

(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2014-515821

(P2014-515821A)

(43) 公表日 平成26年7月3日(2014. 7. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	4 B O 2 9
CO 7 K 14/705 (2006.01)	CO 7 K 14/705	4 B O 6 3
CO 7 K 16/28 (2006.01)	CO 7 K 16/28	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 H O 4 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-501759 (P2014-501759)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月26日 (2012. 3. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月26日 (2013. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/051427
 (87) 国際公開番号 W02012/131564
 (87) 国際公開日 平成24年10月4日 (2012. 10. 4)
 (31) 優先権主張番号 2835/CHE/2010
 (32) 優先日 平成23年3月27日 (2011. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 インド (IN)

(71) 出願人 513244199
 オンコシステム ダイアグノスティックス (モーリシャス) プライベート リミテッド
 ONCOSTEM DIAGNOSTICS (MAURITIUS) PVT. LTD.
 モーリシャス共和国 エベネ、サイバーシティ、19、ラッフルズ タワー、4スフロア
 4th Floor, Raffles Tower, 19, Cybercity, Ebene Republic of Mauritius

(74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞を同定するためのマーカー、その方法およびキット

(57) 【要約】

本開示は、癌の予後を識別するための、生物学的マーカー (CD44、CD24、ABC G2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンを含む) の組み合わせに関する。本開示はさらに、前記マーカーを同定する方法、癌に対する予後を予測する方法、および癌の個別化処置を設計する方法にも関する。本開示はさらに、前記予測のための、前記マーカーに対する抗体/前記マーカーを検出する別の方法を含む、キット/試験にも関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌の予後診断のための、CD 4 4、CD 2 4、A B C G 2、E S A、A B C C 4、C D 1 3 3、O c t - 4、S o x - 2、A P C、 カテニン、および P カドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される、生物学的マーカー。

【請求項 2】

癌が乳癌である、請求項 1 に記載の生物学的マーカー。

【請求項 3】

マーカーが、細胞膜、細胞質、核、および核膜またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される位置における癌の腫瘍細胞上に位置する、請求項 1 に記載の生物学的マーカー。

10

【請求項 4】

癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後診断のためのキットであって、CD 4 4、CD 2 4、A B C G 2、E S A、A B C C 4、C D 1 3 3、O c t - 4、S o x - 2、A P C、 カテニン、および P カドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を、任意に、有機溶媒、試薬、二次抗体、免疫組織化学の実施用の酵素、および取扱説明書と共に含む、前記キット。

【請求項 5】

腫瘍であるかまたは腫瘍であることが疑われる生物学的試料中の細胞上の生物学的マーカーを同定する方法であって、以下の行為：

20

a) 生物学的試料を、収集し、固定し、切片化し、有機溶媒を用いて処理すること、次いで、所定の試料希釈液を用いて、CD 4 4、CD 2 4、A B C G 2、E S A、A B C C 4、C D 1 3 3、O c t - 4、S o x - 2、A P C、 カテニン、および P カドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する一次抗体を加えることにより、抗原回復すること；および

b) 生物学的マーカーを同定するために、酵素と結合した二次抗体および着色反応物または蛍光を得るための試薬を加えること、を含む、前記方法。

【請求項 6】

癌が乳癌である、請求項 4 に記載のキットおよび請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

有機溶媒が、アルコールおよびキシレンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される、請求項 4 に記載のキットおよび請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

収集、固定、切片化および処理を、所定の条件下で従来の免疫組織化学手法により実施する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後診断の方法であって、以下の行為：

40

a) 対象から生物学的試料を収集し、試料の細胞における、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、および H e r - 2 - n e u 受容体またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される受容体の、発現または不在を同定し、発現が同定された細胞を得ること；

b) ステップ (a) の細胞上で、CD 4 4、CD 2 4、A B C G 2、E S A、A B C C 4、C D 1 3 3、O c t - 4、S o x - 2、A P C、 カテニン、および P カドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学分析を実施すること；および

c) 試料の細胞における受容体および 1 または 2 以上の生物学的マーカーの発現または不在を同定し、該マーカーの同定を、対象の予後を予測するための予測転帰参照表と関連させること、

50

を含む、前記方法。

【請求項 10】

免疫組織化学分析が従来法により実施され、マーカーの同定が、試料からの細胞の染色によって該方法の完了時に得られる着色反応物または蛍光を視覚化することにより行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

相関させることが、染色のパーセント、染色強度および染色位置またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択されるパラメータに基づき；および、前記染色の位置が、細胞膜、細胞質、核および核膜またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 12】

相関させることが、染色のパーセントを染色強度に乗じて予測スコアを算出することを含み、こうして生物学的マーカーの発現の位置に応じて予後が良いか悪いかを予測する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

予測スコアが、約 1 ～ 約 80 の範囲の低スコア、約 81 ～ 約 150 の範囲の中スコア、および約 150 ～ 約 300 の範囲の高スコアを含む群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

予測転帰参照表が、1、1A、2、2A、3、3A、4、4A、5、6、6A、7、7A、8、9、および 10 またはこれらの表の任意の組み合わせを含む群から選択される、個別の表、またはその組み合わせである、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 15】

癌を処置する方法であって、以下の行為：

a) 生物学的試料中の腫瘍細胞上に、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、および P カドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーを同定すること、および癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後を予測すること；および

b) この予測に基づき、癌の抑制のための癌治療を設計すること、を含む、前記方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、癌の予後を識別するための生物学的マーカーの組み合わせに関する。本開示はさらに、前記マーカーを同定する方法、予後を予測する方法、および癌に対する個人化された処置を計画する方法に関する。本開示はさらに、前記予測のための前記マーカーに対する抗体 / これを検出する別の方法を含む、キット / 試験にも関する。

【背景技術】

【0002】

開示の背景および従来技術

化学療法 / 放射線療法：

腫瘍学の分野では、癌細胞の検出、同定および特徴付けは、診断の重要な側面である。医学の多くの課題の中で、癌の処置と治療よりも議論の的となる始まりを有するものはなく、苦難に満ちた進歩を経験したものもない。多くの患者に対する効果的な処置は、転移性疾患を突き止めるために身体の全ての臓器に到達することが必要であった。癌患者の 70% 以上は化学 / 放射線療法を受ける。

【0003】

複数の角度からの癌治療の革新的進歩にもかかわらず、癌の治療は依然としてとらえどころのないままである。進行した固形悪性腫瘍は、最高の治療を受けたとしても、一部は

40

50

放射線および化学療法に対する抵抗性の発達により治療の課題が残る。例えば神経グリア芽細胞腫は最も致命的な癌の一つであり、現在の治療では緩和しか提供できない。神経グリア芽細胞腫のための標準的医療は、外科的切除、外部電離放射線照射、および化学療法から構成される。放射線療法は最も効果的な非外科的処置法であるが、しかし再発は本質的に普遍的である。

しかし化学/放射線療法を受ける患者の大部分は、処置による不必要で重篤な副作用に苦しめられる。さらに、多くの患者はまた処置への抵抗性を示し、このため処置の失敗がもたらされる。

【0004】

したがって、処方された化学/放射線療法の有効性を事前に決定できる診断テストの、開発の必要性が存在する。今日では、処置の決定は、例えば腫瘍組織学、腫瘍体積および腫瘍ステージ、さらに生体イメージング技術などの臨床パラメータに基づいて行われる。放射線/化学療法の用量およびスケジュール、ならびに薬物との組み合わせは、周囲の正常組織の許容限度を考慮した経験的クラスの解として処方される。現在の標準的処置の処方、腫瘍の不均一性/個性を考慮しないために、治療はしばしば失敗し、患者は不必要な副作用を受ける。

腫瘍は典型的に2種類の細胞、CSCと腫瘍細胞を有する。CSCは腫瘍の一部のみを構成し、通常は少数である。腫瘍の大部分は、定常的に分裂して「腫瘍」と呼ばれる固体の大きな塊をつくる、腫瘍細胞から構成される。

【0005】

一方CSCは、ほとんど分裂せずに自己再生する能力を有する静止細胞であり、すなわち、それ自身の完全なコピーでありかつ移動して特定の腫瘍の様々な細胞に分化することができる娘細胞を作るような方法で分裂する(参考文献: The Biology of Cancer Stem Cells, Neethan A. Lobo et al, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2007. 23:675-99およびThe theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice?, Isidro Sa´nchez-García et al, BioEssays 29:1269-1280)。

【0006】

化学/放射線治療は、急速に分裂する細胞を標的として殺すことにより、腫瘍サイズの縮小を目指す。CSCはほとんど分裂しないため、これらの治療によっては殺されず、生き残って再度腫瘍を作り、これは癌の「再発」と呼ばれる。(参考文献: Chemotherapy and Cancer Stem Cells, Jeremy N. Rich et al, Cell Stem Cell 1, October 2007; Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening, Piyush B. Gupta et al, Cell 138, 1-15, August 21, 2009; Identification and targeting of cancer stem cells, Tobias Schatton et al, BioEssays 31:1038-1049; TUMOUR STEM CELLS AND DRUG RESISTANCE, Michael Dean et al, Nature Reviews, cancer, Volume 5, April 2005; Cancer stem cells in solid tumors, Patrick C. Hermann et al, Seminars in Cancer Biology (2008))。

【0007】

上記の参考文献から、CSCが、新鮮な腫瘍からそれが有する特定の細胞表面マーカーに基づいて、FACS(蛍光活性化セルソーティング)を用いて単離されてきたことがわかる。これらの単離されたCSCは、10000~20000個までの非CSC/大量の腫瘍細胞に対し、100~200個の細胞であっても新しい腫瘍を誘導するのに十分であった。(参考文献: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, Muhammad Al-Hajj et al, PNAS, April 1, 2003, vol. 100 _ no. 7 _ 3983-3988; Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors, Sheila K. Singh et al, CANCER RESEARCH 63, 5821-5828, September 15, 2003; Identification of human brain tumour initiating cells, Sheila K. Singh et al, NATURE | VOL 432 | 18 NOVEMBER 2004)。CSCは、90年代半ばに血液の癌で同定され、固体腫瘍では2003年に初めて乳癌から、続いて脳およびすべての他の癌から同定された。

【0008】

CSCの存在およびこれに対する薬物の欠如は、癌の治療が達成されない理由の1つとなり得る。多くの製薬会社およびバイオテクノロジー企業が、腫瘍内のこれらCSCを特異的に標的化し、癌の再発を予防する薬物の発明に努力を傾けている。これらの薬物の多くは臨床試験に供されている。

化学/放射線療法への抵抗性および処置の失敗は、腫瘍内の癌幹細胞(CSC)と呼ばれるものの存在による。腫瘍は本質的に不均質であり、2種類の細胞、すなわち癌幹細胞と腫瘍の大部分を形成する腫瘍細胞とを含む。全ての腫瘍細胞が、新しい腫瘍や処置後の再発を誘導する能力を有するのではないことは、昔から認識されていたが、最近になって初めて方法論的進歩があり、これが最終的にCSCを同定して、その生物学的調査を可能とした。CSCは、白血病および乳房、脳、結腸、頭頸部および脾臓の腫瘍を含む、より多くのヒト癌から予測的に単離されてきた。異なる腫瘍に対して、CSC亜集団の移植は、同じ腫瘍からの未分類集団と比べて、より高い腫瘍保有率をもたらすことが示されている。

10

【0009】

CSCは、自己更新して、腫瘍を構成するすべての癌細胞の異種の系統を生成する能力を有する、腫瘍内の細胞として定義される。これはCSCが、対称または非対称分裂によってCSCプールを拡大するかまたは癌前駆細胞に分化することができる、腫瘍細胞の小さな亜集団の可能性のあることを意味する。しかし、これについては腫瘍種類に依存し、メラノーマにおいてCSCは、総腫瘍細胞の顕著に高い割合を占める。非幹細胞は、腫瘍内の全ての癌細胞の大部分を構成するが、増殖能は限られており、腫瘍発生性ではない。

20

【0010】

CSCの特性：CSCは腫瘍内に存在する静止細胞であり、したがって、腫瘍の大部分を構成する急速に増殖する腫瘍細胞とは機能的に異なっている。静止する性質により、CSCは化学/放射線療法の「望ましい効果」に良好に抵抗するが、それは、これらの療法が腫瘍の急速に分裂する細胞を標的とするためである。加えてCSCは、複数のイオンチャネル/輸送、より高い低酸素耐性、および差次的遺伝子発現などに恵まれており、これらはCSCの化学/放射線耐性現象に寄与している。増加するデータ集団は、CSCと非CSCの生物学的な違いが標準療法への応答に重要であることを示唆しており、多くの製薬会社は、CSCに対する合理的な薬物の設計にこれらの違いを用いている。放射線療法および化学療法の処置の失敗についての根本的な理由の1つは、現在の処置の、癌幹細胞(CSC)の根絶に対する有効性の低さのためである可能性がある。CSCは細胞傷害性/放射線療法に抵抗性であり、このため処置の失敗に貢献する可能性があることを、多くの証拠が示している。

30

【0011】

本開示と類似の分野の現在の技術には、Oncotype DxおよびMammaprintが含まれる。これらは類似しているが、CSCの存在を検出しない。これらは、患者におけるER/PRおよびHer-2-neu経路の存在を評価して、患者が術後化学療法を必要とするかどうかを評価する。現在、腫瘍におけるCSCの存在を検出する診断テストは存在せず、したがって、再発の時間と化学および放射線治療の有用性を予測できない。また、現在の方法は、特定の化学療法薬/組み合わせを選択する際の支援を提供しない。

40

【0012】

臨床的観点から、この概念の直接的な帰結は、癌治療が患者を治療できるのは、全てのCSCが除去された場合のみであり、1個のCSCの生存が再発や転移を引き起こし得るということである。さらにまた、腫瘍が、化学/放射線療法を処方する前に、CSCの存在について評価される場合、腫瘍医にとって、処置の有効性を予測でき、癌処置をより良好に管理し、治療が有効でない場合に患者に対する望ましくない処置の副作用を低減する、かなりのチャンスがある。2004年の最初の固形腫瘍のCSCの発見以来、CSCの生物学について大きな進歩があった。CSCの内容、分布および感度、微小環境のCSCニッチおよびシグネチャー(signature)についての予測試験を用いて、解のクラス内で、CSCに基づく個別に設計された治療を可能とすべきである。

50

【0013】

開示の陳述

従って、本開示は以下に関する：癌の予後診断のための、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される、生物学的マーカー；癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後診断のためのキットであって、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を、任意に、有機溶媒、試薬、二次抗体、免疫組織化学の実施用の酵素、および取扱説明書と共に含む、前記キット；腫瘍であるかまたは腫瘍であることが疑われる生物学的試料中の細胞上の生物学的マーカーを同定する方法であって、以下の行為：a) 生物学的試料を収集し、固定し、切片化し、有機溶媒を用いて処理し、次いで、所定の試料希釈液を用いて、抗原回復すること、およびb) CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する一次抗体を加え、生物学的マーカーを同定するために、酵素と結合した二次抗体および着色反応物または蛍光を得るための試薬を加えること、を含む、前記方法；癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後診断の方法であって、以下の行為：a) 対象から生物学的試料を収集し、試料の細胞における、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびHer-2-neu受容体またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される受容体の、発現または不在を同定し、発現が同定された細胞を得ること、b) ステップ(a)の細胞上で、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学分析を実施すること、およびc) 試料の細胞における受容体および1または2以上の生物学的マーカーの発現または不在を同定し、該マーカーの同定を、対象の予後を予測するための予測転帰参照表と関連させること、を含む、前記方法；および、癌を処置する方法であって、以下の行為：a) 生物学的試料中の腫瘍細胞上に、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーを同定すること、および癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後を予測すること、およびb) 予測に基づき、癌の抑制のための癌治療を設計すること、を含む、前記方法。

【0014】

発明の詳細な説明

本開示は、癌の予後診断のための、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに関する。

本開示の一態様において、癌は乳癌である。

本開示の別の態様において、マーカーは、細胞膜、細胞質、核、および核膜またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される位置における癌の腫瘍細胞上に位置する。

【0015】

本開示はさらに、癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後診断のためのキットであって、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を、任意に、有機溶媒、試薬、二次抗体、免疫組織化学の実施用の酵素、および取扱説明書と共に含む、前記キットに関する。

【0016】

本開示はさらに、腫瘍であるかまたは腫瘍であることが疑われる生物学的試料中の細胞上の生物学的マーカーを同定する方法であって、以下の行為：

- a) 生物学的試料を、収集し、固定し、切片化し、有機溶媒を用いて処理すること、次いで、所定の試料希釈液を用いて、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する一次抗体を加えることにより、抗原回復すること；および
- b) 生物学的マーカーを同定するために、酵素と結合した二次抗体および着色反応物または蛍光を得るための試薬を加えること、を含む、前記方法に関する。

【0017】

本開示の一態様において、癌は乳癌である。

本開示の別の態様において、有機溶媒は、アルコールおよびキシレンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される。

本開示のさらに別の態様においては、収集、固定、切片化および処理を、所定の条件下で従来の免疫組織化学手法により実施する。

【0018】

本開示はさらに、癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後診断の方法であって、以下の行為：

- a) 対象から生物学的試料を収集し、試料の細胞における、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびHer-2-neu受容体またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される受容体の、発現または不在を同定し、発現が同定された細胞を得ること；
 - b) ステップ(a)の細胞上で、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学分析を実施すること；および
 - c) 試料の細胞における受容体および1または2以上の生物学的マーカーの発現または不在を同定し、該マーカーの同定を、対象の予後を予測するための予測転帰参照表と関連させること、
- を含む、前記方法に関する。

【0019】

本開示の一態様において、免疫組織化学分析は従来法により実施され、マーカーの同定は、試料からの細胞の染色によって該方法の完了時に得られる着色反応物または蛍光を視覚化することにより行われる。

本開示の別の態様において、関連させることは、染色のパーセント、染色強度および染色位置またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択されるパラメータに基づき；および、前記染色の位置は、細胞膜、細胞質、核および核膜またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される。

【0020】

本開示のさらに別の態様において、関連させることは、染色のパーセントを染色強度に乗じて予測スコアを算出することを含み、こうして生物学的マーカーの発現の位置に応じて予後が良いか悪いかを予測する。

本開示のさらに別の態様において、予測スコアは、約1～約80の範囲の低スコア、約81～約150の範囲の中スコア、および約150～300の範囲の高スコアを含む群から選択される。

本開示のさらに別の態様において、予測転帰参照表は、1、1A、2、2A、3、3A、4、4A、5、6、6A、7、7A、8、9、および10またはこれらの表の任意の組み合わせを含む群から選択される、個別の表、またはその組み合わせである。

【0021】

本開示はさらに、癌を処置する方法であって、以下の行為：

10

20

30

40

50

a) 生物学的試料中の腫瘍細胞上に、CD44、CD24、ABCG2、ESA、ABCC4、CD133、Oct-4、Sox-2、APC、カテニン、およびPカドヘリンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される生物学的マーカーを同定すること、および癌を有するかまたは癌を有することが疑われる対象の予後を予測すること；および

b) 予測に基づき、癌の抑制のための癌治療を設計すること、を含む、前記方法に関する。

【0022】

本開示は、あるCSC特異的マーカーを用い、ある腫瘍中の、標準治療に対する患者の応答の指標であるCSC/薬物耐性細胞の存在を調べるための手法として免疫組織化学および逆転写ポリメラーゼ反応(RT-PCR)を用いて、腫瘍試料を評価する診断テストである。マーカーの例としては、限定はされないが、CD44、CD133、CD24、Oct4、Sox2、およびCSC上に存在するイオントランスポーター/チャネルであって例えばトランスポーターのABCファミリー、すなわちABCG2およびABCC4、ESA、APC、Pカドヘリン、Bカテニン(リン、総リン、および非リン)を含む。

【0023】

本開示は、腫瘍学の分野において、腫瘍の早期発見に有用性を有する。可能な癌の診断/予後診断は、腫瘍専門医が化学療法を計画し、代替の標的処置を処方することを支援する。患者はさらに、高価な処置の望ましくない副作用から免れる。

本開示はまた、CSCを同定するのに用いるマーカーおよびこれらのマーカーの組み合わせに、ならびにかかる癌幹細胞(CSC)を検出する方法論にも関する。

以下の具体的な例を参照してより完全な理解を得ることができ、これらは例示のみを目的として提供され、本開示の範囲の限定は意図していない。

【0024】

以下の例は、乳癌の予後診断のために、個別にまたは互いに組み合わせて用いることができる、種々のマーカーを示す。本明細書に提供される例は、癌を有するか有することが疑われる対象の予後を解析するため、および予後診断に到達するための可能な組み合わせの種類を例示する。本明細書に提供される表は、マーカーの組み合わせまたは個別のマーカーのどちらかを認識することによって如何にして解釈に到達するかについての、説明および明確さのために組み合わせられている。本明細書に示されている任意の組み合わせからの任意の表は、単一で、または本明細書に提供されている任意の別のマーカーと組み合わせて、本明細書の例によっては明示的に説明されていない可能性もある解釈のために、用いることができる。全てのかかる可能な組み合わせおよびかかる組み合わせの解釈は、本開示の範囲内である。当業者はしたがって、試料を検査し、結論に到達し、結論を本明細書に提供されているマーカーの解釈と比較することにより、対象の予後を予測することができ、正確な予後診断と、かかる予後診断に基づくさらなる処置の過程の戦略化を行うことができる。

【0025】

例

本開示において、IHC(免疫組織化学)を、CD44とCD24に対する2種の抗体を用いて実施して、これらの患者において任意のCSCシグネチャーが見出せるかどうかを確かめる。探索するシグネチャーは、CD44⁺/CD24⁻/lowである。

しかしながらこれら2つのマーカーは、表面/膜に関連する発現のみを検出するFACS分析に基づいて、CSC上に存在することが知られている。FACSは膜発現のみを検出可能であり、細胞質でのCD24発現が多くの場合に見られたとしても、これは陰性としてとらえられるか、または細胞質としてマークされる。しかしIHCは、膜および細胞質の両方でCD24の存在を検出することができ、多くの場合発現は膜に加えて細胞質で見られるか、または細胞質のみで見られる場合もある。したがって、本開示の一部の表に開示されるように発現が完全に細胞質である場合、そこでの結果は、FACSを用いて検出した場合には、本開示のIHCを用いる場合と異なり、CD24⁻(CD24陰性)と

10

20

30

40

50

考えられる。本開示の I H C に基づく検出により、膜および細胞質、および核膜での発現が検出される。

【 0 0 2 6 】

本開示の一態様において、癌 / 腫瘍のリンパ節状態 / ステージ N 0 でも、悪い転帰を示す場合があることに留意すべきである。しかし一般的な方法として、通常はリンパ節ステージの増加、例えば N 2 または N 1 は悪い転帰を示し、一方 N 0 は隣接するリンパ節への転移がないと考えられ、したがって良い転帰 / 癌・腫瘍のより軽症の形態を有するものとされる。それにもかかわらず、本開示で開示された表 1 0 (患者の病歴) によれば、低いリンパ節ステージの腫瘍でも悪い転帰があり、その逆もあることが明確に示されている。したがって、リンパ節の状態には完全に依拠することができず、良いまたは悪い予後診断を、リンパ節状態の同定等の以前から知られている技術のみに基づいて実施することができないため、試料のより深い分析が求められる。したがって、本開示は明らかに、腫瘍のリンパ節の状態等の以前から知られている技術と組み合わせることができる、癌細胞上に存在するマーカーの同定の必要性とその重要性を示している。したがって、本開示から明らかであるように、染色された細胞 %、染色強度および各マーカーの位置の組み合わせを考慮して、患者試料の正確な予後診断に到達すべきである。

10

【 0 0 2 7 】

本開示の別の態様において、以下に示されるマーカーを、患者試料の癌幹細胞 / 癌始原細胞 / 腫瘍始原細胞においてのみでなく、試料の全腫瘍細胞を包含して同定すべきであることにも、留意されたい。

20

【 0 0 2 8 】

例 1

本開示の患者試料中のマーカーの同定に用いる技術には、免疫組織化学 (I H C) または R T - P C R が関与する。

腫瘍から癌幹細胞を同定するためのプロセスを、下記のような技法を用いて行う : 腫瘍試料を患者から採取する。試料をパラフィン中に包埋してホルマリン固定し、ブロックを作る

ブロックを、スライド上で切片化する

30

スライドを一連の有機溶媒に通して脱水する

抗原回復を、制御された実験条件下で、特定の試料希釈を用いて実施する

続いて、スライド上の切片を室温 (R T) に冷却する

続いて遮断剤を添加する

続いて抗原に対する一次抗体を加える

40

続いて酵素に結合した二次抗体を加える

続いて着色反応物を得るための試薬を加える

染色を観察して、染色の %、染色の強度および位置を同定する。

これら全結果の相関をとって、腫瘍試料における C S C の存在の同定を行い、その結果として良い / 悪い転帰に到達する。

【 0 0 2 9 】

本発明の一態様において、以下の詳細なプロトコルに記載されている有機溶媒、試薬、二次抗体および酵素は例示目的のみであり、本質的に限定するものと解釈されるべきでは

50

ない。本開示は、当業者に一般に知られており使用されているかかる溶媒、試薬、二次抗体および酵素の、全ての可能な組み合わせおよび代替物を想定し包含する。

本開示で使用するプロセスの明解性をさらに提供するために、以下に免疫組織化学の詳細なプロトコルを提供する：

【 0 0 3 0 】

I H C プロトコル

A] スライドのコーティングおよび F F P E ブロックの切片的切り取り

- 1 . 新しいスライドガラスを水道水で洗浄する。
- 2 . スライドを、 1 % 酸性アルコール溶液 (1 m l の H C l + 9 9 m l の 7 0 % エタノール) に 5 分間浸す。
- 3 . スライドを蒸留水で 1 度洗浄し、酸アルコールが洗い流されていることを確認する。
- 4 . スライドを乾燥させる。
- 5 . スライドを、水中の 1 0 % ポリ - L - リジン溶液 (P L L) に室温 (R T) で 1 5 分間浸す。
- 6 . スライドを取り出し、室温で乾燥させる。
- 7 . これらの P L L 被覆スライド上に、 F F P E 腫瘍ブロックの 3 ~ 5 ミクロンの切片を Leica Microteome を用いて載せる。
- 8 . 切片を 6 0 で 3 時間または一晩インキュベートする。

10

【 0 0 3 1 】

B] 脱パラフィン化プロトコル：

- 1 . 腫瘍切片を有するスライドを、キシレン - I に室温で 1 0 分間浸す。
- 2 . スライドを、キシレン - I I に室温で 1 0 分間浸す。
- 3 . スライドを、キシレン - I I I に室温で 1 0 分間浸す。
- 4 . スライドを、 1 0 0 % アルコールに室温で 5 分間浸す。
- 5 . スライドを、 1 0 0 % アルコールに室温で 5 分間浸す。
- 6 . スライドを、 7 0 % アルコールに室温で 5 分間浸す。
- 7 . スライドを、 7 0 % アルコールに室温で 5 分間浸す。
- 8 . スライドを、 D / W に室温で 5 分間浸す。
- 9 . スライドを、メタノール中の 3 % H 2 O 2 に室温で 2 0 ~ 3 0 分間浸す。

20

【 0 0 3 2 】

C] 抗原回復および免疫染色：

このステップは、各抗体 / マーカーにより異なる。以下は抗体 A および B に対するプロトコルである。両抗体に対する抗原回復用の緩衝液は以下である：

1 m M の E D T A + 1 0 m M の トリス - C l 緩衝液、 p H 7 . 4

1 . 抗体 A 対して：抗原は、圧力鍋条件を用いて、トリス - E D T A 緩衝液中 3 笛で最大に回復される (用いる圧力鍋により笛数は調節可能。加熱し過ぎを避けること) 。

抗体 B 対して：抗原は、次の電子レンジ条件を用いて最大に回復される：

8 0 0 ワットで 6 分間

8 0 0 ワットで 6 分間

2 0 0 ワットで 1 5 分間

40

【 0 0 3 3 】

しかし、上のような圧力鍋の方法を試してみてもよい。

- 2 . 抗原回復後、スライドを緩衝液中で室温に 3 0 分間冷却する。
- 3 . スライドを蒸留水で 2 分間洗浄する。
- 4 . スライドを、 T B S T (トリス緩衝食塩水に 0 . 1 % Tween 20) で 5 分間洗浄する。
- 5 . スライドを T B S T で 5 分間洗浄する。
- 6 . スライドを 3 % B S A 溶液でブロックする / 二次抗体用キットを用いている場合は、キットで提供される遮断を適宜用いる。
- 7 . 緩衝液で希釈した一次抗体 (下記参照) を、室温で 6 0 分間加える。
- 8 . スライドを、 T B S T で室温で 5 分間洗浄する。

50

9. 8 番のステップをさらに 2 回繰り返す。

10. 二次抗体、すなわち HRP 結合抗マウス抗体を、キットに従って適切な希釈で加える。室温で 30 ~ 60 分間インキュベートする。

【0034】

11. TBS で室温で 5 分間洗浄する。

12. 11 番のステップをさらに 2 回繰り返す。

13. キット推奨の基質 DAB 等を加える。

14. 過剰な基質をキットに従って洗い流す。

15. ヘマトキシリンにより逆染色する。

16. 100% アルコールに 5 分間浸すことにより、過剰な染色を洗い流す。

10

17. 16 番のステップを繰り返す。

18. スライドを乾燥させる。

19. キシレン中で室温で 5 分間、1 回洗浄する。

20. DPX / 適切な封入剤中に封入する。

21. シートに従って、スライドをスコア / グレード付けする。

【0035】

溶液の処方：

1. 酸アルコール：1 ml の濃 HCl + 99 ml の 70% アルコール

2. 抗原回復緩衝液：10 mM の EDTA、pH 8.0 + 10 mM の トリス - Cl、pH 7.4

20

3. 一次抗体希釈緩衝液：10 mM の トリス - Cl、pH 7.4 + 0.9% NaCl + 0.5% BSA

4. 遮断緩衝液：トリス - Cl、pH 7.4 中の 3 ~ 5% BSA、または、キットが提供する遮断液、または、それぞれのプロトコルによる

5. TBS：10 mM の トリス - Cl、pH 7.4 + 0.9% NaCl + 0.1% Tween -20

さらに、抗原回復のために使用する特定の試料希釈液、有機溶媒および実験条件は、例示目的のみのために、以下のように提供される。当業者は、用いられる種々のパラメータおよび条件を理解することができ、したがって、かかる分析用のプロトコルに到達するための、当技術分野での知識を有する者に知られている全ての様々な代替および置換もまた、本開示の範囲内である。

30

【0036】

抗体 A - 圧力鍋 (PC)、トリス - EDTA (TE) pH 7.4 の緩衝液、設定 2 で 2 笛および設定 1 で 1 笛；希釈 1 : 1400

抗体 B - 電子レンジ、50 mM のクエン酸緩衝液、pH 6.0；電子レンジ / Cit 6.0 / 「高」の設定 - 700 W で 7 分；高 - 750 W で 5 分；「解凍」の設定 - 200 W で 15 分；希釈 1 : 50

抗体 C - 2 N の HCl、室温；希釈 1 : 300

抗体 E - 50 mM のクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 90 で 30 分間の水浴；希釈 1 : 600

40

抗体 F - 圧力鍋、クエン酸緩衝液 pH 6.0；ヒーター上で設定 1 で 1 笛、および設定 1 で 20 分沸騰；希釈 1 : 200

抗体 G - 2 N の HCl、室温で 15 分、希釈 1 : 50

抗体 H - PC / Cit 6.0 / 設定 2 で 2 笛 & 設定 1 で 1 笛；希釈 1 : 1000

抗体 I - 圧力鍋 (2 分で 2 笛、設定 1 で 1 笛)、Cit 6.0；希釈 1 : 1000

【0037】

抗体 J - 圧力鍋、Cit 6.0；圧力鍋 (2 分で 2 笛、設定 1 で 1 笛)；1 : 50 の抗体希釈

抗体 K - クエン酸塩 pH 6.0 中で 90 で 30 分の水浴；希釈 1 : 100

抗体 L - 圧力鍋 (2 分で 2 笛、1 分で 1 笛)；TE 緩衝液、pH 7.4、会社からの予備

50

希釈された抗体

抗体 O - 圧力鍋のクエン酸緩衝液 pH 6 . 0 中、設定 2 で 2 筈、設定 1 で 1 筈

【 0 0 3 8 】

例 2

本開示で使用する抗体は、次の 1 または 2 以上から選択される：

C D 4 4 : (参照 : C D 4 4 標準 / H C A M A b - 4 (クローン 1 5 6 - 3 C 1 1))

C D 2 4 : (参照 : (C D 2 4 (G P I 結合表面ムチン) A b - 2 (クローン S N 3 b)

A B C G 2 : (参照 : N B - 1 1 0 9 3 5 1 1、Novus Biologicals より)

E S A : (参照 : Novocastra 上皮特異抗原)

A B C C 4 : (参照 : A B C C 4 モノクローナル抗体 (M 0 3)、クローン 1 B 2)

C D 1 3 3 : (参照 : P A B - 1 2 6 6 3、Abnova より)

O c t - 4 : (参照 : O c t - 4 抗体 (N B 1 1 0 - 9 0 6 0 6))

S o x - 2 : (E - 1 8 6 0 0、Spring Biosciences より)

A P C : (参照 : 腺腫性ポリポーシス遺伝子産物)

P カドヘリン : (参照 : 抗 P カドヘリン抗体 [5 6 C 1]、希釈済み (a b 7 5 4 4 2))

B カテニン : (参照 : 抗活性 カテニン (抗 A B C)、クローン 8 E 7) J B C - 1 8 7 0 0 5 7。

【 0 0 3 9 】

以下の表 1 ~ 9 の全ての表において、細胞染色の強度は 1 ~ 3 の値を有する。ここで、強度 1 = 極めて淡褐色の染色スライド、強度 2 = 中程度の褐色の染色スライド、および強度 3 = 暗褐色の染色スライド。中間の色を観察した場合は、1 ~ 2 または 2 ~ 3 等と表示する。

さらに、本明細書に提供されている 1、1 A、2、2 A、3、3 A、4、4 A、5、6、6 A、7、7 A、8、9、および 10 を含む群から選択される個別の表、またはその任意の組み合わせの表は、当業者が使用することができ、癌を有するか有することが疑われる対象の予後予測のための関連する結果について解釈され、これに到達することができる。個別または組み合わせのこれらの表はまた、本開示において、予測転帰参照表とも称される。

【 0 0 4 0 】

【表 1 - 1】

表 1	患者番号	抗体 A			抗体 B		
		CD44			CD24		
		細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	20	1-2	M	60	1.5	M
	2	20	2-3	M	80	1.5	C
	3	陰性			10	1.5	M
	4	35	2	M	40	1.5	C
	5	5	3	M	55	1.5	C
	6	40	2-3	M	65-70	1.5	C
	7	40	3	M	85	3	M
	8	10	1.5	C	50	2	C
	9	20	3	M	80	2-3	C
ER+/PR+ 悪い転帰	10	20	1.5	M	20	1-2	M
	11	60	2	C	35-40	3	C
	12	95	3	M	25-30	2	M
	13	70	3	M	75	2	C
	14	90	2.5	M	35-40	1.5	M
	15	75	1.5	M	25	各 1.5	M
	16	60	2.5	M	15		C
	16	80-85	3	M			C

【表 1 - 2】

	17	65-70	3			20	2	M
	18	90	3			55	1.5	C
	19	100	2-3			70	1	M
	20	90	3			50	1-2	C
	21	80	3			70	3	C
	22	40	2.5			60	1-2	M
	23	95	3			90	1	C
	24	95	3			50	1.5	C
	25	90	3			20	1.5	M
	26	95	3			10	陰性	M
	27	80	3			45	1.5	C
	28	<5	1			35	1.5	M
	29	75	各 3			60-70	1-2	M
	30	5	1-2			40	1-2	C
	31	30	2.5			20	1-2	C
	32	70	1.5			50	2-3	M
	33	40	1.5			90	2-3	C
	34	45	2.5			40	2-3	M
	35	30	1.5			60	2-3	C
	36	35	3			95	2.5	C
		15	1-2			55	1.5	M
						95	2	C
						50	2	M
						90	1.5	C
						45	1.5	M
							陰性	
						50	2	C
						30	1.5	M

10

20

30

40

【0042】

表 1 A

A / C D 4 4 の発現は、D C I S 辺縁部においてではなく、浸潤辺縁部においてスコア付けされるべきである。

M : 細胞膜

C : 細胞質

N : 核

N M : 核膜

【表 1 A】

ER/PR の状態	転帰	発現レベルおよび位置		可能性のある利用法
		マーカーA	マーカーB	
P/P	良い	M で低発現 65	Cのみで発現の場合、中程度に高い 91.5 MCで発現の場合、CではMより高い M-65 C-108	攻撃性の低いフォローアップ
	悪い	M で高発現 213	Cのみで発現の場合、中程度 142 MCで発現の場合、CではMより高い M-57 C-82	より攻撃的な処置
N/N	良い	M で高発現 238	MCで発現の場合、CではMより高い M-82 C-119	攻撃性の低い処置
	悪い	Mのみで発現の場合、低い 20 MCで発現の場合、MではCより大幅に高い M-131 C-58.5	MCで発現の場合、CではMより大幅に高い M-91 C-148	よりよいフォローアップの手がかり

【 0 0 4 3 】

範囲：低：1～80；中：81～150；高：150～

スコア付けに適用される式：

カラム A 合計（細胞の％）／患者試料数＝スコア A

カラム B 合計（強度）／患者試料数＝スコア B

スコア A × スコア B ＝ 該カテゴリーにおける該マーカーの最終スコア

上記のスコア付けと式は、カテゴリーの全ての患者試料ではなく、特定の分野〔マーカーの位置〕内の実体を念頭に置いて用いられてきた。例えば：ER - / PR - 状態の患者でマーカー A について悪い転帰を有する者において、予後を予測するためのスコア付けは以下の方法で行う：

マーカー A の膜と細胞質の両方における発現という解釈に到達するために、9 試料中の 6 つのみを考慮し、これは残りの 3 つは膜のみで発現を有する試料を構成するからである。同様に、マーカー A の膜のみでの発現という解釈に到達するために、9 試料中の 3 つのみを考慮し、これは残りの 6 つは、このカテゴリーの予測に要求される基準である膜のみではなく、細胞質と膜の両方で発現を有する試料を構成するからである。

同様の戦略および変換を用いて、全てのマーカーおよび ER / PR 状態にわたる、全試料の結果の解釈を行う。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

注記：E R + / P R + 良い転帰：

浸潤辺縁部におけるマーカーの存在または不在を評価することが重要である。D C I S 病巣を有する腫瘍全体はAの高発現を有するが、浸潤辺縁部では低い発現か発現がない可能性があり、したがって、マーカーAについての結果解釈に非常に重要なのは、浸潤辺縁部における実際の発現である。

【0045】

表1および1Aの解釈：

患者試料を、E R + / P R + 状態に基づきこれを1つの群とし、E R - / P R - 状態を別の群として分離する。かかる発現の選択および分離において、試験試料を、表1に示す個別マーカーまたはマーカーの組み合わせ（例えばここに示すように：C D 4 4 と C D 2 4 の組み合わせを考慮する）のどちらかの存在について検査する。

【0046】

良いおよび悪い予後 / 転帰の結果は、表1に開示されているように、染色強度の発現をマーカーの位置および染色%と組み合わせで考慮した後に、マーカー状態を理想的に示す。表1Aに示す良い / 悪い転帰のパターンの判定は、前述の例1に開示されたプロセスステップを実施した後の試料における3つの実体、すなわち染色%、染色強度、およびマーカー位置を相関させることによる。留意すべきなのは、浸潤辺縁部におけるマーカーAの有無を評価することが非常に需要であることである。D C I S 病巣を有する腫瘍全体はAの高発現を有するが、浸潤辺縁部では低い発現か発現がない可能性があり、したがって、この側面は、マーカーAについての結果解釈に非常に重要である。

【0047】

上述のプロセスステップを試験試料に行って得られた結果が、良い転帰に対するマーカー発現結果（表1に開示されたもの）と一致すれば、表10（患者病歴）の良い転帰を有する患者についての処置モジュールを参照することができて、したがってかかる患者に対する処置戦略は、少ないフォローアップまたはより攻撃的でない処置戦略が必要であろう。しかし、悪い転帰についてのマーカー発現（表1に開示のように）と一致する試料の結果の場合には、かかる患者は、より攻撃的なフォローアップを戦略的な処置モジュールと共に必要とするか、または、その発現を低減するための、これらのマーカーの組み合わせ（ここではC D 4 4 と C D 2 4 ）に特異的な抗体を開発および投与することを本質的に含み得る、代替的な処置のアプローチを用いるか、これを考慮することが必要である。

【0048】

世界中でさらに認識されているのは、悪い転帰を有する傾向のある、E R + / P R + 患者のサブセットの存在である。我々の上述の結果は、良いおよび悪い転帰を有する可能性のあるE R + / P R + の女性を、C D 4 4 と C D 2 4 の発現に基づいて分離することを可能とする。しかし当業者は上述の結果に基づき、これらの患者を処置する一方法は抗C D 4 4 抗体を処方することであり、それは、C D 4 4 がこれらの患者の細胞膜で高発現されており、長期の疾患なしの生存の希望が持てるからであることを理解できるであろう。一方、悪い転帰を有する可能性のあるE R - / P R - の患者においては、全体的にC D 4 4 の低い発現があり、そのためC D 4 4 に対する抗体はあまり効果がないであろう。それでも、かかる患者を同定し、より標的化された薬物で適切に処置し、頻繁で完全なフォローアップ等を行って、長期の疾患なしの生存を保証することは重要である。類似の戦略を、様々なマーカー発現を有する癌患者の処置に用いることができ、これらのいくつかは以下の表に例示される。

【0049】

さらに留意すべきは、E R / P R 状態にわたる良い転帰は組み合わせられないことである。前述のように、典型的に+ / + の患者は良好な予後のケースと考えられ、したがって攻撃的に処置する必要はない。典型的に+ / + の患者に対するフォローアップは6 ~ 12月に1回実施することができ、これは+ / + の悪い転帰の群に対しては長すぎる。したがって前述の転帰の解釈の場合に、中間再発と呼ばれる2度のフォローアップの中間での癌の再発を低減するより頻繁なフォローアップを、特に+ / + の悪い転帰のケース / 患者に

対して推論することができる。一方 - / - の癌は攻撃的な癌であり、そのため良い転帰の患者は攻撃的に処置する必要はない。一方で悪い転帰の - / - 患者は、より詳細で効果的かつ革新的なフォローアップを受けて転移をできるだけ早くとらえ、処置を開始することができる。

【 0 0 5 0 】

【表 2 - 1】

表 2	患者 番号	抗体 A			抗体 B			抗体 F		
		CD44			CD24			ABCC4		
		細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	20	1-2	M	60 80	1.5 1.5	M C	20	1-2	M
	2	20	2-3	M	10 40	1.5 1.5	M C	30	1.5	M
	3	陰性			55	1.5	C	陰性		
	4	35	2	M	65-70	1.5	C	60 35	各 1.5	C M
	5	5	3	M	85 50	3 2	M C	50	2	M
	6	40	2-3	M	80 20	2-3 1-2	C M	20 20	2 2	M C
	7	40	3	M	35-40 25-30	3 2	C M	20 30	2 2	M C
	8	10	1.5	C	75 35-40	2 1.5	C M	各 50	1-2 1-2	C M
	9	20	3	M	25 15	各 1.5	M C	15 15	1.5	M
ER+/PR+ 悪い転帰	10	20 60	1.5 2	M C	95	1.5	C	50	1.5	C
	11	95	3	M	<10 90	1 1	M C	陰性		
	12	70	3	M	50 70	2-3 1-2	M C	70	2	M
	13	90	2.5	M	95	2.5	C	90 50	3 2	C M
	14	75	1.5	M	95 80	1.5 1.5	C M	80	1.5	M

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	15	60	2.5	M	70	1.5	C	陰性		
	16	80-85	3	M	10 20	1.5 2	C M	陰性		
	17	65-70	3	M	55	1.5	C	40	1.5	C
	18	90	3	M	50 50	1 1	M C	陰性		
ER-/PR- 良い転帰	19	100	2-3	M	70 70	1 1	M C	20	1.5	M
	20	90	3	M	50 70	1-2 3	M C	40-50	1.5	M
	21	80	3	M	60 70	1-2 1	M C	陰性		
	22	40	2.5	M	95 60	1.5 1.5	C M	陰性		
	23	95	3	M	60 90	2-3 2-3	M C	70	2	M
	24	95	3	M	50 20	1.5 1.5	C M	陰性		
	25	90	3	M	陰性			陰性		
	26	95	3	M	10	1.5	M	25	1.5	M
	27	80	3	M	45 35	1.5 1.5	C M	85	3	M
	28	<5	1	M	60-70 40	1-2 1-2	M C	30	1.5	M
	29	75 20	各 3	M C	20	1-2	C	60 20	2 2	M C
ER-/PR- 悪い転帰	30	5	1-2	M	50 90	2-3 2-3	M C	陰性		

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

【表 2 - 3】

	31	30	2.5	M	40	2-3	M	20	1.5	M
		50	2	C	60	2-3	C			
	32	70	1.5	M	95	2.5	C	60	1.5	M
		40	1.5	C	55	1.5	M			
	33	60	2.5	M	95	2	C	80	2.5	M
		40	1.5	C	50	2	M			
	34	45	2.5	M	90	1.5	C	60	各 1.5	C
	35	30	1.5	C	45	1.5	M	35		M
		30	2.5	M		陰性		50	1.5	C
	36	35	3	M	50	2	C	75	各 1.5	C
		15	1-2	C	30	1.5	M	55		M

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

【表 2 A】

ER/PR の状態	転帰	発現レベルおよび位置			可能性のある利用法
		マーカーA	マーカーB	マーカーF	
P/P	良い	M で低発現 65	Cのみで発現の場合、中程度に高い 91.5 MCで発現の場合、CではMより高い M-65 C-108	Mのみで発現の場合、低い 49 MCで発現の場合、CではMより高い M-56 C-72	攻撃性の低いフォローアップ
	悪い	M で高発現 213	Cのみで発現の場合、中程度 142 MCで発現の場合、CではMより高い M-57 C-82	Cのみで発現の場合、低い 67.5 Mのみで発現の場合、中程度 135 MCで発現の場合、CではMより大幅に高い M-100 C-270 ER+良いと比較した場合	より攻撃的な処置
N/N	良い	M で高発現 238	MCで発現の場合、CではMより高い M-82 C-119	Mで中程度の発現 98 または 発現なし	攻撃性の低い処置
	悪い	Mのみで発現の場合、低い 20 MCで発現の場合、MではCより大幅に高い M-131 C-58.5	MCで発現の場合、CではMより大幅に高い M-91 C-148	Mのみで発現の場合、中程度 86 MCで発現の場合、CではMより高い M-85 C-88	よりよいフォローアップの手がかり

10

20

30

【0054】

A / C D 4 4 の発現は、D C I S 辺縁部においてではなく、浸潤辺縁部においてスコア付けされるべきである。

M : 細胞膜

C : 細胞質

N : 核

N M : 核膜

【0055】

表 2 および 2 A の解釈 :

患者試料を、E R + / P R + 状態に基づきこれを 1 つの群とし、E R - / P R - 状態を別の群として分離する。かかる発現の選択および分離において、試験試料は、表 2 に示す個別マーカーまたはマーカーの組み合わせ (例えばここに示すように : C D 4 4 と C D 2 4 の、A B C C 4 との組み合わせを考慮する) のどちらかの存在について検査する。

良いおよび悪い予後 / 転帰の結果は、表 2 に開示されているように、染色強度の発現をマーカーの位置および染色 % と組み合わせで考慮した後に、マーカー状態を理想的に示す。

【0056】

表 2 A に示す良い / 悪い転帰のパターンの判定は、前述の例 1 に開示されたプロセスス

40

50

テップを実施した後の試料における3つの実体、すなわち染色%、染色強度、およびマーカー位置を相関させることによる。留意すべきなのは、浸潤辺縁部におけるマーカーAの有無を評価することが非常に需要であることである。DCIS病巣を有する腫瘍全体はAの高発現を有するが、浸潤辺縁部では低い発現か発現がない可能性があり、したがって、この側面は、マーカーAについての結果解釈に非常に重要である。

【0057】

上述のプロセスステップを試験試料に行って得られた結果が、良い転帰に対するマーカー発現結果(表2に開示されたもの)と一致すれば、表10(患者病歴)の良い転帰を有する患者についての処置モジュールを参照することができて、したがってかかる患者に対する処置戦略は、少ないフォローアップまたはより攻撃的でない処置戦略が必要であろう。しかし、悪い転帰についてのマーカー発現(表2に開示のように)と一致する試料の結果の場合には、かかる患者は、より攻撃的なフォローアップを戦略的な処置モジュールと共に必要とするか、または、その発現を低減するための、これらのマーカーの組み合わせ(ここでは、CD44とCD24をABCC4と組み合わせたもの)に特異的な抗体を開発および投与することを本質的に含み得る、代替的な処置のアプローチを用いるか、これを考慮することが必要である。

10

【0058】

世界中でさらに認識されているのは、悪い転帰を有する傾向のある、ER+/PR+患者のサブセットの存在である。我々の上述の結果は、良いおよび悪い転帰を有する可能性のあるER+/PR+の女性を、CD44とCD24の発現に基づいて分離することを可能とする。しかし当業者は上述の結果に基づき、これらの患者を処置する一方法は抗CD44抗体を処方することであり、それは、CD44がこれらの患者の細胞膜で高発現されており、長期の疾患なしの生存の希望が持てるからであることを理解できるであろう。一方、悪い転帰を有する可能性のあるER-/PR-の患者においては、CD44の全体的な低い発現があり、そのためCD44に対する抗体はあまり効果がないであろう。それでも、かかる患者を同定し、より標的化された薬物で適切に処置し、頻繁で完全なフォローアップ等を行って、長期の疾患なしの生存を保証することは重要である。類似の戦略を、様々なマーカー発現を有する癌患者の処置に用いることができ、これらのいくつかは以下の表に例示される。

20

【0059】

さらに留意すべきは、ER/PR状態にわたる良い転帰は組み合わせられないことである。前述のように、典型的に+/+の患者は良好な予後のケースと考えられ、したがって攻撃的に処置する必要はない。典型的に+/+の患者に対するフォローアップは6~12月に1回実施することができ、これは+/+の悪い転帰の群に対しては長すぎる。したがって前述の転帰の解釈の場合に、中間再発と呼ばれる2度のフォローアップの間での癌の再発を低減するより頻繁なフォローアップを、特に+/+の悪い転帰のケース/患者に対して推論することができる。一方-/ -の癌は攻撃的な癌であり、そのため良い転帰の患者は攻撃的に処置する必要はない。一方で悪い転帰の-/ -患者は、より詳細で効果的かつ革新的なフォローアップを受けて転移をできるだけ早くとらえ、処置を開始することができる。

30

40

【0060】

ABCC4は膜トランスポーターである。細胞はこれを用いて化学療法の薬物を排出し、したがってこのマーカーの発現が高い場合、細胞はCT(化学療法)により抵抗性である。また留意すべきなのは、このトランスポーターの細胞質発現が、細胞が薬物を排出するのを助けることであり、これは患者を処置するときに考慮されるべきである。ABCC4のMまたはM+Cでの高い発現を有する患者は、薬物に対してより抵抗性であり、そのため悪い予後/転帰を有することになり、したがってこれに応じて処置されるべきである。

【0061】

【表 3 - 1】

表 3	患者番号	抗体 I			抗体 J		
		Oct-4			Sox-2		
		細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	90	3	N	20	3	N
	2		陰性			陰性	
	3		陰性			陰性	
	4		陰性		15	2.5	N
	5		陰性		40	3	N
	6		陰性		40	3	N
	7	60	陰性	N		陰性	
	8		陰性			陰性	
	9		陰性			陰性	
ER+/PR+ 悪い転帰	10	70	2-3	N		陰性	
	11	90	3	N		陰性	
	12	70	2-3	N		陰性	
	13	65	1-2	C		陰性	
	14	30	1-2	N		陰性	
	15	75	1-2	N		陰性	
	16	30-35	3	N		陰性	
	17	25-30	1-2	N		陰性	
	18	80	3	N		陰性	
	19	65	1-2	N	25	3	N
	20		陰性			陰性	
	21		陰性		10	3	N
	22		陰性		10	3	N
	23		陰性			陰性	

【表 3 - 2】

ER-/PR- 良い転帰	24	陰性			陰性		
	25	75	1-2	N	陰性		
	26	陰性			80	3	N
	27	15	1-2	N	陰性		
ER-/PR- 悪い転帰	28	80	2.5	N	45	3	N
	29	40	1-2	N	25	3	N
	30	陰性			50	3	N
	31	陰性			陰性		
	32	25	陰性	N	陰性		
	33	20	1-2	N	陰性		
	34	25	2	N	陰性		
	35	20	3	N	10	3	N
	36	55	1-2	N	陰性		

10

20

30

40

【表 3 A】

ER/PR の状態	転帰	発現レベルおよび位置		可能性のある利用法
		マーカー I	マーカー J	
P/P	良い	発現なし	Nで中程度の発現 84 または 発現なし	攻撃性の低いフォローアップ
	悪い	Nで中程度の発現 118	発現なし	より攻撃的な処置
N/N	良い	Nで低発現 78 または 発現なし	Nで中程度の発現 93 または 発現なし	攻撃性の低い処置
	悪い	Nで低発現 76	Nで中程度の発現 98 または 発現なし	よりよいフォローアップの手がかり

10

20

M：細胞膜

C：細胞質

N：核

NM：核膜

【0064】

表 3 および 3 A の解釈：

患者試料を、ER + / PR + 状態に基づきこれを 1 つの群とし、ER - / PR - 状態を別の群として分離する。かかる発現の選択および分離において、試験試料は、表 3 に示す個別マーカーまたはマーカーの組み合わせ（例えばここに示すように：O c t - 4 と S o x - 2 の組み合わせを考慮する）のどちらかの存在について検査する。

30

良いおよび悪い予後 / 転帰の結果は、表 3 に開示されているように、染色強度の発現をマーカーの位置および染色 % と組み合わせ考慮した後に、マーカー状態を理想的に示す。

表 3 A に示す良い / 悪い転帰のパターンの判定は、前述の例 1 に開示されたプロセスステップを実施した後の試料における 3 つの実体、すなわち染色 %、染色強度、およびマーカー位置を相関させることによる。

【0065】

上述のプロセスステップを試験試料に行って得られた結果が、良い転帰に対するマーカー発現結果（表 3 に開示されたもの）と一致すれば、表 10（患者病歴）の良い転帰を有する患者についての処置モジュールを参照することができて、したがってかかる患者に対する処置戦略は、少ないフォローアップまたはより攻撃的でない処置戦略が必要であろう。しかし、悪い転帰についてのマーカー発現（表 3 に開示のように）と一致する試料の結果の場合には、かかる患者は、より攻撃的なフォローアップを戦略的な処置モジュールと共に必要とするか、または、その発現を低減するための、これらのマーカーの組み合わせ（ここでは、O c t - 4 と S o x - 2）に特異的な抗体を開発および投与することを本質的に含み得る、代替的な処置のアプローチを用いるかこれを考慮することが必要である。

40

【0066】

さらに留意すべきは、ER / PR 状態にわたる良い転帰は組み合わせられないことである。前述のように、典型的に + / + の患者は良好な予後のケースと考えられ、したがって攻撃的に処置する必要はない。典型的に + / + の患者に対するフォローアップは 6 ~ 1 2

50

月に 1 回実施することができ、これは + / + の悪い転帰の群に対しては長すぎる。したがって前述の転帰の解釈の場合に、中間再発と呼ばれる 2 度のフォローアップの間での癌の再発を低減するより頻繁なフォローアップを、特に + / + の悪い転帰のケース / 患者に対して推論することができる。一方 - / - の癌は攻撃的な癌であり、そのため良い転帰の患者は攻撃的に処置する必要はない。一方で悪い転帰の - / - 患者は、より詳細で効果的かつ革新的なフォローアップを受けて転移をできるだけ早くとらえ、処置を開始することができる。

【 0 0 6 7 】

【表 4 - 1】

表 4	患者番号	抗体 K			抗体 0		
		APC			B カテニン		
		細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	60 80 30	2 3 3	M C N	35-40 45	各 1-2	N M
	2	70	2	C	15 10	1-2 2	M N
	3	85 50	3 2	C M	陰性		
	4	85 70	2 2-3	C NM	20	1.5	M
	5	60 90	2 2.5	M C	-		
	6	10 90	1-2 3	M C	陰性		
	7	80 30	3 2-3	C M	10	2	N
	8	90 50	3 3	C N	陰性		
	9	75 30	2 1-2	M C	35	1.5	M
	10	80 50	3 2-3	C NM	50	1.5	C
	11	65 85 65	2 2.5 2.5	M C NM	80	2	M
	12	60 80	2 2	M C	50 25-30	2 1-2	C M
	13	90	3	C	-		
ER+/PR+ 悪い転帰							

【表 4 - 2】

	14	70 60	3 2-3	C M	20	1.5	M
	15	90 50	2-3 2	C M		-	
	16	70 60	1-2 2	C N		-	
	17	50	1-2	C	40	2	M
	18	80 50	2.5 2.5	C NM	65	3	M
	19	30 60	2 1-2	M C	75	1-2	M
	20	70 90	2-3 2-3	M C	60	1-2	M
	21	50 70	2 1.5	M C	20	1-2	M
	22	60 60	3 2	C M	50	1.5	C
	23	90 80	3 2.5	C M	75	1-2	M
	24	85 75	3 2-3	C M		-	
	25	85 30	3 2	C M		-	
	26	80	1-2	C		陰性	
	27	70 70	2 2	C M	60	3	M
	28	80 55	2-3 1.5	M C	50	1-2	M
	29	40 40	1.5 2	C M	60	2	M

10

20

30

40

【表 4 - 3】

	30	90 40 65	2-3 2 2.5	C M NM	60	1-2	M
	31	95 60	3 2-3	C M	60	1-2	M
	32	80 70 50	3 2-3 2-3	C M NM	75	2	M
	33	90 85	3 2	C M	80 40	各 1.5	C M
	34	95 60	3 2	C M	-		
	35	30	1-2	C	-		
	36	90	2	C	陰性		

【表 4 A】

ER/PR の状態	転帰	発現レベルおよび位置		可能性のある利用法
		マーカーK	マーカーO	
P/P	良い	MCで発現の場合、CではMより大幅に高い M-86 C-225 Nでも種々のレベルの発現が見られる	Mのみで発現の場合、低い 41 NとMで発現の場合、MとNでほぼ同等の発現 M-45 N-43	攻撃性の低いフォローアップ
	悪い	Cのみで発現の場合、中程度 140 MCで発現の場合、CではMより高い M-114 C-200 C-NMで発現の場合、CではNMより高い NM-138 C-246	Mで中程度の発現 102 Cでの発現も見られる	より攻撃的な処置
N/N	良い	MCで発現の場合、CではMより高い M-116 C-152	Mのみで中程度の発現 104	攻撃性の低い処置
	悪い	MCで発現の場合、CではMより高い M-130 C-150 Cのみで発現の場合、中程度 108 C、MおよびNMで発現の場合、Cで最大、続いてNMとM M-110 NM-145 C-238	Mのみで中程度の発現 104	よりよいフォローアップの手がかり

10

20

30

40

【 0 0 7 1 】

M : 細胞膜

C : 細胞質

N : 核

50

N M : 核膜

【 0 0 7 2 】

表 4 および 4 A の解釈 :

患者試料を、E R + / P R + 状態に基づきこれを 1 つの群とし、E R - / P R - 状態を別の群として分離する。かかる発現の選択および分離において、試験試料は、表 4 に示す個別マーカーまたはマーカーの組み合わせ (例えばここに示すように : A P C と B カテニンの組み合わせを考慮する) のどちらかの存在について検査する。

良いおよび悪い予後 / 転帰の結果は、表 4 に開示されているように、染色強度の発現をマーカーの位置および染色 % と組み合わせで考慮した後に、マーカー状態を理想的に示す。

表 4 A に示す良い / 悪い転帰のパターンの判定は、前述の例 1 に開示されたプロセスステップを実施した後の試料における 3 つの実体、すなわち染色 %、染色強度、およびマーカー位置を相関させることによる。

【 0 0 7 3 】

上述のプロセスステップを試験試料に行って得られた結果が、良い転帰に対するマーカー発現結果 (表 4 に開示されたもの) と一致すれば、表 1 0 (患者病歴) の良い転帰を有する患者についての処置モジュールを参照することができて、したがってかかる患者に対する処置戦略は、少ないフォローアップまたはより攻撃的でない処置戦略が必要であろう。しかし、悪い転帰についてのマーカー発現 (表 4 に開示のように) と一致する試料の結果の場合には、かかる患者は、より攻撃的なフォローアップを戦略的な処置モジュールと共に必要とするか、または、その発現を低減するための、これらのマーカーの組み合わせ (ここでは、A P C と B カテニン) に特異的な抗体を開発および投与することを本質的に含み得る、代替的な処置のアプローチを用いるかこれを考慮することが必要である。

【 0 0 7 4 】

さらに留意すべきは、E R / P R 状態にわたる良い転帰は組み合わせられないことである。前述のように、典型的に + / + の患者は良好な予後のケースと考えられ、したがって攻撃的に処置する必要はない。典型的に + / + の患者に対するフォローアップは 6 ~ 1 2 月に 1 回実施することができ、これは + / + の悪い転帰の群に対しては長すぎる。したがって前述の転帰の解釈の場合に、中間再発と呼ばれる 2 度のフォローアップの中間での癌の再発を低減するより頻繁なフォローアップを、特に + / + の悪い転帰のケース / 患者に対して推論することができる。一方 - / - の癌は攻撃的な癌であり、そのため良い転帰の患者は攻撃的に処置する必要はない。一方で悪い転帰の - / - 患者は、より詳細で効果的かつ革新的なフォローアップを受けて転移をできるだけ早くとらえ、処置を開始することができる。

【 0 0 7 5 】

10

20

30

【表 5 - 1】

表 5	患者番号	抗体 G		
		CD133		
		細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	60	2.5	N
		30	1.5	M
	2	50	1.5	C
	3	90	各 1.5	C
		20		M
	4	30-35	2	M
		50	1.5	C
	5	70	2	M
		50	2	C
ER+/PR+ 悪い転帰	6	50	2	M
		60	2	C
	7	40	2	M
		70	2-3	C
	8	45	1-2	C
	9	65	2	M
	10	80	1.5	C
	11	60	1-2	C
	12	25	2	M
		80	2	C
	13	80	2	C
	14	90	2	M
		30	1.5	C
	15	70	各 1.5	M
		30		C
	16	15	各 1.5	M
		35		C
	17	30	1.5	M

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

【表 5 - 2】

	18	陰性		
ER-/PR- 良い転帰 ER-/PR-	19	陰性		
	20	70	2	M
		60	2	C
	21	25	1-2	M
	22	65	各 1.5	C
		65		M
	23	55	2	M
		75	2	C
	24	60	2	M
		25	1-2	C
ER-/PR- 悪い転帰 ER-/PR-	25	60	1.5	C
		40	1.5	M
	26	20	1.5	M
	27	55	各 1.5	C
		45		M
	28	60	1-2	M
		30	1-2	C
	29	20	2	M
		20	2	C
	30	50	各 1.5	M
ER-/PR- 悪い転帰 ER-/PR-		50		C
	31	55	各 1.5	C
		10		M
	32	70	2	M
		45	1.5	C
	33	80	各 2	C
		75		M
	34	65	2	C
	35	40	2	C
		20	3	N
	36	50	2	C

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

【表 6 - 1】

表 6	患者番号	抗体 L P カドヘリン		
		細胞 %	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	20	2-3	M
	2		陰性	
	3		陰性	
	4	20	2	M
	5		陰性	
	6		陰性	
	7	50	3	M
	8	10	3	M
	9	40	3	M
ER+/PR+ 悪い転帰	10	20	3	M
	11	80	3	M
	12	20	3	M
	13		陰性	
	14		陰性	
	15	90	3	M
	16	30	2.5	M
	17	45	2.5	M
	18	90-100	3	M
ER-/PR- 良い転帰	19	50	3	M
	20	55	3	M
	21	50	3	M

【表 6 - 2】

ER-/PR-	22	80	3	M
	23	70	2	M
	24	70	3	M
	25	65-70	3	M
	26	陰性		
	27	80	3	M
ER-/PR- 悪い転帰 ER-/PR-	28	80	3	M
	29	15-20	3	M
	30	15	3	M
	31	陰性		
	32	20	3	M
	33	75	3	M
	34	<5	3	M
	35	45	2.5	M
	36	陰性		

【表 6 A】

ER/PR の状態	転帰	発現レベルおよび位置	可能性のある利用法
		マーカー L	
P/P	良い	Mで中程度の発現 84	攻撃性の低いフォローアップ
	悪い	Mで高発現 162	より攻撃的な処置
N/N	良い	Mで高発現 195	攻撃性の低い処置
	悪い	Mで中程度の発現 111	よりよいフォローアップの手がかり

10

20

30

40

50

M：細胞膜

C：細胞質

N：核

NM：核膜

【0080】

表 6 および 6 A の解釈：

患者試料を、ER + / PR + 状態に基づきこれを 1 つの群とし、ER - / PR - 状態を別の群として分離する。かかる発現の選択および分離において、試験試料は、表 6 に示す個別マーカーまたはマーカーの組み合わせ（例えばここに示すように：P カドヘリンのみを考慮する）のどちらかの存在について検査する。

良いおよび悪い予後 / 転帰の結果は、表 6 に開示されているように、染色強度の発現をマーカーの位置および染色 % と組み合わせで考慮した後に、マーカー状態を理想的に示す。

【0081】

表 6 A に示す良い / 悪い転帰のパターンの判定は、前述の例 1 に開示されたプロセスステップを実施した後の試料における 3 つの実体、すなわち染色 %、染色強度、およびマーカー位置を相関させることによる。

上述のプロセスステップを試験試料に行って得られた結果が、良い転帰に対するマーカー発現結果（表 6 に開示されたもの）と一致すれば、表 10（患者病歴）の良い転帰を有する患者についての処置モジュールを参照することができて、したがってかかる患者に対する処置戦略は、少ないフォローアップまたはより攻撃的でない処置戦略が必要であろう。しかし、悪い転帰についてのマーカー発現（表 6 に開示のように）と一致する試料の結果の場合には、かかる患者は、より攻撃的なフォローアップを戦略的な処置モジュールと共に必要とするか、または、その発現を低減するための、これらのマーカーの組み合わせ（ここでは、P カドヘリンのみ）に特異的な抗体を開発および投与することを本質的に含み得る、代替的な処置のアプローチを用いるかこれを考慮することが必要である。

【0082】

世界中でさらに認識されているのは、悪い転帰を有する傾向のある、ER + / PR + 患者のサブセットの存在である。我々の上述の結果は、良いおよび悪い転帰を有する可能性のある ER + / PR + の女性を、P カドヘリンの発現に基づいて分離することを可能とする。しかし当業者は上述の結果に基づき、これらの患者を処置する一方法は抗 P カドヘリン抗体を処方することであり、それは、P カドヘリンがこれらの患者の細胞膜で高発現されており、長期の疾患なしの生存の希望が持てるからであることを理解できるであろう。

一方、悪い転帰を有する可能性のある E R - / P R - の患者においては、Pカドヘリンの全体的な低い発現があり、そのためPカドヘリンに対する抗体はあまり効果がないであろう。それでも、かかる患者を同定し、より標的化された薬物で適切に処置し、頻繁で完全なフォローアップ等を行って、長期の疾患なしの生存を保証することは重要である。類似の戦略を、様々なマーカー発現を有する癌患者の処置に用いることができ、これらのいくつかは以下の表に例示される。

【 0 0 8 3 】

さらに留意すべきは、E R / P R 状態にわたる良い転帰は組み合わせられないことである。前述のように、典型的に + / + の患者は良好な予後のケースと考えられ、したがって攻撃的に処置する必要はない。典型的に + / + の患者に対するフォローアップは6 ~ 12月に1回実施することができ、これは + / + の悪い転帰の群に対しては長すぎる。したがって前述の転帰の解釈の場合に、中間再発と呼ばれる2度のフォローアップの間での癌の再発を低減するより頻繁なフォローアップを、特に + / + の悪い転帰のケース / 患者に対して推論することができる。一方 - / - の癌は攻撃的な癌であり、そのため良い転帰の患者は攻撃的に処置する必要はない。一方で悪い転帰の - / - 患者は、より詳細で効果的かつ革新的なフォローアップを受けて転移をできるだけ早くとらえ、処置を開始することができる。

【 0 0 8 4 】

【表 7 - 1】

表 7	患者番号	抗体 A			抗体 B			抗体 I			抗体 J		
		CD44			CD24			Oct-4			Sox-2		
		細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置	細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	20	1-2	M	60	1.5	M	90	3	N	20	3	N
	2	20	2-3	M	10	1.5	M		陰性			陰性	
	3		陰性		55	1.5	C		陰性		<5%	2-3	N
	4	35	2	M	65-70	1.5	C		陰性		15	2.5	N
	5	5	3	M	85	3	M		陰性		40	3	N
	6	40	2-3	M	80	2-3	C		陰性		40	3	N
	7	40	3	M	35-40	3	C	60	陰性	N		陰性	
	8	10	1.5	C	75	2	C		陰性			陰性	
	9	20	3	M	25	各 1.5	M		陰性			陰性	
	10	20	1.5	M	95	1.5	C	70	2-3	N		陰性	
ER+/PR+ 悪い転帰	11	95	3	M	<10	1	M	90	3	N		陰性	
	12	70	3	M	50	2-3	M	70	2-3	N	5	3	N

【表 7 - 2】

13	90	2.5	M	95	2.5	C	65	1-2	C	陰性
14	75	1.5	M	95 80	1.5 1.5	C M	30	1-2	N	陰性
15	60	2.5	M	70	1.5	C	75	1-2	N	陰性
16	80- 85	3	M	10 20	1.5 2	C M	30-35	3	N	陰性
17	65- 70	3	M	55	1.5	C	25-30	1-2	N	陰性
18	90	3	M	50 50	1 1	M C	80	3	N	陰性
19	100	2-3	M	70 70	1 1	M C	65	1-2	N	25 3 N
20	90	3	M	50 70	1-2 3	M C	陰性	陰性	陰性	陰性
21	80	3	M	60 70	1-2 1	M C	10	陰性	3	N
22	40	2.5	M	95 60	1.5 1.5	C M	10	陰性	3	N
23	95	3	M	60 90	2-3 2-3	M C	陰性	陰性	陰性	陰性
24	95	3	M	50 20	1.5 1.5	C M	<5	陰性	2-3	N
25	90	3	M	陰性	陰性	75	1-2	N	陰性	陰性
26	95	3	M	10	1.5	M	80	陰性	3	N
27	80	3	M	45 35	1.5 1.5	C M	15	1-2	N	陰性
28	<5	1	M	60-70 40	1-2 1-2	M C	80	2.5	N	3 N
29	75 20	各 3	M C	20	1-2	C	40	1-2	N	3 N

【表 7 - 3】

悪い転帰	30	5	1-2	M	50 90	2-3 2-3	M C	陰性			50	3	N
	31	30 50	2.5 2	M C	40 60	2-3 2-3	M C	陰性					
		70 40	1.5 1.5	M C	95 55	2.5 1.5	C M	25	1-2	N	陰性	<5%	-
	33	60 40	2.5 1.5	M C	95 50	2 2	C M	1-2			陰性		
		45 30	2.5 1.5	M C	90 45	1.5 1.5	C M	25	2	N	陰性		
	35	30	2.5	M		陰性		20	3	N	10	3	N
		35 15	3 1-2	M C	50 30	2 1.5	C M	55	1-2	N	陰性		
	36												

10

20

30

40

【表 7 A - 1】

ER/PR 状態	転帰	発現レベルおよび位置				可能性のある 利用法
		マーカーA	マーカーB	マーカーI	マーカーJ	
P/P	良い	Mで低発現 65	Cのみで発現の 場合、中程度に 高い 91.5 MCで発現の場 合、CではMよ り高い M-65 C-108	発現なし	Nで中程度の 発現 84 または 発現なし	攻撃性の低いフオ ローアップ
		Mで高発現 213	Cのみで発現の 場合、中程度 142 MCで発現の場 合、CではMよ り高い M-57 C-82	Nで中程度の発 現 118	発現なし	
N/N	良い	Mで高発現 238	MCで発現の場 合、CではMよ り高い M-82 C-119	Nで低発現 78 または 発現なし	Nで中程度の 発現 93 または 発現なし	攻撃性の低い処置
		Mのみで発現の 場合、低い 20 MCで発現の場 合、MではCよ り大幅に高い M-131 C-58.5	MCで発現の場 合、CではMよ り大幅に高い M-91 C-148	Nで低発現 76	Nで中程度の 発現 98 または 発現なし	
	悪い					よりよいフオロー アップの手がかり

10

20

30

40

【0088】

A / C D 4 4 の発現は、D C I S 辺縁部においてではなく、浸潤辺縁部においてスコア付けされるべきである。

M : 細胞膜

C : 細胞質

N : 核

N M : 核膜

【0089】

表 7 および 7 A の解釈 :

50

患者試料を、E R + / P R + 状態に基づきこれを1つの群とし、E R - / P R - 状態を別の群として分離する。かかる発現の選択および分離において、試験試料は、表7に示す個別マーカーまたはマーカーの組み合わせ（例えばここに示すように：C D 4 4 と、C D 2 4、O c t - 4、およびS o x - 2の組み合わせを考慮する）のどちらかの存在について検査する。

良いおよび悪い予後／転帰の結果は、表7に開示されているように、染色強度の発現をマーカーの位置および染色%と組み合わせで考慮した後に、マーカー状態を理想的に示す。

【0090】

表7Aに示す良い／悪い転帰のパターンの判定は、前述の例1に開示されたプロセスステップを実施した後の試料における3つの実体、すなわち染色%、染色強度、およびマーカー位置を相関させることによる。留意すべきなのは、浸潤辺縁部におけるマーカーAの有無を評価することが非常に需要であることである。D C I S 病巣を有する腫瘍全体はAの高発現を有するが、浸潤辺縁部では低い発現か発現がない可能性があり、したがって、この側面は、マーカーAについての結果解釈に非常に重要である。

【0091】

上述のプロセスステップを試験試料に行って得られた結果が、良い転帰に対するマーカー発現結果（表7に開示されたもの）と一致すれば、表10（患者病歴）の良い転帰を有する患者についての処置モジュールを参照することができて、したがってかかる患者に対する処置戦略は、少ないフォローアップまたはより攻撃的でない処置戦略が必要であろう。しかし、悪い転帰についてのマーカー発現（表7に開示のように）と一致する試料の結果の場合には、かかる患者は、より攻撃的なフォローアップを戦略的な処置モジュールと共に必要とするか、または、その発現を低減するための、これらのマーカーの組み合わせ（ここでは、C D 4 4 と、C D 2 4、O c t - 4、およびS o x - 2の組み合わせ）に特異的な抗体を開発および投与することを本質的に含み得る、代替的な処置のアプローチを用いるかこれを考慮することが必要である。

【0092】

世界中でさらに認識されているのは、悪い転帰を有する傾向のある、E R + / P R + 患者のサブセットの存在である。我々の上述の結果は、良いおよび悪い転帰を有する可能性のあるE R + / P R + の女性を、C D 4 4 とC D 2 4 の発現に基づいて分離することを可能とする。しかし当業者は上述の結果に基づき、これらの患者を処置する一方法は抗C D 4 4 抗体を処方することであり、それは、C D 4 4 がこれらの患者の細胞膜で高発現されており、長期の疾患なしの生存の希望が持てるからであることを理解できるであろう。一方、悪い転帰を有する可能性のあるE R - / P R - の患者においては、C D 4 4 の全体的な低い発現があり、そのためC D 4 4 に対する抗体はあまり効果がないであろう。それでも、かかる患者を同定し、より標的化された薬物で適切に処置し、頻繁で完全なフォローアップ等を行って、長期の疾患なしの生存を保証することは重要である。類似の戦略を、様々なマーカー発現を有する癌患者の処置に用いることができ、これらのいくつかは以下の表に例示される。

【0093】

さらに留意すべきは、E R / P R 状態にわたる良い転帰は組み合わせられないことである。前述のように、典型的に+ / + の患者は良好な予後のケースと考えられ、したがって攻撃的に処置する必要はない。典型的に+ / + の患者に対するフォローアップは6 ~ 12月に1回実施することができ、これは+ / + の悪い転帰の群に対しては長すぎる。したがって前述の転帰の解釈の場合に、中間再発と呼ばれる2度のフォローアップの間での癌の再発を低減するより頻繁なフォローアップを、特に+ / + の悪い転帰のケース／患者に対して推論することができる。一方- / - の癌は攻撃的な癌であり、そのため良い転帰の患者は攻撃的に処置する必要はない。一方で悪い転帰の- / - 患者は、より詳細で効果的かつ革新的なフォローアップを受けて転移をできるだけ早くとらえ、処置を開始することができる。

【 0 0 9 4 】

【 表 8 - 1 】

表 8	患者番号	抗体 C		
		ABCG2		
		細胞 %	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	95	3	N
	2	30	1.5	M
	3	75	3	N
	4	95	1.5	C
	5	35	1.5	M
	6	90	2.5	C
	7	35	1.5	M
	8	50	2	M
	9	80	2	C
ER+/PR+ 悪い転帰	10	<5	2	M
	11	80	2-3	C
	12	90	3	N
	13	60	3	C
	14	90	3	N
	15	70	2	C
	16	10	1-2	M
	17	45	3	N
	18	35	2	M
ER+/PR+ 悪い転帰	19	95	各 1.5	C
	20	45	各 1.5	N
	21	80	2	C
	22	90	3	N
	23	20	1.5	M
	24	50	1.5	C
	25	40	2.5	N
	26	90	2.5	C
	27	90	1.5	C
悪い転帰	28	70	1.5	M
	29	95	各 1.5	N
	30	95	各 1.5	C
悪い転帰	31	20	各 1.5	M
	32	30	3	N
	33	30	3	N

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

【表 8 - 2】

	17	60	2	C
	18	80	3	N
		50	1.2	C
		80	3	N
	19	80	3	Nu
	20	40	2	M
		80	2-3	C
		75	3	Nu
	21	65	2.5	N
		40	1.5	C
		30	2	M
	22	75	1.5	N
		90	1.5	C
		65	1.5	M
	23	30	2	M
		65	3	C
	24	85	1.5	C
		50	1.5	M
	25	75	2.5	N
		80	1.5	C
		20	1.5	M
	26	45	2	N
		95	2	C
	27	20	2	N
		20	2	M
	28	50	各 1.5	N
		65		C
		20		M
	29	40	2-3	C
		20	3	Nu
	30	70	2	C

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

【表 8 - 3】

	31	70	2.5	C
		10	2	M
	32	30	各 2	N
		60		M
		40		C
	33	95	1.5	C
		10	1	M
	34	75	1.5	C
	35	80	2	C
		30	3	N
	36	85	2	C
		40	2	N

【 0 0 9 7 】

10

20

30

40

【表 9 - 1】

表 9	患者番号	抗体 E		
		ESA		
		細胞%	強度	位置
ER+/PR+ 良い転帰	1	90	3	M
	2	90	3	M
	3	95	3	M
	4	95	3	M
	5	90	3	M
	6	95	3	M
	7	95	3	M
	8	-	-	-
	9	45	3	M
ER+/PR+ 悪い転帰	10	95	3	M
	11	95	3	M
	12	75	3	M
	13	95	3	M
	14	95	3	M
	15	95	3	M
	16	90	3	M
	17	55	3	M
	18	100	3	M
ER-/PR- 良い転帰 ER-/PR-	19	85-90	3	M
	20	95	3	M
	21	90	3	M
	22	95	3	M
	23	90	3	M
	24	95	3	M
	25	95	3	M
	26	85	3	M
	27	35	3	M
ER-/PR-	28	100	3	M
	29	50	3	M

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

【表 9 - 2】

悪い転帰 ER-/PR-	30	85	3	M
	31	90	3	M
	32	95	3	M
	33	95	3	M
	34	95 70	3 1.5	M C
	35	75	3	M
	36	90	3	M

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

【表 10 - 1】

表 10: 患者病歴	患者番号	年齢	ステージ	グレード	ER/PR/Her2	MRM/CT/RT	患者の状態
ER+/PR+ 良い転帰	1	54, 閉経後	IDC-2, 小病巣 DCIS, L Br	T2N2M0, pT2NaM2	P/P/P	11/03: MRM; 12/03-04/04: CT-FAC x6; 04/04: RT; 10/04 Tamx, 腰痛の訴え Nov 04 4 分円切除術, BCT /RT/CT- FAC, TAM 20γ HS; 2007-正常, TAM を3年間; Dec 2009-正常, 5年使用後 TAMを中止; 2011-全て正常	転移なしで 生存;
	2	26	IDC-2, L Br	T2N0M0 (ステージ- 2a)	P/P/N		生存, 癌なしの 確率大
	3	44, 閉経前.	IDC-3 リ ンパ管塞 栓 & 神経 周囲浸潤; R Br	T2N1M0, pT2N3M0 (ステージ- 3a)	20%P/20%P	既往歴: 糖尿病(DM), 甲状腺機能低下, 高血圧(HT), 腹腔鏡下(Lap)胆嚢 切除術; 01/04 Trucut 生検, 骨のスキヤ ン-正常, MRM; 02-06/04 CT-FEC x6; 04/04 RT; 07/09 エクステンデッド アジュバントホルモン療法; 06/10 Anastrozole を6年間 L-Mammo: 一部 しこりが存在, 介入を勧めず; 08/11: R-Mammo -正常, Zolodronic acid 注射.	転移なしで 生存;
	4	48	IDC-2; L Br	pT2N0M0	P/P/P	08/2005MRM; 08-12/2005 に Adj CT- FEC x6; 12/2005 Tamx 20mg/d 開始, 5年間; 12/2005-01/2006 RT 45 Gy/25#	生存

【表 10 - 2】

	5	55, 閉経後	IDC, L Br	T2N2M0	P/P	12/02:左乳房 Exi.生検, MRM, 骨のスクリーン-正常; 01-06/03:高リスク CT-AC x6; 03-05/03: RT; 06/03 Tamx 開始; 03/09: 息切れ, 体重増加なし, R Br, L MRM - 正常, PET-CT スキャンを勧める	6 年間転移なしで生存
	6	54, 閉経後	IDC-3, R Br	T2N0M0, pT2N0	P/P	右乳房にしこり 2 週間, MRM 05/03; 06-08/03 CT-AC x4; Tamoxifen 全 7 年間 & anastrozole 5 年間; 10/06 全て正常; 09/08 全て正常; 07/09 肝臓に脂肪変化, 02/11 左乳房正常; 12/11 BMD-骨粗しょう症, 左右乳房正常, 01/10 から 12/11 Zoledromide	転移なしで生存
	7	52/54, 閉経後	IDC, L Br	多巣性 T1N1M0	P/P	'99 右乳房腫瘍摘出術, 2001 に再度, これは正常であった, 術後 CT/RT; TAM を処方するが中止, Tab Anastrozole を開始; 母親は癌だった; 05/04/08 胆嚢切除術	転移なしで生存, '91, '00 に右乳房(所見は正常), 母親は癌だった
	8	62	IDC-3	T2N0	P/P	K/乳癌の訴え; 03/2005 L-MRM; Adj CT-Taxol x4; Shalcal 処方; Stazonex, Zolasta 注射; 2005 から anastrozole ect 錠剤および通常のフォローアップ; 07/2011 最後のフォローアップ; 次の予定 07/2012.	生存、良好、転移なし
	9	40	IDC-III; R Br	T2N1MX	N/P30%/P	6 か月間右乳房にしこり; 08/2005 R-MRM; 09-12/2005 Adj CT-TACx6, 01-02/2006 Adj RT 50.4 Gy/28#s; 2006-2009 Tamx; 02/2009 Aromasin に変更; 04/2011 最後のフォローアップ全て正常.	全て正常

【表 1 0 - 3】

ER+/PR+ 悪い転帰	10	41, 閉経前.	ILC, R Br	T2N0M0	P/P	04/03 右乳房にしこりの訴え(6 か月間), 既往歴: 甲状腺機能低下, Trucut 生検, 04/2003 MRM, 骨のスキューン-正常, 04-06/2003 CT-AC x6; RT; 09/2007 局所再発右胸壁&右胸壁病変部広く存在, 11/07-02/2008 CT-FECx6; 03/08 過去 4 年間ホルモン処方なし, Anastrozole を勧める; Anastrozole を摂らず; 05 2010 フォローアップ左右乳房正常&現在 Anastrozole; 05/2011 乳房正常, U/S 正常 Anastrozole を継続; 全て正常; 09/11 心臓チェックアップ-正常, 左首に疼痛, 臨床的に結節は同定されず, 断層撮影, TSH, FT4 - 全て正常, Thyroxene 補充について内分泌医を受診するよう勧める	転移ありで生存; 4 年以内に局所再発, defaulted on CT
ER+/PR+ 悪い転帰	11	54, 閉経後	IDC-3, R Br	T2N0M0	P/P	既往歴: 甲状腺機能低下, 最少でも 1 日 1 回 15 日間嘔吐(03/01), 胃炎の甲状腺機能亢進の訴え; 06/04 MRM (右乳房), 術後緑色の尿, 家族歴なし; CT-FACx6 (07-10/04); 06/08 てんかん発作の訴え, 脳 CT, 抗痙攣薬を投与, RT 06/08, 緩和 WBRT 30Gy/10# 2 週間を完了; 2x CT-Gem+Cis (11 & 30/07/08); 乳癌(ステージ 4)+ 頭蓋内転移, ホルモン療法へ, 処置を拒否; 緩和 RT & CT-Gem+Cis を 29/08/08 に完了; 感覚	診断/06/04 MRM, 骨&脳転移, 4 年で死亡 09/08

10

20

30

40

【表 10 - 4】

					の変化、発熱、嘔吐、腕の色が青みがる、FFP 2 単位+ 2 回赤血球輸血、18/09/08 自宅での緩和ケアのために退院	
12	43, 閉経後	ILC, R Br	T2N2M0	P/P	04/04: 乳房にしこり; 05/04: MRM; 05-09/04: CT-FAC x6 09-11/04: RT 50.4Gy/18#; 09/04: Tamx 開始; 02/05: 疼痛と共に戻る、Novolox; 10/05 骨 のスキヤン- 複数の転移、RT を勧め る; 06/06: 骨、肝臓、肺転移; 03/07: CT- Gem+Cis x6; 06/07: RT 30Gy/10#; 09/07: 頭蓋内 CT-Methotrexate; 09/07: 死亡	3.5 年で死亡。 1-2 年以内に骨、 肺、肝臓転移
13	58, 閉経後	ILC; L Br	-	P/80%P	02/02 重い腰痛の訴え、Op. 椎弓切除、 surg. D9 脊椎、乳房にしこり発見; 乳 房の Trucut 生検、診断: ILC と複数骨 転移、脊椎病変部の RT 記録、pan-CK 陽性; 02/02 CT- Dexona; 06/06 Letrozole、右肩疼痛と腰痛の訴え、緩 和 RT 記録 20Gy/5#/1 週間	転移および死 亡; 骨転移を有 して来院、4 年 以内に転移再発 の可能性あり?
14	66	IDC-3; R Br	T2N1M0 (L Br)	80%P/N/100%P	既往歴: 子宮摘出('87)、高血圧、 甲状腺機能低下; 02/03: しこり、 MRM+BCS, RT; 04-09/03 Herceptin & Xeloda、局所再発 T 結節 ++ が再建乳 房全体に; 06/03 結節が退縮、RT; 10/03 左乳房- 正常、皮膚は健常 Herceptin 週 3 回投与; 12/03 右乳房 気づく、FNAC 陽性; 01/04 局所再 発、FAC 記録、Tamx, Letrozole、緩 和 Gemcitabine 開始; 02/04 転移腺癌	転移および死 亡; CT, RT, ホル モン療法にかか わらず進行性、 1 年未満で局所 再発

10

20

30

40

【表 10 - 5】

ER+/PR+ 悪い転帰	15	61	IDC-3, R Br	pT3N2aMx	P/5%P/P	進行性疾患の訴え, 緩和 CT x6 の記録, CT の計画-5FU+Levoflex/毎週; 04/04 緩和 MRM (R) + Exi. 左側結節, Toilet Mast (R); 09/04 対症療法のみ, 首と胸壁に激しい疼痛の訴え, 意識喪失, 局所再発疾患による眩暈, 脳 CT を勧める	3 年以内に左 胸、5 年以内に 脳に再発; 死亡 の可能性大.
	16	48	IDC3; L Br	T2N2aM0	P/P/N	09/03 右乳房 TCB; 09/03 R MRM; 09/03-11/03 CT-FECx3; 11/03-01/04 RT 50.4Gy; 11/03-01/04 CT-FECx3; 05/04 正常フォローアップ; 2007 左乳房再 発; 2007 L-MRM; -/+の攻撃的疾患; 03/09 骨転移; 現在転移性の進行性疾 患; Dr Patil によれば 2009 の転移性疾 患により死亡の可能性大	局所疾患再発を 有して生存
	17	58	ILC-2A; R Br	pT2N0Mx	P/P/N	08/2000 L MRM w ax. Clearance; 08- 10/2000 Adj CT-ACx3; Defaulted on CT; 2003 に局所性進行性疾患; 04/2006 乳房胸壁軟組織に IDC の再 発; RT 50.4+10 Gy/30#; Defaulted on CT; 12/2009 胸壁再発; 12/2009 から 04/2010 まで CT-FECx6; Lterozole 2.5 mg を 3 か月; 通常のフォローアップ ブ; 最終 10/2011	転移性疾患/死 亡
	18	55	IDC-3; L Br	T2N1	P/P(20%)N	05/2005 腫瘍摘出術; 06-09/2005 Neo adj CT-FACx6; 11/2005 右乳房の組織 内近接照射療法??/; 02/2006 フォロー アップ正常	転移および死亡
						02/2005 MRM	

【表 10 - 6】

ER-/PR- 良い転帰	19	49, 閉経後	IDC-3, L Br, 高い有 糸分裂ケ ース、塞 栓または 浸潤なし だが壊死 あり	T2N0M0	N/N	03/03 腫瘍摘出術, 腫瘍摘出試料を 取る, 04/03MRM	MRM から9年 間生存
	20	62, 閉経後	IDC-3, L Br	T4N0Mx	N/N	Mammo, Trucut (01/01/04), 6 & 7/01/04 しこり, MRM(左乳房); CT-FACx6 (17/01-10/05/04), RT 50.4Gy/28# (02/06-08/07/04); 08/06-寛解; 08/07-尿 路感染 (UTI), 嘔吐, 発熱の訴え, CT スキャン, Mammo を勧める; 10/07- Avastin 注射; 04/08 右乳房正常; 07/09 -腰痛, 骨スキャン-転移なし; 01/12- MRM から8年, 右乳房に疼痛なし, Mammo を勧める.	MRM (左乳房) から8年, 現在 右乳房に疼痛の 訴え
	21	49, 閉経前.	IDC, R Br	T2N2M0	N/N	08/03: 右乳房にしこり(1.5 か月), MRM; 09-12/03 CT-FEC x6; 10/03 RT 50.4GY/26# 02/06: 全て正常; 11/06: 事 故, 右肩に打撲傷	生存&転移なし
	22	61,	IDC-3 と DCIS 病 巣; R Br	pT2N1Mx	N/N	10/08 フォローアップ左乳房, 右 MRM - 正常	転移なしで生存
	23	51, 閉経前.	IDC-3, R Br	T2N1M0, pT3N2M0	N/N/N	91, '00: 左のしこりに FNAC, 右乳房 の FNAC-陰性(それぞれ); 既往歴:卵 管切除; 08/03:胸にしこり(2年), 月経 中のみに痛みの訴え, MRM (R);	転移を有して生 存; 1 回目の FNAC を'91, 次 に'00, MRM を

【表 10 - 7】

						08/03-01/04 CT-FEC x6; 12/03 RT; 04/04 乳房癌性結節の再発-exi 生検; 06/08 MRM から5年, 全て正常; 06/09: 骨のスキャン-正常; 06/11: 複 数の首の結節-転移癌; 07/11: Local RT, Capecitabine 開始; 09/11: CT, 1 週 間おいて Capecitabine 開始; 12/11: Capecitabine を5サイクル; 01/12: ---?	03, 1 年で局所 再発、8 年で再 発
24	43	IDC-3 + DCIS, L Br	T2N1M0	N/N		02/2003 L-MRM; 03-05/2003 Adj CT- ACx4 ; 07/2003 Adj RT 50.4Gy/28 # + Boost RT 14Gy/7#; 08-09/2003 CT- Pacli x4; 08/2008 肝臓転移; 転移あ り、生存	転移あり、生 存、調 査
25	47	IDC-3	pT2N0M0	N/N/P		06/2001 左乳房手術 & B/L 卵巣摘出; 07-09/2001 Adj CT-ECx4; 10/2001 Adj RT 50.4+10 Gy/33#s; 2002-2004 Tamx & フローアープ全て正常; 06/2005 局所再発; 08/2005 L-MRM; 09- 12/2005 Adj CT-Docx6; 01-02/2006 Adj RT 50.4Gy/28#; 11/2008 フロー アープ正常; 05/2011 フローアープ 正常	局所転移あり、 生存
26	57	IDC; 髄様 癌; R Br	T2N0M0; ス テージ 2A	N/N/N		02/2006 R-MRM; 03-05/2006 Adj CT- ACx4; 05-08/2006 Adj CT-Paclix12; 08- 10/2006 Adj RT を R 胸壁 50.4Gy/28#; 2007-2009 通常のフローアープ, 全 て正常, 痛みを伴う腕の腫れのマイ ナーな訴え; 05/2010 左乳房に局所再 発;	良好
27	35	IDC-III; L	T2N1M0; ス	N/N/P		01/2006 に L BC 手術; 02-05/2006 Adj	良好
ER-/PR-							

【表 10 - 8】

良い転帰			Br	ページ 2B		CT-TACx6; 05-08/2006 Adj CT Pacli+ Herceptin x12;	
ER-/PR- 悪い転帰	28	68, 閉経後	IDC-3, R Br	T3N1M0	N/N	06/03: 右乳房にしこり(3週間), MRM, 骨のスキーン-骨転移の可能性あり; 06/03-01/04: CT-AC x6; 06/04 転移, 顔 面麻痺(R), 激しい衰弱の訴えなし; 10/04 の他の神経に関する病訴なし; 10/04 左肩に激しい疼痛, 骨のスキーン-複 数の骨転移, 緩和 CT-Taxane と RT を 勧める	転移および死 亡; 1年以内に 骨転移
	29	50	R Br	T4bN1M1	-	06/2000: 肺転移を有する乳癌の診断, ヒドロコルチゾン(Hyd), 01-04/03 緩和 CT-FAC; 04/03: 右乳房-しこりのサ イズ減少; 11/03 嘔吐, 頭痛, 見当識障 害の訴え->脳転移, 緩和 RT を施す	3年以内に脳転 移、死亡
	30	42, 閉経前.	IDC-3, R Br	T2N1M0	N/N	08/03 MRM, adj CT-FEC x1/ FEC x6; RT 受ける; 06/05 頭痛の既往; 22 か月 で脳に再発, 06/05 開頭術実施	MRM の 1.8 年 以内に脳転移; 死亡
	31	55, 閉経後	IDC-2, R Br	T4N2M0	N/N/P	Neo CT-AC x1/ RT+Tamoxifen x4/ MRM-3c/ Her2+ & Xeloda x1; 10 か月 内に左乳房と 骨に転移/ CT- Herceptin + Vinorelbine	転移および死 亡; 10 か月内 に左乳房、骨
	32	38, 閉経前.	ILC+IDC- 3+DCIS; L Br		N/N/	02/03 FNAC, しこり, MRM; 02-08/03 CT-AC x6; 03/03 RT 50.4GY/28#; 02/04 - 全て正常; 07/05 嘔吐, 頭痛, 左 顔面疼痛, Dexona, Hydrocort を勧め る; 10/05 脱力感, やや蒼白, 骨髄穿刺 & Bx-転移癌, CT-Docetaxel/週を勧め る; 06/06 右乳房 FNAC - IDC, 小さな	転移および死 亡; 骨 (3 年) および続いて脳 転移 (4 年)

【表 10 - 10】

ER-/PR- 悪い転帰	35	60	IDC-3b,	T4N2M1; IV	TBD	06/2004 来診時右乳房にしこり+骨& 脳転移; 06-08/2004 Neo-adj CT- Dose+epirubicin x3;08/2004 進行性疾 患のため、サルベージ CT Gemcitabine+Vinorelbine に変更; 01- 03/2005 T しこり増大, CT を緩和 CT- TACx4 に変更; 高血圧(HT)も有する, 17.8.2005 患者死亡	複数の CT; 転 移性腺癌、死亡
	36	44	IDC-3; R Br	TxN1M1	N/N/P2+	08/2005B/L しこり切除; 11/2005 R- MRM; 11/05-02/06 Adj CT-FECx6; 03- 05/2006 RT 50.4/28#; 12/2006 脳転移 &頭蓋骨切除実施; 01/2007 脳に RT 45Gy/25#s; 02/2007 咳、右/左肺転 移の訴え; 注射による CT を望まず、 そのため経口 CT を勧める	転移および死亡

10

20

30

40

【提出日】平成25年6月21日(2013.6.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳癌の予後診断のための、以下の組み合わせ：

- a) CD44、ABCC4、Pカドヘリン、および カテニンからなる生物学的マーカー；または
- b) CD44、ABCG2、CD133およびPカドヘリン、および任意にOct-4からなる生物学的マーカー；または
- c) CD44、ABCG2およびCD133からなる生物学的マーカー；または
- d) CD44、CD133およびPカドヘリンからなる生物学的マーカー。

【請求項2】

CD44、ABCC4、Pカドヘリン、および カテニンからなる生物学的マーカーの組み合わせが、エストロゲン受容体またはプロゲステロン受容体またはその両方を発現する細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項3】

CD44、ABCG2、CD133およびPカドヘリン、および任意にOct-4からなる生物学的マーカーの組み合わせが、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現しない細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項4】

CD44、ABCG2、およびCD133からなる生物学的マーカーの組み合わせが、ヒト上皮細胞成長因子受容体2、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現しない細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項5】

CD44、CD133およびPカドヘリンからなる生物学的マーカーの組み合わせが、ヒト上皮細胞成長因子受容体2を発現し、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現しない細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項6】

マーカーが、細胞膜、細胞質、核、および核膜またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される位置における、対象の腫瘍細胞上に位置する、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項7】

乳癌を有するかまたは乳癌を有することが疑われる対象の予後診断のためのキットであって、以下の組み合わせ：

- a) CD44、ABCC4、Pカドヘリン、および カテニンからなる生物学的マーカー；または
 - b) CD44、ABCG2、CD133およびPカドヘリン、および任意にOct-4からなる生物学的マーカー；または
 - c) CD44、ABCG2、およびCD133からなる生物学的マーカー；または
 - d) CD44、CD133およびPカドヘリンからなる生物学的マーカー、
- に対する抗体を、任意に、有機溶媒、試薬、二次抗体、免疫組織化学の実施用の酵素、および取扱説明書と共に含む、前記キット。

【請求項8】

乳癌を有するかまたは有することが疑われる対象の生物学的試料中の細胞上の生物学的マーカーを同定する方法であって、以下の行為：

a) 生物学的試料を、収集し、固定し、切片化し、有機溶媒を用いて処理すること、次いで、所定の試料希釈液を用いて、以下の組み合わせ：

i. CD44、ABCC4、Pカドヘリン、および カテニンからなる生物学的マーカー；または

ii. CD44、ABCG2、CD133およびPカドヘリン、および任意にOct-4からなる生物学的マーカー；または

iii. CD44、ABCG2、およびCD133からなる生物学的マーカー；または

iv. CD44、CD133およびPカドヘリンからなる生物学的マーカー、

に対する一次抗体を加えることにより、抗原回復すること；および

b) 生物学的マーカーを同定するために、酵素と結合した二次抗体および着色反応物または蛍光を得るための試薬を加えること、

を含む、前記方法。

【請求項9】

有機溶媒が、アルコールおよびキシレンまたはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される、請求項7に記載のキットまたは請求項8に記載の方法。

【請求項10】

CD44、ABCC4、Pカドヘリン、および カテニンからなる生物学的マーカーの組み合わせが、エストロゲン受容体またはプロゲステロン受容体またはその両方を発現する細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項7に記載のキットまたは請求項8に記載の方法。

【請求項11】

CD44、ABCG2、CD133およびPカドヘリン、および任意にOct-4からなる生物学的マーカーの組み合わせが、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現しない細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項7に記載のキットまたは請求項8に記載の方法。

【請求項12】

CD44、ABCG2、およびCD133からなる生物学的マーカーの組み合わせが、ヒト上皮細胞成長因子受容体2、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現しない細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項7に記載のキットまたは請求項8に記載の方法。

【請求項13】

CD44、CD133およびPカドヘリンからなる生物学的マーカーの組み合わせが、ヒト上皮細胞成長因子受容体2を発現し、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現しない細胞を有する対象における、乳癌の予後を診断する、請求項7に記載のキットまたは請求項8に記載の方法。

【請求項14】

収集、固定、切片化および処理を、所定の条件下で従来の免疫組織化学的技術により実施する、請求項8に記載の方法。

【請求項15】

乳癌を有するかまたは乳癌を有することが疑われる対象の予後診断のためのキットであって、

a) CD44、ABCC4、Pカドヘリン、 カテニン、ABCG2およびCD133、および任意にOct-4からなる群から選択される少なくとも3つの生物学的マーカーの組み合わせに対する抗体；および

b) 任意に、有機溶媒、試薬、二次抗体、免疫組織化学の実施用の酵素、および取扱説明書を含む、前記キット。

【請求項16】

乳癌を有するかまたは乳癌を有することが疑われる対象の予後診断の方法であって、以

下の行為：

a) 対象から生物学的試料を収集し、試料の細胞における、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびヒト上皮細胞成長因子受容体 2 受容体またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される受容体の、発現または不在を同定して、発現が同定された細胞を得ること；

b) ステップ (a) の細胞上で、CD44、ABCG2、ABCC4、CD133、Oct-4、Pカドヘリンおよびカテニンからなる群から選択される生物学的マーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学分析を実施すること；および

c) 試料の細胞における受容体および生物学的マーカーの発現または不在を同定し、該マーカーの同定を、以下にそれぞれ示す予測転帰参照表 No. 11、12、13、14、15 および 16 に基づく対応する転帰と関連させて、対象の予後を予測すること；

【表 11】

マーカー	ER+/PR+	ER-/PR-	結果
CD44	YES	-	<u>良い転帰</u> CD44 の膜での低発現
	YES	-	<u>悪い転帰</u> CD44 の膜での高発現 または 単に細胞質/核での発現
CD44	-	YES	<u>良い転帰</u> CD44 の膜での高発現
	-	YES	<u>悪い転帰</u> CD44 の膜での低発現 または 単に細胞質/核での発現

【表 12】

マーカー	ER+/PR+	ER-/PR-	結果
ABCG2	-	YES	<u>良い転帰</u> ABCG2 の核での高発現
	-	YES	<u>悪い転帰</u> ABCG2 の核での低発現

【表 1 3】

マーカー	ER+/PR+	ER-/PR-	結果
ABCC4	YES	-	<u>良い転帰</u> ABCC4の膜での低発現
	YES	-	<u>悪い転帰</u> ABCC4の膜での高発現

【表 1 4】

マーカー	ER+/PR+	ER-/PR-	結果
CD133	-	YES	<u>良い転帰 (HER2 陰性)</u> CD133の膜での低発現
	-	YES	<u>悪い転帰 (HER2 陰性)</u> CD133の膜での高発現
CD133	-	YES	<u>良い転帰 (HER2 陽性)</u> CD133の膜での高発現
	-	YES	<u>悪い転帰 (HER2 陽性)</u> CD133の膜での低発現

【表 1 5】

マーカー	ER+/PR+	ER-/PR-	結果
Pカドヘリン	YES	-	<u>良い転帰</u> Pカドヘリンの膜での低発現
	YES	-	<u>悪い転帰</u> Pカドヘリンの膜での高発現
Pカドヘリン	-	YES	<u>良い転帰</u> Pカドヘリンの膜での高発現
	-	YES	<u>悪い転帰</u> Pカドヘリンの膜での低発現

【表 16】

マーカー	ER+/PR+	ER-/PR-	結果
β カテニン	YES	-	<u>良い転帰</u> β カテニンの膜での低発現
	YES	-	<u>悪い転帰</u> β カテニンの膜での高発現

表中、低発現は、0～40%の間の細胞染色強度パーセントを、および高発現は、40%を超えて100%までの細胞染色強度パーセントを表す、を含む、前記方法。

【請求項 17】

乳癌を有するかまたは乳癌を有することが疑われる対象の予後診断の方法であって、以下の行為：

a) 対象から生物学的試料を収集し、試料の細胞における、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびヒト上皮細胞成長因子受容体2受容体またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される受容体の、発現または不在を同定して、発現が同定された細胞を得ること；

b) ステップ (a) の細胞上で、以下の組み合わせ：

i. CD44、ABCC4、Pカドヘリン、および カテニンからなる生物学的マーカー；または

ii. CD44、ABCG2、CD133およびPカドヘリン、および任意にOct-4からなる生物学的マーカー；または

iii. CD44、ABCG2、およびCD133からなる生物学的マーカー；または

iv. CD44、CD133およびPカドヘリンからなる生物学的マーカー、

に対する抗体を用いて、免疫組織化学分析を実施すること；および

c) 試料の細胞における受容体および生物学的マーカーの発現または不在を同定し、該マーカーの同定を、予測転帰参照表No. 11、12、13、14、15および16の組合せに基づく対応する転帰と関連させて、対象の予後を予測すること、を含む、前記方法。

【請求項 18】

免疫組織化学分析が従来法により実施され、マーカーの同定が、試料からの細胞の染色によって該方法の完了時に得られる着色反応物または蛍光を視覚化することにより行われる、請求項 16または17に記載の方法。

【請求項 19】

関連させることが、染色のパーセント、染色強度および染色位置またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択されるパラメータに基づき；および、前記染色の位置が、細胞膜、細胞質、核および核膜またはこれらの任意の組み合わせを含む群から選択される、請求項 16または17に記載の方法。

【請求項 20】

関連させることが、染色のパーセントを染色強度に乗じて予測スコアを算出することを含むか、または、関連させることが、染色された細胞のパーセントに基づいて実施され、こうして生物学的マーカーの発現の位置に応じて予後が良いか悪いかを予測する、請求項 16または17に記載の方法。

【請求項 21】

乳癌を処置する方法であって、以下の行為：

a) 生物学的試料中の腫瘍細胞上の生物学的マーカーの組み合わせを同定し、乳癌を有するかまたは乳癌を有することが疑われる対象の予後を予測すること；および

b) この予測に基づき、乳癌の抑制のための癌治療を設計すること；

ここで、生物学的マーカーの組み合わせは：

i . C D 4 4、A B C C 4、Pカドヘリン、および カテニン；または

i i . C D 4 4、A B C G 2、C D 1 3 3 および Pカドヘリン、および任意に O c t - 4
；または

i i i . C D 4 4、A B C G 2、および C D 1 3 3 ；または

i v . C D 4 4、C D 1 3 3、および Pカドヘリン、である、
を含む、前記方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2012/051427		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/574 (OCT 2005) C12N 5/095 (JAN 2010)				
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)				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPODOC, Medline, Heapplus and Biosis: CD44, CD24, ABCG2, ESA, ABCC4, CD133, OCT-4, SOX-2, APC, beta-catenin, P-cadherin, cancer stem cell, diagnose, biomarker, breast cancer and other like terms				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
	Documents are listed in the continuation of Box C			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 19 July 2012		Date of mailing of the international search report 20 July 2012		
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999		Authorized officer Esther Ng AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262833129		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/IB2012/051427
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, Q. et al., 'Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas', Chinese Medical Journal, 2009, vol. 122, no. 22, pages 2763-2769 Abstract, Pages 2764, 2765 and 2768 and Tables 1, 2 and 3	1-15
X	HONETH, G. et al., 'The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors', Breast Cancer Research, 2008, vol. 10, R53 Abstract, Introduction, Pages 2 and 3 and Tables 1 and 2	1-15
X	SNYDER, E.L. et al., 'Identification of CD44v6+/CD24- breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies', Laboratory Investigation, 2009, vol. 89, pages 857-866 Abstract, Pages 858 and 859	1-15
X	HWANG-VERSLUES, W.W. et al., 'Multiple Lineages of Human Breast Cancer Stem/Progenitor Cells Identified by Profiling with Stem Cell Markers', Plos One, 2009, vol. 4, e8377 Pages 2 and 9, Table 1 and Figure 5	1-15
X	WO 2008/042236 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 10 April 2008 Paragraphs [004], [013], [081], [092]-[095], [0102], [0180], [0229]	1-15
P,X	WO 2011/113047 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 15 September 2011 Abstract, Pages 4, 5, 36, 38 and 40	1-15

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/IB2012/051427	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2008/042236 A2	10 Apr 2008	AU 2007305443 A1	10 Apr 2008
		CA 2664738 A1	10 Apr 2008
		CN 101583624 A	18 Nov 2009
		CO 6180466 A2	19 Jul 2010
		CR 10667 A	25 May 2009
		EA 200970335 A1	30 Oct 2009
		EP 2066694 A2	10 Jun 2009
		JP 2010504755 A	18 Feb 2010
		KR 20090078334 A	17 Jul 2009
		MA 30808 B1	01 Oct 2009
		MX 2009003229 A	18 Jun 2009
		NO 20091635 A	26 Jun 2009
		NZ 576404 A	24 Feb 2012
		US 2008187532 A1	07 Aug 2008
		US 7750124 B2	06 Jul 2010
		US 2010316637 A1	16 Dec 2010
		WO 2008042236 A2	10 Apr 2008
		ZA 200901615 A	27 Jan 2010
WO 2011/113047 A2	15 Sep 2011	WO 2011113047 A2	15 Sep 2011
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</p>			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 15/00	
		G 0 1 N 33/574	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, RS, 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, DO, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 バクレ, マンジャリ

インド共和国、カルナータカ州 5 6 0 0 3 7、バンガルール県、ドダッネクンディー、クターリング ロード、ファーンズ シティ、ファースト フロア、# 3 1 8

F ターム(参考) 4B029 AA07 BB11 BB17 CC02 CC08 FA04 GB06
 4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33 QX01
 4C084 AA17 NA20 ZA81 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 CA41 DA75 DA86 EA51
 FA71 GA01