

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5531360号
(P5531360)

(45) 発行日 平成26年6月25日 (2014. 6. 25)

(24) 登録日 平成26年5月9日 (2014. 5. 9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M

請求項の数 15 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2009-536276 (P2009-536276)	(73) 特許権者	506070051
(86) (22) 出願日	平成19年11月7日 (2007. 11. 7)		ザ ボード オブ トラストィーズ オブ
(65) 公表番号	特表2010-508844 (P2010-508844A)		ザ ユニヴァーシティー オブ アーカ
(43) 公表日	平成22年3月25日 (2010. 3. 25)		ンソー
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/023404		THE BOARD OF TRUSTE
(87) 国際公開番号	W02008/057545		ES OF THE UNIVERSIT
(87) 国際公開日	平成20年5月15日 (2008. 5. 15)		Y OF ARKANSAS
審査請求日	平成22年11月5日 (2010. 11. 5)		アメリカ合衆国 アーカンソー州 722
(31) 優先権主張番号	60/857, 456		07-3606 リトル ロック ノース
(32) 優先日	平成18年11月7日 (2006. 11. 7)		ユニヴァーシティー アヴェニュー 2
(33) 優先権主張国	米国 (US)		404
		(74) 代理人	100082072
			弁理士 清原 義博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現プロファイリングに基づく高リスク多発性骨髄腫のゲノムシグネチャーの特定とその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

低リスクから高リスク多発性骨髄腫への転換に対する被験体の感受性を試験する方法であって、

被験体から分離したプラズマ細胞より、KIF14、SLC19A1、CKS1B、YWHAZ、MPHOSPH1、TMPO、NADK、LARS2、TBRG4、AIM2、ASPM、AHCYL1、CTBS、MCLC及びLTBP1を含む遺伝子セットの遺伝子発現プロファイルを得る工程を含み、

前記遺伝子セットの異常な発現プロファイルは、低リスクから高リスク多発性骨髄腫への転換に対する被験体の感受性の増大を示し、

さらにKIF14、SLC19A1、CKS1B、YWHAZ、MPHOSPH1、TMPO、NADK、LARS2、TBRG4及びAIM2の上方制御は高リスク予後への転換の可能性の指標であり、及び／または、

ASPM、AHCYL1、CTBS、MCLC及びLTBP1の下方制御は高リスク予後への転換の可能性の指標であることを特徴とする方法。

【請求項 2】

高平均比の発現が、高リスク疾患に伴うゲノムシグネチャーを示すことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

高リスク疾患の前記ゲノムシグネチャーが、より短期間の完全寛解、イベントフリー、早期疾患関連死、またはこれらの組み合わせと相関することを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

高リスク疾患のゲノムシグネチャーをもった個人が、2次予防試験から選択されることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

低平均比の発現が、低リスク疾患に伴うゲノムシグネチャーを示すことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

低リスク疾患の前記ゲノムシグネチャーが、より長期間の完全寛解、より長期の生存、良好な予後、またはこれらの組み合わせと関連することを特徴とする請求項 5 記載の方法。

10

【請求項 7】

前記方法が、個人の臨床転帰および生存を予測する、疾患に罹患した個人のための治療の選択に有効である、処置後再発リスクを予測する、疾患の分子分類がリスクグループを定義するゲノムシグネチャーと関連する、または、これらの組み合わせであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記分子分類がCD1であり、高リスク多発性骨髄腫のゲノムシグネチャーと関連することを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記分子分類がCD2であり、低リスク多発性骨髄腫のゲノムシグネチャーと関連することを特徴とする請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 10】

プラズマ細胞がCD138+であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記多発性骨髄腫が再発性の多発性骨髄腫であり、随意に幹細胞支持、随意にボルテゾミブで被験体が処置されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記遺伝子セットがさらにアフィメトリクス参照番号 242488__at 及び 1557277__a__at を持つプローブで検出可能な遺伝子を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 13】

前記異常な発現プロファイルが段階的多変数直線判別分析 (MSDA) の判別スコアで評価されることを特徴とする請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記MSDAの判別スコアは $200\ 638_s_at \times 0.283 - 1\ 557\ 277_a_at \times 0.296 - 20\ 0850_s_at \times 0.208 + 201\ 897_s_at \times 0.314 - 202\ 729_s_at \times 0.287 + 203\ 432_at \times 0.251 + 204\ 016_at \times 0.193 + 205\ 235_s_at \times 0.269 + 206\ 364_at \times 0.375 + 206\ 513_at \times 0.158 + 211\ 576_s_at \times 0.316 + 213\ 607_at \times 0.232 - 213\ 628_at \times 0.251 - 218\ 924_s_at \times 0.230 - 219\ 918_s_at \times 0.402 + 220\ 789_s_at \times 0.191 + 242\ 488_a_t \times 0.148$ の式を用いて計算され、変数が特定のプローブに対する値を表し、1.6より大きいスコアが高リスク予後を示すことを特徴とする請求項 13 記載の方法。

40

【請求項 15】

低リスクから高リスク多発性骨髄腫への転換に対する被験体の感受性を試験するための核酸プローブのキットであって、前記核酸プローブが、KIF14、SLC19A1、CKS1B、YWHAZ、MPHOSPH1、TMPO、NADK、LARS2、TBRG4、AIM2、ASPM、AHCYL1、CTBS、MCLC、LTBP1及びアフィメトリクス参照番号 242488__at 及び 1557277__a__at を持つプローブで検出可能な遺伝子からなる遺伝子に特異的にハイブリダイズすることを特徴とする核酸プローブのキット。

【発明の詳細な説明】

【連邦資金の説明】

50

【0001】

本発明の一部は、国立ガン研究所研究補助金CA55819およびCA97513の下、連邦政府からの資金により創出された。その結果、合衆国政府は本発明に関する一定の権利を有する。

【関連出願の説明】

【0002】

本出願は、2006年11月7日出願の米国仮特許出願第60/857,456号（現失効）に係る優先権の利益を主張するものである。

【技術分野】

【0003】

本発明は、概括的にはガン研究の分野に関係する。より具体的には、本発明は、臨床転帰および生存の予測に有用な、高リスク多発性骨髄腫に特異的なゲノムシグネチャーを特定するための、遺伝子発現プロファイリングの使用に関係する。

【背景技術】

【0004】

骨髄にホーミングし、そこで拡張する末梢分化B細胞（プラズマ細胞）の腫瘍である多発性骨髄腫（MM）は、標準および高用量治療後の転帰の著しい多様性を特徴とする。疾患発生に伴う遺伝的および分子的病変の多くは知られているものの、進行性臨床経過を促進する病変はよく分かっていない。

【0005】

全てのミエローマには大きく分けて、超2倍体および非超2倍体がある[非特許文献1-4]。典型的には第3、5、9、11、15、19および21染色体のトリソミーを伴う超2倍性が、約60%の患者に存在する[非特許文献5]。高解像度オリゴヌクレオチドアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）データの教師なしクラスタリングおよび非負行列因子分解は、超2倍体ミエローマが更に、上述の奇数染色体のトリソミーを呈するものと、それに加えて第1qおよび第7染色体の獲得、第13染色体の欠失、およびトリソミー11の欠損を呈するものの、2つのグループに分けることができることを明らかにした[非特許文献6]。非超2倍体ミエローマもまた、1q染色体の高レベル増幅と1pおよび13染色体の欠失を特徴とするものと、第1染色体異常はないが、第8および13染色体の欠失をもつものの、2つに分けることができる[非特許文献6]。さらに、（14q32染色体上のイムノグロブリン重鎖座の関与する転座によって起こる）CCND1、CCND3、MAF、MAFB、またはFGFR3/MMSET の転写活性化は、非超2倍体ミエローマに典型的であり、約40%の症例に存在する[非特許文献5,7,8]。

【0006】

包括的遺伝子発現パターンの教師なし階層クラスタリングを用いて、超2倍性および再発性転座と強い相関を表すサブグループが最近定義され、7種のミエローマの存在を確認した[非特許文献9]。増殖遺伝子の過剰発現を示し、他の6型から進展した症例に由来するものと、t(4;14)(p16;q32)によって定義されるものの、2つの高リスク型が特定された[非特許文献9]。

【0007】

第1染色体長腕（1q）の獲得は、ミエローマにおいて最も一般的な遺伝子異常のひとつである[非特許文献10]。セントロメア辺縁ヘテロクロマチンの脱凝縮に起因する1q染色体バンドの直列重複および跳躍分節重複は、疾病の進行に頻繁に伴う[非特許文献11-13]。くすぶり型ミエローマ患者由来のプラズマ細胞から分離したDNAのaCGHを用いて、ロシノルらは、顕在型疾患への転換リスクは1q21の獲得および第13染色体の喪失とリンクしていることを示した[非特許文献14]。これらの知見は分裂間期蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）分析によって確認された。さらに、症候性ミエローマにおける1q21の獲得は低生存率と関連しており、再発時さらに増幅していることが示された[非特許文献15]。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

- 【非特許文献1】 Smadja NV et al. Leukemia. 1998;12:960-969
- 【非特許文献2】 Wullemme S et al. Leukemia. 2002;19:275-278
- 【非特許文献3】 Cremer FW et al. Genes Chromosomes Cancer. 2005;44:194-203
- 【非特許文献4】 Gutierrez NC et al. Blood. 2004;104:2661-2666
- 【非特許文献5】 Fonseca R et al. Cancer Res. 2004;64:1546-1558
- 【非特許文献6】 Carrasco D et al. Cancer Cell. 2006;9:313-325
- 【非特許文献7】 Shaughnessy J, Barlogie, B. Immunol. Rev. 2003;94:140-163
- 【非特許文献8】 Kuehl WM, Bergsagel PL Nature Rev. Cancer. 2002;2:175-187
- 【非特許文献9】 Zhan F et al. Blood. 2006;108:2020-2028
- 【非特許文献10】 Avet-Loiseau et al. Genes Chromosomes Cancer. 1997;19:124-133 10
- 【非特許文献11】 Sawyer JR et al. Blood. 1998;91:1732-1741
- 【非特許文献12】 Le Baccon et al. Genes Chromosomes Cancer. 2001;32:250-64
- 【非特許文献13】 Sawyer JR, et al. Genes Chromosomes Cancer. 2005;42:95-106
- 【非特許文献14】 Rosinol L, Carrio A, Blade J, et al. Br J Haematol. 2005;130:729-732
- 【非特許文献15】 Hanamura et al. Blood. 2006;16: Epub ahead of print
- 【非特許文献16】 Zhan F, et al. Blood. 2002; 99:1745-1757
- 【非特許文献17】 Storey JD, Tibshirani R. Proc Natl Acad Sci. 2003;100:9440-9445 5
- 【非特許文献18】 Kaplan EL, Meier P, J Am Stat Assoc 1958; 53:457-481 20
- 【非特許文献19】 Mantel N. Cancer Chemother Rep 1966; 50:163-170
- 【非特許文献20】 O'Quigley J, Xu R, Stare J. Stat Med. 2005;24:479-489
- 【非特許文献21】 R. Development Core Team. Vienna, Austria. 2004; (ISBM 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>)
- 【非特許文献22】 Rao CR., Wiley, New York (1973)
- 【非特許文献23】 Greipp P et al. J Clin Oncol. 2005;23:3412-20
- 【非特許文献24】 Shaughnessy, J. et al. Blood. 2003;101:3849-3856
- 【非特許文献25】 Kapanadze et al. FEBS Lett. 1998;426:266-270
- 【非特許文献26】 Itoyama et al. Genes Chromosomes Cancer. 2002;35:318-328
- 【非特許文献27】 Lu YJ et al. Lancet. 2002;360:385-386 30
- 【非特許文献28】 Hattinger et al. Br J Cancer. 2002;86:1763-1769
- 【非特許文献29】 Cheng KW, et al. Nat Med. 2004; 10:1251-2156
- 【非特許文献30】 Zudaire I et al. Histopathology. 2002;40:547-555
- 【非特許文献31】 Richardson P et al. N Engl J Med 2005; 16; 352: 2487-2498
- 【非特許文献32】 Richardson P et al. Blood 2007 Aug 9; [epub ahead of print]
- 【非特許文献33】 Shaughnessy JD et al. Blood 2007; 109: 2276-2284
- 【非特許文献34】 Mulligan G et al. Blood 2007; 109: 3177-3188
- 【非特許文献35】 Shaffer AL et al. Immunity 2001; 15: 375-385
- 【非特許文献36】 Ferrando AA et al. Cancer Cell 2002; 1: 75-87
- 【非特許文献37】 Ross ME et al. Blood 2004; 104: 3679-3687 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って、疾病の進行に寄与し、高リスク疾患の特定に使用でき、治療処置をガイドするような、多発性骨髄腫の生存と関連した明確で予後上有用なゲノムシグネチャーを特定するための遺伝子発現プロファイリングに関して、先行技術は不十分である。先行技術は、処置後再発を起こす患者を特定できる遺伝子発現パターンまたは遺伝子発現モデルに関しても不十分である。本発明は、この長期にわたる技術上の需要と要求を満足させる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、疾病特異的な生存に関連したゲノムシグネチャーを特定するための遺伝子発現プロファイリングの方法を目的とする。その方法は、集団内の個々人からプラズマ細胞を分離すること、および核酸をプラズマ細胞から分離することを含む。そして核酸は、プラズマ細胞中の遺伝子発現レベルを決定するためにDNAマイクロアレイにハイブリダイズされ、遺伝子は、発現レベルに基づいて4分位に分別される。そして、プラズマ中の上方制御および下方制御された遺伝子を特定するために、4分位に対し対数ランク検定が実施され、ここで、上方制御された遺伝子の下方制御された遺伝子に対する発現レベルの $\log_2$ 幾何平均は、その疾患に関する生存に関連した具体的なゲノムシグネチャーを指す。

【0011】

本発明は、疾患特異的な生存にリンクしたゲノムシグネチャーの特定のためのキットも目的とする。そのようなキットは、DNAマイクロアレイ、および個人のプラズマ細胞から核酸を抽出し、核酸をDNAマイクロアレイにハイブリダイズするための説明書からなる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】トレーニング用集団中のリスクグループを区別する遺伝子発現パターン。図1Aは、70遺伝子を特定するために用いられた351人の新規診断患者間の発現パターンの著しい類似性を例示する、70遺伝子のヒートマップを示す。患者列の上の赤色バーは、疾患関連で死亡した症例を示す。左側の赤色バー（上部の行、上方制御）によって指定した行の51遺伝子は、早期疾患関連死の高リスクにある発現上位4分位内の患者を特定した。緑色バー（下方制御）によって指定した19遺伝子の行は、早期疾患関連死の高リスクにある発現下位4分位内の患者を特定した。

【図1B】トレーニング用集団中のリスクグループを区別する遺伝子発現パターン。図1Bは、51上方制御遺伝子／19下方制御遺伝子の $\log_2$ 発現平均比間のサンプル差のトレーニング用集団における頻度を示す。この自己標準化発現比は、極端な発現分布をもった単一の高リスクグループ（13.1%）を定義する遺伝子を検出するよう設計された、上位／下位4分位対数ランク差次的発現分析と整合する、顕著な二峰性分布を持つ。 $\log_2$ スケールにおける上方／下方制御比と解釈すると、高い値ほど悪転帰と相関する。

【図1C】トレーニング用集団中のリスクグループを区別する遺伝子発現パターン。図1Cは、低リスクミエローマ（青色）および高リスクミエローマ（赤色）におけるイベントフリーのカプランマイヤー評価は、高リスクシグネチャーをもつ13.1%の患者では、生命表法による5年イベントフリー生存率（18% 対 60%, $P < .0001$; $HR = 4.51$ ）よりも低いことを実証している。

【図1D】トレーニング用集団中のリスクグループを区別する遺伝子発現パターン。図1Dは、低リスクミエローマ（青色）および高リスクミエローマ（赤色）における総生存率のカプランマイヤー評価は、高リスクシグネチャーをもつ13.1%の患者では、生命表法による総生存率（28% 対 78%, $P < .0001$, $HR = 5.16$ ）よりも低いことを実証している。

【図2】22人の健常人（NPC）、14人の意義未確定の単クローン性高ガンマグロブリン血症（MGUS）患者、351人の新規に診断されたミエローマ（MM）患者および42人のヒト多発性骨髄腫細胞株（HMCL）由来のプラズマ細胞における、70の高リスク遺伝子の遺伝子発現クラスターグラム。各横列は1遺伝子を表し、各縦列は1サンプルを示す。遺伝子は、表1のランクに基づいて上から下に並んでいる。赤色の遺伝子は、中央値よりも高い発現を示し、青色は中央値よりも低いことを示す。ミエローマリスクグループ内のサンプルは、予測リスクが左から右に連続して上昇するように並べた。

【図3A】試験集団におけるリスクグループ分布および生存分析。図3Aは、 $\log_2$ 上方／下方制御遺伝子の平均比の試験集団における頻度を示す。高リスクに対する閾値は、 $\log_2$ 比の独立クラスタリングによって決定した。トレーニングおよびバリデーション組は、同様の高リスク閾値および同様の部分の高リスクグループへの集中を含め、この70遺伝子の発現サマリーと同様の分布をもつ。

【図3B】試験集団におけるリスクグループ分布および生存分析。図3Bは、試験集団内の分子リスクグループ間のイベントフリー生存率のカプランマイヤー評価を示す。

10

20

30

40

50

【図3C】試験集団におけるリスクグループ分布および生存分析。図3Cは、試験集団内の分子リスクグループ間の総生存率のカプラン-マイヤー評価を示す。

【図4A】診断時および再発時の70遺伝子リスクスコアが再発後生存率を予測することを示す。図4Aは、トレーニング集団由来の51症例の診断（青色）および再発（赤色）サンプル対の70遺伝子リスクスコアを示す。遺伝子発現リスクスコアを左側に示す。サンプル対は、最低ベースラインスコアに基づいて左から右に並べる。

【図4B】診断時および再発時の70遺伝子リスクスコアが再発後生存率を予測することを示す。図4Bは、診断時および再発時とも低リスク（低-低）、診断時低リスクおよび再発時高リスク（低-高）、および両時点で高リスク（高-高）により定義される3グループの再発後生存率の、カプラン-マイヤープロットである。

【図5A】図5Aは、試験セット内の17遺伝子モデルにより定義されたリスクグループの、イベントフリーおよび総生存率を示す。181新規診断MM症例は、高リスク（16.6%）および低リスク（83.4%）グループと予測された。低リスクおよび高リスクミエローマの生存率のカプラン-マイヤー評価は、生命表法によるイベントフリー2年生存率が高リスク（赤色）88%対低リスク（青色）50%（ $P<.0001$ ）を示した。

【図5B】図5A-5Bは、試験セット内の17遺伝子モデルにより定義されたリスクグループの、イベントフリーおよび総生存率を示す。181新規診断MM症例は、高リスク（16.6%）および低リスク（83.4%）グループと予測された。低リスクおよび高リスクミエローマの生存率のカプラン-マイヤー評価は、総生存率が高リスク（赤色）91%対低リスク（青色）54%（ $P<.0001$ ）を示した。

【図6】70遺伝子教師ありモデルとサブグループ教師なし分類子[非特許文献9]との間の相関関係。データは、いわゆるミエロイドシグネチャー（MY）を伴う症例群（最も左）を含め、各7サブタイプ内の高リスク数（赤色）および低リスク数（青色）の積み重ね棒グラフとして表す。

【図7A】70遺伝子モデルにより定義される高リスクを分子特性と関連付けた。図7Aは、トレーニング集団の351症例の70遺伝子リスクスコアによる、遺伝子発現に基づく増殖インデックス（x軸）の散布図を示す。70遺伝子モデルにより定義された低リスク症例（青色）および高リスク症例（赤色）を表示する。2つの変数は顕著な相関を示す（ $r = 0.73$; $P < 0.001$ ）。2つの変数の転帰との影響を評価するために、PI分割点5および高リスク分割点.66を用いて、集団を4つのサブグループに分割した。グループは、2本の緑色線の交点によって定義される。上部左側の四半部は高PI/低リスクの症例を、上部右側四半部は高PI/高リスク症例を、下部左側四半部は低PI/低リスクの症例を、下部右側四半部は低PI/高リスクの症例を示す。直線は、データの直線傾向を表す。

【図7B】70遺伝子モデルにより定義される高リスクを分子特性と関連付けた。図7Bは、図7Aにおいて定義された4グループの総生存率評価を示し、リスクグループ内にPIの影響がないことを明らかにしている。

【図7C】70遺伝子モデルにより定義される高リスクを分子特性と関連付けた。図7Cは、 $t(4;14)$ 陽性ミエローマの総生存率評価のカプラン-マイヤープロットを各サンプルの70遺伝子高リスクスコア呼称と関連付けて示し、高リスクおよび低リスクスコアの重大な影響を示している。

【図8A】17遺伝子発現モデルが、ボルテゾミブ単剤により処置された再発症例の転帰の予測に使用可能であることを示す。図8Aは、U2およびU4データ、および17遺伝子および16遺伝子発現モデルを使用したリスクグループの予測を示す。リスクグループ予測分析は、114例の新規診断ミエローマに対して実施した。2つのモデル間には高度な相関があった。

【図8B】17遺伝子発現モデルが、ボルテゾミブ単剤により処置された再発症例の転帰の予測に使用可能であることを示す。図8Bは、ミレニアムデータセットにおけるカプラン-マイヤー生存分析を示す。16遺伝子モデルは、APEX治験[非特許文献31]において処置された156例の再発ミエローマ患者に対し適用された。高リスクおよび低リスクは、各々13.1%および86.5%と予測された。生命表法による1年総生存率は、低リスクグループ（青色）74%対高リスクグループ（赤色）32%であった（ $P=0.0014$; $HR=2.52$ ）。

【図8C】17遺伝子発現モデルが、ボルテゾミブ単剤により処置された再発症例の転帰の予測に使用可能であることを示す。図8Cは、ボルテゾミブ群における総生存率を示す。低リスクおよび高リスクミエローマにおけるカプラン–メイヤー生存率評価は、低リスク79%対高リスク36%なる1年生命表法OS確率を示した ($P=0.0495$; $HR=2.34$)。

【図8D】17遺伝子発現モデルが、ボルテゾミブ単剤により処置された再発症例の転帰の予測に使用可能であることを示す。図8Dは、デキサメタゾン群における総生存率を示す。低リスクおよび高リスクミエローマにおけるカプラン–メイヤー生存率評価は、低リスク64%対高リスク23%なる1年生命表法OS確率を示した ($P=0.0174$; $HR=2.55$)。APEX治験全体(669患者)の分析は、患者の交差にもかかわらず、ボルテゾミブ対デキサメタゾンに付き優れたOSを明らかにした(30対20ヶ月; $P=0.027$; 追跡中央値22ヶ月, イベント発生44%) [非特許文献32]。

10

【図9A】UAおよびU2両方による144新規診断症例における総生存率分析を示す。図9Aは、144新規診断ミエローマ患者に適用した17遺伝子U2由来モデルを示す。総生存率のカプラン–メイヤー評価は、低リスクミエローマ(青色)および高リスクミエローマ(赤色)各々の5年生命表法生存率に有意な差があるを明らかにした(50%対68%, $P=0.0046$; $HR=2.40$)。

【図9B】UAおよびU2両方による144新規診断症例における総生存率分析を示す。図9Bは、16遺伝子UA由来モデルにより定義されたリスクに基づく、144患者のOSのカプラン–メイヤー評価を示す。それは、高リスク対低リスクの5年生命表生存確率が、各々46%対70% ($P=0.0026$; $HR=2.58$)であることを明らかにした。

20

【発明を実施するための形態】

【0013】

多発性骨髄腫患者における生存率のばらつきは、ISSステージングシステムで採用されるベータ-2-マクログロブリンおよびアルブミンレベルのような現在の検査パラメータによってよく説明できない[非特許文献22]。原発性高リスク疾患は、薬剤耐性を獲得するミエローマおよび頻回再発後の進行性臨床経過とは根本的に異なる可能性がある。

【0014】

本発明は、生存率と関連した遺伝子サブセットの発現異常が、ミエローマ疾患進行におけるDNAコピー変化の効果を代表するかもしれないことを示す。従って本発明は、その発現レベルが早期疾患関連死に関し高リスクにある13%–14%の小集団の特定を可能にする、70遺伝子群を特定することができた。本モデルにより定義される高リスク疾患は、他の治療法との関連において確認されるべき、独立でかつ高度に有意な予後変因であった。

30

【0015】

診断時13%から再発時76%への高リスク指定頻度の顕著な上昇は、再発後転帰に影響する疾患進化の分子的証拠を与える。進行性ミエローマの表現型は、原発性か獲得性かに係らず、同様のメカニズムにより発現するのかもしれない。ここで議論するモデルの更なる改良をもって、本発明は、治療管理の全期間における定量的リスク評価のためのツールを開発することを企図する。

【0016】

臨床的意義に加えて、ここで提示した知見は、疾患を進行させる根本的な分子メカニズムに重要な光を当てる可能性もある。高リスクシグネチャーの特筆すべき特徴は、第1染色体からの遺伝子の有意な占有である: 19の過小発現遺伝子のほぼ50%および51の過剰発現遺伝子の30%は、各々1pおよび1q染色体由来であった。高リスクスコアにおける1q染色体由来遺伝子の優勢は、疾患進行はコピー数増加のみならず1q21増幅細胞のパーセンテージとも関連していることを示す最近の報告とも合致している[非特許文献15]。ここで定義される遺伝子発現に基づく高リスクシグネチャーは、1q21の増幅と1p13の欠失を特徴とする高解像度aCGHプロファイリングによって定義される疾患クラスとも著しく一致する[非特許文献6]。あわせると、これらのデータは、遺伝子的または後成的修飾、あるいはそれらの両方によるこの染色体の変質が、成長または生存、又はその両方に係る優位性を与えることにより疾病進化において有意な役割を演じている可能性があることを示唆する。

40

50

【0017】

高解像度aCGHとマイクロアレイプロファイリングの組み合わせを用いて、ミエローマゲノム全域のゲノム獲得の47の最小共通領域（MCRs）、およびこれらのMCRs内に位置し、その発現がコピー数増加に伴って上昇する207遺伝子が特定された[非特許文献6]。これらのコピー数感受性遺伝子の発現を70遺伝子モデルによって定義される高・低リスククラス間比較した時、1q21、1q22および1q43-q44に位置する遺伝子は、高リスク疾患において有意に過剰発現していることが見出された。

【0018】

第1染色体遺伝子は疾患進行における重要な因子とみなされるが、FABP5, YWHAZ, EXOSC4, およびEIFC2なる別の4遺伝子が8q21-8q24領域内に存在することは、8qの獲得もまた高リスク疾患に寄与する可能性があることを示唆する。これらの遺伝子は、最近特定された8q24.12-8q24.13および8q24.2-8q24.3における獲得／増幅のMCRsを含む[非特許文献6]。興味あることに、8q24におけるMCRに位置するMYCの発現は、今回の研究において生存率とは関連しなかった。

【0019】

13q14染色体欠失は、タンDEM移植治験において処置を受けたミエローマ患者の生存率の重要な予測指標である[非特許文献24]。13q14染色体に位置する一遺伝子、すなわち、以前BRCA1に有意な相同性を有するB-CLL内のガン抑制遺伝子として特定されたRFP2 [非特許文献25] の喪失が、本分析において低生存率と再び関連付けられたことは注目に値する。非ホジキンリンパ腫、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、乳ガンおよび卵巣ガンにおける1q21 [非特許文献12,26-30]を含む、多くの後期ステージのガンにおける第1染色体の頻繁な増幅は、ここで記述した遺伝子発現モデルが他のガンにおいて予後上の意義を持つかどうかを決定するための研究を正当化する。本発明は多発性骨髄腫のゲノムシグネチャーを特定するために遺伝子発現プロファイリングを使用した。ここで提供される方法およびキットは、他のガンにおける転帰の予測因子である同じ遺伝子または異なる遺伝子を特定するために使用できる可能性がある。同じ理由で、ここで特定された遺伝子は他のガンにおける転帰の予測因子となり得る。

【0020】

元の70遺伝子の多変数判別分析により、17のプローブセットは、高リスクミエローマの検出に使用することができた。従って本発明は、これらのステージング／リスク関連遺伝子と教師なし分子分類において特定された分子サブタイプ／病因関連遺伝子を統合する、定量的RT-PCRに基づくアッセイを開発し実証することを企図する。これらの遺伝子の発現レベルの評価は、限定的な予後上の含意しか持たず、また創薬ターゲットも欠いている、現在用いられている非常に多くの標準的因子を検査する必要を無くす、簡単かつ強力な分子ベースの予後試験を供する可能性がある。PCRに基づく方法の使用は、蛍光in situハイブリダーゼーションに基づく分析において費やされる時間と労力を劇的に減ずるばかりでなく、分析に必要な組織量も大幅に減ずるであろう。これらの遺伝子シグネチャーがミエローマ腫瘍細胞に特異的であれば、その様な試験は、おそらく検体源として末梢血を用いて、処置後に最小残留疾患を評価するのに有用であるかもしれない。

更に、本発明は、単一の薬剤ボルテゾミブで処置された再発患者の転帰を予測する目的でも17遺伝子モデルを適用した。このモデルは元来多剤化学療法後に移植指示HDTおよび維持療法によって処置されたミエローマ患者のために開発されたので、ここで議論する結果は幾分予想外であった。これらの結果は、転帰に関連した遺伝子発現パターンは、再発および新規診断MM患者において類似していることを強く示唆する。高リスク遺伝子発現モデルは、具体的な治療方法に非依存적であるようでもあり、このことは、それが現在使用されている薬物または薬物の組み合わせに概して非感受性である患者を特定することを示唆している。この解釈は、ボルテゾミブ処置された再発ミエローマ患者の部分集団を用いて開発された既に確認された生存率分類因子 [非特許文献34] が、総治療2によって処置された高リスク患者をも特定したという観察によって支持される（データ図示せず）。

【0021】

マイクロアレイプラットフォームにおける差異以上に、この研究設計の種々の他の特徴は、これら2つのMM臨床ゲノムデータセットを区別する。とりわけ、UAMS研究が単一のセンターであるのに対して、ミレニアムのサンプルは複数のセンターにおいて得られた。UAMSは、CD138に基づくイムノマグネティックビーズ選別によりプラズマ細胞を精製したが、ミレニアム研究においては96の参加診療センターは、それぞれ凍結腫瘍検体の送付の前にネガティブセクションを実施した。

【0022】

2つの重要な意味がこれらの観察より導かれる。第1に、変動遺伝子発現パターンはしばしば正常細胞 [非特許文献35] と形質転換組織 [非特許文献35、36、37] との本質的な生物学的状態の違いを表すので、高リスクシグネチャーは多発性骨髄腫における薬剤耐性や早期再発の生物学的表現型と関係している可能性が高い。従って、このミエローマ表現型は、最も関連の深い経路をより解明したり治療機会を特定したりする目的で、さらに研究する価値がある。ここで使用された比較的大きな遺伝子発現データセットは、これらの腫瘍のタイプをより完全に定義する一つの手段を供する。第2に、高リスク分類を日常的に臨床実施するにはいくつかのハードルが残っているが、この仕事は、ある種のミエローマ患者が現行の治療からは極僅かな利益しか受けないことを明白にする。その様な患者を特定する実用的方法は、患者治療を顕著に改善するはずである。良好な転帰が予期される患者に対しては、標準治療の毒性を最小化する努力が必要であるかもしれないし、悪い転帰が予想される患者は、現行の治療に拘らず実験的処方の早期投与が考慮されてよい。本発明は、この腫瘍GEP高リスクモデルが、臨床的に実施可能であるか、および、プロテアソーム阻害薬またはIMiDs、またはその両方と、標準的抗ミエローマ薬およびHDTとの新しい組み合わせを試験するものを含む、他の前線治療法に有用であることを決定することを企図する。最後に、治療応答の事前分析は、ボルテゾミブ応答の分類子がボルテゾミブ単剤治療に特異的であることを示唆した [非特許文献34]；全3治療法の活性に関係した生物学的過程、および総治療、ボルテゾミブ単剤またはデキサメタゾン単剤に特異的に関係した経路を明らかにするには、これら2つのデータセットの追加分析が必要である。

【0023】

本発明の一実施例においては、以下の手順からなる疾患特異的な生存と関連したゲノムシグネチャーを特定するための遺伝子発現プロファイリングの方法が供される：集団内の個人群からプラズマ細胞を分離すること、前述のプラズマ細胞から核酸を抽出すること、プラズマ細胞中の遺伝子発現レベルを決定するために核酸をDNAマイクロアレイにハイブリダイズし、遺伝子を前述遺伝子の発現レベルに応じて異なる四半部に分けること、そして、プラズマ中の上方制御および下方制御された遺伝子を特定するために、上方制御された遺伝子の下方制御された遺伝子に対するlog2幾何平均比がその疾患の生存率に関連した特異的ゲノムシグネチャーの指標である、対数ランク検定を四半部に対して実施すること。

【0024】

その様な方法はさらに、教師なしクラスター分析を実施することを含み、そのクラスター分析は疾患のサブセットをクラス分類する。その方法は、全ゲノムシグネチャーについて多変数段階的判別分析 (MSDA) を適用することも含んでよく、ここでその適用は、生存または高リスクおよび低リスク疾患の分別の少なくとも一方に関連した17遺伝子を特定する。これらの遺伝子は、ゲノムDNAの第1染色体に位置するものを含んでよいが、これらに限定されない。そのような遺伝子の代表例は、KIF14、SLC19A1、CKS1B、YWHAZ、MPHOSPH1、TMPO、NADK、LARS2、TBRG4、AIM2、NA、ASPM、AHCYL1、CTBS、MCLC、LTBP1およびFLJ13052からなる群より選択されたものであってよい。

【0025】

加えて、上方制御された遺伝子は1q染色体に位置してよく、下方制御された遺伝子は1p染色体に位置してよい。このような遺伝子の例は、FABP5、PDHA1、TRIP13、AIM2、SELI、SLC19A1、LARS2、OPN3、ASPM、CCT2、UBE2I、STK6、FLJ13052、LAS1L、BIRC5、RFC4、CKS1B、CKAP1、MGC57827、DKFZp7790175、PFN1、ILF3、IFI16、TBRG4、PAPD1、EIF2C2、MGC4

10

20

30

40

50

308, ENO1, DSG2, C6orf173, EXOSC4, TAGLN2, RUVBL1, ALDO, CPFS3, NA(1q43), MGC15606, LGALS1, RAD18, SNX5, PSMD4, RAN, KIF14, CBX3, TMPO, DKFZP586L0724, WEE1, ROBO1, TCOF1, YWHAZ, MPHOSPH1, GNG10, NA(1p13), PNPLA4, NA(20q11.21), KIAA1754, AHCYL1, MCLC, EVI5, AD-020, NA(6p21.31), PARG1, CTBS, UBE2R2, FUCA1, RFP2, FLJ20489, NA(11q13.11), LTBP1 および TRIM33からなる群より選択されたものであってよいがそれらに限定されない。

【0026】

さらに、この方法で得られた高発現平均比は、高リスク疾患と関係したゲノムシグネチャーの指標であってよい。そのような高リスク疾患ゲノムシグネチャーは、完全寛解、無イベントの短期継続、早期疾患関連死またはこれらの組み合わせと相関してよい。加えて、高リスク疾患のゲノムシグネチャーをもった個人は2次予防治験に選ばれてよい。あるいは、低発現平均比は、低リスク疾患と関連したゲノムシグネチャーの指標であってよい。そのような低リスク疾患ゲノムシグネチャーは、完全寛解の長期継続、長期生存、良好な予後、またはこれらの組み合わせと相関してよい。

【0027】

さらに、ここで述べる方法は、臨床転帰および個人の生存を予測するかもしれない、罹患した個人のための治療選択に有効であるかもしれない、個人の処置後再発リスクおよび生存を予測するかもしれない、疾患の分子分類をリスクグループを定義するゲノム署名と関連付けるかもしれない、またはこれらの組み合わせを可能にするかもしれない。分子分類はCD1であってよく、高リスク多発性骨髄腫のゲノム署名と相関してよい。CD1分類は、MMSET、MAF/MAFB、PROLIFERATION署名、またはこれらの組み合わせの上昇した発現から成ってよい。または、分子分類はCD2であってよく、低リスク多発性骨髄腫のゲノム署名と関連してよい。CD2分類は、HYPERDIPOIDY、LOW BONE DISEASE、CCND1/CCND3 転位、CD20発現、またはこれらの組み合わせより成ってよい。加えて、その様な方法を使用してゲノム署名を特定される疾患型は、症候性多発性骨髄腫または多発性骨髄腫を含んでよいが、これらに限定されない。

【0028】

本発明の別の実施例では、疾患特異的な生存にリンクしたゲノム署名の特定のための以下よりなるキットが供される：DNAマイクロアレイおよび個人のプラズマ細胞から核酸を抽出し核酸をDNAマイクロアレイにハイブリダイズするための説明書。その様なキット中のDNAマイクロアレイは、第1染色体に位置する遺伝子のmRNAに相補的な核酸プローブを含んでよい。第1染色体に属する遺伝子の例は、FABP5, PDHA1, TRIP13, AIM2, SEL1, SLC19A1, LARS2, OPN3, ASPM, CCT2, UBE2I, STK6, FLJ13052, LAS1L, BIRC5, RFC4, CKS1B, CKAP1, MGC57827, DKFZp7790175, PFN1, ILF3, IFI16, TBRG4, PAPD1, EIF2C2, MGC4308, ENO1, DSG2, C6orf173, EXOSC4, TAGLN2, RUVBL1, ALDO, CPFS3, NA(1q43), MGC15606, LGALS1, RAD18, SNX5, PSMD4, RAN, KIF14, CBX3, TMPO, DKFZP586L0724, WEE1, ROBO1, TCOF1, YWHAZ, MPHOSPH1, GNG10, NA(1p13), PNPLA4, NA(20q11.21), KIAA1754, AHCYL1, MCLC, EVI5, AD-020, NA(6p21.31), PARG1, CTBS, UBE2R2, FUCA1, RFP2, FLJ20489, NA(11q13.11), LTBP1 およびTRIM33からなるグループから選択されるものを含んでよいが、それらに限定されない。加えて、キットが使用される疾患は、症候性多発性骨髄腫または多発性骨髄腫を含んでよいが、これらに限定されない。

【0029】

(原文において) "a"または"an"は一またはそれ以上を意味する場合がある。ここで使用される通り、請求項において、「より成る("comprising")」なる語と組み合わせ用いられるとき、"a"または"an"なる語は一または一以上を意味することがある。ここで使用される通り、「別の("another")」または「他の("other")」は、最低第2のまたはそれ以上の同じまたは異なる請求事項またはその構成物を意味する場合がある。

【0030】

以下の例は、発明の種々の実施例を例示する目的で供するものであり、本発明をいかなる様態においても制限することを意図しない。当業者は、本発明が目的を達するよう良く

10

20

30

40

50

適応されていることを容易に認識し、述べられた範囲と有利性、および内在する目的、範囲および有利性を取得するであろう。請求項の範囲によって定義される本発明の精神の中にある変更および別の使用は当業者に起こりうる。

【実施例】

【0031】

実施例1

患者

精製プラズマ細胞は、正常健康人および、意義未確定の単クローン性ガンマグロブリン血症（MGUS）および要治療顕性ミエローマの患者から得た。トレーニンググループ（ $n=351$ ）およびバリデーショングループ（ $n=181$ ）の患者の特徴は既に述べた[非特許文献9]。トレーニンググループの351症例のうち51例は、再発時にもサンプルを採取した。両方のプロトコルは、導入療法後、メファランによるタンデム自家移植、地固め化学療法、および維持療法を使用した。

【0032】

実施例2

遺伝子発現プロファイリング

アフィメトリクス社製U133Plus2.0マイクロアレイを用いたプラズマ細胞の精製およびGEPは、既述の通り実施した[非特許文献9、16]。本研究に用いた532人の患者のマイクロアレイデータおよび転帰データは、NIH遺伝子発現オムニバスに受け入れ番号GSE2658として入れた。

【0033】

実施例3

統計およびマイクロアレイ分析

アフィメトリクス社製U133Plus2.0マイクロアレイは、GCOS1.1ソフトウェアで前処理し、定型的GCOS1.1スケールリングを用いて標準化した。疾患関連生存率との単変数相関の対数ランク検定は、54,675の「シグナル」サマリーの各々に対して実行した。具体的には、対数ランク検定は、過小および過剰発現した予後遺伝子を決定するために、第1四半部（ Q_1 ）対第2-4四半部（ Q_2-4 ）および第4四半部（ Q_4 ）対第1-3四半部（ Q_1-3 ）に対して適用した。2.5%の誤発見率閾値を対数ランク検定のP値の各リストに適用し[非特許文献17]、19の過小発現および51の過剰発現プローブセットを得た。ヒートマップカラム系統樹は、患者対の $\log_2$ スケール発現間のピアソンの相関距離を用いた階層クラスタリングによって計算した。カラム系統樹の枝は、51の上方制御および19の下方制御遺伝子の平均 $\log_2$ スケール発現間の各患者の差に基づき左から右へ整理した：この差は、 $\log_2$ スケール上の上方/下方制御平均比（すなわち、幾何平均）と解釈される。各患者に対する70遺伝子発現プロファイルのこの簡単な一変数サマリーは、全70遺伝子を乗法的に増加または減少させる残留アレイ効果に対するロバスト性を向上させる可能性があり、またMAS5.0スケールファクターに非依存的でもある。ハザード比による加重発現は、非標準化または標準化に関らず（すなわち、ワールド統計）、このスコアを向上せず、設計は、遺伝子ごとの対数ランク検定を超える総生存率（OS）またはイベントフリー生存率（EFS）による教師を使用しないことであった。そして、 $\log_2$ 上方/下方制御平均比は、ヒストグラム中小極右モードを分離するために、K平均を用いて3グループにクラスタ化した：低上方/下方平均比をもつ2つのグループは結合された。ヒストグラムおよびヒートマップ右側は、極端患者グループは25%以下、13%により近いものの、上方/下方平均発現比の単極限モードは、異なる発現分析において用いられた極限四分位対数ランク検定と一致する。

【0034】

異なるクラスタリングアルゴリズムおよび多数のグループは、12%および29%の患者間に高平均比グループを発生させることに留意されたい：K平均は（ $K=3$ ）、小さい右手モードをより大きな分布から分離することに最も優れていたもので採用された。10%および30%患者の間を補足する如何なる一変数閾値も、351患者トレーニングセットにおけるOSに有意である。181患者バリデーションセットにおいて、高対低 $\log_2$ 比に対する独立の閾値を生成

するために、K平均クラスタリングが独立に実行された。バリデーションセットにおけるトレーニングセットの閾値の適用は、1.7%の独立に確認された分類エラーを与える（すなわち、低リスクバリデーションセットの3患者が高リスクに分類される）。早期バリデーションは、70遺伝子上方／下方制御平均比の総生存率との関連を強力に支持する証拠を提供するために、より新しいプロトコル下に処理された独立集団に基いて提示した。平均比に対する高リスク閾値は、プロトコルに無関係に新規診断患者において幅広く生存率と関連するはずであるので、バリデーションセットに対するプロトコルの違いは、証拠を弱めず、むしろ強化する。平均比は、既に処置された患者の転帰とも相関するかもしれないが、高リスクグループを定義するために比の新しい閾値が必要であろう。重要な注意事項は、70遺伝子モデルは、（平均比によってランク付けされた）下位3分の2の患者の転帰を説明するのに特に適してはいないということである：これは、Q1およびQ4対数ランク検定に対し75%の患者をを単一グループに一まとめにした、オリジナルの対数ランクスクリーンと一致する：これらの遺伝子は、設計により、最も進行性のミエローマプラズマ細胞を特定する。

【0035】

アフィメトリクス社製U133Plus2.0マイクロアレイ上のプローブセットのゲノム地図上の厳密な位置と順番を決定するため、自動的にNCBIサーチエンジン (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) に全遺伝子の開始および終了部位を問い合わせるためのソフトウェアが開発された。そして、各プローブセットの位置は、それに対応する遺伝子、または転写開始点と比較され、p腕テロメアからq腕テロメアまで整列される。この方法で、98%以上（54,675中53,581）のプローブセットの厳密な染色体上の位置が与えられた。位置決定に使用したソフトウェアは、(<http://lambertlab.uams.edu/software>) で見つけることができる。

【0036】

イベントフリー、総生存率、および完全寛解期間（完全応答の開始から数えた）の分布はカプランマイヤー法[非特許文献18]によって評価され、対数ランク検定が全グループの品質を検定するために使用された[非特許文献19]。カイ2乗検定およびフィッシャーの直接検定は、カテゴリーの独立性の検定に使用された。多変数比例障害分析は予測因子の効果を調整し、組み合わせ予測因子によって説明される観測された不均一性の比率、すなわち R^2 が計算された[非特許文献20]。表5は、 $\log_2$ スケール上方／下方制御比の多変数直線近似分析を要約する。統計パッケージRバージョン2.0.1 [非特許文献21] が、この分析に使用された。

【0037】

ウィルクのラムダ基準[非特許文献22]を用いた段階的多変数直線判別分析（MSDA）は、高リスクおよび低リスクMMを区別することが同等にできる70遺伝子のサブセットを選択するために使用された。MSDAは以下の式を選択した：判別スコア=200 638_s_at x 0.283 - 1 557 277_a_at x 0.296 - 200 850_s_at x 0.208 + 201 897_s_at x 0.314 - 202 729_s_at x 0.287 + 203 432_at x 0.251 + 204 016_at x 0.193 + 205 235_s_at x 0.269 + 206 364_at x 0.375 + 206 513_at x 0.158 +211 576_s_at x 0.316 + 213 607_at x 0.232 - 213 628_at x 0.251 - 218 924_s_at x 0.230 - 219 918_s_at x 0.402 + 220 789_s_at x 0.191 + 242 488_at x 0.148 （変数は特定のプローブに対するアフィメトリクス値を表す）。カットオフ値は1.5であったので、1.5よりも小さい値は低リスクグループに属すサンプルを示し、1.5よりも大きい値は高リスクMMグループに属するサンプルを示した。前向きおよび後ろ向き両方の変数選択が実行された。入力するか除くかの選択は、全サンプルの総ばらつきに対するグループ内のばらつきを最小化することに依拠した。

【0038】

実施例4

遺伝子発現パターンは、ミエローマにおける生存率の独立した予測因子である

高リスクミエローマ独特の分子シグネチャーの特定を目的として、早期疾患関連死は、

10

20

30

40

50

遺伝子発現の行き過ぎと関連付けられた。351新規診断患者由来のCD138選択されたプラズマ細胞のマイクロアレイデータからの遺伝子発現レベルは四分位に分けられ、対数ランク検定は、短期生存と関連した70遺伝子の特定に使用された。51人は高（四分位4、Q4）、19人は低（四分位1、Q1）発現を持ち（表1）、その発現レベルはカラーグラムに示した（図1A）。特筆すべきは、右手側の患者の51遺伝子の同時上方制御と19遺伝子の同時下方制御である。従って、各患者についてQ4およびQ1 $\log_2$ -スケール発現の平均の差を計算した。この教師なし発現サマリーは、 $\log_2$ -スケール上方対下方制御平均発現比（リスクスコアと呼ばれる）と解釈できる。その頻度分布は、高 $\log_2$ 上方／下方制御比をもつことが明白なグループを明らかにする（図1B）。頻度プロットとヒートマップの両方ともグループサイズが25%より小さいことを示唆するものの、これこそが、そもそもQ1およびQ4対数ランク検定が探すように設計された異常発現グループの種類である。 $\log_2$ 比の教師なしK平均クラスタリングは、その割合を13.4%と評価した。このグループは、未調整ハザード比（HR）4.51で有意に劣るイベントフリー生存率を示し（図1C、 $P < 0.001$ ）、総生存率も未調整HR5.16で劣っていた（図1D、 $P < 0.001$ ）。70遺伝子が発見されたトレーニング集団について有意な相関が期待され、それらは説明の目的で報告される。

【0039】

早期疾患関連死の転帰は、進行性ミエローマにおける標的遺伝子を特定する目的で特別に選択され、その結果、351患者のオリジナル集団において遺伝子発見に用いられた対数ランク検定には24の死亡例しかなかった。70遺伝子を用いた教師ありクラスタリングは、22健常人ドナー、MGUS 14症例、トレーニング集団351患者およびヒトミエローマ細胞株38種由来のプラズマ細胞に適用された。その結果は、低リスクミエローマグループがMGUSおよび正常プラズマ細胞と類似したパターンをもち、高リスクグループはヒトミエローマ細胞株と類を呈することを明らかにした（図2）。

【0040】

次に、発現シグネチャーの総生存率との関連は、181患者の独立したテスト集団において検討された。実際、 $\log_2$ -スケール上方／下方制御発現比の独立かつ教師なしクラスタリングは、構成比において同等の極端な異常調節を呈する患者のサブセットを特定した（12.2%、図3A）。同様の生存率分布およびハザード比の結果は、トレーニング集団と同様、イベントフリー生存率（HR=3.41, $P = 0.002$, 図3B）および総生存率（HR=4.75, $P < 0.001$, 図3C）の両方で見出された。高リスクスコアを持つ患者においては3年率20%しかないのに対し（データ図示せず）、高リスクスコアのないことは、60%を占める5年継続完全寛解した良好な患者のサブセットを特定した。

【0041】

クラスターの臨床特徴との関連における妥当性をさらに評価するため、種々の臨床パラメータとの相関を、トレーニング（表2）およびテストセット（表3）両方において低および高リスクサブグループ間で分析した。トレーニングおよびテスト集団両方において、臨床特徴分布の顕著な類似性が観測された： β_2 -ミクログロブリン、C-反応性タンパク質、クレアチニン、ラクテート脱水素酵素（LDH）の高血清レベル、およびFISHにより定義される第13染色体の欠失と中期細胞遺伝学的異常は全て、トレーニングおよびテスト集団両方において高リスクグループにより一般的であった（ $P < 0.05$ ）。同様に、トレーニング

【0042】

総生存率およびイベントフリー生存率と関連した変数の多変数分析において、高下方／上方制御比予測子（高リスクスコア）は、トレーニング（表4: HR = 4.1, $P < 0.001$ ）およびテスト集団（データ図示せず、 $P=0.025$ ）両方において、競合する遺伝的および臨床的変数（国際ステージングシステムさえ含む）に対して調整後もその有意性を保持した。重要なことに、高リスクスコアは、完全寛解期間に逆相関する唯一の独立ベースラインパラメータでもあった（ハザード比、3.07; $P < 0.001$ ）。GEP由来リスクスコアのこの強

力な予後性能は、上方／下方制御比を転帰とする多変数分析によって示されるように、その既知の臨床予後変数との強力な相関によって部分的には説明することができる（表5）。表5中の変数は、広範に用いられるGEPアッセイに対する一時的、部分的代替として機能する可能性がある一方、表4は、高リスク転位（これもGEPによって測定可能）と組み合わせたそのようなアッセイは、ミエローマ用の強力かつ簡単な予後検査を提供する可能性を持つことを示唆する。

【表1－1】

表1-1

表1: 70 遺伝子高リスクシグネチャーを構成する遺伝子のリスト

ランク (Q4)	染色体	アフィニティスプローブセット	シンボル
1	8q21.13	202345_s_at	<i>FABP5</i>
2	Xp22.12	1555864_s_at	<i>PDHA1</i>
3	5p15.33	204033_at	<i>TRIP13</i>
4	1q22	206513_at	<i>AIM2</i>
5	2p24.1	1555274_a_at	<i>SELI</i>
6	21q22.3	211576_s_at	<i>SLC19A1</i>
7	3p21.3	204016_at	<i>LARS2</i>
8	1q43	1565951_s_at	<i>OPN3</i>
9	1q31.3	219918_s_at	<i>ASPM</i>
10	12q15	201947_s_at	<i>CCT2</i>
11	16p13.3	213535_s_at	<i>UBE2I</i>
12	20q13.31	204092_s_at	<i>STK6</i>
13	1p36.33	213607_x_at	<i>FLJ13052</i>
14	Xq12	208117_s_at	<i>LAS1L</i>
15	17q25	210334_x_at	<i>BIRC5</i>
16	3q27	204023_at	<i>RFC4</i>
17	1q21.2	201897_s_at	<i>CKS1B</i>
18	19q13.12	216194_s_at	<i>CKAP1</i>
19	1p11	225834_at	<i>MGC57827</i>
20	19q13.12	238952_x_at	<i>DKFZp7790175</i>
21	17p13.3	200634_at	<i>PFN1</i>
22	19p13.2	208931_s_at	<i>ILF3</i>
23	1q22	206332_s_at	<i>IFI16</i>
24	7p13	220789_s_at	<i>TBRG4</i>
25	10p11.23	218947_s_at	<i>PAPDI</i>

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表1-2

26	8q24	213310_at	<i>EIF2C2</i>
27	3q12.1	224523_s_at	<i>MGC4308</i>
28	1p36.13	201231_s_at	<i>ENO1</i>
29	18q12.1	217901_at	<i>DSG2</i>
30	6q22	226936_at	<i>C6orf173</i>
31	8q24.3	58696_at	<i>EXOSC4</i>
32	1q23.3	200916_at	<i>TAGLN2</i>
33	3q21	201614_s_at	<i>RUVBL1</i>
34	16p11.2	200966_x_at	<i>ALDOA</i>
35	2p25.1	225082_at	<i>CPSF3</i>
36	1q43	242488_at	<i>NA</i>
37	3q12.3	243011_at	<i>MGC15606</i>
38	22q13.1	201105_at	<i>LGALS1</i>
39	3p25.3	224200_s_at	<i>RAD18</i>
40	20p11	222417_s_at	<i>SNX5</i>
41	1q21.2	210460_s_at	<i>PSMD4</i>
42	12q24.3	200750_s_at	<i>RAN</i>
43	1q32.1	206364_at	<i>KIF14</i>
44	7p15.2	201091_s_at	<i>CBX3</i>
45	12q22	203432_at	<i>TMPO</i>
46	17q24.2	221970_s_at	<i>DKFZP586L0724</i>
47	11p15.4	212533_at	<i>WEE1</i>
48	3p12	213194_at	<i>ROBO1</i>
49	5q33.1	244686_at	<i>TCOF1</i>
50	8q23.1	200638_s_at	<i>YWHAZ</i>
51	10q23.31	205235_s_at	<i>MPHOSPH1</i>

10

20

30

【表 1 - 3】

表1-3

ランク (Q1)	染色体	アフィメトリクスプローブセット	遺伝子シンボル
1	9q31.3	201921_at	<i>GNG10</i>
2	1p13	227278_at	<i>NA</i>
3	Xp22.3	209740_s_at	<i>PNPLA4</i>
4	20q11.21	227547_at	<i>NA</i>
5	10q25.1	225582_at	<i>KIAA1754</i>
6	1p13.2	200850_s_at	<i>AHCYL1</i>
7	1p13.3	213628_at	<i>MCLC</i>
8	1p22	209717_at	<i>EVI5</i>
9	1p13.3	222495_at	<i>AD-020</i>
10	6p21.31	1557277_a_at	<i>NA</i>
11	1p22.1	1554736_at	<i>PARG1</i>
12	1p22	218924_s_at	<i>CTBS</i>
13	9p13.2	226954_at	<i>UBE2R2</i>
14	1p34	202838_at	<i>FUCA1</i>
15	13q14	230192_at	<i>RFP2</i>
16	12q13.11	48106_at	<i>FLJ20489</i>
17	11q13.1	237964_at	<i>NA</i>
18	2p22.3	202729_s_at	<i>LTBP1</i>
19	1p13.1	212435_at	<i>TRIM33</i>

10

20

30

【表 2】

表 2: トレーニング集団 (n=351) における臨床パラメータとリスクグループの相関関係

特徴	低リスク%	高リスク%	P
年齢 ≥ 65 才	20	20	0.856
アルブミン < 3.5 g/dL	13	35	0.001
β_2 -ミクログロブリン			
< 3.5 mg/L	62	42	0.005
≥ 3.5 且つ < 5.5 mg/L	20	20	
≥ 5.5 mg/L	19	40	
C-反応性タンパク質 ≥ 4 mg/L	51	62	0.235
LDH ≥ 190 IU/L	30	59	< 0.001
間期 FISH 定義 del13	31	49	0.031
細胞遺伝学的異常	26	70	< 0.001
GEP に基づく転位			
<i>CCND1</i>	20	0	< 0.001
<i>MMSET</i>	12	28	
<i>MAF/MAFB</i>	3	9	
無スパイク	65	63	

10

20

30

【表 3】

表 3: テスト集団 (n=181) における臨床パラメータとリスクグループの相関関係

特徴	低リスク%	高リスク%	P
年齢 ≥ 65 才	30	23	0.692
アルブミン < 3.5 g/dL	17	32	0.163
β_2 -ミクログロブリン			
< 3.5 mg/L	57	32	0.005
≥ 3.5 且つ < 5.5 mg/L	23	18	
≥ 5.5 mg/L	19	50	
C-反応性タンパク質 ≥ 4 mg/L	44	59	0.271
LDH ≥ 190 IU/L	18	59	0.000
細胞遺伝学的異常	27	77	0.000
GEP-に基づく転位			
<i>CCND1</i>	14	0	< 0.001
<i>MMSET</i>	12	23	
<i>MAF/MAFB</i>	7	36	
無スパイク	67	41	

10

20

【表 4】

表 4: トレーニング集団におけるイベントフリーおよび総生存率の多変数分析

N=325 [†]		イベントフリー生存率			生存率	
有意な予測子 [‡]	%	HR	P		HR	P
高リスク 上方／下方制御発現比 (Log ₂ -スケール) *	13	3.24	< 0.001		4.09	< 0.001
ベータ-2-ミクログロブリン ≥ 3.5 mg/L ベータ-2-ミクログロブリン < 5.5 mg/L	20	1.72	0.001		--	--
ベータ-2-ミクログロブリン ≥ 5.5 mg/L	21	2.01			--	
LDH ≥ 190 IU/L	34	--	--		1.92	0.004
間期 FISH 定義 del13	33	1.63	0.007		--	--
GEP 定義高リスク転位	18	1.97	0.001		1.85	0.0120
イベント / 死亡	138				87	
R ²	0.324				0.288	

[†] 351 中 26 患者は、FISH 定義 del13 を欠いていた。

[‡] 両転帰に対し P > 0.05 の予測子: 年齢 ≥ 65、間期細胞遺伝学的異常、アルブミン ≤ 3.5 g/dL および C-反応性タンパク質 ≥ 4。ダッシュは、いずれかの転帰に対する非有意性を示す。

* 51Q4 遺伝子の平均 log₂(発現) 引く 19Q1 遺伝子の平均 log₂(発現) (すなわち、上方制御対下方制御遺伝子幾何平均 log₂-スケール比)。高リスクは、K-平均クラスタリング > 0.66 (すなわち 1.58 の比) による。MMSET/FGFR3 スパイク (14.1%) は MAF/MAFB スパイク (3.7%) とあわせた。低リスクは、CCND1 スパイク (16.9%) および無スパイク (65.3%) を含む。まとめたカテゴリーは、高リスクおよび低リスクカテゴリー内のサブグループに対する転帰分布の類似性および MAF/MAFB サブグループのサイズが小さいことにより、予後カテゴリーとしてよりよく機能する。

10

20

【表 5】

表 5: 上方／下方制御発現比における倍変化の多変数分析

N=250 [†]		倍	
有意な予測子 [‡]	%	変化	P 値
相間 FISH 定義 amp1q21	43	0.316	< 0.001
細胞遺伝学的異常	30	0.353	< 0.001
CCND1 または CCND3 スパイク	20	-0.248	0.008
MAF/MAFB スパイク	4	0.430	0.030
MMSET/FGFR3 スパイク	14	0.297	0.005
LDH $\geq$ 190 U/L	31	0.332	< 0.001
アルブミン $\leq$ 3.5 g/dL	18	0.249	0.014
R ²	0.324		

[†] 351 中 98 患者は、FISH による amp1q21 を欠き、別の 3 人はアルブミンを欠いていた。

[‡] 両転帰に対し $P > 0.05$ である予測子: 年齢 ≥ 65 、ベータ-2-ミクログロブリン (≥ 3.5 , ≥ 5.5)、C-反応性タンパク質 (≥ 4)。

【0043】

実施例5

遺伝子発現モデルは再発後リスクと生存率を予測する

70遺伝子リスクモデルを、トレーニングセットの351患者中51人からの再発サンプルに適用した時、39 (76%) が高リスクスコアを示した (図4A)。ベースラインおよび再発サンプルの対分析において、診断時および再発時ともに低リスクとされた25患者が優れた再発後生存を示し、診断時低リスクで再発時高リスクの11患者、両観察時高リスクであった13患者がこれに続いた (図4B)。診断時高リスクで再発時低リスクの症例は2例しかなかった。

【0044】

実施例6

第1染色体遺伝子は高リスクモデルにおいて過剰発現している

70遺伝子ハイリスクシグネチャーが、高リスクMMにおける特定の遺伝子DNAの獲得または欠失を反映するかどうかを決定するため、遺伝子発現リスクシグネチャーを含む70遺伝子のマップ位置を比較した (表6)。マイクロアレイ上の遺伝子の10%に過ぎないが、70ハイリスク遺伝子のうち21 (30%) は第1染色体に位置した ($P < .0001$) : 第1四分位遺伝子19のうち9 (47%) は1pに位置し、うち5は1p13に位置した; 第4四分位遺伝子51のうち第1染色体に位置する12 (24%) のうち、9は1qに位置し、1pに位置する4つはp腕の極端なテロメアおよびセントロメア領域に位置した。これらのデータは、1q上におけるDNA物質の獲得と1p上の欠失が、高リスクMMの有意な決定因子であることを示唆する。

【表 6】

表 6: U133Plus2.0 マイクロアレイ上の全マップ済みプローブおよび高リスクシグネチャーの 70 遺伝子の染色体分布

	U133 Plus2.0		Q1		Q4		合計		
染色体	遺伝子数	%	遺伝子数	%	遺伝子数	%	遺伝子数	%	P *
1	5,379	10	9	47.4	12	23.5	21	30	< .0001
2	3,958	7.3	1	5.3	2	3.9	3	4.3	
3	3,275	6.1	0	0	7	13.7	7	10	
4	2,314	4.3	0	0	0	0	0	0	
5	2,615	4.8	0	0	2	3.9	2	2.9	
6	2,956	5.5	1	5.3	1	2	2	2.9	
7	2,769	5.1	0	0	2	3.9	2	2.9	
8	2,014	3.7	0	0	4	7.8	4	5.7	
9	2,139	4	2	10.5	0	0	2	2.9	
10	2,192	4.1	1	5.3	2	3.9	3	4.3	
11	2,889	5.4	1	5.3	1	2	2	2.9	
12	2,739	5.1	1	5.3	3	5.9	4	5.7	
13	1,250	2.3	1	5.3	0	0	1	1.4	
14	1,793	3.3	0	0	0	0	0	0	
15	1,805	3.3	0	0	0	0	0	0	
16	2,084	3.9	0	0	2	3.9	2	2.9	
17	2,843	5.3	0	0	3	5.9	3	4.3	
18	966	1.8	0	0	1	2	1	1.4	
19	2,839	5.3	0	0	3	5.9	3	4.3	
20	1,487	2.8	1	5.3	2	3.9	3	4.3	
21	662	1.2	0	0	1	2	1	1.4	
22	1,225	2.3	0	0	1	2	1	1.4	
X	1,691	3.1	1	5.3	2	3.9	3	4.3	
Y	107	0.2	0	0	0	0	0	0	
	53,991		19		51		70		
Affy コントロール	62								
未知	622								
総計	54,675								

*2 項分布の直接検定は、第 1 染色体に位置する保持プローブセット割合を全アレイに対する割合と比較するために使用した。

【 0 0 4 5 】

実施例 7

17 遺伝子モデルは 70 遺伝子モデルの代替となり得る。

高リスクは第 1 染色体のゲノム変化に関係しているらしいことを示した上で、高リスクおよび低リスクミエローマを判別できる最小遺伝子セットを決定した。トレーニングセットにおいて 70 遺伝子モデルにより定義された高リスク (N=46) および低リスク (N=305)

10

20

30

40

50

症例全部に付き、70高リスク関連遺伝子の多変数段階的判別分析（MSDA）を適用し、その結果得られた直線判別関数中に17遺伝子が特定された（表7）。モデル中のQ1遺伝子5中3（60%）およびQ4遺伝子12中5（45%）が、各々1pおよび1qに位置することは特筆に価する。そして、17遺伝子モデルは、トレーニンググループに適用され、70遺伝子モデルの高／低リスククラス分けに基づく正確なクラスを97.7%の正確さで予測した（表8A）。交差バリデーション分析は、サンプルセットからサンプルを1度に1つずつ除いて実行し、予測モデルをそのサンプル抜きで再計算した。そして、そのモデルを除去したサンプルのクラス分けに使用した。この交差バリデーション法において、予測精度は96.9%であった。そして、17遺伝子モデルは、第2プロトコルUARK 03-033を受ける181の新規診断患者のテストセットに対して適用された。MSDAモデルは再び、159中150（94.3%）の低リスクおよび22中21（95.5%）の高リスクサンプルを正しく判別した（表8B）。高リスクおよび低リスクグループの総生存率のカプラン－メイヤー評価は、17遺伝子モデル（図5）または70遺伝子モデル（図3D）のいずれによって定義しても同様であった。

【表7】

表 7: スコア順に並べた MSDA により定義される 17 遺伝子

アフィメトリクス プローブセット	遺伝子シンボル	染色体位置	MSDA スコア	70 遺伝子 四分位
206364_at	<i>KIF14</i>	1q32.1	0.38	Q4
211576_s_at	<i>SLC19A1</i>	21q22.3	0.32	Q4
201897_s_at	<i>CKS1B</i>	1q21.2	0.31	Q4
200638_s_at	<i>YWHAZ</i>	8q23.1	0.28	Q4
205235_s_at	<i>MPHOSPH1</i>	10q23.31	0.27	Q4
203432_at	<i>TMPO</i>	12q22	0.25	Q4
213607_x_at	<i>NADK</i>	1p36.21	0.23	Q4
204016_at	<i>LARS2</i>	3p21.3	0.19	Q4
220789_s_at	<i>TBRG4</i>	7p14-p13	0.19	Q4
206513_at	<i>AIM2</i>	1q22	0.16	Q4
242488_at	<i>NA</i>	1q43	0.15	Q4
219918_s_at	<i>ASPM</i>	1q31	-0.40	Q4
200850_s_at	<i>AHCYL1</i>	1p13.2	-0.21	Q1
218924_s_at	<i>CTBS</i>	1p22	-0.23	Q1
213628_at	<i>MCLC</i>	1p13.3	-0.25	Q1
202729_s_at	<i>LTBP1</i>	2p22-p21	-0.29	Q1
1557277_a_at	<i>NA</i>	6p21	-0.30	Q1

10

20

30

40

50

【表 8 A】

表 8A: 17 遺伝子モデルを用いたトレーニングセットのリスク予測の混同行列

70 遺伝子リスクグループ	総計	17 遺伝子リスクグループ	
		低	高
低	305	298	7
高	46	1	45

10

【表 8 B】

表 8B. 17 遺伝子を用いたテストセットのリスク予測の混同行列

70 遺伝子リスクグループ	総計	17 遺伝子リスクグループ	
		低リスク	高リスク
低	159	150	9
高	22	1	21

20

【0046】

実施例8

70遺伝子モデルにより定義された高リスクミエローマの、教師なし階層クラスター分析によって定義された分子サブグループとの関連付け

30

特定された高リスクグループは、以前定義された分子分類 [非特許文献9] との関連において検討された。高リスク疾患の定義は、CCND1またはCCND3 スパイクおよびCD20およびPREB3 発現を特徴とするCD-2タイプを除く全てのミエローマに関連していた (図6)。高リスクシグネチャーと増殖 (PR) サブグループの強度の相関にもかかわらず (図6)、外れ症例の存在は、高リスクシグネチャーが腫瘍細胞の増殖を反映するだけでなく、薬剤耐性のような短期生存を与える他の疾患特性も含む可能性のあることを示唆する。351トレーニング症例の70遺伝子高リスク閾値.66および増殖インデックス (PI) 5に従った分析は (図7A)、高および低PI分類が低リスクおよび高リスクグループ内の異なる生存率を持つサブグループの特定できないことを明らかにした (図7B)。t(4;14)(p16;q32)の50患者に適用したとき、70遺伝子リスクスコアは、再び低および高リスクサブグループを分割した (P < 0.001) (図7C)。

40

【0047】

実施例9

ボルテゾミブ単剤処置を受ける再発疾患における転帰を予測するための17遺伝子モデルの適用

17遺伝子モデルがミレニアムデータセットにおいて高リスクを予測するかどうかを調査するため、U133Plus2.0由来 (U-2) 17遺伝子モデルは、U133AB (U-AB) データを用いて再構築された。簡単に記述すると、高用量治療および幹細胞支持により処置された351新規診断症例からCD138 選択されたプラズマ細胞上のアフィメトリクスU133Plus2.0 (U2) マイクロアレイ (アフィメトリクス社、サンタクララ、カリフォルニア) は既に記述した (

50

GEO受け入れコード GSE2658) [非特許文献33]。上述の351中最初の144例由来の全く同じRNAサンプルも、U133A/B (UA) マイクロアレイ (アフィメトリクス社、サンタクララ、カリフォルニア) 上で分析し、このデータはGEOに入れた (GSE8991)。第3相試験においてボルテゾミブまたはデキサメタゾンで処置された再発多発性骨髄腫156患者のUAデータは、以前述べた^{2,3} (GEO受け入れ番号保留)。

【0048】

U2由来データを用いたウイルクスのラムダ基準による段階的多項直線判別分析 (MSDA) は、高および低リスク疾患の17遺伝子モデル予測子を定義するために使用された [非特許文献33]。生存分布は、カプランマイヤー法を使って表示され、対数ランク検定と比較した。統計検定は、SPSS 12.0ソフトウェアパッケージ (SPSS、シカゴ、イリノイ) を用いて実行した。

10

【0049】

U2プラットフォームを用いて特定された17遺伝子のうち、16はUAマイクロアレイ上にあった (表9)。そして、17遺伝子U2モデルを開発するために用いた多変数段階的判別分析 (MSDA) は、両タイプのアレイからのデータをもつ144症例の16UA遺伝子のシグナル強度に適用した。その結果得られたU2由来リスクスコアをUA由来モデルと関連させることにより、この分析は強い相関を明らかにし (図8A; $r = 0.89$; $P < 0.001$)、1.6よりも大きいスコアは量モデルにおいて高リスクであることを示した。両モデルにおいて1.6を閾値として用いると、混同行列は、U2およびUAで定義された高および低リスク間の96.5%の一致を示し (表10)、僅か5患者のみリスク帰属が異なっていた (UA版分類子は、高リスク2例と低リスク3例を帰属し直した)。U2モデルにより定義された高および低リスクグループのカプランマイヤー生存分析は、無調整ハザード比 (HR) 2.49で2グループ間の総生存率に有意な差を明らかにした (図9A)。同様に、UAにより定義したリスクグループのカプランマイヤー分析は、高リスクのHR2.58で、2グループ間の生存率に有意な差 ($P = 0.0026$) を明らかにした (図9B)。これらの結果は、UAプラットフォームを使用してリスクモデルを再構築できることを示す。

20

【0050】

次に、UA版は、ボルテゾミブまたはデキサメタゾンのいずれかによって処置された156例の再発疾患のミレニアムデータセットに適用した。高リスクモデルは、16遺伝子モデルを用いて156人のAPEX患者の13.5%を高リスクと定義した。これらの患者は、残りの患者に比べて有意に短い生存期間であった (図8B、 $P=0.0014$, $HR=2.5$)。この結果は、高リスクモデルが新規診断患者と同様に再発多発性骨髄腫にも有用であることを示唆する。この結果は、モデルが、ボルテゾミブおよびデキサメタゾンのような単剤治療を受けた患者に有用であることも示唆する。従って、各APEX腫瘍腕 (ボルテゾミブおよびデキサメタゾン治療患者、各々80人および76人) は、モデルが特定の治療薬に有意に影響されるかどうかを決定するために、別々に調べられた。図8Cおよび8Dに示すとおり、高リスクモデルは両グループにおいて高死亡リスクの患者を成功裏に特定した (各々、 $P=0.049$, $HR=2.3$ および $P=0.017$, $HR=2.5$)。

30

【表 9】

表 9. 16 遺伝子高リスクシグネチャーを構成する遺伝子のリスト

染色体	アフィメトリクスプローブセット	遺伝子シンボル
1q22	206513_at	<i>AIM2</i>
21q22.3	211576_s_at	<i>SLC19A1</i>
3p21.3	204016_at	<i>LARS2</i>
1q31	219918_s_at	<i>ASPM</i>
1p36.33-p36.21	213607_x_at	<i>FLJ13052</i>
1q21.2	201897_s_at	<i>CKS1B</i>
7p14-p13	220789_s_at	<i>TBRG4</i>
1q43	242488_at	<i>NA</i>
1pter-q31.3	206364_at	<i>KIF14</i>
12q22	203432_at	<i>TMPO</i>
8q23.1	200638_s_at	<i>YWHAZ</i>
10q23.31	205235_s_at	<i>MPHOSPH1</i>
1p13.2	200850_s_at	<i>AHCYL1</i>
1p13.3	213628_at	<i>MCLC</i>
1p22	218924_s_at	<i>CTBS</i>
2p22-p21	202729_s_at	<i>LTBP1</i>

10

20

30

【表 10】

表 10. 144 症例の 17 および 16 遺伝子モデルによるサブグループ帰属の混同行列

40

モデル	17 遺伝子	高リスク (N=26)	低リスク (N=118)	精度 (%)
16 遺伝子	高リスク	24	3	96.5
	低リスク	2	115	

【図 1 A】

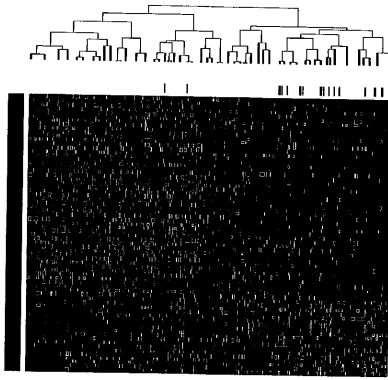
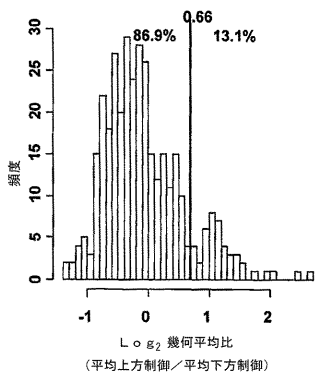
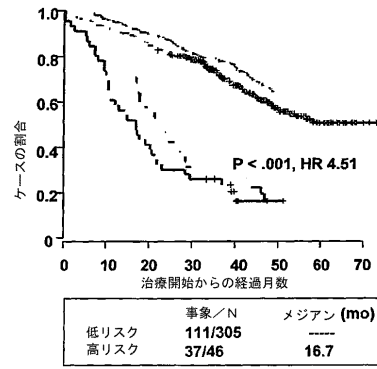


Fig. 1A

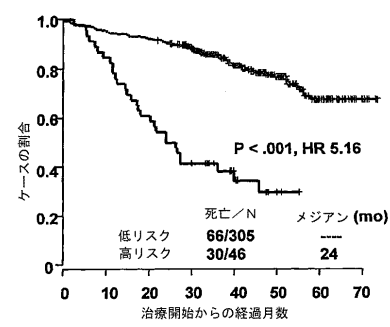
【図 1 B】



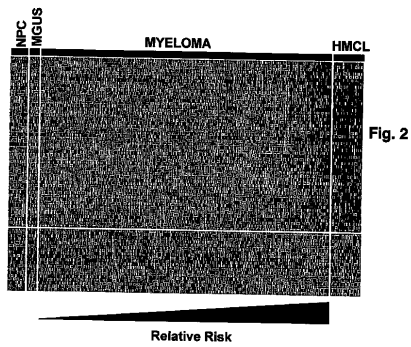
【図 1 C】



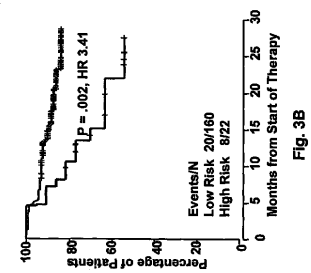
【図 1 D】



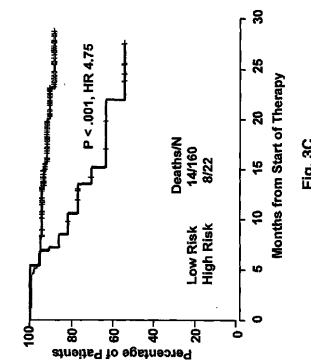
【図 2】



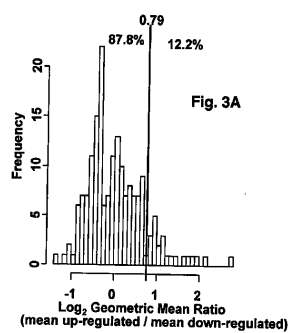
【図 3 B】



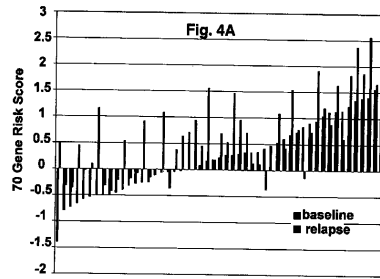
【図 3 C】



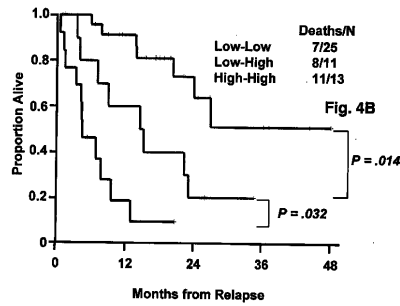
【図 3 A】



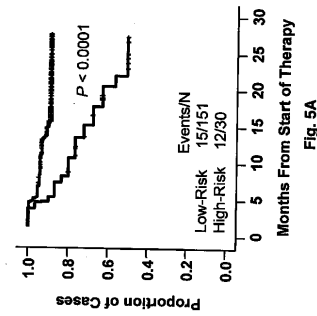
【図 4 A】



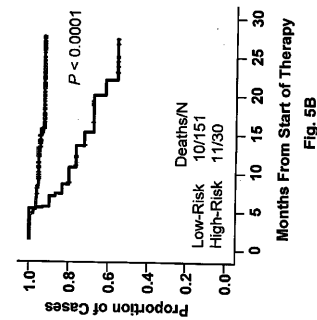
【図 4 B】



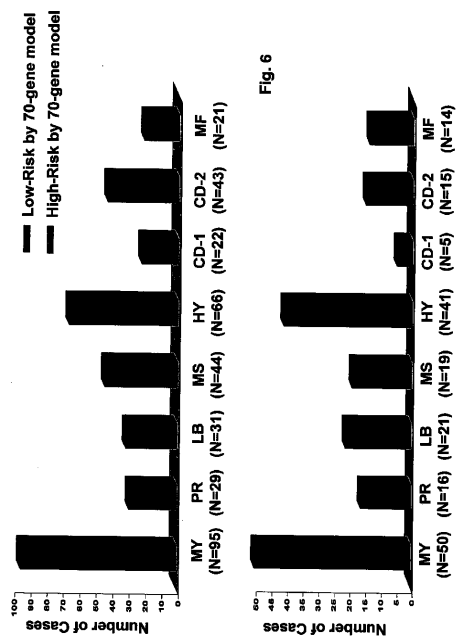
【図 5 A】



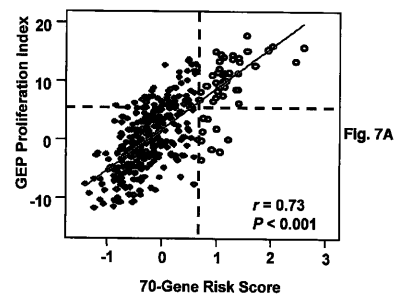
【図 5 B】



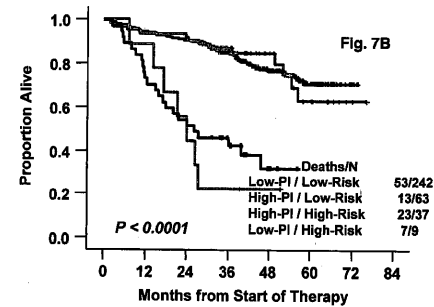
【図 6】



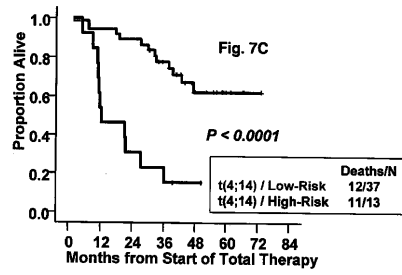
【図 7 A】



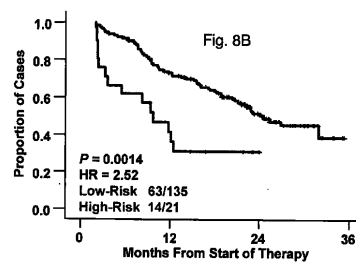
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 8 B】



【図 8 A】

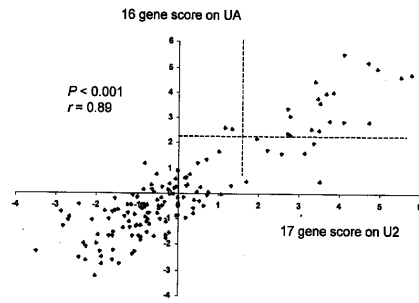
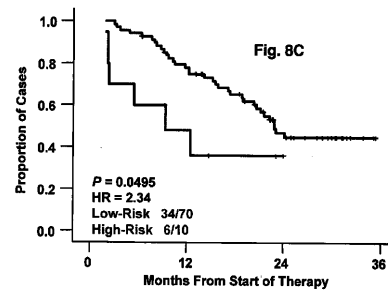
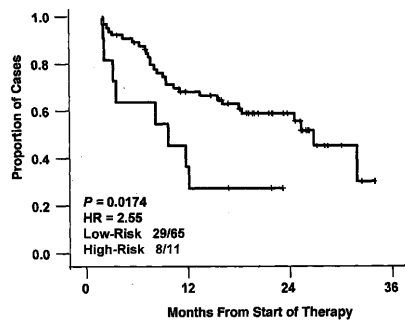


Fig. 8A

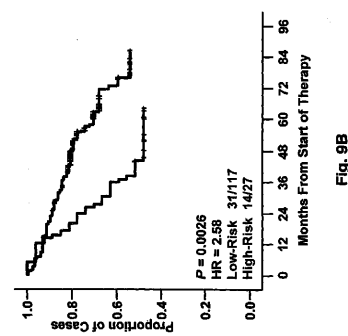
【図 8 C】



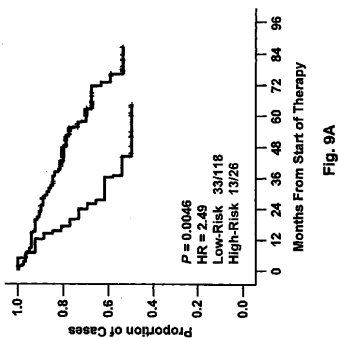
【図 8 D】



【図 9 B】



【図 9 A】



フロントページの続き

- (72)発明者 シャフネッシー, ジョン ディー
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 1 3 5 ローランド グッドソン ロード 2 6 2 1 7
- (72)発明者 チャン, フォンホアン
アメリカ合衆国 アリゾナ州 7 2 2 1 1 リトル ロック チェリー ベンド ドライヴ 2 0
0 2
- (72)発明者 バーロギー, バート
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 5 リトル ロック エドガーストーン ドライヴ
3 1 1 8
- (72)発明者 バーリントン, バート イー
アメリカ合衆国 アーカンソー州 7 2 2 0 5 リトル ロック ダブリュ マーカム ストリー
ト 4 3 0 1

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 5 / 1 1 6 2 5 9 (WO, A 1)
Blood, (2006.09), 108, [6], p.2020-2028

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 0 0
P u b M e d