAGCAA TCCACCCGCT	22
78	CAAATACTCATGTGTATGGGCAAAAACTCGAGTAGTTGGAACCTTCAAGTG TCAAAACAT	4
79	GACGGGCCGATTGCCTGAGCTCAGGAGTTCGACCCTTCTCACGTGGGCTA AGGGCCTGAC	16
80	ACTAGCTGGGTGACCCTAGACAGTTTGTTTCGAGGCTACAGTGAGCTGTGA TAGTGCCACT	22
81	TGTTGTATCCATTATTGAAAGTGGAGTATCGAGGCTGCAGTGAGCTGAGAT CATTCCACT	18
82	GACAGGCAGATTGCCTGAGCTCAGGAGTTCGACATCTCTACACTCATTCT TTCTACTCAG	17
83	ACATTTCAAATCCTCTCTTCTAGCTACCTCGAAACACCACTACTTGTCAGT TTACAATGA	9
84	CGGTGTCTGGTGAGTTTTAACATCCTTGTCGAGCTGCAGACTTGGCTTTGG AAGAATCAC	5
85	GCTCAGCAAATGAATGTTTTCAAAGCACTCGATTGCAATGCAGGATCCTAT GCTGGATTC	4
86	GTGCTTCAAGCAGAGCTTCCTCCCTCCGTCGAACTCCTGACCTCGTGATC CGCCTGCCTC	X
87	ATCCTAACTGCTGAAGTCTGTGTTTTCATCGAACTCCTGACCTCGTGATCC GCCTGCCTC	X
88	GGCTTGCCTAAAAAAGTAAACAAAACAGTCGAACTCCTGCTCATGATCCG CCTGCCTTGG	X
89	CCAAGGCAGGCGGATCATGAGCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAAGAT AGTGAAACCC	X
90	GCCGAGGCGGGTGGATCAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAAGA TAGTGAAACCC	X
91	GGCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAAGAT AGTGAAACCC	X
92	CACTACTACCCAGGAAAGTGATGGGAGGTCGAGATTGCAGGAAATGGAGA GTACATGCCT	X

10

20

30

40

50

表5. o

	プローブ位置				4kb配列位置		
	Start1	End1	Start2	End2	Chr	Start1	End1
53	81892358	81892389	81927417	81927448	10	81888388	81892389
54	44737133	44737164	44777294	44777325	20	44737133	44741134
55	137535817	137535848	137608464	137608495	7	137531847	137535848
56	38161086	38161117	38182050	38182081	3	38157116	38161117
57	19257091	19257122	19273469	19273500	19	19253121	19257122
58	37569072	37569103	37583052	37583083	22	37569072	37573073
59	11322306	11322337	11348627	11348658	1	11318336	11322337
60	187439656	187439687	187454060	187454091	3	187435686	187439687
61	44638528	44638559	44671483	44671514	20	44634558	44638559
62	91285675	91285706	91296544	91296575	6	91281705	91285706
63	20560917	20560948	20666337	20666368	9	20556947	20560948
64	53404056	53404087	53422397	53422428	17	53404056	53408057
65	69655187	69655218	69676432	69676463	10	69651217	69655218
66	77124213	77124244	77283671	77283702	18	77124213	77128214
67	42305719	42305750	42342568	42342599	22	42301749	42305750
68	40456120	40456151	40581683	40581714	17	40456120	40460121
69	103512508	103512539	103564984	103565015	4	103512508	103516509
70	19271977	19272008	19303710	19303741	19	19271977	19275978
71	44744656	44744687	44767157	44767188	20	44740686	44744687
72	87408248	87408279	87515324	87515355	4	87408248	87412249
73	11190905	11190936	11269915	11269946	1	11190905	11194906
74	103430366	103430397	103512508	103512539	4	103426396	103430397
75	87373087	87373118	87515324	87515355	4	87373087	87377088
76	17890555	17890586	17934729	17934760	19	17886585	17890586
77	42332064	42332095	42352233	42352264	22	42328094	42332095
78	106058602	106058633	106118157	106118188	4	106058602	106062603
79	66835284	66835315	66909693	66909724	16	66835284	66839285
80	42335475	42335506	42362266	42362297	22	42335475	42339476
81	77151077	77151108	77274975	77275006	18	77151077	77155078
82	41214832	41214863	41227254	41227285	17	41214832	41218833
83	20377197	20377228	20560917	20560948	9	20377197	20381198
84	140753951	140753982	140893107	140893138	5	140749981	140753982
85	87166373	87166404	87408248	87408279	4	87166373	87170374
86	100646274	100646305	100689454	100689485	X	100646274	100650275
87	100625073	100625104	100689454	100689485	X	100625073	100629074
88	100590317	100590348	100627655	100627686	X	100586347	100590348
89	100627655	100627686	100647899	100647930	X	100627655	100631656
90	100647899	100647930	100675114	100675145	X	100647899	100651900
91	100602468	100602499	100647899	100647930	X	100602468	100606469
92	100610457	100610488	100670898	100670929	X	100610457	100614458

10

20

30

40

50

表5. p

	4kb配列位置		プローブ
	Start2	End2	
53	81927417	81931418	ANXA11_10_81889664_81892389_81927417_81929312_FR
54	44777294	44781295	CD40_20_44737133_44739370_44777294_44780862_RR
55	137608464	137612465	CREB3L2_7_137532509_137535848_137608464_137613205_FR
56	38182050	38186051	MyD88_3_38159544_38161117_38182050_38188284_FR
57	19269499	19273500	MEF2B_19_19255724_19257122_19271977_19273500_FF
58	37583052	37587053	IL-2RB_22_37569072_37572860_37583052_37586677_RR
59	11344657	11348658	FRAP1_1_11321482_11322337_11347781_11348658_FF
60	187450090	187454091	BCL6_3_187438677_187439687_187452395_187454091_FF
61	44667513	44671514	MMP9_20_44635898_44638559_44669235_44671514_FF
62	91296544	91300545	MAP3K7_6_91275515_91285706_91296544_91297579_FR
63	20662367	20666368	MLLT3_9_20556478_20560948_20658310_20666368_FF
64	53418427	53422428	HLF_17_53404056_53408147_53420274_53422428_RF
65	69676432	69680433	SIRT1_10_69650583_69655218_69676432_69678199_FR
66	77279701	77283702	NFATc1_18_77124213_77127824_77280170_77283702_RF
67	42342568	42346569	TNFRSF13C_22_42302849_42305750_42342568_42346797_FR
68	40577713	40581714	STAT3_17_40456120_40457219_40580136_40581714_RF
69	103561014	103565015	NFKB1_4_103512508_103516923_103561903_103565015_RF
70	19299740	19303741	MEF2B_19_19271977_19273500_19302232_19303741_RF
71	44767157	44771158	CD40_20_44739847_44744687_44767157_44770555_FR
72	87511354	87515355	MAPK10_4_87408248_87409426_87514697_87515355_RF
73	11269915	11273916	FRAP1_1_11190905_11194522_11269915_11272450_RR
74	103512508	103516509	NFKB1_4_103425293_103430397_103512508_103516923_FR
75	87511354	87515355	MAPK10_4_87373087_87377906_87514697_87515355_RF
76	17934729	17938730	JAK3_19_17889333_17890586_17934729_17936992_FR
77	42352233	42356234	TNFRSF13C_22_42329800_42332095_42352233_42353781_FR
78	106118157	106122158	TET2_4_106058602_106063965_106118157_106119978_RR
79	66905723	66909724	NAE1_16_66835284_66840537_66902726_66909724_RF
80	42362266	42366267	TNFRSF13C_22_42335475_42336871_42362266_42363517_RR
81	77274975	77278976	NFATc1_18_77151077_77154182_77274975_77276499_RR
82	41227254	41231255	BRCA1_17_41214832_41217070_41227254_41229572_RR
83	20556947	20560948	MLLT3_9_20377197_20385409_20556478_20560948_RF
84	140889137	140893138	PCDHGA6/B2/B4_5_140751685_140753982_140892508_140893138_FF
85	87408248	87412249	MAPK10_4_87166373_87167382_87408248_87409426_RR
86	100689454	100693455	BTK_X_100646274_100647902_100689454_100691928_RR
87	100689454	100693455	BTK_X_100625073_100626595_100689454_100691928_RR
88	100627655	100631656	BTK_X_100587279_100590348_100627655_100629872_FR
89	100647899	100651900	BTK_X_100627655_100629872_100647899_100654354_RR
90	100671144	100675145	BTK_X_100647899_100654354_100673203_100675145_RF
91	100647899	100651900	BTK_X_100602468_100603585_100647899_100654354_RR
92	100666928	100670929	BTK_X_100610457_100612966_100667570_100670929_RF

10

20

30

40

50

表5. q

	内部プライマー		
	PCR-プライマー-1_ID	PCR-プライマー-1	PCR-プライマー-2_ID
53	OBD RD048.209	GGCTCGTAACAAACCCCTGACCCAG	OBD RD048.211
54	OBD RD048.213	TCCCCATTACCCCATCAGTGCTCCCC	OBD RD048.215
55	OBD RD048.217	GGAGAGGCAGAGCAGAGAGTGAAGGG	OBD RD048.219
56	OBD RD048.221	GACAGCAGTTTCTAAGCCTGGCA	OBD RD048.223
57	OBD RD048.225	TTTGGAGGACTGGGACTTGCCGT	OBD RD048.227
58	OBD RD048.229	AACTGAAAGAAAGACCCAGAGGC	OBD RD048.231
59	OBD RD048.233	GACCCAAAGGGCAATACCAGAGC	OBD RD048.235
60	OBD RD048.237	CACGCTCGCCCATCATTGAAAAC	OBD RD048.239
61	OBD RD048.241	TCCCTTCATCCACAGGAATACCT	OBD RD048.243
62	OBD RD048.245	GGTTAGGTCTTCTGCCTTCAAAG	OBD RD048.247
63	OBD RD048.249	GTGTAACAATCAAGTCAGGGAAT	OBD RD048.251
64	OBD RD048.253	CACAGAGCCTGCCATCCTCACAT	OBD RD048.255
65	OBD RD048.257	AAATAAGTAAGGACAAAGAGTGC	OBD RD048.259
66	OBD RD048.261	TCGCCTACGGCTTGTTTACGCACAGC	OBD RD048.263
67	OBD RD048.265	GCTTATTTACAAGACGAACCCGC	OBD RD048.267
68	OBD RD048.269	TTCTGTTGTCCAGGCTTGAGTGC	OBD RD048.271
69	OBD RD048.273	CACTATTGAGTTCTAAGAGTTCT	OBD RD048.275
70	OBD RD048.277	GGAACCCACGCCCTCCCCTAAGTCTT	OBD RD048.279
71	OBD RD048.281	GGTGTGCTTTGCCAGGATAAGAA	OBD RD048.283
72	OBD RD048.285	TCTCCCTGGCGACCTCGTCCCTA	OBD RD048.287
73	OBD RD048.289	TGTTTGCTTTATGGACACACAGA	OBD RD048.291
74	OBD RD048.293	CATTTACTCACTCTCATACCATA	OBD RD048.295
75	OBD RD048.297	ACTCTGCCGCTCGGTACCAACCTGA	OBD RD048.299
76	OBD RD048.301	GACAAGGGAGGGAGGAGGATGGG	OBD RD048.303
77	OBD RD048.305	CCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGC	OBD RD048.307
78	OBD RD048.309	GTGAACCTCAGCCAAGCACAGTGGTGG	OBD RD048.311
79	OBD RD048.313	TTCTTTACCCCTGTCACTCACCT	OBD RD048.315
80	OBD RD048.317	TGGTTGGAAGTAGCCCTGATTCA	OBD RD048.319
81	OBD RD048.321	GTTGCCTTGTTATCTGCCTGGTT	OBD RD048.323
82	OBD RD048.325	GTAATCCTAACACTGTGGGAGGC	OBD RD048.327
83	OBD RD048.329	GGGAGCATTGTGGGCTAACAGGAGAC	OBD RD048.331
84	OBD RD048.333	TCGTAGGCAACATCGTCAAGGAT	OBD RD048.335
85	OBD RD048.337	CTGGGCAACAGAGTGAGAGCCTG	OBD RD048.339
86	OBD RD051.001	TGCTACCTCTGACTACAGGGTGG	OBD RD051.003
87	OBD RD051.005	GCTGACTGAAGATTCTGCCTTTC	OBD RD051.007
88	OBD RD051.009	TAGGATGGCAAGCAGCATTGGCT	OBD RD051.011
89	OBD RD051.013	CACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG	OBD RD051.015
90	OBD RD051.017	CACGCCTGTAATCCCAGCACTCTG	OBD RD051.019
91	OBD RD051.021	ATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG	OBD RD051.023
92	OBD RD051.025	CCACCATTCTGTGCTCCAACACTC	OBD RD051.027

10

20

30

40

50

表5. r

	内部プライマー			
	PCRプライマー-2	遺伝子	マーカー	GLMNET
53	ACAGTTGTGGAGGCTCAATACCT	ANXA11	OBD RD048.209.211	0.00000056
54	CGGTAACAGACACGGAGTGAAAT	CD40	OBD RD048.213.215	0.00000222
55	GCAGGGACTGAGAAACATAGGAT	CREB3L2	OBD RD048.217.219	3.82E-08
56	TGGACCCCAGGGCAGGGCTTCAT	MyD88	OBD RD048.221.223	0.000000196
57	TCAGACCCTCCTTCCCACCTCTC	MEF2B	OBD RD048.225.227	0.00000288
58	CCCCTTCTCCTGCTGCTACCATCCAG	IL-2RB	OBD RD048.229.231	0.000000645
59	CTCAGGGAGACCAAGGCAGTGAC	FRAP1	OBD RD048.233.235	0.00000196
60	GGGACTGGAGGGAAGGAAGTGGG	BCL6	OBD RD048.237.239	0.00000325
61	GGAGCAGTGTAGGGCAGGGTGTGAGA	MMP9	OBD RD048.241.243	0.00000227
62	ATGTCTACAGCCTCTGCCGCCTCCTC	MAP3K7	OBD RD048.245.247	0.000000566
63	GCCCTGTAATCCCAGCACTTTGG	MLLT3	OBD RD048.249.251	0.00000046
64	CCCCAGGGACTGAGGACTTGTGT	HLF	OBD RD048.253.255	0.000000743
65	AACAATCTATTTTACCAACCTAT	SIRT1	OBD RD048.257.259	0.00000188
66	CAGGTAGTGTGTTTTCCAACCTCTGTT	NFATc1	OBD RD048.261.263	0.000000147
67	TAGTAGAGAGTGGGTGCCACAGGC	TNFRSF13C	OBD RD048.265.267	0.000000402
68	GGCAAGGTCTCCAGTGGTGAGGT	STAT3	OBD RD048.269.271	0.00000103
69	GTCTCACTCTGTTGCCAGGCTG	NFKB1	OBD RD048.273.275	0.00000177
70	TGGATTTTCTGCGGCTCTGTTTG	MEF2B	OBD RD048.277.279	0.00000137
71	AGTCCCCTCTCTGGGTCTCAGCCAAG	CD40	OBD RD048.281.283	0.00000449
72	TATGGCATTTCCTTCCAGTA	MAPK10	OBD RD048.285.287	0.00000213
73	CACTCCAGCCTGAGAGACAGAGC	FRAP1	OBD RD048.289.289	0.00000287
74	GTCTCACTCTGTTGCCAGGCTG	NFKB1	OBD RD048.291.293	0.00000178
75	CAGGGTTGTTGTGAGGGTTATGT	MAPK10	OBD RD048.295.297	0.00000339
76	GTCCCTGCTCTCTTAGCCCCAGA	JAK3	OBD RD048.299.301	0.000000206
77	AGACCTTTGGTTTCTACATCTAT	TNFRSF13C	OBD RD048.303.305	0.000000144
78	GGTATCAAATGTTCCACAAGTGTTGC	TET2	OBD RD048.307.309	0.000000972
79	CCAGGATGTCTTACCGCCCCGTCAG	NAE1	OBD RD048.311.313	0.00000172
80	GGGTCTCACTCTGTTGCCAAGC	TNFRSF13C	OBD RD048.315.317	0.00000164
81	CGTCTTGCTCTGTCTGTTGCCAGGC	NFATc1	OBD RD048.319.321	0.00000111
82	GGCAATAGGGATGATTCTGTGAA	BRCA1	OBD RD048.323.325	0.00000046
83	GCACAGGAGGGTTACTTCACAAG	MLLT3	OBD RD048.327.329	0.00000292
84	GCTTCACGGGAGGAGGGTAGACTCTC	PCDHGA6/ B2/B4	OBD RD048.331.333	0.00000208
85	TATGGCATTTCCTTCCAGTA	MAPK10	OBD RD048.335.337	-0.00000511
86	ATGTTAGTCCCTTCCCACCTAT	BTK	OBD RD051.001.003	-0.000000091
87	ATGTTAGTCCCTTCCCACCTAT	BTK	OBD RD051.005.007	-8.44E-08
88	ACGCCTGTAATCCCAGCACTTTG	BTK	OBD RD051.009.011	-0.00000019
89	GATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG	BTK	OBD RD051.013.015	9.55E-08
90	CGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG	BTK	OBD RD051.017.019	5.07E-08
91	CGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG	BTK	OBD RD051.021.023	2.87E-08
92	CTCACGAACCGCCTCCTTTCTCTC	BTK	OBD RD051.025.027	0.00000409

【 0 2 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6. a

	プローブ	遺伝子座	総プローブ数	有意な プローブ数
1	MIR98_X_53608013_53611637_53628991_53630033 _RR	MIR98	16	4
2	DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_9014273 8_FR	DAPK1	46	9
3	HSD3B2_1_119912462_119915175_119959754_119 963670_RR	HSD3B2	20	5
4	ERG_21_39895678_39899145_39984806_39991905_ RF	ERG	52	4
5	SRD5A3_4_56188038_56191526_56242301_562453 14_RF	SRD5A3	12	4
6	MMP1_11_102658858_102661735_102664717_1026 67643_FF	MMP1	n/a	n/a

10

表6. b

	HyperG_Stats	FDR_HyperG	パーセント 有意性	logFC	AveExpr	t
1	0.064790053	0.737205743	25	0.67511652	0.67511652	13.76185645
2	0.032709022	0.548212211	19.57	0.299375751	0.299375751	7.197207444
3	0.040338404	0.548212211	25	-0.168081632	-0.168081632	-3.274998031
4	0.765503518	1	7.69	-0.425291613	-0.425291613	-11.67074071
5	0.024128503	0.483719041	33.33	0.266992266	0.266992266	4.835274287
6	n/a	n/a	n/a	n/a	4.72222828	n/a

20

表6. c

	P値	調整P値	B	FC	FC_1	LS
1	0.000000031	0.0000143	9.558686586	1.596725728	1.596725728	1
2	0.0000184	0.000805368	3.154114326	1.230611817	1.230611817	1
3	0.007481356	0.033194645	-3.020586815	0.890025372	-1.123563476	-1
4	0.000000168	0.0000357	7.913111034	0.744688192	-1.342843905	-1
5	0.000536131	0.005815136	-0.328887879	1.203296575	1.203296575	1
6	0.04505295	0.4547981	n/a	n/a	n/a	n/a

30

40

表6. d

	検出された ループ	プローブ配列
		60 mer
1	侵攻性	AGTTGTATTTT TAGAAAGTAGTGT TTAATCGATAGAAATATAACATGA AACACATATATA
2	侵攻性	ACTAATCCCCTGAAGAAGCAAATTA ACTTCGAGTATCCCTTTAAGTT TGTTTTTAAAATA
3	緩慢性	TCAGTTTCTGCTCTCAAGAAGCTTACAGTCGAAGGTCCCAAGTTAGA TTACGGCAAAGCT
4	緩慢性	TCTTGAATGTGCTTAGTATTATT CAGACTCGAAAACATAATTTGAAAG GAATTCATTCTG
5	侵攻性	AGGAGGTAACGATTGGTCAGCTGCTTAATCGAGGCAGAAGTCTATTT GAAACGTAAGATA
6	n/a	GGCCTTTAAGGCCCTCTGAAATCCAGCATCGAAGAGGGAAACTGC ATCACAGTTGATGG

10

20

表6. e

	プローブ位置					4kb配列位置		
	Chr	Start1	End1	Start2	End2	Chr	Start1	End1
1	X	53608013	53608044	53628991	53629022	X	53608013	53612014
2	9	90073586	90073617	90140806	90140837	9	90069616	90073617
3	1	119912462	119912493	119959754	119959785	1	119912462	119916463
4	21	39895678	39895709	39991874	39991905	21	39895678	39899679
5	4	56188038	56188069	56245283	56245314	4	56188038	56192039
6	11	102661704	102661735	102667612	102667643	11	102657734	102661735

30

表6. f

	4kb配列位置		マーカー
	Start2	End2	
1	53628991	53632992	MIR98_X_53608013_53611637_53628991_53630033_RR
2	90140806	90144807	DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR
3	119959754	119963755	HSD3B2_1_119912462_119915175_119959754_119963670_RR
4	39987904	39991905	ERG_21_39895678_39899145_39984806_39991905_RF
5	56241313	56245314	SRD5A3_4_56188038_56191526_56242301_56245314_RF
6	102663642	102667643	MMP1

40

50

表6. g

	プライマー名	プライマー配列		
1	PCa119-245	AAGAAGGGATGGGACGGGACT	PCa119-247	GGTACACGAATTAACCTTCCCTGT
2	PCa119-165	ACTGGTCACAGGGAACGATGG	PCa119-167	AGGTGTGAATGTTACTGAACACAAA
3	PCa119-130	ACTTGGATTCCCAAAACGCAC	PCa119-132	CTCTTCCCCGGTGAGTTTCCA
4	PCa119-065	CAGCCTACCTTGCCTGACACT	PCa119-067	AAAGCCCAGTGATGGCCCAT
5	PCa119-154	TCCATTTTCCTTTCCCTTTGCTCTG	PCa119-155	CCACACAGGGCCCTAATGACC
6	MMP 1-4 2F	GGGGAGTGGATGGGATAAGGTG	MMP 1F	TGGGCCTGGTTGAAAAGCAT

10

表6. h

	プローブ	プローブ配列	遺伝子
1	OBD119F015	AGTGTTTAATCGATAGAAATATAACATGAAACACA	MIR98
2	OBD119F06	AGGGATACTCGAAGTTAATTTGCTTCTT	DAPK1
3	OBD119F09	AAGAAGCTTACAGTCGAAGGTCCCAA	HSD3B2
4	OBD119F08	ATTCCTTTCAAATTATGTTTTCGAGTCTGAATAATA	ERG
5	SRD5A3FAM7415RC	AAATAGACTTCTGCCTCGATTAAGCA	SRD5A3
6	MMP1F1b2	ATCCAGCATCGAAGAGGGAAACTGCATCA	MMP1

20

表6. i

	マーカー	GLMNET
1	PCa119-245.247	-5.91743E-06
2	PCa119-165.167	-1.57185E-05
3	PCa119-130.132	4.47291E-07
4	PCa119-065.067	6.32136E-06
5	PCa119-154.155	-8.00857E-08
6	MMP1-4 1F. MMP 1F	0

30

【 0 2 8 7 】

40

50

【表 7】

表7. 好ましいDLBCLマーカー

マーカー	GLMNET
OBD RD048.001.003	2.08E-08
OBD RD048.005.007	5.6E-07
OBD RD048.009.011	4.49E-06
OBD RD048.013.015	8.38E-07
OBD RD048.017.019	1.56E-06
OBD RD048.021.023	1.37E-06
OBD RD048.025.027	0.0000046
OBD RD048.029.031	1.81E-06
OBD RD048.033.035	1.78E-06
OBD RD048.037.039	4.02E-07

【 0 2 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表8. a

N	EpiSwitch_ID	内部フォワード プライマーID	内部フォワードプライマー配列
1	ORF1_1_1034282_1037357_1049484_1054771 _FF	OBD169_001	GCCAGAGAACAGATGTG TGTGTCT
2	ORF5_1_1140030_1142517_1196191_1197234 _RR	OBD169_005	GCCTCTCTGGTGCCACA TCTTATCTT
3	ORF5_1_1182474_1185271_1270569_1273244 _RF	OBD169_009	CTGCCTGTGTGTAGTCA CGAGAAGC
4	ORF5_1_1182474_1185271_1196191_1197234 _RR	OBD169_013	CTGACAGCAGAAGCACG AAAAGGTC
5	ORF5_1_1283682_1285577_1335341_1338794 _RF	OBD169_017	CCATCCACCCACAGTT CCTATGAAA
6	ORF5_1_1147651_1150121_1196191_1197234 _RF	OBD169_021	CCCAACGAGGTCAGGAA GGGAGA
7	ORF5_1_1140030_1142517_1289361_1294150 _FF	OBD169_025	TGTCTCAGTATCTATTTC CCAAGTGC
8	ORF1_1_1038521_1042933_1098468_1101242 _RF	OBD169_029	CAGGACCCAGACTTGCC CAAACC
9	ORF5_1_1146367_1147651_1165983_1167502 _FF	OBD169_033	AGACCCAATGCCTGCCA CACGGA
10	ORF5_1_1140030_1142517_1270569_1273244 _RF	OBD169_037	CTGCCTGTGTGTAGTCA CGAGAAGC
11	ORF5_1_1196191_1197234_1230936_1232838 _RR	OBD169_041	GCATAACTCAGAGAAAG CCACTGTGA
12	ORF5_1_1182474_1185271_1209527_1216771 _RR	OBD169_045	CTGACAGCAGAAGCACG AAAAGGTC
13	ORF5_1_1270569_1273244_1300933_1312034 _FF	OBD169_049	CTGCCTGTGTGTAGTCA CGAGAAGC
14	ORF5_1_1157878_1159517_1196191_1197234 _RF	OBD169_053	CCCAACGAGGTCAGGAA GGGAGA
15	ORF5_1_1273244_1276010_1335341_1338794 _RF	OBD169_057	CACCCATCCACCCACACA GTTCTT
16	ORF5_1_1196191_1197234_1289361_1294150 _FF	OBD169_061	CCCAACGAGGTCAGGAA GGGAGA
17	ORF5_1_1140030_1142517_1230936_1232838 _RR	OBD169_065	CCTCTCTGGTGCCACAT CTTATCTTA
18	ORF5_1_1142517_1146335_1270569_1273244 _RR	OBD169_069	TTGACCTGGGCTCACAT CGCTGA
19	ORF5_1_1230936_1232838_1273244_1276010 _RR	OBD169_073	GTCTTCAAGCCACAGAG CAGGATTCC

10

20

30

40

50

20	ORF5_1_1157878_1159517_1300933_1312034_FF	OBD169_077	GGTCTGAAAATGTGAAT GTCTTGTGT
21	ORF5_1_1147651_1150121_1273244_1276010_RR	OBD169_081	GTGCCCTTGAGTCCAGC CGTCAT
22	ORF1_1_1049484_1054771_1098468_1101242_FF	OBD169_085	TGTCTCTCTCCTAAGGT GTCCCC
23	ORF5_1_1209527_1216771_1270569_1273244_RF	OBD169_089	CTGCCTGTGTGTAGTCA CGAGAAGC
24	ORF48_2_84841864_84843477_84864219_84866005_FF	OBD169_093	GCACTTTCTCTCCAGGT CACCCCT
25	ORF48_2_84864219_84866005_84885415_84887815_RR	OBD169_097	CTGCTTGGGCTGGTCTT TGGTTG
26	ORF48_2_84841864_84843477_84925461_84928171_FF	OBD169_101	GGCACTTTCTCTCCAGG TCACCC
27	ORF41_2_36413514_36415342_36452868_36458269_RR	OBD169_105	TGAGCGGTCACTGCTGT TGTAGG
28	ORF48_2_84864219_84866005_84876440_84877895_RF	OBD169_109	TTCCATCCTGCTGTCCG TCCTGC
29	ORF48_2_84864219_84866005_84925461_84928171_FF	OBD169_113	CGGAGAGAAGGCGGAGA AACCGT
30	ORF41_2_36413514_36415342_36468165_36471683_RR	OBD169_117	GAGCGGTCACTGCTGTT GTAGGC
31	ORF91_7_65033242_65035577_65065127_65067650_RF	OBD169_121	CATTCCTGGTATCGTGT TGCCGC
32	ORF91_7_65032142_65033242_65065127_65067650_FF	OBD169_125	GGACTTCCTCCTCGCCT AATGCG
33	ORF91_7_65037215_65039217_65065127_65067650_RF	OBD169_129	TCCTCCCATCCTCACTG GACCAC
34	ORF9_10_23456592_23460302_23494817_23496168_RR	OBD169_133	AGGGCTCTGCGTTTACT CCAGGC
35	ORF15_11_39960254_39968870_39992990_40001746_RR	OBD169_137	CTGGAGCCTGAGTAATG AATAGGAGC
36	ORF16_11_40371218_40374048_40393587_40395559_RR	OBD169_141	GCCCCAATCCCATCCAG AATCCA
37	ORF15_11_39932865_39938937_40079832_40084530_FF	OBD169_145	CTTTCTCTCTCCCTCGT CCCTGG
38	ORF15_11_39992990_40001746_40079832_40084530_RF	OBD169_149	TTTGATAATGAGGGCTG GCTGGGCAT
39	ORF16_11_40371218_40374048_40393587_40395559_RF	OBD169_153	GGATGCCTTAGTTCCTA TTGACACT

10

20

30

40

50

40	ORF27_12_63568927_63574607_63596388_63 598936_RR	OBD169_157	CTGCTGGAGGAGTGACA CAAAGTTTC
41	ORF27_12_63568927_63574607_63586940_63 589534_RR	OBD169_161	GCCTGCTGGAGGAGTGA CACAAAGTT
42	ORF31_15_29619588_29621525_29646237_29 648560_RR	OBD169_165	CCTTTCCTCTTCCATCTA CTCATTCC
43	ORF30_15_10476260_10484217_10545581_10 548270_RR	OBD169_169	TTCTATCCCTCCACAAG ATGCTCATA
44	ORF32_16_10690178_10695010_10747182_10 750815_RR	OBD169_173	GGGAGACGGAGGAAAAG CCTATC
45	ORF32_16_10747182_10750815_10765838_10 768877_RR	OBD169_177	AACCTCCTCAAAGAGAG AGCCTTCCC
46	ORF32_16_10726068_10729293_10772875_10 776021_FF	OBD169_181	AGGTCTTCAACCAAACA CCACCAGTG
47	ORF32_16_10747182_10750815_10792291_10 794979_RF	OBD169_185	CCTCCTGTATTTCTACTT CCACTCAG
48	ORF32_16_10726068_10729293_10792291_10 794979_FF	OBD169_189	GCAGGTCTTCAACCAAA CACCACCAG
49	ORF32_16_10747182_10750815_10772875_10 776021_RR	OBD169_193	AACCTCCTCAAAGAGAG AGCCTTCCC
50	ORF32_16_10778964_10780903_10792291_10 794979_FF	OBD169_197	CAGTGTGAAAGCACCTT CGCTCTTGC
51	ORF68_25_630610_633794_676143_680436_F F	OBD169_201	GGGCAATGTGAGGCTGT TATGCTTGT
52	ORF68_25_630610_633794_687567_692655_F F	OBD169_205	CCAGGGCAATGTGAGGC TGTTATGCT
53	ORF70_26_27906620_27909025_27963114_27 965001_RR	OBD169_209	TTTGAGGGCAGAGCAGG AAGGGT
54	ORF70_26_27876428_27879774_27894296_27 895372_RR	OBD169_213	GTCCCTGCTCCACTGCC AATGAG
55	ORF70_26_27890569_27893929_27933912_27 935209_RR	OBD169_217	GTGCCCTGGATGGAGAA CTTGCT
56	ORF70_26_27933912_27935209_27963114_27 965001_RR	OBD169_221	TACAGAAAGCCCTCGCT GGGAGC
57	ORF70_26_27876428_27879774_27890569_27 893929_RR	OBD169_225	AAGTGTAGCACGGACCA GAGAGC
58	ORF70_26_27894296_27895372_27963114_27 965001_RR	OBD169_229	CTGCCTCCAGAAGGTGT CTCAGA
59	ORF70_26_27890569_27893929_27906620_27 909025_RR	OBD169_233	GTGCCCTGGATGGAGAA CTTGCT

10

20

30

40

50

60	ORF75_31_28027888_28030129_28041732_28043951_FF	OBD169_237	GGACAAGCATCCTGGTT GAGCCA
61	ORF75_31_28027888_28030129_28043951_28045576_FF	OBD169_241	GGACAAGCATCCTGGTT GAGCCA
62	ORF79_32_24013860_24017127_24039530_24040887_RF	OBD169_245	GACCCAGAAATGAACCC AAAAGATGA
63	ORF79_32_23988046_23989457_24013860_24017127_RR	OBD169_249	GCACTCCCTACACACAA ATCCTTAGA
64	ORF79_32_23965697_23967743_24013860_24017127_RR	OBD169_253	GCAACAGTTCATAACCG AGTGCCAAC
65	ORF79_32_23965697_23967743_24028587_24030780_RR	OBD169_257	GCAACAGTTCATAACCG AGTGCCAAC
66	ORF79_32_23965697_23967743_24000345_24005192_RR	OBD169_261	CAGTTCATAACCGAGTG CCAACAGAA
67	ORF79_32_24013860_24017127_24028587_24030780_RR	OBD169_265	GGTGACTGATGAGACTC CAGGAAAGT
68	ORF79_32_23965697_23967743_24039530_24040887_RF	OBD169_269	GACCCAGAAATGAACCC AAAAGATGA
69	ORF79_32_23988046_23989457_24039530_24040887_RF	OBD169_273	GACCCAGAAATGAACCC AAAAGATGA
70	ORF82_32_9652472_9664654_9692674_9698030_RR	OBD169_277	CCCACCTCCCTGCTCCA ACAAGATTT
71	ORF79_32_24000345_24005192_24039530_24040887_RF	OBD169_281	GACCCAGAAATGAACCC AAAAGATGA
72	ORF79_32_23988046_23989457_24000345_24005192_RR	OBD169_285	GCAGCCTTTGGCAGCAC TCTCTG
73	ORF104_X_109512943_109516164_109526507_109531763_RF	OBD169_289	CCCTTCTGGAAGTGGAT GAGCCCTTA
74	ORF104_X_109508063_109510622_109526507_109531763_FF	OBD169_293	TGAGCCCTTAGTCAATG GGACCG
75	ORF106_X_75279499_75281082_75297768_75302185_RF	OBD169_297	CCAGTTCACCAAGGTTG AGTGCC

表8. b

N	内部リハース プライマーID	内部リハースプライマー配列	遺伝子	マーカー	GLMNET
1	OBD169_003	AAAACCTCCACCTGT CTGTGTCAC	NFATC1	OBD169_001.OBD1 69_003	0.150341207
2	OBD169_007	GCATAACTCAGAGAA AGCCACTGTGA	ATP9B	OBD169_005.OBD1 69_007	0

10

20

30

40

50

3	OBD169_011	GACAGCAGAAGCACG AAAAGGTCATT	ATP9B	OBD169_009.OBD1 69_011	-0.065057056
4	OBD169_015	TGTCCCTCCAGCCTC TGTTACCC	ATP9B	OBD169_013.OBD1 69_015	0.011765488
5	OBD169_019	GGTCTGAAAGCACCT GTAACCTCTGGA	ATP9B	OBD169_017.OBD1 69_019	0
6	OBD169_023	CCCTTGAGTCCAGCC GTCATTAC	ATP9B	OBD169_021.OBD1 69_023	0
7	OBD169_027	ACACGATGAGACAGA GCACCAGAGTC	ATP9B	OBD169_025.OBD1 69_027	0
8	OBD169_031	GGTGAGTTCTGACCT GGGCTTTC	NFATC1	OBD169_029.OBD1 69_031	0
9	OBD169_035	TCTGAGGTCCTGATG GAGCACAG	ATP9B	OBD169_033.OBD1 69_035	0
10	OBD169_039	CCTCTCTGGTGCCAC ATCTTATCTTA	ATP9B	OBD169_037.OBD1 69_039	0
11	OBD169_043	GTCTTCAAGCCACAG AGCAGGATTCC	ATP9B	OBD169_041.OBD1 69_043	0.122625202
12	OBD169_047	CCATCTTCTGTAACC CTGAACGGAGT	ATP9B	OBD169_045.OBD1 69_047	0
13	OBD169_051	CGTTATCTATGGTCC CACTACTGTGT	ATP9B	OBD169_049.OBD1 69_051	-0.050953035
14	OBD169_055	GCAGGTTATTAGAGG ACCGAGGC	ATP9B	OBD169_053.OBD1 69_055	0
15	OBD169_059	CGCCACCAAGAATGT CATCTCCG	ATP9B	OBD169_057.OBD1 69_059	0
16	OBD169_063	CGATGAGACAGAGCA CCAGAGTC	ATP9B	OBD169_061.OBD1 69_063	0.127785257
17	OBD169_067	GTCTTCAAGCCACAG AGCAGGATTCC	ATP9B	OBD169_065.OBD1 69_067	-6.18E-06
18	OBD169_071	GTGGCTACCTGTGGT CCTCTCCT	ATP9B	OBD169_069.OBD1 69_071	0
19	OBD169_075	GCCACCAAGAATGTC ATCTCCGATTT	ATP9B	OBD169_073.OBD1 69_075	0
20	OBD169_079	GGCTTCGTTATCTATG GTCCCACTAC	ATP9B	OBD169_077.OBD1 69_079	0
21	OBD169_083	CGCCACCAAGAATGT CATCTCCG	ATP9B	OBD169_081.OBD1 69_083	0
22	OBD169_087	CAGGACCCAGACTTG CCCAAACC	NFATC1	OBD169_085.OBD1 69_087	0

10

20

30

40

50

23	OBD169_091	CTGTAACCCTGAACG GAGTAGAATAG	ATP9B	OBD169_089.OBD1 69_091	0
24	OBD169_095	GGCGGAGAAACCGTT CGTGTGTG	MTOR	OBD169_093.OBD1 69_095	0
25	OBD169_099	GGCAAGGGACCACTC TTAGTCTGC	MTOR	OBD169_097.OBD1 69_099	0
26	OBD169_103	TCCCCTTATCAACCA ACTCGGGC	MTOR	OBD169_101.OBD1 69_103	0.003937173
27	OBD169_107	TTGGTGGTCAGGACT GGAGTGCC	PCDHGC5	OBD169_105.OBD1 69_107	0.029250039
28	OBD169_111	CTGCTTGGGCTGGTC TTTGTTG	MTOR	OBD169_109.OBD1 69_111	0
29	OBD169_115	TCCCCTTATCAACCA ACTCGGGC	MTOR	OBD169_113.OBD1 69_115	0
30	OBD169_119	GAGGTCAAGGGAAGA GACAGGGA	PCDHGC5	OBD169_117.OBD1 69_119	0
31	OBD169_123	TGTGGAATGAGCCTC CGTCCCTG	CABLES1	OBD169_121.OBD1 69_123	0
32	OBD169_127	CATTCTGGTATCGT GTTGCCGC	CABLES1	OBD169_125.OBD1 69_127	0.005994639
33	OBD169_131	CCAGAACATCTCTTC GTGGTGGG	CABLES1	OBD169_129.OBD1 69_131	0
34	OBD169_135	GATGCTGTCCCTGTG CTATGAGC	SREBF2	OBD169_133.OBD1 69_135	0.161924686
35	OBD169_139	GTCATCAACACTCTTT CCCTGCTCCT	MLLT3	OBD169_137.OBD1 69_139	0
36	OBD169_143	CCATTGCCTGAATCC TCCCTGGC	FOCAD	OBD169_141.OBD1 69_143	0
37	OBD169_147	TGAGGGCTGGCTGGG CATTCATA	MLLT3	OBD169_145.OBD1 69_147	0
38	OBD169_151	GTCATCAACACTCTTT CCCTGCTCCT	MLLT3	OBD169_149.OBD1 69_151	0
39	OBD169_155	CAGCCCCAATCCCAT CCAGAATCCA	FOCAD	OBD169_153.OBD1 69_155	0
40	OBD169_159	CTGTGATTCCCTTGTT ATGGTTTTGA	ATG5	OBD169_157.OBD1 69_159	0
41	OBD169_163	GCCTCTGTCCTGTGT GTTATGAAACT	ATG5	OBD169_161.OBD1 69_163	0
42	OBD169_167	CTACAAGGGAAGTGC CTGCTTCGCTA	FAF1	OBD169_165.OBD1 69_167	0

10

20

30

40

50

43	OBD169_171	AACAGGCTTACCTCT TCGGACTGCTC	KITLG	OBD169_169.OBD1 69_171	0.063674679
44	OBD169_175	CTCCTCAAAGAGAGA GCCTTCCCG	CREB3L2	OBD169_173.OBD1 69_175	0
45	OBD169_179	GCGTGTGAGAGAGGA GATAAATGGAT	CREB3L2	OBD169_177.OBD1 69_179	0.013500095
46	OBD169_183	CTGGCTGGCTCTTGA CTTTGCTATTG	CREB3L2	OBD169_181.OBD1 69_183	0
47	OBD169_187	AACCTCCTCAAAGAG AGAGCCTTCCC	CREB3L2	OBD169_185.OBD1 69_187	0.248790766
48	OBD169_191	CCTCCTGTATTTCTAC TTCCACTCAG	CREB3L2	OBD169_189.OBD1 69_191	0
49	OBD169_195	GACTGATTGTAGGAG GACTCACAGAT	CREB3L2	OBD169_193.OBD1 69_195	0
50	OBD169_199	CCTCCTGTATTTCTAC TTCCACTCAG	CREB3L2	OBD169_197.OBD1 69_199	0
51	OBD169_203	ATCATTGGTTTGGAGT GACAACTACT	FOXO1	OBD169_201.OBD1 69_203	0
52	OBD169_207	GGTAGTGTCTGTTTTT TGGACTTTAC	FOXO1	OBD169_205.OBD1 69_207	0
53	OBD169_211	GGTGTGGGTGTGTAA GAGGGACC	SPECC1L	OBD169_209.OBD1 69_211	0
54	OBD169_215	CTGCCTCCAGAAGGT GTCTCAGA	SPECC1L	OBD169_213.OBD1 69_215	0
55	OBD169_219	TACAGAAAGCCCTCG CTGGGAGC	SPECC1L	OBD169_217.OBD1 69_219	0
56	OBD169_223	AGGGTGTGGGTGTGT AAGAGGGA	SPECC1L	OBD169_221.OBD1 69_223	0
57	OBD169_227	CCACTGTGCCCTGGA TGAGAGAAC	SPECC1L	OBD169_225.OBD1 69_227	0
58	OBD169_231	GGTGTGGGTGTGTAA GAGGGACC	SPECC1L	OBD169_229.OBD1 69_231	-0.042293888
59	OBD169_235	TTGAGGGCAGAGCAG GAAGGGTG	SPECC1L	OBD169_233.OBD1 69_235	0.052029568
60	OBD169_239	GGGATACCCAGAGAG AAGGGCAAG	IFNGR2	OBD169_237.OBD1 69_239	0
61	OBD169_243	AGACCTGAGGAAGGA GGGTGGAC	IFNGR2	OBD169_241.OBD1 69_243	0.043975004
62	OBD169_247	GTGAGAGGCAGAGAC AGCACAGACTA	NFKB1	OBD169_245.OBD1 69_247	0

10

20

30

40

50

63	OBD169_251	GTGAGAGGCAGAGAC AGCACAGACTA	NFKB1	OBD169_249.OBD1 69_251	0
64	OBD169_255	GGTGACTGATGAGAC TCCAGGAAAGT	NFKB1	OBD169_253.OBD1 69_255	0
65	OBD169_259	GCCTAAACTTTCTCTC TCAGTCAGCG	NFKB1	OBD169_257.OBD1 69_259	0.01527689
66	OBD169_263	GCCTCTGTCATTCGT GCTTCCAGTGT	NFKB1	OBD169_261.OBD1 69_263	0
67	OBD169_267	GCCTAAACTTTCTCTC TCAGTCAGCG	NFKB1	OBD169_265.OBD1 69_267	0.141700302
68	OBD169_271	TGTTACGCACAACC TCGGCTCTG	NFKB1	OBD169_269.OBD1 69_271	0
69	OBD169_275	GCAGCCTTTGGCAGC ACTCTCTG	NFKB1	OBD169_273.OBD1 69_275	0
70	OBD169_279	CCCAGAACTTTGCT AACTCCTATTG	MAPK10	OBD169_277.OBD1 69_279	-0.097352472
71	OBD169_283	GCCTCTGTCATTCGT GCTTCCAGTGT	NFKB1	OBD169_281.OBD1 69_283	0
72	OBD169_287	GCCTCTGTCATTCGT GCTTCCAG	NFKB1	OBD169_285.OBD1 69_287	0
73	OBD169_291	AAGTGCCTGTTTTATG GAGAACTGGC	F9	OBD169_289.OBD1 69_291	0
74	OBD169_295	CCCTTCTGGAAGTGG ATGAGCCC	F9	OBD169_293.OBD1 69_295	0
75	OBD169_299	CACAGCCGAAGAGCC ACTGAAGC	BTK	OBD169_297.OBD1 69_299	0

【 0 2 8 9 】

【表 9】

表9. a

N	プローブ	マーカー	GLMNET
1	ORF1_1_1034282_1037357_1049484_1054771_F F	OBD169_001.OBD169_ 003	0.150341207
2	ORF5_1_1182474_1185271_1270569_1273244_R F	OBD169_009.OBD169_ 011	-0.065057056
3	ORF5_1_1147651_1150121_1196191_1197234_R F	OBD169_021.OBD169_ 023	0
4	ORF5_1_1146367_1147651_1165983_1167502_F F	OBD169_033.OBD169_ 035	0
5	ORF5_1_1196191_1197234_1230936_1232838_R R	OBD169_041.OBD169_ 043	0.122625202
6	ORF5_1_1270569_1273244_1300933_1312034_F F	OBD169_049.OBD169_ 051	-0.050953035

10

20

30

40

50

7	ORF5_1_1196191_1197234_1289361_1294150_F F	OBD169_061.OBD169_ 063	0.127785257
8	ORF5_1_1140030_1142517_1230936_1232838_R R	OBD169_065.OBD169_ 067	-6.18144E-06
9	ORF5_1_1230936_1232838_1273244_1276010_R R	OBD169_073.OBD169_ 075	0
10	ORF41_2_36413514_36415342_36452868_36458 269_RR	OBD169_105.OBD169_ 107	0.029250039
11	ORF91_7_65032142_65033242_65065127_65067 650_FF	OBD169_125.OBD169_ 127	0.005994639
12	ORF91_7_65037215_65039217_65065127_65067 650_RF	OBD169_129.OBD169_ 131	0
13	ORF9_10_23456592_23460302_23494817_23496 168_RR	OBD169_133.OBD169_ 135	0.161924686
14	ORF16_11_40371218_40374048_40393587_4039 5559_RF	OBD169_153.OBD169_ 155	0
15	ORF31_15_29619588_29621525_29646237_2964 8560_RR	OBD169_165.OBD169_ 167	0
16	ORF30_15_10476260_10484217_10545581_1054 8270_RR	OBD169_169.OBD169_ 171	0.063674679
17	ORF32_16_10747182_10750815_10792291_1079 4979_RF	OBD169_185.OBD169_ 187	0.248790766
18	ORF70_26_27894296_27895372_27963114_2796 5001_RR	OBD169_229.OBD169_ 231	-0.042293888
19	ORF70_26_27890569_27893929_27906620_2790 9025_RR	OBD169_233.OBD169_ 235	0.052029568
20	ORF79_32_24013860_24017127_24028587_2403 0780_RR	OBD169_265.OBD169_ 267	0.141700302
21	ORF82_32_9652472_9664654_9692674_9698030 _RR	OBD169_277.OBD169_ 279	-0.097352472
22	ORF104_X_109508063_109510622_109526507_1 09531763_FF	OBD169_293.OBD169_ 295	0

10

20

30

40

50

表9. b

N	Freq	ランク中央値	P値平均	P値中央値	分類
1	429	14	0.061922326	0.036945939	リンパ腫に存在
2	156	171.75	0.722387112	1	健常対照に存在
3	155	29.75	0.137404255	0.119176434	リンパ腫に存在
4	278	14.75	0.076727087	0.075561315	リンパ腫に存在
5	300	22.25	0.11481488	0.111802994	リンパ腫に存在
6	262	107.5	0.614169025	0.608053733	健常対照に存在
7	375	16.5	0.07087785	0.048199002	リンパ腫に存在
8	112	168.5	0.749906059	1	健常対照に存在
9	115	28	0.185541633	0.104567082	リンパ腫に存在
10	262	16.25	0.099987147	0.048199002	リンパ腫に存在
11	300	22.75	0.163342682	0.089691605	リンパ腫に存在
12	130	33.5	0.190563594	0.148661263	リンパ腫に存在
13	406	18	0.093426309	0.075561315	リンパ腫に存在
14	270	23.25	0.114536951	0.056118783	リンパ腫に存在
15	135	23.5	0.159941064	0.104567082	リンパ腫に存在
16	452	7	0.034141832	0.02207464	リンパ腫に存在
17	498	2	0.009682876	0.006340396	リンパ腫に存在
18	225	97.75	0.608040664	0.516296715	健常対照に存在
19	357	9.25	0.060876258	0.035136821	リンパ腫に存在
20	451	12	0.055525573	0.036945939	リンパ腫に存在
21	225	94.5	0.550385123	0.521495378	健常対照に存在
22	257	32.5	0.167821507	0.104567082	リンパ腫に存在

【 0 2 9 0 】

【表 1 0】

表10. 前立腺がんリスク群カテゴリ

カテゴリ	リスク	PSA (ng/ml)	グリソンスコア	T ステージ
1	低リスク	< 10	≤6	T1 – T2a
2	中リスク	10–20	7	T2b
3	高リスク	>20	8–10	T2c*, T3 または T4

*NCCNガイドライン2018改訂によれば、T2cは中リスクとみなされる。

略語 PSA: 前立腺特異的抗原

【 0 2 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 11. 前立腺がんの診断に使用される5マーカースグネチャ

マーカー	遺伝子記号	遺伝子名	P値
PCa.57.59	ETS1	ETSがん原遺伝子1、転写因子	0.11
		ミトジェン活性化タンパク質キナーゼキナー	0.11
PCa.81.83	MAP3K14	ゼキナーゼ14	
PCa.73.75	SLC22A3	溶質キャリアファミリー22 メンバー3	0.107
PCa.77.79	SLC22A3	溶質キャリアファミリー22 メンバー3	0.005
PCa.189.191	CASP2	カスパーゼ2	0.137

10

【 0 2 9 2】

【表 1 2】

表 12.

病理およびEpiSwitch(商標)の結果の比較

	病理結果	
	PCa	健常
EpiSwitch (商標) 診断		
PCa	8	2
健常	2	8

20

盲検サンプル(n=20)の分類からの結果

統計	値	95% CI
感度	80.00%	44.39%—97.48%
特異度	80.00%	44.39%—97.48%
陽性尤度比	4.00	1.11 — 14.35
陰性尤度比	0.25	0.07 — 0.90
罹患率 (*)	50.00%	27.20%—72.80%
陽性予測値 (*)	80.00%	52.71%—93.49%
陰性予測値 (*)	80.00%	52.71%—93.49%

30

(*) これらの値は、罹患率に依存する。

略語 95% CI: 95% 信頼区間

【 0 2 9 3】

40

50

表 13. 高リスクカテゴリー3 vs 低リスクカテゴリー1に関するマーカーおよび高リスクカテゴリー3 vs 中リスクカテゴリー2に関するマーカー

高リスクカテゴリー3 vs 低リスクカテゴリー1に関するバイオマーカー			高リスクカテゴリー3 vs 中リスクカテゴリー2に関するバイオマーカー		
遺伝子座	遺伝子位置	マーカー	遺伝子座	遺伝子位置	マーカー
6_7724582_7733496_7801590_7806316_FF	BMP6	PCa.119.37.39	1_119912462_119915175_119959754_119963670_RR	HSD3B2	PCa.119.129.131
21_39895678_39899145_39984806_39991905_RF	ERG	PCa.119.65.67	4_177629821_177639626_177740221_177743175_FR	VEGFC	PCa.119.205.207
8_16195878_16203315_16396849_16400398_FF	MSR1	PCa.119.77.79	12_99061113_99062942_99098781_99108240_FF	APAF1	PCa.119.49.51
1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	MUC1	PCa.119.121.123	1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	MUC1	PCa.119.121.123
11_107955219_107960166_108013361_108018367_FF	ACAT1	PCa.119.57.59	11_107955219_107960166_108013361_108018367_FF	ACAT1	PCa.119.57.59
9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	DAPK1	PCa.119.165.167	9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	DAPK1	PCa.119.165.167

陰影をつけた最後の3つのマーカーは共通している。

略語 ACAT1: アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ1; APAF1: アポトーシスペプチダーゼ活性化因子1; BMP6: 骨形成タンパク質 6; DAPK1: 細胞死関連タンパク質キナーゼ1; ERG: ETS 転写因子ERG; HSD3B2: ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ, 3 ベーターおよびステロイドデルター-イソメラーゼ2; MSR1: マクロファージスカベンジャー受容体1; MUC1: ムチン1, 細胞表面関連; VEGFC: 血管内皮細胞増殖因子C

表14. 一定の範囲のアッセイ感度での血液および一致する原発性前立腺腫瘍における同様のエピジェネティックマーカーの検出

遺伝子位置	マーカー	血液サンプル										組織サンプル									
		患者					1					1					3				
		カテゴリー					A					A					A				
		患者					A					A					A				
BMP6	PCa.119.37.39	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	4
ERG	PCa.119.65.67	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	3
MSR1	PCa.119.77.79	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2
MUC1	PCa.119.121.123	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
DAPK1	PCa.119.165.167	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2
ACAT1	PCa.119.57.59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
HSD3B2	PCa.119.129.131	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	4
VEGFC	PCa.119.205.207	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
APAF1	PCa.119.49.51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	4

正しいサイズのPCRバンドが検出された場合、スコア1が与えられる。バンドが検出されなかった場合、スコア0が与えられる。

略語 ACAT1: アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ1; APAF1: アポトーシスベプチダーゼ活性化因子1; BMP6: 骨形成タンパク質6;

DAPK1: 細胞死関連タンパク質キナーゼ1; ERG: ETS転写因子 ERG; HSD3B2: ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ, 3

ペーターゼおよびステロイドデルター-インメラゼ2; MSR1: マクロファージスカベンジャー受容体1; MUC1: ムチン1, 細胞表面関連;

VEGFC: v血管内皮細胞増殖因子C

カテゴリーに関するマーカー

3 vs 1

3 vs 1

3 vs 2

3 vs 2

【表 1 5】

表15.

カテゴリー3 vs 1分類子に関する病理およびEpiSwitch(商標)結果の比較

EpiSwitch(商標)診断	病理結果	
	カテゴリー1	カテゴリー3
カテゴリー1	39	5
カテゴリー3	3	20

10

カテゴリー3 vs 1分類子についての盲検サンプル(n=67)の分類からの結果

統計	値	95% CI
感度	80.00%	59.30%—93.17%
特異度	92.86%	80.52%—98.50%
陽性尤度比	11.20	3.70 — 33.91
陰性尤度比	0.22	0.10 — 0.47
罹患率 (*)	37.31%	25.80%—49.99%
陽性予測値 (*)	86.96%	68.77%—95.28%
陰性予測値 (*)	88.64%	78.00%—94.49%

20

(*) これらの値は、罹患率に依存する。

略語 95% CI: 95%信頼区間

【0 2 9 6】

30

40

50

【表 1 6】

表16.

カテゴリー3 vs 2分類子に関する病理およびEpiSwitch(商標)結果
の比較

EpiSwitch(商標)診断	病理結果	
	カテゴリー2	カテゴリー3
カテゴリー2	16	4
カテゴリー3	2	21

10

カテゴリー3 vs 2分類子についての盲検サンプル(n=43)の分類からの
結果

統計	値	95% CI
感度	84.00%	63.92%—95.46%
特異度	88.89%	65.29%—98.62%
陽性尤度比	7.56	2.02 — 28.24
陰性尤度比	0.18	0.07 — 0.45
罹患率 (*)	58.14%	42.13%—72.99%
陽性予測値 (*)	91.30%	73.76%—97.51%
陰性予測値 (*)	80.00%	61.62%—90.88%

20

(*)これらの値は、罹患率に依存する。

略語 95% CI: 95%信頼区間

【 0 2 9 7】

30

40

50

【表 1 7】

表17. 試験に参加した患者の臨床的特徴付け

特徴付け	カテゴリ	患者数
グリソンスコア	≤6	39
	7	54
	8-10	29
	不明	18
	中央値	7
ステージ	1	36
	2	49
	3	25
	4	14
	不明	16
年齢	45-54	12
	55-64	21
	65-74	44
	75+	63
	不明	0
PSA	<10	55
	10-20	23
	>20	51
	不明	11
	中央値	12.2
転移患者		21

略語 PSA: 前立腺特異的抗原

【 0 2 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 18】

表 18. 初期のアレイにおいてテストされた425個の前立腺がん関連遺伝子座のリスト

遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数
ABHD3	20	CALR	15	CREBBP	20	EPS15	111
ABR	20	CAP1	20	CSE1L	20	ERBB2	20
ACAT1	20	CARS	20	CSF2	11	ERBB3	20
ACPP	20	CASP2	20	CSF2RA	3	ERBB4	200
ACTA1	20	CASP3	20	CSNK1A1	20	ERG	67
ACTR2	20	CASP9	20	CTBP1	20	ERRFI1	20
ACTR3	20	CAV1	20	CTNNA1	43	ESR1	200
ADAM9	20	CBL	20	CTNNB1	45	ESR2	20
ADRB2	20	CCDC67	31	CTNND1	20	ETS1	105
AGAP2	15	CCND1	20	CXCL16	19	ETV1	47
AIP	9	CCND2	20	CXCR1	20	ETV4	20
AKT1	20	CCNE1	20	CXCR2	19	ETV5	20
AKT2	20	CCNJ	6	CXCR4	20	EZH2	31
AKT3	122	CD244	20	CXCR6	19	FASN	20
AMACR	20	CD4	20	CYCS	18	FGD4	52
AP2M1	20	CD44	75	CYP17A1	20	FGF19	20
APAF1	26	CD82	20	CYP19A1	149	FGF2	39
APC	37	CD8A	20	CYP1B1	19	FGF6	20
AR	115	CDC25A	20	DAND5	20	FGF8	10
ARAF	20	CDC25B	20	DAPK1	56	FGFR1	20
ARNT	20	CDC25C	20	DDIT4	16	FGFR4	12
ARTN	20	CDC37	20	DOK4	20	FHL2	20
ASAH1	20	CDC45	20	DPP4	103	FLNA	9
ATM	54	CDH1	20	E2F1	20	FLT1	97
AXIN1	20	CDK2	2	E2F4	20	FLT4	10
AXL	20	CDK4	20	EDN1	20	FN1	20
BAD	20	CDK6	111	EDNRA	35	FOLH1	35
BCAR1	28	CDKN1A	20	EED	20	FOSB	11
BCL2L1	20	CDKN1B	20	EGF	26	FOXA1	18
BCORL1	20	CDKN2A	20	EGFR	200	FOXO1	21
BGLAP	11	CDKN2B	16	EIF4E	20	FOXO3	139
BIRC5	4	CDKN2C	10	EIF4EBP1	20	FOXP1	200
BMI1	20	CDKN2D	20	EIF6	20	FZD1	18
BMP6	71	CENPBD1	7	ELAC2	20	GAB1	107
BMP7	20	CHAMP1	20	ENPP2	74	GAS6	20
BRAF	20	CHEK2	20	EP300	20	GLIPR1	15
BRCA1	20	CHUK	29	EPHA2	20	GNRH1	20
BRCA2	20	CLU	28	EPHB4	20	GNRHR	3
CA1	20	COMMD3 -BMI1	20	EPHB6	6	GRB2	20

10

20

30

40

50

遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数
GSK3B	92	KLK4	17	MIR34A	20	NFKB1	66
GSTP1	20	KRAS	20	MIR361	20	NFKBIA	20
HDAC1	20	LPAR1	30	MIR365A	5	NGF	21
HDAC3	20	LPAR2	5	MIR376A1	9	NKX3-1	20
HGF	27	LPAR3	31	MIR454	11	NOVA1	34
HIF1A	20	LPAR4	5	MIR500A	20	NOX5	43
HIPK2	20	LRP5	20	MIR582	3	NPDC1	1
HRAS	6	LRP6	35	MIR619	20	NR0B1	10
HSD3B1	20	MAGEA11	20	MIR636	20	NR3C1	25
HSD3B2	20	MAP2K1	20	MIR648	20	NR4A3	20
HSP90AA1	20	MAP2K2	20	MIR671	20	NRAS	20
HSP90AB1	20	MAP2K5	196	MIR766	15	NRIP1	69
HSPA1A	20	MAP3K14	20	MIR877	13	NTF3	31
HSPB1	20	MAP3K2	24	MIR887	18	NTRK1	20
IGF1	20	MAPK1	20	MIR93	20	PA2G4	20
IGF1R	102	MAPK3	20	MIR98	17	PAQR7	20
IGFBP3	14	MAPKAP1	31	MIRLET7G	3	PAX8	20
IGFBP5	20	MCM7	20	MLST8	2	PCBP2	20
IL16	82	MDM2	20	MMP14	20	PCYT1A	20
IL2	2	MDM4	23	MMP9	20	PDGFA	20
IL6	20	MED1	20	MSMB	20	PDGFB	20
IL6R	20	MEN1	20	MSR1	200	PDGFRA	24
IL8	17	MET	105	MTA1	1	PDGFRB	20
INPPL1	20	MIF	12	MTCH1	20	PDPK1	20
INS	17	MIR125B1	4	MTOR	32	PIAS1	89
IRAK1	20	MIR149	3	MTRR	20	PIAS2	21
IRS1	20	MIR151A	31	MUC1	7	PIAS3	20
ITK	24	MIR152	15	MYB	20	PIAS4	20
JAK1	20	MIR16-1	20	MYC	20	PIK3C2A	20
JAK2	20	MIR183	20	NCOA1	170	PIK3C2B	21
JAK3	20	MIR197	7	NCOA2	200	PIK3C2G	200
JUN	20	MIR204	20	NCOA3	20	PIK3CA	20
KAT7	20	MIR222	6	NCOA4	18	PIK3CB	21
KCNH2	20	MIR224	20	NCOR1	35	PIK3CD	20
KDM6B	20	MIR23B	20	NCOR2	26	PIK3CG	20
KIT	107	MIR24-2	20	NEDD4	85	PIK3R1	81
KLF4	20	MIR26B	3	NEDD4L	128	PIK3R2	20
KLK2	20	MIR27B	20	NET1	20	PLD1	189
KLK3	8	MIR335	20	NF1	190	PLD2	20

10

20

30

40

50

遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数	遺伝子名	アレイ プローブ数
PLD3	20	PXN	20	SFTPA1	20	TGFB1I1	20
PML	20	RAB9B	16	SFTPA2	8	TGFB2	75
POU2F1	26	RAD51	9	SHC1	11	TGFB3	15
POU2F2	20	RAF1	20	SIRT1	20	TGFBR1	20
PPP1CA	20	RAN	20	SKP2	16	TGFBR2	65
PPP2CA	20	RB1	82	SLC22A3	56	TIMP1	20
PRKCA	148	RCHY1	20	SMAD3	20	TMF1	20
PRKCB	176	REL	25	SMAD4	67	TMPRSS2	36
PRKCD	20	RGS6	200	SMARCE1	20	TNK2	20
PRKCG	20	RHEB	20	SOAT1	20	TOP2A	20
PRKCH	200	RHOA	20	SOS1	103	TOP2B	24
PRKCI	43	RICTOR	38	SOX9	20	TP53	15
PRKCQ	59	RNASEL	13	SP1	20	TRAF3	20
PRKCZ	20	RNF14	20	SPDEF	17	TRAF6	20
PRSS3	23	RNF20	20	SPINK1	20	TSC1	20
PRSS8	20	RNF40	20	SPOPL	20	TSC2	2
PSAP	20	ROCK1	67	SRC	20	TUBB	4
PSCA	20	ROR2	193	SRD5A1	13	VEGFA	20
PSG1	19	RPS6KA1	20	SRD5A2	79	VEGFC	57
PTEN	23	RPS6KB1	20	SRD5A3	20	VIM	9
PTGS2	20	RPTOR	68	SREBF1	20	WAS	12
PTK2B	54	RREB1	85	SRY	3	WNT1	20
PTK7	20	RYBP	20	STAT3	20	WNT2	40
PTPN11	20	S100A4	20	SUZ12	20	WNT3	20
PTPN12	20	S100P	20	SVIL	51	WNT5A	23
PTPN14	135	SAGE1	20	TBC1D8	43	ZAP70	20
PTPRF	20	SATB1	20	TERT	20	ZFAND1	20
PTPRR	200	SCGB1A1	20	TGFB1	20	ZMYND10	20
PTPRT	200					合計	14241

【 0 2 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

ブロープ	遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	バイナリ
ACAT1_11_107955219_107960166_108018367_FF	ACAT1	-0.436725529	-0.436725529	-11.90723067	1.37E-07	3.10E-05	8.114204006	0.738809576	-1.353528748	-1
ACTA1_1_229547333_229551721_229600994_229605798_FR	ACTA1	0.417850291	0.417850291	8.736657363	2.98E-06	0.000260244	5.025483662	1.335935441	1.335935441	1
AKT3_1_243680126_243690814_243948602_243948601_FR	AKT3	0.652970743	0.652970743	16.8960264	3.63E-09	3.08E-06	11.560433	1.572402697	1.572402697	1
AKT3_1_243680126_243690814_243915703_243918596_FR	AKT3	0.598435451	0.598435451	11.73324265	1.59E-07	3.45E-05	7.966660757	1.514073719	1.514073719	1
AKT3_1_243680126_243690814_243727939_243733240_FF	AKT3	0.520843747	0.520843747	19.9294303	6.33E-10	1.07E-06	13.10148999	1.434794129	1.434794129	1
AKT3_1_243680126_243690814_243860421_243862288_FR	AKT3	0.410316196	0.410316196	12.44251976	8.76E-08	2.55E-05	8.554504322	1.328977055	1.328977055	1
APAF1_12_99061113_99062942_9908781_99108240_FF	APAF1	-0.441488336	-0.441488336	-13.23940926	4.63E-08	1.71E-05	9.174110234	0.736374546	-1.358004571	-1
APC_5_112020873_112029146_112079758_112082452_FF	APC	0.399930381	0.399930381	6.922678201	2.63E-05	0.000993557	2.789251424	1.319444238	1.319444238	1
AR_X_66792540_66795953_66818342_66825862_RF	AR	-0.33854166	-0.33854166	-6.221155823	6.77E-05	0.001660581	1.810263084	0.790840324	-1.264477758	-1
AR_X_66736338_66750729_66875649_66881776_RR	AR	0.760948793	0.760948793	21.04618466	3.54E-10	7.78E-07	13.59167252	1.694604721	1.694604721	1
AR_X_66736338_66750729_66906874_66911452_RR	AR	0.563742659	0.563742659	20.89428568	3.82E-10	7.78E-07	13.52715233	1.478098751	1.478098751	1
AR_X_66750729_66754087_66950367_66956132_FR	AR	0.528294859	0.528294859	9.248783162	1.71E-06	0.000187011	5.588100983	1.442223604	1.442223604	1
AR_X_66818342_66825862_66950367_66956132_FF	AR	0.388697407	0.388697407	10.14296783	6.90E-07	9.11E-05	6.507167389	1.309210798	1.309210798	1
AR_X_66911452_66916150_66950367_66956132_RR	AR	0.377269056	0.377269056	7.449040178	1.34E-05	0.000639022	3.480123787	1.298880815	1.298880815	1
AR_X_66736338_66750729_66875649_66881776_FR	AR	0.370736884	0.370736884	5.172651841	0.000316014	0.004216579	0.210960602	1.293013093	1.293013093	1
ATM_11_108112750_108115594_108208085_108223747_FR	ATM	-0.370811815	-0.370811815	-8.707610279	3.07E-06	0.000260244	4.997731905	0.773347206	-1.293080251	-1
ATM_11_108155279_108156687_108208085_108223747_RR	ATM	0.363186489	0.363186489	6.602286154	4.02E-05	0.001238401	2.350592936	1.28626374	1.28626374	1
BMP6_6_7724582_7733496_7801590_7806316_FF	BMP6	-0.468602239	-0.468602239	-8.973309325	2.30E-06	0.000229279	5.288915333	0.722564415	-1.383768149	-1
BMP6_6_7724582_7733496_7743581_7746369_FR	BMP6	-0.388036314	-0.388036314	-5.889142945	0.000108497	0.002198909	1.322801574	0.764169025	-1.30861101	-1
CD44_11_35172600_35178637_35204720_35210484_FR	CD44	-0.398048925	-0.398048925	-5.668665177	0.000149604	0.002652749	0.990360448	0.758883891	-1.317724638	-1
CDH1_16_68794947_68799115_68857468_68863222_FR	CDH1	0.49540487	0.49540487	10.65592887	4.22E-07	6.84E-05	7.000965624	1.409716315	1.409716315	1
CTNNA1_3_41228301_41234483_41281934_41304993_FR	CTNNA1	0.427937487	0.427937487	10.8349435	3.57E-07	6.15E-05	7.167935447	1.345308914	1.345308914	1
DPP4_2_162933505_162942299_162961246_162964936_FR	DPP4	-0.512949291	-0.512949291	-14.57522664	1.71E-08	1.09E-05	10.1259903	0.700788356	-1.426964348	-1
DPP4_2_162946178_162949954_162972154_162979139_RF	DPP4	-0.445665864	-0.445665864	-3.573437421	0.004427816	0.023189841	-2.491256189	0.734245353	-1.361942565	-1
EGFR_7_55080257_55086091_55224588_55235839_RR	EGFR	-0.493404965	-0.493404965	-11.0577665	2.91E-07	5.37E-05	7.372042198	0.710346599	-1.407763479	-1
EP315_1_51804255_51813510_51945087_51946855_FF	EP315	0.386206462	0.386206462	8.69890643	3.10E-06	0.000260244	4.982882133	1.306952276	1.306952276	1
ERBB4_2_213060845_213063716_213336205_213346911_FR	ERBB4	-0.681305564	-0.681305564	-14.78217408	1.48E-08	1.00E-05	10.26456915	0.623600693	-1.603590265	-1

10

20

30

40

50

表 19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

ブローブ	遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	ハイリ
ERBB4_2_212789287_212796405_212962659_212969505_FR	ERBB4	-0.435496836	-0.435496836	-5.826671395	0.000118755	0.002319347	1.229315586	0.739439062	-1.352376485	-1
ERBB4_2_213052672_213059531_213336205_213346911_FR	ERBB4	-0.425728775	-0.425728775	-12.76218491	6.75E-08	2.15E-05	8.808033687	0.7444462573	-1.343250872	-1
ERBB4_2_212789287_212796405_212846041_212850086_RF	ERBB4	-0.356744537	-0.356744537	-6.538422232	4.38E-05	0.001298756	2.261469357	0.780924761	-1.280533093	-1
ERBB4_2_212556994_212565232_212622803_212628844_FR	ERBB4	0.689270832	0.689270832	10.79286971	3.71E-07	6.29E-05	7.128763987	1.611351047	1.611351047	1
ERBB4_2_213182054_213190315_213317793_213323368_RR	ERBB4	0.447473513	0.447473513	10.33352546	5.73E-07	8.45E-05	6.693320715	1.363650103	1.363650103	1
ERBB4_2_212622803_212628844_212789287_212796405_RF	ERBB4	0.416082272	0.416082272	5.631318317	0.000158077	0.002758619	0.931355245	1.334299258	1.334299258	1
ERBB4_2_213151813_213159540_213182054_213190315_FF	ERBB4	0.378653461	0.378653461	3.217386637	0.008284402	0.035699071	-3.122923982	1.300308063	1.300308063	1
ERBB4_2_212556994_212565232_212858137_212868453_FF	ERBB4	0.359671724	0.359671724	6.923758849	2.62E-05	0.000993557	2.790707369	1.283133896	1.283133896	1
ERG_21_39895678_39899145_39984806_39991905_RF	ERG	-0.425291613	-0.425291613	-11.67074071	1.68E-07	3.57E-05	7.913111034	0.744688192	-1.342843905	-1
ESR1_6_152151654_152158599_152307023_152319013_RF	ESR1	-0.334294612	-0.334294612	-9.744626114	1.03E-06	0.000124223	6.107253454	0.793171853	-1.260760825	-1
ETS1_11_128387417_128389914_128489818_128498866_FF	ETS1	-0.529524556	-0.529524556	-8.680536392	3.17E-06	0.000260244	4.562121749	0.692783005	-1.443453423	-1
ETS1_11_128431527_128436474_128489818_128498866_RF	ETS1	-0.370215655	-0.370215655	-5.977392038	9.56E-05	0.002017625	1.453907443	0.77366684	-1.292546027	-1
ETS1_11_128342943_128345136_128399358_128409879_FF	ETS1	-0.344088814	-0.344088814	-4.169479623	0.001593588	0.012099379	-1.449395395	0.787805386	-1.269349026	-1
ETS1_11_128342943_128345136_128489818_128498866_FF	ETS1	-0.342780154	-0.342780154	-4.97505672	0.000429841	0.005055727	-0.100832117	0.788520324	-1.26819813	-1
ETV1_7_13928482_13938998_14075713_14080964_FR	ETV1	-0.438646448	-0.438646448	-12.61661413	7.60E-08	2.29E-05	8.693428053	0.737826521	-1.355332144	-1
ETV1_7_13928482_13938998_14040827_14042620_FR	ETV1	-0.420116215	-0.420116215	-7.525930383	1.22E-05	0.000603601	3.57803973	0.747364419	-1.338035334	-1
FOLH1_11_49157869_49163274_49234427_49241370_FF	FOLH1	-0.327026922	-0.327026922	-4.300654557	0.001279787	0.010350202	-1.224472556	0.7971776	-1.254425613	-1
FOLH1_11_49214976_49217503_49234427_49241370_RF	FOLH1	0.418767287	0.418767287	6.637609483	3.83E-05	0.00120659	2.399644945	1.336784849	1.336784849	1
FOLH1_11_49157869_49163274_49193665_49198286_RR	FOLH1	0.359712744	0.359712744	10.54139329	4.70E-07	7.47E-05	6.892707121	1.28317038	1.28317038	1
GLPR1_12_75847260_75849629_75907812_75913956_FR	GLPR1	-0.345396052	-0.345396052	-5.155710032	0.000324389	0.004293149	0.189996553	0.787091873	-1.270499715	-1
GSK3B_3_119542459_119548768_119722182_119724690_FR	GSK3B	0.449273935	0.449273935	10.95895529	3.18E-07	5.68E-05	7.282033839	1.365352943	1.365352943	1
HGF_7_81320024_81325883_81430055_81434910_FF	HGF	-0.43281007	-0.43281007	-4.979466125	0.000426875	0.00504444	-0.093681464	0.740817421	-1.349860265	-1
IGFBP5_2_217560127_217567417_217584428_217589578_FR	IGFBP5	0.375003854	0.375003854	12.14650233	1.12E-07	2.78E-05	8.313515985	1.296843019	1.296843019	1
IL16_15_81429756_81433873_81539851_81547011_FR	IL16	-0.481896248	-0.481896248	-9.127530593	1.95E-06	0.000208593	5.457383883	0.716035863	-1.396578093	-1
IL6_7_22721376_22727129_22765455_22766829_FR	IL6	0.364631786	0.364631786	4.801938715	0.00056537	0.005957969	-0.383664127	1.28755297	1.28755297	1
JUN_1_59244918_59246918_59258836_59260597_RF	JUN	-0.318607525	-0.318607525	-5.099115371	0.000354116	0.004543222	0.099336736	0.801843436	-1.247126254	-1
MIT_4_55553401_55555465_55610649_55618756_FR	MIT	0.392634635	0.392634635	7.232977499	1.76E-05	0.000779657	3.200921573	1.312788617	1.312788617	1

10

20

30

40

50

表 19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

ブロープ	遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	ハイリ
KRAS_12_25363357_25368892_25413300_25418096_FF	KRAS	0.414148209	0.414148209	11.99343016	1.28E-07	3.02E-05	8.186481963	1.332511707	1.332511707	1
	IPAR3	-0.38895037	-0.38895037	-13.49428502	3.80E-08	1.61E-05	9.363780155	0.76368502	-1.309440376	-1
IPAR3_1_85307233_85315383_85371057_85373099_RR	IPAR3	0.402766702	0.402766702	11.08898448	2.82E-07	5.32E-05	7.400314167	1.322040801	1.322040801	1
	IPAR3_1_85265679_85268722_85307233_85315383_RR	0.404437029	0.404437029	9.01303797	2.20E-06	0.000221829	5.3325553143	1.323572323	1.323572323	1
MAP2K5_15_67818519_67824995_68067482_68072379_FF	MAP2K5	-0.396294954	-0.396294954	-12.18592711	1.08E-07	2.78E-05	8.345964775	0.759807072	-1.316123575	-1
	MAPKAP1_9_128376452_128376700_128393518_128397379_R	0.373313547	0.373313547	4.540644288	0.000861835	0.007908614	-0.818047279	1.295324487	1.295324487	1
MIR454_17_57199107_57202160_57227315_57228782_FF	MIR454	0.373313547	0.373313547	23.55441003	1.06E-10	5.41E-07	14.56868412	1.673026728	1.673026728	1
	MIR98_X_53595032_53600487_53628991_53630033_RR	0.075111652	0.075111652	13.76185645	3.10E-08	1.43E-05	9.558686586	1.596725728	1.596725728	1
MIR98_X_53608013_53611637_53628991_53630033_RR	MIR98	-0.589823054	-0.589823054	-8.317534796	4.77E-06	0.000337002	4.54380866	0.664424394	-1.50506214	-1
	MSR1_8_16213140_16220021_16405541_16412741_RR	-0.419369028	-0.419369028	-3.516010141	0.004895359	0.024952597	-2.59289798	0.747751587	-1.337342532	-1
MSR1_8_16195878_16203315_16396849_16400398_FF	MSR1	-0.385863508	-0.385863508	-10.14385541	6.89E-07	9.11E-05	6.508042059	0.765304873	-1.306668799	-1
	MSR1_8_16142611_16149459_16195878_16203315_FF	-0.337812738	-0.337812738	-6.009884545	9.13E-05	0.00198016	1.501898146	0.791239998	-1.263839041	-1
MSR1_8_16142611_16149459_16396849_16400398_RF	MSR1	-0.328903769	-0.328903769	-5.188518336	0.000308377	0.004162163	0.242242178	0.796141201	-1.256058596	-1
	MSR1_8_16251114_16260512_16462577_16467449_FF	-0.318902812	-0.318902812	-7.84658429	8.28E-06	0.000473286	3.978390344	0.801679333	-1.247381538	-1
MSR1_8_16195878_16203315_16433596_16442100_FF	MSR1	0.420145921	0.420145921	3.761840375	0.003192302	0.018914227	-2.159017761	1.338062886	1.338062886	1
NCOA1_2_24829718_24833469_24853776_24866328_RR	NCOA1	0.383599799	0.383599799	7.061388057	2.19E-05	0.000893094	2.974854782	1.304593006	1.304593006	1
	NCOA1_2_24696090_24698819_24840193_24848780_RF	0.376458226	0.376458226	8.007884338	6.84E-06	0.000434693	4.175013545	1.298151018	1.298151018	1
NCOA1_2_24672976_24676297_24840193_24848780_RF	NCOA1	0.368303096	0.368303096	8.47574282	3.98E-06	0.000302485	4.72794807	1.290833654	1.290833654	1
	NEDD4L_18_55713082_55720762_55811019_55814883_RR	-0.444311776	-0.444311776	-12.22570821	1.05E-07	2.78E-05	8.378595915	0.734934827	-1.360664869	-1
NEDD4L_18_55713082_55720762_55848311_55850861_RR	NEDD4L	-0.390337066	-0.390337066	-12.14497251	1.12E-07	2.78E-05	8.312254649	0.76295133	-1.310699595	-1
	NEDD4L_18_55713082_55720762_55882560_55885168_RR	-0.37571287	-0.37571287	-12.60684517	7.66E-08	2.29E-05	8.685686665	0.770724485	-1.297480512	-1
NEDD4L_18_55713082_55720762_55869254_55872326_RR	NEDD4L	-0.360925867	-0.360925867	-11.91420916	1.36E-07	3.10E-05	8.120075504	0.778664702	-1.284249816	-1
	NEDD4L_18_55713082_55720762_55774243_55779941_RR	-0.35657074	-0.35657074	-9.240361998	1.73E-06	0.000187011	5.579071341	0.781018843	-1.28037884	-1
NEDD4L_18_55713082_55720762_55961376_55965188_RR	NEDD4L	-0.356380382	-0.356380382	-8.945405461	2.37E-06	0.00023	5.258165908	0.781121902	-1.28020991	-1
	NEDD4L_18_55713082_55720762_55784812_55787427_RR	-0.354821703	-0.354821703	-12.0183087	1.25E-07	3.02E-05	8.207242683	0.781966277	-1.27887526	-1
NEDD4L_18_55713082_55720762_55986600_55989306_RR	NEDD4L	-0.349236239	-0.349236239	-11.79725824	1.51E-07	3.34E-05	8.021205936	0.784999566	-1.273886055	-1

10

20

30

40

50

表 19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

グループ	遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	バイナリ
NEDD4L_18_55713082_55720762_55927256_55929658_RR	NEDD4L	-0.343996768	-0.343996768	-8.731068109	3.00E-06	0.000260244	5.011188722	0.787855651	-1.269268043	-1
NEDD4L_18_55713082_55720762_55950636_55953432_RR	NEDD4L	-0.326323266	-0.326323266	-12.21462858	1.06E-07	2.78E-05	8.36951882	0.797566509	-1.253813932	-1
NEDD4L_18_55713082_55720762_55876126_55882560_RR	NEDD4L	-0.319472154	-0.319472154	-10.93796227	3.24E-07	5.69E-05	7.262808228	0.801363023	-1.24787739	-1
NF1_17_29477103_29483764_29709143_29714529_FR	NF1	0.640366513	0.640366513	17.71768057	2.20E-09	2.49E-06	12.01137937	1.5587251	1.5587251	1
NF1_17_29659279_29666456_29709143_29714529_FR	NF1	0.558103066	0.558103066	14.14945638	2.33E-08	1.29E-05	9.83363673	1.472332041	1.472332041	1
NF1_17_29477103_29483764_29651799_29657368_FF	NF1	0.451959985	0.451959985	13.17645951	4.86E-08	1.71E-05	9.126648681	1.367897363	1.367897363	1
NF1_17_29629862_29634257_29659279_29666456_FF	NF1	0.36665184	0.36665184	7.2650224	1.69E-05	0.000763315	3.242712391	1.289357057	1.289357057	1
NFKB1_4_103436488_103442700_103548256_103555520_FR	NFKB1	0.79980903	0.79980903	13.11977478	5.08E-08	1.72E-05	9.083698686	1.740870671	1.740870671	1
NFKB1_4_103425294_103430395_103548256_103555520_FR	NFKB1	0.430874236	0.430874236	14.09753934	2.42E-08	1.29E-05	9.797304101	1.348050213	1.348050213	1
NOVA1_14_26999345_27006013_27046501_27053973_FR	NOVA1	-0.461947202	-0.461947202	-11.22100125	2.51E-07	5.00E-05	7.519008961	0.726005709	-1.377399637	-1
NOVA1_14_26986332_26987866_27070837_27086602_FF	NOVA1	-0.325885172	-0.325885172	-7.120645256	2.03E-05	0.000844533	3.053363996	0.797808737	-1.253433252	-1
NR4A3_9_102621891_102624499_102636939_102640160_FR	NR4A3	-0.326733183	-0.326733183	-6.549075716	4.32E-05	0.001283905	2.276375868	0.797339926	-1.254170233	-1
PIAS2_18_44419921_44425175_44533399_44538938_FF	PIAS2	-0.376922678	-0.376922678	-4.811482513	0.000556831	0.005918513	-0.367966827	0.770078446	-1.298569003	-1
PIK3C2A_11_17158103_17163660_17253125_17255535_FR	PIK3C2A	-0.412653759	-0.412653759	-9.581839254	1.21E-06	0.000138409	5.939488583	0.751240236	-1.331132109	-1
PIK3C2G_12_18503466_18517448_18605599_18615448_FF	PIK3C2G	-0.397193613	-0.397193613	-6.065111351	8.44E-05	0.001886444	1.58120211	0.759333934	-1.316943647	-1
PIK3C2G_12_18682015_18689955_18755082_18765416_FF	PIK3C2G	-0.349259284	-0.349259284	-7.872086105	8.03E-06	0.000473286	4.009686303	0.784987026	-1.273906404	-1
PIK3C2G_12_18503466_18517448_18653437_18654550_FF	PIK3C2G	0.813156179	0.813156179	32.76884362	3.04E-12	3.10E-08	17.09863144	1.757051136	1.757051136	1
PIK3C2G_12_18503466_18517448_18800920_18805991_FR	PIK3C2G	0.52068763	0.52068763	19.49409228	8.00E-10	1.16E-06	12.9000512	1.434638875	1.434638875	1
PIK3C2G_12_18503466_18517448_18586459_18591749_FR	PIK3C2G	0.500422551	0.500422551	22.08623513	2.12E-10	7.17E-07	14.016338	1.414627832	1.414627832	1
PIK3C2G_12_18503466_18517448_18623979_18629934_FR	PIK3C2G	0.454500507	0.454500507	14.21973094	2.21E-08	1.29E-05	9.882576362	1.370308292	1.370308292	1
PIK3C2G_12_18466693_18474305_18503466_18517448_RF	PIK3C2G	0.418315764	0.418315764	7.846493305	8.28E-06	0.000473286	3.978278546	1.336366539	1.336366539	1
PIK3C2G_12_18407299_18408850_18503466_18517448_RF	PIK3C2G	0.417537091	0.417537091	12.19551672	1.08E-07	2.78E-05	8.35384099	1.335645449	1.335645449	1
PIK3C2G_12_18503466_18517448_18748288_18755082_FR	PIK3C2G	0.412545687	0.412545687	8.404871486	4.32E-06	0.000313738	4.645813078	1.331032398	1.331032398	1
PIK3C2G_12_18409429_18411730_18662602_18673822_RF	PIK3C2G	0.404135265	0.404135265	7.905355237	7.72E-06	0.000473286	4.050395593	1.323295505	1.323295505	1
PIK3C2G_12_18466693_18474305_18765637_18775643_FR	PIK3C2G	0.401350605	0.401350605	10.51089877	4.83E-07	7.57E-05	6.863693215	1.32074377	1.32074377	1
PRKCB_16_23929937_23938239_24143206_24145438_FR	PRKCB	0.359090966	0.359090966	12.83614979	6.36E-08	2.09E-05	8.865730305	1.283345005	1.283345005	1
PRKCH_14_61911060_61914582_62023126_62035192_FR	PRKCH	-0.411325245	-0.411325245	-5.079346062	0.000365169	0.004598091	0.067573492	0.751932339	-1.329906892	-1

10

20

30

40

50

表 19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

プローブ		遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	ハイリ
PRKCH_14_61772357_61775932_61963825_61969638_RR	PRKCH	-0.335493699	-0.335493699	-0.335493699	-7.529186724	1.22E-05	0.000603601	3.582169975	0.792512887	-1.261809134	-1
PTGS2_1_186630471_186639286_186675090_186678395_RR	PTGS2	-0.481332802	-0.481332802	-0.481332802	-6.768676224	3.22E-05	0.001116912	2.580151439	0.716315566	-1.396032765	-1
PTPN14_1_214555543_214567111_214696754_214699528_RR	PTPN14	-0.656412698	-0.656412698	-0.656412698	-6.179949212	7.18E-05	0.001709697	1.750618263	0.634453925	-1.576156584	-1
PTPN14_1_214555543_214567111_214590581_214592230_FF	PTPN14	-0.341216493	-0.341216493	-0.341216493	-6.202805991	6.95E-05	0.001671497	1.783732259	0.789375423	-1.266824341	-1
PTPN14_1_214512778_214523707_214646434_214652454_FF	PTPN14	-0.318133487	-0.318133487	-0.318133487	-4.495773109	0.000977417	0.008276791	-0.89351305	0.802106947	-1.246716543	-1
PTPN14_1_214555543_214567111_214643240_214644608_FF	PTPN14	0.743894345	0.743894345	0.743894345	14.95502699	1.31E-08	9.50E-06	10.37860359	1.674690326	1.674690326	1
PTPRR_12_71045661_71048060_71347632_71356891_FF	PTPRR	-0.321158046	-0.321158046	-0.321158046	-5.612244267	0.0001626	0.002808651	0.904163728	0.80042712	-1.249332981	-1
PTPRR_12_71085097_71096639_71123929_71126257_FF	PTPRR	0.550492009	0.550492009	0.550492009	13.87391165	2.85E-08	1.38E-05	9.639060097	1.464585085	1.464585085	1
PTPRR_12_71085097_71096639_71150835_71153565_FF	PTPRR	0.37642789	0.37642789	0.37642789	7.745377455	9.35E-06	0.000508734	3.85340498	1.298123721	1.298123721	1
PTPRT_20_40761966_40770575_40995945_41003669_FF	PTPRT	0.390974701	0.390974701	0.390974701	5.898131356	0.000107101	0.002179292	1.336206195	1.31127902	1.31127902	1
PTPRT_20_40695490_40704819_40853486_40862226_FF	PTPRT	0.363092378	0.363092378	0.363092378	6.022994423	8.96E-05	0.001959674	1.521218337	1.286179837	1.286179837	1
RAN_12_131315466_131318726_131332056_131334187_RR	RAN	0.409645167	0.409645167	0.409645167	4.697687617	0.000668175	0.00665819	-0.555916376	1.328359062	1.328359062	1
RB1_13_48835536_48838517_49000831_49010576_FF	RB1	-0.421233583	-0.421233583	-0.421233583	-6.218242572	6.80E-05	0.001663343	1.806054195	0.746785809	-1.339072045	-1
REL_2_61090704_61099366_61123363_61128146_FF	REL	-0.396733033	-0.396733033	-0.396733033	-8.151247086	5.78E-06	0.000384323	4.347158457	0.759576389	-1.316523281	-1
REL_2_61090704_61099366_61149976_61161058_FF	REL	-0.36693886	-0.36693886	-0.36693886	-7.752686136	9.27E-06	0.000506975	3.862472978	0.775426067	-1.289613597	-1
REL_2_61090704_61099366_61144132_61147262_FF	REL	0.677200702	0.677200702	0.677200702	15.31760281	1.02E-08	7.96E-06	10.6128694	1.599034097	1.599034097	1
RG56_14_72418571_72425681_72679959_72689252_RR	RG56	0.640246502	0.640246502	0.640246502	17.59662222	2.45E-09	2.49E-06	11.91593523	1.558595442	1.558595442	1
ROR2_9_94323433_94326108_94448327_94455574_FF	ROR2	-0.317797399	-0.317797399	-0.317797399	-13.17593415	4.86E-08	1.71E-05	9.126251542	0.802293826	-1.246426144	-1
SCGB1A1_11_62128712_62135211_62160970_62163465_FF	SCGB1A1	-0.657694922	-0.657694922	-0.657694922	-10.36431148	5.56E-07	8.40E-05	6.723090349	0.633890292	-1.57756005	-1
SOS1_2_39227963_39230003_39353282_39361637_FF	SOS1	0.674466946	0.674466946	0.674466946	13.89064783	2.82E-08	1.38E-05	9.651002	1.596006963	1.596006963	1
SOS1_2_39209340_39220780_39276526_39280091_FF	SOS1	0.461207721	0.461207721	0.461207721	10.99304586	3.08E-07	5.60E-05	7.313177343	1.376693805	1.376693805	1
SRD5A2_2_31741633_31747723_31778586_31789876_FF	SRD5A2	-0.437278492	-0.437278492	-0.437278492	-17.05212796	3.30E-09	3.05E-06	11.6482057	0.738526456	-1.354047634	-1
SRD5A2_2_31729027_31741633_31760980_31767977_FF	SRD5A2	0.394046044	0.394046044	0.394046044	9.411702288	1.44E-06	0.000162975	5.761374339	1.314073565	1.314073565	1
SRD5A2_2_31760980_31767977_31778586_31789876_FF	SRD5A2	0.36636811	0.36636811	0.36636811	11.1293664	2.72E-07	5.28E-05	7.436768688	1.289103509	1.289103509	1
TGFB2_1_218504155_218510817_218542394_218548723_FF	TGFB2	-0.401060991	-0.401060991	-0.401060991	-18.11165268	1.74E-09	2.22E-06	12.21835228	0.757301142	-1.320478664	-1
TGFB2_1_218491029_218498929_218553354_218556593_FF	TGFB2	-0.386196098	-0.386196098	-0.386196098	-7.834000204	8.41E-06	0.000476069	3.962917896	0.765144376	-1.306594288	-1
TM6RSS2_21_42841804_42850832_42927381_42930038_FF	TM6RSS2	0.46760546	0.46760546	0.46760546	8.609824216	3.43E-06	0.000272613	4.88179253	1.382812413	1.382812413	1

10

20

30

40

表 19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

グループ	遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	ハイリ
TOP2A_17_38547618_38549511_38613131_38616534_RR	TOP2A	-0.334752665	-0.334752665	-8.436098305	4.17E-06	0.000304987	4.682072992	0.792920063	-1.261161178	-1
TOP2A_17_38564762_38568693_38613131_38616534_RR	TOP2A	-0.33269637	-0.33269637	-9.020450371	2.18E-06	0.000221829	5.340676459	0.79405103	-1.259364905	-1
TOP2B_3_25644985_25663188_25716096_25717154_FF	TOP2B	0.677625777	0.677625777	11.54384037	1.88E-07	3.83E-05	7.803482889	1.599505304	1.599505304	1
VEGFC_4_177629821_177639626_177693384_177697283_FR	VEGFC	0.624813933	0.624813933	8.924483137	2.42E-06	0.00023044	5.235055692	1.542011936	1.542011936	1
VEGFC_4_177629821_177639626_177740221_177743175_FR	VEGFC	0.532875204	0.532875204	11.11732726	2.75E-07	5.28E-05	7.425914159	1.446809728	1.446809728	1
VEGFC_4_177629821_177639626_177693384_177697283_FF	VEGFC	0.418296493	0.418296493	13.22565823	4.68E-08	1.71E-05	9.163763582	1.336348688	1.336348688	1
EZH2_7_148496931_148503515_148602692_148606606_FF	EZH2	0.221213903	0.221213903	6.686469603	3.59E-05	0.001181426	2.467211314	1.165714021	1.165714021	1
EZH2_7_148496931_148503515_148610251_148614284_FR	EZH2	0.220468898	0.220468898	8.311487407	4.80E-06	0.000337006	4.53671325	1.165112204	1.165112204	1
SP1_12_53752782_53754759_53771263_53775550_RF	SP1	0.197127842	0.197127842	4.00029596	0.002121214	0.014464632	-1.742110313	1.146413768	1.146413768	1
SP1_12_53771263_53775550_53824264_53827278_FR	SP1	0.193365041	0.193365041	3.676018582	0.003703744	0.02071572	-2.31009962	1.143427617	1.143427617	1
DAPK1_9_90064560_90073617_90176237_90180153_FF	DAPK1	-0.210075392	-0.210075392	-5.311660617	0.000255365	0.00370395	0.437247364	0.864492054	-1.156748631	-1
DAPK1_9_90064560_90073617_90339152_90340776_FF	DAPK1	-0.289887636	-0.289887636	-3.250481175	0.007812935	0.034291978	-3.064141545	0.817965763	-1.222545056	-1
DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	DAPK1	0.299375751	0.299375751	7.197207444	1.84E-05	0.000805368	3.154114326	1.230611817	1.230611817	1
DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FF	DAPK1	0.22308584	0.22308584	3.330633912	0.006781108	0.031049051	-2.92175958	1.167227549	1.167227549	1
FGD4_12_32760791_32767406_32781508_32786048_FR	FGD4	-0.274580142	-0.274580142	-5.050237381	0.000382113	0.004709684	0.020720467	0.82669087	-1.209642004	-1
FGD4_12_32760791_32767406_32781508_32786048_RR	FGD4	-0.282349703	-0.282349703	-5.378249402	0.000230809	0.003536515	0.541798821	0.822250734	-1.216174043	-1
FGD4_12_32714978_32722972_32735447_32738552_RR	FGD4	0.277743465	0.277743465	4.897130535	0.000486024	0.005488137	-0.227642215	1.212297233	1.212297233	1
FGD4_12_32714978_32722972_32768073_32772358_RR	FGD4	0.224660977	0.224660977	3.77524936	0.003119249	0.018634903	-2.135456788	1.168493717	1.168493717	1
GAB1_4_144235957_144242111_144369687_144374560_FF	GAB1	0.322283078	0.322283078	7.881995854	7.94E-06	0.000473286	4.021826263	1.250307607	1.250307607	1
GAB1_4_144272552_144276220_144402622_144411096_FR	GAB1	0.232807271	0.232807271	5.862864002	0.00012692	0.002243704	1.283544618	1.175119384	1.175119384	1
GAB1_4_144254752_144257034_144321110_144332903_RF	GAB1	-0.1933323	-0.1933323	-3.299161865	0.00716858	0.03218585	-2.977661138	0.874583297	-1.143401668	-1
GAB1_4_144298156_144300750_144321110_144332903_FR	GAB1	-0.203419346	-0.203419346	-6.533724514	4.41E-05	0.001301693	2.254894123	0.868489706	-1.151424126	-1
HSD3B2_1_119937390_119948935_119959754_119963670_FR	HSD3B2	0.207425802	0.207425802	6.208022809	6.90E-05	0.001671497	1.791279777	1.154626147	1.154626147	1
HSD3B2_1_119937390_119948935_119959754_119963670_FF	HSD3B2	0.167484698	0.167484698	5.70659508	0.000141491	0.002556892	1.048050136	1.123098683	1.123098683	1
HSD3B2_1_119912462_119915175_119959754_119963670_RR	HSD3B2	-0.168081632	-0.168081632	-3.274998031	0.007481356	0.033194645	-3.020586815	0.890025372	-1.123563476	-1
KLK2_19_51340459_51344004_51390533_51395187_FR	KLK2	-0.233986179	-0.233986179	-5.085188859	0.000361865	0.004584902	0.076963796	0.850282306	-1.176079983	-1
KLK2_19_51317027_51319938_51340459_51344004_FF	KLK2	0.259249519	0.259249519	3.256953029	0.007723978	0.033974819	-3.052644106	1.196855945	1.196855945	1

10

20

30

40

50

表19. 予後アレイ層別化カテゴリ1 vs 3およびカテゴリ2 vs 3に対するマーカー。予後アレイから生成された上位181個のマーカー。

グループ	遺伝子座	logFC	AveExpr	t	P値	調整P値	B	FC	FC_1	ハイナリ
KLK2_19_51317027_51319938_51346270_51350944_FF	KLK2	0.251147882	0.251147882	3.297865414	0.007185018	0.032204988	-2.979964123	1.190153686	1.190153686	1
MAP3K14_17_43358197_43360790_43375304_43380378_FF	MAP3K14	0.227459078	0.227459078	4.562645956	0.000831476	0.00777086	-0.781135175	1.170771132	1.170771132	1
MAP3K14_17_43360790_43364282_43409961_43415408_FF	MAP3K14	0.198862372	0.198862372	4.316518127	0.00124648	0.010161606	-1.197399861	1.147792913	1.147792913	1
MAP3K14_17_43358197_43360790_43375304_43380378_RR	MAP3K14	-0.205626917	-0.205626917	-6.208573083	6.89E-05	0.001671497	1.792075671	0.867161784	-1.15318735	-1
MIF_22_24194490_24195811_24245843_24254074_RR	MIF	0.254727783	0.254727783	10.740652239	3.82E-07	6.37E-05	7.098970594	1.193110598	1.193110598	1
MIF_22_24206371_24208274_24245843_24254074_FR	MIF	0.207093745	0.207093745	5.104189064	0.000351337	0.004526272	0.107467258	1.154360424	1.154360424	1
MUC1_1_155176403_155179713_155191807_155193554_FR	MUC1	-0.209333417	-0.209333417	-6.160281821	7.38E-05	0.001740993	1.722065484	0.864936775	-1.156153871	-1
MUC1_1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	MUC1	-0.218468452	-0.218468452	-5.993061073	9.35E-05	0.001993646	1.477069135	0.859477364	-1.163497775	-1
RAD51_15_40972719_40979675_41025213_41027977_RF	RAD51	0.352545734	0.352545734	4.666716555	0.00070238	0.006893753	-0.607362881	1.276811662	1.276811662	1
RAD51_15_40937212_40938851_41025213_41027977_RF	RAD51	-0.242505623	-0.242505623	-4.646371743	0.000725849	0.007053284	-0.641225269	0.845275991	-1.183045551	-1
RAD51_15_41009919_41011826_41025213_41027977_RF	RAD51	-0.243901539	-0.243901539	-6.598967119	4.03E-05	0.001240188	2.34597507	0.844458518	-1.184190791	-1
RNASEL_1_182541376_182556600_182605098_182607856_FR	RNASEL	0.268497887	0.268497887	3.858975685	0.002700604	0.016960458	-1.988638304	1.204553012	1.204553012	1
RNASEL_1_182541376_182556600_182577916_182584530_FF	RNASEL	0.25710383	0.25710383	3.235840558	0.008018044	0.03489118	-3.090150814	1.195077211	1.195077211	1
SRC_20_35928873_35935451_35989678_35993330_FR	SRC	0.206516047	0.206516047	6.456694813	4.89E-05	0.001394478	2.146589494	1.153898277	1.153898277	1
SRC_20_35928873_35935451_35989678_35993330_FF	SRC	0.198581558	0.198581558	6.507686654	4.56E-05	0.001334586	2.218375228	1.147569522	1.147569522	1
SRD5A3_4_56188038_56191526_56242301_56245314_RF	SRD5A3	0.266992266	0.266992266	4.835274287	0.000536131	0.005815136	-0.328887879	1.203296575	1.203296575	1
SRD5A3_4_56209429_56213336_56242301_56245314_RF	SRD5A3	0.239396914	0.239396914	4.842348143	0.000530134	0.005781472	-0.317283393	1.180499078	1.180499078	1
WNT1_12_49327866_49332429_49386082_49387249_RF	WNT1	0.171379721	0.171379721	4.015889993	0.002065728	0.014255673	-1.715014756	1.126134949	1.126134949	1
WNT1_12_49361168_49364315_49377006_49380965_RF	WNT1	-0.188758659	-0.188758659	-6.377243699	5.46E-05	0.001476292	2.0340141	0.877360306	-1.139782588	-1
WNT1_12_49327866_49332429_49364343_49365445_FF	WNT1	-0.289012147	-0.289012147	-10.04098231	7.63E-07	9.95E-05	6.406185639	0.81846229	-1.221803389	-1

略語 logFC: 倍率変化の対数; AveExpr: 平均発現; 調整P値: 調整されたp-値; B: B-統計値 (遺伝子が差別的に発現される対数オッズ);

FC: 倍率変化; FC_1: 1を中心とした倍率変化; ハイナリ: ループの存在/非存在に関するハイナリ呼び出し。

【表 2 0】

表20. 本研究で使用したDLBCL細胞株。細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、ドイツ・コレクション・オブ・マイクロオーガニズム・アンド・セルカルチャー(DSMZ)、およびジャパン・ヘルス・サイエンス・ファウンデーション・リソース・バンク(JHSF)から得た。

細胞株	Cat#	入手元	DLBCLサブタイプ
Toledo	CRL-2631	ATCC	ABC
Pfeiffer	CRL-2632	ATCC	ABC
RC-K8	ACC 561	DSMZ	ABC
Ri-1	ACC 585	DSMZ	ABC
A4/Fukada	JCRB 0097	JHSF	ABC
A3/Kawakami	JCRB 0101	JHSF	ABC
RL	CRL 2261	ATCC	GCB
HT	CRL-2260	ATCC	GCB
DB	CRL-2289	ATCC	GCB
Karpas-422	ACC 32	DSMZ	GCB
SU-DHL-10	ACC 576	DSMZ	GCB
SU-DHL-16	ACC 577	DSMZ	GCB

10

【 0 3 0 1】

【表 2 1】

20

表21. 初期バイオマーカー発見スクリーニングに使用された97個の遺伝子座

遺伝子記号				
ABCG2	CD40	IL-10	MMP9	SFPQ
ANXA11	CD80	IL10RA	MTHFR	SIAH1
ARRB2	CDKN2C	IL-15	MyD88	SIRT1
ASPSCR1	CREB3L2	IL22RA1	NAE1	SKP1
BAX	CTNNB1	IL-2RA	NCKIPSD	SOCS7
BBS9	CXCL8	IL-2RB	NFATc1	STAT3
BCL2A1	DBF4	IL-6	NFKB1	TAL2
BCL2L10	ERC1	IL-7	NFKB2	TET2
BCL6	ETV6	ITGA5	NFKBIA	TLR4
BRCA1	FCGR2A	ITPR3	NFKBIB	TNF
BTK	FOS	JAK3	PAK1	TNFRSF12A
c13orf34	FOXO1	JDP2	PCDHGA6/B2/B4	TNFRSF13B
c15orf55	FOXP1	LRP6	PIK3CG	TNFRSF13C
c21orf45	FRAP1	MAP3K7	PIM1	TOP1
CABLES1	FZD10	MAPK10	PRDM1	WNT11
CAMK2D	GATA4	MAPK13	PRKCZ	WNT9A
CASP10	GDF6	MEF2B	PTGS2	ZMYM3
CASP3	GRAP2	MLLT3	RBL1	
CCR9	HLF	MMP14	RCA1	
CD22	IFNAR1	MMP2	REL	

30

40

【 0 3 0 2】

50

【表 2 2】

表22. 発見コホートにおけるDLBCL-CCSに関する複合予測確率

患者ID	クラス	EpiSwitch_ABC_GBC_Prob	患者ID	クラス	EpiSwitch_ABC_GBC_Prob
G149474	ABC	0.1932724	G680501	GCB	0.8140926
G510833	ABC	0.20099	G812590	GCB	0.813454
G779156	ABC	0.2110736	G139629	GCB	0.8133554
G425812	ABC	0.212716	G254772	GCB	0.8095988
G469616	ABC	0.2139196	G515146	GCB	0.8066254
G268685	ABC	0.2154116	G3383	GCB	0.8038896
G483940	ABC	0.2166548	G694634	GCB	0.7949872
G635399	ABC	0.216758	G158912	GCB	0.7817198
G61310	ABC	0.218381	G833689	GCB	0.780263
G935357	ABC	0.2184674	G259245	GCB	0.7739536
G232946	ABC	0.2190392	G81760	GCB	0.7730372
G783641	ABC	0.2227972	G547813	GCB	0.7723438
G421531	ABC	0.223797	G913775	GCB	0.7705852
G707842	ABC	0.225338	G474390	GCB	0.7670176
G78398	ABC	0.2266852	G213298	GCB	0.763692
G855052	ABC	0.2267892	G153040	GCB	0.762577
G985511	ABC	0.2373018	G108325	GCB	0.762146
G529836	ABC	0.2380336	G243731	GCB	0.7621028
G173235	ABC	0.2385374	G819965	GCB	0.7593464
G418054	ABC	0.2411416	G701045	GCB	0.7579728
G577693	ABC	0.2429652	G544037	GCB	0.756705
G415338	ABC	0.2478544	G370848	GCB	0.7554284
G175733	ABC	0.2580098	G739109	GCB	0.754522
G852875	ABC	0.2595216	G926574	GCB	0.7539074
G292009	ABC	0.2633318	G779214	GCB	0.7536828
G52081	ABC	0.2763932	G572374	GCB	0.7526758
G544695	ABC	0.276862	G901049	GCB	0.7491072
G880954	ABC	0.2855876	G937404	GCB	0.7285326
G181400	ABC	0.297829	G254120	GCB	0.7000562
G418564	ABC	0.2980288	G557427	GCB	0.6935706

【 0 3 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表23. 発見コホートにおけるDLBCL-CCSおよびFluidigmサブタイプ呼び出し。サブタイプ呼び出しは、既知のDLBCLサブタイプのサンプル上での*EpiSwitch* DLBCL-CCSおよびFluidigmアッセイによってなされた。60個のサンプル中60個が両アッセイによりABCまたはGCBとして独立して呼び出された

ABC			GCB		
患者ID	Fluidigm	EpiSwitch	患者ID	Fluidigm	EpiSwitch
RG332787	ABC	ABC	RG949161	GCB	GCB
RG857282	ABC	ABC	RG552773	GCB	GCB
RG639274	ABC	ABC	RG385960	GCB	GCB
RG227462	ABC	ABC	RG713290	GCB	GCB
RG898976	ABC	ABC	RG874071	GCB	GCB
RG469063	ABC	ABC	RG475279	GCB	GCB
RG235350	ABC	ABC	RG885516	GCB	GCB
RG341829	ABC	ABC	RG681434	GCB	GCB
RG769788	ABC	ABC	RG231526	GCB	GCB
RG401919	ABC	ABC	RG855093	GCB	GCB
RG849927	ABC	ABC	RG458634	GCB	GCB
RG714326	ABC	ABC	RG279476	GCB	GCB
RG109735	ABC	ABC	RG373871	GCB	GCB
RG563907	ABC	ABC	RG853726	GCB	GCB
RG847865	ABC	ABC	RG101525	GCB	GCB
RG698196	ABC	ABC	RG525277	GCB	GCB
RG208608	ABC	ABC	RG954268	GCB	GCB
RG126501	ABC	ABC	RG521469	GCB	GCB
RG988758	ABC	ABC	RG673708	GCB	GCB
RG436104	ABC	ABC	RG386174	GCB	GCB
RG611396	ABC	ABC	RG380741	GCB	GCB
RG565461	ABC	ABC	RG132060	GCB	GCB
RG513781	ABC	ABC	RG118710	GCB	GCB
RG549011	ABC	ABC	RG578086	GCB	GCB
RG233693	ABC	ABC	RG542280	GCB	GCB
RG192075	ABC	ABC	RG313590	GCB	GCB
RG374916	ABC	ABC	RG387871	GCB	GCB
RG410219	ABC	ABC	RG108874	GCB	GCB
RG216984	ABC	ABC	RG883839	GCB	GCB
RG538574	ABC	ABC	RG489043	GCB	GCB

【0 3 0 4】

【表 2 4】

表24. 上位10個の DLBCL-CCS 遺伝子座における生物学的機能のエンリッチメント

分析タイプ	経路ID	経路説明	遺伝子数	FDR	マッチングタンパク質
GO-分子機能	GO.0001228	転写アクチベーター活性、RNAポリメラーゼII転写調節領域	4	0.0365	MEF2B,NFATC1,NFKB1,STAT3
GO-生物学的プロセス	GO.0045893	転写の正の制御、DNA-テンプレート	7	0.00187	CD40,IFNAR1,MAP3K7,MEF2B,NFATC1,NFKB1,STAT3
KEGG経路	4620	Toll様受容体シグナル伝達経路	4	2.21E-05	CD40,IFNAR1,MAP3K7,NFKB1

【0 3 0 5】

【表 2 5】

表25. a

No.	マーカーの詳細			
	タイプ	マップ される 遺伝子	プローブ	遺伝子座
1	診断	GRCh37	ETS1_11_128419843_128421939_128481262_128489818_RR	ETS1
2	診断	GRCh37	SLC22A3_6_160805748_160812960_160839018_160842982_RR	SLC22A3
3	診断	GRCh37	SLC22A3_6_160805748_160812960_160884099_160888471_RR	SLC22A3
4	診断	GRCh37	MAP3K14_17_43360790_43364282_43409961_43415408_FR	MAP3K14
5	診断	GRCh37	CASP2_7_142940014_142947169_142963973_142967512_FR	CASP2
6	予後 3v1	GRCh37	BMP6_6_7724582_7733496_7801590_7806316_FF	BMP6
7	予後 3v1	GRCh37	ACAT1_11_107955219_107960166_108013361_108018367_FF	ACAT1
8	予後 3v1	GRCh37	ERG_21_39895678_39899145_39984806_39991905_RF	ERG
9	予後 3v1	GRCh37	MSR1_8_16195878_16203315_16396849_16400398_FF	MSR1
10	予後 3v1	GRCh37	MUC1_1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	MUC1
11	予後 3v1	GRCh37	DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	DAPK1
12	予後 3v2	GRCh37	ACAT1_11_107955219_107960166_108013361_108018367_FF	ACAT1
13	予後 3v2	GRCh37	MUC1_1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	MUC1
14	予後 3v2	GRCh37	DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	DAPK1
15	予後 3v2	GRCh37	APAF1_12_99061113_99062942_99098781_99108240_FF	APAF1
16	予後 3v2	GRCh37	HSD3B2_1_119912462_119915175_119959754_119963670_RR	HSD3B2
17	予後 3v2	GRCh37	VEGFC_4_177629821_177639626_177740221_177743175_FR	VEGFC

表25. b

No.	Hyper G アレイ Stats					マイクロアレイ出力	
	総プローブ数	有意な プローブ数	HyperG_ Stats	FDR_HyperG	パーセント 有意	logFC	AveExpr
1	100	22	0.143767534	0.706164223	22	0.788832719	0.788832719
2	54	16	0.019214151	0.218625878	29.63	0.739725229	0.739725229
3	54	16	0.019214151	0.218625878	29.63	0.729027457	0.729027457
4	11	5	0.029574086	0.259389379	45.45	0.735407293	0.735407293
5	13	3	0.402919615	1	23.08	-0.469997725	-0.469997725
6	69	8	0.366815399	1	11.59	-0.468602239	-0.468602239
7	15	2	0.441893041	1	13.33	-0.436725529	-0.436725529
8	52	4	0.765503518	1	7.69	-0.425291613	-0.425291613
9	191	41	1.07E-06	0.000448644	21.47	-0.419369028	-0.419369028
10	5	3	0.008132099	0.285301135	60	-0.218468452	-0.218468452
11	46	9	0.032709022	0.548212211	19.57	0.299375751	0.299375751
12	15	2	0.441893041	1	13.33	-0.436725529	-0.436725529
13	5	3	0.008132099	0.285301135	60	-0.218468452	-0.218468452
14	46	9	0.032709022	0.548212211	19.57	0.299375751	0.299375751
15	10	1	0.644810187	1	10	-0.441488336	-0.441488336
16	20	5	0.040338404	0.548212211	25	-0.168081632	-0.168081632
17	57	16	8.02E-05	0.006755982	28.07	0.532875204	0.532875204

10

20

30

40

50

表25. c

No.	マイクロアレイ出力					
	T	P値	調整P値	B	FC	FC_1
1	15.59116667	0.0000000108	0.00000135	10.64875918	1.727676038	1.727676038
2	18.80485468	0.00000000155	0.00000124	12.53177853	1.669857773	1.669857773
3	19.34951235	0.00000000115	0.00000112	12.81371179	1.657521354	1.657521354
4	15.29282549	0.00000000131	0.00000138	10.45220415	1.664867419	1.664867419
5	-13.28933415	0.0000000055	0.00000252	9.016293707	0.721965736	-1.385107284
6	-8.973309325	0.000000230	0.000229279	5.288915333	0.722664415	-1.383768149
7	-11.90723067	0.000000137	0.0000310	8.114204006	0.738809576	-1.353528748
8	-11.67074071	0.000000168	0.0000357	7.913111034	0.744688192	-1.342843905
9	-3.516010141	0.004895359	0.024952597	-2.59289798	0.747751587	-1.337342532
10	-5.993061073	0.0000935	0.001993646	1.477069135	0.859477364	-1.163497775
11	7.197207444	0.0000184	0.000805368	3.154114326	1.230611817	1.230611817
12	-11.90723067	0.000000137	0.0000310	8.114204006	0.738809576	-1.353528748
13	-5.993061073	0.0000935	0.001993646	1.477069135	0.859477364	-1.163497775
14	7.197207444	0.0000184	0.000805368	3.154114326	1.230611817	1.230611817
15	-13.23940926	0.0000000463	0.0000171	9.174110234	0.736374546	-1.358004571
16	-3.274998031	0.007481356	0.033194645	-3.020586815	0.890025372	-1.123563476
17	11.11732726	0.000000275	0.0000528	7.425914159	1.446809728	1.446809728

10

20

30

40

50

表25. d

No.	マイクロアレイ出力		プローブ配列
	LS	検出された ループ	60 mer
1	1	Pca	CCATGGTGTGAGTGTGGATTTAGGTGAATCGAAAGATCTAGTA GGTTCTGTCCAGACTGT
2	1	Pca	AATTCTGAGGGTGGAAAGGAAGGTGGGAGTCGATGGCTCTTAT GCAGCATTATTTATCAAT
3	1	Pca	AATTCTGAGGGTGGAAAGGAAGGTGGGAGTCGAGGGACTTTCA GGTAGAGGAGCCACCAAG
4	1	Pca	AGGGGCTGATCAGTTTGTGGAGTTCTGATCGAGGGAGAGGAG TGGCAGTGGGGGAGTGGGA
5	-1	HC	TCCAGAAGCTGAGCTTGAGCCAAGGTGTTTCAACTCCTGGGC TGAAGCAATCTCCTGCCT
6	-1	2,3	ACGTCGTTACAGTTTTAATTTTTCTACTTCGATGTTAATCTCCT AAAAAACATCCAACCA
7	-1	1	CAATTGGTGGATATAGAAAGGTCTAAATTCGATAAGTATAGAC TCAGAATGCAAAAATGT
8	-1	2,3	TCTTGAATGTGCTTAGTATTATTCAGACTCGAAAACATAATTTG AAAGGAATTCATTCTG
9	-1	2,3	CACCAGTTGGTAATTTCTATGTGTAAGTTTCGAGCTTATAAGAT CAATCAGGAATTATTCC
10	-1	3	GCAGGGTGGCTATAGCTCAGGAGAGTGCTCGACGGAGTCTTG CTCTTTCACCCAGGCTGG
11	1	3	ACTAATCCCCTGAAGAAGCAAATTAACCTTCGAGTATCCCTTTA AGTTTGTTTTTAAAATA
12	-1	1	CAATTGGTGGATATAGAAAGGTCTAAATTCGATAAGTATAGAC TCAGAATGCAAAAATGT
13	-1	3	GCAGGGTGGCTATAGCTCAGGAGAGTGCTCGACGGAGTCTTG CTCTTTCACCCAGGCTGG
14	1	3	ACTAATCCCCTGAAGAAGCAAATTAACCTTCGAGTATCCCTTTA AGTTTGTTTTTAAAATA
15	-1	3	CCTAATTTACTTAACCAAACCTCTAGTTATCGAACATCCAGGAT GTTATAAGAATTCAATG
16	-1	3	TCAGTTTCTGCTCTCAAGAAGCTTACAGTCGAAGGTCCCAAGT TAGATTACGGCAAAGCT
17	1	3	TTTTATGAAACATCCAACCTAAATATAATCGAATGCATTACATT TACAGAACTATTTCCA

10

20

30

40

50

表25. e

No.	プローブ位置					4kb配列位置			
	Chr	Start1	End1	Start2	End2	Chr	Start1	End1	Start2
1	11	128419843	128419873	128481262	128481292	11	128419843	128423843	128481262
2	6	160805748	160805778	160839018	160839048	6	160805748	160809748	160839018
3	6	160805748	160805778	160884099	160884129	6	160805748	160809748	160884099
4	17	43364251	43364282	43409961	43409991	17	43360281	43364282	43409961
5	7	142947138	142947169	142963973	142964003	7	142943168	142947169	142963973
6	6	7733465	7733496	7806286	7806316	6	7729496	7733496	7802316
7	11	107960135	107960166	108018337	108018367	11	107956166	107960166	108014367
8	21	39895678	39895708	39991875	39991905	21	39895678	39899678	39987905
9	8	16203284	16203315	16400368	16400398	8	16199315	16203315	16396398
10	1	155149955	155149986	155191807	155191837	1	155145986	155149986	155191807
11	9	90073586	90073617	90140806	90140836	9	90069617	90073617	90140806
12	11	107960135	107960166	108018337	108018367	11	107956166	107960166	108014367
13	1	155149955	155149986	155191807	155191837	1	155145986	155149986	155191807
14	9	90073586	90073617	90140806	90140836	9	90069617	90073617	90140806
15	12	99062911	99062942	99108209	99108240	12	99058941	99062942	99104239
16	1	119912462	119912492	119959754	119959784	1	119912462	119916462	119959754
17	4	177639595	177639626	177740221	177740251	4	177635625	177639626	177740221

10

20

表25. f

No.	4kb配列位置		内部 プライマー
	End2	プローブ	PCR- プライマー1_ID
1	128485262	ETS1_11_128419843_128421939_128481262_128489818_RR	PCa-57
2	160843018	SLC22A3_6_160805748_160812960_160839018_160842982_RR	PCa-73
3	160888099	SLC22A3_6_160805748_160812960_160884099_160888471_RR	PCa-77
4	43413961	MAP3K14_17_43360790_43364282_43409961_43415408_FR	PCa-81
5	142967973	CASP2_7_142940014_142947169_142963973_142967512_FR	PCa-189
6	7806316	BMP6_6_7724582_7733496_7801590_7806316_FF	PCa119-37
7	108018367	ACAT1_11_107955219_107960166_108013361_108018367_FF	PCa119-57
8	39991905	ERG_21_39895678_39899145_39984806_39991905_RF	PCa119-65
9	16400398	MSR1_8_16195878_16203315_16396849_16400398_FF	PCa119-77
10	155195807	MUC1_1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	PCa119-121
11	90144806	DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	PCa119-165
12	108018367	ACAT1_11_107955219_107960166_108013361_108018367_FF	PCa119-57
13	155195807	MUC1_1_155146523_155149986_155191807_155193554_FR	PCa119-121
14	90144806	DAPK1_9_90064560_90073617_90140806_90142738_FR	PCa119-165
15	99108240	APAF1_12_99061113_99062942_99098781_99108240_FF	PCa119-49
16	119963754	HSD3B2_1_119912462_119915175_119959754_119963670_RR	PCa119-129
17	177744221	VEGFC_4_177629821_177639626_177740221_177743175_FR	PCa119-205

30

40

50

表25. g

No.	内部プライマー		
	PCRプライマー-1	PCR-プライマー-2_ID	PCRプライマー-2
1	CACTGCATGAGGGTAGTATAG	PCa-59	CCTCTGTCTGCATCATACC
2	TGATGAGGCACACAGATAAAG	PCa-75	ACACGCCCAGAAACAATAC
3	GAGACATGATGAGGCACAC	PCa-79	GTGTGAGTTGATAGCTGACC
4	TGGAATGGGAAGGGATGAG	PCa-83	GAGACTCCAGGCAAGAATTTG
5	ATGAAGACAGAAAGCCTATGG	PCa-191	CAGTGGAACTTCCTGAGAAC
6	CGGCCAGGAATGACTATTG	PCa119-39	GTAAGCGAGGTCATCATAGAAG
7	AGTAGTGTATCAGGACTGGGT	PCa119-59	TCTTGGTAACCTTGAAAAGTTTGAT
8	CAGCCTACCTTGCCTGACACT	PCa119-67	ATGGGCCATCACTGGGCTTT
9	AATCCTCTTGAGCACAGACC	PCa119-79	TAGGCCCAAATGGCTCAC
10	TGTTGCTAGCTCAGGAAGCC	PCa119-123	AGATCAAGCCACTGTGCTCC
11	ACTGGTCACAGGGAACGATGG	PCa119-167	AGGTGTGAATGTTACTGAACACAAA
12	AGTAGTGTATCAGGACTGGGT	PCa119-59	TCTTGGTAACCTTGAAAAGTTTGAT
13	TGTTGCTAGCTCAGGAAGCC	PCa119-123	AGATCAAGCCACTGTGCTCC
14	ACTGGTCACAGGGAACGATGG	PCa119-167	AGGTGTGAATGTTACTGAACACAAA
15	GGTATTCCAATAAATACTTGTGCCC	PCa119-51	TACTGTGCCAGATGCTCTCA
16	TCACATCAGTTTCTGCTCTCAAG	PCa119-131	GGAGGGAGGCTCAGAGAAGC
17	TCTCTGACTGCAGTGCAAAATAAT	PCa119-207	CTCCTTCTACATTACGTGCTTTCA

表25. h

No.	PCR Stats		
	遺伝子	マーカー	GLMNET
1	ETS1	Pca-57.59	-0.00000007417665
2	SLC22A3	Pca-73.75	0.00000001852548
3	SLC22A3	Pca-77.79	0.00000002568381
4	MAP3K14	Pca-81.83	0.00000001902257
5	CASP2	Pca-189.191	0.0000001325828
6	BMP6	PCa-119-37.39	0.000009609007
7	ACAT1	PCa-119-57.59	0.000004371579
8	ERG	PCa-119-65.67	0.000006321361
9	MSR1	PCa-119-77.79	0.000005500154
10	MUC1	PCa-119-121.123	0.00000006234414
11	DAPK1	PCa-119-165.167	-0.00001571847
12	ACAT1	PCa-119-57.59	0.000004371579
13	MUC1	PCa-119-121.123	0.00000006234414
14	DAPK1	PCa-119-165.167	-0.00001571847
15	APAF1	PCa-119-49.51	0.000003531754
16	HSD3B2	PCa-119-129.131	0.0000004472913
17	VEGFC	PCa-119-205.207	-0.0000006807692

10

20

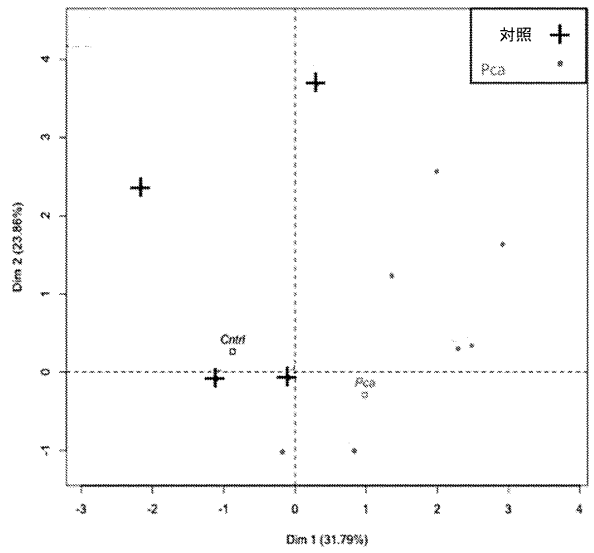
30

40

50

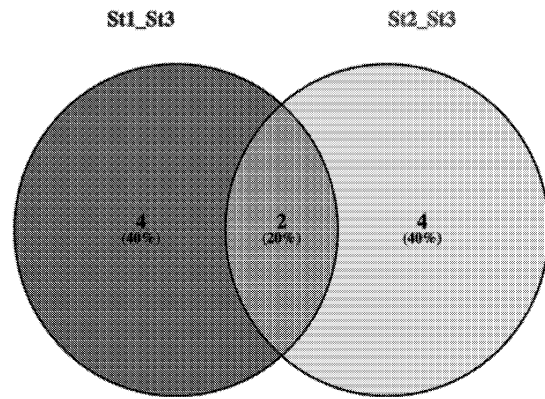
【図面】

【図 1】



【図 2】

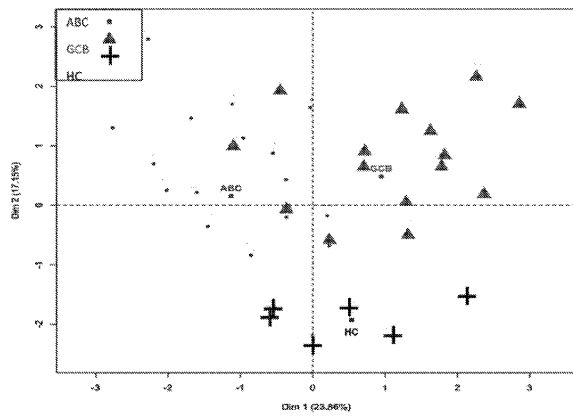
Figure 2



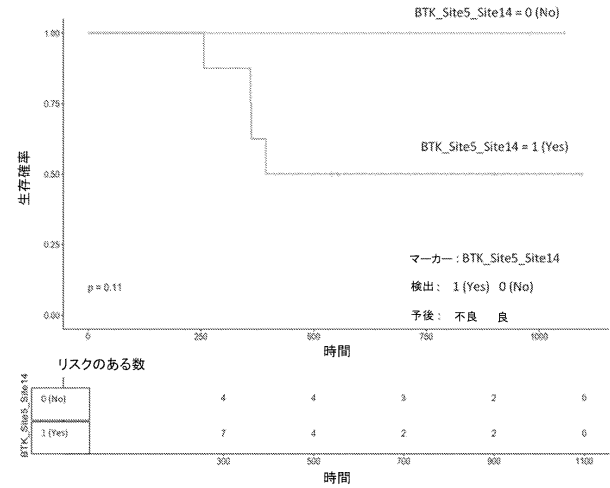
10

【図 3】

Figure 3



【図 4】

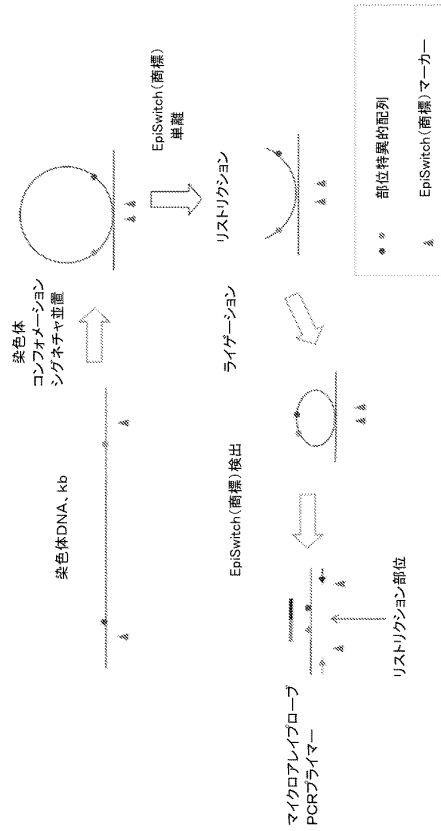


30

40

50

【図 5】



【図 6】

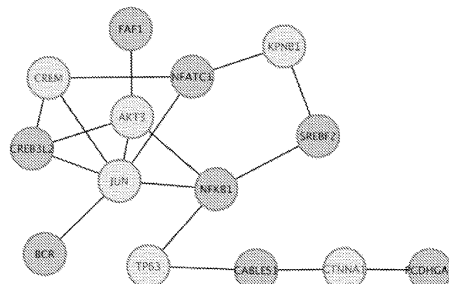
	A	B	C	D	E	F
	マーカー	アルファ 0.4	頻度	ランク中央値	p値中央値	マーカー
1	OBD169_185.OBD169_187	0.249	498	2	0.006	OBD169_185.OBD169_187_1x
2	OBD169_169.OBD169_171	0.064	452	7	0.022	OBD169_169.OBD169_171_1x
3	OBD169_233.OBD169_235	0.052	357	9.25	0.035	OBD169_233.OBD169_235_1.4x
4	OBD169_265.OBD169_267	0.142	451	12	0.037	OBD169_265.OBD169_267_1.2x
5	OBD169_001.OBD169_003	0.15	429	14	0.037	OBD169_001.OBD169_003_1x
6	OBD169_105.OBD169_107	0.029	262	16.25	0.048	OBD169_105.OBD169_107_1.2x
7	OBD169_061.OBD169_063	0.128	375	16.5	0.048	OBD169_061.OBD169_063_1x
8	OBD169_153.OBD169_155	0	270	23.25	0.056	OBD169_153.OBD169_155_1.4x
9	OBD169_033.OBD169_035	0	278	14.75	0.076	OBD169_033.OBD169_035_1.2x
10	OBD169_133.OBD169_135	0.162	406	18	0.076	OBD169_133.OBD169_135_1x
11	OBD169_125.OBD169_127	0.006	300	22.75	0.09	OBD169_125.OBD169_127_1.2x
12	OBD169_165.OBD169_167	0	135	23.5	0.105	OBD169_165.OBD169_167_1.4x
13	OBD169_073.OBD169_075	0	115	28	0.105	OBD169_073.OBD169_075_1.2x
14	OBD169_293.OBD169_295	0	257	32.5	0.105	OBD169_293.OBD169_295_1x
15	OBD169_041.OBD169_043	0.123	300	22.25	0.112	OBD169_041.OBD169_043_1.2x
16	OBD169_021.OBD169_023	0	155	29.75	0.119	OBD169_021.OBD169_023_1x
17	OBD169_129.OBD169_131	0	130	39.5	0.149	OBD169_129.OBD169_131_1x
18	OBD169_277.OBD169_279	-0.042	225	97.75	0.516	OBD169_277.OBD169_279_1.2x
19	OBD169_049.OBD169_051	-0.051	262	107.5	0.608	OBD169_049.OBD169_051_1x
20	OBD169_065.OBD169_067	-6.18144E-06	112	168.5	1	OBD169_065.OBD169_067_1x
21	OBD169_009.OBD169_011	-0.055	156	171.75	1	OBD169_009.OBD169_011_1.2x

10

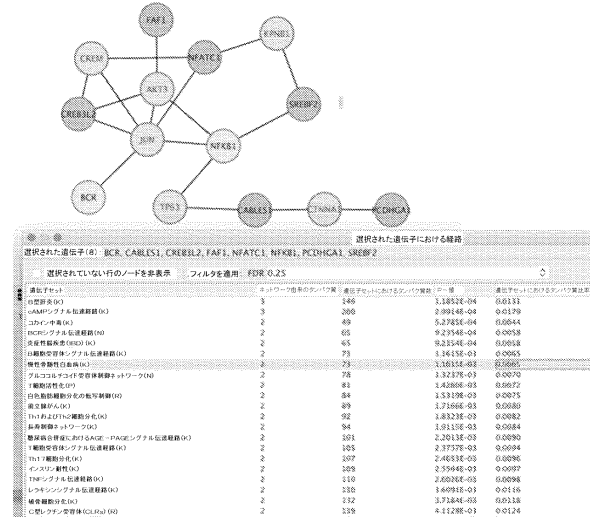
20

【図 7】

プローブ	Hchr	Hstart	Hstop	遺伝子
OBD169_033	chr18	79329076	79363050	ATP9B
OBD169_061	chr18	79162770	79279102	ATP9B
OBD169_233	chr22	23223523	23241206	BCR
OBD169_125	chr18	23194452	23232756	CABLES1
OBD169_185	chr7	137883915	137934211	CREB3L2
OBD169_169	chr1	50592143	50681003	FAF1
OBD169_153	chr9	20782946	20806283	FOCAD
OBD169_001	chr18	79485835	79516751	NFATC1
OBD169_265	chr4	102589993	102607062	NFKB1
OBD169_105	chr5	141432319	141485447	PCDHGA1
OBD169_133	chr22	41856337	41901029	SREBF2



【図 8】

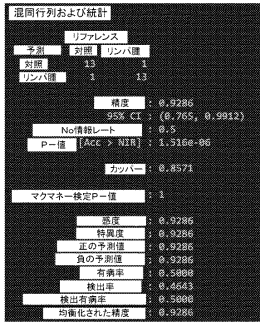


30

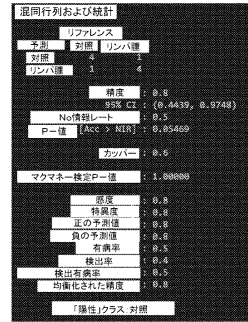
40

50

【図 9】

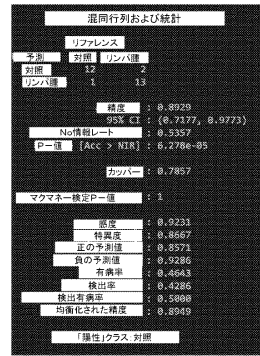


上記は、11個のマーカを用いたトレーニングサンプル(28)に関する分類統計を示す。モデルはRにおけるXGBoostを用いて構築した。

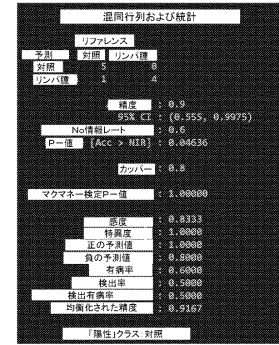


上記は、隣接したトレーニングサンプルで構築したモデルを用い、テストサンプル(10)に関する分類統計を示す。

【図 10】

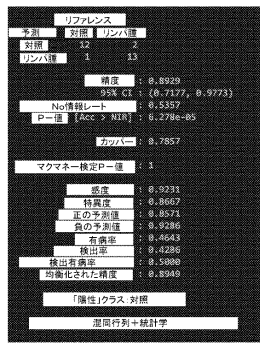


上記は、11個のマーカを用いたトレーニングサンプル(28)に関する分類統計を示す。モデルはRにおけるXGBoostを用いて構築した。

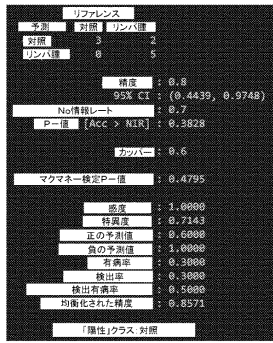


上記は、隣接したトレーニングサンプルで構築したモデルを用い、テストサンプル(10)に関する分類統計を示す。

【図 11】

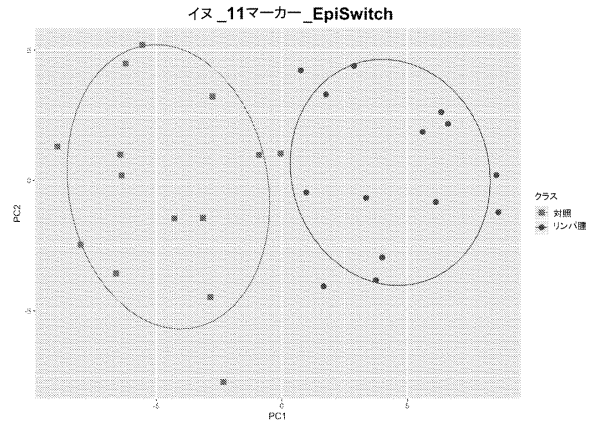


上記は、11個のマーカを用いたトレーニングサンプル(28)に関する分類統計を示す。モデルはRにおけるXGBoostを用いて構築した。



上記は、隣接したトレーニングサンプルで構築したモデルを用い、テストサンプル(10)に関する分類統計を示す。

【図 12】



10

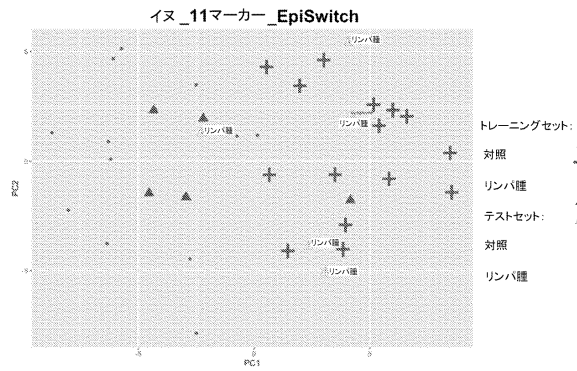
20

30

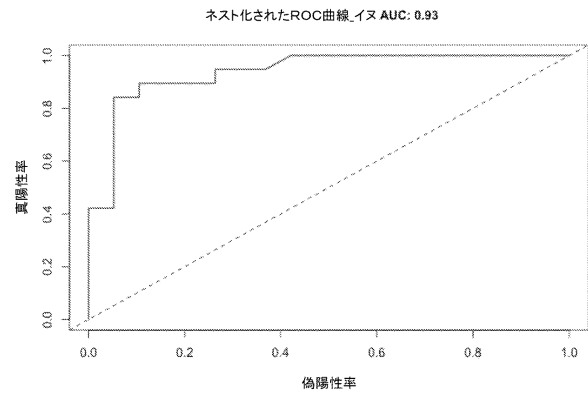
40

50

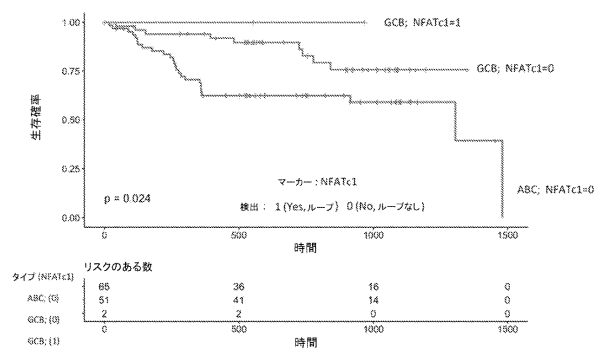
【図 13】



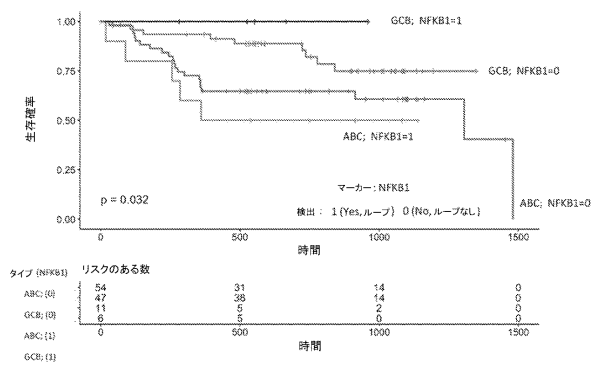
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

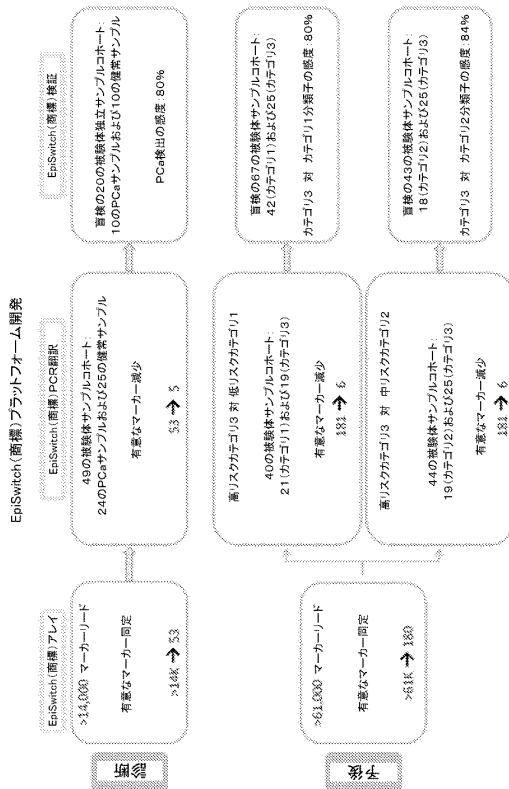
20

30

40

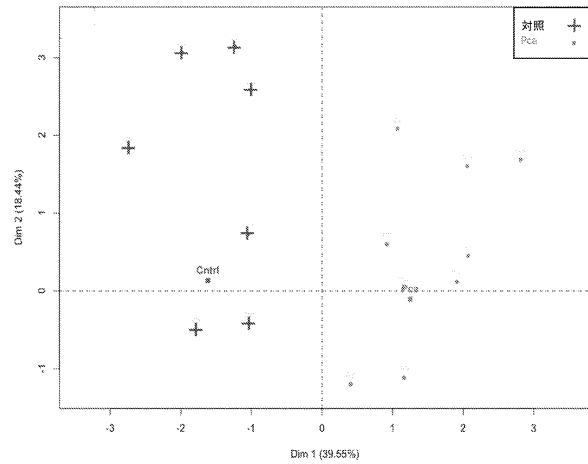
50

【図 17】



前立腺がん(PCA)の診断および予後バイオマーカーを同定、評価および検証するための3段階のアプローチ

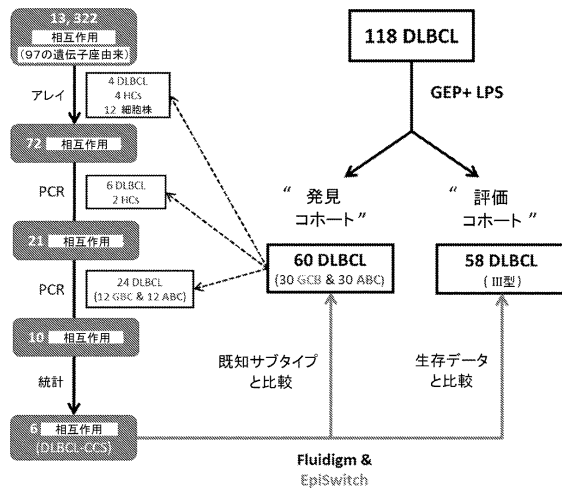
【図 18】



10

20

【図 19】



DLBCL-CGS分類子を開発するために使用されるワークフロー。DLBCL-CGS分類子を、2週間からの連続したアッセイを使用して開発し、合計118のDLBCLサンプルを、遺伝子発現プロファイリング(GEP)およびI-PSPの計算を使用して、疾患サブタイプ(ABC、GBCまたはIII型)に分類した。既知のサブタイプのサンプル(I-PSPスケール上の1)と未知の30のサンプルを使用して、ABCとGBCのサブタイプ(EpiSwitch DLBCL-CGS)を最近の区別する6つのゲノム遺伝子座でのゲノムアーキテクチャの変化を特定した。中間DLBCL-CGS(III型)を有する58のサンプルを使用して、EpiSwitch DLBCL-CGSおよびFluidigmアッセイの性能を評価した。

【図 20】

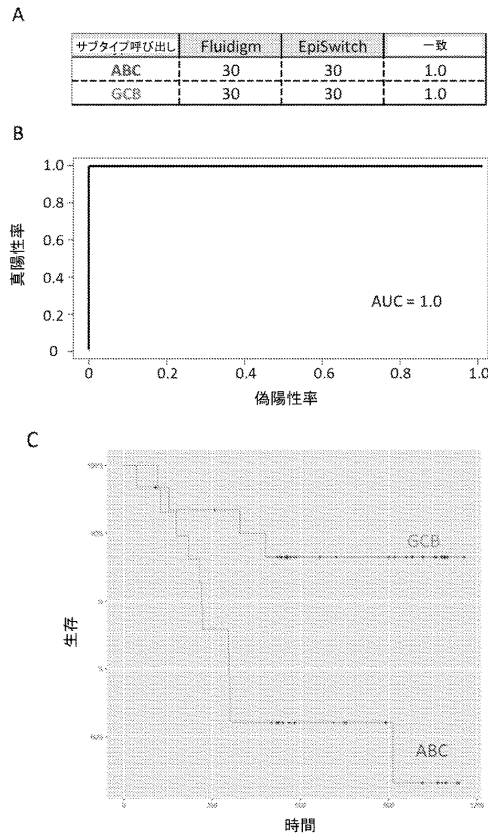
遺伝子座	サブタイプ
STAT3	ABC
TNFRSF13B	ABC
ANXA11	ABC
MAP3K7	GCB
MEF2B	GCB
IFNAR1	GCB

EpiSwitch DLBCL-CCS分類子。DLBCL-CCSは、6つの遺伝子座でのゲノムアーキテクチャにおける測定可能な変化で作り上げられている。これらの「遺伝子ループ」は、様々なDLBCLサブタイプにおいて存在するか、または存在せず。たとえば、ABCサブタイプにおいてはSTAT3、TNFRSF13NおよびANXA11にループが存在するが、MAP3K7、MEF2BおよびIFNAR1にはループは存在しない。その逆パターンがGBCサブタイプで観察される。

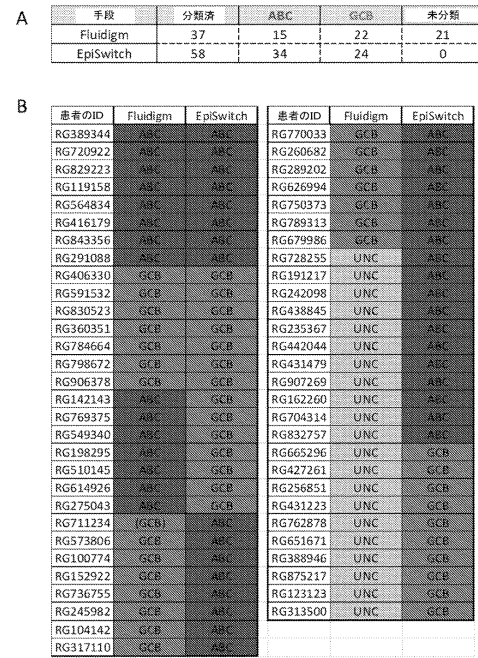
30

40

【図 2 1】

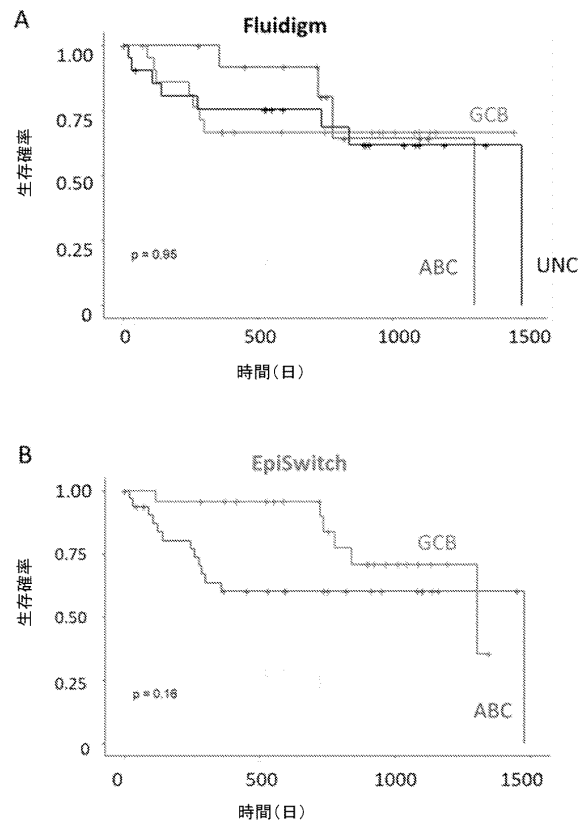


【図 2 2】

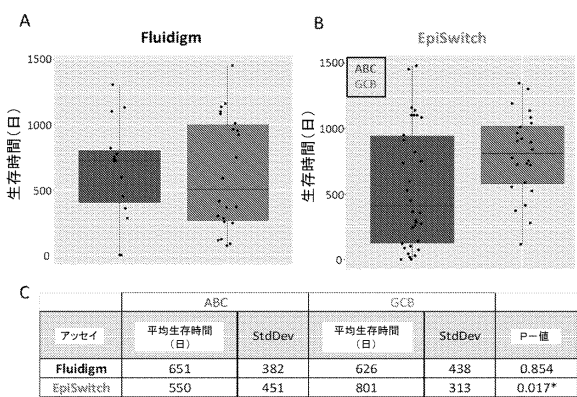


EpiSwitchおよびFluidigmアッセイによるIII型サンプルにおけるDLBCLサブタイプの割り当て。A. EpiSwitchおよびFluidigmによってなされたDLBCLサブタイプの分類の要約。サンプルのうち21個をFluidigmアッセイ(UNC、灰色)によって「未分類」とした。サブタイプの分類が両方のアッセイによってなされた37個のサンプルのうち、15個をABC(赤)またはGCB(緑)として特定して分類した。残りの22個のサンプルを2つのアッセイによって異なるものとして分類した。

【図 2 3】



【図 2 4】



検証コホートでのEpiSwitchおよびFluidigmの分類による平均生存時間。患者の平均生存時間は、Fluidigmアッセイ(A)またはEpiSwitchアッセイ(緑)によってABC(赤)またはGCB(緑)として分類された。EpiSwitch分類子によって分類されたABC(550日)またはGCB(801日)のサンプルの平均生存時間に統計学的に有意な差があった。StdDev=標準偏差(日)

10

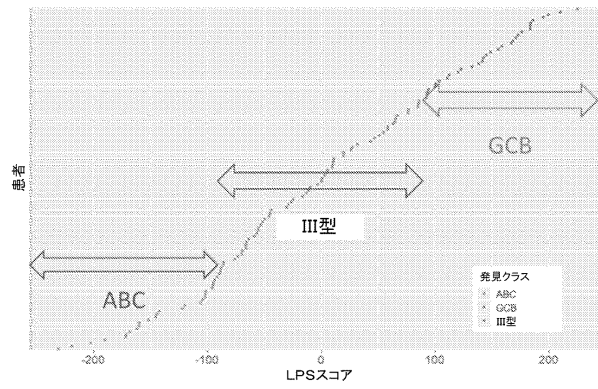
20

30

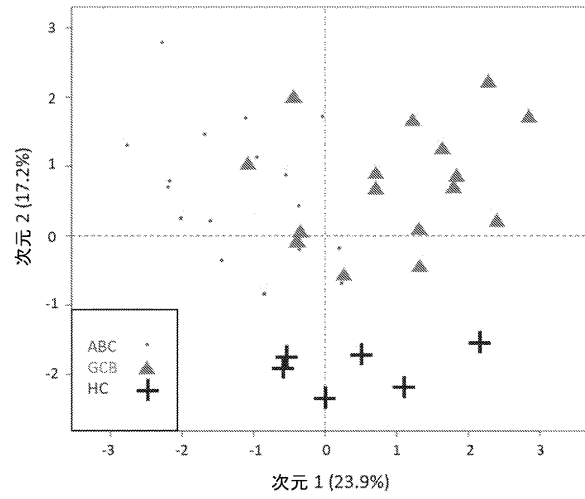
40

50

【図 2 5】



【図 2 6】



10

【配列表】

0007617029000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 2006286.5

(32)優先日 令和2年4月29日(2020.4.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(72)発明者 ラマダス、アロウル

イギリス国、オーエックス4 2ダブリュビー、オックスフォード、オックスフォード ビジネス
パーク、ビルディング 3140、ケア・オブ オックスフォード バイオダイナミックス ピーエ
ルシー

(72)発明者 アクーリチェフ、アレクサンドル

イギリス国、オーエックス4 2ダブリュビー、オックスフォード、オックスフォード ビジネス
パーク、ビルディング 3140、ケア・オブ オックスフォード バイオダイナミックス ピーエ
ルシー

審査官 岡部 佐知子

(56)参考文献 特表2018-527016 (JP, A)

国際公開第2018/100381 (WO, A1)

特表2019-535295 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N

C12Q

A61K

A61P

G01N

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq