

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6554646号
(P6554646)

(45) 発行日 令和1年8月7日 (2019. 8. 7)

(24) 登録日 令和1年7月19日 (2019. 7. 19)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6886 (2018. 01)
G O 1 N 33/574 (2006. 01)
G O 1 N 33/493 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z
G O 1 N 33/574 A
G O 1 N 33/493 A

請求項の数 18 (全 98 頁)

(21) 出願番号 特願2016-554811 (P2016-554811)
(86) (22) 出願日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)
(65) 公表番号 特表2016-538884 (P2016-538884A)
(43) 公表日 平成28年12月15日 (2016. 12. 15)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/066678
(87) 国際公開番号 W02015/077485
(87) 国際公開日 平成27年5月28日 (2015. 5. 28)
審査請求日 平成29年11月20日 (2017. 11. 20)
(31) 優先権主張番号 61/907, 013
(32) 優先日 平成25年11月21日 (2013. 11. 21)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 516150176
パシフィック エッジ リミテッド
ニュージーランド 9016 ダニーディ
ン セント デイヴィッド ストリート
87 ビーオーボックス 56
(74) 代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
(74) 代理人 100088694
弁理士 弟子丸 健
(74) 代理人 100094569
弁理士 田中 伸一郎
(74) 代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子型及び表現型バイオマーカーを用いる無症候性血尿を有する患者のトリアージ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、血尿を提示する患者で尿路上皮癌を有するリスクのレベルを決定する方法：

- a. 前記患者からの尿サンプルを提供する工程；
- b. 前記サンプルでヒトMDK、CDC2、HOXA13、及びIGFBP5の発現レベルを定量することを含む、MI値、並びに更なる値IL-8Rbを定量する工程；
- c. 前記患者の表現型変数、血尿の頻度 (HFREQ)、年齢 (年齢GT50)、性別、喫煙 (SMK)、及び赤血球数 (RBC)を査定する工程；
- d. 遺伝子型＋表現型インデックス (G+Pインデックス)を、
- 式 (i) $G+Pインデックス = (1 * HFREQ + 3 * 性別 + 4 * SMK) + (5 * MI + 2 * IL-8Rb)$ 若しくは
- 式 (ii) $G+Pインデックス = (w1 * HFREQ + w2 * 年齢GT50 + w3 * 性別 + w4 * SMK + w5 * RBC) + (w6 * MI + w7 * IL-8Rb)$ のどちらか、又は
- 式 (iii) $G+Pインデックス = -8.46 + 0.79 IGFBP5 - 1.60 HOXA13 + 2.10 MDK + 0.95 CD C2 - 0.38 IL8Rb + 0.98 SMK + 0.56 HFREQ + 1.11 性別 + 0.64 年齢GT50$
- にしたがって計算する工程、

(式中、

HFREQは6カ月の期間に高倍率一視野につき3つ以上の赤血球を発見する頻度を意味し、頻度が低い場合はHFREQ=0であり、高倍率一視野につき赤血球が3つより多い場合は1であり、

10

20

年齢GT50は対象の年齢を指し、50歳を超える場合は年齢GT50=1であり、50歳未満の場合は0であり、

性別は男性には1の値、女性には0が割り当てられ、

SMKは対象が現在又は以前に喫煙者であるか否かを意味し、非喫煙者ならばSMK=0であり、喫煙者ならば1であり、

RBCは赤血球数を意味し、25以上ならばRBCは1に設定され、25未満ならば0である）；及び

e. 該G+Pインデックスが、当該患者が尿路上皮癌を有するというリスクのレベルを示す閾値よりも高いか否かを決定する工程。

【請求項2】

10

前記閾値が、0から5、6から10、又は11-15のG+Pインデックス値のグループから選択され、ここで、前記値の0から5は低リスクを示し、6から10は中等度リスクを示し、11-15は高リスクを示す、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記閾値が6-10のG+Pインデックス値であるならば、前記患者は追加の臨床検査又は検査室検査を受ける、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記閾値が11-15のG+Pインデックス値であるならば、前記患者は追加の臨床検査又は検査室検査を受ける、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

20

前記閾値が0-5のG+Pインデックス値であるならば、前記患者は更なる臨床検査又は検査室検査のための監視リストに入る、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

閾値が統計的方法を用いて確立される、請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

該統計的方法が、線形判別分析（LDA）、ロジスティック回帰（LogReg）、サポートベクターマシーン（SVM）、k-最接近5近傍探索法（KN5N）及び分割樹分類法（TREE）のいずれか1つである、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

図6又は図7から選択される1つの追加遺伝子型マーカーの発現を定量する工程をさらに含む、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

30

【請求項9】

前記遺伝子発現定量工程がmRNAのレベルを検出することによって実施される、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記遺伝子発現定量工程がcDNAのレベルを検出することによって実施される、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記遺伝子発現定量工程が、前記cDNAの少なくとも一部分と相補的なオリゴヌクレオチドを用いて実施される、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

40

【請求項12】

前記遺伝子発現定量工程が、フォワードプライマー及びリバースプライマーを用いるqRT-PCR方法を用いて実施される、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記遺伝子発現定量工程がタンパク質のレベルを検出することによって実施される、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記遺伝子発現定量工程がペプチドのレベルを検出することによって実施される、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

50

前記遺伝子発現定量工程が前記マーカーに対する抗体を用いて実施される、請求項1から8又は13-14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

前記遺伝子発現定量工程が、サンドイッチ型免疫アッセイ方法を用いて又は抗体チップを用いて実施される、請求項1から8又は13-15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

前記遺伝子発現定量工程がモノクローナル抗体を用いて実施される、請求項1から8又は13-16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

前記遺伝子発現定量工程がポリクローナル抗血清を用いて実施される、請求項1から8又は13-16のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(優先権の主張) 本出願は、米国仮特許出願61/907,013 (2013年11月21日出願 (発明者: David Darling, Satish Kumar, Mark Dalphin及びPaul O' Sullivan)) に関し優先権を主張する (前記仮特許出願は参照により完全に本明細書に含まれる)。

(技術分野)

本発明は、疾患を示さない患者の検出に関する。特に、本発明は、癌がなく血尿を提示する患者のトリージングのために遺伝子マーカー及び表現型マーカーを使用することに関する。具体的には、本発明は、巨視的又は顕微鏡的血尿を有する患者のトリージングにおける遺伝子マーカー及び表現型マーカーの分析に関する。より具体的には、本発明は、無症候性の巨視的又は顕微鏡的血尿を有する患者をトリージングするため、さらに患者の症状が更なる臨床手続きの正当性を担保するか否かを予測するために遺伝子マーカー及び表現型マーカーを組み合わせて使用することに関する。

【背景技術】

【0002】

癌患者の生存は、当該癌が早期に治療されるとき顕著に高められる。膀胱癌症例では、原発部位に限定される疾患を有すると診断された患者は、5年生存率が、転移疾患を有する患者の6%に対して73%である (Altekruse et al)。したがって、膀胱癌の早期かつ正確な診断をもたらす開発は患者の予後の改善をもたらす。癌の早期検出を促進するために、多数の癌特異的マーカーが同定された。しかしながら、これらのマーカーの使用は、炎症性膀胱疾患を有し膀胱癌ではない患者で偽陽性結果を生じうる。

無症候性血尿 ("AH") はもっとも頻繁に生じる泌尿器学的所見の1つであり、発生率は集団に応じて2%から30%である (Schwartz G; Proper evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in the era of evidence-based medicine-progress is being made.

Mayo Clin Proc. 2013, 88(2), 123-125; McDonald M, Swagerty D, Wetzel L; Assessment of Microscopic hematuria in adults. AFP 2006 73:10; Grossfield G, Wolf J, Litwan M, Hricak H, Shuler C, Agarter D, et al. Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of AUA best practice policy recommendations. AAFP 2001:63:1145-54)。

しかしながら、AHは広範囲の病的状態の目安であり、AH集団では尿路悪性疾患の発生率は1.9-7%に及ぶ。AHが確定された全ての患者に完全な診断用精密検査を課することは多くの医療制度にとって大きな負担となる。高リスク患者と低リスク患者の分離のための表現型指標の使用がLooらの最近の研究で開発された (Loo R, Lieberman S, Slezak J, Landa H, Mariani A, Nicolaisen G, Aspera A and Jacobsen S: Stratifying risk of urinary tract malignant tumors in patients with asymptomatic microscopic hematuria. Mayo Clin Proc. 2013, 88(2); 129-138)。

確定されたAHを提示する4414人の患者に関する上述の研究は、73%の患者は原因が特定されず、一方、26%の患者は、原因を特定するために何らかの形の泌尿器学的精密検査の

10

20

30

40

50

必要があることを示した。AHを提示する患者の約2.5%が尿路上皮性悪性疾患と診断され、他の症状、例えば尿路感染（UTI）は2.3%で、腎結石は16.2%で、前立腺出血は4%で、さらに別の診断が行われた混入症例が0.4%であった（Loo et al., 上掲書）。

【発明の概要】

【0003】

我々は、現場における新規な問題、すなわち、膀胱癌ではない又は膀胱癌を有するリスクが低い血尿提示患者をいかにして識別するかを確認した。これは、血尿を示すが膀胱癌ではない多くの患者が、高価で侵襲的な更なる精密検査をそのような検査が必要でないときに受けることがあるという問題を解決する。したがって、本発明は、遺伝子情報及び表現型情報の組合せによって膀胱癌ではない又は膀胱癌を有するリスクが低い患者の識別が提供されるとき、膀胱癌の完全な精密検査に随伴する危険及び費用から個体を排除するために有用であり、かつ癌症状（尿路上皮癌、移行細胞癌（TCC）を含む）及び非癌症状（炎症疾患を含む）を有する患者から癌ではない患者の効率的なトリージングのために有用である。本発明は、癌であることを診断するのではなく癌ではないことを診断することが予想に反して有用であるという点で、新規な問題に対する新規なアプローチである。遺伝子規準及び表現型基準の組み合わせ使用は、遺伝的変数又は表現型変数のみよりも予想に反して良好な区別を提供する。データは、CLIA標準及び内部検証のためのブートストラップ法を用いたCURT+ノースショア（North Shore）製品試験の下で実証されたものに由来する541件から得られた。表現型変数には以下の存在が含まれる：（1）喫煙歴、（2）血尿、（3）性別及び（4）年齢。遺伝的変数にはIGF、HOXA13、MDK、CDC及びIL8Rの発現の分析が含まれる。遺伝子モデル+表現型モデル（“G+P”）は、遺伝的変数又は表現型変数のみよりも予想に反して良好な性能を示した。

【0004】

巨視的血尿（又は肉眼で識別される尿の血液所見）は、膀胱癌を有する患者に共通の所見である。このような患者について、膀胱癌の診断のために追加の診断手順を実施することはしばしば標準的な慣行である。しかしながら、顕微鏡的血尿を有する患者の容易な識別及び尿路上皮癌における顕微鏡的血尿の関与の理解はなお未解決課題である。

本明細書で、我々は、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を提示する患者が、もしそのような患者が追加の臨床手順を実施しないことの正当性を担保するために十分に低い膀胱癌の確率を有するならば、膀胱癌を含む尿路上皮癌（UC）を検出するための更なる侵襲的で高価な臨床手順を回避しうるか否かを決定する改善方法を提供する。

尿路上皮癌（UC）の高い確率を生ぜしめる因子が記載される。環境因子（例えば喫煙歴及び芳香族アミンへの職業的な暴露）に加えて、人工統計学的因子（例えば性別、人種及び年齢）はUC発症のリスクに顕著に寄与する。これらの因子を基準にした健康管理評価における患者の特徴付けは場当たりの利用されている。例えば、血尿を示す喫煙歴を有する60歳の男性は、同じ徴候を提示する35歳の非喫煙女性よりもUC陽性である確率が高い。しかしながら、これらの相違は、UCを有する患者の総合的確率に寄与するために定量化されていない。多様な遺伝子型因子及び表現型因子に特異的な重みを帰属させ、さらにこれらと診断検査の結果とを組み合わせることによって、非侵襲的検査の診断力の精度を顕著に高めることができ、臨床検査及びバイオマーカー検査によって規定されるUCを有する患者の確率を基準にして患者を分離するときより高い確実性を医師に提供する。

【0005】

膀胱癌の存在を検出するために利用可能な方法はあるが、患者が膀胱癌ではないか又は膀胱癌のリスクが低いかなどを決定する信頼できかつ正確な方法は存在しない。これを求めて、我々は、血尿（巨視的血尿又は顕微鏡的血尿）を提示する患者の癌症状を非癌症状から区別する新規な分析方法を開発した。本発明のいくつかの特徴では、我々は、UCを有する確率が低いAH患者をUCの確率が高いAH患者から効率的にトリージングするために、定量化された表現型変数及び定量化された遺伝子マーカー発現を組み合わせ、組合せ分離インデックス（“G+Pインデックス”）を形成した。この分離は、完全な泌尿器学的精密検査を必要としない人々の範囲を完全な精密検査を必要とする人々から明確に限定し、それに

よってUCの確率が低い患者で不要な精密検査を回避する。

表現型アッセイ

G+Pインデックスで評価される表現型変数には、血尿の頻度（HFREQ）、年齢、性別、喫煙歴、及び赤血球数（RBC）が含まれる。これらの用語は下記で定義される。表現型変数は本明細書では臨床所見及び観察を含むと定義される。

【0006】

遺伝子型アッセイ

一般に、パシフィックエッジ社（Pacific Edge Ltd.）によって開発された好ましい遺伝子型アッセイは、遺伝子マーカーCDC2、HOXA13、MDK及びIGFBP5の発現の定量を含む（“4マーカーアッセイ”）。別の好ましいアッセイでは、上記の4マーカー及び5番目のマーカーIL8Rが定量される（“5マーカー”又はCxb bladder(商標)アッセイ（パシフィックエッジ社（Dunedin, New Zealand）の商標）（Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock P et al: Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. Clin Cancer Res 2008;14:742; 及びO'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M et al: A Multigene Urine Test for the Detection and Stratification of Bladder Cancer in Patients Presenting with Hematuria, J Urol 2012, Vol. 188 No 3;746; 及び国際特許出願PCT/NZ2011/000238（発明の名称：膀胱癌検出の新規マーカー（“Novle Markers for Detection of Bladder Cancer”））。これらの刊行物及び特許出願は、参照によりそれらがあたかも別々に取り込まれたかのように完全に本明細書に含まれる。

好ましい実施態様では、4マーカーアッセイが、4つのmRNAマーカー（CDC2、HOXA13、MDK及びIGFBP5）を定量するためにPCR増幅を用い未分画尿について実施されうる（前記は尿路上皮癌で過剰に発現される）。IL8Rは好中球で高度に過剰発現され、結果として非悪性炎症症状で上昇する。この5番目のmRNAを加えることによって、移行細胞癌（TCC）の偽陽性検出リスクが顕著に低下する。患者の視点から、この検査は非侵襲的で非常に簡単である。単一尿サンプル（しばしば中間尿であるが完全にそれだけというものではない）が採取され、採取は来院することなく家庭で実施できる。

【0007】

Cxb bladder(商標)アッセイは、巨視的血尿を提示する患者で細胞学検査よりもはるかに鋭敏であることが示された。極めて注目に値することには、Cxb bladder(商標)アッセイは、Taを超える病期の全ての尿路上皮癌について感度100%（事前指定特異性85%）、全ての高い等級の腫瘍について感度97%を達成した。Cxb bladder(商標)アッセイは、患者の尿で示される5つの遺伝子の定量的な遺伝子発現を組み合わせた単一値スコアをもたらす。このスコアは、当該患者が尿路上皮癌を有する確率を基準にして3つのクラスに患者を分離する。

血尿（巨視的血尿又は顕微鏡的血尿）を提示する患者について、本発明は、同じ時期に当該患者から収集した表現型変数の付加によりこれらの遺伝子型ツール（4マーカーアッセイ又はCxb bladder(商標)アッセイ）を強化し、さらに、これらを組み合わせて尿路上皮癌（“UC”）を有する患者の確率に関して範囲の明確な3つのリスククラスに患者を分離するために用いることができる新規なツール（インデックス）を形成することが示された。

【0008】

特徴

本発明の特徴は下記のように例示される。これらが本発明の唯一の特徴又は実施態様ではないことは理解されよう。当業者は1つ以上の特徴を組み合わせることで別の特徴又は実施態様を生じることができる。

ある特徴は、血尿を提示する患者で尿路上皮癌を有するリスクのレベルを決定する方法を含み、前記方法は以下の工程を含む：

前記患者の尿サンプルを提供する工程；

前記サンプルでヒトMDK、CDC2、HOXA13、及びIGFBP5の発現レベルを定量することを含む、値、MIを定量する工程、

前記患者の表現型変数HFREQ、年齢GT、性別、SMK、及びRBCを査定する工程、
 式(i)、G+Pインデックス $= (1 \cdot \text{HFREQ} + 3 \cdot \text{性別} + 4 \cdot \text{SMK}) + (5 \cdot \text{M1} + 2 \cdot \text{IL-8})$ 若しくは
 式(ii)、G+Pインデックス $= (w1 \cdot \text{HFREQ} + w2 \cdot \text{年齢GT50} + w3 \cdot \text{性別} + w4 \cdot \text{SMK} + w5 \cdot \text{RBC}) + (w6 \cdot \text{M1} + w7 \cdot \text{IL-8})$ のどちらか、又は
 $\text{G+Pインデックス} = -8.46 + 0.79\text{IGF} - 1.60\text{HOXA} + 2.10\text{MDK} + 0.95\text{CDC} - 0.38\text{IL8R} + 0.98\text{SNS} + 0.56\text{Hfreq} + 1.11\text{性別} + 0.64\text{年齢}$ にしたがってG+Pインデックスを計算する工程、及び
 G+Pインデックスが、当該患者が尿路上皮癌を有するというリスクレベルを示す閾値よりも高いか否かを決定する工程。

【0009】

追加の特徴は他の特徴の方法を含み、ここで、前記閾値は、0から5、6から10、又は11
 −15のG+Pインデックス値の群から選択され、前記値の0から5は低リスクを示し、6から10
 は中等度リスクを示し、11−15は高リスクを示す。

さらに別の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記閾値が6−10のG+Pインデ
 ックス値であるならば、前記患者は追加の臨床検査又は検査室検査を受ける。

さらにまた別の特徴は任意の先行する特徴の方法を含み、ここで、前記閾値が11−15の
 G+Pインデックス値であるならば、前記患者は追加の臨床検査又は検査室検査を受ける。

さらになお別の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記閾値が0−5のG+Pイ
 ンデックス値であるならば、前記患者は更なる臨床検査又は検査室検査のための監視リス
 トに入る。

追加の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、閾値は統計的方法を用いて確立さ
 れる。

さらに別の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、統計的方法は、線形判別分析
 (LDA)、ロジスティック回帰(LogReg)、サポートベクターマシーン(SVM)、k-最接近
 5近傍探索法(KN5N)及び分割樹分類法(Partition Tree Classifier (TREE))のいずれ
 か1つである。

追加の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、前記方法はさらに、図6又は図7から選択さ
 れる1つの追加の遺伝子型マーカーの発現を定量する工程を含む。

【0010】

他の特徴は任意の先行する特徴の方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量工程は、mR
 NAのレベルを検出することによって実施される。

さらに別の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量抗体はcD
 NAのレベルを検出することによって実施される。

さらにまた別の特徴は任意の他の特徴のいずれかの方法を含み、ここで、前記遺伝子発
 現定量工程は前記cDNAの少なくとも一部分と相補的なオリゴヌクレオチドを用いて実施さ
 れる。

追加の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量工程は、フォ
 ワードプライマー及びリバースプライマーを用いるqRT-PCR方法を用いて実施される。

さらにまた追加の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量工
 程はタンパク質のレベルを検出することによって実施される。

さらに他の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量工程はペ
 プチドのレベルを検出することによって実施される。

追加の特徴は任意の他の特徴のいずれかの方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量工
 程は前記マーカーに対する抗体を用いて実施される。

さらにまた別の追加の特徴は請求項1から8又は13−15のいずれかの方法を含み、ここ
 で、前記遺伝子発現定量工程は、サンドイッチ型免疫アッセイ方法又は抗体チップを用いて
 実施される。

さらにまた別の特徴は任意の他の特徴の方法を含み、ここで、前記遺伝子発現定量工
 程はモノクローナル抗体を用いて実施される。

他の特徴は任意の他の特徴のいずれかの方法を含み、ここで前記遺伝子発現定量工程は
 ポリクローナル抗血清を用いて実施される。

10

20

30

40

50

【0011】

G+Pインデックス

上記に記載の表現型変数及び遺伝子型変数を以下の関係にしたがって組み合わせてG+Pインデックスを作成する：

$$G+Pインデックス = (w1 * HFREQ + w2 * 年齢GT50 + w3 * 性別 + w4 * SMK + w5 * RBC) + (w6 * M1 + w7 * IL-8),$$

式中、HFREQは6カ月の期間に高倍率一視野につき3つ以上の赤血球を発見する頻度を意味し、頻度が低い場合はHFREQ=0であり、高倍率一視野につき赤血球が3つより多い場合は1である。年齢GT50は対象動物の年齢を指し、50歳を超える場合は年齢GT50=1であり、50歳未満の場合は0である。性別は男性には1の値、女性には0が割り当てられる。SMKは対象動物が現在又は以前に喫煙者であるか否かを意味し、非喫煙者ならばSMK=0であり喫煙者ならば1である。RBCは赤血球数を意味し、25以上ならばRBCは1に設定され、25未満ならば0である。M1は遺伝子マーカーMDK、CDC、IGFBP5及びHOXA13の発現の組合せであり、M1>4.5ならば1に設定され、4.5未満ならば0である。IL-8はIL-8のRNAの発現レベルを指し、IL-8>2.5ならばIL-8は1に設定され、2.5未満ならば0である。記号“*”は乗算演算子を意味し、重み係数、w1-w7はG+Pインデックスで上記に列挙した変数の各々にそれぞれ割り振られる重みである。

【0012】

他の好ましい実施態様では、（年齢GT50及びRBC）は以下に示すように当該モデルから落とすことができる：

$$G+Pインデックス = (1 * HFREQ + 3 * 性別 + 4 * SMK) + (5 * M1 + 2 * IL-8)。$$

G+Pインデックスは0から15の値を生じる。G+Pインデックス値が11から15の患者は膀胱癌について“高リスク”であると考えられ、膀胱癌について追加の精密検査の必要性を指摘する。G+Pインデックス値が6から10の患者は膀胱癌発症の“中等度リスク”と考えられ、追加の精密検査が指摘される。G+Pインデックス値が0から5の患者は膀胱癌発症の“低リスク”と考えられる。“低リスク”グループの患者は監視待機リストに入り、追加の徴候が出現するか又は顕微鏡的血尿の再発エピソードが生じたら、それら患者は更なる可能な精密検査について再評価される。

実施例3（図18及び19）でより完全に述べるように、我々は、定量化表現型変数単独のROC曲線は軽度なレベルの診断力をもたらすことを見出した。定量化遺伝子型マーカー単独のROC曲線は顕著なレベルの診断力を発揮した。我々は、遺伝子型変数及び表現型変数の両方がG+Pインデックスに組み合わされるととき予想に反してより良好な診断力を見出した。

【0013】

遺伝子発現の定量

細胞によって分泌され又は細胞から切り取られる、或いはアポトーシスメカニズムによって失われる（前記事象は単独で又は互に組み合わせられて生じる）タンパク質又は核酸は、疾患（膀胱の炎症疾患及び/又は膀胱癌を含む）の診断のための血清若しくは体液マーカーとして、又は定着疾患の進行を監視追跡するためのマーカーとして有用である。タンパク質及び細胞マーカーの検出は当業界で公知の方法を用いて実施でき、前記方法にはRT-PCR、qRT-PCR、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗血清などの使用が含まれる。

特に、本発明は、血尿（巨視的血尿又は顕微鏡的血尿）を提示する患者をトリアージする方法を提供し、前記方法は、（i）生物学的サンプルを提供する工程、（ii）前記サンプルで1つ以上の膀胱腫瘍マーカー（BTM）を検出する工程を含む。特に関心が高い膀胱腫瘍マーカーにはMDK、CDC2、HOXA13、及びIGFBP5が含まれる（“4-マーカーアッセイ”）。場合によって、ヒト好中球マーカー、インターロイキンレセプターB（IL8Rb）のサンプル中のレベルを検出することができる（Cxbladder(商標)アッセイ）。癌の存在は、1つ以上のBTMのレベルを、正常患者、初期膀胱癌を有する患者、及び/又は炎症疾患を有する患者のレベルと比較することによって確立することができる。例えば、癌の存在は、BTMの発現を発現閾値に対して比較することによって確立することができる。閾値は、癌では

ない患者のグループの発現レベルの少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10、100、1000、又は10,000倍までの規模でありうる。他の特徴では、膀胱腫瘍マーカーの発現が変化しないIL8Rbの高い発現は癌ではなく炎症疾患の目安でありうる。

【0014】

本発明の方法は、膀胱癌を検出する任意の適切なマーカーと合わせて用いることができる。本発明で使用される適切なマーカーの例は図6又は7に概略される。本発明は図6又は7に概略したマーカーのいずれか1つ以上の使用を含む。

場合によって、他の好ましい実施態様では、本発明は、IL8RbとマーカーMDK、CDC2、HOXA13、及びIGFBP5の1つ以上との任意の組合せを含むことができる。前記マーカーはまた、膀胱癌の検出に適切な1つ以上の他のマーカー、例えば図6又は7に概略したマーカーの任意の1つ以上と組み合わせることができる。より具体的には、本発明は、以下の任意の1つ以上のマーカーの組合せの発現を定量することを含む：IL8Rb/MDK、IL8Rb/CDC2、IL8Rb/HOXA13、IL8Rb/IGFBP5、IL8Rb/MDK/CDC2、IL8Rb/MDK/HOXA13、IL8Rb/MDK/IGFBP5、IL8Rb/CDC2/HOXA13、IL8Rb/CDC2/IGFBP5、IL8Rb/HOXA13/IGFBP5、IL8Rb/MDK/CDC2/HOXA13、IL8Rb/MDK/CDC2/IGFBP5、IL8Rb/CDC2/HOXA13/IGFBP5、及びIL8Rb/MDK/CDC2/HOXA13/IGFBP5。これらの組合せは、場合によって膀胱癌の検出に適切な1つ以上のさらに別のマーカー、例えば図6又は7に概略したマーカーの任意の1つ以上を含むことができる。

【0015】

本発明はまた膀胱の炎症症状を検出する方法を提供し、前記方法は、(i)患者の生物学的サンプルを提供する工程、及び(ii)前記サンプルでヒト好中球マーカーインターロイキン8レセプターB (IL8Rb) のレベルを検出する工程を含む。膀胱の炎症症状の存在は、IL8Rbのレベルを、正常患者、血尿を有する患者、及び膀胱の炎症疾患を有する患者のレベルと比較することによって確立される。例えば、膀胱の炎症症状の存在は、マーカーIL8Rbの発現を閾値に対して比較することによって確立することができる。閾値は、別のグループの患者の発現レベルの少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10、100、1000、又は10,000倍までの規模でありうる。

本発明の好ましい遺伝子型分け方法は、任意の適切な遺伝子発現マーカーを検出することによって、例えばmRNA、cDNA、タンパク質又はペプチドのレベルを任意の適切な方法を用いて決定することによって実施できる。

診断の確立は、分類法システム、例えば線形判別分析 (LDA)、ロジスティック回帰 (LogReg)、サポートベクターマシーン (SVM)、k-最接近5近傍探索法 (KN5N) 及び分割樹分類法 (TREE) の使用により達成することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

(本発明をその特定の実施態様及び以下の図面を参照しつつ説明する)

【図1】 IL8Rb (CXCR2としても知られている) のタンパク質及びmRNA配列を示す。

【図2】 非悪性疾患 (前立腺疾患、膀胱炎、尿路感染、及び尿石症) からのTCCの分離におけるIL8Rbの効果を示す散布グラフである。図2c及び2fでは、IL8Rbが種々の膀胱癌RNAマーカーに代わって用いられた。(a) MDK/IGFBP5; (b) MDK/HOXA13; (c) MDK/IL8Rb; (d) CDC2/IGFBP5; (e) CDC2/HOXA13; (f) CDC2/IL8Rb。

【図3】 線形判別分析 (LD) 及び線形回帰 (LR) を用いて得られる診断アルゴリズムにIL8Rbを含むことの効果を示すROC曲線分析 (感度対特異性) である。ROC曲線は、TCC及び上部尿路癌 (n=61)、並びに非悪性疾患 (膀胱炎、尿路感染、及び尿石症) (n=61) を有する患者から得られた。(a) LD1 (実線) 及びLD2 (破線); (b) LR1 (実線) 及びLR2 (破線)。IL8RbはLD2及びLR2に含まれる。

【図4】 線形判別分析 (LD) 及び線形回帰 (LR) を用いて得られる診断アルゴリズムにIL8Rbを含むことの効果を示す拡張ROC曲線分析である。ROC曲線は、コホート内にTCC (n=56) 及び図3と異なり任意の非悪性疾患 (n=386) を有する患者から得られる。(a) LD1 (実線) 及びLD2 (破線); (b) LR1 (実線) 及びLR2 (破線)。IL8RbはLD2及びLR2に含ま

10

20

30

40

50

れる。

【図5】非悪性泌尿器疾患を有する患者の尿中のIL8Rb mRNA蓄積を示すボックスプロットである。RNAはデルタ-Ct法 (Hollyoake et al. 2008) を用いてqRT-PCRによって定量された。この方法によれば、より小さなCtはより高いRNAレベルを表す。BPH：良性前立腺肥大、UTI：尿路感染、Ns prostate：不特定前立腺疾患、Vasc. Prostate：血管性前立腺、warfarin：ワルファリン使用による二次性血尿。膀胱炎/UTIを有する患者における観察は、表示の他の非悪性疾患で示されるものと顕著に相違する ($p=0.001$)。

【図6】膀胱癌で過剰発現されることが知られ、本発明での使用が適切なマーカーを示す。

【図7】膀胱癌で発現が低下することが知られ、本発明での使用が適切なマーカーを示す。 10

【図8】実施例2の患者募集手順及び数についてのフローチャートを示す。

【図9】3カ月時点の疾患状況による患者の基準時の臨床的特徴及び人工統計学的特徴を示す。

【図10】尿検査の総合的感度及び特異性を示す。

【図11】多様なROC曲線を示す。図11aは、NMP22 ELISA及びuRNA-D (4マーカーMDK+CDC2+IGFBP5+HOXA13を含む検査) についてのROC曲線を示す。図11bは、5マーカーMDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5及びIL8RbについてのROC曲線を示す。

【図12】病期、等級、腫瘍の位置、腫瘍の多発度、血尿状況、尿サンプルのクレアチニン、及び性別による尿検査の感度を示す。表は、TCC患者で尿検査陽性を有する者の数及びパーセントを示す。 20

【図13】診断、巨視的血尿、又はクレアチニン及び性別による尿検査の特異性を示す。表は、TCCではない者で尿検査が陰性の結果の数及びパーセントを示す。

【図14】5つの異なる分類法モデル ((i) 線形判別分析 (LDA)、 (ii) ロジスティック回帰 (LogReg)、 (iii) サポートベクターマシン (SVM)、 (iv) k-最接近5近傍探索法 (KN5N) 及び (v) 分割樹分類法 (TREE)) を用いる、以下のマーカー組合せについてのROC曲線を示す： (a) MDK、 (b) CDC、 (c) IGFBP5、 (d) HOXA13、 (e) MDK+CDC2、 (f) MDK+IGFBP5、 (g) MDK+HOXA13、 (h) CDC2+IGFBP5、 (i) CDC+HOXA13、 (j) IGF+HOXA13、 (k) MDK+CDC2+IGFBP5、 (l) MDK+CDC2+HOXA13、 (m) MDK+IGFBP5+HOXA13、 (n) CDC2+IGFBP5+HOXA13、 (o) MDK+CDC2+IGFBP5+HOXA13、 +又は-IL8Rb 30

【図15】感度選択性実験の結果を示す。図15aは、図14のROC曲線の20%までの偽陽性率 (80%特異性) についての“曲線下面積” (AUC) を示し、図15bは、IL8Rbを加えることから生じるAUCの相違を示す。

【図16】5つの異なる分類法モデル ((i) 線形判別分析 (LDA)、 (ii) ロジスティック回帰 (LogReg)、 (iii) サポートベクターマシン (SVM)、 (iv) k-最接近5近傍探索法 (KN5N) 及び (v) 分割樹分類法 (TREE)) を、種々の特異性設定 (a) 80%、 (b) 85%、 (c) 90%、 (d) 95%、 (e) 98%で用いる、4つのマーカー (MDK、CDC2、IGFBP5、及びHOXA13)、+又は-IL8Rbの組合せの感度のグラフを示す。

【図17】種々の設定特異性、 (a) 80%、 (b) 85%、 (c) 90%、 (d) 95%、 (e) 98%でIL8Rbを加えることによる感度の増加、及び種々の特異性、 (f) 80%、 (g) 85%、 (h) 90%、 (i) 95%、 (j) 98%でIL8Rbを加えることにより生じる特異性の増加を示す。 40

【図18】遺伝子検査単独、表現型評価単独、及び/又は遺伝子検査と表現型評価の両方を用いて調べた血尿を有する患者の検査についてのROC曲線を示す。

【図19】変数 (性別、喫煙歴及び本発明のHFREQNEW) のためのオッズ比 (横軸) のグラフを示す。

【図20A-20B】診断精度報告標準のためのフローチャートを示す。図20Aは本実験の3つのコホート全てにおける巨視的血尿を有する患者のためのフローチャートを示す。図20Bは本実験に含まれる顕微鏡的血尿を有する患者の診断精度記録のためのフローチャートを示す。 50

【図 2 1】3つの分類モデルを表すROC曲線である。Pインデックス（点線）、Gインデックス（破線）及びG+Pインデックス（実線）。

【図 2 2】各モデルにおけるNPV対血尿検査陰性患者比を示す。Pインデックス（点線）、Gインデックス（破線）及びG+Pインデックス（実線）。

【図 2 3】検出結果（横軸）とトリアージ結果（縦軸）との関係を示すグラフである。

【図 2 4】G2インデックス（横軸）対G1+Pインデックス（縦軸）のグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

本発明の実施態様を詳細に述べる前に、本明細書で用いられる用語のいくつかの定義を提供することは有用であろう。

“マーカー”という用語は、生物学的現象の存在と定量的又は定性的に密接に関係する分子を指す。“マーカー”の例には以下が含まれる：ポリヌクレオチド（例えば遺伝子若しくは遺伝子フラグメント（コード性又は非コード性））、又は遺伝子生成物（ポリペプチド（例えばペプチド、オリゴペプチド）、タンパク質又はタンパク質フラグメントを含む）、又は任意の関連代謝物、副生成物、又はその他の識別分子（例えば抗体又は抗体フラグメント（当該現象の基礎をなすメカニズムに直接関連するもの又は間接的に関連するもの））。本発明のマーカーには、本明細書に開示されるヌクレオチド配列（例えばGenBank配列）が含まれ、前記はとくに完全長配列、任意のコード配列、任意のフラグメント、任意の可能なプローブ（例えばエクソン-エクソン境界をまたいで作出される）（捕捉モチーフ、ヘアピン又は蛍光色素分子を有するものを含む）、又は前記の任意の相補物、及び上記に定義された任意の測定可能なそのマーカーである。

【0018】

本明細書で用いられる“抗体”又は類似の用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン（Ig）分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原と特異的に結合する（免疫的に反応する）抗原結合部位を含む分子を指す。これらには以下が含まれる：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fc、Fab、Fab'、及びFab₂フラグメント、並びにFab発現ライブラリー（ただしこれらに限定されない）。抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgE及びIgDクラス（前記は当該分子に存在する重鎖の性質によって互に相違する）のいずれとも関係する。これらは同様にサブクラス（例えばIgG1、IgG2及びその他）を含む。軽鎖はカッパ鎖又はラムダ鎖でありうる。本明細書で抗体と言え、全てのクラス、サブクラス及びタイプに該当するものを含む。さらにまた含まれるものは、キメラ抗体、例えばモノクローナル抗体又はそのフラグメントであって2つ以上の供給源（例えばマウス及びヒト）に特異的なものである。さらにまた含まれるものは、ラクダ類の抗体、サメ抗体又はナノボディである。

“癌”及び“癌性”という用語は、典型的には異常な又は調節不能の細胞増殖を特徴とする生理学的状態を指し又はそのような状態をいう。癌及び癌病変は、例えば転移、近隣細胞の正常な機能の妨害、異常なレベルのサイトカイン若しくは他の分泌生成物の放出、炎症応答若しくは免疫学的応答の抑制又は悪化、新形成、前悪性疾患、悪性疾患、周辺若しくは遠位組織又は器官（例えばリンパ節）の侵襲などと密接に関係する。

“腫瘍”という用語は、全ての新形成性細胞成長及び増殖（悪性であれ良性であれ）並びに全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を指す。

“膀胱癌”という用語は膀胱に原発する腫瘍を指す。これらの腫瘍はいずれの器官にも転移することができる。

【0019】

“BTM”又は“膀胱腫瘍マーカー”又は“BTMファミリーメンバー”という用語は、尿路上皮癌、膀胱癌、膀胱の移行細胞癌（TCC）、膀胱の扁平上皮細胞癌、及び腺癌に随伴する腫瘍マーカー（TM）を意味する。BTMという用語はまた個々のマーカーの組合せ物を含み、その組合せ物は膀胱癌検出の感度及び特異性を改善する。BTMは当該マーカーが膀胱腫瘍に対してのみ特異的であることを必要としないことは理解されるべきである。むしろ

、BTMの発現は他のタイプの細胞、罹患細胞、腫瘍（悪性腫瘍を含む）で変化する。

“発現減少BTM”という用語は、非悪性膀胱組織よりも膀胱腫瘍で低い発現を示すマーカーを意味する。

“発現上昇BTM”という用語は、非悪性組織よりも膀胱腫瘍で高い発現を示すマーカーを意味する。

“弁別的に発現される”、“弁別発現”という用語及び類似の語句は、コントロール対象動物（例えば参照サンプル）におけるその発現と比較して、症状、具体的には癌（例えばメラノーマ）を有する対象動物（例えば試験サンプル）でより高レベル又はより低レベルで発現が活性化される遺伝子マーカーを指す。前記用語はまた、同じ症状の異なる病期で、予後良好若しくは予後不良を示す疾患で、又は高レベル若しくは低レベルの増殖を示す細胞でその発現が高レベル若しくは低レベルで活性化されるマーカーを含む。弁別的に発現されるマーカーは、ポリヌクレオチドレベル若しくはポリペプチドレベルで活性化若しくは阻害されるか、或いはまた別のスプライシングを受けて異なるポリペプチド生成物を生じることがある。そのような相違は、例えばポリペプチドのmRNAレベル、表面発現、分泌又はその他の分配における変化によって証明することができる。

【0020】

弁別発現は、2つ以上のマーカー（例えば遺伝子又はそれらの生成物）間の発現の比較、又は2つ以上のマーカー（例えば遺伝子又はそれらの生成物）間の発現比率の比較、又は同じマーカーの異なるプロセスを受けた2つの生成物の比較を含むことができ、それらは、正常な対象動物と罹患対象動物との間で、又は同じ疾患の多様な病期の間で、又は予後がよい疾患と予後が悪い疾患との間で、又は増殖レベルが高い細胞と低い細胞との間で、又は正常組織と罹患組織（具体的には癌、又はメラノーマ）との間で相違する。弁別発現は、例えば正常細胞及び罹患細胞間における、又は異なる疾患事象若しくは病期を経た細胞間における、又は異なる増殖レベルを有する細胞間における遺伝子又はその発現生成物の一時的な発現パターン又は細胞の発現パターンの量的相違及び性状的相違の両方を含む。

“発現”という用語は、ポリヌクレオチド及びポリペプチドの生成、特に遺伝子又は遺伝子の一部分からのRNA（例えばmRNA）の生成を含み、さらにRNA又は遺伝子又は遺伝子の一部分によってコードされるポリペプチドの生成、及び発現に随伴する検出可能な物質の出現を含む。例えば、複合物の形成（例えばポリペプチド-ポリペプチド相互作用、ポリペプチド-ヌクレオチド相互作用などに由来する）は、“発現”という用語の範疇に含まれる。別の例は、結合リガンド（例えばハイブリダイゼーションプローブ又は抗体）の遺伝子若しくは他のポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド、ポリペプチド若しくはタンパク質フラグメントとの結合、及び結合リガンドの可視化である。したがって、マイクロアレイ、ハイブリダイゼーションプロット（例えばノザンプロット）若しくは免疫ブロット（例えばウェスタンブロット）、又はビーズアレイ、又はPCR分析によるスポットの強度は、問題の生物学的分子の“発現”という用語に含まれる。

【0021】

“遺伝子発現閾値”及び“規定発現閾値”は互換的に用いられて問題のマーカーのレベルを指し、その範囲を超えるポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現レベルは、患者の症状を予測するマーカーとして機能する。例えば、一定の閾値を超えるIL8Rbの発現は、患者が炎症症状を有するという診断となる。閾値はまた、膀胱癌マーカーを用いて膀胱癌が疑われる患者を検査するときに用いることができる。閾値を超える発現レベルは患者が炎症性膀胱症状を有することを示し（偽陽性癌検査を引き起こしやすい）、一方、閾値より低いIL8Rbの発現レベルは、患者が炎症性膀胱症状をもたないことを予測する。IL8Rbの測定を加えることによって、膀胱腫瘍マーカーの発現のいずれの結果も、IL8Rbのレベルが閾値より低い場合には信頼することができる（すなわち、陽性結果は、炎症に起因する粘膜の非悪性疾患細胞の剥離から実際に生じた膀胱腫瘍マーカーの増加ではなくて癌を有する患者について陽性である確率が高い）。

“診断閾値”という用語は、ある症状（例えば膀胱癌）の有無を患者に告げることがで

きる閾値を指す。診断閾値は、一般的に、要件（例えば集団、流行、及びおそらくは臨床的所産）に応じて所望の感度及び特異性を達成するように設定される。一般的に、診断閾値はアルゴリズム及び/又はコンピュータによるデータ解析を用いて計算及び/又は確立できる。

正確な閾値は集団に左右され、任意のモデルがまた疾患の予測に用いられる（予測モデル）。閾値は、臨床研究（例えば下記実施例に記載されるもの）から実験的に確立される。用いられる予測モデルに応じて、発現閾値は、最大感度を達成するために、又は最大特異性のために又は最少誤謬（最大分類率）のために設定できる。例えば、最少誤謬の達成のために閾値を設定できるが、これはより低い感度をもたらしうる。したがって、与えられた任意の予測モデルについて臨床試験を実施して、概ね最高の感度を達成するが最少の誤謬率を有する発現閾値が設定されるであろう。一般的に、閾値は以下の発現の規模に存在する可能性が高い。

10

【0022】

“感度”という用語は、（当該モデルによる）検査が陽性疾患を有する個体の割合を意味する。したがって、感度の上昇はより低い偽陰性検査結果を意味する。

“特異性”という用語は、（当該モデルによる）検査が陰性疾患をもたない個体の割合を意味する。したがって、特異性の上昇はより低い偽陽性検査結果を意味する。

“受診者操作特性”（“ROC曲線”）という用語は、個々のマーカー又は検査における異なる打ち切り点についての真の陽性率（感度）対偽陽性率（特異性）のプロットを意味する。ROC曲線の各点は、与えられた閾値に一致する固有の感度/特異性点を表す。ROC曲線は、閾値を確立して所望の成果を提供するために重要でありうる。ROC曲線下の面積（曲線下面積（AUC）表現される）は分析を示し、あるマーカー又は多数のマーカーから成る検査が2つ以上の診断結果を以下に良好に区別しうるかを測定することができる。ROC曲線はまた2つの異なる検査の精度の比較に用いることができる。

20

“オリゴヌクレオチド”という用語は、ポリヌクレオチド、典型的にはプローブ又はプライマーを指し、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖若しくは二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド、及び二本鎖DNAが含まれる（ただしこれらに限定されない）。オリゴヌクレオチド（例えば一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチド）は、しばしば化学的方法によって（例えば市場で入手できる自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて）、又は多様な他の方法によって（*in vitro*発現系、組み換え技術、並びに細胞及び生体での発現を含む）合成される。

30

“過剰発現”又は“過剰発現される”という用語は、正常組織で認められるレベルを超える、患者における遺伝子又はマーカーの発現レベルを指す。発現レベルが、正常組織又は別のグループの患者の組織における発現の1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、10、100、1000、又は10,000倍までならば過剰発現とみなされる。

【0023】

“ポリヌクレオチド”という用語は、単数形又は複数形で用いられるときは一般的に任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指し、前記は未改変RNA若しくはDNA又は改変RNA若しくはDNAであり得る。前記には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、並びに一本鎖及び二本鎖領域を含むRNA、DNA及びRNAを含むハイブリッド分子（一本鎖、より典型的には二本鎖であるか、又は一本鎖及び二本鎖領域を含むうる）。さらにまた含まれるものは、RNA又はDNA又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域である。特に、mRNA、cDNA、及びゲノムDNA、並びにそのフラグメントが含まれる。前記用語は、1つ以上の改変塩基（例えばトリチウム標識塩基）又は非通常塩基（例えばイノシン）を含むDNA及びRNAを含む。本発明のポリヌクレオチドは、コード若しくは非コード配列、又はセンス若しくはアンチセンス配列を包含できる。“ポリヌクレオチド”などというとき、それぞれは完全長配列の他にその任意のフラグメント又は変種を含むことは理解されるであろう。

40

“表現型”という用語は、臨床状況又は診察又は患者の病歴で観察されうる特色を意味

50

する。G+Pインデックスを計算する式で用いられるとき、“表現型”又は“P”は、患者の年齢、性別、血尿の発生率、及び喫煙歴を意味する。

【0024】

本明細書で用いられる“ポリペプチド”は、オリゴペプチド、ペプチド若しくはタンパク質配列又はそのフラグメント、さらに天然に存在するか、組換え、合成又は半合成である分子を指す。“ポリペプチド”が天然に存在するタンパク質分子のアミノ酸配列を指すために本明細書に列挙される場合は、“ポリペプチド”及び同様な用語は、前記完全長分子の完全で天然のままのアミノ酸配列に当該アミノ酸配列を限定することを意味しない。“ポリペプチド”又は同様な用語を指す語は、それぞれ完全長配列の他にその任意のフラグメント、誘導体又は変種を含むことは理解されるであろう。

10

“qPCR”又は“QPCR”という用語は、例えば以下に記載されている定量的ポリメラーゼ連鎖反応を指す：PCR Technique: Quantative PCR, J.W. Larrick, ed., Eaton Publishing, 1997；及びA-Z of Quantative PCR, S. Bustin, ed., IUL Press, 2004。

“逆転写”という用語は、オリゴヌクレオチド（メッセンジャーRNA（“mRNA”）を含む）が相補性オリゴデオキシリボヌクレオチド（“cDNA”）の生化学的合成に鋳型として用いられる、酵素（“逆転写酵素”）を使用するプロセスを意味する（前記酵素は鋳型RNAと結合し、連続的にデオキシリボヌクレオチド塩基を結合させて当該RNA鋳型に相補的なオリゴデオキシリボヌクレオチド鎖を形成する一連の付加反応を触媒する）。

“血尿”という用語は尿中の血液の存在と定義される。前記は、巨視的血尿（血球の可視的痕跡）又は顕微鏡的血尿（血液の顕微鏡的痕跡）として提示されうる。顕微鏡的血尿の確定の目安は、適切に収集した最低3つの尿サンプルで高倍率の顕微鏡一視野（HPF）当たりに3個以上の赤血球の存在と定義される。顕微鏡的血尿はまた、診療所で尿ディップスティック（比色比較推定）によって検出できる。血尿（顕微鏡的又は巨視的）は無症候性（血尿に随伴する追加の徴候が存在しない）又は症候性でありうる。追加の徴候には、排尿障害（排尿に痛みを伴う）、膀胱の残尿感、又は頻度若しくは排尿の増加が含まれる。

20

【0025】

ハイブリダイゼーション反応の“ストリンジェンシー”を当業者は容易に決定することができ、一般的にはプローブの長さ、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的計算である。一般的に、適切なアニーリングのために長いプローブは高い温度を要求し、一方、短いプローブは低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは一般的には、相補鎖がそれらの融解温度より低い環境下で存在するとき変性DNAが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能配列との間の望ましい相同性の度合いが高ければ高いほど、用いることができる相対的温度は高くなる。結果として、より高い相対的温度は反応条件をよりストリンジェントにし、一方、より低い温度はストリンジェンシーを低下させるということになる。ハイブリダイゼーション反応の更なる詳細及び解説は例えば以下の文献で見出される：Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, 1995。

30

本明細書で定義される“ストリンジェントな条件”又は“高いストリンジェンシー条件”は、典型的には、（1）洗浄に低イオン強度及び高温を用いるか（例えば、50℃で0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）、（2）ハイブリダイゼーション中に変性薬剤を用い、例えばホルムアミド、例えば50%（v/v）ホルムアミド（0.1%ウシ血清アルブミン含有）/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム、750mM塩化ナトリウム緩衝液（pH6.5）、75mMクエン酸ナトリウムを42℃で用いるか、又は（3）50%ホルムアミド、5x SSC（0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5x デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（50 µg/mL）、0.1% SDS、及び硫酸デキストランを42℃で用い、0.2x SSC（塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム）及び50%ホルムアミドを用いて55℃で洗浄し、その後で55℃のEDTA含有0.1x SSCを含む高ストリンジェンシー洗浄を伴う。

40

“中等度にストリンジェントな条件”はSambrookら（Sambrook et al., Molecular Clo

50

ning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) が記載したものを認定することができ、上記に記載の条件よりストリンジェンシーが低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば温度、イオン強度及び% SDS）の使用を含む。中等度にストリンジェントな条件の例は、カッコ内のもの（20%ホルムアミド、5x SSC（150 mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5x デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mLの変性せん断サケ精子DNA）を含む溶液での37°C一晩のインキュベーション、その後続く1x SSC中の約37-50°Cでのフィルターの洗浄を含む。当業者は、温度、イオン強度などを必要に応じて調節し、例えばプローブの長さなどの要件をどのように適応させるかを認識しているであろう。

【0026】

“IL8Rb”という用語は、好中球マーカーインターロイキン8受容体B（ケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体2 [CXCR2] としても知られている）（図1；配列番号:1及び2）を意味し、マーカーIL8Rbを含む。前記用語は、ポリヌクレオチド、例えば遺伝子若しくは遺伝子フラグメント、RNA若しくはRNAフラグメント、又は遺伝子生成物（ポリペプチド例えばペプチド、タンパク質又はタンパク質フラグメントを含む）、又は任意の関連する代謝物、副生成物、又は任意のその他の分子（例えば抗体又は抗体フラグメント）を含む。

“信頼性”という用語は、偽陽性及び/又は偽陰性の低い発生率を含む。したがって、マーカーの信頼性が高ければ、当該マーカーを用いる診断に随伴する偽陽性及び/又は偽陰性は少ない。

“精度”は、下記式の、集団内の総件数の数で割った真の結果（真の陽性+真の陰性）の割合である： $\text{真の陽性} + \text{真の陰性} / \text{測定総数}$ 。

“トリアージ”という用語は、膀胱癌を有する確率が低く血尿を有する患者を、膀胱癌を有し更なる臨床精密検査を必要とする合理的確率をもつ血尿を有する患者から弁別することを意味する。

【0027】

実施態様

したがって、ある種の好ましい実施態様では、遺伝子マーカー及び表現型マーカーの組合せが提供され、前記は、膀胱癌を有する確率が低い患者を、更なる臨床精密検査（おそらく膀胱鏡検査又は他の手順を含む）の正当性を担保するために十分な膀胱癌のリスクがある患者から弁別することを可能にする。他の実施態様では、約70%を超える信頼性を有するマーカーが提供され、前記は、他の実施態様では約73%を超え、さらに他の実施態様では約80%を超え、さらに別の実施態様では約90%を超え、さらに他の実施態様では約95%を超え、さらに別の実施態様では約98%を超え、ある種の実施態様では約100%の信頼性である。

遺伝子解析のために、本発明の実施には、特段の指示がなければ、通常の分子生物学技術（組み換え技術を含む）、微生物学、及び生化学が用いられ、前記は当業者の範囲内である。そのような技術は、例えば以下の文献で完全に説明されている：Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Sambrook et al., 1989；Oligonucleotide Synthesis, MJ Gait, ed., 1984；Animal Cell Culture, R.I. Freshney, ed., 1987；Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.；Handbook of Experimental Immunology, 4th edition, D.M. Weir & CC. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987；Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., 198；及びPCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al., eds., 1994。

上記の用語は、タンパク質、DNA配列及び/又はRNA配列を指すことができることは理解されよう。上記用語はまた、非ヒトタンパク質、DNA及び/又はRNA（前記は本明細書に記載されたものと相同な配列を有する）を指すこともまた理解されよう。

【0028】

本発明の実施態様

血尿を有すると泌尿器専門家に照会される患者はしばしば血尿専門病院での診察を予約

10

20

30

40

50

される。巨視的血尿を有する患者は顕微鏡的血尿を有する患者にしばしば優先される。一次医療提供者から照会時に提供される情報は、極めて多様であり尿路上皮癌を有する確率による正確な患者の層別化を困難にする。尿細胞診は患者の診察前にしばしば日常的に要求され、陽性ならば完全な臨床精密検査を受ける患者の優先度を高めるために用いられる。しかしながら、尿細胞診は高度に特異的ではあるが、非常に感度は低く、したがってその高い偽陰性率によりほとんど実的な価値をもたない⁽⁶⁾。

【0029】

膀胱癌がなく血尿を有する患者の表現型及び遺伝子型分析

G+Pインデックス

上記に記載の表現型変数及び遺伝子型変数を以下の関係にしたがって組み合わせてG+Pインデックスを作成する：

$G+Pインデックス = (w1 * HFREQ + w2 * 年齢GT50 + w3 * 性別 + w4 * SMK + w5 * RBC) + (w6 * M1 + w7 * IL-8)$ 、

式中、HFREQは6カ月の期間に高倍率一視野につき3つ以上の赤血球を発見する頻度を意味し、頻度が低い場合はHFREQ=0であり、高倍率一視野につき赤血球が3つより多い場合は1である。年齢GT50は対象動物の年齢を指し、50歳を超える場合は年齢GT50=1であり、50歳未満の場合は0である。性別は男性には1の値、女性には0が割り当てられる。SMKは対象動物が現在又は以前に喫煙者であるか否かを意味し、非喫煙者ならばSMK=0であり喫煙者ならば1である。RBCは赤血球数を意味し、25以上ならばRBCは1に設定され、25未満ならば0である。M1は遺伝子マーカーMDK、CDC、IGFBP5及びHOXA13の発現の組合せであり、M1>4.5ならば1に設定され、4.5未満ならば0である。IL-8はIL-8のRNAの発現レベルを指し、IL-8>2.5ならばIL-8は1に設定され、2.5未満ならば0である。記号“*”は乗算演算子を意味し、重み係数、w1-w7はG+Pインデックスで上記に列挙した変数の各々にそれぞれ割り振られる重みである。

【0030】

他の好ましい実施態様では、（年齢GT50及びRBC）は以下に示すように当該モデルから落とすことができる：

$G+Pインデックス = (1 * HFREQ + 3 * 性別 + 4 * SMK) + (5 * M1 + 2 * IL-8)$ 。

G+Pインデックスは0から15の値を生じる。G+Pインデックス値が11から15の患者は膀胱癌について“高リスク”であると考えられ、膀胱癌について追加の精密検査の必要性を指摘する。G+Pインデックス値が6から10の患者は膀胱癌発症の“中等度リスク”と考えられ、追加の精密検査が指摘される。G+Pインデックス値が0から5の患者は膀胱癌発症の“低リスク”と考えられる。“低リスク”グループの患者は監視待機リストに入り、追加の徴候が出現するか又は顕微鏡的血尿の再発エピソードが生じたら、それら患者は更なる可能な精密検査について再評価される。

膀胱癌がない患者とある患者を弁別するために有用な遺伝子型変数にはRNAマーカー“M1”の発現が含まれ、前記はMDK、CDC、IGFBP5（IGBP5）、及びHOXA13の組合せである。別の遺伝子型変数はIL8RのRNAの発現である。これら遺伝子型変数の係数は下記の表7に示される。4.5及び2.5の閾値がそれぞれM1及びIL8Rのために用いられ、それぞれ5及び2の係数が用いられた。

G+Pインデックスは0から15の値を生じる。11から15のG+Pインデックス値は膀胱癌について“高リスク”と考えられ、膀胱癌について追加の精密検査の必要性を指摘する。6から10のG+Pインデックス値は膀胱癌発症の“中等度リスク”と考えられ、追加の精密検査が指摘される。0から5のG+Pインデックスは膀胱癌発症の“低リスク”と考えられ、これらの患者は監視待機リストに入り、追加の徴候が出現するか又は顕微鏡的血尿の再発エピソードが生じたら、より充実した精密検査について再評価される。

実施例3（図18及び19）でより完全に述べるように、我々は、表現型データ単独のROC曲線は軽度なレベルの診断力をもたらすことを見出した。遺伝子型データ単独のROC曲線は顕著なレベルの診断力を発揮した。我々は、遺伝子型データ及び表現型データの両方がG+Pインデックスに組み合わされるときに予想に反してより良好な診断力を見出した。

【0031】

膀胱癌のない患者の遺伝子解析

いくつかの好ましい実施態様では、本発明は、4マーカーアッセイ又はCxbladder(商標)アッセイ(遺伝子型変数)及び5キーマーカー因子(表現型変数)の1つ以上を組み合わせ、顕微鏡的又は巨視的血尿を有する患者を尿路上皮癌の潜在リスクに関してトリージするために用いることができる選別インデックスを作成する。可撓性膀胱鏡検査の要求を排除はしないが、表現型変数及び遺伝子型変数を基準に尿路上皮癌が高リスクと思われる患者をより早期に診察し、潜在的に全体的な患者の出現を改善することができる。

癌ではない患者を検出するか、又は疾患を有するリスクが低い、中程度又は高い患者グループを選別するためにツールとして、遺伝子型マーカーを用いることができる。当該マーカーは、例えば疾患組織と対応する非疾患組織との間で弁別的に発現されうる。この状況では、弁別的な発現の検出は疾患の存在に付随する。また別には、当該マーカーは、疾患組織で出現する変化又は当該疾患から生じる変化に直接付随することができる。炎症疾患は好中球の増加と密接に関係する。好中球マーカーインターロイキン8受容体B(IL8Rb; 図1; 配列番号:1及び2)は、サンプル中の好中球の存在の良好なマーカーを提供でき、したがって、サンプルで炎症疾患を検出する(特に膀胱の炎症疾患の検出で)診断マーカーとして用いることができる。

10

【0032】

図5に示すように、尿中のIL8Rbの蓄積は膀胱の炎症疾患の存在の指標である。特に、図5は、症状すなわち良性前立腺肥大、尿路感染、非特異的前立腺疾患、血管性及びワーファリン使用による二次的前立腺疾患を有する患者の尿におけるIL8Rbの蓄積を示す。しかしながら、IL8Rbの使用はこれらの疾患の検出に限定されないが、これらの例は膀胱の炎症疾患を有する患者のサンプルではIL8Rbは確かに増加することを示すことは理解されよう。すなわち、IL8Rbは膀胱疾患に随伴する炎症のマーカーとして用いることができ、したがって、炎症と密接に関係するいずれの症状の検出でも使用が適切である。したがって、IL8Rb量の検出を膀胱の炎症疾患のマーカーとして用いることができる。より具体的には、IL8Rbを用いて、好中球の蓄積と密接に関係する膀胱の炎症疾患を検出できる。

20

TCCの尿検査は、剥離した腫瘍細胞に由来する尿中マーカーの存在に大きく依存する。これらの細胞を検出する能力は多数の夾雑細胞(例えば血液細胞及び炎症細胞)によって隠される。さらにまた、膀胱基底層の炎症は粘膜からの非悪性細胞の剥離増加をもたらすことができる。結果として、膀胱移行細胞に由来するマーカーを利用する尿検査は、膀胱炎、尿路感染、又は尿路炎症若しくは移行細胞剥離をもたらすその他の症状(例えば尿石症)を有する患者から採取された尿サンプルで偽陽性結果を提示する蓋然性が高い(Sanchez-Carbayo et al)。

30

【0033】

そのような偽陽性結果を回避する1つの試みは、血液細胞及び炎症細胞で比較的低い発現を示すマーカーを選択することであった。そのようなマーカーの使用は、非悪性炎症症状を提示するTCC患者で偽陽性の低下をもたらす。しかしながら、血液学的派生細胞の低いマーカー発現は、非悪性移行細胞の剥離速度の強化を代償しえない。

膀胱癌尿検査の精度における炎症組織の剥離移行細胞の負の影響は、尿路の炎症症状を有する患者の認定を改善することによって最小限にできることが見出された。ここで驚くべきことに、1つ以上の膀胱腫瘍マーカー(BTM)と組み合わせたマーカーIL8Rbの使用は膀胱癌のより正確な検出を提供することが見出された。特に、マーカーIL8Rbを含む膀胱癌のマーカー依存検査は、偽陽性結果(炎症性非癌症状を罹患する患者で生じうる)への感受性が低い。

40

一般的に、炎症症状の有無は遺伝子発現の閾値を提示することによって確立され、前記より高いIL8Rbの発現は炎症症状の指標である。例えば、一定の閾値を超えるIL8Rbの発現は、患者が炎症症状を有すると診断される(上記に記載の閾値を参照されたい)。

IL8Rbが膀胱癌の存在を予測する1つ以上のマーカーと一緒に用いられるとき、膀胱腫瘍マーカーの発現上昇の存在及び一定の閾値を超えるIL8Rbの発現は、患者が炎症症状を有

50

し癌ではないことを予測する。さらにまた、この検査が患者の尿で実施されるならば、前記結果は患者が膀胱炎症状を有することを予測する。高レベルの膀胱腫瘍マーカーは、炎症の結果として粘膜から生じた非悪性細胞の結果であることが最も蓋然性が高い。すなわち、高レベルの膀胱腫瘍マーカーを有するが、患者は実際には膀胱癌ではなく偽陽性である。

【0034】

また別に、患者は異常に高いレベル又は診断レベルの1つ以上の膀胱腫瘍マーカーを有するが、IL8Rbレベルが閾値より低い場合、患者はおそらく癌、特に膀胱又は尿路上皮の癌である。これは、この検査が患者の尿で実施される場合には特にそうである。前記の結果は健康の提供者にとって極めて有益である。なぜならば、彼らは患者が癌であることを確信でき、直ちに治療を開始することができ、前記の結果は、実際には偽陽性結果を与える炎症症状によって引き起こされることを心配する必要がないからである。

驚くべきことに、好中球マーカーインターロイキン8受容体B (IL8Rb) をコードする遺伝子のRNAの定量は、公知のTCC又はBTMマーカーを用いる、TCCを有する患者の総合的実施を改善することが示された。IL8Rbの参照配列は図1並びに配列番号:1及び2に示される。TCC検出におけるその役割に加えて、IL8Rbは、炎症疾患の診断を助けるために尿マーカーとして用いることが可能か否かを調べられた (図5)。

IL8Rbマーカーの使用は、遺伝子発現レベルを検出するための公知の方法を利用する膀胱の炎症症状の検出に単独で用いることができる。遺伝子発現を検出する方法の例は以下で概略される。

また別に、IL8Rbは1つ以上のBTMと組み合わせて膀胱癌を検出できる。炎症疾患マーカーIL8Rbを膀胱癌検査の部分として利用することによって、偽陽性結果の発生における炎症組織の影響を最小限にすることが示された。マーカーIL8Rbを任意の膀胱癌マーカーと一緒に用いることができ、また別には膀胱癌検出のためにシグナチャーの部分として2つ以上のマーカーとともに用いることができる。

【0035】

偽陽性結果の数を減らすことは、潜在的に不要な手順 (膀胱鏡検査を含む (前記検査はそれ自体リスクがある)) に付される膀胱癌でない患者の数を減らすことを意味する。偽陰性結果の数を減らすことは、膀胱癌を有する患者が検出される蓋然性が高くなり、したがって癌について更なる査定を実施できることを意味する。

膀胱癌の検出を改善するIL8Rbの作用は、膀胱癌を有する患者から非悪性症状を分離する能力から生じる。前記は、IL8Rbの増加はサンプル中の好中球の存在の増加の指標であるという理由により得られる。したがって、IL8Rbの能力は使用される膀胱腫瘍マーカーに依存しない。図2及び12から15に示されるように、多様な膀胱腫瘍マーカー及び膀胱腫瘍マーカーの組合せと組み合わせられるとき、IL8Rbは、対象動物で癌を検出するマーカーの能力の特異性を増加させる一般的効果を有した。本発明のシグナチャーの1つの例は、MDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13と組み合わせたIL8Rbの使用である。前記はまた、膀胱癌の検出に適切な1つ以上の他のマーカー (例えば図6又は7に概略される任意の1つ以上のマーカー) と組み合わせることができる。図14及び15に示されるように、IL8Rbをマーカーの任意の組合せで、特に以下の組合せで用いることができる: IL8Rb/MDK、IL8Rb/ CDC2、IL8Rb/HOXA13、IL8Rb/IGFBP5、IL8Rb/MDK/CDC2、IL8Rb/MDK/HOXA13、IL8Rb/MDK/IGFBP5、IL8Rb/CDC2/HOXA13、IL8Rb/CDC2/IGFBP5、IL8Rb/HOXA13/IGFBP5、IL8Rb/MDK/CDC2/HOXA13、IL8Rb/MDK/CDC2/IGFBP5、IL8Rb/CDC2/HOXA13/IGFBP5、及びIL8Rb/MDK/CDC2/HOXA13/IGFBP5。図14及び15に示すように、IL8Rbを加えることは、対象動物で正確に膀胱癌を診断するマーカー又はマーカーの組合せの能力を高めた。本発明はこれら特定の組合せに限定されないが、場合によって膀胱癌の検出に適切な1つ以上のさらに別のマーカー、例えば図6又は7に概略されたマーカーの任意の1つ以上を含むことができる。下記の表1は、特異的マーカーMDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13並びにIL8Rbのための識別名を示す。

【0036】

表1: 膀胱腫瘍マーカーの識別名

10

20

30

40

50

PE遺伝子名称	HGNC遺伝子名称(公式)	NCBI RefSeq	NCBI登録遺伝子ID	HGNC URL
MDK	MDK	NM_002391	4192	http:// www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=6972
CDC	CDK1	NM_001170406	983	http:// www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=1722
IGF	IGFBP5	NM_000599	3488	http:// www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=5474
HOXA	HOXA13	NM_000522	3209	http:// www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=5102
IL8Rb	CXCR2	NM_001168298	3579	http:// www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=6027

【 0 0 3 7 】

図2から4及び12から17は、膀胱癌の4つの公知で代表的マーカー（MDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13）と組み合わせてIL8Rbを使用することの効果を示す。これらの結果は、IL8Rbの使用と各マーカーとを個々に組み合わせて取り込むことによって、さらに4つのBTMマーカーをシグナチャーとして全ての可能な組み合わせで用いてもまた、TCCを有する患者と非悪性症状の患者のサンプルを分離する能力に改善が存在することを示している。

図10から13に示すように、IL8Rbと4つのマーカー（MDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13（uRNA-D））との混合は、4つのマーカーだけと比較して当該検査の総合的性能を高めるだけでなく、当該検査はまた公知の検査（NMP22(商標)（マトリテック社（Matritech, Inc., of Massachusetts, United States）の登録商標）Elisa、NMP22 BladderChek(商標)（マトリテック社（Matritech, Inc., of Massachusetts, United States）の登録商標）、及び細胞診を十分に凌いだ。図14から17はまた、4つのマーカー（MDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13）と種々に組み合わせられたIL8Rbの効果を示す。

図14は、IL8Rbの存在下及び非存在下における4つのマーカー（MDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13）の全ての組合せについてのROC曲線を示し、前記は、以下の5つの異なる分類法モデルを用いて計算された：（i）線形判別分析（LDA）、（ii）ロジスティック回帰（LogReg）、（iii）サポートベクターマシン（SVM）、（iv）k-最接近5近傍探索法（KN5N）及び（v）分割樹分類法（TREE）。図15は、IL8Rbの存在下及び非存在下における5つの全ての分類法及び4バイオマーカーの15全ての組合せについての曲線下面積（AUC）の一覧表である。このAUCの計算は偽陽性率0から偽陽性率20%の面積（有用な特異性の範囲（80－100%）をカバーする）に限定される。前記AUCは図14のROC曲線における可視的相違を定量する。図16は、（a）80%、（b）85%、（c）90%、（d）95%、（e）98%の特異性でIL8Rbの存在下及び非存在下で測定された4マーカーの全ての組合せの感度を示す。図17は、（a, f）80%、（b, g）85%、（c, h）90%、（d, i）95%及、及び（e, j）98%の固定された特異性での、それぞれ感度（ROC曲線の垂直方向、“上方”がより良好である）又は特異性（ROC曲線の水平方向、“左側”がより良好である）における変化を示す。

【 0 0 3 8 】

これらの結果は、一般的に、IL8Rbは、正常サンプルから腫瘍を分類するバイオマーカー（MDK、CDC2、IGFBP5及びHOXA13）の能力をただ1つでも組み合わせでも改善することを

示す。

これらの結果は一般的に、IL8Rbは、検査が膀胱又は尿路上皮の癌を検出する精度を高めることができたことを示している。最大の収穫は、IL8Rbを加えなければ同様な性能を示さなかったマーカー又は同様な性能を持たなかった分類方法で認められた。より小さな収穫は、IL8Rbの添加前に良好な性能を示し、したがって改善の余地が少なかったマーカー及び/又は分類方法について認められた。これらの結果は集団依拠分析を示し、IL8Rbを加えることの利点は、個々の患者（特にBTMマーカーの発現による診断が不確かな可能性がある患者）を診断する時により大でありうることを特筆することは重要である。

これらの結果は、IL8Rbは膀胱の炎症疾患の検出に用いることができるだけでなく、膀胱癌のマーカーと組み合わせて用いるときには、“偽陽性”結果の減少による膀胱癌の検出の改善をもたらすことを示している。

10

これらの結果はまた、IL8Rbは、多様なマーカーの組合せの総合的な性能に影響を与えるという点でIL8Rbの有用性を示し、さらに1つ以上の膀胱癌マーカーの性能を改善し、患者で癌を正確に検出するIL8Rbの能力を確認する。さらにまた、図14及び15は、一連の分類法モデルを用いて同じ結果を達成できること示し、さらにこの結果は分類法モデル又はアルゴリズムに依存せず、むしろ用いられたマーカーの組合せに左右されることを示している。これらの結果は、いずれの適切な分類法モデル又はアルゴリズムも本発明に用いることを立証している。特に、図14及び15は、IL8Rbは、より高い特異性で特に臨床的に最も評価する範囲でより大きな効果を有することを示している。

したがって、本発明のG+Pインデックスを用い、我々は、表現型変数及び遺伝子型変数を基にして、尿路癌を有する即時上級精密検査が正当である“高リスク”グループ、即時精密検査が正当である“リスク”グループ、及び以降の査定のために監視リストに入りうる“低リスク”グループに血尿を有する患者を正確にトリアージすることができる。

20

【0039】

体サンプルでの遺伝子マーカーの検出

いくつかの好ましい実施態様では、癌アッセイは、望ましくは血液、血漿、血清、腹腔液（例えば腹腔洗浄液から入手される）、又は他の体液、例えば尿、リンパ、脳脊髄液、胃液又は大便サンプルから得られるサンプルで実施できる。膀胱の炎症症状又は膀胱癌の検出のためには、検査は理想的には尿サンプルで実施される。

特に、炎症性膀胱疾患又は膀胱癌を検出する本方法は、尿の指標となる身体由来の任意の適切なサンプルで実施できるが、理想的にはIL8Rbレベル及び任意のさらに別の癌マーカーが尿サンプルから直接確立される。

30

検査は尿サンプルで直接実施されるか、又は当業界で公知の任意の適切な化合物又は緩衝剤を添加してサンプルを安定化させて、サンプル中のRNA及び/又はタンパク質を安定化させさらに分解を予防して後日の分析を可能にするか、又は分析時のRNA及び/又はタンパク質の安定化を担保さえできる。

対象動物の尿中のタンパク質及び/又はRNAレベルの決定は尿で直接実施するか、又は尿を処理しさらにRNA及び/又はタンパク質を精製及び/又は濃縮できる。タンパク質及び/又はRNAを抽出及び/又は濃縮する多くの方法が当業界で周知であり、本発明で用いることができよう。

40

特定の遺伝子の発現レベルを（RNA及び/又はタンパク質レベルで）確立するために、多くの方法が当業界で周知であり、任意の適切な方法を本発明で用いることは理解されよう。いくつかの通常的な方法を下記で概略するが、本発明はこれらの方法に限定されず、タンパク質及び/又はRNAを定量するいずれの方法も本発明での使用に適切である。

【0040】

遺伝子型マーカーを用いる疾患及び癌検出の一般的アプローチ

発現レベルを決定する一般的な方法論を以下に概略するが、発現レベルを決定するいずれの方法も適切であることは理解されよう。

定量的PCR (qPCR)

定量的PCR (qPCR) は、腫瘍サンプル又は血清及び血漿で特異的なプライマー及びプロ

50

ーブを用いて実施できる。制御下反応では、PCR反応 (Sambrook, J., E Fritsch, E. and T Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 2001) で形成される生成物の量は、出発の鋳型量と相関する。PCR生成物の定量は、PCR反応が対数期にあるとき、試薬が限界になる前に反応を停止させることによって実施できる。続いて、PCR生成物をアガロース又はポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、臭化エチジウム又は前記に匹敵するDNA染料で染色し、染色強度をデンストメトリーによって測定する。また別には、PCRの進行は、リアルタイムで生成物の蓄積を測定するPCR機 (例えばApplied Biosystems' Prism 7000TM (アプレラ社 (Applera Corporation, Connecticut, United States) の商標) 又はRoche LightCycler™ (Roche Molecular Systems, Inc., California, United States) の商標) を用いて測定できる。リアルタイムPCRは、合成PCR生成物に挿入されるDNAインターカレート染料 (例えばSybr Green) の蛍光、又は消光分子から切断されたときにレポーター分子によって放出される蛍光を測定する。後者では、レポーター分子及び消光分子はオリゴヌクレオチドプローブに取り込まれ、前記プローブは標的DNA分子とハイブリダイズし、続いてDNA鎖はプライマーオリゴヌクレオチドから伸長する。オリゴヌクレオチドプローブは移動させられ、次のPCRサイクルでTaqポリメラーゼの酵素作用によって分解されて消光分子からレポーターが放出される。ある変法 (スכולピオンとして知られている) では、プローブはプライマーに共有結合で連結される。

【0041】

逆転写PCR (RT-PCR)

RT-PCRを用いて、種々のサンプル集団で、正常及び腫瘍組織で、薬剤治療実施又は非実施でRNAレベルを比較し、発現パターンを特徴付け、密接に関係するRNA間の識別を実施し、さらにRNA構造を分析することができる。

RT-PCRのためには、第一の工程は標的サンプルよりRNAの単離である。出発材料は、典型的にはヒト腫瘍又は腫瘍細胞株、及び対応する正常組織又は細胞株からそれぞれ単離される全RNAである。RNAは、多様なサンプル、例えば乳房、肺、腸 (例えば大腸又は小腸)、結腸直腸、胃、食道、肛門、直腸、前立腺、脳、肝、腎、脾、脾、胸腺、精巣、卵巣、子宮、膀胱などに由来する腫瘍サンプルから、原発腫瘍から、又は腫瘍細胞株から、及び健康なドナーに由来するプールされたサンプルから単離できる。RNAの供給源が腫瘍の場合、RNAは、例えば凍結された又はアーカイブ保存されたパラフィン包埋固定 (例えばホルマリン固定) 組織サンプルから抽出できる。

RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングの第一の工程は、RNA鋳型のcDNAへの逆転写、続いてPCR反応でのその指数関数的増幅である。2つの最も通常的に用いられる逆転写酵素はトリ骨髄芽球症ウイルスの逆転写酵素 (AMV-RT) 及びモロニーネズミ白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT) である。逆転写工程は、遺伝子プロファイリングの環境及び目標に応じて、典型的には特異的なプライマー、ランダムヘキサマー又はオリゴ-dTプライマーを用いて開始される。例えば、抽出RNAは、GeneAmp(商標)RNA PCRキット (Perkin Elmer, CA, USA) を製造業者の指示にしたがって用いて逆転写できる。続いて、誘導されたcDNAをその後のPCR反応で鋳型として用いることができる。

【0042】

PCR工程は多様な熱安定性DNA依存DNAポリメラーゼを利用できるが、典型的にはTaq DNAポリメラーゼが用いられる。前記は、5' -3'ヌクレアーゼ活性を有するが、3' -5'プルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠く。したがって、TaqMan(商標) qPCR (ロシュモレキュラーシステム社 (Roche Molecular Systems, Inc., California, United States) の商標) は、典型的にはTaq又はTthポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性を利用して、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、同等な5'ヌクレアーゼ活性を有するいずれの酵素も用いることができる。

2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応に典型的なアンプリコンを生成できる。第三のオリゴヌクレオチド又はプローブを設計して、2つのPCRプライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出する。このプローブはTaq DNAポリメラーゼ酵素によって伸

長されることはなく、レポーター蛍光染料及びクエンチャー蛍光染料で標識される。2つの染料が当該プローブ上にあり共に近接して配置されるとき、レポーター染料由来のいずれのレーザー誘発発光も消光染料によって消光される。増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は鋳型依存態様で当該プローブを切断する。生じたプローブフラグメントは溶液中で分解し、遊離レポーター染料のシグナルはこの第二の蛍光発光団の消光作用を受けない。レポーター染料の1つの分子は合成された新規な分子の各々のために解放され、消光されなかったレポーター染料の検出は、データの定量的解釈の基礎を提供する。

【0043】

TaqMan(商標) RT-PCR (ロシュモレキュラーシステム社 (Roche Molecular Systems, Inc., California, United States) の商標) は、市場で入手できる装置、例えばABI PRISM 7700TM 配列検出系 (アプレラ社 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、又はLig htcycl erTM (ロシュモレキュラーシステム社 (Roche Molecular Systems, Inc., California, United States) の商標) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いて実施できる。好ましい実施態様では、5' ヌクレアーゼ手順は、リアルタイム定量的PCR装置 (例えばABI PRISM 7700TM 配列検出系) で行うことができる。前記系は、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子 (CCD)、カメラ、及びコンピュータから成る。前記系はサーモサイクラー上で96ウェル様式のサンプルを増幅する。増幅時に、レーザー誘発蛍光シグナルが96ウェルについて光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで収集され、CCDで検出される。前記系は装置を稼働させデータを分析するソフトを含む。

5' ヌクレアーゼアッセイデータは最初Cp (又は閾値サイクル) として表現される。上記で考察したように、蛍光値は各サイクルの間に記録され、増幅反応で当該点に対して増幅された生成物の量を表す。蛍光シグナルが統計的に有であると最初に記録される点が閾値サイクル、Cpである。

【0044】

リアルタイム定量PCR (qRT-PCR)

さらに最近のRT-PCR技術の変型はリアルタイム定量PCRであり、前記は、二重標識蛍光発生プローブ (すなわちTaqMan(商標)プローブ) によりPCR生成物蓄積を測定する。リアルタイムPCRは定量競合PCR及び定量比較PCRの両方に類似する。前者は標準化のために各標的配列について内部競合物を用いるが、後者はサンプル内に含まれる標準化遺伝子又はRT-PCR用ハウスキーピング遺伝子を使用する。更なる詳細は、例えば以下で提供される: Held et al., Genome Research 6: 986-994, 1996。

発現レベルは、RNA供給源として固定されたパラフィン包埋組織を用いて決定できる。本発明のある特徴にしたがえば、PCRプライマーは、増幅されるべき遺伝子に存在するイントロン配列にフランキングするように設計される。この実施態様では、プライマー/プローブ設計の第一の工程は当該遺伝子内のイントロン配列の輪郭描写である。これは、公開ソフト、例えばKentが開発したDNA BLATソフト (Kent, W. J., Genome Res. 12 (4): 656-64, 2002) 又はBLASTソフト (その変型を含む) によって達成できる。その後の工程はPCRプライマー及びプローブ設計のしっかり確立された方法にしたがう。

非特異的シグナルを回避するために、プライマー及びプローブを設計するときにイントロン内の反復配列を覆い隠すことは有用である。これは、ベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) からオンラインで利用できるリピートマスカープログラム (Repeat Masker program) を用いることによって容易に達成できる。前記プログラムは、反復エレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、反復エレメントが隠されたクエリー配列を送信する。続いて覆い隠された配列を用い、任意の市販或いは公開プライマー/プローブ設計パッケージによりプライマー及びプローブ配列を設計することができる。前記設計パッケージは、例えば、プライマーエクスプレス (Primer Express, Applied Biosystems); MGBアッセイバイデザイン (MGB assay-by-design, Applied Biosystems); プライマー3 (Primer3, Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the VIMNV for general users and for biologist programmers in: Krawetz S, Misener

S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386) である。

PCRプライマー設計で考慮されるもっとも重要な要件には、プライマーの長さ、融解温度 (T_m)、及びG/C含量、特異性、相補性プライマー配列、及び3'末端配列が含まれる。一般的には、最適なPCRプライマーは長さが概ね1730塩基であり、約20–80%、例えば約50–60%のG+C塩基を含む。融解温度は50℃から80℃の間、例えば約50から70℃が典型的には好まれる。PCRプライマー及びプローブ設計のための更なるガイドラインのためには、例えば以下を参照されたい: Dieffenbach, C. W. et al., General Concepts for PCR Primer Design in: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp.133-155; Innis and Gelfand, Optimization of PCRs in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; 及びPlasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70: 520-527, 1997 (前記文献の全開示が参照により本明細書に明確に含まれる)。

【0045】

マイクロアレイ分析

弁別的発現はまたマイクロアレイ技術を用いて同定又は確認できる。したがって、疾患特異的マーカーの発現プロファイルは、マイクロアレイ技術を用いて新鮮又はパラフィン包埋腫瘍組織で測定できる。この方法では、問題のポリヌクレオチド配列 (cDNA及びオリゴヌクレオチドを含む) はマイクロチップ基質上にプレートされるか又はアレイされる。アレイ配列 (すなわち捕捉配列) を続いて問題の細胞又は組織の特異的ヌクレオチド (すなわち標的) とハイブリダイズさせる。まさにRT-PCR法のように、RNAの供給源は、典型的にはヒト腫瘍又は腫瘍細胞株及び対応する正常組織又は細胞株から単離した全RNAである。したがって、RNAは多様な原発腫瘍又は腫瘍細胞株から単離できる。RNAの供給源が原発腫瘍の場合は、RNAは、例えば凍結された又はアーカイブ保存されたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプル及び固定 (例えばホルマリン固定) 組織から抽出できる (前記は日々の臨床の現場で日常的に調製及び保存される)。

マイクロアレイ技術の具体的な実施態様では、cDNAクローンのPCR増幅挿入物が基質に適用される。この基質は、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、又は75までのヌクレオチド配列を含むことができる。他の特徴では、この基質は少なくとも10,000のヌクレオチド配列を含むことができる。マイクロチップに固定されたマイクロアレイ配列は、ストリンジентな条件下でのハイブリダイゼーションに適切である。他の実施態様として、マイクロアレイのための標的は、長さが少なくとも50、100、200、400、500、1000、若しくは2000塩基、又は長さが50–100、100–200、100–500、100–1000、100–2000、若しくは500–5000塩基である。さらに別の実施態様として、マイクロアレイのための捕捉プローブは、長さが少なくとも10、15、20、25、50、75、80若しくは100塩基、又は長さが10–15、10–20、10–25、10–50、10–75、10–80、若しくは20–80塩基である。

【0046】

蛍光標識cDNAプローブは、問題の組織から抽出されたRNAの逆転写による蛍光ヌクレオチドの取り込みによって生成できる。チップに適用された標識cDNAはアレイ上の各DNAスポットに特異的にハイブリダイズする。ストリンジентな洗浄で非特異的に結合したプローブを除去した後、共焦点レーザー顕微鏡法によって又は別の検出方法 (例えばCCDカメラ) によってチップをスキャンする。各アレイエレメントのハイブリダイゼーションの定量は、対応するmRNAの豊富さの査定を可能にする。二色蛍光を用いて、2つのRNA供給源から作製され別々に標識されたcDNAプローブを当該アレイに対してペア毎にハイブリダイズさせる。各指定遺伝子に対応する2つの供給源に由来する転写物の相対的豊富さがしたがって同時に決定される。

ハイブリダイゼーション規模の小型化は、多数の遺伝子の発現パターンの便利で迅速な評価を可能にする。そのような方法は、希少転写物 (細胞当たり数コピーで発現される) を検出するために、さらに発現レベルにおいて少なくとも約2倍の差異で再現性をもって検出するために必要な感度を有することが示された (Schena et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 93 (2): 106-149, 1996)。マイクロアレイ分析は、市販の装置によって、例えばAffymetrix GenChip(商標)技術、イルミナ (Illumina) マイクロアレイ技術、又はインサイト (Incyte's) マイクロアレイ技術を用いて製造業者の指示にしたがい実施できる。遺伝子発現の大規模分析のためのマイクロアレイ方法の開発は、癌分類の分子マーカー及び多様な腫瘍タイプの結果の予測について系統的な探索を可能にする。

【0047】

RNAの単離、精製、及び増幅

mRNA抽出の一般的な方法は当業界で周知であり、分子生物学の標準的な成書（例えば以下を含む：Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1997）に開示されている。パラフィン包埋組織からRNAを抽出する方法は、例えば以下に開示されている：Rupp and Locker, Lab Invest. 56: A67, 1987；及びDe Sandres et al., BioTechniques 18: 42044, 1995。特に、RNA単離は、市場の製造業者（例えばQiagen）の精製キット、緩衝剤セット、及びプロテアーゼを用いて当該製造業者の指示にしたがって実施できる。例えば、培養細胞の全RNAは、Qiagen RNeasy(商標)（キアゲン社 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) の登録商標）ミニカラムを用いて単離できる。市場で入手できるその他のRNA単離キットには以下が含まれる：MasterPure™ 完全DNA RNA精製キット (EPICENTRE (D, Madison, WI)、及びパラフィンプロックRNA単離キット (Ambion, Inc.)。組織サンプルの全RNAはRNA Stat-60 (Tel-Test) を用いて単離できる。腫瘍から調製されるRNAは、例えば塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離できる。

RNA供給源として固定パラフィン包埋組織を用いる遺伝子発現プロファイリングのための代表的プロトコルの工程（mRNA単離、精製、プライマー発現及び増幅を含む）は、多様な刊行雑誌の論文で提供される（例えば、T. E. Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91, 2000；K. Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29, 2001）。略記すれば、代表的なプロセスは、パラフィン包埋腫瘍組織サンプルの約10ミクロン厚の切片の切り出しで開始する。続いてRNAを抽出し、タンパク質とDNAを除去する。RNA濃度の分析後、必要ならばRNA修復及び増幅工程を加え、さらに遺伝子特異的プロモーターを用いRNAを逆転写し、続いてRT-PCRを実施する。最後にデータを解析し、被験腫瘍サンプルで同定された特徴的な遺伝子発現パターンを基準にして、患者が利用できる最良の治療選択肢を認定する。

【0048】

免疫組織化学及びプロテオミクス

免疫組織化学の方法もまた本発明の増殖マーカーの発現レベルの検出に適切である。したがって、抗体又は抗血清（好ましくはポリクローナル抗血清及び最も好ましくは各マーカーに特異的なモノクローナル抗体）が、発現の検出に用いられる。抗体は、抗体それ自体の直接標識によって検出されうる（前記標識は、例えば放射能標識、蛍光標識、ハプテン標識（例えばビオチン）、又は酵素（例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）による）。また別には、非標識一次抗体が標識二次抗体（一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清又はモノクローナル抗体を含む）と合わせて用いられる。免疫組織化学プロトコル及びキットは当業界で周知であり、市場で入手できる。

プロテオミクスを用いて、ある時点のサンプル（例えば組織、器官、又は細胞培養）に存在するポリペプチドを分析することができる。特に、プロテオミクス技術を用いて、ポリペプチド発現の全体的な変化をサンプルで評価することができる（発現プロテオミクスとも称される）。プロテオミクス分析は典型的には以下を含む：（1）2Dポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D PAGE）によるサンプル中の個々のポリペプチドの分離；（2）ゲルから回収した個々のポリペプチドの例えば質量分析又はN-末端配列決定による同定；及び（3）バイオインフォマティクスを用いるデータの解析。プロテオミクス方法は、遺伝子発現プロファイリングのその他の方法を補充するために重要であり、単独でも又は他の方法と組み合わせて用いて、本発明の増殖マーカーの生成物を検出できる。

【0049】

マーカー選択性核酸プローブを用いるハイブリダイゼーション方法

これらの方法は、支持体へ核酸プローブを結合する工程、及び適切な条件下で試験サンプルに由来するRNA又はcDNAでハイブリダイズさせる工程を必要とする (Sambrook, J., E Fritsch, E. and T Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 2001)。これらの方法は、腫瘍組織又は液体サンプルに由来するマーカーに適用できる。RNA又はcDNA調製物は典型的には検出及び定量を可能にする蛍光分子又は放射能分子で標識される。いくつかの適用では、ハイブリダイズするDNAに分枝蛍光標識構造物で付箋を付け、シグナル強度を強化することができる (Nolte, F.S., Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. Adv. Clin. Chem. 33, 201-35, 1998)。ゲル画像の蛍光検出又はデンストメトリーによるハイブリダイゼーション量の定量前に、低塩溶液 (例えば0.1x SSC、0.5%SDS) で重点的に洗浄して未ハイブリダイズ標識を除去する。支持体は固体 (例えばナイロン又はニトロセルロース膜) であるか、又は液体懸濁時にハイブリダイズされる微小球又はビーズから成ることができる。洗浄及び精製を可能にするために、ビーズは磁性であるか (Haukanes, B-1 and Kvam, C., Application of magnetic beads in bioassays. Bio/Technology 11, 60-63, 1993)、又は蛍光標識してフローサイトメトリーを可能にすることができる (例えば以下を参照されたい: Spiro, A., Lowe, M. and Brown, D., A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry. Appl. Env. Micro. 66, 4258-4265, 2000)。

ハイブリダイゼーション技術の変型は、QuantiGene Plex(商標)アッセイ (パノミクスの登録商標 (Panomics, California, United States)) (Genospectra, Fremont) であり、前記は蛍光ビーズ支持体を分枝DNAシグナル増幅と合体させる。ハイブリダイゼーション技術のまた別の変型は、Quantikine(商標) mRNAアッセイ (R&D Systems, Minneapolis) である。方法論は製造業者の指示に記載されているとおりである。略記すれば、このアッセイは、ジゴキシゲニンに連結させたオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを利用する。ハイブリダイゼーションは、アルカリホスファターゼに結合させた抗ジゴキシゲニン抗体を用いて比色アッセイで検出される。

また別の方法も当業界では周知であり、本明細書でさらに記載する必要はない。

【0050】

酵素連結免疫学的アッセイ (ELISA)

略記すれば、サンドイッチELISAアッセイでは、マーカーに対するポリクローナル又はモノクローナル抗体を固相に結合させるか (Crowther, J.R. The ELISA guidebook. Human a Press: New Jersey, 2000; Harlow, E. and Lane, D., Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1999)、又は懸濁ビーズに結合させる。他の方法も当業界で公知であり、本明細書でさらに記載する必要はない。モノクローナル抗体はハイブリドーマから誘導してもファージ抗体ライブラリーから選択してもよい (Hust M. and Dubel S., Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments. Methods Mol Biol. 295:71-96, 2005)。非特異的結合部位は、非標的タンパク質調製物及び洗剤でブロックされる。続いて、抗原を含む患者のサンプル又は組織調製物とともに捕捉抗体をインキュベートする。抗体/抗原複合物を第二の抗体 (標的マーカーを検出する) とインキュベートする前に、前記混合物を洗浄する。典型的には、第二の抗体は、蛍光分子又は他のレポーター分子 (前記は酵素反応で又はレポーターと結合された第三の抗体により検出できる) と結合される (Crowther (上掲書))。また別には、直接的ELISAでは、マーカーを含む調製物は支持体又はビーズと直接結合され、標的抗原は抗体-レポーター結合物により直接検出される (Crowther (上掲書))。

モノクローナル抗体及びポリクローナル抗血清を作製する方法は当業界で周知であり、本明細書でさらに記載する必要はない。

【0051】

免疫的検出

これらの方法はまた、腫瘍摘出手術の前後に採取された膀胱癌患者の血清又は血漿中のマーカーファミリーメンバーの免疫的検出のために、他の癌（結腸直腸、膵、卵巣、メラノーマ、肝、食道、胃、子宮内膜及び脳の癌を含むが、ただしこれらに限定されない）を有する患者のマーカーファミリーメンバーの免疫的検出のために、及び膀胱癌患者の尿及び大便中のマーカーファミリーメンバーの免疫的検出のために用いることができる。

疾患マーカーはまた、例えば免疫ブロット又は免疫沈澱のような他の標準的な免疫学的検出をもちいて組織又はサンプルで検出できる (Harlow, E. and Lane, D., Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1999)。免疫ブロットでは、マーカーを含む組織又は液体由来のタンパク質調製物が、ポリアクリルアミドゲル中を変性条件又は非変性条件下で電気泳動される。続いて、タンパク質は膜支持体（例えばナイロン）に移される。続いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体とマーカーを、免疫組織化学について記載したように直接又は非直接的に反応させる。また別に、いくつかの調製物では、タンパク質は事前の電気泳動分離を実施せずに膜に直接スポットされる。シグナルはデンストメトリーによって定量できる。

免疫沈澱では、マーカーを含む可溶性調製物は、マーカーに対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体とともにインキュベートされる。続いて、タンパク質A又はタンパク質Gを共有結合させたアガロース又はポリアクリルアミドから作製した不活性ビーズと前記反応物をインキュベートする。タンパク質A又はGビーズは、ビーズと結合した抗体-マーカー-抗原の固定複合物を形成する抗体と特異的に相互作用する。洗浄後、結合マーカーを免疫ブロット又はELISAによって検出及び定量できる。

【0052】

遺伝子型解析に基づく診断の確立

いったんIL8Rb及び場合によって1つ以上のさらに別の癌マーカーの発現レベルが得られたら、当該対象動物の診断を確立することができる。IL8Rbの発現が、炎症性膀胱疾患ではない対象動物で認められる発現を超える場合、及び/又は炎症性膀胱疾患を有することが分かっている対象動物の発現レベルと一致する場合、当該対象動物は炎症性膀胱疾患を有すると診断されるであろう。また別には、該発現が、炎症性膀胱疾患ではない対象動物で認められる発現を超えない場合、及び/又は炎症性膀胱疾患を有することが分かっている対象動物の発現レベルよりも低い場合、当該対象動物は炎症性膀胱疾患ではないと診断されるであろう。

IL8Rbが膀胱癌の1つ以上のマーカーと一緒に用いられる状況では、IL8Rbの発現レベルは炎症性膀胱疾患ではない対象動物及び/又は炎症性膀胱疾患を有することが分かっている対象動物の発現レベルと比較されるであろう。1つ以上の癌マーカーが、膀胱癌ではない対象動物及び/又は膀胱癌を有することが分かっている対象動物の発現レベルと比較される。IL8Rbの発現レベルが、炎症性膀胱疾患ではない対象動物と一致し（炎症性膀胱疾患を有する患者より低い）、かつ1つ以上の膀胱癌マーカーの発現レベルが膀胱癌を有する対象動物と一致する（膀胱癌ではない対象動物と異なる）場合、当該対象動物は膀胱癌を有すると診断される。IL8Rbの発現レベルが炎症性膀胱疾患ではない対象動物より高く（炎症性膀胱疾患を有する対象動物と一致する）、かつ1つ以上の膀胱癌マーカーの発現レベルが膀胱癌を有する対象動物と一致する（膀胱癌ではない対象動物と異なる）場合、当該対象動物は炎症性膀胱疾患を有すると診断される。IL8Rbの発現レベルが、炎症性膀胱疾患ではない対象動物と一致し（炎症性膀胱疾患を有する対象動物より低い）、かつ1つ以上の膀胱癌マーカーの発現レベルが、膀胱癌ではない対象動物と一致する（膀胱癌を有する対象動物と異なる）場合、当該対象動物は、膀胱癌でも炎症性膀胱疾患でもないとして診断される。

診断マーカーの正常発現と罹患発現の間にはしばしば発現レベルのオーバーラップが存在するので、対象動物の診断を確立するために、典型的には分類閾値が確立される。分類閾値は、対象動物を疾患又は非疾患カテゴリーに区別する値又は閾値である。閾値は、通常は、受診者操作特性（ROC）曲線の使用により評価される（前記曲線では全ての可能な

10

20

30

40

50

閾値について特異性に対して感度がプロットされる)。

【0053】

診断閾値の決定

疾患マーカーを用いる検査のために、あるサンプルを疾患（例えば膀胱癌）について陽性又は陰性と称することを可能にする診断閾値を誘導することができる。これらの診断閾値は、膀胱癌又は炎症性膀胱疾患の存在について精査される患者のコホートの分析によって決定される。診断閾値は検査の適用が異なれば変動しうる。例えば集団スクリーニングの検査で使用される診断閾値は、泌尿器学的徴候から大いに自由である患者のコホートを用いて決定され、これらの診断閾値は、膀胱癌再発の監視下にある患者についての検査で使用されるものとは異なりうる。診断閾値は、要求される臨床設定で実際のレベルの検査特異性（すなわち、過剰な数の患者が偽陽性結果を受け取ることがない合理的な感度を可能にする特異性）を提供するために選択できる。この特異性は80-100%の範囲内でありうる。

10

診断閾値は、各マーカーの遺伝子型発現レベルを一体化するアルゴリズムを前向き臨床試験のサンプルに適用することによって決定される。

使用されるサンプルは、膀胱癌及び一連の非悪性泌尿器学的異常を有する患者に由来する。診断閾値は、所望の特異性をもたらす当該アルゴリズムのスコアを決定することによって選択される。例えば、いくつかの適用では、85%の特異性が所望される。続いて、膀胱癌ではない患者の85%が癌について陰性と正確に分類される結果を生じるアルゴリズムスコアを選択することによって診断閾値が設定される。他の適用（例えば集団スクリーニング）では、より高い特異性、例えば90%が望ましい。この適用のための閾値を設定するために、膀胱癌ではない患者の90%が癌について陰性と正確に分類される結果を生じるアルゴリズムスコアが選択される。アルゴリズムの使用例は実施例で概略される。

20

単一閾値の代替として、検査は検査区間を利用することができ、前記は、疾患の存在について種々の程度の蓋然性を提供し、さらにそれらと密接に関係する種々の臨床結果を有する。例えば、検査は3つの区間を有することができる。1つは膀胱癌の高リスク（例えば90%）と密接に関係し、二番目は膀胱癌の低リスクと密接に関係し、第三は疾患の疑いありと考えられる。“疑いあり”の区間は、指定期間中の反復検査の推奨と密接に関係しうる。

【0054】

データ解析

いったんRNA及び/又はタンパク質の量を試験する方法が完了したら、続いてデータを分析して、腫瘍及び非腫瘍サンプルに付随するバイオマーカー値の分布を決定しなければならない。これは、典型的には、生のデータの標準化、すなわちバックグラウンドの“ノイズ”などを除去し、任意のデュープリケート（又はそれ以上）を平均化し、標準物と比較し、さらにカットオフ又は閾値を確立してサンプルの2つのクラスを最適に分離することを必要とする。前記の実施のために多くの方法が公知であり、正確な方法は、用いられるRNA及び/又はタンパク質の量を決定する具体的な方法に左右されるであろう。

30

下記は、qRT-PCRを用いたときにデータ解析をどのように実施しえるかの例である。しかしながら、一般的な方法を改作してRNA及び/又はタンパク質含有量を確立する他の方法のために用いることができること、又は当業者のあるものが他の方法を確立して同じ結果を達成できることは理解されよう。

40

データ

蛍光の測定は、波長 ω_i ($i=1, 2$) でPCRの各サイクルで採取される。したがって、各ウェルについて、我々是一对の蛍光曲線を観察し、前記は $f_t(\omega_i)$ によって示される。式中、 $t=1, \dots, k$ はサイクル数を示し、 $i=1, 2$ は波長を示す。

蛍光曲線はS字形を有し、水平に近い基準線で始まり上方の漸近線に向けて滑らかに増加する。蛍光曲線が直線状基準線から離れる点 C_p の位置は、標的遺伝子の濃度を特徴付けるために用いられるであろう。厳密な C_p の定義は以下に続く。

以下はこれらのデータを処理する案の例である。

50

- 一周波数帯間の蛍光オーバーラップを補正する
- C_p を推定するために各蛍光曲線について滑らかなモデルを推定する
- 複製ウェルのデータをまとめる
- 標準曲線を推定する
- 標準物に対する濃度を算定する

各生物学的サンプルは5遺伝子の相対的濃度を生じ、前記は識別関数への入力である。

【0055】

色補正

$W_{tj}(\omega)$ によって、サイクル t 及び周波数 ω における染料 j の蛍光レベルを示す。多重アッセイでは、任意の周波数 ω で測定された応答は、当該周波数での全ての染料の寄与の合計であり、各サイクルについて同様である。 10

$$f_t(\omega) = W_{t1}(\omega) + W_{t2}(\omega) + \dots$$

色補正の目的は個々の寄与 $W_{tj}(\omega)$ を観察した混合物 $f_t(\omega)$ から抽出することである。

理想的な状況では、蛍光 $W_{tj}(\omega_o)$ は、周波数 ω における染料 j のために、 $W_{tj}(\omega_o)$ のレベルにもかかわらず参照周波数 ω_o におけるその蛍光 $W_{tj}(\omega_o)$ に比例する。

これは下記線形関係を

【0056】

【数1】

$$\begin{bmatrix} f_t(\omega_1) \\ f_t(\omega_2) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} W_{t1}(\omega_1) + W_{t2}(\omega_1) \\ W_{t1}(\omega_2) + W_{t2}(\omega_2) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & A_{12} \\ A_{21} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} W_{t1}(\omega_1) \\ W_{t2}(\omega_2) \end{bmatrix} \quad 20$$

【0057】

決定されるべきいくつかの比例定数 A_{12} 及び A_{21} について提唱する。

実際には、追加の効果が存在し、前記は、この系に線形関係を導入することによって以下のように効果的にモデルが作成される；

【0058】

【数2】

$$\begin{bmatrix} f_t(\omega_1) \\ f_t(\omega_2) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & A_{12} \\ A_{21} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} W_{t1}(\omega_1) \\ W_{t2}(\omega_2) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_1 + b_1 t \\ a_2 + b_2 t \end{bmatrix} \quad 30$$

【0059】

“色補正”パラメーター A_{12} 及び A_{21} を推定した後、我々は、行列乗算によって $W_{t1}(\omega_1)$ 及び $W_{t2}(\omega_2)$ を、直線状基準線によってゆがめられるが回復することができる；

【0060】

【数3】

$$\begin{bmatrix} W_{t1}(\omega_1) \\ W_{t2}(\omega_2) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & A_{12} \\ A_{21} & 1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} f_t(\omega_1) \\ f_t(\omega_2) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_1^* + b_1^* t \\ a_2^* + b_2^* t \end{bmatrix} \quad 40$$

【0061】

$W_{t1}(\omega_1)$ 及び $W_{t2}(\omega_2)$ は“色補正された”データと称される。この表現の最後の項の線形のゆがみ $a_i^* + b_i^* t$ は、2より下で色補正データについてモデルを推定するとき基準線推定内に収まるであろう。それは C_p の推定に影響を与えない。

色補正係数の推定は、単一（デュプレックスと対比して）プローブを用いる別々のアッセイを必要とする。したがって $W_{t2}(\omega_2) = 0$ は以下を与え：

【0062】

【数 4】

$$\begin{bmatrix} f_t(\omega_1) \\ f_t(\omega_2) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & A_{12} \\ A_{21} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} W_{t1}(\omega_1) \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_1 + b_1 t \\ a_2 + b_2 t \end{bmatrix}$$

【0 0 6 3】

したがって、 $f_t(\omega_2) = A_{21}f_t(\omega_1) + a^* + b^*t$ である。

係数 A_{21} は、 $f_t(\omega_1)$ に向かう $f_t(\omega_2)$ の通常の線形回帰及び $t = 1, \dots, k$ のPCRサイクル t によって推定できる。

【0 0 6 4】

モデルの推定

このセクションでは、 y_t ($t = 1, \dots, k$) に色補正された蛍光曲線を示させる。

増幅

小さくない増幅を示す蛍光曲線のためにのみモデルが推定される。我々は、“増幅”という用語を色補正された蛍光曲線の直線状基準線からの小さくない離脱と定義する。増幅を定量するためにシグナル対ノイズ比 (SNR) を用いる。ここで、SNRはシグナル分散対ノイズ分散の比と定義される。ノイズ分散はアッセイ手順の調製の部分として設定され未変化のままである。この目的のために、増幅を有しえないウェル（すなわちRNAのないウェル）に由来する基準線のために線形モデルの残留分散を用いる。各蛍光曲線について、シグナル分散をもっとも良好に適合する直線の残留分散として推定する（“最も良好”は最小二乗の意味で意図される）。

—SNRが指定された閾値よりも小さい場合、蛍光曲線は直線に近く、増幅は存在しない。したがって、基準線からの離脱点は存在せず、サンプル中の濃度はゼロといえることができる。

—SNRが閾値を超える場合、増幅は存在し、濃度を推定できる。

“増幅”と“非増幅”曲線の間の明瞭な識別を提供するために、（無次元）SNRのための閾値が選択される。例えば、以下の閾値のための範囲がマーカーのために有効である。

【0 0 6 5】

Fluor	遺伝子	範囲
JOE	MDK	40-120
JOE	CDC	35-70
JOE	IL8R	30-60 5
FAM	IGF	50-80
FAM	HOXA	50-150
FAM	XENO	50-80

【0 0 6 6】

モデル

各蛍光曲線についてS字形モデルを推定する。モデルの任意の適切なパラメーター型を用いることができるが、以下の特色をモデルとしなければならない：

- 非ゼロスロープを有することができる直線状基準線、
- 中点辺りで非対称
- 下方及び上方レベルで漸近線
- 基準線から上方漸近線へ向けて滑らかな増加

これらの要件を達成するモデルの例は以下である：

【0 0 6 7】

10

20

30

40

【数 5】

$$g_t(\theta) = A + A_s t + \frac{D}{\left(1 + \left(\frac{t}{B}\right)^E\right)^F}$$

【0 0 6 8】

我々は、これを“6PLモデル”と呼ぶ。パラメーターベクター $\theta = [A, A_s, D, B, E, F]$ は以下の制約を受け、 $g_t(\theta)$ は t の増加関数であり、蛍光曲線の実証的特性を有することを担保する。

$$D > 0, B > 0, E < 0, F < 0$$

10

他の2つのパラメーターは基準線 $A + A_s t$ を決定し、これらのパラメーターは明確な制約を必要としないが、ただし A は常に正であり、スロープパラメーター A_s は常に小さい。パラメーター D は基準線を超える増幅レベルを決定する。残りのパラメーター B 、 E 、 F はそれら自体に固有の解釈をもたないが、曲線の形状を制御する。これらのパラメーターはまた、 C_p の推定に影響を与える唯一のパラメーターである。 $A_s = 0$ のとき、前記は5パラメーターロジスティック関数 (5PL) として知られ、加えて $F = 1$ であるとき、このモデルは4パラメーターロジスティックモデル (4PL) に縮小する (Gottschalk and Dunn, 2005; Spiess et al., 2008)。

【0 0 6 9】

初期化

20

非線形推定のための初期値は以下のように設定される：

$$-A_s = 0, F = 1$$

$$-A = \text{平均}(y, \dots, y_5)$$

$$-D = \text{範囲}(y_1, \dots, y_k)$$

$$-B = \text{半分の高さに対応するサイクル}$$

$-E$ は、 $g_t(\theta)$ を、残りのパラメーターの値を上記に規定したそれらの初期値に設定した線形に変換することによって初期化される。初期化によって下記が得られる

【0 0 7 0】

【数 6】

30

$$E \log\left(1 + \frac{t}{B}\right) = \log\left(\frac{D}{y_t - A}\right)$$

【0 0 7 1】

今や t のために $\log(1 + t/B)$ に向かう $\log(D/y_t - A)$ の回帰によって E を推定し、 t は以下のように選択される：

【0 0 7 2】

【数 7】

$$A + \frac{D}{10} < y_t < A + \frac{9D}{10}$$

40

【0 0 7 3】

ほぼ同一の分析をもたらすこのモデル（それ自身の初期化を有する）のまた別の形は以下のとおりである：

【0 0 7 4】

【数 8】

$$A + A_s t + \frac{D}{\left(1 + \exp\left(-\frac{t - B}{E}\right)\right)^F}$$

【0 0 7 5】

50

$A_s=0$ のとき、前記はときにリチャード等式として知られる (Richards, 1959)。

推定規範

二乗規範のペナルティー合計を最小にするパラメーターを推定する：

【0076】

【数9】

$$\sum_t (y_t - g_t(\theta))^2 + \lambda(\theta)$$

【0077】

ここで $\lambda(\theta)$ は非負関数であり、前記は、 θ のパラメーターのいくつか（又はすべて）の大きな値にペナルティーを科す。この方法は、正則化又は回帰として知られ (Hoerl, 1962)、パラメーターベクトル θ について適切な事前分布を設定することによってBayesの観点から誘導することができる。ペナルティーに対して満足が得られる選択は以下のとおりである：

【0078】

【数10】

$$\lambda(\theta) = \lambda(B^2 + D^2 + E^2 + F^2)$$

【0079】

λ の大きな値はパラメーター推定をゼロに偏らせ、パラメーター推定の分散を減じる。逆に、小さな（又は0の） λ は不安定なパラメーター推定及び収束困難性を最小化アルゴリズムでもたらす。 λ の選択は偏向と分散又は安定化との間の妥協である。経験的証拠は、偏向と分散との間の満足が得られる妥協は、 λ が以下の範囲で選択される場合に達成できることを示している：

$$0.01 > \lambda > 0.0001$$

この選択はまた最適化アルゴリズムの収束を担保する。

【0080】

アルゴリズムの選択

上記範囲の λ のいずれの選択についても、先のパラグラフの記述はパラメーター推定を完全に明示する。古典的なGauss-Newton法（例えばMore (1978) で実行されたLevenberg-Marquardアルゴリズム）に基づく非線形最小二乗法が首尾よく用いられ、前記は適切なアプローチである。アルゴリズム（例えばNelder and Mead (1965) 又はBroyden-Fletcherアルゴリズム (Byrdら (1995) で実行された)）を最適化する一般的な目的もまたこの関係で試験され成功した。

C_p 推定

C_p は、 $g_t(\theta)$ の第二の派生物を最大にする時間 t における点である。各蛍光曲線は、標的遺伝子の濃度を特徴づける C_p を生じる。技術的複製の各セットの推定 C_p sの平均を算定し、その後の解析で用いる。

標準曲線

絶対濃度又は相対濃度は、同じPCRプレートにおける標準曲線との比較から誘導される。線形モデルを用いて希釈シリーズのモデルを作成する：

【0081】

【数11】

$$C_p = R + S \log_{10} Conc$$

【0082】

式中、Concは標準物の絶対又は相対濃度である。切片及びスロープパラメーターはプレート特異的である。集団モデルを設定することによる、切片及びスロープパラメーターにおけるプレート間ばらつきのモデルを作成する：

10

20

30

40

50

【0083】

【数12】

$$R \sim N(\mu_R, \sigma_R^2)$$

$$S \sim N(\mu_S, \sigma_S^2)$$

【0084】

式中、パラメーター μ_R 、 σ_R^2 、 σ_S^2 は、下記に記載されるように以前のデータを基準にして設定される。したがって、あるプレートについてR及びSはこれらの集団の観察と解釈される。

10

濃度 Conc_j における標準物の複製*i*のために、以下のモデルを用いることができる：

【0085】

【数13】

$$C_p(i, j) = R + S \log_{10} \text{Conc}_j + \epsilon_{ij}$$

【0086】

式中、

【数14】

$$\epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_j^2)$$

20

である。残差の分散は C_p に左右されることに注目されたい。

【数15】

$$\text{Var}(\epsilon_{ij})$$

の経験的推定は表2に提供される。公算関数を最大にすることによって、パラメーターR及びSを推定する。発現を通してPCRプロセスの効率の関係でスロープパラメーターを解釈する：

$$S = -1 / \log_{10} \text{効率}$$

30

このモデルはBayesの解釈を有する。すなわち、分布前にパラメーター μ_R 、 σ_R^2 、 σ_S^2 に曖昧さ（非情報性）を与える。続いて、R及びSのための、並びに $C_p(i, j)$ のための集団モデルは、以前のデータのために十分に確率モデルを決定する。マルコフチェーンモンテカルロ（MCMC）アルゴリズム（Lunn et al., 2009）は、 μ_R 、 σ_R^2 、 σ_S^2 の推定を可能にする。以前の分布が省略される場合、伝統的な頻度論者の解釈がもたらされる。この推定手順に従って、表3の遺伝子依存集団パラメーター推定を得ることが可能である。

【0087】

表2：残差の分散

C_p	σ^2	σ_p	σ^2
12	0.0100	21	0.0466
13	0.0108	22	0.0625
14	0.0119	23	0.0860
15	0.0134	24	0.1212
16	0.0155	25	0.1750
17	0.0184	26	0.2591
18	0.0224	27	0.3931
19	0.0279	28	0.6112
20	0.0356	29	0.9741

40

50

【0088】

表3：標準曲線のスロープ及び切片のための集団パラメーター

	μ_R	σ^2_R	μ_S	σ^2_S
MDK	19.49	0.5112	-3.426	0.0481
CDC	18.91	0.2343	-3.414	0.0198
IL8R	31.43	0.0919	-3.192	0.0017
IGF	20.63	0.3835	-3.275	0.0247
HOXA	22.51	0.1544	-3.270	0.0037

10

【0089】

標準曲線の切片及びスロープの推定は

【数16】

 $\hat{R}$ 及び $\hat{S}$

によって示される。

【0090】

相対濃度 ΔC_p

標準曲線を用いて、表現：

【数17】

20

$$C_{p(REF)} = \hat{R} + \hat{S} \log_{10} CONC_{REF}$$

の濃度 $Conc_{REF}$ における $C_{p(REF)}$ を算定する。サンプルの相対濃度は下記表現によって与えられる：

【数18】

$$\Delta C_p = \frac{C_p - C_{p(REF)}}{\hat{S}} = \log_{10} \frac{Conc_{SAMPLE}}{Conc_{REF}}$$

30

【0091】

また別に、

【数19】

 $\hat{S}$

は、PCR効率2に対応する固定レベルで概算することができる。したがって

【数20】

$$\hat{S} = -1/\log_{10}(2) = -3.32$$

40

である。したがって同じ表記 ΔC_p をどちらの選択にも用いる。得られる ΔC_p 推定値（各遺伝子のための推定値）は次の工程の識別関数への入力である。

【0092】

識別関数

ΔC_p 値は、プレート間変動が除去された相対的バイオマーカー値と一致する。 $5\Delta C_p$ 値の相互比較試験（例えば図2参照）は、典型的にはどのような腫瘍サンプルが非腫瘍サンプルと比較して異なるバイオマーカー値を有するかを示す。さらにまた、腫瘍と正常領域はオーバーラップするが、多数のサンプルが効果的に良く分けられている。これらの状況下で多くの異なる分類法を用いて腫瘍サンプルから正常サンプルを分けることができよう。我々はここで、いくつかの分類法の見本は確かに機能してこれらサンプルを分離するこ

50

とを示す。我々は以下の異なる5つの分類方法を用いた：1) 線形判別分析 (LDA)、2) ロジスティック回帰 (LogReg)、3) サポートベクターマシン (SVM)、4) 5近傍探索をベースにするk-最接近-近傍 (KNN) 法 (KN5N)、及び5) 分割樹分類法 (TREE) (引用：Venables & Ripley and Dalgaard)。

分類法の作出は、多数のサンプルについてのバイオマーカー値を含むデータセットを必要とする (前記サンプルは当該分類方法によって試験されるべき最終集団であるべきである)。例えば、分類方法が、リスク集団 (例えば年齢50以上、喫煙者) をスクリーニングするために用いられる場合は、分類方法を作出するために要求されるデータセット (“訓練セット” と呼ばれる) は、当該集団を反映し、喫煙する50歳を超える人々のサンプルのみを含むべきである。典型的には、感度及び特異性のようなパラメーターのために誤差が10%より小さい測定の正確さを得るために、訓練セットは300サンプルより大きくなければ

10

【0093】

分類方法の有効性の推定は交差検証を用いて実施することができる。交差検証 (Wikipedia: Cross-validation) では、データセットは均等サイズの少数の分割部分に分けられる (典型的には3から10)。1つの分割部分を取り置き、残りの分割部分を用いて分類方法を構築する。続いて取り置いた分割部分を新規な分類方法によって検査し、その予測を記録する。これを各分割部分について順次実施し、全ての予測をまとめて解析し、当該分類方法の特徴 (感度、特異性など) を算定する。交差検証がデータを10部分に分割することによって実施される場合、前記は10分割交差検証と呼ばれ、同様に3部分は3分割交差検証であろう。データが、存在するサンプルと同じ多くのクラスに分割されるならば、これは “1個抜き交差検証” と呼ばれる。分類法の構築に用いられないデータについて検査することによって、この方法は追加サンプルが存在しないときに当該分類法の性能の推定を可能にする。

20

我々は、この文書の他の場所に記載した (実施例1) 臨床試験のデータセットを用い、4つのバイオマーカー (MDK、IGFBP5、CDC2、及びH0XA13) の115全ての組合せを用いて分類法を構築し (すべてがIL8Rbバイオマーカーを含むもの及び含まないものである)、10分割交差検証を用いてこれら30の分類法を試験した。これは、上記に列挙した5つの分類法タイプの各々について実施され、ROC曲線が算定された。全ての作業はR統計プログラミング環境 (CITE) を用いて実施された。これらの結果 (図14) は、ほとんどの事例で、IL8Rbを含む分類法は、診断的に有用な特異性の値についてより鋭敏である (偽陽性率は0から20%、特異性は100から80%)。診断的に有用な特異性を有する領域の曲線下面積 (AUC) を用いて、分類法がより良好な性能を示すより高い値を提示してどのように良好な性能を発揮するかを定量する。図15aは各分類法及びバイオマーカー組合せについてのAUCの一覧表であり、一方、図15bは、IL8Rbを加えたときの各条件についてのAUCの増加量を示す。ほとんどの事例で、IL8Rbの付加は正確な診断を下す能力を改善する。診断的に有用な特異性値のための具体的な感度値は、図16で全ての分類法について一覧表にされている。加えて、図17はIL8Rbの付加が提供する感度又は特異性における増加量の一覧表である。

30

分類法の有用性は、それを作出し試験してからそれを用いて新しいサンプルを試験したときにもたらされる。結果の解釈を単純化するために、カットオフスコア又は閾値を確立し、カットオフの一方の側のサンプルは腫瘍について陽性とみなし、他方の側のサンプルは陰性とみなす。追加のカットオフを、例えばある種の結果のレベル増加を示すために確立することもできる。この事例では、我々は、我々の訓練セットで15%の偽陽性率を与えるカットオフを確立した。我々の交差検証ROC曲線を用いて、我々の感度を推定することができる。典型的には、我々はまた75%の陽性予測値でカットオフを確立する。これらのカットオフ値を用いて、85%特異性によって確立されたカットオフよりも低いスコアについて “陰性” 結果を確立する。75%PPVよりも高いスコアは “陽性” と称され、2つの間のスコアは “不確定” 又は “疑いあり” と称される。

40

【0094】

IL8Rbに対する抗体

50

追加される特徴では、本発明はIL8Rbに対する抗体の製造を含む。マーカーIL8Rbは、免疫学的応答を誘引するために適切な十分量で製造することができる。いくつかの事例では完全長IL8Rbを用いることができ、他の事例ではIL8Rbのペプチドフラグメントが免疫原として十分でありうる。免疫原は適切な宿主（例えばマウス、ウサギなど）に注射でき、所望ならば、アジュバント（例えばフロイントの完全アジュバント又はフロイントの不完全アジュバント）を注射して免疫応答を高めることができる。抗体作製は免疫学分野では日常的で、本明細書でさらに記述する必要がないことは理解されよう。結果として、IL8Rbに対するモノクローナル抗体又はファージディスプレイ抗体を含む抗体を製造することができる。

さらに別の実施態様では、本明細書で同定した腫瘍マーカーのタンパク質若しくはタンパク質コアに対して、又はIL8Rbに固有のオリゴヌクレオチド配列に対して抗体を作製できる。ある種のタンパク質はグリコシル化できるが、ある種の環境下におけるグリコシル化パターンの変動は、通常のグリコシル化パターンを欠くIL8Rb型の誤検出をもたらす。したがって、本発明のある種の特徴では、IL8Rb免疫原は脱グリコシル化IL8Rb又は脱グリコシル化IL8Rbフラグメントを含むことができる。脱グリコシル化は当業界で公知の1つ以上のグリコシダーゼを用いて達成できる。また別には、IL8Rb cDNAをグリコシル化欠損細胞株（例えば原核細胞株、大腸菌（E. coli）などを含む）で発現させることができる。

IL8Rbコードオリゴヌクレオチドをその中に有する発現ベクターを作製できる。多くのそのようなベクターは、当業界で公知の標準的なベクターを土台にすることができる。ベクターを用いて、多様な細胞株をトランスフェクトしIL8Rb生成細胞株を作製することができ、前記を用いて、特異的抗体若しくはIL8Rb検出のための他の試薬の開発又はIL8Rbのために開発されたアッセイの標準化のために、所望の量のIL8Rbを製造できる。

【0095】

キット

本発明の発見に基づいて、いくつかのタイプの検査キットを企図し製造することができる。第一に、検出分子（又は“捕捉試薬”）を予めロードした検出装置を有するキットを製造できる。IL8Rb mRNAの検出のための実施態様では、そのような装置は基質（例えばガラス、シリコン、石英、金属など）を含み、その上に検出されるべきmRNAとハイブリダイズする捕捉試薬としてオリゴヌクレオチドが結合される。いくつかの実施態様では、mRNAの直接検出は、基質上のオリゴヌクレオチドとmRNA（cy3、cy5、放射能標識又は他の標識で標識される）をハイブリダイズさせることによって達成できる。他の実施態様では、mRNAの検出は、第一に所望のmRNAに相補的なDNA（cDNA）を作製することによって達成できる。続いて、標識したcDNAを基質上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて検出することができる。

抗体もまた捕捉試薬としてキットで用いることができる。いくつかの実施態様では、基質（例えばマルチウェルプレート）は、それに付着させた特異的なIL8Rb及びBTM捕捉試薬を有することができる。いくつかの実施態様では、キットは封鎖試薬を含むことができる。封鎖試薬を用いて非特異的な結合を減少させることができる。例えば、非特異的オリゴヌクレオチド結合は、任意の通常供給源に由来する、IL8Rb及びBTMオリゴヌクレオチドを含まない過剰なDNA（例えばサケ精子DNA）を用いて減少させることができる。非特異的な抗体結合は、過剰な封鎖タンパク質（例えば血清アルブミン）を用いて減少させることができる。オリゴヌクレオチド及びタンパク質を検出する多数の方法が当業界で公知であること、マーカー関連分子を特異的に検出できる任意の戦略を用いることができ、それらは本発明の範囲内と考えられることは理解されよう。

抗体はまた、固相に結合させるとき（例えば抗体チップを用いるとき）に用いることができ、前記はただ1つのチップで多数のマーカーの検出を可能にするであろう。

基質に加えて、検査キットは、捕捉試薬（例えばプローブ）、洗浄溶液（例えばSSC、他の塩類、緩衝剤、洗剤など）を検出部分（例えばcy3、cy5、放射能標識など）と同様に含むことができる。キットはまた、使用の指示及びパッケージを含むことができる。

サンプル中のIL8Rb及びBTMの検出は任意の適切な技術を用いて実施でき、オリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドプローブ、qPCR又は癌マーカーに対して作製された抗体が含まれる（ただしこれらに限定されない）。

被験サンプルは炎症疾患又は腫瘍が疑われる組織のサンプルに限定されないことは理解されるであろう。マーカーは血清又は他の体液中に分泌される。したがって、サンプルは任意の身体サンプルを含むことができ、前記には生検、血液、血清、腹腔洗浄液、脳脊髄液、尿及び大便サンプルが含まれる。

本発明はヒトの癌の検出に限定されないこと、しかし任意の動物（イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、シカ、ブタ及び癌を発することが知られている任意の他の動物が含まれるが、ただしこれらに限定されない）で癌を検出するために適切であることもまた理解されるであろう。

10

【0096】

炎症疾患又は体液中の癌マーカーのための一般的検査

一般的には、これらの液体中のオリゴヌクレオチド、タンパク質及びペプチドをアッセイする方法は当業界で公知である。オリゴヌクレオチドの検出は、ハイブリダイゼーション方法（例えばノザンブロット、サザンブロット若しくはマイクロアレイ法、又はqPCR）を用いて実施できる。タンパク質を検出する方法には、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、抗体を含むタンパク質チップ、懸濁ビーズ放射性免疫アッセイ（RIA）、ウェスタンブロット及びレクチン結合が含まれる。しかしながら、例示的目的のために、疾患マーカーの液体レベルはサンドイッチ型酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を用いて定量できる。血漿アッセイのためには、適切に希釈したサンプル又は連続希釈標準マーカーの5µLアリコット及びペルオキシダーゼ結合抗ヒトマーカー抗体の75µLをマイクロタイターウェルに添加する。30℃での30分インキュベーション時間後に、リン酸緩衝食塩水（PBS）中の0.05%トウイン20でウェルを洗浄し、未結合抗体を除去する。続いて、マーカーと抗マーカー抗体との結合複合体をH₂O₂含有o-フェニレンジアミンとともに30℃で15分間インキュベートする。1MのH₂SO₄を添加して反応を停止し、マイクロプレートリーダーを用い492nmで吸収を測定する。

20

抗IL8Rb抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗血清でもよいことは理解できるよう。任意の他の体液も適切に調べることができることもまた理解される。

有用であるべきマーカーが生理学的意味で分泌されることは必要ではない。むしろ、マーカータンパク質又は遺伝子が血清に入るいずれのメカニズムも、マーカーの検出可能で定量可能なレベルの発生に有効でありうる。したがって、可溶性タンパク質の細胞からの正常な分泌、膜タンパク質の形質膜からの脱落、また別にmRNAのスプライス型若しくは前記からのタンパク質の発現、細胞死（アポトーシスであれ）は有用であるべきマーカーの十分なレベルを生じうる。

30

診断及び/又は多様な癌タイプに対する治療方法の有効性の評価に血清マーカーを使用することについてますます支持が高まっている。

本明細書に記載する実施例は本発明の実施態様の例示を目的とする。他の実施態様、方法及び分析のタイプも、分子診断分野の業者の範囲内であり、それらについて詳細に記載する必要はない。当分野の範囲内の他の実施態様は本発明の部分と考えられる。

【実施例1】

40

【0097】

膀胱癌の遺伝子型分析

方法

患者：2008年4月から2009年9月の間に、485人の患者がニュージーランド及びオーストラリアの11の泌尿器診療所で募集された。前記患者は、巨視的血尿を有するが尿路悪性疾患の以前の病歴はない。各患者は、膀胱鏡検査及び何らかの追加の診断手続きを受ける直前に尿サンプルを提供した。診断はこの試験に登録後3カ月までに行われた。これら485人の患者のうち442人の患者について、以下に記載の方法を用いて5つの全ての試験遺伝子に関する遺伝子発現データが首尾よく得られた。これらの患者の特徴を表4に示す。

【0098】

50

表4：試験集団Iの特徴

診断	数
良性前立腺肥大	18
膀胱炎	18
運動誘発性血尿	3
非特異性腎疾患	3
非特異性新形成	3
非特異性前立腺疾患	63
血管性前立腺	49
他の泌尿器癌（非TCC）	5
表在血管	3
尿道狭窄	6
尿路感染	18
尿石症	25
ワルファリン使用	10
未知の病因	155
雑多	7
TCC	56
総計	442

10

20

【0099】

表4は、患者が肉眼的血尿を最初に提示してから3か月後の主要診断の各々における患者数を示す。

尿分析：尿サンプルは、サザンコミュニティ検査所（Southern Community Laboratories, Dunedin, New Zealand）の中央細胞学精査によって分析された。診断検査NMP22 BladderChek(商標)（Matritech）及びNMP22 ELISA（Matritech）を製造業者の指示にしたがい臨床現場（BladderChek(商標)）又はサザンコミュニティ実験所（NMP22 ELISA）で実施した。

RNA定量：各患者の尿の2mLをRNA抽出緩衝液と混合する（前記緩衝液は以下を含む：5.6 4Mグアニジンチオシアン酸塩、0.5%サルコシル及び50mM NaOAc (pH6.5)）。続いて、以前に記載されたように、全RNAをトリゾール抽出（Invitrogen）及びRNeasy手順（Qiagen）によって抽出する。RNAを35 µLの水でカラムから溶出させ、3 µLをその後の一重又は二重定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）アッセイの各々で用いた。それぞれ16 µLのqRT-PCR反応は以下を含んでいた：0.3UのRNase-OUT（Invitrogen）、0.225 µMの各Taqmanプローブ、1.25U Superscript III（Invitrogen）、0.275 µMの各プライマー、1.5U ファストスタート（Fast Start）Taqポリメラーゼ（Roche）、10mM DTT、0.375mM dNTP、4.5mM MgSO₄、1.6 µL 10 x ファストスタートPCR緩衝液（Roche）及び2.6 µL GCリッチ溶液（Roche）。プライマー及び蛍光二重標識プローブはインテグレイテッドDNAテクノロジーズ社（Integrated DNA Technologies, Coralville USA）から5つの試験遺伝子（MDK、C DC2、HOXA13、IGFBP5及びIL8Rb）の各々について入手した。プライマー/プローブ配列は表2に示す。反応は96ウェルプレートで設定し、ロシュライトサイクラー(商標)（Roche Light Cycler(商標)）480で以下のようなサイクルで実施した：50°Cで15分；95°Cで8分；95°Cで15秒、60°Cで2分を10サイクル；及び95°Cで15秒、60°Cで1分を30サイクル。参照RNA（プールした細胞株RNAから誘導）の1/16の連続希釈の標準曲線を各プレートに加え、0.3 pg/ µLから20ng/ µLの範囲を作成した。最後の30サーモサイクルの伸長期でデータを収集し、未加工テキストファイルとしてエクスポートした。下記の表5は、5つのRNAマーカーのqRT-PCR定量のために用いられたプライマー及びプローブ配列を示す。

30

40

【0100】

表5

50

マーカー	フォワード配列	リバース配列	プローブ
MDK	TGC ACC CCC AAG ACC AAA (配列番号:3)	TGA TTA AAG CTA ACG AGC AGA CAG AA(配列番号:4)	CCT TCC CTT TCT TGG CTT TGG CCT TT (配列番号:5)
IGFBP5	CGT TGT ACC TGC CCA ATT GTGA(配列 番号:6)	GGG ACG CAT CAC TCA ACG TT (配列番 号:7)	AAG AGA AAG CAG TGC AAA CCTTCCCG T(配列番号:8)
CDC2	GCC GCC GCG GAA TAA T (配列番号:9)	TGT CTA CCC TTA TAC ACA ACT CCA TAG G (配列番号:10)	AGC CGG GAT CTA CCA TAC CCA TTG ACT AAC T (配列番号:11)
HOXA13	TGG AAC GGC CAA ATG TAC TG(配列番 号:12)	TGG CGT ATT CCC GTT CAA GT (配列番 号: 13)	ACT CTG CCC GAC GTG GTC TCC CA(配 列番号:14)
IL8Rb	CCT TGA GGC ACA GTG AAG ACA TC (配列番号:15)	CCT GTA GGA CAC CTC CAG AAG AG (配列番号:16)	TGG CCA CTC CAA TAA CAG CAG GTC ACA (配列番号:17)

10

20

【0101】

qRT-PCRデータ解析

生蛍光データをロシユライトサイクラー(商標)480からタブ区切りファイルとしてエクスポートした(前記ファイルは、サイクル数及びプレートの全てのウェルの2チャンネル蛍光データを含む)。データを色補正に適用したRプログラムを用いて処理し、1つの蛍光チャンネルから別のチャンネルへのブリードオーバーを修正した。続いて、5点ロジスティックモデルに適合させ、第二のデリバティブマキシマムを用いて C_p を推定した(Spiess, 2008)。

全てのサンプル及びコントロールをPCRプレートにデュプリケートで適用した。デュプリケートウェルの C_p 値を使用前に平均した。2つの C_p 値間の相違が3ユニットを超える場合、このサンプルを繰り返した。PCR全体に標準化を提供するために、 C_p 値を20ng/μLの参照RNA(プールした細胞株のRNAから誘導)に対する ΔC_p 値として表現した：

$$\Delta C_p = C_p(\text{サンプル}) - C_p(\text{参照RNA})$$

30

【0102】

統計解析

MDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5及びIL8RbのqRT-PCRの ΔC_p 値を用い、線形判別分析又はロジスティック回帰に基づいて、TCCを含まないサンプルからTCCを含むサンプルを分離する分類法を作製した(Venables、2002)。両事例で、遺伝子間の相互作用は分類法モデルで許容された。LDAの作製は、例えば以下の文献に記載された標準的な手順に従った：“Modern Applied Statistics with S, 4th edition”(W.N. Venables and B.D. Ripley (2002), Springer)。試験のデータセットは一切の完全なデータが除去され、続いて、R統計環境(R Development Core Team, 2009)及びパッケージMASS(Venables and Ripley, 2002)の機能“lda”を用いて線形判別が作製され、臨床試験データで試験された。

40

ロジスティック回帰分類法の作製は、LDAの作製と同様な態様で実施した。繰り返せば、試験データから不完全なデータが除去された。ロジスティック回帰分類法はRを用いて作成され、追加のパッケージは要求されなかった。ロジスティック回帰は、Dalgaard(2008)が記載したように実施された。分類法間の比較は、Rパッケージを用いROC曲線を用いて(ROCR、Sing et al., 2009)実施された。ROC曲線の信頼区間は、Macskassyらの方法(Macskassy, 2005)を用いて作成された。以下のアルゴリズムが作製された。

線形判別分類法

50

第一の分類法、線形判別（LDA-3と称される）は、遺伝子間の多要因交互作用を可能にする5つの遺伝子値（参照値を差し引くことによって参照値に対して標準化される）に基づく。この分類法は、“MASS”（Rバージョン2.9.1；MASSバージョン7.2-49）と称されるパッケージの‘lda()’機能を用いRで構築された。この分類法は以下の等式を用いて構築された：

```
lda3<-lda(TCC.YN~MDK*IGF*CDC*HOXA*IL8R, data=uRNA.Trial)
```

式中、lda3は作製されるモデルであり；TCC.YNは膀胱鏡によって決定される“尿中のTCCの存在”についての真の値（Yes又はNo）であり；MDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5及びIL8Rbは標準化された遺伝子のCp値であり；uRNA Trialは、5遺伝子の各々についてのCp値及び臨床試験から得られるTCC.YN（Yes又はNo）を含むデータファイルである。式中のアステリスク‘*’の使用は乗算を示す。分類法スコアの評価は、入力として5つの遺伝子値を含む新規なデータフレームを分類法lda3と同様に利用し、下記の分類法スコアを出力する：

```
スコア<-c(予測(lda3, new.data)$x)
```

式中、“スコア”はTCCの存在を予測するために当該分類法から用いられる出力であり；“lda3”は上記で作製された分類法であり、“new.data”は、分類法の作製で用いられた同じ名称で呼称される5遺伝子の測定値を含むデータファイルである。シンタックス‘\$x’及び‘c(...)’は、予測機能によって送信される大量の情報から特異的にスコアを抽出するために存在する。スコアカットオフを0.112以上に設定するときは、尿サンプルのTCCの存在について我々の特異性を85%に設定する。LDA-3のための係数は表6に示される：

【0 1 0 3】

表6

MDK.d.R100	5.333639e+00	
IGF.d.R100	3.905978e+00	
CDC.d.R100	6.877143e-01	
HOXA.d.R100	6.073742e+00	
IL8R.d.R100	-1.229466e+00	
MDK.d.R100:IGF.d.R100	-7.420480e-01	
MDK.d.R100:CDC.d.R100	-2.611158e-01	
IGF.d.R100:CDC.d.R100	-1.965410e-01	
MDK.d.R100:HOXA.d.R100	-8.491556e-01	30
IGF.d.R100:HOXA.d.R100	-4.037102e-01	
CDC.d.R100:HOXA.d.R100	-3.429627e-01	
MDK.d.R100:IL8R.d.R100	1.903118e-01	
IGF.d.R100:IL8R.d.R100	2.684005e-01	
CDC.d.R100:IL8R.d.R100	-1.229809e-01	
HOXA.d.R100:IL8R.d.R100	2.909062e-01	
MDK.d.R100:IGF.d.R100:CDC.d.R100	4.108895e-02	
MDK.d.R100:IGF.d.R100:HOXA.d.R100	7.664999e-02	
MDK.d.R100:CDC.d.R100:HOXA.d.R100	4.832034e-02	
IGF.d.R100:CDC.d.R100:HOXA.d.R100	2.116340e-02	40
MDK.d.R100:IGF.d.R100:IL8R.d.R100	-3.750854e-02	
MDK.d.R100:CDC.d.R100:IL8R.d.R100	1.664612e-02	
IGF.d.R100:CDC.d.R100:IL8R.d.R100	2.089442e-03	
MDK.d.R100:HOXA.d.R100:IL8R.d.R100	-1.539486e-02	
IGF.d.R100:HOXA.d.R100:IL8R.d.R100	-3.894153e-02	
CDC.d.R100:HOXA.d.R100:IL8R.d.R100	6.295032e-03	
MDK.d.R100:IGF.d.R100:CDC.d.R100:HOXA.d.R100	-4.359738e-03	
MDK.d.R100:IGF.d.R100:CDC.d.R100:IL8R.d.R100	-2.019317e-04	
MDK.d.R100:IGF.d.R100:HOXA.d.R100:IL8R.d.R100	3.746882e-03	
MDK.d.R100:CDC.d.R100:HOXA.d.R100:IL8R.d.R100	-2.902150e-03	50

IGF.d.R100: CDC.d.R100: HOXA.d.R100: IL8R.d.R100 4.799489e-04
 MDK.d.R100: IGF.d.R100: CDC.d.R100: HOXA.d.R100: IL8R.d.R100 7.512308e-05

【0104】

ロジスティック回帰分類法

ロジスティック回帰に基づく第二の分類法がLDA-3と同じ浄化データセットから誘導された。しかしながら、lda()機能を用いる代わりに、我々は、下記に示す、該パッケージの統計資料(Rの基本インストールに含まれる)に由来するglm()機能を用いた：

```
lrl <- glm(TCC.YN ~ CDC * IGF * HOXA * IL8R * MDK
```

式中、“lrl”は作製される分類法であり、他のパラメーターは線形判別に関して記載したとおりである。もう一度繰り返せば、完全な交互作用が“*”演算子を用いて示される。分類は、LDA-3のそれと非常に類似する態様で以下のように実施される：

```
スコア <- 予測(lrl, new.data, タイプ = ‘応答’)
```

式中、“スコア”は、上記のように、“new.data”における5遺伝子の測定に基づいて尿サンプルを分類するために用いられる値である。Lrlのためのカットオフは0.102に設定され、85%の特異性を達成し、カットオフ付近の値はTCC陽性とみなされる。当該分類法のための係数は以下のとおりである：

【0105】

```
-103.0818143 +
3.9043769 * CDC.d.R100 +
13.1120675 * IGF.d.R100 +
17.4771819 * HOXA.d.R100 +
-10.7711519 * IL8R.d.R100 +
21.1027595 * MDK.d.R100 +
-0.5938881 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 +
-1.0736184 * CDC.d.R100 * HOXA.d.R100 +
-1.3340189 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 +
0.3126461 * CDC.d.R100 * IL8R.d.R100 +
1.4597355 * IGF.d.R100 * IL8R.d.R100 +
1.8739459 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 +
-1.035054 * CDC.d.R100 * MDK.d.R100 +
-2.5885156 * IGF.d.R100 * MDK.d.R100 +
-2.7013483 * HOXA.d.R100 * MDK.d.R100 +
1.4546134 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.0767503 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 +
-0.0663361 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * IL8R.d.R100 +
-0.1015552 * CDC.d.R100 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 +
-0.2110656 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 +
0.1361215 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.1601118 * CDC.d.R100 * HOXA.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.259745 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 * MDK.d.R100 +
-0.0106468 * CDC.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
-0.1947899 * IGF.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
-0.185286 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.0136603 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 +
-0.0151368 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.0056651 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.0030538 * CDC.d.R100 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
0.0232556 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100 +
-0.000867 * CDC.d.R100 * IGF.d.R100 * HOXA.d.R100 * IL8R.d.R100 * MDK.d.R100
```

【0106】

結果

尿サンプルのqRT-PCR分析

TCC検出におけるIL8Rbの効果を概括するために、TCC (n=56) 又は非悪性症状の尿石症 (n=25)、尿路感染 (n=18) 若しくは膀胱炎 (n=18) を有する患者の尿から得られたqRT-PCRを用いて二次元散布図を構築した。この散布図は、4遺伝子シグナチャー (MDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5) の遺伝子ペアを用いて構築された。続いて各ペアの一方の遺伝子をIL8Rbで代用し、データを再プロットした。これらの図は図2a-fに示されている。MDKを含む図でIGFBP5及びHOXA13のIL8Rbによる代用は、TCCを有する患者のサンプルと非悪性症状を有する患者のサンプルとの間の分離の改善を示した。同じ傾向がCDC2を有する図で認められた (前記ではIGFBP5及びHOXA13がIL8Rbで代用された) (図2d-f)。

続いて、肉眼的血尿を提示する患者の正確なTCCの診断に対するIL8Rbの寄与をROC曲線分析によって定量した。シグナチャー (MDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5) 及びIL8Rbの各遺伝子についてのqRT-PCRデータを用いて、TCCを有する患者とTCCでない患者との間の区別を最大にする線形判別アルゴリズムを開発した。442サンプルの全コホートをを用いて以下の2つの線形判別アルゴリズムを開発した: LD1 (MDK、CDC2、HOXA13及びIGFBP5に由来するqRT-PCRデータを用いた) 及びLD2 (MDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5及びIL8Rbを用いた)。続いて、LD1及びLD2を用いてROC曲線を作製した。前記ROC曲線は、確定TCCを有する患者 (n=56) 又は非悪性症状を有する患者 (尿石症 (n=25)、尿路感染 (n=18) 又は膀胱炎 (n=18)) のグループでTCC検出の感度及び特異性を示す。図3aはLD1及びLD2のROC曲線を示す。LD1のためのROC曲線下面積は、LD2の84%に対して78%であった。

線形判別分析の代替として、ロジスティック回帰を独立した方法として用いて、TCCを有する患者と非悪性疾患を有する患者との間を区別するアルゴリズムを開発した。線形判別分析の場合のように、ロジスティック回帰アルゴリズムは、442サンプルの全コホートをを用いて開発された。ロジスティック回帰並びに上記に記載した56のTCC 及び61の非悪性サンプルを用いて得られたROC曲線は図3bに示されている。LR1 (MDK、CDC2、HOXA13及びIGFBP5に由来するqRT-PCRデータを用いて得られた) のROC曲線下面積は、LR2 (MDK、CDC2、HOXA13、IGFBP5及びIL8Rbに由来するqRT-PCRデータを用いて得られた) の86%に対して80%であった。このデータは、尿サンプルを用いてTCCを検出する方法でIL8Rbを加えることは、TCCを有する患者と非悪性疾患 (例えば膀胱炎、尿路感染及び尿石症) を有する患者との間の区別に改善をもたらすことができることを明瞭に示している。

【0107】

IL8Rbによって与えられた、TCC及び尿石症、尿路感染又は膀胱炎を有する患者 (彼らは多くのかつ多様な非悪性患者を含む未選別コホートに維持されている) を区別する精度の改善を確認するために、表1に記載の442サンプルの全コホートをを用いてROC曲線分析を繰り返した。この分析では、LD1及びLD2のための曲線下面積はそれぞれ86及び89%であった (図4a)。同様に、LR1のための曲線下面積は87%でLR2は91%であった (図4b)。この結果は、IL8Rbは尿サンプルを用いるTCCの検出で精度の改善をもたらすことを確認させる。

IL8Rbの付加による癌検出のこの改善は、LD1/LD2及びLR1/LR2を442人の患者コホートに適用し、続いてTCCのTa病期のみの検出感度を決定することによってさらに明示された。Ta期腫瘍は、より進んだ病期の腫瘍よりも典型的には検出が困難である、より小さくより分化した腫瘍である。LD1は、85%の特異性でTa腫瘍を18/31 (58%) で検出し、対してLD2は19/31 (61%) であった。LR1は21/31 (68%) で検出し、対してLR2は24/31 (77%) (85%の特異性) であった。このデータは、IL8RbのLD及びLRアルゴリズムへの付加は、Ta期腫瘍の検出感度を9%まで高めることを示している。これらのRNA検査と比較して、この試験の3つの他の膀胱癌検査はTa腫瘍の検出について以下のように極めて低い精度を示した: 尿細胞学検査 (感度39%、特異性94%)、NMP22 ELISA (感度35%、特異性88%)、及びNMP22 (BladderChek(商標)、マトリテック社 (Matritech, Inc., of Massachusetts, United States) の登録商標) (感度39%、特異性96%)。

【0108】

尿道の炎症の診断補助としてのIL8Rb

例えば膀胱炎又は尿路感染を引き起こしたことによる尿道の炎症を有する患者の診断で使用するIL8Rbの能力を決定するために、良性前立腺肥大、非特異的前立腺疾患、血管性前立腺、ワルファリン使用による二次性血尿、及び膀胱炎/尿路感染と診断された血尿患者でIL8Rb mRNAの尿中レベルをqRT-PCRによって決定した。これらの症状の各々について平均IL8Rb Δ Ctレベルは、それぞれ-3.12、-3.10、-2.84、-1.98及び-5.27であった。膀胱炎/尿路感染を有する患者及び他のひとまとめにした非悪性状態を有する患者の平均IL8Rbレベル間の相違は、ウィルコクソンの順位和検定を用いたとき有意であると決定された($p=0.001$)。このデータを示すボックスプロットは図5に示されている。このデータは、膀胱炎又は尿路感染と診断された患者の大半は、調べた他の非悪性症状と比較してIL8Rbレベルの上昇を示す。プロット間のオーバーラップはおそらく以下の3つの因子の組合せによって説明できる：(i)各症状を正確に診断する標準的臨床慣行が可能でないこと、(ii)共存症（例えば感染と良性前立腺肥大）、及び(iii)良性前立腺肥大、非特異的前立腺疾患、血管性前立腺又はワルファリン使用による二次性血尿を有する患者のサブセットにおける高い尿中好中球数は通常的に密接な関係にあること。それにもかかわらず、炎症と好中球数との間の厳密なつながりが提供されるならば、尿中のIL8Rbの定量は、尿道の炎症を検出する正確な方法を提供する。なぜならば、それは感染の結果として存在するか又は他の非悪性症状と密接な関係にあるからである。

【実施例2】

【0109】

方法

試験集団

以前にTCCの病歴をもたない一貫した一連の患者が、2008年4月28日から2009年8月11日の間に、ニュージーランドで9つ及びオーストラリアで2つの泌尿器診療所から前もって募集された。この患者のセットは実施例1で用いられた患者を含んでいたが、追加の46人の患者を含み、それら患者のデータは最初の分析のためには利用できなかった。更なる試験はまた得られた結果の更なる分析を含む。実施例1に記載したようにサンプルを収集し、RNAを収集して検査した。

RNA検査の開発

uRNA(商標)は4つのmRNAマーカーCDC2、HOXA13、MDK及びIGFBP5から成る。これらのマーカーは、血液及び炎症細胞でのそれらの低い発現及びTCCでの過剰発現に基づいて選択された²。このコホートの試験では、我々は前もって、4つのマーカーを単一スコアにまとめる線形判別アルゴリズム(uRNA-D)を指定した。以前のデータセットで開発されたuRNA-Dは別個のものであった。しかしながら、前記は、検査のために意図される標的集団を代表する厳密に特徴付けられた患者グループを用いて誘導されなかった。結果として、試験プロトコルはまた、募集された患者から得られたデータを用いて5つのマーカーCDC2、HOXA13、MDK、IGFBP5及びIL8Rbを使用する新規なアルゴリズム(分類法-D)の開発の範囲を従来のコホートの試験に限定した。

分類法-Dに加えて、第二のアルゴリズム(分類法-S)は、進行期(1期以上)或いは高等級(WHO/ISUP 1998 分類)のどちらかである腫瘍の同定を可能にするコホートの試験を用いて誘導された。アルゴリズム-Sは5つ全てのマーカーを含み、前記はTa期腫瘍と1期以上の病期の間で弁別的に発現されることが以前に示されたCDC2及びHOXA13を含む。

【0110】

分類法の開発

5つのマーカーCDC2、HOXA13、MDK、IGFBP5及びIL8Rbを使用する2つの分類法(分類法-D及び分類法-S)の開発は、本明細書に概略した方法にしたがいこの試験で得られたデータに基づく。略記すれば、ロジスティック回帰モデルは、統計的プログラミング環境Rを用いて作製された(R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>)。5つのマーカーの各々の ΔC_p 値及びそれらの2要因交互作用(例えばMDK x CDC2、MDK x IGFBP5など)を用いて作製さ

れたモデルをそれらの分類能力について評価し、最低のAIC値を有するものを、特異性を85%に設定したときのそれらの感度について1個抜き交差検証手順で評価した。いくつかのモデルが、分類法-D及び分類法-Sの各々について類似の性能を示し、もっとも少ないパラメーター数を有するモデルが選択された。

統計的方法

診断検査がプロトコルで指定されたとき、感度及び特異性について比率及び95%信頼区間を計算した。受診者操作特性（ROC）曲線をプロットし、スタータroctab及びroccompコマンド（Statacorp and Delong）を用いて比較した。分類法-Dについて信頼区間は適切ではないが、フィッシャーの正確検定又はカイ二乗検定（サンプルサイズが許容する場合）を用いて、TCC又は患者の特徴と真の陽性結果若しくは偽陽性結果の確率との間のつながりについて試験した。ロジスティック回帰モデルを用いて偽陽性及び偽陰性結果と密接に関係する因子を探索した。全ての分析をスタータバージョン11.2で実施した。

【0111】

結果

最初に合計517人の患者をこの試験で募集した。患者の4%は以下の理由で排除された：適格でないことが判明した（n=10）、膀胱鏡検査を受けてなかった（n=9）、TCCの状況が記述されてなかった（n=2）、又は許容できる尿サンプルが提供されなかった（n=2）（図8）。さらに10人の患者が、1つ以上の尿検査の結果をもたなかったので分析から除外された。残りの485人の患者の基準線の人口統計的及び臨床的特徴は図9に示される。

コホートのTCC有病率は13.6%であった。2人は精査期を逃し（両者とも地元の精査ではTaであった）、2人は精査等級を与えられなかった（1人は地元の病理検査技師によれば等級1であり、他は低い等級であった）。66腫瘍のうち55は表在性であり（Ta期、T1又はTis）、11は筋肉侵襲性（T2）であった。いずれの患者からも転移又は領域リンパ節の関与は検出できなかった。1973年の等級系を用いたとき、24人が等級3、38人が等級2、3人が等級1であり、1人は不明であった。WHO98系を用いたとき、29人が高等級と認定され、4人が混合型、32人が低等級、1人は不明であった。TCCに加えて、2人の患者が乳頭腫を有すると診断され、7人が他の新形成（そのうちの5人は泌尿器系新形成）を有すると診断された。

uRNA-D検査のカットオフはこの試験のコホートにより決定され、特異性は85%で設定された。このカットオフを用いて、uRNA-Dは66のTCC症例の41を検出し（感度62%）、それに対してNMP22TM ELISAは50%、Bladderchek(商標)は38%、細胞学検査は56%であった。このコホートデータにより開発されたRNA検査、分類法-Dは85%の特異性でTCC症例の54を検出し（82%）、90%の特異性で48を検出した（73%）。uRNA-D及びNMP22TM ELISAの値は、両検査はこの試験の前に完全に特徴付けられていたので直接比較することができる。図21はROC曲線を示し、曲線下面積（AUC）はそれぞれ0.81及び0.73である（p=0.03）。分類法-DのROC曲線は0.87であり（図21）、uRNA-Dに対して性能の改善は、臨床的に対応する特異性のほぼ範囲内にあるようである（80%を超える）。

【0112】

総合して、分類法-Dは高等級/等級3の腫瘍の97%を検出し、それに対してuRNA-Dは83%、細胞学検査は83%、NMP22 ELISAは69%、Bladderchek(商標)は38%であった。分類法-Dはまた低等級腫瘍の検出についてもより鋭敏であり（69%）、他の検査は28–41%の範囲であった（図12）。分類法-Dは1期以上のTCC症例の全てプラス両Tisについて陽性であったが、Ta期については、感度は68%であった（p=0.016、図12）。これは、他の検査よりもなお実質的に高く、次に高いuRNA-Dは41%であった。尿サンプルで明瞭な巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を有するTCC患者は、IL8Rbを加えることによって、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を示さない患者よりもそのTCCの検出を得る蓋然性は高いが（p<0.0005）、これは、少なくとも部分的には、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を有する患者で進んだ病期及び高い等級のTCCの割合がより高いということの結果らしい。このことを回帰分析でさらに探求するためには数が不十分であった。

分類法-Dが見逃した12症例の全てがTa期であり、1つを除いていずれも低い等級（WHO I

SUP 1998)であった。12のうちの2つのみ(両方ともに低等級、TCCのTa期)を別の検査に選択した(1つをNMP22TM ELISA及びBladderChek(商標)の両検査に、1つをu-RNAに)。分類法-Dが見逃した12症例の全てがTa期であり、1つを除いていずれも低い等級(WHO ISUP 1998)であった。12のうちの2つのみ(両方ともに低等級、TCCのTa期)を別の検査に選択した(1つをNMP22TM ELISA及びBladderChek(商標)の両検査に、1つをu-RNAに)。細胞学検査は分類法-Dが見逃したいずれのTCCも選択しなかった。

患者A: 高い等級の腎骨盤T2腫瘍、Tis同時発生無し、サイズは提示されず、

患者B: 高い等級の膀胱T3a、Tis同時発生無し、2 x 3cm

患者C: 広範囲の間質及び固有筋層の侵襲を伴う4.8 x 5.6cmの高等級腫瘍、血管周囲脂肪に及ぶが転移の証拠なし。

代替診断を受けた患者における尿検査の特異性及び尿サンプルによる特徴は図13に示されている。巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を有するコントロール患者は、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿のない患者より検査偽陽性を有する蓋然性が高く($p=0.002$)、結石を有する患者も同様の傾向があるが、ただし診断による特異性の相違は全体として有意ではなかった($p=0.12$)。他の泌尿器癌を有する5人の患者が存在し、これらの1人のみが分類法-D検査の陽性結果を提示した。適合ロジスティック回帰モデルの結果も同様であった。診断及び巨視的血尿又は顕微鏡的血尿によるロジスティック回帰モデルでは、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿状況とのつながりは依然として有意であり($p=0.006$)、診断がない場合と直接比較したとき、結石を有する患者は、2.7倍高い偽陽性結果の確率を示した(95%CI (1.1から6.4))。年齢は検査の特異性に影響しなかった。

尿サンプルで検出される巨視的血尿又は顕微鏡的血尿は検査の感度に明瞭につながる唯一の因子であった。このコホートの検査陽性の予測値は、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を有する患者について63%でそれらのない患者については24%であり、巨視的血尿又は顕微鏡的血尿を有する患者におけるTCCのはるかに高い有病率を強く反映している(39%対6%)。

分類法-D検査が陽性のTCCを有する54人の患者が存在した。これらの患者は、分類法-Sを用いて重篤TCCと準重篤(less severe) TCCに分類された。重篤TCCは1期以上又は任意の病期の等級3と定義された。90%の特異性では、分類法-Sは重篤なTCC症例の32/35(91%)を正確に分類した。

【実施例3】

【0113】

血尿Iを有する患者の遺伝子型表現型組合せ分析

この試験は、確定無症候性顕微鏡的血尿(AH)を提示する患者に焦点を当てる。前記患者は、ありうる尿路上皮癌(UC)の精査のために完全な臨床精密検査を受けつつある。約500人の患者がこの試験に参加するために登録されている。

本明細書に用いられるように、用語は追加される実施例において下記で定義される。

目的

目的は以下を決定することである：(1)完全な泌尿器の臨床精密検査を予定されている顕微鏡的血尿を提示する患者における遺伝子型及び表現型アルゴリズムの有効性、(2)確定顕微鏡的血尿を提示する患者の一次UC検出について、遺伝子型及び表現型アルゴリズムG+Pインデックスの性能特性(感度、特異性、ROC曲線下の面積、陽性及び陰性予測値)、及び(3)遺伝子型及び表現型ツール、G+PインデックスによってUC陰性と正確に診断され、したがって精査的膀胱鏡検査を必要としない患者の数。

試験集団

試験集団は、試験要件を満たす、確定顕微鏡的血尿を提示する患者から成る。患者は、泌尿器診療所へ患者を照会する一般診療から募集された。

インフォームドコンセント

精査的膀胱鏡検査を予定された患者と参加の可能性を話し合うために接触する。患者に試験の性質の情報を提供して同意を得る。患者は、人口統計、職業及び喫煙歴に関する情報を提供し、その尿サンプルの提供に先立って、情報と同意の様式を彼らが完全に理解していることを担保する。試験の調整者は、遺伝子型及び表現型インデックスへの対応する

10

20

30

40

50

入力を詳述するCRFページを完結し、分析のためにデータを転送する。

組み入れ基準

顕微鏡的血尿の確定臨床所見（2つ又は3つの適切に収集した尿標本で高倍率一視野（HPF）当たり最低3個の赤血球の存在⁽³⁾）に続いて、尿路上皮癌のための精査的膀胱鏡検査を受ける患者。

患者は試験の要求にしたがう意思がある。

患者は18歳を超えている。

除外規準

尿路上皮癌（UC）の前歴。

これまでに巨視的血尿を提示。

10

確定診断（悪性であれ悪性でないものであれ）に付随する巨視的血尿のエピソードの前歴（過去12カ月の間）。

G+Pインデックス

我々は新規なインデックス（G+Pインデックス）を開発した（前記は遺伝型データ及び表現型データの両方の組合せを含む）。遺伝型（“G”）成分は、同時期のウィンドウ（表現型データ“P”）の患者から収集された5つの臨床因子と一緒にしたRNAバイオマーカー発現情報を利用して、AH患者のUCリスクを決定する。

真の臨床結果を決定するために、全患者が標準的な臨床精密検査を受け、この試験による産出結果は、収集された臨床データ及び患者の尿サンプルから収集された遺伝子型データに基づく成果の模倣である。したがって、患者の看護はこの試験の成果の結果にしたがって変更されることはない。患者は尿サンプルを提供し、前記尿サンプルは遺伝子解析のために送られる。

20

患者のトライージ

この試験に参加する患者に対する総合的看護標準に変更は加えられない。完全な泌尿器学精密検査が予定されている患者はいずれも、従来の介護標準にしたがって適切な精査を受ける。

試験データ

人口統計的情報及びリスク因子情報は、遺伝子型及び表現型インデックスへの入力である。最終的な疾患の状態（可撓性膀胱鏡検査及び経過観察によって決定される）は、（Φ）結果及び人口統計的情報と照合され、統計解析に付される。

30

G+Pインデックスの決定

ニュージーランド及びオーストラリアの多数の現場から収集されたサンプルから得られた約500人の患者のデータセットを用いて、TCC=Yesの確率を予測する訓練モデルが開発された。

訓練及び検証集団で使用される変数のために収集されるデータ

表現型変数

臨床所見は以下のとおりである：性別、年齢、喫煙歴、及びHFREQNEW（1以下は低を示し、1より大は高を示す）。

遺伝子型変数

遺伝子型変数はRNAマーカーの発現を含む：M1（=MDK+CDC+IGBP5+HOXA13）及びIL8Rb。下記の表7はG+Pインデックス検証における各因子の係数の推定を示す。

40

【0 1 1 4】

表7

最尤推定の分析							
パラメータ		DE	推定	標準誤差	Wald カイ二乗	Pr> カイ二乗	Exp(Est)
切片		1	-4.8445	0.6532	55.0092	<.0001	0.008
性別	2	1	-1.8544	0.6750	7.5484	0.0060	0.157
喫煙	2	1	-0.9049	0.4537	3.9775	0.0461	0.405
喫煙	3	1	-1.3407	0.4936	7.3756	0.0066	0.262
HFREQNEW	低	1	-0.7015	0.3478	4.0681	0.0437	0.496
M1		1	1.2221	0.1553	61.9328	<.0001	3.394
IL8Rb		1	-0.2408	0.1789	1.8112	0.1784	0.786

10

【0115】

図18はG+PインデックスのROC曲線を示す。図18は、本発明の実施態様の結果についての感度（縦軸）対1－特異性（横軸）のグラフである。比較のために、対角線はモデルを示す。表現型情報のみによる成果は一点短鎖線として示され、遺伝子型情報のみによる成果は短鎖線として示され、さらにG+Pインデックスによる成果は実線として示される。これらの結果は、遺伝子型及び表現型情報の組合せは、予想に反して成果の予測に実質的な改善を提供することを示している。

探査モデルは7つの表現型変数を考慮したが、年齢GT50は有意でない効果を示し、一方、RBCについて不十分なデータが存在した。そこでこれら変数の両方を最終モデルから落とした。残りの5つの表現型変数及び2つのRNAマーカーの有意なレベルに基づいて、インデックスを構築した。訓練データセットのM1、IL8Rb及びTCC(=yes)における関係を用いて、4.5及び2.5の閾値をM1及びIL8Rbのためにそれぞれ用いた。5、4、3、2及び1のスコアをM1、喫煙、男性、IL8Rb、及びHFREQ-に割り当てた（前記は0から15の範囲のインデックススコアをもたらす）。係数に基づく組み込みアルゴリズムは、G+Pインデックスとして以下のように与えられる：

$$\text{G+Pインデックス} = (1 * \text{HFREQ} + 3 * \text{性別} + 4 * \text{SMK}) + (5 * \text{M1} + 2 * \text{IL-8})$$

最終モデルで維持された種々の臨床因子のオッズ比は図19に示される。オッズ比は、それが1（すなわち作用無し）からどれくらい外れているかに応じて当該対象動物に有害作用又は防御作用を有すると解釈することができる。その信頼限界が1を除外するオッズ比は統計的に有意である。一般的には、より大きなオッズ比を有する因子（例えばSMK、性別）は、小さなオッズ比を有する因子（例えばHFREQ）と比較してより大きな重みを割り当てられる。

完全なモデルのために分類表は下記の表8に提供される。

【0116】

表8：

20

30

分類表									
確率 レベル	正確		不正確		パーセンテージ				
	事象	無事象	事象	無事象	正確	感度	特異性	偽陽性	偽陰性
0.000	66	0	415	0	13.7	100.0	0.0	86.3	.
0.050	61	245	170	5	63.6	92.4	59.0	73.6	2.0
0.100	54	319	96	12	77.5	81.8	76.9	64.0	3.6
0.150	47	358	57	19	84.2	71.2	86.3	54.8	5.0
0.200	45	376	39	21	87.5	68.2	90.6	46.4	5.3
0.250	40	381	34	26	87.5	60.6	91.8	45.9	6.4
0.300	37	391	24	29	89.0	56.1	94.2	39.3	6.9
0.350	36	398	17	30	90.2	54.5	95.9	32.1	7.0
0.400	35	402	13	31	90.9	53.0	96.9	27.1	7.2
0.450	35	403	12	31	91.1	53.0	97.1	25.5	7.1
0.500	31	407	8	35	91.1	47.0	98.1	20.5	7.9
0.550	29	408	7	37	90.9	43.9	98.3	19.4	8.3
0.600	29	408	7	37	90.9	43.9	98.3	19.4	8.3
0.650	28	409	6	38	90.9	42.4	98.6	17.6	8.5
0.700	24	409	6	42	90.0	36.4	98.6	20.0	9.3
0.750	20	409	6	46	89.2	30.3	98.6	23.1	10.1
0.800	12	410	5	54	87.7	18.2	98.8	29.4	11.6
0.850	11	411	4	55	87.7	16.7	99.0	26.7	11.8
0.900	6	412	3	60	86.9	9.1	99.3	33.3	12.7
0.950	1	413	2	65	86.1	1.5	99.5	66.7	13.6
1.000	0	415	0	66	86.3	0.0	100.0	.	13.7

【0 1 1 7】

G+Pインデックスの予備的検証試験

G+Pインデックスの使用をさらに試験するために、我々は別の試験を実施した。多様な臨床マーカー及びRNAマーカーの統計的有意さに基づいて、インデックスを構築した。そのTCC状況（yes又はno）がG+Pインデックス変数と同様に利用可能な対象者が98人存在した。

5、4、3、2及び1のスコアをM1（遺伝子検査）、喫煙者、男性、IL8Rb、及びHFREQ-に割り当てた（前記は0から15の範囲のインデックススコアをもたらす）。真の陽性及び真の陰性の数はそれぞれ6と84であった。同様に、偽陽性及び偽陰性の数はそれぞれ5と3であった。したがって、提唱インデックスの総合的精度は0.92であった。

G+Pインデックスに基づく示唆及び経過観察

G+Pインデックスの結果が、UCの“高リスク”（11－15又はそれより上のスコアと定義される）を示す場合、患者は、臨床指標にしたがって可撓性膀胱鏡検査及び腹腔超音波について優先される。

G+Pインデックスの結果が、UCの“中等度リスク”（6－10のスコアと定義される）を示す場合、患者は、臨床慣行にしたがって再吟味され経過観察される。細胞学検査、尿道鏡検査（uretoscopy）及び/又はCTスキャンの使用を考慮できる。

G+Pインデックスの結果がUCの“低リスク”（0－5のスコアと定義される）を示す場合、患者は通常的な標準看護を受け、適切な待機リストに入るであろう。

【0 1 1 8】

参照文献

Agresti, A. and Coull, B. A. (1998) Approximate is better than "ex-act" for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, 52, 119-126.

Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http:// seer.cancer.gov/csr/1975_2007/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/), based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.

Brown, L. D. Cai, T. T. and DasGupta, A. (2001) Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 16, 101-133.

Buckhaults et al., (Cancer Research 61:6996-7001 (2002) describes certain secreted and cell surface genes expressed in colorectal tumours.

Byrd, R. H., Lu, P., Nocedal, J. and Zhu, C. (1995) A limited memory algorithm for bound constrained optimization. *SIAM J. Scientific Computing*, 16, 1190-1208.

Dalgaard (2008). "Introductory Statistics with R, 2nd edition" ; Peter Dalgaard, Chapter 13 (2008), Springer, ISBN 978-0-387-79053-4.

DeLong, E. R., D. M. DeLong, and D. L. Clarke-Pearson. 1988. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: A nonparametric approach. *Biometrics* 44: 837-845.

Gottschalk, P.G. and Dunn, J.R. (2005) The five-parameter logistic: A characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Analytic Biochemistry*, 343, 54-65. Doi:10.1016/j.ab.2005.04.035

Grossfield G, Wolf J, Litwan M, Hricak H, Shuler C, Agerter D, et al. Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of AUA best practice policy recommendations. *AFP* 2001;63:1145-54.

Hall et al (*Laryngoscope* 113(1):77-81 (2003) (PMID: 12679418) (Abstract) described predictive value of serum thyroglobulin in thyroid cancer.

Hoerl, A.E. (1962) Application of ridge analysis to regression problems. *Chemical Engineering Progress*, 58, 54-59.

Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R, Best T, Watanabe J, Kajita Y, et al. Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):742-9.

Hotte et al., (*AJ. American Cancer Society* 95(3):507-512 (2002) describes plasma osteopontin as a protein detectable in human body fluids and is associated with certain malignancies.

Kim et al., (*JAMA* 287(13):1671-1679 (2002) describes osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer.

Koopman et al., (*Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 13(3):487-491 (2004) (Abstract) describes osteopontin as a biomarker for pancreatic adenocarcinoma.

Kuo et al (*Clin. Chim. Acta*. 294(1-2):157-168 (2000) (Abstract) describes serum matrix metalloproteinase-2 and -9 in HCV- and HBV-infected patients.

10

20

30

40

50

Leman et al., (Urology, 69(4) 714-20 (2007) (Abstract) describes EPCA-2 as a serum marker for prostate cancer.

Loo R, Lieberman S, Slezak J, Landa H, Mariani A, Nicolaisen G, Aspera A and Jaconsen S: Stratifying risk of urinary tract malignant tumors in patients with asymptomatic microscopic hematuria. Mayo Clin Proc. 2013, 88(2); 129-138.

Lunn, D., Spiegelhalter, D., Thomas, A. and Best, N. (2009) The BUGS project: Evolution, critique and future directions (with discussion), *Statistics in Medicine* 28: 3049--3082.

10

Marchi et al., (Cancer 112, 1313-1324 (2008) (Abstract) describes ProApolipoprotein AI as a serum marker of brain metastases in lung cancer patients.

Martin et al., (Prostate Cancer Prostatic Dis. March 9, 2004 (PMID: 15007379) (Abstract) described use of human kallikrein 2, prostate-specific antigen (PSA) and free PSA as markers for detection of prostate cancer.

Mazzaferri et al., (J. Clin. Endocrinol. Metab. 88(4):1433-1441 (2003) (Abstract) describes thyroglobulin as a potential monitoring method for patients with thyroid carcinoma.

20

McDonald M, Swagerty D, Wetzel L: Assessment of Microscopic hematuria in adults. AFP 2006 73:10.

Melle et al., (Clin. Chem. 53(4), 629-635 (2007) (Abstract) describes HSP27 as a serum marker for pancreatic adenocarcinoma.

More, J.J. (1978) The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory, in *Lecture Notes in Mathematics* 630: Numerical Analysis, G.A. Watson (Ed.), Springer-Verlag: Berlin, pp. 105-116.

Nelder, J. A. and Mead, R. (1965) A simplex algorithm for function minimization. *Computer Journal* 7, 308-31.

30

O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M et al: A Multigene Urine Test for the Detection and Stratification of Bladder Cancer in Patients Presenting with Hematuria. J Urol 2012, Vol 188 No 3; 746

Pellegrini et al., (Cancer Immunol. Immunother. 49(7):388-394 (2000) (Abstract) describes measurement of soluble carcinoembryonic antigen and TIMP 1 as markers for pre-invasive colorectal cancer.

(R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,

40

URL <http://www.R-project.org/>)

Richards, F.J. (1959) A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*. 10, 290-300.

Rudland et al., (Cancer Res arch 62: 3417-3427 (2002) describes osteopontin as a metastasis associated protein in human breast cancer.

Sing et al (2009). (Tobias Sing, Oliver Sander, Niko Beerenwinkel and Thomas Lengauer (2009). ROCR: Visualizing the performance of scoring classifiers.. R package version 1.0-4. <http://CRAN.R-project.org/package=ROCR>).

10

Speiss, A.-N., Feig, C. and Ritz, C. (2008) Highly accurate sigmoidal fitting of real-time RCR data by introducing a parameter for asymmetry. *BMC Bioinformatics*, 9, 221. Doi:10.1186/1471-2105-9-211.

Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI, Kelvin DJ. Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem*. 1994 Apr 15;269(15):11065-72.

StataCorp. 2009. *Stata Statistical Software: Release 11*. College Station, TX: StataCorp LP.

20

Schwartz G: Proper evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in the era of evidence-based medicine-progress is being made. *Mayo Clin Proc*. 2013, 88(2); 123-125.

Trivedi C and Messing EM: Commentary: the role of cytologic analysis of voided urine in the work-up of asymptomatic microhematuria. *BMC Urology* 2009, 9:13

Tsigkou et al., (I Clin Endocrinol Metab, 92(7) 2526-31 (2007) (Abstract) describes total inhibin as a potential serum marker for ovarian cancer.

Tsigkou et al., (I Clin Endocrinol Metab, 92(7) 2526-31 (2007) (Abstract) describes total inhibin as a potential serum marker for ovarian cancer.

30

Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0).

Whitley et al, (Dim Lab. Med. 24(1):29-47 (2004) (Abstract) describes thyroglobulin as a serum marker for thyroid carcinoma.

Yoshikawa et al., (Cancer Letters, 151: 81-86 (2000) describes tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer.

40

【実施例 4】

【0119】

G+PインデックスIIを用いる血尿を提示する患者のトリアージ

(G+Pインデックスは11から15の範囲の値を有するとき陽性を示す)

定義

本明細書で用いられるように、本実施例及び下記実施例では以下の定義が用いられる。

“AMH”は無症候性顕微鏡的血尿を意味する。

“AUA”はアメリカ泌尿器学会を意味する。

“AUC”は曲線下面積を意味する。

“CI”は信頼区間を意味する。

50

“CT”はコンピュータ断層撮影を意味する。

“ELISA”は酵素連結免疫吸着アッセイを意味する。

“FISH”は蛍光in situハイブリダイゼーションを意味する。

“HPF”は高倍率野を意味する。

“logOR”はlogオッズ比を意味する。

“Hfreq”は直近の血尿エピソードの間の1日平均血尿頻度を意味する。

“ISUP”は国際泌尿器病理学会を意味する。

“MRI”は磁気共鳴画像法を意味する。

“NPV”は陰性予測値を意味する。

“OR”はオッズ比を意味する。

“QC”は品質コントロールを意味する。

“QoL”は生活の質を意味する。

“表現型 (phenotypic)”は、臨床的予後判定の特徴を定義し、それら特徴を遺伝子発現系バイオマーカー（これまで‘遺伝子型’変数と広く定義されている）から弁別するために用いられる。

“RBC”は赤血球を意味する。

“ROC”は受診者操作曲線を意味する。

“RT-qPCR”は定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を意味する。

“STARD”は診断精度報告標準物を意味する。

“UC”は尿路上皮癌を意味する。

“WHO”は世界保健機関を意味する。

【0120】

序

血尿（例えば良性前立腺拡張、感染又は尿結石のような原因にもっとも頻繁に随伴するが、尿路上皮癌（UC）の前兆でもある）は、一般集団の患者の1から22%に発生すると概算される[1,2]。巨視的血尿は患者の尿の可視的な色の変化を特徴とするが、顕微鏡的血尿は、より厳密に、同時に収集された尿サンプルで高倍率一視野につき3つ以上の赤血球（RBC/HPF）の存在と定義される[2]。顕微鏡的血尿を有する患者でUCの全存在率は約4%であると報告されているが、一方、いくつかの研究は、UCの存在率は巨視的血尿を有する患者ではるかに高いと示し続け、その範囲は12–23%であり[2-6]、しかも巨視的血尿に対して4倍の顕微鏡的血尿患者が泌尿器学的査定を受ける[7]。注目すべきことに、アメリカ泌尿器学会（AUA）ガイドライン[2]の最近の変更が、無症候性顕微鏡的血尿（AMH）の閾値の緩和（単一サンプルで3以上のRBC/HPF）に見られ、さらに低い閾値（RBC/HPFは1以上）すら提唱[8]されていることを見れば、血尿があり潜在的UCを精査するために泌尿器学精密検査を受ける患者の数の必然的増加、及び健康保険システムにおけるこれらの患者に関する総合的な臨床及び財政負担の対応する増加が予想される。

そのような血尿関連照会は泌尿器科医師に大きな臨床的負担を課す。なぜならば、しばしば確定的でない診断を提供するために全ての患者が完全な精密検査を受けねばならないからである。さらにまた、既存の診断検査（その多くが侵襲性であるか、又は高い放射能を課す）は、（特に患者が従来のガイドラインで義務付けられた反復膀胱鏡検査を受ける場合[2]）患者の生活の質（QoL）に有害な作用をもつ。予防的に抗生物質を使用しないで実施された膀胱鏡検査について、患者の22%が無症候性細菌尿を有し、患者の1.9%が30日以内に有熱性尿道感染（UTI）を発症することが報告された[9]。他の研究もまた、高率の巨視的血尿、排尿痛及び膀胱鏡検査後の男性の一過性勃起不全を報告した[10,11]。

健康保険システムもまた、血尿患者が完全な精密検査を受ける結果、大きな財政負担を被り[2,3]、さらに、尿細胞診は何ら目覚ましい診断利益を提供することなくコストを増大させると結論されている[14-16]。結果として、正確で非侵襲的な検査を血尿提示患者の一次臨床精密検査に組み入れることは、医師が、血尿患者を効果的にトリアージして、それによってUCのための完全な泌尿器学精密検査及び精査的膀胱鏡検査を受ける患者の数を削減し、患者及び保険システムの双方に顕著な利益を提供することを可能にする[15-19]

10

20

30

40

50

]

【0121】

いくつかの臨床予後判定の特徴（年齢、性別、喫煙歴及び血尿の程度を含む）は、血尿を有する患者のリスク因子として明瞭に確立されている[3,20-22]。最近、いくつかのグループが、臨床予後判定の特徴を基準にして血尿患者でUCリスクを予測するモデルを開発したが[20-22]、重大なことに、これらのモデルは限定的精度しか提供せず、UCでない患者を除外するのではなくUCの患者を検出することに主に焦点を当てていた。検出に焦点を当てるこれらのモデルは、したがって、たとえ尿細胞診を組み合わせ用いても一次査定時に有病患者を確実に認定するためには不十分であった[20-22]。

巨視的血尿を提示する患者のUC発生率が高いにもかかわらず、多数の試験が、巨視的血尿提示患者と比較して、顕微鏡的血尿提示患者で等級及び病期によるUCの分布に有意な相違が存在しないことを示している[5,23-25]。したがって、AUAは、血尿の重篤度がUCの存在のために十分には予測的でない巨視的血尿又はAMHの全ての患者が、完全な泌尿器学精密検査のために泌尿器科医に照会されることを推奨する[2]。しかしながら、血尿を有する患者は一時査定では限定的な尿分析（細胞診及びいくつかの事例では画像化試験（例えば超音波）から成る）を受けることができるだけであるので、完全な泌尿器学精密検査が確定的なUCの検出又は除外にしばしば必要である。尿細胞診は従来のガイドラインで指定され、UCが疑われる患者で日常的に用いられているが、細胞診の結果は非定型所見又は疑わしい所見に関してはしばしば確定的ではなく、さらにUC関連血尿を有する患者について偽陰性結果のリスクが比較的高いことによってもたらされる診断成果の低さもまた問題である[2,26,27]。結果として、巨視的血尿であれAMHであれ、一時査定時に血尿の良性原因を除外することは困難でありうる。特にUC関連血尿が間歇的で、良性原因のための治療後に緩解したように見える場合は特に困難である[12]。

【0122】

UCを有する患者の尿バイオマーカーのプロファイリングのために多数の遺伝子系試験が設定されてきた。これらのバイオマーカーは疾患の検出のためにそれら自身の正確さで有用でありうる[28,29]。それらの臨床的特徴及び遺伝子発現プロファイルを基準にして、患者をトリージングする好機もまた存在する。NMP22酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）検査又は遺伝子マーカーパネルと臨床的特徴との組合せは、臨床的特徴のみと比較して診断精度を改善することが示されたが、これらの組合せモデルは、特に低リスク患者を認定しようとするときには、顕著な進歩を総合的な診断精度に行き渡らせていない[30,31]。それにもかかわらず、臨床因子及び特定の遺伝子発現を組み合わせアルゴリズムに取り入れることは、血尿又はUCを有する患者の診断及び管理のために最良のガイダンスを提供しそうである[32]。

CxbladderTMディテクト（Pacific Edge Ltd., Dunedin, New Zealand）、未分画尿で実施されるマルチ遺伝子検査は、尿細胞診及び巨視的血尿患者でUCを検出するNMP22よりも感度が高く[33]、さらに尿細胞診、NMP22及び比較分析の蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）よりも精度が高いことが以前に示された（Kasabov, Darling, Breen, et al.（未刊行観察））。Cxbladderディテクトは、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）技術を用いて5つのmRNAマーカー（非悪性炎症症状で上昇する5番目のマーカーと並んでUCで過剰発現される4つのマーカー）を検出し、血尿を提示する患者でUC検出に用いるときに高レベルの特異性及び感度を提供する[33]。高性能の遺伝子バイオマーカーを同じ患者から収集した表現型変数と組み合わせる統合モデルは、高い感度（すなわち偽陰性結果を与えられるUC患者の確率が低い）、高い陰性予測値（すなわち全ての陰性結果が真実である割合が大きい）、及び高い検査陰性率を利用する優れた臨床解析を提供し、UCの確率が低い患者の正確なトリージングを可能にすると想定された。これらの遺伝子型変数及び表現型変数は、新規な分離モデルに一体化されるとき、UCの確率が低い血尿患者を認定し、完全な泌尿器学精密検査の実施に反するものとしてトリージングすることを可能にする。

【0123】

方法患者の選別

695人の患者の予測しようとするサンプルを分析した。ここで、真の臨床結果は通常的な臨床評価を用いて決定された。試験サンプルは、血尿を有する患者の最初のコホートから成り、患者は以前に記載したように試験に同意してサンプル採取された[33]。ここでは最近の巨視的血尿歴を有する45歳以上でUCの先行歴がない一貫した一連の517人の患者が、オーストラリア及びニュージーランドの9つの泌尿器診療所から将来を見越して募集された。これらの患者は、尿サンプルのマルチ遺伝子分析に続いてUC状況の決定或いはまた別の診断のために3カ月間経過観察され、陽性UC診断は、膀胱鏡による外観及び組織病理学的試験を基準にした。疾患の病期は、病理学及び画像診断精査によって決定されるTNM病期基準にしたがい分類され、腫瘍の等級は、1998年の世界保健機関(WHO)/国際泌尿器病理学会のコンセンサス分類[34]を用いて地元の病理学慣行にしたがって分類された。

10

巨視的血尿事象に続いて泌尿器精査を受けた、94及び84人の患者の追加のコホートを、2012年3月から2013年4月の間にニュージーランドの2つのセンターから募集してモデルの開発に含めた。センターの参加は、最初の試験での彼らの参加経験及び個々の臨床背景でCxbladderディテクト製品を評価したいという彼らの意思に基づいて選択された。

顕微鏡的血尿を提示する45人の患者の追加される代表的検査セットは、将来を見越して集められ、下記に示すようにG+Pインデックスの更なる検証のために用いられた。

資格基準は[33]の基準と同様であったが、ただし患者は18歳以上で、以前にUC精査のために膀胱鏡検査を受けたが陰性であることが証明されたものが登録の資格を有する点を除く。さらにまた、[33]の場合のように、UTI又は膀胱若しくは腎の結石症を示す症状を有する患者は除外された。

20

この試験に対する倫理的承認は全ての参加センターから与えられ、インフォームド Consentはサンプルを提供する全ての患者から得られた。

【0124】尿サンプルの収集と評価

遺伝子発現データを提供するために、単一尿の中間サンプルを参加者からパシフィックエッジ (Pacific Edge) の尿サンプリング系を用いて収集した。全試験のサンプルのマルチ遺伝子分析を、市販のCxbladderディテクトマルチ遺伝子検査で用いられているように標準操作手順に従って実施した。膀胱鏡検査の前に、診療所で最初のコホートの全尿サンプル (4.5mL) を収集し、真空駆動吸引により安定化液に移し、48時間以内にパシフィックエッジに送った。続いて、バッチ分析に要求されるまでサンプルを-80℃に保存した。その後のコホートのサンプルは、同じ態様で収集したが、ただし周囲温度でパシフィックエッジに輸送し、サンプル収集から7日以内に改正品質管理 (QC) 制限にしたがって処理し、耐性検査はパシフィックエッジ診断実験室で実施した。

30

統計解析

一変量ロジスティック回帰を用いて未調整 (生) のlogオッズ比 (logOR) 係数を、UCに関連する以下の4つの二進法表現型変数のために概算した：年齢、性別、喫煙歴、及び患者の直近の血尿エピソード時の1日の平均血尿頻度 (Hfreq；表9参照)。

【0125】

40

表9：UC関連二進法表現型変数の定義とそれらの対応するスコア

表現型 パラメーター	スコア	
	0	1
性別	女性	男性
年齢	60歳未満	60歳以上
喫煙歴	全く喫煙無し	現在又は過去に喫煙歴
Hfreq	1回以下のエピソード/日	1回を超えるエピソード/日

【0126】

50

4つ全ての表現型変数における多変量ロジスティック回帰を用いて、表現型モデル（Pインデックス）で調整logOR係数を作成した。

Gインデックスはロジスティック回帰を用いて開発し、UCと尿サンプル中の5つのCxbladder(商標)ディテクト遺伝子（IGFBP5、HOXA13、MDK、CDK1及びCXCR2）のmRNA濃度との間のつながりを決定した。Gインデックス及びPインデックスの9つ全ての変数の組合せを用いて、多変量遺伝子型-表現型モデル（G+Pインデックス）を作製した。これらの線形モデルはlogORを決定し、前記からUCを有する患者の確率が誘導された。

モデルの各々の相対的性能は、各モデルによって決定されたように、UCについて試験したとき偽陽性率対真の陽性率をプロットした受診者操作曲線（ROC）で示された。曲線下面積（AUC）を用いて各モデルの相対の有効性を比較し、1に近いAUCが最適と考えられた。

10

モデルの推定と予測が同じデータセットで実施されるときに潜在的偏向を軽減するために、偏向修正AUCを3つのロジスティック回帰モデルの各々についてブートストラップ再サンプリングを用いて計算した[35]。元のサンプルの名目AUCとブートストラップサンプルの平均AUCとの間の相違はサンプル偏向の推定量であり、したがって名目AUCを調整した。偏向修正信頼区間のブートストラップ推定量もまた得られた[36]。

さらにまた、各モデルの性能特性が、可能な限り高い感度をもちつつ高い検査陰性率を有することを更に注意しながら、NPV 0.97の閾値を超えなければならないことがこの臨床検査の設計基準であった。この検査陰性率は、UCを有する確率が低い血尿患者をトリアージ除外するときに高度な臨床決定を提供するために選択される。Gインデックス、Pインデックス及びG+Pインデックス間で比較を実施し、感度及び十分に高い検査陰性率を有するNPVに関して各モデルの性能を決定して、UCの確率が低い血尿を有する患者をトリアージ除外する有効なツールを提供する。

20

結果

サンプルの人工統計

3コホートを通して登録された巨視的血尿を有する695人の患者のうち、23人は不適格と思われ、さらに別の85人の患者のサンプルは、十分なデータがないこと又はサンプルファイリングがQC標準に適合しないために登録から除外された（図20A参照）。合計して、587人の患者のサンプルが72人のUC陽性及び515人のUC陰性サンプルを含むモデル作成に利用できた。

30

提供された顕微鏡的血尿を有する患者の45のサンプルのうち、40が分析に適切であり、5人の患者は不適格と思われて分析から除外された（図20B参照）。45人の患者は全て完全な泌尿器学評価を受け、臨床実態はUC陰性と確定された。両方のサンプル集団の完全な人工統計学的データは表10に提示される。

【0127】

表10：完全なデータを有する顕微鏡的血尿及び巨視的血尿を有する患者のサンプル集団の人工統計

パラメーター		巨視的血尿患者 (N=587)、n (%)	顕微鏡的血尿患者 (N=40)、n (%)
年齢	0-49	65 (11.1)	21 (52.5)
	50-59	111 (18.9)	
	60-69	145 (24.7)	19 (47.5)
	70-79	175 (29.8)	
	80-100	91 (15.5)	
性別	女性	113 (19.3)	25 (62.5)
	男性	474 (80.7)	15 (37.5)
喫煙歴	完全な非喫煙	246 (41.9)	25 (62.5)
	現在又は過去の喫煙者	341 (58.1)	15 (37.5)
Hfreq (エピソード/日)	1回以下	332 (56.6)	40 (100)
	1回を超える	255 (43.4)	-
腫瘍の病期	正常	515 (87.7)	40 (100)
	T1	16 (2.7)	-
	T2	11 (1.9)	-
	T3	2 (0.3)	-
	Ta	40 (6.8)	-
	Tis	3 (0.5)	-

10

20

【0128】

表現型変数と巨視的血尿を有する患者のUCリスクとの間の関係

4つの二進法表現型変数の各々の未調整一変量ロジスティック回帰分析は、60歳以上、男性、喫煙歴及び高頻度の巨視的血尿はいずれもUCリスクの増加と密接に関係することを示した（表11）。

【0129】

表11：血尿を有する患者の表現型因子及び遺伝子型因子によるUCのための未調整及び調整OR

30

				未調整OR (95% CI)	調整P変数OR (95% CI)	調整G+P変数 OR (95% CI)
表現型変数		コント ロール	UC			
年齢	<60	151	11	2.30 (1.22-4.73)	2.24 (1.18-4.65)	1.89 (0.85-4.64)
	≥60	364	61			
性別	女性	105	8	2.05 (1.01-4.75)	1.58 (0.76-3.72)	3.03 (1.12-9.36)
	男性	410	64			
喫煙歴	完全非 喫煙	227	19	2.20 (1.29-3.91)	2.19 (1.27-3.92)	2.67 (1.34-5.64)
	現在又 は過去 の喫煙	288	53			
Hfreq (平均エビ ソード/日)	1回以下	300	32	1.74 (1.06-2.88)	1.80 (1.08-3.00)	1.76 (0.93-3.35)
	1回を超 える	215	40			
遺伝子型変数				未調整OR (95% CI)	調整G変数 OR (95% CI)	調整G+P変数 OR (95% CI)
<u>IGFBP5</u>				7.34 (4.59-12.33)	2.15 (1.03-4.58)	2.21 (1.03-4.83)
<u>HOXA13</u>				6.27 (3.92-10.34)	0.33 (0.13-0.83)	0.20 (0.07-0.56)
<u>MDK</u>				7.10 (4.73-11.10)	4.76 (1.74-13.62)	8.14 (2.64-26.60)
<u>CDK1</u>				7.80 (5.11-12.39)	3.47 (1.39-9.13)	2.59 (0.98-7.18)
<u>CXCR2</u>				1.69 (1.36-2.10)	0.65 (0.45-0.92)	0.69 (0.47-0.98)

【0130】

調整Pインデックス、Gインデックス及びG+Pインデックス変数ORは、それぞれPインデックス、Gインデックス及びG+Pインデックスにおける累乗係数である。

調整logOR係数は多変量ロジスティック回帰モデルで計算された。

Pインデックス = $-3.78 + 0.81 \times \text{年齢} + 0.46 \times \text{性別} + 0.78 \times \text{喫煙歴} + 0.59 \times \text{Hfreq}$ であり

式中、各表現型変数は、表9に示されるように二進法スコアの0又は1を割り当てられ、当該係数の信頼区間は表11に提示される。PインデックスのAUCのための偏向修正推定量は0.66である（95% CI：0.55-0.67；図21）。

【0131】

遺伝子型変数と巨視的血尿を有する患者のUCリスクとの間の関係

Gインデックスが、UC発症を予測するために、尿サンプル中の5つの遺伝子IGFBP5、HOXA13、MDK、CDK1及びCXCR2のlog mRNA濃度を用いてロジスティック回帰によって推定された。

Gインデックス = $-6.22 + 0.77 \times \text{IGFBP5} - 1.11 \times \text{HOXA13} + 1.56 \times \text{MDK} + 1.24 \times \text{CDK1} - 0.43 \times \text{CXCR2}$ である。

Gインデックスは0.83の偏向修正AUCを与える（95% CI：0.74－0.89；図21）。

遺伝子型変数及び表現型変数と巨視的血尿を有する患者のUCリスクとの間の関係

5つの一貫した遺伝子型変数を続いて4つの二進法表現型変数と組み合わせ、多変量ロジスティック回帰を用いてG+Pインデックスを推定した。

G+Pインデックス＝ $-8.46 + (0.79 \times \text{IGF} - 1.60 \times \text{HOXA} + 2.10 \times \text{MDK} + 0.95 \times \text{CDC} - 0.38 \times \text{IL8R}) + (0.64 \times \text{年齢} + 1.11 \times \text{性別} + 0.98 \times \text{喫煙歴} + 0.56 \times \text{Hfreq})$ である。

G+Pインデックスは0.86の偏向修正AUCを与える（95% CI：0.80－0.91）。

GインデックスとG+Pインデックスの比較

GインデックスとG+Pインデックスのための信頼区間の間にはオーバーラップが存在する。そこで各ブートストラップサンプルのためのGインデックス及びG+PインデックスについてAUCの相違を決定することによって、対応のある検定のブートストラップバージョンを構築した。n=587のサンプルサイズを有する10000のブートストラップサンプルを、分析に利用できる元の587サンプルから入れ替えによるランダムサンプリングによって作出した。モデル間の相違について得られた95%CIは0.01－0.08であった。したがって、2つのAUC間の真の相違が0.01未満である確率は<0.025であり、G+PインデックスのAUCがGインデックスのAUCよりも有意に大きいという高い蓋然性が存在することを示唆している。

モデルのNPV及び感度

G+Pインデックスは、0.2から0.7の検査陰性率の範囲にわたって0.97を超えるNPVを生じ、GインデックスモデルのNPVよりほぼいつも高かった（図22）。G+Pインデックスは、検査陰性率が0.4の時に、感度0.95及びNPV 0.98の性能特性を提供した（表12；図22）。対照的に、Gインデックスは、検査陰性率が0.4の時に、感度0.86及びNPV 0.96を達成しただけであった（表12）。

【0132】

10

20

【表 1】

表 12：変動する検査陰性率に対して閾値が設定されたときの各モデルの性能特性

閾 値 (logOR)	検査陰性率 (95% CI)	NPV (95% CI)	感度 (95% CI)	特異性 (95% CI)
P インデックス				
-2.54	0.25 (0.21-0.28)	0.97 (0.92-0.99)	0.93 (0.85-0.98)	0.27 (0.23-0.31)
-2.52	0.38 (0.34-0.42)	0.95 (0.91-0.97)	0.83 (0.74-0.91)	0.41 (0.37-0.45)
-2.39	0.42 (0.37-0.45)	0.95 (0.91-0.97)	0.82 (0.72-0.90)	0.45 (0.40-0.49)
-1.95	0.51 (0.47-0.54)	0.92 (0.89-0.95)	0.68 (0.56-0.78)	0.53 (0.49-0.57)
-1.93	0.51 (0.46-0.55)	0.92 (0.89-0.95)	0.68 (0.56-0.78)	0.53 (0.49-0.58)
-1.73	0.82 (0.79-0.85)	0.90 (0.87-0.92)	0.32 (0.22-0.43)	0.84 (0.81-0.87)
G インデックス				
-3.46	0.20 (0.17-0.23)	0.94 (0.88-0.97)	0.90 (0.80-0.95)	0.22 (0.18-0.25)
-3.23	0.30 (0.26-0.34)	0.95 (0.91-0.98)	0.89 (0.80-0.95)	0.33 (0.28-0.37)
-3.04	0.40 (0.36-0.44)	0.96 (0.92-0.98)	0.86 (0.77-0.93)	0.44 (0.40-0.48)
-2.86	0.50 (0.46-0.54)	0.97 (0.94-0.98)	0.86 (0.77-0.93)	0.55 (0.51-0.59)
-2.63	0.60 (0.56-0.63)	0.96 (0.94-0.98)	0.82 (0.71-0.90)	0.66 (0.62-0.69)
-2.41	0.70 (0.66-0.73)	0.96 (0.94-0.98)	0.78 (0.65-0.86)	0.77 (0.73-0.80)
G+P インデックス				
-4.02	0.20 (0.17-0.23)	0.97 (0.93-0.99)	0.96 (0.88-0.99)	0.22 (0.19-0.26)
-3.67	0.30 (0.26-0.33)	0.98 (0.94-0.99)	0.94 (0.87-0.99)	0.33 (0.29-0.37)
-3.33	0.40 (0.36-0.44)	0.98 (0.95-1.00)	0.95 (0.86-0.98)	0.45 (0.40-0.49)
-2.99	0.50 (0.46-0.54)	0.98 (0.96-0.99)	0.92 (0.83-0.97)	0.56 (0.52-0.60)
-2.71	0.60 (0.56-0.64)	0.97 (0.95-0.99)	0.86 (0.76-0.93)	0.67 (0.63-0.71)
-2.37	0.70 (0.66-0.73)	0.97 (0.94-0.98)	0.80 (0.70-0.88)	0.77 (0.73-0.80)

【0133】

顕微鏡的血尿を有する患者でのG+Pインデックスの応用

10

20

30

40

50

巨視的血尿を有する患者のデータを用いてG+Pインデックスを開発したが、一方、顕微鏡的血尿を有する患者（Hfreq=0）のさらに別の40サンプルでその頑健さを試験した。顕微鏡的血尿の集団ではUCの発生率が低いので、より高い検査陰性率がこの集団では予測され、検査陰性率0.4を用いたとき、32人の患者（80%）が陰性と検査されて正確にトリアージ除外された（したがって、UC決定のために完全な泌尿器学精密検査を要しない）。

【0134】

考察

この試験は、UC検出のために完全な泌尿器学精密検査を受ける必要がある患者から血尿を提示する患者を効果的にトリアージで除外する能力を臨床医及び内科医に提供する臨床ツールの輪郭を描く。この試験は、ブートストラップ依拠CI推定量を有する内部検証遺伝型-表現型モデル（G+Pインデックス）を提示し、前記は高感度と高NPVの結合を提供し（すなわち偽陰性結果を与えるUCを有する個々の患者の確率が低いこと及び全ての陰性結果が真実である割合が高いこと）、これは、遺伝型データのみ又は表現型データのみからもっぱら誘導されるモデルでは提供されない。本モデルは、特に、完全な泌尿器学精密検査を要しないUCのリスクが低い患者を識別することによって、臨床医及び内科医に顕微鏡的血尿及び巨視的血尿を有する患者をトリアージする唯一の機会を提供する。

感度が高い状況での高い検査陰性率は、UCの確率が低い患者を完全な臨床精密検査から外すことを目的とする効果的なトリアージ-アウト検査のために重要な考察である[37]。したがって、0.4の検査陰性率において、ここで提示されるG+Pインデックスの感度は、感度及びNPVの両方を最大にする（それぞれ0.95及び0.98）。これは、[33]に発表された遺伝子型モデル（感度=0.82；NPV=0.97）から選択される最良適合と比肩しうるものであり、さらにまた、膀胱鏡（感度=0.89-0.98；NPV=0.99）及びコンピュータ制御断層撮影（CT）スキャンを用いる実質的膀胱鏡又は磁気共鳴画像化（MRI）（それぞれ感度=0.94及び0.91）の感度及びNPVとも比肩しうる[38-40]。

本事例でGインデックス、Pインデックス及びG+Pインデックスを誘導するために用いられたサンプル集団は巨視的血尿を有する患者から成ることは理解されよう。しかしながら、巨視的血尿を有する患者で検査陰性率0.4におけるこの検査の高い感度は、巨視的血尿患者及び顕微鏡的血尿集団を通してG+Pインデックスを適用することを可能にする。

UCを有する患者及びUCでない患者が顕微鏡的血尿及び巨視的血尿集団で同じように分布すると仮定し、ただし顕微鏡集団では予測されるUC存在率が4%であるとする、顕微鏡的血尿患者集団でもまた高いNPVを予測できる。

UCではない顕微鏡的血尿を有する患者のサンプル集団にG+Pインデックスを適用することによって、患者の80%が当該結果を基準にしてトリアージで除外されるであろうということが示された。20%のみが完全な泌尿器学精密検査のために照会されよう。これは、良性の原因に帰することができない顕微鏡的血尿を有する患者は全て（100%）完全な泌尿器学精密検査を受け、著しい不要なコストと患者のQoLに負の影響を与える従来型ガイドラインと比べられる。

【0135】

血尿の重篤度はUCを有する患者の確率と相関するが、任意の腫瘍の病期又は等級とは相関せず、さらに泌尿器専門医に照会される顕微鏡的血尿及び巨視的血尿を有する患者のそれぞれ概算で96%及び77-88%がUCではないであろう[2-6]。したがって、血尿を有する患者に対して潜在的に不要な泌尿器学精密検査を回避することはいくつかの利点を有する。膀胱鏡検査は有害な作用（例えば排尿時の痛み、出血、UTI、男性の性交時勃起不全及び決定的でないか又は不確定なUC診断に付随する不安）を伴いうる[9-11]。最も注目すべきことは、この新規なアプローチは、UC陰性患者の完全な泌尿器学精密検査に伴う財産負担及び財務コストの削減のために潜在的能力を有する。例えばUKでは、初期細胞診及び/又は腫瘍バイオマーカー検査陰性で血尿を有する患者の膀胱鏡検査の回避は、概算して患者当たり約770米ドル（患者当たり483ポンド）の節約と査定された[13]。ここに記載したG+Pインデックスは、一次評価設定で用いられるとき尿細胞診の使用に対する有効な代替方法を提供する。これは、一次評価がかかりつけ医によって実施される場合は特に適切で

ある。

前記を基準にして、完全な泌尿器学精密検査の各々に任意の“通常コスト”US\$4,500を割り当てるならば、顕微鏡的血尿を有する1000人の患者の精密検査の総コストは450万米ドルに達しよう。対照的に、顕微鏡的血尿を有する患者の80%がG+Pインデックスを用いてトリアージにより除外されるならば、US\$2,500の任意の通常コストでは、残りの20%の患者の検査及び完全な泌尿器学精密検査の直接的な総コストは340万米ドルとなるであろう。これは、顕微鏡的血尿を有する患者1,000人につき直接的成本で約110万米ドルの国家の正味の節約を提供する。

【0136】

O'Sullivanら[33]によって開発された遺伝子型アルゴリズムはここに提示したG+Pインデックスと同じ遺伝子型構成成分を含むが、感度と特異性との間のバランスは、完全な泌尿器学精密検査を受けた症状を有する患者（すなわち血尿を提示する）でUCの最適な一次検出について計算された。対照的に、本試験のG+Pインデックスはまた表現型変数を取り込み、高い感度及び高いNPVのために最適化されており、UCの疑いについて完全な泌尿器学精密検査を必要としない血尿を有する患者を分離させる。UCを有する患者の規定又は選別の試みは為されていない。それよりむしろ、目的は、UCではない患者を確実に排除することであり、したがって、分離されない患者は全て完全な泌尿器学精密検査に向けて進められるであろう。

血尿を提示する患者でUCのリスクを査定するとき表現型を考慮する予測モデルを開発するために、いくつかの試験が以前に探索されたが、表現型依存モデル単独の精度は限定的であるように思われた。例えば、Looら[21]は、泌尿器科への照会及び完全な精密検査を要しなかった顕微鏡的血尿を有する患者を識別するために、表現型パラメーターを用いることができるか否かを予測的に精査し、年齢、男性であること、及び巨視的血尿の最近の診断が重要なUCの予測因子であると結論した。喫煙歴及び最近の尿分析における25を超えるRBC/HPFは、分離においてUCの統計的に有意な予測因子ではなかったが、たとえ彼らの“血尿リスクインデックス”加えられた時でも、このインデックスは0.809のAUCを生じた[21]。興味深いことに、本試験の表現型ORとLooらによって認定されたものは共通点があり、喫煙歴及び性別について95%CIはオーバーラップするが、年齢、性別及び喫煙歴は各モデルで同様な重みを有し、ここに提示したG+Pインデックスの遺伝子型成分の影響がおそらくより高いAUCを説明する[21]。

同様に、Chaら[20]は、年齢、喫煙歴及び血尿の程度は無症候性血尿を有する患者のUCの存在と有意に相関するが性別は相関しないことを報告し、多変量モデルを用いてUCの予測のために表現型データと尿細胞診データを含むノモグラムを開発した。Looら[21]の場合のように、報告された表現型ORはここに報告したものと共通点を有するが、尿細胞診をノモグラムに取り込んだ後でさえ、[20]で報告された0.831のAUCは、G+Pインデックスのものより低かった。

別の試験では、Tanら[22]は、泌尿器専門診療所に照会された血尿を有する患者を、患者の年齢、性別、喫煙歴及び血尿の程度から得られたノモグラムを用いて適及的に高リスクグループ及び低リスクグループに階層化した。この試験との比較は、データが存在しないために除外された患者（405人の患者の80人）の割合が高いので注意しなければならないが、0.804のAUC、0.900の感度及び0.953のNPVはいずれも、ここに記載したG+Pインデックスよりも低かった。

【0137】

表現型モデルを尿バイオマーカー検査の結果で補充することによって、表現型モデルの精度を改善するいくつかの試みもまた実施された。核マトリックスタンパク質NMP22のポイントオブケアプロテオームアッセイがUC検出のための単離で用いられた時、前記アッセイは、0.557の感度及び0.968のNPVを有する[17]。Lotanら[41]は、表現型因子、NMP22及び尿細胞診を含み、UC予測のために0.826のAUCを有する多変量アルゴリズムを発表した（前記は0.802のAUCにより予測的に検証された[31]）。しかしながら、このモデルは、高リスク患者であってUCを有する者とUCではない者とを区別する試みであり、UCの確率が低い

患者をトリアージで除外するために感度及びNPVを最大にすることとは反対であることを特記することは重要である。

遺伝子型データ及び表現型データの両方を含むアルゴリズムで得られる精度の改善は以前に脳の癌で示された（特に[42-45]）。同様に、Mitraら[30]は、分子マーカー及び喫煙歴の組合せを用いて、UCを有する患者の生存の予測において日常的な臨床病理学的パラメーターよりも優れた多変量モデルを計算した。しかしながら、本試験は、表現型リスク因子を遺伝子型データと組み合わせて、血尿を有する患者の生存性予測ではなく種々のレベルの泌尿器学的経過観察及び臨床看護を必要とするカテゴリーに分離するためにモデルの精度を高めることができることを示す最初のものである。

あるモデルで表現型データを遺伝子型データと組み合わせるとき、データの分解はモデルの精度におそらく影響を与える。例えば喫煙はUCのリスク因子であることはよく理解され、UCの検出のためにほとんどの表現型モデルに含まれる。Chaら[20]、Tanら[22]、Lota nら[31,41]及びこれまでの試験では、二元性判別因子、非喫煙及び現在/過去の喫煙者が用いられ、一方、Mitraら[30]は、喫煙年数及び1日の喫煙タバコ数を基準に喫煙の強さを計算し、Looら[21]は、喫煙者を非喫煙、受動喫煙、喫煙停止者及び現在の喫煙者に分類した。UCのリスクは喫煙への暴露とともに実質的に増加することが知られているが[46]、表現型変数を任意に定義することは表現型モデルの総合的精度及び有用性を制限しうる。対照的に、患者の遺伝子型変数と表現型変数との間の交互作用は予測されないであろう。しかしながら、表現型因子及び遺伝子型変数の影響を単一ツール内で結合させることによって、本試験に記載したモデルの精度は改善された。同様な原理はまた血尿表現型の記載にも適用される。顕微鏡的血尿又は巨視的血尿を提示する患者は生物学的には本質的に連続したものであり、UCを有する蓋然性は種々である[2-6,21]。したがって、本試験で全ての患者がHfreqスコア0の顕微鏡的血尿を有するにもかかわらず、彼らの血尿の重篤度は、他の表現型因子と組み合わせて、G+Pインデックスの遺伝子型成分においておそらく間接的に説明される。

【0138】

参考文献

下記に直接示される論文は実施例4に関係し、参照によりいずれも本明細書に完全に含まれる。

10

20

30

1. Kelly JD, Fawcett DP, Goldberg LC: Assessment and management of non-visible haematuria in primary care. *BMJ* 2009, 338:a3021.
2. Davis R, Jones JS, Barocas DA, Castle EP, Lang EK, Leveillee RJ, Messing EM, Miller SD, Peterson AC, Turk TMT, Weitzel W: Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline. *J Urol* 2012, 188(6 Suppl):2473-2481.
3. Sutton JM. Evaluation of hematuria in adults. *JAMA* 1990, 263:2475-2480.
4. Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE: A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate clinical practice. *J Urol* 2000, 163:524-527.
5. Davidson P: Re-design of a haematuria clinic: Assessment of 2346 haematuria patients. *J Urol* 2011, 185(4S):e495.
6. Price SJ, Shephard EA, Stapley SA, Barracough K, Hamilton WT: Non-visible versus visible haematuria and bladder cancer risk: A study of electronic records in primary care. *Br J Gen Pract* 2014, 64:e584-e589.
7. Buteau A, Seideman CA, Svatek RS, Youssef RF, Chakrabati G, Reed G, Bhat D, Lotan Y: What is evaluation of hematuria by primary care physicians? Use of electronic medical records to assess practice patterns with intermediate follow-up. *Urol Oncol* 2014, 32:128-134.
8. Jimbo M: Evaluation and management of hematuria. *Prim Care* 2010, 373:461-472.

10

20

30

9. Herr HW: The risk of urinary tract infection after flexible cystoscopy in bladder tumor patients who did not receive prophylactic antibiotics. *J Urol* 2014 Jul 18. pii: S0022-5347(14)03963-9.
10. Burke DM, Shackley DC, O'Reilly PH: The community-based morbidity of flexible cystoscopy. *BJU Int* 2002, 89:347-349.
11. Stav K, Leibovici D, Goren E, Livshitz A, Siegel YI, Lindner A, Zisman A: Adverse effects of cystoscopy and its impact on patients' quality of life and sexual performance. *Isr Med Assoc J* 2004, 6:474-478. 10
12. Rao PK, Jones JS: How to evaluate 'dipstick hematuria': What to do before you refer. *Cleve Clin J Med* 2008, 75:227-233.
13. Rodgers M, Nixon J, Hempel S, Aho T, Kelly J, Neal D, Duffy S, Ritchie G, Kleijnen J, Westwood M: Diagnostic tests and algorithms used in the investigation of haematuria: systematic reviews and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2006, 10:iii-iv, xi-259. 20
14. Falebita OA, Lee G, Sweeney P: Urine cytology in the evaluation of urological malignancy revisited: is it still necessary? *Urol Int* 2010, 84:45-49.
15. Feifer AH, Steinberg J, Tanguay S, Aprikian AG, Brimo F, Kassouf W: Utility of urine cytology in the workup of asymptomatic microscopic hematuria in low-risk patients. *Urology* 2010, 75:1278-1282.
16. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmäng S, Lcc R, Kim S, Stenzl A, Lotan Y. The economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol* 2014, 66:253-262. 30
17. Grossman HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, Shen Y: Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2005, 293:810-816.
18. Friedlander DF, Resnick MJ, You C, Bassett J, Yarlagadda V, Penson DF, Barocas DA: Variation in the intensity of hematuria evaluation: a target for primary care quality improvement. *Am J Med* 2014, 127:633-640.
19. Shinagare AB, Silverman SG, Gershanik EF, Chang SL, Khorasani R: Evaluating hematuria: impact of guideline adherence on urologic cancer diagnosis. *Am J Med* 2014, 127:625-632. 40

20. Cha EK, Tirsar LA, Schwentner C, Hennenlotter J, Christos PJ, Stenzl A, Mian C, Martini T, Pycha A, Shariat SF, Schmitz-Dräger BJ: Accurate risk assessment of patients with asymptomatic hematuria for the presence of bladder cancer. *World J Urol* 2012, 30:847-852.
21. Loo RK, Lieberman SF, Slezak JM, Landa LM, Mariani AJ, Nicolaisen G, Aspera AM, Jacobsen SJ: Stratifying risk of urinary tract malignant tumors in patients with asymptomatic microscopic hematuria. *Mayo Clin Proc* 2013, 88:129-138. 10
22. Tan GH, Shah SA, Ann HS, Hemdan SN, Shen LC, Galib NAFA, Singam P, Kong CHC, Hong GE, Bahadzor B, Zainuddin ZM: Stratifying patients with haematuria into high or low risk groups for bladder cancer: a novel clinical scoring system. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013, 14:6327-6330.
23. Sultana S, Goodman C, Bryne D, Baxby K: Microscopic haematuria: urological investigation using a standard protocol. *Br J Urol* 1996, 78:691-698.
24. Sugimura K, Ikemoto S-I, Kawashima H, Nishisaka N, Kishimoto T: Microscopic hematuria as a screening marker for urinary tract malignancies. *Int J Urol* 2001, 8:1-5. 20
25. Viswanath S, Zelhof B, Ho E, Sethia K, Mills R: Is routine urine cytology useful in the haematuria clinic? *Ann R Coll Surg Engl* 2008, 90:153-155.
26. Steiner H, Bergmeister M, Verdorfer I, Granig T, Mikuz G, Bartsch G, Stoehr B, Brunner A: Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers. *BJU Int* 2008, 102:291-296.
27. Yeung C, Dinh T, Lee J: The health economics of bladder cancer: An updated review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2014, 32:1093-1104. 30
28. Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R, Best T, Watanabe J, Kajita Y, Matsui Y, Ito M, Nishiyama H, Kerr N, da Silva Tatley F, Cambridge L, Toro T, Ogawa O, Guilford P: Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2008, 14:742-749.
29. Sapre N, Anderson PD, Costello AJ, Hovens CM, Corcoran NM: Gene-based urinary biomarkers for bladder cancer: an unfulfilled promise? *Urol Oncol* 2014, 32:48.e9-e17.
30. Mitra AP, Castela JE, Hawes D, Tsao-Wei DD, Jiang X, Shi SR, Datar RH, Skinner EC, Stein JP, Groshen S, Yu MC, Ross RK, Skinner DG, Cortessis VK, Cote RJ: 40

- Combination of molecular alterations and smoking intensity predicts bladder cancer outcome. *Cancer* 2013, 119:756-765.
31. Lotan Y, Svatek RS, Krabbe LM, Xylinas E, Klatte T, Shariat SF: Prospective external validation of model for bladder cancer detection. *J Urol* 2014, 192:1343-1348.
 32. Abogunrin F, O'Kane HF, Ruddock MW, Stevenson M, Reid CN, O'Sullivan JM, Anderson NH, O'Rourke D, Duggan B, Lamont JV, Boyd RE, Hamilton P, Nambirajan T, Williamson KE: The impact of biomarkers in multi-variate algorithms for bladder cancer diagnosis in patients with hematuria. *Cancer* 2012, 118:2641-2650.
 33. O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, Davidson P, Gilling P, Cambridge L, Harvey J, Toro T, Giles N, Luxmanan C, Felipe Alves C, Yoon HS, Hinder V, Masters J, Kennedy-Smith A, Beaven T, Guilford P: A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol* 2012, 188:741-747.
 34. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK: The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998, 22:1435-1448.
 35. Efron B, Tibshirani RJ: *An introduction to the bootstrap*. New York: Chapman Hill; 1993.
 36. DiCiccio TJ, Tibshirani RJ: Bootstrap confidence intervals. *Statist Sci* 1996, 11:189-228.
 37. Van't Hoog AH, Cobelens F, Vassall A, van Kampen S, Dorman SE, Alland D, Ellner J: Optimal triage test characteristics to improve the cost-effectiveness of the Xpert MTB/RIF assay for TB diagnosis: A decision analysis. *PLoS ONE* 2013, 8:e82786.
 38. Qu X, Huang X, Wu L, Huang G, Ping X, Yan W: Comparison of virtual cystoscopy and ultrasonography for bladder cancer detection: A meta-analysis. *Eur J Radiol* 2010, 80:188-197.
 39. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Cook JA, Fraser C, Griffiths TR; Aberdeen Technology Assessment Review (TAR) Group: Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care* 2011, 27:3-10.

10

20

30

40

40. Blick CG, Nazir SA, Mallett S, Turney BW, Onwu NN, Roberts IS, Crew JP, Cowan NC: Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU Int* 2012, 110:84-94.
41. Lotan Y, Capitanio U, Shariat SF, Hutterer GC, Karakiewicz PI: Impact of clinical factors, including a point-of-care nuclear matrix protein-22 assay and cytology, on bladder cancer detection. *BJU Int* 2009, 103:1368-1374. 10
42. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J: A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 2004, 23:1111-1130.
43. Dubsky P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, Dietze O, Luisser I, Klug E, Sedivy R, Bachner M, Mayr D, Schmidt M, Gehrmann MC, Petry C, Weber KE, Fisch K, Kronenwett R, Gnant M, Filipits M, on behalf the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSCG): The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer* 2013, 109:2959-2964. 20
44. Brentnall AR, Evans DG, Cuzick J: Distribution of breast cancer risk from SNPs and classical risk factors in women of routine screening age in the UK. *Br J Cancer* 2014, 110:827-828.
45. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, Greil R, Stöger H, Jakesz R, Bago-Horvath Z, Dietze O, Regitnig P, Gruber-Rossipal C, Müller-Holzner E, Singer CF, Mlineritsch B, Dubsky P, Bauernhofer T, Hubalek M, Knauer M, Trapl H, Fesl C, Schaper C, Ferree S, Liu S, Cowens JW, Gnant M, Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group: The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014, 20:1298-1305. 30
46. Krabbe LM, Svatek RS, Shariat SF, Messing E, Lotan Y: Bladder Cancer Risk: Use of the PLCO and NLST to Identify as Suitable Screening Cohort. *Urol Oncol.* 20149 July 16): pii: S1078-1439 (14)00215-4.

【 0 1 3 9 】

結論

結論すると、ここに報告したG+Pインデックスは臨床的有用性を変化させる重要な機会を示す。G+Pインデックスは、臨床医又は内科医に血尿を提示し、UCの確率が低い患者を正確にトリージングして除外することができ、高い総合的検査陰性率、高レベルの感度及び高いNPVを有する。このモデルは、血尿を有する患者の一次評価時に使用して、完全な泌尿器学精密検査を要しない患者をトリージングして除外し、それによってUCについて専門医の泌尿器学的評価のために照会を要する血尿患者の数を削減して患者のQoLの維持に役立てかつ診断関連コストの削減に役立てるために適切である。

【実施例 5】

【 0 1 4 0 】

G+PインデックスIII（“G2”）を用いる血尿を有する患者のトリアージ

G+Pインデックスのさらに別の使用はUCのリスクにしたがって患者を分類することである。続いてリスクカテゴリーを用いて、追跡精査のために患者に優先順位をつける。

本実施例は、インデックス（本明細書では“G2+Pインデックス”と呼ぶ）を用いて患者をトリアージするまた別の方法を提供する。前記インデックスは実施例4で上記に記載したG+Pインデックスと類似する。

G2の定義

この分類法は以下の式を計算する：

$$M1 = [IGF] - [HOXA] + [MDK] + [CDC]$$

続いて

$$R = -6.9802$$

$$+ 0.2007 * M1$$

$$+ 1.7893 * [IL8R]$$

$$+ 0.1552 * M12$$

$$- 0.2882 * [IL8R]^2$$

$$- 0.0720 * M1 * [IL8R]$$

スコアを得るために：

$$\text{スコア} = e^R / (1 + e^R)$$

式中、[IGF]、[HOXA]、[MDK]、[CDC]及び[IL8R]は、それぞれ遺伝子IGF、HOXA、MDK、CDC及びIL8Rのサンプル濃度の対数であり、‘*’は通常の乗算であり、さらに $e = 2.718282\dots$ は自然対数（ナピヤ対数）の底である。

高いスコアは、UCが存在する蓋然性がより高いことを示す。例として、0.12の閾値を設定し、スコアが0.12以上はUCを有する蓋然性が高く、0.12より低いスコアはUCを有する蓋然性が低いとすることができる。

【実施例6】

【0141】

血尿を提示し尿路上皮癌の確率が低い患者をトリアージで除外するための[G1=P]-インデックス及びG2の同時使用

A. 巨視的血尿を有する患者

患者データセット

- 45人の患者のサンプルをアッセイした。
- 5人の患者は喫煙状況を欠き、この分析から除外された。
- 全ての患者が完全な泌尿器学精密検査を完了し、いずれも尿路上皮癌ではない。
- 表現型変数：性別、年齢、喫煙状況。
- 患者の人工統計は下記の表13に示される。

【0142】

表13：

性別	年齢	非喫煙者	過去に喫煙者	喫煙者
女性	60歳未満	10	1	2
	60歳以上	9	1	2
男性	60歳未満	3	2	3
	60歳以上	3	2	2

【0143】

観察された検査陰性率

閾値として40%の検査陰性率を用いたときのデータは下記表14に示される。

【0144】

表14

TNR 40%	LR<0.12	0.12≤LR<0.23	0.23≤LR
トリアージ陰性	28	3	1
トリアージ陽性	4	2	2

【0145】

閾値として50%の検査陰性率を用いたときのデータは下記表15に示される。

【0146】

表15

TNR 50%	LR<0.12	0.12≤LR<0.23	0.23≤LR
トリアージ陰性	28	3	3
トリアージ陽性	4	2	0

10

【0147】

閾値として60%の検査陰性率の使用は同一の結果を与える。

最高のリスクグループ（男性、現在又は過去の喫煙者、年齢60歳以上）はこのトリアージ分類について陽性であった。

【0148】

要旨と結論

20

1. 臨床ガイドラインにしたがえば、41人の患者全員が完全な泌尿器学精密検査を受けるだろう。

2. 41人全員が完全な精密検査を受け、41人全員が尿路上皮癌ではないと決定された。

3. 50%の検査陰性率（TNR）では、85%の顕微鏡的血尿患者がスクリーニングで除外され、したがって完全な泌尿器学精密検査を受けないだろう。

4. Cxbladder-トリアージが50%のTNR（トリアージインデックス-3.33）で用いられると、85.4%の患者がトリアージで除外され、結果として正しく完全な泌尿器学精密検査を受けないだろう。

5. Cxbladder-トリアージが40%のTNR（トリアージインデックス-3.0）で用いられると、80.5%の患者がトリアージで除外され、結果として正しく完全な泌尿器学精密検査を受けないだろう。

30

B. 巨視的血尿を有する患者患者のデータセット

臨床試験データ並びにノースショア（North Shore）及びCURT製品試験の587のサンプルが用いられた。このデータセットは、年齢、性別、喫煙状況及び血尿頻度の他にIGF、HOXA、MDK、CDC、IL8Rの遺伝子濃度を含む完全なデータから成るサブセットであった。

我々は下記のCxbladder-トリアージモデルの開発で用いた同じデータを用いた；

$$G+P \text{ インデックス} = -8.46 + 0.79 \text{ IGF} - 1.60 \text{ HOXA} + 2.10 \text{ MDK} + 0.95 \text{ CDC} - 0.38 \text{ IL8R} + 0.98 \text{ SNS} + 0.56 \text{ Hfreq} + 1.11 \text{ 性別} + 0.64 \text{ 年齢}$$

我々は、図24でG2診断スコアに対してトリアージスコアをプロットした。トリアージ閾値、-3.33、-2.99及び-2.71は、検査陰性率、40%、50%及び60%にそれぞれ一致する。黒丸は腫瘍に対応し、緑はTaであり、赤はいずれも他の高い病期の腫瘍である。表16は臨床所見を示す。

40

【0149】

表16

病期	癌無し	T1	T2	T2a	T3	Ta	Tis
数	515	16	10	1	2	40	3

【0150】

我々は、図24の4象限の数を考察し、トリアージインデックス及びG2について多様なカ

50

ットオフによって決定した。

-3のCxbladder-トリアージのための閾値（トリアージインデックス）は50%の検査陰性率と一致する。表17はこれらの結果を示す。

【0151】

表17

象限	閾値	コントロール	TCC
下左	トリアージ<-3及びG2<0.12	272	6
上左	トリアージ>-3及びG2<0.12	155	7
下右	トリアージ<-3及びG2>=0.12	16	0
上右	トリアージ>-3及びG2>=0.12	72	59

10

【0152】

-3.33のCxbladder-トリアージ閾値（40%の検査陰性率）を同じG2閾値0.12とともに用いたとき、我々は表18に示すデータを観察した。

【0153】

表18

象限	閾値	コントロール	TCC
下左	トリアージ<-3.33及びG2<0.12	222	4
上左	トリアージ>-3.33及びG2<0.12	205	9
下右	トリアージ<-3.33及びG2>=0.12	9	0
上右	トリアージ>-3.33及びG2>=0.12	79	59

20

【0154】

要旨と結論

1. Cxbladder-トリアージ（G+P）及びCxbladderディテクト（G2）を同じ時間間隔で同じ患者について一連の組合せで使用するにより、4つの重要な臨床グループへの患者の包括的分類が提供される。

2. 顕微鏡的血尿及び巨視的血尿を提示する患者の合体集団に対して40%の検査陰性率を用いたとき、587人の患者のうち合計235人（40.0%）がトリアージで除外された。我々は、これらの患者はUCのための完全な精密検査を必要としないであろうと結論する。

30

3. 同じ集団について、対応する残りのグループの352人（60%）の患者が完全な泌尿器学精密検査を受けるであろう。

4. この残りのグループはいずれも高い等級で後期の腫瘍を含んでいた。これらの患者はトリアージで除外されず、したがって結果として正しく完全な泌尿器学精密検査を受けるだろう。

5. 合計4例の低等級Ta（腫瘍総数の5.6%）がトリアージで除外され、完全な精密検査を受けないであろう。

6. トリアージルールが、40%未満の検査陰性率で0.12未満のG2スコアを有する全ての患者のトリアージ除外を可能にするならば、合計13の低等級Taはトリアージ除外され（彼らは完全な精密検査を受けないであろう）、さらに全ての高等級の後期腫瘍は捕捉され完全な泌尿器学精密検査を受けるであろう。

40

7. これらの修正トリアージルールは、合計587人から合計440人の患者（75%）のトリアージ除外をもたらした。

【0155】

利点と総合的結論

結論すれば、ここに報告したG+Pインデックスは臨床的有用性を変化させる重要な機会を示す。G+Pインデックスは、臨床医又は内科医に血尿を提示し、UCの確率が低い患者を正確にトリアージして除外することができ、高い総合的検査陰性率、高レベルの感度及び

50

高いNPVを有する。このモデルは、かかりつけ医が使用して、完全な泌尿器学精密検査を要しない患者をトリージングして除外し、それによってUCについて専門医の泌尿器学的評価のために照会を要する血尿患者の数を削減し、患者の生活の質の維持に役立てかつ診断関連コストの削減に役立てるために適切である。提供した開示方法は、予想に反して、血尿を有する患者の追跡精査の必要性の欠如に関して正確な査定を提供する。これらは、本明細書に含まれる開示を使用しなければ達成され得ない優れた効果を表す。

参考文献の取り込み

全ての特許、特許出願及び非特許文献の引用は、別個に完全に取り込まれたかのように参照により本明細書に含まれる。

工業的応用性

本発明の実施態様は保険及び医薬の分野で有用である。

技術分野

本発明の実施態様は、患者をトリージングしてどの患者が実質的な短期手順又は経過観察を必要としないかを決定する、高度に正確で鋭敏でかつ特異的なコンピュータ利用方法を提供する。本方法は、血尿を有する患者の特定の遺伝子型及び表現型情報（明確で有用でかつ具体的な結果を提供する）の分析に基づいて、新規で自明ではないコンピュータ操作を提供することによってコンピュータ操作を改善して、ヘルスケアの質を改善しさらに経費を削減する。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕以下の工程を含む、血尿を提示する患者で尿路上皮癌を有するリスクのレベルを決定する方法：

a. 前記患者からの尿サンプルを提供する工程；

b. 前記サンプルでヒトMDK、CDC2、HOXA13、及びIGFBP5の発現レベルを定量することを
含む、MI値を定量する工程；

c. 前記患者の表現型変数、HFREQ、年齢GT、性別、SMK、及びRBCを査定する工程；

d. 式(i)、 $G+P \text{ インデックス} = (1 \cdot HFREQ + 3 \cdot \text{性別} + 4 \cdot SMK) + (5 \cdot M1 + 2 \cdot IL-8)$ 若しくは
式(ii)、 $G+P \text{ インデックス} = (w1 \cdot HFREQ + w2 \cdot \text{年齢GT}50 + w3 \cdot \text{性別} + w4 \cdot SMK + w5 \cdot RBC) + (w6 \cdot M1 + w7 \cdot IL-8)$ のどちらか、又は

$G+P \text{ インデックス} = -8.46 + 0.79IGF - 1.60HOXA + 2.10MDK + 0.95CDC - 0.38IL8R + 0.98SNS$
 $+ 0.56Hfreq + 1.11 \text{性別} + 0.64 \text{年齢}$

にしたがってG+Pインデックスを計算する工程；及び

e. 該G+Pインデックスが、当該患者が尿路上皮癌を有するというリスクのレベルを示す
閾値よりも高いか否かを決定する工程。

〔2〕前記閾値が、0から5、6から10、又は11-15のG+Pインデックス値のグループから選
択され、ここで、前記値の0から5は低リスクを示し、6から10は中等度リスクを示し、11
-15は高リスクを示す、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕前記閾値が6-10のG+Pインデックス値であるならば、前記患者は追加の臨床検査又
は検査室検査を受ける、前記〔2〕に記載の方法。

〔4〕前記閾値が11-15のG+Pインデックス値であるならば、前記患者は追加の臨床検査
又は検査室検査を受ける、前記〔2〕に記載の方法。

〔5〕前記閾値が0-5のG+Pインデックス値であるならば、前記患者は更なる臨床検査又
は検査室検査のための監視リストに入る、前記〔2〕に記載の方法。

〔6〕閾値が統計的方法を用いて確立される、前記〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の方
法。

〔7〕該統計的方法が、線形判別分析（LDA）、ロジスティック回帰（LogReg）、サポー
トベクターマシーン（SVM）、k-最接近5近傍探索法（KN5N）及び分割樹分類法（TREE）の
いずれか1つである、前記〔1〕から〔6〕のいずれかに記載の方法。

〔8〕図6又は図7から選択される1つの追加遺伝子型マーカーの発現を定量する工程をさ
らに含む、前記〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔 9 〕 前記遺伝子発現定量工程がmRNAのレベルを検出することによって実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 0 〕 前記遺伝子発現定量工程がcDNAのレベルを検出することによって実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 1 〕 前記遺伝子発現定量工程が、前記cDNAの少なくとも一部分と相補的なオリゴヌクレオチドを用いて実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 2 〕 前記遺伝子発現定量工程が、フォワードプライマー及びリバースプライマーを用いるqRT-PCR方法を用いて実施される、前記〔 1 〕 から〔 9 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 3 〕 前記遺伝子発現定量工程がタンパク質のレベルを検出することによって実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 4 〕 前記遺伝子発現定量工程がペプチドのレベルを検出することによって実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 5 〕 前記遺伝子発現定量工程が前記マーカーに対する抗体を用いて実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 又は〔 13 〕 -〔 14 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 6 〕 前記遺伝子発現定量工程が、サンドイッチ型免疫アッセイ方法を用いて又は抗体チップを用いて実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 又は〔 13 〕 -〔 15 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 7 〕 前記遺伝子発現定量工程がモノクローナル抗体を用いて実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 又は〔 13 〕 -〔 16 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 8 〕 前記遺伝子発現定量工程がポリクローナル抗血清を用いて実施される、前記〔 1 〕 から〔 8 〕 又は〔 13 〕 -〔 17 〕 のいずれかに記載の方法。

10

20

【図 1 - 1】

遺伝子座 NM_001557 2880 bp mRNA
定義 ホモサビエンスケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体2 (CXCR2) 受容体2 (CXCR2)、転写変種1、mRNA
アクセッション NM_001557
バージョン NM_001557.3 GI:269973857

タンパク質配列: "MEDNMSDSFEDFKGSDLSNYSVSSILPFLDLAACPBPESL
EINKFYIYALVFLLSLGNLSVLMVLVYRSVGRSVTDVLLNLALDLFLALFLP
LWASKVNGWIECTCKVYSLKVENFYSGILLACISVDYRLAIVHATRIILTKRY
IVKFCISLWGLSLALPFLVLLFRTVYSNVSPACVEDMNNIANWRLLRLILPQSF
GFIVPLILMLFCYGLTFLTKFAMGKXHRMVRIFAIVLFLCWLPLVNLVLAADI
MRTVIGETCERNHIDRAIDATEILGILHSLINFLIYAFIGQKFRHGLLKLAIHGL
ISKSLPKDSRPSFVCSSTSTII"

起点

1 aggttcaaaa cattcagaga cagaagtggtg atagacaaat ctccaccctc agactgtag
61 gctctccag aagccatcag acaggaagat gtagaaatcc ccagacactc tcccagaate
121 actaaagtgc acctgtctgt gcccgaagtc ccagagacaga cctcattott cctctgtggg
181 actaactccc cagagaggca tcttggaatt ccccttgcga acccaggcca gaagtcttat
241 cgtcaaggtt gtttattctt ttttttctgt tctaacagct ctgacaccca cccaaccttg
301 aggcacacgt agacatctgg tggccactcc aataacacga gttcacagct gctctctgg
361 aggtgtcctg caggtgaana gccacagcac ccagtcagga tttaagttta cctcaaaa
421 ggaagatttt aacatggaga gtagacagtt tgaagatttc tggaaaggtg aagattctag
481 tsattacagt tacagctcta cctgcctccc ttttctacta gatgcgccc catgtgaacc
541 agaattccctg gaaatcaaca agtattttgt ggtcattatc tatgcctcgt tattcctgct
601 gaggctgtgt ggaactccc tctgtgtgct ggtcattotta tacagcagggtg tggcgcgtgc

Figure 1

【図 1 - 2】

561 ggtcaatgat gttacatctg tgaactctgc ctgtgctgac ctgtctcttg ccttgacatt
721 gccatctgt gccctctcca aggtgaatgg ctggattttt ggcacattcc tgtgcaaggt
781 ggtctactc ctgaaggaa tcaacttcta tagtggcatc ctgtactctg cctgcatcag
841 ttgtgacctt tacttgcca ttgtccatgc caccacgaca ctgacccaga agcgtactt
901 ggtcaaatc atagtctca gcatctgggg ttgtctcttg cctctgccc tgcctgtctt
961 acttttccga aggaactgt actcatccaa ttgttagcca cctgtctat agaaatggg
1021 caacaatca gaaactggc ggaigtgtgt acggtacttg cccaactct tggcttcat
1081 cgtaccact atgacatgc ttgtctgcta cggattacac ctgcgtacgc tggtaagac
1141 ccaatgggg gaaagcaac gggcattggg ggtcattctt gctgtgctcc tcatctctt
1201 gctctgtgtg ctgctctaca acctgttctt gctggcagac acctcatga ggaacacgt
1261 gttccaggag acctgtgac gccgaatca catcgacgg gctctggatg ccaacagat
1321 tctgggcat ctccacagt gctcaaccc cctcatctac gctctctatg gccagagat
1381 tggcctgga ctctcaaga ttctagctat acatggcttg atcagcaag actccctgac
1441 caagacagc aggtcttctt ttgttgctc ttcttcagg cacactcca ctactctca
1501 agactcttg cctaagtgea gccctctggg gttctcact tctcttca gtcacattcc
1561 aagctctat tccactggt ctctctgctc tcaagtcca tgcagcccc atgtgtgta
1621 caggaagta aggaagcac gttcttacta gtttcccttg catgggttag aaagcttgc
1681 ctgtgtgctt acctctgac atattacta tgtcatttgc tgggctcttg ccaactctgc
1741 cctggagcc atggcactct agtttctag aagtgaat atcacatcca gtgagacag
1801 tctgcataat catagatg gctgttacta aagaagaa aatcagctg gccacaggg
1861 tgaacacct tcttacta aatacaaaa aaaaaaaa atagcagg cgtggtggtg
1921 agtgcctga atcacgta ttgtggagg tgaatggga gaactcttg aaccctggag
1981 cgaaggttg cagtgcagc agatgttgc cctgacitcc agctcagag acagtggag
2041 tctgtctcag tccatgaaga tttagagga aaactggaa tctcagaggt tgtggtggg
2101 gatgtaaaa tgggtgaac actgcagag acagtatgg agttcttcc aactctca
2161 acatagatt aacatgat cctgcaact cactatagg aattgacca caagaatga
2221 aagcagggag ttgaacct atttgtac caattatc agaatgtat tcaacaagc
2281 caaagggag aagaaccaaatgttcaatc atgttcaatc tgaatggcta agcaaatgt
2341 gataatgacc taagaagta tcttctagcc tgaagagga atgaagcact catacattg
2401 acaacacga cgaaccttga aaactttatg ctaagtgaat taagccagac atcaacagat

Figure 1 (続き)

【図 1 - 3】

2461 aaatagttta tgattccacc tacatgaggt actgagagt aacaaattta cagagacaga
 2521 aagcagaaca gtgattacca gggactgagg ggaggaggc atgggaagtg acggtttaat
 2581 gggcacaggg ttatatgtta ggaattgtga aagttctgc agataaacag taglgtatgt
 2641 tgaaccgcaa ttgactttaa tgccacttaa ttgacactta aaaaatggtt aaatggtcaa
 2701 tttgttatg tataatttat atcaatttaa aaaaaaacct gagcccaaaa aggtatttta
 2761 atcacacaag ctgattcaaac caaggctaga accactgccc tataattttt gtaaatgat
 2821 ttcattcaat atcttttttt taataaacca ttttacttg ggtgtttata aaaaaaaaaa

Figure 1 (続き)

【図 2 a】

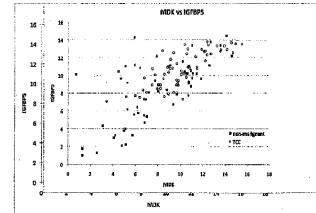


Fig. 2a

【図 2 b】

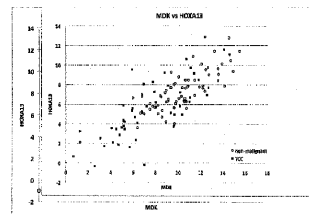


Fig. 2b

【図 2 c】

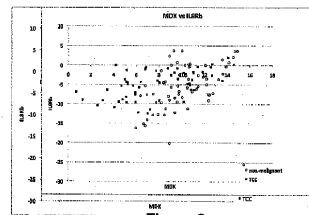


Fig. 2c

Figure 2.

【図 2 d】

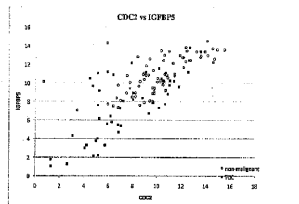


Fig. 2d

【図 2 e】

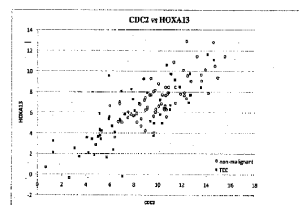


Fig. 2e

【図 2 f】

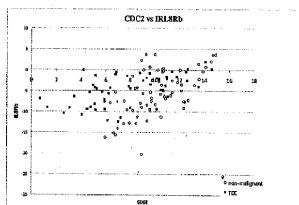


Fig. 2f

【図 3 a - b】

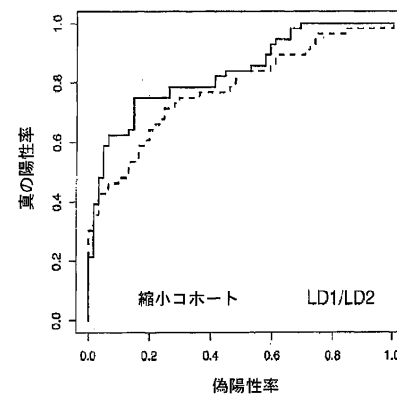


Fig. 3a

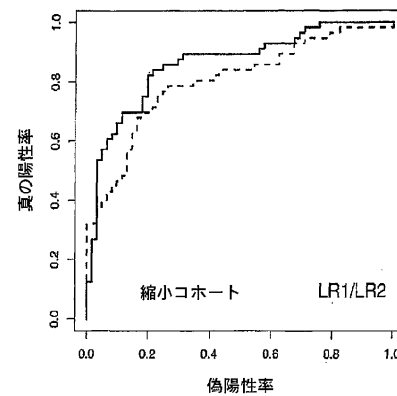


Fig. 3b

Figure 3a-b.

【図 4 a - b】

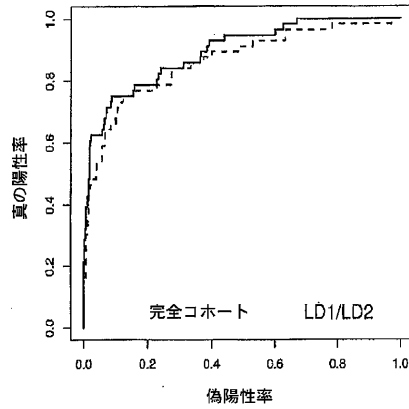


Fig. 4a

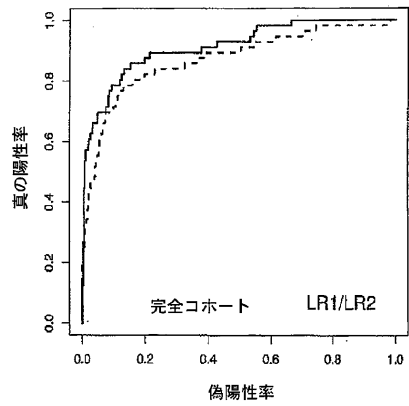


Fig. 4b

Figure 4a-b.

【図 6-1】

遺伝子名称/ 通称 記号	タンパク質 アクセッ ション 番号	mRNA 参照配列 アクセッ ション	MIMC プロテ イン名	中央値 変化倍数	ヒ検定 t検定	ウィル ス 検定	SAM	ラン グ ス ク	腫瘍組織 の腫瘍 ラング 中央値	非腫瘍組 織の腫 瘍ラン グ中央 値	血液
rasホモロー グ 遺伝子ファミリー のメンバー (KRAS), BRAF 変異的タンパク質 GNA	NP_004031.1	NM_004040.2	mwgHuman3 0KFA30814	-2.894582	2.13704E- 10	2.25759E- 09	-10.53678	38	8789.5	4176	23
アニートホックス 遺伝子ファミリー のメンバー (FLT4151), 変異的タンパク質 GNA	NP_078363.1	NM_026087.1	mwgHuman3 0KFA30410	-2.069008	2.54684E- 11	3.25308E- 08	-6.925773	69	14485	9272.5	0
アニートホックス 遺伝子ファミリー のメンバー (FLT4151), 変異的タンパク質 GNA	NP_003457.1	NM_003466.3	mwgHuman3 0KFA33648	-1.961896	4.71674E- 11	4.07074E- 08	-6.906281	82	19419	12999.5	0
タンセンズ転 移因子様七ロー ン OPE転移因子 (OPEFA), 遺伝子ファミリー のメンバー GNA	NP_078367.1	NM_026011.2	mwgHuman3 0KFA36295	-3.34007	1.03703E- 13	3.34027E- 08	-7.811653	96.5	5983.5	1825	0
ヒトヒトセン ズ転移因子様七 ローン (L75400), GNA	NP_036344.1	NM_012212.2	mwgHuman3 0KFA39686	-5.034613	3.08973E- 10	1.41839E- 07	-6.436167	122.5	11946.5	3188	0

Figure 6

【図 5】

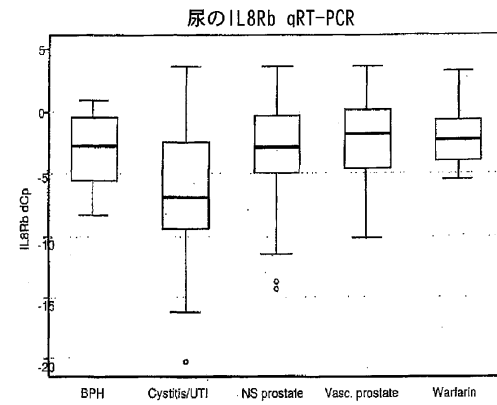


Figure 5.

【図 6-2】

遺伝子名称/ 通称記号	タンパク質 アクセシ ョン	mRNA 参照配列 アクセシ ョン	MWc プローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	血液
SLP17ファミリー 相互作用タンク (ヒト) (IPFZ)、 SHP1 NM_005719.1	NP_065719.1	NM_014804.1	rhwgumap3 OKAIA10478	-1.993829	4.5702E- 20	5.5931E -08	-7.711624	156	19836.5	12951	0
S22ドメイン、 メブリン(人) (NCI320H)、 S22ドメイン、 メブリン(癌細胞系、動物)	NP_006013.1	NM_006022.2	rhwguman3 OKAGA15577	-2.133065	1.12035E- 07	1.8545E- 07	-7.99568	168.5	8415	6130	1
スカルファイトオ キシダーゼ (SIOM) 家族、トリプ チンリジンホ スフィンゲン 二リン酸を核糖 塩基に転写する核糖 塩基に転写する核糖	NP_000447.2	NM_000456.2	rhwguman3 OKAA15512	-1.622803	4.5940E- 10	5.25198E -03	-6.7288932	223	11312.5	8799.5	0
ドラゴリニ ペーザール(RN (TTG2)) cDNA	NP_065698.1	NM_146755.1	rhwguman3 OKAFB3976	-2.976809	2.11314E- 07	4.28806E -07	-6.286432	225	8575.5	3970.5	1

Figure 6 (続き)

【图 6-4】

遺伝子名称/ 通称	タンパク質 アミノ酸 残基数	mRNA 参照配列 アミノ酸 残基数	MMG プロテオ ミクス 名称	中央値 変化倍数	t検定 p値	ウィル コソン 検定 p値	SAM スコア	腫瘍組織 の過剰 発現 中央値	非腫瘍組 織の過剰 発現 中央値	血液
トランスフェリン α2(I)ドメイン 2 (TFM2A), mRNA	NP_065070.2	NM_181719.2	rwghuman3 OKGB3094	-1.799143	8.4141E- 09	3.2117E- 06	322.5	4584.5	3158	5
アンカージン 3 (ANKRD3), mRNA	NP_020809.2, 3 7595.74557.1	AF032809.2, 3 7595.74557.1	rwghuman3 OKGB4325	-1.960121	5.7529E- 08	1.0121E- 07	332.5	4972.5	2843	
シナプソタグミ ン (SYT12), 転写 変種, mRNA	NP_115755.2	NM_032379.3	rwghuman3 OKGB3411	-2.343357	4.0729E- 10	9.67494E- 06	342	19920	12053.5	0
サイクリンG1 (CCNG1), mRNA	NP_004051.1	NM_001060.3	rwghuman3 OKGB3281	-1.87737	2.7620E- 03	4.64906E- 07	365	6269.5	4453	7
ヒトα2マクログロ ブリン (HBM2), mRNA	NP_060413.2	NM_017943.2	rwghuman3 OKGB3685	-1.801846	1.1559E- 06	1.9272E- 06	385.5	17957.5	18132.75	5
皮膚タンパク質 XP_047816 h0519582	XM_059716		rwghuman3 OKGB6228	-2.291304	2.65775E- 08	3.8422E- 06	375	3391	1276	
シロチンドメイン 4 (RMSD4), mRNA	NP_161814.1	NM_032796.1	rwghuman3 OKGB5855	-1.569438	2.0145E- 10	1.1427E- 06	407	15747.5	11247	5

Figure 6 (続き)

【图 6-6】

遺伝子名称/ 通記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセスシ- ョン	MIMC プローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	肺線組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値
細胞のための 増殖抑制因子 [CDIS] マール波群 系、(DAF)、 mRNA	NP_000895-1	NM_006742	rhwgman3 OKGA056760	-2.146183	1.4411E+ 06	6.5282E- 06	-5.689164	471.5	9306.5	4753.25
浸潤性体 ワキミトコンドリア 25 (ミトコンドリ- ア)性染色体, 生殖腺体, 肝臓上皮, (SLC25A3), mRNA	NP_077008.2	NM_024103.2	rhwgman3 OKGA056530	-1.465915	7.79428E- 09	8.89080E- 07	-5.741772	487	10385.5	12418.75
ウイングレス タイプVII阻害 剤アンチヘンダー 素阻害剤, 胚発生調節因- 子, mRNA	NP_004776.2	NM_004186.2	rhwgman3 OKGA056966	-10.745275	2.62932E- 12	3.19728E- 07	-6.75471	561	10716	2016.25
フロイドカハリー 症候群, 肥満症, 糖尿病, 低血糖症, 高尿酸血症, 腎病変, mRNA	NP_003726.1	NM_005735.2	rhwgman3 OKGA03383	-2.070447	2.88577E- 07	6.9243E- 06	-4.982742	511	2357	1931.5

Figure 6 (続き)

【図6-7】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アンサンブルジ ンスキャン	NP_055119	NM_017423.1	mwghuman3 OK#A01420	-1.401045	7.59042E- 08	1.13272E- 06	-6.143981	655.5	10570	8987.75	2
ヒトロシロ スチス	NP_062543	NM_019597.3	mwghuman3 OK#A03547	-2.03801	2.40055E- 06	6.16248E- 06	-5.485662	894	777	472	9
ヒトロシロ スチス	NP_062544	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03548	-1.605462	7.46708E- 08	6.16248E- 06	-4.881771	695	4585	4351.25	3
ヒトロシロ スチス	NP_062545	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03549	-4.953847	7.54477E- 12	1.43656E- 08	-6.602968	705.5	4529.5	744.5	

Figure 6 (続き)

【図6-9】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
ヒトロシロ スチス	NP_055119	NM_017423.1	mwghuman3 OK#A01420	-1.401045	7.59042E- 08	1.13272E- 06	-6.143981	655.5	10570	8987.75	2
ヒトロシロ スチス	NP_062543	NM_019597.3	mwghuman3 OK#A03547	-2.03801	2.40055E- 06	6.16248E- 06	-5.485662	894	777	472	9
ヒトロシロ スチス	NP_062544	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03548	-1.605462	7.46708E- 08	6.16248E- 06	-4.881771	695	4585	4351.25	3
ヒトロシロ スチス	NP_062545	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03549	-4.953847	7.54477E- 12	1.43656E- 08	-6.602968	705.5	4529.5	744.5	

Figure 6 (続き)

【図6-8】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アンサンブルジ ンスキャン	NP_055119	NM_017423.1	mwghuman3 OK#A01420	-1.401045	7.59042E- 08	1.13272E- 06	-6.143981	655.5	10570	8987.75	2
ヒトロシロ スチス	NP_062543	NM_019597.3	mwghuman3 OK#A03547	-2.03801	2.40055E- 06	6.16248E- 06	-5.485662	894	777	472	9
ヒトロシロ スチス	NP_062544	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03548	-1.605462	7.46708E- 08	6.16248E- 06	-4.881771	695	4585	4351.25	3
ヒトロシロ スチス	NP_062545	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03549	-4.953847	7.54477E- 12	1.43656E- 08	-6.602968	705.5	4529.5	744.5	

Figure 6 (続き)

【図6-10】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
ヒトロシロ スチス	NP_055119	NM_017423.1	mwghuman3 OK#A01420	-1.401045	7.59042E- 08	1.13272E- 06	-6.143981	655.5	10570	8987.75	2
ヒトロシロ スチス	NP_062543	NM_019597.3	mwghuman3 OK#A03547	-2.03801	2.40055E- 06	6.16248E- 06	-5.485662	894	777	472	9
ヒトロシロ スチス	NP_062544	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03548	-1.605462	7.46708E- 08	6.16248E- 06	-4.881771	695	4585	4351.25	3
ヒトロシロ スチス	NP_062545	NM_000553.2	mwghuman3 OK#A03549	-4.953847	7.54477E- 12	1.43656E- 08	-6.602968	705.5	4529.5	744.5	

Figure 6 (続き)

【図6-11】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アシル-CoA シンターゼ中 断症候群 メンバ-3 (ACSF3) mRNA	NP_006132.2	NM_006522.3	mwghuman3 OK4B-3076	-1.967123	1.775E- 05	7.3388E -06	-5.050721	705.5	18806.5	12352.25	3
UGT2関連 タンパク質 (UGT1) mRNA	NP_004314.3	NM_004223.3	mwghuman3 OK4A-29581	-2.952417	2.1316E- 03	5.23008E -07	-5.934804	778	9031	4503.5	1
神経前駆細 胞発生遺伝子 グロウ-1 (NEDD4) mRNA	NP_008145.1	NM_008154.1	mwghuman3 OK4B-7852	-1.900818	3.7763E- 06	8.23384E -06	-5.249282	781	15497	12075	2
染色体7ター ンク (CTCF) mRNA	NP_116220.1	NM_032831.1	mwghuman3 OK4B-2324	-1.780725	4.63759E- 06	0.000016 E24	-5.43532	783	11586.5	6704.75	16
カルパイン13 (CAP13) mRNA	NP_055176.2	NM_144575.2	mwghuman3 OK4B-6754	-1.542431	4.41704E- 06	5.81228E -06	-4.843249	808.5	23318	19303.5	0
ヒトオポチク チン (HCT116) mRNA	NP_002138.1	NM_002145.2	mwghuman3 OK4A-01538	-2.702649	2.94498E- 11	5.06284E -08	-6.774876	814.5	11537.5	6408	3

Figure 6 (続き)

【図6-12】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
コイルドコイル ドメイン/含有28 (CDD28A) mRNA	NP_059256.1	NM_015459.2	mwghuman3 OK4B-3128	-1.960806	1.97345E- 06	5.48118E -06	-5.390587	826	19222	14223.75	4
筋線維形成 (MRF1) mRNA	NP_056303.2	NM_015488.3	mwghuman3 OK4B-3179	-1.525759	1.29294E- 05	6.59438E -08	-5.874478	832	13007	10755.75	6
タチニスタン タンパク質 (TATN1) mRNA	NP_006089.1	NM_006099.4	mwghuman3 OK4C-3841	-1.789086	2.16385E- 06	4.35419E -05	-4.900088	844.5	1710	1178	108
スベクトリン リビニペロ ン (SLP1) mRNA	NP_056108.1	NM_015833.1	mwghuman3 OK4B-9104	-1.414534	7.52733E- 07	3.02433E -05	-5.983107	851	20159.5	17233.75	64
アンサンブル スキャン (ASCN) mRNA	NP_002138.1	NM_002145.2	mwghuman3 OK4C-7334	-1.766409	2.12121E- 05	2.01355E -05	-4.468876	853	1264	847.5	3

Figure 6 (続き)

【図6-13】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
骨形成タン パク質 (BMP1) mRNA	NP_004320.2	NM_004329.2	mwghuman3 OK4A-32484	-1.558632	2.22237E- 07	1.23937E -05	-4.510211	874.5	5116	9537.5	4
UGT2関連 タンパク質 (UGT1) mRNA	NP_004314.3	NM_004223.3	mwghuman3 OK4A-29581	-2.952417	2.1316E- 03	5.23008E -07	-5.934804	778	9031	4503.5	1
神経前駆細 胞発生遺伝子 グロウ-1 (NEDD4) mRNA	NP_008145.1	NM_008154.1	mwghuman3 OK4B-7852	-1.900818	3.7763E- 06	8.23384E -06	-5.249282	781	15497	12075	2
染色体7ター ンク (CTCF) mRNA	NP_116220.1	NM_032831.1	mwghuman3 OK4B-2324	-1.780725	4.63759E- 06	0.000016 E24	-5.43532	783	11586.5	6704.75	16
カルパイン13 (CAP13) mRNA	NP_055176.2	NM_144575.2	mwghuman3 OK4B-6754	-1.542431	4.41704E- 06	5.81228E -06	-4.843249	808.5	23318	19303.5	0
ヒトオポチク チン (HCT116) mRNA	NP_002138.1	NM_002145.2	mwghuman3 OK4A-01538	-2.702649	2.94498E- 11	5.06284E -08	-6.774876	814.5	11537.5	6408	3

Figure 6 (続き)

【図6-14】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
骨形成タン パク質 (BMP1) mRNA	NP_004320.2	NM_004329.2	mwghuman3 OK4A-32484	-1.558632	2.22237E- 07	1.23937E -05	-4.510211	874.5	5116	9537.5	4
UGT2関連 タンパク質 (UGT1) mRNA	NP_004314.3	NM_004223.3	mwghuman3 OK4A-29581	-2.952417	2.1316E- 03	5.23008E -07	-5.934804	778	9031	4503.5	1
神経前駆細 胞発生遺伝子 グロウ-1 (NEDD4) mRNA	NP_008145.1	NM_008154.1	mwghuman3 OK4B-7852	-1.900818	3.7763E- 06	8.23384E -06	-5.249282	781	15497	12075	2
染色体7ター ンク (CTCF) mRNA	NP_116220.1	NM_032831.1	mwghuman3 OK4B-2324	-1.780725	4.63759E- 06	0.000016 E24	-5.43532	783	11586.5	6704.75	16
カルパイン13 (CAP13) mRNA	NP_055176.2	NM_144575.2	mwghuman3 OK4B-6754	-1.542431	4.41704E- 06	5.81228E -06	-4.843249	808.5	23318	19303.5	0
ヒトオポチク チン (HCT116) mRNA	NP_002138.1	NM_002145.2	mwghuman3 OK4A-01538	-2.702649	2.94498E- 11	5.06284E -08	-6.774876	814.5	11537.5	6408	3

Figure 6 (続き)

【图 6-15】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質/ アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MMNC プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
アンサンブルジ ンズキヤン分類	AP010153.3.6	90541.116655	rwgumian3 OK6C3968	-1.703242	1.46329E 07	7.26658E -05	-4.5D4002	972.5	3374.5	2739.5	
アンサンブルジ ンズキヤン分類	A139169.14	1367152.2	rwgumian3 OK6C4465	-1.474035	8.96439E 07	3.25437E -05	-5.020854	988.5	28575	28030	
染色体ヒートマ ップ	NM_145063.2		rwgumian3 OK654652	-1.674296	1.77798E -05	3.32344E -05	-4.846371	101.5	14804	10754.75	3
メチルトランス フェラーゼ1 (MET1L1) 転写産物、 mRNA	NM_005371.3		rwgumian3 OK6A00607	-1.664325	1.73109E 07	5.48118E -05	-5.477619	1026	943	645.5	2
アクロチン アクセシブ タンパク質4 (INAP1L4), mRNA	NM_005969.3		rwgumian3 OK6A00708	-1.902267	1.44614E 05	6.9321E -05	-4.962357	1042.5	10396.5	8978.5	12
腫瘍タンパク質 151 (TP53) 転写産物、 mRNA	NM_005070.1		rwgumian3 OK6A05633	-1.55605	1.75544E 06	3.15+03E -05	-4.589369	1070	19033	14646.75	4
細胞周期抑制 因子4 (CDKN4), mRNA	NM_139205.2		rwgumian3 OK6B55911	-1.64935	1.97859E 05	3.70631E -05	-4.903865	1077	12134	9187.5	4

Figure 6 (続き)

【图 6-16】

遺伝子名称/ 通記名	タンパク質 アミノ酸 残基数	mRNA 参照配列 番号	MMG データベース 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の相対 濃度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の相対 濃度 ランク 中央値	血液
線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR4) 転写変種2、	NF_075552.2	NM_029653.2	ncmhuman3 K06S-8174	-2.638426	2.04040E- 06	3.21175E- 06	-6.251786	1087. 5	9762.5	0	
KIAA0674 (KGA0674), mRNA	XP_376933.2	XM_316803.2	ncmhuman3 K06S-0246	-1.362276	3.68739E- 05	3.62035E- 06	-5.432041	1092. 5	10744	4	
多色性バク チリ菌16S-r RNA (191bp)-a- 35a6	U91021	ncmhuman3 K06S-5376	ncmhuman3 K06S-5376	-1.568338	5.9184E- 05	5.5202E- 05	-6.340455	1114. 5	10576.5		
アンダーソン シアンキヤン アンプルロジ ン	AC073810.11 63496.12478 3	NC_000044.2	ncmhuman3 K06C-11337	-1.823108	1.68931E- 06	1.30066E- 05	-5.295374	1114. 5	1434.5	737	
アンドロゲン 受容体(AR), 転写変種、	NF_000035.2	NM_000044.2	ncmhuman3 K06A-01003	-1.575215	1.16973E- 07	1.54005E- 05	-4.291638	1120. 5	18067.5	0	
甲状腺 癌転写因子1	NF_003305.1	NM_003317.3	ncmhuman3 K06A-07197	-1.463957	8.57665E- 07	1.54585E- 06	-6.229277	1124. 5	2139	1026.25	0

Figure 6 (続き)

【図 6-17】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質/ アミノ酸 残基	mRNA 参照配列 アミノ酸 残基	MWG プローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ラング スコア	ラングの強度 中央値	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
スベクトリン リビーン-2含有核 リン酸酵素1 (SWI1), 転写 促進因子, mRNA	NP_692008.1	NM_182961.1	nmwihuman3 OK6C2340	-1.440164	6.37672E- 05	2.15058E- 05	-5.905222	1124. 5	20092.5	21681.5	64	
インカンパニ ン2 (INCENP), mRNA	NP_692008.1	AC019364.79 2	nmwihuman3 OK6C2340	-1.55384	1.48892E- 05	7.77598E- 06	-5.043927	1126. 5	8765.5	8789.5		
インカンパニ ン3 (INCENP), mRNA	NP_692008.1	AC028235.12	nmwihuman3 OK6C2340	-1.693854	8.74991E- 05	0.000122 803	-4.933683	1136. 5	804	484.5		
インカンパニ ン4 (INCENP), mRNA	NP_692008.1	AC028235.12	nmwihuman3 OK6C2340	-1.764079	2.56992E- 05	7.75729E- 05	-4.697759	1156	16693.5	14033.25		
CDK検査ノー ゼン (CLK1), 転写 促進因子, mRNA	NP_004062.2	NM_004071.2	nmwihuman3 OK6C2340	-2.034707	6.15281E- 05	6.99321E- 05	-5.146308	1157. 5	12169	7934.75	4	
インカンパニ ン5 (INCENP), mRNA	NP_663731.1	NM_145893.1	nmwihuman3 OK6C2340	-1.851742	1.40757E- 07	2.99753E- 07	-4.301725	1162. 5	3757	2606	2	
インカンパニ ン6 (INCENP), mRNA	NP_005593.1	NM_005572.2	nmwihuman3 OK6C2340	-1.724223	9.83727E- 05	5.67958E- 05	-4.305026	1162. 5	4447	3295	10	
インカンパニ ン7 (INCENP), mRNA	NP_004062.2	AC029465.15 118908.15149	nmwihuman3 OK6C2340	-1.39662	6.30031E- 08	4.32950E- 08	-6.430308	1163. 5	26795.5	26493.5		

Figure 6 (続き)

【图 6-18】

遺伝子名称 & 記号	TanYクセンシ ン	mRNA 参照配列 アクセッ ション	MNC アローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の速度 中央値	非腫瘍組 織の速度 中央値	血液
LIG4 chr1:50002303 hg19: 7238 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		BC007768	nwghuman3 OKFB:4542	-1.5f6362	5.21322E- 08	3.51403E- 05	4.463332	1171	21189	30075	
ZNF272 chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		AC027086.2 3093.31927.1	nwghuman3 OKFC:8882	-1.59003	1.16113E- 11	3.82785E- 07	6.295271	1172_5	2757	2062.75	
NF_YBPA1 chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		NM_003540.2	nwghuman3 OKFA:39559	-2.01277	6.70509E- 08	1.15158E- 05	-4.384689	1175	4326	3464.5	4
ILKAP chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		AC038322.1 126404.12912	nwghuman3 OKFC:3101	-1.479602	6.01819E- 06	2.53657E- 05	-4.326856	1177	22091.5	20578.5	
ILKAP chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		NM_0147203.1	nwghuman3 OKFB:3532	-1.720336	3.28037E- 05	2.40129E- 05	-5.246863	1178	17912.5	14031	0
ILKAP chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		NM_005362.3	nwghuman3 OKFB:1047	-1.482619	7.48859E- 05	1.62038E- 05	-5.176445	1180_5	15210	14049.75	20
ILKAP chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		NM_004098.2	nwghuman3 OKFB:5279	-1.745086	9.4989E- 09	5.64177E- 07	-5.706572	1189_5	19390	10749.25	0
ILKAP chr1:100000000 hg19: 100000000 ENSEMBL: ENST000002638414 と類似		NM_018659.2	nwghuman3 OKFB:3465	-1.41555	6.70309E- 08	2.1091E- 08	-5.674137	1206	9672.6	7512.25	0

Figure 6 (続き)

【図6-19】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロロー ブ名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
h2591の Pro2591 タンパク質		AF19086	mwghuman3 OK4B11001	-1.487408	7.8937E- 05	1.90297E- 05	-4.929088	1212	27543.5	26689	0
アナンブルジ ンスキャン予測		AC016432.3 94813877.1	mwghuman3 OK4C30539	-3.528975	4.33492E- 13	5.09294E- 08	-6.731611	1216 5	3962.5	1303	
アナンブルジ ンスキャン予測		AF288885.1 637211686.3	mwghuman3 OK4C7809	-1.83021	1.14445E- 05	5.11795E- 05	-4.353188	1218	21163.5	21224.5	
ジンクフィン グリン スキャン予測		NM_145011.2	mwghuman3 OK4C1646	-1.473477	6.43814E- 08	4.39893E- 07	-5.84264	1253 5	21026.5	18171	1
ジンクフィン グリン スキャン予測		NM_145297.2	mwghuman3 OK4B1148	-1.773183	2.31455E- 06	6.63845E- 05	-4.284361	1265	14806.5	10341	1
増殖抑制及CDNA 複製抑制性 (G1045B) mRNA		NM_016675.1	mwghuman3 OK4A30637	-1.950707	0.002000 32	2.03519E- 05	-5.558029	1270 5	13309	8615.5	5
ネブレット (NEB1) 転写産物、 mRNA		NM_006934.1	mwghuman3 OK4A14459	-1.513391	1.95755E- 05	3.15409E- 05	-4.789714	1278	22936	20052.5	1

Figure 6 (続き)

【図6-20】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロロー ブ名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
固定型タンパク質 pro9832 pro9832 リンクタン グリン スキャン予測		NM_018541	mwghuman3 OK4A30371	-1.457098	3.06355E- 05	6.93211E- 05	-5.164495	1289 5	16992.5	14266.5	
REX1, RNAエ ク スクリン スキャン予測		NM_014601.4	mwghuman3 OK4A110680	-1.553366	7.76079E- 07	2.37453E- 06	-5.842285	1292	6288.5	4684.5	1
増殖抑制及CDNA 複製抑制性 (REX1), mRNA		NM_002656.3	mwghuman3 OK4B3218	-1.36857	1.73225E- 05	2.36069E- 05	-5.111364	1305 5	4993	3308.5	6
アナンブルジ ンスキャン予測		AL028041.2 56466.1	mwghuman3 OK4C55406	-1.533348	1.08377E- 05	2.806E- 05	-4.693772	1313	28510	27960.5	
アナンブルジ ンスキャン予測		AL398203.4 942251911.1	mwghuman3 OK4C38900	-1.894452	4.41409E- 05	0.000128 14	-4.850026	1320	11214.5	7546	
固定型タンパク 質と類似 (LOC440804), mRNA		NM_006936.3	mwghuman3 OK4B14832	-1.049648	5.38047E- 11	1.51689E- 07	-6.579174	1332	3647	996.5	0

Figure 6 (続き)

【図6-21】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロロー ブ名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
染色体 フレーム シフト (C10r1f18), mRNA		NM_179494.1	mwghuman3 OK4C11529	-1.448331	1.77522E- 05	2.52057E- 05	-5.140183	1334	27414	24082.75	0
染色体 フレーム シフト (C20r1f152), mRNA		NM_006934.1	mwghuman3 OK4C3261	-1.348612	8.84261E- 06	1.82138E- 05	-4.387286	1349	10775	8852.5	0
アナンブルジ ンスキャン予測		AL380766.1 35686142262	mwghuman3 OK4C4645	-1.516487	5.60395E- 05	4.81914E- 05	-4.642986	1352	28468.5	27079.25	
ホスホリ ン スキャン予測		NM_002863.3	mwghuman3 OK4A30432	-2.190281	5.14475E- 06	0.00069 559	-4.315788	1368 5	10286.5	7222	21
アナンブルジ ンスキャン予測		AC013764.3 17501157349	mwghuman3 OK4C3627	-1.671949	8.77886E- 06	7.34568E- 05	-4.28185	1395 5	1205	828.5	
フォリスチン スキャン予測		NM_015082.1	mwghuman3 OK4B32610	-1.544042	4.78588E- 05	4.36418E- 05	-4.937654	1405 5	17051	12819	0

Figure 6 (続き)

【図6-22】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロロー ブ名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
染色体 フレーム シフト (C10r1f18), mRNA		NM_031427.1	mwghuman3 OK4B34011	-1.512002	1.56095E- 05	5.97939E- 05	-4.695177	1414	15738	14705.75	1
アナンブルジ ンスキャン予測		NM_001182.2	mwghuman3 OK4A30361	-1.837545	4.80727E- 07	0.000105 506	-3.903403	1439	20103.5	14945.5	2
アナンブルジ ンスキャン予測		AC010904.3 83204857.4	mwghuman3 OK4C7433	-1.40403	4.47559E- 05	3.07694E- 05	-4.852228	1444	27423.5	25979.25	
カリクレイン シノバシン (KLK8), 転写 産物、mRNA		NM_144505.1	mwghuman3 OK4B1029	-2.091505	3.56008E- 06	2.61685E- 06	-5.991679	1446 5	8391	6488	0
ロイジン シノバシン (LIG1), mRNA		NM_032287.2	mwghuman3 OK4B3710	-1.501021	2.6568E- 06	1.22937E- 05	-4.280727	1454 5	16509.5	14157	0
2つの ホスホリ ン スキャン予測		NM_017901.3	mwghuman3 OK4B37759	-1.497443	4.32398E- 05	3.32944E- 05	-4.567011	1460 5	17545	11635.75	8

Figure 6 (続き)

【図6-23】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
収束タンパク質 MGC11242 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.527839	2.70218E-05	1.72268E-05	-4.004461	1463.5	17566	13134.5	0
ホスホリラーゼ 活性タンパク質 MGC11242 mRNA	NP_060486.2	NM_018026.2	mwghuman3 OK4617703	-1.464259	5.53361E-05	7.35585E-05	-4.589266	1482.5	9352	7757.75	19
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_058464.1	NM_014431.1	mwghuman3 OK461306	-1.533764	1.02161E-05	4.59222E-05	-4.89538	1486.5	15372.5	14632	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_058464.1	NM_014431.1	mwghuman3 OK461306	-1.41842	7.87044E-05	2.27276E-05	-5.659345	1488.5	8039	5085	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_058464.1	NM_014431.1	mwghuman3 OK461306	-1.525681	2.39913E-05	7.36586E-05	-4.620984	1489.5	21082	20253	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_058464.1	NM_014431.1	mwghuman3 OK461306	-1.469388	3.60065E-05	7.09197E-05	-4.489468	1494	4851	7579.25	10
グリコフォリン C (Glycophorin C) mRNA	NP_002082.1	NM_002101.3	mwghuman3 OK461276	-1.628029	9.49623E-06	0.000135	-4.110107	1502	8042	6771	2

Figure 6 (続き)

【図6-24】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.402822	3.03035E-06	0.000105	-4.471835	1504	13882.5	11233.25	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.273265	1.46830E-05	4.32856E-06	-5.673395	1505.5	4650	3232.25	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.658359	1.32347E-05	2.82396E-05	-4.522341	1506.5	17637.5	14140.5	5
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.626206	5.57628E-05	2.58753E-05	-4.952263	1509.5	20943	14940.5	1
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.528665	7.51739E-05	2.89398E-05	-5.005478	1511.5	23554.5	20060	3
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.485933	6.40488E-05	7.36586E-05	-4.506649	1520.5	22288	20240.75	0

Figure 6 (続き)

【図6-25】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.466889	8.43287E-06	3.15409E-05	-4.387922	1529	4947.5	4850.25	9
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.497795	0.001215	9.05298E-05	-5.38489	1531.5	9574.5	6333.5	9
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.589661	1.17586E-05	3.32944E-05	-4.802532	1535	5885	3946.75	10
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.588633	8.03895E-06	0.000105	-4.741233	1536	1384.5	10367.5	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-3.022239	2.51326E-05	9.24398E-06	-5.846282	1548	1650.5	7500.5	0

Figure 6 (続き)

【図6-26】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.704609	8.00302E-05	0.000166	-4.427372	1551.5	18629	15080.75	5
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.872814	4.27782E-05	0.000142	-4.312941	1556.5	9795	6947.25	4
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.888405	1.18577E-05	9.05298E-05	-4.735768	1570	20158	14933.5	4
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.610345	5.60270E-05	8.1895E-05	-4.437657	1571.5	22494.5	18945.75	0
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.535083	6.75303E-06	4.84059E-05	-4.77065	1574	8049	4838.75	6
収束タンパク質 XN_036406 mRNA	NP_077294.1	NM_024320.2	mwghuman3 OK46130	-1.348586	8.59727E-06	1.6224E-05	-4.71932	1579	15196	16712.25	13

Figure 6 (続き)

【图 6-28】

Figure 6 (続き)Figure 6 (続き)

【图 6-30】

Figure 6 (續左)Figure 6 (続き)

【図 6-3 1】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
マイクログル ブリン結合タン パク質 3 (MAG3), mRNA	NP_067679.5	NM_021647.5	mwghuman3 OKFA3217	-1.957417	0.001373 75	1.98715E- 06	-4.959479	1785	22362	13475.25	3
細胞分裂 周期関連 7 (CCNA7), mRNA	NP_141482.2	NM_031942.3	mwghuman3 OKFA4810	-1.959599	9.25397E- 05	0.00150 05	-4.246093	1788	14826	12577.25	1
MDM2 結合 ドメイン 61 (MDM2), mRNA	NP_075910.1	NM_026234.1	mwghuman3 OKFA1624	-1.531798	0.001544 91	0.000105 505	-4.38785	1801. 5	9756.5	8041.75	3
タンパク質 キナーゼ AMP 活性化サブユ ニット (PRKAB1), mRNA	NP_036244.2	NM_006263.4	mwghuman3 OKFA0468	-1.514877	9.29448E- 05	0.000105 505	-4.4386	1805. 5	16011.5	13854	3
ジンクフィン フィンクド (ZNF102), mRNA	NP_055998.1	NM_008007.1	mwghuman3 OKFA10213	-1.857623	2.78105E- 06	2.67916E- 05	-4.781221	1808. 5	6856.5	4560.25	13
prc825 OKFA334に類似			mwghuman3 OKFA7208	-1.359998	8.48914E- 05	8.30077E- 05	-5.267744	1817	19166	16438	

Figure 6 (続き)

【図 6-3 2】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
カスラーゼ (CAT), mRNA	NP_001745.1	NM_001752.2	mwghuman3 OKFA3550	-2.226876	8.1338E- 07	6.92439E- 05	-4.777365	1820	7219.5	4238.75	31
ペプタジプロテ インシメラーゼ (シグロイリ ン) (SIGIRR), mRNA	NP_580480.1	NM_148175.1	mwghuman3 OKFA5562	-1.384263	4.77437E- 07	4.58274E- 05	-5.336075	1834. 5	3806	3514	5
ペリケン (PCSK), mRNA	NP_570988.1	NM_181882.1	mwghuman3 OKFA31781	-1.390169	1.03356E- 05	6.63845E- 05	-4.549694	1838	19543.5	17122.5	0
乳癌増殖配列 3 (BCAS3), mRNA	NP_080148.2	NM_017679.2	mwghuman3 OKFA31576	-1.41274	2.55422E- 07	3.64015E- 06	-4.03611	1839	15764.5	17960.25	2
ヒゲリンペ アザン (HIF1A), mRNA	AAF65598.1	AF141307.1	mwghuman3 OKFA1170	-1.284232	2.27894E- 05	1.85352E- 05	-4.071282	1850	22760.5	20044.75	
アナンチン アナンチン アナンチン		AC012055.13 12846.17413	mwghuman3 OKFA27012	-1.517896	0.0001343 14	0.000172 435	-4.407353	1854	28139.5	25070.5	
アナンチン アナンチン アナンチン		NM_015308.1	mwghuman3 OKFA88897	-1.360042	0.0001194 22	2.15085E- 05	-5.532889	1855	17142	14814.25	11

Figure 6 (続き)

【図 6-3 3】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アルドセドレ ドリン (ALDOA), mRNA	NP_038322.2	NM_012130.2	mwghuman3 OKFA07479	-2.396851	2.32608E- 05	0.00157 701	-3.740555	1856. 5	13469	8186.5	3
アスチニ ン (ASTN1), mRNA		AF001457.3.8	mwghuman3 OKFA2738	-1.603991	4.05610E- 06	5.9789E- 05	-4.353485	1870	3982	3594.75	
アスチニ ン (ASTN1), mRNA		AC016851.18 1191553.4	mwghuman3 OKFA2738	-1.392136	5.55423E- 07	1.72268E- 05	-4.532353	1873. 5	2463	1925.25	
OUT 5 (OUT5), mRNA	NP_060072.1	NM_017602.2	mwghuman3 OKFA1786	-1.721318	3.42749E- 06	1.37691E- 05	-5.355883	1894. 5	1453	1011	14
アスチニ ン (ASTN1), mRNA		AC026688.5.8 4699.93751.1	mwghuman3 OKFA2546	-1.660723	3.74624E- 06	2.40122E- 05	-5.203866	1859	3201	1676.5	
アスチニ ン (ASTN1), mRNA		NM_024331.2	mwghuman3 OKFA0381	-1.520517	5.83503E- 08	1.82138E- 05	-4.163769	1906	8786	6894	2
ヒゲリンペ アザン (HIF1A), mRNA	NP_026033.1	NM_026122.2	mwghuman3 OKFA07564	-1.736687	1.72294E- 05	1.22307E- 05	-5.445150	1911. 5	18067	13997.25	1

Figure 6 (続き)

【図 6-3 4】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
KIA11843タン パク質 (KIA11843), mRNA	NP_055767.1	NM_014872.1	mwghuman3 OKFA2555	-1.400381	1.30483E- 05	7.36586E- 05	-4.350759	1913. 5	10972	8888.5	12
Oral (Hsp40) タンパク質 8 (Hsp40), mRNA	NP_496647.1	NM_058246.3	mwghuman3 OKFA0464	-1.455502	9.60914E- 05	0.000150 05	-4.286034	1917	3809	2855.5	14
トシド結合 3 (TOSID3), mRNA	NP_002297.1	NM_002206.1	mwghuman3 OKFA10506	-1.33723	6.66527E- 05	2.55121E- 05	-4.690215	1923	2753	1803.5	6
PTPRRタン パク質 (PTPRR), mRNA	NP_003612.1	NM_003621.1	mwghuman3 OKFA3552	-1.815445	1.28489E- 05	2.98753E- 05	-4.14602	1937. 5	6372.5	4594.5	2
ペリケン (PCSK), mRNA	NP_037406.1	NM_013274.2	mwghuman3 OKFA51279	-1.395657	3.5582E- 05	2.84753E- 05	-4.759554	1938	15108.5	11461.25	8

Figure 6 (続き)

【図 6-36】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッ ション 番号	mRNA 参照配列 アクセッ ション 番号	MWG プローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ラン ク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
キネシンファミリー メンバー3と類似 配列: 5265 画像: 4237/93		BC009843	mwghuman3 OKB5438	-1.51682	0.0001682 14	0.000462 131	-4.531075	1992	2307.15	21809.75	
カリウム チャネル β1サブユニット ドメイン含有3 [ICBT3], mRNA	NP_057205.2	NM_015121.3	mwghuman3 OKFA0436	-1.39306	1.34589E- 05	5.38262E- 05	-4.810824	1994, 5	17479.5	13203.75	3
アンサンブルジ ンキサンチン タンパク質		AC016425.3.1 53124, 16675	mwghuman3 OIFC3825	-1.49354	0.0001495 25	0.000192 131	-4.315269	1997	25336	25414.75	
グアニンヌクレ オチド結合タン パク質 [GNA1] ファミリー 阻害剤結合ド メイン プロトド, mRNA	NP_002604.4	NM_002059.4	mwghuman3 OKFA-10201	-1.621361	5.34686E- 06	0.000433 377	-3.855346	2003	15603.5	14062	1
微小管結合 タンパク質4 [MAP4] 転写変異1, mRNA	NP_002660.2	NM_002375.3	mwghuman3 OKBE4355	-1.468752	0.0001551 87	0.000257 25	-4.423897	2004	10052	9060	11

Figure 6 (続き)

【图 6-38】

遺伝子名称、 記号	mRNA タンパク質 アクセッション 番号	MIMC プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t検定	ウィル コソン 検定	SAM	ラング スコア 中央値	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
筋収縮タンパク質 FLJ22965 (PLOC2845), HNF1A	NP_022101.2	nwghuman3 DKAB139776	-1.903469	7.1695E- 05	0.000475 592	-4.078944	2041. 5	2357	0	
細胞周期抑制 タンパク質 p21 ^{CIP1} CDKN1A PLOC2845, HNF1A	NM_023207.2	nwghuman3 DKIB39555	-1.969819	3.0553E- 05	0.000105 503	-4.576244	2049	16457.5	0	
スフィンゴシン 代謝酵素 SPTLC1 PLOC2845, HNF1A	NM_030791.2	nwghuman3 DKIB1409	-1.477332	4.9003E- 05	0.000142 749	-4.328137 5	20094	17541.5	1	
プレックストリ ン PLOC2845, HNF1A	NP_006125.2	nwghuman3 DKAG35515	-1.355391	2.7051E- 05	0.000142 886	-3.863529	2072	14023	13225.25	1
筋収縮タンパク質 LOC2848374 (LOC283874)	NP_0010127 31.1	nwghuman3 DKAF52101	-1.376341	1.4573E- 05	2.67918E 05	-5.079993	2000. 5	23511.5	23000	1

Figure 6 (続き)

【図 6 - 3 9】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
ジクアリン タンパク質 (ZIKV-NS5A) mRNA	NP_076976.1	NM_024071.2	mwgHuman3 OKB40542	-1.579562	0.001142 53	0.000342 648	-4.238027	2094	2864.5	2740.25	0
アキチン タンパク質 (ACTA1) mRNA	NP_004464.2	NM_004473.3	mwgHuman3 OKB40789	-1.67652	1.3104E- 05	0.000192 131	-3.837954	2107	7269	5263.75	0
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_008820.8	NM_008820.8	mwgHuman3 OKB40582	-1.50059	5.72345E- 05	8.88581E- 05	-4.136509	2114	28576	27763.75	
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_008820.8	NM_008820.8	mwgHuman3 OKB40582	-1.363387	0.0001056 64	3.77672E- 05	-3.9371	2131	27002.5	27249.5	
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_115817.1	NM_028441.1	mwgHuman3 OKB40106	-1.423695	0.0001562 67	0.000211 886	-4.538085	2134.5	20393.5	17180.25	2
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_150298.2	NM_032266.2	mwgHuman3 OKB40444	-1.733187	1.98168E- 05	2.70894E- 05	-4.503363	2135	24769	18903	0

Figure 6 (続き)

【図 6 - 4 0】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_079618.3	NM_022781.3	mwgHuman3 OKB40558	-1.302905	2.55282E- 06	2.15085E- 05	-4.980001	2138	24546.5	22146.75	1
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_777549.1	NM_174889.2	mwgHuman3 OKB40576	-1.474373	8.439E-05	0.000359 234	-4.207401	2151.5	9215	7030.25	1
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_055701.1	NM_014886.2	mwgHuman3 OKB40526	-1.665933	0.0003187 58	0.000371 707	-4.786546	2183	7590	5545.5	6
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_292301.3	NM_292301.3	mwgHuman3 OKB40134	-1.639786	7.64251E- 07	4.32656E- 06	-5.437632	2155		18381.5	12815.25
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_004744.2	NM_004753.4	mwgHuman3 OKB40738	-1.438285	4.35632E- 05	0.000322 464	-3.974197	2186.5	4626	3570	3

Figure 6 (続き)

【図 6 - 4 1】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_00013.1	NM_000022.1	mwgHuman3 OKB40287	-1.804252	0.0001969 67	0.00022 464	-4.158771	2178.5	21426	18241	1
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_00013.1	NM_000022.1	mwgHuman3 OKB40287	-1.518222	0.0001284 09	0.000174 117	-4.407239	2174	25713.5	23916	
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_006533.1	NM_006542.1	mwgHuman3 OKB40492	-1.359218	5.91029E- 05	1.22837E- 05	-4.628131	2177.5	18648	16566	4
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_201888.1	NM_033331.1	mwgHuman3 OKB40783	-1.438488	0.0001500 76	0.000245 124	-4.702865	2178.5	23322	22371	2
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_004520.1	NM_004520.1	mwgHuman3 OKB403725	-1.503791	3.87447E- 05	0.000311 603	-4.282874	2188	20164.5	17482	4

Figure 6 (続き)

【図 6 - 4 2】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ラング 中央値	非腫瘍組 織の強度 ラング 中央値	血液
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_000775.1	NM_000784.2	mwgHuman3 OKB40742	-1.399006	4.05018E- 05	3.91278E- 05	-4.065863	2197	20714	13781.5	10
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_000775.1	NM_000784.2	mwgHuman3 OKB40742	-1.649379	5.92894E- 08	3.84322E- 05	-5.055927	2201	6449.5	4787.5	
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_000775.1	NM_000784.2	mwgHuman3 OKB40742	-1.279742	2.53383E- 05	1.72266E- 05	-4.893287	2205.5	3722.5	3385.25	0
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_000775.1	NM_000784.2	mwgHuman3 OKB40742	-1.349603	2.94705E- 06	7.88154E- 05	-4.282185	2213	21381.5	17800.75	
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_000775.1	NM_000784.2	mwgHuman3 OKB40742	-1.789275	0.0003405 69	0.000454 027	-4.413577	2221.5	6261.5	5176	0
アミグダリン タンパク質 (AMY1) mRNA	NP_000775.1	NM_000784.2	mwgHuman3 OKB40742	-1.469848	5.40285E- 05	0.000157 701	-4.384409	2223.5	14138	11702.5	4

Figure 6 (続き)

【图 6-44】

Figure 6 (続き)

【图 6-46】

Figure 6 (續表)Figure 6 (續表)Figure 6 (続き)

【図 6-47】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MWG プローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コソン 検定	SAM	ランク スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値
複製着点タンパク質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506	-4.166213	2374	15233.5	9767.75
アンサンブルジ ンシンゲンタンパク 質 FLJ20032 (FLJ20032), mRNA	NP_060069.2	NM_017628.2	rwgmuamr3 OKB52065	-1.74414	5.6106E- 05	0.000105 506				

Figure 6 (続き)

【图 6-48】

[illegible]

Figure 6 (続き)

【图 6-49】

遺伝子名称/ 通称 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照 アクセッション 番号	MWG プロローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	リンク スコア	腫瘍組織 の発現 リンク 中央値	非腫瘍組 織の発現 リンク 中央値	血液
ASF-B様転写 調節因子 (SLIM) 転写変種1、 mRNA	NF_0793031.2	NM_024755.2	mwghuman3 OKFB:2154	-1.309539	2.00444E- 05	0.001722 893	-4.680459	2477. 5	12490	12290	12
グアニンヌク レオチド結合 タンパク質 ファミリー のメンバー の1つ、 糖基化基様ホ リペプチド、 呼吸タイプ (GNAL)、転写 変種2、 mRNA	NF_302062.1	NM_002071.1	mwghuman3 OKFA:35286	-1.835112	0.003002 5	0.00498 109	-4.10637	2478	19959	16890.75	0
IGF1R生成 調節因子14b175 と類似		XU_005362	mwghuman3 OKFB:7385	-1.746096	0.0011946 23	0.00493 377	-3.872815	2487	14791.5	9814.5	
PHDドメイン及び ロドリンシリン タンパク質ホス タンキナーゼ (Pli PP1、 mRNA	NF_519431.1	NM_194449.1	mwghuman3 OKFB:2242	-2.043619	0.00039079 45	0.00498 109	-4.066924	2500	15125	10009.75	7

Figure 6 (続き)

【图 6-50】

[illegible]

Figure 6 (続き)

【図 6-5 1】

遺伝子名称/ 記号	タンパク質 アクセッション 番号	mRNA 参照配列 アクセッション 番号	MW プローブ 名称	中央値 変化倍数	t-検定	ウィル コクソン 検定	SAM	ラング スコア	腫瘍組織 の強度 ランク 中央値	非腫瘍組 織の強度 ランク 中央値	血液
グリリンデヒ ドロキサム トコゲナ (糖カルボキ シル化: グリ ンデヒドロキ シラゼ、グ リリン切断系 タンパク質)	NP_000181.1	NM_000170.1	rwgHuman3 OKAB.8939	-1.405094	9.33312E- 05	0.000116 76	-4.398207	2942. 6	6039	4550.5	1
プロセリン セリン、35 アミノ酸) (PHSSSS), mRNA	NP_699183.1	NM_153962.1	rwgHuman3 OKAB.3391	-1.451618	0.0002370 39	0.000257 25	-4.319803	2645	16909	14109	0
アクリンギラ ンズアブド ン	AC008134.3.1 _175132.1	AC008134.3.1 _175132.1	rwgHuman3 OKAB.3643	-1.601839	0.0003788 4	0.000286 693	-4.042634	2545	27071.5	25825	
17βH結合カセツ サファアミール (AAGC) ペンバー-12 (AGCA17), 転写数量、mRNA	NP_775099.2	NM_173676.2	rwgHuman3 OKAB.3505	-1.653773	0.0002371 73	0.000475 592	-3.927921	2651. 5	19931	18593.5	0
ペラリ グロビン (ヒトロ ン)の サプレッ (SUH3), mRNA	NP_060136.1	NM_017696.2	rwgHuman3 OKAB.2504	-1.678106	0.0001863 59	0.000546 156	-3.864729	2596	17527	15364.5	1

Figure 6 (続き)

【图 7-1】

[illegible]

Figure 7

【図 7-2】

遺伝子名称/記号	タンパク質	mRNA参照配列 アラセクション	中央値変化 スコア	腫瘍組織の 中央値	非腫瘍組織の 中央値	血液の 指定数
染色体11p15.5-アレルゲング7p-41 (C10orf11)	NP_027598.4	NM_032761.1	-1.81728	12025.5	9585.25	0
BCL2関連因子17p (BAG1), mRNA	NP_004314.3	NM_004323.3	-2.52647	903.1	4803.5	1
配列多型性をもつ7p-41, 7p-8 (F1M43), mRNA	NP_612373.1	NM_136389.1	-1.357114	15303.5	13004.75	1
線粒体複製増進因子受容体4 (FCF4), 転写 産物2, mRNA	NP_073522.2	NM_022693.2	-2.63848	17096	9762.5	0
中央値スコア因子, mRNA	NP_005318.1	NM_003417.3	-1.466937	21139	10266.25	0
NP_057579.4, mRNA	NP_065087.1	NM_0474703.1	-1.720329	17312.5	14031	0
染色性抑制-2 (DOXA1) (EMX2), mRNA	NP_004099.1	NM_004099.2	-1.76985	13500	10749.25	0
染色体19p13.3 (H0303), mRNA	NP_062458.1	NM_019559.2	-1.92455	7575.5	7575.5	0
シグナルペプチド結合ドメイン26 (ZNF526), mRNA	NP_067630.1	NM_145297.2	-1.731383	1266	14806.5	1
染色体17p11.2-アレルゲング7p-41 (F1M44), mRNA	NP_059714.1	NM_014901.4	-1.353386	5288.5	4884.5	1
染色体17p11.2-アレルゲング7p-41 (F1M45), mRNA	NP_005566.1	NM_005566.3	-1.732075	1309	12139.5	0
染色体17p11.2-アレルゲング7p-41 (F1M46), mRNA	NP_038696.3	NM_038696.3	-4.04648	1332	896.5	0
染色体20p12-アレルゲング7p-41-152 (Z00rf152), mRNA	NP_549294.1	NM_080894.1	-1.349812	1349	8652.5	0
染色体20p12-アレルゲング7p-41-152 (Z00rf153), mRNA	NP_055897.1	NM_015062.1	-1.340042	1405.5	12319	0
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_119615.1	NM_031427.1	-1.512002	1414	15739	1
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_055088.1	NM_144505.1	-2.091505	1445.5	14705.75	1
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_115663.2	NM_032287.2	-1.501021	1454.5	8391	0
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_077286.1	NM_054320.2	-1.527859	17665	14157	0
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_055246.1	NM_014431.1	-1.141942	8059	13134.5	0
KIAA1374 (KSA1427), mRNA	NP_077286.1	NM_054320.2	-1.527859	17665	14157	0
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_055246.1	NM_014431.1	-1.141942	8059	13134.5	0
染色体16p11.2-アレルゲング7p-41-168 (C10orf168), mRNA	NP_077286.1	NM_054320.2	-1.527859	17665	14157	0

Figure 7 (續之)

【图 7-3】

遺伝子名称/記号	タンパク質 アクセッション 番号	rRNA参照配列 アクセッション 番号	中央値変化 係数	ランク スコア	腫瘍組織の 免疫スコア 中央値	非腫瘍組織の 免疫スコア 中央値	血液の 免疫スコア 中央値
ブラスチン1 (ブラスチンA) (BLST1), mRNA	NF_002691.1	NM_003870.1	-1.4262026	1503.5	2304.3	1404.5	1
ブラスチン2 (ブラスチンB) (BLST2), mRNA	NF_007437.1	NM_010555.2	-1.168659	1596	1394.5	1937.5	0
ブラスチン3 (ブラスチンC) (BLST3), mRNA	NF_007438.1	NM_010556.2	-1.322259	1548	1394.5	1937.5	0
ブラスチン4 (ブラスチンD) (BLST4), mRNA	NF_007439.1	NM_010557.2	-1.398461	1657.5	1065.5	935.5	0
ブラスチン5 (ブラスチンE) (BLST5), mRNA	NF_005226.1	NM_010441.2	-1.380055	1660	1573.5	121.1	0
ブラスチン6 (ブラスチンF) (BLST6), mRNA	NF_001173.1	NM_003545.1	-2.043346	1759	1392.5	1175.8	0
ブラスチン7 (ブラスチンG) (BLST7), mRNA	NF_007415.1	NM_010281.2	-4.204589	1770	1815.6	923.25	0
ブラスチン8 (ブラスチンH) (BLST8), mRNA	NF_114148.2	NM_031942.3	-1.355558	1788	1482.6	1257.25	1
ブラスチン9 (ブラスチンI) (BLST9), mRNA	NF_002603.1	NM_002631.2	-1.735687	1911.5	1806.7	1397.25	1
ブラスチン10 (ブラスチンJ) (BLST10), mRNA	NF_012370.3	NM_138361.3	-2.034574	1950.5	767.15	442.175	1
ブラスチン11 (ブラスチンK) (BLST11), mRNA	NF_002500.4	NM_002689.4	-1.631381	2003	1680.5	1408.2	1
ブラスチン12 (ブラスチンL) (BLST12), mRNA	NF_067258.2	NM_016174.3	-1.516413	2014	1665.25	1375.75	1
ブラスチン13 (ブラスチンM) (BLST13), mRNA	NF_071984.1	NM_025101.2	-1.590469	2041.5	259.6	237	0
ブラスチン14 (ブラスチンN) (BLST14), mRNA	NF_064652.1	NM_020272.2	-1.358819	2049	1647.5	1397.0	0
ブラスチン15 (ブラスチンO) (BLST15), mRNA	NF_065126.2	NM_019310.2	-1.395361	2072	1402.3	1322.25	1
ブラスチン16 (ブラスチンP) (BLST16), mRNA	NF_007597.1	NM_004773.2	-1.579562	2094	299.45	2740.25	0
ブラスチン17 (ブラスチンQ) (BLST17), mRNA	NF_004464.2	NM_004543.3	-1.679662	2107	726.0	5593.75	0

Figure 7 (続き)

【図 7 - 4】

遺伝子名称/記号	タンパク質 アクセッション	mRNA参照配列 アクセッション	中央値変化 ランクスコア	腫瘍組織の 免疫ラング 中央値	非腫瘍組織の 免疫ラング 中央値	血液の 免疫ラング 推定値
Myc-腫瘍ミトコンドリアタンパク質 (ミミチン)、mRNA	NP_777549.1	NM_174889.2	-1.474873	2151.5	921.5	7030.25
発生多能性阻害5に類似：胚性幹細胞 維持因子1 (LOC341912)、 mRNA	XP_282301.3	XM_282301.3	-1.635786	2155	18581.5	12815.25
ヘパシジン抗原ペプチド (HAMP)、 mRNA	NP_066988.1	NM_021175.2	-1.279742	2205.5	3722.5	3985.25
胚性的タンパク質BC009882 (LOC90113)、mRNA	XP_291077.3	XM_291077.3	-1.769275	2221.5	9381.5	5176
トリパータイゼン3-アミン (TRIM3)、mRNA	NP_006783.1	NM_006783.2	-1.750912	2286.5	4099.5	1365.5
Reg17 Reg17 (LOC90113)、mRNA	NP_006783.1	NM_006783.2	-1.576144	2320.5	2050	1701.75
LINメオボックス9 (LHX9)、転写 因子、mRNA	NP_054589.2	NM_020204.2	-1.374971	2333.5	18158	13872.25
タンパク質結合受容体51 (PR51)、 mRNA	NP_005449.5	NM_005449.5	-1.389185	2361	3420	2489.25
無名タンパク質発生候補 (LOC90113)、mRNA	NP_005449.5	NM_005449.5	-2.259109	2387.5	17288	11926.75
IP1アンカー分子様タンパク質 (GML)、mRNA	NP_002957.1	NM_002957.1	-1.439045	2405	16818	14265.75
プログラム細胞死1 (PCD1)、mRNA	NP_005009.1	NM_005009.1	-1.519488	2537	8575	7118.5
グリシンヒドロリナーゼ (糖カルボ キシル化；グリシンカルボキシラ ゼ、グリシン切断系タンパク質) (GLDC)、mRNA	NP_114097.2	NM_114097.2	-1.393019	2538	15593	12275.75
プログリン-セリン、35 (PR335)、mRNA	NP_001011.1	NM_001011.1	-1.405004	2542.5	6039	4550.5
	NP_001011.1	NM_001011.1	-1.451813	2545	16909	14109

Figure 7 (続き)

【図 8】

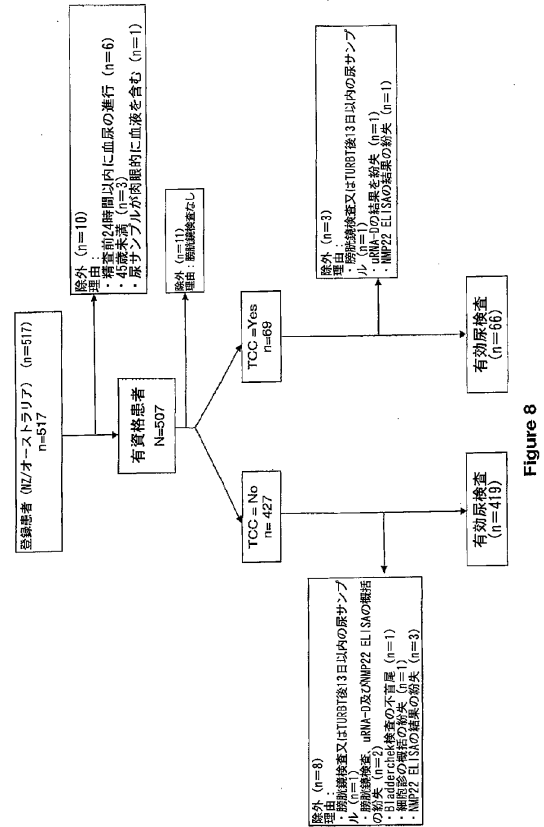


Figure 8

【図 9】

	不特定診断 (N=164)	非悪性疾患 (N=255)	TCC (N=66)	全体 (N=485)
国、n (%)				
ニュージーランド	147 (89.6)	239 (93.7)	64 (97.0)	450 (92.8)
オーストラリア	17 (10.4)	16 (6.27)	2 (3.0)	35 (7.2)
年齢、中央値 (IQR範囲)	64 (55, 75)	71 (62, 78)	71 (63, 80)	69 (59, 77)
性別、n (%)				
男性	112 (68.3)	216 (84.7)	61 (92.4)	389 (80.2)
女性	52 (31.7)	39 (15.3)	5 (7.5)	96 (19.8)
民族、n (%)				
ヨーロッパ人	133 (81.1)	228 (89.4)	62 (93.9)	423 (87.2)
マオリ	15 (9.1)	17 (6.7)	1 (1.5)	33 (6.8)
その他	16 (9.8)	10 (3.9)	3 (4.5)	29 (6.0)
血尿、n (%)				
発生後の年数				
6カ月未満	131 (79.9)	198 (77.6)	57 (86.4)	386 (79.6)
6カ月-1年	11 (6.7)	25 (9.8)	6 (9.1)	42 (8.7)
1-2年	11 (6.7)	18 (7.1)	3 (4.5)	32 (6.6)
3-5年	5 (3.0)	5 (2.0)	0 (0.0)	10 (2.1)
5年超過	6 (3.7)	9 (3.5)	0 (0.0)	15 (3.1)
最後のエピソードの終了				
1-7日	9 (5.5)	26 (10.2)	20 (30.3)	55 (11.3)
8-28日	14 (8.5)	27 (10.6)	13 (19.7)	54 (11.1)
1-2カ月	60 (36.6)	86 (33.7)	14 (21.2)	160 (33.0)
3-6カ月	70 (42.7)	100 (39.2)	19 (28.8)	189 (39.0)
6カ月超過	11 (6.7)	15 (5.9)	0 (0.0)	26 (5.4)
不明	0 (0.0)	1 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.2)
頻度				
1日に1回以下	104 (63.4)	160 (62.7)	30 (45.5)	294 (60.6)
1日に2回以上	59 (36.0)	95 (37.3)	36 (54.5)	190 (39.2)
不明	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)
喫煙歴、n (%)				
現在喫煙者	34 (20.7)	28 (11.0)	14 (21.2)	76 (15.7)
過去に喫煙者	66 (40.2)	114 (44.7)	35 (53.0)	215 (44.3)
非喫煙者	64 (39.0)	113 (44.3)	17 (25.8)	194 (40.0)

Figure 9

【図 10】

検査	全体的感度	全体的特異性
uRNA-D	62.1% (49.3, 73.8)	85.2% (固定)
NMP22 Elisa	50.0% (37.4, 62.6)	88.0% (84.6, 91.0)
NMP22 BladderChek	37.9% (26.2, 50.7)	96.4% (94.2, 98.0)
細胞診*	56.1% (43.3, 68.3)	94.5 (91.9, 96.5)
5遺伝子 (IL88Rbを含む) †	81.8%	85.1% (固定)
5遺伝子 (IL88Rbを含む) † (90%特異性)	72.7%	89.9% (固定)

* 幾人かの患者についてはTCCの決定に含まれる
† そのような信頼区間が提示されない試験データで決定された

Figure 10

【図 1 1】

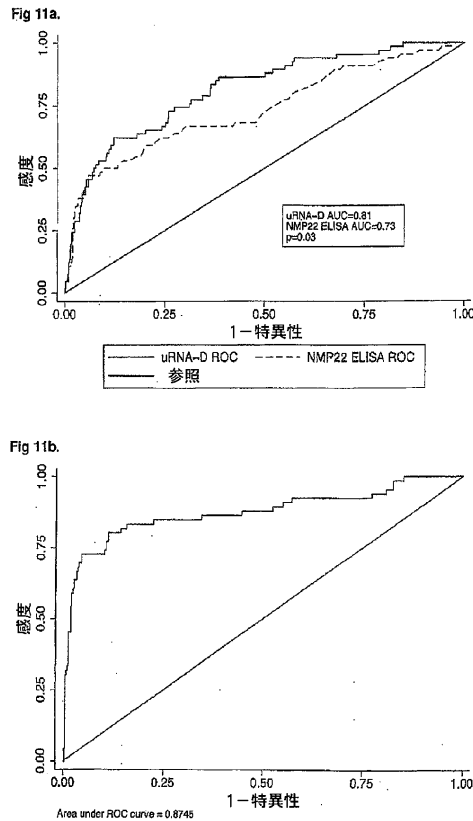


Figure 11

【図 1 3】

細胞診	NMP22 Elisa	NMP22 BladderCheck	uRNA-D*	5マーカー*
n, % (95% CI)	n, % (95% CI)	n, % (95% CI)	n, %	n, %
診断				
診断無し (n=164)				
154, 94% (89, 97)	144, 88% (82, 92)	160, 98% (94, 99)	144, 88%	144, 88%
非悪性疾患の診断				
良性前立腺肥大/前立腺炎 (n=130)				
123, 95% (89, 98)	117, 90% (84, 95)	127, 98% (93, 100)	113, 87%	109/128=85%
膀胱炎/尿道の感染又は炎症 (n=39)				
36, 92% (79, 98)	34, 87% (73, 96)	34, 87% (73, 96)	28, 72%	32, 82%
尿石症 (n=28)				
25, 89% (72, 98)	23, 82% (63, 94)	27, 96% (82, 100)	20, 71%	19, 68%
ワルファリンによる二次性血尿 (n=10)				
10, 100% (69, 100)	9, 90% (55, 100)	10, 100% (69, 100)	8, 80%	8, 80%
その他の泌尿器癌 (n=5)				
5, 100% (48, 100)	4, 80% (28, 99)	5, 100% (48, 100)	5, 100%	4, 80%
顕微鏡的血尿 (n=417)				
Yes n=99	87, 88% (80, 94)	81, 82% (73, 89)	91, 92% (85, 96)	74, 75%
No n=318	307, 97% (94, 98)	287, 90% (86, 93)	311, 98% (96, 99)	279/317=88%
クレアチニン (n=386)				
0-4.3, n=37	95, 90% (83, 100)	90, 93% (86, 97)	95, 98% (93, 100)	87, 90%
4.3-7.1, n=94	92, 98% (93, 100)	81, 86% (78, 92)	90, 96% (89, 99)	81, 86%
7.1-11.2, n=92	75, 86% (77, 92)	83, 90% (82, 95)	90, 98% (92, 100)	76, 83%
≥11.2, n=103	101, 98% (93, 100)	91, 88% (81, 94)	101, 99% (93, 100)	88, 85%
性別 (n=419)				
男性 n=328	311, 95% (94, 97)	290, 88% (84, 92)	316, 96% (94, 98)	291, 89%
女性 n=91	85, 93% (86, 98)	79, 87% (78, 93)	88, 97% (91, 99)	65, 71%

* 全体的特異性は85%に固定
 † 各特徴 (診断、顕微鏡的血尿、クレアチニン、性別) とCxbladder検査結果との間の関係に関するカイニ乗検定によるp値

Figure 13

【図 1 2】

細胞診	NMP22 Elisa	BladderCheck	uRNA-D	5マーカー
n, % (95% CI)	n, % (95% CI)	n, % (95% CI)	n, % (95% CI)	n, %
病期 (n=66)				
Tis (n=2)	2, 100% (16, 100)	0, 0% (0, 84)	0, 0% (0, 84)	1, 50% (1, 99)
Ta (n=37)	13, 35% (20, 53)	13, 35% (20, 53)	14, 38% (22, 52)	15, 41% (25, 58)
T1 (n=16)	11, 69% (41, 89)	12, 75% (48, 93)	8, 50% (25, 75)	15, 94 (70, 100)
T2 (n=9)	9, 100% (66, 100)	6, 67% (30, 93)	2, 22% (3, 60)	9, 100 (66, 100)
≥T3 (n=2)	2, 100% (16, 100)	2, 100% (16, 100)	1, 50% (1, 99)	2, 100%
WHO73の等級 (n=65)				
1 (n=3)	1, 33% (1, 91)	1, 33% (1, 91)	1, 33% (1, 91)	1, 33%
2 (n=38)	17, 44% (29, 62)	15, 39% (24, 57)	13, 34% (20, 51)	21, 55% (38, 71)
3 (n=24)	19, 79% (58, 93)	17, 71% (49, 87)	11, 46% (26, 67)	19, 79% (58, 93)
WHO ISUP 1998の等級 (n=65)				
低 (n=32)	9, 28% (14, 47)	10, 31% (16, 50)	13, 41% (24, 59)	13, 41% (24, 59)
混合型 (n=4)	4, 100% (40, 100)	3, 75% (19, 99)	1, 25% (1, 81)	4, 100 (40, 100)
高 (n=29)	24, 83% (64, 94)	20, 69% (49, 85)	11, 38% (21, 58)	24, 83% (64, 94)
腫瘍の位置 (n=66)				
膀胱 (n=62)	35, 56% (43, 69)	30, 48% (35, 61)	25, 40% (28, 54)	39, 63% (50, 75)
上部道 (n=4)	2, 50% (7, 93)	3, 75% (19, 99)	0, 0% (0, 60)	2, 50% (7, 93)
多発度 (n=66)				
単一 (n=52)	27, 52% (38, 66)	23, 44% (30, 59)	17, 33% (20, 47)	30, 58% (43, 71)
多発病巣 (n=13)	10, 77% (46, 95)	10, 77% (46, 95)	8, 62% (32, 86)	11, 85% (55, 98)
顕微鏡的血尿 (n=65)				
Yes (n=63)	27, 63% (47, 77)	27, 63% (47, 77)	20, 47% (31, 62)	31, 72% (56, 85)
No (n=22)	9, 41% (21, 64)	5, 23% (8, 45)	4, 18% (5, 40)	9, 41% (21, 64)
クレアチニン (n=55)				
0-4.3 (n=11)	5, 45 (17, 77)	3, 27% (6, 51)	4, 36% (11, 69)	4, 36% (11, 69)
4.3-7.1 (n=14)	9, 64% (35, 87)	6, 43% (18, 71)	4, 29% (8, 58)	8, 57% (29, 82)
7.1-11.2 (n=22)	11, 50% (28, 72)	14, 64% (41, 83)	11, 50% (28, 72)	16, 73% (50, 89)
≥11.2 (n=8)	6, 75% (35, 97)	3, 38% (9, 75)	2, 25% (3, 65)	6, 75% (35, 97)
性別 (n=66)				
男性 (n=61)	35, 57% (44, 70)	29, 48% (35, 61)	23, 38% (26, 51)	37, 61% (47, 73)
女性 (n=5)	2, 40% (5, 85)	4, 80% (28, 99)	2, 40% (5, 85)	4, 80% (28, 99)

* 各TCCの特徴とCxbladder検査の結果との間の関連に関するフィッシャーの正確検定によるp値

Figure 12

【図 1 4 a】

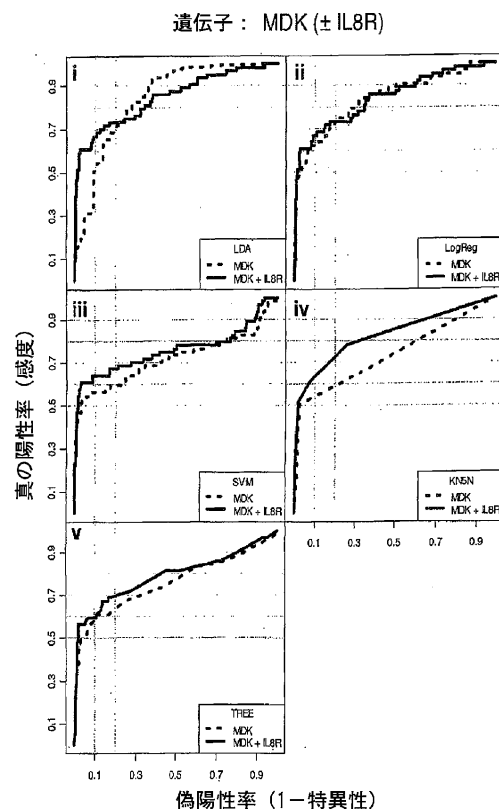


Figure 14a

【図 14 b】

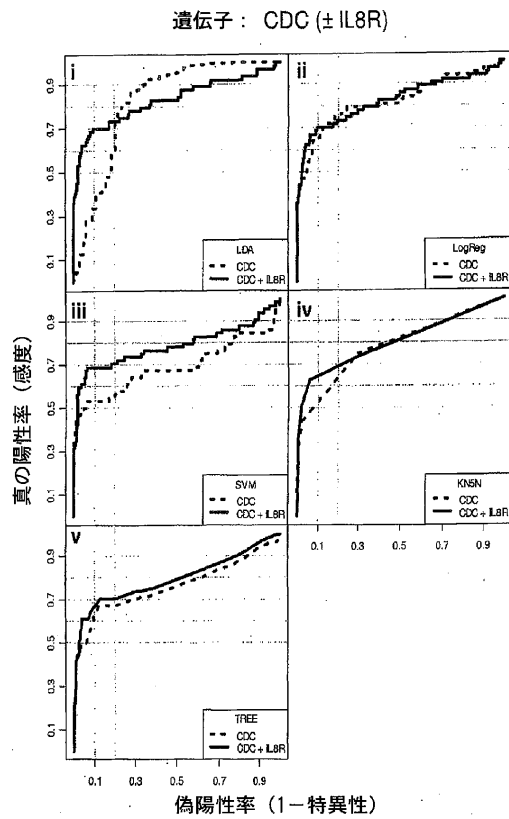


Figure 14b

【図 14 c】

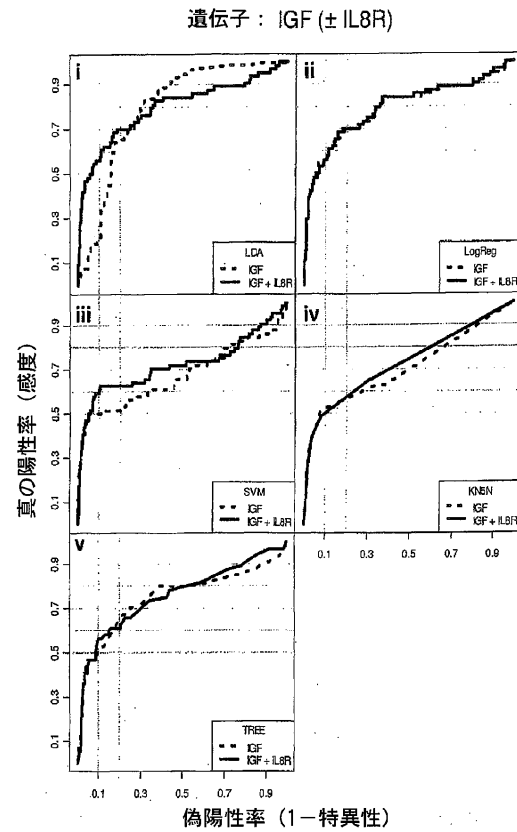


Figure 14c

【図 14 d】

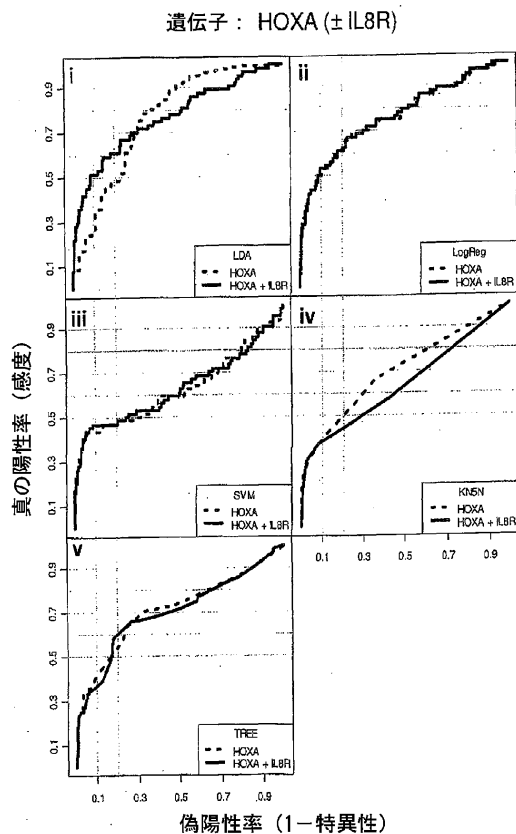


Figure 14d

【図 14 e】

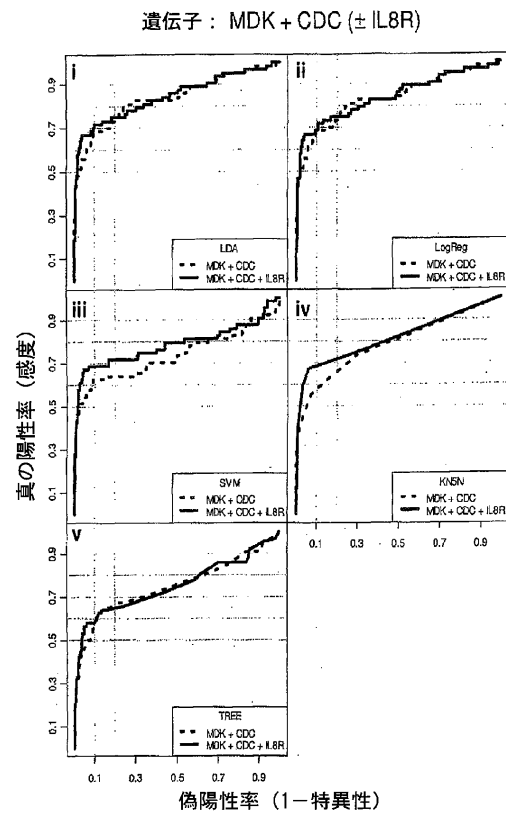


Figure 14e

【図 14 f】

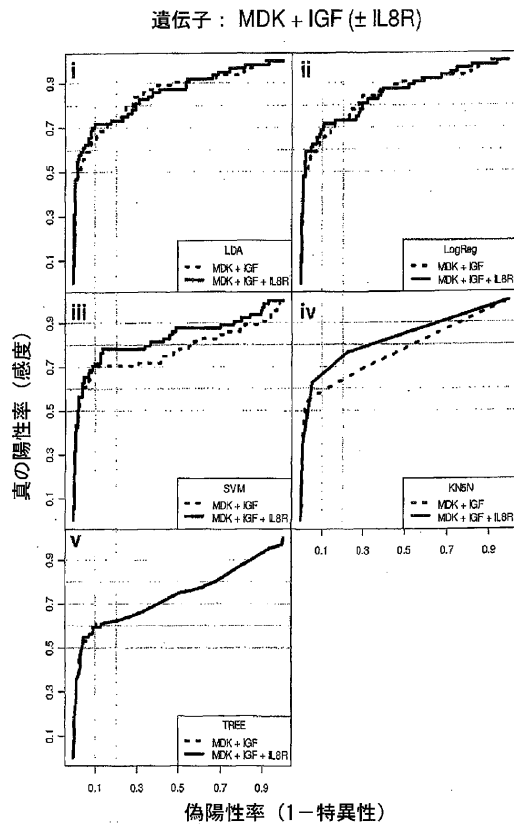


Figure 14f

【図 14 g】

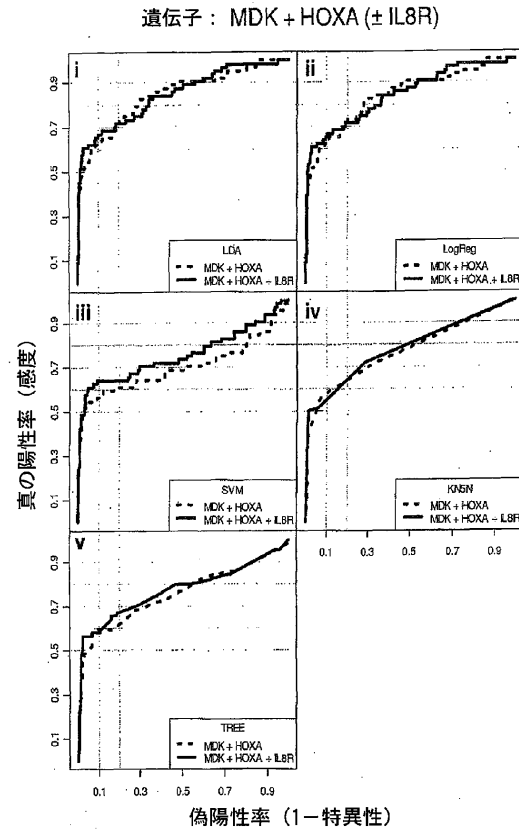


Figure 14g

【図 14 h】

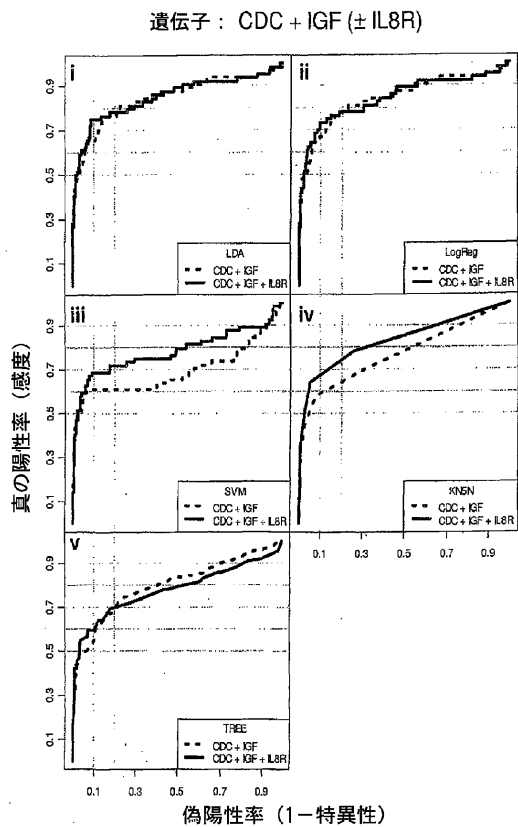


Figure 14h

【図 14 i】

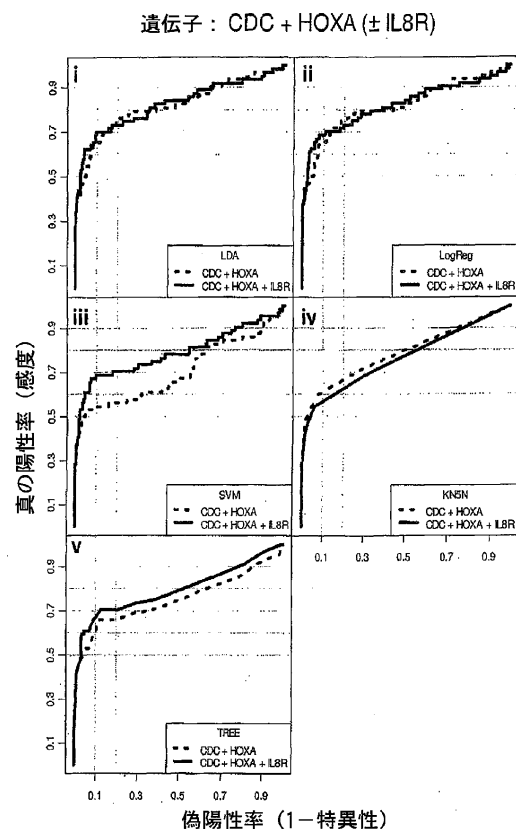


Figure 14i

【図 14 j】

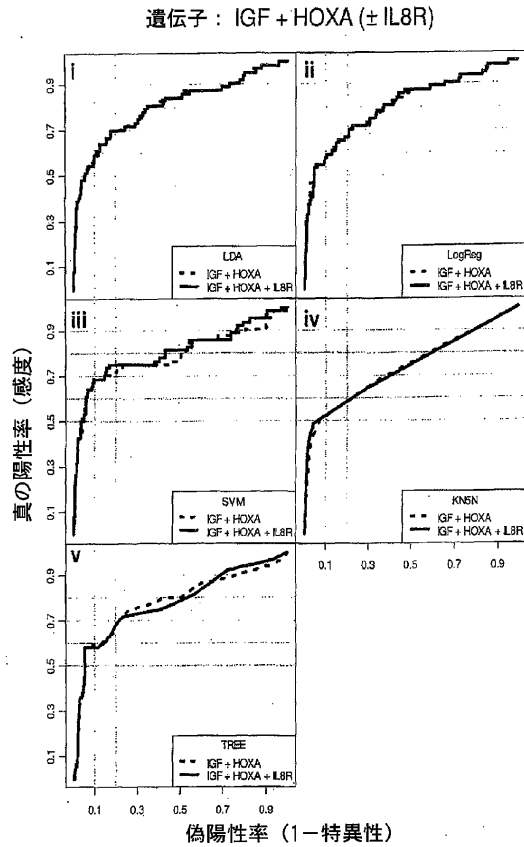


Figure 14j

【図 14 l】

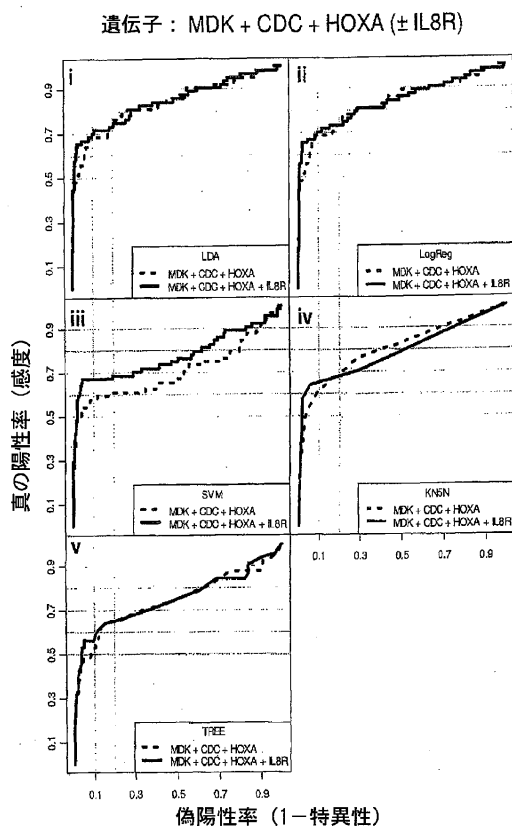


Figure 14l

【図 14 k】

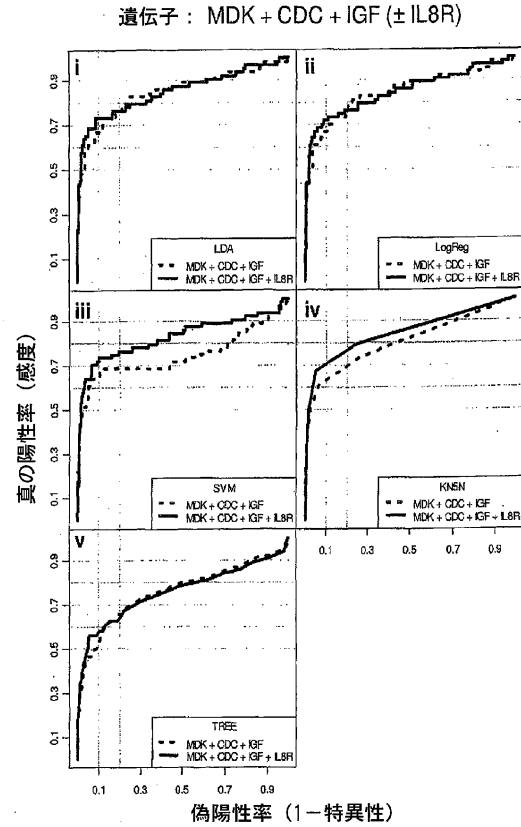


Figure 14k

【図 14 m】

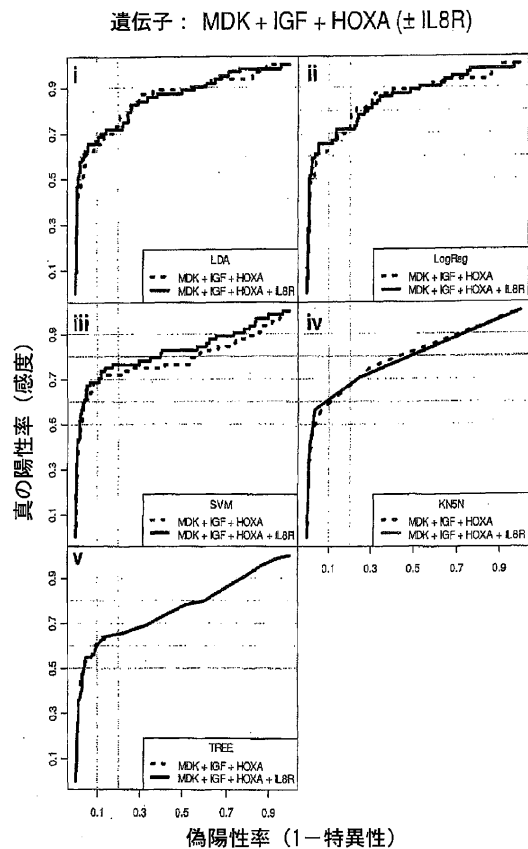


Figure 14m

【図 14 n】

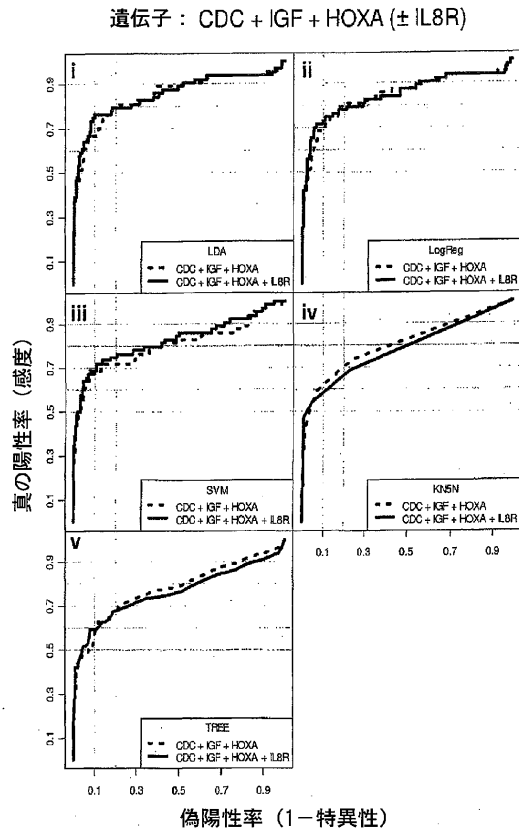


Figure 14n

【図 14 o】

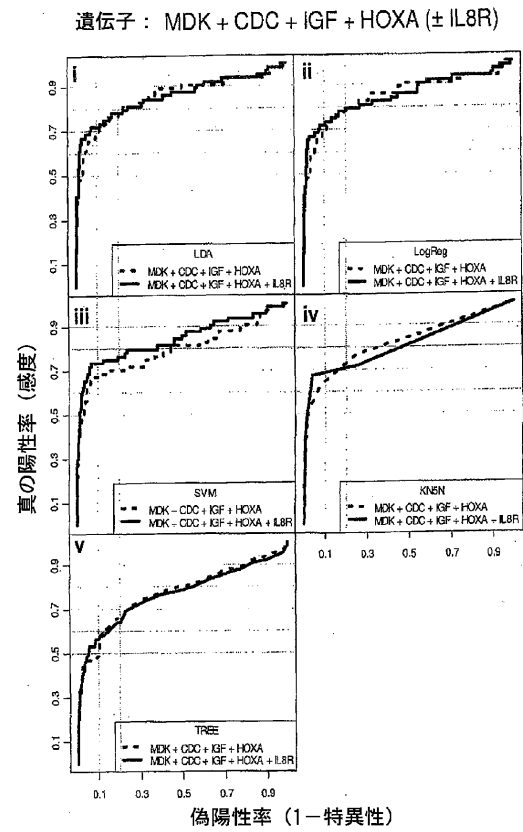


Figure 14o

【図 15 a】

モデル	LDA		LogReg		SVM		KNN		TREE	
	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb
MDK	0.087	0.127	0.129	0.127	0.107	0.121	0.109	0.120	0.107	0.117
CDC2	0.062	0.129	0.124	0.129	0.102	0.127	0.102	0.121	0.114	0.124
IGFBP5	0.060	0.108	0.109	0.108	0.094	0.107	0.093	0.090	0.093	0.096
HOXA13	0.058	0.094	0.094	0.094	0.082	0.084	0.075	0.071	0.078	0.075
MDK + CDC2	0.124	0.134	0.124	0.133	0.115	0.131	0.109	0.128	0.107	0.111
MDK + IGFBP5	0.122	0.129	0.121	0.129	0.125	0.133	0.111	0.122	0.107	0.114
MDK + HOXA13	0.125	0.125	0.118	0.125	0.108	0.118	0.107	0.107	0.107	0.114
CDC2 + IGFBP5	0.128	0.128	0.123	0.123	0.114	0.125	0.109	0.125	0.109	0.115
CDC + HOXA13	0.122	0.128	0.123	0.123	0.114	0.125	0.109	0.125	0.109	0.115
IGF + HOXA13	0.109	0.109	0.108	0.107	0.119	0.123	0.116	0.108	0.113	0.123
MDK + CDC2 + IGFBP5	0.127	0.135	0.127	0.135	0.123	0.134	0.115	0.122	0.110	0.118
MDK + CDC2 + HOXA13	0.125	0.133	0.125	0.134	0.109	0.127	0.113	0.122	0.110	0.118
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.122	0.138	0.121	0.136	0.126	0.132	0.111	0.115	0.110	0.109
CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.129	0.136	0.131	0.131	0.126	0.131	0.117	0.114	0.108	0.111
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.130	0.137	0.130	0.133	0.124	0.137	0.122	0.129	0.103	0.106

Figure 15a

【図 15 b】

モデル	LDA		LogReg		SVM		KNN		TREE	
	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb	-IL8Rb	+IL8Rb
MDK	0.040	0.067	0.068	0.068	0.014	0.010	0.015	0.010	0.010	0.009
CDC2	0.043	0.067	0.068	0.068	0.014	0.010	0.015	0.010	0.010	0.009
IGFBP5	0.043	0.067	0.068	0.068	0.014	0.010	0.015	0.010	0.010	0.009
HOXA13	0.043	0.067	0.068	0.068	0.014	0.010	0.015	0.010	0.010	0.009
MDK + CDC2	0.009	0.009	0.009	0.009	0.015	0.015	0.019	0.019	0.005	0.005
MDK + IGFBP5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.010	0.010	0.010	0.010	0.007	0.007
MDK + HOXA13	0.007	0.007	0.007	0.007	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
CDC2 + IGFBP5	0.006	0.006	0.006	0.006	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
CDC + HOXA13	0.006	0.006	0.006	0.006	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
IGF + HOXA13	0.009	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
MDK + CDC2 + IGFBP5	0.009	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.006	0.006	0.006	0.006	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.006	0.006	0.006	0.006	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.007	0.007	0.007	0.007	0.010	0.010	0.010	0.010	0.006	0.006

Figure 15b

【図 16 a】

a	モデル	LDA		LogReg		SVM		KNN		TREE	
		-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB
	MDK	0.721	0.734	0.734	0.734	0.594	0.672	0.531	0.781	0.623	0.688
	CD2	0.753	0.734	0.750	0.734	0.562	0.703	0.750	0.734	0.672	0.703
	IGFBP5	0.657	0.703	0.688	0.703	0.516	0.625	0.516	0.656	0.656	0.609
	HOXA13	0.486	0.609	0.625	0.609	0.469	0.484	0.406	0.375	0.547	0.578
	MDK + CD2	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.766	0.625	0.625
	MDK + IGFBP5	0.719	0.719	0.734	0.734	0.609	0.641	0.703	0.719	0.609	0.672
	MDK + HOXA13	0.766	0.781	0.766	0.781	0.609	0.641	0.703	0.719	0.672	0.688
	CD2 + IGFBP5	0.750	0.734	0.750	0.734	0.562	0.703	0.750	0.734	0.656	0.703
	CD2 + HOXA13	0.703	0.703	0.672	0.672	0.719	0.734	0.500	0.641	0.688	0.672
	IGF + HOXA13	0.766	0.766	0.766	0.766	0.688	0.766	0.734	0.797	0.656	0.656
	MDK + CD2 + IGFBP5	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.656	0.656
	MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.656	0.656
	CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.797	0.797	0.797	0.797	0.734	0.734	0.734	0.734	0.672	0.672
	MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.766	0.781	0.781	0.781	0.797	0.797	0.766	0.719	0.656	0.641

Figure 16a

【図 16 b】

b	モデル	LDA		LogReg		SVM		KNN		TREE	
		-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB
	MDK	0.657	0.719	0.672	0.719	0.578	0.641	0.531	0.609	0.609	0.672
	CD2	0.481	0.703	0.719	0.703	0.531	0.688	0.500	0.625	0.672	0.703
	IGFBP5	0.595	0.641	0.625	0.656	0.516	0.625	0.516	0.484	0.562	0.578
	HOXA13	0.492	0.594	0.562	0.562	0.469	0.469	0.406	0.375	0.500	0.406
	MDK + CD2	0.688	0.734	0.688	0.734	0.641	0.688	0.562	0.672	0.641	0.641
	MDK + IGFBP5	0.703	0.719	0.703	0.719	0.703	0.781	0.562	0.766	0.609	0.609
	MDK + HOXA13	0.656	0.688	0.656	0.688	0.594	0.641	0.562	0.516	0.594	0.625
	CD2 + IGFBP5	0.750	0.766	0.750	0.766	0.609	0.688	0.578	0.641	0.625	0.703
	CD2 + HOXA13	0.719	0.703	0.719	0.703	0.547	0.688	0.594	0.547	0.656	0.609
	IGF + HOXA13	0.641	0.641	0.641	0.641	0.688	0.734	0.500	0.484	0.609	0.609
	MDK + CD2 + IGFBP5	0.734	0.734	0.734	0.734	0.688	0.734	0.609	0.641	0.641	0.641
	MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.688	0.719	0.688	0.719	0.594	0.672	0.609	0.562	0.703	0.641
	CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.703	0.719	0.703	0.719	0.734	0.734	0.594	0.688	0.625	0.625
	MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.766	0.766	0.766	0.766	0.719	0.734	0.750	0.719	0.609	0.594

Figure 16b

【図 16 c】

c	モデル	LDA		LogReg		SVM		KNN		TREE	
		-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB
	MDK	0.531	0.672	0.625	0.672	0.562	0.641	0.531	0.609	0.609	0.594
	CD2	0.516	0.703	0.656	0.703	0.531	0.688	0.500	0.625	0.625	0.562
	IGFBP5	0.527	0.578	0.562	0.594	0.500	0.594	0.516	0.484	0.500	0.562
	HOXA13	0.527	0.578	0.562	0.594	0.438	0.469	0.406	0.375	0.391	0.359
	MDK + CD2	0.688	0.703	0.688	0.703	0.625	0.688	0.562	0.672	0.562	0.578
	MDK + IGFBP5	0.641	0.719	0.688	0.719	0.609	0.641	0.562	0.625	0.578	0.594
	MDK + HOXA13	0.641	0.672	0.625	0.672	0.641	0.641	0.562	0.616	0.594	0.578
	CD2 + IGFBP5	0.656	0.734	0.656	0.734	0.609	0.688	0.578	0.641	0.547	0.594
	CD2 + HOXA13	0.641	0.641	0.641	0.641	0.594	0.594	0.547	0.594	0.672	0.672
	IGF + HOXA13	0.594	0.594	0.578	0.594	0.547	0.594	0.547	0.594	0.594	0.578
	MDK + CD2 + IGFBP5	0.672	0.734	0.672	0.734	0.672	0.734	0.609	0.641	0.531	0.578
	MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.688	0.703	0.688	0.703	0.578	0.672	0.562	0.625	0.594	0.562
	CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.641	0.672	0.625	0.656	0.688	0.688	0.562	0.625	0.609	0.594
	MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.688	0.719	0.703	0.734	0.672	0.734	0.625	0.672	0.578	0.594

Figure 16c

【図 16 d】

d	モデル	LDA		LogReg		SVM		KNN		TREE	
		-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB	-ILRB	+ILRB
	MDK	0.304	0.609	0.547	0.609	0.531	0.609	0.500	0.609	0.500	0.562
	CD2	0.180	0.625	0.516	0.625	0.500	0.609	0.438	0.625	0.500	0.609
	IGFBP5	0.148	0.484	0.484	0.484	0.500	0.500	0.339	0.391	0.469	0.438
	HOXA13	0.173	0.422	0.422	0.422	0.406	0.406	0.297	0.297	0.344	0.297
	MDK + CD2	0.562	0.672	0.562	0.672	0.547	0.672	0.453	0.672	0.453	0.562
	MDK + IGFBP5	0.562	0.609	0.578	0.609	0.609	0.656	0.562	0.625	0.531	0.547
	MDK + HOXA13	0.531	0.609	0.531	0.609	0.531	0.609	0.562	0.625	0.500	0.562
	CD2 + IGFBP5	0.562	0.609	0.562	0.609	0.531	0.609	0.594	0.641	0.500	0.547
	CD2 + HOXA13	0.516	0.625	0.500	0.625	0.516	0.609	0.500	0.484	0.406	0.406
	IGF + HOXA13	0.484	0.484	0.531	0.531	0.547	0.641	0.500	0.672	0.469	0.500
	MDK + CD2 + IGFBP5	0.594	0.656	0.609	0.672	0.578	0.672	0.516	0.641	0.484	0.562
	MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.562	0.672	0.562	0.672	0.547	0.672	0.516	0.641	0.484	0.562
	CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.609	0.625	0.609	0.609	0.609	0.656	0.562	0.625	0.531	0.547
	MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.609	0.688	0.594	0.672	0.625	0.672	0.625	0.672	0.469	0.484

Figure 16d

【図 16 e】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TRFE
MDK	0.062	0.047	0.047	0.078	0.062
CD2	0.022	-0.016	-0.016	0.135	0.031
IGFBP5	0.016	0.031	0.031	-0.031	-0.016
MDK + CD2	0.047	0.047	0.016	0.109	-0.094
MDK + IGFBP5	0.016	0.016	0.016	0.203	0.000
MDK + HOXA13	0.031	0.031	0.016	-0.047	0.031
CD2 + IGFBP5	0.016	0.016	0.016	0.062	0.016
CD2 + HOXA13	-0.016	-0.016	-0.016	-0.047	0.047
IGF + HOXA13	0.000	0.000	0.062	-0.016	0.000
MDK + CD2 + IGFBP5	0.031	0.031	0.000	0.021	0.016
MDK + CD2 + HOXA13	0.016	0.016	0.047	0.141	0.000
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.016	0.016	0.031	0.094	0.000
MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	-0.016	0.000	-0.016	0.094	-0.016

特異性 0.85 で開始

感度の増加、特異性 0.85 で開始

Figure 17b

【図 17 b】

【図 17 a】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TRFE
MDK	0.013	0.000	0.078	0.250	0.062
CD2	-0.019	-0.016	0.141	-0.016	0.031
IGFBP5	0.046	0.016	0.109	0.141	-0.047
HOXA13	0.123	-0.016	-0.016	-0.031	0.031
MDK + CD2	0.016	0.016	0.078	0.016	-0.031
MDK + IGFBP5	0.000	0.000	0.078	0.078	0.000
MDK + HOXA13	0.016	-0.016	0.031	0.062	0.000
CD2 + IGFBP5	0.016	0.016	0.109	0.094	0.016
IGF + HOXA13	-0.016	-0.016	0.141	-0.016	0.047
MDK + CD2 + IGFBP5	0.000	0.000	0.031	0.000	-0.031
MDK + CD2 + HOXA13	0.000	0.000	0.078	0.000	0.031
MDK + IGFBP5 + HOXA13	-0.016	-0.016	0.046	-0.016	-0.016
CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.000	-0.031	0.031	-0.047	0.000
MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.016	0.016	0.062	-0.047	-0.016

特異性 0.98 で開始

感度の増加、特異性 0.85 で開始

Figure 17a

【図 17 c】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TRFE
MDK	0.161	0.047	0.078	0.078	-0.016
CD2	0.365	0.047	0.156	0.125	0.047
IGFBP5	0.350	0.000	0.094	-0.031	0.062
HOXA13	0.259	0.031	0.031	-0.031	-0.031
MDK + CD2	0.016	0.000	0.062	0.109	0.016
MDK + IGFBP5	0.078	0.047	0.016	0.062	0.016
MDK + HOXA13	0.031	0.031	0.078	-0.047	-0.016
CD2 + IGFBP5	0.094	0.062	0.078	0.062	0.047
IGF + HOXA13	0.000	0.031	0.141	-0.047	0.078
MDK + CD2 + IGFBP5	0.000	0.000	0.016	-0.016	-0.016
MDK + CD2 + HOXA13	0.052	0.047	0.078	0.062	0.047
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.000	0.016	0.094	0.031	0.031
CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.031	0.031	0.000	0.000	-0.016
MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.031	0.031	0.016	-0.047	0.016
MDK + CD2 + IGFBP5 + HOXA13	0.031	0.016	0.062	0.047	0.062

感度の増加、特異性 0.85 で開始

Figure 17c

Figure 16e

Figure 17a

【図 17 d】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TREE
MDK	0.306	0.062	0.078	0.109	0.062
CDC2	0.445	0.109	0.109	0.188	0.109
IGFBP5	0.336	0.000	0.000	0.031	-0.031
HOXA13	0.249	-0.016	-0.016	0.000	-0.047
MDK + CDC2	0.109	0.109	0.125	0.219	0.109
MDK + IGFBP5	0.047	0.062	0.047	0.062	0.016
MDK + HOXA13	0.078	0.078	0.078	-0.047	0.062
CDC2 + IGFBP5	0.047	0.062	0.031	0.188	0.047
CDC2 + HOXA13	0.109	0.125	0.094	-0.047	0.094
IGF + HOXA13	0.000	0.000	-0.016	-0.016	0.000
MDK + CDC2 + IGFBP5	0.062	0.062	0.062	0.062	0.031
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.109	0.109	0.125	0.125	0.125
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.078	0.078	0.047	-0.047	0.016

Figure 17d

【図 17 e】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TREE
MDK	0.353	0.031	0.078	0.031	0.031
CDC2	0.406	0.000	0.109	0.062	-0.047
IGFBP5	0.336	0.000	-0.016	0.031	0.000
HOXA13	0.192	0.078	0.109	0.047	0.031
MDK + CDC2	0.062	0.062	0.031	-0.188	0.000
MDK + IGFBP5	0.062	0.078	0.031	0.078	0.203
MDK + HOXA13	0.062	0.016	0.016	0.031	-0.016
CDC2 + IGFBP5	-0.047	0.016	0.062	-0.078	0.000
IGF + HOXA13	0.000	0.000	0.047	0.172	0.031
MDK + CDC2 + IGFBP5	0.062	0.078	0.052	-0.016	0.078
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.125	0.125	0.094	0.234	0.031
CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.062	0.047	0.047	-0.062	0.000
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.016	0.016	0.091	0.000	-0.031
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.125	0.125	0.062	-0.031	0.047

Figure 17e

【図 17 f】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TREE
MDK	0.020	0.000	0.168	0.180	0.060
CDC2	-0.025	-0.040	0.178	-0.104	0.094
IGFBP5	0.037	0.022	0.131	0.119	-0.025
HOXA13	0.114	-0.007	-0.002	0.116	0.027
MDK + CDC2	0.138	0.030	0.158	-0.101	-0.049
MDK + IGFBP5	0.101	0.101	0.101	0.146	-0.022
MDK + HOXA13	0.000	0.000	0.126	-0.089	0.072
CDC2 + IGFBP5	0.022	0.012	0.143	0.146	0.035
CDC2 + HOXA13	-0.025	-0.040	0.138	-0.109	0.106
IGF + HOXA13	0.000	0.000	0.042	0.158	0.005
MDK + CDC2 + IGFBP5	0.000	0.000	0.133	0.151	-0.012
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.000	0.000	0.165	-0.091	-0.035
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.000	-0.022	0.081	-0.042	-0.032
CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.000	-0.054	0.064	-0.052	0.015
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.027	0.000	0.138	-0.057	-0.010

Figure 17f

【図 17 g】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNSN	TREE
MDK	0.039	0.041	0.123	0.130	0.039
CDC2	0.125	-0.023	0.130	0.130	0.044
IGFBP5	0.041	0.009	0.081	0.069	0.036
HOXA13	0.064	-0.001	-0.001	0.066	-0.013
MDK + CDC2	0.054	0.046	0.108	0.118	0.019
MDK + IGFBP5	0.031	0.041	0.051	0.096	0.017
MDK + HOXA13	0.031	0.046	0.051	0.096	0.011
CDC2 + IGFBP5	0.017	0.003	0.093	0.092	0.041
CDC2 + HOXA13	-0.018	-0.028	0.113	0.086	0.064
IGF + HOXA13	-0.001	-0.001	0.002	0.108	-0.008
MDK + CDC2 + IGFBP5	-0.001	-0.001	0.083	0.101	0.014
MDK + CDC2 + HOXA13	0.049	0.054	0.118	0.130	-0.001
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.007	0.014	0.031	0.113	0.009
CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.051	0.007	0.014	0.101	-0.003
MDK + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	-0.015	-0.001	0.088	0.110	0.004

Figure 17g

【図 17 h】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNN	TRUE
MDK	0.078	0.021	0.035	0.080	0.011
MDK + CDC2	0.098	0.038	0.040	0.080	0.028
MDK + IGFBP5	0.090	0.031	0.043	0.019	0.028
MDK + HOXA13	0.094	0.034	0.028	0.016	-0.026
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.094	0.031	0.038	0.068	0.043
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2	0.028	0.026	0.001	0.046	0.009
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5	0.011	0.016	0.063	0.036	-0.009
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.021	0.028	0.043	0.046	0.009
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5	0.019	0.033	0.063	0.036	0.023
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.001	0.001	0.004	0.058	-0.031
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.001	0.004	0.035	0.051	0.048
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.001	0.004	0.075	0.089	0.023
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.021	0.046	0.001	0.063	0.004
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.021	0.033	0.021	0.051	-0.001
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.031	0.021	0.048	0.060	0.046

Figure 17h

【図 17 i】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNN	TRUE
MDK	0.043	0.025	0.030	0.030	0.028
MDK + CDC2	0.030	0.025	0.030	0.030	0.023
MDK + IGFBP5	0.043	0.001	0.001	0.015	-0.007
MDK + HOXA13	0.045	-0.002	-0.004	0.020	-0.012
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.030	0.030	0.033	0.038	0.013
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2	0.023	0.025	0.010	-0.004	0.006
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5	0.030	0.030	0.013	-0.014	0.028
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.020	0.018	0.015	0.025	0.015
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5	0.023	0.025	0.025	-0.014	0.015
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.001	0.001	-0.007	0.008	0.003
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.025	0.023	0.033	0.001	0.010
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.035	0.033	0.033	0.030	0.013
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.030	0.001	0.030	0.013	0.006
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.030	0.015	0.030	0.001	0.008
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.028	0.030	0.015	0.010	0.010

Figure 17i

【図 17 j】

モデル	LDA	LogReg	SVM	KNN	TRUE
MDK	0.015	0.005	0.008	0.005	0.008
MDK + CDC2	0.020	0.000	0.000	0.000	-0.007
MDK + IGFBP5	0.018	0.000	0.000	0.000	0.003
MDK + HOXA13	0.015	-0.007	-0.007	0.010	0.000
MDK + IGFBP5 + HOXA13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2	0.008	0.000	0.000	0.010	0.003
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5	0.008	0.000	0.000	0.010	0.003
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13	0.003	0.000	0.000	-0.005	-0.002
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5	-0.002	0.000	0.000	-0.010	-0.002
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.000	0.000	0.000	0.008	0.003
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5	0.003	0.003	0.005	0.005	0.010
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.008	0.008	0.003	0.005	0.003
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5	0.008	0.005	0.000	0.005	0.000
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.000	0.000	0.008	0.013	-0.007
MDK + IGFBP5 + HOXA13 + CDC2 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13 + IGFBP5 + HOXA13	0.005	0.005	0.005	0.005	0.010

Figure 17j

【図 18】

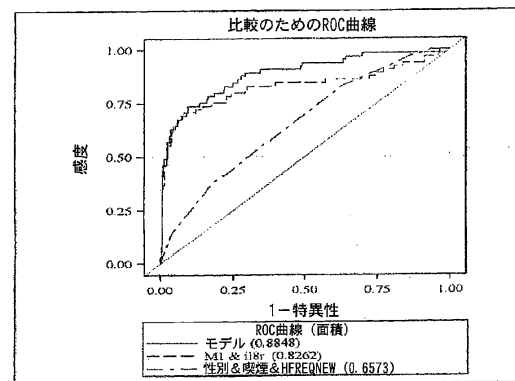


FIG. 18

【図 19】

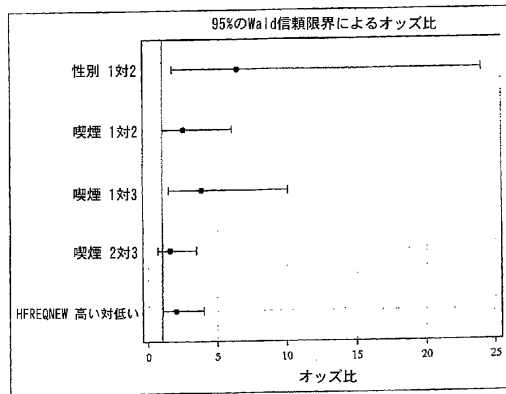


FIG. 19

【図 20 A】

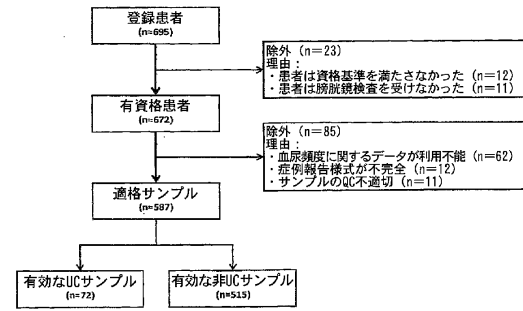


FIG. 20A

【図 20 B】

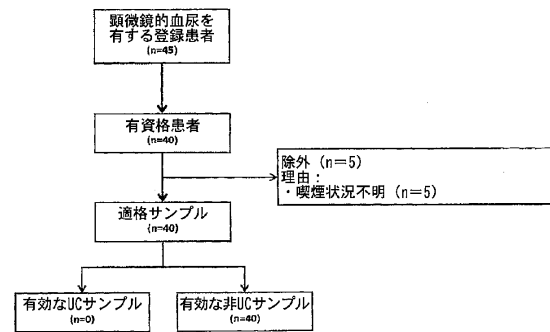


FIG. 20B

【図 21】

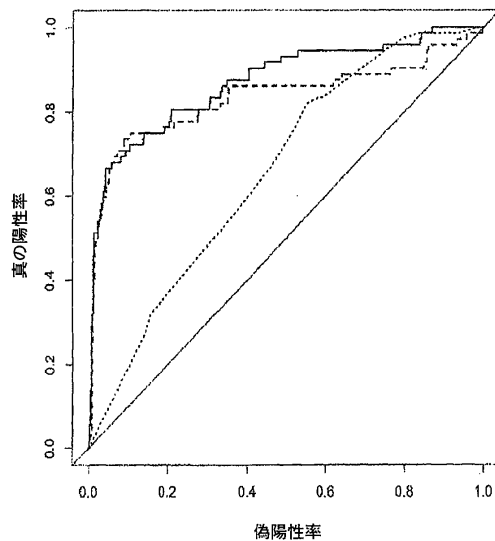


FIG. 21

【図 22】

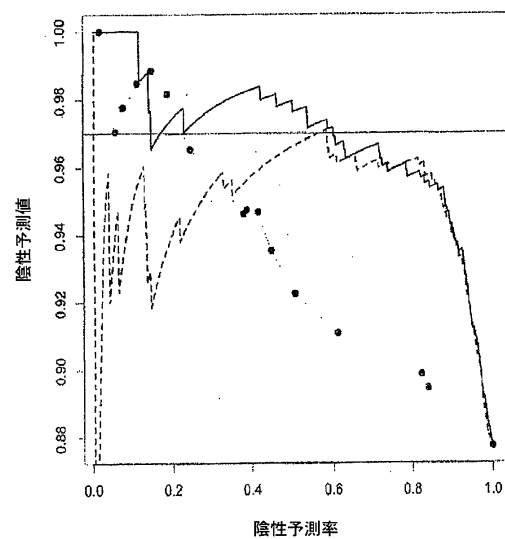


FIG. 22

【図 2 3】

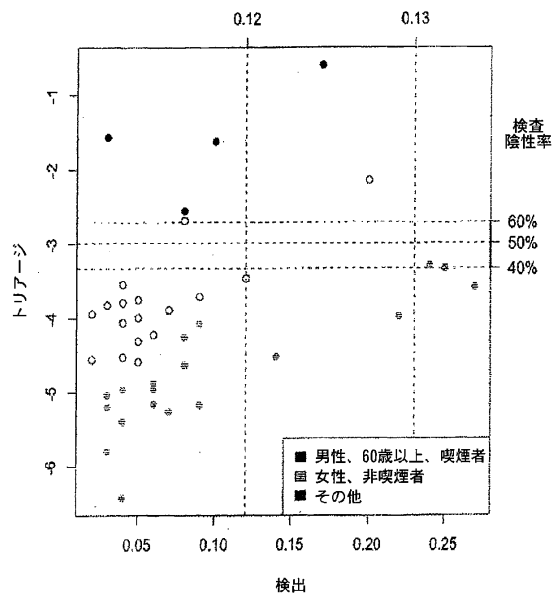


FIG. 23

【図 2 4】

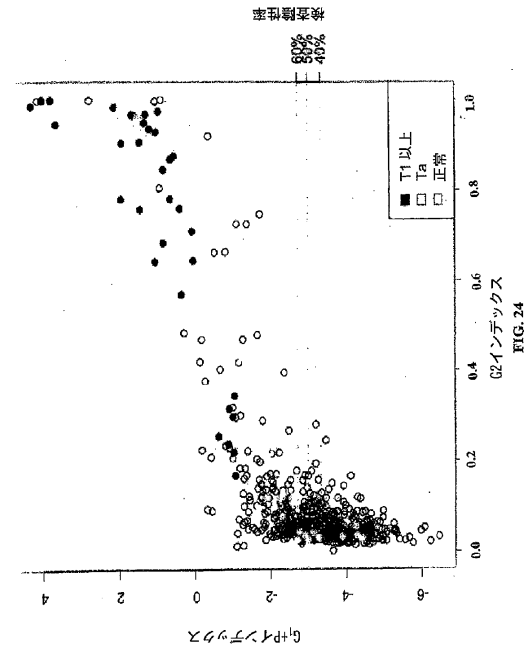


FIG. 24

【配列表】

0006554646000001.xml

フロントページの続き

- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100136249
弁理士 星野 貴光
- (72)発明者 ダルフィン マーク
ニュージーランド 9010 ダニーディン マオリ ヒル チェンバレン ストリート 11
- (72)発明者 ダーリン デイヴィッド
ニュージーランド 9014 ダニーディン カンパニー ベイ ルス ロード 4ビー
- (72)発明者 サティ ジェームズ ミラー
ニュージーランド 9076 ダニーディン サドル ヒル ロード 426 アールディー1
- (72)発明者 カヴァリエリス ライモニス
ニュージーランド 9014 ダニーディン マキャンドリュー ベイ ケラス ストリート 16
- (72)発明者 オスリヴァン ポール
ニュージーランド 9010 ダニーディン セント レオナルズ タカヘ テラス 7
- (72)発明者 クマール サティシュ
ニュージーランド 4130 ハブロック ノース スコット プレイス 13

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 国際公開第2012/078053 (WO, A1)
米国特許出願公開第2012/0135886 (US, A1)
特表2009-528817 (JP, A)
特表2008-507558 (JP, A)
国際公開第2007/026895 (WO, A1)
特表2000-504114 (JP, A)
米国特許出願公開第2011/0151464 (US, A1)
米国特許第06350571 (US, B1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
G01N 33/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
WPIDS/WPIX (STN)