

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6073217号

(P6073217)

(45) 発行日 平成29年2月8日 (2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月13日 (2017.1.13)

(51) Int. Cl.

F 1

G 0 6 F 19/12 (2011.01)

G 0 6 F 19/12

請求項の数 31 (全 143 頁)

(21) 出願番号	特願2013-507949 (P2013-507949)	(73) 特許権者	506115514
(86) (22) 出願日	平成23年4月29日 (2011.4.29)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(65) 公表番号	特表2013-528858 (P2013-528858A)		ティ オブ カリフォルニア
(43) 公表日	平成25年7月11日 (2013.7.11)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/000752		607 オークランド フランクリン ス
(87) 国際公開番号	W02011/139345		トリート 1111 トゥエルフス フロ
(87) 国際公開日	平成23年11月10日 (2011.11.10)		ア
審査請求日	平成26年4月30日 (2014.4.30)	(74) 代理人	100092093
(31) 優先権主張番号	61/343,575		弁理士 辻居 幸一
(32) 優先日	平成22年4月29日 (2010.4.29)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 熊倉 禎男
		(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】 ゲノムモデルに関するデータ統合を用いたパスウェイ認識アルゴリズム (PARADIGM)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロセッサによって実行されるダイナミックパスウェイマップ (DPM) の生成方法であって、

遺伝子発現、活性又は産物に関する複数のパスウェイ要素を格納するパスウェイ要素データベースにアクセスするステップであって、前記パスウェイ要素がタンパク質を含む、ステップと、

前記パスウェイ要素データベースの第1のパスウェイ要素を、遺伝子発現、活性又は産物に関する、少なくとも1つの先験的に既知の属性と関連付けるステップと、

前記パスウェイ要素データベースの第2のパスウェイ要素を、遺伝子発現、活性又は産物に関する、少なくとも1つの仮の属性と関連付けるステップと、

前記第1のパスウェイ要素と前記第2のパスウェイ要素との間の相関性を解釈するためにそれらの関連性を同定し、少なくとも1つのパスウェイについて、前記既知の属性及び前記仮の属性を使用して、前記第1及び第2のパスウェイ要素の影響レベルを割り当てるステップと、

前記少なくとも1つのパスウェイについての各パスウェイ、及び前記少なくとも1つのパスウェイについての前記第1及び第2のパスウェイ要素の前記影響レベルを、確率的パスウェイモデルの因子グラフにおけるエッジとして表現される各パスウェイにおける各相互作用を有する確率モデルに変換するステップであって、前記第1及び第2のパスウェイ要素の影響レベルは、負の値又は正の値うちの1つを含み、前記負の値及び前記正の値は、

10

20

少なくとも1つのパスウェイに関連付られた前記因子グラフの対応するエッジに相関する、ステップと、

分析エンジンを介して前記確率的パスウェイモデルを用いることにより、患者試料の複数の要素についての複数の計測属性から、特定のパスウェイについての確率的参照パスウェイ活性情報を有するDPMを導き出すステップと、
を含む方法。

【請求項2】

前記パスウェイが調節パスウェイネットワーク内にある、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記調節パスウェイネットワークが、加齢パスウェイネットワーク、アポトーシスパスウェイネットワーク、恒常性パスウェイネットワーク、代謝パスウェイネットワーク、複製パスウェイネットワーク、及び免疫応答パスウェイネットワークからなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記パスウェイが、シグナル伝達パスウェイネットワークからなる群であって、個別的パスウェイネットワークのネットワーク内にある群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記シグナル伝達パスウェイネットワークが、カルシウム／カルモジュリン依存性シグナル伝達パスウェイネットワーク、サイトカイン媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、ケモカイン媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、成長因子シグナル伝達パスウェイネットワーク、ホルモンシグナル伝達パスウェイネットワーク、MAPキナーゼシグナル伝達パスウェイネットワーク、ホスファターゼ媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、Rasスーパーファミリー媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、及び転写因子媒介性シグナル伝達パスウェイネットワークからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記タンパク質が、受容体、ホルモン結合タンパク質、キナーゼ、転写因子、メチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、及びヒストンデアセチラーゼからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記パスウェイ要素が核酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記核酸が、タンパク質コード配列、ゲノム調節配列、調節RNA、及びトランス活性化配列からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記確率的参照パスウェイ活性情報が、正常組織、罹患組織、加齢組織、又は回復組織に関して特定のものである、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記既知の属性が、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記仮の属性が、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記計測属性が、突然変異、示差的遺伝子配列オブジェクト、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質活性、及びタンパク質相互作用からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

プロセッサによって実行されるダイナミックパスウェイマップ(DPM)の生成方法で

10

20

30

40

50

あって、

遺伝子発現、活性又は産物に関する複数のパスウェイ要素を含む確率的パスウェイモデルを格納するモデルデータベースにアクセスするステップであって、前記パスウェイ要素がタンパク質を含み、

前記複数のパスウェイ要素のうち第1のパスウェイ要素と第2のパスウェイ要素との間の相関性を解釈するためにそれらの関連性を同定し、少なくとも1つのパスウェイについて、前記既知の属性及び前記仮の属性を使用して、前記第1及び第2のパスウェイ要素の影響レベルを割り当てる、ステップと、

分析エンジンを介して、患者試料の複数の要素についての複数の計測属性を用いることにより、前記確率的パスウェイモデルの期待値最大化からDPMを導き出すステップであって、前記DPMは特定のパスウェイについての確率的参照パスウェイ活性情報を推論する、ステップと、を含む方法。

【請求項14】

前記パスウェイが、調節パスウェイネットワーク、シグナル伝達パスウェイネットワーク、又は個別的パスウェイネットワークのネットワーク内にある、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記パスウェイ要素が、受容体、ホルモン結合タンパク質、キナーゼ、転写因子、メチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、及びヒストンデアセチラーゼからなる群から選択されるタンパク質、又は、ゲノム調節配列、調節RNA、及びトランス活性化配列からなる群から選択される核酸である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記確率的参照パスウェイ活性情報が、正常組織、罹患組織、加齢組織、又は回復組織に関して特定のものである、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

前記既知の属性が、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項18】

前記仮の属性が、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項19】

前記計測属性が、突然変異、示差的遺伝子配列オブジェクト、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質活性、及びタンパク質相互作用からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項20】

プロセッサによって実行される生物学的に関連性のある情報を分析する方法であって、ダイナミックパスウェイマップ(DPM)を格納するモデルデータベースにアクセスするステップであって、前記DPMが、第1の細胞又は患者試料の複数の要素についての複数の計測属性による確率的パスウェイモデルの操作することにより生成される、ステップと、

第2の細胞又は患者試料の複数の要素についての複数の計測属性を得るステップと、

分析エンジンを介して、前記DPM及び前記第2の細胞又は患者試料の前記複数の要素についての前記複数の計測属性を用いることにより、前記第2の細胞又は患者試料についての予測パスウェイ活性情報を決定するステップと、を含む方法。

【請求項21】

前記第1の細胞又は患者試料の前記複数の要素についての前記計測属性が、健常な細胞又は組織、細胞又は組織の特定の年齢、細胞又は組織の特定の疾患、罹患した細胞又は組織の特定の病期、特定の性別、特定の人種、特定の職業集団、及び特定の種に特徴的である、請求項20に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

前記第 2 の細胞又は患者試料の前記複数の要素についての前記計測属性が、突然変異、示差的遺伝子配列オブジェクト、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質活性、及びタンパク質相互作用からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 1 の試料及び前記第 2 の試料が同じ細胞又は患者から得られるものであり、前記第 2 の細胞又は患者試料の前記複数の要素についての前記複数の計測属性が、処置を受けた細胞又は患者から得られるものである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記処置が、放射線照射、前記患者への医薬品の投与、及び前記細胞への候補分子の投与からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 5】

前記候補分子が、候補分子ライブラリのメンバーである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記予測パスウェイ活性情報が、ある要素を、少なくとも 1 つのパスウェイにおいて階層的に優位な要素として同定する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記予測パスウェイ活性情報が、ある要素を、疾患に関連する少なくとも 1 つのパスウェイにおいて疾患の決定因子である要素として同定する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 8】

20

予測パスウェイ活性情報のグラフィック表現を生成するステップをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 9】

少なくとも一部において前記予測パスウェイ活性情報に基づく推奨処置を生成するステップをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記予測パスウェイ活性情報を用いて、疾患についての診断、予後判定、又は処置オプションの選択肢、及び食事指導からなる群から選択される推奨を処方するステップをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 1】

30

前記予測パスウェイ活性情報を用いて、後成的要因、ストレス適応、生物体の状態、及び修復又は治癒の状態を特定するステップをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2010 年 4 月 29 日に出願された「PATHWAY RECOGNITION ALGORITHM USING DATA INTEGRATION ON GENOMIC MODELS (PARADIGM)」と題される米国仮特許出願第 61/343, 575 号明細書に関連するとともにその優先権を主張し、この出願は全体として参照により本明細書に援用される。

40

【0 0 0 2】

本発明は、一部において、以下の米国連邦機関からの資金を用いて行われた：NSF CAREER 賞第 0845783 号、National Cancer Institute 契約／助成金番号第 5R21CA135937-02 号及び第 1U24CA143858-01 号、並びに National Institute of Health 訓練助成金番号第 T32 GM070386-01 号。米国連邦政府は本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

本発明は、個体又は対象における生物学的パスウェイの構成要素を同定し、その個体又

50

は対象にある臨床レジメン又は治療が適応かどうかを決定する方法に関する。本発明はまた、対象が癌、自己免疫疾患、細胞周期障害、又は他の障害に罹りやすいかどうかを、このような方法を用いて診断することにも関する。

【背景技術】

【0004】

現代の癌治療は、診断時に集められた関連臨床情報（例えば、患者病歴、腫瘍組織学及び病期）並びに続く臨床経過観察データ（例えば、治療レジメン及び疾患再発イベント）と共に、腫瘍のゲノム、転写及びエピゲノムの特徴に基づき癌を層別化することで、患者の診断、予後判定、リスク評価、及び治療反応予測を向上させ得ることを主な前提としている。

10

【0005】

癌の分子詳細を探るためのハイスループット技法がいくつか利用可能になっているものの、このパラダイムに基づき実現された成功例は一握りに過ぎない。例えば、ERBB2 成長因子受容体チロシンキナーゼの特定の増幅又は過剰発現を呈する乳癌患者の25%は、現在、この受容体を標的とするモノクローナル抗体であるトラスツズマブによって治療することができる（Vogel C, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ. First-line, single-agent Herceptin (R) (trastuzumab) in metastatic breast cancer. A preliminary report. Eur. J. Cancer 2001 Jan. ; 37 Suppl 1: 25-29)。

20

【0006】

しかしながら、この成功談でさえ、トラスツズマブから実際に何らかの治療利益を得るのはERBB2 陽性乳癌患者の50%未満であるという事実により陰りを帯び、これは、この十分な研究がなされた発癌パスウェイ及びERBB2 陽性乳癌に固有の多くの治療耐性機構について、我々の理解が不完全であることを強調するものである（Park JW, Neve RM, Szollosi J, Benz CC. Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. Clin. Breast Cancer 2008 Oct. ; 8 (5): 392-401)。

30

【0007】

このように全体的に見て基礎癌生物学に現代の進歩を応用できていないのは、一部には、現在実質的にいかなるタイプの癌に関しても技術的に入手可能なオミクスの特徴の全てを総合的に体系化して統合する能力を我々が持たないことに起因する。組織学的に類似している癌が、実際にはそれぞれ臨床的挙動が大きく異なる多数の分子サブタイプの複合体であるという確かなエビデンスにもかかわらず、予後診断及び治療の選択と十分に相関するロバストなシグネチャーがないため、この知識が実際面で適用されることはほとんどない。

40

【0008】

癌は、細胞株の調節不能を引き起こす異常な変化と関連付けられるゲノムの疾患である。明らかでない点は、ゲノムの変化が癌表現型の根底にある遺伝的パスウェイにどのように絡むのかである。ハイスループット機能ゲノミクス研究は、過去十年間に大きく進展した（Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Losos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, SHERLOCK G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown P

50

O, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 Feb. ; 403 (6769) : 503-511. ; Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999 Oct. ; 286 (5439) : 531-537. ; van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002 Dec. ; 347 (25) : 1999-2009)。

【0009】

しかしながら、複数のデータソースを統合して腫瘍の発生及び進行の再現可能且つ解釈可能な分子シグネチャーを同定するという課題は、依然として捉え所がないままである。TCGAなどによる最近のパイロット研究は、癌細胞で観察される変化を理解するために、パスウェイレベルでゲノム摂動を理解する必要があることを明確に示す。そのような知見は、患者が異なる遺伝子におけるゲノム変化又は異常発現を有する場合であっても、それらの遺伝子がしばしば共通のパスウェイに関与することを実証する。加えて、及びさらに特筆すべきことには、これらの観察される変化（例えば、欠失対増幅）は、全てがパスウェイ活性を増加させるか、或いは全てが低下させるかのいずれか、パスウェイ出力を同じ方向に変化させることが多い（Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 2008 Sep. ; 321 (5897) : 1807-1812. ; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008 Oct. ; 455 (7216) : 1061-1068を参照のこと)。

【0010】

ゲノムワイドの癌データを解釈する手法は、特定の表現型又は疾患状態と高度に相関する遺伝子発現プロファイルを同定することに重点が置かれており、有望な結果をもたらしている。分散分析、偽発見、及びノンパラメトリック法を用いる方法が提案されている（Troyanskaya et al., 2002を参照のこと）が提案されている。Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Micr

10

20

30

40

50

oarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. Nat. Rev. Genet. 2006 Jan. ; 7 (1) : 55-65. ; Dudoit S, Fridlyand J. A prediction-based resampling method for estimating the number of clusters in a dataset. Genome Biol 2002 Jun. ; 3 (7) : RESEARCH0036-RESEARCH0036. 21. ; Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001 Apr. ; 98 (9) : 5116-5121 ; Kerr MK, Martin M, Churchill GA. Analysis of variance for gene expression microarray data. J. Comput. Biol. 2000 ; 7 (6) : 819-837 ; Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003 Aug. ; 100 (16) : 9440-9445 ; 及び Troyanskaya OG, Garber ME, Brown PO, Botstein D, Altman RB. Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data. Bioinformatics 2002 Nov. ; 18 (11) : 1454-1461)。

【0011】

いくつかのパスウェイレベルの手法は、遺伝子集合の過剰出現に基づく統計的検定を用いて、パスウェイが疾患条件下で摂動を受けるかどうかを検出する。これらの手法では、遺伝子が、例えば示差的発現又はコピー数の変化のいずれかにより検出されるとき、その示差的活性の程度に基づき順位付けされる。次に、遺伝子集合濃縮解析 (GSEA) で用いられるように、パスウェイの遺伝子が並べ替えたリストの一番端にどの程度近い順位に位置するかを反映する確率スコアが割り当てられる (Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Landier ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005 Oct. ; 102 (43) : 15545-15550)。他の手法としては、超幾何検定に基づく方法を用いることによる、示差的に発現した遺伝子において濃縮された、ジーンオントロジー (Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill D P, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, SHERLOCK G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 2000 May ; 25 (1) : 25-29) 又は MIPS 哺乳動物タンパク質間相互作用 (Pagel P, Kovacs S, Osterheld M, Brauner B, Dunger-Kaltenbach I, Frishman G, Montrone C, Mark P, Stuempfle V, Mewes H, Ruepp A, Frishman D. The MIPS mammalian protein-protein interaction da

tabase. Bioinformatics 2005 Mar. ; 21 (6) : 832-834) のカテゴリーの同定が挙げられる (Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999 Mar. ; 96 (6) : 2907-2912)。

【0012】

パスウェイにおける遺伝子間の既知の相互依存性はパスウェイ関連性についての検出シグナルを増加させ得るが、過剰出現分析はこの相互依存性を組み込まないため、その有効性が限られている。加えて、過剰出現分析は、全ての遺伝子変化を等しいものとして扱い、多くの生体系にとってこれは妥当でないと思われる。

10

【0013】

問題をさらに複雑にしているのは、多くの遺伝子 (例えば、マイクロRNA) が多面的であり、いくつかのパスウェイにおいて異なる役割で作用するという事実である (Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. Drug Resist. Updat. 2007 Jan. ; 10 (1-2) : 13-29)。これらの要因から、過剰出現分析では、活性の差を判断し難い遺伝子を含む機能的に関連性のあるパスウェイが見落とされがちである。過剰出現分析ではまた、小さいパスウェイにおいて単一の遺伝子のみが著しく変化する場合に、多くの偽陽性が生じ得る。遺伝子間の詳細な相互作用及び遺伝子の表現型としての帰結に関する我々の全体的な知識は、急速に増えている。

20

【0014】

こうした知識は従来は諸々の文献に散在し、系統的に利用することが困難であったが、新たな取り組みにより、パスウェイ知識が公的に利用可能なデータベースとして目録化されている。パスウェイトポロジーを含む一部のデータベースは、Reactome (Joshi-Tope G, Gillespie M, Vastrik I, D'Eustachio P, Schmidt E, de Bono B, Jassal B, Gopinath GR, Wu GR, Matthews L, Lewis S, Birney E, Stein L. Reactome: a knowledgebase of biological pathways. Nucleic Acids Res. 2005 Jan. ; 33 (データベース版) : D428-32; Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Res. 1999 Jan. ; 27 (1) : 29-34) 及びNCIパスウェイ相互作用データベース (Pathway Interaction Database) である。これらのデータベースの更新は、遺伝子がどのように互いに調節及び情報交換し合うのかを明確に符号化することにより、生物系についての我々の理解を向上させるものと思われる。重要な前提は、ハイスループットデータ集合を解釈する目的でこれらのパスウェイの相互作用トポロジーを利用し得るということである。

30

40

【0015】

最近まで、パスウェイ知識を組み込んでハイスループットデータ集合を解釈するために利用可能な計算論的手法は、ほとんどなかった。しかしながら、パスウェイトポロジーを組み込む最新のいくつかの手法が提案されている (Efroni S, Schaefer

50

CF, Buetow KH. Identification of key processes underlying cancer phenotypes using biologic pathway analysis. PLoS ONE 2007 ; 2 (5) : e425)。シグナル伝達パスウェイ影響解析 (Signaling Pathway Impact Analysis: SPIA) と呼ばれる一つの手法は、GoogleのPageRankと類似した方法を用いてパスウェイにおける遺伝子の影響を決定する (Tarca AL, Draghici S, Khatrri P, Hassan SS, Mittal P, Kim J, Kim CJ, Kusanovic JP, Romero R. A novel signaling pathway impact analysis. Bioinformatics 2009 Jan. ; 25 (1) : 75-82)。SPIAでは、他の多くの遺伝子にリンクが出る遺伝子に対してより大きい影響が置かれる。SPIAは異なる癌データ集合 (肺腺癌及び乳癌) への適用に成功し、これらの癌に関与することが知られるパスウェイを同定するには、過剰出現解析及び遺伝子集合濃縮解析より優れていることが示された。SPIAは、パスウェイトポロジーを使用した癌データ集合の解釈における大きな進歩に相当するが、一種類のみのゲノムワイドデータの使用に限られている。

【0016】

コピー数、DNAメチル化、体細胞突然変異、mRNA発現及びマイクロRNA発現などの複数のゲノム変化を関係付ける新しい計算論的手法が必要とされている。単一のデータソースは単独では全体像を提供しそうにないため、統合パスウェイ解析は多量の観測集合の因果を解釈する際の精度及び感度を高めるものであることが予想される。

【0017】

ここ数年間に、複数レベルの観測に適合する因果ネットワークを学習するための確率的グラフィカルモデル (PGM) における手法が開発されている。データからパスウェイを自動的に学習する効率的なアルゴリズムが利用可能であり (Friedman N, Goldszmidt M. (1997) Sequential Update of Bayesian Network Structure. In: Proceedings of the Thirteenth Conference on Uncertainty in Artificial Intelligence (UAI '97), Morgan Kaufmann Publishers, pp. 165-174; Murphy K, Weiss Y. Loopy belief propagation for approximate inference: An empirical study. In: Proceedings of Uncertainty in AI. 1999)、遺伝子ネットワーク推論の問題によく適合している (Friedman N. Inferring cellular networks using probabilistic graphical models. Science 2004 Feb. ; 303 (5659) : 799-805)。例として、グラフィカルモデルを使用して、癌生物学における「モジュール」を形成する遺伝子集合が同定されている (Segal E, Friedman N, Kaminski N, Regev A, Koller D. From signatures to models: understanding cancer using microarrays. Nat Genet 2005 Jun. ; 37 Suppl: S38-45)。グラフィカルモデルはまた、腫瘍遺伝子型と発現表現型との間の関係の解明 (Lee S, Pe'er D, Dudley AM, Church GM, Koller D. Identifying regulatory mechanisms using individual variation reveals key role for chromatin modification. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006 Sep. ; 103 (38) : 14062-14067)、並びにタンパク質シグナルネットワーク (Sachs K, Perez O, Pe'er D, Lauffenburger DA, Nolan GP. Causal protein-signal n

10

20

30

40

50

networks derived from multiparameter single-cell data. *Science* 2005 Apr. ; 308 (5721) : 523-529) 及び組換え遺伝子制御コード (Beer MA, Tavazoie S. Predicting gene expression from sequence. *Cell* 2004 Apr. ; 117 (2) : 185-198) の推論にも応用されている。特に、因子グラフを使用して発現データがモデル化されている (Gat-Viks I, Shamir R. Refinement and expansion of signaling pathways: the osmotic response network in yeast. *Genome Research* 2007 Mar. ; 17 (3) : 358-367. ; Gat-Viks I, Tanay A, Raijman D, Shamir R. The Factor Graph Network Model for Biological Systems. In: Hutchison D, Kanade T, Kittler J, Kleinberg JM, Mattern F, Mitchell JC, Naor M, Nierstrasz O, Pandu Rangan C, Steffen B, Sudan M, Terzopoulos D, Tygar D, Vardi MY, Weikum G, Miyano S, Mesirov J, Kasif S, Istrail S, Pevzner PA, Waterman M, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005 p. 31-47. ; Gat-Viks I, Tanay A, Raijman D, Shamir R. A probabilistic methodology for integrating knowledge and experiments on biological networks. *J. Comput. Biol.* 2006 Mar. ; 13 (2) : 165-181.) 。

【0018】

乳癌は臨床的及びゲノム的に異質であり、いくつかの病理学的及び分子的に異なるサブタイプから構成される。従来のターゲット療法に対する患者の応答はサブタイプ間で異なり、マーカーガイド下治療戦略の開発の動機付けとなっている。乳癌細胞株のコレクションは、腫瘍に認められる分子サブタイプ及びパスウェイの多くを反映し、候補治療化合物で細胞株を処置することにより、分子サブタイプ、パスウェイ及び薬物応答の間の関連性の同定が導かれ得ることが示唆される。77の治療化合物の試験では、ほぼ全ての薬物がこれらの細胞株間で示差的応答を示し、約半数がサブタイプ、パスウェイ及び／又はゲノムゲノム異常に特異的な応答を示す。これらの知見は、応答及び抵抗の機構が、臨床薬剤開発並びに薬物を効果的に組み合わせる取り組みに情報を与え得ることを示唆する。

【0019】

様々なレベルにおけるハイスループット腫瘍分子プロファイルの蓄積は、世界的に時間及び費用のかかるプロセスとなっている。様々なレベルで遺伝子調節を複合的に分析することにより、複数の上皮癌で調節が解除される特定の生物学的機能及び分子パスウェイが示され、並びに個々に合わせた治療及びモニタリングを行うための新規患者サブグループが明らかとなり得る。本発明者らは、約110人の乳癌患者からの、原発腫瘍、対応する血液由来、且つ既知の微小転移状態有りの新鮮凍結試料から得られるいくつかの分子レベルのハイスループットデータを収集した（以下、MicMaデータ集合と称する）。これらの患者は、播種性腫瘍細胞（DTC）の存在、再発についての長期経過観察及び全生存に関する情報を含む900件を超える乳癌症例コホートの一部である。MicMa集合は、全ゲノムmRNA発現 (Naume, B. et al., (2007), Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer, 1:160-171)、arrayCGH (Russnes HG, Vollan HKM, Lingjaerde OC, Krasnitz A, Lundin P,

Naume B, Soerlie T, Borgen E, Rye IH, Langer oed A, Chin S, Teschendorff AE, Stephens PJ, Maaner S, Schlichting E, Baumbusch LO, Kaarresen R, Stratton MP, Wigler M, Caldas C, Zetterberg A, Hicks J, Boerresen-Dale A. Genomic architecture characterizes tumor progression paths and fate in breast cancer patients. *Sci Transl Med* 2010 Jun. ; 2 (38) : 38ra47)、DNAメチル化 (Roenneberg JA, Fleischer T, Solvang HK, Nordgard SH, Edvardsen H, Potapenko I, Nebdal D, Daviaud C, Gut I, Bukholm I, Naume B, Boerresen-Dale A, Tost J, Kristensen V. Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. *Mol Oncol* 2011 Feb. ; 5 (1) : 61-76)、全ゲノムSNP及びSNP-CGH (Van, Loo P. et al., (2010), Allele-specific copy number analysis of tumors, 107:16910-169154)、全ゲノムmiRNA発現解析 (5 Enerly, E. et al., (2011), miRNA-mRNA Integrated Analysis Reveals Roles for miRNAs in Primary Breast Tumors, 6:e16915-)、TP53突然変異状態依存性パスウェイ及びハイスループットペアエンドシーケンシング (7 Stephens, P. J. et al., (2009), Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes, 462:1005-1010) の並行するパイロット研究で使用されている。これは、単一の研究室によって同じ原発性乳房腫瘍集合に対して行われる包括的なハイスループット分子データコレクションである。

【0020】

癌研究における極めて重要なトピックは、癌の発症を促進するゲノム異常の同定である。MicMaコホートからの全ゲノムコピー数及び発現プロファイルを利用して、本発明者らは、各ステップが前のステップで選択された遺伝子のなかから最も有望な候補を同定するように設計されたいくつかのフィルタリングステップを定義した。最初の2つのステップは、一般的に異常な、且つ発現にインシス (in-cis) 相関する遺伝子、すなわちコピー数の変化が発現に対して実質的な影響を有する遺伝子の同定を含む。続いて、この方法は、選択された遺伝子のイントランス (in-trans) 効果を考慮して、可能性のある新規ドライバー遺伝子候補をさらに絞り込む (Miriam Ragle Aure, Israel Steinfeld Lars Oliver Baumbusch Knut Liestoel Doron Lipson Bjoern Naume Vessela N. Kristensen Anne-Lise Boerresen-Dale Ole-Christian Lingjaerde and Zohar Yakhini, (2011)、コピー数及び発現の統合解析についてのロバストな新規方法が、乳癌における新規ドライバー遺伝子候補を明らかにする (A robust novel method for the integrated analysis of copy number and expression reveals new candidate driver genes in breast cancer))。最近になって本発明者ら是对立遺伝子特異的コピー数解析を開発しており、これは固形腫瘍の対立遺伝子特異的コピー数の正確な分析が可能なもので (ASCAT

)、同時に腫瘍の倍数性及び異常でない細胞混合物の双方を推定して調整する(Van, Loo P. et al., (2010), Allele-specific copy number analysis of tumors, 107:16910-169154)。これにより、ゲノムワイドな対立遺伝子特異的のコピー数プロファイルの計算が可能となり、そこから獲得、喪失、コピー数中立のイベント、及びヘテロ接合性の喪失(LOH)を正確に決定することができる。DNA異常を対立遺伝子特異的に観測することで、本発明者らは乳癌における対立遺伝子の歪みのゲノムワイドなマップを作成することができた。このマップは、一方の対立遺伝子を選択的に失われる一方で他方の対立遺伝子を選択的に獲得される遺伝子座を示す。本発明者らは、これらの選択的な対立遺伝子が乳癌の発症に異なる影響を有すると仮定する。本発明者らはまた、基底細胞様乳癌が他のサブタイプと比較して著しく高頻度のLOHを有し、そのASCATプロファイルが腫瘍成長中にゲノム材料の大規模な喪失と、それに続く全ゲノム重複を示して近三倍体ゲノムを生じることにも認めることができた(Van et al., (2010) 上記)。個別的な全域DNAメチル化プロファイルは、正常な乳房上皮細胞においても、並びに乳房腫瘍においても報告されている。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

現在、疾患及び障害の特性決定、診断、予防、治療、及び転帰の判断に用い得る方法を提供することが必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0022】

一実施形態において、本発明はダイナミックパスウェイマップ(DPM)の生成方法を提供し、この方法は、複数のパスウェイ要素を格納するパスウェイ要素データベースへのアクセスを提供するステップであって、各パスウェイ要素が少なくとも1つのパスウェイへのその関与により特徴付けられるステップと；パスウェイ要素データベースに結合された修飾エンジンへのアクセスを提供するステップと；修飾エンジンを使用して第1のパスウェイ要素を少なくとも1つの先験的に既知の属性と関連付けるステップと；修飾エンジンを使用して第2のパスウェイ要素を少なくとも1つの仮の属性と関連付けるステップと；修飾エンジンを使用して、第1のパスウェイ要素及び第2のパスウェイ要素を相互に関連させ、少なくとも1つのパスウェイについてのその影響レベルを、それぞれ既知の属性及び仮の属性を使用して割り当てることにより、確率的パスウェイモデルを形成するステップと；分析エンジンを介して確率的パスウェイモデルを用いることにより、患者試料の複数の要素についての複数の計測属性から、特定のパスウェイについての参照パスウェイ活性情報を有するDPMを導き出すステップとを含む。好ましい一実施形態において、パスウェイ要素はタンパク質である。より好ましい実施形態において、タンパク質は、受容体、ホルモン結合タンパク質、キナーゼ、転写因子、メチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、及びヒストンデアセチラーゼからなる群から選択される。代替的な好ましい実施形態において、パスウェイ要素は核酸である。より好ましい実施形態において、核酸は、タンパク質コード配列、ゲノム調節配列、調節RNA、及びトランス活性化配列からなる群から選択される。別のより好ましい実施形態において、参照パスウェイ活性情報は、正常組織、罹患組織、加齢組織、又は回復組織に関して特定のものである。好ましい実施形態において、既知の属性は、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される。別の好ましい実施形態において、仮の属性は、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される。別の代替的实施形態において、計測属性は、突然変異、示差的遺伝子配列オブジェクト、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質活性、及びタンパク質相互作用からなる群から選択される。好ましい実施形態において、パスウェイは調節パスウェイネットワーク内にある。より好ましい実施形態において、調節パスウェイネットワークは、加齢パスウェイネットワーク、アポトーシスパスウ

30

40

50

エイネットワーク、恒常性パスウェイネットワーク、代謝パスウェイネットワーク、複製パスウェイネットワーク、及び免疫応答パスウェイネットワークからなる群から選択される。さらにより好ましい実施形態において、パスウェイはシグナル伝達パスウェイネットワーク内にある。代替的なさらにより好ましい実施形態において、パスウェイは個別的パスウェイネットワークのネットワーク内にある。最も好ましい実施形態において、シグナル伝達パスウェイネットワークは、カルシウム／カルモジュリン依存性シグナル伝達パスウェイネットワーク、サイトカイン媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、ケモカイン媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、成長因子シグナル伝達パスウェイネットワーク、ホルモンシグナル伝達パスウェイネットワーク、MAPキナーゼシグナル伝達パスウェイネットワーク、ホスファターゼ媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、Rasスーパーファミリー媒介性シグナル伝達パスウェイネットワーク、及び転写因子媒介性シグナル伝達パスウェイネットワークからなる群から選択される。

10

【0023】

本発明はまた、ダイナミックパスウェイマップ（DPM）の生成方法も提供し、この方法は、複数のパスウェイ要素を含む確率的パスウェイモデルを格納するモデルデータベースへのアクセスを提供するステップであって；複数のパスウェイ要素の第1の数値が相互相関され、且つ既知の属性に基づき少なくとも1つのパスウェイについての影響レベルを割り当てられ；複数のパスウェイ要素の第2の数値が相互相関され、且つ仮の属性に基づき少なくとも1つのパスウェイについての影響レベルを割り当てられる、ステップと；分析エンジンを介して、患者試料の複数の要素についての複数の計測属性を用いることにより、確率的パスウェイモデルを修飾してDPMを得るステップであって、DPMは特定のパスウェイについての参照パスウェイ活性情報を有する、ステップとを含む。

20

【0024】

好ましい一実施形態において、パスウェイは、調節パスウェイネットワーク、シグナル伝達パスウェイネットワーク、又は個別的パスウェイネットワークのなかあるネットワーク内にある。別の好ましい実施形態において、パスウェイ要素は、受容体、ホルモン結合タンパク質、キナーゼ、転写因子、メチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、及びヒストンデアセチラーゼからなる群から選択されるタンパク質であるか、又は核酸が、ゲノム調節配列、調節RNA、及びトランス活性化配列からなる群から選択される。なおさらに好ましい実施形態において、参照パスウェイ活性情報は、正常組織、罹患組織、加齢組織、又は回復組織に関して特定のものである。別の好ましい実施形態において、既知の属性は、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される。別の好ましい実施形態において、仮の属性は、化合物属性、クラス属性、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、及びタンパク質活性からなる群から選択される。なおさらに好ましい実施形態において、計測属性は、突然変異、示差的遺伝子配列オブジェクト、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質活性、及びタンパク質相互作用からなる群から選択される。

30

【0025】

本発明はさらに、生物学的に関連性のある情報を分析する方法を提供し、この方法は、ダイナミックパスウェイマップ（DPM）を格納するモデルデータベースへのアクセスを提供するステップであって、DPMが、第1の細胞又は患者試料の複数の要素についての複数の計測属性による確率的パスウェイモデルの修飾により生成される、ステップと；第2の細胞又は患者試料の複数の要素についての複数の計測属性を得るステップと；分析エンジンを介して、DPM及び第2の細胞又は患者試料の複数の要素についての複数の計測属性を用いることにより、第2の細胞又は患者試料についての予測パスウェイ活性情報を決定するステップとを含む。好ましい一実施形態において、第1の細胞又は患者試料の複数の要素についての計測属性は、健常な細胞又は組織、細胞又は組織の特定の年齢、細胞又は組織の特定の疾患、罹患した細胞又は組織の特定の病期、特定の性別、特定の人種、特定の職業集団、及び特定の種に特徴的である。別の好ましい実施形態において、第2の細胞又は患者試料の複数の要素についての計測属性は、突然変異、示差的遺伝子配列オブ

40

50

ジェクト、遺伝子コピー数、転写レベル、翻訳レベル、タンパク質活性、及びタンパク質相互作用からなる群から選択される。代替的な好ましい実施形態において、第1の試料及び第2の試料は同じ細胞又は患者から得られ、第2の細胞又は患者試料の複数の要素についての複数の計測属性を得る前に細胞又は患者に処置を提供するステップをさらに含む。より好ましい実施形態において、処置は、放射線照射、患者への医薬品の投与、及び細胞への候補分子の投与からなる群から選択される。別のより好ましい実施形態において、候補分子は、候補分子ライブラリのメンバーである。別の好ましい実施形態において、予測パスウェイ活性情報は、ある要素を、少なくとも1つのパスウェイにおいて階層的に優位な要素として同定する。より好ましい実施形態において、予測パスウェイ活性情報は、ある要素を、疾患に関連する少なくとも1つのパスウェイにおいて疾患の決定因子である要素として同定する。代替的实施形態において、この方法は、予測パスウェイ活性情報のグラフィック表現を生成するステップをさらに含む。代替的实施形態において、この方法は、少なくとも一部において予測パスウェイ活性情報に基づく推奨処置を生成するステップをさらに含む。代替的实施形態において、この方法は、予測パスウェイ活性情報を用いて、疾患についての診断、予後判定、又は処置オプションの選択肢、及び食事指導からなる群から選択される推奨を処方するステップをさらに含む。代替的实施形態において、この方法は、予測パスウェイ活性情報を用いて、後成的要因、ストレス適応、生物体の状態、及び修復又は治癒の状態を特定するステップをさらに含む。

10

【0026】

別の実施形態において、本発明は、必要がある個体の臨床転帰を予測する統合パスウェイ活性 (IPA) の行列を作成するための変形方法であって、(i) キュレーションされたパスウェイの集合を提供するステップであって、パスウェイが複数のエンティティを含む、ステップと；(ii) 各キュレーションされたパスウェイを個別的な確率的グラフィカルモデル (PGM) に変換するステップであって、PGMが各キュレーションされたパスウェイの因子グラフから導かれる、ステップと、(iii) 個体からの生体試料を提供するステップであって、生体試料が、キュレーションされたパスウェイの一つに含まれる少なくとも1つの内因性エンティティを含む、ステップと；(iv) 生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップと；(v) 内因性エンティティのレベルを、別の個体からの既に決定済みの対照試料におけるエンティティのレベルと比較するステップと；(vi) 対照エンティティレベルに対する内因性エンティティのレベルが活性化しているか、基準どおりであるか、又は不活性化しているかを決定するステップと；(vii) 内因性エンティティに数値ステートを割り当てるステップであって、活性化を表すステートが+1であり、基準活性を表すステートが0であり、及び不活性化を表すステートが-1である、ステップと；(viii) 別の内因性エンティティについてステップii～(vi)を繰り返すステップと；(x) 各内因性エンティティの数値ステートを統合パスウェイ活性 (IPA) の行列にコンパイルするステップとを含み、(x) 統合パスウェイ活性の行列がAであり、式中、 A_{ij} は、生体試料jにおけるエンティティiの推論された活性を表す、方法を提供し；この方法により、個体の臨床転帰を予測する統合パスウェイ活性行列がもたらされる。

20

30

【0027】

一実施形態において、IPA行列を作成する方法は、必要がある個体に対して、臨床転帰を予測するステップ、診断を提供するステップ、治療を提供するステップ、治療を送達するステップ、治療を投与するステップ、治療を実施するステップ、治療を管理するステップ、又は治療を投薬するステップを含む。別の実施形態において、キュレーションされたパスウェイの集合は、ヒト生物学の分析によるものである。さらに別の代替的实施形態において、キュレーションされたパスウェイの集合は、非ヒト生物学の分析によるものである。別の実施形態において、対照エンティティレベルに対する内因性エンティティのレベルを決定するステップは、スチューデントのt検定を用いて実行される。代替的实施形態において、対照エンティティレベルに対する内因性エンティティのレベルを決定するステップは、ANOVAを用いて実行される。別の実施形態において、変形方法は、2つ以

40

50

上の個体からの複数の統合パスウェイ活性行列が組み合わせられるステップであって、組み合わせられた複数の行列からクラスターが得られるステップと、得られたクラスターの個々の行列間の距離が決定されるステップとを含む。一実施形態では、決定された距離がK平均法クラスター分析を用いて分析される。別の代替的实施形態では、決定された距離が K^2 平均法クラスター分析を用いて分析される。さらに他の実施形態では、変形方法は、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップを含み、このステップは、抗体によって内因性エンティティを検出するステップであって、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。代替的实施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、核酸プローブによって内因性エンティティを検出するステップであって、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。別の代替的实施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、有機試薬によって内因性エンティティを検出するステップであって、有機試薬が内因性エンティティに結合し、それにより検出可能なシグナルが得られ、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。

10

【0028】

さらに別の代替的实施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、無機試薬によって内因性エンティティを検出するステップであって、無機試薬が内因性エンティティに結合し、それにより検出可能なシグナルが得られ、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。別の代替的实施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、有機試薬によって内因性エンティティを検出するステップであって、有機試薬が内因性エンティティと反応し、それにより検出可能なシグナルが得られ、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。別の代替的实施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、無機試薬によって内因性エンティティを検出するステップであって、無機試薬が内因性エンティティと反応し、それにより検出可能なシグナルが得られ、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。好ましい実施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、内因性エンティティに最適な波長で内因性エンティティの吸光度を計測するステップであって、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。代替的な好ましい実施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、内因性エンティティに最適な波長で内因性エンティティの蛍光を計測するステップであって、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップを含む。さらに別の代替的な好ましい実施形態において、生体試料中の内因性エンティティのレベルを決定するステップは、内因性エンティティを酵素と反応させるステップであって、酵素が内因性エンティティを選択的に消化することにより少なくとも1つの産物が産生されるステップと、その少なくとも1つの産物を検出するステップであって、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップとを含む。より好ましい実施形態において、内因性エンティティを酵素と反応させるステップにより、少なくとも2つの産物の産生が生じる。さらに好ましい実施形態において、少なくとも2つの産物を生じる内因性エンティティを酵素と反応させるステップの次に、産物を別の酵素により処理するステップであって、酵素が、産物の少なくとも1つを選択的に消化することにより少なくとも第3の産物が産生されるステップと、その少なくとも第3の産物を検出するステップであって、それにより内因性エンティティのレベルを決定するステップとが続く。

20

30

40

【0029】

別の好ましい実施形態において、個体は、健常な個体、無症候の個体、及び症候を示す個体の群から選択される。より好ましい実施形態において、個体は、ある病態と診断される個体からなる群から選択され、その病態は疾患及び障害からなる群から選択される。好ましい実施形態において、病態は、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、良性前立腺肥大症、

50

気管支炎、チェディアック・東症候群、胆嚢炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎（*dermatomyositis*）、真性糖尿病、気腫、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、慢性肉芽腫性疾患、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、腓炎、多嚢胞性卵巣症候群、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、重症複合型免疫不全症（*SCID*）、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症；及び腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、腓癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌、静坐不能（*akathisia*）、アルツハイマー病、健忘、筋萎縮性側索硬化症（*ALS*）、失調、双極性障害、緊張病、脳性麻痺、脳血管疾患、クロイツフェルトヤコブ病、認知症、うつ病、ダウン症候群、遅発性ジスキネジー、ジストニー、癲癇、ハンチントン病、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経痛、神経線維腫症、ニューロパチー、パーキンソン病、ピック病、網膜色素変性症、統合失調症、季節性情動障害、老年痴呆、脳卒中、トゥレット症候群並びに腺癌、黒色腫、及びテラトカルシノーマを含む癌、特に脳の癌からなる群から選択される。代替的な好ましい実施形態において、病態は、癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、腓癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌；免疫障害、例えば、後天性免疫不全症候群（*AIDS*）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触性皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、リンパ球毒素性偶発性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、腓炎、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症、外傷、ブルトン型X連鎖性無 γ グロブリン血症（*X-linked agammaglobulinemia of Bruton*）、分類不能型免疫不全症（*CVID*）、ディジョージ症候群（胸腺低形成）、胸腺異形成、IgA単独欠損症、重症複合型免疫不全症（*SCID*）、血小板減少症と湿疹を伴う免疫不全症（ヴィスコット・オールドリッチ症候群）、チェディアック・東症候群、慢性肉芽腫性疾患、遺伝性血管神経性浮腫、及びクッシング病に関連する免疫不全症；並びに発育障害、例えば、尿細管性アシドーシス、貧血症、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成不全、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩、泌尿生殖器奇形、及び精神遅滞）、スミス・マジェニス症候群、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、遺伝性ニューロパチー、例えばシャルコー・マリー・トゥース病及び神経線維腫症、甲状腺機能低下症、水頭症、発作性障害、例えばシデナム舞踏病（*Sydenham's chorea*）及び脳性麻痺、脊椎披裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴、並びに対象の任意の組織、器官、又は系、例えば、脳、副腎、腎臓、骨格系又は生殖器系が関与する細胞成長及び分化、胚発生、及び形態形成に関連する任意の障害からなる群から選択される。別の好ましい実施形態において、病態は、内分泌障害、例えば、性腺機能低下症、シーハン症候群、尿崩症、カルマ

10

20

30

40

50

ン病、ハンド・シュラー・クリスチャン病、レットレル・ジーベ病、サルコイドーシス、エンプティセラ症候群、及び小人症を含む下垂体機能低下に関連する障害；先端巨大症、巨人症、及び抗利尿ホルモン（ADH）不適合分泌症候群（SIADH）を含む下垂体機能亢進症；並びに、甲状腺腫、粘液水腫、細菌感染症に関連する急性甲状腺炎、ウイルス感染症に関連する亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、及びクレチン病を含む甲状腺機能低下に関連する障害；甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、及びプランマー病を含む甲状腺機能亢進に関連する障害；並びに、コン病（慢性高カルシウム血症（chronic hypercalcemia））を含む副甲状腺機能亢進に関連する障害；呼吸器疾患、例えば、アレルギー、喘息、急性及び慢性炎症性肺疾患、ARDS、気腫、肺うっ血及び肺浮腫、COPD、間質性肺疾患、及び肺癌；癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、膵癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌；及び免疫不全症、例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触性皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、リンパ球毒素性偶発性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、膵炎、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症、並びに外傷からなる群から選択される。

【0030】

本発明はまた、本明細書に開示されるとおりの変形方法も提供し、ここでは次に元の構成データ集合の代わりに行列Aを使用して、臨床転帰との関連性を特定することができる。より好ましい実施形態において、キュレーションされたパスウェイは、生化学的パスウェイ、遺伝的パスウェイ、代謝パスウェイ、遺伝子調節パスウェイ、遺伝子転写パスウェイ、遺伝子翻訳パスウェイからなる群から選択される。別のより好ましい実施形態において、エンティティは、核酸、ペプチド、タンパク質、ペプチド核酸、炭水化物、脂質、プロテオグリカン、因子、補因子、生化学的代謝産物、有機組成物、無機組成物、及び塩からなる群から選択される。さらに他の好ましい実施形態において、生体試料は、患者試料、対照試料、実験的に処理された動物試料、実験的に処理された組織培養物試料、実験的に処理された細胞培養物試料、及び実験的に処理されたインビトロ生化学組成物試料からなる群から選択される。より好ましい実施形態において、生体試料は患者試料である。

【0031】

本発明はまた、患者試料において変化する分子パスウェイを推論する出力を有する確率的グラフィカルモデル（PGM）フレームワークも提供し、このPGMは複数の因子グラフを含み、ここで因子グラフは統合された生物学的データ集合を表し、及び患者試料において変化する推論された分子パスウェイはデータから分かる分子パスウェイを含み、及び前記分子パスウェイは臨床的又は非臨床的条件をもたらし、推論された分子パスウェイは臨床レジメン又は治療によって調整されることが既知であり、及び出力は臨床レジメンを指示する。好ましい実施形態において、データは、実験データ、臨床データ、疫学データ、及び現象論的データから選択される。別の好ましい実施形態において、病態は、疾患及び障害からなる群から選択される。より好ましい実施形態において、病態は、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、

自己免疫性甲状腺炎、良性前立腺肥大症、気管支炎、チェディアック・東症候群、胆嚢炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎（dermatomyositis）、真性糖尿病、気腫、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、慢性肉芽腫性疾患、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、膵炎、多嚢胞性卵巣症候群、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、重症複合型免疫不全症（SCID）、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症；及び腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、膵癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌、静坐不能（akathisia）、アルツハイマー病、健忘、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、失調、双極性障害、緊張病、脳性麻痺、脳血管疾患、クロイツフェルトヤコブ病、認知症、うつ病、ダウン症候群、遅発性ジスキネジー、ジストニー、癲癇、ハンチントン病、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経痛、神経線維腫症、ニューロパチー、パーキンソン病、ピック病、網膜色素変性症、統合失調症、季節性情動障害、老年痴呆、脳卒中、トゥレット症候群並びに腺癌、黒色腫、及びテラトカルシノーマを含む癌、特に脳の癌からなる群から選択される。代替的なより好ましい実施形態において、病態は、癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、膵癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌；免疫障害、例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触性皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、リンパ球毒素性偶発性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、膵炎、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症、外傷、ブルトン型X連鎖性無γグロブリン血症（X-linked agammaglobulinemia of Bruton）、分類不能型免疫不全症（CVI）、ディジョージ症候群（胸腺低形成）、胸腺異形成、IgA単独欠損症、重症複合型免疫不全症（SCID）、血小板減少症と湿疹を伴う免疫不全症（ヴィスコット・オールドリッチ症候群）、チェディアック・東症候群、慢性肉芽腫性疾患、遺伝性血管神経性浮腫、及びクッシング病に関連する免疫不全症；並びに発育障害、例えば、尿細管性アシドーシス、貧血症、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成不全、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩、泌尿生殖器奇形、及び精神遅滞）、スミス・マジェニス症候群、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、遺伝性ニューロパチー、例えばシャルコー・マリー・トゥース病及び神経線維腫症、甲状腺機能低下症、水頭症、発作性障害、例えばシデンナム舞踏病（Sydenham's chorea）及び脳性麻痺、脊椎捻転、無脳症、頭蓋脊椎捻転、先天性緑内障、白内障、感音難聴、並びに対象の任意の組織、器官、又は系、例えば、脳、副腎、腎臓、骨格系又は生殖器系が関与する細胞成長及び分化、胚発生、及び形態形成に関連する任意の障害からなる群から選択される。さらに他のより好ましい実施形態において、病態は、内分泌障害、例

10

20

30

40

50

えば、性腺機能低下症、シーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド・シュラー・クリスチャン病、レットレル・ジーベ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、及び小人症を含む下垂体機能低下に関連する障害；先端巨大症、巨人症、及び抗利尿ホルモン（ADH）不適合分泌症候群（SIADH）を含む下垂体機能亢進症；並びに、甲状腺腫、粘液水腫、細菌感染症に関連する急性甲状腺炎、ウイルス感染症に関連する亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、及びクレチン病を含む甲状腺機能低下に関連する障害；甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、及びプランマー病を含む甲状腺機能亢進に関連する障害；並びに、コン病（慢性高カルシウム血症（chronic hypercalcemia））を含む副甲状腺機能亢進に関連する障害；呼吸器疾患、例えば、アレルギー、喘息、急性及び慢性炎症性肺疾患、ARDS、気腫、肺うっ血及び肺浮腫、COPD、間質性肺疾患、及び肺癌；癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、膵癌、副甲状腺癌、陰莖癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌；及び免疫不全症、例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触性皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、リンパ球毒素性偶発性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、膵炎、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症、並びに外傷からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】PARADIGM方法の概略を示す。PARADIGMはパスウェイ構造図を機能的ゲノムデータと共に使用して、さらに下流の分析に使用することのできるゲノム活性を推論する。TCGA GBMデータにおけるNCIパスウェイ相互作用。NCIネイチャー・パスウェイ・データベース（Nature Pathway Database）においてAが遺伝子Bの上流アクチベータであることが分かった全て（ $n=462$ ）のペアについて、TCGA GBMデータから計算されるピアソン相関（x軸）を2つの異なる方法で計算した。ヒストグラムは、Aのコピー数とBの発現との間の相関（C2E、実線赤色）及びAの発現とBの発現との間の相関（E2E、実線青色）をプロットする。ランダムにペアにした遺伝子間の相関のヒストグラムをC2E（破線赤色）及びE2E（破線青色）について示す。矢印は、C2E相関（赤色）及びE2E相関（青色）に認められる正の相関の濃縮を指し示す。

【図2】遺伝的パスウェイ図のPARADIGMモデルへの変換を示す。PARADIGM方法の概略。PARADIGMはパスウェイ構造図を機能的ゲノムデータと共に使用して、さらに下流の分析に使用することのできるゲノム活性を推論する。A. 単一の患者に関するデータが、単一の遺伝子について、DNAコピー、mRNA及びタンパク質レベル、並びにタンパク質活性を表すその遺伝子についての4つの異なる生物学的エンティティの集合を用いて統合される。B. PARADIGMは、標的に対する転写因子（左上）、複合体に凝集するサブユニット（右上）、翻訳後修飾（左下）、及び冗長な機能を果たすファミリーの遺伝子集合（右下）を含む遺伝子間における様々なタイプの相互作用をモデル化する。C. モデルに表現されるとおり、P53、阻害薬MDM2、及び高次プロセスのアポトーシスが関与する小さいサブパスウェイの小例（toy example）。

【図3】癌ゲノムアトラス(The Cancer Genome Atlas:TCGA)プロジェクト(<http://cancergenome.nih.gov>)の多形性膠芽腫(GMB)データにおける例示的NCIパスウェイ相互作用を示す。NCIネイチャー・パスウェイ・データベース(Nature Pathway Database)においてAが遺伝子Bの上流アクチベータ(upstream activator)であることが分かった全て($n=462$)のペアについて、TCGA GMBデータから計算されるピアソン相関(x軸)を2つの異なる方法で計算した。ヒストグラムは、Aのコピー数とBの発現(expression)との間の相関(C2E、実線赤色)及びAの発現とBの発現との間の相関(E2E、実線青色)をプロットする。ランダムにペアにした遺伝子間の相関のヒストグラムをC2E(破線赤色)及びE2E(破線青色)について示す。矢印は、C2E相関(赤色)及びE2E相関(青色)に認められる正の相関の濃縮を指し示す。

10

【図4】抗アポトーシス性のセリン・スレオニンキナーゼ1(AKT1)についての例示的学習パラメータを示す。統合パスウェイ活性(IPA)が期待値最大化(EM)アルゴリズムの反復毎に収束するまで示される。点は、順列化した試料からのIPAを示し、丸は実サンプルからのIPAを示す。赤色の線は実サンプルの平均IPAを指し、緑色の線はヌルサンプルの平均IPA(mean IPA)を指す。

【図5】PARADIGM及びシグナル伝達パスウェイ影響解析(SPIA)によるデコイパスウェイの実パスウェイとの識別を示す。パスウェイの各遺伝子に新しい遺伝子名を割り当てることにより、デコイパスウェイを作成した。次にPARADIGM及びSPIAを用いてパスウェイ毎の摂動を計算した。各線は、摂動の順位を用いて実パスウェイをデコイパスウェイと識別する受信者動作特性を示す。例えば乳癌では、曲線下面積(AUC)はPARADIGM及びSPIAについてそれぞれ0.669及び0.602である。多形性膠芽腫(GBM)では、AUCはそれぞれ0.642及び0.604である。

20

【図6】乳癌においてAktにより媒介されるクラスIホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)シグナル伝達イベントのwithin順列と比較した例示的患者試料IPAを示す。患者試料における平均IPA(赤色)で生物学的エンティティを並べ替え、順列化した(peruted)試料の平均IPAと比較した。各平均の周りの色付きの範囲は、各集合の標準偏差(SD)を表す。右側のIPAはAKT1、CHUK、及びMDM2を含む。

30

【図7】ErbB2パスウェイの例示的CIRCLEMAP表示を示す。ノード毎に、エストロゲン受容体(ER)状態、IPA、発現データ、及びコピー数データが、それぞれ内側から外側に向かう同心円として表示される。アポトーシスノード及びErbB2/ErbB3/ニューレグリン2複合体ノードは直接的な観測値がないため、これらのエンティティはER状態の円及びIPAの円のみを有する。各患者のデータが一つの角度に沿って、円の中心から周縁に向かって表示される。

【図8】TCGA GMBMについてのIPAの例示的クラスタリングを示す。各列が一つの試料に対応し、各行が生体分子エンティティに対応する。階層クラスタリング図の下のカラバーは、図9に使用したクラスターを表す。

【図9】図8のクラスターについてのカプラン・マイヤー生存プロットを示す。

40

【図10】細胞株が治療化合物に対して広範囲の応答を示すことを示す。A. ルミナル型細胞株及びERBB2 AMP型細胞株はAKT阻害に対して選択的に応答する。各バーはSigma AKT1-2阻害薬に対する単一の乳癌細胞株の応答を表す。細胞株は感受性($-\log_{10}(GI_{50})$)が低い順に並べ、サブタイプ別に色を付けている。B. 同様の機構を有する化合物のGI50値は高度に相関する。ヒートマップは、様々な化合物で処置した乳癌細胞株の応答間の相関の階層的クラスタリングを示す。C. 同様の作用機序を有する化合物は、細胞株パネル内で同様の応答パターンを示す。各列が一つの細胞株を表し、各行が試験化合物を表す。GI50値は階層的にクラスター化される。有意なサブタイプ効果を有する化合物のみを含める。同様のサブタイプの細胞株は共にクラスター化され易く、それらが同じ化合物に応答性を有することが示される。灰色は欠損値を表す。

50

D. CNAは関連する感受性である。箱ひげ図は、示されるゲノム遺伝子座に異常な（A）及び正常な（N）コピー数を有する細胞株についての応答感受性の分布を示す。薬物応答とCNAとの間の関連性についてのFDR p値を注記する。A. 9p21（CDKN2A）の欠失は、イクサベピロン、ビノレルビン（vinorelbine）及びファスカプリシンに対する応答と関連する。b. 20q13（STK15/AURKA）の増幅は、VX-680及びGSK1070916と関連する。c. 11q13（CCND1）における増幅は、カルボプラチン及びGSK1070916に対する応答と関連する。

【図11】細胞株及びTCGA試料の双方の非冗長PARADIGM活性のヒートマップを示す。クラスター系統樹は試料間のユークリッド距離を表し、Eisen Clusterを使用して作成し、及びJava Treeviewを使用して描いた。系統樹の下

10

【図12】細胞株サブタイプが固有のネットワーク特徴を有することを示す。全てのパネルにおいて、グラフの各ノードは、タンパク質（丸）、多量体複合体（六角形）、又は抽象的細胞プロセス（正方形）のいずれかに対応する異なるパスウェイ「概念」を表す。ノードの大きさは示差的活性スコアに比例して描いており、従ってノード大きいほど、非基底細胞型細胞株と比べて基底細胞型細胞株とより高い相関を有する活性を含むパスウェイ概念に対応する。色は、その概念が基底細胞サブタイプと正の相関を有するか（赤色）、又は負の相関を有するか（青色）を示す。リンクはタンパク質間レベルの相互作用（破線）及び転写レベルの相互作用（実線）を含む異なる相互作用を表す。相互作用は、それらが平均絶対レベルより高い示差的活性の絶対レベルの概念を相互に連結するときのみ、マ

20

【図13】どのようにパスウェイ図を使用して治療応答を予測することができるかを示す。A. 上のパネル、基底細胞型乳癌細胞株はDNA損傷剤シスプラチンに選択的に応答する。下のパネル、基底細胞型細胞株はDNA損傷応答に関連するパスウェイで活性の亢進を示し、これらの細胞株でシスプラチンを作用させる考えられる機構を提供する。B. 上のパネル、ERBB2AMP型細胞株はHSP90阻害薬ゲルダナマイシンに対して感受性を有する。下のパネル、ERBB2-HSP90ネットワークはERBBP2AMP型

30

株で上方制御される。C. 上のパネル、ERBB2AMP型細胞株はオーロラキナーゼ阻害薬VX-680に対して耐性を有する。下のパネル、耐性はAURKB及びCCNB1の同時制御によって媒介され得る。表記法は図3 12のとおり。

【図14】乳癌細胞株の例示的なゲノムプロファイル及び転写プロファイルを示す。A. 43個の乳癌細胞株についてのDNAコピー数の異常を、y軸上にGISTIC解析の $\log_{10}$ （FDR）及びx軸上に染色体位置としてプロットする。コピー数増加は赤色で正の $\log_{10}$ （FDR）により示し、減少は緑色で負の $\log_{10}$ （FDR）により示す。B. 遺伝子発現シグネチャーに基づく3つのクラスター（クローディン低、ルミナル、基底細胞）を示す55個の乳癌細胞株についての階層的コンセンサスクラスタリング行列。細胞株の組み合わせの各々について、色の濃さはコンセンサスに比例する。

40

【図15】GI50計算が高度な再現性を有することを示す。A. 各バー 再現された薬物／細胞株の組み合わせの頻度のカウント。ほとんどの細胞株はある特定の化合物に対して1回のみ試験したが、一部の薬物／細胞株の組み合わせは複数回試験した。B. 各箱ひげ図は、3回又は4回の反復での薬物／細胞株ペアについての平均偏差中央値の分布を表す。

【図16】倍加時間が細胞株サブタイプ間で異なることを示す。A. 倍加時間中央値（時間）として計算した乳癌細胞株サブタイプの成長速度を箱ひげ図として示す。基底細胞及びクローディン低サブタイプは、ルミナル及びERBB2^{AMP}サブタイプと比較したとき、倍加時間中央値がより短い。クラスカル・ワリス p値（ $p=0.006$ ）。B. ANCOVAモデルは、5'FUへの応答に対するサブタイプ及び成長速度の双方の強い効果

50

を示す。ルミナル型乳癌株（黒色）及び基底細胞／クローディン低型乳癌株（赤色）は、各々、成長速度との有意な関連性を示すが、傾きは異なる。

【図17】推論されたパスウェイ活性がコホート内よりサブタイプ内でより強く相関することを示す。異なるサブタイプの細胞株間のピアソン相関のt統計量（黒色）と比較した同じサブタイプの細胞株とTCGA試料との間で計算したピアソン相関から得られるt統計量（赤色）のヒストグラムを示す。x軸はピアソン相関のt統計量に対応し；y軸は（細胞株，細胞株）ペア又は（細胞株，TCGA試料）ペアの密度を示す。K-S検定（ $P < 1 \times 10^{-22}$ ）は、同じサブタイプの細胞株及びTCGA試料が、他のサブタイプの細胞株と比べてより類似していることを示す。

【図18】SuperPathwayから特定されたサブネットワークの例示的ネットワーク構造を示す。基底細胞型パスウェイマーカーのネットワーク図を示す。グラフの各ノードは、タンパク質（丸）、多量体複合体（六角形）、又は抽象的細胞プロセス（正方形）のいずれかに対応する異なるパスウェイ「概念」を表す。ノードの大きさは示差的活性スコアに比例して描かれ、従ってノードが大きいほど、非基底細胞型細胞株と比べて基底細胞型細胞株とより高い相関を有する活性を含むパスウェイ概念に対応する。色は、その概念が基底細胞サブタイプと正の相関を有するか（赤色）、又は負の相関を有するか（青色）を示す。リンクはタンパク質間レベルの相互作用（破線）及び転写レベルの相互作用（実線）を含む異なる相互作用を表す。相互作用は、それが平均絶対レベルより高い示差的活性の絶対レベルの概念を相互連結するときのみ、マップに含めた。

【図19】SuperPathwayから特定されたサブネットワークの例示的ネットワーク構造を示す。クローディン低型パスウェイマーカーの例示的ネットワーク図を示す。表記法は図18のとおり。

【図20】SuperPathwayから特定されたサブネットワークの例示的ネットワーク構造を示す。ルミナル型パスウェイマーカーの例示的ネットワーク図を示す。表記法は図18のとおり。

【図21】SuperPathwayから特定されたサブネットワークの例示的ネットワーク構造を示す。RBB2AMP型パスウェイマーカーの例示的ネットワーク図を示す。表記法は図18のとおり。

【図22】ルミナル型細胞株、クローディン低型細胞株及び基底細胞型細胞株における例示的URKB-FOXM1-CCNB1ネットワークを示す。A. ルミナル型細胞株におけるAURKB及びFOXM1の周囲のネットワーク。CCNB1は有意に下方制御されなかったため、このパスウェイマップには現れない。B. クローディン低型細胞株において、AURKB及びFOXM1は双方とも上方制御される；CCNB1の活性は有意ではなかった。C. 基底細胞型細胞株では、AURKB、FOXM1及びCCNB1が全て上方制御される。表記法は図18のとおり。

【図23】CNA、mRNA発現、DNAメチル化及びmiRNA発現によるMicMaコホートの患者の教師なしクラスターの例示的分布及び生存曲線を示す。各タイプのゲノムレベルについて、各クラスターのサイズを左側にプロットし、及び右側に生存曲線を示す。生存の差の有意性は2つの方法で評価する（実施例を参照のこと）。

【図24】特定されたPARADIGMクラスターの例示的分布及び生存を示す。A. 各バーは各クラスターのサイズを示す。B. MicMaデータ集合についてのParadigm IPLのヒートマップ。C. Chin-Naderi-Caldasデータ集合にマッピングした後のMicMa Paradigmクラスターの生存曲線。

【図25】各データ集合についてのParadigm IPLの例示的ヒートマップを示す。各行は、3つ全てのコホートにわたる遺伝子又は複合体のIPLを示す。上部にわたるカラーバーは、図2にあるとおり、MicMaから得たParadigmクラスターを示す。対象のパスウェイのメンバーは、そのパスウェイ名を表示する。赤色は活性化したIPLを表し、青色は不活性化したIPLを表す。

【図26】FOXM1転写因子ネットワークを示す。上側のネットワーク図はクラスターpdgm. 3のデータを要約し、一方、下側のクラスターはその他のクラスターのデータ

10

20

30

40

50

を要約する。ノードの形は、各クラスター内で最も高頻度に摂動を受けたデータ型を表し、ノードの色は摂動の方向を表す。エッジの矢印は相互作用の符号を表し、色は相互作用のタイプを表す。

【図27】p53アポトーシスパスウェイのごく一部の小例を示す。NCIのパスウェイ図を、隠れ状態と観測状態との双方を含む因子グラフに変換した。

【図28】推論されたパスウェイ活性（IPA）の例示的ヒートマップを示す。活性化した（赤色）又は不活性化した（青色）と推論される分子エンティティ（行）の1598個の推論を表すIPAを、316個の患者腫瘍試料（列）の各々についてプロットする。IPAはパスウェイエンティティ及び腫瘍試料により階層的にクラスター化し、右側の表示は、個別のパスウェイのエンティティが濃縮されたヒートマップの区間を示す。カラーバーの凡例は底10の対数である。

10

【図29】全試料にわたるFOX M1統合パスウェイ活性（IPA）を要約する。FOX M1転写因子ネットワークにおける各エンティティについての腫瘍試料間のIPA算術平均を赤色で示し、濃い赤色の陰影が2標準偏差を示す。灰色の線及び陰影は、1000個の「ヌル」試料から導き出したIPAの平均値及び2標準偏差を示す。

【図30】FOX M1のIPAの、NCIパスウェイ相互作用データベース（NCI Pathway Interaction Database）における他の検証転写因子（TF）のIPAとの比較を示す。A. 非活性の（値がゼロの）IPAを除いたIPAのヒストグラム。FOX M1ターゲットは他のNCI TFと比べて有意により高く活性化される（ $P < 10^{-267}$ ；コルモゴロフ・スミルノフ（KS）検定）。B. 非活性IPAを含む全てのIPAのヒストグラム。全てのIPAを用いると、他のTFに対するFOX M1の活性はいくらか高い有意性で解釈される（ $P < 10^{-301}$ ；KS検定）。

20

【図31】FOX M1が漿液性卵巣癌と比較して卵管上皮では発現しないことを示す。Tone et al.のデータ（PMID：18593983）を使用して、卵管でのFOX M1の発現レベルを漿液性卵巣癌におけるそのレベルと比較した。FOX M1の発現は、BRCA1/2突然変異を有する試料を含め、卵管ではるかに低く、TCGA漿液性卵巣癌で観察されるFOX M1の高度発現が、単に上皮シグネチャーだけに起因するわけではないことを示している。

【図32】低悪性度癌と比べた高悪性度癌におけるFOX M1転写因子ネットワーク遺伝子の発現を示す。低悪性度（I；黄褐色の箱；26試料）及び高悪性度（II/III；青色の箱；296試料）の双方の卵巣癌について、FOX M1及び9個の選択されたFOX M1ターゲット（NCI-PIDに基づく）の発現レベルをプロットした。9個中7個のターゲットが、高悪性度癌腫において有意に高いFOX M1発現を有することが示された（スチューデントのt検定；p値は箱ひげ図の下に示す）。CDKN2Aもまた示差的に発現し得るが、判断し難いt統計量（ $P = 0.01$ ）を有した。XRCC1は示差的に発現するものとして検出された。

30

【図33】細胞株が治療化合物に対して広範囲の応答を示すことを示す。A. ルミナル型細胞株及びERBB2AMP型細胞株はAKT阻害に対して選択的に応答する。各バーはSigma AKT1-2阻害薬に対する単一の乳癌細胞株の応答を表す。細胞株は感受性（ $-\log_{10}(GI_{50})$ ）が低い順に並べ、サブタイプ別に色を付けている。B. 同様の機構を有する化合物のGI50値は高度に相関する。ヒートマップは、様々な化合物で処置した乳癌細胞株の応答間の相関の階層的クラスタリングを示す。C. 同様の作用機序を有する化合物は、細胞株パネル内で同様の応答パターンを示す。各列が一つの細胞株を表し、各行が試験化合物を表す。GI50値は階層的にクラスター化される。有意なサブタイプ効果を有する化合物のみを含める。同様のサブタイプの細胞株は共にクラスター化され易く、それらが同じ化合物に応答性を有することが示される。灰色は欠損値を表す。D. CNAは関連する感受性である。箱ひげ図は、示されるゲノム遺伝子座に異常な（A）及び正常な（N）コピー数を有する細胞株についての応答感受性の分布を示す。薬物応答とCNAとの間の関連性についてのFDR p値を注記する。A. 9p21（CDKN2A）の欠失は、イクサベピロン、ビノレルビン（vinorelbine）及びファス

40

50

カプリシンに対する応答と関連する。B. 20q13 (STK15/AURKA) の増幅は、VX-680 及び GSK1070916 と関連する。C. 11q13 (CCND1) における増幅は、カルボプラチン及び GSK1070916 に対する応答と関連する。

【図34】A. 細胞株及びTCGA試料の双方の非冗長PARADIGM活性のヒートマップ。クラスター系統樹は試料間のユークリッド距離を表し、Eisen Clusterを使用して作成し、及びJava Treeviewを使用して描いた。系統樹の下のカラバーは、試料サブタイプ(上)及び試料コホート(下)を表す。

【図35】細胞株サブタイプが固有のネットワーク特徴を有することを示す。全てのパネルにおいて、グラフの各ノードは、タンパク質(丸)、多量体複合体(六角形)、又は抽象的細胞プロセス(正方形)のいずれかに対応する異なるパスウェイ「概念」を表す。ノードの大きさは示差的活性スコアに比例して描いており、従ってノード大きいほど、非基底細胞型細胞株と比べて基底細胞型細胞株とより高い相関を有する活性を含むパスウェイ概念に対応する。色は、その概念が基底細胞サブタイプと正の相関を有するか(赤色)、又は負の相関を有するか(青色)を示す。リンクはタンパク質間レベルの相互作用(破線)及び転写レベルの相互作用(実線)を含む異なる相互作用を表す。相互作用は、それらが平均絶対レベルより高い示差的活性の絶対レベルの概念を相互に連結するときのみ、マップに含めた。A. MYC/MAX及びERK1/2サブネットは基底細胞型乳癌細胞株で選択的に活性化する。B. CTNNB1ネットワークはクローディン低型細胞株で活性化する。C. FOXA1/FOXA2ネットワークはルミナルサブタイプで上方制御される。D. ERBB2AMPサブタイプはRPS6KB1パスウェイの下方制御を示す。

【図36】パスウェイ図を使用して治療応答を予測し得ることを示す。A. 上のパネル、基底細胞型乳癌細胞株はDNA損傷剤シスプラチンに選択的に応答する。下のパネル、基底細胞型細胞株はDNA損傷応答に関連するパスウェイで活性の亢進を示し、これらの細胞株でシスプラチンを作用させる考えられる機構を提供する。B. 上のパネル、ERBB2AMP型細胞株はHSP90阻害薬ゲルダナマイシンに対して感受性を有する。下のパネル、ERBB2-HSP90ネットワークはERBBP2AMP型細胞株で上方制御される。C. 上のパネル、ERBB2AMP型細胞株はオーロラキナーゼ阻害薬VX-680に対して耐性を有する。下のパネル、耐性はAURKB及びCCNB1の同時制御によって媒介され得る。表記法は図3 図36のとおり。

【図37】ゲノムコピー数異常を示す。(a) 197例の多形性膠芽腫(GBM)腫瘍のプロファイル46と比較した489例のHGS-OvCaのコピー数プロファイル。コピー数の増加(赤色)及び減少(青色)を正常なゲノムに沿った距離の関数としてプロットする。(b) 有意な局所的増幅領域(赤色)及び欠失領域(青色)をゲノム(gnome)に沿ってプロットする。アノテーションには、20個の最も有意性の高い増幅領域及び欠失領域、遺伝子が8個以下の極めて局所的な領域、及び既知の癌遺伝子又はゲノムワイドの機能喪失スクリーニングにより同定される遺伝子を有する領域が含まれる。各領域に含まれる遺伝子の数は括弧内に示す。(c) 有意に増幅された(赤色)及び欠失した(青色)染色体アーム。

【図38】分子サブタイプの遺伝子及びmiRNA発現パターン及びHGS-OvCaにおける転帰予測を示す。(a) 遺伝子発現に基づき4つのクラスターに分かれたTCGA及びTothill et al. の腫瘍。(b) 訓練データ集合を使用して、予後判定遺伝子シグネチャーを定義し、検証データ集合に適用した。(c) 4つの独立した発現プロファイルデータ集合のカプラン・マイヤー分析、予測される高リスク患者の生存を低リスク患者の生存と比較する。リスク指標の一変量コックスp値が含まれる。(d) miRNA発現に基づき3つのクラスターに分けられた腫瘍、示されるとおりの遺伝子に基づくクラスターと重複している。(e) 3つのmiRNAに基づくクラスター間での患者生存の差。

【図39】HGS-OvCaにおける変化したパスウェイを示す。(a) キュレーションした分析により同定されたRB及びPI3K/RASパスウェイ、及び(b) HotNet解析により同定されたNOTCHパスウェイは、共通して変化する。変化は、体細胞突

10

20

30

40

50

然変異、DNAコピー数変化により、又はある場合には二倍体腫瘍における発現と比較して有意な上方制御又は下方制御により定義される。変化頻度は全ケースに対する割合である；活性化した遺伝子は赤色であり、不活化した遺伝子は青色である。（c）最高49%のケースにおいてHRパスウェイの遺伝子が増化する。BRCA状態の生存分析は、BRCA野生型と比べてBRCA変異ケースについて異なる転帰を示し（より良好な全生存を呈する）、及びBRCA1を後成的にサイレンシングしたケースはより不良な生存を呈する。（d）FOXO1転写因子ネットワークは87%のケースで活性化される。各遺伝子は多重輪状の円として描き、そこにそのコピー数（外側の輪）及び遺伝子発現（内側の輪）を、輪の各「スポーク」が単一の患者試料を表すようにプロットし、試料はFOXO1発現が低い順に並べ替えている。興奮性の相互作用（赤色の矢印）及び阻害性の相互作用（青色の線）は、NCIパスウェイ相互作用データベース（NCI Pathway Interaction Database）から入手した。破線は転写調節を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0033】

本書に開示する実施形態は事例的且つ例示的なものであり、本発明を限定することは意図されない。本発明の特許請求の範囲から逸脱することなく他の実施形態を利用することができ、及び構造の変更を行うことができる。

【0034】

本明細書で使用されるとき、及び添付の特許請求の範囲において、文脈上特に明確に指示されない限り、単数形「a」、「an」、及び「the」は複数形の参照を含む。従って、例えば、「an miRNA」への参照は、複数のかかるmiRNAを含み、「医薬担体（a pharmaceutical carrier）」への参照は、1つ又は複数の医薬担体及びその均等物への参照である等となる。

20

【0035】

本明細書で使用されるとき、用語「キュレーションされた」は、科学的及び／又は臨床的原理に従い、当該技術分野において公知の方法、例えば、分子生物学的技法、生化学的技法、生理学的技法、解剖学的技法、ゲノミクス技法、トランスクリプトミクス技法、プロテオミクス技法、メタボロミクス技法、ADME、及びバイオインフォマティクス技法などを用いて、試験、分析、及び同定されている生体分子及び／又は非生体分子の集合における関係を意味する。この関係は、生化学的パスウェイ、遺伝的パスウェイ、代謝パスウェイ、遺伝子調節パスウェイ、遺伝子転写パスウェイ、遺伝子翻訳パスウェイ、miRNA調節パスウェイ、偽遺伝子調節パスウェイなどの生化学的なものであってよい。

30

【0036】

ハイスループットデータは、癌組織における分子変化の包括的な概観を提供している。新しい技法が、腫瘍試料及び癌細胞株のゲノムコピー数変動、遺伝子発現、DNAメチル化、及びエピジェネティクスの状態の同時ゲノムワイドアッセイを可能にする。

【0037】

癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas：TCGA）、スタンド・アップ・トゥ・キャンサー（Stand Up To Cancer：SU2C）など、及びさらに多くの研究が、様々な腫瘍について近い将来に計画されている。現行のデータ集合の解析から、患者間での遺伝的变化は異なり得るが、多くの場合に共通のパスウェイが関与することが分かる。従って、癌の進行に関与する関連パスウェイを特定し、それらが異なる患者でどのように変化するかを検出することが、決定的に重要である。

40

【0038】

本発明者らは、遺伝子間のキュレーションされたパスウェイ相互作用を包含する患者特異的な遺伝的活性を推論するための新規方法を提示する。遺伝子は、因子グラフにより、遺伝子及びその産物の発現及び既知の活性を符号化する相互に接続し合う変数の集合としてモデル化され、種々のオミクスデータをエビデンスとして取り込むことが可能になる。

【0039】

50

本方法は、確率的推論を用いて、患者においてパスウェイの活性（例えば、内部遺伝子の状態、相互作用、又は高レベル「出力」）が変化する程度を予測する。SPIAと呼ばれる競合するパスウェイ活性推論手法と比較して、本発明者らの方法は、限定はされないが多形性膠芽腫（GBM）及び乳癌の双方のデータ集合において、少ない偽陽性で癌関連パスウェイの活性の変化を特定する。

【0040】

ゲノムモデルに関するデータ統合を用いたパスウェイ認識アルゴリズム（Pathway Recognition Algorithm using Data integration on Genomic Models：PARADIGM）は、遺伝子が独立して考慮される場合に見過ごされるGBM患者のサブセットについて、一貫したパスウェイレベル活性を特定した。さらに、このアルゴリズムを用いてGBM患者をその有意なパスウェイ摂動に基づきグループ化することで、GBM患者が、有意に異なる生存転帰を有する臨床的に関連性のあるサブグループに分けられる。

10

【0041】

これらの知見は、患者群又は個人の共通して摂動を受ける1つ又は複数のパスウェイにおいて重要な点にある遺伝子を標的化することのできる治療法が選択され得ることを示唆している。

【0042】

本発明者らは、任意の数のゲノム及び機能的ゲノムデータ集合を統合して、患者試料で変化する分子パスウェイを推論することのできる因子グラフ（Kschischang：2001、上記）をベースとする確率的グラフィカルモデル（PGM）フレームワークについて記載する。本発明者らは、膠芽腫及び乳癌の双方のデータ集合のコピー数変動及び遺伝子発現データを使用してモデルを検証した。構造化したパスウェイモデルを用いて推論される活性は、成功裏に膠芽腫患者を臨床的に関連性のあるサブタイプに層別化する。この結果から、パスウェイ情報に基づく推論が、遺伝子レベルのデータを独立して使用するより有益な情報を提供することが示唆される。

20

【0043】

より優れた予後判定及び診断を提供することに加え、統合パスウェイの活性化は、疾患の進行を抑止するために用いられ得る有望な治療に関して重要な手掛かりをもたらす。

【0044】

本発明者らは、統合された患者データから遺伝的パスウェイの活性を推論するPARADIGM（Pathway Recognition Algorithm using Data Integration on Genomic Models（ゲノムモデルに関するデータ統合を用いたパスウェイ認識アルゴリズム））と呼ばれる手法を開発した。図1は、本手法の概要を示す。単一の患者試料に関する複数のゲノムスケールの計測値を組み合わせて、単一のNational Cancer Institute（NCI）パスウェイの遺伝子、産物、及び抽象的プロセス入出力の活性を推論する。PARADIGMは統合パスウェイ活性（IPA）の行列Aを生成し、ここで A_{ij} は、患者試料jにおけるエンティティiの推論された活性を表す。次に、行列Aを元の構成データ集合の代わりに使用して、臨床転帰との関連性を特定することができる。

30

40

【0045】

本発明者らは、初めに各NCIパスウェイを個別的な確率モデルに変換した。p53アポトーシスパスウェイのごく一部の小例を図2（c）に示す。NCIのパスウェイ図を、隠れ状態と観測状態との双方を含む因子グラフに変換した（図2）。因子グラフは、エンティティ間の既知の相互作用を表す構造により、遺伝子関連及び生物学的プロセス関連の状態情報に関する観測を統合する。

【0046】

因子グラフで生物学的パスウェイを表現するため、本発明者らは、特定のmRNA又は複合体などの、細胞中のエンティティの状態を変数を用いて記述し、及びそれらのエンティティ間の相互作用及び情報フローを、因子を用いて表現する。これらの変数は各エンテ

50

ィティの示差的状態を、直接的な分子エンティティ濃度ではなく、「対照」又は正常レベルとの比較で表現する。この表現により、多くの場合に遺伝子の示差的状態を直接計測するか、或いは直接的な計測値をマッチングした対照との相対的な計測値に変換するかのいずれかであるDNAマイクロアレイによって検出される遺伝子発現などの、多くのハイスループットデータ集合をモデル化することが可能になる。また、遺伝子間の多様な調節関係についても可能になる。例えば、p 5 3のMDM 2媒介性ユビキチン依存性分解を表す相互作用は、p 5 3タンパク質レベルを阻害する活性化MDM 2としてモデル化することができる。

【0047】

一実施形態では、本方法を用いて、様々な診断上及び治療上の適用、例えば、癌組織の検出、癌組織の病期分類、転移性組織の検出など；神経障害、例えば、限定はされないが、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、統合失調症、癲癇、及びそれらの合併症；ディジョージ症候群、自閉症などの発達障害、多発性硬化症などの自己免疫障害、糖尿病などの検出；感染症、例えば、限定はされないが、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、リーシュマニア、住血吸虫症、マラリア、条虫類、象皮病、線虫、ネマチン（*nematine*）による感染症などの治療に用いることのできる臨床情報を提供し得る。

【0048】

一実施形態では、本方法を用いて、変化した遺伝子発現、mRNAの発現過剰に対する非存在／存在を検出及び定量化し、又は治療介入中のmRNAレベルをモニタするための臨床情報を提供し得る。発現の変化に関連する病態、疾患又は障害としては、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、良性前立腺肥大症、気管支炎、チェディアック・東症候群、胆嚢炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎（*dermatomyositis*）、真性糖尿病、気腫、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、慢性肉芽腫性疾患、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、瘧疾、多嚢胞性卵巣症候群、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、重症複合型免疫不全症（SCID）、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症；及び腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、膵癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌が挙げられる。この診断アッセイは、遺伝子発現の変化を検出するため、ハイブリダイゼーション又は増幅技法を用いて患者の生体試料における遺伝子発現を標準試料と比較し得る。この比較のための定性的又は定量的方法は、当該技術分野において公知である。

【0049】

一実施形態では、本方法を用いて、変化した遺伝子発現；mRNAの非存在、存在、又は過剰発現を検出及び定量化し；又は治療介入中のmRNAレベルをモニタする臨床情報を提供し得る。発現の変化に関連する障害としては、静坐不能（*akathisia*）、アルツハイマー病、健忘、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、失調、双極性障害、緊張病、脳性麻痺、脳血管疾患、クロイツフェルトヤコブ病、認知症、うつ病、ダウン症候群、遅発性ジスキネジー、ジストニー、癲癇、ハンチントン病、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経痛、神経線維腫症、ニューロパチー、パーキンソン病、ピック病、網膜色素変性症、統合失調症、季節性情動障害、老年痴呆、脳卒中、トゥレット症候群並びに腺癌、黒色腫、及びテラトカルシノーマを含む癌、特に脳の癌が挙げられる。

【0050】

一実施形態では、本方法を用いて、哺乳動物タンパク質の発現又は活性の変化に関連する病態についての臨床情報を提供し得る。かかる病態の例としては、限定はされないが、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、良性前立腺肥大症、気管支炎、チェディアック・東症候群、胆嚢炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、慢性肉芽腫性疾患、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、脾炎、多嚢胞性卵巣症候群、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、重症複合型免疫不全症（SCID）、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症；及び腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、脾癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌、静坐不能（akathisia）、アルツハイマー病、健忘、筋萎縮性側索硬化症、失調、双極性障害、緊張病、脳性麻痺、脳血管疾患、クロイツフェルトヤコブ病、認知症、うつ病、ダウン症候群、遅発性ジスキネジー、ジストニー、癲癇、ハンチントン病、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経痛、神経線維腫症、ニューロパチー、パーキンソン病、ピック病、網膜色素変性症、統合失調症、季節性情動障害、老年痴呆、脳卒中、トゥレット症候群並びに腺癌、黒色腫、及びテラトカルシノーマを含む癌、特に脳の癌が挙げられる。

10

20

【0051】

一実施形態では、本明細書に（erein）開示される方法を用いて、核酸配列の発現又は活性の低下に関連する障害を検出、病期分類、診断、及び／又は治療し得る。かかる障害の例としては、限定はされないが、癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、脾癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌；免疫障害、例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触性皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、リンパ球毒素性偶発性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、脾炎、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症、外傷、ブルトン型X連鎖性無γグロブリン血症（X-linked agammaglobinemia of Bruton）、分類不能型免疫不全症（CVI）、ディジョージ症候群（胸腺低形成）、胸腺異形成、IgA単独欠損症、重症複合型免疫不全症（SCID）、血小板減少症と湿疹を伴う免疫不全症（ヴィスコット・オールドリッチ症候群）、チェディアック・東症候群、慢性肉芽腫性疾患、遺伝性血管神経性浮腫、及びクッシング病に関連する免疫不全症；並びに发育障害、例えば、尿細管性アシドーシス、貧血症、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー、

30

40

50

癲癇、性腺形成不全、W A G R 症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩、泌尿生殖器奇形、及び精神遅滞）、スミス・マジェニス症候群、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、遺伝性ニューロパチー、例えばシャルコー・マリー・トゥース病及び神経線維腫症、甲状腺機能低下症、水頭症、発作性障害、例えばシデナム舞踏病（S y n d e n h a m ' s c h o r e a）及び脳性麻痺、脊椎披裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴、並びに対象の任意の組織、器官、又は系、例えば、脳、副腎、腎臓、骨格系又は生殖器系が関与する細胞成長及び分化、胚発生、及び形態形成に関連する任意の障害が挙げられる。

【0052】

一実施形態では、本明細書に（e r e i n）開示される方法を用いて、核酸配列の発現に関連する障害を検出、病期分類、診断、及び／又は治療し得る。かかる障害の例としては、限定はされないが、内分泌障害、例えば、性腺機能低下症、シーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド・シュラー・クリスチャン病、レットレル・ジーベ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、及び小人症を含む下垂体機能低下に関連する障害；先端巨大症、巨人症、及び抗利尿ホルモン（A D H）不適合分泌症候群（S I A D H）を含む下垂体機能亢進症；並びに、甲状腺腫、粘液水腫、細菌感染症に関連する急性甲状腺炎、ウイルス感染症に関連する亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、及びクレチン病を含む甲状腺機能低下に関連する障害；甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、及びブランマー病を含む甲状腺機能亢進に関連する障害；並びに、コン病（慢性高カルシウム血症（c h r o n i c h y p e r c a l e m i a））を含む副甲状腺機能亢進に関連する障害；呼吸器疾患、例えば、アレルギー、喘息、急性及び慢性炎症性肺疾患、A R D S、気腫、肺うっ血及び肺浮腫、C O P D、間質性肺疾患、及び肺癌；癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、膵癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌；及び免疫不全症、例えば、後天性免疫不全症候群（A I D S）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触性皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、リンパ球毒素性偶発性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎症、変形性関節症、骨粗鬆症、膵炎、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の、血液透析の、及び体外循環の合併症、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫の感染症、並びに外傷が挙げられる。ポリヌクレオチド配列は、サザン解析若しくはノーザン解析、ドットプロット、又は他の膜ベースの技法；P C R 法；ディップスティックアッセイ、ピンアッセイ、及びE L I S A アッセイ；及び患者の体液又は組織を利用して核酸配列発現の変化を検出するマイクロアレイにおいて用いられ得る。かかる定性的又は定量的方法は、当該技術分野において公知である。

【0053】

本発明の特徴付け及び最良の態様

P A R A D I G M：P A R A D I G Mを使用した多次元癌ゲノミクスデータからの患者特異的パスウェイ活性の推論

パスウェイに基づく手法の一つの仮説は、パスウェイデータベースに存在する遺伝的相互作用が、癌において検出される遺伝子発現変化の間の相関性を解釈するための情報を有するというものである。例えば、癌関連パスウェイが転写アクチベータAから標的遺伝子Tへのリンクを含む場合、Aの発現がTの発現と正の相関（E 2 E相関）を有することが

予想される。同様に、Aのコピー数とTの発現との間に正の相関（C 2 E相関）が予想される。さらに、Aにおける増幅は、必ずしもAがより高度に発現することを含意するものでなく、それには次にBの上方制御が必要なため、C 2 E相関はE 2 E相関より弱いことが予想される。このように、パスウェイの各リンクがデータに関する予想を提供する；多くの一貫したリンクを含むパスウェイは、さらなる考慮事項について関連性を有し得る。本発明者らはこれらの仮定を検証し、NCIパスウェイが、最近のTCGA GBMデータを予測する多くの相互作用を含むことを見出した（The TCGA research network 2008）。

【0054】

本発明者らは、統合された患者データから遺伝的パスウェイの活性を推論するPARADIGM（Pathway Recognition Algorithm using Data Integration on Genomic Models（ゲノムモデルに関するデータ統合を用いたパスウェイ認識アルゴリズム））と呼ばれる手法を開発した。

【0055】

PARADIGM方法は、既知のシグナル伝達パスウェイによって多様なハイスループットゲノミクス情報を統合し、遺伝子活性、複合体、及び細胞プロセスの状態に関する患者特異的ゲノミック推論を提供する。本方法の核心部は、様々なデータソースを組み合わせるために、因子グラフを用いて推論を利用する。元のハイスループットデータ集合の代わりに、又はそれと併せてかかる推論を使用することで、試料を臨床的に関連性のあるサブタイプに分類する能力が向上する。PARADIGMで統合した活性に基づくGBM患者のクラスタリングにより、異なる生存プロファイルと相関する患者サブタイプが明らかとなった。対照的に、発現データ又はコピー数データのいずれかを用いる試料のクラスタリングでは、データ集合において有意なクラスターは何ら明らかとならなかった。

【0056】

PARADIGMは、GBM及び乳癌の双方の腫瘍試料で有意に変化した遺伝子活性のパスウェイ推論を生成する。SPIAと呼ばれる競合するパスウェイ活性推論手法と比較して、本発明者らの方法は、癌関連パスウェイにおいて変化した活性をより少ない偽陽性で特定する。計算効率上、PARADIGMは現在、NCIパスウェイをそのまま使用する。

【0057】

PARADIGMはEMを用いて隠れ量を推論するが、NCIパスウェイにまだ存在しない新しい相互作用を推論しようと試みるものではない。尤度関数を増加させる新しい相互作用を導入するように手法を拡張することが想像され得る。この問題は概して厄介であるが、構造的EM（Friedman（1997）上記）などのヒューリスティクスを用いることにより、計算機による探索戦略を用いて相互作用を特定することができる。

【0058】

デノボで新規連結を探索するのではなく、タンパク質間相互作用マップ又は有意な数の発現データ集合において相関する遺伝子ペアから得られた相互作用を提案することにより、探索速度を有意に上げることができる。このパスウェイベースの手法の力は、観測される生存の差の根底にある考えられ得る機構に関して手掛かりを提供し得ることである。情報提供性を有するIPAは、治療標的を示唆したり、又は臨床試験に最適な患者を選択したりするのに有用であり得る。例えば、ErbB2増幅は、薬物トラスツズマブにより治療可能な特定の乳癌型の周知のマーカーである。

しかしながら、ErbB2増幅を有する患者の一部は、治療抵抗性の腫瘍を有する。CircMap表示を調べることにより、ErbB2増幅を有するが、PARADIGMにより推論されるときIPAが不活性又は不変のいずれかである患者を特定し得る。ErbB2増幅を有するが、予測される活性がない患者には、代替治療が検討され得る。

【0059】

将来、より多次元のデータ集合が利用可能となるに伴い、かかるパスウェイ推論がコホ

10

20

30

40

50

ート間で一般化されるロバストなバイオマーカーを提供するかどうかを検証することは、有益であろう。

【0060】

乳癌における抗癌化合物に対するサブタイプ及びパスウェイ特異的応答

現在、ヒト悪性腫瘍の治療に向けて800種を超える小分子阻害薬及び生物製剤の開発が進められている(New Medicines Database | PHRMA. <http://newmeds.phrma.org/> (2010))。これらの薬剤の多くは、腫瘍を正常細胞と区別すると考えられる分子的特徴を標的とし、抗代謝産物及びDNA架橋剤、例えばトラスツズマブ及びラパチニブを含めた、癌のサブセットで調節が解除される分子イベント及び経路を選択的に標的化する広域特異性の従来の治療薬からの範囲に及ぶ(例えば、Slamon, D. J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792 (2001); Vogel, C. L. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-726 (2002); Rusnak, D. W. et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 1, 85-94 (2001)を参照のこと)。Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717 (2005)。

【0061】

今日の薬剤開発における一般的な傾向は、従来の薬物と比べて高い効力及び低い毒性を示す標的化薬剤に向かいつつある(Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* 432, 294-297 (2004))。ERBB2/EGFR阻害薬ラパチニブなど、高い標的特異性を示す薬物もあれば、SRC阻害薬ダサチニブなど、広範囲のキナーゼを阻害する薬物もある(Karaman, M. W. et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 26, 127-132 (2008))。

【0062】

臨床試験は応答の予測因子を含むべきで、且つ試験参加患者を層別化すべきであるという認識が高まっている。多くの分子的に標的化された治療剤は、患者を分類するための明らかな分子特徴を提供するが、ほとんどはそうでない。さらに、腫瘍間での分子的及び生物学的違い、標的化された経路の複雑なクロスカップリング及びフィードバック調節並びに不正確な標的特異性により、基本的機構の予測は多くの場合に複雑となる。分子マーカーに基づく臨床試験の過程では、応答性を有するサブセットが同定され得るが、この手法は手配が困難で、高価であり、且つ最も応答性が高いと思われる特定の部分集団において実験的化合物を最初に試験することができない。実際、現在開発中の薬物の大半は今後乳癌で試験されることはなく、従って乳癌患者の部分集団においてのみ極めて有効な化合物は見逃される確率が高い。有望な手法は、前臨床モデルから得られる応答の予測因子を用いて臨床試験の参加患者を層別化することであり、それにより開発費用が低減され、患者

10

20

30

40

50

サブセットで特に有効であり得る薬物が特定され得る。

【0063】

細胞株パネルにおける前臨床試験は、初期臨床試験の指針として応答性を有する分子サブタイプを早期に且つ効率的に同定することを可能にする見込みがある。この手法の有用性の根拠は、細胞株パネルが (a) ゲフィチニブに応答性を有するものとしてEGFR突然変異を伴う肺癌を予測し (Paez, J. G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500 (2004))、(b) トラスツズマブ及び／又はラパチニブに応答性を有するものとしてHER2/ERBB2増幅を伴う乳癌を予測し (Neve, R. M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527 (2006); Konecny, G. E. et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 66, 1630–1639 (2006))、及び (c) メシル酸イマチニブに応答性を有するものとして変異又は増幅したBCR-ABLを伴う腫瘍を予測する (Scappini, B. et al. Changes associated with the development of resistance to imatinib (STI571) in two leukemia cell lines expressing p210 Bcr/Abl protein. *Cancer* 100, 1459–1471 (2004)) ことを示す試験に基づく。NCIのディスカバリー・セラピューティック・プログラム (Discovery Therapeutic Program) は、この手法を大規模に達成しようとするもので、約60種の癌細胞株のコレクションにおいて分子的特徴と100,000種超の化合物に対する応答との間の関連性を特定している (Weinstein, J. N. Spotlight on molecular profiling: “Integrative” analysis of the NCI-60 cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 5, 2601–2605 (2006); Bussey, K. J. et al. Integrating data on DNA copy number with gene expression levels and drug sensitivities in the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther* 5, 853–867 (2006))。多様な応答を伴う化合物の検出に有用であるものの、NCI60パネルはコレクション内での特定の癌サブタイプの代表性が比較的疎であるため、サブタイプ特異的な応答の検出力に限りがある点は議論の余地がある。例えば、このコレクションには乳癌細胞株は6種しか含まれず、これは既知の多様性を適切に表現するには不十分である。従って本発明者らは、乳癌におけるインビトロ治療化合物応答と分子サブタイプと活性化したシグナル伝達パスウェイとの間の関連性を統計的にロバストに同定するため、約50種の乳癌細胞株のコレクションの使用を図った。ここで本発明者らは、FDA承認済み薬物及び試験中の化合物の双方を含む77種の化合物について、定量的な成長阻害応答とサブタイプを定義する分子的特徴と活性化したパスウェイとの間の関連性の評価を報告する。約半数が異常又はサブタイプ特異性を示す。本発明者らはまた、遺伝子発現及びコピー数データの統合的分析から、観測されるサブタイプ関連応答の一部を特定のパスウェイ活性により説明し得ることも示す。

【0064】

統合された分子プロファイルはDcisにおけるインターロイキンシグナル伝達の歪み及び浸潤性乳癌における予後判定力の向上を明らかにする

様々なレベルにおけるハイスループット腫瘍分子プロファイルの蓄積は、世界的に時間及び費用のかかるプロセスとなっている。様々なレベルで遺伝子調節を複合的に分析することにより、複数の上皮癌で調節が解除される特定の生物学的機能及び分子パスウェイが示され、並びに個々に合わせた治療及びモニタリングを行うための新規患者サブグループが明らかとなり得る。本発明者らは、約110人の乳癌患者からの、原発腫瘍、対応する血液由来、且つ既知の微小転移状態有りの新鮮凍結試料から得られるいくつかの分子レベルのハイスループットデータを収集した（以下、MicMaデータ集合と称する）。これらの患者は、播種性腫瘍細胞（DTC）の存在、再発についての長期経過観察及び全生存に関する情報を含む900件を超える乳癌症例コホートの一部である。MicMa集合は、全ゲノムmRNA発現（Naume, B. et al., (2007), Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer, 1:160-17）、arrayCGH（Russnes, H. G. et al., (2010), Genomic architecture characterizes tumor progression paths and fate in breast cancer patients, 2:38ra472）、DNAメチル化（Ronneberg, J. A. et al., (2011), Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer, 5:61-76）、全ゲノムSNP及びSNP-CGH（Van, Loo P. et al., (2010), Allele-specific copy number analysis of tumors, 107:16910-169154）、全ゲノムmiRNA発現解析（Enerly E, Steinfeld I, Kleivi K, Leivonen S, Aure MR, Russnes HG, Roenneberg JA, Johnsen H, Navon R, Roedland E, Maekela R, Naume B, Peraelae M, Kallioniemi O, Kristensen VN, Yakhini Z, Boerresen-Dale A. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors. PLoS ONE 2011; 6 (2): e16915）。TP53突然変異状態依存性パスウェイ及びハイスループットペアエンドシーケンシング（Stephens, P. J. et al., (2009), Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes, 462:1005-1010）の並行するパイロット研究で使用されている。これは、単一の研究室によって同じ原発性乳房腫瘍集合に対して行われる包括的なハイスループット分子データコレクションである。

【0065】

以下にこれらの研究の知見を要約し、研究の各々は、mRNA発現をDNAコピー数、DNAメチル化における調節解除又はmiRNA発現のいずれかと統合することを試みている。過去に本発明者ら及び他の研究者らが複数の分子レベルで乳癌機構を調べているが、mRNA、CNA、miRNA、及びメチル化をパスウェイの文脈でモデル化することによりこれらの観点を統合する試みは、ごく僅かであった。本論において本発明者らは、乳癌からのかかるデータを、摂動を受けるパスウェイ及び個別的な表現型特性を有する分子サブタイプの双方の検出と合わせて分析した。

【0066】

ここで考察するMicMaデータ集合において、本発明者らはメチル化プロファイルに基づき3つの大クラスター（及び1つの小クラスター）を特定した；大クラスターの1つ

は主として筋上皮起源の腫瘍からなり、他の2つの大クラスターは主に内腔上皮起源の腫瘍を含んだ。クラスターは、TP53突然変異及びER、及びERBB2発現状態、並びに悪性度に関して異なった。パスウェイ解析により、EGF、NGFR及びTNFなどの遺伝子を含むカノニカルな（キュレーションした）パスウェイ、樹状細胞成熟及びNF-κBシグナル伝達パスウェイとの有意な関連性が特定された。DCIS及び浸潤癌の試料に対する候補遺伝子のパイロシーケンシングから、ABCB1、FOXC1、PPP2R2B及びPTENが、DCISでメチル化される新規遺伝子として同定された。どの病変が侵襲性となるリスクを伴うかをより良く理解するためには、これらの後成的変化がどのように腫瘍進行の惹起に関与するかを理解することが重要である。

【0067】

本発明者らはまた、MiCMAデータ集合におけるmiRNA及びmRNA発現間の関係についても、それらの互いの、及び臨床的特徴との相関性の観点で調査した。本発明者らは、増殖、細胞接着及び免疫応答などのいくつかの細胞プロセスが一定のmiRNAと強く関連することを示すことができた。分子固有サブタイプ間、及び増殖レベルが異なる試料間において、統計的に有意なmiRNA発現差が認められた。本発明者らは、細胞株に対するハイスループットライセートマイクロアレイを用いて増殖の調節におけるmiRNAの役割を検証し、このプロセスの潜在的なドライバーを指摘した（Enerly et al., (2001) 上記）。

【0068】

この乳癌患者コホートにおいて 10^{-6} のp値カットオフレベルでTP53突然変異状態によれば濃縮差を示す40個超のKEGGパスウェイが同定された。パスウェイの濃縮差はまた、2つの異なるマイクロアレイプラットフォームに基づく、187個の乳癌試料からなるクロスプラットフォームのデータ集合においても認められた。示差的に濃縮されたパスウェイには、TP53シグナル伝達及び細胞周期などのいくつかの既知の癌パスウェイ、免疫応答及びサイトカイン活性化を含むシグナル伝達パスウェイ、並びに脂肪酸代謝を含む代謝パスウェイ（Joshi et al., 2011 上記）が含まれた。

【0069】

先述の研究の各々は、ハイスループット分子データからペアワイズ式に（CNA/mRNA、miRNA/mRNA、DNAメチル化/mRNA、TP53/mRNA）生物学的相互作用を導き出そうと試みている。本研究では、本発明者らは、調節解除されたパスウェイに焦点を合わせ、全ての分子レベルを同時に考慮した統合予後判定指標を開発しようと試みた。本発明者らは、ゲノムモデルに関するデータ統合を用いたパスウェイ認識アルゴリズム（PARADIGM）を適用することにより、様々な遺伝的パスウェイの相対活性を明らかにし、共同の潜在的予後判定能力を評価した。次に、クラスター及びPARADIGMにより特定される調節解除されたパスウェイを別のデータ集合（Chin, S. F. et al., (2007), Using array-comparative genomic hybridization to define molecular portraits of primary breast cancers, 26:1959-1970）で検証し、また、DCIS（非浸潤性乳管癌）などの、前癌性の新形成のデータ集合（Muggerud, A. A. et al., (2010), Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer, 4:357-368）で試験した。

【0070】

卵巣漿液性癌において高頻度で変化したパスウェイ

コピー数及び遺伝子発現の双方の統合分析によって有意に変化したパスウェイを同定するため、本発明者らは最近開発したパスウェイ活性推論法PARADIGM（PMID: 20529912）を適用した。計算モデルはコピー数変化、遺伝子発現データ、及びパスウェイ構造を組み込み、パスウェイデータベースに存在する遺伝子、複合体、及び遺伝的プロセス毎に統合パスウェイ活性（IPA）を生成する。本発明者らは用語「エンティ

10

20

30

40

50

ティ」を、それが遺伝子か、複合体か、又は小分子かを問わず、パスウェイにおける任意の分子を指して使用する。エンティティのIPAは、最終活性のみを指す。遺伝子について、IPAはタンパク質の活性状態の推論された活性のみを指し、これは、パスウェイにおける他の遺伝子のコピー数、遺伝子発現、及びシグナル伝達から推論される。本発明者らはPARADIGMを卵巣試料に適用し、National Cancer Instituteのパスウェイ相互作用データベース(NCIPID)に含まれるパスウェイに存在する多くの異なる遺伝子及びプロセスの変化を見出した。本発明者らは1000回のランダムシミュレーションを用いて推論された変化の有意性を評価し、それらのシミュレーションでは、同じ構造を有するパスウェイが使用されるが、パスウェイにおける種々の点に任意の遺伝子を割り当てた。換言すれば、所与のパスウェイのあるランダムシミュレーションにおいて相互作用の集合は固定されたままであり、従って任意の遺伝子集合がそれらのパスウェイ相互作用によって互いに連結された。全ての試料のIPAの有意性は同じヌル分布に対して評価して、各試料におけるエンティティ毎の有意水準を得た。標準偏差が少なくとも0.1のIPAを、図28にヒートマップとして表示する。

10

【0071】

表3は、PARADIGMにより見出された順列化試料に関して少なくとも3標準偏差だけ変化するパスウェイを示す。FOX M1転写因子ネットワークは、検証した全てのパスウェイのなかで最多数の試料において変化した一試料間で平均化したとき67%のエンティティが活性の変化を有した。それに対して、卵巣コホートにおいて次に最も高いレベルの活性の変化を有したパスウェイとしては、PLK1シグナル伝達イベント(27%)、オーロラBシグナル伝達(24%)、及びトロポキサンA2受容体シグナル伝達(20%)が含まれた。従って、NCIPIDのパスウェイのなかでは、卵巣試料に関して、FOX M1ネットワークが他のパスウェイと比べて有意により大きく変化する活性を含む。

20

【0072】

FOX M1転写因子ネットワークが、最も高い割合の患者試料において、正常対照と比較して腫瘍試料で示差的に変化することが分かった(図29)。FOX M1は、3つの既知の支配的なスプライシング型を有する多機能性転写因子であり、スプライシング型の各々は、細胞増殖及びDNA修復において様々な役割を有する個別的な遺伝子サブセットを調節する。FOX M1cアイソフォームは、AUKB、PLK1、CDC25、及びBIRC5を含めた、細胞増殖において既知の役割を有するいくつかの標的を直接調節する(PMID:15671063)。他方で、FOX M1bアイソフォームは、DNA修復遺伝子BRCA2及びXRCC1を含む完全に異なる遺伝子サブセットを調節する。ATMの間接的な制御下にあるCHEK2は、FOX M1発現レベルを直接調節する(PMID:17101782)。

30

【0073】

本発明者らは、FOX M1転写因子それ自体のIPAが、他の転写因子のIPAと比べてより高度に変化するかという問いを立てた。FOX M1の活性レベルをNCIPIDにおける他の203個の転写因子の全てと比較した。NCI集合の他の転写因子と比較しても、FOX M1転写因子は有意に高いレベルの活性を有した($p < 0.0001$; K-S検定)ことから、それが重要なシグネチャーであり得ることがさらに示唆される(図30)。

40

【0074】

FOX M1はまた、上皮起源の多くの異なる正常組織においても発現するため、本発明者らは、PARADIGMにより同定されるシグネチャーが、他の組織では正常と見なされ得る上皮シグネチャーに起因するかという問いを立てた。これに答えるため、卵管上皮及び卵巣腫瘍組織がマイクロダイセクションされたGEOからの独立したデータ集合をダウンロードし(GSE10971)(PMID:18593983)、遺伝子発現をアッセイした。FOX M1のレベルが正常試料と比較して腫瘍試料において有意に高いことが見出されたことから、実際に癌性組織においてはFOX M1調節が、正常上皮組織に見ら

50

れるものを超えて亢進することが示唆される（図31）。

【0075】

TCGA卵巣コホート全体が高悪性度漿液性腫瘍に由来する試料を含んだため、本発明者らは、FOX M1シグネチャーが高悪性度漿液性に特異的であるのかという問いを立てた。低悪性度及び高悪性度の双方の漿液性腫瘍の転写プロファイルが決定されているEtemad moghadam et al. (2009)のデータ集合から(Etemad moghadam D, deFazio A, Berouk him R, Mermel C, George J, Getz G, Tothill R, Okamoto A, Rader MB, AOC S Study Group, Harnett P, Lade S, Akslen LA, Tinker AV, Locandro B, Alsop K, Chiew YE, Traficante N, Fereday S, Johnson D, Fox S, Sellers W, Urashima M, Salvesen H B, Meyerson M, Bowtell D. Integrated Genome-Wide DNA Copy Number and Expression Analysis Identifies Distinct Mechanisms of Primary Chemoresistance in Ovarian Carcinomas. Clinical Cancer Research 2009 Feb. ; 15 (4) : 1417-1427)、FOX M1及びその標的のいくつかの対数発現を得た。この独立したデータから、FOX M1及びその標的のいくつかは、低悪性度卵巣癌と比較して漿液性卵巣癌において有意に上方制御されることが確認された(図32)。FOX M1転写因子ネットワークの25個の遺伝子が、高悪性度疾患において発現がより高い遺伝子を有意な割合で含んだかどうかを決定するため、本発明者らはEtemad moghadamのデータを使用してスチューデントのt検定を実施した。ゲノム中723個の遺伝子(5.4%)が、有意水準0.05で低悪性度癌と比べて高悪性度癌において有意に上方制御されることが分かった(ベンジャミニ・ホッホバーグ(Benjamin i-Hochberg)の方法を用いて複数の試験に対して補正)。FOX M1ネットワークは、その遺伝子のうち13個(52%)が示差的に調節されることが分かった。これは、超幾何検定に基づけば有意な割合である($P < 3.8 \times 10^{-12}$)。従ってFOX M1ネットワーク遺伝子の高発現は、ゲノムにおける典型的な遺伝子の発現と比較したとき、高悪性度疾患と確かに特異的に関連するようと思われる。

【0076】

乳癌及び肺癌を含め、多くの異なる癌におけるFOX M1の役割が十分に裏付けられているが、卵巣癌におけるその役割はいまだ研究がなされていない。FOX M1は、3つの既知のスプライシング型を有する多機能性転写因子であり、スプライシング型の各々は、細胞増殖及びDNA修復において様々な役割を有する個別的な遺伝子サブセットを調節する。この分析に関連するFOX M1の相互作用ネットワークの抜粋を図27に示す。FOX M1aアイソフォームは、AUKB、PLK1、CDC25、及びBIRC5を含めた、細胞増殖において既知の役割を有するいくつかの標的を直接調節する。対照的にFOX M1bアイソフォームは、DNA修復遺伝子BRCA2及びXRCC1を含む完全に異なる遺伝子サブセットを調節する。ATMの間接的な制御下にあるCHEK2は、FOX M1の発現レベルを直接調節する。卵巣患者のほとんどにおけるFOX M1の発現増加に加え、小さいサブセットはまた、CBSにより検出されるコピー数増幅の増加も有する(19%が、計測したゲノムにおける全遺伝子の上位5%分位内のコピー数増加を伴う)。従って、FOX M1の選択的スプライシング調節はDNA修復と細胞増殖との間の制御スイッチに関与し得る。しかしながら、個別のアイソフォーム活性を区別することは、アイソフォームを区別するエクソン構造及びエクソンアレイプローブの位置によって困難なため、現時点ではこの主張を裏付けるデータは不十分である。これらの試料のmRNAの将来のハイスループットシーケンシングが、示差的なFOX M1アイソフォームレベルの決定を促進し得る。PARADIGMがこの転写因子に集中している最高レベルの活性変化を検出したという観測は、FOX M1が細胞において重要な調節ポイントにあることを示唆

している。

【0077】

診断

本明細書に記載される方法を用いて、変化した遺伝子発現、mRNAの発現過剰に対する非存在／存在を検出及び定量化し、又は治療介入中のmRNAレベルをモニタし得る。発現の変化に関連する病態、疾患又は障害としては、特発性肺動脈高血圧症、二次性肺高血圧症、細胞増殖性障害、特に退形成乏突起膠腫、星状細胞腫、乏突起星細胞腫、膠芽腫、髄膜腫、神経節神経腫、神経細胞腫瘍、多発性硬化症、ハンチントン病、乳腺腺癌、前立腺腺癌、胃腺癌、転移性神経内分泌癌、非増殖性線維囊胞性及び増殖性線維囊胞性乳腺疾患、胆嚢炎及び胆石症、変形性関節症、及び関節リウマチ；後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイドーシス、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、良性前立腺肥大症、気管支炎、チェディアック・東症候群、胆嚢炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、気腫、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、慢性肉芽腫性疾患、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、変形性関節症、骨粗鬆症、脾炎、多嚢胞性卵巣症候群、多発筋炎、乾癬、ライター症候群、関節リウマチ、強皮症、重症複合型免疫不全症（SCID）、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、血液透析、体外循環、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、及び蠕虫感染症；プロラクチン産生障害、不妊症、例えば、卵管疾患、排卵異常、及び子宮内膜症、発情周期の乱れ、月経周期の乱れ、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過剰刺激症候群、子宮内膜腫瘍又は卵巣腫瘍、子宮筋腫、自己免疫障害、子宮外妊娠、及び催奇形性；乳癌、線維囊胞性乳腺疾患、及び乳汁漏出症；精子形成の乱れ、精子の生理異常、良性前立腺肥大症、前立腺炎、ペイロニー病、インポテンス、女性化乳房；日光角化症、動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合結合組織病（MCTD）、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性赤血球増加症、原発性血小板血症、癌の合併症、癌、例えば、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、テラトカルシノーマ、特に、副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、胆嚢癌、ガングリオンの癌、消化管癌、心臓癌、腎癌、肝癌、肺癌、筋肉癌、卵巣癌、脾癌、副甲状腺癌、陰茎癌、前立腺癌、唾液腺癌、皮膚癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、及び子宮癌が挙げられる。別の態様において、本発明の核酸。

【0078】

本明細書に記載される方法を用いて、変化した遺伝子発現；mRNAの非存在、存在、又は過剰発現を検出及び定量化し；又は治療介入中のmRNAレベルをモニタし得る。発現の変化に関連する障害としては、静坐不能（akathisia）、アルツハイマー病、健忘、筋萎縮性側索硬化症、失調、双極性障害、緊張病、脳性麻痺、脳血管疾患、クロイツフェルトヤコブ病、認知症、うつ病、ダウン症候群、遅発性ジスキネジー、ジストニー、癲癇、ハンチントン病、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経痛、神経線維腫症、ニューロパチー、パーキンソン病、ピック病、網膜色素変性症、統合失調症、季節性情動障害、老年痴呆、脳卒中、トゥレット症候群並びに腺癌、黒色腫、及びテラトカルシノーマを含む癌、特に脳の癌が挙げられる。

【0079】

遺伝子発現に関連する病態、疾患又は障害の診断の根拠を提供するため、正常な又は標準の発現プロファイルを確立した。これは、正常な対象（動物又はヒトのいずれか）から採取した生体試料を、ハイブリダイゼーション条件又は増幅条件下でプローブと組み合わせることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な対象を用いて得られた値を、既知量の実質的に精製された標的配列が用いられる実験の値と比較することにより定量化され得る。このようにして得られた標準の値は、特定の病態、疾患、又は障害に症候を示す患者の試料から得られた値と比較され得る。標準の値から特定の病態に

関連する値の方への偏差を使用して、当該の病態が診断される。

【0080】

また、かかるアッセイを用いて、動物試験及び臨床実験における特定の治療的処置レジメンの効力を評価し、又は個別の患者の治療をモニタし得る。病態の存在が確定し、治療プロトコルが開始されると、診断アッセイが定期的に繰り返され、患者の発現レベルが正常な対象で観測されるレベルに近付き始めるかどうかが決まり得る。継続的なアッセイから得られる結果を使用して、数日から数ヶ月の範囲の期間にわたる治療効力が示され得る。

【0081】

モデル系

10

動物モデルは、ヒトのものと同様の毒性応答を示し、且つ曝露条件がヒト曝露に適切である場合に、バイオアッセイとして用いることができる。哺乳動物は最も一般的なモデルであり、低コスト、利用し易さ、及び豊富な毒性学文献から、ほとんどの毒性試験がラット又はマウスなどのげっ歯類で行われている。近交系げっ歯類系統は、対象遺伝子の過小発現又は過剰発現の生理学的影響の研究並びに疾患の診断及び治療方法の開発に好都合なモデルを提供する。特定の遺伝子（例えば、乳中に分泌されるもの）を過剰発現するように同系交配した哺乳動物もまた、当該の遺伝子により発現する好都合なタンパク質供給源として機能し得る。

【0082】

毒性学

20

毒性学は、薬剤の生物系に対する影響の研究である。毒性試験の大半はラット又はマウスで行われ、ヒトの健康に対するそれらの薬剤の影響予測を促進する。生理機能、行動、恒常性過程、及び致死性の定性的及び定量的変化の観測を用いて毒性プロファイルが生成され、薬剤への曝露後のヒトの健康に対する影響が評価される。

【0083】

遺伝毒性学では、遺伝子突然変異を生じさせる薬剤の能力が同定及び分析される。遺伝毒性薬剤は、通常、核酸との相互作用を促進する共通の化学的又は物理的特性を有し、且つ染色体異常が子孫に伝わる時最も有害である。遺伝毒性学的研究では、受胎前の親、妊娠中の母親、又は発育中の生物体のいずれかに投与される場合に子孫における構造的又は機能的異常の頻度を増加させる薬剤が同定され得る。マウス及びラットは、統計学的要件を満足するのに必要な生物個体数を産生する生殖周期が短いため、これらの試験において最も高頻度で利用される。

30

【0084】

急性毒性試験は、薬剤を対象に単回投与して、その薬剤の症候学又は致死性を決定することに基づく。3つの試験が行われる：（a）初回用量範囲を判断する試験、（b）有効用量の範囲を絞り込む試験、及び（c）用量反応曲線を確定する最終試験。

【0085】

長期毒性試験は、薬剤の反復投与に基づく。これらの試験にはラット及びイヌが一般的に用いられ、異なるファミリーの種からのデータが提供される。発癌を除いて、薬剤を高用量濃度で3～4ヶ月間にわたり連日投与すると、成体動物におけるほとんどの毒性形態が明らかになるというエビデンスが多数ある。

40

【0086】

1年以上の継続期間を伴う慢性毒性試験は、薬剤の毒性の欠如又は発癌可能性のいずれかを実証するために用いられる。試験がラットで行われる場合、最低3つの試験群＋1つの対照群が用いられ、動物は、開始時及び実験中所定間隔で検査及び観察される。

【0087】

トランスジェニック動物モデル

対象遺伝子を過剰発現又は過小発現するトランスジェニックげっ歯類を同系交配し、ヒト疾患のモデリング又は治療剤若しくは毒物の試験に用い得る（参照により本明細書に援用される米国特許第4,736,866号明細書；同第5,175,383号明細書；及

50

び同第5, 767, 337号明細書を参照のこと)。ある場合には、導入された遺伝子が、胎児発生中又は出生後に特定の時点で特定の組織型において活性化され得る。実験的薬物治療の投与前、投与中、及び投与後のトランスジェニック動物における表現型又は組織特異的mRNA発現を分析することにより、導入遺伝子の発現が観察される。

【0088】

胚性幹細胞

げっ歯類の胚から単離された胚性幹細胞(ES)は、胚を形成する可能性を保持している。ES細胞を担体の胚内に置くと、それらの細胞は正常な発生を再開し、生産する動物の全ての組織に寄与する。ES細胞は、実験的ノックアウト及びノックインげっ歯類系統の作製に使用される好ましい細胞である。マウス129/SvJ細胞株などのマウスES細胞は初期マウス胚から誘導され、当該技術分野において公知の培養条件下で成長される。ノックアウト系統用のベクターは、生体内で転写及び/又は翻訳を乱すマーカー遺伝子を含むように修飾された疾患遺伝子候補を含む。ベクターは、当該技術分野において公知の電気穿孔、リポソーム送達、マイクロインジェクションなどの形質転換法によってES細胞に導入される。内因性げっ歯類遺伝子は、細胞分裂中の相同組換え及び組込みによって破壊疾患遺伝子に置き換えられる。形質転換ES細胞が同定され、及び好ましくは、C57BL/6マウス系統由来のものなどのマウス細胞胚盤胞に顕微注入される。胚盤胞は偽妊娠の雌親に外科的に移植され、得られたキメラの子孫の遺伝子型同定及び繁殖により、ヘテロ接合又はホモ接合系統が産生される。

【0089】

ES細胞はまた、神経細胞、造血系、及び心筋細胞などのインビトロでの様々な細胞型及び組織の分化の研究にも用いられる(Bain et al. (1995) Dev. Biol. 168:342-357; Wiles and Keller (1991) Development 111:259-267; 及びKlug et al. (1996) J. Clin. Invest. 98:216-224)。最近の進展では、ヒト胚盤胞に由来するES細胞もまた、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉(ectodermal)細胞型を含む8つの別個の細胞系統に分化するようインビトロで操作し得ることが実証されている(Thomson (1998) Science 282:1145-1147)。

【0090】

ノックアウト解析

遺伝子ノックアウト解析では、ヒト疾患遺伝子候補の領域が、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo; 例えば, Capecci (1989) Science 244:1288-1292を参照)などの非哺乳動物遺伝子を含むように酵素的に修飾される。挿入されたコード配列が標的化された遺伝子の転写及び翻訳を阻止し、疾患候補タンパク質の生化学合成を妨げる。修飾された遺伝子は、培養胚性幹細胞(上記に記載される)に形質転換され、形質転換細胞がげっ歯類胚に注入され、及び胞胚が偽妊娠の雌親に移植される。トランスジェニック子孫を異種交配させると、ホモ接合近交系が得られる。

【0091】

ノックイン解析

胚発生初期に存在する全能性ES細胞を使用して、ノックインヒト化動物(ブタ)又はヒト疾患のトランスジェニック動物モデル(マウス又はラット)を作製することができる。ノックイン技術によってヒト遺伝子のある領域が動物ES細胞に注入され、ヒト配列が組換えによって動物細胞ゲノムに組み込まれる。組み込まれたヒト遺伝子を含む全能性ES細胞は、上記に記載したとおり操作される。近交系動物が試験及び処置され、類似のヒト病態に関する情報が得られる。このような方法は、いくつかのヒト疾患のモデル化に用いられている(例えば, Lee et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:11371-11376; Baudoin et al. (1998) Genes Dev. 12:1202-1216; 及びZhuang et al. (1998) Mol. Cell Biol. 18:3340-3349を参照のこと)。

【0092】

非ヒト霊長類モデル

動物試験の分野は、生理学、遺伝学、化学、薬理学及び統計学などの基礎科学のデータ及び方法論を取り扱う。こうしたデータは、非ヒト霊長類に対する治療剤の効果の評価において、それがヒトの健康に関係し得るため、最も重要である。サルは、ワクチン及び薬物評価においてヒトの代理として使用され、その応答は同様の条件下でのヒト曝露に係る。カニクイザル（マカカ・ファシキュラリス（*Macaca fascicularis*）、マカカ・ムラタ（*Macaca mulatta*））及びコモンマーモセット（カリトリクス・ヤックス（*Callithrix jacchus*））が、これらの研究で使用される最も一般的な非ヒト霊長類（NHP）である。NHPコロニーの育成及び維持は巨費を伴うため、通常、初期研究及び毒性学的試験はげっ歯類モデルで行われる。薬物中毒などの行動測定を用いる試験では、NHPは第一選択の試験動物である。加えて、NHP及びヒト個体は、多くの薬物及び毒素に対して示差的感受性を示し、そうした作用物質の「エクステンシブメタボライザー」及び「プアーメタボライザー」として分類される。

10

【0093】

本発明の例示的使用

テーラーメイド医療は、主として利益を受ける可能性が高い患者に1つ又は複数の特異的な治療を送達するのに有望である。本発明者らは、治療化合物の約半数が、臨床的に関連する転写上又はゲノム上の乳癌サブタイプの1つ又は複数において選択的に有効であることを示した。これらの知見は、乳癌治療において応答に関連する分子サブタイプを定義することの重要性を支持している。本発明者らはまた、細胞株に関する転写及びゲノムデータのパスウェイ統合が、観測されるサブタイプ特異的応答についての機構的説明を提供するサブネットワークを明らかにすることも示す。細胞株と腫瘍との間のサブネットワーク活性の比較分析は、サブタイプ特異的サブネットワークの大部分が細胞株と腫瘍との間で保存されていることを示す。これらの分析から、十分に特徴付けられた細胞株パネルにおける実験的化合物の前臨床スクリーニングにより、初期相の臨床試験における感受性濃縮に使用し得る応答に関連する分子シグネチャー候補を同定し得るという着想が裏付けられる。本発明者らは、このインビトロ評価手法が、化合物の臨床開発開始前に応答性の腫瘍サブタイプが同定される可能性を高め得るもので、それにより費用が低減され、最終的にFDA承認が下りる確率が高まり、及び場合により、応答性が低いと思われる患者を治療することに伴う毒性が回避されることを示唆する。この試験において、本発明者らは、転写サブタイプを定義する分子シグネチャーのみを評価し、反復されるゲノムCNAを選択した。本発明者らは、遺伝子突然変異、メチル化及び選択的スプライシングなどのさらなる分子的特徴を解析に含めると、本手法の検出力及び精度が増加し得ると予想する。同様に、細胞株パネルのサイズが大きくなるほど、パネル内でそれほど一般的でない分子パターンを評価する検出力が増加し、ヒト乳癌に存在する多様性のより完全な範囲を表現する確率が高まり得る。

20

30

【0094】

乳癌の発生は、生来の細胞と適応免疫細胞との双方の存在の有意な増加により特徴付けられ、B細胞、T細胞、及びマクロファージが、腫瘍性間質に存在する最も豊富な白血球に相当する（DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. Breast Cancer Res. 2007; 9(4): 212）。腫瘍間質（及び血清）における高い免疫グロブリン（Ig）値、及び過剰な濾胞性B細胞、調節性T細胞の存在量の増加、及び原発性腫瘍又はリンパ節におけるCD4/CD8又はTH2/TH1 Tリンパ球の比の高さが、腫瘍悪性度、病期、及び全患者生存と相関することが示されている（Bates, G. J. et al., (2006), Q

40

50

uantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse, 24:5373-5380); 細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞を含め、白血球によっては抗腫瘍活性を呈し (34 Dunn, G. P., Koebel, C. M., and Schreiber, R. D., (2006), Interferons, immunity and cancer immunoediting, 6:836-848)、マスト細胞、B細胞、樹状細胞、顆粒球、及びマクロファージなど、他の白血球は、腫瘍進行を妨害するか、或いは増強するその能力を通して、より二極化した役割を呈する (35 de Visser, K. E. and Coussens, L. M., (2006), The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development, 13:118-137)。これらの研究における最も傑出した知見は、免疫応答 (TCR) 及びインターロイキンシグナル伝達、IL4、IL6、IL12及びIL23シグナル伝達における摂動の同定であり、これは予後判定値によるサブクラス分類をもたらしものであった。ここで本発明者らは、これらのイベントがハイスループット分子データに反映され、乳房腫瘍の分子的な細分類に強力に干渉するというエビデンスを提供する。

10

【0095】

本開示はまた、HGS-OvCaにおける異常についての初めての大規模な統合的見解も提供する。概して、突然変異スペクトルは意外なほど単純であった。TP53における突然変異が優勢であり、HGS-OvCaの少なくとも96%に起こった一方、BRCA1/2は、生殖細胞系突然変異と体細胞突然変異とを組み合わせることで、腫瘍の22%で変異した。7つの他の有意に変異した遺伝子が同定されたが、HGS-OvCaの2~6%に過ぎなかった。対照的に、HGS-OvCaは著しい度合いのゲノム配列の乱れ (disarray) を実証した。高頻度のSCNAは、膠芽腫による先のTCGAの知見46と顕著な対照をなし、TCGAの知見では、反復的に変異する遺伝子がより多く、染色体腕レベルの又は限局的なSCNAがはるかに少なかった (図37A)。HR成分を含む推定DNA修復遺伝子における突然変異及びプロモーターメチル化の高率発生は、SCNAの高率発生を説明し得る。突然変異スペクトルは、HGS-OvCaを他のOvCa組織学的サブタイプとは完全に異なるものとして特徴付ける。例えば、明細胞OvCaはTP53突然変異が少ないが、反復されるARID1A及びPIK3CA突然変異を有し47~49; 類内膜OvCaは高頻度のCTTNB1、ARID1A、及びPIK3CA突然変異及びより低率のTP53を有する一方48、49、粘液性OvCaはKRAS変異の発生を有する50。卵巣癌サブタイプ間のこれらの差は、病因学的効果と系統効果との組み合わせを反映していると思われ、サブタイプ別のケアによって卵巣癌転帰を改善する機会を表す。

20

30

【0096】

新規治療手法の特定は、TCGAの主目的である。HR欠損を有するHGS-OvCaの約50%はPARP阻害薬によって利益を受け得る。さらに、共通に調節解除されたパスウェイ、RB、RAS/PI3K、FOXO1、及びNOTCHは、治療的攻撃の機会を提供する。最後に、反復性の増幅領域における22個の遺伝子について阻害薬は既に存在し (実施例XIII以下を参照のこと)、これらの標的遺伝子が増幅される場合のHGS-OvCaにおける評価を正当化する。総じてこれらの発見は、異常な遺伝子又はネットワークを検出し、それらの特定の異常に有効となるよう選択される治療によって標的化するHGS-OvCa治療手法の布石となる。

40

【0097】

さらなる実施形態では、まだ開発されていない任意の分子生物学的技法において、そうした新しい技法が、限定はされないがトリプレット遺伝子コード及び特異的塩基対相互作用などの特性を含め、現在公知の核酸分子の特性に頼るものであるならば、ポリヌクレオ

50

チド核酸が用いられ得る。

【0098】

本発明は、以下の例を参照することにより、さらに容易に理解されるであろう。これらの例は、本発明の特定の態様及び実施形態を例示するために含まれるに過ぎず、限定として含まれるものではない。

【実施例】

【0099】

実施例 I：データソース

Chin (2007 上記) の乳癌コピー数データを、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) から受託番号 GPL5737 に基づき、GSE 8757 からの関連するアレイプラットフォームアノテーションと共に入手した。

10

【0100】

プローブアノテーションを、UCSC 癌ゲノミクスブラウザ (UCSC Cancer Genomics Browser) (Zhu: 2009、上記) で表示し、続いて分析するため、BED15 フォーマットに変換した。アレイデータをプローブ ID によってプローブアノテーションにマッピングした。Naderi (2007、上記) からの対応する発現データを、EBI の M I A M I E x p r e s s から受託番号 E-UCON-1 を使用して入手した。Human 1A (V2) のプラットフォームアノテーション情報を、Agilent 社ウェブサイトから入手した。発現データをプローブレベル中央値で正規化し、プローブ ID によって HUGO 遺伝子名にマッピングした。

20

【0101】

全てのデータを、全ての試料-プローブ値を含む順位付け手順を用いてノンパラメトリックに正規化し、順位に基づき各遺伝子-試料ペアについて符号付き p 値を得た。0.05 の最大 p 値を使用して、有意に変化した遺伝子-試料ペアを決定した。

【0102】

TCGA の膠芽腫データを、Affymetrix U133A プラットフォームにおいて 230 例の患者試料及び 10 例の隣接する正常組織についての遺伝子発現を提供する TCGA Data Portal から入手した。患者試料のプローブを、各プローブの正常値中央値を減じて正常組織に対して正規化した。加えて、同じ患者集合についての CBS でセグメント化 (Olshen: 2004 上記 1618 頁) されたコピー数データを入手した。双方のデータ集合を、乳癌データと同じ手順を用いてノンパラメトリックに正規化した。

30

【0103】

実施例 II：パスウェイ概論

本発明者らは、National Cancer Institute パスウェイ相互作用データベース (NCI PID) から利用可能なキュレーションされたパスウェイの集合を集めた (Schaefer: 2009 上記)。各パスウェイは、内因性及び外因性の細胞下レベル、細胞レベル、組織レベル、又は生物体レベルのイベント及び表現型を表す高次の生体分子過程の周りに論理的にまとめ合わされる相互作用の集合を表す。BioPAX レベル 2 フォーマットのパスウェイをダウンロードした。全てのエンティティ及び相互作用を、Rasqal RDF エンジンを使用して SPARQL クエリーで抽出した。

40

【0104】

本発明者らは、3 つの物理的実体 (タンパク質コード遺伝子、小分子、及び複合体)、遺伝子ファミリー、及び抽象的プロセスを含む 5 つの異なるタイプの生物学的実体 (エンティティ) を抽出した。BioPAX タンパク質のクロスリファレンスが異なる遺伝子からのタンパク質を挙げるときは常に、遺伝子ファミリーを作成した。遺伝子ファミリーは、いずれの単一の遺伝子も特定の機能を果たすのに十分である遺伝子のまとまりを表す。例えば、冗長な役割を有する相同体、及び互いを機能的に補うことが認められる遺伝子は、ファミリーに組み入れられる。

50

【0105】

抽出により、種々のタイプを説明するアノテーション付きのパスウェイで使用されるあらゆるエンティティ及び相互作用のリストが作られた。本発明者らは、「アポトーシス」などの、NCIコレクションに存在し得る一般的なプロセスを指す抽象的プロセスもまた抽出した。例えば、p53腫瘍抑制遺伝子が関与する相互作用を詳述するパスウェイは、機械学習による分類用の特徴として利用することができるアポトーシス及び老化へのリンクを含む。

【0106】

予想どおり、C2E相関は中程度であったが、活性化相互作用間で、偶然で予想されるものと比べて正の相関に顕著な濃縮を有した(図3)。E2E相関はさらに強く、同様に濃縮した。従って、特徴付けしにくい癌のこの例であっても、パスウェイ相互作用の有意なサブセットがゲノム変化を遺伝子発現における調節と連結し、パスウェイレベルの手法が追及するに値するという着想が裏付けられる。

10

【0107】

実施例III：生物学的パスウェイのモデル化及び予測

本発明者らは、初めに各NCIパスウェイを個別の確率モデルに変換した。p53アポトーシスパスウェイのごく一部の小例を図2に示す。NCIのパスウェイ図は、隠れ状態と観測状態との双方を含む因子グラフに変換した。この因子グラフは、エンティティ間の既知の相互作用を表す構造により、遺伝子関連及び生物学的プロセス関連の状態情報に関する観測を統合する。

20

【0108】

生物学的パスウェイを因子グラフで表現するため、本発明者らは、特定のmRNA又は複合体など、細胞中のエンティティの状態を変数を用いて記述し、及びそれらのエンティティ間の相互作用及び情報フローを、因子を用いて表現した。これらの変数は各エンティティの示差的状态(\textit{differential})を、分子エンティティの直接的な濃度ではなく、「対照」又は正常レベルとの比較で表現する。この表現により、多くの場合に遺伝子の示差的状态を直接計測するか、或いは直接的な計測値をマッチングした対照との相対的な計測値に変換するかのいずれかであるDNAマイクロアレイによって検出される遺伝子発現などの、多くのハイスループットデータ集合をモデル化することが可能になる。また、遺伝子間の多様な調節関係についても可能になる。例えば、p53のMDM2媒介性ユビキチン依存性分解を表す相互作用は、p53タンパク質レベルを阻害する活性化MDM2としてモデル化することができる。

30

【0109】

因子グラフは、各エンティティのランダム変数 $X = \{x_1, x_1, \dots, x_n\}$ と、エンティティを制約して互いの関数として生物学的に意味のある値をとらせるm個の非負関数、すなわち因子の集合とを使用して細胞の状態を符号化する。j番目の因子 ϕ_j は、エンティティの部分集合 $X_j \subset X$ の確率分布を定義する。

【0110】

エンティティ及び因子のグラフ全体は、以下のとおりに全エンティティに関する同時確率分布を符号化する：

40

【数1】

$$P(X) = \frac{1}{Z} \prod_{j=1}^m \phi_j(X_j), \quad (1)$$

式中、 $Z = \prod_j \sum_{x_j} \phi_j(S)$ は正規化定数であり、 $S \sim X$ は、SがXにおける変数の「セッティング」であることを表す。

【0111】

各エンティティは、対照レベル(例えば、正常組織で計測されたとおりの)と比べて活

50

性化、基準どおり、又は不活性化に対応する3つの状態のうちの1つをとることができ、それぞれ1、0、又は-1として符号化され得る。状態は、エンティティの種類（例えば、遺伝子、タンパク質等）に応じて様々に解釈され得る。例えば、活性化されたmRNAエンティティは過剰発現を表す一方、活性化されたゲノムコピーエンティティはゲノムに3コピー以上が存在することを表す。

【0112】

図2は、単一のタンパク質コード遺伝子の因子グラフの概念モデルを示す。パスウェイ中の各タンパク質コード遺伝子Gについて、エンティティを導入することによりゲノムのコピー数 (G_{DNA})、mRNA発現 (G_{mRNA})、タンパク質レベル ($G_{protein}$)、及びタンパク質活性 ($G_{protein}$) (図2で「DNA」、「mRNA」、「タンパク質」、及び「活性」と表示された楕円) を表現する。パスウェイの化合物、タンパク質複合体、遺伝子ファミリー、及び抽象的プロセス毎に、分子タイプが「活性」の単一変数を含める。

10

【0113】

図2の例は一つのプロセス（「アポトーシス」）のみを示すが、実際には多くのパスウェイが、遺伝子活性の出力（例えば、「アポトーシス」及び「老化」）から入力（例えば、「DNA損傷」）に至る全てを表現する複数のかかるプロセスを有する。

【0114】

因子の構成を単純にするため、本発明者らは初めにこのパスウェイを有向グラフに変換し、そのグラフの各エッジに正又は負のいずれかの影響ラベルを付与する。第一に、タンパク質コード遺伝子G毎に、 G_{DNA} から G_{mRNA} に、 G_{mRNA} から $G_{protein}$ に、及び $G_{protein}$ から $G_{protein}$ にラベル「正」を有するエッジを加え、そのコピー数からその活性化形態のタンパク質産物の存在に至る遺伝子の発現を反映する。パスウェイのいずれの相互作用も、有向グラフの単一のエッジに変換される。

20

【0115】

この有向グラフを使用して、次に本発明者らは、因子グラフを特定する因子のリストを作成する。変数 x_i 毎に単一の因子 $\phi(x_i)$ を加え、式中、 $X_i = \{x_i\} \cup \{Parents(x_i)\}$ (x_i)、及び $Parents(x_i)$ は、有向グラフにおける x_i の全ての親を指す。全ての値のあるセッティングに対する因子の値は、 x_i が $Parents(x_i)$ のセッティングによるその期待値に一致するかどうか依存する。

【0116】

30

この研究について、期待値は親変数の過半数の票に設定される。親が正のエッジにより連結される場合、それは、因子の値に対してそれ自体の状態の+1倍の票に寄与する。逆に、親が負のエッジにより連結される場合、そのとき変数はそれ自体の状態の-1倍を投票する。「最小」のラベルが付されたエッジによって x_i に接続される変数は、単一の票を獲得し、その票の値はそれらの変数の最小値であり、AND状の連結をもたらす。同様に、「最大」のラベルが付されたエッジによって x_i に接続される変数は、単一の票を獲得し、その票の値はそれらの変数の最大値であり、OR状の連結をもたらす。ゼロの票は棄権票として取り扱う。投票がない場合、期待される状態はゼロである。そうでない場合、過半数の票が期待される状態であり、及び1と-1とが同点であると、抑制因子及び欠失により重点が置かれて-1の期待される状態となる。期待される状態のこの定義を所与として、 $\phi_i(x_i, Parents(x_i))$ は以下のとおり特定される：

40

【数2】

$$\phi_i(x_i, Parents(x_i)) = \begin{cases} 1 - \epsilon & x_i \text{が、} Parents(x_i) \text{から期待される状態である} \\ \frac{\epsilon}{2} & \text{その他の場合} \end{cases}$$

【0117】

ここに示す結果について、 ϵ は0.001に設定したが、イプシロンの選択における大きさの程度の違いは結果に有意な影響を及ぼさなかった。最後に、因子グラフに観測変数

50

及び因子を加えて、パスウェイ及び多次元機能的ゲノミクスデータの統合を完了する（図2）。離散化した機能的ゲノミクスデータ集合の各々が、タンパク質コード遺伝子の分子タイプ一つと関連付けられる。

【0118】

コピー数変化のアレイCGH/SNP推定は「ゲノム」型に関連付けられる。遺伝子発現データは「mRNA」型に関連付けられる。ここでの結果に提示しないが、将来の拡張には、「mRNA」型のDNAメチル化データ、並びに「タンパク質」型及び「活性」型のプロテオミクス及び遺伝子リシーケンシングデータが含まれ得る。各観測変数はまた3つ一組の値である。次に記載するとおり、各観測データ型に関連付けられる因子は全エンティティ間で共有され、データから学習される。

10

【0119】

実施例IV：推論及びパラメータ推定

割り当ての集合 $D = \{x_1 = s_1, x_2 = s_2, x_2, \dots, x_k = s_k\}$ が、添え字 $1 \sim k$ が付与された観測変数に関する患者のデータの完全集合を表すとする。 $\{S_D X\}$ が、Dにおける割り当てと一致する変数Xの集合のあらゆる可能な割り当ての集合を表すとする；すなわち隠れ変数は変化し得るが、任意の観測変数 x_1 はDにおけるその割り当てに固定される。

【0120】

患者データを所与として、特定の隠れエンティティ x_1 が状態aであり得るかどうか、例えば、どの程度TP53のタンパク質活性が-1（不活性化される）であり得るか、又は「アポトーシス」が+1（活性化される）であり得るかを推定しようとする。これを行うには、患者のデータを観測する前に事象の事前確率を計算しなければならない。 $A_1(a)$ が単集合の割り当て集合 $\{x_1 = a\}$ を表し、及び ϕ が完全に規定された因子グラフである場合、この事前確率は：

20

【数3】

$$P(x_i = a | \Phi) = \frac{1}{Z} \prod_{j=1}^m \sum_{s_j \in A_j(a)} \phi_j(s), \quad (2)$$

であり、式中、Zは方程式（1）に導入した正規化定数である。同様に、患者の全ての観測と共に x_1 が状態aである確率は：

30

【数4】

$$P(x_i = a, D | \Phi) = \frac{1}{Z} \prod_{j=1}^m \sum_{s_j \in A_j(a) \cup D X_j} \phi_j(s). \quad (3)$$

である。

【0121】

本発明者らは、パスウェイの大部分にHUGIN最新版によるジャンクションツリー推論アルゴリズムを使用した。患者当たりの推論が3秒間より長くかかるパスウェイについては、本発明者らは、逐次更新、収束許容値 10^{-9} 、及び最大反復10,000回で信念伝搬法を使用する。全ての推論は、対数定義域に対するものとしての実数定義域で実施し、libDAI (Moosij: 2009 上記) で実施した。

40

【0122】

観測因子のパラメータの学習に、本発明者らは期待値最大化 (EM) アルゴリズム (Dempsster (1977) 上記) を用いる。簡潔に言えば、EMは、隠れ変数の確率を推論することと、隠れ変数の確率を所与とする尤度を最大化するようにパラメータを変更することとを反復して行うことにより、隠れ変数を含むモデルのパラメータを学習する。本発明者らはコードを書いてlibDAIに投入し、EMを実行した。各パスウェイについて、患者毎の因子グラフを作成し、患者のデータを適用し、尤度の変化が0.1%未満

50

になるまでEMを実行した。各パスウェイから学習したパラメータを平均化し、次にそれらのパラメータを使用して、各変数についての最終的な事後信念を計算した。

【0123】

推論後、「活性」分子タイプを有する各変数について統合パスウェイ活性を出力した。方程式2及び3からの数量を使用して、エンティティ*i*の活性が上昇又は低下するという信念が患者のデータによって増加する程度を反映する対数尤度比を計算した：

【数5】

$$\begin{aligned} L(i, a) &= \log \left(\frac{P(D, x_i = a | \Phi)}{P(D, x_i \neq a | \Phi)} \right) - \log \left(\frac{P(x_i = a | \Phi)}{P(x_i \neq a | \Phi)} \right) \\ &= \log \left(\frac{P(D | x_i = a, \Phi)}{P(D | x_i \neq a, \Phi)} \right). \end{aligned} \quad (4) \quad 10$$

【0124】

次に、

【数6】

$$IPA(i) = \begin{cases} L(i, 1) & L(i, 1) > L(i, -1) \text{ かつ } L(i, 1) > L(i, 0) \\ -L(i, -1) & L(i, -1) > L(i, 1) \text{ かつ } L(i, -1) > L(i, 0) \\ 0 & \text{その他の場合} \end{cases} \quad (5) \quad 20$$

として、対数尤度比に基づき遺伝子*i*についての単一の統合パスウェイ活性（IPA）を計算した。

【0125】

直感的には、IPAスコアは、対数尤度比*L*の符号付きの類似形を反映する。

【0126】

遺伝子が活性化される可能性が高い場合、IPAは*L*に設定される。或いは、遺伝子が不活性化される可能性が高い場合、IPAは対数尤度比の負値に設定される。遺伝子が変わらない可能性が最も高い場合、IPAはゼロに設定される。各パスウェイは、他のパスウェイとは独立して分析される。従って遺伝子は、一つの遺伝子が、それが現れる各パスウェイへと、複数の推論に関連付けられることができる。同じ遺伝子についての推論が異なることは、遺伝子のパスウェイ文脈に応じた代替的なデータ解釈と見ることができる。

【0127】

実施例V：有意性評価

本発明者らは、データの2つの異なる順列によりIPAスコアの有意性を評価する。「within」順列について、初めにランダムな実サンプルを選択し、次に同じパスウェイの範囲内からランダムな遺伝子を選択することによって、新しいデータタプル（すなわち対応した遺伝子発現と遺伝子コピー数）の選択を、パスウェイの各遺伝子についてタプルが選択されるまで行うことにより、順列化したデータサンプルを作成する。「any」順列も手順は同じであるが、但しランダムな遺伝子を選択するステップは、ゲノムのどこからでも遺伝子を選択し得る。双方の順列タイプについて、1,000個の順列サンプルが作成され、順列化サンプル毎に摂動スコアが計算される。順列化サンプルからの摂動スコアの分布をヌル分布として用いて、真の試料の有意性を推定する。

【0128】

実施例VI：シグナル伝達パスウェイ影響解析（SPIA）

Tarca（2009，上記）によるシグナル伝達パスウェイ影響解析（SPIA）をCで実行して実行時間を低減し、本発明者らの解析環境に適合するものとした。本発明者らはまた、より詳細な出力を提供する能力も追加して、SPIA出力とPARADIGM出力とを直接比較することができるようにした。本発明者らのSPIAバージョンは、パ

10

20

30

40

50

スウェイのエンティティ毎に累積摂動及び摂動係数を出力することができる。このコードは、要求に応じて利用可能である。

【0129】

実施例VII：デコイパスウェイ

各癌データ集合についてデコイパスウェイ集合を作成した。各NCIパスウェイを使用してデコイパスウェイを作成し、これは同じ構造からなるが、パスウェイのあらゆる遺伝子をRefGeneのランダム遺伝子に代えて用いた。全ての複合体及び抽象的プロセスは同じままとし、実パスウェイ及びデコイパスウェイの双方を含むパスウェイの集合に対してPARADIGM及びSPIAの双方についての有意性分析を実行した。パスウェイは各方法内で順位付けし、全パスウェイに対する実パスウェイの割合を計算して視覚化した。

10

【0130】

実施例VIII：クラスタリング及びカプラン・マイヤー分析

重心連結による非中心化相関階層的クラスタリングを、Eisen(1998 上記1621頁)の方法を用いて膠芽腫データに対して実行した。75例の患者試料間で少なくとも0.25のシグナルを有するIPAのみをクラスタリングに使用した。目視検査により4つの明らかなクラスターが現れ、カプラン・マイヤー分析に使用した。Rを使用してカプラン・マイヤー曲線を計算し、ログランク統計によってp値を求めた。

【0131】

実施例IX：PARADIGMの検証

EM訓練手順の品質を評価するため、遺伝子発現とコピー数とのタプル(E, C)が遺伝子及び患者にわたり順列化されているヌルデータ集合と比べた実際の患者データを使用して、EMの収束を比較した。予想どおり、PARADIGMは、真のデータ集合ではヌルデータ集合と比べてはるかに急速に収束した。例として、遺伝子AKT1についてのIPAをEM反復の関数としてプロットした(図4)。活性が最初の数回の反復で急速に収束することが分かる。EMは実際の患者データで訓練したとき活性レベルに急速に収束したが、一方、ランダムデータを入れたときは活性不変に収束した。この収束は、パスウェイ構造及び推論が、統合された患者データにおける活性パターンを成功裏に特定可能であることを示唆する。

20

【0132】

本発明者らは次に、乳癌及びGBMの双方のコホートに対してPARADIGMを実行した。本発明者らは統計的シミュレーション手順を開発し、負の分布から予想され得るものと比べてどのIPAが有意に異なるかを決定した。負の分布は、パスウェイにおける全ての患者間及び遺伝子間で順列化することにより作成した。経験的に、各遺伝子がネットワークにより決定される異なるトポロジー的文脈を有するという事実の補正を促進するには、パスウェイの遺伝子間のみでの順列化が必要であることが分かった。乳癌データ集合では、56,172個のIPA(全体の7%)が、対応する陰性対照と比べて有意に高い又は低いことが分かった。平均して、NCIパスウェイは患者当たり497個の有意なエンティティを有し、127個中103個のパスウェイが、20%以上の患者で変化した少なくとも1つのエンティティを有した。GBMデータ集合では、141,682個のIPA(全体の9%)が、対応する陰性対照と比べて有意に高い又は低いことが分かった。平均して、NCIパスウェイは患者当たり616個の有意なエンティティを有し、127個中110個のパスウェイが、20%以上の患者で変化した少なくとも1つのエンティティを有した。

30

40

【0133】

別のコントロールとして、本発明者らは、NCIパスウェイの遺伝子と同じように連結される任意の遺伝子から統合活性を得ることができるかという問いを立てた。これを行うため、偽発見率を推定し、それをSPIA(Tarca:2009 上記)と比較した。多くの遺伝的ネットワークが癌に関係していることが分かっているため、本発明者らは陰性対照集合として模擬「デコイ」パスウェイを使用することを選択した。各NCIパスウ

50

エイについて、NCIパスウェイと同じネットワーク構造を使用してゲノム中のランダム遺伝子を互いに連結することにより、デコイパスウェイを作成した。

【0134】

次に本発明者らはPARADIGM及びSPIAを実行して、NCIパスウェイ及びデコイパスウェイの双方のIPAを導き出した。PARADIGMについては、パスウェイサイズで正規化した後に患者間で有意であることが分かったIPAの数により、各パスウェイを順位付けした。SPIAについては、パスウェイは、それらの計算された影響係数に従い順位付けした。本発明者らは、PARADIGMがSPIAと比べて最上位の活性化パスウェイからより多くのデコイパスウェイを除外することを見出した(図5)。例えば乳癌では、PARADIGMは、上位10に1個、上位30に2個、及び上位50に4個のデコイを順位付けする。それに対してSPIAは、上位10に3個、上位30に12個、及び上位50に22個のデコイを順位付けする。NCI IPAの順位の分布全体は、順位の累積分布をプロットすることにより観察すると、PARADIGMにおいてSPIAより高い($P < \$ 0.009$ 、K-S検定)。

10

【0135】

実施例X：乳癌及びGBMにおける上位PARADIGMパスウェイ

本発明者らは、我々の順列解析により検出された有意なIPAのエンティティ当たりの平均数に従いNCIパスウェイを並べ替え、乳癌(表1)及びGBM(表2)における上位15を計算した。

【0136】

20

上位15のうちのいくつかのパスウェイは、既にそのそれぞれの癌に関係付けられている。乳癌では、SPIA及びPARADIGMの双方が、エストロゲン関連パスウェイ及びErbB2関連パスウェイを検出することができた。最近の主なメタ分析研究において(Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schuetz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. Breast Cancer Res. 2008;10(4):R65)、Wirapeti et al. は、エストロゲン受容体及びErbB2の状態が、乳癌における僅か3つに過ぎない主要な予後判定シグネチャーのうちの2つであることを見出した。PARADIGMはまた、AKT1関連PI3Kシグナル伝達パスウェイを、いくつかの試料において有意なIPAを有する最上位のパスウェイとして特定することができた(図6を参照のこと)。

30

【0137】

【表 1】

表1. 乳癌における上位PARADIGMパスウェイ

順位	名称	Avg. ^a	SPIA ^b
1	Aktにより媒介されるクラスI PI3Kシグナル伝達イベント	20.7	No
2	ネクチン接着パスウェイ	14.1	No
3	インスリン媒介性グルコース輸送	13.8	No
4	ErbB2/ErbB3シグナル伝達イベント	12.1	Yes
5	p75(NTR)媒介性シグナル伝達	11.5	No
6	HIF-1- α 転写因子ネットワーク	10.7	No
7	PTP1Bにより媒介されるシグナル伝達イベント	10.7	No
8	細胞膜エストロゲン受容体シグナル伝達	10.6	Yes
9	ナイーブCD8+ T細胞におけるTCRシグナル伝達	10.6	No
10	アンギオポエチン受容体Tie2媒介性シグナル伝達	10.1	No
11	クラスIB PI3K非脂質キナーゼイベント	10.0	No
13	オステオポンチン媒介性イベント	9.9	Yes
12	IL4媒介性シグナル伝達イベント	9.8	No
14	エンドセリン	9.8	No
15	神経栄養因子媒介性Trkシグナル伝達	9.7	No

^a有意な活性が検出された試料のエンティティ当たりの平均数

^bそのパスウェイがSPIAの上位15にも順位付けされた場合にはYes; そうでない場合No

【0138】

【表 2】

表2. GBMにおける上位PARADIGMパスウェイ

順位	名称	Avg. ^a	SPIA ^b
1	Retチロシンキナーゼによるシグナル伝達	46.0	No
2	肝細胞GFRにより活性化されるシグナル伝達イベント	43.7	No
3	エンドセリン	42.5	Yes
4	Arf6下流パスウェイ	42.3	No
5	HDACクラスIIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	36.3	No
6	FOXO1転写因子ネットワーク	35.9	Yes
7	IL6媒介性シグナル伝達イベント	33.2	No
8	FoxOファミリーシグナル伝達	31.3	No
9	LPA受容体媒介性イベント	30.7	Yes
10	ErbB2/ErbB3シグナル伝達イベント	30.1	No
11	p38- α 及びp38- β により媒介されるシグナル伝達	28.1	No
12	HIF-1- α 転写因子ネットワーク	27.6	Yes
13	非ジェノトロピックアンドロゲンシグナル伝達	27.3	No
14	p38 MAPKシグナル伝達パスウェイ	27.2	No
15	PI3Kにより媒介されるIL2シグナル伝達イベント	26.9	No

^a有意な活性が検出された試料のエンティティ当たりの平均数

^bそのパスウェイがSPIAの上位15にも順位付けされた場合にはYes; そうでない場合No

【0139】

抗アポトーシスAKT1セリンスレオニンキナーゼは乳癌に関与することが知られ、ERBB2パスウェイと相互作用する (Ju X, Katiyar S, Wang C, Liu M, Jiao X, Li S, Zhou J, Turner J, Lisanti MP, Russell RG, Mueller SC, Ojeifo J, Chen WS, Hay N, Pestell RG. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007 May; 104 (18): 7438-7443)。GBMでは、FOXO1及びHIF-1- α の双方の転写因子ネットワークが広範に研究されており、高悪性度の膠芽腫においては悪性度が低い神経膠腫と比べて過剰発現することが示されている (Liu M, Dai B, Kang S, Ban K, Huang F, Lang FF, Aldape KD, Xie T, Peltowski CE, Xie K, Sawaya R, Huang S. FoxO1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. Cancer Res. 2006 Apr.; 66 (7): 3593-3602; Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. Genes Dev. 2000 Aug.; 14 (16): 1983-1991)。

【0140】

実施例XI: データ集合の視覚化

PARADIGM推論の結果を視覚化するため、本発明者らは、パスウェイにおける各遺伝子を中心として複数のデータ集合を表示する「CircleMap」視覚化を開発した (図7)。この表示では、遺伝子の周りに同心円状の輪をプロットすることにより、各

遺伝子がコホート間のその全てのデータと関連付けられ、ここで各輪は、一つの種類の計測値又は計算推論に対応する。輪の中の各度数刻みが一つの患者試料に対応し、一方、色が、活性化レベル（赤色）、不活性化レベル（青色）、又は未変化レベル（白色）の活性に対応する。本発明者らはErbB2パスウェイのサブセットについてCircleMapをプロットし、乳癌コホートからのER状態、IPA、発現、及びコピー数データを含めた。

【0141】

遺伝子発現データは、様々な癌の分子サブタイプを定義することに成功している。癌サブタイプは、薬物感受性及び全生存などの種々の臨床転帰と関連することが分かっている。本発明者らは、GBMについて、生の発現データではなくPARADIGM IPAを使用して情報提供性を有するサブタイプを同定することができるかという問いを立てた。IPAを使用することの利点は、IPAが、コピー数、発現、及び遺伝子間の既知の相互作用の要約を提供し、従って意味のある患者サブグループを明らかにするためのよりロバストなシグネチャーを提供し得ることである。本発明者らは、初めに、GBM試料間で少なくとも中程度に繰り返し活性化した全てのIPAを決定し、1,755個のエンティティが229例中少なくとも75例の試料で0.25のIPAを有したことを見出した。それらのエンティティのIPAを全て、活性行列に集めた。次に試料及びエンティティを、非中心化ピアソン相関及び重心連結による階層的クラスタリングを用いてクラスタ化した（図8）。

【0142】

目視検査から、IPAに基づき4つの明らかなサブタイプが明らかとなり、第4のサブタイプは最初の3つと明らかに異なった。第4のクラスターは、明らかなHIF-1 α 転写因子ネットワークの下方制御並びにEGF転写因子ネットワークの過剰発現を示す。HIF-1 α は、低酸素条件に対する応答の調節に関与する主転写因子である。対照的に、最初の3つのクラスターのうちの2つは、EGFRシグネチャーが高く、且つGATAインターロイキン転写カスケードを含むMAPキナーゼカスケードが不活性である。興味深いことに、EGFRの突然変異及び増幅が高悪性度神経膠腫並びに膠芽腫と関連付けられている（Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vlll as a molecular target in cancer therapy. Endocr. Relat. Cancer 2001 Jun. ; 8 (2) : 83-96）。増幅及び特定の突然変異により、二量体の自己刺激又はリガンド非依存性活性化のいずれかを介して構成的に活性化EGFRが生じ得る。EGFRが構成的に活性化すると、腫瘍形成及び固形腫瘍の進行が促進され得る。EGFRを標的化することが公知の分子ゲフィチニブが、現在、他のEGFR駆動型の癌におけるその効力について研究されている。従って、定性的にはこれらのクラスターは、患者を層別化し得る生物学的に有意義な論題に焦点を合わせているように思われる。

【0143】

これらの観測を定量化するため、本発明者らは、PARADIGMにより同定される異なるGBMサブタイプが異なる生存プロファイルと一致するかという問いを立てた。本発明者らは、4つのクラスターの各々について、初回診断後の月数に対して生存患者の割合をプロットすることにより、カプラン・マイヤー曲線を計算した。4つのクラスターの各々についてカプラン・マイヤー生存曲線をプロットし、個別的なIPAシグネチャーと関連付けられる任意のクラスターが生存転帰を予測し得るかどうかを確かめた（図9）。第4のクラスターは、他のクラスターと大きく異なる（ $P < 2.11 \times 10^{-5}$; Cox比例ハザード検定）。最初の3つのクラスターの患者の半数は18ヶ月を超えて生存する；クラスター4の患者について生存は有意に増加し、半数が30ヶ月超生存する。加えて、20~40ヶ月の範囲にわたり、クラスター4の患者は他のクラスターの患者の2倍生存する可能性が高い。

【0144】

実施例 X I I : クラスターについてのカプラン・マイヤー生存プロット

生存分析から、クラスター4の患者が有意により良好な生存プロファイルを有することが明らかとなった。クラスター4は、網膜芽細胞腫抑制因子と共に作用するE2Fの上方制御を有することが分かった。従ってE2Fの上方制御は、クラスター4の患者の腫瘍試料における細胞周期進行の能動的抑制と整合する。加えて、クラスター4はHIF-1- α 転写因子の不活性と関連付けられた。第4のクラスターにおけるこの不活性は、腫瘍により酸素化されていて、より小さい、又はより新しい腫瘍であり得ることを示唆するマーカーとなり得る。従って、PARADIGM IPAは、顕著に異なる生存転帰を有するサブタイプを描出するのに意味のあるプロファイル集合を提供する。

【0145】

10

比較のため、本発明者らはまた、患者を発現データ又はCNAデータのみを用いたクラスタリングにより患者サブタイプを導き出すことを試みた。これらのデータソースのいずれを用いたクラスタリングからも明らかな群は見出されず、このデータ集合の元のTCGA解析における知見と一致した(TCGA: 2008)(図14を参照のこと)。これは、遺伝子間の相互作用及びそこから得られる個々の遺伝子発現の組み合わせ出力が、患者転帰としてのかかる複雑な表現型のより優れた予測因子を提供し得ることを示唆している。

【0146】

実施例 X I I I : 卵巣癌の統合ゲノム解析: 試料及び臨床データ

この報告は、489個の臨床的にアノテートされたステージII~IVのHGS-OvCa及び対応する正常なDNAの解析を対象にしている。患者は、HGS-OvCaと診断された個体の診断時の年齢、病期、腫瘍悪性度、及び手術転帰を反映した。臨床データは2010年8月25日現在で最新のものとした。HGS-OvCa標本は全身的治療の前に外科的に切除され、但し全ての患者が白金剤の投与を受け、及び94%がタキサン投与を受けた。このコホートの無進行生存及び全生存中央値は、既に公表されている治験と同様である11、12。患者の25%が無病を維持し、及び45%が最終経過観察時に生存していた一方、31%は白金ベース療法の完了後6ヶ月以内に進行した。中央値の追跡は30ヶ月であった(範囲0~179)。TCGA解析用の試料は、70%超の腫瘍細胞核を有し、且つ壊死が20%未満のものを選択した。

20

【0147】

30

独立した部位に複数の分子アッセイを用いる協調的分子解析(Coordinated molecular analyses)を、表4に掲載するとおり(データは<http://tcga.cancer.gov/dataportal>で入手可能)二階層で実施した。階層1のデータ集合は公開されているが、階層2のデータ集合は個人を特定し得る臨床情報又はゲノム情報を含むため、<http://tcga.cancer.gov/dataportal/data/access/closed/>に記載されるとおり条件を満たす必要がある。

【0148】

実施例 X I V : 突然変異分析。316個のHGS-OvCa試料から単離したDNA及び各個体に対応する正常試料に対し、エキソームキャプチャー及びシーケンシングを実施した。キャプチャー試薬は、合計約33メガベースの非冗長性配列の約18,500個の遺伝子から約180,000個のエクソンを標的化した。Illumina GAIIxプラットフォーム(236試料ペア)又はABI SOLiD 3プラットフォーム(80試料ペア)での超並列シーケンシングにより、試料当たり約14ギガベース(合計約9 $\times$ 10⁹塩基)が得られた。平均して、腫瘍及び対応正常試料の双方においてコード塩基の76%が十分な深さで網羅され、確信的な突然変異検出が可能となった。19,356個の体細胞突然変異(腫瘍当たり約61個)をアノテートし、表4に分類した。HGS-OvCa病態生理学において重要であり得る突然変異を、(a)バックグラウンドと比べて有意に増加した頻度で存在する非同義的変異又はスプライス部位変異を調べ、(b)この研究の突然変異をCOSMIC及びOMIMの突然変異と比較し、及び(c)タンパク

40

50

質機能に対する影響を予測することにより、同定した。

【0149】

2つの異なるアルゴリズムにより、非同義的変異又はスプライス部位変異の数が突然変異分布モデルに基づき予想される数を有意に上回った9個の遺伝子が同定された(表5)。公表されている結果と一致して13、TP53は316個中303個の試料において変異し(283個は自動化された方法による、及び20個は手動での精査後)、BRCA1及びBRCA2は、それぞれ9%及び8%のケースで生殖細胞系列突然変異を有し、双方ともさらに3%のケースで体細胞突然変異を示した。6つの他の統計的に繰り返し変異した遺伝子が同定された; RB1、NF1、FAT3、CSMD3、GABRA6、及びCDK12。CDK12はRNAスプライシング調節に関与するもので14、これまでに肺及び大腸の腫瘍に関係付けられた15、16。9個のCDK12突然変異のうちの5個はナンセンス又はインデルのいずれかであったことから、潜在的な機能喪失が示唆され、一方4個のミスセンス突然変異(R882L、Y901C、K975E、及びL996F)がそのプロテインキナーゼドメインにクラスター化された。GABRA6及びFAT3は、双方とも有意に変異したと見られたが、HGS-OvCa又は卵管組織では発現しないものと思われたため、従ってこれらの遺伝子の突然変異がHGS-OvCaにおいて有意な役割を果たす可能性は低い。

10

【0150】

本研究による突然変異をCOSMIC17及びOMIM18データベースの突然変異と比較して、一般的にそれほど変異しないさらなるHGS-OvCa遺伝子を同定した。これにより、BRAF(N581S)、PIK3CA(E545K及びH1047R)、KRAS(G12D)、及びNRAS(Q61R)における突然変異を含め、それぞれ477個及び211個のマッチが得られた。これらの突然変異は形質転換活性を呈することが示されているため、本発明者らは、これらの突然変異がまれであるものの、HGS-OvCaにおける重要なドライバーであると考えた。

20

【0151】

本発明者らは、タンパク質ファミリー及び全脊椎動物ゲノムの配列アラインメントからの進化情報と、予測された局所的なタンパク質構造と、選択されたヒトSwissProtタンパク質特徴とを組み合わせることにより、既知の癌遺伝子及び腫瘍抑制因子における突然変異に関する訓練後、CHASMを使用して推定ドライバー突然変異を同定した19、20。CHASMにより、腫瘍形成性を有すると予測される122個のミスセンス突然変異が同定された。突然変異により駆動されるタンパク質機能の変化を、タンパク質ファミリー配列アラインメント及び既知の又は相同性にに基づく三次元タンパク質構造における残基配置をMutation Assessorを使用して比較することによって、全ての確認済みの体細胞ミスセンス突然変異についての進化情報から推測した。ミスセンス突然変異の27パーセントがタンパク質機能に影響を与えると予測された。

30

【0152】

実施例XV: コピー数解析

489個のHGS-OvCaゲノムに存在する体細胞性コピー数変化(SCNA)を同定し、図37Aにおいて多形膠芽腫データと比較した。SCNAは、広範な染色体領域に影響を及ぼす領域性の異常と、より小さい限局的な異常とに分けた。領域性異常の統計的解析により8個の繰り返し起こる獲得と22個の喪失が同定され、その全てが既に報告されている22(図37B)。獲得のうち5個及び喪失のうち18個は、50%超の腫瘍で起こった。

40

【0153】

GISTICを使用して、繰り返し起こる限局性SCNAを同定した。これにより、8個以下の遺伝子をコードする26領域を含む63領域の限局性増幅(図37C)が得られた。最も一般的な限局性増幅はCCNE1、MYC、及びMECOMをコードし(図37C)、各々20%超の腫瘍で高度に増幅された。HGS-OvCaにおける新しい極めて限局化された増幅ピークは、活性化Cキナーゼ受容体ZMYND8; p53標的遺伝子I

50

R F 2 B P 2 ; D N A 結 合 タ ン パ ク 質 阻 害 薬 I D 4 ; 胚 発 生 遺 伝 子 P A X 8 ; 及 び テ ロ メ ラ ー ゼ 触 媒 サ ブ ユ ニ ッ ト T E R T を コ ー ド し た 。 3 つ の デ ー タ ソ ー ス : <http://www.ingenuity.com/>、<http://clinicaltrials.gov> 及 び <http://www.drugbank.ca> を 使 用 し て 、 増 幅 さ れ た 過 剰 発 現 遺 伝 子 の 潜 在 的 治 療 阻 害 因 子 を 同 定 し た 。 こ の 調 査 に よ り 、 少 なく とも 10 % の ケ ー ス で 増 幅 さ れ た M E C O M 、 M A P K 1 、 C C N E 1 及 び K R A S を 含 め 、 治 療 標 的 で あ る 22 個 の 遺 伝 子 が 同 定 さ れ た 。

【0154】

G I S T I C に よ り 50 個 の 限 局 的 な 欠 失 も 同 定 さ れ た 。 腫 瘍 の 少 なく とも 2 % に お い て 、 既 知 の 腫 瘍 抑 制 遺 伝 子 P T E N 、 R B 1 、 及 び N F 1 が ホ モ 接 合 性 欠 失 領 域 に あ っ た 。 重 要 な こ と に は 、 R B 1 及 び N F 1 は ま た 有 意 に 変 異 し た 遺 伝 子 の な か に も あ っ た 。 一 つ の 欠 失 は 、 5 個 の 非 同 義 的 突 然 変 異 と 2 個 の フ レ ー ム シ フ ト 突 然 変 異 と を 有 す る 必 須 細 胞 周 期 制 御 遺 伝 子 の C R E B B P を 含 め 、 3 つ の 遺 伝 子 の み を 含 ん だ 。

【0155】

実 施 例 X V I : m R N A 及 び m i R N A 発 現 並 び に D N A メ チ ル 化 解 析 。

3 つ の 異 な る プ ラ ッ ト フ ォ ー ム (A g i l e n t 、 A f f y m e t r i x H u E x 、 A f f y m e t r i x U 133A) か ら の 11,864 個 の 遺 伝 子 に つ い て の 発 現 計 測 値 を 、 サ ブ タ イ プ の 同 定 及 び 転 帰 の 予 測 用 に 組 み 合 わ せ た 。 個 々 の プ ラ ッ ト フ ォ ー ム 計 測 値 は 、 限 定 的 な 、 し か し 統 計 的 に 有 意 な バ ッ チ 効 果 を 受 け た が 、 一 方 、 組 み 合 わ せ た デ ー タ 集 合 は そ れ を 受 け な か っ た 。 組 み 合 わ せ た デ ー タ 集 合 の 解 析 か ら 約 1,500 個 の 本 質 的 に 変 化 し 易 い 遺 伝 子 が 同 定 さ れ 、 そ れ ら を N M F コ ン セ ン サ ス ク ラ ス タ リ ン グ に 使 用 し た 。 こ の 解 析 に よ り 4 つ の ク ラ ス タ ー が 得 ら れ た (図 38a) 。 同 じ 解 析 手 法 を T o t h i l l e t a l . の 公 的 に 利 用 可 能 な デ ー タ 集 合 に 適 用 し 、 同 様 に 4 つ の ク ラ ス タ ー を 得 た 。 T o t h i l l の ク ラ ス タ ー と T C G A ク ラ ス タ ー と の 比 較 は 、 明 ら か な 相 関 を 示 し た 。 従 っ て 本 発 明 者 ら は 、 H G S - O v C a に は 少 なく とも 4 つ の ロ バ ス ト な 発 現 サ ブ タ イ プ が 存 在 す る と 結 論 付 け る 。

【0156】

本 発 明 者 ら は 、 そ の 4 つ の H G S - O v C a サ ブ タ イ プ を 、 ク ラ ス タ ー に 含 ま れ る 遺 伝 子 及 び 先 行 す る 観 測 に 基 づ き 25、免 疫 反 応 型 、 分 化 型 、 増 殖 型 及 び 間 葉 型 と 名 付 け た 。 T 細 胞 ケ モ カ イ ン リ ガ ン ド の C X C L 11 及 び C X C L 10、並 び に 受 容 体 の C X C R 3 が 、 免 疫 反 応 型 サ ブ タ イ プ を 特 徴 付 け た 。 H M G A 2 及 び S O X 11 な ど の 転 写 因 子 の 高 発 現 、 卵 巢 腫 瘍 マ ー カ ー (M U C 1、M U C 16) の 低 発 現 並 び に M C M 2 及 び P C N A な ど の 増 殖 マ ー カ ー の 高 発 現 が 、 増 殖 型 サ ブ タ イ プ を 定 義 し た 。 分 化 型 サ ブ タ イ プ は M U C 16 及 び M U C 1 の 高 発 現 並 び に 分 泌 性 卵 管 マ ー カ ー S L P I の 発 現 と 関 連 付 け ら れ 、 よ り 成 熟 し た 発 達 段 階 が 示 唆 さ れ た 。 H O X 遺 伝 子 の 高 発 現 並 び に 筋 線 維 芽 細 胞 (F A P) 及 び 微 小 血 管 周 皮 細 胞 (A N G P T L 2、A N G P T L 1) な ど の 間 質 成 分 の 増 加 を 示 唆 す る マ ー カ ー が 、 間 葉 型 サ ブ タ イ プ を 特 徴 付 け た 。

【0157】

D N A メ チ ル 化 の 上 昇 及 び 腫 瘍 発 現 の 低 下 に よ り 、 168 個 の 遺 伝 子 が 、 卵 管 対 照 と 比 較 し て H G S - O v C a に お い て 後 成 的 に サ イ レ ン シ ン グ さ れ た も の と し て 関 係 付 け ら れ た 26。D N A メ チ ル 化 は 全 試 料 に わ た り 遺 伝 子 発 現 の 低 下 と 相 関 し た 。 A M T、C C L 21 及 び S P A R C L 1 は 、 大 多 数 の 腫 瘍 で プ ロ モ ー タ ー 過 剰 メ チ ル 化 を 示 し た た め 、 注 目 に 値 し た 。 奇 妙 に も 、 卵 巢 癌 で 増 幅 及 び 過 剰 発 現 す る こ と が 以 前 に 報 告 さ れ て い る R A B 25 も ま た 、 一 部 の 腫 瘍 で 後 成 的 に サ イ レ ン シ ン グ さ れ る よ う に 見 え た 。 B R C A 1 プ ロ モ ー タ ー は 、 既 に 報 告 さ れ て い る と お り 、 489 個 中 56 個 (11.5 %) の 腫 瘍 で 過 剰 メ チ ル 化 及 び サ イ レ ン シ ン グ さ れ た 。 腫 瘍 間 で の 様 々 な D N A メ チ ル 化 の コ ン セ ン サ ス ク ラ ス タ リ ン グ に よ り 、 年 齢 、 B R C A 不 活 性 化 イ ベ ン ト 、 及 び 生 存 の 差 と 有 意 に 関 連 付 け ら れ た 4 つ の サ ブ タ イ プ が 同 定 さ れ た 。 し か し な が ら 、 こ れ ら の ク ラ ス タ ー は 中 程 度 の 安 定 性 し か 示 さ な か っ た 。

【0158】

T C G A データ集合の転写サブタイプについて、生存期間に有意な差はなかった。増殖型群が M Y C 増幅及び R B 1 欠失の速度低下を示したのに対し、免疫反応型サブタイプは 3 q 2 6 . 2 (M E C O M) 増幅頻度の増加を示した。D N A メチル化クラスターと遺伝子発現サブタイプとの間の中程度の、しかし有意な重複が指摘された ($p < 2.2 \times 10^{-16}$ 、カイ二乗検定、調整ランド指数 = 0.07)。

【0159】

215 個の試料からの統合した発現データ集合を使用して、全生存を予測し得る 193 個の遺伝子の転写シグネチャーを定義した。一変量コックス回帰分析の後、108 個の遺伝子が不良な生存率と相関し、85 個が良好な生存率と相関した (0.01 の p 値カットオフ)。独立した 255 個の T C G A 試料の集合並びに 3 個の独立した発現データ集合において予測力を検証した 25、29、30。検証試料の各々に、その発現プロファイルと予後判定遺伝子シグネチャーとの間の類似性を反映して、予後判定遺伝子スコアを割り当てた 31 (図 38 c)。このシグネチャーのカプラン・マイヤー生存分析から、全ての検証データ集合で生存率との統計的に有意な関連性が示された (図 38 d)。

【0160】

m i R N A 発現データの N M F コンセンサスクラスタリングにより、3 つのサブタイプが同定された。興味深いことに、m i R N A サブタイプ 1 は m R N A 増殖型サブタイプと重複し、及び m i R N A サブタイプ 2 は m R N A 間葉性サブタイプ (図 38 d) と重複した。生存期間は i R N A サブタイプ間で有意に異なり、m i R N A サブタイプ 1 腫瘍の患者の生存が有意に長かった (図 38 e)。

【0161】

実施例 X V I I : 疾患に影響するパスウェイ

いくつかの分析により、316 例の完全に解析されたケースからデータが統合され、H G S - O v C a に寄与する生物学が特定された。既知の癌関連パスウェイが 1 つ又は複数の突然変異、コピー数変化、又は遺伝子発現変化を含む頻度の解析から、R B 1 パスウェイ及び P I 3 K / R A S パスウェイがそれぞれ 67 % 及び 45 % のケースで調節解除されたことが示された (図 39 A)。H o t N e t 3.3 を使用して大規模タンパク質間相互作用ネットワーク 3.2 において変化したサブネットワークを調べることで、H G S - O v C a 試料の 23 % で変化した N o t c h シグナル伝達パスウェイを含め、いくつかの既知のパスウェイが同定された (図 39 B)。

【0162】

公表された研究では、変異した又はメチル化した B R C A 1 又は変異した B R C A 2 を含む細胞は相同組換え (H R) 欠陥を有し、P A R P 阻害薬に高度な応答性を有することが示されている 35 ~ 37。図 39 C は、H G S - O v C a の 20 % が B R C A 1 / 2 に生殖細胞系列突然変異又は体細胞突然変異を有し、11 % が D N A 過剰メチル化によって B R C A 1 発現を失っており、B R C A 1 の後成的サイレンシングが B R C A 1 / 2 突然変異と相互排他的である ($P = 4.4 \times 10^{-4}$ 、フィッシャーの正確検定) ことを示している。B R C A 状態の一変量生存分析から (図 39 C)、B R C A 変異ケースは B R C A 野生型ケースと比べて全生存 (O S) がより良好であることが示された。興味深いことに、後成的にサイレンシングした B R C A 1 ケースは、B R C A 1 / 2 W T H G S - O v C a と同様の生存を示した (O S 中央値 41.5 ヶ月対 41.9 ヶ月、 $P = 0.69$ 、ログランク検定)。これは、B R C A 1 が相互排他的なゲノム機構及びエピゲノム機構により不活性化されること、及び患者生存が不活性化機構に依存することを示唆している。この研究で見出された、細胞を P A R P 阻害薬に対して感受性にし得る他の H R 遺伝子におけるゲノム変化としては、E M S Y の増幅又は突然変異 (8 %)、P T E N の限局的な欠失又は突然変異 (7 %) ; R A D 5 1 C の過剰メチル化 (3 %)、A T M / A T R の突然変異 (2 %)、及びファンコニー貧血遺伝子の突然変異 (5 %) が含まれる。概して、H R 欠陥は H G S - O v C a の約半数に存在し得るもので、腫瘍これらの H R 関連異常を標的化する P A R P 阻害薬の臨床試験の理論的根拠を提供する。

【0163】

B R C A 不活性化イベントの完全集合を全ての繰り返し変化したコピー数ピークと比較することにより、B R C A 不活性化を有するケースにおいて予想外に低い C C N E 1 増幅頻度が明らかとなった (B R C A 野生型ケースの 26% と比べて、B R C A が変化したケースの 8% が C C N E 1 増幅を有した、F D R 調整 $P = 0.0048$)。既に報告されているとおり 39、全生存は C C N E 1 増幅を有する患者について、他の全てのケースと比較して短くなる傾向があった ($P = 0.072$ 、ログランク検定)。しかしながら、B R C A 野生型ケースのみを調べたとき、C C N E 1 が増幅したケースについての生存上の不利は見られなかったため ($P = 0.24$ 、ログランク検定)、既に報告されている C C N E 1 の生存の差は、B R C A が変異したケースのより良好な生存により説明され得ることが示唆される。

10

【0164】

最後に、確率的グラフィカルモデル (P A R A D I G M 40) により、N C I パスウェイ相互作用データベース (N C I Pathway Interaction Database) における変化したパスウェイを調べ、F O X M 1 転写因子ネットワーク (図 39D) を 87% のケースで有意に変化したものとして同定した。F O X M 1 及びその増殖関連標的遺伝子; A U R B、C C N B 1、B I R C 5、C D C 25、及び P L K 1 は、一貫して過剰発現したが、転写調節の指標となる D N A コピー数変化によっては変化しなかった。T P 53 は D N A 損傷後に F O X M 1 を抑制することから 42、H G S - O v C a における高率の T P 53 突然変異が F O X M 1 過剰発現に寄与することが示唆される。他のデータ集合において、F O X M 1 パスウェイは隣接上皮組織と比べて腫瘍で有意に活性化され、H G S - O v C a と関連付けられる。

20

【0165】

実施例 X V I I I : 卵巣漿液性癌において高頻度で変化したパスウェイ

コピー数及び遺伝子発現の双方の統合解析によって有意に変化したパスウェイを同定するため、本発明者らは P A R A D I G M を適用した。この計算モデルはコピー数変化、遺伝子発現データ、及びパスウェイ構造を組み込み、パスウェイデータベースに存在する遺伝子、複合体、及び遺伝的プロセス毎に統合パスウェイ活性 (I P A) を生成する。本発明者らは用語「エンティティ」を、それが遺伝子か、複合体か、又は小分子かを問わず、パスウェイの任意の分子を指して使用する。エンティティの I P A は、最終活性のみを指す。遺伝子について、I P A はタンパク質の活性状態の推論された活性のみを指し、これは、パスウェイにおける他の遺伝子のコピー数、遺伝子発現、及びシグナル伝達から推論される。本発明者らは P A R A D I G M を卵巣試料に適用し、N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e s のパスウェイ相互作用データベース (N C I - P I D) に含まれるパスウェイに存在する多くの異なる遺伝子及び過程の変化を見出した。本発明者らは、1000回のランダムシミュレーションを用いて推論された変化の有意性を評価し、それらのシミュレーションでは、同じ構造を有するパスウェイが使用されるが、パスウェイの種々の点に任意の遺伝子を割り当てた。換言すれば、所与のパスウェイのあるランダムシミュレーションにおいて相互作用の集合は固定されたままであり、従って任意の遺伝子集合がそれらのパスウェイ相互作用によって互いに連結された。全ての試料の I P A の有意性は同じヌル分布に対して評価して、各試料におけるエンティティ毎の有意水準を得た。I P A 及びそれらが有意である試料の割合及び標準偏差が少なくとも 0.1 の I P A を、図 28 にヒートマップとして表示する。

30

40

【0166】

表 3 は、P A R A D I G M により見出された順列化試料に関して少なくとも 3 標準偏差だけ変化するパスウェイを示す。F O X M 1 転写因子ネットワークは、検証した全てのパスウェイのなかで最多数の試料において変化した一試料間で平均化したとき 67% のエンティティが活性の変化を有した。それに対して、卵巣コホートにおいて次に最も高いレベルの活性の変化を有したパスウェイとしては、P L K 1 シグナル伝達イベント (27%)、オーロラ B シグナル伝達 (24%)、及びトロポキサン A 2 受容体シグナル伝達 (20%) が含まれた。従って、N C I - P I D のパスウェイのなかでは、卵巣試料に関して

50

、FOX M1 ネットワークが他のパスウェイと比べて有意により大きく変化する活性を含む。

【0167】

FOX M1 転写因子ネットワークが、最も高い割合の患者試料において、正常対照と比較して腫瘍試料で示差的に変化することが分かった（図29）。FOX M1 は、3つの既知の支配的なスプライシング型を有する多機能性転写因子であり、スプライシング型の各々は、細胞増殖及びDNA修復において様々な役割を有する個別的な遺伝子サブセットを調節する。FOX M1 cアイソフォームは、AUKB、PLK1、CDC25、及びBIRC5を含めた、細胞増殖において既知の役割を有するいくつかの標的を直接調節する。他方で、FOX M1 bアイソフォームは、DNA修復遺伝子BRCA2及びXRCC1を含む完全に異なる遺伝子サブセットを調節する。ATMの間接的な制御下にあるCHEK2は、FOX M1 発現レベルを直接調節する。

10

【0168】

本発明者らは、FOX M1 転写因子それ自体のIPAが、他の転写因子のIPAと比べてより高度に変化するかという問いを立てた。FOX M1 の活性レベルをNCI-PIDにおける他の203個の転写因子の全てと比較した。NCI集合の他の転写因子と比較しても、FOX M1 転写因子は有意に高いレベルの活性を有した（ $p < 0.0001$ ；K-S検定）ことから、それが重要なシグネチャーであり得ることがさらに示唆される（図30）。

20

【0169】

FOX M1 はまた、上皮起源の多くの異なる正常組織においても発現するため、本発明者らは、PARADIGMにより同定されるシグネチャーが、他の組織では正常と見なされ得る上皮シグネチャーに起因するかという問いを立てた。これに答えるため、卵管上皮及び卵巣腫瘍組織がマイクロダイセクションされたGEOからの独立したデータ集合をダウンロードし（GSE10971）、遺伝子発現をアッセイした。FOX M1 のレベルが正常試料と比較して腫瘍試料において有意に高いことが見出されたことから、実際に癌性組織においてはFOX M1 調節が、正常上皮組織に見られるものを超えて亢進することが示唆される（図31）。

【0170】

TCGA卵巣コホート全体が高悪性度漿液性腫瘍に由来する試料を含んだため、本発明者らは、FOX M1 シグネチャーが高悪性度漿液性に特異的であるのかという問いを立てた。低悪性度及び高悪性度の双方の漿液性腫瘍の転写プロファイルが決定されているEttemadmoghadam et al.（2009）のデータ集合から、FOX M1 及びその標的のいくつかの対数発現を得た。この独立したデータから、FOX M1 及びその標的のいくつかは、低悪性度卵巣癌と比べて漿液性卵巣癌において有意に上方制御されることが確認された（図32）。FOX M1 転写因子ネットワークの25個の遺伝子が、高悪性度疾患において発現がより高い遺伝子を有意な割合で含んだかどうかを決定するため、本発明者らはEttemadmoghadamのデータを使用してスチューデントのt検定を実施した。ゲノム中723個の遺伝子（5.4%）が、有意水準0.05で低悪性度癌と比べて高悪性度癌において有意に上方制御されることが分かった（ベンジャミニ・ホッホバーグ（Benjamini-Hochberg）の方法を用いて複数の試験に対して補正）。FOX M1 ネットワークは、その遺伝子のうち13個（52%）が示差的に調節されることが分かった。これは、超幾何検定に基づけば有意な割合である（ $P < 3.8 \times 10^{-12}$ ）。従ってFOX M1 ネットワーク遺伝子の高発現は、ゲノムにおける典型的な遺伝子の発現と比較したとき、高悪性度疾患と確かに特異的に関連するよう思われる。

30

40

【0171】

乳癌及び肺癌を含め、多くの異なる癌におけるFOX M1 の役割が十分に裏付けられているが、卵巣癌におけるその役割はいまだ研究がなされていない。FOX M1 は、3つの既知のスプライシング型を有する多機能性転写因子であり、スプライシング型の各々は、

50

細胞増殖及びDNA修復において様々な役割を有する個別的な遺伝子サブセットを調節する。この分析に関連するFOX M1の相互作用ネットワークの抜粋を図27に示す。FOX M1 aアイソフォームは、AUKB、PLK1、CDC25、及びBIRC5を含めた、細胞増殖において既知の役割を有するいくつかの標的を直接調節する。対照的にFOX M1 bアイソフォームは、DNA修復遺伝子BRCA2及びXRCC1を含む完全に異なる遺伝子サブセットを調節する。ATMの間接的な制御下にあるCHEK2は、FOX M1の発現レベルを直接調節する。卵巣患者のほとんどにおけるFOX M1の発現増加に加え、小さいサブセットはまた、CBSにより検出されるコピー数増幅の増加も有する（19%が、計測したゲノムにおける全遺伝子の上位5%分位内のコピー数増加を伴う）。従って、FOX M1の選択的スプライシング調節はDNA修復と細胞増殖との間の制御スイッチに参与し得る。しかしながら、個別のアイソフォーム活性を区別することは、アイソフォームを区別するエクソン構造及びエクソンアレイプローブの位置によって困難なため、現時点ではこの主張を裏付けるデータは不十分である。これらの試料のmRNAの将来のハイスループットシーケンシングが、示差的なFOX M1アイソフォームレベルの決定を促進し得る。PARADIGMがこの転写因子に集中している最高レベルの活性変化を検出したという観測は、FOX M1が細胞において重要な調節ポイントにあることを示唆している。

10

【0172】

実施例XIX：データ集合及びパスウェイ相互作用

コピー数及び発現データの双方をPARADIGM推論に組み入れた。8個の正常組織対照の集合が発現データにおける解析に利用可能であったため、患者の遺伝子値の各々を、正常な卵管対照で観察される遺伝子の中央値レベルを減じることにより正規化した。コピー数データは、腫瘍で検出された遺伝子レベルと、それに対する血液正常レベルとの間のコピー数の差を反映するように正規化した。PARADIGMへの入力のため、発現データは、サブタイプ解析に使用したものと同一統合データ集合から取り、コピー数は、MSKCC Agilent 1Mコピー数データのセグメント化コールから取った。

20

【0173】

131個のパスウェイ、11,563個の相互作用、及び7,204個のエンティティを含むNCIPIDから一群のパスウェイを入手した。エンティティは、PARADIGMのグラフィカルモデルにおいて「ノード」として表現される分子、複合体、小分子、又は抽象概念である。抽象概念は、一般的な細胞プロセス（「アポトーシス」又は「光の吸収」など）、及びシグナルトランスデューサーのRASファミリーなどの機能的活性を共有する遺伝子のファミリーに対応する。本発明者らは、タンパク質間相互作用、転写調節相互作用、リン酸化及びユビキチン化などのタンパク質修飾相互作用を含む相互作用を収集した。

30

【0174】

実施例XX：パスウェイ文脈における統合分子活性の推論

本発明者らは、コピー数、遺伝子発現、及び各エンティティのパスウェイ文脈を反映する統合パスウェイ活性（IPA）を割り当てるPARADIGMを使用した。

【0175】

データの遺伝子特異的及び患者特異的断面の順列を使用して、IPAの有意性を評価した。ゲノム中の各遺伝子についての値の遺伝子発現とコピー数とのペアを無作為に選択することにより、1000個の「ヌル」患者のデータを作成した。PARADIGM IPAの有意性を評価するため、パスウェイ構造を維持しながらパスウェイにランダム遺伝子を割り当てることにより、ヌル分布を作成した。

40

【0176】

実施例XXI：FOX M1パスウェイの同定

ランダムシミュレーションの間は、FOX M1ネットワーク内の全ての遺伝子を使用して統計的有意性を評価したが、FOX M1パスウェイの視覚化を可能にするため、図29により有意に変化したIPAを有するFOX M1に直接連結されたエンティティを、図2

50

7に含めるため選択した。これらのうち、DNA修復及び細胞周期制御において役割を有する遺伝子であって、FOX M1との相互作用について文献の裏付けがあると認められたものを表示した。元のNCI-PIDパスウェイに存在しなかったBRCC複合体メンバーを、NCI-PIDによればFOX M1の標的であるBRCA2と共にプロットに含めた。上流DNA修復標的を、他のNCIパスウェイにおけるCHEK2の上流直接因子を見つけることにより同定した（例えば、PLK3シグナル伝達パスウェイにATMからの間接的リンクが見出された）。

【0177】

実施例XXII：クラスタリング

活性及び非活性の確率の変化を直接的に表す推論活性の使用は、それにより様々な種類のエンティティをまとめて一つのヒートマップにクラスター化することを可能にする。PARADIGM推論の結果を包括的に視覚化するため、Eisen Cluster 3.0を使用して特徴フィルタリング及びクラスタリングを実施した。0.1の標準偏差フィルタリングにより7204個中1598個のパスウェイエンティティが残り、エンティティ及びサンプルの双方に対して平均連結法非中心化相関階層的クラスターを実施した。

【0178】

実施例XXIII：細胞株は多くの重要な腫瘍サブタイプ及び特徴をモデル化する

臨床的に関連する分子的応答予測因子の同定に対する細胞株の有用性は、腫瘍における応答を決定する多様な分子機構が細胞株内でどの程度機能するかに依存する。本発明者らは、転写物及びゲノムコピー数の双方のレベルでの細胞株モデルと原発腫瘍との間の類似性に関して以前に報告しており⁹、ここでこの比較を、より高分解能のプラットフォーム及び解析技法を用いて改良する。具体的には、本発明者らは遺伝子発現プロファイルの階層的コンセンサスクラスタリング(HCC)を使用して、50個の乳癌細胞株及び5個の非悪性乳房細胞株を3つの転写サブタイプ：ルミナル、基底細胞及び新しく記載されるクロードン低に分類した(図14A)。これらのサブタイプは先述したものの改良版であり、基底細胞型及びクロードン低(calud in-low)型は、それぞれ先に指定した基底細胞A及び基底細胞Bサブタイプに対応する、表7。改良版高分解能SNPコピー数解析(図14B)により、細胞株パネルが、8q24(MYC)、11q13(CCN D1)、17q12(ERBB2)、20q13(STK15/AURKA)の繰り返し生じる増幅領域、及び原発腫瘍に見られる9p21(CDKN2A)のホモ接合性欠失をモデル化することが確認される。トラスツズマブ及びラパチニブ療法により決定されたとおりのERBB2腫瘍サブタイプの臨床的関連性を所与として、本発明者らは、ERBB2^{AMP}と命名される特別なサブタイプとして、ERBB2のDNA増幅を伴う細胞株を調べた。概して、ルミナル型、基底細胞型、クロードン低型及びERBB2^{AMP}型細胞株の本発明者らの同定は、臨床生物学と一致している。

【0179】

実施例XIX：細胞株はほとんどの治療化合物に示差的感受性を示す

本発明者らは、77種の治療化合物に対する我々の細胞株パネルの感受性を調べた。細胞成長アッセイを用い、定量的エンドポイントは9つの濃度の各薬剤に3日間連続的に曝露した後に計測した。試験した抗癌化合物には、従来の細胞傷害剤(例えば、タキサン、プラチノール、アントラサイクリン(anthracycline))と標的化薬剤(例えば、SERM及びキナーゼ阻害薬)との混合物が含まれた。多くの場合、いくつかの薬剤が同じタンパク質又は分子的作用機構を標的化した。本発明者らは、各化合物について応答の定量的尺度を、50%だけ成長を阻害するのに必要な濃度(GI₅₀と称する)として決定した。基礎となる成長データは高品質であるものの、50%阻害が達成されなかった場合、GI₅₀は試験した最高濃度に設定した。GI₅₀値は全ての化合物について表8に提供する。3つの化合物については(P S1145、セツキシマブ及びバイカレイン)、細胞株応答の変動が最小限であったためさらなる解析から除外した。

【0180】

Sigma AKT1-2阻害薬に対する応答の変動を、関連する転写サブタイプと共

10

20

30

40

50

に示す代表的なウォーターフォールプロットを図10Aに示す。この化合物に対する感受性はルミナル型及びERBB2^{AMP}型で最も高く、基底細胞型及びクローディン低型乳癌細胞株でより低かった。全ての化合物についての細胞株間のGI₅₀値の分布を示すウォーターフォールプロットは、付録に載せる。本発明者らは、3回又は4回の反復による229個の化合物／細胞株の組み合わせについてのGI₅₀値の絶対偏差中央値を計算することにより、データ集合全体の再現性を確立した。これらの反復にわたる平均偏差中央値は0.15であった(図15)。本発明者らは、GI₅₀値の集合間のペアワイズなピアソン相関を計算することにより、8種の化合物に対する応答の一致を評価した(図15B。同様の作用機構を有する薬物のペアに対する感受性は高度に相関したことから、同様の作用機構が示唆される。

10

【0181】

実施例XX：多くの化合物は細胞株のサブセットで選択的に有効である

本研究の主な前提は、細胞株における予測性のある分子的特徴がヒト腫瘍に反映される場合に、前臨床細胞株分析で認められる応答と分子サブタイプとの間の関連性が診療室で繰り返し起こり得ることである。本発明者らは、ノンパラメトリックANOVAを用いて転写サブタイプ及びゲノミクスサブタイプ間のGI₅₀値を比較することにより、応答-サブタイプの関連性を確立した。

【0182】

概して、試験した74個中33個の化合物が、転写サブタイプ特異的な応答を示した(FDR $p < 0.2$ 、表7及び表9)。図10Cは、ルミナル、基底細胞、クローディン低及びERBB2^{AMP}サブタイプの1つ又は複数と有意な関連性を有する34個の薬剤の階層的クラスタリングを示す。サブタイプと最も強い関連性を有する11個の薬剤は、受容体チロシンキナーゼシグナル伝達及びヒストンデアセチラーゼの阻害薬であり、ルミナル型及び／又はERBB2^{AMP}型細胞株で最も高い効力を有した。次に最も高い3つのサブタイプ特異的薬剤-エトポシド、シスプラチン、及びドセタキセル-は、臨床的に観察されたとおり、基底細胞型及び／又はクローディン低型細胞株で選択的活性を示す。イクサベピロン、GSK461364(ポロキナーゼ阻害薬)及びGSK1070916(オーロラキナーゼ阻害薬)を含む分裂装置を標的化する薬剤もまた、基底細胞型及びクローディン低型細胞株に対する活性がより高かった。全てEGFR及び／又はERBB2を標的化するAG1478、BI2536及びゲフィチニブは、ERBB2増幅と正の関連性を有した。HSP90の阻害薬であるゲルダナマイシンもまた、ERBB2増幅と正の関連性を示した。興味深いことに、VX-680(オーロラキナーゼ阻害薬)及びCGC-11144(ポリアミン類似体)は、双方ともERBB2増幅と負の関連性を示したことから、これらはERBB2^{AMP}型腫瘍には比較的不適切な療法であることが示される。

20

30

【0183】

本発明者らは、応答と、繰り返し起こる限局的な高レベルコピー数異常(CNA; 標本のt検定、FDR $p < 0.2$ 、表10)との間に、7つの関連性(6つの固有の化合物)を同定した。図10Dは以下のことを示す：(a) 9p21(CDKN2A及びCDKN2B)におけるホモ接合性欠失が、ビノレルビン、イクサベピロン及びファスカプリシン(fascallypsin)に対する応答と関連性を有した。ファスカプリシン(fascallypsin)はCDK4を阻害した。この特異性は、CDK4の阻害におけるCDKN2Aのp16^{INK4A}産物の役割と一致する²⁰。(b) 20q13(AURKAをコードする)における増幅は、AURKB及びAURKCを標的化するGSK1070916及びVX-680に対する感受性よりむしろ、耐性と関連性を有した²³。これは、AURKAの増幅がAURKB及びAURKC阻害薬の迂回機構を提供することを示唆する。(c) 11q13(CCND1)における増幅は、カルボプラチン及びAURKB/C阻害薬GSK1070916に対する感受性と関連性を有した。

40

【0184】

実施例XXI：サブタイプ特異性は成長速度効果を抑制する

50

概して、本発明者らは、ルミナルサブタイプ細胞株が基底細胞型又はクローディン低型細胞より成長が遅く（クラスカル・ワリス検定 $p = 0.006$ 、図16A及び表7）、倍加時間の範囲が広がった（18～300時間）ことを見出した。これにより、最も感受性が高い細胞株は最も速く成長する細胞株であった可能性が生じた。そうであるならば、次に観測されたサブタイプとの関連性は共変量との関連性を表すことになり得る。この仮説を、共分散分析（ANCOVA）を用いてサブタイプ及び倍加時間の効果を同時に評価することにより検証したところ、33個中22個のサブタイプ特異的化合物が、倍加時間よりサブタイプとより良好な関連性を有したことが分かった（ p 値の平均対数比＝0.92、標準偏差1.11）。これは、サブタイプの構成員が成長速度より良好な応答予測因子であるという着想を支持する。さらに、33個中15個のサブタイプ特異的化合物が、より緩徐に成長するルミナル型細胞株において有効性がより高かった（表7）。一つの薬剤、5-フルオロウラシル（5-fluorouracil）は、サブタイプの検証単独では有意でなかったが、ANCOVAモデルではクラス及び倍加時間の双方について強い有意性を示した。5-フルオロウラシル（5-fluorouracil）に対する応答は、ルミナル型細胞株及び基底細胞型細胞株の双方で倍加時間が増加するに従い低下した（図16B）。本発明者らは、ほとんどの場合に、3日間の成長阻害アッセイが、成長速度により強い影響を受けない分子シグネチャー特異的応答を検出していると結論付ける。

【0185】

実施例XXII：コピー数及び転写計測値の統合は、サブタイプ特異的応答のパスウェイを同定する

本発明者らは、ネットワーク解析ツールPARADIGM²⁴を使用して、細胞株パネルのサブタイプ間におけるパスウェイ活性の違いを同定した。この解析は、キュレーションされたパスウェイが部分的に重複しているという事実によって複雑化する。例えばEGFR、PI3キナーゼ及びMEKは、実際にはそれらが単一のより大きいパスウェイの構成要素であるときにも、別個のパスウェイとしてキュレーションされることが多い。この問題に対処するため、PARADIGMは約1400個のキュレーションされたシグナル伝達パスウェイ、転写パスウェイ及び代謝パスウェイを単一の重畳パスウェイ（Super Pathway）にまとめ合わせ、かかる冗長性を排除する。特定の細胞株についてのコピー数データ及び遺伝子発現データの双方を用いて、PARADIGMはパスウェイ相互作用を使用することにより、遺伝子毎、複合体毎、及び細胞プロセス毎に統合パスウェイレベル（IPL）を推論する。

【0186】

本発明者らは、PARADIGM IPLを用いて、細胞株を原発性乳房腫瘍とそれらのパスウェイ活性化により比較した。細胞株-腫瘍比較データは、癌ゲノムアトラス（The Cancer Genome Atlas：TCGA）プロジェクト（<http://cancergenome.nih.gov>）により生成されたデータを使用して行われた。図11は、階層的クラスタリング後の腫瘍及び細胞株の各々についてのパスウェイ活性を示す。各サブタイプについて上位5つのパスウェイ特徴を表11に掲載する。概して、腫瘍及び細胞株サブタイプは同様のパスウェイ活性を示し、及び調節解除されたパスウェイは、元のサブタイプと比べて転写サブタイプとより良好な関連性を有した（図13）。しかしながら、クローディン低型細胞株サブタイプと関連付けられるパスウェイは腫瘍では十分に表現されない—おそらくは、クローディン低サブタイプが細胞株コレクションに過剰に見られ、且つルミナルAサブタイプが欠けているためである（図12）。

【0187】

実施例XXIII：サブタイプ特異的パスウェイマーカーの同定

本発明者らは、サブタイプ間の違いの根底に固有のパスウェイ活性があるかという問いを立てた。そのため、本発明者らは、あるサブタイプの細胞株で他と比較して示差的に上方制御又は下方制御される遺伝子活性を含むSuper Pathwayのサブネットワークを同定した。基底細胞型細胞株とコレクション内の他の全ての間のパスウェイ活性の比較により、941本のエッジにより連結された965個のノードから構成されるネット

ワークを同定した。ここで、ノードはタンパク質、タンパク質複合体、又は細胞プロセスを表し、エッジはタンパク質リン酸化などの、それらの要素間の相互作用を表す（図18～図22を参照のこと）。図35Aは、増殖、血管新生、及び腫瘍形成に関連するMYC/MAXサブネットワークの上方制御；及び細胞周期、接着、浸潤、及びマクロファージ活性化を制御するERK1/2サブネットワークの上方制御を示す。FOX M1及びDNA損傷サブネットワークもまた、基底細胞型細胞株で顕著に上方制御された。クロードイン低サブタイプを他の全てと比較することにより、基底細胞型細胞株におけるものと同じサブネットワークの多くの上方制御が示され、但し、基底細胞と比較したときのクロードイン低型細胞株におけるβ-カテニン（CTNNB1）ネットワークの上方制御を含めて例外はあった（図35B）。β-カテニンは腫瘍発生に関与しているとされ、不良な予後と関連付けられる。ルミナル型細胞株を他の全てと比較することにより、黒色腫における腫瘍形成能を阻害するATF2ネットワークの下方制御、及びER調節性遺伝子の転写を制御し、且つ良好な予後のルミナル型乳癌に関与するとされるFOXA1/FOXA2ネットワークの上方制御が示された（図35C）。ERBB2AMP型細胞株を他の全てと比較することにより、ルミナル型細胞と共通する多くのネットワーク特徴が示された—ほとんどのERBB2AMP型細胞はまたルミナル型細胞として分類されるため、これは意外ではない。しかしながら図35Dは、ERBB2AMP型細胞株におけるRPS6KBP1を中心とする下方制御を示す。

10

【0188】

IPLを使用した細胞株間における示差的な薬物応答の比較分析から、応答機構に関する情報を提供するパスウェイ活性が明らかとなった。例えば、基底細胞型細胞株は、DNA損傷剤のシスプラチンに対して選択的な感受性を有し、また、シスプラチンに対する応答に関連する中心的存在であるATM、CHEK1及びBRCA1を含むDNA損傷応答サブネットワークの上方制御も示した³⁴（図36A）。同様に、ERBB2AMP型細胞株はHSP90の阻害薬であるゲルダナマイシンに対して感受性を有し、またERBB2-HSP90サブネットワークにおける上方制御を示した（図36B）。この観測はゲルダナマイシンの作用機構と一致する：ゲルダナマイシンはERBB2に結合して、その分解（degradation）をもたらす。本発明者らは、ERBB2AMP型細胞株がオーロラキナーゼ阻害薬VX-680に耐性を示したこと（図36C、上）、さらに、この化合物に対する感受性が20q13（AURKA）における増幅と関連性を有しなかったことを見出した。これにより、この耐性が、FOX M1によりAURKBと同時制御されるCCNB1によって媒介され得る可能性が生じる。4つのサブタイプのうちERBB2AMPは、CCNB1の実質的な下方制御を示す唯一のものである（図36C及び図22）。この提案される機構は、原発腫瘍においてCCNB1遺伝子発現がAURKB遺伝子発現と有意に相関するという観察により裏付けられる。

20

30

【0189】

実施例XXIV：細胞成長阻害アッセイ及び成長速度

本発明者らは、我々の55個の乳癌細胞株パネルにおいて77種の化合物の効力を評価した。このアッセイは既に記載されたとおり実施した（Kuo, W. L. et al. A systems analysis of the chemosensitivity of breast cancer cells to the polyamine analogue PG-11047. BMC Med 7, 77, doi:10.1186/1741-7015-7-77 (2009)）。簡潔に言えば、細胞を1：5段階希釈の一組の9用量の各化合物で72時間処理した。Cell Titer Gloアッセイを用いて細胞生存度を決定した。未処理のウェルについての0hに対する72hの比から、倍加時間（DT）を推定した。

40

【0190】

本発明者らは、非線形最小二乗法を使用して、以下のパラメータでデータにゴンペルツ曲線をフィットした：上側及び下側漸近線、傾き及び変曲点。フィットした曲線は、NCI/NIH DTP Human Tumor Cell Line Screen P

50

rocessにより記載され、且つ以前に記載された方法を用いて、GI曲線に変換した (Screening Services – NCI–60 DTP Human Tumor Cell Line Screen. <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>; Monks, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst 83, 757–766 (1991))。

【0191】

本発明者らは、50%だけ成長を阻害するのに必要な化合物濃度 (GI_{50})、成長を完全に阻害するのに必要な濃度 (全成長阻害、TGI) 及び50%だけ集団を減少させるのに必要な濃度 (50%致死濃度、 LC_{50}) を含め、様々な応答尺度を評価した。基礎をなす成長データが高品質でありながらエンドポイント応答 (GI_{50} 、TGI、 LC_{50}) に達しなかった場合、値を試験した最高濃度に設定した。 GI_{50} は最初に達する閾値に相当し、従って最も正確な計測値集合を含む。

【0192】

薬物応答データを、以下の基準を満たすようフィルタリングした：1) 9つのトリプリケートのデータ点間における標準偏差中央値 <0.20 ；2) 特定の細胞株について、 $DT \pm 2SD$ のDT中央値；3) フィットした曲線の傾き >0.25 ；4) 明らかな応答がないデータ集合について、最高濃度での成長阻害 $<50\%$ 。薬物プレートの約80%が全てのフィルタリング要件を通った。本発明者らは、ロバストな形の標準偏差である絶対偏差中央値 (MAD) を使用して、我々の GI_{50} の反復計測の信頼性を評価した。曲線の当てはめ及びフィルタリングは、特別に書いたRパッケージで実施した。

【0193】

実施例XXV：薬物スクリーニング

統計的解析に含まれた各薬物は、データ品質についての以下のスクリーニング基準を満たした：1) 欠測値：細胞株の集合全体で GI_{50} 値の40%以下が欠測していてもよい；2) ばらつき：少なくとも3細胞株について、 $GI_{50} > 1.5 \text{ mGI}_{50}$ 又は $GI_{50} < 0.5 \text{ mGI}_{50}$ のいずれか、式中 mGI_{50} は所与の薬物についての GI_{50} 中央値である。これらの基準を満たさない化合物は解析から除外した。

【0194】

実施例XXVI：SNP Array及びDNAコピー数解析

AffymetrixゲノムワイドヒトSNPアレイ6.0を使用して、DNAコピー数データを測定した。アレイ品質及びデータ処理は、R統計フレームワーク (<http://www.r-project.org>) を使用してaroma.affymetrixに基づき実行した。乳癌細胞株SNPアレイを、記載のとおり20個の正常試料アレイを使用して正規化した (Bengtsson, H., Irizarry, R., Carvalho, B. & Speed, T. P. Estimation and assessment of raw copy numbers at the single locus level. Bioinformatics (Oxford, England) 24, 759–767 (2008))。データを、bioconductorパッケージのDNAcopyからサーキュラーバイナリセグメンテーション (CBS) を用いてセグメント化した (Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R. & Wigler, M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. Biostatistics (Oxford, England) 5, 557–572 (2004))。MATLABベースの、癌において有意な標的のゲノム同定 (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer: GISTIC) を使用して、有意なDNAコピー数変化を分析した (Beroukhi, R. et al. As

sessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 20007-20012 (2007)). 生データはEuropean Genotype Archive (EGA) において受託番号EGAS0000000059により利用可能である。

【0195】

コピー数の有意な変化を検出する確率が確実に最大となるようにするため、非悪性細胞株はGISTIC解析から除いた。各同質遺伝子細胞株ペアの一方のメンバーのGISTICスコアを使用して他方のゲノム変化を推論した：AU565はSKBR3から推論した；HCC1500はHCC1806から推論した；LY2はMCF7から推論した；ZR75BはZR751から推論した。

10

【0196】

実施例XXVII：エクソンアレイ解析

細胞株の遺伝子発現データは、Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 STエクソンアレイから得た。発現の遺伝子レベルの要約を、aroma.affymetrix Rパッケージを使用して、「HuEx—0—stv2, core」チップタイプに基づく分位点正規化及び対数相加プローブレベルモデル (PLM) で計算した。転写物識別子を、BioMart Rパッケージを使用してEnsemblデータベースに問い合わせることによりHGNC遺伝子記号に変換した。続いて得られた発現プロファイルをフィルタリングし、全細胞株においてlog₂スケールで1.0より大きい標準偏差を表す遺伝子のみを捕捉した。生データはArrayExpress (E-MTAB-181) において利用可能である。

20

【0197】

実施例XXVIII：コンセンサスクラスタリング

階層的コンセンサスクラスタリングを用いて細胞株サブタイプを同定した (Monti, S., Tamayo, P., Mesirov, J. P. & Golub, T. A. Consensus Clustering: A Resampling-Based Method for Class Discovery and Visualization of Gene Expression Microarray Data. Machine Learning 52, 91-118 (2003)。コンセンサスは、細胞株の500サンプリング、試料当たり細胞株の80%、凝集型階層的クラスタリング、ユークリッド距離計量及び平均連結法を用いて計算した。

30

【0198】

実施例XXIX：臨床的に関連するサブタイプと治療剤に対する応答との関連性

本発明者らは、3つのスキームを使用してGI50を比較した：1) ルミナル型対基底細胞型対クローディン低型；2) ルミナル型対基底細胞型+クローディン低型；及び3) ERBB2-AMP型対非ERBB2-AMP型。群のGI50の違いを、順位尺度で、必要に応じてノンパラメトリックANOVA又はt検定により比較した。本発明者らは、3組の検定のp値を組み合わせ、偽発見率 (FDR) を使用して複数の試験を補正した。3標本検定について、各群を他の全てと比較して、どの群が最も感度が高いかを決定することにより、有意なクラス効果を有する化合物に対して事後解析を実施した。事後検定のp値を合わせてFDR補正した。いずれの場合にも、FDR p<0.20を有意と見なした。スキーム2で基底細胞型+クローディン低型の群が有意であると分かったが、スキーム1ではそれらの群のうち一つのみが有意であったケースであった場合、クラス特異度を割り当てる際にその3標本ケースに優先度を与えた。解析はRで実施した。

40

【0199】

実施例XXX：ゲノム変化と治療剤に対する応答との関連性

本発明者らはt検定を用いて、繰り返し起こるコピー数変化 (8q24 (MYC)、11q13 (CCND1)、20q13 (STK15/AURKA) におけるもの) と薬物

50

感受性との間の関連性を評価した。本発明者らは、増幅が低い、又はない細胞株を単一の群に組み合わせ、それを増幅が高い細胞株と比較した。欠失領域について同等の解析を行った。G I 5 0 が試験した最大濃度に等しかった細胞株は、解析から除外した。任意の群のサンプル数が5より小さい場合、化合物を除外した。

【0200】

実施例XXXI：成長速度と治療剤に対する応答との関連性

細胞株クラス及び成長速度の薬物感受性に対する効果を評価するため、本発明者らは、上記に記載される3つの細胞株分類スキームの各々につき一つの、一組の二元配置共分散分析(ANCOVA)検定を実施した。これにより6組のp値が得られた(2つの主効果×3分類スキーム)；一回のFDR補正を用いて有意性を評価し、FDR p値<0.20が対象となることを宣言した。これらの分析はRにおいて関数lm及びANOVAで実施した。これらの関数はcarパッケージの一部として利用可能である。

10

【0201】

実施例XXXII：統合パスウェイ解析

PARADIGMソフトウェアを使用して、コピー数、遺伝子発現、及びパスウェイ相互作用データの統合を実施した。簡潔に言えば、この手順は、単一の細胞株又は患者試料から、パスウェイ相互作用並びにゲノムデータ及び機能的ゲノムデータを使用して、遺伝子、複合体、及びプロセスについての統合パスウェイレベル(IPL)を推論する。詳細は実施例XLを参照のこと。

20

【0202】

実施例XXXIII：TCGA及び細胞株クラスタリング

本発明者らは、細胞株について推論された活性が、TCGA腫瘍試料におけるそのそれぞれのサブタイプでクラスター化されるかという問いを立てた。高度に連結されたハブ遺伝子及び高度に相関した活性によって生じるバイアスを回避するため、相関分析により決定された2351個の非冗長な活性の集合を使用して、細胞株及び腫瘍試料をクラスター化した(補足的方法を参照のこと)。細胞株が同じサブタイプの腫瘍試料とクラスター化される程度を、コルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて計算し、同じサブタイプの細胞株と腫瘍試料とのペア間の相関から計算されたt統計量の分布を、異なるサブタイプの細胞株ペアから計算された分布と比較した(補足的方法を参照)。詳細は実施例XLIを参照のこと。

30

【0203】

実施例XXXIV：サブタイプパスウェイマーカーの同定

本発明者らは、まとめて特定のサブタイプに関する示差的活性を示す相互に連結された遺伝子を探索した。各サブタイプは、細胞株を2つの群に二分化するものとして扱った：一方の群は、そのサブタイプに属する細胞株を含み、第2の群は残りの細胞株を含んだ。本発明者らは、2クラスマイクロアレイ有意性解析(SAM)アルゴリズムのRインプリメンテーションを使用して(Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 5116-5121, doi:10.1073/pnas.091062498 [pii] (2001))、SuperPathwayの概念毎に示差的活性(DA)スコアを計算した。サブタイプについては、正のDAが、そのサブタイプで他の細胞株と比較してより高い活性に対応する。

40

【0204】

SuperPathwayにおける密接に関係する遺伝子の協調的な上方制御及び下方制御が、PARADIGMにより推論される活性を補強する。隣接遺伝子の活性もまた特定の表現型と相関する場合、高いDAスコアのサブネットワーク全体が見出されることが予想される。本発明者らは、2つの概念を連結するリンクであって、双方の概念が平均DA絶対値より高いDAスコアを有したリンクのみを保持することにより、高いDA絶対値

50

の概念が相互連結された Super Pathway における領域を同定した。

【0205】

実施例 XXXV：統合パスウェイ解析

PARADIGMソフトウェアを使用して、コピー数、遺伝子発現、及びパスウェイ相互作用データの統合を実施した²⁴。簡潔に言えば、この手順は、単一の細胞株又は患者試料から、パスウェイ相互作用並びにゲノムデータ及び機能的ゲノムデータを使用して、遺伝子、複合体、及びプロセスについての統合パスウェイレベル (IPL) を推論する。TCGA BRCA データは、2010年11月7日付けのTCGA DCC から入手した。TCGA 及び細胞株遺伝子発現データは、個別に、各データ集合内で中心となるプローブ中央値とした。データ集合全体 (細胞株又はTCGA腫瘍試料全体) の値を全て順位変換し、 $-\log_{10}$ 順位比に変換してから、PARADIGMに投入した。パスウェイは、<http://pid.nci.nih.gov/> から BioPax レベル2 フォーマットで得られ、NCI-PID、Reactome、及び BioCarta データベースを含んだ。相互作用を組み合わせて、結合重畳パスウェイ (Super Pathway) とした。遺伝子、複合体、及び抽象的プロセス (例えば「細胞周期」) をパスウェイ概念として保持した。遺伝子概念を結合する前に、全ての遺伝子識別子を HUGO 命名法に変換した。全ての相互作用が含まれ、矛盾する影響を解決することは試みなかった。P53 (最も多く連結された構成要素) を始端とする幅優先無向探索を実行し、一つの単一構成要素を構築した。得られた結合パスウェイ構造は、3491個のタンパク質、4757個の複合体、及び520個のプロセスに相当する合計8768個の概念を含んだ。PARADIGM用の期待値最大化パラメータを細胞株データで訓練し、次にTCGA試料に適用した。次に細胞株及び腫瘍試料からのデータを組み合わせて単一のデータ行列とした。細胞株又は腫瘍試料のいずれかのデータにおいて0.5 IPLを上回る少なくとも1つの値を有しないエントリーは全て、続く解析から除外した。

【0206】

実施例 XXXVI：TCGA 及び細胞株クラスタリング

PARADIGM IPL を使用して細胞株をTCGA腫瘍試料と共にクラスター化し、細胞株が同じサブタイプの腫瘍試料と類似しているかどうかを決定した。Super Pathway の十分に調べられた範囲は、多数の相互作用を有する遺伝子 (ハブ) と、直接的なデータは利用できない多数の中間的な複合体及び抽象的プロセスの大きいシグナル伝達鎖とを含む。ハブへのバイアスを回避するため、クラスタリング前に、細胞株及び腫瘍試料の双方に高度に相関するベクトル (ピアソン相関係数 > 0.9) を含むパスウェイ概念を、単一のベクトルに統一した。この統一の結果、元の8939個のパスウェイ概念から2351個の非冗長性のベクトルとなった。

【0207】

得られた非冗長性概念の集合を使用して、試料をクラスター化した。47個の細胞株及び183個のTCGA腫瘍試料の双方についての推論されたパスウェイ活性の行列を、Eisen Cluster ソフトウェアパッケージ バージョン3.0 に実装される完全連結法階層的凝集型クラスタリングを用いてクラスター化した。非中心化ピアソン相関をパスウェイ概念の計量として使用し、及び試料計量にユークリッド距離を使用した。

【0208】

細胞株が同じサブタイプの腫瘍試料とクラスター化される程度を定量化するため、本発明者らは、ピアソン相関から導き出される t 統計量の2つの分布を比較した。 C_s をサブタイプ s の細胞株の集合とする。同様に、 T_s をサブタイプ s のTCGA腫瘍試料の集合とする。例えば、 C_{basal} 及び T_{basal} は、それぞれ、全ての基底細胞型細胞株及び基底細胞型腫瘍試料の集合である。第1の分布は、同じサブタイプの細胞株及び腫瘍試料を含むあらゆる可能なペア間のピアソン相関から導き出された t 統計量から構成された；すなわち全てのサブタイプ s について、 $a \in C_s$ 及び $b \in T_s$ であるようなペア (a, b) 間のあらゆるペアワイズ相関 t 統計量を計算した。第2の分布は異なるサブタイプの細胞株間の相関 t 統計量から構成された；すなわち、 $a \in C_s$ 及び $b \in C_{s'}$ 及び $s \neq s'$ であるよう

なペア (a, b) に関して計算した。コルモゴロフ・スミルノフ検定を実施して分布を比較した。

【0209】

実施例 XXXVII：統合パスウェイ解析

PARADIGMソフトウェアを使用して、コピー数、遺伝子発現、及びパスウェイ相互作用データの統合を実施した²⁴。簡潔に言えば、この手順は、単一の細胞株又は患者試料から、パスウェイ相互作用並びにゲノムデータ及び機能的ゲノムデータを使用して、遺伝子、複合体、及びプロセスについての統合パスウェイレベル (IPL) を推論する。TCGA BRCAデータは、2010年11月7日付けのTCGA DCCから入手した。TCGA及び細胞株遺伝子発現データは、個別に、各データ集合内で中心となるプローブ中央値とした。データ集合全体 (細胞株又はTCGA腫瘍試料全体) の値を全て順位変換し、 $-\log_{10}$ 順位比に変換してから、PARADIGMに投入した。パスウェイは、<http://pid.nci.nih.gov/> からBioPaxレベル2フォーマットで得られ、NCI-PID、Reactome、及びBioCartaデータベースを含んだ。相互作用を組み合わせて、結合重畳パスウェイ (SuperPathway) とした。遺伝子、複合体、及び抽象的プロセス (例えば「細胞周期」) をパスウェイ概念として保持した。遺伝子概念を結合する前に、全ての遺伝子識別子をHUGO命名法に変換した。全ての相互作用が含まれ、矛盾する影響を解決することは試みなかった。P53 (最も多く連結された構成要素) を始端とする幅優先無向探索を実行し、一つの単一構成要素を構築した。得られた結合パスウェイ構造は、3491個のタンパク質、4757個の複合体、及び520個のプロセスに相当する合計8768個の概念を含んだ。PARADIGM用の期待値最大化パラメータを細胞株データで訓練し、次にTCGA試料に適用した。次に細胞株及び腫瘍試料からのデータを組み合わせて単一のデータ行列とした。細胞株又は腫瘍試料のいずれかのデータにおいて0.5 IPLを上回る少なくとも1つの値を有しないエントリーは全て、続く解析から除外した。

【0210】

実施例 XXXVIII：TCGA及び細胞株クラスタリング

PARADIGM IPLを使用して細胞株をTCGA腫瘍試料と共にクラスター化し、細胞株が同じサブタイプの腫瘍試料と類似しているかどうかを決定した。SuperPathwayの十分に調べられた範囲は、多数の相互作用を有する遺伝子 (ハブ) と、直接的なデータは利用できない多数の中間的な複合体及び抽象的プロセスの大きいシグナル伝達鎖とを含む。ハブへのバイアスを回避するため、クラスタリング前に、細胞株及び腫瘍試料の双方に高度に相関するベクトル (ピアソン相関係数 > 0.9) を含むパスウェイ概念を、単一のベクトルに統一した。この統一の結果、元の8939個のパスウェイ概念から2351個の非冗長性のベクトルとなった。得られた非冗長性概念の集合を使用して、試料をクラスター化した。47個の細胞株及び183個のTCGA腫瘍試料の双方についての推論されたパスウェイ活性の行列を、Eisen Clusterソフトウェアパッケージバージョン3.0に実装される完全連結法階層的凝集型クラスタリングを用いてクラスター化した⁴⁵。非中心化ピアソン相関をパスウェイ概念の計量として使用し、及び試料計量にユークリッド距離を使用した。

【0211】

細胞株が同じサブタイプの腫瘍試料とクラスター化される程度を定量化するため、本発明者らは、ピアソン相関から導き出されるt統計量の2つの分布を比較した。 C_s をサブタイプsの細胞株の集合とする。同様に、 T_s をサブタイプsのTCGA腫瘍試料の集合とする。例えば、 C_{basal} 及び T_{basal} は、それぞれ、全ての基底細胞型細胞株及び基底細胞型腫瘍試料の集合である。第1の分布は、同じサブタイプの細胞株及び腫瘍試料を含むあらゆる可能なペア間のピアソン相関から導き出されたt統計量から構成された；すなわち全てのサブタイプsについて、 $a \in C_s$ 及び $b \in T_s$ であるようなペア (a, b) 間のあらゆるペアワイズ相関t統計量を計算した。第2の分布は異なるサブタイプの細胞株間の相関t統計量から構成された；すなわち、 $a \in C_s$ 及び $b \in C_{s'}$ 及び $s \neq s'$ であるよう

なペア (a, b) に関して計算した。コルモゴロフ・スミルノフ検定を実施して分布を比較した。

【0212】

実施例XXXIX：様々な遺伝分子レベルにおける腫瘍の分子サブタイプ

乳房腫瘍に関して行われる全ゲノム遺伝子発現解析の先駆的研究から、最も顕著にはエストロゲン受容体 (ER) 陰性基底細胞様サブグループ及びER陽性ルミナルサブグループに属する種々のサブクラスが同定されており (Perou, C. M. et al., (2000), Molecular portraits of human breast tumours, 406:747-752)、その臨床転帰には違いがある (14 Sorlie, T. et al., (2001), Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, 98:10869-10874)。いくつかの分子サブタイプの存在はまた、DNAコピー数解析 (2Russnes et al. (2007) 上記)、DNAメチル化 (Ronneberg et al. (2011) 上記) 及びmiRNA発現解析 (Enerly et al. (2011) 上記) によっても観察されている。しかしながら、問題は、分子解析によって様々な新しい分子レベルで得られたこれらの新しいプロファイルが、mRNA発現による当初見出されたサブクラスをどの範囲まで利用するか、及び临床上重要な新規患者サブグループを同定するこれらの新しい分類の潜在力はどのようなものか? である。これらの問いに取り組むため、本発明者らは初めにMicMaデータ集合の乳癌患者を、偏りのない教師なし方法を用いて、調べる各分子レベルに従いクラスター化した (図23)。分子レベル毎の患者のクラスターリングのヒストグラムを個別に、及び患者サブグループ毎の生存KMプロットを、図23に示す。興味深いことに、このクラスターリング手順により、Pam50分類から導き出されるクラスターと高度に相関した7つのmRNA発現クラスターの同定がもたらされる。これはPam50と一致し、但しルミナルAクラスターはexp1~4 mRNAクラスターの間に、基底細胞及びERBB2は最後の3つ (exp5~7) のクラスターの間に分かれた。miRNAレベルでは、(Enerly et al. (2011) 上記) に既に記載されたとおり、3つの異なるクラスターが得られた; メチル化レベルでは、記載されたとおりの3つの主クラスターと、はるかに小さい1つが認められ、この第4のクラスターはRonneberg et al. (2011, 上記) でも観察されたものであるが、それ以上は考察されていない。CNAレベルでは6つの異なるクラスターが出現した。明らかに、あらゆるレベルで個別的な患者クラスターが特定の生存パターンと関連付けられた (図23)。次に、同じ患者が異なる分子レベルで対応するクラスターを形成したかどうかを評価した。実際、異なるレベルのクラスターリング間に、最も顕著にはDNAメチル化及びmRNA発現及びDNAコピー数の間に、良好な一致が大いにあった (表12)。しかしながら、試料によってはいかなるレベルでも常に共にクラスター化され、別の試料は研究における特定の各分子のエンドポイントに応じて異なる群にクラスター化される。

【0213】

【表 3】

表12

	mrna	meth	mir	paradigm
cna	<u>1.38E-04</u>	<u>6.99E-03</u>	<u>9.09E-02</u>	<u>1.20E-05</u>
mrna		<u>6.30E-05</u>	<u>4.12E-03</u>	<u>1.36E-09</u>
meth			<u>1.83E-01</u>	<u>1.26E-05</u>
mir				<u>2.57E-02</u>

10

【0214】

一つの分子レベルに由来する一つのサブクラスを、もう一つによるクラスタリングにより一貫して分けることで、重要な生物学的関係が明らかとなり得る。例えば、(3)で考察されるとおり、メチル化とmRNA発現との間の良好な相関に基づく分類が認められたが ($p = 2.29 \cdot 10^{-6}$)、ルミナルAクラス (mRNA発現による) はさらになお、2つの異なるメチル化クラスターの間に分けられた。同じことが基底細胞様腫瘍にも該当したことから、mRNA発現クラスターとの強い一致にもかかわらず、DNAメチル化に従うクラスタリングによってさらなる情報が提供されたことが示唆される。異なるDNAメチル化プロファイルを有するルミナルA試料は、生存が異なる (3 Ronneberg, J. A. et al., (2011), Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer, 5:61-76)。本発明者及び他の研究者の双方からの新しいデータ集合の数が増えることで、将来、これらのクラスターがいくつかの最も高頻度及び多数の低頻度の組み合わせに収束するかどうかは明らかとなるであろう。

20

【0215】

30

異なる分子レベルでの再分類は、異なるレベルで影響を受ける新しい有益な生物学的パスウェイが指示され得るため、さらに調べるに値するものの、このようにクラス同士でサンプルを水平に入れ替えるなかでの情報量は限定的であり得る。パスウェイ毎にこれらのクラスターの範囲内で示差的に発現／変化する遺伝子を調べることは、先験的知識及び既知の相互作用の選択に依存し、新規のパスウェイを同定することはできない。さらに、これらの手法は異なるデータ集合における遺伝子及び計測値を独立変数として扱い、パスウェイにおける遺伝子の位置、又はその相互に作用するパートナーの数 (すなわちパスウェイのトポロジー) は考慮せず、遺伝子集合中の1つ又は少数の遺伝子の発現における大きい変動に対して脆弱であり得る。一般に、癌における多くの腫瘍で特定のパスウェイが調節解除され得るが、詳細な遺伝子及び調節解除の方法は腫瘍によって異なることが観察されている (Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 2008 Oct.; 455 (7216): 1061-1068)。従って、次に本発明者らは、パスウェイ及び関連する臨床データの文脈における腫瘍内での各遺伝子の活性レベルを特徴付けるため、単一の遺伝子に関する異なるデータ型の計測値間の相互作用並びに既知の遺伝子間相互作用をモデル化するパスウェイベースのモデリング法を適用した。本発明者らは各遺伝子の統合パスウェイレベル (IPL) を用いて患者を直接同定して、これらの調節解除されたパスウェイに従い (分子データ型間で) 分類し、次に様々な分子レベルにおけるこの新しいクラスターの先述の

40

50

クラスとの関係を調べた。

【0216】

実施例XL：予後判定有意性により浸潤癌を分類するためのPARADIGM

腫瘍表現型を説明し、且つ腫瘍を標的化治療され易いものにし得る個別の生物学的機能を、ゲノム変化がどのように妨げるかを理解するためには、パスウェイレベルの摂動を理解する必要がある。PARADIGMは、遺伝子を単一のレベルで調べた場合には区別できない患者サブセットにおいて、一貫した活性パスウェイを同定する。この方法は、既知のパスウェイ構造に対して、確率的グラフィカルモデル(PGM)から統合ゲノミクスデータに至るまでの技法を用いる。これは既に、TCGA膠芽腫及び卵巣データ集合のコピー数及びmRNA発現データの解析に適用されている。PARADIGM解析はまた、DNAメチル化又はコピー数、mRNA及びmiRNA発現などの、複数のレベルでゲノム変化を関係付けるためにも用いることができ、従って個々の各試料における任意の数のオミクスデータ層を統合することができる。DNAメチル化及びmiRNA発現は、ここで観察された調節解除パスウェイに寄与し、且つMicMaコホートにおいて各々それ自体で乳癌の予後判定及び分子プロファイルに明確な寄与を有するように思われるが(図23)、本発明者らは、これらの2つの分子プロファイルタイプを追加することによるPARADIGMクラスターの予後判定値の向上は認めなかった。これについての一つの説明は、miRNA及びDNAメチル化解析の予後判定値が、その高い相関から、mRNA発現によっても利用されるというものである。しかしながら、そのように結論付けるには、例えば、解析プラットフォームの選択(メチル化についての限られたIllumina 1505 CpG癌パネル)及び真のmiRNA標的についての我々の限られた知識が、総合的に計測し、且つmiRNA及びDNAメチル化情報を有効にモデル化する我々の能力を制限する要因となり得るかどうかに関して、さらなる分析を要する。

【0217】

MicMaコホートのmRNA発現及びコピー数変化に基づくPARADIGM解析により、5つの異なるクラスターの存在が同定され(図24A)、mRNA発現とDNAコピー数とを組み合わせると、個別に研究される分子レベルのいずれと比べても、予後にに関して患者のより優れた判別につながることを示された(図24B及び図23)。その摂動がこの分類に最も強力に寄与したパスウェイは、アンジオポエチン(Angiopoietin)受容体Tie2媒介性シグナル伝達のもの、及び最も顕著には、免疫応答(TCR)及びインターロイキンシグナル伝達のものであり、ここではパスウェイにおけるほぼ全ての遺伝子又は複合体が正常値から外れた(図25A)。最も著明に認められたのは、IL4、IL6、IL12及びIL23シグナル伝達であった。他の著明なパスウェイは、エンドセリン、同様に卵巣で調節が解除されるFOXO1転写、並びに同様に乳癌及び卵巣癌で調節が解除されることが既に分かっている膠芽腫TCGAデータ集合及びERBB4であった。この解析に基づき、本発明者らは、有意に異なる予後を有する以下の患者群を同定した。これらの群は、おおまかに以下のとおり特徴付けることができる：

- p d g m. 1 = 高FOXO1、高免疫シグナル伝達、
- p d g m. 2 = 高FOXO1、低免疫シグナル伝達、マクロファージ優勢、
- p d g m. 3 = 低FOXO1、低免疫シグナル伝達、
- p d g m. 4 = 高ERBB4、低アンジオポエチンシグナル伝達、
- p d g m. 5 = 高FOXO1、低マクロファージシグネチャー。

【0218】

2つの既に発表されているデータ集合でParadigmクラスターの同定を検証した。一つはChin et al 2007 (Chin, S. F. et al., (2007), Using array-comparative genomic hybridization to define molecular portraits of primary breast cancers, 26:1959-1970)によるもので、これはMicMaデータ集合と比較して、ER及び高悪性度腫瘍の頻度がより高かったとともに、さらに一層興味深いことに、別の集合では非悪性DCIS(非浸潤性

乳管癌)が濃縮された(12 Muggenud, A. A. et al., (2010), Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer, 4:357-368)(図25B、図25C)。純粋なDCIS腫瘍のヒートマップを図25Dに示す27。

【0219】

MicMaにおいて最も不良な予後のクラスターpdgm. 2では、IL4シグナル伝達がSTAT6と共に強く下方制御され、STAT6は、ヒト乳癌細胞において成長阻害を妨げることが示されている(16 Gooch, J. L., Christy, B., and Yee, D., (2002), STAT6 mediates interleukin-4 growth inhibition in human breast cancer cells, 4:324-331)。IL4シグナル伝達の下方向制御はまた、より高い腫瘍成長を支持し得るマスト細胞の活性化も促進している(17 de Visser, K. E., Eichten, A., and Coussens, L. M., (2006), Paradoxical roles of the immune system during cancer development, 6:24-37)。逆にpdgm. 5では、IL23シグナル伝達により、マクロファージ活性化が低下し、ナチュラルキラー細胞活性が増加する。免疫応答が、一方の側面でTh-2細胞及びB細胞の動員に、他方でTh-1の増殖に向かい、癌依存的に二極化することが考察されている(1 Ursini-Siegel, J. et al., (2010), Receptor tyrosine kinase signaling favors a protumorigenic state in breast cancer cells by inhibiting the adaptive immune response, 70:7776-7787)。一定の条件下でTh1/CTL免疫応答が、マウスにおける過形成の腺腫への移行を妨げ得る一方、Th2応答が、癌腫への移行を促進する慢性炎症状態を付与することにより得るという仮説が立てられている。IL4はTh-2由来のサイトカインであり、B細胞分化及び癌細胞での慢性炎症を刺激する。さらにTh-2細胞は、これらの癌における免疫抑制を媒介するIL10を分泌する。この免疫抑制は、主に基底細胞癌及びERBB2癌で起こることが示されている。この裏付けとして、最近、「腫瘍促進性微小環境で抗腫瘍性獲得免疫プログラムが奪われ、代わりに、上皮細胞挙動の調節に機能的に関与する先天性免疫系の細胞成分が関わることにより悪性腫瘍が促進され得る」ことが示されている(DeNardo, D. G. et al., (2009), CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages, 16:91-102)。

【0220】

ここに提案されるこの免疫分類と、十分に確立されたmRNA発現による分類(ルミナルA、B、基底細胞、ERBB2、正常様)との間には、少なからぬ一致があった(図24. 基底細胞及びERBB2クラスターに属するサンプルは、主に、prgm1(最も不良な予後)、ルミナルA-prgm3(最も良好な予後)のものであった。しかしながら、Paradigmクラスタリングは、ルミナルA(prgm3)とルミナルB(prgm4)とのクラスター間についてのかかなり有意な区別、並びに予後が極めて不良な基底細胞型腫瘍サブセット(prgm2)の同定を提供する。

【0221】

実施例XLI:摂動がPARADIGMクラスタリングに特異的に影響を与える同定されたパスウェイ

FOXM1転写

FOXM1は、細胞周期進行の主要調節因子であり、その内因的FOXM1発現は細胞周期の相に従い振動する。ヒト癌原遺伝子として確認されたFOXM1は、肝癌、乳癌、

肺癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌、膵癌、脳癌並びに最も一般的なヒト癌の基底細胞癌を含め、ヒト固形癌の大多数で上方制御されることが分かっている。FOX M1は、細胞周期及び染色体／ゲノム維持におけるその複数の役割によって腫瘍形成を促進すると考えられる (Wonsey, D. R. and Follettie, M. T., (2005), Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe, 65:5181-5189)。初代ヒト皮膚ケラチノサイトにおけるFOX M1の異常な上方制御は、ヘテロ接合性の喪失 (LOH) 及びコピー数異常の形でのゲノム不安定性を直接引き起こし得る (Teh M, Gemenet zidis E, Chaplin T, Young BD, Philp ott MP. Upregulation of FOX M1 induces genomic instability in human epidermal keratinocytes. Mol. Cancer 2010; 9:45)。最近の報告では、成人ヒト上皮幹細胞におけるFOX M1の異常な上方制御が3D器官型組織再生系において前癌表現型—ヒト過形成と同様の状態—を引き起こすことが示された (Gemenet zidis, E. et al., (2010), Induction of human epithelial stem/progenitor expansion by FOX M1, 70:9515-952)。この著者らは、FOX M1の過剰発現が、分化経路に干渉し、それにより前駆細胞コンパートメントを拡大することによって幹細胞の固有の自己再生増殖能を利用することを示した。従って、FOX M1が幹細胞／前駆細胞の増殖によって癌の発生を引き起こすという仮説が立てられた。本発明者らは、主にインターロイキンシグナル伝達活性に従い分けられた、このパスウェイの活性が高い群及び低い群の2つの乳癌患者群を明らかに認めている。図26は、クラスターp d g m3 (最良の予後) についての、このパスウェイの逆の活性化のし方を示し (活性化されたとき赤色、対して不活性化されたとき青色)、これはより不良な生存及びそれに寄与する分子レベル (図の形に従いmRNA、CNA、miRNA又はDNAメチル化) を伴うその他のクラスターとは対照的である。p d g m3におけるMMP2の下方制御がDNAメチル化による一方、その他の腫瘍ではDNA欠失によることが分かる。miRNAのなかで、has-let 7-bはp g m3において上方制御され、その他では下方制御され、その標的AURKBと相補的であった。DNA増幅及びmRNA発現の双方が発現の調節解除の原因と見られた。

【0222】

アンギオポエチン受容体tie2媒介性シグナル伝達

Angファミリーは、ヒト癌の発症及び成長の間の血管新生において重要な役割を果たす。Ang2の血管新生における役割は、概してAng1の拮抗体であって、血管成熟及び安定化に重要な、Ang1が促進するTie2シグナル伝達を阻害すると考えられる (23)。Ang2は、別の重要な血管新生因子である血管内皮増殖因子A (VEGFA) と共に、協働的に血管新生を調整する (Hashizume, H. et al., (2010), Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth, 70:2213-2223)。新しいデータは、ヒト癌が進行する間の浸潤性の表現型の癌細胞の血管新生におけるAng2についてのより複雑な役割を示唆する。特定のアンギオポエチン (Ang) ファミリーメンバーはTie1を活性化することができ、例えばAng1は内皮細胞においてTie1リン酸化を誘発する (2 Yuan, H. T. et al., (2007), Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival, 21:3171-3183)。しかしながら、Tie2が内皮細胞において下方制御されるとき、Ang1はTie1リン酸化を誘発できず、及びAng1が存在しない場合に、Tie1リン酸化は構成的に

活性な形態の T i e 2 又は T i e 2 作動性抗体のいずれかにより誘発されるため、T i e 1 リン酸化は T i e 2 依存性である (25 Yuan et al. (2007) 上記)。A n g 1 媒介性 A K T 及び 4 2 / 4 4 M A P K リン酸化は主に T i e 2 媒介性であり、T i e 1 はこのパスウェイを下方制御する。従って T i e 1 の主な役割は、T i e 2 駆動性のシグナル伝達を下方制御するその能力及び内皮生存により、血管形態形成を調整することである。T i e 2 媒介性シグナル伝達並びに V E G F R 1 及び 2 媒介性シグナル伝達の双方及び特異的シグナルが、このデータ集合で観察された。

【0223】

E R B B 4

E R B B 4 は、乳房形態形成における増殖及び細胞運動並びに E r b b 4 を発現する乳房原始上皮の方向性のある細胞運動に寄与する一方で、乳房細胞運命を促進する。N r g 3 / E r b b 4 シグナル伝達の候補エフェクターは同定されており、ここでは初期の乳腺発生及び癌に関連する他のシグナル伝達パスウェイと相互作用することが示されている。E r b B 4 の生体内での主要な機能の一つは、妊娠及び乳汁分泌誘導中の乳腺の成熟にある。妊娠及び長期の乳汁分泌期間は乳癌リスクの低下と関連付けられており、従って腫瘍抑制における E r b B 4 の役割は、乳汁分泌におけるその役割と結び付けられ得る。ほとんどの報告は、思春期に他の E r b B ファミリーメンバーにより惹起される成長刺激を反転させることにおける E r b B 4 の役割と一致するが、しかしながら E R B B 4 発現との生存の有意な関連性は確認されていない (2 Sundvall, M. et al., (2008), Role of ErbB4 in breast cancer, 13: 259-268)。

【0224】

実施例 X L I I : 非浸潤性乳管癌 (D C I S) における分類のための P A R A D I G M

マウスモデルでの前癌性過形成腺における免疫応答の関与を所与として (18 Ursini-Siegel, J. et al., (2010), Receptor tyrosine kinase signaling favors a protumorigenic state in breast cancer cells by inhibiting the adaptive immune response, 70: 7776-7787)、本発明者らは、D C I S ケースから構成される既発表のデータ集合を分析し、浸潤性腫瘍で観察される強い免疫応答及びインターロイキンシグナル伝達が前癌期においても同様に存在するかどうかを見出した。非浸潤性乳管癌 (D C I S) は非浸潤型の乳癌であり、ここでは一部の病変が急激に浸潤性乳管癌 (I D C) に移行する一方、他の病変は変化しないままであると考えられる。本発明者らは、過去に、31 例の純粋な D C I S、36 例の純粋な浸潤癌及び 42 症例の混合診断 (浸潤癌で非浸潤性要素を伴うもの) の遺伝子発現パターンを研究し (1 Muggerud et al. (2010) 上記)、及び組織学的悪性度が高い D C I S 間でのトランスクリプトームの多様性を観測して、進行性腫瘍により類似した遺伝子発現特徴を有する個別的な D C I S サブグループを同定している。このコホート全体 (I D C 及び I L C を含む) についての P A R A D I G M 結果のヒートマップは図 25 C、及び純粋な D C I S 試料についてのヒートマップは図 25 D。純粋な D C I S 腫瘍には、高マクロファージ活性に典型的なシグナル伝達によって特徴付けられる p r g m 2 型のものはなかった (図 25)。それと一致して、実験研究から、原発性乳腺腺癌におけるマクロファージが、その血管新生促進特性の結果として後期発癌を調節するとともに (Lin, E. Y. and Pollard, J. W., (2007), Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer, 67: 5064-5066; Lin, E. Y. et al., (2007), Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages, 1: 288-302)、悪性乳房上皮細胞に上皮成長因子 (E G F) を提供することにより肺転移を助長することが実証されてい

る。ここでも、DCISにおいてPARADIGM解析により同定された上位の調節解除パスウェイには、IL2、4、6、12、23、及び23シグナル伝達に関与するものがあった。

【0225】

双方のデータ集合(DCIS、MicMa)において、ナイーブCD8⁺ T細胞におけるTCRシグナル伝達は、CD8⁺ T細胞を動員することが知られる多数のケモカインと共にリストの上位にあった。一つはIL-12であり、これは、NK細胞及びT細胞からのIFN- γ 産生を刺激することが示された抗原提示細胞により産生される。IFN- γ パスウェイは、調節解除されたパスウェイの一つで、DCISにおけるリストの上位であった。IFN γ はTh1細胞及びNK細胞から産生され、抗腫瘍免疫応答を惹起することが示された。第I相臨床試験では、トラスツズマブ(ハーセプチン(herceptin))の臨床効果が、HER2過剰発現腫瘍を有する患者にIL-12を同時投与すると増強されることが示されており、この効果はNK細胞におけるIFN γ 産生の刺激により媒介される(29)。DCISでは、他の最も強力な寄与因子(表8)は84__NOX4であった。酸素感受性NAPHDオキシダーゼのNOX4、及び食細胞型Aオキシダーゼは、好中性顆粒球における多量の活性酸素種(ROS)の産生、一次免疫応答に関与するものと同様である。また、FN1(フィブロネクチン)、及び血小板由来成長因子受容体であるPDGFRBも、COL1A2、IL12/IL12R/TYK2/JAK2/SPHK2、ESR1及びKRT14と共に、DCISにおいて合わせて特異的に繰り返し現れた。

【0226】

これらの遺伝子/パスウェイは全て、細胞外マトリックスにおける機能、細胞間相互作用、並びに線維症及び角質化に寄与しているように見える。例えば、フィブロネクチン-1、FN1は、細胞表面上、細胞外液、結合組織、及び基底細胞膜に存在する高分子量糖タンパク質ファミリーに属する。フィブロネクチンは他の細胞外マトリックスタンパク質及び細胞性リガンド、例えば、コラーゲン、フィブリン、及びインテグリンと相互作用する。フィブロネクチンは細胞の接着及び遊走プロセスに関与する。血小板由来成長因子受容体PDGFRは、上皮成長因子(EGF)と共に、重要な受容体チロシンキナーゼ(RTK)であるEGF及びPDGF受容体を介してシグナルを伝達する。重要なことに、ここで特定のDCISにおいて過剰発現することが分かったPDGFRは、スニチニブの標的であり(30 Fratto, M. E. et al., (2010), New perspectives: role of sunitinib in breast cancer, 161: 475-482)、及びメシル酸イマチニブ(グリベック(Gleevec))の二次標的である(Weigel, M. T. et al., (2010), In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells, 10: 412)。INF γ 産生を増加させることにより媒介される上記のトラスツズマブ(ハーセプチン(herceptin))の免疫賦活の役割とは逆に、イマチニブはTCR活性化CD4(+)T細胞によるインターフェロン- γ 産生を阻害することが示された。これらの観察は、DCIS及び悪性細胞の表面に提示される成長因子受容体間の相互作用並びに免疫構成を明らかにする点で、本発明者らの議論にとって興味深い。PDGFRに対する刺激性自己抗体が、I型コラーゲンの発現増加をもたらすRas、ERK1/ERK2、及び活性酸素種(ROS)を含む細胞内ループを惹起すると見られることが示された。これは、本発明者らの研究で同様にDCISにおいて調節解除されるものとして観察されたCOL1A2発現と一致する。

【0227】

実施例XLIII: 材料及び方法

本解析は、約110例の乳癌から収集したデータに適用し、mRNA発現はAgilent全ヒトゲノム4×44K 1色法オリゴアレイにより解析した。コピー数変化(CNA)は、Illumina Human-1 109K BeadChipを使用して解

析した。このSNPアレイは遺伝子中心的であり、平均物理距離が30kbのゲノム全体を網羅するマーカーを含み、15,969個の固有の遺伝子を表す(2004年5月作成、hg17、NCBI Build 35)。各試料を全ゲノム増幅に供した。Bead Studio(v. 2.0、Illumina)を使用して、dbSNP(build 125)の順方向の対立遺伝子の向きを参照して遺伝子型レポート及びlogR値を抽出し、CNAについてlogR値を調整した。

【0228】

Agilent Technologies「Human miRNA Microarray Kit (V2)」を使用して、製造者のプロトコルに従い全RNAからのmiRNAプロファイリングを実施した。Agilent Scanner G2565Aでのスキニング及びFeature Extraction (FE) v9.5を使用してシグナルを抽出した。デュプリケートのハイブリダイゼーションを用いて(99試料)、種々のアレイ及び時間点で実験を行った。2つの試料は1回のみプロファイル決定した。複製プローブのmiRNAシグナル強度をプラットフォームで平均化し、log2変換して、75パーセンタイルに対して正規化した。FE v9.5の初期設定により、miRNA発現状態を各試料中における各遺伝子の存在又は非存在としてスコア化した。

【0229】

DNAメチル化。EpiTect 96 重亜硫酸キット(Bisulfite Kit)(Qiagen GmbH、独国)を使用して、1マイクログラムのDNAを重亜硫酸処理した。500ngの重亜硫酸処理したDNAを、807個の癌関連遺伝子における1505ヶ所のCpG部位を同時に解析するGoldenGateメチル化癌パネルI(Methylation Cancer Panel I)(Illumina Inc、CA、米国)を使用して解析した。遺伝子当たり少なくとも2つのCpG部位が解析され、ここで1つのCpG部位はプロモーター領域にあり、1つのCpG部位は最初のエクソンにあり、メチル化データの初期処理にはBead studioソフトウェアを、製造者のプロトコルに従い使用した。各CpG部位の検出p値を使用して標本パフォーマンスを検証し、及び検出p値に基づきデータ集合をフィルタリングし、ここで検出p値>0.05のCpG部位は以降の解析から除外した。

【0230】

データ前処理及びParadigmパラメータ。コピー数をCBSを用いてセグメント化し、次に、hg18のRefSeq遺伝子座標にわたる全てのセグメントの中央値を取ることにより、遺伝子レベルの計測値に対応させた。mRNA発現について、計測値は、各プローブについて発現値中央値を減じることにより、第1のプローブで正規化した。各プローブの製造者のゲノム位置を、UCSCのliftOverツールを使用してhg17からhg18に変換した。次に、RefSeq遺伝子に重なる全てのプローブの中央値を取ることにより、遺伝子毎の計測値を得た。製造者の説明を用いてメチル化プローブを遺伝子と対応させた。各データ集合を個別に分位点変換することにより、先のとおりParadigmを実行し(10)、しかしデータは、5%及び95%分位点においてではなく、等しいサイズのビンに離散化した。パスウェイファイルは、先に解析したとおりPID(36)からであった。図26は、各データ型における上のビン又は下のビンのいずれかの観測割合をカウントし、次に任意のデータ型において観測割合が最大のビンで各ノードをラベル化することによる、離散化した入力データの(及びIPL値ではない)要約を示す。

【0231】

HOPACH教師なしクラスタリング。Rバージョン2.12上で動くHOPACH Rインプリメンテーションバージョン2.10(37)を使用して、クラスターを導き出した。全てのデータ型で相関距離計量を使用し、但しParadigm IPLは例外で、正規分布でなく、且つゼロ値が見られたため、cosangleを使用した。含まれるサンプル数が5より小さい任意のサンプルクラスターについては、各サンプルを、より大きいクラスター中の最も類似するサンプルと同じクラスターにマッピングした。Mi

cMaデータ集合のParadigmクラスターは、MicMaデータ集合における各クラスターのメドイド (medioid) (中央値関数を使用) を決定し、次に別のデータ集合の各サンプルを、cosangle距離により最も近かったいずれかのクラスターメドイド (medioid) に割り当てることにより、他のデータ型にマッピングした。

【0232】

カプラン・マイヤー (Kaplan-Meier)、クラスター濃縮。Rバージョン2.12を使用して、カプラン・マイヤー統計、プロット、及びクラスター濃縮を決定した。coxph() 比例ハザードモデルからワルド検定を使用してコックス p 値を決定し、及びsurvdif() 関数からカイ二乗検定によりログランク p 値を決定した。クラスタリングについての遺伝子の値又はパスウェイメンバーの値の全体的な濃縮をANOVAにより決定し、及び特定のクラスターラベルの遺伝子の濃縮を、特定のクラスターにおける遺伝子の値と、他の全てのクラスターにおける遺伝子の値とのT検定により決定した。p値調整のベンジャミニとホッホバーグ (Benjamini & Hochberg) の方法を用いてFDRを決定した。

10

【0233】

実施例XLIV：データ集合及びパスウェイ相互作用

コピー数及び発現データの双方をPARADIGM推論に組み入れた。8個の正常組織対照の集合が発現データにおける解析に利用可能であったため、患者の遺伝子値の各々を、正常な卵管対照で観察される遺伝子の中央値レベルを減じることにより正規化した。コピー数データは、腫瘍で検出された遺伝子レベルと、それに対する血液正常レベルとの間のコピー数の差を反映するように正規化した。PARADIGMへの入力のため、発現データは、サブタイプ解析に使用したのと同じ統合データ集合から取り、コピー数は、MSKCC Agilent 1Mコピー数データのセグメント化コールから取った。

20

【0234】

131個のパスウェイ、11,563個の相互作用、及び7,204個のエンティティを含むNCIPIDから一群のパスウェイを入手した。エンティティは、PARADIGMのグラフィカルモデルにおいて「ノード」として表現される分子、複合体、小分子、又は抽象概念である。抽象概念は、一般的な細胞プロセス (「アポトーシス」又は「光の吸収」など)、及びシグナルトランスデューサーのRASファミリーなどの機能的活性を共有する遺伝子のファミリーに対応する。本発明者らは、タンパク質間相互作用、転写調節相互作用、リン酸化及びユビキチン化などのタンパク質修飾相互作用を含む相互作用を収集した。

30

【0235】

実施例XLV：パスウェイ文脈における統合分子活性の推論

本発明者らは、コピー数、遺伝子発現、及び各エンティティのパスウェイ文脈を反映する統合パスウェイ活性 (IPA) を割り当てるPARADIGMを使用した。

【0236】

データの遺伝子特異的及び患者特異的断面の順列を使用して、IPAの有意性を評価した。ゲノム中の各遺伝子についての値の遺伝子発現とコピー数とのペアを無作為に選択することにより、1000個の「ヌル」患者のデータを作成した。PARADIGM IPAの有意性を評価するため、パスウェイ構造を維持しながらパスウェイにランダム遺伝子を割り当てることにより、ヌル分布を作成した。

40

【0237】

実施例XLVI：FOXM1パスウェイの同定

ランダムシミュレーションの間は、FOXM1ネットワーク内の全ての遺伝子を使用して統計的有意性を評価したが、FOXM1パスウェイを視覚化するため、図29により有意に変化したIPAを有するFOXM1に直接連結されたエンティティを、図27に含めるため選択した。これらのうち、DNA修復及び細胞周期制御において役割を有する遺伝子であって、FOXM1との相互作用について文献の裏付けがあると認められたものを表示した。元のNCIPIDパスウェイに存在しなかったBRCC複合体メンバーを、N

50

C I - P I DによればF O X M 1の標的であるB R C A 2と共にプロットに含めた。上流DNA修復標的を、他のN C IパスウェイにおけるC H E K 2の上流直接因子を見つけることにより同定した（例えば、P L K 3シグナル伝達パスウェイにA T Mからの間接的リンクが見出された）。

【0238】

実施例X L V I I：クラスタリング

活性及び非活性の確率の変化を直接的に表す推論活性の使用は、それにより様々な種類のエンティティをまとめて一つのヒートマップにクラスター化することを可能にする。P A R A D I G M推論の結果を包括的に視覚化するため、E i s e n C l u s t e r 3 . 0を使用して特徴フィルタリング及びクラスタリングを実施した。0 . 1の標準偏差フィ

10

【0239】

実施例X L V I I I：ゲノムDNAの単離

血液試料（2～3ml）を患者から採取し、使用時まで、E D T Aが入った試験管に－80℃で保存する。この血液試料から、DNA単離キット（P U R E G E N E , G e n t r a S y s t e m s , M i n n e a p o l i s M N）を使用して製造者の指示に従いゲノムDNAを抽出する。DNA純度は、ベックマン分光光度計で計測した260nm及び280nmにおける吸光度の比（1cm光路；A260/A280）として計測される。

20

【0240】

実施例X L I X：SNPの同定

患者のDNA試料からの遺伝子領域は、PCRにより、その領域用に特別に設計されたプライマーを使用して増幅する。PCR産物は、上記に開示されるとおりの、当業者に公知の方法を用いて配列決定する。配列トレースで同定されるSNPを、P h r e d / P h r a p / C o n s e dソフトウェアを使用して検証し、N C B I SNPデータベースに寄託されている既知のSNPと比較する。

【0241】

実施例L：統計的解析

値は平均値±SDとして表現される。 χ^2 分析（W e b C h i S q u a r e C a l c u l a t o r , G e o r g e t o w n L i n g u i s t i c s , G e o r g e t o w n U n i v e r s i t y , W a s h i n g t o n D C）を使用して、正常な対象と障害を有する患者とにおける遺伝子型頻度の差を評価する。事後解析を伴う一元配置ANOVAを示されるとおり実施して、異なる患者群間の血行動態を比較する。

30

【0242】

当業者は、上述の実施形態の様々な適応例及び改良例を本発明の範囲及び精神から逸脱することなく構成し得ることを理解するであろう。当該技術分野において公知の他の好適な技法及び方法が、当業者によって数多くの具体的な様式で、且つ本明細書に記載される本発明の説明をふまえて適用され得る。従って、本発明は本明細書に具体的に記載される以外に従い実施され得ることが理解されるべきである。上記の説明は例示的であることを意図し、限定的であることを意図するものではない。上記の説明を考察することで、当業者には多くの他の実施形態が明らかであろう。従って本発明の範囲は、かかる特許請求の範囲に適用される均等物の全範囲と共に、添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。

40

【0243】

【表 4】

表 3

	A	B	C	D	E	F	G
	名称	患者平均値	平均振動数	合計振動数	エンティティ数	最小平均 (Truth)	最大平均 (Truth)
1							
2	FOXMI転写因子ネットワーク	0.669583023	211.5882353	10791	51	0.016	1.958
3	PLK1シグナル伝達イベント	0.270625465	85.51764706	7269	85	-0.016	0.253
4	オーロラBシグナル伝達	0.242442849	76.6119403	5133	67	-0.274	0.355
5	トロポキサンA2受容体シグナル伝達	0.197799879	62.5047619	6563	105	-0.491	0.15
6	グリピカン2ネットワーク	0.163765823	51.75	207	4	0	0.043
7	概日リズムパスウェイ	0.1570771	49.63636364	1092	22	-0.068	0.226
8	オステオポンチン媒介性イベント	0.14140573	44.68421053	1698	38	-0.047	0.155
9	IL23媒介性シグナル伝達イベント	0.141191983	44.61666667	2677	60	-0.035	0.318
10	血管新生におけるインテグリン	0.122588909	38.73809524	3254	84	-0.444	0.081
11	エンドセリン	0.117550105	37.14583333	3566	96	-0.202	0.102
12	Retチロシンキナーゼにより調節されるシグナル伝達イベント	0.114927447	36.31707317	2978	82	-0.193	0.083
13	PLK2及びPLK4イベント	0.110759494	35	105	3	0.002	0.044
14	オーロラAシグナル伝達	0.107331224	33.91666667	2035	60	-0.274	0.162
15	HIF-1- α 転写因子ネットワーク	0.105388075	33.30263158	2531	76	-0.37	0.03
16	IGF1パスウェイ	0.103097935	32.57894737	1857	57	-0.128	0.079
17	mTORシグナル伝達パスウェイ	0.101086697	31.94339623	1693	53	-0.158	0.031
18	インスリンパスウェイ	0.099854601	31.55405405	2335	74	-0.191	0.057
19	視覚信号伝達: 桿体	0.099744401	31.51923077	1639	52	-0.395	0.054
20	amb2インテグリンシグナル伝達	0.098988885	31.2804878	2565	82	-0.146	0.099
21	STAT5により媒介されるIL2シグナル伝達イベント	0.096662831	30.54545455	672	22	-0.294	0.143
22	グリピカン1ネットワーク	0.095068565	30.04166667	1442	48	-0.332	0.072
	Gliタンパク質により媒介されるヘッジホッグシグナル伝達イベント						
23		0.088169426	27.86153846	1811	65	-0.399	0.04
24	HIF-2- α 転写因子ネットワーク	0.087209302	27.55813953	1185	43	-0.149	0.215
25	シンドカン1媒介性シグナル伝達イベント	0.085629188	27.05882353	920	34	-0.065	0.099
26	アンドロゲン受容体活性の同時制御	0.085109927	26.89473684	2044	76	-0.584	0.148
27	IL4媒介性シグナル伝達イベント	0.084330227	26.64835165	2425	91	-0.952	0.162
28	PDGFR- α シグナル伝達パスウェイ	0.080120829	25.31818182	1114	44	-0.152	0.026
29	LPA受容体媒介性イベント	0.079206999	25.02941176	2553	102	-0.073	0.111
30	エフリンB逆行性シグナル伝達	0.077531646	24.5	1176	48	-0.155	0.048
31	Wntシグナル伝達	0.07278481	23	161	7	-0.03	0.039
32	p38- γ 及びp38- δ により媒介されるシグナル伝達	0.072151899	22.8	342	15	-0.054	0.048
33	リールシグナル伝達パスウェイ	0.070524412	22.28571429	1248	56	-0.064	0.063
34	CD4+ TCRパスウェイにおけるRasシグナル伝達	0.069992554	22.11764706	376	17	-0.014	0.072

【 0 2 4 4 】

10

20

30

40

【表 5】

表3

	A	H	I	J	K
名称	最小平均値 (Within)	最大平均値 (Within)	最小平均 値 (Any)	最大平均値 (Within)	
1					
2	FOX M1 転写因子ネットワーク	1000	-1000	-0.065	-1000
3	PLK1 シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.032	-1000
4	オーロラB シグナル伝達	1000	-1000	-0.04	-1000
5	トロポキサンA2 受容体シグナル伝達	1000	-1000	-0.045	-1000
6	グリピカン2 ネットワーク	1000	-1000	0	-1000
7	概日リズム パスウェイ	1000	-1000	-0.027	-1000
8	オスチオポンチン 媒介性イベント	1000	-1000	-0.042	-1000
9	IL23 媒介性シグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.049	-1000
10	血管新生におけるインテグリン	1000	-1000	-0.062	-1000
11	エンドセリン	1000	-1000	-0.046	-1000
12	Ret プロシキナーゼにより調節されるシグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.056	-1000
13	PLK2 及び PLK4 イベント	1000	-1000	-0.026	-1000
14	オーロラA シグナル伝達	1000	-1000	-0.027	-1000
15	HIF-1- α 転写因子 ネットワーク	1000	-1000	-0.051	-1000
16	IGF1 パスウェイ	1000	-1000	-0.05	-1000
17	mTOR シグナル伝達 パスウェイ	1000	-1000	-0.04	-1000
18	インスリン パスウェイ	1000	-1000	-0.049	-1000
19	視覚信号伝達: 桿体	1000	-1000	-0.044	-1000
20	amb2 インテグリン シグナル伝達	1000	-1000	-0.037	-1000
21	STAT5 により媒介される IL2 シグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.031	-1000
22	グリピカン1 ネットワーク	1000	-1000	-0.032	-1000
23	Gli タンパク質により媒介されるヘッジホッグ シグナル 伝達 イベント	1000	-1000	-0.033	-1000
24	HIF-2- α 転写因子 ネットワーク	1000	-1000	-0.043	-1000
25	シンデカン1 媒介性シグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.036	-1000
26	アンドロゲン 受容体活性の同時制御	1000	-1000	-0.018	-1000
27	IL4 媒介性シグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.092	-1000
28	PDGFR- α シグナル伝達 パスウェイ	1000	-1000	-0.034	-1000
29	LPA 受容体 媒介性 イベント	1000	-1000	-0.053	-1000
30	エフリンB 逆行性シグナル伝達	1000	-1000	-0.03	-1000
31	Wnt シグナル伝達	1000	-1000	-0.018	-1000
32	p38- γ 及び p38- δ により媒介されるシグナル伝達	1000	-1000	-0.029	-1000
33	リーリン シグナル伝達 パスウェイ	1000	-1000	-0.032	-1000
34	CD4+ TCR パスウェイにおける Ras シグナル伝達	1000	-1000	-0.02	-1000

【 0 2 4 5 】

10

20

30

【表6】

表3

	A	B	C	D	E	F	G
名称		患者平均値	平均振動数	合計振動数	エンティティ数	最小平均 (Truth)	最大平均 (Truth)
1							
35	PRLにより媒介されるシグナル伝達イベント	0.069620253	22	748	34	-0.211	0.055
36	FASシグナル伝達パスウェイ(CD95)	0.069350929	21.91489362	1030	47	-0.117	0.031
37	グルココルチコイド受容体調節ネットワーク	0.062902509	19.87719298	2266	114	-0.735	0.141
38	非ジェノトロピックアンドロゲンシグナル伝達	0.061282863	19.36538462	1007	52	-0.121	0.06
39	非カノニカルWntシグナル伝達パスウェイ	0.059761441	18.88461538	491	26	-0.035	0.039
40	シグナル4媒介性シグナル伝達イベント	0.058804081	18.58208955	1245	67	-0.332	0.116
41	シグナル2媒介性シグナル伝達イベント	0.057099615	18.04347826	1245	69	-0.037	0.061
42	TRAILシグナル伝達パスウェイ	0.054786392	17.3125	831	48	-0.187	0.037
43	マスト細胞におけるFcε受容体シグナル伝達	0.054776197	17.30927835	1679	97	-0.15	0.054
44	IL1媒介性シグナル伝達イベント	0.054358922	17.17741935	1065	62	-0.06	0.076
45	FoxOファミリーシグナル伝達	0.05364913	16.953125	1085	64	-0.02	0.345
46	Fas及びTNF-αのHIV-1 Nef:ネガティブエフェクター	0.051195499	16.17777778	728	45	-0.151	0.054
47	HDACクラスIIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	0.047705696	15.075	603	40	-0.128	0.089
48	ネクチン接着パスウェイ	0.047568817	15.03174603	947	63	-0.09	0.06
49	炭疽毒素の細胞内役割	0.046413502	14.66666667	572	39	-0.178	0.049
50	Arf6シグナル伝達イベント	0.044354839	14.01612903	869	62	-0.294	0.058
51	アポトーシスにおけるカスパーゼカスケード	0.04413274	13.94594595	1032	74	-0.09	0.06
52	FOX A2及びFOX A3転写因子ネットワーク	0.042308751	13.36956522	615	46	-0.691	0.14
53	p75(NTR)媒介性シグナル伝達	0.041113924	12.992	1624	125	-0.173	0.076
54	ケラチノサイトにおけるE-カドヘリンシグナル伝達	0.040918457	12.93023256	556	43	-0.079	0.041
55	LPA4媒介性シグナル伝達イベント	0.040875527	12.91666667	155	12	-0.095	0
56	クラスI PI3Kシグナル伝達イベント	0.040575689	12.82191781	936	73	-0.052	0.076
57	PTP1Bにより媒介されるシグナル伝達イベント	0.039473684	12.47368421	948	76	-0.191	0.091
58	BARD1シグナル伝達イベント	0.03847435	12.15789474	693	57	-0.049	0.139
59	IFN-γパスウェイ	0.037788533	11.94117647	812	68	-0.042	0.055
60	細胞膜エントロゲン受容体シグナル伝達 ヘッジホッグファミリーにより媒介されるシグナル伝達 イベント	0.037569915	11.87209302	1021	86	-0.069	0.077
61		0.037548685	11.86538462	617	52	-0.044	0.086
62	レチノイン酸受容体媒介性シグナル伝達	0.03699258	11.68965517	678	58	-0.098	0.181
63	EPHB1順行性シグナル伝達	0.036820551	11.63529412	989	85	-0.05	0.129
64	S1P3パスウェイ	0.036467752	11.52380952	484	42	-0.075	0.064
65	細胞質及び核SMAD2/3シグナル伝達の調節	0.035773253	11.30434783	260	23	-0.002	0.173

【0246】

10

20

30

40

【表 7】

表 3

名称		A		H	I	J	K
		最小平均値 (Within)	最大平均値 (Within)		最大平均値 (Within)	最小平均値 (Any)	最大平均値 (Within)
1							
35	PRLにより媒介されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.044	-1000	-0.044	-1000
36	FASシグナル伝達パスウェイ (CD95)	1000	-1000	-0.033	-1000	-0.033	-1000
37	グルココルチコイド受容体調節ネットワーク	1000	-1000	-0.057	-1000	-0.057	-1000
38	非ジェノトロピックアンドロゲンシグナル伝達	1000	-1000	-0.027	-1000	-0.027	-1000
39	非カノニカルWntシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.047	-1000	-0.047	-1000
40	シグナル伝達4媒介シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.039	-1000	-0.039	-1000
41	シグナル伝達2媒介シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.043	-1000	-0.043	-1000
42	TRAILシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.033	-1000	-0.033	-1000
43	マスト細胞におけるFcε受容体シグナル伝達	1000	-1000	-0.059	-1000	-0.059	-1000
44	IL1媒介シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.051	-1000	-0.051	-1000
45	FoxOファミリーシグナル伝達	1000	-1000	-0.035	-1000	-0.035	-1000
46	Fas及びTNF-αのHIV-1 Nef:ネガティブエフェクター	1000	-1000	-0.05	-1000	-0.05	-1000
47	HDACクラスIIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.028	-1000	-0.028	-1000
48	ネクチン接着パスウェイ	1000	-1000	-0.056	-1000	-0.056	-1000
49	炭疽毒素の細胞内役割	1000	-1000	-0.017	-1000	-0.017	-1000
50	Arf6シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.021	-1000	-0.021	-1000
51	アポトーシスにおけるカスパーゼカスケード	1000	-1000	-0.04	-1000	-0.04	-1000
52	FOXO2及びFOXO3転写因子ネットワーク	1000	-1000	-0.058	-1000	-0.058	-1000
53	p75 (NTR) 媒介シグナル伝達	1000	-1000	-0.059	-1000	-0.059	-1000
54	ケラチノサイトにおけるE-カドヘリンシグナル伝達	1000	-1000	-0.03	-1000	-0.03	-1000
55	LPA4媒介シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.019	-1000	-0.019	-1000
56	クラスI PI3Kシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.044	-1000	-0.044	-1000
57	PTP1Bにより媒介されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.038	-1000	-0.038	-1000
58	BARD1シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.043	-1000	-0.043	-1000
59	IFN-γパスウェイ	1000	-1000	-0.054	-1000	-0.054	-1000
60	細胞膜エントロゲン受容体シグナル伝達 ヘッジホッグファミリーにより媒介されるシグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.055	-1000	-0.055	-1000
61		1000	-1000	-0.035	-1000	-0.035	-1000
62	レチノイン酸受容体媒介シグナル伝達	1000	-1000	-0.036	-1000	-0.036	-1000
63	EPHB1順行性シグナル伝達	1000	-1000	-0.057	-1000	-0.057	-1000
64	SIP3パスウェイ	1000	-1000	-0.031	-1000	-0.031	-1000
65	細胞質及び核SMAD2/3シグナル伝達の調節	1000	-1000	-0.026	-1000	-0.026	-1000

【 0 2 4 7 】

10

20

30

【表 8】

表3

	A	B	C	D	E	F	G
	名称	患者平均値	平均振動数	合計振動数	エンティティ数	最小平均 (Truth)	最大平均 (Truth)
1							
66	PI3Kにより媒介されるIL2シグナル伝達イベント	0.035410301	11.18965517	649	58	-0.177	0.024
67	カノニカルWntシグナル伝達パスウェイ	0.034251675	10.82352941	552	51	-0.161	0.122
68	神経栄養因子媒介性Trk受容体シグナル伝達	0.034203586	10.80833333	1297	120	-0.101	0.077
69	核SMAD2/3シグナル伝達の調節	0.033693224	10.64705882	1448	136	-0.198	0.119
70	a4b1及びa4b7により媒介されるパキシリン非依存性イベント	0.033185084	10.48648649	388	37	-0.068	0.056
71	神経細胞の移動及び発達における脳回欠損遺伝子 (LIS1)	0.03246601	10.25925926	554	54	-0.04	0.052
72	リンパ球におけるカルシニューリン調節性NFAT依存性転写	0.032436709	10.25	697	68	-0.112	0.131
73	IL27媒介性シグナル伝達イベント	0.032141971	10.15686275	518	51	-0.023	0.08
74	他の核内受容体とのRXR及びRARヘテロ二量体化	0.03164557	10	520	52	-0.008	0.115
75	ErbB2/ErbB3シグナル伝達イベント	0.031450828	9.938461538	646	65	-0.031	0.076
76	Arf6下流パスウェイ	0.029658522	9.372093023	403	43	-0.036	0.049
77	シグナル伝達3媒介性シグナル伝達イベント	0.028933092	9.142857143	320	35	-0.052	0.061
78	HIF-1- α の低酸素性及び酸素恒常性調節	0.028864595	9.121212121	301	33	-0.004	0.149
79	IL6媒介性シグナル伝達イベント	0.028565401	9.026666667	677	75	-0.168	0.058
80	オーロラCシグナル伝達	0.028481013	9	63	7	0	0.061
81	Notch及びWntシグナル伝達におけるプレセニリン作用	0.028429135	8.983606557	548	61	-0.159	0.068
82	テロメラーゼの調節	0.028046662	8.862745098	904	102	-0.199	0.075
83	IL12媒介性シグナル伝達イベント	0.027717154	8.75862069	762	87	-0.175	0.08
84	p38- α 及びp38- β により媒介されるシグナル伝達	0.027330265	8.636363636	380	44	-0.181	0.045
85	EPOシグナル伝達パスウェイ	0.027272727	8.618181818	474	55	-0.053	0.041
86	エフリンA逆行性シグナル伝達	0.026672694	8.428571429	59	7	-0.053	0.03
87	セラミドシグナル伝達パスウェイ	0.026414363	8.346938776	409	49	-0.083	0.054
88	BCRシグナル伝達パスウェイ	0.026147551	8.262626263	818	99	-0.044	0.072
89	ナイーブCD8+ T細胞におけるTCRシグナル伝達	0.026099088	8.247311828	767	93	-0.06	0.077
90	新生アドヘレンスジャンクションにおけるE-カドヘリンシグナル伝達	0.025607928	8.092105263	615	76	-0.048	0.05
91	VEGFR1及びVEGFR2により媒介されるシグナル伝達イベント	0.025037975	7.912	989	125	-0.091	0.07
92	a4b1により媒介されるパキシリン依存性イベント	0.02478903	7.833333333	282	36	-0.068	0.041

【表 9】

表3

A		H	I	J	K
名称		最小平均値 (Within)	最大平均値 (Within)	最小平均 値 (Any)	最大平均値 (Within)
1					
66	PI3Kにより媒介されるIL2シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.02	-1000
67	カノニカルWntシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.042	-1000
68	神経栄養因子媒介性Trk受容体シグナル伝達	1000	-1000	-0.049	-1000
69	核SMAD2/3シグナル伝達の調節	1000	-1000	-0.028	-1000
70	a4b1及びa4b7により媒介されるパキシリン非依存性イ ベント	1000	-1000	-0.03	-1000
71	神経細胞の移動及び発達における脳回欠損遺伝子 (LIS1)	1000	-1000	-0.052	-1000
72	リンパ球におけるカルシニューリン調節性NFAT依存性 転写	1000	-1000	-0.067	-1000
73	IL27媒介性シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.048	-1000
74	他の核内受容体とのRXR及びRARヘテロ二量体化	1000	-1000	-0.043	-1000
75	ErbB2/ErbB3シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.062	-1000
76	Ara6下流パスウェイ	1000	-1000	-0.026	-1000
77	シンデカン3媒介性シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.033	-1000
78	HIF-1- α の低酸素性及び酸素恒常性調節	1000	-1000	-0.024	-1000
79	IL6媒介性シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.043	-1000
80	オーロラシグナル伝達	1000	-1000	-0.015	-1000
81	Notch及びWntシグナル伝達におけるプレセニン作用	1000	-1000	-0.047	-1000
82	テロメラーゼの調節	1000	-1000	-0.053	-1000
83	IL12媒介性シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.079	-1000
84	p38- α 及びp38- β により媒介されるシグナル伝達	1000	-1000	-0.03	-1000
85	EPOシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.044	-1000
86	エフリンA逆行性シグナル伝達	1000	-1000	-0.018	-1000
87	セラミドシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.041	-1000
88	BCRシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.057	-1000
89	ナイーブCD8+ T細胞におけるTCRシグナル伝達	1000	-1000	-0.048	-1000
90	新生アドヘレンスジャンクションにおけるE-カドヘリン シグナル伝達	1000	-1000	-0.059	-1000
91	VEGFR1及びVEGFR2により媒介されるシグナル伝達 イベント	1000	-1000	-0.065	-1000
92	a4b1により媒介されるパキシリン依存性イベント	1000	-1000	-0.03	-1000

【 0 2 4 9 】

10

20

30

【表 10】

表3

	A	B	C	D	E	F	G
1	名称	患者平均値	平均振動数	合計振動数	エンティティ数	最小平均 (Truth)	最大平均 (Truth)
93	S1P1パスウェイ	0.023558368	7.444444444	268	36	-0.017	0.07
94	CD4+ TCRパスウェイにおけるカルシウムシグナル伝達	0.023274806	7.35483871	228	31	-0.041	0.032
95	アンギオポエチン受容体Tie2媒介性シグナル伝達	0.023194764	7.329545455	645	88	-0.331	0.059
96	アンドロゲン受容体活性の調節	0.022151899	7	490	70	-0.714	0.048
97	肝細胞成長因子受容体(c-Met)により活性化されるシグナル伝達イベント	0.021742368	6.870588235	584	85	-0.113	0.05
98	VEGFR1特異的シグナル	0.021643309	6.839285714	383	56	-0.091	0.07
99	E-カドヘリンアドヘレンスジャンクションの安定化及び拡大	0.021595963	6.824324324	505	74	-0.096	0.059
100	セラミドシグナル伝達パスウェイ	0.021360759	6.75	513	76	-0.083	0.056
101	カニカルNF-κBパスウェイ	0.021340474	6.743589744	263	39	-0.038	0.049
102	リンパ球におけるカルシニューリン依存性NFATシグナル伝達の役割	0.020969956	6.625506024	550	83	-0.023	0.173
103	PDGFR-βシグナル伝達パスウェイ	0.020422811	6.453608247	626	97	-0.096	0.08
104	視覚信号伝達: 錐体幹細胞因子受容体(c-Kit)により媒介されるシグナル伝達イベント	0.020319787	6.421052632	244	38	-0.013	0.047
105	インスリン媒介性グルコース輸送	0.01959591	6.192307692	483	78	-0.129	0.033
106	BMP受容体シグナル伝達	0.019481804	6.15625	197	32	-0.022	0.076
107	腎臓足細胞におけるネフリン/Neph1シグナル伝達	0.0191586	5.308641975	430	81	-0.036	0.063
108	CD4+ TCRパスウェイにおけるJNKシグナル伝達	0.01591586	5.029411765	171	34	-0.023	0.046
109	ErbB4シグナル伝達イベント	0.015226564	4.882352941	83	17	-0.015	0.034
110	p38-α及びp38-βの調節	0.015060947	4.811594203	332	69	-0.052	0.08
111	異形NF-κBパスウェイ	0.014495713	4.759259259	257	54	-0.053	0.035
112	EGFR依存性エンドセリンシグナル伝達イベント	0.012808921	4.580645161	142	31	-0.035	0.025
113	ポツリヌス毒素の作用	0.011927945	4.047619048	85	21	-0.023	0.05
114	p38 MAPKシグナル伝達パスウェイ	0.010500575	3.769230769	98	26	-0.009	0.045
115	Aktにより媒介されるクラスI PI3Kシグナル伝達イベント	0.010145197	3.318181818	146	44	-0.036	0.053
116	S1P5パスウェイ	0.008562919	3.205882353	218	68	-0.03	0.059
117	HDAC クラスIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	0.007454966	2.705882353	46	17	-0.001	0.025
118	HDAC クラスIIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	0.00721519	2.355769231	245	104	-0.027	0.053
119	S1P4パスウェイ	0.006582278	2.28	171	75	-0.024	0.047
120	Ara6輸送イベント	0.006106258	2.08	52	25	-0.025	0.036
121	選択的NF-κBパスウェイ	0.005598832	1.929577465	137	71	-0.135	0.043
122			1.769230769	23	13	0	0.07

【表 1 1】

表3

	名称	A		H	I	J	K
1		最小平均値 (Within)	最大平均値 (Within)	最小平均 値 (Any)	最大平均値 (Within)		最大平均値 (Within)
93	S1P1パスウェイ	1000	-1000	-0.046	-1000		-1000
94	CD4 + TCRパスウェイにおけるカルシウムシグナル伝達	1000	-1000	-0.036	-1000		-1000
95	アンギオポエチン受容体Tie2媒介性シグナル伝達	1000	-1000	-0.058	-1000		-1000
96	アンドロゲン受容体活性の調節	1000	-1000	-0.036	-1000		-1000
97	肝細胞成長因子受容体(c-Met)により活性化されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.046	-1000		-1000
98	VEGFR1特異的シグナル	1000	-1000	-0.04	-1000		-1000
99	E-カドヘリン/アトヘレンスジャンクションの安定化及び拡大	1000	-1000	-0.068	-1000		-1000
100	セラミドシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.031	-1000		-1000
101	カノニカルNF-κBパスウェイ	1000	-1000	-0.029	-1000		-1000
102	リンパ球におけるカルシニューリン依存性NFATシグナル伝達の役割	1000	-1000	-0.028	-1000		-1000
103	PDGFR-βシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.06	-1000		-1000
104	視覚信号伝達: 錐体	1000	-1000	-0.024	-1000		-1000
105	幹細胞因子受容体(c-Kit)により媒介されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.054	-1000		-1000
106	インスリン媒介性グルコース輸送	1000	-1000	-0.022	-1000		-1000
107	BMP受容体シグナル伝達	1000	-1000	-0.048	-1000		-1000
108	腎臓足細胞におけるネフリン/Neph1シグナル伝達	1000	-1000	-0.04	-1000		-1000
109	CD4 + TCRパスウェイにおけるJNKシグナル伝達	1000	-1000	-0.027	-1000		-1000
110	ErbB4シグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.043	-1000		-1000
111	p38-α及びp38-βの調節	1000	-1000	-0.036	-1000		-1000
112	異形NF-κBパスウェイ	1000	-1000	-0.035	-1000		-1000
113	EGFR依存性エンドセリンシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.033	-1000		-1000
114	ボツリヌス毒素の作用	1000	-1000	-0.014	-1000		-1000
115	p38 MAPKシグナル伝達パスウェイ	1000	-1000	-0.028	-1000		-1000
116	Aktにより媒介されるクラスI PI3Kシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.029	-1000		-1000
117	S1P5パスウェイ	1000	-1000	-0.019	-1000		-1000
118	HDAC クラスIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.038	-1000		-1000
119	HDAC クラスIIIにより媒介されるシグナル伝達イベント	1000	-1000	-0.036	-1000		-1000
120	S1P4パスウェイ	1000	-1000	-0.027	-1000		-1000
121	Arf6輸送イベント	1000	-1000	-0.023	-1000		-1000
122	選択的NF-κBパスウェイ	1000	-1000	0	-1000		-1000

【0 2 5 1】

10

20

30

【表 1 2】

表 3

	A	B	C	D	E	F	G
	名称	患者平均値	平均擾動数	合計擾動数	エンティティ数	最小平均 (Truth)	最大平均 (Truth)
1							
123	スフィンゴシン1-リン酸(S1P)パスウェイ	0.004972875	1.571428571	44	28	-0.022	0.036
124	RanBP2によるSUMO化が転写抑制を調節する	0.003750586	1.185185185	32	27	-0.027	0.052
125	クラスIB PI3K非脂質キナーゼイベント	0.003164557	1	3	3	-0.024	0.025
126	Arf1パスウェイ	0.002519925	0.796296296	43	54	-0.014	0.031
127	E-カドヘリンシグナル伝達イベント	0.001898734	0.6	3	5	0.02	0.04
128	a4b1及びa4b7インテグリンシグナル伝達	0.001898734	0.6	3	5	0.024	0.036
129	ラビッドグルコルチコイドシグナル伝達	0.001107595	0.35	7	20	-0.011	0.025

【0 2 5 2】

10

20

30

40

【表 1 3】

表 3

	A	H	I	J	K
名称		最小平均値 (Within)	最大平均値 (Within)	最小平均 値 (Any)	最大平均値 (Within)
1					
123	スフィンゴシン1-リン酸(S1P)パスウェイ	1000	-1000	-0.025	-1000
124	RanBP2によるSUMO化が転写抑制を調節する	1000	-1000	-0.043	-1000
125	クラスIB PI3K非脂質キナーゼイベント	1000	-1000	-0.017	-1000
126	Arf1パスウェイ	1000	-1000	-0.022	-1000
127	E-カドヘリンシグナル伝達イベント	1000	-1000	0.016	-1000
128	a4b1及びa4b7インテグリンシグナル伝達	1000	-1000	0.017	-1000
129	ラピッドグルコルチコイドシグナル伝達	1000	-1000	-0.012	-1000

【 0 2 5 3】

10

20

30

【表 1 4】

表4. 使用した特性決定プラットフォーム及び生成されたデータ			
データタイプ	プラットフォーム	ケース	データの 利用可能性
エキソームのDNA配列	Illumina GAIIx ^{a,b} ABI SOLiD ^c	236 80	保護 保護
エキソームに存在する突然変異		316	公開
DNAコピー数／遺伝子型	Agilent 244K ^{d,e}	97	公開
	Agilent 415K ^d	304	公開
	Agilent 1M ^e	539	公開
	Illumina 1MDUO ^f	535	保護
	Affymetrix SNP6 ^a	514	保護
mRNA発現プロファイリング	Affymetrix U133A ^a	516	公開
	Affymetrix Exon ^g	517	保護
	Agilent 244K ^h	540	公開
統合されたmRNA発現		489	公開
miRNA発現プロファイリング	Agilent ^h	541	公開
CpG DNAメチル化	Illumina 27K ⁱ	519	公開
統合的分析		489	公開
統合的分析 (突然変異を含む)		309	公開
生成拠点: Broad Institute、Washington University School of Medicine、Baylor College of Medicine、Harvard Medical School、 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center、HudsonAlpha Institute for Biotechnology、Lawrence Berkeley National Laboratory、University of North Carolina、University of Southern California これらのデータタイプの多くについて、TCGA DCCでさらなるデータ が利用可能である。			

【表 1 5】

表5: HGS-OvCaにおいて有意に変異した遺伝子

遺伝子	突然変異 の数	検証済み	未検証
TP53	302	294	8
BRCA1	11	10	1
CSMD3	19	19	0
NF1	13	13	0
CDK12	9	9	0
FAT3	19	18	1
GABRA6	6	6	0
BRCA2	10	10	0
RB1	6	6	0

10

検証済みの突然変異は、独立したアッセイで確認されたものである。その多くは、同じ腫瘍由来の第2の独立したWGA試料を使用して検証される。未検証の突然変異は、独立した確認はまだ行われていないが、真の突然変異である尤度が高い。手計算により、TP53にさらなる25個の突然変異が認められた。

20

【 0 2 5 5 】

【表 1 6】

表6 有意なサブタイプ特異性を示す治療化合物。各列は一元配置ANOVA検定のFDR補正p値を表す。化合物は、3回の検定で得られた最小p値により順位付けされる。

化合物	標的	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル	基底細胞＋ クローデイン低 ／ルミナル	ERBB2AMP／ 非ERBB2AMP	サブタイプ特異性
ラパチニブ	ERBB2, EGFR	0.05	0.02	0.00	ルミナル/ERBB2AMP
Sigma AKT1-2 阻害薬	Akt 1/2	0.00	0.00	0.11	ルミナル/ERBB2AMP
GSK2126458	PI3K, 汎用	0.00	0.00	0.07	ルミナル/ERBB2AMP
ゲフィチニブ	EGFR	0.49	0.34	0.00	ERBB2AMP
BIBW 2992	EGFR及びHER2	0.67	0.83	0.00	ERBB2AMP
GSK2119563	PI3K, β- (α選択的)	0.02	0.00	0.07	ルミナル/ERBB2AMP
ラパマイシン	mTOR	0.01	0.00	0.34	ルミナル
AG1478	EGFR	0.97	0.92	0.02	ERBB2AMP
ポリノスタット	ヒストンデアセチラーゼ	0.05	0.02	0.63	ルミナル
LBH589	HDAC, 汎阻害薬	0.04	0.03	0.31	ルミナル
ドセタキセル	トポイソメラーゼII	0.05	0.03	0.88	基底細胞
エトポシド	トポイソメラーゼII	0.03	0.04	0.89	クローデイン低
シスプラチン	DNA架橋剤	0.07	0.03	0.86	基底細胞
ファスカプリシン	CDK	0.04	0.04	0.36	ルミナル
トリコスタチンA	ヒストンデアセチラーゼ	0.08	0.04	0.64	ルミナル
PD173074	FGFR3	0.04	0.48	0.60	クローデイン低
CGC-11047	ポリアミン類似体	0.05	0.09	0.84	基底細胞
エルロチニブ	EGFR	0.05	0.19	0.29	基底細胞
GSK1070916	オーロキナーゼB及びC	0.05	0.05	0.52	クローデイン低
テムシロリムス	mTOR	0.11	0.05	0.11	ルミナル/ERBB2AMP
トリシリピン	AKT, ZNF217 増幅	0.08	0.07	0.36	ルミナル
GSK1059615	PI3K	0.15	0.07	0.16	ルミナル/ERBB2AMP
17-AAG	Hsp90	0.15	0.08	0.07	ルミナル/ERBB2AMP
VX-680	オーロキナーゼ	0.29	0.54	0.08	非 ERBB2AMP
タモキシフェン	ESR1	0.23	0.09	0.83	ルミナル
イクサベピロン	微小管	0.23	0.09	0.29	基底細胞＋クローデイン低
TPCA-1	IKK2 (IκBキナーゼ2)	0.29	0.12	0.11	基底細胞＋クローデイン低
カルボプラチン	DNA架橋剤	0.28	0.11	0.54	基底細胞＋クローデイン低
GSK461364	PLK	0.29	0.13	0.77	基底細胞＋クローデイン低
CGC-11144	ポリアミン類似体	0.64	0.60	0.15	非 ERBB2AMP
ゲルダナマイシン	Hsp90	0.92	0.86	0.17	ERBB2AMP
ボスチニブ	Src	0.35	0.19	0.32	基底細胞＋クローデイン低
TGX-221	PI3K, β 選択的	0.36	0.19	0.37	ルミナル

10

20

30

【 0 2 5 6 】

【表 1 7】

表 7. パネルにおける細胞株の転写、ゲノム及び表現型の特徴

細胞株	転写サブタイプ	転写サブタイプ+ ERBB2ステータス	培養培地	倍加時間 (時間)	PIK3CA (3q26.32) GISTIC	MYC (8q24.21) GISTIC	CCND1 (12q13.2) GISTIC	ERBB2 (17q12) GISTIC	AURKA (20q13.2) GISTIC
164A1	非悪性、基底細胞	非悪性、基底細胞	MEGM*	63	ND	ND	ND	ND	ND
164B5	非悪性、基底細胞	非悪性、基底細胞	MEGM*	58	ND	ND	ND	ND	ND
600MPE	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	101	増幅なし	増幅なし	増幅なし	低増幅	増幅なし
AU565	ルミナル	ERBB2AMP	RPMI+10%FBS	38	低増幅	高増幅	増幅なし	高増幅	高増幅
BT20	基底細胞	基底細胞	DMEM+10% FBS	62	低増幅	低増幅	低増幅	高増幅	高増幅
BT474	ルミナル	ERBB2AMP	RPMI+10%FBS	91	低増幅	低増幅	低増幅	高増幅	低増幅
BT483	ルミナル	ルミナル	RPMI+10%FBS	141	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
BT549	クローデイン低	クローデイン低	RPMI+10%FBS	25	増幅なし	低増幅	低増幅	増幅なし	低増幅
CAMA1	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	70	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1143	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	59	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1187	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	71	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1395	クローデイン低	クローデイン低	RPMI1640+10%FBS	84	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1419	ルミナル	ERBB2AMP	RPMI1640+10%FBS	170	増幅なし	高増幅	低増幅	高増幅	低増幅
HCC1428	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	88	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	高増幅
HCC1500	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	47	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1599	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	ND	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1806	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	37	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1937	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	49	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC1954	基底細胞	ERBB2AMP	RPMI1640+10%FBS	46	低増幅	高増幅	低増幅	高増幅	低増幅
HCC202	ルミナル	ERBB2AMP	RPMI1640+10%FBS	201	低増幅	高増幅	低増幅	高増幅	低増幅
HCC2185	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	165	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC2218	ルミナル	ERBB2AMP	RPMI1640+10%FBS	ND	高増幅	低増幅	低増幅	高増幅	低増幅
HCC3153	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	59	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC38	クローデイン低	クローデイン低	RPMI1640+10%FBS	53	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HCC70	基底細胞	基底細胞	RPMI1640+10%FBS	73	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
HS578T	クローデイン低	クローデイン低	DMEM+10% FBS	38	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
LY2	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	53	増幅なし	高増幅	低増幅	低増幅	高増幅
MCF10A	非悪性、基底細胞	非悪性、基底細胞	DMEM/F12+5%HS+IHE+コレラ毒素 ^b	27	ND	ND	ND	ND	ND
MCF10F	非悪性、基底細胞	非悪性、基底細胞	DMEM/F12+5%HS+IHE+コレラ毒素 ^b	51	ND	ND	ND	ND	ND
MCF12A	非悪性、基底細胞	非悪性、基底細胞	DMEM/F12+5%HS+IHE+コレラ毒素 ^b	33	ND	ND	ND	ND	ND
MCF7	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	51	増幅なし	高増幅	低増幅	低増幅	高増幅
MDAMB134VI	ルミナル	ルミナル	DMEM+20%FBS	107	ND	ND	ND	ND	ND
MDAMB157	クローデイン低	クローデイン低	DMEM+10% FBS	67	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
MDAMB175VII	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	107	ND	ND	ND	ND	ND
MDAMB231	クローデイン低	クローデイン低	DMEM+10% FBS	25	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし	増幅なし

【表 1 8】

表 7. Tran:

細胞株	CDKN2A (9p21.3) GISTIC 欠失	PTEN (10q23.31) GISTIC 欠失	同質遺伝子 細胞株ペア
184A1	ND	ND	na
184B5	ND	ND	na
600MPE	低欠失	欠失なし	na
AU565	低欠失	低欠失	SKBR3
BT20	高欠失	低欠失	na
BT474	低欠失	欠失なし	na
BT483	低欠失	低欠失	na
BT549	欠失なし	欠失なし	na
CAMA1	欠失なし	低欠失	na
HCC1143	低欠失	欠失なし	na
HCC1187	欠失なし	欠失なし	na
HCC1395	高欠失	高欠失	na
HCC1419	低欠失	低欠失	na
HCC1428	欠失なし	欠失なし	na
HCC1500	高欠失	欠失なし	na
HCC1599	欠失なし	欠失なし	HCC1806
HCC1806	高欠失	欠失なし	na
HCC1937	低欠失	欠失なし	na
HCC1954	低欠失	高欠失	na
HCC202	欠失なし	低欠失	na
HCC2185	低欠失	欠失なし	na
HCC2218	欠失なし	低欠失	na
HCC3153	欠失なし	高欠失	na
HCC38	高欠失	低欠失	na
HCC70	欠失なし	低欠失	na
HS578T	欠失なし	低欠失	na
LY2	高欠失	欠失なし	na
MCF10A	ND	ND	MCF7
MCF10F	ND	ND	na
MCF12A	ND	ND	na
MCF7	高欠失	欠失なし	na
MDAMB134VI	ND	ND	na
MDAMB157	欠失なし	欠失なし	na
MDAMB175VII	ND	ND	na
MDAMB231	高欠失	欠失なし	na

10

【 0 2 5 8 】

20

【表 19】

【0259】

細胞株	転写サブタイプ	転写サブタイプ+ ERBB2ステータス	培養培地	倍加時間 (時間)	PIK3CA (Q26.32) GISTIC	MYC (8q24.21) GISTIC	CCND1 (11q13.2) GISTIC	ERBB2 (17q12) GISTIC	AURKA (20q13.2) GISTIC
MDAMB361	ルミナル	ERBB2AMP	DMEM+10% FBS	74	増幅なし	低増幅	高増幅	高増幅	高増幅
MDAMB415	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	85	低増幅	低増幅	増幅なし	増幅なし	低増幅
MDAMB436	クローデイン低	クローデイン低	DMEM+10% FBS	63	低増幅	低増幅	増幅なし	増幅なし	低増幅
MDAMB453	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	60	低増幅	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅
MDAMB468	基底細胞	基底細胞	DMEM+10% FBS	52	増幅なし	低増幅	低増幅	増幅なし	低増幅
SKBR3	ルミナル	ERBB2AMP	McCoys+10%FBS	56	低増幅	高増幅	増幅なし	高増幅	高増幅
SUM102PT	基底細胞	基底細胞	無血清 Ham's F12+IHE ^a	115	増幅なし	低増幅	増幅なし	増幅なし	増幅なし
SUM1315MO2	クローデイン低	クローデイン低	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	113	増幅なし	低増幅	増幅なし	増幅なし	増幅なし
SUM149PT	基底細胞	基底細胞	Ham's F12+5% FBS+IH ^a	34	ND	ND	ND	ND	ND
SUM159PT	クローデイン低	クローデイン低	Ham's F12+5% FBS+IH ^a	22	増幅なし	高増幅	増幅なし	増幅なし	増幅なし
SUM185PE	ルミナル	ルミナル	Ham's F12+5% FBS+IH ^a	93	増幅なし	低増幅	増幅なし	増幅なし	低増幅
SUM225CWN	ルミナル	ERBB2AMP	Ham's F12+5% FBS+IH ^a	73	低増幅	低増幅	低増幅	高増幅	低増幅
SUM44PE	ルミナル	ルミナル	無血清 Ham's F12+IH ^a	85	ND	ND	ND	ND	ND
SUM52PE	ルミナル	ルミナル	Ham's F12+5% FBS+IH ^a	53	低増幅	低増幅	低増幅	増幅なし	増幅なし
T47D	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	56	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
UACC812	ルミナル	ERBB2AMP	DMEM+10% FBS	99	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
UACC893	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	153	ND	ND	ND	ND	ND
ZR751	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	68	増幅なし	低増幅	高増幅	増幅なし	低増幅
ZR7530	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	336	ND	ND	ND	ND	ND
ZR75B	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	63	増幅なし	低増幅	高増幅	増幅なし	低増幅

a Clonetics MEBM(重炭酸塩不含有)+インスリン(5ug/ml)+トランスフェリン(5ug/ml)+ヒドロコルチゾン(0.5ug/ml)+EGF(5ng/ml)+インプロテノール10e-5M+ウシ下垂体抽出物70ug/ml)+重炭酸ナトリウム(1.176mg/ml)

b DMEM/F12+5%ウマ血清+インスリン(10ug/ml)+ヒドロコルチゾン(500ng/ml)+EGF(20ng/ml)+コラ毒素(100ng/ml)

c Ham's F12+5% FBS+インスリン(5ug/ml)+ヒドロコルチゾン(1ug/ml)+HEPES(10mM)

d Ham's F12+5% FBS+インスリン(5ug/ml)+HEPES(10mM)+EGF(10ng/ml)

e Ham's F12+インスリン(5ug/ml)+HEPES(10mM)+ヒドロコルチゾン(1ug/ml)+エタノールアルアミン(5mM)+トランスフェリン(5ug/ml)+T3(10nM)+亜セレン酸ナトリウム(50nM)+BSA(0.5g/L)

f Ham's F12+インスリン(5ug/ml)+HEPES(10mM)+ヒドロコルチゾン(1ug/ml)+エタノールアルアミン(5mM)+トランスフェリン(5ug/ml)+T3(10nM)+亜セレン酸ナトリウム(50nM)+BSA(0.5g/L)+EGF(10ng/ml)

g DMEM/F12+インスリン(250ng/ml)+ヒドロコルチゾン(1.4nM)+トランスフェリン(10ng/ml)+亜セレン酸ナトリウム(2.6ng/ml)+エストロジオール(100nM)+プロラクチン(5ug/ml)+EGF(10ng/ml)

ND 未実行

na 該当なし

ERBB2ステータスを割り当てるデータはなかったが、文献からは、UACC893及びZR7530が増幅されたERBB2であることが示唆される(PMID:1674877,688225)。

10

20

30

40

【表 2 0】

細胞株	CDKN2A (9p21.3) GISTIC 欠失	PTEN (10q23.31) GISTIC 欠失	同質遺伝子 細胞株ペア
MDAMB361	低欠失	欠失なし	na
MDAMB415	欠失なし	低欠失	na
MDAMB436	低欠失	低欠失	na
MDAMB453	低欠失	欠失なし	na
MDAMB468	欠失なし	欠失なし	na
SKBR3	低欠失	低欠失	na
SUM102PT	高欠失	欠失なし	na
SUM1315MO2	高欠失	欠失なし	na
SUM149PT	ND	ND	na
SUM159PT	低欠失	欠失なし	na
SUM185PE	低欠失	欠失なし	na
SUM225CWN	低欠失	低欠失	na
SUM44PE	ND	ND	na
SUM52PE	低欠失	低欠失	na
T47D	低欠失	低欠失	na
UACC812	低欠失	低欠失	na
UACC893	ND	ND	na
ZR751	欠失なし	欠失なし	na
ZR7530	ND	ND	na
ZR75B	欠失なし	欠失なし	ZR751

a
b
c
d
e
f
g
ND
na

【 0 2 6 0】

【表 2 1】

【 0 2 6 1 】

細胞株	転写サブタイプ	転写サブタイプ+ ERBB2ステータス	培養培地	倍加時間 (時間)	PIK3CA (3q26.32) GISTIC	MYC (8q24.21) GISTIC	CCND1 (12q13.2) GISTIC	ERBB2 (17q12) GISTIC	AURKA (20q13.2) GISTIC
MDAMB361	ルミナル	ERBB2AMP	DMEM+10% FBS	74	増幅なし	低増幅	高増幅	高増幅	高増幅
MDAMB415	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	85	低増幅	低増幅	高増幅	増幅なし	低増幅
MDAMB436	クローデイン低	クローデイン低	DMEM+10% FBS	63	低増幅	低増幅	増幅なし	増幅なし	低増幅
MDAMB453	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	60	低増幅	低増幅	高増幅	低増幅	低増幅
MDAMB468	基底細胞	基底細胞	DMEM+10% FBS	52	増幅なし	低増幅	低増幅	増幅なし	低増幅
SKBR3	ルミナル	ERBB2AMP	McCoy's+10%FBS	56	低増幅	高増幅	増幅なし	高増幅	高増幅
SUM102PT	基底細胞	基底細胞	無血清 Ham's F12+IHE ^a	115	増幅なし	低増幅	増幅なし	増幅なし	増幅なし
SUM1315MO2	クローデイン低	クローデイン低	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	113	増幅なし	低増幅	増幅なし	増幅なし	増幅なし
SUM149PT	基底細胞	基底細胞	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	34	ND	ND	ND	ND	ND
SUM159PT	クローデイン低	クローデイン低	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	22	増幅なし	高増幅	増幅なし	増幅なし	増幅なし
SUM185PE	ルミナル	ルミナル	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	93	増幅なし	低増幅	増幅なし	増幅なし	低増幅
SUM225CWN	ルミナル	ERBB2AMP	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	73	増幅なし	低増幅	低増幅	高増幅	低増幅
SUM44PE	ルミナル	ルミナル	無血清 Ham's F12+IHE ^a	85	ND	ND	ND	ND	ND
SUM52PE	ルミナル	ルミナル	Ham's F12+5% FBS+IHE ^a	53	低増幅	低増幅	低増幅	増幅なし	増幅なし
T47D	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	56	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
UACC812	ルミナル	ERBB2AMP	DMEM+10% FBS	99	増幅なし	低増幅	低増幅	低増幅	低増幅
UACC893	ルミナル	ルミナル	DMEM+10% FBS	153	増幅なし	ND	ND	ND	ND
ZR751	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	68	増幅なし	低増幅	高増幅	増幅なし	低増幅
ZR7530	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	336	ND	ND	ND	ND	ND
ZR75B	ルミナル	ルミナル	RPMI1640+10%FBS	63	増幅なし	低増幅	高増幅	増幅なし	低増幅

a Clonetics MEBM(重炭酸塩不含)+インスリン(5ug/ml)+トランスフェリン(5ug/ml)+ヒドロコルチゾン(0.5ug/ml)+EGF(5 ng/ml)+インプロテノール10e-5M+ウシ下垂体抽出物 70ug/ml)+重炭酸ナトリウム(1.176bmgl/ml)
b DMEM/F12+5%ウマ血清+インスリン(10ug/ml)+ヒドロコルチゾン(500ng/ml)+EGF(20ng/ml)+コラ毒素(100ng/ml)
c Ham's F12+5%FBS+インスリン(5ug/ml)+ヒドロコルチゾン(1ug/ml)+HEPES(10mM)
d Ham's F12+5%FBS+インスリン(5ug/ml)+HEPES(10mM)+EGF(10ng/ml)
e Ham's F12+インスリン(5ug/ml)+HEPES(10mM)+ヒドロコルチゾン(1ug/ml)+エタノールアルミン(5mM)+トランスフェリン(5ug/ml)+T3(10 nM)+亜セレン酸ナトリウム(50nM)+BSA(0.5g/L)
f Ham's F12+インスリン(5ug/ml)+HEPES(10mM)+ヒドロコルチゾン(1ug/ml)+エタノールアルミン(5mM)+トランスフェリン(5ug/ml)+T3(10nM)+亜セレン酸ナトリウム(50nM)+BSA(0.5g/L)+EGF(10ng/ml)
g DMEM/F12+インスリン(250ng/ml)+ヒドロコルチゾン(1.4nM)+トランスフェリン(10ng/ml)+亜セレン酸ナトリウム(2.6ng/ml)+エストラジオール(100nM)+プロラクチン(5ug/ml)+EGF(10ng/ml)
ND 未実行
na 該当なし

ERBB2ステータスを割り当てるデータはなかったが、文献からは、UACC893及びZR7530が増幅されたERBB2であることが示唆される(PMID: 1674877, 688225)。

10

20

30

40

【表 2 2】

細胞株	CDKN2A (9p21.3) GISTIC 欠失	PTEN (10q23.31) GISTIC 欠失	同質遺伝子 細胞株ペア
MDAMB361	低欠失	欠失なし	na
MDAMB415	欠失なし	低欠失	na
MDAMB436	低欠失	低欠失	na
MDAMB453	低欠失	欠失なし	na
MDAMB468	欠失なし	欠失なし	na
SKBR3	低欠失	低欠失	na
SUM102PT	高欠失	欠失なし	na
SUM1315MO2	高欠失	欠失なし	na
SUM149PT	ND	ND	na
SUM159PT	低欠失	欠失なし	na
SUM185PE	低欠失	欠失なし	na
SUM225CWN	低欠失	低欠失	na
SUM44PE	ND	ND	na
SUM52PE	低欠失	低欠失	na
T47D	低欠失	欠失なし	na
UACC812	低欠失	欠失なし	na
UACC893	ND	ND	na
ZR751	欠失なし	欠失なし	na
ZR7530	ND	ND	na
ZR75B	欠失なし	欠失なし	ZR751

a
b
c
d
e
f
g
ND
na

【 0 2 6 2 】

【表 2 3】

表8. 治療化合物及びその細胞株毎のGI50値											
化合物	17-AAG	5-FdUR	5-FU	AG1024	AG1478	Sigma AKT1-2 阻害薬	トリシリピン	AS-252424	AZD6244	BEZ235	BIBW 2992
標的	Hsp90	DNA	ピリミジン類似体、 チミジル酸合成	IGF1R	EGFR	Akt 1/2	AKT, ZNF217 増幅	PI3K γ	MEK	PI3K	EGFR及び HER2 阻害薬
600MPE	6.87	4.11	NA	NA	3.99	NA	5.43	NA	NA	NA	NA
AU565	7.25	5.18	4.97	4.48	4.57	5.61	6.80	4.87	NA	6.59	NA
BT20	NA	NA	3.49	4.48	NA	5.00	5.26	4.65	4.30	5.42	5.56
BT474	7.69	3.17	3.29	4.48	6.17	6.08	6.40	5.36	4.30	6.46	8.23
BT483	6.65	4.48	4.13	4.48	5.64	6.08	6.91	5.37	4.30	4.95	5.78
BT549	7.47	3.74	NA	4.48	4.41	NA	4.23	NA	NA	NA	NA
CAMA1	6.57	3.51	3.92	4.48	4.46	5.59	5.16	4.18	4.30	4.78	5.65
HCC1143	6.86	3.69	4.02	4.58	3.78	4.87	4.94	NA	NA	NA	5.86
HCC1187	5.29	3.18	3.81	4.48	3.78	5.47	5.96	5.78	NA	4.48	NA
HCC1395	6.54	3.13	3.60	4.48	4.57	NA	5.36	NA	4.54	NA	NA
HCC1419	7.35	3.77	2.73	4.70	5.92	6.03	5.87	4.69	4.75	NA	8.53
HCC1428	7.70	4.99	3.91	5.05	3.78	5.35	6.38	5.31	4.30	4.77	5.76
HCC1500	6.91	4.23	4.21	4.58	4.58	4.89	6.18	5.24	4.30	NA	6.47
HCC1806	7.04	4.59	4.02	4.48	4.07	5.05	5.89	5.15	4.30	NA	6.27
HCC1937	6.87	3.64	3.37	4.48	4.88	5.00	4.39	4.18	4.30	NA	5.68
HCC1954	7.49	4.78	3.99	4.50	5.64	5.08	4.43	5.46	5.84	7.28	6.91
HCC202	8.39	4.41	NA	4.92	5.75	NA	7.22	NA	NA	NA	NA
HCC2185	6.93	3.42	3.12	5.11	4.33	5.75	6.69	4.46	4.30	6.58	5.86
HCC3153	6.81	3.45	3.24	5.11	NA	4.99	5.49	4.48	NA	6.19	NA
HCC38	7.23	3.72	4.00	4.48	4.03	4.98	5.44	NA	4.30	6.31	5.74
HCC70	6.62	4.05	3.67	5.21	3.94	5.74	6.23	4.67	NA	6.80	6.33
LY2	6.97	4.41	5.01	4.48	3.78	5.77	6.63	4.51	NA	NA	NA
MCF7	6.25	4.39	NA	4.48	NA	5.78	6.01	4.80	4.30	6.23	NA
MDAMB134V1	7.46	2.01	3.15	4.69	4.00	5.02	5.54	4.30	5.93	6.00	5.44
MDAMB157	NA	3.11	NA	4.48	4.47	NA	5.14	NA	NA	NA	NA
MDAMB175V1	7.54	3.95	4.69	4.82	6.19	5.51	4.08	4.61	5.59	5.94	8.35
MDAMB231	6.11	3.75	3.10	NA	NA	NA	4.17	NA	4.30	NA	NA
MDAMB361	7.24	3.84	NA	4.69	4.71	6.05	3.78	4.71	4.30	6.09	NA
MDAMB415	7.30	NA	NA	4.48	3.78	4.95	6.44	NA	4.30	6.58	NA
MDAMB436	5.96	2.97	NA	4.48	3.99	4.47	5.62	4.74	4.30	NA	5.43

【表 2 4】

表8 化合物	ボルテゾミブ	カルボプラチン	CGC- 11047	CGC- 11144	シスプラチン	CPT-11	ドセタキセル	ドキシルビシン	エピルビシン	エルロチニブ
標的	プロテアソーム、NFκB	DNA架橋剤	ポリアミン類似体	ポリアミン類似体	DNA架橋剤	トポインメラゼI	微小管	トポインメラゼII	トポインメラゼII	EGFR
600MPE	6.37	3.82	3.33	6.49	4.33	4.68	7.01	6.57	6.46	4.28
AU565	8.28	4.94	3.54	6.31	5.73	5.91	8.28	7.03	6.84	4.88
BT20	7.33	NA	NA	6.52	NA	NA	NA	NA	NA	5.70
BT474	8.13	3.98	3.57	6.02	4.48	4.11	8.20	6.51	5.17	4.98
BT483	7.71	5.82	3.23	6.25	3.59	5.33	7.63	6.82	6.78	4.18
BT549	8.22	4.58	4.53	6.65	5.42	NA	NA	NA	6.69	4.38
CAMA1	7.78	3.72	2.90	6.40	4.39	4.84	8.25	6.58	NA	4.18
HCC1143	8.07	3.85	3.95	6.88	5.04	4.88	7.96	6.28	6.54	4.24
HCC1187	8.47	4.66	2.81	6.02	5.56	4.57	8.60	6.88	6.00	5.12
HCC1395	8.14	5.00	4.06	6.20	5.92	6.00	8.25	6.60	6.35	4.40
HCC1419	8.36	4.15	4.85	6.30	5.06	4.58	7.78	6.29	6.15	4.97
HCC1428	7.04	3.86	3.69	6.33	4.40	4.62	5.30	5.92	5.87	4.75
HCC1500	7.91	4.69	4.20	6.65	5.38	5.85	8.56	6.70	6.61	5.19
HCC1806	7.64	4.80	4.13	6.71	5.68	5.81	8.59	6.79	6.78	5.37
HCC1937	8.12	4.44	5.16	6.76	5.48	NA	NA	NA	6.69	4.41
HCC1954	8.00	4.37	6.16	6.56	5.27	4.72	8.78	6.73	6.70	5.51
HCC202	8.14	4.44	4.84	6.26	5.74	4.75	8.43	6.28	6.22	4.43
HCC2185	8.35	4.69	3.39	6.60	5.65	5.03	8.52	7.16	6.90	4.63
HCC3153	7.98	4.45	5.24	6.72	5.12	4.73	8.01	6.45	6.19	4.50
HCC38	7.96	4.76	4.93	6.81	5.78	6.14	8.69	7.14	7.03	4.18
HCC70	8.75	4.82	5.68	6.55	5.83	4.37	8.29	5.64	6.38	5.76
LY2	6.22	4.39	2.82	5.18	5.00	4.88	8.37	6.71	6.67	4.48
MCF7	7.72	3.77	4.07	6.33	4.79	4.68	7.91	6.30	6.45	4.18
MDAMB134V1	8.08	3.73	2.97	6.38	3.87	4.96	7.63	5.92	5.98	4.18
MDAMB157	8.16	4.07	2.99	6.96	4.59	4.80	NA	6.40	6.26	4.30
MDAMB175V1	8.28	4.44	3.21	6.75	5.36	4.21	7.80	6.15	7.00	5.51
MDAMB231	7.56	4.09	2.60	4.66	4.65	5.06	8.55	6.67	6.57	4.40
MDAMB361	5.22	4.34	3.15	5.78	5.01	4.99	8.25	6.63	6.65	4.19
MDAMB415	7.49	3.73	4.12	6.78	3.57	4.94	8.54	6.43	6.58	NA
MDAMB436	8.06	4.18	3.42	6.06	4.98	4.98	7.77	6.23	6.15	4.26

【表 2 5】

表8															
化合物	エトポシド	ファスカブリ シン	ゲルダナマイシ ン	ゲムシタピン	Glycyl-H- 1152	GSK92329 5	ラパチニブ	GSK1070916 B	GSK1120212 B						
標的	トポイソメラー ゼII	CDK	Hsp90	ピリミジン 代謝拮抗薬 (animetabolite)	Rhoキナーゼ	CENPE	ERBB2, EGFR	オーロラキ ナーゼB 及びC	MEK						
600MPE	5.01	6.54	7.41	7.64	NA	4.48	4.78	5.10	8.17						
AU565	6.17	6.92	7.29	7.81	5.14	7.62	6.40	5.52	4.82						
BT20	5.48	6.51	NA	NA	5.15	NA	4.78	NA	NA						
BT474	4.72	6.72	7.84	3.98	4.18	5.42	6.40	5.19	4.78						
BT483	5.37	7.18	6.84	8.05	4.35	6.44	4.78	5.35	4.78						
BT549	5.86	6.29	8.26	8.17	NA	NA	4.78	NA	5.17						
CAMA1	5.30	6.61	7.10	6.57	5.09	7.33	4.78	5.05	4.78						
HCC1143	5.29	6.56	7.09	7.89	4.80	6.77	4.78	5.51	NA						
HCC1187	6.16	7.81	7.80	6.31	6.08	7.52	4.78	7.95	4.78						
HCC1395	5.51	6.49	7.21	6.09	NA	7.33	4.78	6.24	6.71						
HCC1419	4.15	6.58	7.49	3.98	4.77	5.72	6.57	5.18	7.23						
HCC1428	4.46	7.43	7.50	4.52	4.30	5.21	4.78	5.19	4.78						
HCC1500	5.85	6.65	6.81	8.48	4.18	7.28	4.78	5.19	4.78						
HCC1806	5.51	6.59	7.12	8.72	NA	7.34	4.78	5.16	5.08						
HCC1937	5.34	6.41	7.53	6.04	4.18	7.20	4.78	5.42	4.78						
HCC1954	6.00	6.57	8.14	3.84	4.48	7.62	5.56	5.56	6.53						
HCC202	6.03	7.37	8.83	4.77	NA	7.77	6.12	6.03	10.23						
HCC2185	5.11	6.90	7.74	7.50	5.54	7.43	5.42	6.34	4.78						
HCC3153	5.53	6.46	7.17	7.19	4.48	7.22	4.78	4.95	4.78						
HCC38	6.53	6.56	7.54	8.15	5.99	7.32	4.78	6.44	4.78						
HCC70	4.89	6.90	7.03	4.13	6.09	7.68	4.96	6.59	8.18						
LY2	NA	8.10	7.00	7.42	NA	NA	NA	NA	4.78						
MCF7	4.95	6.72	6.62	4.14	4.67	5.90	4.78	5.06	4.78						
MDAMB134V1	5.61	6.65	7.68	NA	5.93	5.50	NA	5.57	7.72						
MDAMB157	6.02	6.77	NA	NA	NA	7.50	4.78	5.95	4.78						
MDAMB175V1	4.14	6.72	7.75	8.12	4.48	6.76	6.03	5.07	7.94						
MDAMB231	5.69	6.60	7.54	8.02	4.64	7.34	4.78	5.78	6.86						
MDAMB361	4.85	7.09	7.59	8.20	4.48	7.42	5.05	5.19	4.78						
MDAMB415	4.86	7.22	7.24	5.56	4.48	7.28	NA	5.76	6.13						
MDAMB436	6.00	6.38	6.83	7.39	4.36	7.59	4.78	7.01	4.81						

【表 2 6】

化合物	TGX-221		GSK1838705		GSK461364A		GSK2119563		GSK2126458		GSK1487371		GSK1059615		イバンドロン酸 ナトリウム塩
	PI3K, β 選択的	IGF1R	PLK	PI3K, β -(α 選択的)	PI3K, 汎用	PI3K, γ 選択的	PI3K	PI3K, γ 選択的	PI3K	PI3K	PI3K	PI3K	PI3K	PI3K	
600MPE	5.09	6.49	5.16	6.23	8.22	NA	6.31	NA	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31	6.31	NA
AU565	5.18	5.63	8.35	6.25	8.10	5.89	6.32	5.89	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32	3.74
BT20	4.77	4.63	NA	5.97	7.80	4.18	NA	4.18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.69
BT474	5.10	5.08	5.07	6.82	8.36	NA	6.80	NA	6.80	6.80	6.80	6.80	6.80	6.80	3.98
BT483	5.37	5.52	5.35	7.47	8.94	5.57	NA	5.57	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.24
BT549	4.62	5.21	NA	5.38	7.32	5.45	5.73	5.45	5.73	5.73	5.73	5.73	5.73	5.73	NA
CAMA1	5.10	5.05	5.17	4.61	6.97	5.59	5.77	5.59	5.77	5.77	5.77	5.77	5.77	5.77	3.79
HCC1143	4.48	5.55	7.13	5.48	7.43	NA	6.26	NA	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	4.36
HCC1187	5.48	5.61	7.48	6.18	8.30	5.81	6.48	5.81	6.48	6.48	6.48	6.48	6.48	6.48	3.77
HCC1395	5.13	5.28	8.31	5.05	7.31	NA	5.61	NA	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	5.13
HCC1419	5.16	5.21	5.12	7.41	8.75	NA	6.59	NA	6.59	6.59	6.59	6.59	6.59	6.59	5.12
HCC1428	4.77	5.79	5.26	6.00	7.48	5.75	6.28	5.75	6.28	6.28	6.28	6.28	6.28	6.28	3.89
HCC1500	4.18	5.02	7.89	5.09	7.11	6.11	5.71	6.11	5.71	5.71	5.71	5.71	5.71	5.71	4.42
HCC1806	4.48	4.27	7.95	5.79	7.54	5.32	5.82	5.32	5.82	5.82	5.82	5.82	5.82	5.82	4.48
HCC1937	4.51	4.71	7.51	5.50	7.57	NA	6.09	NA	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	4.39
HCC1954	4.79	5.08	8.16	5.98	7.97	6.25	6.63	6.25	6.63	6.63	6.63	6.63	6.63	6.63	4.26
HCC202	5.20	5.11	4.48	7.75	9.03	6.47	7.23	6.47	7.23	7.23	7.23	7.23	7.23	7.23	NA
HCC2185	NA	5.54	8.26	NA	NA	6.12	6.89	6.12	6.89	6.89	6.89	6.89	6.89	6.89	4.82
HCC3153	4.38	5.26	7.50	4.46	7.36	5.60	5.48	5.60	5.48	5.48	5.48	5.48	5.48	5.48	4.10
HCC38	5.11	5.00	7.42	6.03	7.62	5.85	6.11	5.85	6.11	6.11	6.11	6.11	6.11	6.11	4.24
HCC70	5.98	5.18	7.01	6.14	8.13	5.72	6.75	5.72	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75	4.16
LY2	4.78	6.26	NA	6.34	7.93	4.46	5.82	4.46	5.82	5.82	5.82	5.82	5.82	5.82	NA
MCF7	NA	5.89	7.82	6.03	8.14	4.85	5.53	4.85	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	NA
MDAMB134V1	4.78	5.06	7.83	6.33	7.95	6.01	6.25	6.01	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	4.16
MDAMB157	4.30	5.05	8.98	4.49	6.49	5.33	NA	5.33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MDAMB175V1	4.18	5.30	5.21	5.88	8.29	4.18	6.18	4.18	6.18	6.18	6.18	6.18	6.18	6.18	4.47
MDAMB231	4.61	5.28	7.68	4.92	5.57	5.90	5.21	5.90	5.21	5.21	5.21	5.21	5.21	5.21	4.13
MDAMB361	4.75	5.04	8.72	5.58	7.46	5.38	5.84	5.38	5.84	5.84	5.84	5.84	5.84	5.84	NA
MDAMB415	NA	5.37	7.08	NA	NA	5.05	NA	5.05	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.31
MDAMB436	4.72	5.00	7.90	5.48	6.75	NA	5.88	NA	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88	NA

【 0 2 6 6】

10

20

30

40

【表 27】

表8 化合物	ICRF-193	ゲフィチニブ	イクサベピン	LBH589	レスタウルチニブ	MLN4924	NSC 663284	ヌトリン3a	NU6102
標的	PLK1, トポII	EGFR	微小管	HDAC, 汎阻害薬	FLT-3, TrkA	DHFR	cdc25s	CDK1/CCN B	MDM2
600MPE	NA	5.14	5.28	6.73	5.77	3.78	5.34	4.32	NA
AU565	6.14	5.97	8.37	6.98	6.07	3.78	5.81	4.79	4.64
BT20	4.38	NA	8.09	6.41	5.49	3.48	5.48	4.47	4.23
BT474	4.30	6.14	8.08	7.46	6.61	3.48	5.56	4.39	4.56
BT483	NA	5.21	5.27	7.14	6.13	NA	6.02	5.19	4.18
BT549	NA	4.82	8.22	NA	NA	3.48	NA	4.35	NA
CAMA1	4.30	4.57	9.00	7.21	5.65	7.10	5.58	4.30	4.91
HCC1143	4.30	4.93	8.01	7.08	6.48	7.62	5.70	4.67	4.87
HCC1187	6.05	4.52	8.66	6.76	6.08	3.78	5.68	4.68	5.11
HCC1395	NA	5.15	7.92	NA	NA	3.48	6.16	4.65	5.24
HCC1419	NA	5.56	4.96	7.23	5.94	3.78	5.72	4.39	4.54
HCC1428	4.38	4.97	7.23	6.87	6.27	3.48	5.59	4.50	4.87
HCC1500	4.66	5.09	8.49	6.79	6.80	7.51	5.42	4.57	4.78
HCC1806	4.30	5.33	8.31	6.82	6.79	3.78	NA	4.29	4.64
HCC1937	4.30	5.08	6.51	6.72	6.21	3.48	6.07	4.63	4.27
HCC1954	4.82	5.69	8.71	6.43	5.31	7.81	5.22	4.76	4.34
HCC202	NA	6.34	4.70	NA	NA	7.69	NA	5.02	NA
HCC2185	5.69	5.03	5.04	7.16	5.49	3.48	5.96	4.81	4.85
HCC3153	4.48	4.48	8.21	6.53	5.11	NA	5.73	4.44	4.81
HCC38	6.54	4.55	8.55	7.45	7.21	3.48	5.64	4.66	5.03
HCC70	4.48	4.76	8.85	7.11	6.74	NA	5.51	4.73	4.69
LY2	4.48	4.56	8.22	NA	NA	7.47	6.27	5.35	4.32
MCF7	4.48	4.57	9.44	7.10	5.85	7.24	5.43	5.24	4.39
MDAMB134V	4.39	4.52	8.79	7.18	6.44	3.48	5.24	4.76	4.34
MDAMB157	NA	4.82	8.31	NA	NA	3.78	NA	4.45	NA
MDAMB175V	4.48	6.68	NA	6.41	6.09	NA	5.22	5.08	4.26
MDAMB231	NA	4.48	9.34	NA	NA	3.48	NA	4.18	NA
MDAMB361	4.48	5.19	8.64	7.30	6.28	6.80	5.14	4.23	4.77
MDAMB415	4.48	5.13	8.09	7.40	NA	3.48	5.59	4.59	4.46
MDAMB436	4.30	4.48	8.24	6.60	5.86	7.70	NA	4.30	4.28

【表 28】

表8 化合物	オキサリプ ラチン	オキサムフ ラチン	パクリタキセ ル	PD173074	PD 98059	ペメトレキセド	プルバノ ルA	L-779450	ラパマイシ ン	ポリノスタット
標的	DNA架橋剤	HDAC	微小管	FGFR3	MEK	DNA合成/ 修復	CDK1	B-raf	mTOR	ヒストンデア セチラーゼ
600MPE	4.89	NA	7.18	5.01	4.30	NA	4.52	NA	NA	4.15
AU565	5.55	6.19	8.09	5.13	5.12	2.53	5.01	4.48	7.50	4.08
BT20	NA	5.42	NA	4.80	4.04	NA	4.56	4.44	7.87	3.72
BT474	4.73	6.57	7.99	4.48	4.00	2.53	3.78	4.73	7.82	4.26
BT483	4.56	6.15	7.46	NA	4.12	2.53	4.40	4.84	8.78	4.23
BT549	5.72	NA	NA	5.13	NA	2.53	3.78	NA	4.48	3.83
CAMA1	5.02	6.27	7.95	NA	4.65	2.83	3.86	4.44	7.82	4.18
HCC1143	4.69	6.28	7.77	4.87	4.00	2.53	3.78	4.39	NA	3.90
HCC1187	5.85	6.19	8.05	4.97	5.56	2.53	4.74	5.07	7.49	4.79
HCC1395	4.97	5.64	7.80	6.21	4.00	NA	3.78	4.54	NA	3.51
HCC1419	4.73	5.88	6.16	5.35	4.20	2.53	3.78	4.78	8.36	3.88
HCC1428	5.12	6.33	4.78	5.17	4.12	2.53	4.44	4.80	7.29	4.42
HCC1500	5.47	5.98	8.10	4.61	NA	6.30	3.95	4.48	4.03	3.78
HCC1806	5.59	6.16	8.06	5.30	4.30	2.83	4.00	NA	4.18	3.89
HCC1937	5.29	5.84	NA	5.12	4.50	3.81	4.97	4.84	5.91	3.75
HCC1954	5.59	5.81	8.15	5.12	4.30	6.67	4.43	4.48	8.45	3.95
HCC202	5.23	NA	8.10	5.07	NA	7.68	3.99	NA	8.30	4.76
HCC2185	5.52	6.46	8.14	4.53	4.55	2.53	4.57	4.42	8.79	4.28
HCC3153	5.19	5.82	7.70	4.81	NA	2.53	3.83	4.48	5.25	3.81
HCC38	5.43	6.77	8.13	5.53	NA	2.53	NA	4.77	7.47	4.63
HCC70	5.38	6.35	8.09	5.15	4.30	2.53	3.78	4.50	6.92	4.46
LY2	5.19	5.88	7.98	5.13	NA	6.33	NA	NA	NA	3.85
MCF7	5.27	5.74	7.79	NA	NA	2.53	4.80	4.48	6.84	4.19
MDAMB134V1	NA	6.18	8.00	4.73	4.12	2.53	4.26	4.60	8.17	4.40
MDAMB157	4.54	NA	NA	5.63	NA	2.53	3.78	NA	3.78	4.01
MDAMB175V1	5.44	5.41	7.71	NA	4.24	NA	4.46	5.05	8.43	4.26
MDAMB231	4.72	NA	8.28	5.17	NA	NA	3.78	4.49	5.45	4.11
MDAMB361	5.46	6.15	7.88	4.82	4.30	6.31	3.78	5.04	6.13	4.26
MDAMB415	4.51	6.14	8.28	NA	NA	NA	NA	NA	8.68	4.18
MDAMB436	4.18	5.28	7.37	5.19	NA	2.53	3.78	5.66	3.78	3.74

【表 2 9】

表8 化合物	SB-3CT	イスピネ シブ	ボスチニ ブ	ソラフェニ ブ	リンゴ酸ス ニチニブ	タモキシフェ ン	TCS JNK 5a	TCS 2312 ジヒドロクロリド	テムシロリム ス	TPCA-1
	MMP2, MMP9	キネシン	Src	VEGFR	VEGFR	ESR1	JNK	chk1	mTOR	IKK2 (IkB キナーゼ2)
600MPE	NA	7.68	5.05	4.34	5.37	4.32	NA	6.22	4.74	4.18
AU565	4.00	7.65	5.67	3.75	5.42	4.54	NA	6.56	7.00	4.18
BT20	4.42	7.77	5.86	4.20	4.78	NA	5.97	5.70	6.11	4.36
BT474	4.99	7.29	6.14	4.00	4.77	5.62	4.17	6.21	7.87	4.18
BT483	4.59	10.31	5.45	4.93	4.73	4.62	5.94	6.18	4.18	NA
BT549	NA	7.33	NA	3.92	5.29	3.78	NA	NA	NA	4.18
CAMA1	4.00	7.50	5.49	4.02	5.06	4.46	5.48	6.25	7.36	NA
HCC1143	4.00	7.29	5.31	4.23	5.16	4.79	4.21	6.47	5.80	5.07
HCC1187	4.83	7.57	5.50	4.49	5.30	NA	6.08	6.01	6.10	5.67
HCC1395	3.78	7.56	NA	4.32	5.33	4.84	6.21	7.21	4.90	5.22
HCC1419	3.78	5.17	6.12	3.38	4.75	4.48	NA	5.97	7.28	5.53
HCC1428	4.18	5.35	5.41	4.34	5.29	5.49	4.61	6.11	5.21	5.45
HCC1500	3.78	7.47	5.59	3.75	5.19	3.98	5.31	6.02	4.61	5.39
HCC1806	4.00	7.54	5.68	3.83	5.27	4.88	3.92	6.14	4.69	5.34
HCC1937	4.00	6.55	5.84	3.29	5.16	3.78	3.88	6.52	6.36	4.18
HCC1954	4.00	7.51	5.93	4.26	5.25	4.01	5.90	5.49	6.66	4.77
HCC202	NA	8.12	NA	4.14	5.03	4.53	NA	NA	NA	3.88
HCC2185	4.21	7.53	5.30	4.83	4.69	4.85	4.66	5.82	7.88	5.36
HCC3153	4.00	7.55	5.42	3.92	4.96	3.78	5.59	6.38	4.70	4.87
HCC38	4.62	7.33	6.05	4.06	5.24	4.28	5.32	6.99	6.41	5.50
HCC70	3.88	7.34	6.05	4.45	5.60	3.78	5.64	6.52	6.39	5.44
LY2	NA	7.64	5.61	NA	5.19	4.25	NA	6.65	6.68	4.54
MCF7	4.00	7.42	5.59	4.19	5.23	3.99	NA	6.00	5.81	NA
MDAMB134V	4.00	7.36	4.00	4.54	4.97	4.08	4.78	5.81	6.78	4.79
MDAMB157	NA	7.50	NA	3.62	5.20	3.78	NA	NA	NA	4.34
MDAMB175V	4.00	5.77	5.97	4.09	5.26	4.84	5.02	5.77	5.64	NA
MDAMB231	3.78	7.50	NA	4.05	5.44	3.78	NA	NA	NA	4.45
MDAMB361	4.00	7.47	5.82	4.22	4.93	3.78	NA	6.34	6.60	4.18
MDAMB415	4.00	7.12	NA	4.02	5.25	4.47	NA	6.59	7.12	NA
MDAMB436	3.78	7.41	5.30	4.29	4.95	4.51	3.77	6.53	4.27	5.16

【表 3 0】

表8 化合物		トポテカン	トリコスタチン A	ビノレルビン	VX-680	XRP44X	ZM 447439
標的		トポイソメラー ゼ]	ヒストンデア セチラーゼ	微小管	オーロラキ ナーゼ	Ras-Net (Eik- 3)	AURKA
600MPE	NA	NA	5.18	5.29	NA	NA	NA
AU565	7.73	7.73	5.43	8.06	5.66	6.35	5.82
BT20	NA	NA	4.81	NA	4.72	5.29	5.29
BT474	5.60	5.60	5.00	7.32	4.54	5.34	4.20
BT483	7.79	7.79	5.00	8.14	5.44	4.18	4.57
BT549	NA	NA	5.13	8.02	NA	NA	NA
CAMA1	6.40	6.40	5.57	7.88	4.58	6.27	5.40
HCC1143	6.59	6.59	4.77	6.58	5.98	NA	4.98
HCC1187	6.51	6.51	5.32	7.57	6.93	6.23	6.19
HCC1395	7.82	7.82	4.50	8.45	NA	NA	NA
HCC1419	6.44	6.44	4.85	6.45	4.81	3.88	5.32
HCC1428	6.35	6.35	5.73	5.66	5.10	5.85	5.13
HCC1500	7.84	7.84	4.82	7.96	4.56	5.74	5.28
HCC1806	7.69	7.69	4.97	7.93	NA	5.92	NA
HCC1937	NA	NA	4.82	6.65	5.10	3.88	5.23
HCC1954	6.52	6.52	4.95	8.45	4.48	6.30	4.48
HCC202	6.12	6.12	6.04	7.87	NA	NA	NA
HCC2185	7.39	7.39	4.79	4.58	6.46	6.63	5.92
HCC3153	6.68	6.68	4.62	7.29	4.76	5.95	4.48
HCC38	8.43	8.43	5.22	7.94	6.94	5.85	6.24
HCC70	4.72	4.72	4.84	8.13	5.35	5.98	6.01
LY2	6.59	6.59	4.86	7.88	NA	6.08	NA
MCF7	5.88	5.88	5.16	7.78	5.08	6.40	NA
MDAMB134V	6.94	6.94	5.17	7.87	6.11	6.21	4.66
MDAMB157	6.40	6.40	4.68	7.89	NA	NA	NA
MDAMB175V	5.54	5.54	5.23	7.41	4.61	5.44	4.28
MDAMB231	5.93	5.93	5.26	8.29	NA	NA	NA
MDAMB361	6.28	6.28	5.09	8.18	5.63	6.06	5.53
MDAMB415	6.72	6.72	4.90	7.74	4.86	6.30	4.48
MDAMB436	7.52	7.52	4.67	7.57	6.19	5.47	5.33

【 0 2 7 0 】

10

20

30

【表 3 1】

表8 治療化合物及びその細胞株毎のGI50値											
化合物	17-AAG	5-FdUR	5-FU	AG1024	AG1478	Sigma AKT1-2 阻害薬	トリシリン	AS-252424	AZD6244	BEZ235	BIBW 2992
標的	Hsp90	DNA	ピリミジン類似体、 チミジル酸合成 酵素	IGF1R	EGFR	Akt 1/2	AKT, ZNF217 増幅	PI3K γ	MEK	PI3K	EGFR 及び HER2 阻害薬
MDAMB453	7.14	4.01	NA	4.51	3.78	5.73	6.34	4.69	4.30	6.88	7.04
MDAMB468	5.62	3.71	3.22	4.48	4.02	5.01	5.85	4.18	4.30	4.48	6.20
SKBR3	7.50	4.48	3.66	4.48	4.92	5.68	6.55	4.40	4.30	6.23	7.88
SUM1315MO	7.66	3.37	3.13	5.17	5.60	5.33	5.53	4.75	5.12	6.65	6.79
SUM149PT	7.00	4.14	4.11	4.48	5.74	5.03	5.64	4.66	6.28	6.57	7.13
SUM159PT	7.46	4.68	4.49	NA	4.77	5.17	4.79	NA	NA	7.44	5.59
SUM185PE	7.46	2.53	NA	5.57	3.78	5.95	6.14	5.27	4.30	4.82	5.25
SUM225CWN	NA	NA	3.71	5.03	NA	6.05	6.19	5.02	NA	NA	8.03
SUM44PE	8.84	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	7.46	4.40	3.49	5.45	3.78	5.81	5.01	4.44	5.01	4.77	5.47
T47D	NA	NA	3.48	4.68	4.74	5.78	6.19	5.25	4.30	6.55	NA
UACC812	NA	4.02	4.34	4.48	NA	5.53	NA	4.88	NA	4.78	8.55
UACC893	7.90	3.30	NA	4.75	5.65	NA	5.75	NA	NA	NA	NA
ZR751	6.56	4.51	5.27	4.52	3.78	5.94	4.32	5.20	5.21	4.78	5.63
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR75B	7.14	4.95	5.16	4.48	3.78	5.93	5.10	4.65	4.30	6.85	5.52

【表 3 2】

表8 化合物	ボルテゾミブ	カルボプラチン	CGC-11047	CGC-11144	シスプラチン	CPT-11	ドセタキセル	ドキシソルビシン	エピルビシン	エルロチニブ
標的	プロテアソーム、NFKB	DNA架橋剤	ポリアミン類似体	ポリアミン類似体	DNA架橋剤	トポイソメラーゼII	微小管	トポイソメラーゼII	トポイソメラーゼII	EGFR
MDAMB453	8.16	4.23	3.30	6.28	5.16	5.18	8.36	6.67	6.65	4.35
MDAMB468	7.85	4.31	6.05	6.17	5.27	4.49	8.54	6.13	6.16	4.67
SKBR3	8.12	4.87	2.30	5.30	4.18	5.49	8.12	6.90	NA	4.80
SUM1315MO2	7.86	4.56	3.15	5.69	5.72	5.29	8.53	6.67	7.44	5.13
SUM149PT	8.13	4.87	4.54	6.53	5.79	NA	8.76	NA	6.66	5.70
SUM159PT	8.13	4.55	3.97	6.60	5.40	4.41	8.34	6.46	6.85	4.93
SUM185PE	8.27	3.90	3.30	6.68	3.59	4.99	5.30	6.51	6.39	4.18
SUM225CWN	7.98	NA	NA	5.45	NA	NA	NA	NA	NA	5.15
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	8.28	4.71	5.45	6.79	5.74	5.86	8.74	7.01	6.53	4.50
T47D	8.08	3.95	5.03	6.96	5.27	NA	NA	NA	NA	4.30
UACC812	7.62	4.81	3.47	6.78	5.44	5.52	8.49	7.13	6.60	4.91
UACC893	9.19	3.04	2.68	6.60	4.22	4.22	7.94	6.08	6.11	4.91
ZR751	7.76	4.07	3.30	6.48	4.92	5.28	7.55	6.86	6.60	4.18
ZR7530	NA	4.55	2.30	NA	5.58	4.13	8.40	6.96	NA	NA
ZR758	6.88	3.52	3.25	NA	3.59	5.81	7.81	6.60	6.94	4.18

【表 3 3】

表8 化合物	エトポシド	ファスカブリ ン	ゲルダナマイ ン	ゲムシタピン	グリシルー 1152	GSK92329 5	ラパチニブ	GSK1070916	GSK1120212 B
標的	トポイソメラー ゼII	CDK	Hsp90	ピリミジン 代謝拮抗薬 (animetabolite)	Rhoキナーゼ	CENPE	ERBB2, EGFR	オーロラキ ナーゼB 及びC	MEK
MDAMB453	5.30	7.06	7.71	7.85	4.55	6.96	5.05	5.51	6.61
MDAMB468	5.59	7.11	7.56	7.27	5.69	7.61	4.78	7.89	4.85
SKBR3	5.92	6.65	7.79	7.97	4.33	7.34	6.29	5.29	4.78
SUM1315MO	6.54	6.38	7.42	NA	4.96	7.44	4.81	5.89	7.19
SUM149PT	5.58	6.40	8.22	7.86	4.52	7.17	NA	5.48	7.51
SUM159PT	6.11	6.37	8.20	7.99	5.76	7.43	NA	5.77	7.93
SUM185PE	5.31	7.26	7.70	6.30	NA	5.42	NA	5.94	4.78
SUM225CWN	4.99	7.17	NA	NA	NA	NA	6.16	NA	NA
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	5.59	6.74	7.92	8.15	5.04	7.64	4.78	6.84	5.06
T47D	5.97	6.34	NA	6.02	4.82	NA	4.78	NA	4.78
UACC812	NA	NA	7.91	NA	4.42	7.92	6.34	4.51	4.78
UACC893	4.26	6.73	7.96	3.84	NA	7.91	5.74	5.06	4.81
ZR751	5.68	6.45	6.93	7.43	5.45	6.92	4.78	4.94	4.78
ZR7530	NA	NA	8.15	NA	NA	7.68	NA	4.71	NA
ZR75B	6.06	6.39	7.03	7.34	4.18	7.15	4.78	5.75	4.78

【表 3 4】

表 8		GSK1838705	GSK461364A	GSK2119563	GSK2126458	GSK1487371	GSK1059615	イバンドロン酸 ナトリウム塩
化合物	TGX-221	A		A	A	A	B	
標的	PI3K, β 選択的	IGF1R	PLK	PI3K, β -(α 選択的)	PI3K, 汎用	PI3K, γ 選択的	PI3K	ファルネシルリン 酸合成酵素、 FPPS (20 nM)
MDAMB453	4.81	5.07	7.97	6.44	8.28	5.65	6.52	3.96
MDAMB468	6.27	5.29	8.41	5.81	7.47	6.29	5.96	4.03
SKBR3	5.33	5.16	7.78	6.68	8.41	5.71	6.71	4.05
SUM1315MO2	5.04	5.33	7.51	6.25	8.02	6.02	6.49	4.30
SUM149PT	4.58	5.41	7.72	5.75	7.64	5.38	6.01	3.76
SUM159PT	4.49	5.46	7.49	6.46	7.52	5.97	6.73	4.37
SUM185PE	NA	5.48	5.66	NA	NA	NA	7.13	NA
SUM225CWN	NA	4.89	NA	NA	NA	NA	NA	3.30
SUM444PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	NA	5.68	8.19	7.59	8.46	6.14	6.89	4.45
T47D	5.45	5.01	NA	7.19	8.45	4.46	6.58	4.46
UACC812	4.85	5.31	4.92	6.99	8.67	6.24	6.62	3.81
UACC893	4.18	5.20	8.15	6.49	8.22	9.44	6.89	NA
ZR751	5.64	5.17	4.57	5.50	8.07	5.58	5.87	4.16
ZR7530	NA	NA	5.21	NA	NA	NA	6.82	NA
ZR75B	6.43	5.00	7.02	5.62	8.31	NA	6.51	3.85

【表 3 5】

表8 化合物	ICRF-193	ゲフィチ ニブ	イクサベピロ ン	LBH589	レスタウルチ ニブ	メトレキサート	MLN4924	NSC 663284	ヌトリン3a	NU6102
	PLK1, トポII	EGFR	微小管	HDAC, 汎阻害薬	FLT-3, TrkA	DHFR	NAE	cdc25s	CDK1/CCN B	MDM2
標的	MDAMB453	4.45	5.13	8.11	7.31	6.18	3.48	5.66	4.32	4.91
	MDAMB468	4.97	4.60	8.88	6.63	6.39	7.49	6.69	4.44	4.85
	SKBR3	5.22	5.55	7.98	7.26	5.99	6.16	6.82	4.32	4.51
	SUM1315MO2	6.21	5.53	8.22	6.60	7.43	3.48	4.48	4.67	5.40
	SUM149PT	4.75	5.54	8.26	6.50	7.04	3.48	6.72	4.56	5.08
	SUM159PT	6.38	5.07	8.16	6.88	6.54	3.48	6.23	4.78	4.90
	SUM185PE	NA	4.68	8.07	7.11	7.20	3.48	NA	4.54	5.53
	SUM225CWN	NA	NA	4.70	NA	6.00	3.48	NA	4.69	4.30
	SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	SUM52PE	5.52	5.10	8.53	6.77	6.86	3.48	6.40	5.61	5.27
	T47D	4.48	4.80	8.10	6.82	5.25	NA	6.93	5.19	4.82
	UACC812	4.66	NA	5.23	6.89	5.98	NA	6.00	5.43	4.42
UACC893	NA	5.94	8.20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
ZR751	6.07	4.49	6.53	6.71	5.75	7.18	4.47	5.73	4.76	
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
ZR758	6.60	4.67	NA	7.08	6.34	3.48	6.84	5.26	5.69	4.85

【表 3 6】

表8 化合物	オキサリプ ラチン	オキサムフ ラチン	バクリタキセ ル	PD173074	PD 98059	ペメトレキセド	プルバノ ラ	L-779450	ラパマイン ン	ポリノスタット
標的	DNA架橋剤	HDAC	微小管	FGFR3	MEK	DNA合成/ 修復	CDK1	B-raf	mTOR	ヒストンデア セチラーゼ
MDAMB453	5.24	6.56	7.99	5.71	NA	4.47	NA	4.48	NA	4.46
MDAMB468	4.37	5.57	8.06	5.18	4.32	2.83	4.12	4.90	5.55	3.70
SKBR3	5.59	5.96	7.95	5.10	4.73	2.83	4.60	4.66	7.22	4.30
SUM1315MO	4.86	5.64	8.21	5.47	4.30	2.53	5.09	4.62	5.48	3.76
SUM149PT	5.90	6.17	8.03	5.04	4.44	NA	4.88	5.13	5.03	4.02
SUM159PT	5.60	6.50	7.82	5.19	4.30	NA	3.78	4.70	6.14	3.93
SUM185PE	4.41	6.51	7.62	NA	4.88	2.53	4.69	NA	NA	4.42
SUM225CWN	NA	6.07	NA	NA	4.42	NA	4.28	NA	7.78	3.84
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.26	NA
SUM52PE	5.43	6.22	8.31	7.64	4.92	2.53	4.79	5.13	8.52	4.72
T47D	5.47	6.06	NA	4.87	4.30	2.53	3.78	4.48	6.31	3.96
UACC812	5.86	5.71	8.04	5.15	4.27	2.53	NA	4.97	7.33	4.37
UACC893	3.81	NA	7.93	5.16	NA	NA	3.78	NA	3.78	4.49
ZR751	5.63	5.65	7.56	4.81	4.32	3.69	4.01	4.53	NA	3.78
ZR7530	3.20	NA	7.66	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR75B	5.51	6.41	8.10	NA	4.00	NA	3.78	4.51	NA	4.02

【表 3 7】

表8 化合物	SB-3CT	イスピネ シブ	ボスチニ ブ	ソラフェニ ブ	リンゴ酸ス ニチニブ	タモキシ フェン	TCS JNK 5a	TCS 2312 ジヒドロクロリドス	テムシロリム	TPCA-1
標的	MMP2, MMP9	キネシン	Src	VEGFR	VEGFR	ESR1	JNK	chk1	mTOR	IKK2 (IkB キナーゼ2)
MDAMB453	3.78	7.37	5.63	3.00	5.38	4.44	6.12	6.29	7.00	4.18
MDAMB468	4.00	7.72	5.59	3.80	5.35	NA	4.37	6.07	5.25	5.94
SKBR3	4.00	7.47	5.41	4.15	5.17	3.98	5.27	6.27	7.27	4.18
SUM1315MO2	3.95	7.39	6.06	3.73	5.13	4.00	6.31	6.48	5.95	6.09
SUM149PT	4.53	7.48	6.12	4.80	5.57	3.99	5.46	6.62	5.21	5.78
SUM159PT	4.85	7.32	5.86	4.66	5.81	3.91	NA	6.02	6.64	5.81
SUM185PE	4.76	6.96	NA	5.83	5.98	5.05	3.98	6.82	8.96	NA
SUM225CWN	4.00	6.98	NA	4.39	5.20	NA	NA	6.14	NA	NA
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	4.22	7.54	5.84	5.77	5.94	4.04	4.86	6.40	9.38	6.25
T47D	4.00	7.08	5.25	4.59	5.08	3.78	NA	5.90	5.85	3.88
UACC812	4.28	NA	5.56	NA	NA	NA	5.72	5.98	6.24	NA
UACC893	NA	7.98	NA	3.48	6.06	5.51	NA	NA	NA	5.21
ZR751	4.00	7.05	4.85	4.34	4.88	3.78	NA	6.09	4.18	4.36
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR75B	4.62	6.88	5.15	3.16	5.12	4.79	4.59	6.06	6.97	NA

【表 3 8】

表8		トポテカン	トリコスタチン A	ビノレルビン	VX-680	XRP44X	ZM 447439
化合物							
標的	トポイソメラー ゼI	ヒストンデア セチラーゼ	微小管	オーロラキ ナーゼ			AURKA
MDAMB453	7.07	5.23	8.42	5.03	6.20	4.45	
MDAMB468	7.34	4.85	7.97	6.95	5.93	6.18	
SKBR3	7.95	5.21	7.76	4.48	5.58	4.77	
SUM1315MO2	8.08	4.31	8.65	5.65	6.11	4.48	
SUM149PT	NA	5.14	7.91	5.07	5.63	4.18	
SUM159PT	6.13	5.23	7.91	6.37	6.16	NA	
SUM185PE	7.20	4.76	8.08	5.62	NA	4.50	
SUM225CWN	NA	4.85	NA	NA	NA	NA	
SUM44PE	6.43	NA	NA	NA	NA	NA	
SUM52PE	8.08	5.57	8.27	6.41	6.06	5.40	
T47D	NA	5.44	5.33	5.03	5.29	4.94	
UACC812	7.22	5.04	7.13	4.50	6.30	4.88	
UACC893	6.46	5.54	7.96	NA	NA	NA	
ZR751	7.39	4.74	7.35	5.27	5.90	5.46	
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
ZR75B	7.20	5.30	8.05	6.79	5.90	5.00	

【 0 2 7 8】

10

20

30

【表 3 9】

表9. 全ての治療化合物のサブタイプ関連性

	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル (生p値)	基底細胞＋ クローデイン低 ／ルミナル (生p値)	ERBB2AMP ／非ERBB2 AMP(生p値)	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル (FDR p値)	基底細胞＋ クローデイン低 ／ルミナル (FDR p値)	ERBB2AMP/ 非ERBB2AMP (FDR p値)
Sigma AKT1-2阻害薬	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.11
GSK2126458	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.07
ラパマイシン	0.00	0.00	0.13	0.01	0.00	0.34
GSK2119563	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.07
エトポシド	0.00	0.00	0.80	0.03	0.04	0.89
アスカプリシン	0.00	0.00	0.14	0.04	0.04	0.36
PD173074	0.00	0.24	0.35	0.04	0.48	0.60
LBH589	0.00	0.00	0.10	0.04	0.03	0.31
CGC-11047	0.01	0.02	0.68	0.05	0.09	0.84
ボリノスタット	0.01	0.00	0.40	0.05	0.02	0.63
ラパチニブ	0.01	0.00	0.00	0.05	0.02	0.00
ドセタキセル	0.01	0.00	0.78	0.05	0.03	0.88
GSK1070916	0.01	0.01	0.29	0.05	0.05	0.52
エルロチニブ	0.01	0.05	0.09	0.05	0.19	0.29
シスプラチン	0.01	0.00	0.76	0.07	0.03	0.86
トリコスタチンA	0.02	0.00	0.43	0.08	0.04	0.64
トリシリビン	0.02	0.01	0.14	0.08	0.07	0.36
テムシロリムス	0.02	0.01	0.02	0.11	0.05	0.11
GSK1059615	0.03	0.01	0.04	0.15	0.07	0.16
17-AAG	0.04	0.02	0.01	0.15	0.08	0.07
タモキシフェン	0.06	0.02	0.66	0.23	0.09	0.83
イクサペピロン	0.06	0.02	0.09	0.23	0.09	0.29
カルボプラチン	0.08	0.02	0.31	0.28	0.11	0.54
TPCA-1	0.09	0.03	0.02	0.29	0.12	0.11
GSK461364	0.09	0.03	0.57	0.29	0.13	0.77
ボスチニブ	0.14	0.05	0.12	0.35	0.19	0.32
TGX-221	0.15	0.05	0.15	0.36	0.19	0.37

10

20

30

40

【表 4 0】

表9. 全ての治療化合物のサブタイプ関連性

	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル (生p値)	基底細胞＋ クローデイン低 ／ルミナル (生p値)	ERBB2AMP ／非ERBB2 AMP(生p値)	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル (FDR p値)	基底細胞＋ クローデイン低 ／ルミナル (FDR p値)	ERBB2AMP／ 非ERBB2AMP (FDR p値)
ゲフィチニブ	0.26	0.13	0.00	0.49	0.34	0.00
BIBW 2992	0.46	0.67	0.00	0.67	0.83	0.00
AG1478	0.93	0.84	0.00	0.97	0.92	0.02
VX-680	0.09	0.31	0.01	0.29	0.54	0.08
CGC-11144	0.42	0.37	0.04	0.64	0.60	0.15
ゲルダナマイシン	0.85	0.76	0.04	0.92	0.86	0.17
NU6102	0.21	0.27	0.07	0.44	0.49	0.24
GSK1487371	0.92	0.71	0.09	0.97	0.84	0.29
イバンドロン酸ナトリウム塩	0.39	0.25	0.10	0.63	0.48	0.31
リンゴ酸スニチニブ	0.45	0.23	0.11	0.67	0.47	0.32
グリシルーH-1152	0.46	0.26	0.12	0.67	0.49	0.32
5-FU	0.15	0.16	0.14	0.37	0.37	0.35
オキサリプラチン	0.40	0.57	0.18	0.63	0.77	0.40
メトレキサート	0.17	0.72	0.18	0.39	0.84	0.40
ペメトレキセド	0.16	0.87	0.19	0.37	0.93	0.42
AS-252424	0.96	0.94	0.21	0.98	0.97	0.45
GSK923295	0.26	0.11	0.22	0.49	0.32	0.45
ゲムシタビン	0.23	0.25	0.23	0.47	0.48	0.47
レスタウルチニブ	0.16	0.13	0.26	0.37	0.34	0.49
ドキシルビシン	0.86	0.65	0.29	0.92	0.83	0.52
GSK1838705	0.36	0.15	0.37	0.60	0.37	0.60
TCS 2312ジヒドロクロリド	0.11	0.31	0.37	0.32	0.54	0.60
BEZ235	0.20	0.37	0.46	0.44	0.60	0.67
ソラフェニブ	0.72	0.43	0.47	0.84	0.64	0.67
トポテカン	0.70	0.47	0.50	0.84	0.67	0.70
ヌトリン3a	0.30	0.15	0.56	0.54	0.36	0.76
L-779450	0.70	0.97	0.60	0.84	0.98	0.81

【 0 2 8 0 】

10

20

30

40

【表 4 1】

表9. 全ての治療化合物のサブタイプ関連性

	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル (生p値)	基底細胞＋ クローデイン低 ／ルミナル (生p値)	ERBB2AMP ／非ERBB2 AMP(生p値)	基底細胞／ クローデイン低 ／ルミナル (FDR p値)	基底細胞 ＋クローデイン低 ／ルミナル (FDR p値)	ERBB2AMP／ 非ERBB2AMP (FDR p値)
NSC 663284	0.30	0.52	0.61	0.54	0.71	0.82
エピルビシン	0.63	0.62	0.64	0.82	0.82	0.83
ICRF-193	0.24	0.96	0.64	0.48	0.98	0.83
AZD6244	0.94	0.72	0.66	0.97	0.84	0.83
パクリタキセル	0.29	0.11	0.68	0.52	0.32	0.84
ZM 447439	0.66	0.41	0.72	0.83	0.64	0.84
ボルテソミブ	0.90	0.67	0.72	0.95	0.83	0.84
AG1024	0.24	0.13	0.73	0.48	0.34	0.84
オキサムフラチン	0.47	0.22	0.78	0.67	0.46	0.88
XRP44X	0.70	0.42	0.80	0.84	0.64	0.89
TCS JNK 5a	0.63	0.51	0.80	0.82	0.71	0.89
PD 98059	0.63	0.80	0.84	0.82	0.89	0.92
ビノレルビン	0.11	0.10	0.85	0.32	0.32	0.92
5-FdUR	0.63	0.42	0.90	0.82	0.64	0.95
プルバロールA	0.11	0.41	0.93	0.32	0.64	0.97
MLN4924	0.73	0.42	0.93	0.84	0.64	0.97
GSK1120212	0.41	0.24	0.97	0.64	0.48	0.98
イスピネシブ	0.46	0.37	0.95	0.67	0.60	0.98
CPT-11	0.37	0.76	0.97	0.60	0.86	0.98
SB-3CT	0.46	0.32	0.99	0.67	0.56	0.99

【表 4 2】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	17-AAG	5-FU	5-FdUR	AG1024	AG1478	Sigma	AKT1-2	阻害薬	トリシリン	AS-252424	AZD6244	BEZ235	BIBW 2992
600MPE	6.87	4.11	NA	NA	3.99	NA	NA	5.43	NA	4.87	NA	NA	NA
AU565	7.25	5.18	4.97	NA	4.57	5.61	6.80	5.43	NA	4.87	NA	6.59	NA
BT20	NA	NA	3.49	NA	NA	5.00	5.26	5.43	NA	4.65	NA	5.42	5.56
BT474	7.69	3.17	3.29	NA	6.17	6.08	6.40	5.43	NA	5.36	NA	6.46	8.23
BT483	6.65	4.48	4.13	NA	5.64	6.08	6.91	5.43	NA	5.37	NA	4.95	5.78
BT549	7.47	3.74	NA	NA	4.41	5.59	4.23	5.43	NA	NA	NA	NA	NA
CAMA1	6.57	3.51	3.92	NA	4.46	5.59	5.16	5.43	NA	NA	NA	4.78	5.65
HCC1143	6.86	3.69	4.02	NA	NA	4.87	4.94	5.43	NA	NA	NA	NA	5.86
HCC1187	5.29	3.18	3.81	NA	NA	5.47	5.96	5.43	NA	5.78	NA	NA	NA
HCC1395	6.54	3.13	3.60	NA	4.57	NA	5.36	5.43	NA	NA	4.54	NA	NA
HCC1419	7.35	3.77	2.73	4.70	5.92	6.03	5.87	5.43	NA	4.69	4.75	NA	8.53
HCC1428	7.70	4.99	3.91	5.05	NA	5.35	6.38	5.43	NA	5.31	NA	4.77	5.76
HCC1500	6.91	4.23	4.21	NA	4.58	4.89	6.18	5.43	NA	5.24	NA	NA	6.47
HCC1806	7.04	4.59	4.02	NA	4.07	5.05	5.89	5.43	NA	5.15	NA	NA	6.27
HCC1937	6.87	3.64	3.37	NA	4.88	5.00	4.39	5.43	NA	NA	NA	NA	5.68
HCC1954	7.49	4.78	3.99	NA	5.64	5.08	4.43	5.43	NA	5.46	5.84	7.28	6.91
HCC202	8.39	4.41	NA	4.92	5.75	NA	7.22	5.43	NA	NA	NA	NA	NA
HCC2185	6.93	3.42	3.12	5.11	4.33	5.75	6.69	5.43	NA	4.46	NA	6.58	5.86
HCC3153	6.81	3.45	3.24	5.11	NA	4.99	5.49	5.43	NA	NA	NA	6.19	NA
HCC38	7.23	3.72	4.00	NA	4.03	4.98	5.44	5.43	NA	NA	NA	6.31	5.74
HCC70	6.62	4.05	3.67	5.21	NA	5.74	6.23	5.43	NA	NA	NA	6.80	6.33
LY2	6.97	4.41	5.01	NA	NA	5.77	6.63	5.43	NA	NA	NA	NA	NA
MCF7	6.25	4.39	NA	NA	NA	5.78	6.01	5.43	NA	4.80	NA	6.23	NA
MDAMB134VI	7.46	2.01	3.15	4.69	4.00	5.02	5.54	5.43	NA	NA	5.93	6.00	5.44
MDAMB157	NA	3.11	NA	NA	4.47	NA	5.14	5.43	NA	NA	NA	NA	NA
MDAMB175VII	7.54	3.95	4.69	4.82	6.19	5.51	4.08	5.43	NA	4.61	5.59	5.94	8.35
MDAMB231	6.11	3.75	3.10	NA	NA	NA	4.17	5.43	NA	NA	NA	NA	NA
MDAMB361	7.24	3.84	NA	4.69	4.71	6.05	NA	5.43	NA	4.71	NA	6.09	NA

10

20

30

40

【表 4 3】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	ホルテゾミブ	CPT-11	カルボプラチン	シスプラチン	ドセタケセル	ドキソリビン	エピルビン	エルロチニブ	エトポシド	ファスカリニン
600MPE	6.37	4.68	3.82	4.33	7.01	6.57	6.46	NA	5.01	6.54
AU565	8.28	5.91	4.94	5.73	8.28	7.03	6.84	4.88	6.17	6.92
BT20	7.33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.70	5.48	6.51
BT474	8.13	NA	3.98	4.48	8.20	6.51	5.17	4.98	4.72	6.72
BT483	7.71	5.33	5.82	3.59	7.63	6.82	6.78	NA	5.37	7.18
BT549	8.22	NA	4.58	5.42	NA	NA	6.69	4.38	5.86	6.29
CAMA1	7.78	4.84	3.72	4.39	8.25	6.58	NA	NA	5.30	6.61
HCC1143	8.07	4.88	3.85	5.04	7.96	6.28	6.54	NA	5.29	6.56
HCC1187	8.47	4.57	4.66	5.56	8.60	6.88	6.00	5.12	6.16	7.81
HCC1395	8.14	6.00	5.00	5.92	8.25	6.60	6.35	4.40	5.51	6.49
HCC1419	8.36	4.58	4.15	5.06	7.78	6.29	6.15	4.97	4.15	6.58
HCC1428	7.04	4.62	3.86	4.40	5.30	5.92	5.87	4.75	4.46	7.43
HCC1500	7.91	5.85	4.69	5.38	8.56	6.70	6.61	5.19	5.85	6.65
HCC1806	7.64	5.81	4.80	5.68	8.59	6.79	6.78	5.37	5.51	6.59
HCC1937	8.12	NA	4.44	5.48	NA	NA	6.69	4.41	5.34	6.41
HCC1954	8.00	4.72	4.37	5.27	8.78	6.73	6.70	5.51	6.00	6.57
HCC202	8.14	4.75	4.44	5.74	8.43	6.28	6.22	4.43	6.03	7.37
HCC2185	8.35	5.03	4.69	5.65	8.52	7.16	6.90	4.63	5.11	6.90
HCC3153	7.98	4.73	4.45	5.12	8.01	6.45	6.19	4.50	5.53	6.46
HCC38	7.96	6.14	4.76	5.78	8.69	7.14	7.03	NA	6.53	6.56
HCC70	8.75	4.37	4.82	5.83	8.29	5.64	6.38	5.76	4.89	6.90
LY2	6.22	4.88	4.39	5.00	8.37	6.71	6.67	4.48	NA	8.10
MCF7	7.72	4.68	3.77	4.79	7.91	6.30	6.45	NA	4.95	6.72
MDAMB134VI	8.08	4.96	3.73	3.87	7.63	5.92	5.98	NA	5.61	6.65
MDAMB157	8.16	4.80	4.07	4.59	NA	6.40	6.26	NA	6.02	6.77
MDAMB175VII	8.28	NA	4.44	5.36	7.80	6.15	7.00	5.51	4.14	6.72
MDAMB231	7.56	5.06	4.09	4.65	8.55	6.67	6.57	4.40	5.69	6.60
MDAMB361	5.22	4.99	4.34	5.01	8.25	6.63	6.65	NA	4.85	7.09

【表 4 4】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	ゲルダナマイシン	ゲムシタビン	グリシル-H-1152	ICRF-193	イバンドロン酸ナトリウム塩	イレッサ	イクサヘピロン	LBH589
600MPE	7.41	7.64	NA	NA	NA	5.14	5.28	6.73
AU565	7.29	7.81	5.14	6.14	3.74	5.97	8.37	6.98
BT20	NA	NA	5.15	NA	4.69	NA	8.09	6.41
BT474	7.84	NA	NA	NA	3.98	6.14	8.08	7.46
BT483	6.84	8.05	NA	NA	4.24	5.21	5.27	7.14
BT549	8.26	8.17	NA	NA	NA	4.82	8.22	NA
CAMA1	7.10	6.57	5.09	NA	3.79	NA	9.00	7.21
HCC1143	7.09	7.89	4.80	NA	4.36	4.93	8.01	7.08
HCC1187	7.80	6.31	6.08	6.05	3.77	NA	8.66	6.76
HCC1395	7.21	6.09	NA	NA	5.13	5.15	7.92	NA
HCC1419	7.49	3.98	4.77	NA	5.12	5.56	4.96	7.23
HCC1428	7.50	4.52	NA	NA	3.89	4.97	7.23	6.87
HCC1500	6.81	8.48	NA	4.66	4.42	5.09	8.49	6.79
HCC1806	7.12	8.72	NA	NA	4.48	5.33	8.31	6.82
HCC1937	7.53	6.04	NA	NA	4.39	5.08	6.51	6.72
HCC1954	8.14	NA	NA	4.82	4.26	5.69	8.71	6.43
HCC202	8.83	4.77	NA	NA	NA	6.34	4.70	NA
HCC2185	7.74	7.50	5.54	5.69	4.82	5.03	5.04	7.16
HCC3153	7.17	7.19	NA	NA	4.10	NA	8.21	6.53
HCC38	7.54	8.15	5.99	6.54	4.24	NA	8.55	7.45
HCC70	7.03	4.13	6.09	NA	4.16	4.76	8.85	7.11
LY2	7.00	7.42	NA	NA	NA	NA	8.22	NA
MCF7	6.62	4.14	NA	NA	NA	NA	9.44	7.10
MDAMB134VI	7.68	NA	5.93	NA	4.16	NA	8.79	7.18
MDAMB157	NA	NA	NA	NA	NA	4.82	8.31	NA
MDAMB175VII	7.75	8.12	4.48	NA	4.47	6.68	NA	6.41
MDAMB231	7.54	8.02	4.64	NA	4.13	NA	9.34	NA
MDAMB361	7.59	8.20	4.48	NA	NA	5.19	8.64	7.30

【表 4 5】

表 10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	レスタウルチン	メトレキサート	NSC 663284	NU6102	オキサリプラチン	オキサムプラチン	PD173074	PD 98059	パクリタセル
600MPE	5.77	3.78	5.34	NA	NA	4.89	NA	5.01	7.18
AU565	6.07	3.78	5.81	4.64	NA	5.55	6.19	5.13	8.09
BT20	5.49	NA	5.48	NA	NA	NA	5.42	4.80	NA
BT474	6.61	NA	5.56	4.56	4.73	4.73	6.57	NA	7.99
BT483	6.13	NA	6.02	NA	4.56	4.56	6.15	NA	7.46
BT549	NA	NA	NA	NA	5.72	5.72	NA	5.13	NA
CAMA1	5.65	7.10	5.58	4.91	5.02	5.02	6.27	NA	7.95
HCC1143	6.48	7.62	5.70	4.87	4.69	4.69	6.28	4.87	7.77
HCC1187	6.08	3.78	5.68	5.11	5.85	5.85	6.19	4.97	8.05
HCC1395	NA	NA	6.16	5.24	4.97	4.97	5.64	6.21	7.80
HCC1419	5.94	3.78	5.72	4.54	4.73	4.73	5.88	5.35	6.16
HCC1428	6.27	NA	5.59	4.87	5.12	5.12	6.33	5.17	4.78
HCC1500	6.80	7.51	5.42	4.78	5.47	5.47	5.98	NA	8.10
HCC1806	6.79	3.78	NA	4.64	5.59	5.59	6.16	5.30	8.06
HCC1937	6.21	NA	6.07	NA	5.29	5.29	5.84	5.12	NA
HCC1954	5.31	7.81	5.22	NA	5.59	5.59	5.81	5.12	8.15
HCC202	NA	7.69	NA	NA	5.23	5.23	NA	5.07	8.10
HCC2185	5.49	NA	5.96	4.85	5.52	5.52	6.46	NA	8.14
HCC3153	5.11	NA	5.73	4.81	5.19	5.19	5.82	4.81	7.70
HCC38	7.21	NA	5.64	5.03	5.43	5.43	6.77	5.53	8.13
HCC70	6.74	NA	5.51	4.69	5.38	5.38	6.35	5.15	8.09
LY2	NA	7.47	6.27	NA	5.19	5.19	5.88	5.13	7.98
MCF7	5.85	7.24	5.43	4.39	5.27	5.27	5.74	NA	7.79
MDAMB134VI	6.44	NA	5.24	NA	NA	NA	6.18	4.73	8.00
MDAMB157	NA	3.78	NA	NA	4.54	4.54	NA	5.63	NA
MDAMB17SVII	6.09	NA	5.22	NA	5.44	5.44	5.41	NA	7.71
MDAMB231	NA	NA	NA	NA	4.72	4.72	NA	5.17	8.28
MDAMB361	6.28	6.80	5.14	4.77	5.46	5.46	6.15	4.82	7.88

【表 4 6】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	ペムレキセト	フルバラン	ラノールA	L-779450	ラパマイン	ポリノスチン	SB-3CT	ホスチニブ	ゾラフェニブ	リンゴ酸スニチニブ	TCS JNK 5a
600MPE	NA	4.52	NA	NA	NA	4.15	NA	5.05	4.34	5.37	NA
AU565	NA	5.01	NA	NA	7.50	4.08	NA	5.67	3.75	5.42	NA
BT20	NA	4.56	NA	NA	7.87	3.72	4.42	5.86	4.20	4.78	5.97
BT474	NA	NA	4.73	NA	7.82	4.26	4.99	6.14	4.00	4.77	4.17
BT483	NA	4.40	4.84	NA	8.78	4.23	4.59	5.45	4.93	4.73	5.94
BT549	NA	NA	NA	NA	4.48	3.83	NA	NA	3.92	5.29	NA
CAMA1	2.83	NA	NA	NA	7.82	4.18	NA	5.49	4.02	5.06	5.48
HCC1143	NA	NA	NA	NA	NA	3.90	NA	5.31	4.23	5.16	4.21
HCC1187	NA	4.74	5.07	NA	7.49	4.79	4.83	5.50	4.49	5.30	6.08
HCC1395	NA	NA	4.54	NA	NA	3.51	NA	NA	4.32	5.33	6.21
HCC1419	NA	NA	4.78	NA	8.36	3.88	NA	6.12	3.38	4.75	NA
HCC1428	NA	4.44	4.80	NA	7.29	4.42	NA	5.41	4.34	5.29	4.61
HCC1500	6.30	NA	NA	NA	4.03	3.78	NA	5.59	3.75	5.19	5.31
HCC1806	2.83	4.00	NA	NA	4.18	3.89	NA	5.68	3.83	5.27	NA
HCC1937	3.81	4.97	4.84	NA	5.91	3.75	NA	5.84	3.29	5.16	NA
HCC1954	6.67	4.43	NA	NA	8.45	3.95	NA	5.93	4.26	5.25	5.90
HCC202	7.68	3.99	NA	NA	8.30	4.76	NA	NA	4.14	5.03	NA
HCC2185	NA	4.57	NA	NA	8.79	4.28	4.21	5.30	4.83	4.69	4.66
HCC3153	NA	NA	NA	NA	5.25	3.81	NA	5.42	3.92	4.96	5.59
HCC38	NA	NA	4.77	NA	7.47	4.63	4.62	6.05	4.06	5.24	5.32
HCC70	NA	NA	NA	NA	6.92	4.46	NA	6.05	4.45	5.60	5.64
LY2	6.33	NA	NA	NA	NA	3.85	NA	5.61	NA	5.19	NA
MCF7	NA	4.80	NA	NA	6.84	4.19	NA	5.59	4.19	5.23	NA
MDAMB134V1	NA	4.26	4.60	NA	8.17	4.40	NA	NA	4.54	4.97	4.78
MDAMB157	NA	NA	NA	NA	NA	4.01	NA	NA	3.62	5.20	NA
MDAMB175VII	NA	4.46	5.05	NA	8.43	4.26	NA	5.97	4.09	5.26	5.02
MDAMB231	NA	NA	NA	NA	5.45	4.11	NA	NA	4.05	5.44	NA
MDAMB361	6.31	NA	5.04	NA	6.13	4.26	4.00	5.82	4.22	4.93	NA

【表 4 7】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	OS	2312シトログロリド	TPCA-1	トホデカン	タモキシフェン	テムシロリムス	トリコスタチンA	VX-680	ビノレルビン	XRP44X
600MPE	6.22	NA	NA	NA	4.32	4.74	5.18	NA	5.29	NA
AU565	6.56	NA	NA	7.73	4.54	7.00	5.43	5.66	8.06	6.35
BT20	5.70	4.36	NA	NA	NA	6.11	4.81	4.72	NA	5.29
BT474	6.21	NA	NA	5.60	5.62	7.87	5.00	4.54	7.32	5.34
BT483	6.18	NA	NA	7.79	4.62	4.18	5.00	5.44	8.14	4.18
BT549	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.13	NA	8.02	NA
CAMA1	6.25	NA	NA	6.40	4.46	7.36	5.57	NA	7.88	6.27
HCC1143	6.47	5.07	NA	6.59	4.79	5.80	4.77	5.98	6.58	NA
HCC1187	6.01	5.67	NA	6.51	NA	6.10	5.32	6.93	7.57	6.23
HCC1395	7.21	5.22	NA	7.82	4.84	4.90	4.50	NA	8.45	NA
HCC1419	5.97	5.53	NA	6.44	4.48	7.28	4.85	4.81	6.45	NA
HCC1428	6.11	5.45	NA	6.35	5.49	5.21	5.73	5.10	5.66	5.85
HCC1500	6.02	5.39	NA	7.84	3.98	4.61	4.82	4.56	7.96	5.74
HCC1806	6.14	5.34	NA	7.69	4.88	4.69	4.97	NA	7.93	5.92
HCC1937	6.52	NA	NA	NA	NA	6.36	4.82	5.10	6.65	NA
HCC1954	5.49	4.77	NA	6.52	4.01	6.66	4.95	NA	8.45	6.30
HCC202	NA	NA	NA	6.12	4.53	NA	6.04	NA	7.87	NA
HCC2185	5.82	5.36	NA	7.39	4.85	7.88	4.79	6.46	4.58	6.63
HCC3153	6.38	4.87	NA	6.68	NA	4.70	4.62	4.76	7.29	5.95
HCC38	6.99	5.50	NA	8.43	4.28	6.41	5.22	6.94	7.94	5.85
HCC70	6.52	5.44	NA	4.72	NA	6.39	4.84	5.35	8.13	5.98
LY2	6.65	4.54	NA	6.59	4.25	6.68	4.86	NA	7.88	6.08
MCF7	6.00	NA	NA	5.88	3.99	5.81	5.16	5.08	7.78	6.40
MDAMB134VI	5.81	4.79	NA	6.94	4.08	6.78	5.17	6.11	7.87	6.21
MDAMB157	NA	NA	NA	6.40	NA	NA	4.68	NA	7.89	NA
MDAMB175VII	5.77	NA	NA	5.54	4.84	5.64	5.23	4.61	7.41	5.44
MDAMB231	NA	4.45	NA	5.93	NA	NA	5.26	NA	8.29	NA
MDAMB361	6.34	4.18	NA	6.28	NA	6.60	5.09	5.63	8.18	6.06

【表 4 8】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じG
I50値は除外した。

細胞株	CGC-11047	CGC-11144	GSK923295	GSK1070916	GSK1120212B	TGX-221	GSK1838705A	GSK461364A	GSK2119563A
600MPE	3.33	6.49	NA	5.10	8.17	5.09	6.49	5.16	6.23
AU565	3.54	6.31	7.62	5.52	NA	5.18	5.63	8.35	6.25
BT20	NA	6.52	NA	NA	NA	4.77	4.63	NA	5.97
BT474	3.57	6.02	5.42	5.19	NA	5.10	5.08	5.07	6.82
BT483	3.23	6.25	6.44	5.35	NA	5.37	5.52	5.35	7.47
BT549	4.53	6.65	NA	NA	5.17	NA	5.21	NA	5.38
CAMA1	2.90	6.40	7.33	5.05	NA	5.10	5.05	5.17	4.61
HCC1143	3.95	6.88	6.77	5.51	NA	NA	5.55	7.13	5.48
HCC1187	2.81	6.02	7.52	7.95	NA	5.48	5.61	7.48	6.18
HCC1395	4.06	6.20	7.33	6.24	6.71	5.13	5.28	8.31	5.05
HCC1419	4.85	6.30	5.72	5.18	7.23	5.16	5.21	5.12	7.41
HCC1428	3.69	6.33	5.21	5.19	NA	4.77	5.79	5.26	6.00
HCC1500	4.20	6.65	7.28	5.19	NA	NA	5.02	7.89	5.09
HCC1806	4.13	6.71	7.34	5.16	5.08	NA	4.27	7.95	5.79
HCC1937	5.16	6.76	7.20	5.42	NA	NA	4.71	7.51	5.50
HCC1954	6.16	6.56	7.62	5.56	6.53	4.79	5.08	8.16	5.98
HCC202	4.84	6.26	7.77	6.03	10.23	5.20	5.11	NA	7.75
HCC2185	3.39	6.60	7.43	6.34	NA	NA	5.54	8.26	NA
HCC3153	5.24	6.72	7.22	4.95	NA	4.38	5.26	7.50	4.46
HCC38	4.93	6.81	7.32	6.44	NA	5.11	5.00	7.42	6.03
HCC70	5.68	6.55	7.68	6.59	8.18	5.98	5.18	7.01	6.14
LY2	2.82	5.18	NA	NA	NA	4.78	6.26	NA	6.34
MCF7	4.07	6.33	5.90	5.06	NA	NA	5.89	7.82	6.03
MDAMB134VI	2.97	6.38	5.50	5.57	7.72	4.78	5.06	7.83	6.33
MDAMB157	2.99	6.96	7.50	5.95	NA	NA	5.05	8.98	4.49
MDAMB175VII	3.21	6.75	6.76	5.07	7.94	NA	5.30	5.21	5.88
MDAMB231	2.60	4.66	7.34	5.78	6.86	4.61	5.28	7.68	4.92
MDAMB361	3.15	5.78	7.42	5.19	NA	4.75	5.04	8.72	5.58

10

20

30

40

【表 4 9】

表10. 打ち切りGI50値。
種々の薬物に使用した
最大実験濃度と同じ
GI50値は除外した。

細胞株	GSK2126458A	GSK487371A	GSK1059615B	ラパチニブ	MLN4924	ストリン3a	イスピネソブ	ZM447439
600MPE	8.22	NA	6.31	NA	6.43	NA	7.68	NA
AU565	8.10	5.89	6.32	6.40	6.74	4.79	7.65	5.82
BT20	7.80	NA	NA	NA	5.56	4.47	7.77	5.29
BT474	8.36	NA	6.80	6.40	6.24	4.39	7.29	4.20
BT483	8.94	5.57	NA	NA	4.48	5.19	10.31	4.57
BT549	7.32	5.45	5.73	NA	NA	NA	7.33	NA
CAMA1	6.97	5.59	5.77	NA	7.29	NA	7.50	5.40
HCC1143	7.43	NA	6.26	NA	6.61	4.67	7.29	4.98
HCC1187	8.30	5.81	6.48	NA	6.30	4.68	7.57	6.19
HCC1395	7.31	NA	5.61	NA	NA	4.65	7.56	NA
HCC1419	8.75	NA	6.59	6.57	7.64	4.39	5.17	5.32
HCC1428	7.48	5.75	6.28	NA	6.93	4.50	5.35	5.13
HCC1500	7.11	6.11	5.71	NA	7.93	4.57	7.47	5.28
HCC1806	7.54	5.32	5.82	NA	7.67	NA	7.54	NA
HCC1937	7.57	NA	6.09	NA	5.58	4.63	6.55	5.23
HCC1954	7.97	6.25	6.63	5.56	5.35	4.76	7.51	NA
HCC202	9.03	6.47	7.23	6.12	NA	5.02	8.12	NA
HCC2185	NA	6.12	6.89	5.42	6.43	4.81	7.53	5.92
HCC3153	7.36	5.60	5.48	NA	6.64	4.44	7.55	NA
HCC38	7.62	5.85	6.11	NA	7.56	4.66	7.33	6.24
HCC70	8.13	5.72	6.75	NA	4.48	4.73	7.34	6.01
LY2	7.93	4.46	5.82	NA	6.80	5.35	7.64	NA
MCF7	8.14	4.85	5.53	NA	NA	5.24	7.42	NA
MDAMB134VI	7.95	6.01	6.25	NA	7.28	4.76	7.36	4.66
MDAMB157	6.49	5.33	NA	NA	NA	4.45	7.50	NA
MDAMB175VII	8.29	NA	6.18	6.03	6.37	5.08	5.77	4.28
MDAMB231	5.57	5.90	5.21	NA	NA	NA	7.50	NA
MDAMB361	7.46	5.38	5.84	5.05	NA	NA	7.47	5.53

【表 5 0】

細胞株	17-AAG	5-FU	5-FdUR	AG1024	AG1478Sigma	AKT1-2 阻害薬	トリシリン	AS-252424	AZD6244	BEZ235	BIBW 2992
MDAMB415	7.30	NA	NA	NA	NA	4.95	6.44	NA	NA	6.58	NA
MDAMB436	5.96	2.97	NA	NA	3.99	4.47	5.62	4.74	NA	NA	5.43
MDAMB453	7.14	4.01	NA	NA	NA	5.73	6.34	4.69	NA	6.88	7.04
MDAMB468	5.62	3.71	3.22	NA	4.02	5.01	5.85	NA	NA	NA	6.20
SKBR3	7.50	4.48	3.66	NA	4.92	5.68	6.55	4.40	NA	6.23	7.88
SUM1315MO2	7.66	3.37	3.13	5.17	5.60	5.33	5.53	4.75	5.12	6.65	6.79
SUM149PT	7.00	4.14	4.11	NA	5.74	5.03	5.64	4.66	6.28	6.57	7.13
SUM159PT	7.46	4.68	4.49	NA	4.77	5.17	4.79	NA	NA	7.44	5.59
SUM185PE	7.46	2.53	NA	5.57	NA	5.95	6.14	5.27	NA	4.82	5.25
SUM225CWN	NA	NA	3.71	5.03	NA	6.05	6.19	5.02	NA	NA	8.03
SUM44PE	8.84	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	7.46	4.40	3.49	5.45	NA	5.81	5.01	4.44	5.01	4.77	5.47
T47D	NA	NA	3.48	4.68	4.74	5.78	6.19	5.25	NA	6.55	NA
UACC812	NA	4.02	4.34	NA	NA	5.53	NA	4.88	NA	4.78	8.55
UACC893	7.90	3.30	NA	4.75	5.65	NA	5.75	NA	NA	NA	NA
ZR751	6.56	4.51	5.27	NA	NA	5.94	4.32	5.20	5.21	4.78	5.63
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR758	7.14	4.95	5.16	NA	NA	5.93	5.10	4.65	NA	6.85	5.52

【表 5 1】

細胞株	ホルテゾミブ	CPT-11	カルボプラチン	シスプラチン	トセタキセル	トキシソルビシン	エヒルビシン	エルロチニブ	イトボシド	フラスカブリジン
MDAMB415	7.49	4.94	3.73	3.57	8.54	6.43	6.58	NA	4.86	7.22
MDAMB436	8.06	4.98	4.18	4.98	7.77	6.23	6.15	NA	6.00	6.38
MDAMB453	8.16	5.18	4.23	5.16	8.36	6.67	6.65	NA	5.30	7.06
MDAMB468	7.85	4.49	4.31	5.27	8.54	6.13	6.16	4.67	5.59	7.11
SKBR3	8.12	5.49	4.87	4.18	8.12	6.90	NA	4.80	5.92	6.65
SUM1315MO2	7.86	5.29	4.56	5.72	8.53	6.67	7.44	5.13	6.54	6.38
SUM149PT	8.13	NA	4.87	5.79	8.76	NA	6.66	5.70	5.58	6.40
SUM159PT	8.13	4.41	4.55	5.40	8.34	6.46	6.85	4.93	6.11	6.37
SUM185PE	8.27	4.99	3.90	3.59	5.30	6.51	6.39	NA	5.31	7.26
SUM225CWN	7.98	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.15	4.99	7.17
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	8.28	5.86	4.71	5.74	8.74	7.01	6.53	4.50	5.59	6.74
T47D	8.08	NA	3.95	5.27	NA	NA	NA	NA	5.97	6.34
UACC812	7.62	5.52	4.81	5.44	8.49	7.13	6.60	4.91	NA	NA
UACC893	9.19	NA	NA	4.22	7.94	6.08	6.11	4.91	4.26	6.73
ZR751	7.76	5.28	4.07	4.92	7.55	6.86	6.60	NA	5.68	6.45
ZR7530	NA	NA	4.55	5.58	8.40	6.96	NA	NA	NA	NA
ZR75B	6.88	5.81	3.52	3.59	7.81	6.60	6.94	NA	6.06	6.39

【表 5 2】

細胞株	ゲルダナマイシン	ゲムンタピン	クリシール-H-1152	ICRF-193	イバントロン酸ナトリウム塩	イレッサ	イクサヘピロン	LBH589
MDAMB415	7.24	5.56	4.48	NA	4.31	5.13	8.09	7.40
MDAMB436	6.83	7.39	NA	NA	NA	NA	8.24	6.60
MDAMB453	7.71	7.85	4.55	NA	3.96	5.13	8.11	7.31
MDAMB458	7.56	7.27	5.69	4.97	4.03	NA	8.88	6.63
SKBR3	7.79	7.97	NA	5.22	4.05	5.55	7.98	7.26
SUM1315MO2	7.42	NA	4.96	6.21	4.30	5.53	8.22	6.60
SUM149PT	8.22	7.86	4.52	4.75	3.76	5.54	8.26	6.50
SUM159PT	8.20	7.99	5.76	6.38	4.37	5.07	8.16	6.88
SUM185PE	7.70	6.30	NA	NA	NA	4.68	8.07	7.11
SUM225CWN	NA	NA	NA	NA	3.30	NA	4.70	NA
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	7.92	8.15	5.04	5.52	4.45	5.10	8.53	6.77
T47D	NA	6.02	4.82	NA	4.46	4.80	8.10	6.82
UACC812	7.91	NA	4.42	4.66	3.81	NA	5.23	6.89
UACC893	7.96	3.84	NA	NA	NA	5.94	8.20	NA
ZR751	6.93	7.43	5.45	6.07	4.16	NA	6.53	6.71
ZR7530	8.15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR75B	7.03	7.34	NA	6.60	3.85	NA	NA	7.08

【表 5 3】

細胞株	メトレキサート	NSC 663284	NU6102	オキサリプラチン	オキサムプラチン	PD173074	PD 98059	パクリタキセル
MDAMB415	NA	5.59	4.46	4.51	6.14	NA	NA	8.28
MDAMB436	7.70	NA	NA	4.18	5.28	5.19	NA	7.37
MDAMB453	NA	5.26	4.91	5.24	6.56	5.71	NA	7.99
MDAMB468	7.49	5.19	4.85	4.37	5.57	5.18	4.32	8.06
SKBR3	6.16	5.86	4.51	5.59	5.96	5.10	4.73	7.95
SUM1315MO2	NA	6.00	5.40	4.86	5.64	5.47	NA	8.21
SUM149PT	7.04	5.74	5.08	5.90	6.17	5.04	4.44	8.03
SUM159PT	6.54	5.64	4.90	5.60	6.50	5.19	NA	7.82
SUM185PE	7.20	6.50	5.53	4.41	6.51	NA	4.88	7.62
SUM225CWN	6.00	5.66	NA	NA	6.07	NA	4.42	NA
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	6.86	5.61	5.27	5.43	6.22	7.64	4.92	8.31
T47D	5.25	5.19	4.82	5.47	6.06	4.87	NA	NA
UACC812	5.98	5.43	4.42	5.86	5.71	5.15	4.27	8.04
UACC893	NA	NA	NA	3.81	NA	5.16	NA	7.93
ZR751	5.75	5.73	4.76	5.63	5.65	4.81	4.32	7.56
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.66
ZR75B	6.34	5.26	4.85	5.51	6.41	NA	NA	8.10

【表 5 4】

細胞株	ベメレキセド	プルハノールA L-779450	ラハマイシン	ポリノスタット	SB-3CT	ホスチニブ	ソラフェニブ	リンゴ酸スニチニブ	TCS JNK 5a
MDAMB415	NA	NA	8.68	4.18	4.00	NA	4.02	5.25	NA
MDAMB436	NA	NA	NA	3.74	NA	5.30	4.29	4.95	NA
MDAMB453	4.47	NA	NA	4.46	NA	5.63	NA	5.38	6.12
MDAMB468	2.83	4.12	5.55	3.70	NA	5.59	3.80	5.35	4.37
SKBR3	2.83	4.60	7.22	4.30	NA	5.41	4.15	5.17	5.27
SUM1315MO2	NA	5.09	5.48	3.76	NA	6.06	3.73	5.13	6.31
SUM149PT	NA	4.88	5.03	4.02	4.53	6.12	4.80	5.57	5.46
SUM159PT	NA	NA	6.14	3.93	4.85	5.86	4.66	5.81	NA
SUM165PE	NA	4.69	NA	4.42	4.76	NA	5.83	5.98	NA
SUM225CWN	NA	4.28	7.78	3.84	NA	NA	4.39	5.20	NA
SUM44PE	NA	NA	9.26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	NA	4.79	8.52	4.72	4.22	5.84	5.77	5.94	4.86
T47D	NA	NA	6.31	3.96	NA	5.25	4.59	5.08	NA
UACC812	NA	NA	7.33	4.37	4.28	5.56	NA	NA	5.72
UACC893	NA	NA	NA	4.49	NA	NA	3.48	6.06	NA
ZR751	3.69	4.01	NA	3.78	4.00	4.85	4.34	4.88	NA
ZR7530	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR758	NA	4.51	NA	4.02	4.62	5.15	NA	5.12	4.59

【表 5 5】

細胞株	CS	2312ジヒドロクロリド	TPCA-1	トポテカン	タモキシフェン	テムシロリムス	トリコスタチンA	VX-680	ビノレリビン	XRP40X
MDAMB415		6.59	NA	6.72	4.47	7.12	4.90	4.86	7.74	6.30
MDAMB436		6.53	5.16	7.52	4.51	4.27	4.67	6.19	7.57	5.47
MDAMB453		6.29	NA	7.07	4.44	7.00	5.23	5.03	8.42	6.20
MDAMB468		6.07	5.94	7.34	NA	5.25	4.85	6.95	7.97	5.93
SKBR3		6.27	NA	7.95	3.98	7.27	5.21	NA	7.76	5.58
SUM1315MO2		6.48	6.09	8.08	4.00	5.95	4.31	5.65	8.65	6.11
SUM149PT		6.62	5.78	NA	3.99	5.21	5.14	5.07	7.91	5.63
SUM159PT		6.02	5.81	6.13	NA	6.64	5.23	6.37	7.91	6.16
SUM185PE		6.82	NA	7.20	5.05	8.96	4.76	5.62	8.08	NA
SUM225CWN		6.14	NA	NA	NA	NA	4.85	NA	NA	NA
SUM44PE		NA	NA	6.43	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE		6.40	6.25	8.08	4.04	9.38	5.57	6.41	8.27	6.06
T47D		5.90	NA	NA	NA	5.85	5.44	5.03	5.33	5.29
UACC812		5.98	NA	7.22	NA	6.24	5.04	NA	7.13	6.30
UACC893		NA	5.21	6.46	5.51	NA	5.54	NA	7.96	NA
ZR751		6.09	NA	7.39	NA	4.18	4.74	5.27	7.35	5.90
ZR7530		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ZR75B		6.06	NA	7.20	4.79	6.97	5.30	6.79	8.05	5.90

【表 5 6】

細胞株	CGC-11047	CGC-11144	GSK923295	GSK1070916	GSK1120212B	TGX-221	GSK1838705A	GSK461364A	GSK2119563A
MDAMB415	4.12	6.78	7.28	5.76	6.13	NA	5.37	7.08	NA
MDAMB436	3.42	6.06	7.59	7.01	NA	4.72	5.00	7.90	5.48
MDAMB453	3.30	6.28	6.96	5.51	6.61	4.81	5.07	7.97	6.44
MDAMB468	6.05	6.17	7.61	7.89	NA	6.27	5.29	8.41	5.81
SKBR3	NA	5.30	7.34	5.29	NA	5.33	5.16	7.78	6.68
SUM1315MO2	3.15	5.69	7.44	5.89	7.19	5.04	5.33	7.51	6.25
SUM149PT	4.54	6.53	7.17	5.48	7.51	NA	5.41	7.72	5.75
SUM159PT	3.97	6.60	7.43	5.77	7.93	4.49	5.46	7.49	6.46
SUM185PE	NA	6.68	5.42	5.94	NA	NA	5.48	5.66	NA
SUM225CWN	NA	5.45	NA	NA	NA	NA	4.89	NA	NA
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	5.45	6.79	7.64	6.84	5.06	NA	5.68	8.19	7.59
T47D	5.03	6.96	NA	NA	NA	5.45	5.01	NA	7.19
UACC812	3.47	6.78	7.92	NA	NA	4.85	5.31	4.92	6.99
UACC893	2.68	6.60	7.91	5.06	NA	NA	5.20	8.15	6.49
ZR751	3.30	6.48	6.92	4.94	NA	5.64	5.17	NA	5.50
ZR7530	NA	NA	7.68	4.71	NA	NA	NA	5.21	NA
ZR75B	3.25	NA	7.15	5.75	NA	6.43	5.00	7.02	5.62

【表 5 7】

細胞株	GSK2126458A	GSK487371A	GSK1059615B	ラパチニブ	MLN4924	ストリン3a	イスヒネジブ	ZM447439
MDAMB415	NA	5.05	NA	NA	7.13	4.59	7.12	NA
MDAMB436	6.75	NA	5.88	NA	6.57	NA	7.41	5.33
MDAMB453	8.28	5.65	6.52	5.05	5.66	NA	7.37	NA
MDAMB468	7.47	6.29	5.96	NA	6.69	4.44	7.72	6.18
SKBR3	8.41	5.71	6.71	6.29	6.82	NA	7.47	4.77
SUM1315MO2	8.02	6.02	6.49	NA	4.48	4.67	7.39	NA
SUM149PT	7.64	5.38	6.01	NA	6.72	4.56	7.48	NA
SUM159PT	7.52	5.97	6.73	NA	6.23	4.78	7.32	NA
SUM185PE	NA	NA	7.13	NA	NA	4.54	6.96	4.50
SUM225CWN	NA	NA	NA	6.16	NA	4.69	6.98	NA
SUM44PE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SUM52PE	8.46	6.14	6.89	NA	6.40	4.73	7.54	5.40
T47D	8.45	4.46	6.58	NA	6.93	4.51	7.08	4.94
UACC812	8.67	6.24	6.62	6.34	6.00	4.45	NA	4.88
UACC893	8.22	9.44	6.89	5.74	NA	4.69	7.98	NA
ZR751	8.07	5.58	5.87	NA	4.47	5.51	7.05	5.46
ZR7530	NA	NA	6.82	NA	NA	NA	NA	NA
ZR75B	8.31	NA	6.51	NA	6.84	5.69	6.88	5.00

【0 2 9 7】

10

20

30

40

【表 5 8】

表 11. 腫瘍一細胞株比較におけるサブタイプ毎の上位パスウェイ特徴

サブタイプ	順位	パスウェイ特徴
ERBB2	1	ZDHHC21, NOS3, パルミトイル化、ミリスチル化Enos二量体
	2	HNRNP1, NHP2
	3	ERBB2/ERBB3, ERBB2/ERBB3/NEUREGULIN 2
	4	CXCR1, IL8RA, CXCR2, IL8RB
	5	GIT1
ルミナル	1	TXNDC5
	2	CAST, GLRX, PCSK1, CCNH, ANKRA2, BMP2, ZFYVE16, XRCC4, EDIL3, RASGRF2
	3	LMNB1
	4	SNURF
	5	PPAP2A
基底細胞	1	AURKB, コンデンシンI複合体, NDC80
	2	AP-1
	3	E2F-1/DP-1
	4	有糸分裂細胞周期のG1期, SHC1
	5	IL27RA
クローデイン低	1	KAT5
	2	RELA/P50/ATF-2/IRF/C-JUN/HMG1/PCAF
	3	IGF-1R-ALPHA/IGF-1R-BETA/IRS-1, IRS1
	4	CASP9
	5	NCL

10

20

30

40

【図 1】

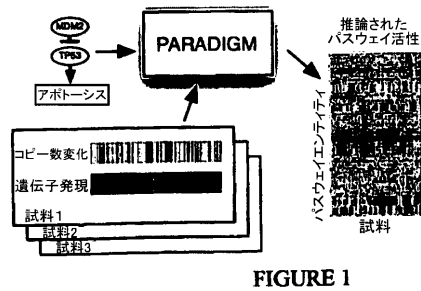


FIGURE 1

【図 2】

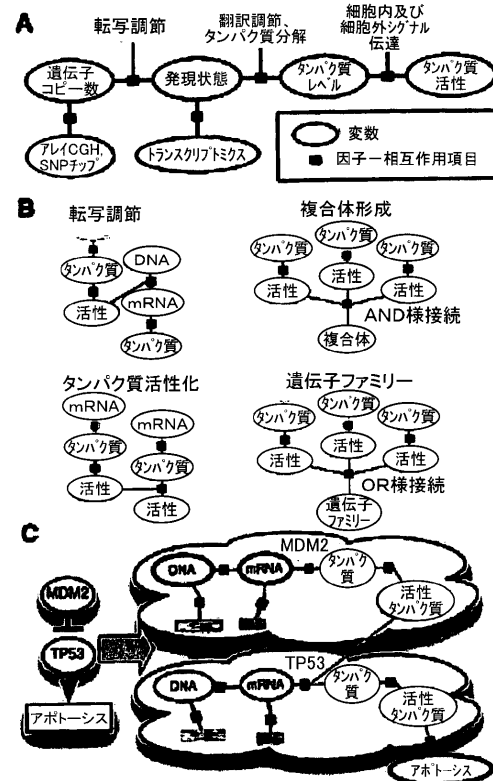


FIGURE 2

【図 3】

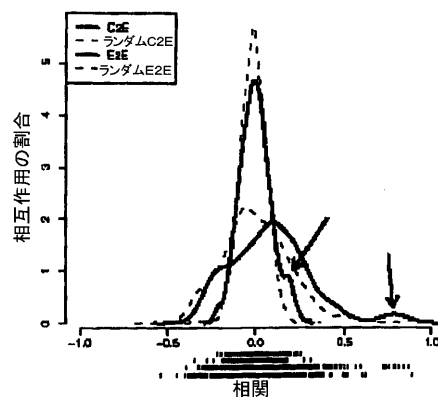


図1. TCGA GBMデータにおけるNCIパスウェイ相互作用。NCIネイチャー・パスウェイ・データベース (Nature Pathway Database)においてAが遺伝子Bの上流アクチベータであることが分かった全て (n=462) のペアについて、TCGA GBMデータから計算されるピアソン相関 (x軸) を2つの異なる方法で計算した。ヒストグラムは、Aのコピー数とBの発現との間の相関 (C2E、実線赤色) 及びAの発現とBの発現との間の相関 (E2E、青色) をプロットする。ランダムにペアにした遺伝子間の相関のヒストグラムをC2E (破線赤色) 及びE2E (破線青色) について示す。矢印は、C2E相関 (赤色) 及びE2E相関 (青色) に認められる正の相関の濃縮を示す。

FIGURE 3

【図 4】

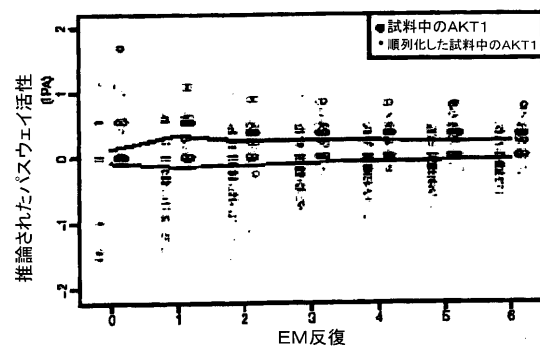


図4. AKT1学習のパラメータ。IPAがEMアルゴリズムの反復毎に収束するまで示される。点は順列化した試料からのIPAを示し、丸は実サンプルからのIPAを示す。赤色の線は実サンプルの平均IPAを指し、緑色の線はヌルサンプルの平均IPA (man IPA) を指す。

FIGURE 4

【図 5】

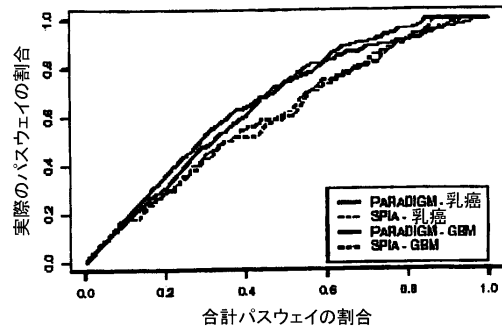


図5. PARADIGM及びSPIAによるデコイパスウェイの実パスウェイとの識別。パスウェイの各遺伝子に新しい遺伝子名を割り当てることにより、デコイパスウェイを作成した。次にPARADIGM及びSPIAを用いてパスウェイ毎の摂動を計算した。各線は、摂動の順位を用いて実パスウェイをデコイパスウェイと識別する受信者動作特性を示す。例えば乳癌では、曲線下面積(AUC)はPARADIGM及びSPIAについてそれぞれ0.669及び0.602である。GBMでは、AUCはそれぞれ0.642及び0.604である。

FIGURE 5

【図 6】

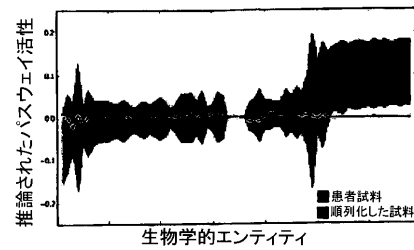


図6. 乳癌においてAktにより媒介されるクラスI PI3Kシグナル伝達イベントの「within」順列と比較した患者試料IPAを示す。患者試料における平均IPA(赤色)で生物学的エンティティを並べ替え、順列化した試料の平均IPAと比較した。各平均の周りの色付きの範囲は、各集合のSDを表す。右側のIPAはAKT1、CHUK、及びMDM2を含む。

FIGURES 6

【図 7】

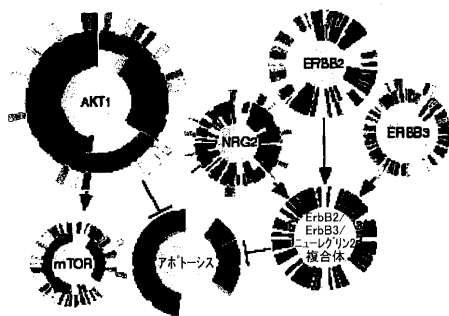


図7. EMB2パスウェイのCircleMap表示。ノード毎に、ER状態、IPA、発現データ、及びコピー数データが、それぞれ内側から外側に向かう同心円として表示される。アポトーシスノード及びErbB2/ErbB3/ニューレグリン2複合体ノードは直接的な観測値がないため、これらのエンティティはER状態の円及びIPAの円のみを有する。各患者のデータが一つの角度に沿って、円の中心から周縁に向かって表示される。

FIGURES 7

【図 8】

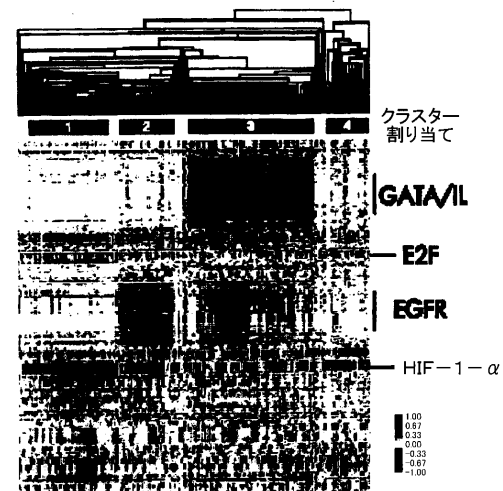


図8. TCGA GBMについてのIPAのクラスタリング。各列が一つの試料に対応し、各行が生体分子エンティティに対応する。階層クラスタ樹形図の下のカラースケールは、図9に使用したクラスタを表す。

FIGURE 8

【図 9】

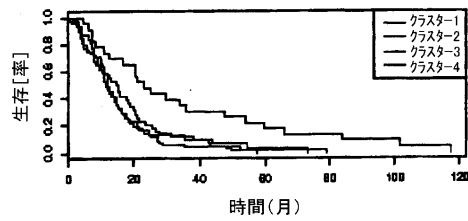


図9. 図8のクラスターについての Kaplan・マイヤー生存プロット

FIGURE 9

【図 10】

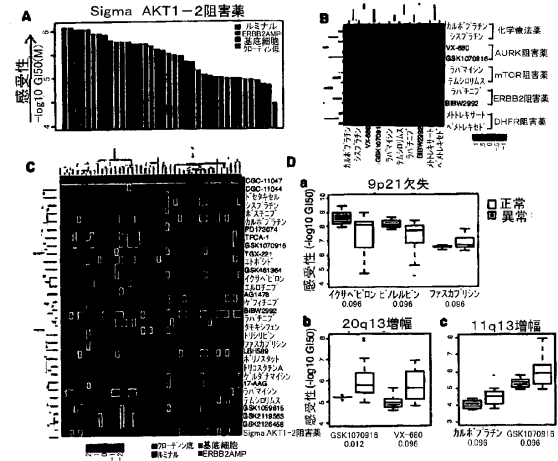


FIGURE 10

【図 11】

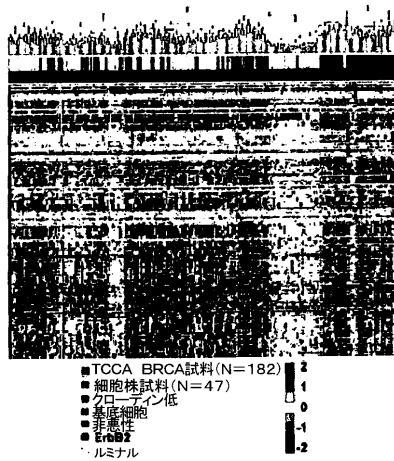


FIGURE 11

【図 12】

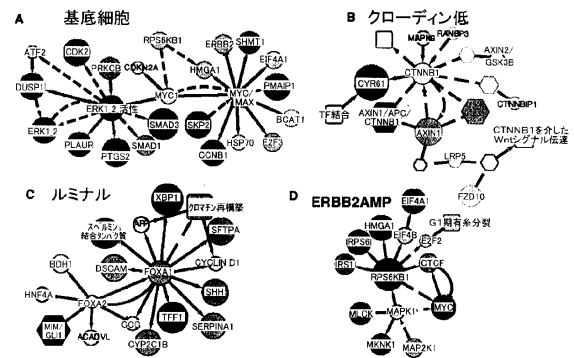


FIGURE 12

【図 17】

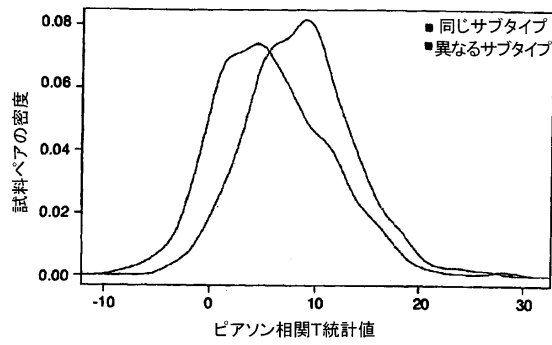


FIGURE 17

【図 18】

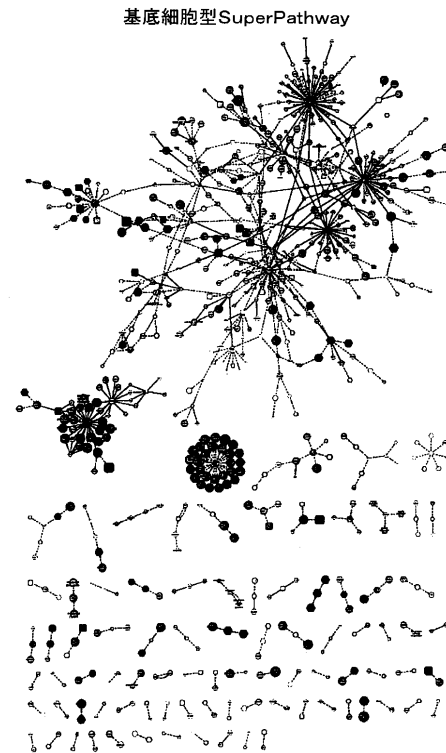


FIGURE 18

【図 19】

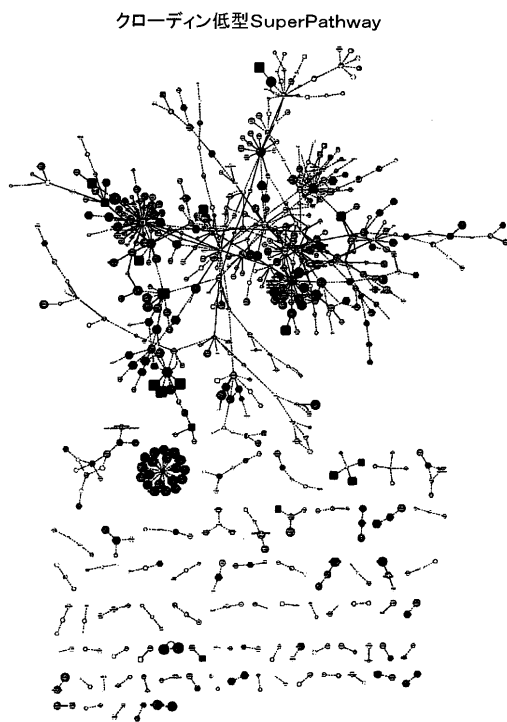


FIGURE 19

【図 20】

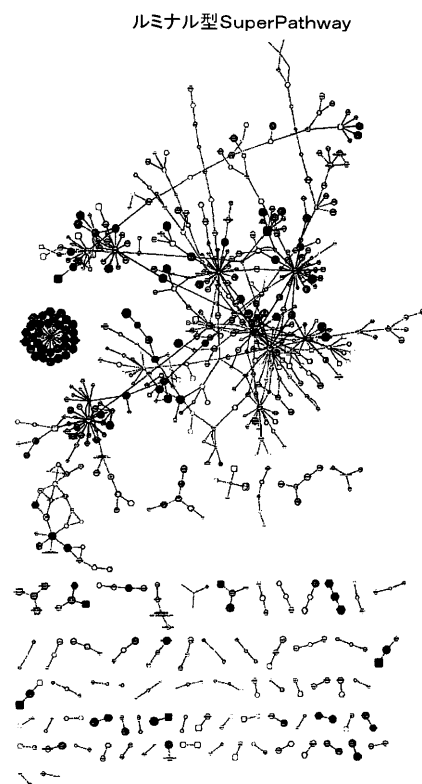


FIGURE 20

【図 2 1】

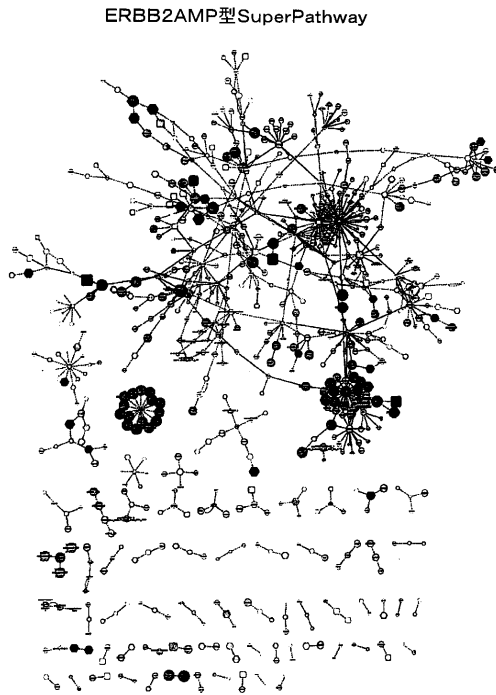


FIGURE 21

【図 2 2】

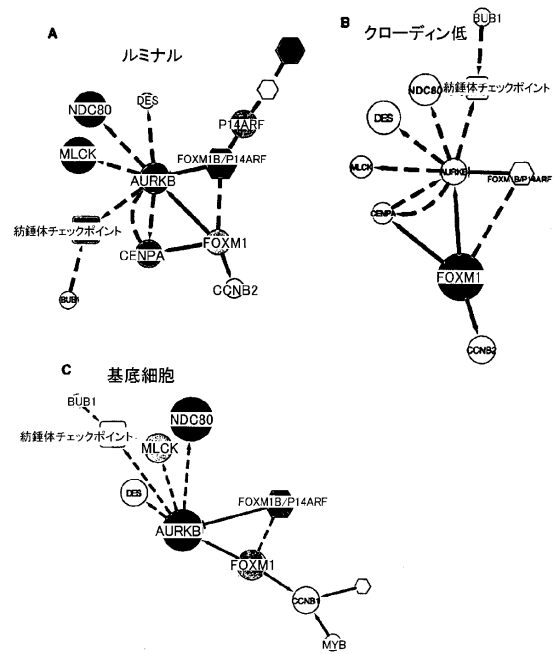


FIGURE 22

【図 2 3】

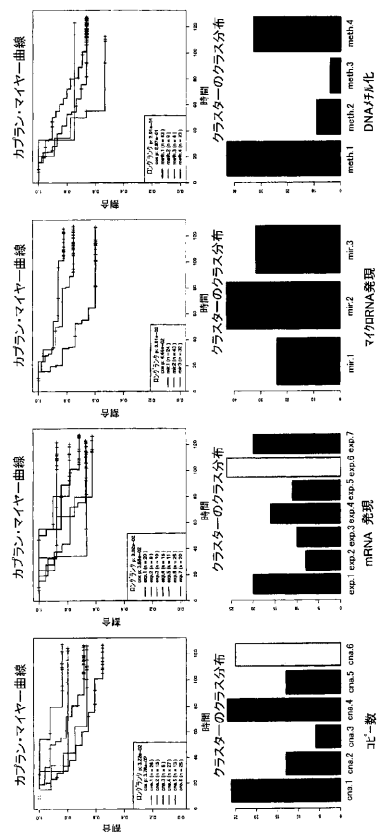


FIGURE 23

【図 2 4】

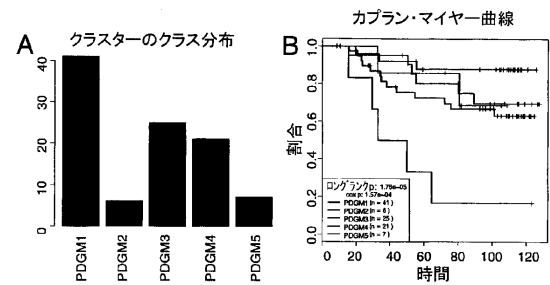


FIGURE 24

【図 25】



【図 2 6】

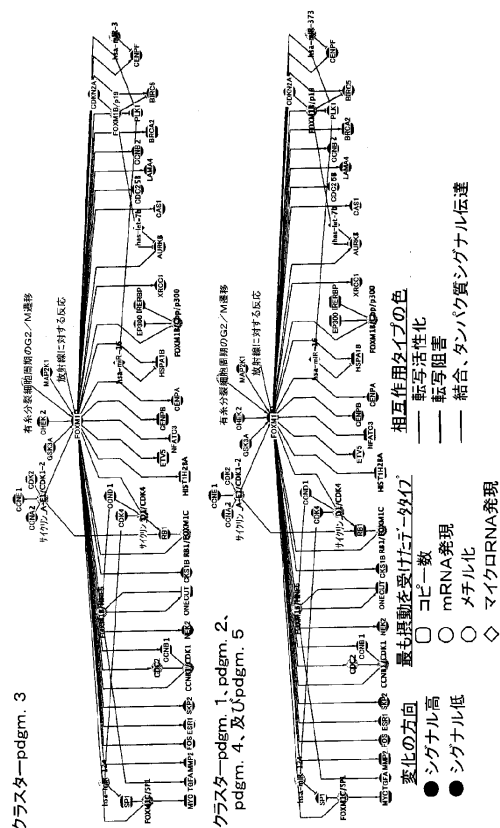


FIGURE 26

【図 27】

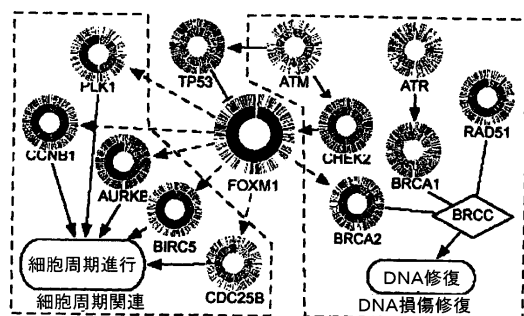


FIGURE 27

【図 28】

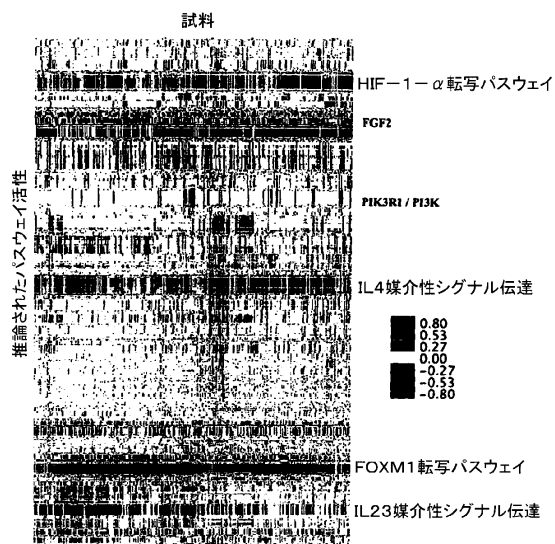
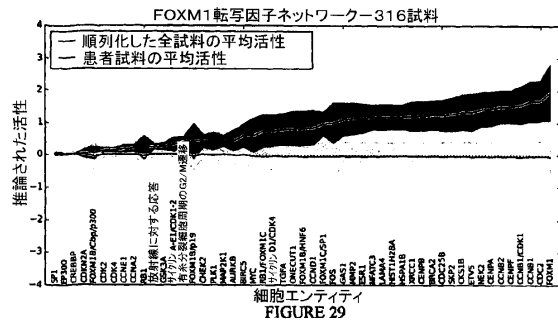
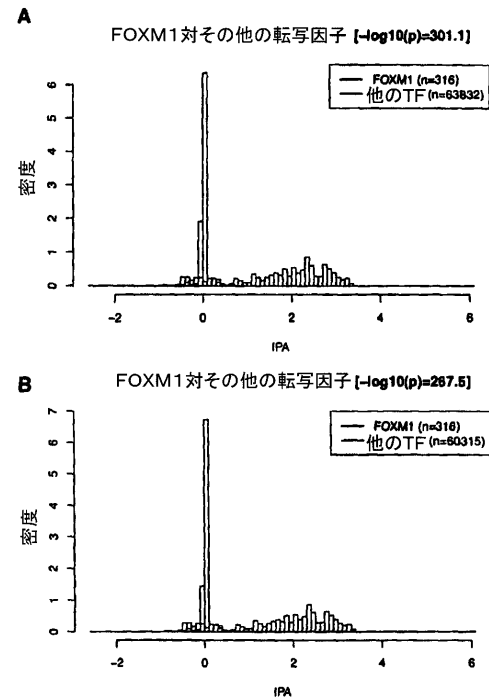


FIGURE 28

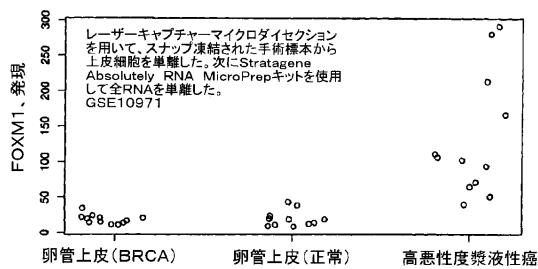
【図 29】



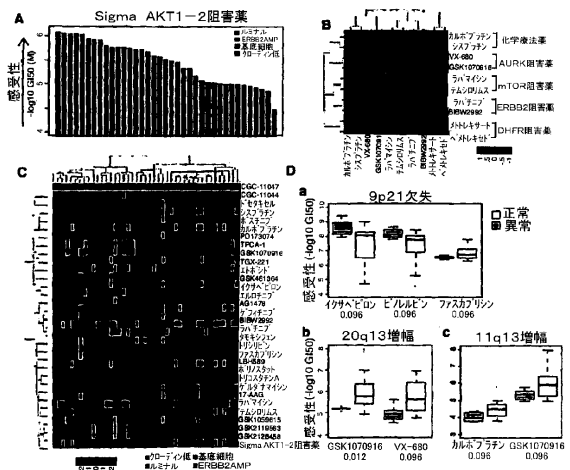
【図 30】



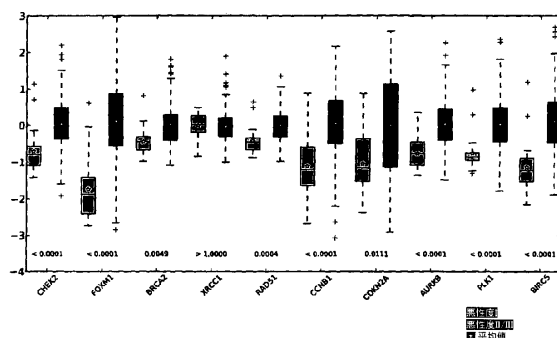
【図 31】



【図 33】



【図 32】



【図 3 4】

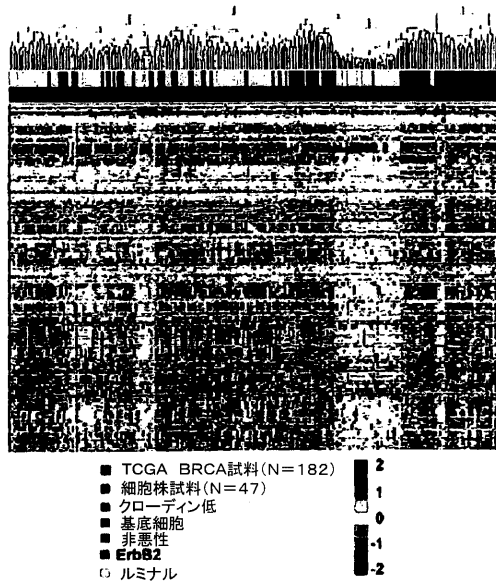


FIGURE 34

【図 3 5】

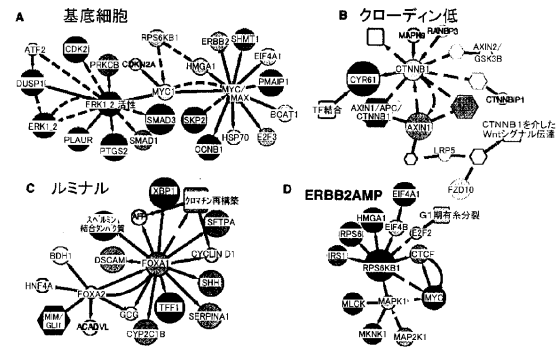


FIGURE 35

【図 3 6】

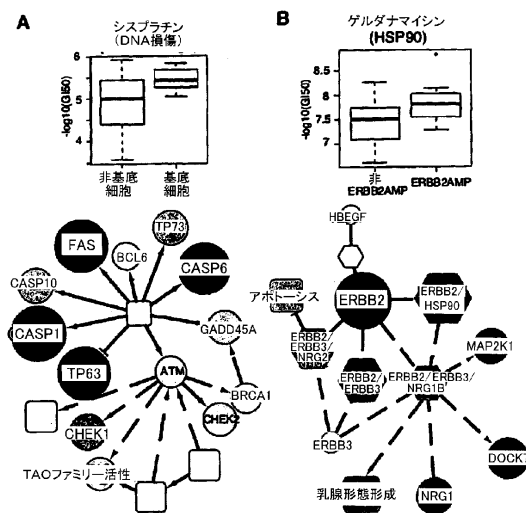


FIGURE 36

【図 3 7】

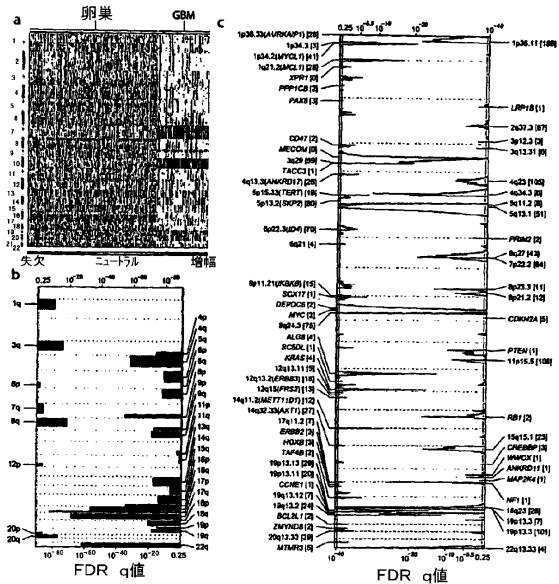


FIGURE 37

【図 38】

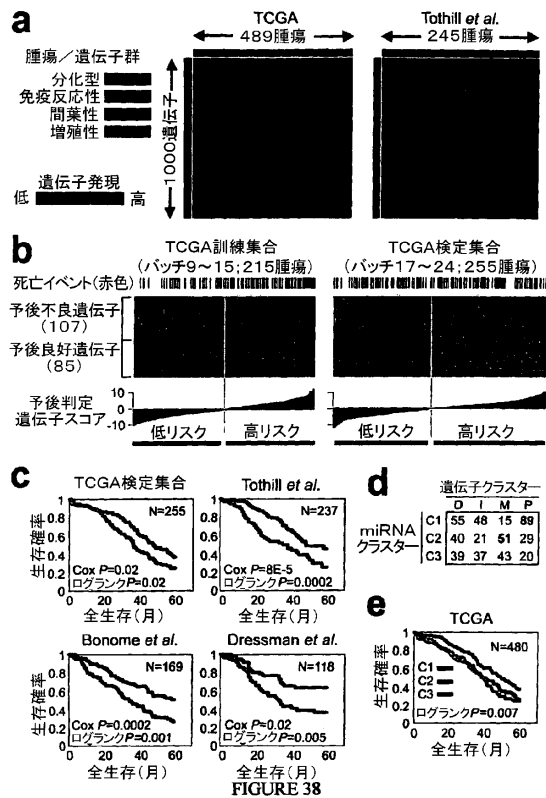


FIGURE 38

【図 39】

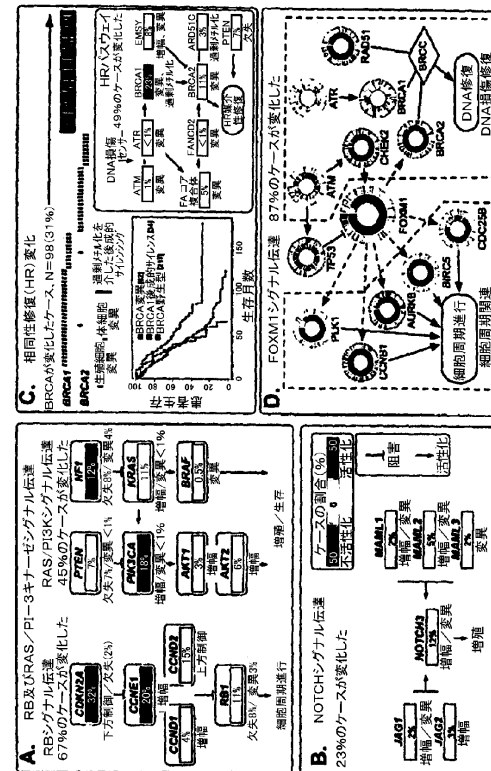


FIGURE 39

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 100183379
弁理士 藤代 昌彦
- (72)発明者 ヴァスク チャールズ ジェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95064 サンタ クルーズ ユニバーシティ オブ カ
リフォルニア サンタ クルーズ内
- (72)発明者 ベンツ スティーブン シー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95064 サンタ クルーズ ユニバーシティ オブ カ
リフォルニア サンタ クルーズ内
- (72)発明者 スチュアート ジョシュア エム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95064 サンタ クルーズ ユニバーシティ オブ カ
リフォルニア サンタ クルーズ内
- (72)発明者 ハウスラー ディヴィッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95064 サンタ クルーズ ユニバーシティ オブ カ
リフォルニア サンタ クルーズ内

審査官 関 博文

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0167763 (US, A1)
米国特許出願公開第2003/0113761 (US, A1)
米国特許出願公開第2006/0122792 (US, A1)
特開2007-011996 (JP, A)
特開2006-122792 (JP, A)
特開2006-185412 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G06F 19/10-19/28