

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-526863

(P2013-526863A)

(43) 公表日 平成25年6月27日(2013.6.27)

(51) Int.Cl.	F 1	C 12 Q 1/68 G01N 33/15 G01N 33/50 G01N 33/53 C 12 N 15/09	Z N A A GO 1 N 33/15 GO 1 N 33/50 GO 1 N 33/53 C 12 N 15/00	テーマコード (参考) 2 G 04 5 4 B 02 4 4 B 06 3 M A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁)				
(21) 出願番号		特願2013-509571 (P2013-509571)		
(86) (22) 出願日		平成23年5月12日 (2011.5.12)		
(85) 翻訳文提出日		平成25年1月11日 (2013.1.11)		
(86) 國際出願番号		PCT/EP2011/057691		
(87) 國際公開番号		W02011/141544		
(87) 國際公開日		平成23年11月17日 (2011.11.17)		
(31) 優先権主張番号		61/334,318		
(32) 優先日		平成22年5月13日 (2010.5.13)		
(33) 優先権主張国		米国(US)		
(31) 優先権主張番号		10162783.4		
(32) 優先日		平成22年5月13日 (2010.5.13)		
(33) 優先権主張国		歐州特許庁(EP)		
(71) 出願人		504177963 ユニバーシテート チューリッヒ スイス国 ツェーハー-8006 チュ リッヒ ラーミシュトラーゼ 71		
(71) 出願人		506110634 イーティーエイチ・チューリッヒ スイス・CH-8092・チューリッヒ・ レーミッシュトラーゼ・101・イーティー エイチ・トランツファー		
(71) 出願人		512292441 パレク アーゲー		
(71) 出願人		ドイツ連邦共和国 40212 デュッセ ルドルフ、コーニングサレー 90		
(74) 代理人		100092783 弁理士 小林 浩		

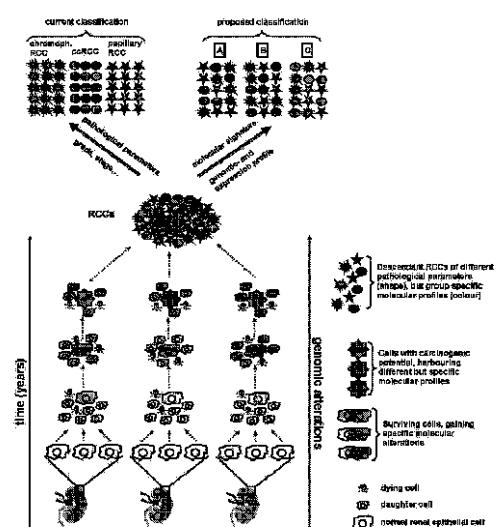
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】バイオマーカーとして用いるための不連続状態

(57) 【要約】

本発明は、試料を分類するための不連続状態及びサインの使用について記載する。

Fig. 7



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも、

- a . 腎細胞癌を患うと疑われているヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、
- b . 表 10 の少なくとも 6 遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、
- c . ステップ b . において決定されたサインに基づき、前記試料に不連続腎細胞癌特異的状態を割り当てるステップと

を含む、腎細胞癌疾患に罹患している疑いがある少なくとも 1 体のヒト又は動物患者における腎細胞癌を診断、予後、層別化及び / 又はスクリーニングする方法。

10

【請求項 2】

少なくとも、

- a . 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、腎細胞癌を患うと疑われているヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、
- b . 表 10 の少なくとも 6 遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、
- c . ステップ b . において決定されたサインに基づき、前記試料に不連続腎細胞癌特異的状態を割り当てるステップと、

d . 前記個体における疾患症状における薬学的に有効な薬剤の効果を決定するステップと、

20

- e . 疾患症状及び / 又は不連続腎細胞癌特異的状態における効果と、試料の初期不連続腎細胞癌特異的状態との間の相関を同定するステップと

を含む、腎細胞癌に罹患している疑いがある少なくとも 1 体のヒト又は動物個体の薬学的に有効な薬剤に対する応答性を決定する方法。

【請求項 3】

少なくとも、

- a . 請求項 2 に記載の方法を用いることにより、薬学的に有効な薬剤の投与の結果、疾患症状及び / 又は不連続腎細胞癌特異的状態における効果と、初期不連続腎細胞癌特異的状態との間に相関が存在するか決定するステップと、

b . 表 10 a サインの少なくとも 6 遺伝子の発現を決定することにより、腎細胞癌に罹患している疑いがあるヒト又は動物個体患者の試料を、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して検査するステップと、

- c . ステップ c . において決定されたサインに基づき、不連続及び不連続腎細胞癌特異的状態特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

d . ステップ c . における試料の不連続及び不連続腎細胞癌特異的状態特異的状態と、ステップ a . において相関が決定された不連続及び不連続腎細胞癌特異的状態特異的状態とを比較するステップと、

- e . 前記患者の疾患症状における薬学的に有効な化合物の効果を予見するステップと
- を含む、腎細胞癌に罹患している疑いがある少なくとも 1 体の患者の、薬学的に有効な薬剤に対する応答性を予見する方法。

30

【請求項 4】

少なくとも、

- a . 薬学的に有効な薬剤が適用される前に、腎細胞癌を患う疑いがあるヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、

b . 表 10 の少なくとも 6 遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、

- c . ステップ b . において決定されたサインに基づき、不連続腎細胞癌特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

d . 薬学的に有効な薬剤が適用された後に、腎細胞癌を患う疑いがある前述のヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、

40

50

e . 表 1 0 の少なくとも 6 遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、

f . ステップ e . において決定されたサインに基づき、不連続腎細胞癌特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

g . ステップ c . 及び f . において同定された不連続腎細胞癌特異的状態を比較するステップと

を含む、腎細胞癌の治療のための潜在的な薬学的に有効な化合物の効果を決定する方法。

【請求項 5】

表 1 0 の遺伝子 1 ~ 2 8 6 が過剰発現され、表 1 0 の遺伝子 2 8 7 ~ 4 5 4 が過小発現される、表 1 0 の少なくとも 1 0 遺伝子の発現パターンによってサインが特徴付けられる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 6】

表 1 0 の遺伝子 1 ~ 2 8 6 が過小発現され、表 1 0 の遺伝子 2 8 7 ~ 4 5 4 が過剰発現される、表 1 0 の少なくとも 1 0 遺伝子の発現パターンによってサインが特徴付けられる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

表 1 1 の少なくとも 6 遺伝子の発現を決定することにより、サインを更に細分できる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

表 1 1 の遺伝子 1 ~ 1 9 が過剰発現され、表 1 1 の遺伝子 2 0 ~ 1 9 5 が過小発現される、表 1 1 の少なくとも 1 0 遺伝子の発現パターンによってサインが特徴付けられる、請求項 7 に記載の方法。 20

【請求項 9】

表 1 1 の遺伝子 1 ~ 1 9 が過小発現され、表 1 1 の遺伝子 2 0 ~ 1 9 5 が過剰発現される、表 1 1 の少なくとも 1 0 遺伝子の発現パターンによってサインが特徴付けられる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

ヒト又は動物個体における腎細胞がんの診断、予後、層別化及び／又はスクリーニングにおける使用のための、表 1 0 の少なくとも 6 遺伝子の発現パターンによって定義されるサイン。 30

【請求項 11】

腎細胞がんの治療のための少なくとも 1 種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び／又はスクリーニングするための標的の読み出し情報としての使用のための、表 1 0 の少なくとも 6 遺伝子の発現パターンによって定義されるサイン。

【請求項 12】

表 1 0 の遺伝子 1 ~ 2 8 6 が過剰発現され、表 1 0 の遺伝子 2 8 7 ~ 4 5 4 が過小発現される、表 1 0 の少なくとも 6 遺伝子の発現パターンによって定義される、請求項 10 又は 1 1 に記載の使用のためのサイン。

【請求項 13】

表 1 0 の遺伝子 1 ~ 2 8 6 が過小発現され、表 1 0 の遺伝子 2 8 7 ~ 4 5 4 が過剰発現される、表 1 0 の少なくとも 6 遺伝子の発現パターンによって定義され、表 1 1 の少なくとも 6 遺伝子の発現パターンによって更に定義される、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の使用のためのサイン。 40

【請求項 14】

表 1 1 の遺伝子 1 ~ 1 9 が過剰発現され、表 1 1 の遺伝子 2 0 ~ 1 9 5 が過小発現される、請求項 1 3 に記載の使用のためのサイン。

【請求項 15】

表 1 1 の遺伝子 1 ~ 1 9 が過小発現され、表 1 1 の遺伝子 2 0 ~ 1 9 5 が過剰発現される、請求項 1 3 に記載の使用のためのサイン。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】**

分子生物学及び分子医学が出現するまでは、疾患の多くは、その表現型の特徴に基づいて分類されてきた。これは当然ながら、表現型の特徴が明らかになったときに初めて疾患を診断できることを意味し、そのときには疾患発症のかなり後期になっている可能性がある。更に近年、類似の表現型が、異なる分子機構に起因し得ることが理解されている。したがって、採用された治療アプローチが正しい原因機構に対処しない場合、厳密に表現型に基づく治療法は、役に立たない可能性がある。

【0002】

10

一例として、乳がんは、腫瘍形成に関して同一の外観をもたらす異なる分子機構によって発生し得る。このような機構のあるものは、Her2の上方制御に関与し、一方、他の機構はこれに関与しないであろう。したがって、Her2の過剰発現に対処する抗体ハーセプチノン(Herceptin)（登録商標）による治療法は、それに対応する機構により罹患した患者にしか役に立たない。疾患の根底にある分子機構を少なくともある程度まで理解しないと、選ばれた治療法は、効果を表さない可能性がある。

【0003】

20

したがって、分子生物学及び分子医学は、疾患発症の分子基盤の解読を目的とする。疾患の分子基盤をより良く理解することは、切迫した又は進行中の疾患発症の早い段階での発見に役立ち、医療従事者による早い段階での治療法の調整又は代替的な治療アプローチの開発を可能にするであろう。例えば、ハーセプチノン（登録商標）が特定の群の患者にしか効果がないことを知つていれば、これらの患者を予め選択して、それに従つて治療することができる。更に、異なる疾患が、少なくともある程度まで同一機構に起因することができる。かかる場合は、ある疾患のみのために本来開発された薬物を他の疾患の治療用に検討することもできる。当然ながら、このためには、問題の疾患に特徴的であり、適切な治療選択のための関連する機構、関連する臨床エンドポイント及び関連する判断基準に関する、多くの場合バイオマーカーと呼ばれる分子マーカーが手近にあることが必要とされる。このようなマーカーは、DNA、RNA又はタンパク質レベルにおいて見出され得る。

【0004】

30

単一遺伝子(monogenetic)疾患の場合、疾患がある確率で発生するか否か予見するためにDNAレベルの異常を用いることができるため、分子マーカーの診断ツールとしての使用は、比較的単純明快である。例えば、DNAレベルにおける三塩基配列伸長(trinucleotide expansion)は、個体がハンチントン舞蹈病を発症するか予見するために用いることができる。同様に、生存運動ニューロン(Survival of Motor Neuron)遺伝子における変異は、個体が脊髄性筋萎縮症を発症するか予見するために用いることができる。

【0005】

40

腫瘍疾患の分子理解の当初から、腫瘍発生、悪性度、進行、転移形成、治療応答性、生存時間並びに臨床医にとって及び効率的な治療法の開発にとって重要な他の機能特性に関連する分子マーカーを定義することが望まれてきた。多くの有用なマーカー、第一に組織切片(大切片、細針生検)、体液、スメア(smear)(血液、糞便、痰、尿)由来又は毛髪試料等、試料の検査のための病理学的マーカーが同定されてきた。炎症又は進行中のアポトーシスのマーカー、代謝特性のマーカー、或いはRas、Myc、CDK等、癌遺伝子と、p16、p27又はp53等、腫瘍抑制遺伝子との間のバランスの調節解除により誘導された腫瘍誘導の機構の理解から得られた分子マーカー等、多くのマーカーが、同定された(例えば、「The Hallmarks of cancer」(2000)におけるHanahan & Weinbergを参照)。

【0006】

血管外漏出、浸潤及び免疫応答回避等、制御されない細胞増殖、老化及びアポトーシス回避等、腫瘍発生機構の具体的な理解は、腫瘍抑制遺伝子仮説を更に強調した。

【0007】

50

しかし、がんを含む過剰増殖性(hyper-proliferative)疾患等、大多数の疾患は、単一遺伝子原因に起因せず、異常で複合的な分子相互作用によるものである。

【0008】

例えば、がんは、複合的分子ネットワークの調節解除(軽微なものから重大なものまで)によって生じる多因子疾患の典型例であると考えられる。多くの場合、この疾患は、単一遺伝子の変異からは発症せず、寧ろ様々な遺伝子における変異の蓄積に起因する。単一の変異それぞれは、それ自体では疾患発症の開始に十分ではない可能性がある。それどころか、変異の経時的な蓄積は、細胞内の複合的分子シグナル伝達ネットワークをますます調節解除すると思われる。したがって通常、このような場合、疾患発症は、重要事象によって特徴付けることのできない緩やかで連続的な過程であると考えられてきた。その結果、このような疾患は、単一のバイオマーカーでは診断又は分類できないが、疾患の根底にある複合的分子機構を理想的には単純化された様式で反映するマーカー群によって診断又は分類できると一般に仮定される。

10

【0009】

多くのヒトがんから大量の分子情報を利用できるにもかかわらず、現在のがん研究は、依然として主に、血管新生増強等、薬物標的となる可能性がある腫瘍型特異的バイオマーカー候補を理想的には有する、単一の、高頻度で変化した染色体上の座位に焦点を置いており、これは、Her受容体ファミリー並びにそのリガンド及び関連する変異体の腫瘍促進的な役割の理解をもたらしている。このような試みの一部は、実際に、腫瘍治療法選択のための特定の有用なマーカーをもたらした(Her-2受容体が増幅した患者のためのハーセプチン(登録商標)治療)。

20

【0010】

これらの結果は全て、主に最高の専門家知識から得られた。一般及び通常の仮定として、腫瘍は、上述の標的発現のために正常組織とは異なっている筈である。したがって、多くの場合病理学的パラメータ(腫瘍サブタイプ、グレード又はステージ分類等)と関連付けられる大部分の研究は、単一の標的の調査に集中的に取り組む。特定の経路におけるその役割及びその結合パートナーは、適切な細胞株又はマウスモデルにおいて明らかになるとしても、ネットワーク全体の一部としてのその特定の役割は、依然として不明のままである。

30

【0011】

ヒトゲノムプロジェクトは、疾患に罹患した個体間又は個別の細胞間の個々のゲノム変種の解析、それぞれのトランスクriptーム、プロテオーム等の解析等、そのあらゆるスピノフ(spin-off)プロジェクトと共に、多種多様な有用バイオマーカーを直接もたらすと想定してきた。興味深いことに、これらのアプローチの多くにおいて、異なる分子経路を有する疾患に観察された表現型の差異を関連付ける試みが再度なされた。

【0012】

例えば、肺がん又は前立腺がん等、例えば臓器レベルで、或いは例えば細胞型レベルで数種の明確に弁別可能なマーカーと明らかに関連する多くの疾患の種類及びサブタイプが存在する。バイオマーカーを同定するため的一般的な概念は、このような表現型をバイオマーカーの別個の組合せと関連付け、これによりそれぞれの表現型を示す特定の疾患サブタイプの診断を可能にすることである。例えば、このようなアプローチは、健常個体に対する罹患した患者の小細胞肺がん組織又は非小細胞肺がん組織における異なるプロテオーム発現パターンの同定を試み、続いて、このような発現パターンを将来的な患者の診断に用いる。興味深いことに、これらのアプローチは、多くの場合、生存時間等、臨床的に関連するパラメータと、マーカーとの関連付けに着目しない。しかし、データの豊富さ及び複雑さは、このようなパターンの明快な同定をある程度妨げてきた。

40

【0013】

よって、分子レベルにおける疾患の分類と、例えば診断目的に用いることのできるバイオマーカーの提供とを可能にするツールが引き続き必要とされる。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0014】**

本発明の一目的は、好ましくは、臨床上又は薬理学的に関連するエンドポイントとの明らかな相関による、疾患の分類に適切且つ特異的な新しいタイプのマーカーを提供することである。

【0015】

本発明の別の目的は、好ましくは、臨床上又は薬理学的に関連するエンドポイントとの明らかな相関による、疾患の分類に適切且つ有効なマーカーを検出するための方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0016】**

後に続く説明から明らかになる上述及び他の目的は、独立請求項の内容により達成される。従属請求項は、本発明の好適な実施形態の一部に関する。

【0017】

本発明は、基本的にあらゆる種類の腫瘍に対する、また、潜在的には非腫瘍疾患に対する臨床的関連性の網羅的且つ機能的なバイオマーカーのための戦略的且つ直接的なアプローチを提供する。不連続安定又は準安定(meta-stable)状態に関連する腫瘍に関する本知見により、あらゆる種類の腫瘍に対するこのような不連続状態の存在の同定及び証明だけでなく、このような状態と関連する記述子(descriptor)及びサイン(signature)によるこのような状態の割り当てを当業者に行わせる方法を定義できるようになった。更に、本技術は、所定の腫瘍細胞試料における別の状態からこのような不連続状態のそれを疑いの余地なく同定及び識別する、最小限の記述子の同定を可能にする。

【0018】

このような状態の理解は、定量的測定値及び実験アクセスの容易さのために大きなダイナミックレンジを有する記述子の同定も可能にする。

【0019】

よって、本発明は、根底にある分子機構を反映する不連続状態によって疾患が特徴付けられ得るとの驚くべき知見に基づく。興味深いことに、このような不連続状態同士は互いに別個のものであり、これにより疾患発症は、連続的な過程によって特徴付けられているとは思われない。そうではなく、不連続状態は、別の不連続状態への切換えが為される特定の閾値レベルに達するまで維持されているように思われる。更に、不連続状態は、臨床上及び薬理学的に重要なパラメータと関連付けできるように思われる。しかし、必ずしも標準組織学的分類スキームと一致すると思われる必要はない。

【0020】

各不連続状態は、異なるサインによって説明することができる。サインは、少なくとも1種類の記述子の定性的及び/又は定量的出現を反映するパターンである。好ましくは、サインは、複数の記述子の定性的及び/又は定量的出現を反映するパターンである。記述子は、原則として、試験できるいかなる分子、機能、サイズ、形態又は細胞に関連付けることのできる他のパラメータであってもよい。よって、記述子は、例えば、遺伝子又はタンパク質やRNA等の遺伝子関連分子となることができる。このような分子の発現パターンは、サインを定義することができる。

【0021】

本発明のこれらの知見は、様々な診断、予後及び治療目的に用いることができる。これらの知見は、過剰増殖性疾患等、疾患の新しい治療の研究及び開発に用いることもできる。

【0022】

よって、本発明は、その一態様において、過剰増殖性疾患等、疾患に罹患している疑いがある患者から得られた試料の分類における診断及び/又は予後マーカーとして用いるための少なくとも1種類の不連続疾患特異的状態に関する。本発明は、過剰増殖性疾患等、疾患の細胞株の分類における診断及び/又は予後マーカーとして用いるための少なくとも

10

20

30

40

50

1種類の不連続疾患特異的状態に更に関する。本発明は、また、薬学的に有効な化合物を開発、同定及び／又はスクリーニングするための標的として用いるための少なくとも1種類の不連続疾患特異的状態に関する。

【0023】

不連続疾患特異的状態は、サインによって決定することができるため、本発明は、その一実施形態において、過剰増殖性疾患等、疾患の罹患が疑われる患者から得られた試料の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための少なくとも1種類のサインに関する。本発明は、また、過剰増殖性疾患等、疾患の細胞株の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための少なくとも1種類のサインに関する。本発明は、薬学的に有効な化合物を開発、同定及び／又はスクリーニングするための標的の読み出し情報(read out)として用いるための少なくとも1種類のサインに更に関する。

10

【0024】

一部の実施形態において、本発明は、サイン及び不連続疾患特異的状態を利用することにより、過剰増殖性疾患等、疾患を診断する方法に関する。

【0025】

本発明は、また、サイン及び不連続疾患特異的状態を利用することにより、過剰増殖性疾患等、疾患を患有試験集団の、薬学的に有効な薬剤に対する応答性を決定する方法に関する。

【0026】

更に、本発明は、サイン及び不連続疾患特異的状態を利用することにより、臨床治験において過剰増殖性疾患等、疾患を患有患者の、薬学的に有効な薬剤に対する応答性を予見する方法に関する。

20

【0027】

本発明は、また、サイン及び不連続疾患特異的状態を利用することにより、潜在的な薬学的に有効な化合物の効果を決定する方法に関する。

【0028】

不連続疾患特異的状態及びサインの特定の使用に加えて、本発明は、また、患者に由来しても、例えば細胞株に由来してもよい試料におけるサイン及び不連続疾患特異的状態を同定するための方法に関する。

30

【0029】

本発明のこれらの実施形態は全て、がん等、過剰増殖性疾患を含む疾患との関連、好ましくは、腎細胞癌との関連で用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1A】解析した症例のパーセンテージとして示した、RCCにおける領域的ゲノムCNAを示す図である。第1～第22染色体(方向を示すために偶数の染色体番号が表示されている)における不均衡頻度が、-50～50スケールのパーセンテージとして示されている。上パネル：45例の試験症例における全CNAの描写であり、ゲノム増加はゼロ線より上に表され、ゲノム減少はゼロ線より下に表されている。下パネル：Progene tixデータベース(472症例)を通じてアクセスできる、公表されている染色体及びアレイCGH RCCデータ。CNVは、100kbサイズ限界の適用以外は、試験症例データにフィルターをかけていない。ゲノム増加はゼロ線より上に表され、ゲノム減少はゼロ線より下に表されている。

40

【図1B】PANTHER分類のアウトプットにより、SNPにより以前に同定された57遺伝子が、76種の上位の(superior)生物学的プロセスとマッチングされる。4種の優位な「ネットワーク」に番号が振られている。Y軸は、ネットワークに関して発見された遺伝子数を0～38のスケールで表示する。注：マッチングの有効性を増加させるために、最初の769遺伝子のリストを「PubMed」と及び「Cellera」データバンクに対し同時に走査した。したがって、この棒グラフには多岐にわたるアウトプット数が示されている(ex. 遺伝子/全遺伝子)。

50

【図2A】本出願人らのRCC実験から得られた147種のマイクロアレイのセットに亘る、PANTHERによりアノテートされた血管新生由来の遺伝子を表す、HG-U133Aマイクロアレイプローブセットの階層的クラスタリングを示す図である。遺伝子発現の相対的な、青：増加、白：減少。「経路」毎に、RCC試料の全体分割を高度に表す最大4種のプローブセットクラスター（ボックス）が選択された。SAMソフトウェアによりクラスターを同定した。各列（row）は、各経路に対し解析された遺伝子を指定する。各行（line）は、解析された試料を表す。行の横と列の上にある濃度描写図（densogram）は、試料及び遺伝子のグループ化を表示する。

【図2B】本出願人らのRCC実験から得られた147種のマイクロアレイのセットに亘る、PANTHERによりアノテートされた炎症由来の遺伝子を表す、HG-U133Aマイクロアレイプローブセットの階層的クラスタリングを示す図である。遺伝子発現の相対的な、青：増加、白：減少。「経路」毎に、RCC試料の全体分割を高度に表す最大4種のプローブセットクラスター（ボックス）が選択された。SAMソフトウェアによりクラスターを同定した。各列（row）は、各経路に対し解析された遺伝子を指定する。各行（line）は、解析された試料を表す。行の横と列の上にある濃度描写図（densogram）は、試料及び遺伝子のグループ化を表示する。

【図2C】本出願人らのRCC実験から得られた147種のマイクロアレイのセットに亘る、PANTHERによりアノテートされたインテグリン由来の遺伝子を表す、HG-U133Aマイクロアレイプローブセットの階層的クラスタリングを示す図である。遺伝子発現の相対的な、青：増加、白：減少。「経路」毎に、RCC試料の全体分割を高度に表す最大4種のプローブセットクラスター（ボックス）が選択された。SAMソフトウェアによりクラスターを同定した。各列（row）は、各経路に対し解析された遺伝子を指定する。各行（line）は、解析された試料を表す。行の横と列の上にある濃度描写図（densogram）は、試料及び遺伝子のグループ化を表示する。

【図2D】本出願人らのRCC実験から得られた147種のマイクロアレイのセットに亘る、PANTHERによりアノテートされたWnt「経路」由来の遺伝子を表す、HG-U133Aマイクロアレイプローブセットの階層的クラスタリングを示す図である。遺伝子発現の相対的な、青：増加、白：減少。「経路」毎に、RCC試料の全体分割を高度に表す最大4種のプローブセットクラスター（ボックス）が選択された。SAMソフトウェアによりクラスターを同定した。各列（row）は、各経路に対し解析された遺伝子を指定する。各行（line）は、解析された試料を表す。行の横と列の上にある濃度描写図（densogram）は、試料及び遺伝子のグループ化を表示する。

【図3】RCCのA、B、C群及び細胞株の同定を示す図である。最も有意な生物学的プロセスのクラスタリングから構築された92遺伝子に対する147種のRCC試料のAffymetrix発現マイクロアレイデータの二元配置（Two-way）階層的クラスタリング。遺伝子発現の相対的な、青：増加、白：減少。SAMソフトウェアによりクラスターを同定した。各列は、解析された遺伝子を指定する。各行は、解析された試料を表す。行の横と列の上にある濃度描写図は、試料及び遺伝子のグループ化を表示する。

【図4A】RCC群及び異なるがん型特異的サインの色分け地図（Heatmap）を示す図である。黄又は赤（絶対値）は、遺伝子発現の相対的増加を表示し、青又は緑（腫瘍対正常組織の比）は、相対的減少を表示する。過剰発現が観察される領域は、矢印で表示されている。A) A、B及びC型腫瘍のサブセットに亘る、腫瘍型A及びCに対する腫瘍型Bの約50種の最良の分類指標（classifier）の遺伝子発現（左の像）。GENEVESTIGATORによるこれら遺伝子の比較メタ解析は、同一発現サインを有する複数の他の腫瘍型を明らかにした（右の像）。列は試料を表示し、行は遺伝子を表示する。最初の34行（上から下へ、左右の像）は、表1の順番の遺伝子に対応する。最後の16行（上から下へ、左右の像）は、表2の順番の遺伝子に対応する。最初の16列（左から右へ、左の像）は、その内7種が乳頭状RCC、9種が明細胞RCCである試料に対応する。これら全て状態Bであった。次の24列（左から右へ、左の像）は、その内7種が乳頭状RCC、17種が明細胞RCCである試料に対応する。これら全て状態A又はCのいずれかであ

10

20

30

40

50

った。次の20列（左から右へ、右の像）は、その内4種が腎臓がん及びRCC、3種が乳がん、1種が多発性骨髄腫、1種が付属器漿液性癌（adnexal serous carcinoma）、4種が未分化大細胞リンパ腫、1種が口腔扁平上皮癌、1種が胃がん、1種が結腸直腸腺腫、4種が血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫である試料に対応する。これらは、状態A又はCのいずれかであった。次の8列（左から右へ、右の像）は、その内1種が胃腫瘍、6種が卵巣腫瘍、1種がアルドステロン産生腺腫である試料に対応する。これら全て状態Bであった。左の像において、左上部分及び右下部分は、過剰発現を表示する。左下部分及び右上部分は、発現低下を表示する。破線は、左、右、上及び下部分を表示する。右の像において、左上部分及び右下部分は、発現低下を表示する。左下部分及び右上部分は、過剰発現を表示する。破線は、左、右、上及び下部分を表示する。

【図4B】B) A及びC型腫瘍のサブセット（左の像）、並びにGENEVESTIGATORにおいて同定された相関する他の腫瘍（右の像）に亘る、腫瘍型Cに対する腫瘍型Aの24種の最良の分類指標の遺伝子発現。全サインはがん特異的であり、対応する「正常」組織において検出不能である。列は試料を表示し、行は遺伝子を表示する。最初の5行（上から下へ、左右の像）は、表3の順番の遺伝子に対応する。最初の2行は、同一遺伝子（RARRES1）の異なるアイソフォームを表す。最後の19行（上から下へ、左右の像）は、表4の順番の遺伝子に対応する。最初の9列（左から右へ、左の像）は、全て明細胞RCCである試料に対応する。これら全て状態Aである。次の15列（左から右へ、左の像）は、その内7種が乳頭状RCC、8種が明細胞RCCである試料に対応する。これらは状態Cである。次の4列（左から右へ、右の像）は、その内2種が腎臓がん、2種が甲状腺がんである試料に対応する。これらは状態Aである。次の12列（左から右へ、右の像）は、その内2種が子宮頸部扁平上皮癌、1種が腺癌、1種が付属器漿液性癌、3種が膀胱がん、5種が乳がんである試料に対応する。これらは状態Cである。左の像において、左上部分及び右下部分は、発現低下を表示する。左下部分及び右上部分は、過剰発現を表示する。破線は、左、右、上及び下部分を表示する。右の像において、左上部分及び右下部分は、発現低下を表示する。左下部分及び右上部分は、過剰発現を表示する。破線は、左、右、上及び下部分を表示する。

【図4C】C) 矢印で状態A、B又はCと表示される3群を同定する、HG-U133Aアレイの全プローブセットに亘る40種のRCC試料の階層的クラスタリング（左）。3種のRCC群を明らかにする、SNPアレイ解析から同定された769遺伝子のサブセットを表す662種のプローブセットから得られた発現シグナル値に基づく40種の（色分けされている）RCC試料の階層的クラスタリング（右）。濃度描写図は、40種のRCC試料間の関係性を反映する。

【図4D】D) 176名のRCC患者における腫瘍特異的生存率のカプラン-マイヤー解析。A（高MVD、DEK及びMSH陽性）、B（MSH6陰性）及びC（低MVD、DEK及びMSH陽性）にグループ化されている（対数順位検定： $p < 0.0001$ ）。y軸は、生存者のパーセンテージを0%～100%スケールで表示する。x軸は、平均生存時間を0～100ヶ月スケールで表示する。

【図5】マーカーCD34、DEK及びMSH6の組合せの抗体染色によるRCC検査TMAを用いて、A、B及びC群を定義した。拡大画像は、内皮微小血管（CD34）及び腫瘍細胞の核（DEK及びMSH6）の特異的染色を図示する。

【図6】異なる抗体によるRCC検査の解析を示す図である。

【図7】腎細胞がんの漸進的变化による（evolutionary driven）分子分類モデルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

以下に例示的に説明する本発明は、本明細書に特に開示されていない要素（単数又は複数）や制約（単数又は複数）なしで適宜実施することができる。

【0032】

特定の実施形態に関し特定の図を参照しつつ本発明を説明するが、これは本発明を限定

するものではなく、本発明は特許請求の範囲のみにより限定される。下文に記す用語は、一般に、他に断りがなければ常識的な範囲のものであると理解されたい。

【0033】

本明細書及び特許請求の範囲において、用語「を含む（comprising）」が用いられている場合、この用語は他の要素を除外しない。本発明のため、用語「からなる（consisting of）」は、用語「で構成される（comprising of）」の好適な実施形態であると考慮される。下文において、ある群が、少なくともある一定数の実施形態を含むと定義される場合、これは、好ましくはこれら実施形態のみからなる群も開示すると理解されたい。

【0034】

単数名詞について述べるときに不定冠詞又は定冠詞（例えば、「a」、「a n」又は「the」）が用いられる場合、他に特に記されていなければ、これは該名詞の複数を包含する。

【0035】

本発明の文脈において、用語「約」又は「およそ」は、問題の特色的効果を依然として保証すると当業者が理解するであろう正確性の幅を意味する。この用語は、通常、表示されている数値の±10%、好ましくは±5%の偏差を指す。

【0036】

上述の通り、疾患特性評価のための診断ツール探索における以前の試みは、疾患発症が連続的な過程であると仮定し、例えば肺がん等のがんの異なる主に組織学的表現型を特異的な発現パターンに関連付けようとしたが、これは、異なる検出可能な表現型が、連続的で進行性の疾患発症を反映すると仮定したためである。

【0037】

それに代わり、本発明は、過剰増殖性疾患の異なるサブタイプに確立された組織学的特性評価とは必ずしも相関しないが、生存時間等、臨床的に関連するパラメータと関連付けることのできる不連続疾患特異的状態の限定的なセットにより、過剰増殖性疾患等の疾患を包括的に説明できるであろうとの知見に基づく。特定の科学理論又は専門家の知識に縛られることは望まないが、疾患が、不連続疾患特異的状態へと切り換えることにより特徴付けられるとの仮説を立てる。この仮説は、細胞内における制御ネットワークの調節解除が、全体の不連続状態に影響を与えることなく一定の閾値レベルまで生じ得ることを示唆する。しかし、ひとたび閾値レベルを超えると、細胞は、別の特異的不連続状態に切り換わるものと思われる。したがってこれらの状態は、切り換わる前にある程度の変動が可能であるという点において安定的又は準安定的であると考慮することができる。本出願人らは、異なる制御ネットワーク間及びネットワーク内の相互作用の流れ及び範囲を反映する不連続状態を理解する。細胞は、異なる不連続状態へと切り換わると思われるため、このような切換えは、疾患の攻撃性の変化を生じ得る、また、異なる不連続状態を例えば異なる平均生存時間に関連付けることができる理由の説明にも役立ち得る、異なる制御ネットワーク間及びネットワーク内の相互作用の流れ及び範囲の主要な再編成を表示するものと思われる。

【0038】

興味深いことに、腎細胞癌又は卵巣がん等、異なる種類の過剰増殖性疾患において見出すことのできる不連続状態が存在し、このことは、これら疾患の少なくとも一部の形態が、同等な分子機構に関与することを示し得る。更に、特定の過剰増殖性疾患においてのみ見出すことのできる不連続状態が存在し得る。

【0039】

このような異なる制御ネットワーク間及びネットワーク内の相互作用の範囲及び流れは、例えば、このような制御ネットワーク内の例えばタンパク質の発現レベルによって検出可能となり得る。着目される分子構造物は、記述子と呼ぶことができる。記述子のセットに対し検出されるパターンは、サインとして考慮することができる。上述の具体例において、サインは、記述子として機能するタンパク質の発現パターンとなるであろう。当然ながら、異なる種類の記述子及び異なる種類のサインを選ぶことができる。よって、RNA

10

20

30

40

50

レベルの遺伝子発現レベルに着目してもよい。m i R N A の制御に着目しても、いっそ特定の因子の細胞局在等、記述子の定性的分布又は細胞の形状に着目してもよい。サインを定義するために、同一種類の分子（例えば、m R N A）の記述子の所定のセットを用いても、異なる分子（m R N A、タンパク質及びm i R N A等）群である記述子の所定のセットを用いてもよく、異なるサインは、例えば異なる発現パターンを反映する。よって、本発明の論理に従い、不連続状態は、異なるサインと相関し得ることに留意することが重要である。しかし、単一のサインは、1種類の不連続状態のみを定義するであろう。

【0040】

下文に記す通り、本発明により、異なるサインによって同一の不連続状態を特徴付けることができる。

10

【0041】

腎細胞癌（R C C）に関し下文に説明する通り、このような不連続疾患特異的状態は、平均生存時間等、医学的に重要なパラメータと関連付けることができる。しかし、興味深いことに、不連続疾患特異的状態は一般的な組織学的分類スキームと必ずしも相関せず、これは、例えば異なる患者の乳頭状R C Cを異なる不連続分子状態によって特徴付けることができ、よって、患者のがんが組織学的標準により同等であると分類されたとしても、患者が異なる生存期待値を有する可能性があることを意味する。更に、R C Cに存在する不連続分子状態の一部が、他のがん型においても検出できることが見いだされ、これは、通常無関係であると考えられる異なるがんが、実際には、不連続状態を定義する同一分子相互作用に少なくともある程度起因することを示唆する。

20

【0042】

このように、腫瘍の分子的な新規分類を目標とする発癌の新しい解釈が示唆される。この新規分類は、不連続疾患特異的状態及びサインの同定を可能にする。サインは、現在の臨床病理学的（即ち、腫瘍ステージ、サブタイプ、分化グレード、腫瘍特異的生存）、遺伝学的（即ち、対立遺伝子増加（allelic gain）／「癌遺伝子」発現の増加、対立遺伝子欠失（allelic loss）／「腫瘍抑制遺伝子」発現の減少）及び生物学的（即ち、フォンヒッペル-リンダウタンパク質制御経路）な評価の先入観なく、最初にモデルとして腎細胞癌（R C C）において精査された。

【0043】

異なる種類の疾患において存在し得る異なる不連続疾患特異的状態により、過剰増殖性疾患等、疾患を特徴付けることができるとの知見は、重要な意味を持つ。

30

【0044】

不連続疾患特異的状態（複数可）は、患者及びその試料を別個の群へと分類するためには用いることができる。不連続疾患特異的状態は、生存時間又は別の薬物への応答性等、臨上重要なパラメータと更に関連付けることができるため、治療計画の選択において有用となるであろう。このように、不連続分子状態（複数可）は、腫瘍を臨床的に関連するサブグループ、例えば、R C C、卵巣がん、乳がん等のサブグループへと分類する新しい仕方を提供する診断及び／又はマーカーとして用いることができる。

【0045】

新規医薬品の開発に向けた多くのプロジェクトは、既存の治療法との差別化が不十分であること、確実性を欠く統計データ又は第I I 相若しくは第I I I 相の膨大な患者数を必要とすること（これは数百万ドルの投資と長大な時間を要求する）に苦しんでいる。しかし、薬物が、例えば肺がんのサブタイプを患い、相互作用する分子ネットワークの同一の不連続疾患特異的状態によって特徴付けられる選択された患者群のみに優先的に作用することが示され得るのであれば、この薬物は、異なる疾患を患うが、同一の不連続分子状態によって特徴付けられる他の患者において検査することができる。このような臨床治験は、より小さな患者群に対し統計的に信頼のおける結果をもたらすであろうと予想できる。実際に、大規模な臨床治験が、多くのノンレスポンダーによりいかなる統計的に有意義な結果解釈もできず結果を出すことができなくても、これにより治療が有効であることを示すことができる。

40

50

【 0 0 4 6 】

このように、不連続状態は、臨床治験のための患者のグループ化を可能にするため、薬理学的治療の検査のための層別化ツールを提供する。実質的に生存時間の重大なパラメータにプラスの影響を与えると予想又は期待される薬物候補が同定されたと仮定すると、F D A 認可を受けるために臨床治験によってこれを証明する必要がある。将来的な薬物は、機構的な治療介入に重点を置くことになるであろう。機構的に有効な薬剤は、臨床エンドポイントパラメータ「生存時間」に関して成功する場合、恐らく、パラメータ「生存時間」と関連付けられた機構と選択的に相互作用する。これらの機構的サブグループはまさに、例えば、本発明によって可能になった不連続分子状態によって定義されたサブグループである。よって、ほぼ確実に、ある患者サブグループが、別のサブグループとは異なる程度に陽性反応することができる。この患者コホート特異的不均衡の知識は、薬物認可を求めている業界にとって最大級に重要であり、これを知ることは、医師が最適の治療計画を選ぶために、また支払人（payor）が、治療成功の見込みを持って患者に最も効率的に金銭を使うために重要である。平均余命延長の観点において最大の相対効果で反応するサブグループの定義はいずれも、F D A 登録の可能性を高める。

10

【 0 0 4 7 】

不連続疾患特異的状態に関する知識は、医薬製品開発における標的としてこれら状態の使用も可能にする。例えば、異なる不連続特異的疾患状態は、生存時間又は特定の薬物に対する奏効率等、臨床的に関連するパラメータと関連付けることができる。薬剤が、試料又は細胞株における不連続疾患特異的状態を、短い生存時間と関連付けられる状態から長い生存時間の状態へと切り換えることが示される場合、このような切換えは、薬剤が問題の疾患の治療において治療上有効となり得ることの指標として用いることができる。このように、不連続疾患特異的状態と、例えば関連する臨床パラメータとの間の相関を利用するアッセイを考案することができる。

20

【 0 0 4 8 】

更に、不連続疾患特異的状態それ自体が存在することを知っていると、新しい不連続疾患特異的状態の同定ができるようになる。例えば、本発明は、R C C を 3 種の異なる不連続疾患特異的状態によっておおまかに特徴付けできることを示す。このような不連続疾患特異的状態の一部は、例えば、卵巣がん等、R C C とは異なるがんにも更に存在することが示されている。しかし、全ての卵巣がんが、R C C に見いだされた不連続状態に関連付けられるという訳ではなく、これは、卵巣がんに対して異なる不連続疾患特異的状態を同定する必要があることを意味する。この文脈において、本発明はまた、不連続分子状態を同定するための、或いは実質的な患者サブセットの新規不連続疾患特異的状態を統計的に除外するための方法を提供する。例えば、本発明は、R C C の全症例が、3 種の別個の不連続疾患特異的状態に起因し得ることを示す。

30

【 0 0 4 9 】

これらの方法の論理は、不連続状態下の不連続準状態（substate）と、不連続準状態下の更なる不連続準状態（命名法を分かり易くするため不連続レベルと呼ぶことができる）の定義に用いることもできる。この不連続準状態及び不連続レベルは、疾患の更により細かいレベルでの説明を可能にし得る。

40

【 0 0 5 0 】

よって、本明細書において同定された特異的不連続疾患特異的状態は、R C C を特徴付けるだけではなく、一般に他のがん又は疾患の特徴付けに用いることもできる。更に、これは、他の不連続疾患特異的状態が、これら他の疾患に存在するかの指針を提供することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明は、このような不連続疾患特異的状態それ自体を同定するための方法と、不連続疾患特異的状態の検出に用いることのできる記述子のサインを同定するための方法とを更に提供する。R C C に関し、本発明は、その発現パターン（即ち、サイン）が、平均生存時間に応じたR C C の分類を可能にする遺伝子記述子のリストを実際に提供する。

50

【 0 0 5 2 】

不連続疾患特異的状態が存在し、そのあらゆる面で疾患発症を推し進めることを知つていれば、記述子のサインを同定することができ、続く診断検査においてそれを用いて、異なる種類の過剰増殖性疾患等、疾患を分類することができる。このように、これら記述子のサインは、疾患又はそのサブタイプ分類のための読み出し情報として機能する。

【 0 0 5 3 】

次に、本発明及びその実施形態をより詳細に説明する。次の定義をより完全に理解するため、RCCに関連する知見の大まかな概略を記す。その次に、不連続疾患特異的状態の同定を可能にするデータを後に更に詳細に記す。

【 0 0 5 4 】

大多数の RCC が、乳頭状、嫌色素性及び明細胞 RCC としてのその組織学的特性評価にかかわりなく、長い、中間的及び短い生存時間を示す 3 種の不連続疾患特異的状態に分類できることが見いだされた。このように、不連続疾患特異的状態は、腫瘍の攻撃性を反映するであろう。以下、A、B 及び C と称するこれら 3 種の不連続分子状態の読み出し情報は、発現パターン、即ち限定的な記述子セット、即ち遺伝子のサインである。次に、同一のサイン、即ち同一遺伝子の発現パターンは、リンパ腫、骨髄腫、乳がん、結腸直腸がん又は卵巣がん等、他のがん型において少なくともある程度検出された。この結果は、異なる過剰増殖性疾患の発生が、少なくともある程度同一の分子機構に関与することを示唆する。更に、この知見は、異なる過剰増殖性疾患が、同一の不連続疾患特異的ステージにある程度分類できることを示唆する。そして、これらの状態は、これら異なる過剰増殖性疾患の生存時間の予後を可能にする。RCC のサイン、そして不連続疾患特異的状態を同定するため、これら異なるがん又は他の疾患における更に別の不連続疾患特異的状態の同定に適用できる発現データの階層的クラスタリングアプローチを用いた。このアプローチの主な特色は、少なくとも 2 種の異なる制御ネットワークに由来する記述子に着目することである。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

次に、本出願人らは、本発明の理解に有用な定義を提示し、その後に本発明をより詳細に記す。

【 0 0 5 6 】

「状態」は、少なくとも 2 体の患者由来の少なくとも 2 種の生物学的試料において同定され、標準状態に対し参照される細胞又は分子レベルの単一の記述子又は複数の記述子によって説明することができる、安定的又は準安定的な一群の細胞及び / 又は細胞集団を意味する。下文に説明されている通り、このような状態は、少なくとも 2 種の制御ネットワークから得られた記述子を解析することにより同定することができる。下文に説明されている通り、このような状態は、少なくとも 1 種類又は様々なサイン又は代替サインによって特徴付けることができる。

【 0 0 5 7 】

「準状態」は、少なくとも 2 体の患者由来の少なくとも 2 種の生物学的試料において同定され、標準状態に対し参照される細胞又は分子レベルにおいて少なくとも 2 種の記述子により説明することができる状態下の安定的又は準安定的な一群の細胞を意味する。下文に説明されている通り、このような準状態は、少なくとも 2 種の制御ネットワークから得られた記述子を解析することにより同定することができる。下文に説明されている通り、このような準状態は、少なくとも 1 種類又は様々なサイン又は代替サインによって特徴付けることができる。

【 0 0 5 8 】

「レベル」は、少なくとも 2 体の患者由来の少なくとも 2 種の生物学的試料において同定され、標準状態に対し参照される細胞又は分子レベルの少なくとも 3 種の記述子によって説明することができる準状態下の安定的又は準安定的な一群の細胞を意味する。下文に説明されている通り、このようなレベルは、少なくとも 2 種の制御ネットワークから得られた記述子を解析することにより同定することができる。下文に説明されている通り、こ

のようなレベルは、少なくとも 1 種類又は様々なサイン又は代替サインによって特徴付けることができる。

【0059】

定義によれば、異なる状態、準状態及びレベルは、異なる安定 (stable)、準安定した (metastable) 一群の細胞を指し、これは、これら一群が、細胞内で相互作用する少なくとも 2 種の制御ネットワークの分子の種類及び範囲の観点から互いに別個のものであることを意味する。異なる状態、準状態及びレベルは、異なるサインを生じる限定的な記述子セットによって特徴付けることができる。したがって、これらは、「不連続分子状態、準状態又はレベル」と称してもよい。

【0060】

状態、準状態又はレベルが疾患を示す場合、これを「疾患特異的分子状態、準状態又はレベル」と呼んでもよい。場合によっては、疾患特異的状態、準状態又はレベルは、生存率、治療法、応答性その他等、臨床的に関連するパラメータと関連付けることができる。

【0061】

健常なヒト又は動物対象において見出すことのできる状態、準状態又はレベルは、「健常状態、準状態又はレベル」と言ってもよい。

【0062】

不連続疾患特異的状態、準状態又はレベルという用語は、好ましくは、不連続疾患特異的状態、準状態又はレベルによって特徴付けられたサブタイプを臨床上又は薬理学的に重要なパラメータに関連付ける新しい分類スキームに従った、異なるサブタイプの疾患の識別を可能にする。

【0063】

用語「臨床又は薬理学的に関連するパラメータ」は、通常、臨床治験において解析されるため、好ましくは、有効性に関連するパラメータに関する。このように、これらは、疾患の組織学的外観の変化に必ずしも関係せず、寧ろ平均生存時間、無進行生存時間、特定の薬物に対する応答性、確立されたスケールシステムを利用した自覚的な患者又は医師の評価する改善、耐容性、有害事象等、重要な臨床エンドポイントに関係する。この用語は、治療に対する応答性も包含する。

【0064】

「記述子」は、存在、構成、量、局在、共局在、化学的誘導体又は他の物理的特性（これらに限定されない）の観点から検出することができる、分子又は細胞レベルにおける測定可能なパラメータを意味する。このように、記述子は、メチル化パターン、m i R N A モチーフ、このような m i R N A モチーフの変種若しくは化学的誘導体、タンパク質若しくはペプチド、このようなタンパク質若しくはペプチドのプロセシング変種若しくは化学的誘導体又は前述の任意の組合せ等（これらに限定されない）、少なくとも 1 種類の特異的 m R N A、少なくとも 1 種類の特異的 m R N A のプロセシング若しくは成熟化誘導体、特異的 D N A モチーフ、このようなモチーフの変種若しくは化学的誘導体の存在、動態学的変動、クラスタリング、細胞局在又は共局在（これらに限定されない）の少なくとも 1 種類の定性的及び / 又は定量的測定パラメータを報告する。

【0065】

具体例において、記述子は、その過剰又は過小発現が、不連続疾患特異的状態、準状態又はレベル、対異なる不連続疾患特異的状態、準状態又はレベル、或いは、対不連続健常状態、準状態又はレベルの説明に用いることのできるタンパク質となることができる。異なるタンパク質、即ち異なる記述子が、その発現挙動に関して解析される場合、この記述子セットの過剰及び / 又は過小発現の観察パターンは、サイン（後述を参照）と呼ぶことのできるパターンを生じる。同一の不連続状態、準状態及びレベルを説明するために異なる種類の記述子を用いてよいことを理解されたい。例えば、ある記述子セットは、第一セットのタンパク質の発現データ、第二セットのタンパク質の翻訳後修飾に関するデータ及び m i R N A 群のデータを含むことができる。

【0066】

10

20

30

40

50

好ましい記述子として、遺伝子及びmRNA又はタンパク質等の遺伝子関連の分子が挙げられる。

【0067】

記述子の「定性的」検出は、好ましくは、例えば細胞内における、例えばタンパク質、mRNA又はmiRNA等、記述子の局在の決定を意味する。これは、細胞のサイズ及び/又は形状も意味する。

【0068】

記述子の「定量的」検出は、好ましくは、例えば所定の試料における記述子の存在、好ましくは量の決定を意味する。

【0069】

好適な実施形態において、記述子の定量的測定は、遺伝子及びmRNA又はタンパク質等の遺伝子関連の分子の量の検出に関する。

10

【0070】

続いて、この記述子セットの組合せの解析によってもたらされるパターンは、サインとして考慮されることになる。

【0071】

「サイン」は、不連続状態、準状態及び/又はレベルの特徴的な説明である、少なくとも2種の実験的に検出可能な及び/又は数量化できる記述子のセットのパターンを意味する。

【0072】

「代替サイン」は、同一の不連続状態、準状態又はレベルの特徴付けに適したあらゆる種類の代替的なサイン候補を意味するものである。

20

【0073】

シグナル伝達は、化学的又は物理的インプットシグナルに応答して化学的又は物理的アウトプットシグナルを生じるよう、外部及び/又は内部で相互作用する分子間の連絡を意味する。このように、この用語は本技術分野において一般的に用いられる。

【0074】

本技術分野において一般に用いられる用語「シグナル伝達連鎖」は、互いに直線的に相互作用して、特異的な化学的又は物理的インプットシグナルのセットを、特異的な又は化学的アウトプットシグナルのセットへと変換する、十分な又は完全な一連の分子を意味する。よって、直線的シグナル伝達経路は、例えば、インテグリン等、特異的受容体から細胞核への段階的シグナル伝達を説明するよう定義されている。異なる直線的シグナル伝達連鎖は、互いに交差連絡(cross-communicate)し得る、或いはフィードバックループ等の制御機構を含み得ると理解される。

30

【0075】

「制御ネットワーク」は、直線的に単純化されたシグナル伝達連鎖及びその相互作用の多次元的性質及び自動制御(kybernetics)を説明する。よって、この用語は、異なるシグナル伝達経路に属し得るが、その機能障害がそのあらゆる面で疾患の一因となり得る、炎症、血管新生等、生物学的プロセスに寄与し得る分子のセットを定義する。

【0076】

制御ネットワークは、好ましくは、PANTHERソフトウェア(進化的関係性によるタンパク質解析(Protein Analysis Through Evolutionary Relationship)、例えば、<http://www.pantherdb.org>、Thomas et al、Genome Res., 13: 2129-2141 (2003)、(20、21)を参照)によって提供される。PANTHERソフトウェアは、その標準パラメータで用いた場合、経路とも呼ばれる165種の制御ネットワークを含む。

40

【0077】

用語「疾患」は、過剰増殖性疾患を包含するあらゆる種類の疾患に関する。この用語は、疾患のあらゆるステージ、例えば、初期段階等の疾患形成、疾患伝播等の疾患発達、顕性化段階、疾患維持、疾患監視等を反映する。

【0078】

50

用語「過剰増殖性」疾患は、細胞の異常増殖(growth)又は増大化(multiplication)に関するあらゆる疾患に関する。過剰増殖性疾患は、対象における病変として顕在化する疾患であってもよい。過剰増殖性疾患として、あらゆる種類の良性及び悪性腫瘍と共に、角質増殖及び乾癬等の疾患も挙げられる。

【0079】

腫瘍性疾患として、肺がん(非小細胞肺がんを含む)、腎臓がん、腸がん、頭頸部がん、結腸(直腸)がん、神経膠芽腫、乳がん、前立腺がん、皮膚がん、メラノーマ、非ホジキンリンパ腫その他等々、がんが挙げられる。

【0080】

特に、検討されるがんは、腫瘍学分野における国際疾病分類(International Classification of Diseases)(<http://en.wikipedia.org/wiki/carcinoma>を参照)に従って定義されているがんである。このようながんとして、上皮性腫瘍等、上皮癌；扁平上皮癌等、扁平細胞腫瘍；基底細胞癌等、基底細胞性腫瘍；移行細胞乳頭腫及び細胞癌；腺腫、腺癌、形成性胃炎、インスリノーマ、グルカゴノーマ、ガストリノーマ、ビポーマ、胆管細胞癌、肝細胞癌、腺様囊胞癌、カルチノイド腫瘍、プロラクチノーマ、オンコサイトーマ、ハースル細胞腺腫、腎細胞癌、グラビツツ腫瘍、多発性内分泌腺腫、類内膜腺腫等、腺腫及び腺癌(腺)；皮膚付属器腫瘍；粘膜表皮性腫瘍；囊胞腺腫、腹膜偽粘液腫等、囊胞性、粘液性及び漿液性腫瘍；腺管、小葉及び髓様腫瘍；腺房細胞腫瘍；ワルチン(Warthin)腫瘍、胸腺腫等、複合型上皮性腫瘍；性索間質性腫瘍、莢膜細胞腫、顆粒膜細胞腫瘍、男化腫瘍、セルトリ-ライディッヒ細胞腫瘍等、固有性腺腫瘍(specialized gonadal neoplasm)；傍神経節腫、褐色細胞腫、グロムス腫瘍等、傍神経節腫及びグロムス腫瘍；色素性母斑、悪性メラノーマ、メラノーマ、結節性メラノーマ、異形成母斑、悪性黒子由来メラノーマ、肉腫及び間葉由来のがん、表在拡大型メラノーマ及び末端黒子型悪性メラノーマ等、母斑及びメラノーマが挙げられる。

10

20

30

40

【0081】

用語「試料」は通常、例えば過剰増殖性疾患を患っていると疑われるヒト又は個体を意味する。このような個体は、患者と呼んでよい。よって、試料は、組織、細胞、唾液、血液、血清等となることができる。

【0082】

用語「細胞株」は、患者の試料から開発された初代細胞株、或いは、通常ある特定の種類の過剰増殖性疾患の代表であると考えられる初代細胞株のいずれかの細胞株を言う。

【0083】

本明細書に記載されているあらゆる方法及び使用は、その一実施形態において、少なくとも1ステップ、好ましくは全ステップがヒト又は動物の体外において実施できることを理解されたい。したがって、例えば「試料が得られる」と記述される場合、これは、試料が、好ましくはヒト又は動物の体外の形態で提供されることを意味する。

【0084】

先ず、本発明に従ってサインを同定し得る方法について説明する。サインが、不連続疾患特異的状態を示すことを理解されたい。

【0085】

原則として、サイン及び不連続疾患特異的状態は、過剰増殖性疾患の患者又は過剰増殖性疾患の細胞株のいずれかに由来する多数の試料に対し、少なくとも2種の異なる制御ネットワークから得られた記述子の質及び/又は量を解析することにより同定することができる。続いて、このデータは、(i)記述子に亘り質及び/又は量に関してデータをグループ化すること、(ii)第二のステップにおいて、全記述子候補に亘り記述子の質及び/又は量の類似性に関して試料又は細胞株をグループ化することによって、特定のパターンに関し解析される。

【0086】

よって、本発明は、その一実施形態において、少なくとも、

a. 疾患を患有疑いがあるヒト若しくは動物個体に由来する疾患特異的試料又は前記疾患

50

の細胞株における遺伝子又は遺伝子関連分子の記述子の質及び／又は量を検査するステップと、

b . 少なくとも、

i . 各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

i i . 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . 共通の記述子セットの異なるパターンを同定するステップと、

i v . ステップa .) i i i .)において同定された各パターンにサインを割り当てるステップと、

v . ステップb .)、i v .)において同定された各サインに不連続疾患特異的状態を必要に応じて割り当てるステップと

を含む、ステップa .)において得られた結果をクラスタリングするステップと

を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に関するサイン及び必要に応じて少なくとも1種類の不連続疾患特異的状態を同定する方法に関する。

【0087】

このような方法のため、mRNA又はタンパク質等の記述子の発現等、量を検出することが好ましくなり得る。しかし、miRNAの局在及びプロセシング又はタンパク質の翻訳後修飾等、他の記述子の他の特性に着目することもできる。このように、例えば、記述子の局在、プロセシング、修飾、動態、発現等に着目することができる。明確にするため、mRNA又はタンパク質等、記述子の発現パターンに関して次の実施形態を記すが、その理由として、これらの記述子は、サインの単純明快な同定と、例えば診断及び／又は予後目的のためのその実行を可能にするからである。しかし、このような発現データへの注目は説明を目的としており、本発明を発現データに限定するものと解釈するべきではないことを理解されたい。

【0088】

クラスタリングステップb .)は、様々なソフトウェアプログラムにおいて実行されるため、例えば階層的クラスタリング処理となることができる。適切なソフトウェアは、例えば、ユークリッド(Euclidian)距離及び平均連結法を用いたTIGR M e Vソフトウェア(23)となることができる。ソフトウェアは、そのデフォルトパラメータで用いられる。

【0089】

クラスタリングステップは、好ましくは、例えば第一の遺伝子、即ち記述子がその発現強度によって分別され、続いて試料が全遺伝子、即ち全記述子に亘る同等な発現に関して分別される、「二元配置階層的」クラスタリングアプローチとなることができる。より詳細には、二元配置クラスタリングは、遺伝子発現強度及び腫瘍類似性に従ったソフトウェアによって実行することができる。その結果、全体的に類似の遺伝子発現プロファイルを有する腫瘍は、互いに隣接して存在する。ソフトウェアは、距離測定としてピアソン相関及び最適葉順序(Leaf Ordering)によるそのデフォルトパラメータで用いられる。

【0090】

このアプローチが、例えば、十分な数の試料に亘り全ヒト遺伝子に対し行われる場合、所定の記述子セットの、原則としてサイン、即ち例えば発現データのパターンが出現する筈である。このようなサインの同定は、SAM(12)を用いて行うことができる。ソフトウェアは、そのデフォルトパラメータで用いられる。記述子セットのパターンが同定されている場合、GENEVESTIGATOR(10、11)等、代替的なソフトウェアを用いることによって精度を照合することができる。所定の記述子セットに対する異なるサインの出現は、このレベルの解像度の不連続疾患特異的状態の存在と同等であることを理解されたい。より詳細には、二元配置クラスタリングは、遺伝子発現強度及び腫瘍類似性に従ったソフトウェアによって実行することができる。その結果、全体的に類似の遺伝子発現プロファイルを有する腫瘍は、互いに隣接して存在する。ソフトウェアは、距離測定としてピアソン相関及び最適葉順序によるそのデフォルトパラメータで用いられる。

10

20

30

40

50

【0091】

この一般アプローチは、例えば、利用できる試料の数又は必要な演算能力により、実用的な観点において制限され得る。

【0092】

しかし、これらの制限を克服し、より高い精度及び速度によるサインの同定を可能にする手段が存在する。

【0093】

したがって、好適な実施形態において、本発明は、少なくとも、
a. 疾患を患有ヒト又は動物個体に由来する疾患特異的試料、或いは前記疾患の細胞株における遺伝子又は遺伝子関連分子の記述子の質及び／又は量を検査するステップと、
b. 少なくとも、

i. 各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、
ii. 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、
iii. 前記疾患特異的試料又は細胞株に亘り異なって制御される異なる記述子群を同定するステップと
を含む、ステップa.)において得られた結果をクラスタリングするステップと、
c. ステップb.) i ii.)において同定された記述子を組み合わせるステップであって、疾患特異的試料又は細胞株における前記記述子の質及び／又は量が、ステップa.)により既に知られているステップと、
d. 少なくとも、

i. ステップc.)の各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、
ii. 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、
iii. ステップc.)において得られた記述子セットの異なるパターンを同定するステップと、
iv. ステップd.) i ii.)において同定された各パターンにサインを割り当てるステップと、

v. ステップd.)、iv.)において同定された各サインに不連続疾患特異的状態を必要に応じて割り当てるステップと
を含む、ステップc.)において得られた結果をクラスタリングするステップと
を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に関するサイン及び必要に応じて少なくとも1種類の不連続疾患特異的状態を同定する方法に関する。

【0094】

このアプローチは、得られたデータが同じ分別原理に従って2回クラスター化されるという点において、上述の実施形態とは異なる。よって、1回目のクラスタリングにおいて、異なる腫瘍試料又は細胞株等、異なる試料において異なって制御される、おおまかに定義された遺伝子群を特徴付けることができる。この反復クラスタリングは、データ量を低下させ、シグナルノイズ比を改善し得る。

【0095】

二元配置クラスタリング等、下文に記載するあらゆるクラスタリング処理の試みは、同一の発現プロファイル等、記述子プロファイルの腫瘍を近接させることである。その結果得られるデンドログラムは、ある「パターン」へと濃縮される条件を伝える。

【0096】

どちらのステップにおけるクラスタリングも、ユークリッド距離及び平均連結法を用いたTIGR MeVソフトウェア(23)によって実行することができる。ソフトウェアは、そのデフォルトパラメータで用いられる。第一のクラスタリングステップ後の群の同定と、続く第二のクラスタリングステップ後のサインの同定は、SAM(12)を用いて行うことができる。ソフトウェアは、そのデフォルトパラメータで用いられる。記述子セ

10

20

30

30

40

50

ットのパターンが同定されている場合、GENEVESTIGATOR(10、11)等、代替的なソフトウェアを用いることによって精度を照合することができる。

【0097】

続く2回目のクラスタリングにおいて解析が先鋭化されるため、この1回目においては、例えば目視検査により明確に定義されていない群が取り込めるよう選択は幾分おおまかでよい。

【0098】

原則として、できるだけ多くの遺伝子及びできるだけ多くの試料が解析されることは、解析の精度にとって有益である。しかし、例えば演算能力が制約されている場合、約50～約400試料、約75～約300試料、約100～約200試料、好ましくは約100試料における、約200～約1000遺伝子、約200～約800遺伝子、約200～約600遺伝子又は好ましくは約200～約400遺伝子等、約100～約2000遺伝子の発現を解析することができる。10

【0099】

次に、このデータは、1回目の、例えば階層的二元配置クラスタリングに付され、異なった制御の遺伝子群が得られる。続いてこれら遺伝子群は組み合わされ、2回目の階層的二元配置クラスタリングが為される。当然ながら、1回目のクラスタリングの前に最初に得られた発現データは、2回目のクラスタリングに用いることができる。

【0100】

このアプローチは、サイン、したがって不連続疾患特異的状態のより単純明快な同定を可能にする。一例として、乳頭状、明細胞及び嫌色素性RCC等、あらゆる種類のRCCを均等に表すであろう、約100種のRCC試料における約200～約400遺伝子の発現データを得ることができる。1回目のクラスタリングにおいて、全100遺伝子を含む20群を同定することができる。例えば、群1は10遺伝子を含むことができ、群2は20遺伝子を含むことができ、群3は6遺伝子等を含むことができる。20

【0101】

次に、これら100遺伝子に2回目の階層的二元配置クラスタリングが為される。続いて、ソフトウェアは、400種の記述子セットに対し3種の識別可能なパターン、即ち、3種のサインを生じる。あらゆる種類のRCCに対し3種のサインのみが存在するため、このレベルの解像度において3種の不連続疾患特異的状態が存在することが分かる。更に別のステップにおいて、次に、その発現データが3種の異なる状態の間を最も確実に識別する遺伝子セットを同定することができる。続いて、これらのサインが、例えば生存率どのように相關するか解析することもできる。30

【0102】

異なって制御される遺伝子を有する群の同定と、したがってサイン及び不連続疾患特異的状態の同定をより迅速に行い、最終的に記述子セットのサイズを低下させ得る更に別のアプローチも存在する。

【0103】

このアプローチは、公知の制御ネットワークにおける記述子の質及び/又は量の解析を探求する。あるネットワークは、他のネットワークよりも強力に、例えば腫瘍発達に寄与し得るため、例えば單一ネットワーク内における異なって発現される遺伝子の群の同定は、より単純明快となり得る。この操作はデータ量を低下させ、したがってシグナルノイズ比を改善しつつ、特定のネットワークの選別を可能にする。40

【0104】

よって、本発明は、その特に好適な実施形態において、少なくとも、
a. 過剰増殖性疾患を患うヒト又は動物個体に由来する過剰増殖性疾患特異的試料、或いは過剰増殖性疾患の細胞株における少なくとも2種の制御ネットワークに関連する遺伝子又は遺伝子関連分子の記述子の質及び/又は量を検査するステップと、
b. 少なくとも、
i. 少なくとも1種類の制御ネットワーク内における各記述子の結果をその質及び/又

50

50

50

50

50

は量によって分別するステップと、

i i . 1 種類の制御ネットワーク内の全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . 各制御ネットワーク内における前記疾患特異的試料又は細胞株に亘り異なって制御される異なる記述子群を同定するステップと

を含む、ステップa .)において得られた結果をクラスタリングするステップと、

c . ステップb .) i i i .)において同定された記述子を組み合わせるステップであつて、疾患特異的試料又は細胞株における前記記述子の質及び／又は量が、ステップa .)により既に知られているステップと、

d . 少なくとも、

i . ステップc .)の各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

i i . 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . ステップc .)において得られた記述子セットの異なるパターンを同定するステップと、

i v . ステップd .) i i i .)において同定された各パターンにサインを割り当てるステップと、

v . ステップd .)、i v .)において同定された各サインに不連続疾患特異的状態を必要に応じて割り当てるステップと

を含む、ステップc .)において得られた結果をクラスタリングするステップと
を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に関するサイン及び必要に応じて少なくとも1種類の不連続疾患特異的状態を同定する方法に関する。

【0105】

この場合も同様に、クラスタリングは、上述の階層的二元配置クラスタリングとなることができる。どちらのステップにおけるクラスタリングも、ユークリッド距離及び平均連結法を用いたTIGR MeVソフトウェア(23)によって実行することができる。ソフトウェアは、そのデフォルトパラメータで用いられる。第一のクラスタリングステップの後の群の同定と、第二のクラスタリングステップの後のサインの同定は、SAM(12)を用いて実行することができる。ソフトウェアは、そのデフォルトパラメータで用いられる。記述子セットのパターンが同定されれば、GENEVESTIGATOR(10、11)等、代替的なソフトウェアを用いることにより精度を照合することができる。

【0106】

よって、この実施形態において、例えばソフトウェア(後述を参照)によって、特異的制御ネットワークに割り当てられる全遺伝子に対し1回目のクラスタリングを行うことになる(ステップa ~ b) i i i .)。この回のクラスタリングは、異なる制御ネットワークに対し行われることになる。このように、限定的な遺伝子セットは、ネットワーク毎にクラスター化されるため、特異的パターンが出現し得る(図2を参照)。続いて、解析された全ネットワークのこれらのパターンの記述子、例えば遺伝子が組み合わされ(ステップc)、組み合わせたセットが第二のクラスタリングに付される(ステップd) i . ~ v .)。

【0107】

このサイン及び状態同定法を更に合理化することもできる。

【0108】

記載されている通り、多くのネットワークは、ステップb .) i i i .)において同定可能な群を生じないため、1回目のクラスタリング(ステップb)における制御ネットワークへの集中は、サインを同定する最も信頼のおける仕方となり得る。よって、第二のクラスタリングステップのために組み合わされる遺伝子等、記述子の数は、更に低下することになる。

【0109】

10

20

30

40

50

しかし、2回のクラスタリングによる前出の(afore-described)実施形態に関し、制御ネットワーク解析において同定された全記述子群の組合せリストである記述子セットが得られるであろう。次に2回目のクラスタリングにおいて、この記述子セットは、試料を別個の不連続疾患特異的状態にグループ化するためのパターン、即ちサインを生じるであろう。RCCの場合、このアプローチが採用され(図2、図3及び図4を参照)、3種の状態A、B、Cを同定した。

【0110】

1回目のクラスタリングにおいて用いられたネットワークは、PANTHERソフトウェアにおいて記載されているネットワークとなることができる。原則として、PANTHERソフトウェアの全165種の制御ネットワークを用いることができる。しかし、最初の選択ステップを組み入れて、所定の試料セットに対し、試料において最も影響を受ける制御ネットワークを決定してもよい。この目的を達成するため、いずれのネットワークが最も高頻度の記述子を含むか解析することができる。次に、最大、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10種の最も影響を受ける制御ネットワークを選択し、これらネットワークのみに対し最初のクラスタリングステップを実行することができる。RCCの例は、一般結果、即ち、不連続疾患特異的状態の数が、4種の最も影響を受ける経路を解析するか、或いは76種の影響を受ける全経路を解析するかに応じて異なることを示す。当然ながら、数を減らした経路に着目すれば、2回目のクラスタリングに用いられる記述子、即ち記述子セットの数を減らすことができ、したがって、シグナルノイズ比を改善し、サイン同定を単純化することができる。

10

20

30

【0111】

解析は、疾患において影響を受ける可能性のある遺伝子等、記述子を最初に同定することにより更に単純化することができる。これは、例えば、疾患試料であることを示し得る一塩基多型(SNP)を同定することによって行うことができる。例えば、また、実験の節に記載されている通り、組織学的解析により組織が疾患に罹患していることが確認されたある個体の疾患の影響を受けた組織に由来する試料と、組織学的解析により組織が疾患に罹患していないことが確認された同一個体の同一組織に由来する試料のSNPの差異を解析することができる。次に、これらの候補遺伝子は、例えば、PANTHERソフトウェアを用いることにより、例えば制御ネットワークに割り当てることができる。続いて、例えばSNPが同定された遺伝子の大部分を含むことから、最も高頻度に影響を受けていると思われる1、2、3、4、5種以上の制御ネットワークを同定する。その後の解析において、次に、これら最も高頻度に影響を受けるネットワークに属す全遺伝子の発現に関して疾患試料が解析されるが、なお、SNP解析においてこれら遺伝子の全てが同定された訳ではない。次に、前述の方法においてこの発現データを用いる。

30

【0112】

メチル化、リン酸化等を同定する方法等、このような候補記述子を生じるいかなる初期選択方法を用いてもよい。

40

【0113】

原則として、僅か、例えば2種の制御ネットワークによる上述のアプローチを用いて、僅か2種の試料を解析すれば十分と思われる。通常、より多くの制御ネットワークを検討し、より多くの試料を検査すれば、解析の信頼性及び解像度は増加するであろう。十分な結果は、例えば約75種、100種、150種又は200種等、少なくとも約50種の試料を検査することにより得ることができる。制御ネットワークの観点から、例えば、発現データから明らかとなり得るように、最も影響を受けると思われる約3、4又は5種のネットワークの解析で十分となり得る。

【0114】

記述子セットは、必ずしも異なるサインを生じる必要がないことを理解されたい。よって、選ばれた記述子セットは、1種類のサインしか生じないことがある。これは、それによって、試験された疾患が1種類の不連続疾患特異的状態のみを有することを示すであろう。当然ながら、これは、解析が、明細胞、乳頭状及び嫌色素性 RCCの試料等、あらゆ

50

る関連する種類の疾患を網羅する包括的な試料セットにより行われたことを想定する。当業者であれば、あらゆる関連する疾患サブタイプの大部分が解析のために網羅されていることを確信するために十分な数の試料を選択する仕方を理解しているであろう。

【0115】

当然ながら、所定の記述子セットは、2、3、4、5種以上のサイン等、複数のサインを生じてもよい。サインの数は、このレベルの疾患解像度において観察され得る不連続疾患特異的状態の数を示すであろう。例えば、小細胞肺がんの包括的な試料セットを解析し、例えば、3種のサインを同定する場合、これは、3種の不連続疾患特異的状態により小細胞肺がんを特徴付ける得ることを意味する。非小細胞肺がんを解析に含める場合、2種の追加的なサインを同定することができ、このことは、非小細胞及び小細胞肺がんのレベルにおいて、これらのがんを5種の不連続疾患特異的状態に分類できることを意味する。このように、試料の種類の選択は、いずれの疾患レベルにおいて不連続疾患特異的状態を観察できるかを定義する。

【0116】

所定のサインが、疑いの余地なく不連続疾患特異的状態に関係すると理解することが更に重要である。しかし、不連続疾患特異的状態は、いずれの種類及び組合せの記述子がサインの同定に用いられたかに応じて、複数のサインにより説明することができる。

【0117】

したがって、上述のアプローチは、サイン及び不連続疾患特異的状態を同定するための数多くの可能性のうちのほんの一部を提供する。例えば、バイクラスタリング (Biclustering) 等、二元配置階層的クラスタリング以外のクラスタリング方法を用いてもよい。これらの方法は、一般に、例えば類似の形質を有する腫瘍の試料を一緒にまとめる。本発明の発見は、腫瘍群となることのできるこれら「整列された試料群」が、次に、疾患の特徴付けに用いることのできる不連続疾患特異的状態として考慮できることである。

【0118】

一般に、遺伝子又は遺伝子関連分子の完全なセット又はサブセットに亘り、記述子に起因し得るパラメータ（発現等）の類似性に応じて試料をグループ化することにより群を同定することができ、類似性は、好ましくは、ユークリッド距離、ピアソン相関、スピアマン相関又はマンハッタン距離等、統計的距離測定を用いて測定される。

【0119】

しかし、例えば二元配置階層的クラスタリングに頼る上述のアプローチは、容易にアクセスでき、大規模に試験できるパラメータ（例えば、RNA又はタンパク質レベルにおける発現）を利用するため、所定の解像度の不連続疾患特異的状態の数を同定するため、また、これらの状態を説明するサインを同定するための重要なツールを提供する。

【0120】

前述の方法等により、記述子セットに対し多くのサインを同定すると、異なるサイン間の最も優れた識別に必要な記述子の数を更に減らすことができる。

【0121】

この目的を達成するため、異なる不連続疾患特異的状態の最も優れた差別化を可能にする記述子に関して、上述の解析により疾患特異的状態が分かる試料を解析することができる。これらの記述子は、必ずしも不連続疾患特異的ステージの同定を最初にもたらした記述子である必要はない。

【0122】

例えば、例えば遺伝子の発現データを利用する上述の方法により、腫瘍試料等、疾患特異的試料の不連続特異的状態を同定すると、全部でおよそ24.000遺伝子に亘る発現の不連続疾患特異的状態が分かる試料を解析することができる。次に、異なる不連続疾患特異的状態の試料間で最も異なって制御される遺伝子を選択することができ、これらの発現パターンをサインとして用いることができる。この種の解析は、マイクロアレイ発現解析によって行うことができる。

【0123】

10

20

30

40

50

例えば、この例において、92遺伝子、即ち記述子の発現データは、RCCの3種のサイン、したがって3種の不連続疾患特異的状態A、B及びCの同定を可能にする（図3を参照）。更なる解析において、不連続疾患特異的状態A、B又はCいずれのものであるか分かるようになった試料を、Affymetrix遺伝子チップを用いておよそ20.00遺伝子の発現に関して解析した。次に、ソフトウェアを用いて、不連続疾患特異的状態A、B又はCの試料間で最も異なって制御される遺伝子を同定した。特定の遺伝子リスト（後述を参照）に着目することにより、試料を不連続RCC特異的状態B並びにA及びCを表すACへと最初に最も良く割り当てる事が判明した。続いて、追加的な遺伝子に着目することにより、状態ACは、A及びCへと更に識別することができる。

10

【0124】

このアプローチを用いて、約50遺伝子のセットを同定した。これらの遺伝子（表1）のうち約34種の過剰発現と、これら遺伝子のうち約16種の過小発現は、状態B対A及びCの間の最適な区別を可能にする。別の解析は、約4（表3）遺伝子の群の過剰発現及び約19遺伝子（表4）の群の過小発現が、状態A及びCの識別に良く適していることを明らかにした。これらの遺伝子は、必ずしも不連続疾患特異的状態を本来同定した約92遺伝子と同一である必要はない。

【0125】

表1、2、3及び4との関連における用語「遺伝子」が、Affymetrix遺伝子チップにおけるプローブを意味することを理解されたい。表1、2、3及び4は全て、明瞭な同定を為すプローブ識別子(identifier)を命名する。プローブ識別子のDNA又はアミノ酸配列が分かっていればそれが表示されている。表1、2、3及び4に関する下文のあらゆる記述は、好ましくは、DNA及び/又はアミノ酸配列が公知の遺伝子のみを包含する。

20

【0126】

約50%以上の信頼性で状態Bを同定するためには、例えば、それぞれ表1又は2の少なくとも1遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分である。約80%以上の信頼性で状態Bを同定するためには、それぞれ表1又は2の少なくとも2遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約90%以上の信頼性で状態Bを同定するためには、それぞれ表1又は2の少なくとも3遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約95%以上の信頼性で状態Bを同定するためには、それぞれ表1又は2の少なくとも5遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約99%以上の信頼性で状態Bを同定するためには、それぞれ表1又は2の少なくとも6遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。

30

【0127】

約50%以上の信頼性で状態A対Cを同定するためには、例えば、それぞれ表3又は4の少なくとも2遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分である。約70%以上の信頼性で状態A対Cを同定するためには、それぞれ表3又は4の少なくとも3遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約80%以上の信頼性で状態A対Cを同定するためには、それぞれ表3又は4の少なくとも4遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約90%以上の信頼性で状態A対Cを同定するためには、それぞれ表3又は4の少なくとも5遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約95%以上の信頼性で状態A対Cを同定するためには、それぞれ表3又は4の少なくとも6遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。約99%以上の信頼性で状態A対Cを同定するためには、それぞれ表3又は4の少なくとも7遺伝子の過剰又は過小発現を検査すれば十分となり得る。

40

【0128】

異なるサインと、したがって不連続状態を最も良く識別できる記述子セットを同定するために、SAMソフトウェア（12）を用いて、発現レベルの少なくとも2倍の変化を選択パラメータとして設定することができる。サインの精密性を高めると同時に、異なるサ

50

イン間の区別に用いられる記述子の数を減らしたければ、3、4、5以上等、閾値を高くすることができる。

【0129】

本発明は、不連続疾患特異的状態、サイン等を同定する方法について記述する際は常に、記述子の質及び／又は量を検査する必要があると考えていることに留意されたい。この検査は、例えば、遺伝子発現を決定するためのマイクロアレイの使用等、技術手段を包含することができる。本発明が、記述子の質及び／又は量を示すデータであって、技術手段を用いた決定後に例えばデータベースに寄託されたデータに依存し、これを使用することによるこのような方法の適用を検討する場合、これらの方法は、コンピュータ等、技術機器において実施されるであろう。したがって、不連続疾患特異的状態、サイン等を同定するための、本明細書に記載されているあらゆる方法は、コンピュータ実行様式で行うことができる。

10

【0130】

実施例から明らかになる通り、RCCに関し同定された不連続疾患特異的状態は、他の過剰増殖性疾患においてもある程度見られる可能性がある。

【0131】

よって、上述の方法は、過剰増殖性疾患の患者試料又は過剰増殖性疾患の細胞株等、試料セット内における包括的なセットのサインと、したがって不連続疾患特異的状態の同定に適している。次に、サイン及び状態は、平均生存時間等、臨床的に関連するパラメータと相関し得るため、発現データ等、容易にアクセスできるパラメータにより、疾患の臨床上重要な特性評価をもたらすことができる。しかし、このようなサインが、それぞれの疾患の表現型上の組織学的特性評価と必ずしも相関せず、寧ろ、疾患発症を特徴付ける例えば分子レベルにおける不連続状態を説明するように見えることは新しい。

20

【0132】

上に指摘されている通り、これらの不連続疾患特異的状態は、閾値レベルに達して、別の不連続疾患特異的状態への切換えが起こるまでのある変化（例えば、変異、調節解除等）を明らかに考慮に入れている。

【0133】

現在、例えばRCCの3種の状態が、第一の状態Aが起り、次に状態B、続いて状態Cへと切り換わるような連続した状態を表すのか、或いはこれらの状態が並行して起るのか、連続且つ並行した発生の組合せであるのかは明らかではない。しかし、重要な側面は、例えば、RCC等、過剰増殖性疾患が、生存時間等、臨床的に関連するパラメータと関連付けることのできる不連続状態で起こることである。例えば、化学的化合物が、短い生存時間と相關した状態から長い生存時間と相關した状態へと細胞を切り換えるかについて検査することができる。これについては、下でより詳細に説明する。

30

【0134】

更に、疾患を特徴付けることが判明したサイン及び状態を用いて、他の疾患を特徴付けることができる。このことは、例えば、異なる疾患を同一の状態により特徴付けることができれば、異なる疾患に対する薬学的に有効な化合物の有効性の予見を可能にする。

40

【0135】

次に、本出願人らは、サイン及び不連続疾患特異的状態を診断、予後、分析及び治療目的に使用できることを詳細に説明する。これらの態様において、不連続疾患特異的状態及びサインは、これらの用語が互換的であるかの如く並列に記される。しかし、不連続疾患特異的状態は、選ばれた記述子の種類及び組合せに応じた様々なサインによって説明され得ることに注意されたい。以下にサインという用語が用いられる場合、したがってこれは、単一の不連続疾患特異的状態の説明に用いることのできるあらゆるサインを組み入れていることを意味する。更に、サインに関して記述するあらゆる実施形態は、不連続疾患特異的状態にも等しく適用される。

【0136】

記述されている通り、本発明は、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑

50

いがある患者由来の試料の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための不連続疾患特異的状態に関する。本発明は、また、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の細胞株の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための不連続疾患特異的状態に関する。本発明は、更に、薬学的に有効な化合物開発の標的として用いるための不連続疾患特異的状態に関する。

【0137】

本発明は、また、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある患者由来の試料の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるためのサインであって、少なくとも1種類の記述子の定性的及び／又は定量的パターンを含み、不連続疾患特異的状態を示すサインに関する。状態に関して、本発明は、また、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の細胞株の分類における、診断及び／又は予後マーカーとして用いるためのサインであって、少なくとも1種類の記述子の定性的及び／又は定量的パターンを含み、不連続疾患特異的状態を示すサインに関する。更に、本発明は、薬学的に有効な化合物の開発、同定及び／又は適用における標的の読み出し情報として用いるためのサインであって、少なくとも1種類の記述子の定性的及び／又は定量的パターンを含み、不連続疾患特異的状態を示すサインに関する。標的は、サインによって反映される不連続疾患特異的状態となることができる。

10

【0138】

上述の通り、不連続疾患特異的状態は、少なくとも2体の患者に由来する試料又は細胞株における少なくとも2種の制御ネットワークを比較することにより同定された、少なくとも2種の記述子を含む1又は複数のサインによって説明することができる。

20

【0139】

不連続疾患特異的状態及びそれに関するサインは、診断目的に用いることができる。よって、過剰増殖性疾患等、疾患を患う患者の試料をその不連続疾患特異的状態に関して解析し、それに従って分類することができる。試料の分類と、したがって患者の診断における不連続疾患特異的状態の重要性は、RCCの実験から明瞭となる。

【0140】

これらの例は、RCCをその不連続疾患特異的状態に基づき区別する方が、乳頭状、明細胞及び嫌色素性RCC等、その表現型上の分類よりも情報価値が高くなり得ることを示す。実際に、実験は、異なる患者に由来する乳頭状RCC試料は、その不連続疾患特異的状態が異なる可能性があることを示す。その一方で、異なる乳頭状及び明細胞RCCを同一の不連続疾患特異的状態により特徴付けることができる。

30

【0141】

このように、腫瘍は、組織学的レベルで同等のように見えていても、根底にある分子機構の観点で異なっている可能性がある。逆に、腫瘍は、異なる組織学的特性を示していてもなお、不連続疾患特異的状態の観点から同一の根底にある分子機構を共有し得る。RCCに関して同定され得る3種の不連続疾患特異的状態が、平均生存時間と明確に相關することを考慮すると、例えばその組織学的特性ではなくその不連続疾患特異的分子状態による試料の分類は、新しい重要な分類スキームを提供する。更に、不連続疾患特異的状態に関する知識は、組織学的变化又は他の表現型上の特性が未だ識別不能な時点の早い段階で患者から得られた試料における、進行中の疾患発症の診断に有用となり得る。

40

【0142】

よって、本発明は、その一態様において、少なくとも、

- a . 疾患に罹患している疑いがあるヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、
- b . 前記試料をサインに関して検査するステップと、
- c . ステップb .)において決定されたサインに基づき、前記試料に不連続疾患特異的状態を割り当てるステップと

を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体の患者における、或いは疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の少なくとも1種類の細胞株における疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患を診断、層別化及び／又はスクリーニングする

50

方法に関する。

【0143】

試料は、腫瘍試料となることができる。

【0144】

サインを検査する様々な仕方が存在し得る。サインが未だ知られていない場合、上述の通りこれを同定することができる。サインが既に知られている場合、サインの同定に用いられた記述子の質及び／又は量を解析することにより、これを検査することができる。異なる状態間の最も優れた差別化を可能にする最適化されたサインを用いることもできる。例えば、サインが、所定の遺伝子又はRNA若しくはタンパク質等、遺伝子関連分子のセットの発現データに基づく場合、この分子セットの発現パターンを単純に決定することによりサインを検査することができる。これは、マイクロアレイ発現解析等、標準方法により行うことができる。

10

【0145】

サインを同定すれば、このサインと相關する不連続疾患特異的状態も分かる。よって、このような方法を用いて、同一の不連続疾患特異的分子状態をもたらす一般的な分子機構により、患者試料を分類することができる。このような不連続疾患特異的状態が、表現型上の変化が明らかとなる前に生じる場合、したがって、早い段階でのRCC等、過剰増殖性疾患の診断が可能となる。

20

【0146】

好ましくは、「不連続疾患特異的状態、準状態又はレベル」は、これなしでは一般レベルで診断されてしまう疾患をカテゴリー化するための新しい層別化ツールとして用いられる。

【0147】

よって、本発明は、その一実施形態において、好ましくは、過剰増殖性疾患等、疾患を不連続疾患特異的状態、準状態及びレベルを示すサインに関して解析することによる、上述の不連続疾患特異的状態、準状態、レベル等の同定に関する。この解析は、例えば、RCC、肺がん、乳がん等、特定の種類の過剰増殖性疾患に関して行われるであろう。このように、疾患は、罹患した臓器等、一般的な選択判断基準により同定することができる。しかし、例えば組織学的分類スキームに基づくこれら過剰増殖性疾患の細分類に最初から注意することはない。例えば、RCC等の疾患の異なる不連続疾患特異的状態を同定すれば、表現型上の変化が認識不能な時点で早くも、進行中の疾患発症に関して上述の通り試料を検査することができる。したがって、不連続疾患特異的状態は通常、問題の疾患のいずれのサブタイプが発症しているか直接的に予見させる（例えば、RCCの状態A、B又はC）。これらのサブタイプは、例えば、生存時間等、臨床的に関連するパラメータと関連する。このように、不連続疾患特異的状態、準状態又はレベルという用語は、好ましくは、サブタイプを臨床上又は薬理学的に重要なパラメータと関連付ける新しい分類スキームに従った、疾患の異なるサブタイプの識別を可能にする。よって、不連続疾患特異的状態が疾患に存在し、必ずしもその組織学的特性によってではなく、臨床上又は薬理学的に関連するパラメータによって特徴付けられるサブタイプと関連し得るとの本発明の知見は、不連続疾患特異的状態、準状態及びレベルに基づく新しいコードによる疾患の解読を可能にする。

30

【0148】

不連続疾患特異的状態が、例えばRCCその他の過剰増殖性疾患に存在するという知識を用いて、RCC又は他の過剰増殖性疾患の新しい治療のための臨床治験を受けている患者コホートを層別化することもできる。本明細書において言及されている通り、特定の薬学的に有効な薬剤は、特定の不連続疾患特異的状態においてのみ作用し得る。このような有効な薬剤による臨床治験を受ける患者コホートが、他の不連続疾患特異的状態の個体から主になる場合、特定の不連続疾患特異的状態において薬学的に有効な薬剤のいかなる効果も識別不能となり得る。しかし、このような効果は、患者コホートが不連続疾患特異的状態に従って群分けされていれば、統計的に有意となり得る。よって、不連続疾患特異的

40

50

状態の存在に関する知識を用いて、その不連続疾患特異的状態に従い、臨床治験を受けている試験集団を層別化することができる。

【0149】

更に、不連続疾患特異的状態が分かれば、その存在に関する知識を用いて、異なる過剰増殖性疾患におけるサブタイプとしても同様に生じるか検査することができる。よって、不連続疾患特異的状態、準状態及びレベル並びにそれらに関するサインを用いて、これらサブタイプの存在に関して異なる疾患をスクリーニングすることができる。

【0150】

このように、それぞれのサインの同定による試料のその不連続疾患特異的状態に関する分類は、過剰増殖性疾患等、疾患の診断に用いることができる。しかし、過剰増殖性疾患等、疾患の患者のものであれ、細胞株のものであれ、試料のその不連続疾患特異的状態に関する分類は、更なる意味合いを持つ。

10

【0151】

不連続疾患特異的状態が、根底にある分子的疾患機構の決定的なステージを反映すると思われることを考慮すると、状態は、平均生存時間又は薬物に対する応答性等、関連する臨床及び薬理学的パラメータと関連付けることができる。このことは、患者試料のそのそれぞれの不連続疾患特異的分子状態に関する解析が、初期時点における疾患の種類の診断を可能にするだけではなく、疾患の将来的な経過についての予後を可能にすることを意味する。よって、患者が例えばRCCを患っているか、また、このRCCが高悪性度又は比較的中程度の形態となるかについて早く知ることができる。次に、この予後は、薬物療法、理学療法(physical treatment)又は手術の種類について決断するときの治療目的に用いることができる。

20

【0152】

更に、試料に不連続疾患特異的状態を割り当てる可能性は、特定の薬物による治療の有効性の解析を可能にする。例えば、過剰増殖性疾患を患う患者又は患者集団を、(i)薬学的に有効な薬剤による治療に対するその反応と、(ii)その不連続疾患特異的分子状態に関し検査することができる。治療に対する反応は、例えば、臨床改善の質及び量によって測定することができる。次に、治療に対するこのようなレスポンダーを不連続疾患特異的状態と相關させるよう試みることができる。特定の不連続疾患特異的状態により疾患が特徴付けられた患者が、治療に対しより順調に反応することが判明した場合、これらの患者は、治療に対しより高度な応答性を示す。

30

【0153】

よって、本発明は、一態様において、少なくとも、

- a . 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、
- b . サインに関して前記試料を検査するステップと、
- c . 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、
- d . 前記個体における疾患症状及び/又は不連続疾患特異的状態における薬学的に有効な化合物の効果を決定するステップと、

40

- e . 疾患症状及び/又は不連続疾患特異的状態における効果と、試料の初期不連続疾患特異的状態との間の相関を同定するステップと

を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体の薬学的に有効な薬剤に対する応答性を決定する方法に関する。

【0154】

サインは、上述に関して検査することができる。試料は、腫瘍試料となることができる。

【0155】

例えば不連続疾患特異的状態の患者の治療に対する応答性を予見できると、多くの面で有用である。例えば、このような応答性が知られている場合、治療のための患者を予め選

50

択することができる。このように、サイン及び不連続疾患特異的状態の同定は、効果的な治療のために患者を予め選択できるコンパニオン（companion）診断法として機能する。特定の治療に応答するであろう患者を同定するためのツールは、高価な治療費を償還するためにこのような検査を必要とする公衆衛生システムにとってますます重要となっている。その不連続疾患特異的状態によって特徴付けられる特定の患者群が、特定の薬学的に有効な薬剤に対し順調に反応するか予見できることも、他の分野にとって重要である。例えば、多くの薬物は、特定の適応症に対してのみFDA等、監督官庁からその最初の販売承認を受ける。多くの場合、その次に、このような薬物が他の疾患の治療に対しても有効であるかの検査を試みる。しかし、このような臨床治験は極めて費用がかかる。

【0156】

10

特定の不連続疾患特異的状態の患者のみが、特定の薬物に対し陽性に反応したことを前もって知っており、その上でこの薬物を他の疾患に関して検査すれば、異なる疾患であっても同一状態の患者を検査する際に、陽性応答を示した不連続疾患特異的プロファイルの患者のみを選択することにより、有意により小さな患者群によりこのような臨床治験を行うことができるであろう。これらの臨床治験は、試験集団がより小さくなることを考慮するとより安価となるだけでなく、治療の効果がより顕著となるため前向きな成績をもたらす可能性もあり、したがってシグナルノイズ比が改善されるためより容易に統計方法により識別可能となり得る。

【0157】

20

治療の応答性を予見できることは、また、本発明の予後的態様の一部を形成する。

【0158】

本発明は、その一実施形態において、少なくとも、

- a . 上述の薬学的に有効な薬剤の投与の結果、疾患症状及び／又は不連続疾患特異的状態における効果と、初期不連続疾患特異的状態との間に相関が存在するか決定するステップと、
- b . 疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがあるヒト又は動物個体の試料をサインに関して検査するステップと、
- c . 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、
- d . ステップc . における試料の不連続疾患特異的状態と、ステップa .)において相関が決定された不連続疾患特異的状態とを比較するステップと、
- e . 前記患者における疾患症状における薬学的に有効な化合物の効果を予見するステップと

を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体の患者の、薬学的に有効な薬剤に対する応答性を予見する方法に関する。

【0159】

30

試料は、腫瘍試料となることができる。

【0160】

40

過剰増殖性疾患等、疾患が、不連続疾患特異的状態によって特徴付けられるとの発見はまた、新しい治療法上有効な薬剤の開発及び／又は同定のための新しいアプローチも提供する。

【0161】

50

上述の通り、患者由来の試料は、その不連続疾患特異的状態に応じて特徴付けることができる。更に、疾患の細胞株も、このような不連続疾患特異的状態を示し得る。不連続疾患特異的状態の患者が応答性となる薬学的に有効な薬剤は、場合により、別の不連続疾患特異的状態（state）への切換えを誘導することができると仮定される。このような他の不連続疾患特異的状態は、全く新しい不連続疾患特異的状態か、或いは他の患者に見られた不連続疾患特異的状態となることができる。例えば、薬学的に有効な薬剤は、低い平均生存時間と相関した不連続疾患特異的状態から、より長い平均生存時間と相関した不連続疾患特異的状態への切換えを誘導することができる。不連続疾患特異的状態及びそれに関する

るサインは、上述の通り同定することができる。

【0162】

実際に、薬学的に有効な薬剤が、不連続疾患特異的状態の切換えを誘導できるのであれば、不連続疾患特異的状態及びそれに関するサインを、薬学的に有効な薬剤の潜在的な有効性の読み出し情報パラメータとして用いることができる。よって、薬学的に有効な薬剤が作用する標的は、不連続疾患特異的状態である。よって、不連続疾患特異的状態は、薬学的に有効な薬剤の標的であると考慮される。

【0163】

したがって、本発明は、その一実施形態において、少なくとも、
 a. 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体又は疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の細胞株の試料を用意するステップと、
 b. 前記試料又は細胞株をサインに関して検査するステップと、
 c. 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料又は細胞株に割り当てるステップと、
 d. 薬学的に有効な薬剤が投与された後に、前記試料又は細胞株をサインに関して検査するステップと、
 e. 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料又は細胞株に割り当てるステップと、
 f. ステップc.)及びe.)において同定された不連続疾患特異的状態を比較するステップと

を含む、薬学的に有効な化合物の効果を決定する方法に関する。

【0164】

試料は、腫瘍試料となることができる。

【0165】

例えば、生存時間の増加等、より有利な臨床パラメータと相關した不連続疾患特異的状態への切換えが観察される場合、この方法によって決定された効果は、例えば、疾患においてプラスの影響を持ち得る化合物の同定を可能にし得る。しかし、化合物が、生存時間の減少等、より不利な臨床パラメータと相關した不連続疾患特異的状態への切換えを誘導する場合、この方法は、有毒化合物の同定も可能にし得る。よって、これらの方法は、例えば、過剰増殖性疾患等、疾患における薬学的に有効な化合物の潜在的な有効性を決定するための、潜在的な薬学的に有効な化合物の開発、同定及び/又はスクリーニングにおけるアッセイとして用いることができる。これらのアッセイは、薬学的に有効な化合物の毒性を決定するために用いることもできる。

【0166】

活性及び/又は有毒薬物候補のためのこのような不連続状態に関するアッセイ系は、新しい医薬品の同定に大いに役立つ。腫瘍の特定の不連続状態が、過剰増殖細胞である状況を単に暗示するだけではなく、例えば腫瘍の攻撃性又は患者の生存時間に関するとの合理的な仮定により、サインの切換えによってモニターされる状態の切換えは、腫瘍状態を変化させるための一般的な「読み出し情報」として興味深いスクリーニングシステムを特徴付ける。そこで、「読み出し情報」は、腫瘍機能と必ずしも関係しない特定の分子標的を遮断するのではなく、機能的有効性に関連する。このようなスクリーニングシステムは、相互作用の分子標的にかかわりなく状態を切り換える任意の化合物を単純に取り上げるであろう。このようなスクリーニングは、逆転写酵素等、特定のウイルス酵素の阻害剤のスクリーニングよりも、細胞培養物におけるウイルス増殖に干渉するアッセイに酷似する。

【0167】

一方、このようなアッセイは、健常細胞に特徴的な状態を過剰増殖性細胞の状態に特徴的な状態に変化させる、化合物の腫瘍形成能(tumorigenicity)を暗示し得る。

【0168】

10

20

30

40

50

例えば、H S 2 9 4 T 細胞の発現解析が行われた。5 mM アセチルシスティンの投与の6時間後、発現解析により、R C C の状態Bに対応する不連続疾患特異的状態の存在が明らかになった。この状態は、投与前には検出できなかった。この結果は、アセチルシスティンが、H S 2 9 4 T 細胞においてこの状態Bへの切換えを誘導できることを示す。

【0169】

同様に、ヒト悪性末梢神経鞘腫瘍(90-8)細胞の発現解析が行われた。これらの細胞を、ICP34.5欠失腫瘍退縮性単純ヘルペスウイルス(oHSV)であるG207に感染させた。感染後、発現解析により、R C C の状態Bに対応する不連続疾患特異的状態の存在が明らかになった。この状態は、感染前には検出できなかった。これは、oHSVが、90-8細胞におけるこの状態Bへの切換えを誘導できることを示す。

10

【0170】

メバロン酸、UO126、MK886、デフェロキサミン、パクリタキセル等、化合物は、類似の効果を持ち得る。

【0171】

よって、疾患の特徴としての不連続疾患特異的状態の知見は、様々な診断、予後、治療、スクリーニング及び開発のためのアプローチを可能にする。これらアプローチの多くにおいて、不連続疾患特異的状態の存在の読み出し情報パラメータとしてサインが用いられる。当然ながら、容易に且つ確実に決定できるサインの使用を目標とする。

【0172】

したがって、好ましくは、遺伝子又はRNA及びタンパク質等の遺伝子関連分子が記述子として用いられ、その発現パターンがサインとして機能するサインを用いることができる。このアプローチの利点は、サインを同定するために通常のマイクロアレイ発現プロファイリングに依存することである。更に、上述の同定方法を利用することにより関連するサイン及び状態を同定するために、マイクロアレイ解析から得られた既存の発現データを用いることができる。

20

【0173】

下文に記す通り、R C Cにおいて3種の異なる不連続疾患特異的状態が同定された。更に、これらの状態は、卵巣癌等、他の過剰増殖性疾患において少なくともある程度まで見出された。これらの状態は、発現データに基づくサインにより説明することができる。

30

【0174】

このデータは、信頼のおける単純明快な読み出し情報を提供するため、本発明は、その一実施形態において、過剰増殖性疾患等、疾患、好ましくはがん、より好ましくは腎細胞癌の分類における診断及び/又は予後マーカーとして用いるため、或いは薬学的に有効な化合物を開発、同定及び/又はスクリーニングするための標的の読み出し情報として用いるためのサインであって、

- a . 表1の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び/又は
 - b . 表2の少なくとも1遺伝子の過小発現
- によって特徴付けられるサインに関する。

【0175】

このサインの存在は、約50%等、約45~約55%の患者が60カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す少なくともR C Cにおける不連続疾患特異的状態を示すであろう。好ましくは、このサインの存在は、約45%等、約40~約50%の患者が90カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す少なくともR C Cにおける不連続疾患特異的状態を示すであろう。

40

【0176】

このようなサインは、

- a . 表1の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び/又は
- b . 表2の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表1及び表2の少なくとも1遺伝子の過剰及び/又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度50%で割り当てる。

50

【0177】

このようなサインは、

- a . 表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 1 及び表 2 の少なくとも 2 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 80 % で割り当てる。

【0178】

このようなサインは、

- a . 表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

10

によって特徴付けられ、それぞれ表 1 及び表 2 の少なくとも 3 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 90 % で割り当てる。

【0179】

このようなサインは、

- a . 表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 1 及び表 2 の少なくとも 4 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 95 % で割り当てる。

【0180】

このようなサインは、

20

- a . 表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 1 及び表 2 の少なくとも 5 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 99 % で割り当てる。

【0181】

不連続疾患特異的状態の割り当てのために、表 1 又は表 2 の単一遺伝子の解析で十分であったとしても、より多くの遺伝子が解析されれば、正確な割り当ての尤度が増加するであろうことを理解されたい。よって、サインは、表 1 の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33 若しくは 34 遺伝子の過剰発現及び / 又は表 2 の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 若しくは 16 遺伝子の過小発現の解析も包含する。表 1 及び / 又は表 2 の全遺伝子の発現データに着目すれば、最も単純明快となり得る。ただ 1 種類よりも多い記述子について考慮することは、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 % 又は少なくとも約 99 % の尤度で、サインと、したがって不連続疾患の決定を可能にし得る。好ましくは、サインは、表 1 及び / 又は表 2 の 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 遺伝子を解析することにより決定される。

30

【0182】

本発明は、その一実施形態において、がん等、過剰増殖性疾患、好ましくは腎細胞癌の分類における診断及び / 又は予後マーカーとして用いるための、或いは薬学的に有効な化合物の開発の標的として用いるための、サインであって、

40

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

により特徴付けられるサインに関する。

【0183】

このサインの存在は、例えば、約 40 % 等、約 30 % ~ 約 45 % の患者が 60 カ月後に生存すると予想できる低い平均生存時間を示す少なくとも RCC における不連続疾患特異的状態を示すであろう。好ましくは、このサインの存在は、約 10 % ~ 20 % 等、約 5 ~ 約 30 % の患者が 90 カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す少なくと

50

も RCC における不連続疾患特異的状態を示すであろう。

【0184】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 2 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 50 % で割り当てる。

【0185】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 3 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 70 % で割り当てる。

【0186】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 4 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 80 % で割り当てる。

【0187】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 5 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 90 % で割り当てる。

【0188】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 6 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 95 % で割り当てる。

【0189】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 7 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定は、不連続疾患特異的状態を尤度 99 % で割り当てる。

【0190】

不連続疾患特異的状態の割り当てのために、表 3 又は表 4 の単一遺伝子の解析で十分であったとしても、より多くの遺伝子が解析されれば、正確な割り当ての尤度が増加するであろうことを理解されたい。よって、サインは、表 3 の少なくとも 2、3 若しくは 4 遺伝子の過剰発現及び / 又は表 4 の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 若しくは 19 遺伝子の過小発現の解析も包含する。表 3 及び / 又は表 4 の全遺伝子の発現データに着目すれば、最も単純明快となり得る。ただ 1 種類よりも多い記述子について考慮することは、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 % 又は少なくとも約 99 % の尤度で、サインと、したがって不連続疾患の決定を可能にし得る。好ましくは、サインは、表 3 及び / 又は表 4 の 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 遺伝子を解析することにより決定される。

【0191】

10

20

30

40

50

本発明は、その一実施形態において、がん等、過剰増殖性疾患、好ましくは腎細胞癌の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための、或いは薬学的に有効な化合物の開発の標的として用いるための、サインであって、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
 - b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現
- により特徴付けられるサインに関する。

【 0 1 9 2 】

このサインの存在は、約 80 % 等、約 70 ~ 約 90 % の患者が 60 ヶ月後に生存すると予想できる高い平均生存時間を示す少なくとも RCC における不連続疾患特異的状態を示すであろう。好ましくは、このサインの存在は、約 70 % 等、約 60 ~ 約 80 % の患者が 90 ヶ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す少なくとも RCC における不連続疾患特異的状態を示すであろう。

10

【 0 1 9 3 】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

により特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 2 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定は、尤度 50 % で不連続疾患特異的状態を割り当てる。

20

【 0 1 9 4 】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

により特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 3 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定は、尤度 70 % で不連続疾患特異的状態を割り当てる。

30

【 0 1 9 5 】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

により特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 4 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定は、尤度 80 % で不連続疾患特異的状態を割り当てる。

30

【 0 1 9 6 】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

により特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 5 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定は、尤度 90 % で不連続疾患特異的状態を割り当てる。

40

【 0 1 9 7 】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

により特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 6 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定は、尤度 95 % で不連続疾患特異的状態を割り当てる。

【 0 1 9 8 】

このようなサインは、

- a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

により特徴付けられ、それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 7 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定は、尤度 99 % で不連続疾患特異的状態を割り当てる。

【 0 1 9 9 】

不連続疾患特異的状態の割り当てのために、表 3 又は表 4 の単一遺伝子の解析で十分で

50

あつたとしても、より多くの遺伝子が解析されれば、正確な割り当ての尤度が増加するであろうことを理解されたい。よつて、サインは、表3の少なくとも2、3若しくは4遺伝子の過小発現及び／又は表4の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18若しくは19遺伝子の過剰発現の解析も包含する。表3及び／又は表4の全遺伝子の発現データに着目すれば、最も単純明快となり得る。ただ1種類よりも多い記述子について考慮することは、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%又は少なくとも約99%の尤度で、サインと、したがつて不連続疾患の決定を可能にし得る。好ましくは、サインは、表3及び／又は表4の2、3、4、5、6、7、8、9又は10遺伝子を解析することにより決定される。

10

【0200】

これらのサイン及びそれに関する不連続疾患特異的状態は、好ましくは、RCCとの関連において上述の診断、治療及び予後目的に用いることができる。しかし、これらのサイン及び状態は、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、骨髄腫、結腸直腸がん、大細胞リンパ腫、口腔扁平上皮癌、子宮頸部扁平上皮癌、甲状腺がん、腺癌においても同定されたため、これらのがん型との関連において上述の目的に用いることもできる。

【0201】

上述の通り、CD34（配列番号780（DNA配列）、781（アミノ酸配列））、DEK（配列番号782（DNA配列）、783（アミノ酸配列））及びMSH6（配列番号784（DNA配列）、785（アミノ酸配列））遺伝子の発現を解析することにより、RCCと先述のがんの高い、中間的及び低い生存時間のサイン（例えば、90カ月後に約80%）を決定することができる。

20

【0202】

高い生存時間の不連続状態は、CD34の高発現、DEKの低～高発現及びMSH6の低～高発現により同定することができる。中間的生存時間の不連続状態は、CD34の低～高発現、DEKの発現なし及びMSH6の発現なしにより同定することができる。低い生存時間の不連続状態は、CD34の低発現、DEKの低～高発現及びMSH6の低～高発現により同定することができる。これらのサインは、本明細書に記載されているあらゆる実施形態において用いることができる。

30

【0203】

既に上で述べた通り、本発明は、腎細胞癌等、過剰増殖性疾患が、異なる不連続疾患特異的状態において存在すると思われるとの知見に依存する。3種のこのようない連続疾患特異的状態は、元々、2回の二元配置階層的クラスタリングアプローチを用いて腎細胞癌（RCC）に対して同定された。第一のステップにおいて、別個の腫瘍コホート内における、しかし該コホートの全部ではなく一部の腫瘍に対し共通して調節解除された、異なつて発現された遺伝子を同定した（図2A～2Dを参照）。第二のステップにおいて、腫瘍サブグループ間の差別化を可能にするこれらの遺伝子を選び、同一腫瘍コホートに対する第二の二元配置階層的クラスタリングステップのマトリクスへと組み合わせた。RCCの場合、これは、A、B及びC8と表示される3種の不連続疾患特異的状態を明らかにした（図3を参照）。これらの状態の一部は、他の腫瘍において同定された（図4を参照）。RCCのため、特定の遺伝子が適切な記述子であると同定された（上述及び例えば表1～4を参照）。これら遺伝子の発現プロファイルは、3種の上述の状態を示す異なるサインを生じる。

40

【0204】

この手持ちの知識に基づき、コンピュータにより実行される、アルゴリズムに基づくアプローチに取り組み、その3種の不連続疾患特異的状態によりRCCの特性評価をもたらす更に別の遺伝子セットを同定した。

【0205】

これらのコンピュータにより実行される、アルゴリズムに基づくアプローチを次に説明するが、これは、その発現パターンを用いて不連続RCC特異的状態B対A C間を識別で

50

きる、表10に表されるおよそ454遺伝子の同定をもたらした。表11に表される別のセットのおよそ195遺伝子の発現パターンを用いて、不連続RCC特異的状態A対C間を識別することができる。次に、これらの結果の意味を説明する。次に、コンピュータにより実行される、アルゴリズムに基づくアプローチを更に詳細に説明する。

【0206】

記載の通り、表10に列挙されている約454遺伝子の発現パターンを用いて、本明細書における命名法のためにBと命名された、3種の不連続RCC特異的状態のうち1種を明確に同定することができる。より正確には、ヒト又は動物個体の試料において、表10の遺伝子1～286が過剰発現されていると判明し、表10の遺伝子287～454が過小発現されていると判明する場合、個体は、不連続RCC特異的状態Bを有すると特徴付けられるであろう。先に記述した通り、この状態は、約50%等、約45～約55%の患者が60カ月後に生存すると予想できる、中間的平均生存時間を見出す。好ましくは、このサインの存在は、約45%等、約40～約50%の患者が90カ月後に生存すると予想できる、中間的平均生存時間を示す、RCCにおける不連続疾患特異的状態を示すであろう。

10

【0207】

しかし、表10の遺伝子1～286が過小発現され、表10の遺伝子287～454が過剰発現されていることが判明する場合、この個体は、残りの2種の不連続RCC特異的状態のうち一方、即ちA又はCを示すと診断することができる。

20

【0208】

このような個体が、状態AかCを示すか決定するため、表11に列挙されている遺伝子の発現パターンを試験することができる。表11の遺伝子1～19が過剰発現され、表11の遺伝子20～195が過小発現されている場合、この個体は、例えば、約40%等、約30%～約45%の患者が60カ月後に生存すると予想できる、低い平均生存時間を示す状態Cを示すであろう。好ましくは、このサインの存在は、約10%～20%等、約5～約30%の患者が90カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す、RCCにおける不連続疾患特異的状態を示すであろう。

20

【0209】

しかし、表11の遺伝子1～19が過小発現され、表11の遺伝子20～195が過剰発現される場合、この個体は、約80%等、約70～約90%の患者が60カ月後に生存すると予想できる、高い平均生存時間を示す状態Aを示すであろう。好ましくは、このサインの存在は、約70%等、約60～約80%の患者が90カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す、RCCにおける不連続疾患特異的状態を示すであろう。

30

【0210】

発現レベルは、Affymetrix遺伝子チップHG-U133A、HG-U133B、HG-U133_Plus_2等を用いて決定することができる。特異的試料における特定の遺伝子が過剰又は過小発現されているかに関する決定は、対照との比較において行われるであろう。この対照は、ソフトウェアにおいて実行されても、測定に亘って全体の中央値又は他の算術平均がなされてもよい。多数の試料を暗示することにより、各遺伝子それぞれの中央値及び/又は平均値を計算することも考え得る。これらの結果に関連して、それぞれの遺伝子発現値が上方又は下方制御としてモニターされる。

40

【0211】

表10及び11の遺伝子の発現パターンにより定義されるRCCサインが、複数の試料に亘る統計解析の成績を反映することを理解されたい。

【0212】

本明細書に記載されている診断、予後、層別化、応答性決定等の方法のため、通常、個体から得られた試料を検査することになる。個体レベルでは、表10及び/又は11の単一遺伝子の発現レベルでは、個体が例えば該単一遺伝子を過剰発現しないとして不連続RCC特異的状態を明確に割り当てるのに必ずしも十分ではない。したがって、通常、表10及び11の2以上の遺伝子の発現パターンを解析することになる。

50

【0213】

通常、表10の少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19又は少なくとも約20遺伝子の発現パターンを解析して、本明細書においてBと表示されている不連続RCC特異的状態が存在するか否かを決定することになる。表10の少なくとも6遺伝子の発現パターンの解析は、状態B又は状態A若しくはCが、約60%以上の信頼性で存在することの決定を可能にするであろう。この信頼性は、より多くの遺伝子が解析されれば増加するであろう。よって、表10の少なくとも10遺伝子の発現パターンの解析は、状態B又は状態A若しくはCが、約80%以上の信頼性で存在することの決定を可能にするであろう。表10の少なくとも15遺伝子の発現パターンの解析は、状態B又は状態A若しくはCが、約90%以上の信頼性で存在することの決定を可能にし、表10の少なくとも20遺伝子の発現パターンの解析は、状態B又は状態A若しくはCが約99%以上の信頼性で存在することの決定を可能にするであろう。このように、表10の約454遺伝子のセットは、状態Bの明確な特性評価の貯蔵所(reservoir)として機能する。例えば、この貯蔵所のおよそ10遺伝子の発現挙動を解析することにより、(i)患者がRCCを患っているか、及び(ii)がん患者が状態Bであるか、又は他の2種の状態A若しくはCいずれかであるかに関して少なくとも80%の信頼性で決定できるようになり、平均生存時間に関する予後をなし得る。状態AとCとを区別するため、次に、表11の遺伝子の発現パターンを解析する必要がある。

10

20

30

40

50

【0214】

同様に、表11の少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19又は少なくとも約20遺伝子の発現パターンを解析して、本明細書においてA又はCと表示されている不連続RCC特異的状態が存在するかどうかを決定することになる。表11の少なくとも5遺伝子の発現パターンの解析は、状態A若しくはCが、約60%以上の信頼性で存在することの決定を可能にするであろう。この信頼性は、より多くの遺伝子が解析されれば増加するであろう。よって、表11の少なくとも10遺伝子の発現パターンの解析は、状態A若しくはCが、約80%以上の信頼性で存在することの決定を可能にするであろう。表11の少なくとも15遺伝子の発現パターンの解析は状態A若しくはCが、約90%以上の信頼性で存在することの決定を可能にし、表11の少なくとも20遺伝子の発現パターンの解析は、状態A若しくはCが約99%以上の信頼性で存在することの決定を可能にするであろう。

【0215】

よって、本発明は、表10の少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19又は少なくとも約20遺伝子の発現パターンに由来し得るサインに関する。このサインは、3種の不連続RCC特異的状態のうち1種、即ち状態Bが存在するかの明確な決定を可能にするであろう。このサインは、表10の遺伝子1~286の過剰発現及び遺伝子287~454の過小発現によって定義される。表10の遺伝子1~286の過小発現及び遺伝子287~454の過剰発現によって定義されるサインは、RCCの他の2種の状態、即ちA又はCを示す。

【0216】

本発明はまた、表11の少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19又は少なくとも約20遺伝子の発現パターンに由来し得るサインに関する。このサインは、残りの2種の不連続RCC特異的状態、即ち状態A又はC

のいずれが存在するかの明確な決定を可能にするであろう。表11の遺伝子1～19の過剰発現及び遺伝子20～195の過小発現によって定義されるサインは、状態Cを示す。表11の遺伝子1～19の過小発現及び遺伝子20～195の過剰発現によって定義されるサインは、状態Aを示す。

【0217】

本発明はまた、RCCとの関連で診断及び/又は予後マーカーとして用いるための上述のサインに関する。サインが存在するか決定することにより、患者が、RCCそれ自体を患う及び/又は将来的にRCCそれ自体を発症する可能性が高いかについて決定することができる。更に、RCC発症の攻撃性の間を識別し、それに従って治療法を調整することができる。更に、本発明は、RCC治療の臨床治験のための試験集団の層別化において用いるための上述のサインに関する。

10

【0218】

更に、本発明は、上述の通りRCCとの関連で少なくとも1種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び/又はスクリーニングするための標的の読み出し情報として用いるための上述のサインに関する。

【0219】

本発明はまた、進行中又は切迫したRCC発症を患うと疑われるヒト又は動物個体の層別化において用いるための上述のサインに関する。層別化は、これらの不連続RCC特異的状態によるこれら個体のグループ化を可能にする。よって、RCC治療において有効であると仮定される潜在的な薬学的に有効な化合物は、このような予め選択された患者群において解析することができる。

20

【0220】

本発明は、また、その一実施形態において、少なくとも、
 a . 腎細胞癌を患うと疑われているヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、
 b . 表10の少なくとも6、好ましくは少なくとも10遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、
 c . ステップb.)において決定されたサインに基づき、前記試料に不連続腎細胞癌特異的状態を割り当てるステップと

を含む、腎細胞癌疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物患者における腎細胞癌を診断、予後、層別化及び/又はスクリーニングする方法に関する。

30

【0221】

更に、本発明は、その一実施形態において、少なくとも、
 a . 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、腎細胞癌を患うと疑われているヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、
 b . 表10の少なくとも6、好ましくは少なくとも10遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、
 c . ステップb.)において決定されたサインに基づき、前記試料に不連続腎細胞癌特異的状態を割り当てるステップと、
 d . 前記個体における疾患症状及び/又は不連続腎細胞癌特異的状態における薬学的に有効な薬剤の効果を決定するステップと、

40

e . 疾患症状及び/又は連続腎細胞癌特異的状態における効果と、ステップc.)において決定された試料の初期不連続腎細胞癌特異的状態との間の相関を同定するステップとを含む、腎細胞癌に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体の薬学的に有効な薬剤に対する応答性を決定する方法に関する。

【0222】

さらに別の実施形態において、本発明は、少なくとも、
 a . 上記の方法を用いることにより、薬学的に有効な薬剤の投与の結果、疾患症状及び/又は不連続腎細胞癌特異的状態における効果と、初期不連続腎細胞癌特異的状態との間に相関が存在するか決定するステップと、
 b . 表10の少なくとも6、好ましくは少なくとも10遺伝子の発現を決定することによ

50

り、腎細胞癌に罹患している疑いがあるヒト又は動物個体患者の試料を、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して検査するステップと、

c . ステップ c .)において決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

d . ステップ c . における試料の不連続腎細胞癌特異的状態と、ステップ a .)において相関が決定された不連続腎細胞癌特異的状態とを比較するステップと、

e . 前記患者の疾患症状における薬学的に有効な化合物の効果を予見するステップとを含む、腎細胞癌に罹患している疑いがある少なくとも1体の患者の、薬学的に有効な薬剤に対する応答性を予見する方法に関する。

【0223】

10

本発明の一実施形態は、少なくとも、

a . 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、腎細胞癌を患う疑いがあるヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、

b . 表10の少なくとも6、好ましくは少なくとも10遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、

c . ステップ b .)において決定されたサインに基づき、不連続腎細胞癌特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

d . 薬学的に有効な薬剤が投与された後に、腎細胞癌を患う疑いがあるヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、

e . 表10の少なくとも6、好ましくは少なくとも10遺伝子の発現を決定することにより、不連続腎細胞癌特異的状態を示すサインに関して前記試料を検査するステップと、

f . ステップ e .)において決定されたサインに基づき、不連続腎細胞癌特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

g . ステップ c .)及びf .)において同定された不連続腎細胞癌特異的状態を比較するステップと

を含む、腎細胞癌の治療のための薬学的に有効な薬剤候補の効果を決定する方法に関する。

【0224】

20

これらのことについて、表10の遺伝子1～286が過剰発現され、表10の遺伝子287～454が過小発現される、表10の少なくとも6、7、8又は9、好ましくは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20遺伝子の発現パターンによって、1種類のサインが特徴付けられる。このサインは、不連続RCC特異的状態Bを示す。よって、サインは、約50%等、約45～約55%の患者が60カ月後に生存すると予想できる、中間的平均生存時間のRCC型を示す。好ましくは、このサインの存在は、約45%等、約40～約50%の患者が90カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す、RCCにおける不連続疾患特異的状態を示すであろう。

【0225】

30

これらのことについて、表10の遺伝子1～286が過小発現され、表10の遺伝子287～454が過剰発現される、表10の少なくとも6、7、8又は9、好ましくは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20遺伝子の発現パターンによって1種類のサインが特徴付けられる。このサインは、不連続RCC特異的状態A又はCを示す。明確な差別化のため、表11の遺伝子の発現プロファイルに基づくサインに依存することができる。

【0226】

40

このようなサインは、表11の遺伝子1～19が過剰発現され、表11の遺伝子20～195が過小発現される、表11の少なくとも6、7、8又は9、好ましくは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20遺伝子の発現パターンによって特徴付けることができる。このサインは、不連続特異的RCC状態Cを示す。よって、これは、例えば、約40%等、約30%～約45%の患者が60カ月後に

50

生存すると予想できる、低い平均生存時間の R C C 型を表示する。好ましくは、このサインの存在は、約 10% ~ 20% 等、約 5 ~ 約 30% の患者が 90 力月後に生存すると予想できる、中間的平均生存時間を示す R C C における不連続疾患特異的状態を示すであろう。

【 0 2 2 7 】

別のサインは、表 11 の遺伝子 1 ~ 19 が過小発現され、表 11 の遺伝子 20 ~ 195 が過剰発現される、表 11 の少なくとも 6、7、8 又は 9、好ましくは、少なくとも 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 遺伝子の発現パターンによって特徴付けることができる。このサインは、不連続特異的 R C C 状態 A を示す。よって、これは、約 80% 等、約 70 ~ 約 90% の患者が 60 力月後に生存すると予想できる、高い平均生存時間の R C C 型を表示する。好ましくは、このサインの存在は、約 70% 等、約 60 ~ 約 80% の患者が 90 力月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す、R C C における不連続疾患特異的状態を示すであろう。

10

【 0 2 2 8 】

上述の通り、R C C の症例に存在する 3 種の不連続疾患特異的状態を示した後、コンピュータにより実行される、アルゴリズムに基づくアプローチにより表 10 及び 11 における遺伝子のセットを同定した。この手持ちの知識に基づき、コンピュータにより実行される、アルゴリズムに基づくアプローチを用いて、既存の発現データにおけるこのようなパターンを同定できることが推測された。このようなアプローチは、「3. R C C 特異的遺伝子セットの同定」の実施例の節に記載されている。

20

【 0 2 2 9 】

よって、本発明は、その一部の実施形態において、次の項目に関する。

【 0 2 3 0 】

1. 疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも 1 体の患者に由来する試料の分類における診断及び / 又は予後マーカーとして用いるための不連続疾患特異的状態。

【 0 2 3 1 】

2. 疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の最小 1 種類の細胞株の分類における診断及び / 又は予後マーカーとして用いるための不連続疾患特異的状態。

30

【 0 2 3 2 】

3. 少なくとも 1 種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び / 又はスクリーニングするための標的として用いるための不連続疾患特異的状態。

【 0 2 3 3 】

4. 少なくとも 1 種類の記述子のサインによって説明することのできる、1 ~ 3 のいずれかに記載の不連続疾患特異的状態。

【 0 2 3 4 】

5. 前記状態が、少なくとも 2 体の患者に由来する試料又は細胞株における少なくとも 2 種類の制御ネットワークの比較によって同定された少なくとも 2 種類の記述子を含むサインによって記載できる、4 に記載の不連続疾患特異的状態。

40

【 0 2 3 5 】

6. 少なくとも 1 種類の記述子の定性的及び / 又は定量的パターンを含み、不連続疾患特異的状態を示すサインであって、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患していると疑われる少なくとも 1 体の患者に由来する少なくとも試料の分類における診断及び / 又は予後マーカーとして用いるためのサイン。

【 0 2 3 6 】

7. 少なくとも 1 種類の記述子の定性的及び / 又は定量的パターンを含み、不連続疾患特異的状態を示すサインであって、少なくとも 1 種類の疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の少なくとも 1 種類の細胞株の分類における診断及び / 又は予後マーカーとして用いるためのサイン。

【 0 2 3 7 】

50

8 . 少なくとも 1 種類の記述子の定性的及び / 又は定量的パターンを含み、不連続疾患特異的状態を示すサインであって、少なくとも 1 種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び / 又はスクリーニングするための標的の読み出し情報として用いるためのサイン。

【 0 2 3 8 】

9 . 少なくとも 2 体の患者に由来する試料又は少なくとも 2 種の異なる細胞株における少なくとも 2 種の異なる制御ネットワークに由来する複数の記述子の解析により同定することのできる、 6 ~ 8 のいずれかに記載のサイン。

【 0 2 3 9 】

10 10 . およそ 100 体の患者に由来する試料又はおよそ 20 種の細胞株におけるおよそ 7 6 種の制御経路に由来するおよそ 200 ~ 400 種の記述子の解析により同定することのできる、 9 に記載のサイン。

【 0 2 4 0 】

11 . およそ 100 体の患者に由来する試料又はおよそ 20 種の細胞株におけるおよそ 1 6 5 種の制御経路に由来するおよそ 200 ~ 400 種の記述子の解析により同定される、 9 に記載のサイン。

【 0 2 4 1 】

12 . 記述子の局在、プロセシング、修飾、動態及び / 又は発現パターンが、サインとして機能する、 6 ~ 11 のいずれかに記載のサイン。

【 0 2 4 2 】

13 . 遺伝子又は遺伝子関連分子が記述子として用いられ、その発現パターンがサインとして機能する、 6 ~ 12 のいずれかに記載のサイン。

【 0 2 4 3 】

14 . 発現が、 R N A 又はタンパク質レベルで検査される、 13 に記載のサイン。

【 0 2 4 4 】

15 . ・表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は
・表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現
によって特徴付けられるサインであって、

少なくとも 1 種類の疾患、必要に応じて少なくとも 1 種類の過剰増殖性疾患、好ましくは腎細胞癌の分類における診断及び / 又は予後マーカーとして用いるための、或いは少なくとも 1 種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び / 又はスクリーニングするための標的の読み出し情報として用いるための、 6 ~ 14 のいずれかに記載のサイン。

【 0 2 4 5 】

16 . それぞれ表 1 及び表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 50 % を超える割り当てを可能にする、

a . 表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は

b . 表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、 15 に記載のサイン。

【 0 2 4 6 】

17 . それぞれ表 1 及び表 2 の少なくとも 4 遺伝子の過剰及び / 又は過小発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 95 % での割り当てを可能にする、

a . 表 1 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は

b . 表 2 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、 16 に記載のサイン。

【 0 2 4 7 】

18 . 約 45 ~ 約 55 % の患者が 60 ヶ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す少なくとも R C C における不連続疾患特異的状態を示す、 15 ~ 17 のいずれかに記載のサイン。

【 0 2 4 8 】

19 . a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び / 又は

b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

10

20

30

40

50

によって特徴付けられるサインであって、

少なくとも 1 種類の疾患、必要に応じて少なくとも 1 種類の過剰増殖性疾患、好ましくは腎細胞癌の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための、或いは少なくとも 1 種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び／又はスクリーニングするための標的の読み出し情報として用いるための、7～14 のいずれかに記載のサイン。

【0249】

20. それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰及び／又は過小発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 50 %での割り当てを可能にする、

a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び／又は

b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、19 に記載のサイン。

10

【0250】

21. それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 6 遺伝子の過剰及び／又は過小発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 95 %での割り当てを可能にする、

a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現、及び／又は

b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、20 に記載のサイン。

20

【0251】

22. 約 35～約 45 % の患者が 60 力月後に生存すると予想できる低い平均生存時間を示す少なくとも RCC における不連続疾患特異的状態を示す、19～21 のいずれかに記載のサイン。

20

【0252】

23. a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は

b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

によって特徴付けられるサインであって、

少なくとも 1 種類の疾患、必要に応じて少なくとも 1 種類の過剰増殖性疾患、好ましくは腎細胞癌の分類における診断及び／又は予後マーカーとして用いるための、或いは少なくとも 1 種類の薬学的に有効な化合物を開発、同定及び／又はスクリーニングするための標的の読み出し情報として用いるための、7～14 のいずれかに記載のサイン。

30

【0253】

24. それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 50 %での割り当てを可能にする、

a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は

b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

によって特徴付けられる、23 に記載のサイン。

40

【0254】

25. それぞれ表 3 及び表 4 の少なくとも 6 遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 95 %での割り当てを可能にする、

a . 表 3 の少なくとも 1 遺伝子の過小発現、及び／又は

b . 表 4 の少なくとも 1 遺伝子の過剰発現

によって特徴付けられる、24 に記載のサイン。

40

【0255】

26. 約 70～約 90 % が 60 力月後に生存すると予想できる高い平均生存時間を示す少なくとも RCC における不連続疾患特異的状態を示す、23～25 のいずれかに記載のサイン。

50

【0256】

27. 生存時間等、機能的臨床パラメータを示す不連続疾患特異的状態を示す、7～26 のいずれかに記載のサイン。

50

【0257】

28. 少なくとも、

a . 疾患を患うヒト若しくは動物個体に由来する疾患特異的試料又は前記疾患の細胞株における遺伝子又は遺伝子関連分子の記述子の質及び／又は量を検査するステップと、
 b . 少なくとも、

i . 各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

i i . 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . 共通の記述子セットの異なるパターンを同定するステップと、

i v . ステップ b .) i i i .)において同定された各パターンにサインを割り当てるステップと、

v . ステップ b .)、i v .)において同定された各サインに不連続疾患特異的状態を必要に応じて割り当てるステップと

を含む、ステップ a .)において得られた結果をクラスタリングするステップと
 を含む、少なくとも1種類の疾患、必要に応じて少なくとも1種類の過剰増殖性疾患に関するサイン及び必要に応じて少なくとも1種類の不連続疾患特異的状態を同定する方法。
 。

【 0 2 5 8 】

29 . 少なくとも、

a . 疾患を患うヒト又は動物個体に由来する疾患特異的試料、或いは前記疾患の細胞株における遺伝子又は遺伝子関連分子の記述子の質及び／又は量を検査するステップと、

b . 少なくとも、

i . 各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

i i . 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . 前記疾患特異的試料又は細胞株に亘り異なって制御される異なる記述子群を同定するステップと

を含む、ステップ a .)において得られた結果をクラスタリングするステップと、

c . ステップ b .) i i i .)において同定された記述子を組み合わせるステップであって、疾患特異的試料又は細胞株における前記記述子の質及び／又は量が、ステップ a .)により既に知られているステップと、

d . 少なくとも、

i . ステップ c .)の各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

i i . 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量に関して疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . ステップ c .)において得られた記述子セットの異なるパターンを同定するステップと、

i v . ステップ d .) i i i .)において同定された各パターンにサインを割り当てるステップと、

v . ステップ d .)、i v .)において同定された各サインに不連続疾患特異的状態を必要に応じて割り当てるステップと

を含む、ステップ c .)において得られた結果をクラスタリングするステップと
 を含む、28に記載の方法。

【 0 2 5 9 】

30 . 少なくとも、

a . 疾患を患うヒト又は動物個体に由来する疾患特異的試料、或いは前記疾患の細胞株における少なくとも2種の制御ネットワークに関する遺伝子又は遺伝子関連分子の記述子の質及び／又は量を検査するステップと、

b . 少なくとも、

i . 少なくとも1種類の制御ネットワーク内における各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

10

20

30

40

50

i i . 1 種類の制御ネットワーク内の全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量について疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . 少なくとも 1 種類の制御ネットワーク内における前記疾患特異的試料又は細胞株に亘り異なって制御される異なる記述子群を同定するステップと

を含む、ステップ a .) において得られた結果をクラスタリングするステップと、
c . ステップ b .) i i i .) において同定された記述子を組み合わせるステップであつて、疾患特異的試料又は細胞株における前記記述子の質及び／又は量が、ステップ a .) により既に知られているステップと、
d . 少なくとも、

i . ステップ c .) の各記述子の結果をその質及び／又は量によって分別するステップと、

i i . 全記述子に亘り、記述子の同等な質及び／又は量について疾患特異的試料又は細胞株を分別するステップと、

i i i . ステップ c .) において得られた記述子セットの異なるパターンを同定するステップと、

i v . ステップ d .) i i i .) において同定された各パターンにサインを割り当てるステップと、

v . ステップ d .) 、 i v .) において同定された各サインに不連続疾患特異的状態を必要に応じて割り当てるステップと

を含む、ステップ c .) において得られた結果をクラスタリングするステップと
を含む、 28 又は 29 に記載の方法。

【 0260 】

31 . およそ 100 体の患者に由来する試料又はおよそ 20 種の細胞株におけるおよそ 76 種の制御経路に由来するおよそ 200 ~ 400 種の記述子が解析される、 30 に記載の方法。

【 0261 】

32 . およそ 100 体の患者に由来する試料又はおよそ 20 種の細胞株におけるおよそ 165 種の制御経路に由来するおよそ 200 ~ 400 種の記述子が解析される、 31 に記載の方法。

【 0262 】

33 . 記述子の局在、プロセシング、修飾、動態及び／又は発現パターンが、サインとして機能する、 28 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【 0263 】

34 . 遺伝子又は遺伝子関連分子が記述子として用いられ、その発現パターンがサインとして機能する、 28 ~ 33 のいずれかに記載の方法。

【 0264 】

35 . 発現が、 RNA 又はタンパク質レベルで検査される、 34 に記載の方法。

【 0265 】

36 . 制御ネットワークが、 Panther ソフトウェアにより同定可能である、 30 ~ 35 のいずれかに記載の方法。

【 0266 】

37 . 請求項 28 ~ 30 のステップ b . 又は d . におけるクラスタリングプロセスが、 TIGR M e V ソフトウェアによる二元配置階層的クラスタリングである、 28 ~ 36 のいずれかに記載の方法。

【 0267 】

38 . 請求項 28 ~ 30 のステップ b . 又は d . における群及びサインの同定プロセスが、 SAM ソフトウェアによりなされる、 28 ~ 37 のいずれかに記載の方法。

【 0268 】

39 . 疾患特異的試料が腎細胞癌細胞株である、 28 ~ 38 のいずれかに記載の方法。

【 0269 】

10

20

30

40

50

40. 細胞株が、初代又は永久腎細胞癌細胞株である、28～38のいずれかに記載の方法。

【0270】

41. 不連続疾患特異的状態及びそれを説明するサインが、生存時間等、機能的臨床パラメータに関連付けられる、28～40のいずれかに記載の方法。

【0271】

42. 28～41のいずれかの方法により得られる記述子セット。

【0272】

43. 28～41のいずれかの方法により得られるサイン。

【0273】

44. 28～41のいずれかの方法により得られる不連続疾患特異的状態。

10

【0274】

45. 少なくとも1種類の疾患、必要に応じて少なくとも1種類の過剰増殖性疾患のための診断又は予後マーカーとして、或いは標的的読み出し情報として、或いは少なくとも1種類の薬学的に有効な化合物の開発及び／又は適用の標的としての、42に記載の記述子セット、43に記載のサイン及び／又は44に記載の不連続疾患特異的試料の使用。

【0275】

46. 少なくとも、

a. 疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患を患うと疑われるヒト又は動物個体、或いは疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の少なくとも1種類の細胞株の試料を用意するステップと、

20

b. サイン、必要に応じて43に記載のサインに関して前記試料を検査するステップと、
c. ステップb.)において決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料又は細胞株に割り当てるステップと

を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体の患者における、或いは疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の少なくとも1種類の細胞株における疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患を診断、層別化及び／又はスクリーニングする方法。

【0276】

47. 少なくとも、

30

a. 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体の試料を用意するステップと、

b. サイン、必要に応じて43に記載のサインに関して前記試料を検査するステップと、

c. 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料に割り当てるステップと、

d. 前記個体における疾患症状及び／又は不連続疾患特異的状態における薬学的に有効な化合物の効果を決定するステップと、

e. 疾患症状及び／又は不連続疾患特異的状態における効果と、試料の不連続疾患特異的状態との間の相関を同定するステップと

を含む、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体の薬学的に有効な薬剤に対する応答性を決定する方法。

40

【0277】

48. 疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体の患者の薬学的に有効な薬剤に対する応答性を予見する方法であって、少なくとも、

a. 46に記載の方法を用いることにより、薬学的に有効な薬剤の投与の結果としての疾患症状における効果と、不連続疾患特異的状態との間に相関が存在するか決定するステップと、

b. サイン、必要に応じて43に記載のサインに関して、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがあるヒト又は動物個体の試料を検査するステップと、

c. 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料に割り当てるステップ

50

と、

d . ステップ c . における試料の不連続疾患特異的状態対、ステップ a .)において相関が決定された不連続疾患特異的状態を比較するステップと、

e . 前記患者における疾患症状における薬学的に有効な化合物の効果を予見するステップと

を含む、方法。

【0278】

49 . 少なくとも、

a . 薬学的に有効な薬剤が投与される前に、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体、或いは疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の細胞株の試料を用意するステップと、

b . サイン、必要に応じて43に記載のサインに関して前記試料又は細胞株を検査するステップと、

c . 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料又は細胞株に割り当てるステップと、

d . 薬学的に有効な薬剤が投与された後に、疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患に罹患している疑いがある少なくとも1体のヒト又は動物個体、或いは疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患の細胞株の試料を用意するステップと、

e . サイン、必要に応じて43に記載のサインに関して前記試料又は細胞株を検査するステップと、

f . 決定されたサインに基づき、不連続疾患特異的状態を前記試料又は細胞株に割り当てるステップと、

g . ステップc.)及びf.)において同定された不連続疾患特異的状態を比較するステップと

を含む、潜在的な薬学的に有効な化合物の効果を決定する方法。

【0279】

50 . 前記不連続疾患特異的状態が、腎細胞癌を患っている疑いがある患者の試料、或いは腎細胞癌細胞株に対して決定される、46~49のいずれかに記載の方法。

【0280】

51 . 疾患、必要に応じて過剰増殖性疾患、好ましくは腎細胞癌の不連続疾患特異的状態が、

a . 表1の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び/又は

b . 表2の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられるサインによって割り当てられる、46~50のいずれかに記載の方法。

【0281】

52 . それぞれ表1及び表2の少なくとも1遺伝子の過剰及び/又は過小発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 50%での割り当てを可能にする、サインが

a . 表1の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び/又は

b . 表2の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、51に記載の方法。

【0282】

53 . それぞれ表1及び表2の少なくとも4遺伝子の過剰及び/又は過小発現の決定が、不連続疾患特異的状態の尤度 90%での割り当てを可能にする、サインが

a . 表1の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び/又は

b . 表2の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、52に記載の方法。

【0283】

54 . サインが、約45~約55%の患者が60カ月後に生存すると予想できる中間的平均生存時間を示す少なくともRCCにおける不連続疾患特異的状態を示す、51~53の

10

20

30

40

50

いずれかに記載の方法。

【0284】

55. 腎細胞癌の不連続疾患特異的状態が、

- a . 表3の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び／又は
- b . 表4の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられるサインによって割り当てられる、46～50のいずれかに記載の方法。

【0285】

56. それぞれ表3及び表4の少なくとも1遺伝子の過剰及び／又は過小発現の決定が、
不連続疾患特異的状態の尤度 50%での割り当てを可能にする、サインが

- a . 表3の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び／又は
- b . 表4の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、55に記載の方法。

【0286】

57. それぞれ表3及び表4の少なくとも6遺伝子の過剰及び／又は過小発現の決定が、
不連続疾患特異的状態の尤度 95%での割り当てを可能にする、サインが

- a . 表3の少なくとも1遺伝子の過剰発現、及び／又は
- b . 表4の少なくとも1遺伝子の過小発現

によって特徴付けられる、56に記載の方法。

【0287】

58. サインが、約35～約45%の患者が60カ月後に生存すると予想できる低い平均生存時間を示す少なくとも RCC における不連続疾患特異的状態を示す、55～57のいずれかに記載の方法。

【0288】

59. 腎細胞癌の不連続疾患特異的状態が、

- a . 表3の少なくとも1遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表4の少なくとも1遺伝子の過剰発現

によって特徴付けられるサインによって割り当てられる、46～50のいずれかに記載の方法。

【0289】

60. それぞれ表3及び表4の少なくとも1遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定が、
不連続疾患特異的状態の尤度 50%での割り当てを可能にする、サインが

- a . 表3の少なくとも1遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表4の少なくとも1遺伝子の過剰発現

によって特徴付けられる、59に記載の方法。

【0290】

61. それぞれ表3及び表4の少なくとも6遺伝子の過小及び／又は過剰発現の決定が、
不連続疾患特異的状態の尤度 95%での割り当てを可能にする、サインが

- a . 表3の少なくとも1遺伝子の過小発現、及び／又は
- b . 表4の少なくとも1遺伝子の過剰発現

によって特徴付けられる、60に記載の方法。

【0291】

62. 約70～約90%の患者が60カ月後に生存すると予想できる高い平均生存時間を示す少なくとも RCC におけるサインが不連続疾患特異的状態を示す、60～62のいずれかに記載の方法。

【0292】

63. サインが、生存時間等、機能的臨床パラメータを示す不連続疾患特異的状態を示す、46～62のいずれかに記載の方法。

【0293】

次に、本発明を特定の実験に関して説明する。しかし、これらの実験を限定的なものと

10

20

30

40

50

解釈するべきではない。

【0294】

実験

1. 材料と方法

組織標本、細胞株、核酸抽出

凍結初代腎細胞癌（RCC）及びRCC転移由来の組織をチューリッヒ大学病院（University Hospital Zurich）の組織バイオバンクから得た。本研究は、地域倫理委員会（local commission of ethics）による承認を受けた（参照番号StV38-2005）。全腫瘍は、尿路病理学（uropathology）を専門にする病理学者により点検し、3段階評点方式（3-tiered grading system）（14）に従ってグレード分けし、世界保健機関（World Health Organisation）分類（15）に従って組織学的に分類した。組織学的に検証された少なくとも80%の腫瘍細胞の存在により、全腫瘍組織を選択した。56種のccRCC、13種のpRCC及び69種の対応する正常腎組織から、血液組織キット（Blood and Tissue Kit）（Qiagen）を用いてDNAを抽出した。74種のccRCC、22種のpRCC、2種の嫌色素性RCC、15種のccRCC転移から、RNeasyミニキット（Qiagen）を用いてRNAを抽出した。46種のccRCC及び10種のpRCCから得られたDNA及びRNAを、SNPアレイ及びマイクロアレイ実験の両方に用いた。24種のRCC細胞株、RCC転移由来の6種の細胞株及び対照として4種の前立腺がん細胞株から得られたRNAにより、発現解析を更に行なった。SNP及び発現アレイ実験に用いたあらゆる腫瘍及び細胞株を表6に列挙する。

10

20

30

40

50

【0295】

SNPアレイ解析及び分類

メーカーの説明書（Affymetrix）に従い、全ゲノムヒトSNP6.0アレイによりSNPアレイ解析を行なった。GeneChipスキャナー3000 7Gを用いてアレイをスキャンした。

【0296】

aroma.affymetrixプロジェクト（16）（<http://groups.google.com/group/aroma-affymetrix/>）から入手したアレイ解析パッケージを用いて、R統計ソフトウェアフレームワーク（<http://www.cran.org>）により未加工のプロープデータCELファイルを処理した。総コピー数の評価は、対立遺伝子クロストークキャリブレーション、プロープ配列効果の正規化及びPCR断片長効果の正規化を含むCRMAv2方法（17）を用いて行った。Circular Binary Segmentation方法（18）を用いてコピー数の分節化を行い、Bioconductorプロジェクト（<http://www.bioconductor.org>）から入手できるDNAコピーパッケージにて実行した。分節化結果、癌遺伝子マップ位置及びゲノム変種データベース（Database of Genomic Variants）（DGV、<http://projects.tcag.ca/variation/>；（19））において報告された公知のコピー数変動を含む正規化データのプロットを、Progenetixプロジェクト（2）（<http://www.progenetix.net>）のために開発されたソフトウェアパッケージにより作成した。2006年3月のヒト参照配列（NCBI Build 36.1）に基づき、UCSCゲノムアセンブリhg18に関してマップ位置を参照した。コピー数不均衡の評価へと進む前に、正規化後に顕著なプロープレベルノイズのあるアレイのデータを除外した。全体として、114種のSNP6.0アレイ（45種の腫瘍、69種の正常組織試料）を最終データ処理に用いた。

【0297】

癌ゲノム（oncogenomic）不均衡は、多くの場合、数百個の可能な標的遺伝子を有する広大なゲノム領域に広がるため、コピー数分節化データにおいて動的閾値化アプローチを用いた。癌遺伝子標的を含有する集中的ゲノム不均衡の決定のため、コピー数ベースラインから高偏差のサイズ制限領域をその遺伝子含量に対し評価した。対応する完全重複CNVがDGVに報告されていなければ、コピー数不均衡領域から第一の候補遺伝子を選択した。全体的ゲノム不均衡プロファイルの作成のため、確率的閾値0.13/-0.13を

それぞれゲノム増加及び減少に用いた。反復的に出現する候補は列挙され、更なる解析に1回だけ検討される。Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>)、KEGG (京都遺伝子ゲノム百科事典 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) - <http://www.genome.jp/kegg/>) 及びPANTHER (進化的関係性によるタンパク質解析) 分類システム (20、21) (<http://www.pantherdb.org>)により、機能的遺伝子分類を行った。PubMed 及びCelaera両データセットを検討しつつPANTHERにより、遺伝子/タンパク質リストの作成及び解析を行った。

【0298】

マイクロアレイ及び発現解析

メーカーの説明書 (Affymetrix、カリフォルニア州サンタクララ) に従ってRNAをハイブリダイズさせた。HTスキャナーを用いてアレイをスキャンした。Bioconductor (22) のMAS5を用いてAffymetrix GeneChipデータを正規化し、 \log_2 スケーリングした。ユークリッド距離及び平均連結法を用いたTIGR MeV (23) により階層的クラスタリングを行った。SAM (12) を用いて腫瘍型特異的バイオマーカーの同定を行った。最も重要な遺伝子をGENEVESTIGATOR (10、11) にて照合して、全試料に亘り信号 (call) なしのプローブセットを取り除いた。

【0299】

PANTHER (血管新生195種、炎症271種、インテグリン196種及びWnt 263種のプローブセット) から抽出された4種の経路由来の遺伝子の少なくとも半分のプローブセットを同定することができた。経路毎に、プローブセット対発現アレイの完全なセット (147アレイ) の二元配置階層的クラスタリングを適用した。本出願人らは、各経路における全体的アレイクラスタリングを最も良く表す最大4種のクラスターを選択した (図2、表8)。最後に、これらクラスターから得られた全プローブセットのジョイントクラスタリングは、記載されているグループ化をもたらした (図3、表5)。

【0300】

マイクロアレイ及びSNPデータは、GSE19949 (暫定公開: 30.06.2010) としてGEOに寄託されている。総説リンク (Reviewer link) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=zronrguasyacefq&acc=GSE19949>

【0301】

試料毎にHG-U133A Affymetrixチップをそれぞれ用いることにより、未加工のマイクロアレイ発現データを作成した。更なる解析のため、オンラインの高品質の手作業で精選した発現データベース及びメタ解析システムGENEVESTIGATOR (www.genestigator.com) にこれらの生データをアップロードした。次に、記載の通り、二元配置階層的クラスタリングを行った。遺伝子発現対試料セット全体をクラスター化した。この第一のクラスタリングに用いた遺伝子リストをPANTHER分類システム (www.pantherdb.org) により提示し、1経路に属す遺伝子全体を網羅させた (図2及び図3を参照)。このようなクラスタリングの結果は、入力した全プローブセットに亘って観察される同一の発現プロファイルを有する腫瘍が、近接して存在することである。異なる腫瘍試料における反復性の異なって制御される遺伝子の存在に依存して、腫瘍コホート全体に亘り別個のクラスターが形成される。第二のステップにおいて、これら形成されたクラスターを表すプローブセットを取り上げ、別のクラスタリングマトリクスへと組み合わせた。その後、同一の試料コホートに対し、同一の二元配置階層的クラスタリング条件を実行した。この解析により、腫瘍群が出現した (図3)。

【0302】

更に別のステップにおいて、別個の群の間の明瞭な差別化を可能にする最良の遺伝子候補が既に図3に取り上げられているかとの疑問が生じた。この疑問に回答するため、図3から異なる群に由来する40種の腫瘍試料 (Affymetrix HG-U133A、生データ) を最良の識別子検出のために任意に取り上げた。GENEVESTIGATORを統計プログラムSAM (マイクロアレイの有意性分析) と組み合わせて用いることによ

10

20

30

40

50

り、それぞれの群のための最良の識別子を計算した(図4)。このように、Affymetrix HG-U133Aマイクロアレイに存在する全22,000種のプローブセットの発現に関して、これら40種の任意に選ばれた試料を統計的に解析した。図3及び図4における作成されたデータは、絶対発現値である。

【0303】

本出願人らは、その結果生じたこのサイン(図4)を、続くメタ解析のための「マーカーサイン」として用いた。この目的のため、GENEVESTIGATORデータベースにおける全HG_U133Aマイクロアレイから入手できる、異なる腫瘍研究に亘るこれら遺伝子の発現特徴を確認した。本明細書に示されている値は、相対値である(図4A及び4Bの右の像)。本明細書において、Affymetrix腫瘍チップ毎に、対応する対照が存在する。サインは、腫瘍試料に出現するが、対照には出現しない。更に、示されている値は平均値である。別個の腫瘍型を表す1種類の実験手順の数種の発現アレイチップはオーバーレイされている。

10

【0304】

TMA構築及び免疫組織化学

本出願人らは、それぞれ27種由来の腫瘍組織及び254種のRCC関連の腎摘除術標本による、2種の組織マイクロアレイ(TMA)を用いた。チューリッヒ大学病院(スイス、チューリッヒ)外科病理学研究所(Institute for Surgical Pathology)の1993年~2007年の間のアーカイブから試料を回収した。以前に記載された通りにTMAを構築した(24)。腫瘍不均一性に十分に対処するため、本出願人らは、27種の腫瘍試料によるTMAの構築のために腫瘍当たり3回パンチ採取した(25)。腫瘍当たり1種類の生検シリンドラーが、254種の腫瘍によるTMA構築に十分であると考えた。スライドグラス上のTMA切片(2.5μm)を、Ventana(米国アリゾナ州ツーソン)自動プロトコールに従った免疫組織化学的解析に付した。CD34(Serotec Ltd.-クローンQBEND-10、1:800希釈)、MSH6(BD Biosciences-クローン44、1:500希釈)及びDEK(BD Biosciences-クローン2、1:400希釈)染色を行い、Leitz Aristoplan顕微鏡(Leica、ドイツ、ウェッツラー)下で解析した。1%を超える腫瘍細胞が明解な核発現を示した場合、腫瘍がMSH6又はDEK陽性であると考慮した。以前に記載された通りにMVDを決定した(26)。Statview5.0(SAS、米国)及びWindows(登録商標)用SPSS17.0(SPSS Inc.、イリノイ州シカゴ)により統計を行った。

20

【0305】

2. 結果

先ず、Affymetrix SNPアレイを用いて、45種のRCC及び対応する正常組織のゲノムプロファイルを解析した。例示するため、本出願人らは、progenetixウェブサイト(<http://www.progenetix.net>)を用いてゲノム不均衡の全体的概略を抽出し、これを472種のRCCの利用できる全データセットと比較した(図1A)。以前のCGHデータ(8)と一致して、本出願人の結果は、RCCにおけるCGHプロファイルの全体的複合物を確認した。

30

【0306】

次に、本出願人らは、CGHにより得られる染色体減少及び増加の解像限界である5Mbを下回る腫瘍特異的ゲノム変化に焦点を合わせた(9)。本出願人らは、0.5kb~5Mbの間を変動し、61種の対立遺伝子増加及び65種の対立遺伝子欠失を包含する、本出願人のコホートにおける126種の異なる領域を同定した。アレル不均衡及び遺伝子機能の種類にかかわりなく、本出願人らは、同一の関連性を、これが「影響を受けた」と考えることにより、各同定領域及び遺伝子に割り当てた。合計すると、769遺伝子のコード領域が部分的又は全体的に関与し、5遺伝子(AUTS2、ETS1、FGD4、PRKCH、FTO)のみが最大5種の腫瘍のみにおいて反復的に影響を受けることが判明した。

40

50

【0307】

公開データにおけるC G Hにより一般に検出される大規模な染色体異常とは対照的に、< 5 Mbのゲノム変化は、形態学的に定義されたRCCサブタイプと関連付けることができない。GENEVESTIGATOR(10、11)(<http://www.genestigator.com>)ヒトマイクロアレイデータセットに対する769遺伝子の追加的な発現解析は、明らかなクラスタリングを示さなかった(データ図示せず)。

【0308】

本出願人らは、Ingenuity、KEGG及びPANTHER等、分類システムに對し遺伝子リスト全体のランを実行した。PANTHERソフトウェアは、これらを上位の生物学的プロセスへと統合した。このデータベースは、769種のIDのうち557種をマッピングした(73%)。PANTHER棒グラフは、557遺伝子を合計165種の利用可能なシグナル伝達及び代謝「ネットワーク」のうち76種へと割り当てた(図1B、表7)。これら4種のプロセスそれぞれの遺伝子の解析は、結果的に上位の生物学的プロセスと異なる「経路」に一般に關与する遺伝子による、多様性及び可塑性を明らかにした。一例として、当初は「炎症」と関連(affiliated)した(PANTHER経路ID P00031)「アクチン関連タンパク質2/3複合体」は、インテグリンシグナル伝達(PANTHER経路ID P00034)、ハンチントン病(PANTHER経路ID P00029)又はRho GTPaseによる細胞骨格制御(PANTHER経路ID P00016)にも關与する遺伝子ARPC5Lを含有する。

10

【0309】

次に、本出願人らは、PANTHERにより割り当てられた76種のプロセスそれぞれの遺伝子リストを作成し、Affymetrix HG-U133Aアレイを用いた98種の初代RCC(SNPアレイ実験に用いた試料を含む)、15種のRCC転移と34種の細胞株における階層的クラスタリングにより、これら遺伝子リストのそれぞれをRNA発現レベルにおいて調査した(表6)。例えば、4種の優位な生物学的プロセス(図1B)「炎症」、「血管新生」、「インテグリン」及び「Wnt」は、それぞれ476、354、365及び497遺伝子で構成された。これら4種の優位なプロセスのクラスタリング内において、本出願人らは、異なる、明確に識別可能な主要な群パターン(図2A~D、表5)を観察したが、これは、数種類の腫瘍群特異的遺伝子制御機構を示唆する。対照的に、残りの72種の生物学的プロセス(アポトーシス、HIF又はp53シグナル伝達のプロセスを含む)の遺伝子の階層的クラスタリングでは、明瞭な異なった遺伝子発現パターンは得られなかった。

20

30

【0310】

次に、本出願人らは、試料の全体クラスタリング(図2A~D、赤ボックス、表8)の最も代表的な合計92遺伝子により4種のマトリクスそれから最大4種の遺伝子クラスターを選択し、それらを新たなマトリクスへと組み合わせた。このマトリクスのその後のクラスタリングは、4種の明確に別個の腫瘍群(「A」、「B」、「C」及び「細胞株」と称する)を生じた(図3、表5)。PANTHERにより提案された4種の「経路」のメンバーではあるが、92遺伝子は、これら生物学的プロセスに關与する遺伝子は低いパーセンテージしか表さなかった。したがって、本出願人らは、腫瘍群を経路特異的であると考えるより、腫瘍群の「A」、「B」、「C」及び「細胞株」への細分化を好む。特に、92種の選択されたクラスター関連遺伝子から選ばれた単一の(ITALG)は、本出願人らのRCCセットの単一の腫瘍においてCNAにより直接的に影響を受けるとしても、本出願人らのSNPアレイ解析により検出されたゲノム変化から最終的に生じたと思われる群特異的発現サインを集合的に構成する。

40

【0311】

別の群を表す細胞株とは対照的に、RCC転移及び初代RCCは、腫瘍サブタイプ、ステージ又は分化グレードにかかわりなく群A、B又はCに分かれる。明細胞RCC(cc RCC)、乳頭状RCC(pRCC)及び嫌色素性RCCは、異なる形態学的表現型を有するが、異なるクラスターに亘る3種のサブタイプの出現組合せは、分子的類似性を示唆

50

する。

【0312】

次に、本出願人らは、図3において以前に同定された3種の腫瘍群から任意に選ばれた40種の初代RCC試料に亘り遺伝子発現をプロファイルした。このアレイの全22,000種のプローブセットに亘るこれら試料の階層的クラスタリングは、B型が、A及びCとは明確に別個のものであること(図4C左)を示し、群Aは、Cクラッド(clad)内の高度な(tight)クラスターとして現れる。SAM(12)を用いたところ、2,000を超える遺伝子において発現レベルの少なくとも2倍の変化が観察され、そのうちA及びCと比較してBにおいて1,455遺伝子はより高発現、715遺伝子はより低発現であり、A対Cにおいて221遺伝子は正に、11遺伝子は負に制御された。これらの独立した知見は、SNPアレイの結果に由来する遺伝子に基づくRCCの以前のグループ化を確認した。
10

【0313】

群B並びに群A及びC間で最も異なって制御された遺伝子は、48遺伝子によって表され、そのうち16遺伝子はBにおいて低発現だがA及びCにおいて強く発現し(8.7~5.7倍の変化)、32遺伝子の転写産物はBに豊富だがA及びCでは減少した(14.4~5.2倍の変化)(図4A左、表1及び2)。23遺伝子は、群A及びCを明確に識別し、そのうち4遺伝子はCにおいて高度に発現したがAでは高度に発現せず(14.3~2.5倍の変化)、一方、19遺伝子はAにおいて高度に発現したがCでは高度に発現しなかった(16.0~4.2倍の変化)(図4B左、表3及び4)。
20

【0314】

次に、本出願人らは、GENEVESTIGATORデータベースにおける全HG_U133Aマイクロアレイから入手できる、80種の異なる腫瘍研究に亘るこれら遺伝子の発現特徴を比較した(「腫瘍」対「健常」の比較セット)。RCC腫瘍B対RCC腫瘍A及びC間で異なって発現する遺伝子に関し、4種の独立した腎臓がん実験及び24種の更に別の腫瘍セットは、非常に類似した二峰性(bimodal)発現サインを呈した。これらセットのうち16セットは、RCC型A及びCと類似のサインを有し、8セットはB型と類似していた。同様に、RCC腫瘍A型対C型間で最も有意に調節解除された遺伝子に関し、16種の腫瘍セットは、GENEVESTIGATORにおいて類似の特徴を示した。腎臓がんに加えて甲状腺がんも、RCC型Aと類似していたが、乳癌、膀胱癌及び子宮頸部癌等、12種の他のセットは、C型と高度に相関していた。データベースに存在する残りの39種の腫瘍セットに関し、群A、B又はC特異的遺伝子サインを有するものはなかった。これらの結果は、本出願人らのアプローチが、RCCだけでなく他の腫瘍型における発癌における3種の異なる一般分子サインの高度な再現性を立証し、多くの異なるヒトがんによって活用される分子戦略に適合すると主張するものとして確認した。
30

【0315】

次に、本出願人らは、3群それぞれから27種のRCCを無作為に選択し(図3)、それらを小組織マイクロアレイ(TMA)へと配置した。ヘマトキシリノ/エオシン染色したTMA切片は、病理学者により盲検的に評価された。群Aの腫瘍全9種を高い微小血管密度(MVD)により特徴付けたが、群B及びCの腫瘍において特異的な形態的特色は見られなかった。この知見を更に検証するため、本出願人らは、この27種のRCCにおける内皮細胞マーカーCD34を免疫組織化学的に染色した。
40

【0316】

表9及び図5に示す通り、結果は、群特異的血管新生形質を大部分確認した。群Aにおいては全9種の腫瘍だが、群Bにおいては3種のみ、群Cにおいては1種のみが、アレイスポット(0.036mm²)当たり100を超える微小血管を有したが、一方、それ以外は50未満の微小血管を有していた。これに従い、高及び低MVDの腫瘍を分類した。群B及びCに割り当てられた腫瘍において更に別の特異的な形態学的特色は観察されなかつた。

【0317】

10

20

30

40

50

次に、本出願人らは、この3群において明瞭な有無が分かる発現プロファイルを有する遺伝子をS A Mにより探索した。これら遺伝子にコードされた数種のタンパク質候補の染色パターンを調べることにより、本出願人らは、最終的に、高M V D且つD E K及びM S H 6陽性の腫瘍を群A、M S H 6陰性腫瘍を群B、低M V DだがD E K及びM S H 6陽性的腫瘍を群Cに割り当てる事ができた。

【0318】

得られた群特異的タンパク質発現パターンを更に数多くの腫瘍において評価するため、本出願人らは、254種のR C CによるT M Aをスクリーニングした。小検査T M Aから得られた染色組合せを厳密に適用することにより、189種の腫瘍(75%)を特定の群に明確に割り当てる。異なる腫瘍サブタイプ及び核分化グレードだが、これらの群において変動する頻度の臓器限局型転移性R C Cが存在した(図6)。

10

【0319】

これらの群の臨床上の攻撃性を決定するため、本出願人らは、生存データが利用できるT M Aによる189種のR C C試料のうち176種における解析に集中した。カプラン-マイヤー解析は、群関連と全体的生存との高度に有意な相関(対数順位検定: $p < 0.001$)を示し、それによると、患者成績は群Aが最も良く、群Cが最も悪かった(図4D)。この結果は、腫瘍ステージ及び多変量解析におけるT h o e n e sグレードとは独立的であった(図6)。この生存解析を行うことにより、本出願人らは、R C Cの分子的再分類が、患者予後不良を伴う高い転移潜在力を有する初期腫瘍($p T 1$ 及び $p T 2$)の同定を可能にすることを立証する。その上、群Aにおける後期非転移性R C Cの知見は、その腫瘍が $p T 3$ にカテゴリー化されたとしても相対的に予後良好となる患者の存在も示唆する。

20

【0320】

本報告に提示されているデータは、クラスターを形成する発見された群が、発癌の3種の共通様式を反映する遺伝子サインを表すことを示唆する。これらの遺伝子クラスターは、本出願人らのR C Cコホートにおいて検出された126種の腫瘍特異的C N Aの全セットを適用することによってのみ決定することができる。したがって、C N Aの頻度が單一の腫瘍において大きく異なり、なし及び18種の変化したゲノム領域間で変動するとしても、群特異的遺伝子発現パターンのそれぞれは安定的なままであることに注目すべきである。結果として、これらR C Cのそれぞれは、3種の腫瘍群のうち1群に到達するよう分子成分の制御を共に支持する、C N Aとは別の個々に均衡を保つ機構(即ち、変異、メチル化、転写及び翻訳修飾)を発達させてきたに違いない(図7)。

30

【0321】

本出願人らのメタ解析は、多くの異なるヒトがん型によって追求された類似の戦略を示唆する。したがって、腫瘍型コホートにおける単一の腫瘍に存在する異なる種類の分子変化(即ち、変異、C N A及びメチル化)全体か、特定の種類の分子変化(即ち、C N Aのみ)全体のいずれかが、遺伝子発現プロファイリングにより可視化できる群特異的アウトプットを常にもたらすとの推測が導かれる。

30

【0322】

データは、各腫瘍が、試行錯誤により自身の分子ロードマップをプログラムし、最終的に3種の異なる「目的地」の1種に到達することを示す。本出願人らのメタ解析は、様々なヒトがん型におけるこれら群又は不連続状態の存在を立証したが、全てのヒトがん型ではないため、更に別の未知の群が存在し得る。

40

【0323】

3. R C C特異的遺伝子セットの同定

発現データ作成

コンピュータで実行される、アルゴリズムに基づく解析に用いるデータは、A f f i m e t r i x製等のマイクロアレイチップを用いて作成した。試料中のm R N Aは、P C Rを用いて増幅する。マイクロアレイチップにおいて、各遺伝子は、遺伝子から得られた複数(通常10~20種)の25ヌクレオチド配列により表される。通常、各配列は、修正

50

バージョンのチップ上に 2 回登場する。この修正バージョンをミスマッチと呼ぶ（正確なバージョンは完全マッチと呼ばれる）。これは、mRNA の特定の配列への非特異的結合の評価に用いられる。この配列ペアをプローブペアと呼ぶ。1 遺伝子の全プローブペアをプローブセットと呼ぶ。配列及びそのチップにおけるレイアウトは、マイクロアレイチップのベンダーにより定義及び記述されている。試料の各測定の後、遺伝子当たり最大 50 個の値が得られ、これらは試料における遺伝子の発現レベル 1 個へと組み合わせる必要がある。

【 0 3 2 4 】

正規化

発現レベルを決定するため、異なるアプローチを用いることもできる。顕著な一例は、モデルベースの正規化である（27）。各プローブペアのモデルベースの正規化において、完全マッチ（PM）及びミスマッチ（MM）間の差異が計算される。次に、複数の試料又は測定から得られたある 1 プローブセット（即ち、ある 1 遺伝子）の結果を検討する。

【 0 3 2 5 】

各プローブペア p の感度 s_p は様々であるが、このプローブペアに特異的であると仮定される。一方、ある 1 試料 s における各遺伝子の発現 e_s レベルは、全プローブペアで一定となる筈である。したがって、

$$PM_{s,p} - MM_{s,p} = s_p e_s + n_{p,s} \quad (1)$$

（式中、 $n_{p,s}$ は、追加的なノイズであり、 s_p 及び e_s は、ここでは、 $n_{p,s}$ の合計が最小となり、 s_p^2 の合計がプローブペア数に等しくなるよう最適化されている）
と仮定する。

【 0 3 2 6 】

データを正規化する更に別の仕方は、カーネル回帰の使用に依存する。カーネル回帰正規化を用いることの根拠は、プローブペアシグナル及び / 又は発現レベルが、異なる測定において異なるスケーリング及びオフセットを依然として提示し得ることである。例えば、PCR の期間及び有効性は、シグナルをこのようなやり方で改変し得る。更に、シグナル増幅は、非直線的な仕方において測定間で異なる可能性がある。測定を比較するために、これらの改変は補正される必要がある。この補正のための選択肢の 1 つは、カーネル回帰方法（32）例えば、Lowess である。

【 0 3 2 7 】

回帰を決定するため、遺伝子セット及び参照試料を定義する必要がある。参照試料は、異常値（outlier）の数が最も少ない最も平均な試料となるよう採用される。遺伝子セットは、全遺伝子を含んでいてもよいが、遺伝子のサブセット、例えば、マイクロアレイベンダー）によって供給される所定のハウスキーピング遺伝子セット又は不变セット方法（28）により決定された遺伝子セットを用いてもよい。しかし、がん状態による遺伝子群の系統的増幅は、試料間に類似の非線形関係を生じ得る。したがって、カーネル回帰方法は、この文脈において慎重に用いるべきである。ソフトウェア dChip（29）は、上述の正規化方法の大部分を実行する。

【 0 3 2 8 】

スケーリング

正規化は通常、試料セットにおいて行われる。したがって、これらの試料は、スケール及びオフセットが同程度となる。しかし、異なる場所で測定及び正規化された試料は、やはりこの点において異なるであろう。したがって、

- ・極限のデータポイントにおける誤差
- ・オフセット及び
- ・線形スケーリング

に対して強いデータのスケーリングが必要とされる。

【 0 3 2 9 】

更に、スケーリングは、この点において、他の試料から得られたいかなるデータにも依存するべきではない。これを達成するための可能性の 1 つは、次式の使用である。

10

20

30

40

50

$$e_{scaled} = (f(e) - m) / (2) \quad (2)$$

・任意の関数 f は、極値の影響を低下させるために発現レベルを変換することができる。例えば、これは、単位元 (identity) 又は対数となることができる。対数等の関数が用いられる場合、非有限値を回避するため、対数を評価する前に小さな定数 m を加えることが必要となる場合がある。次に、 e のサイズは、最小の測定された発現レベルの順となるべきである。

・任意の平均 m は、1 試料内の全体発現レベル (f による変換後) から得られる。この平均の例として、算術平均又は中央値が挙げられる。

・任意の量 m は、データのスケールを表す。本明細書における例として、1 試料内の全体発現レベル (f による変換後) から得られた標準偏差が挙げられる。2 個の中央四分位点の考慮に入れる範囲を低下させることもできる。10

【0330】

別の可能性として、発現レベルのハウスキーピング遺伝子セットに関して直線的なスケーリングが挙げられる。これらの遺伝子は、カーネル回帰に関して同様に選択するべきである。

【0331】

クラスター検索

状態は、ある腫瘍群を他の腫瘍群から遺伝子発現レベル及び医学パラメータの両方において分ける共通の特性と考えられる。これらの腫瘍群は、学習セットの腫瘍の遺伝子発現プロファイルに、教師なし学習 (unsupervised learning) の異なる種類の方法 (33) (ニューラルガス (neural gases) (31) 及びクラスター検索、例えば、 k -最近傍検索 (35) 等) を適用することによって確立することができる。アルゴリズムにより用いられる距離測定 (メトリック (metric)) の選択も重要である。単純ユークリッドノルムだけではなく、相関を選ぶこともできる。用いたスケーリングの種類もまた、メトリックと、したがってクラスター検索の結果に影響を及ぼす。20

【0332】

したがって、状態を導くことができる包括的な図柄を得るには、異なるアルゴリズム、メトリック及びスケーリングを用いるのが賢明である。

【0333】

これらの状態は、2 セットの状態が明確に分けられるが、それ自身が準状態に分かれる一種類の階層を形成することもできる。30

【0334】

RCC の場合、A、B、C と表示されるがんの 3 状態が見出された。状態 A 及び C は、 AC と呼ぶことのできる、より一般的な状態の準状態である。

【0335】

遺伝子検索

状態が決定されると、今度は、所定の試料セットにおいてある状態を他の状態と区別する遺伝子を見つけなければならない。遺伝子は、あらゆる種類の系統的誤差に対し可能な限り強い仕方で選択するべきである。これは、スケーリング関数の良い選択と、選択判断基準の良い選択とを含む。可能な選択判断基準として、次のものが挙げられる。40

- ・マイクロアレイインデックスの有意性分析 (30)。
- ・対象の状態の試料以外の全試料に対し 0 となる関数に対する、学習セットにおける全試料の発現レベルの相関。対象の状態の試料の場合、この関数は 1 となる。
- ・最適化された単一遺伝子モデル (例えば、次節を参照) を用いた遺伝子に基づく予見の正確さ。

【0336】

遺伝子選択の質を高めるため、これらの判断基準は、異なるスケーリング、例えば、(2) 及び (4) 又は異なる正規化、例えば、 $dChip$ データ及び単にモデルベースの正規化データ並びにそれらの任意の組合せにおいて検定することができる。

【0337】

10

20

30

40

50

遺伝子検索は、あらゆる選択された判断基準に対し最小値、例えば、0.7を超える相関の絶対値又は0.85を超える正確さを達成する遺伝子のみを含むべきである。

【0338】

モデル

各サブモデルは、対応する閾値 g 及びサイド (sides) ((1) 及び (-1)) を有する遺伝子 g のリスト並びに 2 セットの状態 (セット「in」及びセット「out」) からなる。先ず、各遺伝子を個々に評価する。この遺伝子リストは、上述の遺伝子検索を用いて決定され、遺伝子の閾値は、正確さが最適となるように決定される。正の相関を有する遺伝子は「過剰発現」と考えられ、その他の遺伝子は「過小発現」と考えられる。

【0339】

サイドが「過剰発現」である場合、次の検定が行われる。

$e_g > g^+$ であれば、 N_{in} を 1 増加させる (3a)

$e_g < g^-$ であれば、 N_{out} を 1 増加させる (3b)

【0340】

サイドが「過小発現」である場合、次の検定が行われる。

$e_g < g^-$ であれば、 N_{in} を 1 増加させる (3c)

$e_g > g^+$ であれば、 N_{out} を 1 増加させる (3d)

【0341】

因数 $>= 0$ は、遺伝子閾値 g 前後の不確実性の範囲を定義する。スケールフリースケーリング ((2) 等) を用いた場合、の合理的な選択は 1/3 である。そうでなければ、スケールはに含まれる必要がある。

【0342】

これらの検定は、サブモデルにおける全遺伝子に対し行われる。最終的に、2 個の計算値 N_{in} 及び N_{out} が得られる。続いて、これら 2 個の計算値を比較する。

- $N_{in} > N_{all}$ 且つ $N_{in} > N_{out}$ であれば、腫瘍は、「in」状態の 1 種であると考えられる。

- $N_{out} > N_{all}$ 且つ $N_{out} > N_{in}$ であれば、腫瘍は、「out」状態の 1 種であると考えられる。

【0343】

因数 α は、(3)において決定されたと思われる遺伝子の最小画分を定義する。因数 β は、検討されている状態セットがどの程度他の状態セットを上回る (beat) かにより定義する。合理的な選択は、 $\alpha = 1/3$ 、 $\beta = 2$ である。

【0344】

縮小モデル

一部の適用のためには、遺伝子検索 (遺伝子検索の節を参照) により作成された遺伝子リストは包括的に過ぎる。この場合、遺伝子検索の節に記されている判断基準のうち 1 又は複数によって選択された最良の遺伝子のみを用いてもよい。しかし、これは、用いられる所定数の遺伝子の最良の選択とはならない可能性がある。全遺伝子は個々に検定され、多数の正確な予見状態を生じるが、遺伝子がより大規模なリストから慎重に選択されない限り、同一試料を誤分類する可能性がある。要求されるサブセットのサイズが小さい程、より慎重に選択を行わなければならない。したがって、遺伝子をサブ選択 (sub-select) するためのアルゴリズムが必要とされる。これは、最適化判断基準のセットにおける遺伝的アルゴリズム又は単純ランダム - ウォーク最適化等、任意の最適化アルゴリズムにより行うことができる。このような判断基準は、次のものを含むことができる。

- 試料の学習セットにおける予見の正確さ。完全な遺伝子リストの結果は、試料の正確な状態であると仮定される。このように、縮小モデルは、完全モデルと一致する。

- 試料の学習セットにおける予見の傾向の正確さ。上に定義するモデルから不確実性の範囲を完全に ($\alpha = 0$ 、 $\beta = 0$ 、 $\gamma = 1$)、或いは部分的に (例えば、 $\alpha = 0$ 、 $\beta = 1$) 取り除く場合、依然として状態を得ることができるが、その信頼性は低い。変化させていないモデルが状態を予見しない場合、これらの状態を予見の傾向と呼び、これを本明細書に

10

20

30

40

50

おいて用いることができる。更に、完全遺伝子リストを用いた予見及び傾向は、試料の正確な状態を表すと仮定される。このように、縮小モデルは、予見及び傾向の両方において完全モデルと一致する。

・検定セット試料の予見及び傾向における誤差。これらの検定セット試料は、オリジナルの学習セットには含まれていない。このようなデータは、遺伝子発現オムニバス（Gene Expression Omnibus）（34）から得ることができる。

【0345】

追加的な制約（例えば、少なくとも25%の過剰発現遺伝子）を選択アルゴリズムに適用してもよい。

【0346】

【表1】

No.	プローブ セットID*	遺伝子記号	配列番号 (mRNA)	配列番号 (アミノ酸)
1	216527_at	-	---	---
2	214715_x_at	ZNF160	1	2
3	222368_at	-	---	---
4	214911_s_at	BRD2	3	4
5	214870_x_at	LOC100288442	5	6
6	215978_x_at	LOC152719	7	8
7	221501_x_at	LOC339047	9	10
8	212177_at	SFRS18	11	12
9	216563_at	ANKRD12	13	14
10	213311_s_at	TCF25	15	16
11	216187_x_at	-	---	---
12	208246_x_at	-	---	---
13	214235_at	CYP3A5	17	18
14	220796_x_at	SLC35E1	19	20
15	206792_x_at	PDE4C	21	22
16	214035_x_at	LOC399491	23	24
17	215545_at	-	---	---
18	212487_at	GPATCH8	25	26
19	221191_at	STAG3L1	27	28
20	213813_x_at	-	---	---
21	220905_at	-	---	---
22	214052_x_at	BAT2D1	29	30
23	212520_s_at	SMARCA4	31	32
24	221419_s_at	-	---	---
25	211948_x_at	BAT2D1	33	34
26	221860_at	HNRNPL	35	36
27	211600_at	PTPRO	37	38
28	214055_x_at	BAT2D1	39	40
29	220940_at	ANKRD36B	41	42
30	212027_at	RBM25	43	44
31	213917_at	PAX8	45	46
32	208610_s_at	SRRM2	47	48
33	202379_s_at	NKTR	49	50
34	211996_s_at	LOC100132247	51	52

*プローブセットIDは、Affymetrix HG-U133Aチップの識別番号を意味する。

【0347】

10

20

30

40

【表2】

No.	プローブ セットID*	遺伝子記号	配列番号 (mRNA)	配列番号 (アミノ酸)
1	201554_x_at	GYG1	53	54
2	221449_s_at	ITFG1	55	56
3	201337_s_at	VAMP3	57	58
4	203207_s_at	MTFR1	59	60
5	214359_s_at	HSP90AB1	61	62
6	208029_s_at	LAPTM4B	63	64
7	209739_s_at	PNPLA4	65	66
8	202226_s_at	CRK	67	68
9	207124_s_at	GNB5	69	70
10	211450_s_at	MSH6	71	72
11	218163_at	MCTS1	73	74
12	218462_at	BXDC5	75	76
13	211563_s_at	C19orf2	77	78
14	215236_s_at	PICALM	79	80
15	200973_s_at	TSPAN3	81	82
16	219819_s_at	MRPS28	83	84

*プローブセットIDは、Affymetrix HG-U133Aチップの識別番号を意味する。

10

20

【0 3 4 8】

【表3】

No.	プローブ セットID*	遺伝子記号	配列番号 (mRNA)	配列番号 (アミノ酸)
1	221872_at	RARRES1	85	86
2	211519_s_at	KIF2C	87	88
3	219429_at	FA2H	89	90
4	204259_at	MMP7	91	92

*プローブセットIDは、Affymetrix HG-U133Aチップの識別番号を意味する。

30

【0 3 4 9】

【表4】

No.	プローブ セットID*	遺伝子記号	配列番号 (mRNA)	配列番号 (アミノ酸)
1	206836_at	SLC6A3	93	94
2	208711_s_at	CCND1	95	96
3	221031_s_at	APOLD1	97	98
4	205903_s_at	KCNN3	99	100
5	205247_at	NOTCH4	101	102
6	219371_s_at	KLF2	103	104
7	204677_at	CDH5	105	106
8	205902_at	KCNN3	107	108
9	212558_at	SPRY1	109	110
10	221529_s_at	PLVAP	111	112
11	212538_at	DOCK9	113	114
12	218995_s_at	EDN1	115	116
13	218353_at	RGS5	117	118
14	204468_s_at	TIE1	119	120
15	219091_s_at	MMRN2	121	122
16	205507_at	ARHGEF15	123	124
17	209070_s_at	RGS5	125	126
18	221489_s_at	SPRY4	127	128
19	203934_at	KDR	129	130

*プローブセットIDは、Affymetrix HG-U133Aチップの識別番号を意味する。

【0 3 5 0】

10

20

【表5】

No.	プローブ セットID*	遺伝子記号
1	202677_at	RASA1
2	207121_s_at	MAPK6
3	203218_at	MAPK9
4	200885_at	RHOC
5	200059_s_at	RHOA
6	218236_s_at	PRKD3
7	206702_at	TEK
8	221016_s_at	TCF7L1
9	203238_s_at	NOTCH3
10	202273_at	PDGFRB
11	205247_at	NOTCH4
12	32137_at	JAG2
13	204484_at	PIK3C2B
14	202743_at	PIK3R3
15	205846_at	PTPRB
16	203934_at	KDR
17	202668_at	EFNB2
18	212099_at	RHOB
19	219304_s_at	PDGFD
20	210220_at	FZD2
21	204422_s_at	FGF2
22	202647_s_at	NRAS
23	202095_s_at	BIRC5
24	219257_s_at	SPHK1
25	205962_at	PAK2
26	205897_at	NFATC4
27	208041_at	GRK1
28	208095_s_at	SRP72
29	200885_at	RHOC
30	212294_at	GNG12
31	208736_at	ARPC3
32	217898_at	C15orf24
33	200059_s_at	RHOA
34	207157_s_at	GNG5
35	208640_at	RAC1
36	201921_at	GNG10
37	209239_at	NFKB1
38	211963_s_at	ARPC5
39	204396_s_at	GRK5
40	201473_at	JUNB
41	201466_s_at	JUN
42	212099_at	RHOB
43	202112_at	VWF
44	213222_at	PLCB1
45	203896_s_at	PLCB4
46	202647_s_at	NRAS
47	219918_s_at	ASPM
48	217820_s_at	ENAH
49	202647_s_at	NRAS
50	205055_at	ITGAE
51	200950_at	ARPC1A
52	203065_s_at	CAV1
53	208750_s_at	ARF1
54	201659_s_at	ARL1

10

20

30

40

55	200059_s_at	RHOA
56	201097_s_at	ARF4
57	204732_s_at	TRIM23
58	219431_at	ARHGAP10
59	209081_s_at	COL18A1
60	216264_s_at	LAMB2
61	210105_s_at	FYN
62	204484_at	PIK3C2B
63	202743_at	PIK3R3
64	204543_at	RAPGEF1
65	221180_at	YSK4
66	206044_s_at	BRAF
67	217644_s_at	SOS2
68	206370_at	PIK3CG
69	213475_s_at	ITGAL
70	205718_at	ITGB7
71	221016_s_at	TCF7L1
72	205656_at	PCDH17
73	219656_at	PCDH12
74	204677_at	CDH5
75	204726_at	CDH13
76	208712_at	CCND1
77	213222_at	PLCB1
78	219427_at	FAT4
79	201921_at	GNG10
80	202981_x_at	SIAH1
81	201375_s_at	PPP2CB
82	201218_at	CTBP2
83	200765_x_at	CTNNAL1
84	208652_at	PPP2CA
85	212294_at	GNG12
86	203896_s_at	PLCB4
87	220085_at	HELLS
88	202468_s_at	CTNNAL1
89	206194_at	HOXC4
90	206858_s_at	HOXC6
91	201321_s_at	SMARCC2

10

20

30

*プローブセットIDは、Affymetrix HG-U133Aチップの識別番号を意味する。

【 0 3 5 1 】

【表6】

チップ#	Genevestigator_チップ標題	グレード Thoenes	ステージ	サブタイプ/ 細胞株	群への クラスター	SNPアレイ においても 同様に
1	RCC_clear cell_BI_repl	2	2	明細胞RCC	B	あり
2	RCC_clear cell_BI_rep2	2	2	明細胞RCC	B	なし
3	RCC_clear cell_BI_rep5	2	2	明細胞RCC	A	なし
4	RCC_clear cell_S1_BI_repl	2	1	明細胞RCC	C	あり
5	RCC_clear cell_S1_BI_rep2	1	2	明細胞RCC	B	なし
6	RCC_clear cell_S1_BI_rep3	2	2	明細胞RCC	B	あり(外側)
7	RCC_clear cell_S1_BI_rep4	1	1	明細胞RCC	A	なし
8	RCC_clear cell_S1_BI_rep5	2	2	明細胞RCC	B	あり(外側)
9	RCC_clear cell_S3_BI_repl	3	3	明細胞RCC	B	あり(外側)
10	RCC_clear cell_S3_BI_rep2	2	3	明細胞RCC	A	なし
11	RCC_clear cell_S3_BI_rep3	3	2	明細胞RCC	C	あり
12	RCC_clear cell_S3_BI_rep4	2	3	明細胞RCC	C	あり
13	RCC_clear cell_S3_BI_rep5	2	3	明細胞RCC	A	なし
14	RCC_clear cell_S3_BI_rep6	3	3	明細胞RCC	A	あり
15	RCC_clear cell_S4_BI_repl	1	3	明細胞RCC	C	あり
16	RCC_clear cell_S4_BI_rep2	1	3	明細胞RCC	A	あり(外側)
17	RCC_clear cell_S4_BI_rep3	2	3	明細胞RCC	C	あり(外側)
18	RCC_clear cell_S4_BI_rep4	2	3	明細胞RCC	B	なし
19	RCC_clear cell_S4_BI_rep5	2	3	明細胞RCC	C	なし
20	RCC_clear cell_S4_BI_rep6	2	2	明細胞RCC	B	あり(外側)
21	RCC_clear cell_BII_repl	2	3	明細胞RCC	B	あり(外側)
22	RCC_clear cell_BII_rep2	2	2	明細胞RCC	B	あり(外側)
23	RCC_clear cell_BII_rep3	2	2	明細胞RCC	B	あり
24	RCC_clear cell_BII_rep4	2	3	明細胞RCC	A	なし
25	RCC_clear cell_BII_rep5	1	1	明細胞RCC	A	あり
26	RCC_clear cell_BII_rep6	2	2	明細胞RCC	A	あり
27	RCC_clear cell_BII_rep7	2	2	明細胞RCC	C	なし
28	RCC_clear cell_BII_rep8	1	1	明細胞RCC	A	あり
29	RCC_clear cell_BII_rep9	1	1	明細胞RCC	A	あり
30	RCC_clear cell_BII_rep10	1	1	明細胞RCC	A	あり
31	RCC_clear cell_BII_rep11	2	3	明細胞RCC	A	あり
32	RCC_clear cell_BII_rep12	1	1	嫌色素性RCC	C	なし

10

20

30

40

33	RCC_clear cell_BII_rep13	1	1	明細胞RCC	A	なし
34	RCC_clear cell_BII_rep14	2	1	明細胞RCC	A	なし
35	RCC_clear cell_BII_rep15	1	3	明細胞RCC	A	あり
36	RCC_clear cell_BII_rep16	1	2	明細胞RCC	A	なし
37	RCC_clear cell_BII_rep17	2	3	明細胞RCC	A	あり
38	RCC_clear cell_BII_rep18	1	1	明細胞RCC	A	なし
39	RCC_clear cell_BII_rep19	1	1	明細胞RCC	A	あり(外側)
40	RCC_clear cell_BII_rep20	1	1	明細胞RCC	A	あり
41	RCC_clear cell_BII_rep21	2	1	明細胞RCC	A	あり
42	RCC_clear cell_BII_rep22	1	1	明細胞RCC	A	あり
43	RCC_clear cell_BII_rep23	2	1	明細胞RCC	A	あり(外側)
44	RCC_clear cell_BII_rep24	3	3	明細胞RCC	C	あり(外側)
45	RCC_clear cell_BII_rep25	1	1	明細胞RCC 及び乳頭状RCC	C	あり
46	RCC_clear cell_BII_rep26	1	1	明細胞RCC	A	なし
47	RCC_clear cell_BII_rep27	1	1	明細胞RCC	A	あり(外側)
48	RCC_clear cell_BII_rep28	2	2	明細胞RCC	A	あり(外側)
49	RCC_clear cell_BII_rep29	1	3	明細胞RCC	A	なし
50	RCC_clear cell_BII_rep30	1	1	明細胞RCC	B	なし
51	RCC_clear cell_BII_rep31	1	1	明細胞RCC	A	なし
52	RCC_clear cell_BII_rep32	2	3	明細胞RCC	A	なし
53	RCC_clear cell_BII_rep33	1	3	明細胞RCC	C	なし
54	RCC_clear cell_BII_rep34	1	3	明細胞RCC	A	なし
55	RCC_clear cell_BII_rep35	-	-	転移	B	なし
56	RCC_clear cell_BII_rep36	1	1	明細胞RCC	A	なし
57	RCC_clear cell_BII_rep37	1	1	明細胞RCC	A	なし
58	RCC_clear cell_BII_rep38	2	3	明細胞RCC	A	あり
59	RCC_clear cell_BII_rep39	2	2	明細胞RCC	A	あり
60	RCC_clear cell_BII_rep40	2	2	乳頭状RCC	C	あり(外側)
61	RCC_clear cell_BII_rep41	2	3	明細胞RCC	C	あり
62	RCC_clear cell_BII_rep42	1	1	明細胞RCC	A	なし
63	RCC_clear cell_S1_BII_r ep1	1	2	明細胞RCC	B	あり(外側)
64	RCC_clear cell_S1_BII_r ep2	1	1	明細胞RCC	A	あり
65	RCC_clear cell_S1_BII_r ep3	1	1	明細胞RCC	A	あり
66	RCC_clear cell_S1_BII_r ep4	1	1	明細胞RCC	A	あり
67	RCC_clear cell_S1_BII_r ep5	2	1	明細胞RCC	A	あり
68	RCC_clear cell_S2_BII_r ep1	1	2	嫌色素性RC C	B	あり
69	RCC_clear cell_S2_BII_r ep2	1	2	明細胞RCC	A	なし
70	RCC_clear cell_S2_BII_r	1	2	明細胞RCC	A	あり

10

20

30

40

	ep3					
71	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep1	1	3	明細胞RCC	B	なし
72	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep2	1	3	明細胞RCC	B	なし
73	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep3	1	3	明細胞RCC	A	なし
74	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep4	1	3	明細胞RCC	A	あり
75	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep5	2	3	明細胞RCC	A	なし
76	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep6	1	3	明細胞RCC	A	あり(外側)
77	RCC_clear_cell_S3_BII_r ep7	2	3	明細胞RCC	A	あり(外側)
78	RCC_clear_cell_S4_BII_r ep1	1	3	明細胞RCC	B	なし
79	RCC_clear_cell_S4_BII_r ep2	1	1	明細胞RCC	A	なし
80	RCC_papillary_BI_rep1	2	2	乳頭状RCC	A	なし
81	RCC_papillary_BI_rep2	2	2	乳頭状RCC	B	なし
82	RCC_papillary_BI_rep3	1	1	乳頭状RCC	C	あり
83	RCC_papillary_BI_rep5	2	3	乳頭状RCC	C	なし
84	RCC_papillary_BI_rep6	1	3	乳頭状RCC	B	なし
85	RCC_papillary_BI_rep7	2	2	乳頭状RCC	B	なし
86	RCC_papillary_BI_rep8	3	2	乳頭状RCC	B	なし
87	RCC_papillary_S1_BI_rep 1	1	1	乳頭状RCC	C	あり
88	RCC_papillary_S1_BI_rep 2	1	1	乳頭状RCC	C	あり
89	RCC_papillary_S2_BI_rep 1	2	2	乳頭状RCC	B	なし
90	RCC_papillary_S2_BI_rep 2	2	2	乳頭状RCC	C	あり
91	RCC_papillary_S4_BI_rep 1	2	3	乳頭状RCC	C	あり
92	RCC_papillary_S4_BI_rep 2	1	2	乳頭状RCC	B	あり(外側)
93	RCC_papillary_BII_rep1	2	3	乳頭状RCC	C	あり
94	RCC_papillary_BII_rep2	1	2	乳頭状RCC	C	あり
95	RCC_papillary_BII_rep3	1	1	乳頭状RCC	C	あり
96	RCC_papillary_BII_rep4	1	1	乳頭状RCC	C	なし
97	RCC_papillary_BII_rep5	1	1	乳頭状RCC	C	なし
98	RCC_papillary_BII_rep6	1	1	乳頭状RCC	C	なし
99	RCC_papillary_BII_rep7	3	3	明細胞RCC 及び乳頭状RCC	C	なし
100	RCC_meta._BI_rep1	-	-	転移	C	なし
101	RCC_meta._BI_rep2	-	-	転移	A	なし
102	RCC_meta._BI_rep3	-	-	転移	C	なし
103	RCC_meta._BI_rep4	-	-	転移	C	なし
104	RCC_meta._BI_rep5	-	-	転移	C	なし
105	RCC_meta._BI_rep6	-	-	転移	C	なし
106	RCC_meta._BI_rep7	-	-	転移	C	なし

10

20

30

40

107	RCC_meta_BI_rep8	-	-	転移	C	なし
108	RCC_meta_BI_rep9	-	-	転移	C	なし
109	RCC_meta_BI_rep10	-	-	転移	C	なし
110	RCC_meta_BI_rep11	-	-	転移	C	なし
111	RCC_meta_BI_rep12	-	-	転移	C	なし
112	RCC_meta_BI_rep13	-	-	転移	A	なし
113	RCC_meta_BI_rep14	-	-	転移	A	なし
114	RCC_cell_line_BI_rep1	-	-	UMRC2	NA	なし
115	RCC_cell_line_BI_rep2	-	-	SLR24	NA	なし
116	RCC_cell_line_BI_rep3	-	-	A-498	NA	なし
117	RCC_cell_line_BI_rep4	-	-	SK-RC 52	NA	なし
118	RCC_cell_line_BI_rep5	-	-	786O (vh19)	NA	なし
119	RCC_cell_line_BI_rep6	-	-	UMRC 6	NA	なし
120	RCC_cell_line_BI_rep7	-	-	ACHN	NA	なし
121	RCC_cell_line_BI_rep8	-	-	786O (vh130)	NA	なし
122	RCC_cell_line_BI_rep9	-	-	A-704	NA	なし
123	RCC_cell_line_BI_rep10	-	-	SLR 26	NA	なし
124	RCC_cell_line_BI_rep11	-	-	Caki-1	NA	なし
125	RCC_cell_line_BI_rep12	-	-	RCC4 (vh1)	NA	なし
126	RCC_cell_line_BI_rep13	-	-	769-P	NA	なし
127	RCC_cell_line_BI_rep14	-	-	KC 12	NA	なし
128	RCC_cell_line_BI_rep15	-	-	RCC4 (neo)	NA	なし
129	RCC_cell_line_BI_rep16	-	-	SK-RC 29	NA	なし
130	RCC_cell_line_BI_rep17	-	-	SW 156	NA	なし
131	RCC_cell_line_BI_rep18	-	-	SK-RC 31	NA	なし
132	RCC_cell_line_BI_rep19	-	-	SLR 22	NA	なし
133	RCC_cell_line_BI_rep20	-	-	SK-RC 38	NA	なし
134	RCC_cell_line_BI_rep21	-	-	786-O	NA	なし
135	RCC_cell_line_BI_rep22	-	-	SK-RC 42	NA	なし
136	RCC_cell_line_BI_rep23	-	-	786O	NA	なし
137	RCC_cell_line_meta_BI_r_ep1	-	-	SLR 25	NA	なし
138	RCC_cell_line_meta_BI_r_ep2	-	-	SLR 20	NA	なし
139	RCC_cell_line_meta_BI_r_ep3	-	-	Caki-2	NA	なし
140	RCC_cell_line_meta_BI_r_ep4	-	-	SLR 21	NA	なし
141	RCC_cell_line_meta_BI_r_ep5	-	-	KU 19-20	NA	なし
142	RCC_cell_line_meta_BI_r_ep6	-	-	SLR 23	NA	なし
143	RCC_prost_can_cell_line_BI_rep1	-	-	PC3 hep 27	NA	なし
144	RCC_prost_can_cell_line_BI_rep2	-	-	PC3 hep 30	NA	なし
145	RCC_prost_can_cell_line_BI_rep3	-	-	PC3 vec 1	NA	なし
146	RCC_prost_can_cell_line_BI_rep4	-	-	PC3 vec 3	NA	なし
147	RCC_kidney_cell_line_BI_rep1	-	-	HK-2	NA	なし

10

20

30

40

【表7】

経路名(Panther受託番号)	遺伝子数*	遺伝子総数に対する遺伝子ヒットのパーセント	経路ヒット総数に対する遺伝子ヒットのパーセント
2-アラキドノイルグリセロール生合成(P05726)	2	0,2	0,4
5-ヒドロキシトリプタミン分解(degradation)(P04372)	1	0,1	0,2
SHT1型受容体介在性シグナル伝達経路(P04373)	4	0,4	0,8
SHT2型受容体介在性シグナル伝達経路(P04374)	10	1	2
SHT3型受容体介在性シグナル伝達経路(P04375)	2	0,2	0,4
SHT4型受容体介在性シグナル伝達経路(P04376)	4	0,4	0,8
アデニン及びヒポキサンチンサルベージ経路(P02723)	2	0,2	0,4
アドレナリン及びノルアドレナリン生合成(P00001)	2	0,2	0,4
アルファ-アドレナリン受容体シグナル伝達経路(P00002)	6	0,6	1,2
アルツハイマー病-アミロイド分泌酵素経路(P00003)	6	0,6	1,2
アルツハイマー病-プレセニリン経路(P00004)	8	0,8	1,6
血管新生(P00005)	21	2,2	4,3
Gタンパク質及びベータ-アレスチンによるアンジオテンシンII刺激性シグナル伝達(P05911)	4	0,4	0,8
アポトーシスシグナル伝達経路(P00006)	15	1,5	3
Slit/Robo介在性軸索誘導(P00008)	2	0,2	0,4
ネトリン介在性軸索誘導(P00009)	2	0,2	0,4
セマフォリン介在性軸索誘導(P00007)	2	0,2	0,4
B細胞活性化(P00010)	12	1,2	2,4
ベータ1アドレナリン受容体シグナル伝達経路(P04377)	6	0,6	1,2
ベータ2アドレナリン受容体シグナル伝達経路(P04378)	6	0,6	1,2
ベータ3アドレナリン受容体シグナル伝達経路(P04379)	4	0,4	0,8
カドヘリンシグナル伝達経路(P00012)	4	0,4	0,8
コルチコトロピン(Corticotropin)放出因子受容体シグナル伝達経路(P04380)	4	0,4	0,8
Rho GTPaseによる細胞骨格制御(P00016)	8	0,8	1,6
ドバミン受容体介在性シグナル伝	7	0,7	1,4

10

20

30

40

達経路(P05912)			
EGF受容体シグナル伝達経路(P00018)	10	1	2
内在性カンナビノイドシグナル伝達(P05730)	2	0,2	0,4
エンドセリンシグナル伝達経路(P00019)	13	1,3	2,6
エンケファリン放出(P05913)	4	0,4	0,8
FASシグナル伝達経路(P00020)	6	0,6	1,2
FGFシグナル伝達経路(P00021)	14	1,4	2,8
ホルミルテトラヒドロギ酸生合成(P02743)	2	0,2	0,4
ヘテロ三量体Gタンパク質シグナル伝達経路-Giアルファ及びGsアルファ介在性経路(P00026)	12	1,2	2,4
ヘテロ三量体Gタンパク質シグナル伝達経路-Gqアルファ及びGoアルファ介在性経路(P00027)	12	1,2	2,4
ヘテロ三量体Gタンパク質シグナル伝達経路-桿体外節光伝達(P00028)	2	0,2	0,4
ヒスタミンH1受容体介在性シグナル伝達経路(P04385)	6	0,6	1,2
ヒスタミンH2受容体介在性シグナル伝達経路(P04386)	2	0,2	0,4
ハンチントン病(P00029)	12	1,2	2,4
ケモカイン及びサイトカインシグナル伝達経路の介在する炎症(P00031)	33	3,4	6,7
インスリン/IGF経路-マイトイエン活性化プロテインキナーゼキナーゼ/MAPキナーゼカスケード(P00032)	4	0,4	0,8
インスリン/IGF経路-プロテインキナーゼBシグナル伝達カスケード(P00033)	2	0,2	0,4
インテグリンシグナル伝達経路(P00034)	20	2,1	4,1
インターフェロン-ガンマシグナル伝達経路(P00035)	4	0,4	0,8
インターロイキンシグナル伝達経路(P00036)	8	0,8	1,6
イオンチャネル型グルタミン酸受容体経路(P00037)	2	0,2	0,4
JAK/STATシグナル伝達経路(P00038)	2	0,2	0,4
代謝型グルタミン酸受容体I群経路(P00041)	2	0,2	0,4
代謝型グルタミン酸受容体II群経路(P00040)	4	0,4	0,8
代謝型グルタミン酸受容体III群経路(P00039)	6	0,6	1,2

10

20

30

40

メチルクエン酸回路(Methylcitrate cycle)(P02754)	2	0,2	0,4
ムスカリン性アセチルコリン受容体1及び3シグナル伝達経路(P00042)	6	0,6	1,2
ムスカリン性アセチルコリン受容体2及び4シグナル伝達経路(P00043)	6	0,6	1,2
ニコチン性アセチルコリン受容体シグナル伝達経路(P00044)	6	0,6	1,2
Notchシグナル伝達経路(P00045)	2	0,2	0,4
オピオイドプロダイノルフィン経路(P05916)	4	0,4	0,8
オピオイドプロエンケファリン経路(P05915)	4	0,4	0,8
オピオイドプロオピオメラノコルチン経路(P05917)	4	0,4	0,8
酸化ストレス応答(P00046)	13	1,3	2,6
オキシトシン受容体介在性シグナル伝達経路(P04391)	10	1	2
PDGFシグナル伝達経路(P00047)	11	1,1	2,2
PI3キナーゼ経路(P00048)	4	0,4	0,8
パーキンソン病(P00049)	8	0,8	1,6
Ras経路(P04393)	6	0,6	1,2
シナプス小胞輸送(P05734)	2	0,2	0,4
T細胞活性化(P00053)	10	1	2
TCA回路(P00051)	2	0,2	0,4
TGF-ベータシグナル伝達経路(P0052)	10	1	2
甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体シグナル伝達経路(P04394)	8	0,8	1,6
Toll受容体シグナル伝達経路(P00054)	2	0,2	0,4
bZIP転写因子による転写制御(P00055)	2	0,2	0,4
ユビキチンプロテアソーム経路(P00060)	2	0,2	0,4
VEGFシグナル伝達経路(P00056)	11	1,1	2,2
Wntシグナル伝達経路(P00057)	18	1,8	3,7
p38 MAPK経路(P05918)	1	0,1	0,2
p53経路フィードバックループ2(P04398)	2	0,2	0,4
p53経路(P00059)	8	0,8	1,6

*候補をCelera及びNCBI(ヒト(H. sapiens))に対してblast検索したため、二重値(double value)を示す。

10

20

30

40

【表8】

血管新生		炎症		インテグリン		Wnt	
クラスターI-プローブセットID*	遺伝子記号	クラスターI-プローブセットID*	遺伝子記号	クラスターI-プローブセットID*	遺伝子記号	クラスターI-プローブセットID*	遺伝子記号
202677_at	RASA1	205962_at	PAK2	217820_s_at	ENAH	221016_s_at	TCF7L1
207121_s_at	MAPK6	205897_at	NFATC4	202647_s_at	NRAS	205656_a_t	PCDH17
203218_at	MAPK9	208041_at	GRK1	205055_at	ITGAE	219656_a_t	PCDH12
200885_at	RHOC			200950_at	ARPC1A	204677_a_t	CDH5
200059_s_at	RHOA			203065_s_at	CAV1	204726_a_t	CDH13
218236_s_at	PRKD3					208712_a_t	CCND1
						213222_a_t	PLCB1
						219427_a_t	FAT4
クラスターII-プローブセットID*		クラスターII-プローブセットID*		クラスターII-プローブセットID*		クラスターII-プローブセットID*	
206702_at	TEK	208095_s_at	SRP72	208750_s_at	ARF1	201921_a_t	GNG10
221016_s_at	TCF7L1	200885_at	RHOC	201659_s_at	ARL1	202981_x_at	SIAH1
203238_s_at	NOTCH3	212294_at	GNG12	200059_s_at	RHOA	201375_s_at	PPP2CB
202273_at	PDGFRB	208736_at	ARPC3	201097_s_at	ARF4	201218_a_t	CTBP2
205247_at	NOTCH4	217898_at	C15orf24			200765_x_at	CTNNA1
32137_at	JAG2	200059_s_at	RHOA			208652_a_t	PPP2CA
204484_at	PIK3C2B	207157_s_at	GNG5			212294_a_t	GNG12
202743_at	PIK3R3	208640_at	RAC1				
205846_at	PTPRB	201921_at	GNG10				
203934_at	KDR	209239_at	NFKB1				
202668_at	EFNB2	211963_s_at	ARPC5				
212099_at	RHOB						
219304_s_at	PDGFD						

10

20

30

40

クラスタ ーIII-プロ ーブセッ トID*		クラスタ ーIII-プロ ーブセッ トID*		クラスタ ーIII-プロ ーブセッ トID*		クラスタ ーIII-プロ ーブセ ットID*	
210220_at	FZD2	204396_s_at	GRK5	204732_s_at	TRIM23	203896_s_at	PLCB4
204422_s_at	FGF2	201473_at	JUNB	219431_at	ARHGA P10	220085_a t	HELLS
202647_s_at	NRAS	201466_s_at	JUN	209081_s_at	COL18A 1	202468_s_at	CTNNA L1
202095_s_at	BIRC5	212099_at	RHOB	216264_s_at	LAMB2		
219257_s_at	SPHK1	202112_at	VWF	210105_s_at	FYN		
		213222_at	PLCB1	204484_at	PIK3C2 B		
				202743_at	PIK3R3		
		クラスタ ーIV-プロ ーブセッ トID*		クラスタ ーIV-プロ ーブセッ トID*		クラスタ ーIV-プロ ーブセ ットID*	
		203896_s_at	PLCB4	204543_at	RAPGE F1	206194_a t	HOXC4
		202647_s_at	NRAS	221180_at	YSK4	206858_s_at	HOXC6
		219918_s_at	ASPM	206044_s_at	BRAF	201321_s_at	SMARC C2
				217644_s_at	SOS2		
				206370_at	PIK3CG		
				213475_s_at	ITGAL		
				205718_at	ITGB7		

*プローブセットIDは、Affymetrix HG-U133Aチップの識別番号を意味する。

【 0 3 5 4 】

10

20

30

【表9】

	群A			群B			群C		
	CD34	DEK	MSH6	CD34	DEK	MSH6	CD34	DEK	MSH6
腫瘍1	高MVD	1	2	低MVD	3	0	低MVD	0	0
腫瘍2	高MVD	1	1	高MVD	1	0	低MVD	2	2
腫瘍3	高MVD	2	2	高MVD	0	0	低MVD	1	1
腫瘍4	高MVD	0	0	高MVD	0	0	低MVD	2	0
腫瘍5	高MVD	1	1	低MVD	0	0	低MVD	0	0
腫瘍6	高MVD	2	1	低MVD	0	0	低MVD	1	0
腫瘍7	高MVD	2	2	低MVD	0	0	低MVD	2	2
腫瘍8	高MVD	2	2	低MVD	0	0	低MVD	0	1
腫瘍9	高MVD	1	2	低MVD	0	0	低MVD	2	2

0=陰性、1=弱い染色強度、2=中程度の染色強度、3=強い染色強度

【0 3 5 5】

【表10】

No.	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ	No	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ
1	221860_at	1	3.3441	3191	131	71	205367_at	1	1.2617	10603	201
2	219754_at	1	2.8455	55285	132	72	222186_at	1	1.7502	54469	202
3	211454_x_at	1	3.8185	40094	9	133	208936_x_at	1	2.4216	3964	203
4	216112_at	1	1.3782	---	134	74	202102_s_at	1	3.5148	23476	204
5	211386_at	1	1.8448	84786	135	75	213971_s_at	1	2.1596	100292	205
6	33768_at	1	1.5069	1762	136	76	201680_x_at	1	3.3522	51593	206
7	206789_s_at	1	2.0255	5451	137	77	213876_x_at	1	2.1010	8233	207
8	215338_s_at	1	2.9496	4820	138	78	221350_at	1	0.2892	3224	208
9	32029_at	1	2.4556	5170	139	79	216525_x_at	1	2.8062	5387	209
10	212487_at	1	2.8105	23131	140	80	222182_s_at	1	3.4695	4848	210
11	222368_at	1	2.0125	---	141	81	214473_x_at	1	2.7307	5387	211
12	222366_at	1	2.8874	---	142	82	208475_at	1	0.9177	55691	212
13	204771_s_at	1	3.2049	7270	143	83	215667_x_at	1	2.4823	100132	213
14	213813_x_at	1	2.8246	---	144	84	219392_x_at	1	4.3567	55771	214
15	212783_at	1	2.8134	5930	145	85	213205_s_at	1	0.3487	23132	215
16	221191_at	1	1.2696	54441	146	86	222047_s_at	1	3.9224	51593	216
17	216527_at	1	1.2548	---	147	87	209932_s_at	1	3.8225	1854	217
18	215545_at	1	1.2992	---	148	88	219507_at	1	2.6101	51319	218
19	220905_at	1	2.7221	---	149	89	204538_x_at	1	4.8527	9284	219
20	208662_s_at	1	3.4742	7267	150	90	41386_i_at	1	1.0805	23135	220
21	208120_x_at	1	3.3528	40094	9	151	214004_s_at	1	4.1868	9686	221
22	48580_at	1	2.9000	30827	152	92	217804_s_at	1	2.7713	3609	222
23	213185_at	1	1.6378	23247	153	93	216751_at	1	0.6769	---	223
24	203496_s_at	1	2.7044	5469	154	94	215541_s_at	1	0.7933	1729	224
25	203701_s_at	1	1.6273	55621	155	95	212028_at	1	2.5778	58517	225
26	207186_s_at	1	3.5894	2186	156	96	217576_x_at	1	0.7751	6655	226
27	219437_s_at	1	3.5114	29123	157	97	215434_x_at	1	3.6643	100132	227

10

20

30

40

28	212317_at	1	2.7809	23534	158	98	212759_s_at	1	2.7559	6934	228
29	217994_x_at	1	3.1814	54973	159	99	45687_at	1	3.0172	78994	229
30	210463_x_at	1	1.6328	55621	160	100	209534_x_at	1	3.0095	11214	230
31	212994_at	1	2.7464	57187	161	101	213956_at	1	2.3039	9857	231
32	202379_s_at	1	4.4881	4820	162	102	202384_s_at	1	1.9349	6949	232
33	219639_x_at	1	2.9579	56965	163	103	220940_at	1	3.7431	57730	233
34	205178_s_at	1	2.9427	5930	164	104	216550_x_at	1	2.9023	23253	234
35	215032_at	1	1.8919	6239	165	105	201224_s_at	1	2.8594	10250	235
36	213235_at	1	2.7268	40050 6	166	106	220696_at	1	-0.7982	---	236
37	210266_s_at	1	2.9143	51592	167	107	206565_x_at	1	3.2219	11039	237
38	203297_s_at	1	2.0353	3720	168	108	213650_at	1	3.8542	23015	238
39	212596_s_at	1	2.1500	10042	169	109	204403_x_at	1	4.2212	9747	239
40	218555_at	1	1.3394	29882	170	110	201856_s_at	1	1.8053	51663	240
41	202774_s_at	1	2.6265	6433	171	111	210069_at	1	2.6025	1375	241
42	214001_x_at	1	2.6765	---	172	112	202574_s_at	1	1.6621	1455	242
43	212571_at	1	2.3779	57680	173	113	204741_at	1	2.5709	636	243
44	202682_s_at	1	3.1557	7375	174	114	218920_at	1	2.4642	54540	244
45	202473_x_at	1	0.9283	3054	175	115	221526_x_at	1	2.9858	56288	245
46	214464_at	1	3.9210	8476	176	116	208930_s_at	1	3.8138	3609	246
47	206567_s_at	1	2.4514	51230	177	117	204428_s_at	1	1.7085	3931	247
48	209579_s_at	1	4.2461	8930	178	118	214041_x_at	1	3.0486	6168	248
49	34260_at	1	1.0468	9894	179	119	221043_at	1	0.7752	---	249
50	214195_at	1	0.9257	1200	180	120	212451_at	1	2.5922	9728	250
51	219105_x_at	1	2.2929	23594	181	121	218808_at	1	0.0000	55152	251
52	213328_at	1	2.8602	4750	182	122	213311_s_at	1	4.0840	22980	252
53	208663_s_at	1	2.9901	7267	183	123	44146_at	1	1.6473	26205	253
54	214843_s_at	1	2.6647	23032	184	124	205415_s_at	1	0.7316	4287	254
55	220072_at	1	2.8119	79848	185	125	213729_at	1	3.6076	55660	255
56	219468_s_at	1	2.1238	40409 3	186	126	217734_s_at	1	2.7312	11180	256

10

20

30

40

57	220370_s_at	1	1.5578	57602	187	127	205339_at	1	0.0537	6491	257
58	212318_at	1	2.6286	23534	188	128	221718_s_at	1	2.9493	11214	258
59	206169_x_at	1	2.8966	23264	189	129	39650_s_at	1	0.5091	80003	259
60	201728_s_at	1	2.6719	9703	190	130	221496_s_at	1	2.8841	10766	260
61	205434_s_at	1	3.3218	22848	191	131	210094_s_at	1	3.0740	56288	261
62	203597_s_at	1	2.3050	11193	192	132	214526_x_at	1	2.3316	5379	262
63	222291_at	1	2.7298	25854	193	133	214723_x_at	1	1.7216	375248	263
64	208859_s_at	1	2.8255	546	194	134	209715_at	1	3.3266	23468	264
65	201959_s_at	1	3.4533	23077	195	135	212177_at	1	4.3567	25957	265
66	40569_at	1	1.2913	7593	196	136	217679_x_at	1	3.9197	---	266
67	209088_s_at	1	3.1422	29855	197	137	213850_s_at	1	4.4362	9169	267
68	209945_s_at	1	2.6078	2932	198	138	216563_at	1	2.3194	23253	268
69	206967_at	1	1.4198	904	199	139	202818_s_at	1	2.9712	6924	269
70	206416_at	1	1.4064	7755	200	140	221829_s_at	1	4.5874	3842	270

10

20

30

40

表10続き

No	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ	No	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ
141	220368_s_at	1	1.4496	55671	271	210	208989_s_at	1	1.7391	22992	340
142	210666_at	1	1.3500	3423	272	211	202821_s_at	1	2.0807	4026	341
143	211342_x_at	1	2.5036	9968	273	212	213926_s_at	1	2.2782	3267	342
144	216450_x_at	1	3.3900	7184	274	213	215856_at	1	0.3196	284266	343
145	212926_at	1	2.0261	23137	275	214	32032_at	1	2.2692	8220	344
146	208995_s_at	1	2.0054	9360	276	215	201072_s_at	1	2.1603	6599	345
147	217152_at	1	0.6767	---	277	216	208710_s_at	1	3.9944	8943	346
148	213277_at	1	-0.6754	677	278	217	200702_s_at	1	3.8224	57062	347
149	222104_x_at	1	4.0594	2967	279	218	217485_x_at	1	2.1485	5379	348
150	215279_at	1	0.9778	---	280	219	213526_s_at	1	1.3571	55957	349
151	217620_s_at	1	1.3042	5291	281	220	220456_at	1	1.6757	55304	350
152	218742_at	1	1.2959	64428	282	221	214756_x_at	1	2.0706	5379	351
153	207605_x_at	1	1.2134	51351	283	222	214353_at	1	0.2380	---	352

154	210579_s_at	1	-0.3495	10107	284	223	78495_at	1	1.6266	155060	353
155	208803_s_at	1	2.7603	6731	285	224	203204_s_at	1	1.2374	9682	354
156	44822_s_at	1	0.8390	54531	286	225	217878_s_at	1	2.0496	996	355
157	214870_x_at	1	4.9662	10028 844	287	226	41160_at	1	2.1791	53615	356
158	205787_x_at	1	2.0152	9877	288	227	214017_s_at	1	0.0077	9704	357
159	213893_x_at	1	2.7065	5383	289	228	214659_x_at	1	2.2679	56252	358
160	48612_at	1	1.5062	9683	290	229	50376_at	1	2.4008	55311	359
161	222133_s_at	1	1.4355	51105	291	230	216187_x_at	1	4.4533	---	360
162	212027_at	1	3.5596	58517	292	231	213445_at	1	1.5876	23144	361
163	222024_s_at	1	3.4062	11214	293	232	217611_at	1	0.4124	157697	362
164	208993_s_at	1	3.0181	9360	294	233	205068_s_at	1	2.7417	23092	363
165	205370_x_at	1	4.7353	1629	295	234	201635_s_at	1	2.8099	8087	364
166	222193_at	1	0.2730	60526	296	235	214552_s_at	1	0.8368	9135	365
167	214035_x_at	1	4.8781	39949 1	297	236	220962_s_at	1	0.4547	29943	366
168	201861_s_at	1	4.8281	9208	298	237	221780_s_at	1	2.2823	55661	367
169	208797_s_at	1	1.1428	23015	299	238	211097_s_at	1	-0.1281	5089	368
170	204195_s_at	1	0.9807	5316	300	239	217622_at	1	0.2285	25807	369
171	222034_at	1	1.6939	10399	301	240	201026_at	1	1.6815	9669	370
172	220828_s_at	1	-0.4009	55338	302	241	211996_s_at	1	4.9230	100132 247	371
173	208900_s_at	1	3.6447	7150	303	242	220609_at	1	1.7994	202181	372
174	205134_s_at	1	1.5062	26747	304	243	213344_s_at	1	-0.0550	3014	373
175	216310_at	1	1.3131	57551	305	244	207205_at	1	-0.3542	1089	374
176	201205_at	1	0.5415	10029 2328	306	245	206966_s_at	1	0.0713	11278	375
177	201996_s_at	1	2.0236	23013	307	246	208610_s_at	1	4.7898	23524	376
178	221501_x_at	1	5.0156	33904 7	308	247	204097_s_at	1	2.7474	51634	377
179	216843_x_at	1	2.3442	5379	309	248	211948_x_at	1	4.0689	23215	378
180	208879_x_at	1	1.4191	24148	310	249	212885_at	1	2.7556	10199	379
181	43544_at	1	1.8638	10025	311	250	37278_at	1	0.8022	6901	380
182	204909_at	1	-0.1882	1656	312	251	206500_s_at	1	0.8385	55320	381
183	202509_s_at	1	2.2336	7127	313	252	214055_x_at	1	4.4115	23215	382

10

20

30

40

184	214395_x_at	1	1.9902	1936	314	253	214501_s_at	1	3.9227	9555	383
185	215582_x_at	1	0.9031	8888	315	254	214335_at	1	0.1607	6141	384
186	220796_x_at	1	4.0349	79939	316	255	AFFX-M_27830_5_at	1	3.7141	---	385
187	206323_x_at	1	3.5161	4983	317	256	221023_s_at	1	-0.6003	81033	386
188	209136_s_at	1	2.1393	9100	318	257	217654_at	1	-0.0306	---	387
189	218859_s_at	1	2.6581	51575	319	258	220466_at	1	0.3488	80071	388
190	216212_s_at	1	2.1806	1736	320	259	215605_at	1	0.8272	10499	389
191	220071_x_at	1	4.0476	55142	321	260	46142_at	1	0.9219	64788	390
192	208994_s_at	1	2.5538	9360	322	261	201024_x_at	1	4.6527	9669	391
193	204227_s_at	1	1.1780	7084	323	262	202301_s_at	1	2.7863	65117	392
194	202773_s_at	1	0.6752	6433	324	263	202414_at	1	2.6600	2073	393
195	222351_at	1	1.8154	5519	325	264	211886_s_at	1	-0.6122	6910	394
196	58900_at	1	1.6313	222070	326	265	217380_s_at	1	-0.4102	7511	395
197	206056_x_at	1	4.4435	6693	327	266	214250_at	1	0.4289	4926	396
198	210251_s_at	1	3.0237	22902	328	267	214911_s_at	1	4.4278	6046	397
199	203468_at	1	2.9207	8558	329	268	208685_x_at	1	4.2214	6046	398
200	211289_x_at	1	2.1424	728642	330	269	214693_x_at	1	4.9733	100132	399
201	214052_x_at	1	2.7074	23215	331	270	214742_at	1	0.5155	22994	400
202	204649_at	1	-0.3037	10024	332	271	222023_at	1	-0.9535	11214	401
203	219380_x_at	1	1.4667	5429	333	272	202339_at	1	1.4628	8189	402
204	215848_at	1	0.4399	49855	334	273	203792_x_at	1	-0.0612	7703	403
205	207598_x_at	1	1.8445	7516	335	274	221686_s_at	1	-0.1091	9400	404
206	217644_s_at	1	0.6763	6655	336	274	221686_s_at	1	-0.1091	9400	404
207	222249_at	1	-0.5170	---	337	275	212079_s_at	1	1.6697	4297	405
208	218914_at	1	1.2460	51093	338	276	208237_x_at	1	0.1915	53616	406
209	212620_at	1	1.2975	23060	339	277	221683_s_at	1	1.1982	80184	407

10

20

30

40

表10続き

No	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ	No	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ
278	217471_at	1	-0.9988	---	408	347	211676_s_at	-1	0.7779	3459	477
279	212106_at	1	2.3823	23197	409	348	203776_at	-1	0.3872	27238	478
280	217498_at	1	-0.9042	---	410	349	221381_s_at	-1	1.1420	10933	479
281	220401_at	1	-1.0337	79860	411	350	209112_at	-1	1.4732	1027	480
282	81737_at	1	-0.4582	---	412	351	209310_s_at	-1	0.7831	837	481
283	219897_at	1	0.6897	79845	413	352	203261_at	-1	1.7458	10671	482
284	221007_s_at	1	2.0715	81608	414	353	208860_s_at	-1	-0.4157	546	483
285	207349_s_at	1	-0.1878	7352	415	354	206174_s_at	-1	0.8336	5537	484
286	214113_s_at	-1	1.0133	9939	416	355	212168_at	-1	0.5727	10137	485
287	202919_at	-1	1.1561	25843	417	356	201529_s_at	-1	0.6302	6117	486
288	219485_s_at	-1	0.7641	5716	418	357	212438_at	-1	0.3453	11017	487
289	216304_x_at	-1	1.0802	10730	419	358	212544_at	-1	1.0899	9326	488
290	217959_s_at	-1	1.2672	51399	420	359	203689_s_at	-1	1.1102	2332	489
291	214429_at	-1	1.1991	9107	421	360	201179_s_at	-1	0.2789	2773	490
292	201020_at	-1	1.1169	7533	422	361	208857_s_at	-1	1.1374	5110	491
293	200056_s_at	-1	1.0703	10438	423	362	203138_at	-1	0.5301	8520	492
294	209551_at	-1	0.1229	84272	424	363	202799_at	-1	1.0538	8192	493
295	212268_at	-1	0.4909	1992	425	364	218519_at	-1	0.0973	55032	494
296	208992_s_at	-1	1.2101	6774	426	365	218486_at	-1	0.8606	8462	495
297	217865_at	-1	1.9469	55819	427	366	203758_at	-1	1.9611	1519	496
298	212833_at	-1	0.9751	91137	428	367	211967_at	-1	2.2047	114908	497
299	218449_at	-1	0.9798	55325	429	368	208029_s_at	-1	0.5497	55353	498
300	221531_at	-1	-0.2519	80349	430	369	201408_at	-1	1.3267	5500	499
301	203156_at	-1	1.2641	11215	431	370	218395_at	-1	0.8451	64431	500
302	213027_at	-1	1.1477	6738	432	371	200973_s_at	-1	0.0428	10099	501
303	221547_at	-1	0.2353	8559	433	372	200983_x_at	-1	2.2568	966	502
304	209096_at	-1	0.7868	7336	434	373	204045_at	-1	0.6250	9338	503

10

20

30

40

305	212461_at	-1	1.1393	51582	435	374	211985_s_at	-1	1.4396	801	504
306	202166_s_at	-1	-0.0224	5504	436	375	213882_at	-1	-0.5182	83941	505
307	201176_s_at	-1	2.1289	372	437	376	205084_at	-1	0.1770	55973	506
308	212815_at	-1	0.5212	10973	438	377	200777_s_at	-1	2.5773	9689	507
309	219819_s_at	-1	0.0455	28957	439	378	213883_s_at	-1	1.3376	83941	508
310	212573_at	-1	0.9699	23052	440	379	212536_at	-1	0.9452	23200	509
311	202381_at	-1	1.9412	8754	441	380	212515_s_at	-1	0.9260	1654	510
312	202194_at	-1	2.0624	50999	442	381	200628_s_at	-1	0.7853	7453	511
313	201351_s_at	-1	1.2193	10730	443	382	213405_at	-1	0.5778	57403	512
314	203136_at	-1	1.4305	10567	444	383	209296_at	-1	1.3937	5495	513
315	211703_s_at	-1	-0.6144	83941	445	384	218229_s_at	-1	0.8658	57645	514
316	209786_at	-1	0.7245	10473	446	385	218946_at	-1	1.8086	27247	515
317	214545_s_at	-1	-0.8808	11212	447	386	202823_at	-1	0.9882	6921	516
318	204342_at	-1	0.5450	29957	448	387	208666_s_at	-1	0.5861	6767	517
319	212335_at	-1	0.9285	2799	449	388	201689_s_at	-1	-0.0148	7163	518
320	202089_s_at	-1	-0.3621	25800	450	389	201716_at	-1	0.8628	6642	519
321	200698_at	-1	1.9150	11014	451	390	218137_s_at	-1	0.8201	60682	520
322	219162_s_at	-1	0.3746	65003	452	391	200054_at	-1	0.4418	8882	521
323	203376_at	-1	0.7431	51362	453	392	208638_at	-1	2.6546	10130	522
324	218042_at	-1	1.3650	51138	454	393	206542_s_at	-1	1.1986	6595	523
325	213750_at	-1	-0.0803	26156	455	394	209208_at	-1	-0.2471	9526	524
326	220199_s_at	-1	0.7265	64853	456	395	218185_s_at	-1	0.6604	55156	525
327	217786_at	-1	-0.0522	10419	457	396	209300_s_at	-1	0.3792	25977	526
328	203646_at	-1	-0.0231	2230	458	397	214531_s_at	-1	0.5117	6642	527
329	208761_s_at	-1	1.3619	7341	459	398	209027_s_at	-1	0.6943	10006	528
330	202579_x_at	-1	1.6123	10473	460	399	200876_s_at	-1	2.7394	5689	529
331	208841_s_at	-1	1.7403	9908	461	400	221808_at	-1	1.2999	9367	530
332	218616_at	-1	-0.4623	57117	462	401	200812_at	-1	1.8392	10574	531
333	217919_s_at	-1	0.6034	28977	463	402	217898_at	-1	2.4200	56851	532

10

20

30

40

334	212418_at	-1	0.7882	1997	464	403	213404_s_at	-1	1.7281	6009	533	
335	212038_s_at	-1	2.2340	7416	465	404	217313_at	-1	1.0846	---	534	
336	203142_s_at	-1	0.5976	8546	466	405	208852_s_at	-1	1.5732	821	535	
337	201078_at	-1	1.5492	9375	467	406	205961_s_at	-1	0.3967	11168	536	
338	202979_s_at	-1	-0.0674	58487	468	407	218408_at	-1	0.7486	26519	537	
339	209330_s_at	-1	1.4640	3184	469	408	202978_s_at	-1	0.0798	58487	538	
340	218578_at	-1	0.0056	79577	470	409	214812_s_at	-1	2.4679	55233	539	
341	209861_s_at	-1	1.0650	10988	471	410	212878_s_at	-1	0.1008	3831	540	
342	200991_s_at	-1	1.0796	9784	472	411	202119_s_at	-1	2.0419	8895	541	
343	202675_at	-1	1.2146	6390	473	412	209387_s_at	-1	0.3916	4071	542	
344	218570_at	-1	0.2103	11497	1	474	413	209440_at	-1	2.0282	5631	543
345	208944_at	-1	2.1295	7048	475	414	220985_s_at	-1	0.4970	81790	544	
346	200071_at	-1	1.0260	10285	476	415	218172_s_at	-1	0.4654	79139	545	

10

20

30

40

表10続き

No.	プローブセットID	S	T*	Entrez	SEQ
416	203284_s_at	-1	0.6826	9653	546
417	202163_s_at	-1	0.3248	9337	547
418	216483_s_at	-1	0.6811	56005	548
419	212887_at	-1	1.2028	10484	549
420	206989_s_at	-1	1.7013	9169	550
421	217725_x_at	-1	1.4834	26135	551
422	202314_at	-1	0.2208	1595	552
423	202680_at	-1	0.3848	2961	553
424	217843_s_at	-1	1.1394	29079	554
425	209025_s_at	-1	0.9337	10492	555
426	200668_s_at	-1	2.8886	7323	556
427	210691_s_at	-1	0.4321	27101	557
428	201472_at	-1	1.6450	7411	558
429	212956_at	-1	0.8992	23158	559
430	220926_s_at	-1	0.1949	80267	560
431	219356_s_at	-1	1.6198	51510	561
432	201511_at	-1	0.8429	14	562
433	212453_at	-1	1.5109	26128	563
434	212440_at	-1	1.7380	11017	564
435	218236_s_at	-1	0.8765	23683	565
436	201515_s_at	-1	2.1329	7247	566
437	201858_s_at	-1	1.1537	5552	567
438	212250_at	-1	1.6486	92140	568
439	217900_at	-1	2.1840	55699	569
440	217989_at	-1	1.7563	51170	570
441	210250_x_at	-1	1.3997	158	571
442	218761_at	-1	1.1344	54778	572
443	203053_at	-1	1.5515	10286	573

444	203721_s_at	-1	1.2257	51096	574
445	212989_at	-1	0.3137	259230	575
446	201847_at	-1	2.1432	3988	576
447	203983_at	-1	1.0034	7257	577
448	221761_at	-1	0.5938	159	578
449	203302_at	-1	0.3182	1633	579
450	212112_s_at	-1	1.9386	23673	580
451	210283_x_at	-1	1.2625	10605	581
452	217987_at	-1	1.4309	54529	582
453	218118_s_at	-1	0.6889	10431	583
454	202832_at	-1	1.3710	9648	584

10

「No.」は、本明細書において言及されている通りの表10の遺伝子番号を意味する。「プローブセットID」は、Affymetrix遺伝子チップHT_HG-U133Aにおける識別番号を意味する。「S」は、「サイド(side)」を意味する。「サイド」は、実施例の節の「3.RCC特異的遺伝子セットの同定」に記載されているモデルに従い、遺伝子が、状態Bのために過剰又は過小発現される必要があるかを定義する。値「1」は過剰発現を表示し、値「-1」は過小発現を表示する。「T*」は「閾値」を意味し、過剰発現又は過小発現を決定するための対照として用いられる値を記す。これは、実施例3の式(3)における閾値 θ_g に対応し、「Entrez」は、Entrez Genbank受託番号を記す。「SEQ」は、配列番号を意味する。

20

【 0 3 5 6 】

【表11】

No	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ	No.	プローブ セットID	S	T*	Entrez	SEQ
1	203744_at	1	0.4538	3149	585	71	40687_at	-1	1.7953	2701	655
2	208699_x_at	1	2.1223	7086	586	72	221123_x_at	-1	2.2593	55893	656
3	218847_at	1	0.7209	10644	587	73	55583_at	-1	0.8311	57572	657
4	203355_s_at	1	0.1877	23362	588	74	214438_at	-1	0.3285	3142	658
5	213009_s_at	1	1.3696	4591	589	75	205656_at	-1	2.0638	27253	659
6	219874_at	1	-0.3138	84561	590	76	205572_at	-1	1.2492	285	660
7	218412_s_at	1	1.9539	9569	591	77	206271_at	-1	1.7322	7098	661
8	214039_s_at	1	3.7728	55353	592	78	218149_s_at	-1	2.9141	55893	662
9	208905_at	1	3.8095	54205	593	79	211266_s_at	-1	-0.6392	2828	663
10	201870_at	1	1.2113	10953	594	80	205903_s_at	-1	-1.5187	3782	664
11	34764_at	1	0.3539	23395	595	81	32137_at	-1	0.9339	3714	665
12	212186_at	1	1.2865	31	596	82	204642_at	-1	1.3247	1901	666
13	218526_s_at	1	1.4536	29098	597	83	44783_s_at	-1	1.7356	23462	667
14	202515_at	1	2.3460	1739	598	84	207414_s_at	-1	0.0035	5046	668
15	222056_s_at	1	1.1711	51011	599	85	213030_s_at	-1	0.3669	5362	669
16	217852_s_at	1	3.1994	55207	600	86	205199_at	-1	1.5983	768	670
17	222165_x_at	1	0.2755	79095	601	87	202479_s_at	-1	1.4550	28951	671
18	221196_x_at	1	0.7029	79184	602	88	202878_s_at	-1	2.8315	22918	672
19	206836_at	-1	2.3095	6531	603	89	218804_at	-1	-0.1414	55107	673
20	208712_at	-1	2.9253	595	604	90	209543_s_at	-1	2.1103	947	674
21	221747_at	-1	2.6506	7145	605	91	219091_s_at	-1	2.1372	79812	675
22	208711_s_at	-1	3.0413	595	606	92	209200_at	-1	1.5685	4208	676
23	218864_at	-1	0.6244	7145	607	93	201578_at	-1	2.5705	5420	677
24	205247_at	-1	0.9875	4855	608	94	204464_s_at	-1	1.5208	1909	678
25	219232_s_at	-1	2.6881	112399	609	95	210512_s_at	-1	4.3501	7422	679
26	222033_s_at	-1	2.7751	2321	610	96	206995_x_at	-1	0.5703	8578	680
27	205902_at	-1	-0.5815	3782	611	97	52255_s_at	-1	-0.0854	50509	681
28	208981_at	-1	2.8818	5175	612	98	219315_s_at	-1	2.0402	79652	682
29	204468_s_at	-1	0.3388	7075	613	99	210078_s_at	-1	0.1896	7881	683
30	218995_s_at	-1	0.6571	1906	614	100	218731_s_at	-1	2.3146	64856	684
31	221529_s	-1	2.6064	83483	615	101	212382_at	-1	1.9947	6925	685

10

20

30

40

	at										
32	202112_at	-1	3.0937	7450	616	102	212977_at	-1	1.7593	57007	686
33	212171_x_at	-1	3.1837	7422	617	103	215104_at	-1	-0.3730	83714	687
34	210513_s_at	-1	2.6802	7422	618	104	212793_at	-1	0.1560	23500	688
35	204736_s_at	-1	-0.0441	1464	619	105	206814_at	-1	-0.1826	4803	689
36	215244_at	-1	0.1464	26220	620	106	201655_s_at	-1	2.4592	3339	690
37	204726_at	-1	0.7609	1012	621	107	200878_at	-1	4.2720	2034	691
38	221009_s_at	-1	2.4870	51129	622	108	203438_at	-1	1.1001	8614	692
39	209652_s_at	-1	0.3797	5228	623	109	203238_s_at	-1	3.3351	4854	693
40	221794_at	-1	1.0626	57572	624	110	212538_at	-1	1.4583	23348	694
41	219134_at	-1	2.1160	64123	625	111	213349_at	-1	2.0507	23023	695
42	204677_at	-1	2.2375	1003	626	112	212758_s_at	-1	1.7063	6935	696
43	221031_s_at	-1	1.6851	81575	627	113	204904_at	-1	1.5891	2701	697
44	205073_at	-1	1.7351	1573	628	114	208851_s_at	-1	1.9715	7070	698
45	209071_s_at	-1	4.2320	8490	629	115	221814_at	-1	1.0068	25960	699
46	210287_s_at	-1	-0.8701	2321	630	116	213541_s_at	-1	0.5653	2078	700
47	203934_at	-1	2.2038	3791	631	117	219821_s_at	-1	-0.0525	54438	701
48	210869_s_at	-1	3.0257	4162	632	118	218507_at	-1	3.3707	29923	702
49	214297_at	-1	-0.6537	1464	633	119	204200_s_at	-1	0.5029	5155	703
50	206481_s_at	-1	1.9796	9079	634	120	218839_at	-1	0.8679	23462	704
51	206236_at	-1	-0.0285	2828	635	121	221748_s_at	-1	3.7428	7145	705
52	205507_at	-1	0.4425	22899	636	122	222079_at	-1	-0.8229	2078	706
53	218484_at	-1	1.9968	56901	637	123	201328_at	-1	1.9460	2114	707
54	219656_at	-1	0.8195	51294	638	124	201041_s_at	-1	4.0892	1843	708
55	218353_at	-1	4.3356	8490	639	125	212951_at	-1	2.1755	221395	709
56	218950_at	-1	0.6994	64411	640	126	202478_at	-1	1.6323	28951	710
57	208982_at	-1	3.2519	5175	641	127	211148_s_at	-1	0.0334	285	711
58	209784_s_at	-1	0.8851	3714	642	128	207290_at	-1	-1.5986	5362	712
59	203421_at	-1	-0.1158	9537	643	129	47550_at	-1	0.6652	11178	713
60	208394_x_at	-1	2.5754	11082	644	130	38918_at	-1	0.2916	9580	714
61	211626_x_at	-1	1.1110	2078	645	131	212387_at	-1	2.0779	6925	715
62	211527_x_at	-1	2.4324	7422	646	132	205846_at	-1	0.5781	5787	716
63	209439_s_at	-1	1.7810	5256	647	133	209183_s_at	-1	2.8982	11067	717

10

20

30

40

64	209086_x_at	-1	1.6992	4162	648	134	203753_at	-1	2.4717	6925	718
65	213075_at	-1	1.9951	169611	649	135	204463_s_at	-1	0.4644	1909	719
66	218723_s_at	-1	2.6944	28984	650	136	205326_at	-1	0.9484	10268	720
67	221489_s_at	-1	1.5033	81848	651	137	209199_s_at	-1	1.7644	4208	721
68	209070_s_at	-1	3.0697	8490	652	138	212386_at	-1	2.8700	6925	722
69	213792_s_at	-1	2.9646	3643	653	139	219619_at	-1	0.8413	54769	723
70	218825_at	-1	0.4534	51162	654	140	218660_at	-1	2.1403	8291	724

表11続き

No.	プローブセットID	S	T*	Entrez Gene	SEQ
141	201624_at	-	1	2.7292	1615
142	218975_at	-	1	-0.5101	50509
143	219700_at	-	1	0.4445	57125
144	213891_s_at	-	1	2.3933	6925
145	201809_s_at	-	1	2.5137	2022
146	202877_s_at	-	1	1.9466	22918
147	205935_at	-	1	-0.3196	2294
148	203063_at	-	1	0.4574	9647
149	217844_at	-	1	2.5577	58190
150	200632_s_at	-	1	4.0630	10397
151	201365_at	-	1	1.9308	4947
152	220027_s_at	-	1	1.1731	54922
153	222146_s_at	-	1	2.3658	6925
154	200904_at	-	1	3.7534	3133
155	41856_at	-	1	0.3849	219699
156	207560_at	-	1	0.4660	9154
157	220335_x_at	-	1	0.9676	23491
158	218876_at	-	1	0.3678	51673
159	219777_at	-	1	2.1049	474344
160	205341_at	-	1	-0.9784	30846

10

20

30

40

161	212813_at	-1	2.0963	83700	745
162	219761_at	-1	0.1239	51267	746
163	209438_at	-1	1.2005	5256	747
164	212730_at	-1	1.0922	23336	748
165	214265_at	-1	0.3480	8516	749
166	204134_at	-1	0.8627	5138	750
167	200795_at	-1	3.4708	8404	751
168	218892_at	-1	-1.2529	8642	752
169	202912_at	-1	3.5054	133	753
170	221870_at	-1	2.5560	30846	754
171	212599_at	-1	2.5884	26053	755
172	208850_s_at	-1	1.5384	7070	756
173	206477_s_at	-1	-1.2220	4858	757
174	45297_at	-1	1.2774	30846	758
175	201150_s_at	-1	2.9579	7078	759
176	38671_at	-1	1.8357	23129	760
177	218656_s_at	-1	2.0210	10186	761
178	212552_at	-1	3.2921	3241	762
179	213869_x_at	-1	2.4380	7070	763
180	219602_s_at	-1	0.1530	63895	764
181	208983_s_at	-1	1.1928	5175	765
182	212235_at	-1	2.0713	23129	766
183	205801_s_at	-1	1.0815	25780	767
184	219719_at	-1	-0.9314	51751	768
185	204220_at	-1	1.6400	9535	769
186	212494_at	-1	1.3189	23371	770
187	220471_s_at	-1	-0.7667	80177	771
188	336_at	-1	-0.5174	6915	772
189	211340_s_at	-1	2.6655	4162	773

10

20

30

40

190	<u>222101_s_at</u>	-	1	1.1035	8642	774
191	<u>220507_s_at</u>	-	1	0.3747	51733	775
192	<u>203439_s_at</u>	-	1	0.3593	8614	776
193	<u>212226_s_at</u>	-	1	3.8913	8613	777
194	<u>218805_at</u>	-	1	1.8552	55340	778
195	<u>64064_at</u>	-	1	1.6477	55340	779

10

「No.」は、本明細書において言及されている通りの表10の遺伝子番号を意味する。「プローブセットID」は、Affymetrix遺伝子チップHT_HG-U133Aにおける識別番号を意味する。「S」は、「サイド」を意味する。「サイド」は、実施例の節の「3.RCC特異的遺伝子セットの同定」に記載されているモデルに従い、遺伝子が、状態Cにおいて過剰又は過小発現される必要があるかを定義する。値「1」は過剰発現を表示し、値「-1」は過小発現を表示する。「T*」は「閾値」を意味し、過剰発現又は過小発現を決定するための対照として用いられる値を記す。これは、実施例3の式(3)における閾値 θ_g に対応する。「Entr ez」は、Entrez Genbank受託番号を記す。「SEQ」は、配列番号を意味する。

20

【 0 3 5 7 】

次の刊行物が本発明の文脈内にあると考察された。

1. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Cell 100, 57 (2000).
2. M. Baudis, M. L. Cleary, Bioinformatics 17, 1228 (2001).
3. L. J. Engle, C. L. Simpson, J. E. Landers, Oncogene 25, 1594 (2006).
4. R. Beroukhim et al., Cancer Res 69, 4674 (2009).
5. R. Beroukhim et al., Nature 463, 899 (2010).
6. R. S. Huang, M. E. Dolan, Pharmacogenomics 11, 471 (2010).
7. J. L. Huret, S. Senon, A. Bernheim, P. Dessen, Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 50, 805 (2004). 30
8. M. Baudis, BMC Cancer 7, 226 (2007).
9. F. Forozan, R. Karhu, J. Kononen, A. Kallioniemi, O. P. Kallioniemi, Trends in Genetics 13, 405 (1997).
10. T. Hruz et al., Adv Bioinformatics 2008, 420747 (2008).
11. P. Zimmermann, L. Hennig, W. Gruissem, Trends Plant Sci 10, 407 (2005).
12. V. G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Proc Natl Acad Sci U S A 98, 5116 (2001). 40
13. G. M. Poage et al., PLoS One 5, e9651 (2010).
14. W. Thoenes, S. Storkel, H. J. Rumpelt, Pathol Res Pract 181, 125 (1986).
15. J. N. Eble, G. Sauter, E. J.I., I. A. E. Sesterhenn, World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. (IARC Press, Lyon, 2004).
16. H. Bengtsson, P. Wirapati, T. P. Speed, Bioinformatics 25, 2149 (2009).
17. H. Bengtsson, A. Ray, P. Spellman, T. P. Speed, Bioinformatics 25, 861 (2009). 50
18. E. S. Venkatraman, A. B. Olshen, Bioinformatics 23, 657 (2007).
19. A. J. Iafrate et al., Nat Genet 36, 949 (2004).
20. P. D. Thomas et al., Genome Res 13, 2129 (2003).
21. H. Mi et al., Nucleic Acids Res 33, D284 (2005).

22. R. C. Gentleman et al., *Genome Biol* 5, R80 (2004).
23. A. I. Saeed et al., *Methods Enzymol* 411, 134 (2006).
24. J. Kononen et al., *Nat Med* 4, 844 (1998).
25. M. A. Rubin, R. Dunn, M. Strawderman, K. J. Pienta, *Am J Surg Pathol* 26, 312 (2002).
26. P. Schraml et al., *J Pathol* 196, 186 (2002).
27. Cheng Li and Wing Hung Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 98, 31-36 (2001 a).
28. Cheng Li and Wing Hung Wong, *Genome Biology* 2(8) (2001b).
29. [dChip] dChip Software, available at 10
1357809198265_0
- .
30. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G., *Proc Natl Acad Sci U S A*/ 98(9): 5116-5121 (2001).
31. T. Martinetz and K. Schulten. *A, Artificial Neural Networks*, 1:397-402, (1991).
32. Jianqing Fan, Irene Gijbels: *Local Polynomial Modelling and Its Applications*. Chapman and Hall/CRC, 1996, ISBN 978-0412983214.
33. Clarke, R., Ressom, H. W., Wang, A., Xuan, J., Liu, M. C., Gehan, E. A., & Wang, Y., *Nature Reviews Cancer*, 8(1), 37-49, (2008). 20
34. Gene Expression Omnibus:
1357809198265_1
35. Gregory Shakhnarovich, Trevor Darrell, Piotr Indyk : *Nearest-neighbor methods in learning and vision*. MIT Press, 2005, ISBN 026219547X

【図1A】

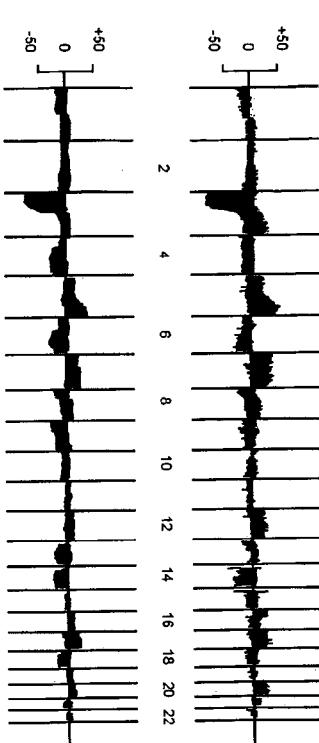
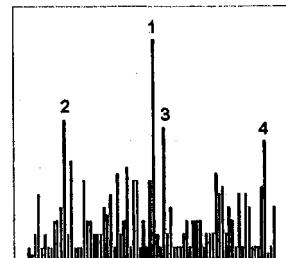


Fig.1

Fig.1

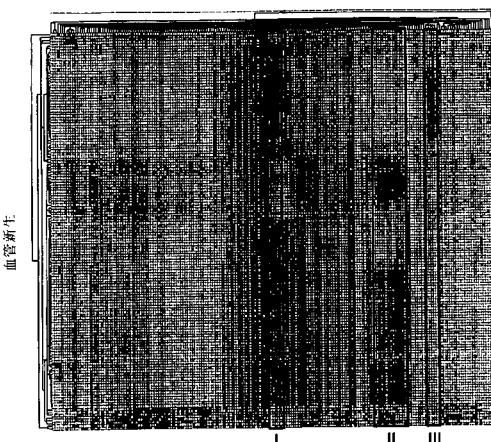
B)



- (1) ケモカイン及びサイトカインシグナル伝達経路の介在する炎症
- (2) 血管新生
- (3) インテグリンシグナル伝達経路
- (4) Wntシグナル伝達経路

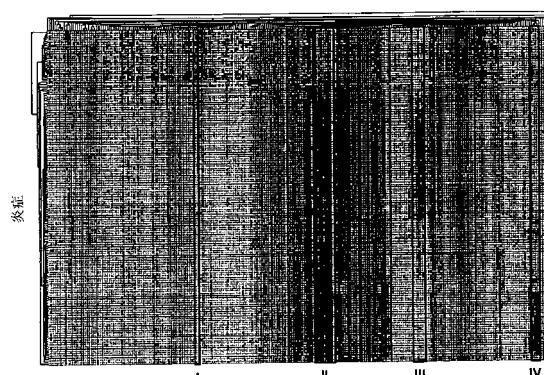
【図2A】

Fig. 2A



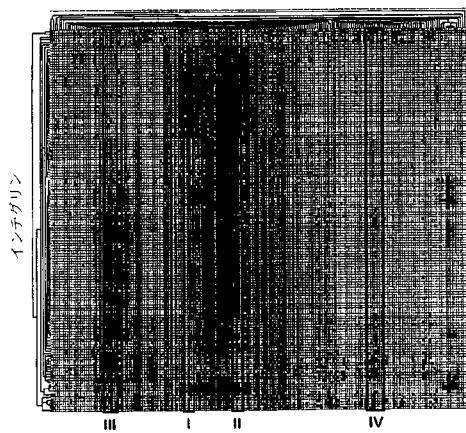
【図2B】

Fig. 2B



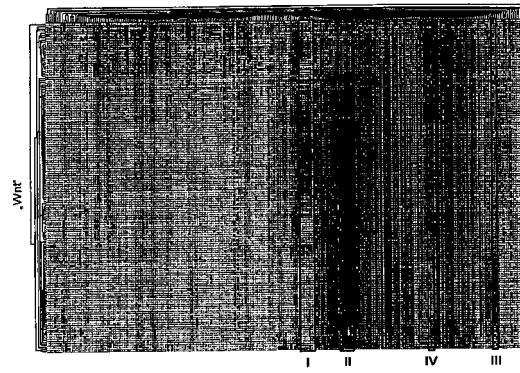
【図2C】

Fig. 2C



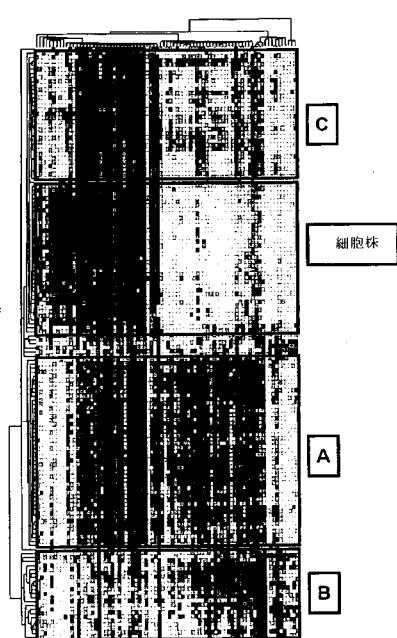
【図2D】

Fig. 2D



【図3】

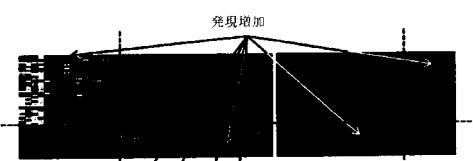
Fig. 3



【図4 A】

Fig. 4

A)



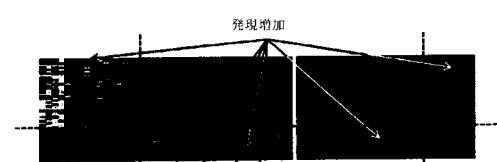
B)



【図4 B】

Fig. 4

A)



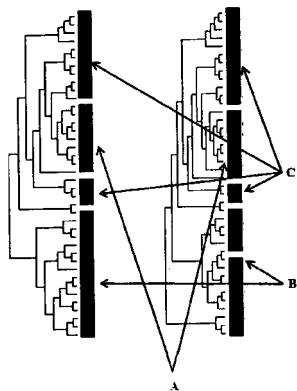
B)



【図4 C】

Fig. 4

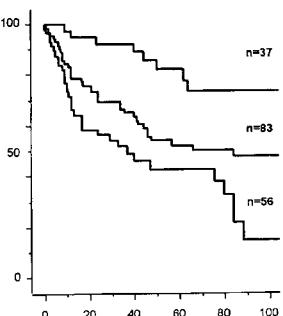
C)



【図4 D】

Fig. 4

D)



【図5】

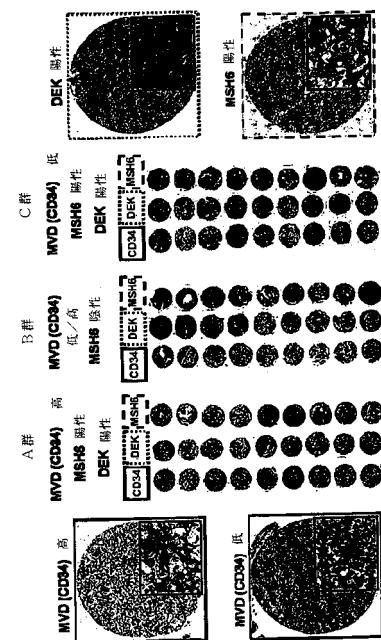


Fig. 5

【図6】

Fig. 6

統計:評価RCC-TMA(n=254);MVD(CD34), DEK, MSH6

判断基準:
-群A:MVD(CD34)高;DEK 1~3及びMSH6 1~3
-群B:MVD(CD34)低/高;MSH6=0
-群C:MVD(CD34)低;DEK 1~3及びMSH6 1~3

サブタイプ対群

RCCサブタイプ	A群	B群	C群	総数
嫌色素性	0	7	3	10
明細胞	39	66	41	146
乳頭状-1/2型	0	17	16	33
総数	39	90	60	189

群対ステージ

群	局所性	転移性	総数
A	27	12	39
B	48	39	87
C	20	36	56
総数	95	87	182

群対グレード

群	Thoenes 1	Thoenes 2	Thoenes 3	総数
A	19	17	3	39
B	18	42	28	88
C	13	22	25	60
総数	50	81	56	187

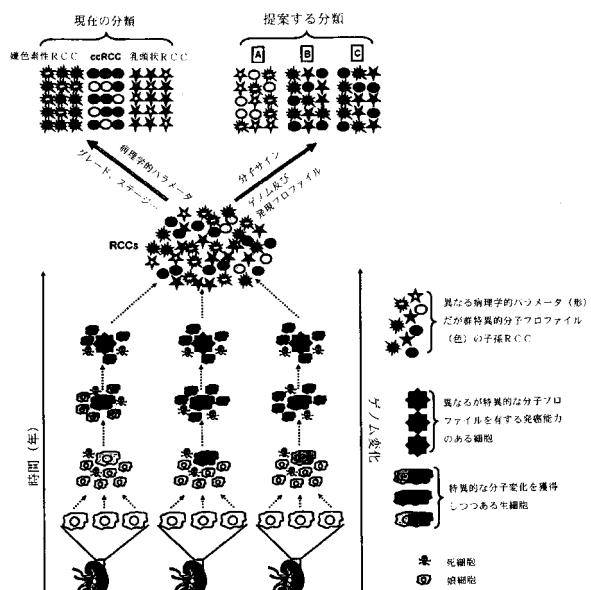
生存率のコックス比例ハザード回帰分析

変量	単変量			多変量		
	95% CI	RR	P	95% CI	RR	P
Thoenes グレード 1/2/3	1.85~3.07	2.38	<.0001	1.03~2.08	1.46	<.033
ステージ pT1/2 対 pT3/4	2.60~5.55	3.80	<.0001	1.57~4.64	2.70	<.0001
群 A/B/C	1.49~2.82	2.05	<.0001	1.09~2.20	1.55	<.013

CI=信頼区間; RR=相対リスク

【図7】

Fig. 7



【配列表】

2013526863000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2011/057691
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/>	on paper	
<input checked="" type="checkbox"/>	in electronic form	
b. (time)		
<input checked="" type="checkbox"/>	in the international application as filed	
<input type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form	
<input type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search	
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/057691

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **10-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information
It is not clear what is meant with "signature" in claims 10-15, most probably a list of genes is meant and this would fall under non-patentable subject-matter according to R. 39.1(v) PCT.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/057691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 C12Q1/68 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q
--

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
--

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LENBURG MARC E ET AL: "Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 3, no. 1, 27 November 2003 (2003-11-27), page 31, XP021004597, ISSN: 1471-2407, DOI: DOI:10.1186/1471-2407-3-31 whole doc, in particular abstract and methods -----	1,5-9
X	WO 2008/128043 A2 (GEN HOSPITAL CORP [US]; ILIOPoulos OTHON [US]; HULICK PETER [US]) 23 October 2008 (2008-10-23) whole doc, in particular abstract, claims and paragraph [0303] ----- -/-	1,5-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
--

12 July 2011

22/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Lüdemann, Susanna

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/057691

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/133420 A2 (MILLENNIUM PHARM INC [US]; BRYANT BARBARA M [US]; DAMOKOSH ANDREW I [U] 14 December 2006 (2006-12-14) whole doc, in particular abstract, claims and table 1. -----	2-9
A	LUU V D ET AL: "[Von-Hippel-Lindau gene mutation types. Association of gene expression signatures in clear cell renal cell carcinoma].", DER PATHOLOGE NOV 2008 LNKD-PUBMED:18751980, vol. 29 Suppl 2, November 2008 (2008-11), pages 303-307, XP002648617, ISSN: 1432-1963 the whole document -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/057691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008128043	A2 23-10-2008	US	2010222230 A1	02-09-2010
WO 2006133420	A2 14-12-2006	AU	2006254834 A1	14-12-2006
		CA	2611728 A1	14-12-2006
		EP	1899486 A2	19-03-2008
		JP	2008544223 A	04-12-2008

フロントページの続き

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

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100110663

弁理士 杉山 共永

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ベロイト,マンフレッド

スイス国 ツェーハー 8400 ウィンターサー,ノイヴィーゼンシュトラーセ 47

(72)発明者 シュラムル,ペーター

スイス国 ツェーハー 4058 バーゼル,クララホフウェグ 11

(72)発明者 モチ,ホルガー

スイス国 ツェーハー 8057 チューリッヒ,ウェーターレルシュトラーセ 73

(72)発明者 ボウディス,ミッセル

スイス国 ツェーハー 8006 チューリッヒ,エッケハードシュトラーセ 17

(72)発明者 シメルマン,フィリップ

スイス国 ツェーハー 2540 グレンチャン,ベットラチシュトラーセ 153エイ

(72)発明者 グルイスセム,ウィルヘルム

スイス国 ツェーハー フォーチ 8127,オウウィスシュトラーセ 7

(72)発明者 ヘンコ,カルステン

ドイツ連邦共和国 40629 デュッセルドルフ,アム ティエフェンバーゲ 27

F ターム(参考) 2G045 AA26 BB24 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03

4B024 AA12 CA01 CA12 DA02 HA12

4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR62

QR66 QR72 QR73 QR82 QS10 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39

QX02