

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522555

(P2017-522555A)

(43) 公表日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/574	A 2 G041
G01N 27/62 (2006.01)	G01N 27/62	V 4 C084
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	
A61P 25/00 (2006.01)	A61P 25/00	
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2016-575349 (P2016-575349)
(86) (22) 出願日	平成27年6月26日 (2015.6.26)
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月21日 (2017.2.21)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/038043
(87) 國際公開番号	W02015/200823
(87) 國際公開日	平成27年12月30日 (2015.12.30)
(31) 優先権主張番号	62/017,748
(32) 優先日	平成26年6月26日 (2014.6.26)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人 516384449
 インスティテュート フォー システムズ
 バイオロジー
 I N S T I T U T E F O R S Y S T E
 M S B I O L O G Y
 アメリカ合衆国 98109 ワシントン
 、シアトル、ノース、テリー アベ
 ニュー 401
 401 Terry Avenue No
 rth, Seattle, Washi
 ngton 98109 United
 States of America
 (74) 代理人 100120293
 弁理士 中谷 智子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多形膠芽腫 (G B M) のためのマーカー及び治療指標

(57) 【要約】

多形膠芽腫 (G B M) の対象者を健常者対照から 9.8 %を超える正確さで識別する 33 種類の細胞表面タンパク質を含む、G B M組織に存在するタンパク質のシグネチャー (G B M S i g) が記載される。さらに、本シグネチャーのメンバーのうちの 4 種類は、血液中 G B M マーカーとして特に有用である。本シグネチャーの特定の他のメンバーは、この病態の治療における T G F - 1 阻害剤の使用の潜在的有効性の指標となる。G B M S i g タンパク質に基づいて G B M を治療し、層別化する方法もまた開示される。

【選択図】図 4

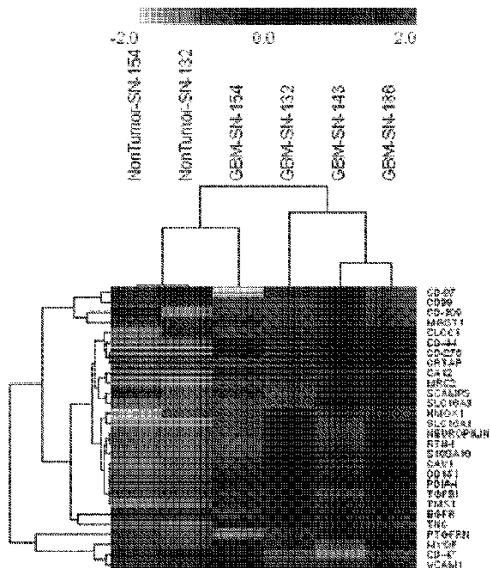


Figure 4

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト被験者が多形膠芽腫（G B M）に罹患している可能性を評価するための方法であつて：

- a) 被験者の血液又はその画分中の H M O X 1、 C D 4 4、 V C A M 1、 及び T G F - I からなる群より選択される少なくとも 1 種類のタンパク質のレベルを評価すること；
 - b) 前記少なくとも 1 種類の該タンパク質のレベルを、健常者の血液又はその画分中の該タンパク質のレベルと比較すること；
- を含み、

ここで、健常者と比較して該被験者における、 C D 4 4 レベルの減少、及び／又は、 H M O X 1 レベルの増加、及び／又は、 V C A M 1 レベルの減少、及び／又は、 T G F B I レベルの減少は、該被験者が G B M に罹患している可能性があることを示す、方法。 10

【請求項 2】

少なくとも 2 種類の前記タンパク質のレベルが被験者において評価され、健常者と比較される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 2 種類のタンパク質が C D 4 4 と H M O X 1 である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 a) の評価が、 S R M 質量分析法又はイムノアッセイにより行われる、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 5】

タンパク質 H M O X 1、 C D 4 4、 V C A M 1、 及び T G F B I の各々を検出するための試薬が並べられてアレイに結合されている、固相支持体。

【請求項 6】

被験者が G B M に罹患している可能性を評価するための方法であつて：

a) 該被験者の血液又はその画分のサンプルを請求項 5 に記載の並べられたアレイに接触させること；

b) 該アレイ中の対応する試薬に結合した、 H M O X 1、 C D 4 4、 V C A M 1 及び T G F B I の少なくとも 1 種類の量を評価すること；

c) 該量を、健常者の血液又はその画分について実施された同様のアッセイで観測された量と比較すること； 30

を含み、

ここで、健常者と比較して該被験者における、 C D 4 4 のレベルの減少、及び／又は、 H M O X 1 レベルの増加、及び／又は、 V C A M 1 レベルの減少、及び／又は、 T G F B I レベルの減少は、該被験者が G B M に罹患している可能性があることを示す、方法。

【請求項 7】

G B M に罹患した被験者が T G F - 1 阻害剤による治療に応答性であるかどうかを判定する方法であつて、該被験者の血液もしくはその画分中の又は G B M 組織中の T G F B I、 I T G A 7、 T N C、 D D R 2、 M R C 2、 M G S T 1、 C L C C 1、 P T G F R N、 C R T A P、 C D 1 0 9、及び S L C 1 6 A 1 からなる群より選択される少なくとも 1 種類のタンパク質のレベルを評価すること、及び該レベルを健常者におけるレベルと比較することを含み、ここで、該被験者における該タンパク質のレベルの亢進が T G F - 1 阻害剤による治療への感受性を示す、方法。 40

【請求項 8】

前記被験者の血液中の C D 4 7、 M Y O F、 A B C A 1、 S 1 0 0 A 1 0、 C A 1 2、 及び S L C 1 6 A 3 からなる群より選択される少なくとも 1 種類のタンパク質のレベルを評価することをさらに含み、ここで、少なくとも 1 種類の該タンパク質のレベルが高いことが T G F - 1 阻害剤による治療への感受性を示す、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

G B M に罹患した被験者が T G F - 1 阻害剤による治療に応答性であるかどうかを判 50

定する方法であって、該被験者由來の血液もしくはその画分中又はG B M組織中のH M O X 1、S L C 1 6 A 1、C D 4 7、及びM R C 2からなる群より選択される少なくとも1種類のタンパク質のレベルを評価すること、及び該レベルを健常組織におけるレベルと比較することを含み、ここで、健常組織と比較して該G B M組織中の該タンパク質のレベルの亢進がT G F - 1阻害剤による治療への感受性を示す、方法。

【請求項 1 0】

対象者におけるG B Mの治療に使用するための組成物であって、血液又は組織中のH M O X 1、S L C 1 6 A 1、C D 4 7、M R C 2、T G F B I、I T G A 7、T N C、D D R 2、M R C 2、M G S T 1、C L C C 1、P T G F R N、C R T A P、C D 1 0 9、及びS L C 1 6 A 1からなる群より選択されるタンパク質の発現レベル又は濃度を低下させる有効成分を含む組成物。

10

【請求項 1 1】

G B M組織を分類する方法であって、組織中の少なくとも1種類のG B M S i gタンパク質のレベルを評価すること、及び該レベルを健常組織中のレベルと比較することを含み、ここで、該G B M組織中のA S P H、S C A M P 3、C L C C 1、及び／又はC A D M 1のレベルの亢進は、該組織が前神経性であることを示し、該G B M組織中のC D 4 4、T T G 4 7、及び／又はE G F Rのレベルの亢進は、該G B M組織が古典的であることを示し、該組織中のC A V及び／又はT G F B Iのレベルの亢進は、該組織が間葉系であることを示す、方法。

20

【請求項 1 2】

ヒト被験者が多形膠芽腫(G B M)に罹患している可能性を評価するための方法であって、被験者の脳組織、腫瘍細胞、若しくは血液、又はそれらの画分中のG B M S i gの33種類のタンパク質からなる群より選択される少なくとも1種類のタンパク質のレベルを評価すること、及び該タンパク質のレベルを健常者の脳組織、腫瘍細胞、若しくは血液、又はそれらの画分中の該タンパク質のレベルと比較することを含み、それにより、健常者と比較した該被験者におけるレベルの差が、該被験者がG B Mに罹患している可能性があることを示し、

20

ここで、該33種類のタンパク質は、A B C A 1、A S P H、C A 1 2、C A D M 1、C A V 1、C D 1 0 9、C D 1 5 1、C D 2 7 6、C D 4 4、C D 4 7、C D 9 7、C D 9 9、C L C C 1、C R T A P、D D R 2、E G F R、H M O X 1、I T G A 7、M G S T 1、M R C 2、M Y O F、N R P 1、P D I A 4、P T G F R N、R T N 4、S 1 0 0 A 1 0、S C A M P 3、S L C 1 6 A 1、S L C 1 6 A 3、T G F B I、T M X 1、T N C、及びV C A M 1である、方法。

30

【請求項 1 3】

前記少なくとも1種類のタンパク質が、D D R 2、P D I A 4、C A D M 1、I T G A 7、M R C 2、M Y O F、N R P 1、R T N 4、T N C、S C A M P 3、及びC D 4 7からなる群より選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項 1 4】

A B C A 1、A S P H、C A 1 2、C A D M 1、C A V 1、C D 1 0 9、C D 1 5 1、C D 2 7 6、C D 4 4、C D 4 7、C D 9 7、C D 9 9、C L C C 1、C R T A P、D D R 2、E G F R、H M O X 1、I T G A 7、M G S T 1、M R C 2、M Y O F、N R P 1、P D I A 4、P T G F R N、R T N 4、S 1 0 0 A 1 0、S C A M P 3、S L C 1 6 A 1、S L C 1 6 A 3、T G F B I、T M X 1、T N C、及びV C A M 1からなる群より選択される少なくとも3種類のタンパク質を検出するための試薬が、並べられたアレイに結合されている、固相支持体。

40

【請求項 1 5】

被験者がG B Mに罹患している可能性を評価するための方法であって：

a) 該被験者の血液、脳組織、腫瘍組織、又はそれらの画分のサンプルを請求項14に記載の並べられたアレイに接觸させること；

b) 該アレイ中の対応する試薬に結合した、A B C A 1、A S P H、C A 1 2、C A D

50

M1、CAV1、CD109、CD151、CD276、CD44、CD47、CD97、CD99、CLCC1、CRTAP、DDR2、EGFR、HMOX1、ITGA7、MGST1、MRC2、MYOF、NRP1、PDIA4、PTGFRN、RTN4、S100A10、SCAMP3、SLC16A1、SLC16A3、TGFBI、TMX1、TNC、及びVCAM1から選択される少なくとも3種類のタンパク質の量を評価すること；

c) 該量を、健常者の血液、脳組織、腫瘍組織、又はそれらの画分について実施された同様のアッセイで観測された量と比較すること；を含み、

それにより、健常者と比較した該被験者における該少なくとも3種類のタンパク質のレベルの差は、該被験者がGBMに罹患している可能性があることを示す、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究のもとで行われた発明に対する権利の陳述

この研究は、米国国立衛生研究所／国立がん研究所（NIH/NCI）のNanoSystems Biology Cancer Center グラント（grant）U54 CA151819A（LH）、及び、NIH/NCIのHoward Temin Pathway to Independence Award in Cancer Research（NDP）によって一部支援されたものである。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

20

【0002】

技術分野

本発明は、成人において最もよく見られる悪性の原発性脳腫瘍である、多形膠芽腫（glioblastoma multiforme：GBM）に関する。特に、本発明は、この病態の血液中のマーカー及び可能性のある治療法による生存率の指標となるマーカーの同定に関する。

30

【背景技術】

【0003】

多形膠芽腫（GBM）は、全ての成人脳腫瘍の中で最も侵襲的で悪性である。腫瘍細胞は、脳室下帯及び基底膜を通って脳の局所及び遠隔領域に浸潤し得る。このようなGBM病理は、頭蓋内圧の発生、認知機能障害及び関連症状をもたらし、必ず死に至る。

【0004】

長年に亘り、他の癌種が治療成績と生存転帰において顕著に改善されたのに比べ、GBMの生存期間中央値は治療を受けていてもわずか1.5年であり、この数字は数十年間ほとんど変わっていない。米国だけでも、毎年9,500件の新しいGBM症例と13,000人の死亡が登録されている[1]。

【0005】

GBM患者の生存期間が短いため、患者を救い得る治療法を見い出すべく複数の治療法を試験するにも非常に短い治療期間（therapeutic window）しかない。治療期間をより長く広げ、かつ、治療への分子応答に関するより良い評価法を提供するため、効果的な血液ベースの診断法が切望されている。

40

【0006】

近年、オミックス（omics）技術の進歩により、高感度で高スループットの分析データの作成が可能となった。GBM疾患により乱されたネットワークを明らかにすることにより疾患メカニズムが深く洞察され、診断方法が提供され始めている。Philipら[2]が報告した星状細胞腫サンプル（N=76）のDNAマイクロアレイ分析からのGBMの分子サブクラスと、その後のClomanら[3]による追跡調査研究は、38遺伝子の生存セット及び予後不良に関連した9遺伝子のセットを示す結果となった。最

50

近、癌ゲノムアトラス (The Cancer Genome Atlas : TCGA) プロジェクトは、遺伝子発現、全ゲノムコピー数アレイ及び染色体転座、エピゲノミクス、全エクソーム (exome) 配列決定、ならびにマイクロRNA発現アレイを組み込んだGBMの異常なゲノム全体像の多次元オミックスビューを提供した [4]。この研究は、臨床的に明確に特定された腫瘍試料 (> 500) と非腫瘍サンプルの大規模なコホートで行われ、3つの重要な疾患により乱された経路に関する新しい洞察を提供した [5]。

【0007】

非常に有益な研究であるにもかかわらず、これらの研究は、免疫不全マウスにおいて腫瘍を形成することができるGBM癌幹細胞 (CSC) の存在を正しく認識することができていない [6, 7]。CSCは非分裂及び非増殖状態で長期間存在するので、CSC上に発現した本物の細胞表面タンパク質を慎重に選択してこれらの細胞を物理的に分離することにより、これらの集団をより良く特徴付けることができる。細胞表面膜貫通タンパク質CD133を標的とする抗体は、バルク腫瘍集団からCSCを単離するために使用されてきたが、いくつかの最近の研究から、CD133は単独のCSCマーカーとして用いるには限界があることが示唆されており、さらなる細胞表面マーカーの必要性が強調されている [8~11]。

【発明の概要】

【0008】

GBMがもたらす治療期間が非常に短いという観点から、早期診断の必要性が明らかであり、今まで、早期診断できる十分に非侵襲性で簡便な優れたアッセイ法は存在していない。さらに、GBMに対する従来の治療法の失敗から、特定のタイプの治療に応答する個体を識別する必要性が示唆されている。特に、本発明は、直接的なGBMの診断方法、ならびにGBMと診断された個体がTGF- β 1阻害剤に応答するか否かを評価するための基礎を提供する。

【0009】

発明の開示

本発明は、被験者がGBMに罹患している可能性を評価するための、血液サンプルをアッセイすることによって利用できる、タンパク質マーカーのセットを提供する。よって、一態様では、ヒト被験者が多形膠芽腫 (GBM) に罹患している可能性を評価するための方法であって、該方法は、：

a) 被験者の血液又はその画分中のHMOX1、CD44、VCAM1、及びTGF- β 1からなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質のレベルを評価すること；

b) 前記少なくとも1つの該タンパク質のレベルを、健常者の血液又はその画分中の該タンパク質のレベルと比較すること；

を含んでなり、

ここで、健常者と比較して、該被験者におけるCD44レベルが減少し、及び/又は、HMOX1レベルが増加し、及び/又は、VCAM1レベルが減少し、及び/又は、TGF- β 1レベルが減少することは、該被験者がGBMに罹患している可能性があることを示す。

【0010】

これらのタンパク質は血液中で容易にアッセイされるが、脳組織及び腫瘍細胞中のそれらのレベルもまたマーカーとして使用することができる。

【0011】

別の態様において、本発明は、ヒト被験者が多形膠芽腫 (GBM) に罹患している可能性を評価するための方法であって、該方法は：

被験者の脳組織、腫瘍細胞、若しくは血液、又はそれらの画分中のABC-A1、ASPH、CA12、CADM1、CAV1、CD109、CD151、CD276、CD44、CD47、CD97、CD99、CLCC1、CRTAP、DDR2、EGFR、HMOX1、ITGA7、MGST1、MRC2、MYOF、NRP1、PDIA4、PTGFRN、RTN4、S100A10、SCAMP3、SLC16A1、SLC16A3、

10

20

30

40

50

T G F B I、T M X 1、T N C、及びV C A M 1からなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質のレベルを評価すること；及び

前記少なくとも1つの該タンパク質のレベルを、健常者の脳組織、腫瘍細胞、若しくは血液、又はそれらの画分中の該タンパク質のレベルと比較すること；
を含んでなり。

ここで、健常者におけるレベルと比較した該被験者におけるレベルの差は、該被験者がG B Mに罹患している可能性があることを示す、に関する。

【0012】

さらに別の態様において、本発明は、これらのタンパク質及び被験者におけるG B Mの存在を示すものとして以下に記載されるように同定されたさらなるタンパク質を検出するように設計された、試薬が並べられたパネルに関する。
10

【0013】

さらに別の態様において、本発明は、被験者がT G F - 1の阻害剤を投与することによるG B Mの治療に応答するか否かを評価する方法に関する。これは、G B Mを正常組織から区別して同定することに使用できるタンパク質の一部は、T G F - 1の侵襲性促進力が増強することによりもたらされる異常を示す、という理解から得られる。

【0014】

さらに他の態様において、本発明は、T G F - 刺激時に侵襲性を促進するものとして同定されたタンパク質の発現又は活性を調節することによってG B Mを治療する方法、ならびにG B Mを分類する方法に関する。
20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、G B M (n = 228) 及び関連疾患、すなわち、星状細胞腫 (n = 148) と乏突起膠腫 (oligodendroma) (n = 67)、から得られた組織アレイを用いたショットガンプロテオミクスにより同定された細胞表面タンパク質の交差トランスクリプトーム (cross-transcriptomic) 特性解析を示す。これらの同定は、33の細胞表面タンパク質 (CSP) を含むG B M特異的膜シグネチャー (GBMSig) を開発するために用いられた。ヒートマップの各列は、平均log2 [腫瘍 / 非腫瘍] 比として示される。

【図2a】図2aは、GBMSigタンパク質 (n = 33) を用いたREMBRANDT
30 G B Mトランスクリプトームアレイの主成分分析 (PCA) を示す。赤色の点は非腫瘍分離物を表し、灰色の点はG B Mを表す。

【図2b】図2bは、GBMSigタンパク質 (n = 33) を用いたTCGA G B MトランスクリプトームアレイのPCAを示す。赤色の点は非腫瘍分離物を表し、灰色の点はG B Mを表す。

【図2c】図2cは、TCGAにおける異なるG B M組織アレイ (n = 547のG B M及びn = 10の非腫瘍) を用いたGBMSig (n = 28) の感度及び特異度分析を示し、G B M集団を同定する際の高度の特異性を示した。

【図2d】図2dは、REMBRANDT組織アレイを用いたGBMSig (n = 33) の感度及び特異度分析を示す。

【図3a】図3aは、癌幹細胞 (CSC) (Cellprogen社) と健常な神経幹細胞 (NSC) (Millipore社) を区別することができるユニークなGBMSigを同定するために使用されたd-SRMアッセイの結果を示す。
40

【図3b】図3bは、GBMSig発現のSRMによる結果を代替法であるフローサイトメトリーにより検証した結果を示す。G B M患者から得られた個々の原発性癌幹細胞は、健常な神経幹細胞と比較して、HMOX1、SLC16A1ではより高い発現を示したが、SLC16A3ではより低い発現を示した。

【図4】図4は、非腫瘍分離物 (n = 2) と比較した、個々の患者腫瘍 (n = 4) からの組織ホモジネート中の21種類のGBMSigの蓄積パターンを示すヒートマップである。
50

【図5a】図5aは、GBMSigタンパク質とTGF-1シグナル伝達ネットワークとの関連を示す。

【図5b】図5bは、GBMSigタンパク質と癌浸潤との関連の効果を示す。

【図5c】図5cは、GBMSigタンパク質が過剰発現された場合のREMBRANDTリポジトリからのGBM患者(n=100)の低い生存率(p<0.003)を示す。

【図6a】図6aは、示されたGBMSigタンパク質であるHMOX1、CD44、VCAM1、及びTGFBIについて、21人の健常人と21人のGBMの血漿をELISAアッセイした結果を示す。

【図6b】図6bは、血液分析からGBMを診断するための基礎となる、HMOX1、CD44、VCAM1、及びTGFBIのELISA結果のROC分析(10,000×10分割交差検証)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、正常組織と対照的にGBMに特徴的である表面タンパク質の性質及びレベルに基づく診断及び治療法の選択に有用な方法及び組成物、ならびにGBMを治療する方法に関する。

【0017】

本発明は、1) 転写産物レベル及びプロテオームレベルの両方でGBM組織を健常組織から正確に識別することができる細胞表面GBMSig分類指標(ABC A1、ASPH、CA12、CADM1、CAV1、CD109、CD151、CD276、CD44、CD47、CD97、CD99、CLCC1、CRTAP、DDR2、EGFR、HMOX1、ITGA7、MGST1、MRC2、MYOF、NRP1、PDIA4、PTGRN、RTN4、S100A10、SCAMP3、SLC16A1、SLC16A3、TGFBI、TMX1、TNC及びVCAM1などの、33の細胞表面タンパク質)、2) GBMSigタンパク質の中の血液バイオマーカー(そのサブセットはd-SRM及びELISAによって検証された)、3) GBMにおける主要なGBMSigタンパク質によって代表される、破壊されたTGF-1ネットワーク成分、及び4) GCS Cの代表的な細胞表面マーカーに関する。

【0018】

細胞表面タンパク質の異常な発現及び活性は、ほとんどの癌の顕著な特徴である。これらのタンパク質は、該細胞とその微小環境との間の戦略的位置を占めており、膜の外表面と細胞質の両端から発するシグナルを感じ取ることができる。よって、細胞表面上のこれらのタンパク質の異常な発現は、細胞の正常な活動を破壊して、新生生物形質転換に影響を及ぼす。健常組織と癌性組織との間の細胞表面タンパク質の発現の差は、癌マーカーとして役立ち、かつ標的療法を開発するための情報を提供することができる。切断されて血液中に流出する細胞表面タンパク質は、診断用血液マーカーとして有用である。

【0019】

本発明者らは、代表的なGBM C S C、健常N S C、ならびにU87及びT98細胞株により例示されるバルク腫瘍細胞集団の比較解析により、GBMにおける細胞表面タンパク質を分析した。細胞表面プロテオミクスデータを、REMBRANDT及びTCGA腫瘍一覧の大規模なGBM組織トランスクリプトームアレイ解析と組み合わせた。この統合的アプローチにより、GBM組織を特徴付ける33種類の細胞表面タンパク質を含むGBMSigを得た。

【0020】

GBMに関連する4つの細胞株の細胞表面タンパク質を分析した。これらの細胞株には、バルク腫瘍集団を代表する2つの細胞株U-87及びT-98、代表的な健常N S C株(推定幹細胞マーカー-tub*iiii*、oct-4、sox-2及びCD133について陽性)、及びGBM C S C株(CD133発現について陽性)が含まれる。一般的に低存在量の細胞表面タンパク質を濃縮するために、膜不透過性スルホ-N H S -S S -ビオチン法を用いて、インタクトな細胞から細胞表面タンパク質を捕捉した。各細胞株の細胞

10

20

30

40

50

表面組成は他とは著しく異なっており、このことはこれら4つの細胞株が同様に機能的に異なることを示唆するか、あるいは、異種性は単に全ての癌の基礎となる増大した突然変異プロセスを反映しているにすぎないことを示唆している。

【0021】

捕捉された細胞表面タンパク質をトリプリケートで高分解能質量分析法にかけ、Global Proteome Machine [(GPM) (the GPM.orgでWorld Wide Web上にある)]を用いて $<10^{-3}$ の最小対数期待値スコアによりタンパク質を同定した。合計868、813、541及び564の非重複タンパク質がそれぞれU87、T98、NSC及びCSC集団から同定された。全細胞表面タンパク質調製物からこれらの膜貫通(TM)タンパク質を同定するために膜貫通予測アルゴリズムTMHMMを用いたところ、U-87、T-98、NSC及びCSCにおいて、それぞれ157、154、98及び80のTMタンパク質が同定された。全体で273の異なるTMタンパク質が全4種類の細胞株から同定された。同定されたTMタンパク質の中には53種類のCDマーカー、98種類のマルチTMドメイン含有細胞表面タンパク質が確認され、後者は、それらの疎水性及び限られた細胞存在量のため、全細胞プロテオームデータセットでは実際より少なく示される。

10

【0022】

細胞表面プロテオミクスデータをREMBRANDT組織源からのトランスクリプトーム一覧と統合することにより、脳の腫瘍領域と非腫瘍領域との間に示差的に発現された転写産物の存在を評価した[12]。細胞表面プロテオミクス研究により同定された270種類の細胞表面TMタンパク質のうち、202種類(532種類の独立したプローブ)の情報がREMBRANDT中の対応する転写産物として見つかった。これらの転写産物の発現値をlog2変換し、非腫瘍脳組織と比較して最小で2倍の平均発現(FDR < 0.05)を発現解析におけるカットオフ値として使用した。202種類の細胞表面タンパク質の転写産物のうち、155種類は制御されておらず、47種類は脳の228の腫瘍領域と9の非腫瘍領域の間でダウンレギュレーションされていた。GBM関連の細胞表面タンパク質の発現変化を特定するために、REMBRANDTに記載される星状細胞腫(N=148腫瘍)及び乏突起膠腫(N=67腫瘍)などの他の脳疾患でも示差的に発現される転写産物を取り除いた。図1に示すように、33種類の細胞表面タンパク質からなるGBM膜固有のシグネチャー(GBMSig)が得られた。

20

【0023】

多様なGBM被験者におけるGBMSigの能力を試験するために、REMBRANDTとは異なるGBM試料(N=547のGBM腫瘍サンプル及び10の健常脳組織)上に構築されたTCGA遺伝子発現アレイを評価した。TCGAでは、33種類のGBMSig転写産物のうち28種類がGBMと脳の非腫瘍領域との間で示差的に発現した。

30

【0024】

GBMSigの識別力を評価するために、分類指標(すなわち、GBMSigの33種類のタンパク質)をサポートベクターマシン(support vector machine:SVM)教師あり学習モデルによって評価した。10分割交差検証(CV)及びトレーニングデータセット(REMBRANDT)への該モデルのフィッティング後、ハイパーパラメーター(10分割CV後に調整されたパラメーター)を同定し、検証セット(TCGAデータセット)に対する分類指標の識別能力を予測した。これにより、分類指標は、99.85%の感度、75%の特異度、99.54%の陽性予測値、及び90.69%の陰性予測値であるとの結果が得られた。分類指標の主成分分析(PCA)、及び試験セットと検証セットの両方に対する個々の特異度と感度を図2a~2dに示す。GBMSigは、GBMを非腫瘍対応物から効果的に識別する。

40

【0025】

腫瘍を個別のサブタイプに層別化するためのGBMSigの有用性を検証するために、古典的(N=64)、間葉系(N=59)、前神経性(N=59)及び神経性(N=34)として予め分類されたTCGAの腫瘍組織(N=216)を追加セットとして試験した

50

。予め層別化されたG B M組織($N = 216$)にわたる各遺伝子の相対的順位を、それぞれのZスコアから決定した。与えられたG B Mサブタイプにおいて最高のZスコアを有する各G B M S i g遺伝子は、優勢なG B Mサブクラスを同定する識別能力についてR O C分析を行い評価した。19種類のG B M S i gタンパク質、すなわち、A S P H、S C A M P 3、C L C C 1及びC A D Mが前神経性について；C D 4 4、I T G A 7及びE G F Rが古典的について；C A V 1及びT G F B Iが間葉系サブタイプについて、高い特異度(>80%)を示した。

【0026】

実施例の考察：

最初に、U 8 7、T 9 8、C D 1 3 3⁺ C S C (C e l p r o g e n社)及びN S C株(M i l l i p o r e社)を含む種々のG B M細胞株の細胞表面組成を、高分解能質量分析法によって試験し、これにより細胞表面タンパク質、特に膜貫通ドメインを有するものが同定された。ペプチドの配列は、S R Mアッセイのセットアップに必要とされるペプチドの質量分析適合性を示した。総合的細胞表面プロテオミクスデータは、R E M B R A N D T(228のG B Mと9の非腫瘍)及びT C G A(547のG B Mと10の非腫瘍)リポジトリ中の大規模G B M組織トランスクリプトームリポジトリと統合された。これらの統合分析から、G B M膜シグネチャー(G B M S i g)が開発された。それは、トレーニングデータセット(R E M B R A N D T、腫瘍=228、非腫瘍=9)において高い感度(97.30%、10分割C V)、特異度(95%、10分割C V)、及び精度(99.56%、10分割C V)で正常な組織からG B M腫瘍を正確に識別することができる、33種類の細胞表面膜貫通タンパク質からなる。S V Mモデルをトレーニングデータセット(R E M B R A N D T)にフィッティングさせ、ハイパーパラメーターをロックダウン(lock down)した後、10回の独立した反復から、高い感度(99.85%、10分割C V)及び特異度(75%、10分割C V)が、99.54%の陽性予測値及び90.69%の陰性予測値と共に検証データセット(T C G A、腫瘍=547；非腫瘍=10)から得られた。

【0027】

R E M B R A N D T及びT C G Aデータセットにおける腫瘍と非腫瘍との間の異なるG B M S i g発現に基づくP C A分析もまた、図2a～2d(複数のデータセットに沿ってG B Mを診断する際のG B M S i gパネルの強力な予測能力を強調している)に示すように、同等の分離度を示した。d-S R M標的化プロテオミクスアッセイを開発することにより、サンプル分析において多重化能及びより高い処理能力を使えることに加え、他の方法では少ない存在量としてしか検出できない生物学的分離物中のC S Pの検出が可能になった。全体として、Spearmanクラスタリング及び代表的なP C A分析においてさらに実証されるように、33種類のG B M S i gのうちの21種類の濃縮パターンは、一意的にG B M組織を表した。血漿中に放出された4つのG B M S i gタンパク質、すなわち、V C A M 1、H M O X 1、C D 4 4、及びT G F - Iの、E L I S Aによる21のG B M血漿と21の健常血漿(年齢と性別を一致させた)を用いた代替検証もまた、健常者に対してG B Mに高い感度と特異度を示した。

【0028】

組織S R M分析は、おそらく疾患の結果として無秩序となった、多数のG B M S i gタンパク質が、T G F - 誘導性タンパク質であるT G F B Iと共に過剰発現されたことを示し、このことから、これらのG B M S i gタンパク質がT G F - シグナル伝達を介して調節されることが推定される。新規なT G F - 応答要素が、実験的検証によってG B M S i g中に同定された。U 8 7細胞株を用いたインビトロ分析によって、T G F - 応答性における19種類のG B M S i gタンパク質のモジュラー役割(modular role)が実証された。U 8 7細胞を、T G F - 1もしくはその阻害剤単独で処理するか、又は阻害剤とその後にT G F - 1で連続的に処理した。このような処理の後のG B M S i gタンパク質の発現の変化をS R Mアッセイによって測定した。その結果は、G B M S i gタンパク質のサブセットとT G F - 1シグナル伝達との関連を示し、こうした

10

20

30

40

50

関連はこれまで開示されていなかった。これらの結果を図 5 a に示す。

【0029】

これらの新規な TGF - 応答性タンパク質のサブセット、すなわち、SLC16A1、HMOX1、MRC2、CD47、SLC16A3、及びCD97は、図 5 b に示すように、健常 NSC と比較して GBM 細胞間の TGF - に応答性を示す特徴があるかについてさらに研究された。示されたタンパク質に対する siRNA で処理した U87 細胞を、基底膜 (Cell Biolabs 社) を介した TGF - 1 勾配に向かって浸潤させた。浸潤した細胞を比色アッセイにより分析した。3つの独立した実験からの結果を平均して、非標的化 (non-targeting) siRNA プール (スクランブルド (scrambled)) で正規化した。SLC16A1、MRC2、及び HMOX1 の siRNA による阻害後の細胞移動の消失は、既知の浸潤マーカー CD47 の結果と類似している。10

【0030】

U87 の同系 (isogenic) 細胞株であって、EGFR 及び EGFRVII などの重要な増殖性遺伝子が単独で、又は PTEN との組み合わせで過剰発現している細胞株を用いて、TGF - 处理に対する同系細胞株の分子応答性について試験した。EGFR 及び EGFRVII 同系細胞株では、TGF - 处理に応答して SLC16A1 及び HMOX1 の表面発現が上昇した。しかし、PTEN 発現はこの効果を阻害した。このことから、腫瘍抑制遺伝子 PTEN が GBM におけるこれらのタンパク質の表面発現のモジュレートに関与している可能性が示された。一方、MRC2 及び CD47 は、PTEN が過剰発現された場合、TGF - 处理に応答してアップリギュレーションされた。20

【0031】

SN143 腫瘍由来の GSC 集団は、U87 由来の同系細胞株とは異なる TGF - 応答性を示した。それらは、TGF - 处理と比べて TGF - 阻害剤処理に応答して HMOX1 の表面発現が 30 % 増加したが、TGF - 阻害剤と比べて TGF - 处理に応答して MRC2 の発現が増加したことは、U87 細胞株と同様であった。HMOX1 は、酸化的損傷の間に細胞を保護することが知られており、したがって、このタンパク質の発現を調節することにより、GSC は治療薬による損傷を免れる可能性がある。増殖している SN143 細胞上に多く見られることが見出された細胞表面タンパク質である、HMOX1 の発現増加は、この防御応答に関連し得る。30

【0032】

本実施例の結果は、癌細胞の弾性 (elasticity) が相補的な活性を有する複数の細胞表面タンパク質の動員によって維持されることを示している。TGF - に対する NSC の応答性は、GBM 細胞株の応答性と、また、SN143 腫瘍由来 GSC の応答性とは顕著に異なっていた。NSC では、TGF - 处理に応答して、SLC16A1、HMOX1、MRC2、CD47、SLC16A3、及び CD97 の細胞表面発現に顕著な変化はなかった。本実施例の結果は、以前の報告に記載されるように、神経発生及び増殖能力を抑制する態勢にある、健常 NSC における不活性型・非摂動 TGF - ネットワークに有利に働く。さらに、NSC の TGF - 阻害剤処理は、MRC2、CD47、SLC16A3、及び CD97、すなわち TGF - 阻害剤処理後に GBM 細胞において阻害された GBM si g タンパク質の発現を増加させた。原発性 SN143 細胞の TGF - 阻害剤応答性が、HMOX1 の過剰発現によって媒介される可能性が高い一方、NSC において同様の効果を示すのは MRC2 であった。本実施例の結果は、SLC16A1、MRC2、及び HMOX1 が癌細胞における TGF - シグナル伝達の重要なメディエーターであり、その調節は健常 NSC の分子応答性とは異なることを示しており、これはおそらく健常細胞と癌細胞における TGF - ネットワークが作動する枠組みの違いに起因している。本実施例の結果はまた、SLC16A1、HMOX1、及び MRC2 の siRNA 媒介阻害が、既知の浸潤マーカー CD47 のものと同様の細胞浸潤の減少 (スクランブル siRNA で処理した細胞と比較して > 50 %) をもたらしたことを見出し、GBM 浸潤及び TGF - 応答性におけるこれらのタンパク質の直接関与を示唆している。した4050

がって、 S L C 1 6 A 1 、 H M O X 1 、 C D 4 7 、 及び M R C 2 の侵襲的性質ならびに G C S C 上でのこれらのタンパク質の過剰発現は、これらの細胞が T G F - 1 に応答して転移に寄与することを可能とし、それゆえに患者の生存に悪影響を与えると思われる。よって、これらのタンパク質の発現を特徴付けること、又はそれらの活性を阻害することは、効果的な治療となり得る。 T C G A データセットの生存率分析はこの見解を支持しており、 R E M B R A N D T データセットにおいて、 5 種類の G B M S i g タンパク質、すなわち S L C 1 6 A 1 、 H M O X 1 、 M R C 2 、 C D 4 7 、 及び S L C 1 6 A 3 を共発現する患者は 30 % 低い生存率 (p < 0.08) を示し、一方 10 種類の G B M S i g タンパク質、すなわち C A 1 2 、 M R C 2 、 C D 4 4 、 T N C 、 S L C 1 6 A 1 、 S 1 0 0 A 1 0 、 H M O X 1 、 I T G A 7 、 S L C 1 6 A 3 、 及び C L C C 1 は、 50 % 低い生存率 (p < 0.003) を示した。図 5 c は、 G B M S i g タンパク質が過剰発現している場合、 R E M B R A N D T リポジトリからの G B M 患者 (n = 100) が低い生存率 (p < 0.003) であることを示す。

10

【 0 0 3 3 】

これらの実験の結果は、以下の進歩をもたらす。第 1 に、非侵襲性であって、血液検査に基づく G B M の早期診断法が初めて利用可能となった。以下の結果は、 G B M S i g タンパク質のメンバーのうちの 4 種類、すなわち C D 4 4 、 H M O X 1 、 V C A M 1 、 及び T G F B I が、健常者とは対照的に、 G B M 対象者の血漿中に変化したレベルで存在することを示す。また、 G B M S i g タンパク質の残りのメンバーも、健常者と比較して G B M 対象者の血液中の濃度が変化すると考えられ、これも本発明の一部である。これらの血液マーカーの各々を検出するための試薬が並べられたアレイ (o r d e r e d a r r a y) を有するパネルは、パッケージ化され、またキットとして使用することができ、これもまた診断に役立つ。

20

【 0 0 3 4 】

血液中に存在し得る追加のマーカーには、 D D R 2 、 P D I A 4 、 C A D M 1 、 I T G A 7 、 M R C 2 、 M Y O F 、 N R P 1 、 R T N 4 、 T N C 、 S C A M P 3 、 及び C D 4 7 が含まれる。

30

【 0 0 3 5 】

第 2 に、多くの G B M S i g タンパク質は、 T G F - 刺激によってアップレギュレーションされることが同定された。これらのタンパク質は、浸潤性を促進することで T G F - の効果を増強する。したがって、これらのタンパク質を高レベルで有する対象者から得られた G B M 腫瘍組織は、その対象者が T G F - 阻害剤の投与に基づく治療の有望な候補であることを示す。これらのタンパク質には、 S L C 1 6 A 1 、 H M O X 1 、 M R C 2 、 及び C D 4 7 が含まれる。

40

【 0 0 3 6 】

第 3 に、 T G F - に対して応答性が亢進していることを示すタンパク質が浸潤性を促進することから、これらのタンパク質の発現の低下又はそれらの活性の阻害をもたらす治療法は、 G B M を治療するのに有用である。このような方法には、 s i R N A 、アンチセンス構築物などの発現阻害剤の使用が含まれ、活性を阻害する方法には、抗体、アブタマ一、抗体模倣物などの、タンパク質そのものに対する結合剤を投与することが含まれる。

【 0 0 3 7 】

第 4 に、 G B M S i g タンパク質のいくつかは、さまざまな形態の G B M に特徴的であることが示されている。したがって、実施例 6 に示すように、 G B M の間葉系、古典的 / 増殖性、及び前神経性のサブタイプを、これらのタンパク質の特定のサブセットの発現パターンに基づいて識別することが可能である。

【 0 0 3 8 】

準備 AG B M S i g の S R M アッセイの開発

G B M 組織及び血液中のタンパク質バイオマーカーとしての G B M S i g の役割を評価するために、 S R M アッセイ [13] を開発した。 33 種類の G B M S i g タンパク質を

50

代表する合計 70 種類の細胞表面タンパク質 (CSP) ペプチドを d - S R M アッセイの開発 (各タンパク質につき約 2 つ) に使用した。内在性ペプチドのサロゲート (代用物) として働く、C 末端がリシン (K) 又はアルギニン (R) のいずれかで標識 (¹⁻³C¹⁻⁵N) された合成ペプチドの代表的なものを、コリジョンエネルギー (collision energy : CE) の最適化に供し、各ペプチド結合からのトラップエネルギー (trapped energy) の放出を最大にした。ペプチドの 3 つの親 (Q1) 電荷 (+2, +3, +4) 及び 2 つの娘 (Q3) イオン電荷 (+1, +2) を、アッセイの最適化のために、全ての実行可能な組み合わせで試験した; 最高の存在量を示しかつ妨害イオンの影響を最小限に抑えた Q1 / Q3 トランジション - CE 組み合わせを、アッセイ検証のために最終的に選択した。最終的な S R M 法では、最低 3 トランジションを有する最も性能の高いペプチドを定量に使用した。この標的化アプローチは、これらの生物学的分離物中の典型的には少ない存在量である CSP の検出の感度及び特異度を改善した。

10

【0039】

以下の実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0040】

実施例 1G B M 診断のための血液分泌型 G B M S i g タンパク質

4 つの G B M 血漿を、S R M 質量分析によって循環 G B M S i g について分析した。3 20
3 種類の G B M S i g タンパク質のうちの 14 種類を、トリブリケート S R M ランにおいて独立して検出した。4 種類の循環 G B M S i g タンパク質 H M O X 1、C D 4 4、V C
A M 1、及び T G F B 1 もまた、E L I S A によって評価した。42 個の血漿サンプル (21 人の健常及び 21 人の G B M、年齢と性別を一致させた) を用いて、統計的に有意な差異がこれらのタンパク質の濃度に観察された。健常血漿と G B M 血漿を比較すると、濃度は以下の通りであった:

C D 4 4 について: 149.31 の健常対 75.09 ng / ml の G B M (p < 3.69 E - 08、両側検定);

H M O X 1 について: 10.70 の健常対 17.52 ng / ml の G B M (p < 9.21 E - 05、両側検定);

V C A M 1 について: 583.22 の健常対 436.40 ng / ml の G B M (p < 0.02、両側検定); 及び

T G F B 1 について: 2482.51 の健常対 931.74 ng / ml の G B M (p < 5.68 E - 10)。

したがって、G B M 血漿において、C D 4 4、V C A M 1、及び T G F B 1 の濃度は減少し、H M O X 1 は増加する。

【0041】

これらの結果を図 6 a に示す。図 6 b は、H M O X 1、C D 4 4、V C A M 1、及び T G F B 1 の E L I S A 結果の R O C 分析 (10,000 × 10 分割交差検証) を示し、これは血液分析により G B M を診断するための基礎となる。

30

【0042】

各サンプルはデュブリケートで分析した。R O C 分析により、C D 4 4 について 0.934、H M O X 1 について 0.831、V C A M 1 について 0.685、及び T G F B 1 について 0.982 の曲線下面積 (A U C) が明らかとなった。C D 4 4 及び H M O X 1 について 10,000 × 10 分割 C V で 0.99 の総合平均 A U C が見出された。E L I S A の結果は、現行の手法について、効果量 (> | 0.8 |) とサンプリング法 (力 > 0.8) との間で良好な一致を示した。

【0043】

実施例 2G B M S i g タンパク質間の共通の T G F - 応答

40

50

G B M 組織又は正常組織をアッセイすると、多くの G B M S i g タンパク質が、 T G F B I の高レベルの共発現と中等度から高度の相関を示した。 T G F B I は、癌浸潤に重要な役割を果たす T G F - 誘導性タンパク質である。 T G F - 1 は、上皮から間葉への移行 (epithelial to mesenchymal transition : E M T) の誘導因子であり、腫瘍細胞の局所転移、癌幹細胞ニッチの維持、及び癌細胞の治療抵抗性を含む G B M 生物学のいくつかの局面において基本的な役割を果たす。対象者において T G F - 1 による刺激と相関する G B M S i g タンパク質レベルは、 T G F - 1 の阻害剤がそのような対象者における G B M の治療に有益であり得ることを示している。

【 0 0 4 4 】

この治療から恩恵を受ける可能性がある対象者のマーカーを同定するために、星状細胞腫細胞株 U 8 7 を一晩血清飢餓状態にし、 1 0 n g / m l の T G F - 1 で 4 0 時間処理した。 T G F - 处理は、無血清培地で増殖させた細胞と比較して S M A D 2 の C 末端リン酸化を増加させたが、これは T G F - 1 シグナル伝達の活性化を示唆する。しかし、血清には多くの必須要素及び増殖因子が含まれているため、細胞への血清飢餓の影響は、 T G F - シグナル伝達の阻害に特異的ではない可能性がある。したがって、本発明者は、 S M A D 2 の C 末端リン酸化を妨げることが知られている T G F - 阻害剤 (S B 4 3 1 5 4 2) を使用した。 T G F - 1 阻害剤を補充した標準培地 (D M E M + 1 0 % F C S) 中で増殖させた細胞は、無血清培地中で増殖させた細胞について観察されたものと同様に、 S M A D 2 の C 末端リン酸化を抑制又は減少させた。したがって、その後の S R M 分析では、血清飢餓の代わりに T G F - 阻害剤を使用した。

【 0 0 4 5 】

U 8 7 細胞株を用いて実施された 3 1 の d - S R M アッセイのうち、 T G F B I を含む 1 1 の G B M S i g タンパク質は、 T G F - 阻害剤単独で処理した細胞と比較して、 T G F - 处理後に少なくとも 2 倍高い発現を示した。これらのタンパク質は以下の通りである：

T G F B I (1 0 . 5 4 倍 ± 3 . 0 1 S E M) ,
 I T G A 7 (9 . 4 5 倍 ± 5 . 3 3 S E M) ,
 T N C (6 . 5 5 倍 ± 1 . 1 9 S E M) ,
 D D R 2 (3 . 5 3 倍 ± 0 . 8 3 S E M) ,
 M R C 2 (3 . 0 6 倍 ± 0 . 1 6 4 S E M) ,
 M G S T 1 (2 . 7 7 倍 ± 0 . 3 2 S E M) ,
 C L C C 1 (2 . 2 6 倍 ± 0 . 4 6 8 S E M) ,
 P T G F R N (2 . 1 8 倍 ± 0 . 1 8 4 S E M) ,
 C R T A P (2 . 1 2 倍 ± 0 . 4 5 2 S E M) ,
 C D 1 0 9 (2 . 0 9 倍 ± 0 . 6 1 S E M) , 及び
 S L C 1 6 A 1 (2 . 0 5 倍 ± 0 . 2 0 S E M) 。

これらの 1 1 のタンパク質はまた、 T G F - 阻害剤で処理された細胞を T G F - で再処理したとき、過剰発現された。これら 1 1 のタンパク質と S M A D 2 依存性 T G F - シグナル伝達との関連は、これまでに開示されていない。

【 0 0 4 6 】

8 つの追加の G B M S i g タンパク質、すなわち、 C D 4 7 、 V C A M 1 、 M Y O F 、 A B C A 1 、 C D 4 4 、 S 1 0 0 A 1 0 、 C A 1 2 及び S L C 1 6 A 3 は、 T G F - 阻害剤処理に対して T G F - 处理にポジティブな富化 (阻害剤処理に対して > 1 . 3 倍) を示したが、4 つの G B M S i g タンパク質、すなわち、 A S P H 、 N R P 1 、 C D 2 7 6 及び H M O X 1 は、 T G F - 处理後に発現が比較的減少し、また、8 つの G B M S i g タンパク質、すなわち、 C D 9 7 、 S C A M P 3 、 P D I A 4 、 C D 9 9 、 A B C A 1 、 T M X 1 、 R T N 4 及び C D 1 5 1 は、阻害剤処理と比較して、ほとんど変化しなかつた。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

別のアッセイでは、6つのGBMSigタンパク質、すなわち、SLC16A1、MRC2、CD47、SLC16A3、HMOX1及びCD97を、TGF-シグナル伝達の下流因子としてフローサイトメトリーにより試験した。TGF-又はTGF-阻害剤で処理した無傷のU-87細胞をフローサイトメトリーによって分析し、TGF-阻害剤と比べたTGF-1に応答する各GBMSig発現の比率を得た。TGF-阻害剤と比べたTGF-に応答する細胞表面上のタンパク質の比率は、それぞれの場合に以下の量だけ増加することが見出された。

CD47 : 40% ($p < 3.68E-08$)
 SLC16A3 : 30% ($p < 4.72E-09$)
 MRC2 : 25% ($p < 6.43E-08$)
 SLC16A1 : 20% ($p < 4.44E-06$)
 HMOX1 : 20% ($p < 5.45E-06$)
 CD97 : 本質的に変化しない (1.1倍増加)。

10

HMOX1発現の食い違いは、個々のタンパク質に特有であり、全内部プールと比較して細胞表面上のタンパク質の示差的分配に関連し得る。こうして、TGF-シグナル伝達を増強するGBMSig分子のサブセット、すなわち、CD47、SLC16A3、MRC2、SLC16A1及びHMOX1が同定された。

【0048】

実施例3TGF-1媒介浸潤応答における特定のGBMSigタンパク質の役割

20

TGF-1はEMTプロセスの誘導因子であるので、TGF-1応答因子として実施例2で同定されたGBMSigのサブセットは、星状細胞腫細胞の浸潤性に寄与し得る。TGF-応答性GBMSig遺伝子をU87細胞においてsi-RNAによりサイレンシングし、これらの遺伝子をサイレンシングされた細胞が細胞外マトリックスから侵入する能力を評価した。siRNAは、個々にSLC16A1、HMOX1、MRC2及びCD47に対するものであるか、又は組み合わせ (SLC16A1 + HMOX1及びCD47 + HMOX1)に対するものであった。siRNA媒介遺伝子サイレンシングの効率は、転写レベルでのqPCR及び細胞表面上のフローサイトメトリーの両方によって評価した。非標的化RNAと比較して、標的遺伝子の2倍を超える発現低下が見出された。siRNA処理の前後での細胞生存率への影響を把握するために、生存率をカルセインAMアッセイで試験した。細胞生存率に何の変化も見られなかった。

30

【0049】

移動及び浸潤に対する遺伝子サイレンシングの影響を評価するために、siRNA又は非標的化RNAで処理した細胞をトランスウェルチャンバーに播種し、細胞浸潤の程度を、サイレンシングを受けていない細胞に対するサイレンシングを受けた細胞により浸潤された細胞のパーセンテージとして評価した。SLC16A1、HMOX1及びMRC2のサイレンシングは、それぞれ、細胞浸潤の $52.88\% \pm 9.70$ SEM、 $46.76\% \pm 2.27$ SEM及び $42.26\% \pm 2.19$ SEMの減少をもたらし、既知の浸潤タンパク質CD47がサイレンシングされた細胞 ($57.74\% \pm 6.32$ SEM減少した細胞浸潤)と同様であった。

40

【0050】

SLC16A1 + HMOX1及びHMOX1 + CD47の組み合わせサイレンシングもまた、細胞浸潤への影響を示した (それぞれ $52.28\% \pm 5.35$ SEM及び $46.55\% \pm 0.18$ SEM)。

【0051】

要約すると、これらの結果は、SLC16A1、HMOX1及びMRC2がGBM細胞の移動及び浸潤において重要な役割を果たすことを示している。これらはまた、GBM癌幹細胞 (商業的供給源由来のGCS CならびにSN143組織由来のGCS C) 上にも発現される。

【0052】

50

実施例 4G B M 細胞株 v s . 健常神経幹細胞における T G F - 1 応答

よく変異を起こす G B M 遺伝子には、 E G F R 、 E G F R V I I I 及び P T E N が含まれる。これらの遺伝子が単独で、又は E G F R V I I I 及び P T E N 又は E G F R と P T E N の組み合わせで、安定して組み込まれたレトロウイルスベクターを介して発現される、 U 8 7 の 4 つの同系細胞株が使用された [14] 。

【 0 0 5 3 】

全ての U 8 7 同系細胞株において、 T G F - 1 に応答して C D 4 7 、 S L C 1 6 A 3 、 M R C 2 、 H M O X 1 及び S L C 1 6 A 1 の細胞表面発現の増加が、親細胞株のそれと同様に、見られた。しかし、 E G F R V I I I 又は E G F R を過剰発現する U 8 7 同系細胞株では、親細胞株と比較して、それぞれ 1.75 倍 ± 0.029 SEM 及び 1.5 倍 ± 0.028 SEM の S L C 1 6 A 1 発現の増加が観察され、 H M O X 1 の増加は、それぞれ 2.13 倍 ± 0.03 及び 2.69 倍 ± 0.06 SEM であった。両タンパク質の発現は、 E G F R V I I I + P T E N 細胞において減少し (S L C 1 6 A 1 については 1.19 倍 ± 0.020 SEM 及び H M O X 1 については 1.48 倍 ± 0.03 SEM) 、また、 E G F R + P T E N 細胞においても減少する (S L C 1 6 A 1 については 0.724 倍 ± 0.003 SEM 及び H M O X 1 については 1.058 倍 ± 0.01 SEM) ことが見出され、このことは、おそらく、これらのタンパク質の細胞表面発現がホスファターゼ P T E N の発現を介して調節されるという事実を強調している。

【 0 0 5 4 】

E G F R V I I I 単独 (S L C 1 6 A 3 については 0.97 倍 ± 0.027 SEM 及び C D 9 7 については 0.75 倍 ± 0.010 SEM) と比較して、 E G F R V I I I + P T E N では、 S L C 1 6 A 3 (1.3 倍 ± 0.025 SEM) 及び C D 9 7 (1.51 倍 ± 0.007 SEM) のより高い発現が見られた。

【 0 0 5 5 】

T G F - 1 に応答性の選択された G B M S i g タンパク質、すなわち、 S L C 1 6 A 1 、 H M O X 1 、 M R C 2 、 S L C 1 6 A 3 、 C D 4 7 及び C D 9 7 の発現はまた、 T G F - 1 又はその阻害剤の存在下で、フローサイトメトリーによって S N 1 4 3 腫瘍組織からの原発性 G B M 細胞において試験された。

【 0 0 5 6 】

原発性 G B M 細胞 (S N 1 4 3 細胞から得られた) では、 T G F - 1 で処理した場合に S L C 1 6 A 1 (0.79 倍 ± 0.009 SEM) 及び H M O X 1 (0.77 倍 ± 0.012 SEM) のより低い発現、 M R C 2 (1.62 倍 ± 0.01 SEM) のより高い発現が、その阻害剤と比較して見出された。健常 N S C は、 T G F - 1 処理と比較して、 T G F - 1 阻害剤処理に応答して M R C 2 (0.19 倍 ± 0.034 SEM) 及び C D 4 7 (0.61 倍 ± 0.003 SEM) のより低い発現を示した。 S L C 1 6 A 1 、 H M O X 1 及び C D 9 7 は、 T G F - 1 又は阻害剤処理に対してほとんど又は全く影響を示さず、健常細胞における T G F - 1 シグナル伝達の異なる応答性を強調する。これは、異なる G B M 細胞と健常 N S C との間の T G F - 1 応答性には特殊性 (d i s t i n c t i v e n e s s) があること、また、重要な遺伝子、すなわち、 G B M で改変された E G F R 、 E G F R V I I I 及び P T E N が、さまざまな G B M S i g タンパク質の発現を通して観察されるように、 T G F - 1 応答性においてさらなる不均一性を生じ得ること、を示している。

【 0 0 5 7 】

実施例 5N S C 及び G C S C における細胞表面タンパク質の発現

次第に増えつつある証拠により、 N S C 又はそれらの前駆細胞は、突然変異の変化を受けて、腫瘍増殖、薬剤耐性及び再発を促進する持続的な自己複製能力を有する G C S C を生み出しえる、ことが示される。 N S C と G C S C との間で示差的に発現される G B M S i g タンパク質は、これらの集団を識別するための細胞表面マーカーとしての役割を果た

10

20

30

40

50

す。

【0058】

NSC 及び G C S C からの等量 (5.7 μg) の細胞溶解物を酵素消化して清澄化し、SRM 分析のために等量の SRM ペプチド標準 (¹³C¹⁵N K/R で C 末端標識した) を加えた。細胞溶解物中の GBMS Ig の検出の感度及び特異度を高めるために、本発明者らは、それぞれの細胞溶解物を用いた事前のランで各ペプチドのクロマトグラフィー保持時間 (RT) を測定することによりダイナミック SRM アッセイ (d-SRM) を開発した。内在性ペプチドと共に溶出された該溶解物中のサロゲート標識ペプチド (C 末端の ¹³C¹⁵N K/R) の存在は、アッセイの品質及び精度を確実にした。サロゲートペプチド及び内在性ペプチドのピーク面積は、スカイライン (skyline) を介して定量化し、H (サロゲート) / L (内在性) の比として表した。各細胞タイプを 4 回分析し、これらのランの結果を平均して、図 3 に示した。

10

【0059】

d-SRM アッセイによって定量された 33 の GBMS Ig タンパク質のうち、22 の該タンパク質は、G C S C と NSC 細胞との間で異なった発現パターンを示した。

【0060】

G C S C と NSC 細胞との間で異なった発現を示す 4 つの GBMS Ig タンパク質、すなわち、SLC16A1、HMOX1、MRC2 及び SLC16A3 は、フローサイトメトリーでさらに検証された。無傷の NSC 及び G C S C 細胞を適切な一次抗体で標識し、結合した抗体を FITC - 又は PE - 二次抗体コンジュゲートによって検出した。アイソタイプ減算後の各抗体タイプの 4 つの反復試料から平均蛍光強度 (MFI) を算出し、平均値 ± 平均差の S.E. (SEM) として表した。

20

【0061】

上述したように、SLC16A1、HMOX1、MRC2 及び SLC16A3 は全て、NSC と比較して CSC 上で高度に発現されることが判明した。G C S C 細胞は、NSC 細胞と比較して、SLC16A1 及び HMOX1 を、それぞれ 26 倍及び 8 倍高いレベルで発現した ($p < 0.001$)。これらのデータは、NSC と比べて G C S C において SLC16A1 及び HMOX1 のより高い発現を示した d-SRM アッセイとよく一致する。G C S C と比較して、NSC 表面上の SLC16A3 及び MRC2 の発現の減少は、フローサイトメトリー分析から明らかであった。

30

【0062】

細胞溶解物及び細胞表面などの 2 つの代替供給源からの細胞表面タンパク質の定量的測定における特殊性は、G C S C 細胞の表面上のこれらの分子の細胞内分配におけるさらなる調節に関連し得る。

【0063】

また、商業的供給源からの癌幹細胞とは異なる、原発性 GBM 細胞上の潜在的な G C S C マーカーとしての GBMS Ig タンパク質の可能性も検討された。SLC16A1、HMOX1、MRC2、CD47、SLC16A3 及び CD97 を含む GBMS Ig タンパク質のサブセットを、原発性 GBM 細胞の幹様特性との関連で表面発現レベルについてさらに評価した。これらの細胞を、SN143 細胞（標的化した組織及び血清プロテオミクスにも使用された）から単離して、G C S C 集団を富化するために幹細胞模倣条件で維持した。幹細胞富化培地で増殖させた G C S C では、幹細胞マーカーであるネスチング (nesting) の発現の増加が G C S C 集団の 80 % 以上で観察された。G C S C 上のネスチングの富化は NSC のそれと同様であった。

40

【0064】

並行実験において、幹細胞富化培地で増殖させた増殖性 SN143 細胞は、増殖因子を取り出すことによって分化させた。G C S C 細胞の細胞分化は、既知の分化マーカー G F AP の発現の増加及び既知の G C S C マーカー CD133 の表面発現の減少から確認された。

【0065】

50

分化後の G B M S i g 発現の定量的变化を検証するために、増殖性 G C S C と分化性 G C S C の両方をフローサイトメトリーによって分析した。増殖条件と比べて分化条件において M R C 2 (アイソタイプに類似)、 S L C 1 6 A 3 (38.5% ± 4.12 S E M)、 C D 9 7 (70.77% ± 4.52 S E M) 及び H M O X 1 (23.5% ± 1.92 S E M) の表面発現レベルの低下が観察されたが、 C D 4 7 の増強された発現 (21.43% ± 1.37 S E M) は、増殖条件と比べて分化条件において観察された。フローサイトメトリーで測定したとき分化中の S L C 1 6 A 1 発現のレベルに有意な変化はなかったが、蛍光顕微鏡法では、増殖条件下で S L C 1 6 A 1 について陽性に染色され、分化後に減退する、 G C S C 細胞の小さな集団が検出された。

【0066】

10

蛍光顕微鏡法で観察されるような、増殖条件での H M O X 1 (別の推定 G C S C マーカー) の発現の増加及びその後の分化条件での減少もまた、フローサイトメトリーデータとよく一致する。

【0067】

したがって、 S L C 1 6 A 1 陽性細胞のフローサイトメトリー分析から生じた食い違いは、 S N 1 4 3 由来 G C S C 集団の中の S L C 1 6 A 1 陽性細胞の希少性によるフローサイトメトリーにおける S L C 1 6 A 1 シグナルの平均化に関連し得る。要するに、これらの結果から、 M R C 2 、 S L C 1 6 A 3 、 S L C 1 6 A 1 、 H M O X 1 及び C D 9 7 と、 G C S C 集団中で富化された増殖性原発性 G B M 細胞との関連が実証された。

【0068】

20

実施例 6腫瘍の層別化

ワシントン州シアトルの S w e d i s h H o s p i t a l で手術を受けた 4 人の男性患者 (S N 1 3 2 、 S N 1 4 3 、 S N 1 5 4 及び S N 1 8 6) からの脳組織と血液を使用した。外科的処置と検体採取の前に、適切な同意を得た。腫瘍起源及び非腫瘍起源の脳組織をホモジナイズし、酵素で消化し、 C 1 8 を用いて清澄化し、 S R M 分析用に合成 C 末端標識 (^{1 3} C ^{1 5} N K / R) ペプチドを加えた。上述したように、 d - S R M アッセイは、事前のランで対応する組織又は血清分離物の存在下に各サロゲートペプチドの保持時間を測定することによって開発されたものであり、したがって、異なる分離物間のペプチド保持時間の高い相関 ($R^2 > 0.99$) から明らかであるように、 S R M ラン中のペプチド保持時間ウインドウが短縮され、かつ複数の分離物にわたるペプチド同定の信頼性が向上する。さらに、個々のペプチドについての複数のトランジション (Q 1 - Q 3) の分析は、 S R M 分析の精度と品質を改善した。

30

【0069】

33 の G B M S i g タンパク質のうち 21 の相対的発現が 4 つの G B M 組織全てにおいて定量化された。非腫瘍脳組織の希少性のため、4 つの G B M 組織における G B M S i g 発現は、 S N 1 3 2 及び S N 1 5 4 対象者由来の 2 つの非腫瘍組織におけるものと比較できたにすぎなかった。6 つの脳組織 (4 つの G B M と 2 つの非腫瘍) にわたる S R M トレース (内在性ペプチド対サロゲートペプチドの比) の Z スコア変換の後、4 つの G B M 組織全てにおいて過剰発現された 12 の G B M S i g タンパク質が、両方の非腫瘍組織と比較して観察され、図 4 に示すヒートマップとして表される。

40

【0070】

G B M S i g タンパク質の大部分は、脳の腫瘍領域と非腫瘍領域との間で示差的発現を示したが、 G B M S i g 発現における腫瘍内不均一性が明々白々であった。これら 4 人の G B M 患者間の不均一性のレベルを調べるために、 P h i l l i p s r a [2] によって記載された 33 の既知の遺伝子パネルについて q R T - P C R を用いて、これらの腫瘍を層別化した。患者 S N 1 5 4 は増殖性として、 S N 1 8 6 は前神経性として、 S N 1 4 3 は間葉系として、 S N 1 3 2 は中間として層別化された。各 G B M S i g タンパク質 (N = 28) は、4 つの G B M 組織にわたって Z スコアに基づいてランク付けされ、その結果、28 の G B M S i g が 3 つのグループに分類された。 T C G A の G B M S i g - トランス

50

クリプトームをベースとした層別化と比較して、8つのGBMSigタンパク質について同様のサブタイプ特異的発現が観察された。

【0071】

CAV1、TGFBI及びCA12は、TCGAデータセット中に下線を施された間葉系サブタイプと同様、神経膠肉腫SN143において比較的過剰発現されることが判明した。同様に、古典的／増殖性SN154では、EGFRの相対的過剰発現及びS100A10とNRP1の発現低下が観察され、前神経性SN186の場合には、トランスクリプトーム及びプロテオームの両レベルでSLC16A3とSCAMP3の相対的過剰発現が観察された。中間サブタイプSN132では、CAV1、TGFBI及びCA12タンパク質の過剰発現から明らかな間葉系と、EGFRの過剰発現から明らかな増殖性との両方の発現パターンがはっきりと見られた。したがって、選択されたGBMSigタンパク質の発現パターンは、GBM層別化を可能にするように、トランスクリプトーム及びプロテオームの両レベルでGBMの不均一性を暗示する。

10

【0072】

参考文献

1. Jemal A, S.R., Xu J, Ward E., Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin., 2010. 60(5) : p. 277 - 300
2. Phillips HS, K.S., Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K., Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell., 2006. 9(3) : p. 157 - 73.
3. Colman H, Z.L., Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, Rivera A, Popoff S, Nutt CL, Louis DN, Cairncross JG, Gilbert MR, Phillips HS, Mehta MP, Chakravarti A, Pelloski CE, Bhat K, Feuerstein BG, Jenkins RB, Aldape K., A multigene predictor of outcome in glioblastoma. Neuro Oncol., 2010. 12(1) : p. 49 - 57.
4. Verhaak RG, H.K., Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler H S, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network., Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NFL. Cancer Cell., 2010. 17(1) : p. 98 - 110.

20

30

40

50

5. McLendon R, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008. 455(7216): p. 1061-8.
6. O'Brien CA, P. A., Gallinger S, Dick JE., A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 106-10.
7. Singh SK, H.C., Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB., Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004. 432(7015): p. 396-401.
8. Kemper K, S.M., de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G, Medema JP., The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.*, 2010. 70(2): p. 719-29.
9. Wan F, Z.S., Xie R, Gao B, Campos B, Herold-Mende C, Lei T., The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain Pathol.*, 2010. 20(5): p. 877-89.
10. Wang J, S.P., Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Rosland G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger PO., CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, 2008. 122(4): p. 761-8.
11. Chen R, N.M., Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriani RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, Vandenberg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS ., A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*., 2010. 17(4).
12. Madhavan S, Z.J., Kotliarov Y, Sahni H, Fine HA, Buetow K., Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Mol Cancer Res.*, 2009. 7(2): p. 157-67.

10

30

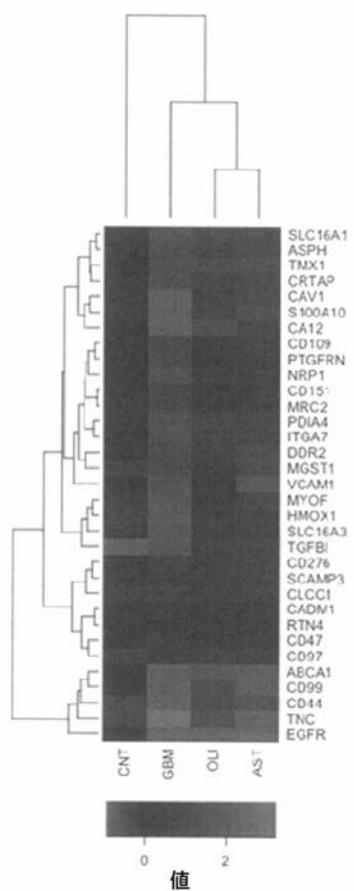
40

50

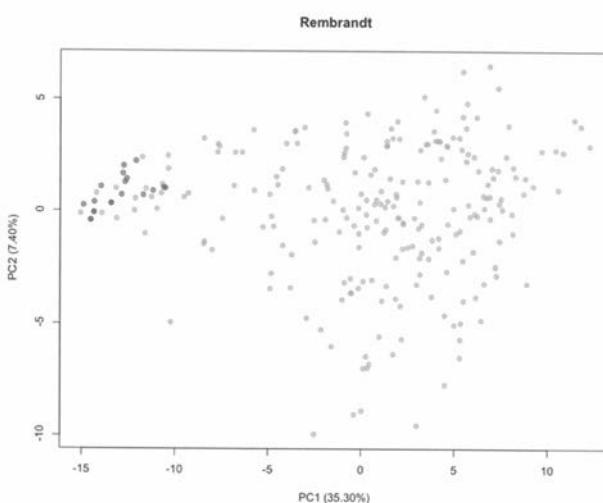
13. Ruedi Aebersold, A.L.B., and Ralph A. Bradshaw, Western Blots versus Selected Reaction Monitoring Assays: Time to Turn the Tables? Mol Cell Proteomics., 2013. 12(9): p. 2381-2382.

14. Gini B, Z.C., Guo D, Matsutani T, Masi K, Ikegami S, Yang H, Nathanson D, Villa GR, Shackelford D, Zhu S, Tanaka K, Babic I, Akhavan D, Lin K, Assuncao A, Gu Y, Bonetti B, Mortensen DS, Xu S, Raymon HK, Cavenee WK, Furnari FB, James CD, Kroemer G, Heath JR, Hege K, Chopra R, Cloughesy TF, Mischel PS., The mTOR kinase inhibitors, CC214-1 and CC214-2, preferentially block the growth of EGFRvIII-activated glioblastomas. Clin Cancer Res. , 2013. 19(20): p. 5722-32. 10

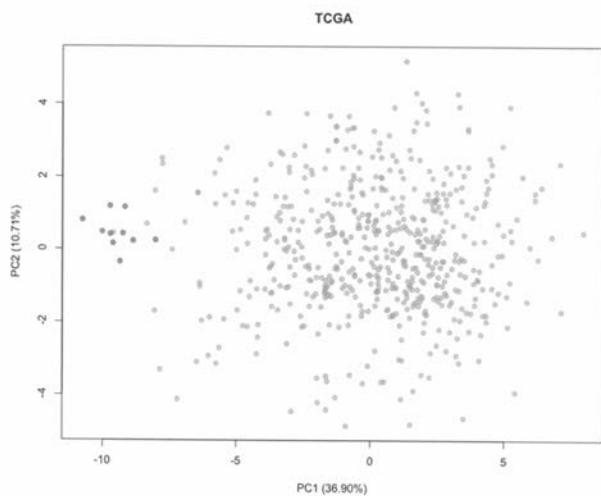
【図1】



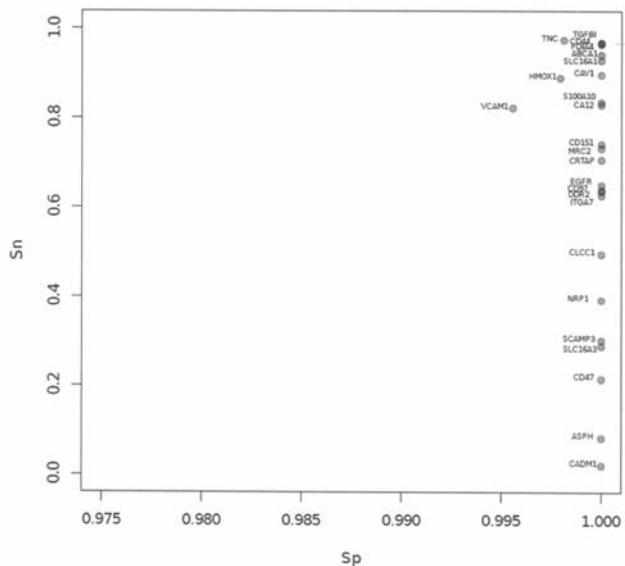
【図2a】



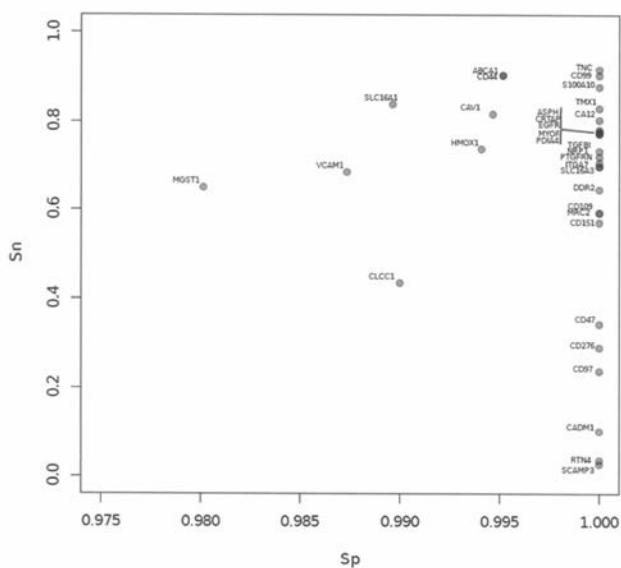
【図2b】



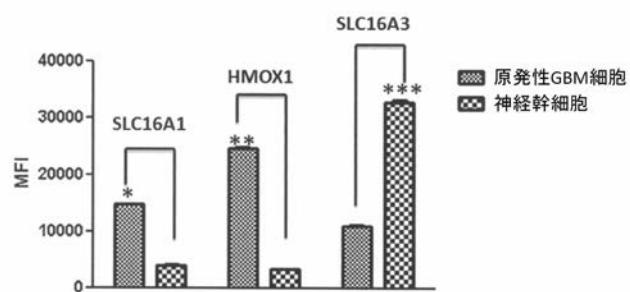
【 図 2 c 】



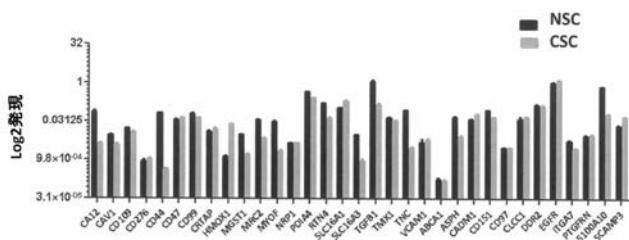
【図2d】



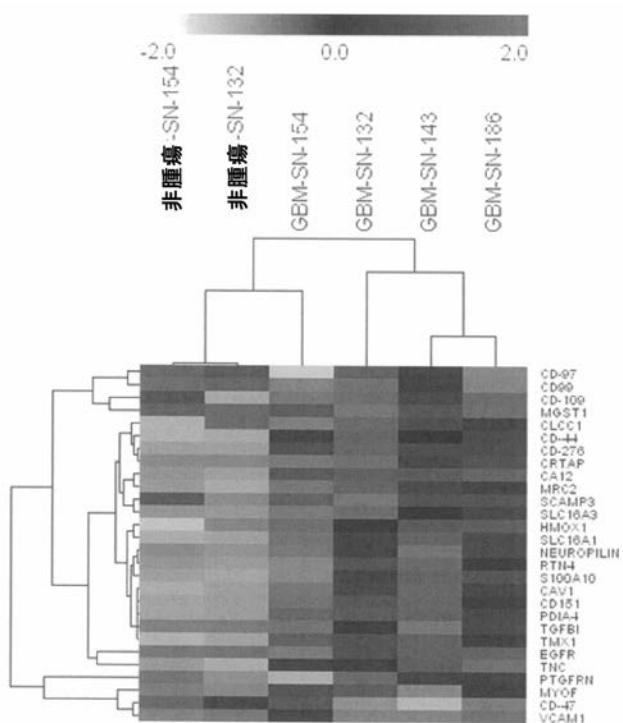
【 図 3 b 】



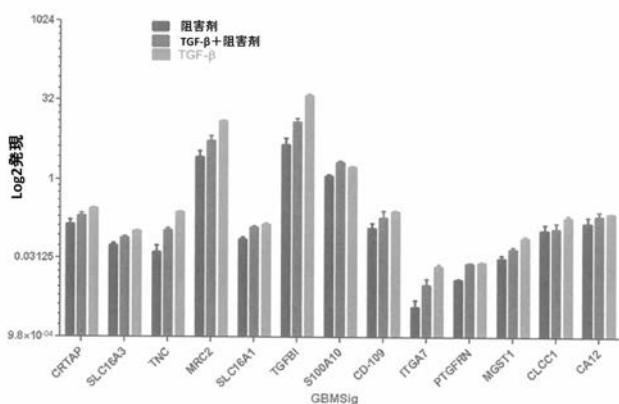
【図3a】



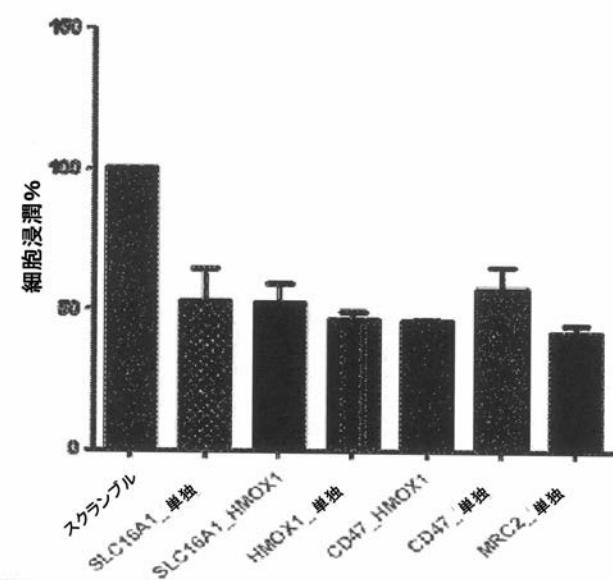
【図4】



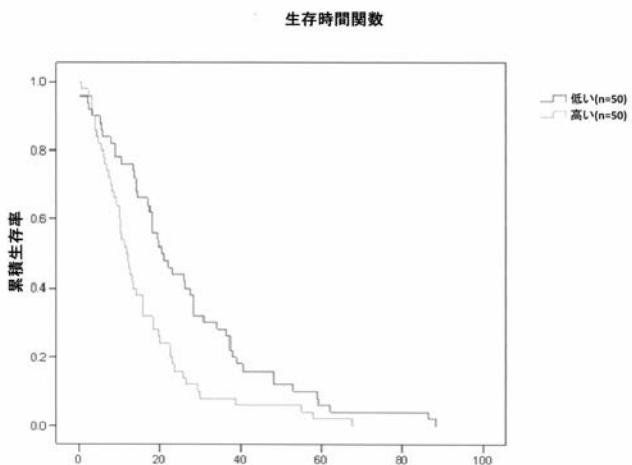
【図5 a】



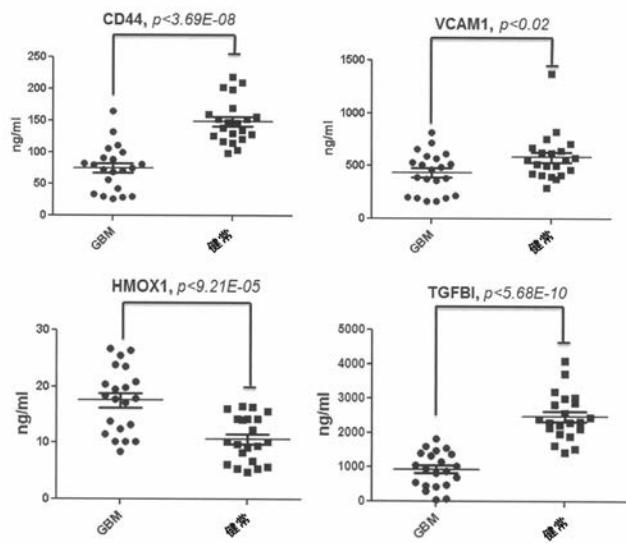
【図5 b】



【図5 c】



【図 6 a】



【図 6 b】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/38043
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/574 (2015.01) CPC - G01N 2333/705; C12Q 1/6886 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 5/095, 5/09; G01N 33/574; C12Q 1/68; A61K 31/55, 31/517, 31/519, 31/53, 31/505 (2015.01) CPC: C12N 5/0695; G01N 33/6887, 2333/705; C12Q 1/6886; A61K 31/519, 31/55, 31/505, 31/517, 31/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; NCBI/PubMed; Dialog ProQuest; glioblastoma, 'glioblastoma multiforme,' patient, subject, level, marker, expression, protein, diagnosis, 'CD44,' 'TGFBI'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0105133 A1 (CLARKE, MF et al.); May 10, 2007; paragraphs [0017], [0039], [0073], [0227], [0250], [0251]; Tables 4, 5	5, 14
Y		1-4, 6-9, 11-13, 15
X	WO 2005/065691 A1 (SCIOS INC.); July 21, 2005; paragraphs [0006], [0007], [0014], [0020], [0021]; Claims 27, 28	10
Y	WO 2011/022335 A1 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF NEW YORK UNIVERSITY); February 24, 2011; paragraphs [0025], [0026], [0092], [0093]	6-8, 12, 13, 15
Y	US 2012/0255043 A1 (CHIOU, SH et al.); October 4, 2012; paragraph [0047]	1-4, 6
		11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 September 2015 (22.09.2015)	Date of mailing of the international search report 15 OCT 2015	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ゴーシュ、 ディマンクリシュナ

アメリカ合衆国 98199 ワシントン、 シアトル、 #302、 ウエスト マナー ブレイス 2701

(72)発明者 コブス、 チャールズ、 エス.

アメリカ合衆国 98040 ワシントン、 マーサー アイランド、 サウスイースト サーティース プレイス、 8225

(72)発明者 ブライス、 ナーザン、 ディー.

アメリカ合衆国 98112 ワシントン、 シアトル、 イースト プロスペクト、 2406

(72)発明者 フード、 リーロイ

アメリカ合衆国 98121 ワシントン、 シアトル、 #2033、 セカンド アベニュー、 2033

Fターム(参考) 2G041 CA01 FA12 LA08

4C084 AA17 NA05 NA14 ZA012 ZB262 ZC412