

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5256038号

(P5256038)

(45) 発行日 平成25年8月7日(2013.8.7)

(24) 登録日 平成25年4月26日(2013.4.26)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 33/48 P

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 Y

GO 1 N 33/574 (2006.01)

GO 1 N 33/574 Z

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 102 頁)

(21) 出願番号 特願2008-536150 (P2008-536150)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月28日 (2006.9.28)
 (65) 公表番号 特表2009-515148 (P2009-515148A)
 (43) 公表日 平成21年4月9日 (2009.4.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2006/003168
 (87) 国際公開番号 W02007/045996
 (87) 国際公開日 平成19年4月26日 (2007.4.26)
 審査請求日 平成21年9月9日 (2009.9.9)
 (31) 優先権主張番号 05292200.2
 (32) 優先日 平成17年10月19日 (2005.10.19)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 60/764,356
 (32) 優先日 平成18年2月2日 (2006.2.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508122068
 アンセルム (アンスティチュ ナシオナ
 ル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ル
 シェルシュ メディカル)
 フランス国 エフー75013 パリ リ
 ュ ドゥ トルビアック 101
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100146422
 弁理士 田中 聖
 (74) 代理人 100147533
 弁理士 岡崎 祐一
 (74) 代理人 100116919
 弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌を患う患者の生存時間の予後のためのデータを提供するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の工程

a) マーカーが、CD 3⁺細胞及びCD 4 5 RO⁺細胞であり、CD 3⁺細胞及びCD 4 5 RO⁺細胞の細胞密度の、患者からの腫瘍の二つの別の領域、(i) 腫瘍の中心 (CT) および (i i) 腫瘍の浸潤性周辺部 (IM) それぞれから採取した腫瘍組織サンプル中で定量を行うこと、

b) 下記の比較工程：

(i) CTにおけるマーカーのそれぞれについて工程 a) で得られた定量値を該マーカーについて所定の CT 参照値と比較すること、

(i i) IMにおけるマーカーのそれぞれについて工程 a) で得られた定量値を該マーカーについて所定の IM 参照値と比較すること、

を行うこと、

を含む、癌を患う患者の生存時間の予後のためのデータを提供するための方法であって、所定の参照値が、生存時間と相関している、方法。

【請求項 2】

下記の工程

a) マーカーが、CD 8⁺細胞及びCD 4 5 RO⁺細胞であり、CD 8⁺細胞及びCD 4 5 RO⁺細胞の細胞密度の、患者からの腫瘍の二つの別の領域、(i) 腫瘍の中心 (CT) および (i i) 腫瘍の浸潤性周辺部 (IM) それぞれから採取した腫瘍組織サンプル

10

20

中で定量を行うこと、

b)下記の比較工程：

(i) C Tにおけるマーカーのそれぞれについて工程 a) で得られた定量値を該マーカーについて所定の C T 参照値と比較すること、

(i i) I Mにおけるマーカーのそれぞれについて工程 a) で得られた定量値を該マーカーについて所定の I M 参照値と比較すること、

を行うこと、

を含む、癌を患う患者の生存時間の予後のためのデータを提供するための方法であって、所定の参照値が、生存時間と相関している、方法。

【請求項 3】

下記の工程

a)マーカーが、C D 3⁺細胞、C D 8⁺細胞、C D 4 5 R O⁺細胞及び G Z M B⁺細胞からなる群より選択された少なくとも三つであり、該少なくとも三つの細胞の細胞密度の、患者からの腫瘍の二つの別の領域、(i) 腫瘍の中心 (C T) および (i i) 腫瘍の浸潤性周辺部 (I M) それぞれから採取した腫瘍組織サンプル中で定量を行うこと、

b)下記の比較工程：

(i) C Tにおけるマーカーのそれぞれについて工程 a) で得られた定量値を該マーカーについて所定の C T 参照値と比較すること、

(i i) I Mにおけるマーカーのそれぞれについて工程 a) で得られた定量値を該マーカーについて所定の I M 参照値と比較すること、

を行うこと、

を含む、癌を患う患者の生存時間の予後のためのデータを提供するための方法であって、所定の参照値が、生存時間と相関している、方法。

【請求項 4】

該マーカーの定量が、免疫検出によって工程 a) で行われる、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の癌の転帰の予後診断の分野に関する。

さらに正確には、本発明は、患者の癌の転帰の予後診断に関し、この予後診断は、上記患者の上記癌に対する適応的免疫応答の存在またはレベルを標示する 1 種または数種の生物学的マーカーを定量することに基づく。

【背景技術】

【0002】

癌は、とりわけヨーロッパおよび米国における第 2 の主要死亡原因であるので、莫大な量の努力と財源が、新規な治療方法を開発するのに注ぎ込まれている。しかしながら、信頼し得る診断および予後診断手段の必要性は、癌治療の成功的利用においては律速段階である。このことは、現在知られている癌マーカーの殆どが信頼性に乏しいという事実が最もよく示している。

今日まで、悪性腫瘍は、一般に、TNMシステムによって分類されている。TNM (“腫瘍・結節・転移(Tumor-Node-Metastasis)” に対しての使用)分類システムは、腫瘍の大きさ、局所リンパ節内の腫瘍の存在または不存在、および遠隔転移の存在または不存在を使用して腫瘍に対する病期を決定している(AJCC Cancer Staging Manual, Lippincott, 5th edition, pp. 171-180, 1997)。決定した病期を、適切な療法の選定および予後診断目的の根拠として使用する。結腸直腸癌の病期決定において使用する場合、TNMシステムは、(T) T0～T4範囲の腸壁の浸潤度、(N) N0～N3範囲のリンパ節関与度および(M) M0～M1範囲の転移度間の区別を可能にする。

結腸直腸癌においては、病期は、デュークス分類によっても腫瘍に対して決定し得る。

デュークス分類は、少なくとも4つの主たる腫瘍病期、(A)腸壁に限られた腫瘍、(B)腸壁を越えて拡大した腫瘍、(C)局所結節の関与および(D)遠隔転移の発生それぞれ間の区別を可能にする。

しかしながら、上記の臨床分類は、有用ではあるものの、完全ではなく、癌の転帰の信頼し得る予後診断を可能としない。このことは、広範囲の重篤度を有するデュークス分類Bと判定した癌に対してとりわけ当てはまる。

【0003】

通常の臨床病期決定の代りに、当該技術においては、広範囲の癌の診断または予後診断において潜在的に有用である、遺伝子およびタンパク質のような数多くの生物学的マーカーが提供されている。とりわけ、結腸直腸癌の診断または予後診断におけるような癌の診断または予後診断手段として潜在的に有用である遺伝子発現パターンを得る種々の方法が開示されている。

これに関連して、種々の従来技術の研究は、(i)宿主免疫応答の各種生物学的マーカーの存在または発現レベルと(ii)癌の発症および癌発症の病期との相関を、主として腫瘍組織が免疫応答から逃避することの基礎をなすメカニズムを判読する見地により、最終的には適切な抗癌免疫療法戦略を提案する見地により証明することを目的としていた。

例えば、Nistico等(1999, Int. J. Cancer, Vol. 84 : 598-603)は、その有効性が腫瘍内(IT)または腫瘍周辺(PT)組織内での腫瘍HLAクラスI分子発現およびCD3+(T)リンパ球局在化に依存し得る、HLA-A2陽性乳癌患者のerbB-2腫瘍遺伝子産生物に対する自然発生免疫応答の存在を示唆している。これらの著者によれば、これらの結果は、乳癌に対するより特異的でより有効な免疫療法戦略を明確にするのに有用であり得る新たなパラメーターの同定に至り得ていた。

Philips等(2004, British Journal of Surgery, Vol. 91 : 469-475)は、マイクロサテライト不安定性を有する結腸直腸癌の腫瘍浸潤性リンパ球が活性化され、細胞毒性であることを、(i) CD8/CD3 mRNA比および(ii) CD3、CD4、CD8、IL-2R α およびグランザイムBタンパク質産生の双方を腫瘍組織中でアッセイすることにより証明したが、T細胞マーカーmRNAのコピー数と免疫組織化学点数間に有意な相関はなかった。これらの著者は、マイクロサテライト不安定性を有する結腸直腸癌においては、抗腫瘍免疫応答を誘発する免疫原性変異体化ペプチドが産生され得ることを示唆し、上記の癌モデルは、宿主腫瘍相互作用を、とりわけ免疫療法戦略を改良する点で理解する助けとなると結論付けている。

【0004】

Maki等(2004, J. Gastroenterology and Hepatology, Vol. 19 : 1348-1356)は、T細胞によるCD3 ζ およびCD28タンパク質発現の減少並びにCD28ダウン調節T細胞のカスパーゼ-3活性の上昇によって評価した肝細胞癌腫担持患者における細胞免疫系の障害を証明し、HCC患者におけるT細胞アポトーシスの発生を示唆している。これらの著者によれば、そのようなT細胞を活性化させることとする抗腫瘍免疫療法の新しい方式を確立させて、これらのT細胞をアポトーシスから防ぎ得るとしている。また、T細胞浸潤性頸癌におけるCD3 ζ 発現減少は、Grujil等によって報告されている(1999, British Journal of Cancer, Vol. 79(7/8) : 1127-1132)。これらの著者は、ワクチン接種戦略が成功裏であるためには、CD3 ζ のこの喪失に至るメカニズムを先ず同定し、妨げることが本質的であると示唆している。

また、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)に対するCD3、CD4、CD8およびFasリガンドの発現の評価による宿主免疫応答障害も口腔癌患者において証明されている(Reichert et al. (2002, Clinical Cancer

Research, Vol. 8 : 3137-3145)。同様な観察は、Prado-Garcia等によってもなされており(2005, Lung Cancer, Vol. 47 : 361-371)、彼らは、末梢血および胸水中のCD3+、CD4+およびCD8+細胞の割合、さらには、CD8+T細胞サブセット中でのCD27、CD28、CD45RO、CD45RA、グランザイムA、Fasおよびパーフォリンタンパク質発現を測定した肺腺癌の回避メ

10

20

30

40

50

カニズムを試験した。これらの著者は、免疫応答の阻害を見出しており、さらなる研究が、腺癌細胞が肺癌の初期、増殖および浸潤プロセスにおけるCD8+T細胞を抑制する種々のメカニズムを理解するには、肺悪性腫瘍の改良された治療法を開発する見地でもって必要であることを示唆している。

【0005】

同様な観察は、Kuss等によってもなされており(2003, British Journal of Cancer, Vol. 88 : 223-230)、彼らは、扁平上皮細胞癌担持患者における機能不全TcRシグナル伝達経路と関連するCD8+CD45RO-CD27-エフェクターT細胞サブセット増殖を測定している。これらの著者は、上記観察されたシグナル伝達欠陥をアポトーシスおよび癌患者における急速なリンパ球回転率と関連付けする上記仮説を直接確認するさらなる研究を提案している。

10

また、Valmori等(2002, Cancer Research, Vol. 62 : 1743-1750)は、CD45RA+CCR7-CD8+ PBL T細胞サブセットの存在が黒色腫患者において細胞溶解活性を有することを見出している。これらの著者は、改良された抗腫瘍ワクチン接種は、そのようなエフェクター免疫応答を、疾病過程の早期において、そのような応答が有効である時点で賦活化し且つ維持して最小の残留疾患を根絶させ、再発を予防すべきであると示唆している。

上記に関連する従来の研究は、各種癌に対する免疫応答メカニズムを理解する途中での免疫応答の多くの生物学的マーカーの使用を開示している。しかしながら、これら従来の研究は、(i)これら生物学的マーカーの存在または発現レベルと(ii)疾患の転帰の予後診断との統計的に有意な関係に関するデータを提示していない。

20

【0006】

他の研究は、宿主からの免疫応答の生物学的マーカーの発現と種々の癌の転帰との統計的相関を立証するデータを提示している。

例えば、Ishigami等(2002, Cancer, Vol. 94 (5) : 1437-1442)は、CD3-ζ発現の減少は、胃癌のリンパ節関与、浸潤の深さおよび臨床病期と負に相関していたことを証明している。とりわけ、これらの著者は、CD3-ζ発現の減少が、胃癌の“病期IV”と診断された患者のみを除いて、患者の5年生存率の低下と相関していることを証明している。

Oshokiri等(2003, Journal of Surgical Oncology, Vol. 84 : 224-228)は、CD8+T細胞による癌細胞巣の浸潤と肝外胆管癌(EBDC)に侵されている患者の生存率との間の統計的関連を証明している。これらの著者は、腫瘍内CD8+T細胞免疫反応性が、(i)低めのリンパ節転移、(ii)静脈および神経周囲浸潤の減少および(iii)より良好なpTNM病期値と有意の相関を示すことを実証している。従って、これらの著者は、CD8+T細胞浸潤レベルが通常のpTNM臨床病理法と良好に相関していることおよび上記生物学的マーカーはEBDC患者の生存を予測するのに信頼し得るものであることを証明している。

30

また、Diederischen等(2003, Cancer Immunol. Immunother., Vol. 52 : 423-428)は、TIL中で低CD4+/CD8+比を有する結腸直腸患者が、デュークス病期および年齢にかかわらず、有意に高い5年生存率でもって良好な臨床経過を有することを証明している。

40

さらに、Zhang等(2003, New England Journal of Medicine, Vol. 348(3) : 203-213)は、CDに対して免疫染色することにより、腫瘍内T細胞の存在または不存在が減量およびアジュバント化学療法後の進行性卵巣癌の臨床転帰と相関していることを証明している。これらの結果は、腫瘍凍結切片のCD3、CD4、CD8、CD83、CD45、CD45RO、CD19、CD57およびCD11cに対するモノクローナル抗体による免疫染色アッセイにより、さらにまた、HLADR、CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD45、IgG1およびIgG2aに対するモノクローナル抗体を使用しての新鮮腫瘍サンプルからの細胞のフローサイトメトリーにより得られている。これらの著者は、腫瘍島細胞内および腫瘍周辺ストローマ内のCD3+腫瘍浸潤性T細胞の存在または不存在を検出している。こ

50

これらの著者は、腫瘍がT細胞を含有する患者が、腫瘍がT細胞を含有していない患者よりも統計的に高い(i)無進行生存期間および(ii)全生存期間双方の中央値を有していたことを見出している。これらの著者は、卵巢癌患者の分類および治療における細胞内T細胞検出の使用をさらに検証することを提案している。

【0007】

上記で報告した従来技術の研究は、(i)免疫応答のある種の生物学的マーカーの存在または量と(ii)癌の転帰間の良好な相関を開示しているものの、これら従来技術の研究の殆どの結果は、上記生物学的マーカーの使用を、専ら、通常の臨床病理病期決定法による癌病期決定の確認或いは上記通常の癌病期決定法への追加情報とみなしていることを示している。例えば、Ishigami等(2002年、前出)が使用した生物学的マーカーは、疾病の“病期IV”として既に診断された胃癌担持患者において専ら使用可能であることが判明している。同様に、Zhang等(2003年、前出)は、前向き研究が、卵巢癌患者の分類および治療における腫瘍内(CD3+)T細胞の検出を検証するために必要であると結論付けている。同様に、Diederichsen等(2003年、前出)は、CD4+/CD8+比を、結腸直腸癌における生存予後診断価値を有する生物学的マーカーとして開示している。しかしながら、これらの著者は、上記の生物学的マーカーが、通常の臨床病理病期決定法によってもたらされた同時の病期決定データなしで、それ自体で癌予後診断において十分であり得るとは示唆していない。

Oshikiri等(2003年、前出)のみは、彼らが使用した生物学的マーカー、即ち、CD8+T細胞による癌細胞巢の浸潤は、とりわけこのマーカーがpTNM病期決定値と良好に相関したことから、EBDC患者の長期生存の信頼し得るマーカーとなるであろうとみなしている。しかしながら、Oshikiri等は、上記生物学的マーカーを、通常の臨床病理病期決定法による従来の癌病期決定の確認として使用しているだけである。さらに、Oshikiri等(2003年)に見出された(a)腫瘍内CD8+T細胞数と(b) (i)低めのリンパ節転移($P=0.005$)、(ii)静脈浸潤の低下($P=0.0021$)、(iii)神経周囲浸潤の減少($P=0.0083$)および(iv)より良好なpTNM病期値($P=0.0356$)のような各種臨床パラメーターとの統計相関値は、この生物学的マーカーを、通常の臨床病理病期決定データの同時使用なしで、正確且つ信頼し得る癌予後診断において使用するように当業者に示唆するには、客観的にあまりにも低過ぎる。

【0008】

従って、当該技術において、通常の癌病期決定法によってもたらされる同時の臨床病理データを必要とすることなく、宿主からの適応的免疫応答の生物学的マーカーを専ら使用する癌予後診断の信頼し得る方法を開示するものはない。

さらに、現在、早期段階(病期I/II)結腸直腸癌患者において、癌転帰の予測を可能にする信頼し得る入手可能なマーカーは存在しない。

従って、当該技術においては、専らではないが本質的には臨床病理病期決定法である現在利用可能な方法よりも正確且つ信頼し得る方法で疾病を病期決定する結腸直腸癌のような癌の転帰を予後診断する改良された方法が求められている。

とりわけ、改良された予後診断方法が利用可能であることは、術前および術後のような適切な治療処置について患者がより良好に選択するのを可能にする。事実、結腸直腸癌のような多くの癌において、術後の適切な治療処置の選択は、切除腫瘍組織の分析によってもたらされる組織病理データによって導かれている。例えば、結腸直腸癌においては、リンパ節の関与が診断された場合、ほぼアジュバント化学療法処置が、そのような処置の毒性および他の患者にとって利益が無い故に、処方される。

【発明の開示】

【0009】

本発明は、癌の進行についての患者の生体外予後診断方法に関し、該方法は、下記の工程を含むことを特徴とする：

a) 上記患者からの腫瘍組織サンプルにおいて、癌に対する上記患者の適応的免疫応答状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーを定量する工程；および、

b) 工程a)で得られた上記少なくとも1種の生物学的マーカーの値を同じ生物学的マーカーの所定の参照値と比較する工程(この所定の参照値は、前記癌の進行の特定の予後診

10

20

30

40

50

断と相関している)。

上記方法の幾つかの実施態様においては、工程a)は、1種以上の生物学的マーカーを、免疫化学法により、好ましくは2つの異なる組織において、とりわけ、(i)腫瘍の中心(CT)および(ii)浸潤性周辺部(IM)の双方において定量することからなる。

上記方法の幾つかの他の実施態様においては、工程a)は、1種以上の生物学的マーカーを、遺伝子発現分析により、腫瘍組織全体サンプルにおいて定量することからなる。

また、本発明は、患者の癌に対する適応的免疫応答状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーを定量するための手段を含むことを特徴とする、患者における癌進行の予後診断用キットにも関する。

また、本発明は、患者の癌に対する適応的免疫応答状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーを定量するための手段を含むことを特徴とする、対象者の薬物による治療(アジュバント療法または新アジュバント療法)の有効性のモニタリング用キットにも関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、患者の癌の転帰の新規な予後診断方法を提供し、この新規な方法は、腫瘍部位において、上記患者の癌に対する適応的免疫応答の存在またはレベルを標示する1種以上の生物学的マーカーを検出および/または定量することに基づく。

今回、驚くべきことに、悪性癌に対する、とりわけ、結腸直腸癌に対する現場適応的免疫応答の精確な測定を、局所腫瘍浸潤の度合および局所リンパ節への拡散にかかわらず、癌担持患者のその後の臨床転帰を予測する単なるパラメーターとして使用し得ることを本発明に従って証明した。

(i) 腫瘍部位での患者からの適応的免疫応答レベルと(ii) 疾病の転帰とのこの統計的に極めて有意な相関は、全て、従来技術の知識によれば、哺乳類癌における浸潤性免疫細胞が有害な炎症性プロセスから有益な適応的免疫応答までの範囲の極めて変動性のある転帰からなるさらに驚くべきことである。

さらに、本発明に従い意外にも見出した上記の高度に有意な相関は、今や、デュークスまたはフライス(Grujis)法のような当該技術において知られている通常の臨床病理癌病期決定方法によって提供される臨床病理データをさらに必要とすることなく、患者の癌の転帰の予後診断の判定を可能にする。

さらに詳述するように、(i) 本明細書において開示するような、適応的免疫応答の1種以上の生物学的マーカーの存在または量と(ii) 無病生存率(DFS)および全生存率(OS)を含む患者の癌の現実の転帰との統計的相関を判断したとき、 10^{-8} よりも高いP値が、例えば、Zhang等(2003年、前出)、Diederischen等(2003年、前出)またはOshikiri等(2003年、前出)の研究のような種々の従来技術の研究において開示されている $5 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-3}$ のP値と比較して、本発明によって得られている。

【0011】

本出願人は、(i) 腫瘍中の免疫細胞のタイプ、密度および位置と(ii) DFSおよびOSを含む患者の臨床的転帰との極めて有意な関係(例えば、低P値)が存在することを見出した。この極めて有意な相関は、適応的免疫応答の生物学的マーカーをアッセイするのに、(i)免疫化学アッセイまたは(ii)遺伝子発現分析のいずれかを使用したときに見出している。

適応的免疫応答の生物学的マーカーを、遺伝子発現分析により、全腫瘍組織サンプル中で分析することにより、少なくとも2種のマーカーの多くの有意な組合せのような多数の有意なマーカーの組合せを、およそ 10^{-4} 以下のP値でもって見出した。

重要なことに、本発明においては、 T_{H1} 適応的免疫に対する共調節遺伝子の主要クラスターを同定しており、このクラスターは、TBX1 (T-ボックス転写因子21)、IRF1 (インターフェロン調節因子1)、IFNG(ガンマ-インターフェロン)、CD3Z (CD3ζ)、CD8、GLNY (グランジュリン)およびGZMB(グランザイムB)を含む。さらに、これらの遺伝子発現と腫瘍再発間の逆相関も見出している。

本発明に従うもう1つの極めて有意な遺伝子クラスタは、PDCD1LG1、VEGF、TNFRSF6B、IRF1、IL8RAおよびSELLを含む。

適応的免疫応答の生物学的マーカーを、免疫組織化学分析により、(i)腫瘍の中心(CT)内、(ii)“浸潤性周辺部”とも称し得る腫瘍を取巻く細胞環境部(IM)内または(iii) CTおよびIMの双方内のいずれかで分析することによっても、マーカーの多くの有意の組合せを見出した。最高の統計相関値は、生物学的マーカーを腫瘍の中心(CT)内および浸潤性周辺部(IM)内の双方において定量したときに見出している。

【0012】

第1に、本発明に従い、腫瘍部位での高密度のT細胞と疾病の好ましい転帰との高い相関が存在することを見出している。とりわけ、癌の前向き転帰は、腫瘍の中心部分中またはその浸潤性周辺部中いずれかの腫瘍部位での高密度のCD3+細胞、CD8+細胞、CD45RO+細胞またはグランザイム-B+細胞の定量と高度に相関していることを証明している。

第2に、腫瘍部位での高密度のCD3+細胞、CD8+細胞、CD45RO+細胞またはグランザイム-B+細胞の存在の測定は、癌再発の減少および/または癌再発の遅延および/または癌再発の無いことに高度に相関していることを見出している。

第3に、腫瘍部位での高密度のCD3+細胞、CD8+細胞、CD45RO+細胞またはグランザイム-B+細胞の存在の測定は、併発的遠隔転移の減少または併発的遠隔転移(M病期)の無いことに高度に相関していることを見出している。

第4に、腫瘍部位での高密度のCD3+細胞、CD8+細胞、CD45RO+細胞またはグランザイム-B+細胞の存在の測定は、早期転移の減少または早期転移(VEまたはLIまたはPI)の無いことに高度に相関していることを見出している。

第5に、腫瘍部位での高密度のCD3+細胞、CD8+細胞、CD45RO+細胞またはグランザイム-B+細胞の存在の測定は、腫瘍細胞による局所リンパ節の浸潤(N病期)の減少に高度に相関していることを見出している。

第6に、腫瘍部位での高密度のCD3+細胞、CD8+細胞、CD45RO+細胞またはグランザイム-B+細胞の存在の測定は、腸壁を介しての浸潤(T病期)の減少に高度に相関していることを見出している。

さらに一般的には、リンパ血管および神経周囲構造体内での腫瘍塞栓によって示される腫瘍の早期蔓延の無いことは、強い現場免疫応答の存在と著しく関連していることを見出しており、この強い免疫応答を、とりわけ、腫瘍部位で見出される高免疫細胞密度により、さらにまた、腫瘍部位の免疫と関連する種々の遺伝子の高発現レベルにより例証している。

【0013】

さらに、本発明によれば、2つの異なる腫瘍領域、即ち、腫瘍の中心(CT)プラス腫瘍の浸潤性周辺部(IM)での強い適応的免疫応答の検出は、患者の長期無病生存時間および全生存時間と高度に相関しており、癌進行の患者の予後診断に有意に有益であることも見出している。

重要なことに、本発明においては、(i) 単一の生物学的マーカーを使用して免疫組織化学アッセイにおいてアッセイしたときの、免疫系を形成する特異性タイプの細胞の細胞密度と(ii) DFSまたはOSとの高い相関を、上記生物学的マーカーを腫瘍中心(CT)中および浸潤性周辺部(IM)中の双方でアッセイしたとき、少なくとも 10^{-7} ほどの低いP値でもって見出している。

一般的には、本発明によれば、適応的免疫応答の生物学的マーカーの存在または量をアッセイしたときの癌患者における免疫細胞のタイプ、密度および位置は、デュークスおよびUICC-TNM分類のような通常の臨床病理癌病期決定方法の価値を上回り且つそれに依存しない予後診断的価値を有することを見出している。

さらに詳細には、本発明は、今や、患者の癌の転帰を、とりわけ疾病の早期段階の癌について、さらに詳細には、デュークス分類に従い病期I/IIIとして当初分類された癌について予測する、通常の臨床病理癌病期決定方法よりもはるかに正確であることを証明した予後診断方法および技術的手段を提供する。

即ち、本発明によれば、腫瘍部位での強い適応的免疫応答の検出は、患者の長期の無病生存時間(DFS)および全生存時間(OS)と高度に相関していることを見出している。

【0014】

従って、本発明の第1の目的は、下記の工程を含むことを特徴とする、患者の癌の進行の生体外予後診断方法からなる：

a) 上記患者からの腫瘍組織サンプルにおいて、癌に対する上記患者の適応的免疫応答状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーを定量する工程；および、

b) 工程a)で得られた前記少なくとも1種の生物学的マーカーの値を同じ生物学的マーカーの所定の参照値と比較する工程(この所定の参照値は、前記癌の進行の特定の予後診断と相関している)。

予期に反して、本発明によれば、強い調節された適応的免疫応答は、等しく好ましい癌予後診断と相関していることを見出している。

さらに予期に反して、本発明に従って見出した上記の相関は、腸壁を介しての腫瘍浸潤および局所リンパ節への拡大(デュークス分類A、B、C)とは無関係であることも見出している。

逆に、驚くべきことに、弱い現場適応的免疫応答は、最低の腫瘍浸潤性を有する患者(デュークス分類A)においてさえも、極めて貧弱な予後診断と相関していることも見出している。

従って、本発明の癌予後診断方法に従って使用する基準、即ち、癌患者の適応的免疫応答の状態は、T、N、Mおよびデュークス分類の基準とは異なるだけでなく、疾病の予測(無病間隔および生存時間)においてもより正確であるようである。

従って、本発明によれば、癌担持患者の適応的免疫応答レベルの尺度を、癌疾患の転帰を予測するための単なる尺度として、さらなるデータを何ら必要としないで、とりわけ通常の癌病期決定方法によってもたらされる臨床病理データを何ら必要としないで使用し得ることを初めて見出している。

事実、種々の従来技術の研究は、癌予後診断における適応的免疫応答のマーカー(1種以上)の可能性ある関連を指摘していたものの、これらの従来研究は、通常の癌病期決定方法によって提供される予後診断データに対する確認としてまたは追加情報として使用し得るデータしか含んでいない。従って、従来技術の研究において、癌担持患者の適応的免疫応答を標示する1種以上の生物学的マーカーの測定に専ら基づく信頼し得るまたは再現性のある如何なる生体外癌予後診断方法をも開示または示唆するものはない。

また、腫瘍部位での強い適応的免疫応答の検出は、結腸癌と直腸癌のような複数の癌に対する信頼し得るマーカーであることも見出している。

また、本発明の癌予後診断の実施は、従来技術方法よりも高い正確性でもって、免疫療法のようなアジュバント療法からの利益を受け得る腫瘍再発の高リスクにある患者を指標する。

【0015】

本明細書において意図するとき、“癌の進行の予後診断”なる表現は、癌の発症が既に診断されている患者における、下記のような種々の事象の予後診断を含む：

(i) 転移発生の可能性；

(ii) 結腸直腸癌のような随所(loco-regional)再発発生の可能性；および、

(iii) 長期の無病(DFS)および/または長期の全生存(OS)時間の発生の可能性；即ち、本発明に従う生体外予後診断による試験後5年以上のDFS時間またはOS時間。

本明細書において意図するとき、“腫瘍組織サンプル”とは、(i) 包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心からの組織サンプル、(iii) 腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプル、(iv) 腫瘍と近接しているリンパ島、(v) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(vi) 術前に採取された腫瘍組織サンプル(例えば、処置後の患者のフォローアップのための)、および(vii) 遠隔転移を含む。

好ましくは、工程a)が、1種以上の遺伝子、即ち、1種以上の適切な生物学的マーカー

10

20

30

40

50

の発現分析からなる場合は、上記1種以上の遺伝子の発現の定量は、全腫瘍組織から実施する。

好ましくは、工程a)が、1種以上の細胞発現生物学的マーカーの免疫組織化学アッセイによる特異性免疫細胞密度の評価からなる場合には、上記1種以上の生物学的マーカーの定量は、上記(i)～(vi)と番号付けした腫瘍組織サンプルのうちの少なくとも2つの異なる腫瘍組織サンプルにおいて別々に実施する。最も好ましくは、この実施態様によれば、上記1種以上の生物学的マーカーの定量は、(i)腫瘍の中心(CT)内または(ii)浸潤性周辺部(IM)内の双方内で別々に実施する。

【0016】

腫瘍組織サンプルは、腫瘍の中心、腫瘍の浸潤性周辺部または最も近いリンパ節のいずれに由来するかどうかにかかわらず、1種または数種の生物学的マーカーの、とりわけ組織学または免疫組織化学法による、フローサイトメトリー法による並びにゲノムおよびプロテオミクス分析のような遺伝子またはタンパク質発現分析法によるさらなる定量のための、外科的腫瘍切除後または生検のための組織サンプル採取後のような、腫瘍中心または腫瘍を取巻く浸潤性周辺部から取出した組織の切片またはスライスを包含する。腫瘍組織サンプルは、本発明の癌予後診断方法において使用し得るものであることを承知されたい。これらの実施態様においては、生物学的マーカーの発現レベルは、腫瘍組織サンプル、例えば、患者から得られた腫瘍組織塗抹標本中の生物学的マーカーの量(例えば、絶対量または濃度)を評価することによって評価し得る。細胞サンプルは、勿論、サンプル中の生物学的マーカーの量を評価する前に、種々の周知の採取後調製および保存方法(例えば、核酸および/またはタンパク質抽出、固定、保存、凍結、超音波処理、濃縮、蒸発、遠心分離等)に供し得る。同様に、腫瘍組織塗抹標本も、採取後調製および保存方法、例えば、固定に供し得る。

本明細書において意図するとき、“適応的免疫応答”とは、腫瘍部位での局所的な宿主癌患者の免疫系からの細胞の活性化量のような活性の存在を含む。

本明細書において意図するとき、“上記腫瘍に対する上記患者の適応的免疫応答”なる表現は、直接(TCR依存性)または間接(TCR非依存性)またはその両方の上記癌に対する作用を介しての上記患者の任意の適応的免疫応答を含む。

適応的免疫応答は、宿主癌患者の腫瘍に対する特異的免疫応答を意味し、宿主の特異的免疫応答に関与する細胞の存在、数または活性を含む。

本明細書において使用するとき、Tリンパ球は、Th1およびTh2 Tヘルパーリンパ球細胞サブセットのようなTヘルパーリンパ球を含む。

本明細書において使用するとき、Tリンパ球は、T細胞毒性リンパ球を含む。

【0017】

適応的免疫

先天性免疫との比較において、後天性(適応的)免疫は、身体が各種の抗原に晒され、その抗原に対して特異性の防御を構築するときに発生する。

適応的免疫応答は、抗原特異性であり、発生するのに数日以上を要し得る。適応的免疫において重要な役割を有する細胞タイプは、マクロファージおよび樹状細胞のような抗原提示細胞である。T細胞サブタイプの抗原依存性賦活化、B細胞活性化および抗体産生、並びにマクロファージおよびNK細胞の活性化は、全て適応的免疫において重要な役割を果たす。また、適応的免疫応答は、免疫記憶、即ち、生涯に亘って発生し続けるプロセスを誘発させ、所定の抗原に対する将来の応答を増強させる。

白血球の特定のタイプであるリンパ球は、下位群、即ち、後天性免疫応答における重要な実践体であるBおよびTリンパ球を含有する。Bリンパ球(B細胞とも称する)は、抗体を産生させる。抗体は、特異性抗原に結合し、食細胞が抗原を破壊するのを容易にする。Tリンパ球(T細胞)は、抗原を直接攻撃し、免疫応答の制御をもたらす。1つの抗原タイプに特異性であるB細胞およびT細胞が発現する。異なる抗原に暴露されたときは、異なるB細胞およびT細胞が形成される。

リンパ球は、発現するとき、通常、身体自身の組織(自己)を、身体中には通常見出せない

い組織および粒子(非自己)から異なるものとして認識することを習得する。B細胞およびT細胞が形成された時点で、これら細胞の幾分かは増殖し、免疫系についての“記憶”を得る。これによって、免疫系が同じ抗原に暴露される次の機会により迅速に且つより効果的に応答し、多くの場合、病気になるのを阻止するのを可能にする。例えば、適応的免疫は、水痘症に罹患しいわゆる“免疫”であった個々人が再び水痘症に罹患するのに対処する。

【0018】

適応的免疫系

適応的免疫系は、後天性免疫系とも称し、殆どの哺乳類が病原体による最初の感染に対し生き残るとき、これら哺乳類がその同じ病原体によって生じるさらなる病気に対して一般に免疫であるという興味ある事実を説明している。この事実は、近代の医療においてワクチンを使用することによって活用されている。適応的免疫系は、骨髄内の幹細胞によって産生されるロイコサイト(即ち、白血球)と称する免疫細胞に基づく。免疫系は、2つの成分に分類し得る。哺乳類を含む多くの種は、下記のタイプを有する：

体液(血液のような)内の細菌およびウイルスに対して作用する体液免疫系。その主要な作用手段は、B細胞によって産生される抗体とも称するイムノグロブリンである(Bは、これら細胞が骨髄内で発現することを意味する)。

ウイルスが感染した他の細胞を保護する細胞免疫系。これは、Tリンパ球とも称するT細胞によりなされる(Tは、これらの細胞が胸腺内で発現することを意味する)。下記の2つの主要タイプのT細胞が存在する：

細胞毒性T細胞(TC細胞)は、T細胞レセプターを使用して他の細胞表面を精査することによって感染細胞を認識する。TC細胞が感染細胞を認識した場合、TC細胞は、感染細胞にアポトーシスとなる(“自殺する”)ようにシグナルを送るグランザイムを放出し、そのようにして、感染細胞および形成過程において存在し得るウイルスを死滅させる。

ヘルパーT細胞(TH細胞)は、マクロファージ(危険物質を取込む)と相互作用し、さらにまた、BおよびT細胞の増殖を誘発させるサイトカイン類(インターロイキン類)を産生させる。

さらに、細胞介在免疫の調節において重要である調節T細胞(Treg細胞)も存在する。

【0019】

細胞毒性T細胞：細胞毒性(またはTC)T細胞は、その表面に、ウイルス感染体細胞および腫瘍細胞の群IのMHC分子によって示される抗原フラグメントに結合し得る抗原レセプターを有するT細胞(白血球の1つのタイプ)である。MHC-抗原複合体により一旦活性化されると、TC細胞はタンパク質パーフォリンを放出し、このパーフォリンがターゲット細胞の原形質膜に孔を形成する；この孔は、イオンおよび水をターゲット細胞中に流入させ、ターゲット細胞を膨張させ、最終的には溶解させる。また、TCは、グランザイム、即ち、セリンプロテアーゼを放出し、このプロテアーゼは、パーフォリンにより形成された孔からターゲット細胞に入り、アポトーシス(細胞死)を誘発させる。殆どのTC細胞は、細胞表面上に、群IのMHC分子の1部に引付けられるタンパク質CD8を存在させている。この親和性は、TC細胞とターゲット細胞を、抗原特異性活性化の間、緊密に一緒に結合したままに保つ。CD8表面タンパク質を含むTC細胞は、CD8+T細胞と称する。

ヘルパー(またはTH)T細胞：ヘルパー(またはTH)T細胞は、その表面に、プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)上で見出される群IIのMHC分子によって示される抗原フラグメントに結合し得る抗原レセプターを有するT細胞(白血球の1つのタイプ)である。一旦抗原に結合すると、TH細胞は、増殖し、活性化TH細胞と記憶TH細胞に分化する。活性化TH細胞は、他のリンパ球を賦活化するサイトカイン、タンパク質またはペプチド類を分泌する；最も一般的なのは、強力なT細胞増殖因子であるインターロイキン-2

(IL-2)である。活性化されて増殖中のTH細胞は、2つの主要サブタイプの細胞、Th1およびTh2細胞に分化し得る。これらのサブタイプは、産生される特定のサイトカインに基づき定義される。Th1細胞は、インターフェロン-ガンマおよびインターロイキン12を産生させ、一方、Th2細胞は、インターロイキン-4、インターロイキン-5およびインターロイキ

ン-13を産生させる。記憶TH細胞は、最初に遭遇した抗原に対して特異性であり、二次免疫応答中に動員され得る。殆どのTH細胞は、細胞表面上に、群IIのMHC分子の1部に引付けられるタンパク質CD4を存在させている。この親和性は、TH細胞とターゲット細胞を、抗原特異性活性化の間、緊密に一緒に結合したままに保つ。CD4表面タンパク質を含むTH細胞は、CD4+T細胞と称する。CD4+T細胞数の減少は、HIVがAIDSを引起す一次メカニズムである。

【0020】

他の関連用語の定義

本明細書において使用するとき、“腫瘍部位”なる表現は、腫瘍組織自体、並びに腫瘍の浸潤性周辺部のような腫瘍組織と密接に接触している組織および腫瘍組織または腫瘍の浸潤性周辺部に最も近い局所リンパ節を意味する。

10

本明細書において意図するとき、適応的免疫応答の“状態”は、(i) 腫瘍部位での癌に対する特異的免疫応答の存在、および(ii) 該特異的免疫応答のレベルを含む。

本明細書において意図するとき、“生物学的マーカー”は、癌患者の腫瘍に対する適応的免疫応答の状態を標示し得る任意の検出可能な、測定可能なまたは定量可能なパラメーターからなる。マーカーは、本発明の癌予後診断方法を、(i) 上記マーカーについての定量値の上昇または低下と(ii) 患者において実際に観察した癌の進行との間に良好な統計的相関を見出す場合に実施する目的においては、“生物学的マーカー”となる。試験した各マーカーについて補正值を算出し、従って、本発明に従う“生物学的マーカー”としての上記マーカーの統計的関与度を判定するには、当業者にとって既知の統計方法の任意の1つを使用し得る。例えば、カプラン・メイヤー(Kaplan-Meier)曲線を使用する統計方法および/またはログランク検定を使用する単変量解析および/またはCox比例ハザードモデルを、本明細書の実施例において示しているようにして使用し得る。0.05よりも低い、より好ましくは 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} または 10^{-7} よりも低いP値(単変量および多変量解析(例えば、それぞれ、ログランク検定およびCox検定)に従う)を測定した任意のマーカーが、本発明の癌予後診断方法において使用し得る“生物学的マーカー”からなる。

20

生物学的マーカーとしては、腫瘍部位における免疫系に由来する細胞の存在或いは数または密度がある。

また、生物学的マーカーとしては、腫瘍部位における免疫系由来の細胞によって特異的に産生されたタンパク質の存在または量がある。

30

【0021】

また、生物学的マーカーとしては、腫瘍部位における宿主の特異的免疫応答の発生に関連する遺伝子の発現レベルを標示する任意の生物学的物質の存在または量がある。従って、生物学的マーカーとしては、腫瘍部位における免疫系由来の細胞が特異的に産生するタンパク質をコード化するゲノムDNAから転写したメッセンジャーRNA(mRNA)の存在または量がある。

従って、生物学的マーカーとしては、腫瘍組織内またはその近隣において(腫瘍の浸潤性周辺部内または最も近いリンパ節内のような)集められたBリンパ球、Tリンパ球、単球/マクロファージ樹状細胞、NK細胞、NKT細胞およびNK-DC細胞によるような免疫系に由来する細胞によって特異的に発現された表面抗原、或いは該表面抗原をコード化するmRNAがある。

40

具体的には、生物学的マーカーとして使用する興味ある表面抗原としては、T細胞またはT細胞サブセットが発現するCD3、CD4、CD8およびCD45ROがある。

例えば、CD3抗原の発現またはそのmRNAの発現を生物学的マーカーとして使用する場合、本発明に従う方法の工程a)でのこの生物学的マーカーの定量は、Tリンパ球およびNKT細胞全部に関連する患者の適応的免疫応答レベルを標示し得る。

例えば、CD8抗原の発現またはそのmRNAの発現を生物学的マーカーとして使用する場合、本発明に従う方法の工程a)でのこの生物学的マーカーの定量は、細胞毒性Tリンパ球に関連する患者の適応的免疫応答レベルを標示し得る。

例えば、CD45RO抗原の発現またはそのmRNAの発現を生物学的マーカーとして使用する場

50

合、本発明に従う方法の工程a)でのこの生物学的マーカーの定量は、記憶Tリンパ球または記憶エフェクターTリンパ球に関連する患者の適応的免疫応答レベルを標示し得る。

さらに具体的には、生物学的マーカーとして使用するタンパク質としては、パーフォリン、グランジュリンおよびグランザイム-Bのような、免疫系由来の細胞により特異的に産生された細胞溶解性タンパク質がある。

【0022】

生体外癌予後診断方法の説明

上記方法の工程a)：

本発明に従う方法の工程a)の終了時には、使用する少なくとも1種の生物学的マーカーの各々についての定量値が得られる。

先に詳述したように、工程a)の特定の実施態様は、下記を含む：

(i) 1種以上の生物学的マーカーを、免疫化学法により定量する工程；興味ある1種以上のタンパク質マーカーを、例えば、上記1種以上のタンパク質マーカーの各々に対する特異性の抗体を使用しての、腫瘍組織サンプルでの現場免疫組織化学方法によって定量することを含む。ある実施態様においては、得られる定量値は、分析中の腫瘍組織サンプルで上記タンパク質マーカーの各々を発現させる細胞の密度からなる。

(ii) 1種以上の生物学的マーカーを、遺伝子発現分析により定量する工程；1種以上の興味あるマーカーmRNAを、例えば、リアルタイムPCRであるTaqman PCR分析を実施することによって定量することを含む。

【0023】

従って、本発明方法のある種の実施態様においては、工程a)は、腫瘍組織サンプル中で、適応的免疫応答の特異性生物学的マーカーを発現する細胞を定量することからなる。一般的には、少なくとも2種の生物学的マーカーの組合せをアッセイする。本発明方法の工程a)のこれらの実施態様においては、工程a)の終了時に得られた値は、上記腫瘍組織サンプル中に含ませ且つ、例えば、生物学的マーカーの組合せのうちで、1つの特定の生物学的マーカーを発現させる免疫系の細胞またはその細胞サブセットの数または密度からなる。これらの実施態様においては、工程a)の終了時に得られるのは、マーカーの組合せ中に含ませた各生物学的マーカーにおいて見出せる細胞密度値である。本明細書において使用するとき、興味ある細胞の密度は、組織サンプルの表面積の1単位当りで計数したこれら興味ある細胞の数として、例えば、組織サンプル表面積の平方cmまたは平方mm当りで計数したこれら興味ある細胞の数として表し得る。本明細書において使用するとき、興味ある細胞の密度は、サンプルの1容量単位当りのこれら興味ある細胞の数として、例えば、サンプルの立方cm当りの興味ある細胞の数としても表し得る。本明細書において使用するとき、興味ある細胞の密度は、全体細胞数または全体細胞下位集団(100%とする)当りの特定の細胞サブセット(例えば、CD3+T細胞)の百分率からなっているもよい。例えば、上記方法の1つの実施態様においては、細胞を、先ず、腫瘍組織サンプルからの機械的分散により集め、その後、興味ある細胞を、必要に応じて、細胞密度を判定する前に、例えばラベル化表面抗原-特異性抗体によりラベル化した後、フローサイトメトリーによって計数する。本発明者等は、本発明者等が(i) 興味ある生物学的マーカーの定量値と(ii) 癌疾患の転帰との間に、上記定量値を免疫組織化学法によって評価したときに見出した高い統計的関連性は、少なくとも、下記によって説明し得るものと信じている：

- 腫瘍組織スライスの表面積当りのマーカー発現性細胞を、上記腫瘍組織スライスの複数の異なる表面積から行うようにして計数するような、各マーカーについての高度に正確な定量方法；および、

- 2種類以上の組織サンプル中の上記マーカーの別々の定量の組合せ、例えば、(i) 腫瘍中心(CT)内および(ii) 浸潤性周辺部(IM)内の双方での上記生物学的マーカー定量の組合せ；上記統計的関連性は、その場合、例えば、多変量解析により、測定している各定量値の組合せから出発して算出していることが理解し得る。

【0024】

上記方法のある種の実施態様においては、工程a)は、腫瘍組織サンプル中で、適応

10

20

30

40

50

的免疫応答の1種以上のマーカー遺伝子の発現レベル(例えば、相応する特異性mRNAの量)を定量することからなる。一般的には、少なくとも2種のマーカー遺伝子の組合せについての発現レベルの評価を行う。上記方法の工程a)のこれらの実施態様においては、工程a)の終了時に得られるのは、上記マーカーの組合せにおいて含ませた免疫系由来の細胞によって特異的に産生された各マーカータンパク質(1種以上)について見出された発現レベル値である。

また、上記発現レベルは、組織サンプル中で検出した上記興味あるタンパク質の量を反映する任意の任意単位、例えば、上記組織サンプルのmRNA分のリアルタイムPCR分析によるような上記組織サンプルのmRNA分のPCR分析によって生成させたcDNA物質が発出する放射性または蛍光シグナルの強度としても表し得る。

10

また、上記発現レベルは、組織サンプル中で検出した上記興味あるタンパク質をコード化するmRNAの量を反映する任意の任意単位、例えば、興味あるタンパク質に特異的に結合させたラベル化抗体が発出する放射性または蛍光シグナルの強度としても表し得る。また、工程a)の終了時に得られる値は、当該技術において周知の種々のタンパク質検出方法、例えば、ELISA、SELDI-TOF、FACSまたはウェスタンブロッティングによって測定し得る興味あるタンパク質(1種以上)の濃度からなり得る。

本発明に従う癌予後診断方法の工程a)のある種の実施態様においては、生物学的マーカー(1種以上)を、(i) 包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心からの組織サンプル、(iii) 腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプル、(iv) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(v) 術前の腫瘍生検の実施(例えば、処置後の患者のフォローアップのための)および(vi) 遠隔転移からなる群から選ばれる癌患者由来の1種または2種以上の腫瘍組織サンプル中で個別に定量する。これらの実施態様においては、工程a)の終了時に、腫瘍組織サンプル(i)、(ii)または(iii)の各々において得られた定量値を、上記方法の工程b)において、腫瘍組織サンプル(i)~(vi)の各々において前以って測定した相応する参照値をそれぞれ比較する。上記方法の工程a)において、使用する生物学的マーカー毎に2回以上の定量値を得ることにより、生物学的マーカー毎に1回のみの定量値を測定したときよりも正確な最終癌予後診断を可能にする。

20

【0025】

本発明に従う癌予後診断方法の他の実施態様においては、2種以上の生物学的マーカーについての定量値を、上記方法の工程a)において取得する。これらの実施態様においては、工程b)は、使用した生物学的マーカー毎に、(i) この生物学的マーカーについて工程a)で得られた定量値を(ii) 同じ生物学的マーカーについての所定の参照値と比較することによって実施する。

30

本発明に従う癌予後診断方法のさらなる実施態様においては、工程a)を2種以上の腫瘍組織サンプルにおける定量値を単一生物学的マーカーにおいて得ることによって実施するか、または工程a)を2種以上の生物学的マーカーにおいて定量値を得ることによって実施し、その後、これらの定量値を、工程b)において、相応する所定の参照値と比較する。

本発明の生体外予後診断方法の好ましい実施態様においては、工程a)は、下記からなる群から選択する：

40

a1) 腫瘍組織切片中の上記少なくとも1種の生物学的マーカーを、免疫検出法により、(i) 腫瘍中心(CT)および(ii) 浸潤性周辺部(IM)の双方において別々に定量する工程；および、

a2) 上記腫瘍組織サンプル全体中の上記少なくとも1種の生物学的マーカーを遺伝子発現分析により定量する工程。

本発明の生体外予後診断方法の第1の特定の実施態様によれば、工程a1)は、少なくとも2種の異なる生物学的マーカーを(i) 腫瘍中心(CT)内および(ii) 浸潤性周辺部(IM)内の双方において別々に定量することによって実施する。

本発明の生体外方法において、工程a)が工程a1)からなる場合、工程b)は、(i) 同じ生物学的マーカーについてそれぞれCTおよびIM内で得られた各々の定量値を(ii) それぞれCT

50

およびIMにおける相応する参照値と比較することによって実施する。

本発明の生体外予後診断方法の第2の特定の実施態様によれば、工程a2)は、全組織サンプルにおいて、少なくとも5種の異なる生物学的マーカーを定量することによって実施する。

本発明の生体外方法において、工程a)が工程a2)からなる場合、工程b)は、(i) 少なくとも5種の異なる生物学的マーカーの上記組合せの各生物学的マーカーについて得られた各々の定量値を比較することによって実施する。

【0026】

上記方法の工程b)

上記方法の工程b)においては、使用した各々の生物学的マーカーにおいて、工程a)の終了時に得られた値を、同じ生物学的マーカーにおける参照値と、さらに、腫瘍中心(CT)および浸潤性周辺部(IM)における参照値を必要とする場合は上記同じ生物学的マーカーにおける参照値と比較する。従って、同じ生物学的マーカーにおける参照値は、前以って測定するか、或いは、上記生物学的マーカーにおいて、患者の癌に対する適応的免疫応答の高レベルおよび低レベル間の識別に適する参照値を標示することが既に知られている。上記生物学的マーカーにおける上記前以って測定した参照値は、良好な癌予後診断と相関するか、或いは、逆に、悪い癌予後診断と相関している。

参照値を前以って測定するための第1の例としての実施態様

各生物学的マーカーにおける各参照値は、下記の工程を含む方法を実施することによって前以って測定し得る：

a) 下記からなる群から選ばれる少なくとも1つの腫瘍組織サンプル収集物を得る工程；

i) Tis、またはT1、またはT2、またはT3もしくはT4、およびN0、またはN1、またはN2、またはN3、およびM0またはM1と分類され、そして、早期転移(VEまたはLIまたはPI)の無いまたは早期転移の有る、抗癌治療を受けており、その後、抗癌治療後の癌の再発または癌の再生のない癌患者からの腫瘍組織サンプルの収集物；

ii) Tis、またはT1、またはT2、またはT3もしくはT4、およびN0、またはN1、またはN2、またはN3、およびM0またはM1と分類され、そして、早期転移(VEまたはLIまたはPI)の無いまたは早期転移の有る、抗癌治療を受けており、その後、抗癌治療後の癌の再発または再生のある癌患者からの腫瘍組織サンプルの収集物；

b) 工程a)において得られた腫瘍組織サンプルの収集物に含まれる各腫瘍組織サンプルについて、上記生物学的マーカーを定量し、それによって上記生物学的マーカーおよび上記腫瘍組織サンプル収集物についての定量値の収集物を得る工程；

c) 工程b)の終了時に得られた上記定量値の収集物から、上記生物学的マーカーについての平均定量値を算出し、それによって特定の癌予後診断と相関する上記生物学的マーカーにおける所定の参照値を得る工程。

上記工程a)の定義において述べている“抗癌治療”とは、上記腫瘍組織サンプルを収集する以前に癌患者が受けた、放射線療法、化学療法および手術、例えば、腫瘍の外科的切除のようなあらゆるタイプの癌治療に関する。

上記の所定の参照値を得る方法によれば、2以上の所定参照値を、1つの生物学的マーカーにおいて得ることができる。例えば、1つの生物学的マーカーにおいて、上記方法は、同じ生物学的マーカーについて少なくとも4つの所定参照値、即ち、工程a)において、上述する腫瘍組織サンプルの収集物(i)および(ii)の各々によって出発したときに得られた平均定量値から算出したそれぞれ1つの所定参照値の測定を可能にする。

【0027】

参照値を前以って測定するための第2の例としての実施態様

また、本発明方法の工程b)での比較において使用する参照値は、以下で説明するようにして測定し得る“カットオフ”値からなり得る。

各生物学的マーカーについての各々の参照(“カットオフ”)値は、下記の工程を含む方法を実施することによって前以って測定し得る：

- a) 参照値を測定すべきである生物学的マーカーを選定する工程；
b) 癌患者からの腫瘍組織サンプルの収集物を得る工程；
c) 工程b)において得られた各腫瘍サンプルについて、相応する癌患者における実際の臨床転帰に関する情報を得る工程；
d) 工程a)において選定した上記生物学的マーカーにおいて1連の任意定量値を得る工程；
e) 上記生物学的マーカーを工程b)において得られた収集物中に含まれる各腫瘍組織サンプル中で定量する工程；
f) 上記腫瘍サンプルを、工程c)において得られた1つの特定の任意定量値についてそれぞれ下記の2つの群：
(i) 上記1連の定量値中に含まれた上記任意定量値よりも低い上記マーカーに対する定量値を示す腫瘍サンプルを含む第1群；
(ii) 上記1連の定量値中に含まれた上記任意定量値よりも高い上記マーカーに対する定量値を示す腫瘍サンプルを含む第2群；
に分類し、それによって、2つの群の腫瘍サンプルを上記特定の定量値に対して得、各群の腫瘍サンプルを別々に計数する工程；
g) (i)工程e)において得られた上記生物学的マーカーについての定量値と(ii)工程f)において定義した第1および第2群に含ませた腫瘍サンプルが由来する患者の実際の臨床転帰と間の統計的有意性を算出する工程；
h) 工程f)およびg)を、工程d)において得られた任意定量値の全てを検定するまで繰返す工程；
i) 上記参照値(“カットオフ”値)を、最高の統計的有意性(最も有意である)を工程g)において算出した任意定量値からなるものとして設定する工程。

10

20

【0028】

上記方法は、“カットオフ”値をデータ群の中央値において設定することからなり、本明細書の実施例において十分に開示している。

上記で開示しているように、上記方法は、悪いおよび良い転帰予後診断間の区別を可能にする単一の“カットオフ”値の設定を可能にする。実際には、本明細書における実施例において開示しているように、高い統計的有意値(例えば、低P値)は、一般に、連続する任意定量値の範囲において得られ、単一の任意定量値においてのみではない。従って、上記“カットオフ”値の測定方法の1つの別の実施態様においては、最小の統計的有意値(有意の最小閾、例えば、最大閾P値)を任意に設定し、そして、工程g)で算出した統計的有意値がより高い(より有意である、例えば、より低いP値)任意定量値範囲を保持し、それによって定量値の範囲を得る。該定量値範囲は、本発明に従う“カットオフ”値からなる。“カットオフ”値のこの特定の実施態様によれば、悪いまたは良い臨床転帰予後診断は、本発明の予後診断方法の工程b)において、工程a)において得られた値を、1つの特定の生物学的マーカーに対して上記“カットオフ”値の範囲定めする上記範囲値と比較することによって判定し得る。ある実施態様においては、検討した生物学的マーカーにおける定量値の範囲からなるカットオフ値は、最高の統計的有意値(例えば、一般的には見出す最低P値)を見出した定量値を中心とした値の範囲からなる。

30

40

上記で説明しているカットオフ値を前以って測定する方法のある種の好ましい実施態様においては、上記生物学的マーカーは、腫瘍サンプル内で特異性タンパク質マーカーを発現する細胞の密度からなる。さらに、単一のタンパク質マーカーにおいては、少なくとも2つの異なる生物学的マーカーにおけるカットオフ値、それぞれ、(i)腫瘍の中心(CT)において上記タンパク質マーカーを発現する細胞の密度からなる第1の生物学的マーカーにおいて測定した第1のカットオフ値および(ii)浸潤性周辺部(IM)において上記タンパク質マーカーを発現する細胞の密度からなる第2の生物学的マーカーにおいて測定した第2のカットオフ値を測定し得る。

上記のカットオフ値の測定方法の工程c)のある種の好ましい実施態様においては、患者の実際の臨床転帰に関する上記情報は、(i)無病生存(DFS)の期間および(ii)全生存率(OS

50

)からなる群から選ばれる。

事実、本発明に従う癌予後診断方法を実施するに当っては、2種以上の生物学的マーカーについての所定の参照値を利用できることが好ましい。従って、一般的には、少なくとも1つの所定の参照値を、本発明に包含される癌に対する適応的免疫応答の状態を標示する複数の生物学的マーカーにおいて、上記で説明している所定の参照値を得る方法の任意の1つを複数の生物学的マーカーについて単純に繰返すことによって測定し得る。

例えば、生物学的マーカーが、免疫系に由来する細胞が発現するCD3抗原のような表面抗原からなり、さらに、上記癌予後診断方法の工程a)において、腫瘍部位でのCD3+細胞密度のフローサイトメトリー分析を実施するある種の実施態様においては、所定の参照値は、細胞全体または細胞下位集団全体当りの特異性細胞(例えば、CD3+)の、悪い癌予後診断、例えば、再発または再帰、短い生存時間等と相関する百分率のような細胞密度値からなり得るか、或いは、対照的に、良好な癌予後診断、例えば、早期転移のないこと、転移が全くないことまたは長期の無病生存時間と相関する細胞密度値からなり得る。

【0029】

ある種の実施態様においては、上記参照所定値は、上記で既に開示したような“カットオフ”値からなり、この“カットオフ”値は、悪い癌予後診断と良い癌予後診断間を区別する興味ある生物学的マーカーの定量中央値からなる。例えば、ヒト結腸直腸癌においては、生物学的マーカーとして腫瘍部位でのCD3+細胞の免疫組織化学分析を使用する場合、所定のカットオフ参照値は、腫瘍の中心から集めた腫瘍組織サンプルにおいてはCD3+細胞数約300個/mm²を有し得ること、さらに、所定のカットオフ参照値は、浸潤性周辺部から集めた腫瘍組織サンプルにおいてはCD3+細胞数約600個/mm²を有し得ることが判明している。カットオフ値が低および高CD3+定量値を範囲定めする値の範囲からなる他の実施態様においては、上記カットオフ値は、最適には、腫瘍中心(CT)における定量においてCD3+細胞数50個/mm²~CD3+細胞数1000個/mm²の範囲、浸潤性周辺部(IM)における定量においてCD3+細胞数80個/mm²~CD3+細胞数1300個/mm²の範囲である。

CD3、CD8、CD45RO、GZMB細胞密度におけるログランク検定に基づく最適カットオフ値は、本明細書の実施例において示しているように、腫瘍中心において、それぞれ、細胞数370、80、80、30個/mm²、また、浸潤性周辺部において、それぞれ、細胞数640、300、190、60個/mm²であった。

上記実施態様によれば、悪い癌予後診断は、CD3+生物学的マーカーにおいて発生させた定量値が、比較を本発明方法の工程b)において実施したとき、所定のカットオフ参照値よりも低い場合に得られる。逆に、良い癌予後診断は、CD3+生物学的マーカーにおいて発生させた定量値が、比較を本発明方法の工程b)において実施したとき、所定のカットオフ参照値よりも高い場合に得られる。

【0030】

参照値を前以って測定するための第3の例としての実施態様

また、例えば、生物学的マーカーが人体の免疫応答に関連する遺伝子の発現レベルからなる実施態様においては、所定の参照値は、悪い癌予後診断、例えば、再発または再帰、短い生存時間等と相関する遺伝子発現値からなり得るか、或いは、対照的に、良好な癌予後診断、例えば、転移が全くないことまたは長期の無病生存時間と相関する遺伝子発現値からなり得る。遺伝子発現値は、任意の任意単位として表し得る。例えば、遺伝子発現値は、(i) 生物学的マーカー特異性mRNAの量と(ii) 腫瘍組織サンプル中で見出される、例えば、リボソーム18S mRNAのような無関係mRNAの量との差(デルタCT)と表し得る。例えば、ヒト結腸直腸癌においては、(i) 生物学的マーカー特異性mRNAの量と(ii) 無関係mRNAの量との差は、デルタCTおよび参照群(例えば、“100%”と設定した、転移過程の早期処置(VELIPI)を受け、再発を被っている患者における)からの全ての値の平均からなるように任意に決定し得る。これらの実施態様においては、上記方法の工程a)において特定の遺伝子特異性mRNAにおいて発生させた定量値が100%よりも高いと、その場合は、所定の参照値によるよりも良好な癌予後診断が得られる。例えば、このことは、本明細書における実施例において、とりわけ、CD8α特異性mRNA、GZM-B特異性mRNAおよびGLNY特異

性mRNAを使用したときに示されている。

【0031】

工程b)において行う比較

既に詳述したように、また、下記の実施例において示すように、本発明の生体外予後診断方法の工程b)は、試験する生物学的マーカー毎に、下記をそれぞれ比較することからなる：

- (i) 上記生物学的マーカーについて工程a)において見出した定量値；および、
- (ii) 上記生物学的マーカーについて既に前以って測定している相応する参照値。

2種以上の生物学的マーカーを工程a)において定量する場合は、工程b)は、2回以上の上記で定義した種類の比較工程からなる。

また、1種の特定の生物学的マーカーを、工程a)において、種々の腫瘍位置、とりわけ、腫瘍中心(CT)内および浸潤性周辺部(IM)内の双方で別々に定量する場合は、工程b)は、上記特定の生物学的マーカーについて、上記特定の生物学的マーカーを定量した腫瘍位置の数と同じ数の比較工程を含む。とりわけ、特定の生物学的マーカーを、工程a)において、CT内およびIM内の双方において別々に定量する状況においては、その場合、工程b)は、上記特定の生物学的マーカーについて、下記の2回の比較工程をそれぞれ含む：

(i) 上記生物学的マーカーについてCT内で工程a)において得られた定量値と上記生物学的マーカーについてのCT内での所定の参照値との第1の比較工程；および、

(ii) 上記生物学的マーカーについてIM内で工程a)において得られた定量値と上記生物学的マーカーについてのIM内での所定の参照値との第2の比較工程。

即ち、工程b)は、工程a)で得られた定量値の数と同じ数の単一比較工程を含む。

上記比較工程b)は、工程a)が、上記で定義したような、工程a1) (免疫学的方法)または工程a2) (遺伝子発現分析)のいずれかからなるかの如何にかかわらず、好ましくは、工程a)において測定した複数のマーカー定量値の統計的適応性を、相応する参照値との比較後に、例えば、下記の実施例において開示しているように、Pログランク検定を使用して算出することも含む。

【0032】

さらに簡単には、上記比較工程b)は、工程a)において、各生物学的マーカーについて、さらにまた、必要に応じて試験する各種の腫瘍組織について測定した定量値を、それぞれ、(i) 上記生物学的マーカーについての、必要に応じて上記の種の腫瘍組織内での定量値が所定の相応する参照値よりも高い場合の“Hi”と称する第1群および(ii) 上記生物学的マーカーについての、必要に応じて上記の種の腫瘍組織内での定量値が所定の相応する参照値よりも低い場合の“Lo”と称する第2群の2つの群に分類することを含み得る。比較工程b)の結果が、試験した各マーカーについて専ら“Hi”値からなる場合、その癌に対しては好ましい転帰の予後診断が決定されることとなる。逆に、比較工程b)の結果が、試験した各マーカーについて専ら“Lo”値からなる場合は、その癌に対しては貧弱な転帰の予後診断が決定される。中間の結論は、下記の実施例において開示しておるように、比較工程b)において、“Hi”定量値が試験した1種以上の生物学的マーカーについて見出され、さらに、“Lo”定量値が試験した組合せ生物学的マーカーの残りのマーカーについて見出される場合の“不均質”患者において決定される。

本発明者等は、癌の転帰を予測するための本発明に従う生体外予後診断方法の高い統計的適応性を説明するさらなる理由は、高度に正確な参照値、例えば、良い予後診断を有する患者と悪い予後診断を有する患者間で再現性のある正確な区別を可能にする高度に正確な“カットオフ”値を提供する試験した患者コホートの大きさからなるものと信じている。

従って、本発明に従う生体外方法の最も好ましい実施態様においては、比較工程b)において使用する各特定の生物学的マーカーおよび必要に応じての腫瘍組織タイプについての所定の参照値は、癌担持個々人の大集団に由来する腫瘍組織サンプルにおいて前以って測定した上記マーカーおよび必要に応じての上記腫瘍組織タイプ中の上記マーカーについての定量値に基づき算出する。

【0033】

特定の所定参照値の正確性は、特定の生物学的マーカーについての定量値を得、従って、特定の癌転帰と関連する平均値(所定の参照値)を算出するのに使用する組織サンプルの数によって上昇する。従って、本発明に従う生体外予後診断方法の高い正確性に対するもう1つの説明は、本発明方法の工程b)において上記定量値と比較する所定の参照値の高い適応性においても存在する。最も好ましくは、興味ある各生物学的マーカーについて高度に適応性のある所定参照値を得る見地において、上記の所定参照値は、特定の臨床転帰を受けている同じ複数の癌担持患者由来の組織サンプルにおいて測定した上記マーカーの複数の定量値の平均値からなる。

最も好ましくは、正確な所定参照値を評価するに当っては、上記参照値は、特定の生物学的マーカーについての、特定の悪いまたは良い臨床転帰、例えば、診断後5年よりも長いDFSまたはOFSを受けている少なくとも50名の癌担持患者由来の組織サンプルを使用しての少なくとも50の定量値から前以って決定する。

好ましい実施態様においては、特定の生物学的マーカーについての少なくとも60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500のまたはそれ以上の低量値から得られる。

例えば、下記の実施例において開示する所定の参照値は、約500名の癌担持患者のコホートに由来する組織サンプルから得られている。

大患者コホート、即ち、大多数の組織サンプルを試験するのを本発明に従って実現し得たのは、とりわけ、本明細書においてさらに詳述する組織マイクロアレイ技術の使用によっていた。

工程b)を実施するのに使用する方法の特定の実施態様は、下記の実施例において十分に詳述している。

【0034】

本発明方法の必要に応じての工程c)

本発明の生体外癌予後診断方法は、予後診断結果自体を提供する工程c)をさらに含む得る。

即ち、本発明の癌予後診断方法は、使用する生物学的マーカー(1種以上)次第で、下記のいずれかであるさらなる工程c)を含む得る：

(i) 癌再発も癌再帰もない患者の癌進行に対する良好な予後診断を、特定の生物学的マーカーまたは生物学的マーカーの特定の組合せについて工程a)において得られた定量値(1以上)が、それぞれ、相応する所定の参照値(1以上)よりも高いまたは低いときに判定する；または、

(ii) 癌再発も癌再帰もある患者の癌進行に対する悪い予後診断を、特定の生物学的マーカーまたは生物学的マーカーの特定の組合せについて工程a)において得られた定量値(1以上)が、上記相応する所定の参照値(1以上)よりも高いまたは低いときに判定する。

また、本発明の癌予後診断方法は、使用する生物学的マーカー(1種以上)次第で、下記のいずれかであるさらなる工程c)を含む得る：

(i) 高無病生存率(DFS)値または高全生存率(OS)値を有する患者の癌進行に対する良好な予後診断を、特定の生物学的マーカーまたは生物学的マーカーの特定の組合せについて工程a)において得られた定量値(1以上)が、それぞれ、相応する所定の参照値(1以上)よりも高いまたは低いときに判定する；または、

(ii) 低無病生存率(DFS)値または低全生存率(OS)値を有する患者の癌進行に対する悪い予後診断を、特定の生物学的マーカーまたは生物学的マーカーの特定の組合せについて工程a)において得られた定量値(1以上)が、上記相応する所定の参照値(1以上)よりも高いまたは低いときに判定する。

通常、本発明において使用する生物学的マーカーの殆どにおいて、定量値は、癌に対する適応的免疫応答の増大によって上昇する。例えば、工程a)において定量する生物学的マ

10

20

30

40

50

ーカーが免疫系の細胞により特異的に発現されたタンパク質または遺伝子からなる場合、上記マーカーの定量値は、試験する患者の癌に対する適応的免疫応答のレベルによって上昇する。従って、本発明の癌予後診断方法の工程b)を実施する場合、良好な予後診断は、工程a)において得られる特定の生物学的マーカーについての定量値が、相応する所定の参照値よりも、とりわけ所定の参照値がカットオフ値からなる実施態様において高いときに判定する。逆に、悪い予後診断は、工程a)において得られる特定の生物学的マーカーについての定量値が、相応する所定の参照値よりも、とりわけ所定の参照値がカットオフ値からなる実施態様において低いときに判定する。

工程c)を実施するのに使用する方法の特定の実施態様は、下記の実施例において十分に詳述している。

10

【0035】

生物学的マーカーの組合せ

本発明の癌予後診断方法を2種以上の生物学的マーカーにより実施する場合、工程a)において定量する異なる生物学的マーカーの数は、通常は100種未満の異なるマーカー数、殆どの実施態様においては50種未満の異なるマーカー数である。

有利には、高処理量のサンプルスクリーニングを探索する場合、本発明の癌予後診断方法は、20種類までの異なる生物学的マーカーを使用して実施する。

本発明方法の工程a)において定量する異なる生物学的マーカーの数が高いほど、最終の癌予後診断は正確である。

本発明の生体外予後診断方法を使用して、正確且つ信頼し得る癌予後診断を得るのに必要な異なる生物学的マーカーの数は、とりわけ、工程a)において実施する定量方法のタイプによって変動し得る。

20

具体的には、高い統計的有意性は、工程a)を興味あるタンパク質マーカーの現場免疫組織化学検出により実施するときの少数の生物学的マーカーの組合せにより見出せたが、上記各マーカーの別々の定量を腫瘍中心(CT)内および浸潤性周辺部(IM)内の双方で実施することを条件とした。例えば、高い統計的有意性は、下記の実施例において開示しているように、2~10種の生物学的マーカーの組合せによって得られている。何ら特定の理論によって拘束することは望まないが、本発明者等は、癌予後診断における高度の統計的適応性(10^{-3} よりも低いP値)は、工程a)を、生物学的マーカー定量において免疫組織化学方法を使用することによって、また、3種またはそれ以上の異なる生物学的マーカーの組合せを使用することによって実施するとき達成されるものと信じている。

30

さらに具体的には、高い統計的有意性は、工程a)を興味ある遺伝子マーカーの遺伝子発現分析により実施するときの少数の生物学的マーカーによっても見出せたが、遺伝子発現分析法は、全腫瘍サンプルにおいて実施している。2種遺伝子マーカーの種々の高度に有意な組合せの具体的な実施態様は、とりわけ下記の表4において示している。何ら特定の理論によって拘束することは望まないが、本発明者等は、高度の統計的適応性(10^{-3} よりも低いP値)は、工程a)を、生物学的マーカー定量において遺伝子発現分析法を使用することによって、また、10種の異なる生物学的マーカーの組合せ、より好ましくは15種の異なる生物学的マーカーの組合せ、最も好ましくは20種またはそれ以上の異なる生物学的マーカーの組合せを使用することによって実施するとき達成されるものと信じている。

40

【0036】

下記の実施例において示すように、信頼し得る癌予後診断は、例えば、CD3+、CD8+、CD45RO、GZM-B、GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9およびCXCL10の各生物学的マーカーの定量によって例示されるように、単一の生物学的マーカーを本発明方法の工程a)において定量するとき得ることができる。

従って、本発明に従う癌予後診断方法の好ましい実施態様においては、工程a)において述べている腫瘍組織サンプルは、(i)

包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心からの組織サンプル、(iii)

腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプル、(iv) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(v)

50

術前に行った腫瘍生検(例えば、処置後の患者のフォローアップのための)、および(vi)遠隔転移からなる群から選ばれる。

最も好ましくは、本発明の生体外予後診断方法を、特異性タンパク質を発現する細胞の密度からなる生物学的マーカーによって実施する場合、工程a)を免疫組織化学法によって実施し、細胞密度を、(i)腫瘍の中心(CT)内、(ii)浸潤性周辺部(MI)内、(iii) CT内およびIM内の双方において別々に測定する。

最も好ましくは、本発明の生体外予後診断方法を、興味ある遺伝子の発現レベルからなる生物学的マーカーによって実施する場合、工程a)を、癌患者から初期に集めた全腫瘍組織、例えば、外科手術中の腫瘍切除に由来する腫瘍組織から出発するリアルタイムTaqman PCR分析のような遺伝子発現分析法により実施する。

好ましくは、工程a)において定量する、上記患者の癌に対する適応的免疫応答の状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーは、Bリンパ球、単球/マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、NKT細胞、およびNK-DC細胞からなる群から選ばれる免疫系由来の細胞によって発現される少なくとも1種の生物学的マーカーからなる。

【0037】

好ましくは、工程a)において定量する上記少なくとも1種の生物学的マーカーは、下記からなる群から選択する：

(i) 腫瘍組織サンプル中に含まれ、上記生物学的マーカー、一般的にはタンパク質マーカーを発現する免疫系由来の細胞の数または密度；および、

(ii) 腫瘍組織サンプル中の興味ある核酸の発現レベル、一般的には、特異性遺伝子マーカーによってコード化されたmRNAの量。

ある種の実施態様においては、上記少なくとも1種の生物学的マーカーは、腫瘍部位に存在するTリンパ球の密度からなる。

本発明方法のある種の他の実施態様においては、上記少なくとも1種の生物学的マーカーは、腫瘍部位に存在する免疫系由来の細胞によって発現されるタンパク質の定量値からなる。

本発明方法のさらなる実施態様においては、上記少なくとも1種の生物学的マーカーは、腫瘍部位に存在する免疫系由来の細胞によって特異的に発現された遺伝子の発現定量値からなる。

本発明の癌予後診断方法を実施するのに使用し得る好ましい生物学的マーカーの目録は、下記の表2、4、8、9および10に列挙している。表2、9および10は、列挙している各々の生物学的マーカーについて、GenBank国際データベースにおいて利用し得るように、その核酸およびアミノ酸配列に対する受託番号も含んでいる。

本発明に従う癌予後診断方法は結腸直腸癌について試験しているものの、上記方法は、広範囲の癌について応用可能である。何ら特定の理論によって拘束することを望まないが、本発明者等は、本発明の癌予後診断方法は、免疫系由来の細胞が入り込む中心腫瘍から発症するあらゆる癌の進行を予後診断するのに成功裏に実施し得るものと信じている。

【0038】

従って、本発明に従う癌予後診断方法は、以下からなる群から選ばれる癌の進行について患者の予後を判定するのに潜在的に有用である：副腎皮質癌、肛門癌、胆管癌(例えば、末梢癌(periphilar

cancer)、末梢胆管癌、肝臓内胆管癌)、膀胱癌、骨肉腫(例えば、骨芽細胞腫、骨軟骨腫、血管腫、軟骨粘液線維腫、骨肉腫、軟骨肉腫、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、骨の巨細胞腫、脊索腫、リンパ腫、多発性骨髄腫)、脳および中枢神経系の癌(例えば、髄膜腫、星状細胞腫、乏突起膠腫、上皮腫、神経膠腫、髄芽腫、神経節膠腫、神経鞘腫、胚細胞腫、頭蓋咽頭腫)、乳癌(例えば、非浸潤性乳管癌、浸潤性道管癌、浸潤性小葉腺癌、上皮内小葉癌、女性化乳房)、キャススルマン病(例えば、巨大リンパ節過形成、血管濾胞性リンパ節過形成)、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌(例えば、子宮内膜腺癌、アデノカントーマ、乳頭漿液性腺癌、明細胞)、食道癌、胆嚢癌(粘液腺癌、小細胞癌)、消化管カルチノイド腫瘍(例えば、絨毛癌、破壊性胎状奇胎)、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、カポ

10

20

30

40

50

シ肉腫、腎臓癌(例えば、腎細胞癌)、咽頭および下咽頭癌、肝臓癌(例えば、血管腫、肝細胞腺腫、限局性結節性過形成、肝細胞癌)、肺癌(例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌)、中皮腫、形質細胞腫、鼻腔および副鼻腔癌(例えば、鼻腔神経芽細胞腫、中正肉芽腫)、鼻咽腔癌、神経芽細胞腫、口腔および口腔咽頭癌、卵巣癌、膀胱癌、陰茎癌、下垂体癌、前立腺癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫(例えば、胎児性横紋筋肉腫、胞巣状横紋筋肉腫、多形性横紋筋肉腫)、唾液腺癌、皮膚癌(例えば、メラノーマ、非メラノーマ皮膚癌)、胃癌、睾丸癌(例えば、セミノーマ、非セミノーマ生殖細胞癌)、胸腺癌、甲状腺癌(例えば、濾胞腺癌、退形成癌、低分化癌、甲状腺髄様癌、甲状腺リンパ腫)、腔癌、外陰癌、および子宮癌(例えば、子宮平滑筋肉腫)。

【0039】

本発明方法のさらなる実施態様においては、上記少なくとも1種の生物学的マーカーは、下記の生物学的マーカーからなる群から選択する：

(i) 各種生物学的マーカー：ICAM-2/CD102、4-1BB/TNFRSF9、IFN-ガンマR1、IFN-ガンマR2、B7-1/CD80、IL-1 RI、IL-2 Rアルファ、BLAME/SLAMF8、IL-2 Rベータ、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、IL-7 Rアルファ、CCR9、CXCR1/IL-8 RA、CD2、CD3イプシロン、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD4、CD4+/45RA-、IL-12 Rベータ 1、CD4+/45RO-、IL-12 Rベータ 2、CD4+/CD62L-/CD44、CD4+/CD62L+/CD44IL-17、CD5、インテグリン アルファ 4/CD49d、CD6、インテグリンアルファ E/CD103、CD8、インテグリンアルファ M/CD11b、CD8+/45RA-、インテグリンアルファ X/CD11c、CD8+/45RO-、インテグリンベータ 2/CD18、CD27/TNFRSF7、LAG-3、CD28、LAIR1、CD30/TNFRSF8、LAIR2、CD31/PECAM-1、CD40リガンド/TNFSF5、NCAM-L1、CD43、NTB-A/SLAMF6、CD45、CD83、CD84/SLAMF5、RANK/TNFRSF11A、L-セレクチン、CD229/SLAMF3、SIRPベータ 1、CD69、SLAM、共通ガンマ鎖/IL-2 Rガンマ、C RACC/SLAMF7、CX3CR1、CXCR3、CXCR4、CXCR6、TNF RI/TNFRSF1A、TNF RII/TNFRSF1B、Fas/TNFRSF6、Fasリガンド/TNFSF6、TSLP、TSLP R、ICAM-1/CD54、IL-2、IFN-ガンマ、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13；

(ii) Th1/Th2細胞の生物学的マーカー：IL-2R共通ベータ鎖、共通ガンマ鎖/IL-2 Rガンマ、IFN-ガンマ、IFN-ガンマ R1、IL-12、IFN-ガンマ R2、IL-12 Rベータ 1、IL-2、IL-12 Rベータ 2、IL-2 R アルファ、IL-2 Rベータ、IL-24、TNF RI/TNFRSF1A、TNF RI I/TNFRSF1B、IL-4 R、TNF-ベータ/TNFSF1B；

(iii) インターフェロン群の生物学的マーカー：IFNアルファ、IFNベータ、IFN-アルファ/ベータR1、IFN-アルファ/ベータ R2、IFN-ガンマ R1、IFN-ガンマ R2、IFN-アルファ A、IFN-アルファ/ベータ R2、IFN-アルファ B2、IFN-ベータ、IFN-アルファ C、IFN-ガンマ、IFN-アルファ D、IFN-アルファ G、IFN-オメガ、IFN-アルファ H2；

(iv) 共通ガンマ鎖レセプター群の生物学的マーカー：共通ガンマ鎖/IL-2 Rガンマ、IL-7 Rアルファ、IL-2、IL-9、IL-2 R アルファ、IL-9 R、IL-2 R ベータ、IL-15、IL-15 R アルファ、IL-21、IL-7、IL-21 R、IL-31；

【0040】

(v) CX3C ケモカインおよびレセプターの生物学的マーカー：CX3Cケモカインリガンド、CX3CL1/フラクタルカイン、CX3Cケモカインレセプター、CX3CR1；

(vi) CXCケモカインおよびレセプター類の生物学的マーカー：CXCケモカインリガンド、CXCL13/BLC/BCA-1、CXCL11/I-TAC、CXCL14/BRAX、CXCL8/IL-8、CINC-1、CXCL10/IP-10/CRG-2、CINC-2、CINC-3、CXCL16、CXCL15/ラングカイン、CXCL5/ENA、CXCL9/MIG、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、GRO、CXCL4/PF4、CXCL1/GRO アルファ、CXCL12/SDF-1、CXCL2/GROベータ、胸腺ケモカイン-1、CXCL3/GRO ガンマ、CXCケモカインレセプター、CXCR6、CXCR3、CXCR1/IL-8 RA、CXCR4、CXCR2/IL-8 RB、CXCR5；

(vii) CCケモカインおよびレセプターの生物学的マーカー：CCケモカインリガンド、CCL21/6Cカイン、CCL12/MCP-5、CCL6/C10、CCL22/MDC、CCL28、CCL3L1/MIP-1アルファイソ型LD78 ベータ、CCL27/CTACK、CCL3/MIP-1アルファ、CCL24/エオタキシン-2、CCL4/MIP-1ベータ、CCL26/エオタキシン-3、CCL15/MIP-1デルタ、CCL11/エオタキシン、CCL9/10/MIP-1ガンマ、CCL14a/HCC-1、MIP-2、CCL14b/HCC-3、CCL19/MIP-3ベータ、CCL16/HCC-4、CCL

10

20

30

40

50

20/MIP-3アルファ、CCL1/I-309/TCA-3、CCL23/MPIF-1、MCK-2、CCL18/PARC、CCL2/MCP-1、CCL5/RANTES、CCL8/MCP-2、CCL17/TARC、CCL7/MCP-3/MARC、CCL25/TECK、CCL13/MCP-4C、ケモカインレセプター、CCR1、CCR7、CCR2、CCR8、CCR3、CCR9、CCR4、D6、CCR5、HCR/CRAM-A/B、CCR6；

(viii) CCケモカインインヒビターの生物学的マーカー：CCI、CCウィルスケモカインホモログ、MCV-タイプII、MIP-II、MIP-I、MIP-III；

(ix) Cケモカインおよびレセプターの生物学的マーカー：第1および第3システイン残基を欠落するC(ガンマ)下位群、リンホタクチン(SCM-1 アルファとしても知られている)およびSCM-1ベータ(現在、これら2つのみの群メンバーであり、双方ともリンパ球およびNK細胞に対し化走活性を有する)、Cケモカインリガンド、XCL1/リンホタクチン、Cケモカインレセプター、XCR1；

(x) 他のインターロイキンの生物学的マーカー：IL-12、IL-12 Rベータ1、IL-12 Rベータ2、IL-27、IL-15、IL-31。

【0041】

本明細書においては、興味ある各種生物学的マーカーの各々の名称は、HUGO Gene Nomenclature Committeeからのデータベースにおけるような、国際的に承認された遺伝子配列およびタンパク質配列データベースにおいて見出せるような相応する遺伝子の国際的に承認された名称を参照している；上記データベースは、とりわけ下記のインターネットアドレスにて利用可能である：

<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html>

また、本明細書においては、興味ある各種生物学的マーカーの各々の名称は、国際的に承認された遺伝子配列およびタンパク質配列データベースGenBankにおいて見出せるような相応する遺伝子の国際的に承認された名称も参照し得る。

これらの国際的に承認された配列データベースにより、本明細書において説明する興味ある生物学的マーカーの各々に相応する核酸およびアミノ酸配列を、当業者であれば検索し得る。

本発明方法のさらなる実施態様においては、既に説明しているように、生物学的マーカーの組合せについての定量値は、本発明の癌予後診断方法の工程a)において取得する。

従って、本発明の癌予後診断方法は、生物学的マーカーの組合せによって実施し得る。使用する生物学的マーカーの数は、本発明方法を実施する時点で実際に入手可能である興味ある異なる生物学的マーカーの数によってのみ限定される。しかしながら、生物学的マーカーの数があまり多過ぎると、最終の予後判定を同時に有意に改良することなく、上記方法の時間を有意に長引かせる。

【0042】

通常、本発明の癌予後診断方法を生物学的マーカーの組合せによって実施する実施態様においては、50種よりも多くない異なる生物学的マーカーを、工程a)において定量する。殆どの実施態様においては、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、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50種の異なる生物学的マーカーの組合せを定量する。しかしながら、本明細書において既に先に説明しているように、高い統計的有意性(例えば、 10^{-3} よりも低いP値)を達成するのに必要な組合せマーカー数は、上記生体外予後診断方法の工程a)において上記生物学的マーカーの組合せを定量する方法の種類に依存するであろう。

工程a)を、生物学的マーカーを免疫組織化学法により定量することによって実施する本発明の生体外予後診断方法のある種の実施態様においては、少ない数のマーカーの組合せ使用は、とりわけこれら生物学的マーカーを腫瘍中心(CT)内および浸潤性周辺部(IM)内の双方において別々に定量する場合に、十分に有益であり得る。

工程a)を、生物学的マーカーを遺伝子発現分析法により定量することによって実施する本発明の生体外予後診断方法のある種の実施態様においては、高めの数のマーカー、例えば、少なくとも約10種の異なる生物学的マーカーの組合せ使用を一般に必要とする。

【0043】

本発明方法のさらなる実施態様においては、上記少なくとも1種の生物学的マーカーは、CD3、CD8、GZMB、CD45RO、GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9、CXCL10、CD4、CXCR3、CXCR6、IL-18、IL-18Rベータ、フラクタルカイン、IL-23、IL-31、IL-15、IL-7、MIG、パーフォリン、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、LAT、ZAP70、CD5およびCD2からなる群から選択する。これらの生物学的マーカーは、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、現場免疫組織化学法のような免疫化学法によって定量する。定量値は、腫瘍組織サンプルからの組織切片の表面積当りの含まれた興味あるマーカータンパク質を発現する細胞の平均密度として表し得る。

例えば、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または28種の異なる生物学的マーカーの組合せを、工程a)において定量し、これらの生物学的マーカーは、CD3、CD8、GZMB、CD45RO、GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9、CXCL10、CD4、CXCR3、CXCR6、IL-18、IL-18Rベータ、フラクタルカイン、IL-23、IL-31、IL-15、IL-7、MIG、パーフォリン、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、LAT、ZAP70、CD5およびCD2からなる群から選択する。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、免疫組織化学法によって実施する。

さらに具体的には、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において定量し得る2種以上の異なる生物学的マーカーの組合せは、CCR5、CR7、CD103、CD119、CD120a、CD120b、CD122、CD127、CD134、CD14、CD152、CD154、CD178、CD183、CD184、CD19、CD1a、CD210、CD25、CD26、CD27、CD28、CD3、CD32、CD4、CD44、CD45、CD45Ra、CD45Ro、CD47、CD49d、CD5、CD54、CD56、CD62L、CD69、CD7、CD8、CD80、CD83、CD86、CD95、CD97、CD98、CXCR6、GITR、HLA-DR、ICOS、IFN γ RII、IL-18R α 、KIR-NKAT2、PD1、TCR $\alpha\beta$ およびTGFRIIからなる群から選ばれる2種以上の生物学的マーカーであり得る。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、免疫組織化学法によって実施する。これらのマーカータンパク質の各々に対して特異性の抗体の目録は、下記の表3に示している。

【0044】

さらに、少なくとも2種の生物学的マーカーの組合せは、以下の生物学的マーカーを含む生物学的マーカーの群から選ばれる2種以上の異なる生物学的マーカーの組合せを包含する：T-ボックス転写因子21 (T-bet)、インターフェロン調節因子1 (IRF-1)、IFN γ 、CD3 ζ 、CD8、グラニュリシン(GLNY)およびグランザイムB (GZMB)。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、免疫組織化学法によって実施する。

例えば、2種の生物学的マーカーの組合せは、CD8A-TBX21、CD3Z-CD8A、CD3Z-TBX21、B7H3-TGFB1、IFNG-TBX21、CD4-CD8A、CD8A、IFNG、CD4-TBX21、CD3Z-CD4、CD4-TGFB1、CD8A-GLNY、IFNG-IRF1、GLNY-IFNG、IRF1-TBX21、IL8-PTGS2、GLNY-TBX21、CD3Z-GLNY、CD3Z-IFNG、GZMB-IFNG、GLNY-IRF1、IL10-TGFB1、CD8A-IL10、CD4-IL10、CD8A-GZMB、GZMB-TBX21、CD3Z-GZMB、CD4-IRF1、GNLY-GZMB、B7H3-IL10、CD4-GZMB、GZMB-IRF1、IL10-TBX21、CD4-IFNG、B7H3-CD4、CD8A-TGFB1、CD3Z-IL10およびCD4-GNLYからなる群から選択し得る。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、遺伝子発現分析法によって実施する。

必要に応じて1種以上の異なる生物学的マーカーと一緒に使用し得る2種の生物学的マーカーの他の組合せは、下記の表4に列挙している。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、遺伝子発現分析法によって実施する。

必要に応じて1種以上の異なる生物学的マーカーと一緒に使用し得る少なくとも2種のマーカーのさらなる組合せは、下記の表8に列挙している。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、遺伝子発現分析法によって実施する。

【0045】

10

20

30

40

50

少なくとも2種の生物学的マーカーのさらなる組合せは、以下の生物学的マーカーを含む下記の表9に列挙している生物学的マーカーの群から選択する2種以上の異なる生物学的マーカーの組合せを包含する：18s、ACE、ACTB、AGTR1、AGTR2、APC、APOA1、ARF1、AXIN1、BAX、BCL2、BCL2L1、CXCR5、BMP2、BRCA1、BTLA、C3、CASP3、CASP9、CCL1、CCL11、CCL13、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCNB1、CCND1、CCNE1、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、CD154、CD19、CD1a、CD2、CD226、CD244、PDCD1LG1、CD28、CD34、CD36、CD38、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD40LG、CD5、CD54、CD6、CD68、CD69、CLIP、CD80、CD83、SLAMF5、CD86、CD8A、CDH1、CDH7、CDK2、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEACAM1、COL4A5、CREBBP、CRLF2、CSF1、CSF2、CSF3、CTLA4、CTNNB1、CTSC、CX3CL1、CX3CR1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL9、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CYP1A2、CYP7A1、DCC、DCN、DEFA6、DICER1、DKK1、Dok-1、Dok-2、DOK6、DVL1、E2F4、EBI3、ECE1、ECGF1、EDN1、EGF、EGFR、EIF4E、CD105、ENPEP、ERBB2、EREG、FCGR3A、FCGR3B、FN1、FOXP3、FYN、FZD1、GAPD、GLI2、GNLY、GOLPH4、GRB2、GSK3B、GSTP1、GUSB、GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、HLA-B、HLA-C、HLA-D、MA、HLA-DMB、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DPA1、HLA-DQA2、HLA-DRA、HLX1、HMOX1、HRAS、HSPB3、HUWE1、ICAM1、ICAM-2、ICOS、ID1、ifna1、ifna17、ifna2、ifna5、ifna6、ifna8、IFNAR1、IFNAR2、IFNG、IFNGR1、IFNGR2、IGF1、IHH、IKBKB、IL10、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL13RA2、IL15、IL15RA、IL17、IL17R、IL17RB、IL18、IL1A、IL1B、IL1R1、IL2、IL21、IL21R、IL23A、IL23R、IL24、IL27、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL31RA、IL4、IL4RA、IL5、IL6、IL7、IL7RA、IL8、CXCR1、CXCR2、IL9、IL9R、IRF1、ISGF3G、ITGA4、ITGA7、インテグリン、アルファE（抗原CD103、ヒト粘膜リンパ球、抗原1；アルファポリペプチド）、遺伝子hCG33203、ITGB3、JAK2、JAK3、KLRB1、KLRC4、KLRF1、KLRG1、KRAS、LAG3、LAIR2、LEF1、LGALS9、LILRB3、LRP2、LTA、SLAMF3、MADCAM1、MADH3、MADH7、MAF、MAP2K1、MDM2、MICA、MICB、MKI67、MMP12、MMP9、MTA1、MTSS1、MYC、MYD88、MYH6、NCAM1、NFATC1、NKG7、NLK、NOS2A、P2X7、PDCD1、PECAM-、CXCL4、PGK1、PIAS1、PIAS2、PIAS3、PIAS4、PLAT、PML、PP1A、CXCL7、PPP2CA、PRF1、PROM1、PSMB5、PTCH、PTGS2、PTP4A3、PTPN6、PTPRC、RAB23、RAC/RHO、RAC2、RAF、RB1、RBL1、REN、Drosha、SELE、SELL、SELP、SERPINE1、SFRP1、SIRP、ベータ1、SKI、SLAMF1、SLAMF6、SLAMF7、SLAMF8、SMAD2、SMAD4、SMO、SMOH、SMURF1、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SOD1、SOD2、SOD3、SOS1、SOX17、CD43、ST14、STAM、SAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、STK36、TAP1、TAP2、TBX21、TCF7、TERT、TFRC、TGFA、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TIMP3、TLR1、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF11A、TNFRSF18、TNFRSF1A、TNFRSF1B、OX-40、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF10、TNFRSF6、TOB1、TP53、TSLP、VCAM1、VEGF、WIF1、WNT1、WNT4、XCL1、XCR1、ZAP70およびZIC2。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、遺伝子発現分析法によって実施する。

【0046】

少なくとも2種の生物学的マーカーのさらなる好ましい組合せは、以下の生物学的マーカーを含む群から選択する2種以上の異なる生物学的マーカーの組合せを包含する：TNFRSF6B、CEACAM1、PDCD1LG1、CD8A、PTGS2、BIRC5、SELL、INDO、IRAK4、TNF、TNFRSF10A、MMP7、LILRB3、CD3Z、TNFRSF8、GAPD、CXCL10、EBAG9、IL8、STAT1、CXCR3、TGFB1、ICOS、CXCL9、CD97、IL18RAP、CXCR6、ART1、IRF1、B7H3、ACE、IL18R1、TBX21、IL18、PDCD1、IFNG、GNLY、GATA3、VEGF、GZMB、LAT、CD4、IRTA2、IL10、TNFRSF4、THSD1およびPDCD1LG2。この群の生物学的マーカーの定量は、好ましくは、本発明の生体外予後診断方法の工程a)において、遺伝子発現分析法によって実施する。

本明細書において説明している生物学的マーカーの群から選ばれる少なくとも2種の生物学的マーカーの如何なる組合せも、本発明に包含される。

本発明方法のある種の実施態様においては、本明細書においては生物学的マーカーの“

セット”とも称し得る2種の生物学的マーカーの組合せを、工程a)において使用する。

遺伝子発現分析法により定量し得る生物学的マーカーの特定のセットは、以下の生物学的マーカーからなるセットからなる：PDCD1LG1、VEGF、TNFRSF6B、IRF1、IL8RAおよびSEL L。この生物学的マーカーのセットは、下記の実施例において開示しているように、高い統計的適応性を有している。

【0047】

生物学的マーカーを定量する一般的方法

本発明に包含される細胞タイプ、タンパク質タイプまたは核酸タイプの生物学的マーカーを定量する当業者にとって既知の任意の1つの方法を、本発明の癌予後診断方法を実施するのに使用し得る。即ち、サンプル中のタンパク質または核酸を検出または定量するための当該技術において周知の標準および非標準(新しい)方法の任意の1つを容易に使用し得る。

そのような方法は、核酸タイプの生物学的マーカーを核酸プローブまたはプライマーによって検出および定量することを含む。

また、そのような方法は、タンパク質タイプの生物学的マーカーを、核酸(例えば、周知のセレックス(Selex)法により結合するように選定した核酸)および抗体(抗体フラグメントを含む)のような上記マーカーに特異的に結合する任意のタイプのリガンド分子によって検出および定量することを含む。興味ある生物学的マーカーが酵素からなるある種の実施態様においては、これらの検出および定量方法は、相応する酵素活性を検出および定量することを含む。

とりわけ、抗体類、即ち、表2に列挙している生物学的マーカーのような本明細書において説明する生物学的マーカーは、全部ではないにしても殆どが現在のところ既に入手可能である。

さらに、抗体が所定の生物学的マーカーにとってまだ利用できない状況或いは所定の生物学的マーカーに対するさらなる抗体の産生を探索している状況においては、上記所定の生物学的マーカーに対する抗体は、抗体産生性ハイブリドーマの生成のような通常の方法によって容易に得ることができる。この方法においては、生物学的マーカータンパク質の完全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドを合成または分離する(例えば、当該タンパク質またはペプチドを発現させる細胞からの精製により、或いは当該タンパク質またはペプチドをコード化する核酸を、公知の方法を使用して、生体内または生体外で転写し、翻訳することにより)。脊椎動物、好ましくは、マウス、ラット、ウサギまたはヒツジのような哺乳類を、上記タンパク質またはペプチドを使用して免疫する。脊椎動物は、必要に応じて(好ましくは)、少なくともさらにもう1回、上記タンパク質またはペプチドで免疫して、脊椎動物が上記タンパク質またはペプチドに対して旺盛な免疫応答を示すようにし得る。脾細胞を免疫化脊椎動物から分離し、当該技術において周知の種々の方法のいずれか1つを使用して、不死化細胞系と融合させてハイブリドーマを形成させる。その後、この方法で形成させたハイブリドーマを、標準方法を使用して、スクリーニングし、上記生物学的マーカータンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合する抗体を産生する1種以上のハイブリドーマを同定する。本発明は、この方法により製造したハイブリドーマおよびそのようなハイブリドーマを使用して製造した抗体も包含する。ポリクローナル抗体も同様に使用し得る。

【0048】

本発明の生物学的マーカーの発現は、転写核酸またはタンパク質の発現を検出する多種多様な周知の方法のいずれか1つにより評価し得る。そのような方法の非限定的な例としては、分泌した細胞表面、細胞質または核タンパク質の免疫学的検出法；タンパク質精製法、タンパク質の機能または活性アッセイ法；核酸ハイブリッド化法；核酸逆転写法、および核酸増幅法がある。

1つの好ましい実施態様においては、マーカーの発現は、その通常の翻訳後修飾の全部または1部を受けているマーカータンパク質のようなマーカータンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合する抗体(例えば、放射線ラベル化、発色団ラベル化、フルオロ

10

20

30

40

50

フォアラベル化、ポリマーバックボーン抗体または酵素ラベル化抗体)、抗体誘導体(例えば、基質またはタンパク質-リガンド対(例えば、ビオチン-ストレプトタビジン)のタンパク質もしくはリガンドを接合させた抗体)または抗体フラグメント(例えば、一本鎖抗体、分離した抗体超可変ドメイン)を使用して評価する。

もう1つの好ましい実施態様においては、マーカーの発現は、mRNA/cDNA(即ち、転写ポリヌクレオチド)を患者腫瘍組織サンプル中の細胞から調製することにより、さらに、このmRNA/cDNAをマーカー核酸またはそのフラグメントの補体である参照ポリヌクレオチドでハイブリッド化することにより評価する。cDNAは、必要に応じて、参照ポリヌクレオチドとのハイブリッド化前に、種々のポリメラーゼ連鎖反応法の任意の1つを使用して増幅させ得る;好ましくは、cDNAは、増幅させない。

関連する実施態様においては、上記サンプルから得られた転写ポリヌクレオチドの混合物を、生物学的マーカー核酸の少なくとも1部(例えば、少なくとも7、10個、15個、20個、25個、30個、40個、50個、100個、500個またはそれ以上のヌクレオチド残基)と相補性または相同性のポリヌクレオチドを固定させた基質と接触させる。相補性または相同性のポリヌクレオチドが基質上で識別的に検出可能であれば(例えば、異なる選定位置の固定した異なる発色団またはフルオロフォアを使用して検出可能である)、その場合は、複数のマーカーの発現レベルを、単一の基質(例えば、選定した位置に固定したポリヌクレオチドの“遺伝子チップ”マイクロアレー)を使用して、同時に評価することができる。核酸相互のハイブリッド化を含むマーカー発現評価方法を使用する場合、ハイブリッド化は、緊縮ハイブリッド化条件下に実施するのが好ましい。

【0049】

腫瘍組織サンプル中の生物学的マーカータンパク質または核酸を検出および/または定量する例としての1つの方法は、腫瘍組織サンプル、例えば、(i) 包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心からの組織サンプル、(iii) 腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプル、(iv) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(v) 術前に行った腫瘍生検(例えば、処置後の患者のフォローアップのための)、および(vi) 遠隔転移を癌患者から取得することを含む。該方法は、上記生物学的サンプルを、ポリペプチドまたは核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNAまたはcDNA)を検出することのできる化合物または薬剤と接触させるさらなる工程を含む。本発明の検出方法は、そのように、例えば、生体外腫瘍組織サンプル中のmRNA、タンパク質、cDNAまたはゲノムDNAを検出することを使用することができる。例えば、mRNAの生体外検出方法は、ノーザンハイブリッド化および現場ハイブリッド化を含む。生物学的マーカータンパク質の生体外検出方法は、酵素免疫吸着測定法(ELISA)、ウェスタンブロット法、免疫沈降法および免疫蛍光法を含む。さらにまた、マーカータンパク質の生体内検出方法は、対象者に該タンパク質またはそのフラグメントに対して特異性のラベル化抗体を導入することを含む。例えば、抗体は、対象者内でのその存在および位置を標準の画像形成法によって検出し得る放射性マーカーでラベル化し得る。

そのような検出および/または定量アッセイの一般的原理は、生物学的マーカーとプローブを含有し得るサンプルまたは反応混合物を、該マーカーとプローブが相互作用し結合するのを可能にする適切な条件下に十分な時間で調製し、それによって、取出すことのできるおよび/または反応混合物中で検出することのできる複合体を形成させることを含む。

本明細書において使用するとき、用語“プローブ”は、特異的に意図したターゲット分子、例えば、生物学的マーカーによってコード化されたまたは該マーカーに相応するヌクレオチド転写物またはタンパク質に選択的に結合し得る任意の分子を称する。プローブは、当業者であれば、適切な生物学的調製物から合成または誘導し得る。ターゲット分子の検出目的においては、プローブは、本明細書において説明するように、ラベル化するように特異的に設計し得る。プローブとして使用し得る分子の例としては、限定するものではないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体および有機分子がある。

【0050】

これらの生物学的マーカーの検出および/または定量アッセイ法は、種々の方法で実施し得る。

例えば、そのようなアッセイを実施する1つの方法は、プローブを基体とも称する固相支持体上に固定し、この固相上に固定されたターゲットマーカー/プローブ複合体を反応終了時に検出することを含む。そのような方法の1つの実施態様においては、生物学的マーカーの定量についてアッセイすべき対象者からのサンプルを、担体または固相支持体上に固定させてもよい。もう1つの実施態様においては、プローブを固相に固定させ、対象者からのサンプルをアッセイの固定していない成分として反応させることができる逆の状況も可能である。

10

アッセイ成分を固相に固定させる多くの確立された方法が存在する。これらの方法としてが、限定するものではないが、ビオチンとストレプトタビジンの接合により固定されたマーカーまたはプローブ分子がある。そのようなビオチン化アッセイ成分は、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から、当該技術において既知の方法(例えば、ビオチン化キット; Pierce Chemicals社、イリノイ州ロックフォード)を使用して調製し、ストレプトタビジンコーティング96ウェルプレート(Pierce Chemicals社)のウェル中に固定し得る。ある種の実施態様においては、固定させたアッセイ成分を含む表面は、前以って製造して、保存することができる。

そのようなアッセイ用の他の適切な担体または固相支持体としては、マーカーまたはプローブが属する群の分子を結合することのできる任意の材料である。周知の支持体または担体としては、限定するものではないが、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、およびマグネタイトがある。

20

【0051】

アッセイを上記方法により実施するためには、固定していない成分を、第2成分を固定している固相に添加する。反応を終えた後、複合体化していない成分を、形成された全ての複合体は固相上に固定したままであるような条件で除去する(例えば、洗浄することによって)。固相に固定させたマーカー/プローブ複合体の検出は、本明細書において概略した多くの方法で達成し得る。

30

好ましい実施態様においては、プローブは、固定していないアッセイ成分である場合、検出およびアッセイの読出し目的において、本明細書において説明し且つ当業者にとっては周知である検出可能なラベルにより直接または間接的にラベル化し得る。

また、マーカー/プローブ複合体形成を、さらなる操作またはいずれかの成分(マーカーまたはプローブ)のラベル化もすることなく、例えば、蛍光エネルギー移動法を使用することによって直接検出することもできる(例えば、Lakowicz等の米国特許第5,631,169号、Stavrianopoulos等の米国特許第4,868,103号参照)。第1の‘供与体’分子上のフルオロフォアラベルを、適切な波長の入射光による励起時に、その発出された蛍光エネルギーが第2の‘受容体’分子上の蛍光ラベルによって吸収されて、今度は、この蛍光ラベルが吸収エネルギーに基づき蛍光を発し得るように選定する。また、‘供与体’タンパク質分子は、トリプトファン残基の自然蛍光エネルギーを単純に利用し得る。異なる波長の光を発出して‘受容体’分子ラベルを‘供与体’のラベルと識別し得るようなラベルを選定する。各ラベル間のエネルギー移動の効率は各分子を分離している距離と関連しているので、各分子間の、空間関係を評価することができる。結合が分子間で生じる場合には、アッセイにける‘受容体’分子ラベルの蛍光発出は最大でなければならない。FRET結合事象は、当該技術において周知の標準の蛍光検出手段によって好都合に測定し得る(例えば、蛍光測定計を使用して)。

40

もう1つの実施態様においては、プローブがマーカーを認識する能力を測定するのは、いずれのアッセイ成分(プローブまたはマーカー)もラベル化することなく、リアルタイム生体分子相互作用分析(BIA)のような方法を使用することによって達成し得る(例えば、Sj

50

olander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem.

63:2338-2345; および, Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct.

Biol. 5:699-705を参照されたい)。本明細書において使用するとき、“BIA”または“表面プラズモン共鳴”は、生体特異性相互作用を、相互作用物のいずれも(例えば、BIAコア)ラベル化することなく、リアルタイムで試験するための方法である。結合表面での質量の変化(結合事象を標示する)は、表面近くの光の屈折率の変化をもたらす(生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用し得る検出可能なシグナルを生じる表面プラズモン共鳴(SPR)の光現象)。

【0052】

また、もう1つの実施態様においては、同様な診断および予後診断アッセイは、液相中の溶質としてのマーカーおよびプローブによって実施し得る。そのようなアッセイにおいては、複合体化したマーカーとプローブを、複合体化していない成分から、限定するものではないが分画遠心法、クロマトグラフィー、電気泳動および免疫沈降法のような多くの標準方法の任意の1つによって分離する。分画遠心法においては、マーカー/プローブ複合体は、複合体化していないアッセイ成分から、複合体の異なるサイズおよび密度に基づく複合体の異なる沈降平衡による1連の遠心分離工程によって分離し得る(例えば、Rivas, G., and

Minton, A. P., 1993, Trends Biochem Sci. 18(8):284-7参照)。標準のクロマトグラフィー法を使用しても、複合体化分子を複合体化していない分子から分離し得る。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、分子をサイズにより分離し、カラムフォーマット内で適切なゲル濾過樹脂を使用することにより、例えば、比較的大きな複合体を比較的小きな複合体化していない成分から分離し得る。同様に、複合体化していない成分と比較したときのマーカー/プローブ複合体の相対的に異なる荷電特性も、複合体を複合体化していない成分から識別するのに、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂を使用することによって活用し得る。そのような樹脂およびクロマトグラフィー法は、当業者にとって周知である(例えば、Heegaard, N.

H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6):141-8; Hage, D. S., and Tweed, S. A. J Chromatogr B Biomed Sci Appl

1997 Oct. 10;699(1-2):499-525を参照されたい)。また、ゲル電気泳動を使用しても、複合体化アッセイ成分を未結合成分から分子し得る(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols

in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999を参照されたい)。この方法においては、タンパク質または核酸複合体を、例えば、サイズまたは電荷に基づき分離する。結合相互作用を電気泳動過程において維持するためには、非変性ゲルマトリックス材料および還元剤の存在しない条件は典型的に好ましい。また、SELDI-TOF法も活性表面とカップリングさせたマトリックスまたはビーズ上または抗体コーティング表面またはビーズ上で使用し得る。

特定のアッセイおよびその成分に対する適切な条件は、当業者にとって周知である。

【0053】

特定の実施態様においては、マーカーmRNAの量を、生物学的サンプル中で、当該技術において既知の方法を使用して、現場および生体外方式の双方によって測定し得る。用語“生物学的サンプル”は、対象者から分離した組織、細胞、生体液およびこれらの分離物、並びに対象者内に存在する組織、細胞および液体を包含するものとする。多くの発現検出方法は、分離したRNAを使用する。生体外方法においては、mRNAの分離に対しては選択しない任意のRNA分離方法を、結腸直腸癌由来のRNAの精製において使用し得る(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular

Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999参照)。さらに、多数量の組織サンプルは、例えば、Chomczynskiの1工程RNA分離法(1989年、米国特許第4,843,155号)のような当業者にとって周知の方法を使用して容易に処理し得る。

分離したmRNAは、限定するものではないが、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ

連鎖反応分析およびプローブアレー法のようなハイブリッド化および増幅アッセイにおいて使用し得る。mRNAレベル検出のための1つの好ましい診断方法は、分離したmRNAを、検出する遺伝子によってコード化されているmRNAにハイブリッド化し得る核酸分子(プローブ)と接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、長さにおいて少なくとも7、15、30、50、100、250または500個のヌクレオチドを有し、そして本発明のマーカをコード化するmRNAまたはゲノムDNAに緊縮条件下に特異的にハイブリッド化するに十分なオリゴヌクレオチドのような全長cDNAまたはその1部であり得る。本発明の予後診断アッセイにおいて使用するのに適する他のプローブは、本明細書において説明している。mRNAのプローブによるハイブリッド化は、当該マーカが発現したことを指標する。

1つの方式において、mRNAを、例えば分離したmRNAをアガロースゲル上に流し込み、mRNAをこのゲルからニトロセルロースのような膜に移すことによって固体表面に固定しプローブと接触させる。別の方式においては、プローブ(1種以上)を固体表面に固定し、mRNAを、プローブ(1種以上)と、例えば、Affymetrix遺伝子チップアレー内で接触させる。熟練技術者であれば、既知のmRNA検出方法を、本発明のマーカによりコード化されているmRNAの量の検出において使用するよう容易に適応化し得るであろう。

【0054】

サンプル中のmRNAマーカ量を測定する別の方法は、例えば、rtPCR (Mullisの米国特許第4,683,202号、1987年に示されている試験実施態様)、リガーゼ連鎖反応 (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193)、自律性配列複製 (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製 (Lizardi等の米国特許第5,854,033号)または他の任意の核酸増幅法による核酸の増幅工程、および、その後の増幅した分子の当業者にとって周知の方法を使用しての検出工程を含む。これらの検出方式は、核酸分子を、そのような分子が極めて少数しか存在しない場合に検出するのにとりわけ有用である。本明細書において使用するとき、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域(それぞれ、プラスおよびマイナスストランド; その逆も可能である)にアニーリングし且つ間に短領域を含有し得る核酸分子の対であると定義する。一般に、増幅プライマーは、長さで約10~30個のヌクレオチドであり、長さで約50~200個のヌクレオチドの領域にフランキングしている。適切な条件下に適切な試薬により、そのようなプライマーは、これらプライマーがフランキングしたヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

現場法においては、mRNAは、検出前に、結腸直腸癌から分離することを必要としない。そのような方法においては、細胞または組織サンプルは、既知の組織学方法を使用して調製/加工する。その後、サンプルを支持体、典型的にはガラススライド上に固定し、次いで、上記マーカをコード化しているmRNAにハイブリッド化し得るプローブと接触させる。

【0055】

マーカの絶対的発現量に基づき測定を行う別法として、測定は、マーカの標準化した発現量に基づき得る。発現量を、その発現をマーカでない遺伝子、例えば、構成的に発現するハウスキーピング遺伝子の発現と比較することによりマーカの絶対発現量を補正することによって標準化する。標準化用の適切な遺伝子としては、アクチン遺伝子、リボソーム18S遺伝子、GAPD遺伝子、または上皮細胞特異性遺伝子のようなハウスキーピング遺伝子がある。この標準化は、1つのサンプル、例えば、患者サンプル中ともう1つのサンプル、例えば、結腸直腸癌でないサンプル中での発現量或いは異なる源からのサンプル間の比較を可能にする。

また、発現量は、相対的発現量として提示し得る。マーカの相対的発現量を測定するには、そのマーカの発現量を、当該サンプルにおける発現量を測定する前に、正常対癌

細胞分離物の10以上のサンプル、好ましくは50以上のサンプルにおいて測定する。多数のサンプル中でアッセイした遺伝子各々の平均発現量を判定し、これをそのマーカーの基礎発現量として使用する。その後、試験サンプルにおいて測定したマーカーの発現量(絶対発現量)を、そのマーカーにおいて得られた上記平均発現値で除する。これによって、相対発現値を得る。

【0056】

本明細書において既に説明しているように、本発明の癌予後診断方法を実施するときに生物学的マーカータンパク質を検出および/または定量するための1つの好ましい薬剤は、そのような生物学的マーカータンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体、好ましく、検出可能なラベルを含む抗体である。抗体は、ポリクローナル、或いは、より好ましくはモノクローナルであり得る。完全抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体(例えば、FabまたはF(ab')₂)サブユニット2)を使用し得る。プローブまたは抗体に関しての“ラベル化”なる用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング(即ち、物理的に結合)させることによるプローブまたは抗体の直接のラベル化、並びに、直接ラベル化したもう1つの試薬による反応性によるプローブまたは抗体の間接ラベル化を包含するものとする。間接ラベル化の例としては、蛍光ラベル化二次抗体を使用する一次抗体の検出、およびDNAプローブを蛍光ラベル化ストレプトタビジンによって検出できるようにするDNAプローブのビオチンによる末端ラベル化がある。

種々の方式を使用して、サンプルが所定の抗体に結合する生物学的マーカータンパク質を含有するかどうかを判定することができる。そのような方式の例としては、限定するものではないが、酵素イムノアッセイ(EIA)法、ラジオイムノアッセイ(RIA)法、ウェスタンブロット分析法および酵素免疫吸着測定法(ELISA)がある。熟練技術者であれば、既知のタンパク質/抗体検出および/または定量法を、本発明に従う癌予後診断方法において使用するように容易に適応化し得るであろう。

1つの方式においては、抗体、或いは抗体フラグメントまたは誘導体を、ウェスタンブロット、SELDI-TOF(マトリックス上にカップリングさせた抗体-ビーズにより実施する)または免疫蛍光法のような方法において使用して、発現タンパク質を検出する。そのような使用においては、抗体またはタンパク質のいずれかを固相支持体上に固定させるのが好ましい。適切な固相支持体または担体としては、抗原または抗体を結合し得る任意の支持体がある。周知の支持体または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩およびマグネタイトがある。

当業者であれば、抗体または抗原を結合させる多くの他の適切な担体を知っているであろうし、そのような支持体を本発明による使用のために適応化し得るであろう。例えば、結腸直腸癌から分離したタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供してニトロセルロースのような固相支持体上に固定させ得る。その後、支持体を適切な緩衝液で洗浄し、次いで、検出可能なラベル化した抗体により処理する。その後、固相支持体を緩衝液で2回洗浄して未結合抗体を除去する。その後、固相支持体上の結合ラベルの量を、通常の手段により検出することができる。

【0057】

本発明の癌予後診断方法を実施する目的において生物学的マーカーを定量する最も好ましい方法を、以下に説明する。

組織マイクロアレイによる生物学的マーカーの定量

ある種の実施態様においては、生物学的マーカーまたは生物学的マーカーのセットは、当該技術において既知の組織マイクロアレイ法の任意の1つによって定量し得る。

組織マイクロアレイは、組織を通常の組織学パラフィンブロックから再配置して複数の患者またはブロックに由来する組織を同じスライド上で見られるようにする方法によって製造する。この製造は、ニードルを使用して標準の組織切片を生検し、このコアを受入れパラフィンブロック上のアレイに入れることによって実施する。この方法は、1987年、Wanによって最初に開示された(Wan, Fortuna and Furmanski ; Journal of

Immunological Methods)。組織マイクロアレーのある種の実施態様においては、組織コアを、ブロック内の特定の空間固定位置に配置する。この方法は、とりわけKononen等によって開示されている(Nature Medicine in 1998)。

組織アレー法は、パラフィン埋込み組織試験標本から小さな最低限の円筒状サンプルを獲得することを含む。その後、これらの円筒体を、もう1つのパラフィンブロック内に系統的な高密度グリッドに配列する。

例えば、(i)腫瘍の中心、(ii)浸潤性周辺部または(iii)局所リンパ節の生検サンプルの形としてのような腫瘍組織サンプルを、適切な数の個々人から入手し、ホルマリン固定し、パラフィン埋込み腫瘍組織ブロックとする。これらをTMAブロックに移す。複数のTMAブロックを同時に作成し得る。各TMAブロックを300倍まで区分化する；得られる全てのTMAスライドは、同じ配置位置に同じ組織を有する。個々のスライドは、組織形態を確認するためのH&E染色、mRNA現場ハイブリッド化、タンパク質免疫組織化学または遺伝子変化についてのDNA分析のような種々の分子分析において使用し得る。

【0058】

これらの円筒状腫瘍組織サンプルは小さい(直径0.4~1mm×高さ3~4mm)ので、1000個までの組織を、劣化および組織要件を最小にしながら、1個のパラフィンブロック内に配列し得る。さらにまた、これらのパラフィンブロックは、横方向に切断して数百枚の組織マイクロアレー切片とすることができ、その後、各々を種々の遺伝子分析において使用し得る。

分析速度の増大以外に、組織マイクロアレーは、本発明に従う癌予後診断方法の再現性および信頼性も確認し得る；何故ならば、数百の種々の組織サンプルを、同じスライド上で全て実質的に同一の方法で、並行して取扱い、調製し、染色し得るからである(Kallioniemi, O.; Wagner, U.; Kononen, J. and Sauter, G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Human Molecular Genetics (2001), 10, 657-662)。

典型的には、腫瘍の代表的な領域をパラフィン埋込み腫瘍組織ブロックから取出し、それによって腫瘍組織サンプルを取得する。その後、これらの腫瘍組織サンプルをもう1つの受入れパラフィンブロックに移し、そこでこれらのサンプルをスポット付けする。次いで、上記受入れパラフィンブロック内に配列した組織サンプルスポットを、さらなる分析用に、薄い切片、典型的には2~5μmの切片に切断する。

典型的には、さらなる分析においては、アレーの1枚の薄片、即ち、組織マイクロアレーを、先ず、興味ある1種の生物学的マーカーに対して特異性のラベル化抗体と一緒にインキュベートする。洗浄後、上記興味ある生物学的マーカーに結合したラベル化抗体を、ラベル化抗体が担持するラベルの種類、例えば、放射線、蛍光または酵素ラベルに応じた適切な方法によって明白化する。また、複数のラベル化も、とりわけ、2種以上の生物学的マーカーを定量する目的で2種以上のタンパク質特異性抗体を使用する実施態様において、同時に実施し得る。

組織マイクロアレーを使用して生物学的マーカーを定量する具体的な実施態様は、下記の実施例において開示している。

【0059】

通常の組織スライド(パラフィン埋込みまたは凍結試験標本)における免疫組織化学による生物学的マーカーの定量

ある種の実施態様においては、生物学的マーカーまたは生物学的マーカーのセットは、当該技術において既知の免疫組織化学法の任意の1つの方法により定量し得る。

その場合、分析は、(i) 包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心からの組織サンプル、(iii)

腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプルおよび(iv) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(vi)

遠隔転移において実施し得る。

また、分析は、好ましくは、腫瘍領域(上記で定義した)の組合せにおいても実施し得る。

典型的には、さらなる分析においては、腫瘍の1枚の薄片を、先ず、興味ある1種の生物学的マーカーに対して特異性のラベル化抗体と一緒にインキュベートする。洗浄後、上記興味ある生物学的マーカーに結合したラベル化抗体を、ラベル化抗体が担持するラベルの種類、例えば、放射線、蛍光または酵素ラベルに応じた適切な方法によって明白化する。また、複数のラベル化も同時に実施し得る。

フローサイトメトリー法による生物学的マーカーの定量

ある種の実施態様においては、生物学的マーカーまたは生物学的マーカーのセットは、当該技術において既知のフローサイトメトリー法の任意の1つの方法により定量し得る。

例えば、試験する腫瘍組織サンプル中に含まれる細胞を、先ず、機械的に分散させることにより抽出し、液媒中の細胞懸濁液を調製する。

その後、そのようにして得られた細胞を、定量すべき生物学的マーカー(1種以上)に対して特異性の抗体と一緒に適切な時間インキュベートする。

細胞懸濁液を洗浄して未結合抗体を除去した後、得られた細胞を、フローサイトメトリーを実施することにより、上記生物学的マーカーの各々を発現する細胞懸濁液中に存在する細胞総数の割合を定量する見地において分析する。

フローサイトメトリーを使用して生物学的マーカーを定量する具体的な実施態様は、下記の実施例において開示している。

【0060】

核酸増幅による生物学的マーカーの定量

ある種の実施態様においては、生物学的マーカーまたは生物学的マーカーのセットは、当該技術において既知の核酸増幅法の任意の1つの方法により定量し得る。

その場合、分析は、(i) 包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心(CT)からの組織サンプル、(iii) 腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプルおよび(iv) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(vi) 遠隔転移において実施し得る。

また、分析は、好ましくは、腫瘍顕微解剖後の腫瘍領域(上記で定義した)の組合せにおいても実施し得る。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、そのような生物学的マーカーの定量における高感度で強力な方法である。

本発明の癌予後診断方法を実施するときに生物学的マーカーを定量するのに適している核酸増幅法の任意の1つの方法を実施するには、ターゲットmRNAまたはターゲットcDNAと特異的にハイブリッド化するプライマーの対を必要とする。

興味あるターゲット核酸生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化するプライマーの対は、当該技術において既知の多くの方法の任意の1つの方法によって設計し得る。

ある種の実施態様においては、本発明の生物学的マーカーの各々について、少なくとも1対の特異性プライマー対並びに相応する検出核酸プローブは、とりわけ下記のインターネットアドレスの公的な“Quantitative PCR primer database”において既に示され、完全に説明されている：

<http://lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer>

他の実施態様においては、プライマーの特異性対は、Nakae等の米国特許第6,892,141号に開示された方法を使用して設計し得る；該米国特許の開示は、全て参考として本明細書に合体させる。

【0061】

PCR方法の多くの特定の適応化が、定性および定量検出の双方について当該技術において知られている。とりわけ、蛍光染料を使用して増幅させたPCR生成物を検出し定量する方法が知られている。均質PCRとしても知られている現場増幅および検出も、以前から開示されている。例えば、Higuchi et al., (Kinetics PCR Analysis:

10

20

30

40

50

Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions, Bio/Technology, Vol 11, pp 1026-1030 (1993)); Ishiguro et al., (Homogeneous quantitative Assay of Hepatitis C Virus RNA by Polymerase Chain Reaction in the Presence of a Fluorescent Intercalater, Anal. Biochemistry 229, pp 20-213 (1995)); および、Wittwer et al., (Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid cycle DNA Amplification, Biotechniques, vol.22, pp 130-138 (1997.))を参照されたい。

また、核酸を定量する多くの他の方法も開発されている(Southern, E. M., J. Mol. Biol.,

98:503-517, 1975; Sharp, P. A., et al., Methods Enzymol.

65:750-768, 1980; Thomas, P. S., Proc. Nat. Acad. Sci.,

77:5201-5205, 1980)。さらに最近、サンプル中の核酸の量を測定することのできるPCRおよびRT-PCR法も開発されている。1つの方法は、例えば、反応生成物のプラトー形成前の反応の対数期におけるPCR生成物量を測定する(Kellogg,

D. E., et al., Anal. Biochem. 189:202-208 (1990); および、Pang, S., et

al., Nature 343:85-89 (1990))。比較的一定量で全てのサンプル中に含まれる遺伝子配列をサンプル増幅効率標準化に利用している。しかしながら、この方法は、幾つかの欠点を有する。この方法は、各サンプルが等しい入力量の核酸を含むことおよびサンプル間の増幅効率が分析時まで同一であることを必要とする。さらにまた、ゲル電気泳動またはプレート捕捉ハイブリッド化のような通常のPCR定量方法を使用して、サンプルの全てがこの方法が必要とするような反応の対数期中に実際に分析されているかを判定するのは困難である。

【0062】

定量的拮抗(QC)-PCRと称するもう1つの方法は、名前が暗示するように、各反応物中に内部対照拮抗剤を含ませることに依存している(Becker-Andre, M., Meth. Mol. Cell Biol.

2:189-201 (1991); Piatak, M. J., et al., BioTechniques

14:70-81 (1993); および、Piatak, M. J., et al., Science

259:1749-1754 (1993))。各反応の効率を内部拮抗剤に標準化している。既知の量の内部拮抗剤を各サンプルに典型的に添加する。未知のターゲットPCR生成物を既知の拮抗剤PCR生成物と比較して相対的量を得る。この一般的方法における困難性は、同じ効率のターゲット分子と一緒に増幅する内部対照を開発することにある。

例えば、使用する核酸増幅方法は、リアルタイム定量PCR分析からなり得る。

リアルタイムまたは定量的PCR (QPCR)は、DNA、cDNAまたはRNAテンプレートの出発量の定量を可能にする。QPCRは、PCR生成物が増幅サイクル毎に集積するにつれて増大する蛍光レポーター分子の検出に基づく。蛍光レポーター分子としては、二本鎖DNA(即ち、SYBR Green I)または配列特異性プローブ(即ち、Molecular BeaconsまたはTaqMan[®] Probes)に結合する染料がある。

好ましい核酸増幅方法は、Therianos等の公開米国特許出願第2005/0089862号(該米国特許出願の開示は、全て参考として本明細書に合体させる)に開示されている方法のような多重定量PCR法を含む定量的PCR増幅方法である。

例えば、本発明の生物学的マーカーの定量においては、腫瘍組織サンプルは、生検収集後まもなく迅速凍結する。その場合、“腫瘍組織サンプル”、即ち、(i) 包括的な原発腫瘍(全体としての)、(ii) 腫瘍の中心からの組織サンプル、(iii) 腫瘍を直接取巻く組織(該組織はより具体的には腫瘍の“浸潤性周辺部”と称する)からの組織サンプル、(iv) 腫瘍に最も近い位置にあるリンパ節、(v)

術前実施の腫瘍生検(例えば、処置後の患者のフォローアップのための)、および(vi) 遠隔転移からの全RNAを分離し、定量する。その後、抽出し定量したRNAの各サンプルを逆転写し、得られたcDNAを、PCRにより、定量する各生物学的マーカーに対して特異性のプライマーの対を使用して増幅させる。対照のプライマー対、例えば、18S cDNAおよびGADPH

cDNA、または任意の他の周知の“ハウスキーピング”遺伝子と特異的にハイブリッド化するプライマー対を対照として同時に使用する。

核酸増幅法を使用して生物学的マーカーを定量する具体的な実施態様は、下記の実施例において開示している。

【0063】

癌予後診断キット

本発明は、患者の癌(例えば、腫瘍組織患者サンプルのようなサンプル中の)の予後を評価するためのキットも包含する。このキットは、複数の試薬を含み、その各々は、生物学的マーカー核酸またはタンパク質と特異的に結合し得る。マーカータンパク質と結合させるための適切な試薬としては、抗体、抗体誘導体、抗体フラグメント等がある。マーカー核酸(例えば、ゲノムDNA、mRNA、スプライスマRNAまたはcDNA等)と結合させるための適切な試薬としては、相補性核酸がある。例えば、核酸試薬としては、基体に固定させたオリゴヌクレオチド(ラベル化したまたはラベル化していない)、基体と結合させていないラベル化オリゴヌクレオチド、PCRプライマー対、分子ビーコンプローブ等があり得る。

従って、本発明のさらなる目的は、患者の癌進行の予後診断用のキットからなり、このキットは、上記患者の癌に対する適応的免疫応答の状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーを定量する手段を含む。

本発明のキットは、必要に応じて、本発明の方法を実施するのに有用なさらなる成分を含み得る。例えば、上記キットは、相補性核酸をアニーリングするのに適するまたは抗体を該抗体が特異的に結合するタンパク質と結合させるのに適する液体(例えば、SSC緩衝液)、1以上のサンプルコンパートメント、本発明の癌予後診断方法の性能を説明する使用説明材料等を含み得る。

【0064】

抗体を含むキット

ある種の実施態様においては、本発明に従うキットは、抗体の1種、組合せまたはセットを含み、これら抗体の各々の種は、本発明の1つの生物学的マーカーに対して特異性である。

1つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも2種類の抗体を含む組合せまたはセットを含み、抗体の各々の種は、CD3、CD8、GZMB、CD45RO、GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9、CXCL10、CD4、CXCR3、CXCR6、IL-18、IL-18Rベータ、フラクタルカイン、IL-23、IL-31、IL-15、IL-7、MIG、パーフォリン、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、LAT、ZAP70、CD5、CD2生物学的マーカーの1つの対して特異性の抗体からなる群から選ばれる。

本発明に従う抗体キットは、2~20種類の抗体を含み得、各々の種類の抗体は、本発明の1つの生物学的マーカーに対して特異性である。例えば、本発明に従う抗体キットは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種類の抗体を含み得、各々の種類の抗体は、本明細書において定義しているような1つの生物学的マーカーに対して特異性である。

本発明に従う生物学的マーカーに対して特異性の各種抗体は、CD3、CD8、GZMB、CD45RO、GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9、CXCL10、CD4、CXCR3、CXCR6、IL-18、IL-18Rベータ、フラクタルカイン、IL-23、IL-31、IL-15、IL-7、MIG、パーフォリン、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、LAT、ZAP70、CD5およびCD2からなる群から選ばれる生物学的マーカーに対して特異性の抗体を含む。

本発明に従う生物学的マーカーに対して特異性の各種抗体は、CCR5、CR7、CD103、CD119、CD120a、CD120b、CD122、CD127、CD134、CD14、CD152、CD154、CD178、CD183、CD184、CD19、CD1a、CD210、CD25、CD26、CD27、CD28、CD3、CD32、CD4、CD44、CD45、CD45Ra、CD45Ro、CD47、CD49d、CD5、CD54、CD56、CD62L、CD69、CD7、CD8、CD80、CD83、CD86、CD95、CD97、CD98、CXCR6、GITR、HLA-DR、ICOS、IFN γ RII、IL-18R α 、KIR-NKAT2、PD1、TCR $\alpha\beta$ およびTGFRIIからなる群から選ばれる生物学的マーカーに対して特異性の抗体を含む。これらの抗体の特定の実施態様は、下記の表3に列挙している。

また、特異性抗体によって検出し得る生物学的マーカーは、CD3、CD8、GZMB、CD45RO、

GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9、CXCL10、CD4、CXCR3、CXCR6、IL-18、IL-18Rベータ、フラクタルカイン、IL-23、IL-31、IL-15、IL-7、MIG、パーフォリン、TCR α β 、TCR γ δ 、LAT、ZAP70、CD5、CD2からなる生物学的マーカーの群から選ばれ得る。

ある種の他の実施態様においては、本発明に従うキットは、本発明の1種以上の生物学的マーカーと結合するリガンド対または特異性可溶性分子の1種、組合せまたはセットを含む。

【0065】

核酸プライマーを含むキット

ある種の他の実施態様においては、本発明に従うキットは、プライマー対の1種、組合せまたはセットを含み、これらプライマー対の各々の種は、本発明の1つの生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化する。

1つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも2種類のプライマー対を含むプライマー対の組合せまたはセットを含み、プライマー対の各々の種類は、CD8A-TBX21、CD3Z-CD8A、CD3Z-TBX21、B7H3-TGFB1、IFNG-TBX21、CD4-CD8A、CD8A、IFNG、CD4-TBX21、CD3Z-CD4、CD4-TGFB1、CD8A-GLNY、IFNG-IRF1、GLNY-IFNG、IRF1-TBX21、IL8-PTGS2、GLNY-TBX21、CD3Z-GLNY、CD3Z-IFNG、GZMB-IFNG、GLNY-IRF1、IL10-TGFB1、CD8A-IL10、CD4-IL10、CD8A-GZMB、GZMB-TBX21、CD3Z-GZMB、CD4-IRF1、GNLY-GZMB、B7H3-IL10、CD4-GZMB、GZMB-IRF1、IL10-TBX21、CD4-IFNG、B7H3-CD4、CD8A-TGFB1、CD3Z-IL10およびCD4-GNLY生物学的マーカーのうちの1つとハイブリッド化するプライマー対からなる群から選択し得る。

【0066】

もう1つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも2種類のプライマー対を含むプライマー対の組合せまたはセットを含み、プライマー対の各々の種類は、以下の生物学的マーカーのうちの1つとハイブリッド化するプライマー対からなる群から選ばれる：18s、ACE、ACTB、AGTR1、AGTR2、APC、APOA1、ARF1、AXIN1、BAX、BCL2、BCL2L1、CXCR5、BMP2、BRCA1、BTLA、C3、CASP3、CASP9、CCL1、CCL11、CCL13、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCNB1、CCND1、CCNE1、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、CD154、CD19、CD1a、CD2、CD226、CD244、PDCD1LG1、CD28、CD34、CD36、CD38、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD40LG、CD5、CD54、CD6、CD68、CD69、CLIP、CD80、CD83、SLAMF5、CD86、CD8A、CDH1、CDH7、CDK2、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEACAM1、COL4A5、CREBBP、CRLF2、CSF1、CSF2、CSF3、CTLA4、CTNNB1、CTSC、CX3CL1、CX3CR1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL9、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CYP1A2、CYP7A1、DCC、DCN、DEFA6、DICER1、DKK1、Dok-1、Dok-2、DOK6、DVL1、E2F4、EBI3、ECE1、ECGF1、EDN1、EGF、EGFR、EIF4E、CD105、ENPEP、ERBB2、EREG、FCGR3A、CGR3B、FN1、FOXP3、FYN、FZD1、GAPD、GLI2、GNLY、GOLPH4、GRB2、GSK3B、GSTP1、GUSB、GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、HLA-B、HLA-C、HLA-D、MA、HLA-DMB、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DPA1、HLA-DQA2、HLA-DRA、HLX1、HMOX1、HRAS、HSPB3、HUWE1、ICAM1、ICAM-2、ICOS、ID1、ifna1、ifna17、ifna2、ifna5、ifna6、ifna8、IFNAR1、IFNAR2、IFNG、IFNGR1、IFNGR2、IGF1、IHH、IKBKB、IL10、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL13RA2、IL15、IL15RA、IL17、IL17R、IL17RB、IL18、IL1A、IL1B、IL1R1、IL2、IL21、IL21R、IL23A、IL23R、IL24、IL27、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL31RA、IL4、IL4RA、IL5、IL6、IL7、IL7RA、IL8、CXCR1、CXCR2、IL9、IL9R、IRF1、ISGF3G、ITGA4、ITGA7、インテグリン、アルファE（抗原CD103、ヒト粘膜リンパ球、抗原1；アルファポリペプチド）、遺伝子hCG33203、ITGB3、JAK2、JAK3、KLRB1、KLRC4、KLRF1、KLRG1、KRAS、LAG3、LAIR2、LEF1、LGALS9、LILRB3、LRP2、LTA、SLAMF3、MADCAM1、MADH3、MADH7、MAF、MAP2K1、MDM2、MICA、MICB、MKI67、MMP12、MMP9、MTA1、MTSS1、MYC、MYD88、MYH6、NCAM1、NFATC1、NKG7、NLK、NOS2A、P2X7、PDCD1、PECAM-、CXCL4、PGK1、PIAS1、PIAS2、PIAS3、PIAS4、PLAT、PML、PP1A、CXCL7、PPP2CA、PRF1、PROM1、PSMB5、PTCH、PTGS2、PTP4A3、PTPN6、PTPRC、RAB23、RAC/RHO、RAC2、RAF、R

B1、RBL1、REN、Drosha、SELE、SELL、SELP、SERPINE1、SFRP1、SIRP ベータ 1、SKI、SLAMF1、SLAMF6、SLAMF7、SLAMF8、SMAD2、SMAD4、SMO、SMOH、SMURF1、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、SOD1、SOD2、SOD3、SOS1、SOX17、CD43、ST14、STAM、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6、STK36、TAP1、TAP2、TBX21、TCF7、TERT、TFRC、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TIMP3、TLR1、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF11A、TNFRSF18、TNFRSF1A、TNFRSF1B、OX-40、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF10、TNFRSF6、TOB1、TP53、TSLP、VCAM1、VEGF、WIF1、WNT1、WNT4、XCL1、XCR1、ZAP70およびZIC2。

【0067】

1つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも2種類のプライマー対を含むプライマー対の組合せまたはセットを含み、プライマー対の各々の種類は、以下の生物学的マーカーのうちの1つとハイブリッド化するプライマー対からなる群から選ばれる：TNFRSF6B、CEACAM1、PDCD1LG1、CD8A、PTGS2、BIRC5、SELL、INDO、IRAK4、TNF、TNFRSF10A、MMP7、LILRB3、CD3Z、TNFRSF8、GAPD、CXCL10、EBAG9、IL8、STAT1、CXCR3、TGFB1、ICOS、CXCL9、CD97、IL18RAP、CXCR6、ART1、IRF1、B7H3、ACE、IL18R1、TBX21、IL18、PDCD1、IFNG、GNLY、GATA3、VEGF、GZMB、LAT、CD4、IRTA2、IL10、TNFSF4、THSD1およびPDCD1LG2。

1つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも2種類のプライマー対を含むプライマー対の組合せまたはセットを含み、プライマー対の各々の種類は、以下の生物学的マーカーのうちの1つとハイブリッド化するプライマー対からなる群から選ばれる：CD3、CD8、GZMB、CD45RO、GLNY、TBX21、IRF1、IFNG、CXCL9、CXCL10、CD4、CXCR3、CXCR6、IL-18、IL-18Rベータ、フラクタルカイン、IL-23、IL-31、IL-15、IL-7、MIG、パーフォリン、TCR α β 、TCR γ δ 、LAT、ZAP70、CD5、CD2。

さらにもう1つの実施態様においては、上記キットは、核酸プライマーまたはプライマー対のセットまたは組合せを含み、各々のプライマーまたはプライマー対は、PDCD1LG1、VEGF、TNFRSF6B、IRF1、IL8RAおよびSELL生物学的マーカーとハイブリッド化する。

本発明に従うプライマーキットは、2~20種類のプライマー対を含み得、各々の種類のプライマー対は本発明の生物学的マーカーの1つと特異的にハイブリッド化する。例えば、本発明に従うプライマーキットは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種類のプライマー対を含み得、各々の種類のプライマー対は、本明細書において定義しているような1つの生物学的マーカーに対して特異的にハイブリッド化する。

とりわけ、興味ある1つの生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化する、少なくとも1対の特異性プライマー並びに相応する検出核酸プローブは、とりわけ下記のインターネットアドレスの公的な“Quantitative PCR primer database”において既に示され、完全に説明されている：

<http://lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer>

【0068】

抗癌治療のモニタリング

本発明の生物学的マーカーの発現レベルに対する薬剤(例えば、薬物化合物)の影響をモニターすることは、患者の適応的免疫応答の状態を経時的にモニターすることに当てはまる。例えば、生物学的マーカー発現に影響を与える薬剤の有効性を、抗癌治療を受けている患者の治療中にモニターし得る。

好ましい実施態様においては、本発明は、以下の工程を含むことを特徴とする、薬物(例えば、作用薬、拮抗薬、ペプチド擬態物、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子または他の薬物候補剤)による患者の治療の有効性のモニタリング方法を提供する：(i) 上記薬剤の投与前の患者から投与前サンプルを取得する工程；(ii) 上記投与前サンプル中の本発明の1種以上の選定した生物学的マーカーの発現レベルを検出する工程；(iii) 上記患者から1以上の投与後サンプルを取得する工程；(iv) 上記投与後サンプル中の上記生物学的マーカー(1種以上)の発現レベルを検出する工程；(v) 上記投与前サンプル中の上記

生物学的マーカー(1種以上)の発現レベルを上記投与後の1以上のサンプル中の上記マーカー(1種以上)の発現レベルと比較する工程;および、(vi)上記薬剤の患者への投与を相応に変更する工程。例えば、治療過程における生物学的マーカー遺伝子(1種以上)の発現の低下は、有効でない投与量および投与量増大の望ましさを指標し得る。逆に、生物学的マーカー遺伝子(1種以上)の発現上昇は、有効な治療および投与量変更の必要のないことを指標し得る。

【0069】

既に本明細書において説明しているように、本発明の癌予後診断方法の実施は、従来技術の方法を上回る正確さでもって、免疫療法のようなアジュバント療法の利益を受け得る腫瘍再発高リスク患者を標示し得る。

例えば、本発明の癌予後診断方法の終了時に、転移のない良好な予後または長い無病生存時間の予後を判定した場合、その後の抗癌治療は、何らのアジュバント化学療法を含まない。

しかしながら、本発明の癌予後診断方法の終了時に、転移のある悪い予後または短い無病生存時間の悪い予後を判定した場合、患者は、適切なアジュバント化学療法組成物の投与を受ける。

さらに、本発明の癌予後診断方法の終了時に、転移のある悪い予後または短い無病生存時間の悪い予後を判定した場合、患者は、インターロイキンのような免疫賦活化サイトカインまたはケモカインを含む製薬組成物のような適切な免疫賦活化用組成物の投与を受ける。

好ましい免疫賦活化サイトカインまたはケモカインは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-7、G-CSF、IL-15、GM-CSF、IFN- γ 、CXCL9、CXCL10、フラクタルカイン、MIG、IFN α 、IL-18、IL-12、IL-23およびIL-31からなる群から選ばれる。

従って、本発明は、癌患者における癌治療を適応化する方法にも関し、該方法は、下記の処置を含むことを特徴とする:

a) 上記患者から収集した少なくとも1種の腫瘍組織サンプルに対して、本明細書において開示する上記癌予後診断方法を実施する処置;

b) 上記癌患者の癌治療を、悪い癌予後が処置a)の終了時に判定された場合、上記患者にアジュバント化学療法または免疫賦活化療法を施すことにより適応化させる処置。

本発明のもう1つの目的は、患者の薬剤による治療(アジュバントまたは新アジュバント)の有効性をモニターするためのキットからなり、このキットは、上記患者の癌に対する適応的免疫応答の状態を標示する少なくとも1種の生物学的マーカーを定量する手段を含むことを特徴とする。

本発明を、以下の実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明をこれら実施例に限定するものではない。

【実施例】

【0070】

A. 各実施例における材料および方法

実施例1～4の材料および方法

A. 1. 患者およびデータベース

Laennec/HEGP Hospitalにおいて1986年～2004年の間に腫瘍の一次切除を受けている結腸直腸癌の全ての症例(n = 959)を再検討した。この選択されていないコホートにおける観察時間は、診断から最後の接触(死亡または最後のフォローアップ)までの間であった。データは、再発の無かった或いは死亡した患者の最後のフォローアップ時において検討されていた。フォローアップの平均期間は、44.5ヶ月であった。フォローアップの無かった6名の患者は、分析から除外した。組織病理および臨床知見は、下記の表1に開示しているように、UICC-TNM病期決定システム(Sobin LH,

Wittekind C, (eds). UICC TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002)に従って採点した。早期転移性浸潤は、血管塞栓の存在(VE)、リンパ節浸潤(LI)、または神経周囲浸潤(PI)として定義した。VELIPI陽性腫瘍は、これら

10

20

30

40

50

の病理知見の少なくとも1つを有し、一方、VELIPI陰性腫瘍は、上記3つの知見を有してなかった。腫瘍のTNMおよびVELIPI状態は、切除時の組織病理報告から決定した。信頼し得るウェブベースのデータベース、TME.データベース (Tumoral MicroEnvironment Database)を、Java (登録商標) -2 Enterprise-Edition (J2EE)を使用して3段構造物上に構築し、臨床データセットおよび結果を高処理法により統合した。

【0071】

前向きに連続した選定されていない患者コホートを示すLaennec/HEGP Hospitalにおいて1986年～2004年の間に一次切除を受けている959名の結腸直腸癌患者の記録を回顧的に再検討した。AJCC/UICC TNM病期、デュークス病期、腫瘍タイプのような通常の組織病理パラメーター並びに分化、リンパ節血管塞栓、神経周囲腫瘍浸潤(VELIPI)の度合は、表1に詳述している。アジュバントおよび緩和化学療法についてのデータは、記録されていた。5-フルオロウラシル(FU)系化学療法によるアジュバント療法は、327名の患者に施されていた(病期IIの疾病患者57名、病期IIIの疾病患者136名、病期IVの疾病患者134名)。

身体検査、血球数、肝機能試験、血清癌胎児性抗原、腹部超音波検査およびコンピュータ断層撮影検査、および胸部X線のような術後患者サーベイランスは、Laennec/HEGPおよび関連病院において、結腸癌患者における一般的な基準に従って患者全員に実施されていた。結腸鏡検査は、切除の1年後および正常な場合の3年毎に1回行われていた。腫瘍再発が疑われた場合、患者は、腹部コンピュータ断層撮影検査、磁気共鳴映像検査、胸部X線、結腸鏡検査、および該当する場合の生検を含む集中的精密検査を受けていた。

臨床知見、処置、組織病理報告およびフォローアップデータを前向きに収集し、更新し(A.Bにより)、TME.データベースに収録した。該データベースは、zlatko.trajanoski@tugraz.at. に対して申請したときにアクセス可能である。観察時間は、診断から最後の接触(死亡または最後のフォローアップ)までの間であった。データは、再発の無かった患者においては最後のフォローアップ時に或いは死亡時に検討されていた。フォローアップの平均期間は、44.5ヶ月であった。進行/死亡または最後のフォローアップまでの最低：最高値は、それぞれ、(0：214)ヶ月であった。フォローアップの無かった6名の患者は、分析から除外した。再発までの時間または無病時間は、再発患者においては手術日から確定腫瘍再発日まで、無病患者においては手術日から最後のフォローアップの日までの時間として定義した。

【0072】

A.2. 組織病理

各患者における腫瘍のH&E切片の全てを、結腸癌の病理に長じている2名の病理学者(D.D.、T.M.)または2名の研究者(F.P.、J.G.)により、以下の各々について盲検的に再評価した：(a) 腫瘍性リンパ浸潤物、(b) 浸潤性周辺部でのリンパ反応(患者当たり10～20領域分析)。これらの免疫浸潤物の密度を、上記研究者個々により、以下で開示するように、弱い(点数1)、中程度(点数2)または強い(点数3)として採点した。

TMAにより評価した415の腫瘍からの377の無作為に選択した腫瘍を、免疫細胞密度について再評価した。組織切片の再評価は、結腸癌の病理に長じている2名の病理学者(D.D.、T.M.)または2名の研究者(F.P.、J.G.)により個々に実施した。原発腫瘍の4枚の切片の平均数を分析した。分析領域は、上記領域を代表するものとして選定し、壊死性物質または膿腫からは距離があった。免疫浸潤物は、下記のようにして採点した：

(a) 腫瘍性リンパ浸潤物

腫瘍性リンパ浸潤物の密度は、腫瘍上皮および腫瘍周囲ストローマ内に分布した小円型リンパ球を5本の中出力視野(Nikon顕微鏡、×20対物)において計数することによって定量した。1(弱い)、2(中程度)または3(強い)と採点した免疫浸潤物密度は、それぞれ、上記群の16%、62%および22%において観察された。

(b) 浸潤性周辺部でのリンパ反応

進行性腫瘍(浸潤性周辺部)の最深点に隣接するリンパ球のカフ(cuff)を、明白(点数3)、明白でない(点数2)または無し(点数1)として判定した。1、2または3と採点したリンパ反応は、それぞれ、上記群の18%、60%および22%において観察された。

(c) 腫瘍の周囲を取巻くリンパ節

クローン様リンパ反応は、固有筋層外面(muscularis propria externa)と結腸周囲繊維-脂肪組織との界面において典型的に見出され、粘膜(例えば、憩室起源)または先在リンパ節のいずれにも関連しない浸潤癌の周囲を取り囲むリンパ凝集物(多くの場合、胚中心を有する)として定義した。切片内での2個の大きなリンパ凝集物がこの特徴の存在に必要であった(点数2)。2個よりも多い大リンパ凝集物を点数3として示し、一方、リンパ凝集物の1個のみまたは不存在的は、1と採点した。1、2または3として採点したリンパ結節密度は、それぞれ、上記群の38%、39%および23%において観察された。

【0073】

リアルタイムTaqman PCR分析

全RNAを、959症例コホートからの100の無作為に選択した凍結腫瘍試験標本から抽出した；十分な品質と量を有する75サンプルを、下記で開示しているように、定量的リアルタイムTaqMan-PCR(低密度アレー)および7900ロボット化PCR装置(Applied-Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ)を使用して、遺伝子発現について分析した。

組織サンプルは、手術後15分以内に急速凍結され、液体N₂中で保存されていた。上記コホートからの無作為に選択した凍結腫瘍試験標本(n = 100)をRNAについて抽出した。全RNAをRNeasy分離キット(Qiagen社、カリフォルニア州バレンシア)による均質化によって分離した。RNAの完全性と量を、バイオアナライザー

2100 (Agilent Technologies社、カリフォルニア州パロアルト)において評価した。75サンプルが、低密度アレー分析に対して十分なRNA品質と量を有していた。これらのサンプルは、上記コホートを代表し、全てを遺伝子発現分析において評価した。RT-PCR試験を、製造業者の使用説明書(Applied-Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ)に従い実施した。定量的リアルタイムTaqMan-PCRを、低密度アレーおよび7900ロボット化リアルタイムPCR装置(Applied-Biosystems社)を使用して実施した(詳細については、表2の遺伝子目録を参照されたい)。18SおよびGAPDHプライマーおよびプローブを、内部対照として使用した。データは、SDSソフトウェア v2.2 (Applied-Biosystems社)を使用して解析した。

組織サンプルは、手術後15分以内に急速凍結され、液体N₂中で保存されていた。上記コホート(n = 959)からの無作為に選択した凍結腫瘍試験標本(n = 100)をRNAについて抽出した。全RNAをRNeasy分離キット(Qiagen社、カリフォルニア州バレンシア)による均質化によって分離した。RNAの完全性と量を、バイオアナライザー2100 (Agilent Technologies社、カリフォルニア州パロアルト)において評価した。75サンプルが、低密度アレー分析に対して十分なRNA品質と量を有していた。これらのサンプルは、上記コホートを代表し、全てを遺伝子発現分析において評価した。RT-PCR試験を、製造業者の使用説明書(Applied-Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ)に従い実施した。定量的リアルタイムTaqMan-PCRを、低密度アレーおよび7900ロボット化リアルタイムPCR装置(Applied-Biosystems社)を使用して実施した(詳細については、表2の遺伝子目録を参照されたい)。18SおよびGAPDHプライマーおよびプローブを、内部対照として使用した。データは、SDSソフトウェア v2.2 (Applied-Biosystems社)を使用して解析した。

【0074】

大規模フローサイトメトリ分析

細胞を、39の新鮮腫瘍サンプルから機械的分散により抽出した。全ての細胞(腫瘍細胞を含む)を、フローサイトメトリにより分析した。新鮮腫瘍から離れている部位からの正常粘膜に由来する細胞も分析した。細胞を、免疫細胞マーカーに対する抗体と一緒に4℃で30分間インキュベートした(抗体目録についての表3を参照されたい)。分析は、4色FACS

CaliburフローサイトメーターおよびCellQuestソフトウェア(Becton Dickinson社、カリフォルニア州サンディエゴ)により実施した。免疫下位集団を、全細胞総数の百分率および全CD3+細胞数の百分率として測定した。平均連結階層的クラスタ分析

を適用し、結果は、GENESISプログラムを使用して表示した(Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. Bioinformatics 2002;18(1):207-8; Galon J, Franchimont D, Hiroi N, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. Faseb J 2002;16(1):61-71; <http://www.genome.tugraz.at>において利用可能なソフトウェア)。

組織マイクロアレーの構築

組織アレー装置(Beecher Instruments; ALPHELYS社、フランス国プレジール)を使用して、腫瘍の2つの代表的領域(中心および浸潤性周辺部)を、切除時に調製されていたパラフィン埋込み組織ブロックから取出した(それぞれ、0.6mmおよび1mm直径穿孔)。1990年～2003年に切除された結腸癌のうち、50%(415症例)を、組織マイクロアレーの構築用に無作為に選定した。T、N、M、VELIPI病理知見によれば、これらの腫瘍を有する患者は、上記コホート全体を代表していた。受入れパラフィンブロック内に配列した組織コアを、ハリスヘマトキシリン(HE)および免疫組織化学染色用に5 μ m切片に切断した。

【0075】

免疫組織化学

抗原を検索し、内生ペルオキシダーゼ活性を失活させた後、切片を、CD45ROおよびCD3に対するモノクローナル抗体(Neomarkers社、カリフォルニア州フレモント)と一緒にインキュベートした(室温で60分間)。エンビジョン+系(二次抗体に結合させた酵素接合ポリマー主鎖)およびDAB色原体を使用した(Dako社、デンマーク国コペンハーゲン)。組織切片をハリスヘマトキシリンにより対比染色した。イソタイプ整合マウスモノクローナル抗体を陰性対照として使用した。各スライドを、画像分析ワークステーション(Spot Browser^R、ALPHELYS社)を使用して分析した。多染性高解像力スポット画像(740 $\times$ 540ピクセル、1.181 μ m/ピクセル解像力)を得た($\times$ 100倍率)。測定値は、組織表面単位当りの陽性細胞数として記録した。

統計解析

Kaplan-Meier曲線を使用して、全生存率および無病生存率に対する早期転移浸潤(VELIPI)の病理兆候の影響を評価した。各種臨床パラメーターの有意性は、ログランク検定を使用する単変量解析により評価した(表1)。Cox比例ハザードモデルを使用して、単変量解析においては有意であることが判明している全ての共変量の生存率(全および無病)に対する同時影響を検定した。同じ検定を使用して、CD45RO密度(細胞数/mm²)の全および無病生存率に対する効果を、単独で、または腫瘍、結節および転移(T、N、M)病期決定共変量と一緒に評価した。Anova-t検定およびWilcoxon-Mann-Whitney検定は、VELIPI陽性およびVELIPI陰性腫瘍間で有意に異なる発現によってマーカーを同定するのに使用したパラメトリックおよび非パラメトリック検定であった。遺伝子発現レベルおよびCD45RO密度の対数の正規性は、Shapiro検定を使用して判定した。Wilcoxon検定は、種々の患者群に亘っての中央値生存率間の差異の有意性を評価するのに使用した。全ての検定は、両側であった。P値 <0.05を統計的に有意であるとみなした。全てのP値を、多重補正調整なしで報告している。全ての解析を、統計ソフトウェアRおよびStatviewにより行った。

【0076】

実施例5の材料および方法

A.3. 患者およびデータベース

Laennec-HEGP Hospital群において1990年～2003年の間に腫瘍の一次切除を受けていた415名の結腸直腸癌(CRC)患者の記録を再検討した。Laennec-HEGP Hospital群からのこれら415名の患者は、本研究の主対象者であった(表1 1～S1)。

パラフィン埋込み腫瘍サンプルは、Avicenne Hospitalにおいて1996年～2001年の間にCRCを有すると診断された150名の連続する患者から入手できた。最後に、フォローアップも失くしてなく利用可能な2つの腫瘍領域からの生検サンプル(組織マイクロアレースポット)を有するこれらのバリデーション群の119名の患者を、生存率分析において評価した

。Avicenne Hospitalからのこれら119名の患者(それぞれ、UICC-TNM病期I、II、IIIおよびIVを有する12名、33名、48名および26名の患者)は、第1のバリデーション群であった。

Laennec-HEGP Hospital群からの75名の患者由来の凍結腫瘍サンプルは、遺伝子発現分析用に選定した。これらの患者は、主要群の415名の患者とは異なる。この群の75名の患者(それぞれ、UICC-TNM病期I、II、IIIおよびIVを有する6名、17名、24名および28名の患者)から、利用可能な2つの腫瘍領域からの生検サンプル(組織マイクロアレースポット)を有する69名の患者からのパラフィン埋込み腫瘍サンプルを、生存率分析において評価した。Laennec-HEGP Hospital群からのこれら69名の患者は、第2のバリデーション群であった。

これらのコホートにおける観察時間は、診断から最後の接触(死亡または最後のフォローアップ)までの間であった。データは、再発の無かった患者においては最後のフォローアップ時に或いは死亡時に検討されていた。主要群の平均フォローアップ期間は、45.3ヶ月であった。進行/死亡または最後のフォローアップまでの最低：最高値は、それぞれ、(0：166)ヶ月であった。再発までの時間または無病時間は、再発患者においては手術日から確定腫瘍再発日まで、無病患者においては手術日から最後のフォローアップの日までの時間として定義した。組織病理および臨床知見は、UICC-TNM病期決定システムに従って採点されていた(L.

Sobin, C. Wittekind, TNM classification of malignant tumors. 6th, Ed. (Wiley-Liss, New York, 2002))。術後患者サーベイランスは、Laennec-HEGP、Avicenneおよび関連病院群において、CRC患者に対する一般的基準に従って患者全員に実施されていた。アジュバント化学療法は、病期IIIのCRCを有する患者、高リスク病期IIのCRCに対して施され、緩和化学療法は、進行性結腸直腸癌を有する患者(病期IV)および腫瘍の完全切除がなされていない患者に対して施されていた。アジュバント化学療法は、フルオロウラシル(FU)系であった。フォローアップデータを前向きに収集し、更新した。信頼し得るウェブベースのデータベース、TME.データベース (Tumor MicroEnvironment Database)を、Java (登録商標) -2 Enterprise-Edition (J2EE)を使用して3段構造物上に構築し、臨床データと高処理法によるデータを統合した。

【0077】

A.4. 組織病理

リアルタイムTaqman PCR分析

リアルタイムTaqman PCR分析は、上記実施例1～4の材料および方法において記載したようにして実施した。

組織マイクロアレーの構築

組織マイクロアレーの構築は、上記実施例1～4の材料および方法において記載したようにして実施した。

免疫化学

組織マイクロアレー切片を、CD3 (SP7)、CD8 (4B11)、CD45RO (OPD4)、GZMB (GrB-7)、サイトケラチン(AE1/AE3)およびサイトケラチン-8 (Neomarkers社、カリフォルニア州フレモント)に対するモノクローナル抗体と一緒にインキュベートした(室温で60分間)。エンビジョン+系(二次抗体に結合させた酵素接合ポリマー主鎖)およびDAB色原体を使用した(Dako社、デンマーク国コペンハーゲン)。二重染色は、リン酸塩接合二次抗体とファストブルー(FastBlue)色原体によって明確化された。単染色においては、組織切片をハリスヘマトキシリンにより対比染色した。イソタイプ整合マウスモノクローナル抗体を陰性対照として使用した。各スライドを、画像分析ワークステーション(Spot Browser^R、ALPHELYS社)を使用して分析した。多染色性高解像力スポット画像(740×540ピクセル、1.181μm/ピクセル解像力)を得た(×100倍率)。密度は、単位組織表面積当りの陽性細胞数として記録した。各複製において、平均密度を統計解析において使用した。

各腫瘍において、スポットの複製は、各腫瘍領域(CTおよびIM)において染色細胞密度の

良好なレベルの均質性を示していた。腫瘍領域(CT/IM)間での免疫浸潤物の不均質密度(Hi LoおよびLoHi)は、CD3、CD8、CD45ROおよびGZMB細胞密度についてそれぞれ評価した腫瘍の37%、33%、47%、36%において存在していた。

【0078】

統計解析

ジェネシスクラスタリングソフトウェア(J. Galon et al., 2002, Faseb J, Vol. 16 : 61)を使用して、図1に示す相関マトリックスを可視化し、ピアソン非集中階層的クラスタ分析を行った。pvクラスタRパッケージを使用して、判明クラスタを検証した。

カプラン・メイヤーの生存推定量を使用して、生存曲線を可視化し、OSおよびDFSの2年、4年および5年における中央値75位パーセンタイルおよび生存率の推定量を得た。ログランク検定を使用して異なる群の患者間の無病および全生存率を比較した。RT-PCRにより測定したマーカーにおいては、中央値発現量をカットオフとして採用し、変数を二分した。TMA (CD3、CD45RO、CD8、GZM)を使用して2つの異なる領域(CTおよびIM)においてさらに試験した4種のマーカーにおいては、“最小P値”法を使用して、無病生存転帰の関連する患者群間で最良の分離を提供するカットオフを得た。CD3、CD8、CD45RO、GZMB細胞密度におけるカットオフ値は、それぞれ、腫瘍中心において370、80、80、30細胞/mm²、浸潤性周辺部において640、300、190および60細胞/mm²であった。この方法で得られたP値は重大な過剰適合を示し得るので、DFSログランクP値は、Altman等が提案した式を使用して補正した(D.G.

Altman et al., 1994, J. Natl Cancer Inst, Vol. 86 : 829)。さらに、DFSおよびOSログランクP値は、2倍クロス確認を使用して算出した(D. Faraggi et al., 1996, Stat Med, Vol.

15 : 2203)。100回の繰返しを行った(分類変量に対して層化してまたは層化しないで)。中央値P値は、表13～14(S4～S5)および16～17(S7～S8)に要約している。

多変量Cox比例ハザードモデルを、CD3_{CT}CD3_{IM}併用領域マーカーに当てはめて、伝統的組織病理学腫瘍マーカーによる調節後のその危険率を判定した。Coxモデルは、UICC-TNM I、II、IIIを示す患者のみに当てはめて、共通ベースラインハザード関数を担保した。DFSモデルからの危険率は、Hollander等が提案しているようなリーブ・ワン・アウトクロス確認(leave-one-out cross-validation)により推定した縮小係数(Shrinkage factor)を使用して補正した(N. Hollander et al., 2004, Stat Med, Vol.

23 : 1701)。中央値をカットオフとして使用するモデルは、表14～15および18～19に提示している。さらに、興味あるマーカーは、興味あるマーカーをその本来の連続尺度で考慮したときは、独立した予後因子であった(データは示していない)。

明細書全体を通して、<0.05のP値を、統計的に有意であるとみなした。解析は、全て、統計ソフトウェアR (生存パッケージ)およびStatviewにより行った。

【0079】

B. 結果

実施例1：臨床転帰と適応的免疫応答との相関

1.1 早期転移浸潤および臨床転帰

早期転移浸潤(VELIPI)を示す血管塞栓(VE)、リンパ浸潤(LI)および神経周囲浸潤(PI)の存在の予後診断の意義を、959名の結腸直腸癌患者の単変量解析によって研究した。VE、LI、PIおよびVELIPI、並びにT、N、M病期は、無病および全生存率の有意に影響していた(P<0.001) (表1)。

5年無病生存率は、それぞれ、VELIPI陰性腫瘍を有する患者において32.4%、VELIPI陽性腫瘍を有する患者において12.1%であった。また、差異は、無病生存期間中央値においても観察された(VELIPI陽性腫瘍およびVELIPI陰性腫瘍において、それぞれ、3.3対26.9ヶ月、P<0.001)。同様なパターンは、全生存率においても見出された(表1)。

さらにまた、早期転移浸潤の1以上の兆候の存在は、悪い予後を与えていた。カプロン・メイヤー曲線は、VELIPI陽性腫瘍を有する患者におけるよりもVELIPI陰性腫瘍を有する患者においてより長い全生存および無病生存を示唆していた(ログランク検定、P<0.001)

。VE、LIまたはPIは、NおよびM病期と相関していた(全ての比較において $P<0.001$)。生存に対する全ての有意な共変数の影響を、Cox比例ハザードモデルを使用して同時に検定した。TNM病期決定について調整する多変数解析により、VELIPI状態が良好な予後と有意に且つ非依存的に関連していることを確認した(全および無病生存それぞれにおいて $P=0.04$ および $P=0.01$)。デュークス病期決定についての調整では、VELIPI状態は、良好な予後と非依存的に関連していた(全および無病生存それぞれにおいて $P=0.007$ および $P=0.002$)。

【0080】

1.2 免疫細胞浸潤、炎症、早期転移浸潤および予後

結腸直腸腫瘍(n=377)を、腫瘍内および浸潤性周辺部内の免疫細胞浸潤物について組織病理学的に評価した。

強い免疫浸潤物の存在(点数3)は、VELIPI陰性腫瘍に関連していた。

75例の結腸直腸腫瘍における炎症誘発性および免疫抑制性分子に対するmRNAを、低密度アレー定量的リアルタイムPCRにより測定した。炎症誘発性メディエーター(IL-8、VEGF、CEACAM-1、MMP-7、Cox-2およびトロンプスポンジン-1)または免疫抑制性分子(TGF β 、IL-10、B7-H3およびCD32b)に対するmRNA含有量とVELIPI状態または再発との有意な関係は、見出せなかった(図1、データは示していない)。

T細胞は、T-betまたはGATA-3の発現後、T_H1またはT_H2細胞にそれぞれ分化する。防御免疫応答は、表現型CD8⁺、CD45RO⁺、CCR7⁻、CD62L⁻、パーフォリン⁺、グラニュリシン⁺、グランザイム-B⁺を有するエフェクター記憶T細胞により介在される。これらの細胞は、細胞毒性メディエーターを放出することにより、抗原刺激に対し即時のエフェクター機能を発揮する。図1に示すように、CD8 α 、グラニュリシンおよびグランザイム-Bは、VELIPI陰性腫瘍においては上昇し、再発のなかった患者からのそのような腫瘍においては、再発のあった患者からのVELIPI陽性腫瘍と比較したとき、さらに上昇していた($P<0.05$)。

さらにまた、再発のなかった患者からのVELIPI陰性腫瘍は、再発のあった患者からのVELIPI陽性腫瘍と比較して、T_H1メディエーターT-bet、IRF-1およびIFN- γ の有意の上昇を有していた($P<0.05$)。対照的に、T_H2転写因子、GATA-3は、いずれの群の患者においても上昇していなかった(図1)。

【0081】

実施例2：腫瘍浸潤性免疫細胞の表現型

39例の新鮮切除結腸癌からの免疫細胞の下位集団を、大規模フローサイトメトリーにより分析した。分析を純化するために、410の種々の組合せの表面マーカーをFACSによって測定し、結果を、最低から最高発現までプロットした。

T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞およびマクロファージを、腫瘍のVELIPI状態との関連で分析した。CD3⁺T細胞が、最も有力な腫瘍浸潤性免疫細胞であった。CD3⁺、CD3⁺CD4⁺およびCD3⁺CD8⁺ T細胞は、VELIPI陽性腫瘍と比較して、VELIPI陰性腫瘍において有意に上昇していた(それぞれ、2.6、2.5、4.9倍上昇、 $P<0.05$)。

T細胞下位集団の表現型および官能性マーカーの大規模分析(腫瘍から分離した集団全体中およびCD3⁺T細胞集団中での陽性細胞のパーセント)は、65の種々の組合せのマーカーにおいてVELIPI陰性およびVELIPI陽性腫瘍間の有意差($P<0.05$)を明らかにしていた。段階的

クラスタ分析(Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(25):14863-8)は、VELIPI陽性腫瘍における均質パターンを示しており、一方、VELIPI陰性腫瘍の2つの下位群を識別し得た。

T細胞分化過程の未熟ものからエフェクター記憶T細胞までの全てのマーカー(CD45RO、CD45RA、CD27、CD28、CCR7、CD127)が、識別的に発現したマーカーのクラスタ内に存在していた。T細胞の移行(CD62L⁻、CCR7⁻、CD103、CD49d、CXCR3)および活性化(HLA-DR、CD98、CD80、CD86、CD134)の各マーカーも、VELIPI陰性およびVELIPI陽性腫瘍腫瘍間で識別的に発現していた。

結果は、未熟T細胞(CD3+CCR7+)が腫瘍中では稀であることを示していた。対照的に、早期記憶T細胞(CD45RO+CCR7-CD28+CD27+)からエフェクター記憶T細胞(CD45RO+CCR7-CD28-CD27-)までの分化経路においては、全ての下位集団が検出された。VILIPI陽性腫瘍と比較すると、VILIPI陰性腫瘍は、これらT細胞を有意に多く含んでいた($P<0.05$)。結果は、VILIPI陰性腫瘍における成熟CD8+ T細胞の高割合を示していた。腫瘍とは対照的に、同じ患者のからの離れた正常粘膜は、VELIPI状態に応じたCD8+T細胞下位集団の差異を示していなかった。

【0082】

実施例3：エフェクター記憶T細胞および生存率

415例の結腸直腸癌から製造した組織マイクロアレイにおける免疫組織化学分析を実施した。抗-CD3抗体による染色は、腫瘍の内部および浸潤性周辺部の双方におけるT細胞の存在を明らかにした。CD45RO+細胞は、自動画像ソフトウェアによって計数した。バリデーション試験は、光学および自動細胞計数間に近い相関を示した($R^2=0.914$, $P<0.001$)。

VELIPI陰性腫瘍は、VILIPI陽性腫瘍と比較したとき、多数のCD45RO細胞を含んでいた($P=0.02$)。さらに、高密度の記憶T細胞は、リンパ節陰性(N-)および転移陰性(M-)腫瘍と関連していた($P<0.001$)。

リンパ節浸潤の進行性病期(N2、N3)は、腫瘍中でのCD45ROの低密度に関連していた(図2)。

多変数Cox比例ハザード解析は、M ($P<0.001$)、N ($P=0.002$)およびT ($P=0.004$)、並びにCD45RO ($P=0.02$) が、全生存率に対する独立した予後因子であることを示していた。カプラン・メイヤー曲線は、低密度のCD45ROを有する患者におけるよりも高密度CD45ROを含有する腫瘍を含む患者において、長い全生存および無病生存を示唆していた(図3A、3B) (ログランク検定、 $P<0.001$)。腫瘍が高密度のCD45ROを含有している患者は、低密度のCD45ROを有する患者におけるそれぞれ11.1ヶ月および20.6ヶ月と比較したとき、36.5ヶ月の無病生存中央値および53.2ヶ月の全生存中央値を有していた(全比較において $P<0.001$) (図3A、B3)。5年全生存(図3A)および無病生存(図3B)率は、高密度のCD45ROを含有する腫瘍を有する患者においては46.3%と43.1%、低密度のCD45ROを含有する腫瘍を有する患者においては23.7%と21.5%であった。

【0083】

上記実施例1～3の結果は、959例の結腸直腸癌における早期転移浸潤(血管塞栓(VE)、リンパ浸潤(LI)および神経周囲浸潤(PI)、(集約してVELIPIと称する)の病理兆候と転帰の間に関連が存在することを示している。

また、腫瘍のVELIPI状態と腫瘍内での免疫応答の痕跡との間の関連の存在を証明している。とりわけ、39例の結腸直腸癌の分析は、CD3、CD8、CD45RO、CCR7、CD28およびCD27マーカーに特徴を有する腫瘍内エフェクター記憶T細胞の存在がVELIPI陰性腫瘍と関連していることを示していた。415例の結腸直腸癌の分析は、高密度の浸潤性CD45RO+細胞が良好な臨床転帰と相関していることを示していた。

本発明における1連の959例の結腸直腸癌においては、細心の病理試験により検出された塞栓は、VELIPI状態と全生存率間の有意で独立した関連を示していた。

上記実施例1～3においては、VILIPI陽性およびVILIPI陰性腫瘍中或いは再発のあったまたはなかった患者からの腫瘍中の炎症誘発性および免疫抑制性分子に対するmRNAの含有量における有意差は、見出せなかった。これらの知見は、炎症が早期転移浸潤における要因ではないことを示唆していた。

対照的に、 T_H1 エフェクターT細胞(CD8、T-bet、IRF-1、IFN- γ 、グラニュリシンおよびグランザイム-B)の産生物およびマーカーに対するmRNAは上昇しており、この上昇は、長期の生存および早期転移浸潤の病理兆候の無いことと関連していた。

組織マイクロアレイを使用して、高数のCD45RO+T細胞と、リンパ血管および神経周囲浸潤の不存在との関連($P<0.002$)を、上記実施例1～3において証明した。高密度のエフェクター記憶T細胞を含有する腫瘍は、そのような細胞を欠如する腫瘍よりも長い無病およ

10

20

30

40

50

び全生存率と関連していた($P<0.001$)。腫瘍中のCD45RO陽性記憶T細胞の存在は、独立した予後因子である。

【0084】

実施例1～3においては、結腸直腸癌における細胞および分子の差異の高処理量定量測定は、腫瘍微細環境の詳細な特性決定および臨床転帰との関連の特定を可能にした。試験結果は、腫瘍微細環境と宿主免疫応答が腫瘍進行において多大な重要性を有することを示している。

即ち、上記実施例1～3においては、単変量解析により、早期転移浸潤の組織学的兆候の存在または不存在に応じた無病および全生存率における有意差($P<0.001$)が示されたことを証明している。多変量Cox解析によれば、病理学的病期(T、N、M) ($P<0.001$)および早期転移浸潤($P=0.04$)とは、生存率と個々に関連していた。早期転移浸潤の兆候の無い腫瘍は、免疫細胞の浸潤物を含み、 T_H1 エフェクターT細胞(CD8、T-bet、IRF-1、IFN- γ 、グラニュリシンおよびグランザイム-B)の産生物に対するmRNAを上昇させていた。

対照的に、炎症誘発性メディエーターまたは免疫抑制性分子のいずれも識別的に発現していなかった。転移浸潤の早期兆候を有するまたは有しない腫瘍においては、65組のT細胞マーカー組合せにおいて有意差が存在し、階層的クラスタ分析は、T細胞移行、活性化および分化のマーカーがこれらの兆候を欠く腫瘍において上昇していること示していた。

これらの腫瘍は、早期記憶(CD45RO+CCR7-CD28+CD27+)からエフェクター記憶(CD45RO+CCR7-CD28-CD27-)までのT細胞範囲の増大した数のCD8陽性T細胞を含有していた。免疫組織化学によって評価した浸潤性記憶CD45RO+細胞の存在は、早期転移浸潤、病理学的病期および生存率に相関していた。

従って、結腸直腸癌中での免疫応答兆候は、早期転移浸潤病理痕跡の無いことおよび長期生存と関連していることを証明している。

【0085】

実施例4：(i)適応的免疫応答と(ii)再発および生存時間との相関

結腸直腸癌中での宿主応答の機能的配向を、18種の免疫関連遺伝子の評価による定量的リアルタイムPCRによって調べた。これらの遺伝子は、試験した75例の腫瘍の中から可変的に発現させた。

全ての遺伝子間で行った相関解析(153回の相関検定を示す)は、39組の高有意性組合せ($P<0.0001$)を含む70組の有意性組合せ($P<0.05$)を示した(図4参照)。

相関マトリックスを作成し、次いで、全ての相関における類似性および相違性パターンを可視化する好都合な方法を提供する非監視(unsupervised)階層的クラスタ分析を行った。この分析は、 T_H1 (T-bet、IRF-1、IFN- γ)および免疫適応(CD3 ζ 、CD8、GLNYおよびGZMB)関連遺伝子からなる共調節遺伝子の主要クラスタ、並びに炎症誘発性メディエーターおよび免疫抑制性メディエーターと称する2つのクラスタの同定を可能にする。

各クラスタの発現パターンは、腫瘍内で、ほぼ共通して排他的であった。 T_H1 /適応性クラスタ由来の遺伝子の発現量は再発に逆相関しており、一方、他(VEGF、MMP-7、Cox-2、IL-8、サバイビン、CEACAM1、TRAIL-R、B7H3、IL-10、TGFB)は、逆相関していなかった。

75例の結腸直腸癌を T_H1 /適応性クラスタ由来の遺伝子のmRNA量(最高から最低の発現量)に従って分類する階層的3構造は、20%から80%までの累進的再発率を示していた(群1と群2を比較するフィッシャーの精密検定、 $P=0.016$)。腫瘍中で T_H1 /適応性遺伝子発現の均質な上昇パターンを有する患者は、最良の予後と関連していた。

要するに、これらのデータは、臨床転帰に対する現場 T_H1 /適応的免疫の有益な効果についての証拠を提供していた。

【0086】

その後、免疫適応性遺伝子発現プロファイルの細胞最終結果を、415例の腫瘍の免疫組織化学による組織マイクロアレー分析によって評価した。

さらにまた、現場適応的免疫応答の分布を、腫瘍中心(CT)を浸潤性周辺部(IM)と一緒にスポッティングすることによって探究した。

両腫瘍領域において、全Tリンパ球(CD3)、CD8 T細胞エフェクターおよび関連細胞毒性

分子(GZMB)、並びに記憶T細胞(CD45RO)の免疫染色は、試験した全てのサンプルにおいて広範囲の陽性免疫細胞密度を示していた。

6640例の相応する免疫染色物を、正確な細胞密度測定を可能にする、シグナル定量(取込みスポット)用の専用画像分析ワークステーションによって分析した。

バリデーション試験は、光学および自動細胞計数間で近い相関を示した(全てのマーカーにおいて $R^2>0.9$ 、 $P<0.001$)。

特定領域における免疫細胞分布を、臨床転帰と関連させて分析した。再発の無かった患者からの腫瘍は、再発の有った患者からの腫瘍よりも、各腫瘍領域(CTまたはIM)における有意に高い免疫細胞密度(CD3、CD8、CD45RO、GZMB)を有していた(全て $P<0.003$) (図4)

コンピュータシグナル定量化に基づき、無病および全生存時間について患者を区別するための染色細胞密度(両腫瘍領域の全てのマーカーについて)のカットオフ値を検定する手段を考案した(1600回のログランク検定)。これによって、免疫細胞密度(CD3、CD8、CD45RO、GZMB)の最適カットオフ値を定め、且つ2つの腫瘍領域における有意である広い範囲のカットオフ値が存在することを示すのを可能にした(図5)。これらのカットオフ値に従い、腫瘍の各領域(CTまたはIM)における免疫細胞浸潤物(CD3、CD8、CD45RO、GZMBにおける高または低密度)が患者($n=415$)を種々の無病生存(DFS)中央値を有する群へ明白に区別したことを観察した(図5)。ログランク検定は、DFS ($1.5\times 10^{-4}\sim 1.4\times 10^{-8}$ 範囲のP値) (図5および表5)およびOS (表6)について両腫瘍領域において試験した全てのマーカーにおいて高度に有意であった。

【0087】

さらに、免疫細胞集団の腫瘍(CT/IM)内での人工的分布が予後に影響し得るどうかを試験した。DFSおよびOSについての Kaplan-Meier 曲線を、両腫瘍領域において高または低CD3密度を有する患者について解析した。この解析は、高CD3_{CT}/CD3_{IM}密度が、単一領域での高CD3密度と比較したとき、有意に良好な全および無病生存率をもたらしていることを証明していた($P<0.0001$) (図7A、7B)。CT領域プラスIM領域を合せた解析では、全ての適応的免疫マーカーについて高および低密度を有する患者間のDFS差の中央値は、CTまたはIM領域の単独解析と比較したとき(図6および図7C)、さらに上昇していた($3.7\times 10^{-7}\sim 5.2\times 10^{-11}$ 範囲のP値)。従って、低-および高-患者における中央値DFSは、それぞれ、CD3_{CT}において5.9対45.9ヶ月、CD3_{IM}において12.9対47.8ヶ月(図6)、CD3_{CT}/CD3_{IM}において5.9対66.2ヶ月であった(図7Cおよび表4)。まとめると、これらの観察は、無病および全生存時間を、現場調節適応的免疫応答の異なる腫瘍領域における人工的分布および増幅に基づいて予測し得ることを示唆している。

結腸直腸癌予後診断は、現在、腫瘍浸潤の病理学的基準によっている。TNM病期および腫瘍分化について調整したCox比例ハザード回帰モデルは、CD3_{CT}/CD3_{IM}密度が無病および全生存率に対する独立した予後指標であることを示していた(それぞれ、 $P=2.8\times 10^{-6}$ 、 $P=3.0\times 10^{-3}$) (表5)。明らかに、CD3_{CT}/CD3_{IM}密度は、無病生存に関連する最も意義のあるパラメーターであり、全生存解析におけるTおよびN病期のP値よりも良好なP値を有していた。さらにまた、全ての適応的免疫マーカーが、無病および全生存に対して、TNM病期および腫瘍分化について調整した独立の予後診断価値を示していた(図7)。

【0088】

結腸直腸癌の通常的病期決定法は、各病期に属する転帰の際立った変動性について説明していない。上記現場免疫応答の本質および増幅は強い独立した予後診断価値を保持しているので、本発明者等は、この調整した免疫応答が各病期での患者転帰をさらに予測し得るかどうかを調べた。本発明者等は、患者をデュークス分類に従い階層化し(図8a)、疾病の全ての病期におけるCD3_{CT}/CD3_{IM}の影響を証明した(図8b)。

予期に反して、本発明者等は、強い現場調整適応的免疫応答が、腸壁を介しての腫瘍浸潤および局所リンパ節への拡大(デュークス分類A、B、C)にもかかわらず、同様に好ましい予後と相関していることを見出した。逆に、弱い現場適応的免疫応答は、最小の腫瘍浸潤を有する患者(デュークス分類AおよびB)においてさえも、極めて貧弱な予後と相関していた(図8b)。

上記実施例1～3においては、腫瘍蔓延の早期兆候(リンパ血管および神経周囲浸潤)およびリンパ節浸潤の無いことが強い密度の腫瘍内エフェクター記憶T細胞(T_{EM})の存在と関連していることを実証した。

本実施例においては、両腫瘍領域における記憶($CD45RO^+$)細胞密度対 $CD3^+$ T細胞密度のさらなる評価が腫瘍再発のリスクにある患者をさらに区別し得るかどうかをさらに判定する。 $CD3_{CT}/CD3_{IM}/CD45RO_{CT}/CD45RO_{IM}$ は、患者を、腫瘍再発の高および低リスクを有する2つの群に顕著に階層化した(図8C)。明らかに、両腫瘍領域内のこれらのマーカーの低密度は、同時遠隔転移を有する患者(デュークスD)と比較したとき、デュークスC、Bの、さらにはA病期でさえも患者における同様な転帰を明らかにしていた。

この場合、細胞および分子の免疫パラメーターの高処理量定量測定法を使用して、ヒト結腸直腸癌の微細環境内の免疫力を特性決定した。

【0089】

免疫学的サーベイランスおよび形作りの役割の如何にかかわらず、本発明のデータは、ヒト結腸直腸癌が臨床的に検出可能になる時点で、現場の自然抗-腫瘍免疫が外科的切除後の腫瘍再発の制御に主要な役割を果たすという概念を明らかに実証している。

有益な現場適応的免疫応答は、最小の腫瘍浸潤を有する患者に限られるものではなく、現場免疫力が腫瘍の進行とともに持続し得ることを示唆している。腫瘍内リンパ球が、腫瘍細胞の転移能力を減退させるような形で、腫瘍ストローマ、腫瘍細胞、またはその双方を変性させる可能性は、否定し得ない。

しかしながら、現場適応的免疫マーカー、 T_{H1} 関連分子および細胞毒性メディエーターの発現と腫瘍再発の低発生率との相関は、術後の持続性腫瘍細胞の免疫介在拒絶についての証拠を提供している。

この方法において、高密度の記憶T細胞($CD45RO$ 陽性細胞)の現場存在と関連する良好な予後診断価値は、おそらくは、マウスモデル¹⁸において示されているように、これらの細胞の重大なトラフィッキング特性および長期持続性抗-腫瘍防御能力に由来している。

腫瘍の中心および周辺部双方における免疫細胞密度の定量的測定法を使用しての、予め形成された現場適応的免疫応答の本評価は、腫瘍再発を制御する調整された適応的免疫応答の重要性を明らかにした。

予期に反して、本明細書において使用する免疫学的基準は、優れた、TNMおよびデュークス分類の予後診断価値とは別個の予後診断価値を有するのみならず、腫瘍浸潤性にかかわらず同様に好ましい予後と相関していた。

再発までの時間および全生存時間は、腸壁を介して、さらに、局所リンパ節へ拡散する腫瘍の存在によるよりはむしろ局所適応的免疫応答の状態によって支配されていることも証明している。

この新規な見識は、幾つかの重要な意味合いを有し、結腸直腸癌を含む癌腫の進化についての理解を変え得る。さらに、使用している基準は、現在使用している結腸直腸癌の分類の再評価につながるべきであり、さらなる正確さでもって、アジュバント療法(免疫療法のような)の利益を受けることのできる腫瘍再発の高リスクにある患者を指標すべきである。

免疫マーカーに対する広範な抗体群の入手可能性と組合せた免疫組織化学の使用は、本発明方法の他の腫瘍への応用を容易にするであろう。

【0090】

実施例5：(i)適応的免疫応答と(ii)再発および生存時間との相関に関するさらなる結果

ゲノムおよび現場免疫染色分析を、それぞれ、75名および415名の患者において実施した(表11(S1))。データを、専用のTumoral MicroEnvironment Database (TMEデータベース；申請時にアクセス可能)に入力した。定量的リアルタイムPCRを使用して、炎症、 T_{H1} 適応的免疫および免疫抑制に関連する免疫遺伝子の発現量を評価した。これらの遺伝子は、試験した75例の腫瘍において可変的な発現パターンを示した。全ての遺伝子間で行った相関解析は、39組の高度に有意

の組合せを示した($P<0.0001$)

(表4)。 T_{H1} 適応的免疫について共調節した遺伝子の優性クラスタを同定した(Tボックス転写因子21 (T-bet)、インターフェロン調節因子1 (IRF-1)、 $IFN\gamma$ 、CD3 ζ 、CD8、グラニニューリン(GLNY)、グランザイム B (GZMB))。患者をこのクラスタからの遺伝子の発現量に従って分類する階層的3構造は、これら遺伝子の発現と腫瘍再発との逆相関を明らかにした(患者群を比較するP値、全て $P<0.05$)。これらのデータは、 T_{H1} 適応的免疫が臨床転帰に対し有益な効果を有することを示している。

次に、組織マイクロアレーを使用して、415例のCRCの腫瘍中心(CT)および浸潤性周辺部(IM)内での現場適応的免疫応答を調べた。全Tリンパ球(CD3)、CD8 T細胞エフェクターおよびその関連細胞毒分子(GZMB)、および記憶T細胞(CD45RO)の免疫染色を、専用画像分析ワークステーションを使用して定量した。再発の無かった患者からの腫瘍は、上記実施例4において先に観察されているように、腫瘍が再発した患者からの腫瘍が有するよりも高い免疫細胞密度(CD3、CD8、GZMB、CD45RO)を各腫瘍領域(CT、IM)において有していた。各腫瘍領域(CT、IM)において、また各マーカー(CD3、CD8、GZMB、CD45RO)について、免疫細胞密度と患者転帰との間に、広い範囲のカットオフ値において統計的に有意な相関が存在する(図9(S5))。とりわけ、無病生存に対して最小P値を与えるカットオフを使用すると、各腫瘍領域(CT、IM)におけるCD3+、CD8+、GZMB+およびCD45RO+細胞の密度は、患者を統計的に異なる無病生存($1.0\times 10^{-2}\sim 4.8\times 10^{-6}$ の範囲の、(23)後に補正したP値)および全生存($5.5\times 10^{-3}\sim 7.9\times 10^{-8}$ の範囲のP値)を有する群に階層化することを可能にする(表12、13(S3、S4))。(24)後の100回繰返しの2倍クロス確認を使用(表12、13(S3、S4))しての或いはカットオフをデータ群の中央値に設定(表14、15(S5、S6))してのデータの再評価は、各免疫パラメーターの予後診断価値に関して一致した結果を与えた。

【0091】

その後、腫瘍領域の合せた解析が患者の生存予測を改善し得るかどうかを調べた。適応的免疫のマーカー全て(CD3、CD8、GZMBおよびCD45RO)において、CTプラスIM領域の合せた解析(HiHi対LoLo)は、単一領域分析(Hi対Lo)と比較したとき、患者間の無病および全生存時間の差を増大させた(表12～15(S3～S6))。また、データを、(24)後に2倍クロス確認(各マーカーにおいて100*CV)を使用して解析し、高有意差を証明した(表12、13(S3、S4))。CD3_{CT}/CD3_{IM}は、無病および全生存解析における最小P値(それぞれ、 $P=7.6\times 10^{-8}$ および $P=4.0\times 10^{-7}$)と関連していた(表12、13(S3、S4))。これらの結果を確認するために、第1群とは異なるさらなる患者コホートおよび他の病院からのCRCの第3のコホートを分析した。各コホートにおいて、CD3_{CT}/CD3_{IM}の中央値カットオフ値(高密度を有する50%の患者および低密度を有する50%の患者)を決定した。上記2つの独立したコホートは、第1群で得られたデータを確証した。また、全ての統計解析を、同時の遠隔転移の無い下位群の患者(UICC-TNM病期I、IIおよびIII)において実施した。有意なP値は、無病生存および全生存解析におけるCD3_{CT/IM}、CD8_{CT/IM}およびCD45RO_{CT/IM}において観察された(表16～19(S7、S10))。

これらの免疫基準が患者転帰を癌進行の各段階で識別し得るかどうかを判定した、患者を、UICC-TNM分類(25)に従い階層化した(図10A)。両腫瘍領域内での強い現場免疫反応は、腫瘍の局所拡大および局所リンパ節浸潤(病期I、II、III)にもかかわらず、好ましい予後と相関していた。逆に、両腫瘍領域内での弱い現場免疫反応は、最小の腫瘍浸潤(病期I)を有する患者においてさえも貧弱な予後と相関していた(図10B)。本発明者等は、最近、CRCの腫瘍蔓延の抑制におけるCD45RO+記憶T細胞密度の重要性を実証していた(22)。本発明者等は、両腫瘍領域(CTおよびIM)内で低密度のCD3+細胞およびCD45RO+記憶T細胞を有する患者は、同時の遠隔転移を有する患者(病期IV)と同様に、極めて貧弱な予後を有することを見出した(図10C)。腫瘍浸潤(T病期)、腫瘍分化およびリンパ節浸潤(N病期)について調節した後の多変量解析においては、CD3_{CT}/CD3_{IM}密度(HiHi、不均質、LoLo)は、無病生存解析において最高の危険率および最小のP値を有する独立の予後因子のままであった(2.391のHR；(26)後に補正した $P=1.4\times 10^{-6}$) (表20(S11))。CD3_{CT}/CD3_{IM}密度は、全生存と関連する特異な独立したパラメーターであった(1.89のHR； $P=1.2\times 10^{-5}$) (表

2 1 (S12))。組織病理パラメーターは、もはや、両腫瘍領域において調整された高または低密度の免疫マーカーを有する患者の無病および全生存と関連していなかった(HiHi対LoLo) (表 2 0 および 2 1 (S11および12))。

【0092】

さらに、図 1 1 および 1 2 に示すように、本発明に従う生体外予後診断方法は、結腸および直腸癌の転帰の予測によって例証されているように、各種タイプの癌の予後診断において成功裏に実施することができる。

さらにまた、図 1 3 に例示しているように、本発明に従う生体外予後診断方法は、早期段階の癌を患っている患者における癌の転帰の予後診断において高度に信頼し得ることが判明している。

10

さらにまた、図 1 4 に例示しているように、本発明に従う生体外予後診断方法は、癌の転帰の正確な予後診断を、1 種以上の生物学的マーカーとして、6 種の生物学的マーカーの組合せまたはセット、即ち、遺伝子発現分析方法、より正確には、リアルタイムPCR分析法によって定量するPDCD1LG1、VEGF、TNFRSF6B、IRF1、IL8RAおよびSELLを使用して可能にすることも証明している。

要するに、実施例 5 に提示した結果は、ヒトCRCが臨床的に検出可能になる時点で、適応的免疫応答が腫瘍再発の予防において役割を果たすことを示している。

T_{H1}分極化、細胞毒性および記憶T細胞に対するマーカーの存在と腫瘍再発の低い発生率との明確な相関を見出した。

従って、本発明においては、CRC内での免疫細胞のタイプ、密度および位置は、優れた、UICC-TNM分類(L . Sobin et al., 2002, TNM classification of malignant tumors. 6th, Ed., Wiley-Liss, New York) の価値とは別個の予後診断価値を有することを見出した。これらの結果は、再発までの時間および全生存時間が局所適応的免疫応答の状態によってほぼ支配されていることを示している。

20

本発明が提供する新規な免疫学的手段は、臨床転帰の現在の指標の見直しにつながり得、アジュバント療法の最大の利益を受ける高リスク患者を同定する一助となり得る。

【0093】

表1：無病および全生存率(n= 959；患者数)

	患者数	無病生存率(DFS)					全生存率(OS)				
		5年時生存率(%)	中央値月数	P値*			5年時生存率(%)	中央値月数	P値*		
T 病期				<0.001	s				<0.001	s	
pTis	39	48.7	55.7				48.7	55.7			
pT1	54	42.6	52.2				44.4	53.8			
pT2	156	40.4	43.6				44.2	49.1			
pT3	502	23.7	16.5				26.7	25.8			
pT4	208	16.8	1.6				17.8	16.8			10
N 病期				<0.001	s				<0.001	s	
N0	568	35.4	34.6				38.6	43.1			
N+	384	15.1	4.3				16.7	16.9			
M 病期				<0.001	s				<0.001	s	
M0	747	34.5	32.6				37.6	41.1			
M+	212	0.5	0.1				0.9	12.3			
デュークス分類				<0.001	s				<0.001	s	
A	83	47.0	55.6				47.0	55.6			
B	438	37.2	39.2				41.1	46.8			
C	227	24.7	19.5				27.3	28.1			
D	212	0.5	0.1				1.0	12.1			20
性別				0.38	ns				0.47	ns	
男性	494	25.9	16.4				28.5	29.4			
女性	465	28.2	19.3				30.5	27.3			
局在性				0.20	ns				0.14	ns	
RC	243	23.9	14.5				24.7	19.7			
TC	51	7.8	9.2				9.8	22.2			
LC	84	28.6	15.3				31.0	27.2			
SC	298	26.8	14.7				29.5	29.5			
R	287	32.4	32.1				36.5	40.4			
分化				0.26	ns				0.09	ns	
良好	737	30.7	21.7				33.6	33.2			30
適度	187	14.4	9.3				15.5	17.8			
貧弱	35	17.1	2.6				17.1	11.6			
粘液コロイド				0.087	ns				0.270	ns	
無	766	28.2	19.5				30.9	30.9			
有	193	22.3	14.9				23.8	21.8			
解析リンパ節数				0.11	ns				0.69	ns	
<8	426	34.0	31.0				37.1	40.0			
≥8	533	21.4	12.9				23.5	23.2			
VE				<0.001	s				<0.001	s	
無	797	31.0	23.6				33.9	34.1			
有	162	7.4	1.4				8.0	13.9			40
LI				<0.001	s				<0.001	s	
無	803	29.5	21.6				32.1	32.0			
有	158	14.1	0.5				16.0	16.1			
PI				<0.001	s				<0.001	s	
無	860	28.3	20.7				32.0	32.0			
有	99	7.1	0.1				8.1	16.2			

VELIPI(VE または LI または PI)	<0.001	s		<0.001	s
無 702 32.4 26.9			35.5 35.5		
有 257 12.1 3.3			13.2 16.8		
VE または LI	<0.001	s		<0.001	s
無 716 31.6 24.4			35.2 35.0		
有 243 13.6 3.7			12.8 16.3		
VE および LI	<0.001	s		<0.001	s
無 884 28.3 10.7			31.2 31.0		
有 75 12.0 0.2			9.3 11.9		
VE および LI および PI	<0.001	s		<0.001	s
無 911 28.0 19.5			30.7 30.5		
有 48 8.3 0.1			6.3 9.5		

10

RC：右結腸、TC：横行結腸、LC：左結腸、SC：S状結腸、R：直腸、VE：血管塞栓、L
I：リンパ節浸潤、PI：神経周囲浸潤

*P値：ログランク検定

表2：遺伝子目録

遺伝子	名称	受託番号	Chr. Loc.
IL10	インターロイキン 10	NM_000572	1q31-q32
IL8	インターロイキン 8	NM_000584	4q13-q21
IFNG	インターフェロン、ガンマ	NM_000619	12q14
TGFB1	形質転換成長因子、ベータ 1	NM_000660	19q13.2
PTGS2	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ 2 (Cox2)	NM_000963	1q25.2
CEACAM1	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1	NM_001712	19q13.2
IRF1	インターフェロン調節因子 1	NM_002198	5q31.1
MMP7	マトリックスメタロプロテイナーゼ 7 (マトリリシン、子宮)	NM_002423	11q21-q22
VEGF	血管内皮成長因子	NM_003376	6p12
GZMB	グランザイム B	NM_004131	14q11.2
TBX21	T-ボックス 21 (T-bet)	NM_013351	17q21.2
B7H3	B7 ホモログ 3	NM_025240	15q23-q24
CD8A	CD8 抗原、アルファポリペプチド (p32)	NM_001768	2p12
GNLY	グラニュリシン	NM_006433	2p12-q11
BIRC5	バキュロウイルス IAP 反復含有 5 (サバイビン)	NM_001168	17q25
CD3Z	CD3Z 抗原、ゼータポリペプチド (TiT3 複合体)	NM_198053 NM_000734	1q22-q23
TNFRSF10A	腫瘍壊死因子レセプター上科、メンバー10a	NM_003844	8p21
CD4	CD4 抗原 (p55)	NM_000616	12pter-p12

20

30

表3：抗体目録

抗体	一般名	クローン	アイソタイプ	蛍光色素	種	製造業者
CCR5	CCR5	45531	IgG2b	FITC	マウス	R&D systems
CCR7	CCR7	3D12	IgG2a	PE	ラット	BD pharmingen

40

CD103	インテグリン アルファ E	Ber-ATC8	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD119	IFN-ガンマ- R1	BB1E2	IgG2a	FITC	マウス	serotec
CD120a	TNFR1	H398	IgG2a	PE	マウス	serotec
CD120b	TNFR2	MR2-1	IgG1	PE	マウス	serotec
CD122	IL-2R-ベータ	MIK-ベータ 1	IgG2a	FITC	マウス	serotec
CD127	IL-7R-アルファ	R34.34	IgG1	PE	マウス	beckman coulter
CD134	OX40L-R	ACT35	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD14	CD14	M5E2	IgG2a	APC	マウス	BD pharmingen
CD152	CTLA-4	BNI3	IgG2a	APC	マウス	BD pharmingen
CD154	CD40L	TRAP1	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD178	ファス L	NOK1	IgG1	-	マウス	BD pharmingen
CD183	CXCR3	1C6/CXCR3	IgG1	APC	マウス	BD pharmingen
CD184	CXCR4	12G5	IgG2a	APC	マウス	BD pharmingen
CD19	CD19	HIB19	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD1a	CD1a	HI149	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD210	IL-10R-アルファ	3F9	IgG2a	PE	ラット	BD pharmingen
CD25	IL-2R-アルファ	M-A251	IgG1	APC	マウス	BD pharmingen
CD26	ジベプチジル- ペプチダーゼ IV	M-A261	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD27	CD27	M-T271	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD28	CD28	CD28.2	IgG1	APC	マウス	BD pharmingen
CD3	CD3 ε	UCHT1	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD3	CD3 ε	UCHT1	IgG1	CyCr	マウス	BD pharmingen
CD3	CD3 ε	S4.1	IgG2a	PE- Cy5	マウス	serotec
CD32	Fc γ RII	AT10	IgG1	FITC	マウス	serotec
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD4	CD4	RPA-T4	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD44	CD44	G44-26	IgG2b	APC	マウス	BD pharmingen
CD45	CD45	HI30	IgG1	CyCr	マウス	BD pharmingen
CD45Ra	CD45Ra	HI100	IgG2b	FITC	マウス	BD pharmingen
CD45Ro	CD45Ro	UCHTL1	IgG2a	APC	マウス	BD pharmingen
CD47	CD47	B6H12	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD49d	VLA-4	9F10	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD5	CD5	UCHT2	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD54	ICAM-1	HA58	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD56	CD56	B159	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD62L	L-セレクトリン	Dreg56	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD69	CD69	FN50	IgG1	APC	マウス	BD pharmingen
CD7	CD7	M-T701	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD8	CD8	RPA-T8	IgG1	APC	マウス	BD pharmingen
CD8	CD8	HIT8a	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD80	B7.1	L307.4	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen

10

20

30

40

CD83	CD83	HB15e	IgG1	PE	マウス	BD pharmingen
CD86	B7.2	FUN-1	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD95	ファス	DX2	IgG1	APC	マウス	BD pharmingen
CD97	CD97	VIM3b	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CD98	CD98	UM7F8	IgG1	FITC	マウス	BD pharmingen
CXCR6	CXCR6	56811	IgG2b	PE	マウス	R&D systems
GITR	GITR	polyclonal	IgG	-	ヤギ	R&D systems
HLA-DR	HLA-DR	G46.6(L243)	IgG2a	FITC	マウス	BD pharmingen
ICOS	ICOS	C394.4A	IgG	PE	マウス	clinisciences
IFN γ RII	IFN γ RII	ポリクロナール	IgG	-	ヤギ	R&D systems
IL-18R α	IL-18R α	70625	IgG1	PE	マウス	R&D systems
KIR- NKAT2	KIR-NKAT2	DX27	IgG2a	FITC	マウス	BD pharmingen
PD1	PD1	J116	IgG1	PE	マウス	clinisciences
ストレプト タビジン	ストレプトタ ビジン	-	-	APC	-	BD pharmingen
TCR $\alpha \beta$	TCR $\alpha \beta$	T10B9.A1-31	IgM	FITC	マウス	BD pharmingen
TGFR II	TGFR II	25508	IgG1	FITC	マウス	R&D systems

10

20

表4：相関解析

遺伝子	相関	95%CI	P 値
CD8A - TBX21	0,902	(0.848/0.938)	<0.0001
CD3Z - CD8A	0,797	(0.694/0.868)	<0.0001
CD3Z - TBX21	0,784	(0.676/0.859)	<0.0001
B7H3 - TGFB1	0,760	(0.643/0.843)	<0.0001
IFNG - TBX21	0,759	(0.635/0.844)	<0.0001
CD4 - CD8A	0,738	(0.612/0.828)	<0.0001
CD8A - IFNG	0,728	(0.592/0.823)	<0.0001
CD4 - TBX21	0,727	(0.597/0.820)	<0.0001
CD3Z - CD4	0,719	(0.586/0.815)	<0.0001
CD4 - TGFB1	0,678	(0.531/0.786)	<0.0001
CD8A - GNLY	0,671	(0.522/0.781)	<0.0001
IFNG - IRF1	0,664	(0.505/0.779)	<0.0001
GNLY - IFNG	0,663	(0.505/0.779)	<0.0001
IRF1 - TBX21	0,656	(0.502/0.770)	<0.0001
IL8 - PTGS2	0,643	(0.485/0.761)	<0.0001
GNLY - TBX21	0,627	(0.464/0.749)	<0.0001
CD3Z - IRF1	0,617	(0.451/0.742)	<0.0001
CD8A - IRF1	0,617	(0.451/0.742)	<0.0001
CD3Z - GNLY	0,613	(0.446/0.739)	<0.0001
CD3Z - IFNG	0,605	(0.428/0.737)	<0.0001
GZMB - IFNG	0,604	(0.422/0.739)	<0.0001
GNLY - IRF1	0,597	(0.425/0.727)	<0.0001
IL10 - TGFB1	0,596	(0.424/0.726)	<0.0001
CD8A - IL10	0,586	(0.411/0.719)	<0.0001
CD4 - IL10	0,583	(0.408/0.717)	<0.0001
CD8A - GZMB	0,574	(0.392/0.713)	<0.0001
GZMB - TBX21	0,548	(0.359/0.693)	<0.0001
CD3Z - GZMB	0,538	(0.347/0.687)	<0.0001
CD4 - IRF1	0,520	(0.330/0.670)	<0.0001

30

40

GNLY · GZMB	0,520	(0.324/0.673)	<0.0001	
B7H3 · IL10	0,517	(0.326/0.668)	<0.0001	
CD4 · GZMB	0,507	(0.309/0.663)	<0.0001	
GZMB · IRF1	0,504	(0.305/0.661)	<0.0001	
IL10 · TBX21	0,494	(0.297/0.650)	<0.0001	
CD4 · IFNG	0,493	(0.289/0.655)	<0.0001	
B7H3 · CD4	0,475	(0.275/0.636)	<0.0001	
CD8A · TGFB1	0,466	(0.264/0.628)	<0.0001	
CD3Z · IL10	0,459	(0.255/0.623)	<0.0001	
CD4 · GNLY	0,454	(0.250/0.619)	<0.0001	
TBX21 · TGFB1	0,433	(0.226/0.603)	0.0001	10
GNLY · IL10	0,413	(0.202/0.587)	0.0002	
CD3Z · TGFB1	0,398	(0.185/0.575)	0.0004	
IFNG · IL10	0,390	(0.168/0.575)	0.0009	
B7H3 · VEGF	0,371	(0.155/0.554)	0.0011	
B7H3 · IL8	0,370	(0.152/0.553)	0.0012	
CEACAM1 · IRF1	0,359	(0.140/0.544)	0.0017	
IL10 · IRF1	0,355	(0.136/0.541)	0.0019	
IRF1 · VEGF	0,351	(0.131/0.538)	0.0022	
B7H3 · MMP7	0,335	(0.112/0.526)	0.0038	
B7H3 · PTGS2	0,333	(0.112/0.523)	0.0037	
IRF1 · TGFB1	0,333	(0.111/0.523)	0.0038	
IL10 · PTGS2	0,325	(0.103/0.517)	0.0047	20
GZMB · IL10	0,320	(0.092/0.517)	0.0066	
CD4 · VEGF	0,316	(0.093/0.509)	0.0062	
GZMB · TGFB1	0,306	(0.076/0.504)	0.0097	
IL8 · MMP7	0,295	(0.068/0.493)	0.0116	
TBX21 · VEGF	0,294	(0.069/0.491)	0.0113	
CEACAM1 · VEGF	0,292	(0.066/0.489)	0.0119	
TGFB1 · VEGF	0,290	(0.065/0.488)	0.0124	
BIRC5 · IRF1	0,265	(0.037/0.466)	0.0234	
GNLY · TGFB1	0,257	(0.029/0.460)	0.0278	
PTGS2 · TGFB1	0,257	(0.028/0.459)	0.0281	
MMP7 · VEGF	0,251	(0.020/0.456)	0.0332	
IFNG · TGFB1	0,239	(0.001/0.452)	0.0492	
IRF1 · TNFRSF10A	0,238	(0.009/0.444)	0.042	30
BIRC5 · PTGS2	0,224	(-0.007/0.431)	0.0571	
IL8 · TGFB1	0,223	(-0.007/0.431)	0.0578	
B7H3 · IRF1	0,222	(-0.009/0.430)	0.059	
MMP7 · TGFB1	0,221	(-0.012/0.430)	0.0622	
B7H3 · CD8A	0,216	(-0.015/0.425)	0.0664	
GZMB · VEGF	0,209	(-0.028/0.423)	0.0829	
CD3Z · VEGF	0,207	(-0.024/0.418)	0.0784	
IFNG · IL8	0,206	(-0.034/0.424)	0.0922	
CD3Z · CEACAM1	0,204	(-0.027/0.415)	0.0836	
CD8A · VEGF	0,203	(-0.028/0.414)	0.0846	
IL10 · IL8	0,196	(-0.036/0.408)	0.0967	
BIRC5 · IFNG	0,195	(-0.045/0.414)	0.111	40
GZMB · IL8	0,194	(-0.043/0.410)	0.1087	
B7H3 · TBX21	0,191	(-0.041/0.403)	0.1056	
B7H3 · CD3Z	0,188	(-0.044/0.401)	0.1109	
CD4 · MMP7	0,181	(-0.052/0.397)	0.1274	
CEACAM1 · TBX21	0,174	(-0.059/0.388)	0.1416	
GNLY · PTGS2	0,173	(-0.059/0.388)	0.1435	
MMP7 · PTGS2	0,162	(-0.073/0.379)	0.1748	

BIRC5 - GZMB	0,161	(-0.077/0.381)	0.1842	
B7H3 - GZMB	0,160	(-0.078/0.381)	0.1862	
CD4 - TNFRSF10A	0,160	(-0.072/0.377)	0.176	
IFNG - TNFRSF10A	0,156	(-0.086/0.380)	0.2048	
GNLY - TNFRSF10A	0,153	(-0.079/0.370)	0.1957	
TBX21 - TNFRSF10A	0,147	(-0.086/0.365)	0.2157	
BIRC5 - IL8	0,145	(-0.088/0.363)	0.2225	
TNFRSF10A - VEGF	0,136	(-0.097/0.355)	0.2518	
B7H3 - TNFRSF10A	0,135	(-0.098/0.355)	0.2541	
CD8A - TNFRSF10A	0,134	(-0.099/0.354)	0.2577	
GZMB - PTGS2	0,134	(-0.104/0.358)	0.2702	
CEACAM1 - TNFRSF10A	0,133	(-0.100/0.352)	0.2641	10
B7H3 - IFNG	0,126	(-0.116/0.353)	0.3088	
IFNG - VEGF	0,123	(-0.119/0.351)	0.3177	
CD3Z - TNFRSF10A	0,117	(-0.117/0.338)	0.3269	
BIRC5 - CEACAM1	0,109	(-0.124/0.331)	0.3597	
GNLY - IL8	0,106	(-0.128/0.328)	0.3754	
IFNG - PTGS2	0,106	(-0.136/0.336)	0.3903	
GZMB - TNFRSF10A	0,104	(-0.135/0.331)	0.3942	
CEACAM1 - IFNG	0,093	(-0.148/0.325)	0.4506	
B7H3 - GNLY	0,090	(-0.143/0.313)	0.4514	
BIRC5 - GNLY	0,088	(-0.145/0.311)	0.4628	
CEACAM1 - GZMB	0,087	(-0.151/0.316)	0.4736	
CEACAM1 - GNLY	0,082	(-0.151/0.306)	0.4911	20
IL10 - MMP7	0,081	(-0.153/0.307)	0.499	
IL8 - VEGF	0,078	(-0.155/0.303)	0.5132	
BIRC5 - MMP7	0,077	(-0.157/0.304)	0.5192	
CD8A - CEACAM1	0,076	(-0.157/0.301)	0.5232	
TGFB1 - TNFRSF10A	0,071	(-0.162/0.296)	0.5538	
BIRC5 - VEGF	0,065	(-0.168/0.291)	0.5855	
IRF1 - PTGS2	0,064	(-0.169/0.289)	0.594	
IRF1 - MMP7	0,063	(-0.171/0.290)	0.6012	
PTGS2 - VEGF	0,063	(-0.170/0.289)	0.5995	
CEACAM1 - MMP7	0,035	(-0.199/0.264)	0.7742	
IL10 - TNFRSF10A	0,032	(-0.199/0.261)	0.786	
IL8 - IRF1	0,021	(-0.211/0.249)	0.8633	30
CD4 - CEACAM1	0,014	(-0.217/0.243)	0.9088	
BIRC5 - TBX21	0,013	(-0.218/0.242)	0.9124	
IFNG - MMP7	0,009	(-0.231/0.249)	0.9402	
CD3Z - MMP7	0,005	(-0.227/0.236)	0.968	
CEACAM1 - PTGS2	-0,001	(-0.231/0.229)	0.9923	
IL10 - VEGF	-0,004	(-0.234/0.226)	0.9721	
CD8A - PTGS2	-0,008	(-0.238/0.222)	0.9448	
GZMB - MMP7	-0,008	(-0.244/0.229)	0.947	
IL8 - TNFRSF10A	-0,017	(-0.246/0.214)	0.8892	
GNLY - VEGF	-0,023	(-0.252/0.208)	0.8484	
PTGS2 - TBX21	-0,036	(-0.264/0.196)	0.7631	
MMP7 - TBX21	-0,049	(-0.277/0.185)	0.6844	
BIRC5 - CD8A	-0,051	(-0.278/0.181)	0.6675	40
CD3Z - PTGS2	-0,051	(-0.278/0.181)	0.6683	
BIRC5 - CD3Z	-0,054	(-0.280/0.179)	0.6528	
B7H3 - CEACAM1	-0,063	(-0.289/0.169)	0.5972	
PTGS2 - TNFRSF10A	-0,066	(-0.292/0.166)	0.5782	
CD8A - MMP7	-0,086	(-0.311/0.149)	0.4739	
B7H3 - BIRC5	-0,095	(-0.318/0.138)	0.4236	

CD4 - IL8	-0,101	(-0.323/0.133)	0.3987
CEACAM1 - IL10	-0,101	(-0.323/0.132)	0.3979
IL8 - TBX21	-0,111	(-0.333/0.122)	0.3494
BIRC5 - IL10	-0,111	(-0.333/0.122)	0.3495
IL8 - TBX21	-0,131	(-0.350/0.102)	0.2714
BIRC5 - IL10	-0,134	(-0.353/0.099)	0.2583
CD8A - IL8	-0,163	(-0.378/0.070)	0.1701
MMP7 - TNFRSF10A	-0,217	(-0.427/0.015)	0.0668
BIRC5 - TGFB1	-0,218	(-0.426/0.013)	0.0643
BIRC5 - CD4	-0,231	(-0.438/-0.001)	0.0489
CEACAM1 - TGFB1	-0,239	(-0.445/-0.010)	0.0413
GNLY - MMP7	-0,241	(-0.448/-0.010)	0.0408
BIRC5 - TNFRSF10A	-0,243	(-0.448/-0.014)	0.0378
CD3Z - IL8	-0,258	(-0.461/-0.030)	0.0272

表 5

	患者数	無病生存率(DFS)				P 値
		2 年時生存率(%)	4 年時生存率(%)	5 年時生存率(%)	中央値月数	
GZM - CT						1.66 E-06
Hi	163	57.66	46.62	41.71	36.5	
Lo	191	35.93	26.04	21.87	12.4	
GZM - IM						9.42 E-07
Hi	175	56.00	44.57	38.28	36.6	
Lo	129	38.76	31.00	26.36	12.9	
CD45RO - CT						1.43 E-08
Hi	294	51.70	40.81	36.05	27.4	
Lo	67	20.58	11.76	8.82	2.4	
CD45RO - IM						2.16 E-06
Hi	190	56.31	46.84	42.10	42.0	
Lo	178	35.19	24.58	20.11	12.4	
CD8 - CT						3.68 E-08
Hi	227	54.18	43.17	38.32	31.1	
Lo	132	27.81	20.30	16.45	5.9	
CD8 - IM						1.53 E-04
Hi	129	60.93	50.78	45.31	49.2	
Lo	185	40.64	29.41	24.59	16.6	
CD3 - CT						3.90 E-08
Hi	192	60.41	48.95	43.75	45.9	
Lo	165	28.91	19.87	16.26	5.9	
CD3 - IM						3.37 E-08
Hi	178	59.77	49.72	44.69	47.8	
Lo	175	35.42	24.57	20.00	12.9	
GZM - CT/IM						3.67 E-07
HiHi	95	62.74	51.96	46.07	51.4	
LoLo	80	39.43	29.57	25.35	12.9	
CD45RO - CT/IM						4.57 E-10
HiHi	151	60.26	52.31	47.68	51.6	
LoLo	41	16.66	11.90	9.52	1.8	
CD8 - CT/IM						4.61 E-08
HiHi	96	65.62	55.20	50.00	59.2	
LoLo	93	30.85	21.27	17.02	5.9	
CD3 - CT/IM						5.20 E-11
HiHi	109	69.72	61.46	55.04	66.2	
LoLo	93	27.95	19.35	13.97	5.9	

10

20

30

表 6

	患者数	全生存率(OS)				P 値
		2 年時生 存率(%)	4 年時生 存率(%)	5 年時生 存率(%)	中央値 月数	
GZM - CT						8.18 E-07
Hi	163	62.58	50.31	43.56	50.2	
Lo	191	48.17	32.46	25.13	21.2	
GZM - IM						1.27 E-02
Hi	175	61.14	48.57	39.43	45.3	
Lo	129	55.04	37.21	29.46	29.1	
CD45RO - CT						3.14 E-09
Hi	294	57.82	45.92	38.78	34.9	
Lo	67	37.31	16.42	11.94	16.4	
CD45RO - IM						7.68 E-04
Hi	190	62.63	50.53	44.21	49.2	
Lo	178	46.63	30.90	23.03	19.8	
CD8 - CT						2.66 E-07
Hi	227	59.47	48.02	40.53	42.5	
Lo	132	43.94	25.76	19.70	18.7	
CD8 - IM						1.22 E-03
Hi	129	65.63	53.91	46.88	54.8	
Lo	185	54.84	37.10	28.50	29.6	
CD3 - CT						7.86 E-08
Hi	192	65.63	55.21	47.40	57.8	
Lo	165	42.42	24.24	18.18	18.6	
CD3 - IM						9.08 E-05
Hi	178	64.04	52.25	46.07	52.6	
Lo	175	48.57	32.57	24.00	21.4	
GZM - CT/IM						1.50 E-03
HiHi	95	68.42	55.79	47.37	58.3	
LoLo	80	58.75	37.50	28.75	32.0	
CD45RO - CT/IM						4.12 E-07
HiHi	151	64.24	54.97	49.67	59.6	
LoLo	41	39.02	14.63	12.20	17.7	
CD8 - CT/IM						1.21 E-06
HiHi	96	69.79	59.38	52.08	61.2	
LoLo	93	49.46	29.03	21.51	22.3	
CD3 - CT/IM						5.07 E-08
HiHi	109	72.48	64.22	55.96	63.9	
LoLo	93	45.16	25.81	16.13	19.3	

10

20

30

表 7 : DFSについての多変数比例ハザード解析

変数*	危険率	95%CI	P
T 病期	1.780	(1.348 - 2.362)	5.2 E-05
N 病期	2.130	(1.481 - 3.060)	4.5 E-05
分化	1.110	(0.777 - 1.584)	5.7 E-01
CD3 _{CT} /CD3 _{IM} パターン	0.570	(0.450 - 0.721)	2.8 E-06

変数*	危険率	95%CI	P
T 病期	1.700	(1.275 - 2.268)	3.1 E-04
N 病期	2.117	(1.449 - 3.093)	1.1 E-04
分化	0.969	(0.676 - 1.389)	8.6 E-01
CD8 _{CT} /CD8 _{IM} パターン	0.614	(0.480 - 0.786)	1.1 E-04

変数*	危険率	95%CI	P
T 病期	1.880	(1.441 - 2.452)	3.3 E-06
N 病期	2.298	(1.599 - 3.301)	6.8 E-06
分化	1.035	(0.736 - 1.457)	8.4 E-01
CD45RO _{CT} /CD45RO _{IM} パターン	0.564	(0.439 - 0.723)	6.2 E-06

変数*	危険率	95%CI	P
T 病期	1.777	(1.334 - 2.37)	8.5 E-05
N 病期	2.449	(1.651 - 3.63)	8.3 E-06
分化	1.049	(0.707 - 1.56)	8.1 E-01
GZMB _{CT} /GZMB _{IM} パターン	0.591	(0.459 - 0.76)	4.3 E-05

*M階層化

表 7 : OSについての多変数比例ハザード解析

変数	危険率	95%CI	P
T 病期	1.335	(1.052 - 2.693)	1.7 E-02
N 病期	1.657	(2.989 - 6.595)	3.6 E-03
M 病期	4.440	(1.179 - 2.328)	1.5 E-13
分化	1.058	(0.748 - 1.496)	7.5 E-01
CD3 _{CT} /CD3 _{IM} パターン	0.726	(0.587 - 0.897)	3.0 E-03

変数	危険率	95%CI	P
T 病期	1.376	(1.070 - 1.769)	1.3 E-02
N 病期	1.575	(1.100 - 2.254)	1.3 E-02
M 病期	4.467	(2.966 - 6.729)	8.0 E-13
分化	0.966	(0.679 - 1.375)	8.5 E-01
CD8 _{CT} /CD8 _{IM} パターン	0.712	(0.571 - 0.888)	2.5 E-03

変数	危険率	95%CI	P
T 病期	1.396	(1.114 - 1.750)	3.7 E-03
N 病期	1.684	(1.204 - 2.355)	2.3 E-03
M 病期	4.160	(2.805 - 6.170)	1.4 E-12
分化	0.935	(0.677 - 1.292)	6.9 E-01
CD45RO _{CT} /CD45RO _{IM} パターン	0.703	(0.558 - 0.885)	2.8 E-03

変数	危険率	95%CI	P
T 病期	1.360	(1.071 - 1.73)	1.2 E-02
N 病期	1.710	(1.188 - 2.46)	3.9 E-03
M 病期	4.392	(2.866 - 6.73)	1.1 E-11
分化	1.094	(0.752 - 1.59)	6.4 E-01
GZMB _{CT} /GZMB _{IM} パターン	0.905	(0.722 - 1.14)	3.9 E-01

10

20

30

40

50

表 8

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランクp値	組合せに対してLoLo	組合せに対してHiHi
IRF1 GNLY	1	1	25	27	9	0,00000637	1,26E-04	1
IRF1 GNLY	0	0	71,42857143	10	25	0,00000637	1	1,26E-04
PDCD1LG1 GNLY	1	1	32,43243243	25	12	0,00001957	3,89E-04	1
PDCD1LG1 GNLY	0	0	75	9	27	0,00001957	1	3,89E-04
PDCD1LG2 IRF1	1	1	25,71428571	26	9	0,00003780	2,71E-04	1
PDCD1LG2 IRF1	0	0	70,58823529	10	24	0,00003780	1	2,71E-04
PDCD1LG1 IRF1	1	1	30,23255814	30	13	0,00003942	4,85E-04	1
PDCD1LG1 IRF1	0	0	69,04761905	13	29	0,00003942	1	4,85E-04
PDCD1LG1 GNLY	0	1	40	9	6	0,00005604	0,02553386	0,74929474
PDCD1LG1 GNLY	1	0	40	9	6	0,00005604	0,02553386	0,74929474
IRF1 IL8	1	1	26,66666667	22	8	0,00008324	6,56E-04	1
IRF1 IL8	0	0	72,4137931	8	21	0,00008324	1	6,56E-04
ICOS GNLY	0	1	33,33333333	12	6	0,00009669	0,00648539	1
ICOS GNLY	1	0	47,36842105	10	9	0,00009669	0,069525	0,55885623
ICOS GNLY	1	1	35,29411765	22	12	0,00009903	0,00148605	1
ICOS GNLY	0	0	75	8	24	0,00009903	1	0,00148605
TNFRSF6B IRF1	1	1	27,27272727	24	9	0,00010448	4,71E-04	1
TNFRSF6B IRF1	0	0	71,875	9	23	0,00010448	1	4,71E-04
PDCD1LG2 GNLY	1	1	28,57142857	25	10	0,00010559	7,00E-04	1
PDCD1LG2 GNLY	0	0	70,58823529	10	24	0,00010559	1	7,00E-04
IRTA2 GNLY	1	1	26,92307692	19	7	0,00010819	7,02E-04	1
IRTA2 GNLY	0	0	76	6	19	0,00010819	1	7,02E-04
IRF1 GNLY	1	0	50	8	8	0,00013118	0,20696761	0,11061678

10

20

30

40

表 8 (続き 1)

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランク p-値	組合せに対してLoLo	組合せに対してHiHi
IRF1 GNLY	0	1	56,25	7	9	0,00013118	0,34514115	0,05584765
STAT1 PDCD1LG1	1	1	31,03448276	20	9	0,00015364	0,00411737	1
STAT1 PDCD1LG1	0	0	70	9	21	0,00015364	1	0,00411737
STAT1 IRF1	1	1	25	21	7	0,00017203	0,00136119	1
STAT1 IRF1	0	0	68,96551724	9	20	0,00017203	1	0,00136119
GATA3 CD8A	0	1	69,23076923	4	9	0,00018062	0,3355095	0,02232563
GATA3 CD8A	1	0	84,61538462	2	11	0,00018062	0,04841363	0,00103488
GNLY CXCL9	1	1	31,42857143	24	11	0,00018108	0,00167576	1
GNLY CXCL9	0	0	70,58823529	10	24	0,00018108	1	0,00167576
TBX21 GNLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00021196	4,58E-04	1
TBX21 GNLY	0	0	75	8	24	0,00021196	1	4,58E-04
TNFRSF6B PDCD1 LG1	1	1	31,25	22	10	0,00021333	9,67E-04	1
TNFRSF6B PDCD1 LG1	0	0	74,19354839	8	23	0,00021333	1	9,67E-04
IRF1 ICOS	1	1	27,77777778	26	10	0,00021448	0,00164508	1
IRF1 ICOS	0	0	67,64705882	11	23	0,00021448	1	0,00164508
IL8 CD4	1	0	33,33333333	18	9	0,00021968	3,65E-04	0,39718035
IL8 CD4	0	1	37,93103448	18	11	0,00021968	5,91E-04	0,58270625
TBX21 IRF1	1	1	25	27	9	0,00022445	3,28E-04	1
TBX21 IRF1	0	0	68,57142857	11	24	0,00022445	1	3,28E-04
PDCD1LG2 IRF1	0	1	47,05882353	9	8	0,00022793	0,13051259	0,20662362
PDCD1LG2 IRF1	1	0	58,82352941	7	10	0,00022793	0,53057151	0,03154075

10

20

30

40

表 8 (続き 2)

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランク p-値	組合せに対してLoLo	組合せに対してHiHi
GPLY CD4	1	0	22,22222222	14	4	0,00023630	2,62E-04	0,22728471
GPLY CD4	0	1	45	11	9	0,00023630	0,03419617	1
MMP7 IRF1	1	1	25	21	7	0,00025303	4,06E-04	1
MMP7 IRF1	0	0	74,07407407	7	20	0,00025303	1	4,06E-04
TNF PDCD1LG1	0	1	29,41176471	12	5	0,00027386	0,00205134	0,75798695
TNF PDCD1LG1	1	0	41,17647059	10	7	0,00027386	0,02760881	1
TNFRSF6B GNLY	1	1	30,3030303	23	10	0,00027678	0,00119011	1
TNFRSF6B GNLY	0	0	71,875	9	23	0,00027678	1	0,00119011
TGFB1 IRF1	1	1	29,03225806	22	9	0,00028329	8,07E-04	1
TGFB1 IRF1	0	0	73,33333333	8	22	0,00028329	1	8,07E-04
PDCD1LG2 PDCD1 LG1	1	1	31,70731707	28	13	0,00031033	0,00180905	1
PDCD1LG2 PDCD1 LG1	0	0	67,5	13	27	0,00031033	1	0,00180905
TGFB1 IRF1	0	1	38,0952381	13	8	0,00031619	0,02015558	0,5556315
TGFB1 IRF1	1	0	57,14285714	9	12	0,00031619	0,24654453	0,05090421
TBX21 PDCD1LG1	1	1	27,77777778	26	10	0,00033814	8,35E-04	1
TBX21 PDCD1LG1	0	0	68,57142857	11	24	0,00033814	1	8,35E-04
TNF GNLY	1	1	34,48275862	19	10	0,00033997	4,10E-04	1
TNF GNLY	0	0	82,14285714	5	23	0,00033997	1	4,10E-04
PDCD1LG1 IRF1	0	1	44,44444444	5	4	0,00035285	0,24937129	0,45141556
PDCD1LG1 IRF1	1	0	55,55555556	4	5	0,00035285	0,45891075	0,24655356

10

20

30

40

表 8 (続き 3)

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランク p-値	組合せに対し てLoLo	組合せに対し てHiHi
IRF1 CXCL9	1	1	30	28	12	0,00036339	0,00157043	1
IRF1 CXCL9	0	0	66,66666667	13	26	0,00036339	1	0,00157043
TBX21 GNLY	0	1	42,10526316	11	8	0,00037639	0,03467136	0,54586516
TBX21 GNLY	1	0	47,36842105	10	9	0,00037639	0,069525	0,24596116
PTGS2 IRF1	1	1	30,76923077	18	8	0,00038160	0,00500586	1
PTGS2 IRF1	0	0	72	7	18	0,00038160	1	0,00500586
IRF1 ART1	1	0	20	8	2	0,00038775	0,01498501	0,6043956
IRF1 ART1	0	1	66,66666667	3	6	0,00038775	0,4965035	0,31468531
INDO GNLY	1	1	35,29411765	22	12	0,00039262	0,00707271	1
INDO GNLY	0	0	69,6969697	10	23	0,00039262	1	0,00707271
PDCD1LG1 ICOS	1	1	31,57894737	26	12	0,00039662	0,00489333	1
PDCD1LG1 ICOS	0	0	66,66666667	12	24	0,00039662	1	0,00489333
PDCD1LG2 GNLY	0	1	47,05882353	9	8	0,00039685	0,13051259	0,22435124
PDCD1LG2 GNLY	1	0	52,94117647	8	9	0,00039685	0,23279471	0,12613911
TNFRSF6B TBX21	1	1	24	19	6	0,00041496	5,44E-04	1
TNFRSF6B TBX21	0	0	75	6	18	0,00041496	1	5,44E-04
PDCD1 IRF1	1	1	25,64102564	29	10	0,00043410	5,64E-04	1
PDCD1 IRF1	0	0	65,78947368	13	25	0,00043410	1	5,64E-04
IRF1 IFNG	1	1	27,02702703	27	10	0,00043964	7,09E-04	1
IRF1 IFNG	0	0	68,75	10	22	0,00043964	1	7,09E-04
TNF GNLY	0	1	34,7826087	15	8	0,00044402	0,00122608	1
TNF GNLY	1	0	43,47826087	13	10	0,00044402	0,00736128	0,57364958

10

20

30

40

表 8 (続き 4)

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランク p-値	組合せに対し てLoLo	組合せに対し てHiHi
IL8 GNLY	1	1	31,03448276	20	9	0,00046499	0,00136119	1
IL8 GNLY	0	0	75	7	21	0,00046499	1	0,00136119
TNFRSF6B IFNG	1	1	25	21	7	0,00046651	9,10E-04	1
TNFRSF6B IFNG	0	0	72	7	18	0,00046651	1	9,10E-04
PDCD1LG1 PDCD1	1	1	27,02702703	27	10	0,00047832	9,77E-04	1
PDCD1LG1 PDCD1	0	0	66,66666667	12	24	0,00047832	1	9,77E-04
IRTA2 GNLY	0	1	42,30769231	15	11	0,00048486	0,0227009	0,3822739
IRTA2 GNLY	1	0	56	11	14	0,00048486	0,23209547	0,04831826
PDCD1LG1 CXCL9	1	1	34,14634146	27	14	0,00050191	0,0038056	1
PDCD1LG1 CXCL9	0	0	67,5	13	27	0,00050191	1	0,0038056
IL8 ICOS	1	1	39,28571429	17	11	0,00050590	0,00668911	1
IL8 ICOS	0	0	76,92307692	6	20	0,00050590	1	0,00668911
TNF IRF1	1	1	31,42857143	24	11	0,00054072	6,84E-04	1
TNF IRF1	0	0	73,52941176	9	25	0,00054072	1	6,84E-04
IL8 ICOS	0	1	40	15	10	0,00055140	0,01074613	1
IL8 ICOS	1	0	41,66666667	14	10	0,00055140	0,01996838	1
IRF1 IL8	1	0	40,90909091	13	9	0,00057567	0,04324338	0,37231571
IRF1 IL8	0	1	59,09090909	9	13	0,00057567	0,37716737	0,02446738
PDCD1 GNLY	1	1	31,42857143	24	11	0,00058024	6,84E-04	1
PDCD1 GNLY	0	0	73,52941176	9	25	0,00058024	1	6,84E-04
TNFRSF6B CXCL9	1	1	32,14285714	19	9	0,00063900	0,00694187	1

10

20

30

40

表 8 (続き 5)

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランク p-値	組合せに対し てLoLo	組合せに対し てHiHi
TNFRSF6B CXCL9	0	0	71,42857143	8	20	0,00063900	1	0,00694187
GNLY CXCL10	1	1	34,28571429	23	12	0,00064897	0,00374119	1
GNLY CXCL10	0	0	70,58823529	10	24	0,00064897	1	0,00374119
SELL GNLY	1	1	32,14285714	19	9	0,00065255	0,00105233	1
SELL GNLY	0	0	77,77777778	6	21	0,00065255	1	0,00105233
SELL IRF1	1	1	26,66666667	22	8	0,00065555	6,56E-04	1
SELL IRF1	0	0	72,4137931	8	21	0,00065555	1	6,56E-04
MMP7 GNLY	1	1	31,03448276	20	9	0,00067878	0,00136119	1
MMP7 GNLY	0	0	75	7	21	0,00067878	1	0,00136119
PDCD1LG1 EBAG9	1	1	37,93103448	18	11	0,00067896	0,03430795	1
PDCD1LG1 EBAG9	0	0	68,96551724	9	20	0,00067896	1	0,03430795
TGFB1 GNLY	1	1	29,03225806	22	9	0,00071504	0,00204606	1
TGFB1 GNLY	0	0	70	9	21	0,00071504	1	0,00204606
IL18R1 GNLY	1	1	36,36363636	21	12	0,00075372	0,01304077	1
IL18R1 GNLY	0	0	68,75	10	22	0,00075372	1	0,01304077
IFNG GNLY	1	1	28,57142857	25	10	0,00075584	0,00119534	1
IFNG GNLY	0	0	70	9	21	0,00075584	1	0,00119534
TNFRSF6B PDCD1 LG2	1	1	26,66666667	22	8	0,00076477	0,00169422	1
TNFRSF6B PDCD1 LG2	0	0	68,96551724	9	20	0,00076477	1	0,00169422
TNFRSF6B PDCD1	1	1	29,62962963	19	8	0,00081540	8,73E-04	1

10

20

30

40

表 8 (続き 6)

遺伝子組合せ	状態1	状態2	再発パーセント	再発無しの数	再発有りの数	ログランク p-値	組合せに対し てLoLo	組合せに対し てHiHi
TNFRSF6B PDCD1	0	0	76.92307692	6	20	0.00081540	1	8,73E-04
INDO GNLY	0	1	33.33333333	12	6	0.00081585	0,01830705	1
INDO GNLY	1	0	55.55555556	8	10	0.00081585	0,36715926	0,23851585
TBX21 IL8	1	0	39.28571429	17	11	0.00081677	0,00372377	0,77529553
TBX21 IL8	0	1	46.42857143	15	13	0.00081677	0,00995396	0,40283859
TNFRSF8 IRF1	1	1	25.80645161	23	8	0.00082357	0,00458134	1
TNFRSF8 IRF1	0	0	63.33333333	11	19	0.00082357	1	0,00458134
TNF PDCD1LG1	1	1	37.14285714	22	13	0.00083836	0,00148511	1
TNF PDCD1LG1	0	0	76.47058824	8	26	0.00083836	1	0,00148511
IRF1 EBAG9	1	1	35.71428571	18	10	0.00085969	0,01512429	1
IRF1 EBAG9	0	0	71.42857143	8	20	0.00085969	1	0,01512429
PDCD1LG1 IL18R1	1	1	37.14285714	22	13	0.00087042	0,01603268	1
PDCD1LG1 IL18R1	0	0	67.64705882	11	23	0.00087042	1	0,01603268
IRTA2 IRF1	1	1	33.33333333	22	11	0.00087051	0,00113427	1
IRTA2 IRF1	0	0	75	8	24	0.00087051	1	0,00113427
IRF1 IL18R1	1	1	33.33333333	22	11	0.00087233	0,0063032	1
IRF1 IL18R1	0	0	68,75	10	22	0.00087233	1	0,0063032
LAT IL8	0	1	34.48275862	19	10	0.00091759	0,00148805	0,3996356
LAT IL8	1	0	41,37931034	17	12	0.00091759	0,00461551	0,77997357
SELL GNLY	0	1	37,5	15	9	0.00095410	0,00482852	0,77381721
SELL GNLY	1	0	50	12	12	0.00095410	0,04632871	0,25940735

10

20

30

40

表 9

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
18s		内在性制御	内在性制御	X03205
ACE	ACE	腫瘍	DCP、ACE1、DCP1 、CD143、MGC26566	NM_000789
ACTB	ベータアク チン	内在性制御	内在性制御	NM_003234
AGTR1	アンギオテ ンシンIIレ セプター、 タイプ1	血管形成	AT1、AG2S、AT1B、 AT2R1、HAT1R、AG TR1A、AGTR1B、AT 2R1A、AT2R1B	NM_031850.1、 NM_000685.3
AGTR2	アンギオテ ンシンIIレ セプター、 タイプ2	血管形成	AT2	NM_000686
APC				NM_000038
APOA1	アポリポタ ンパク質A-I	MHC経路	present sur cell tum et module cytotox, in teraction TCRg9d2	NM_000039
ARF1	p53シグナ ル伝達	腫瘍サプレッサ		NM_001658
AXIN1	アキシン	アキシン		NM_181050 N M_003502
BAX	BAX	アポトーシス経路		NM_138763、N M_138765、NM _004324、NM_ 138761
BCL2	BCL2	アポトーシス経路		NM_000633
BCL2L1	BCL-XL	アポトーシス経路		NM_001191
CXCR5		ケモカイン経路		NM_001716

10

20

30

表9(続き1)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
BMP2	BMP2	TGF経路	骨形成タンパク質8 a	NM_001200
BRCA1				NM_007294 NM_007295 NM_007296 NM_007297 NM_007298 NM_007299 NM_007300 NM_007301 NM_007302 NM_007303 NM_007304 NM_007305 NM_007306
BTLA	BTLA	適応的免疫	BおよびTリンパ球 関連	NM_181780
C3	C3	C3		NM_000064
CASP3	アポトーシス	アポトーシス		NM_004346
CASP9	カスパーゼ9、アポトーシス関連システインペプチダーゼ、遺伝子hCG25367 (Celera社注釈)			NM_001229.2
CCL1	CCL1	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド1	NM_002981
CCL11	エオタキシン	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド11	NM_002986
CCL13	MCP-4	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド13	NM_005408
CCL16	HCC-4	ケモカイン経路	CCケモカインおよびレセプター	NM_004590
CCL17	TARC	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド17	NM_002987
CCL18	PARC	ケモカイン経路	CCケモカインおよびレセプター	NM_002988

10

20

30

表9(続き2)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CCL19	Mip-3c、MIP-3ベータ	ケモカイン経路	SCYA19	NM_006274
CCL2	MCP-1	ケモカイン経路	SCYA2	NM_002982
CCL20	MIP-3アルファ	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド20	NM_004591
CCL21	6Ckine	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21	NM_002989
CCL22	CCR4リガンド、MDC、T-regスベック	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド22	NM_002990
CCL23	MPIF-1	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド23	NM_145898 NM_005064
CCL24	エオタキシン-2	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド24	NM_002991
CCL25	TECK	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド25	NM_148888 NM_005624
CCL26	エオタキシン-3	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド26	NM_006072
CCL27	CTACK	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド27	NM_006664
CCL28	CCL28	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド28	NM_019846 NM_148672
CCL3	Mip-1a	ケモカイン経路	SCYA3	NM_002983
CCL5	Rantes	ケモカイン経路	SCYA5	NM_002985
CCL7	MCP-3	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド7	NM_006273
CCL8	MCP-2	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド8	NM_005623
CCNB1		細胞周期		NM_031966

10

20

30

表9(続き3)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CCND1		細胞周期		NM_053056
CCNE1		細胞周期		NM_001238 NM_057182
CCR1		ケモカイン経路	CCケモカインおよびレセプター	NM_001295
CCR10	CCR10	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター10	NM_016602
CCR2	CCR2	ケモカイン経路		NM_000647
CCR3	CCR3	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター3	NM_178329 NM_001837
CCR4	CCR4	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター4	NM_005508
CCR5	CCR5	ケモカイン経路		NM_000579
CCR6	CCR6	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター6	NM_031409 NM_004367
CCR7	CCR7	ケモカイン経路		NM_001838
CCR8	CCR8	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター8	NM_005201
CCR9	CCR9	ケモカイン経路	ケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター9	NM_006641
CCRL2	HCR	ケモカイン経路	CCケモカインおよびレセプター	
CD154	CD154(TNFSF5)	適応的免疫		NM_000074
CD19	B細胞	適応的免疫		NM_001770
CD1a	CD1A	適応的免疫	CD1A抗原、ポリペプチド	NM_001763
CD2	CD2抗原(p50)、ヒツジ赤血球レセプター	適応的免疫		NM_001767

10

20

30

表 9 (続き 4)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CD226	PTA1 ; DNAM1 ; D NAM-1 ; TLiSA1 要約：CD226は、N K細胞、血小板、単 核球およびT細胞サ ブユニットの表面上 に発現する約65kDa の糖タンパク質であ る。CD226は、V-set の2つのIg様ドメイ ンを含むIg-上科 のメンバーであり、 ヒト染色体18q22.3 上の遺伝子によって コード化されている 。CD226は、同定さ れていないリガンド を担持し且つCD226 を細胞活性を生じる 抗体により架橋させ る他の細胞への細胞 接着を介在する。	接着、活性化		NM_006566

10

20

30

表9(続き5)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CD244	CD244天然キラー細胞レセプター2B4			NM_016382
PDCD1LG1	B7H1	適応的免疫		NM_014143
CD28	CD28	適応的免疫		NM_006139
CD34	CD34	CD34		NM_001773
CD36	CD36抗原(コラーゲンタイプIレセプター、トロンボスポンジンレセプター)			NM_001001547 NM_001001548 NM_000072
CD38	CD38	適応的免疫		NM_001775
CD3E	CD3E抗原、エプシロンポリペプチド(TiT3複合体)	適応的免疫		NM_000733
CD3G	CD3G抗原、ガンマポリペプチド(TiT3複合体)	適応的免疫		NM_000073
CD3Z	CD3Z抗原、ゼータポリペプチド(TiT3複合体)	適応的免疫		NM_000734
CD4	CD4抗原(p55)	適応的免疫		NM_000616
CD40LG	TNFSF5	適応的免疫	CD40L	NM_000074
CD5		適応的免疫		NM_014207
CD54	ICAM-1	適応的免疫		NM_000201
CD6		適応的免疫		NM_006725
CD68	CD68	先天性免疫		NM_001251
CD69		適応的免疫		NM_001781

10

20

30

表 9 (続き 6)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CLIP	CD74抗原 (主要組織適合性複合体の不変性ポリペプチド、クラスII抗原関連)	MHC経路		NM_001025158 NM_001025159 NM_004355
CD80	CD80	適応的免疫		NM_005191
CD83		適応的免疫		NM_004233
SLAMF5	CD84	適応的免疫		NM_003874
CD86	CD86	適応的免疫		NM_006889
CD8A	CD8	適応的免疫		NM_001768.1
CDH1	カドヘリン1、タイプ1、E-カドヘリン(上皮)	接着、転移	塞栓	NM_004360
CDH7	接着	接着		NM_004361
CDK2		細胞周期		NM_052827 NM_001798
CDK4		細胞周期		NM_000075
CDKN1A	CIP1 p21	突然変異およびメチル化	サイクリン-依存性キナーゼサブプレッサー1A (p21、Cip1)	

表 9 (続き 7)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
DKN1B	KIP1 p27	突然変異およびメチル化	サイクリン-依存性キナーゼインヒビター1B(p27、Kip1)	NM_004064
CDKN2A	p16INK4a	突然変異およびメチル化	サイクリン-依存性キナーゼインヒビター2A(メラノーマ、p16、CDK4を抑制)	NM_000077 ; NM_058195 ; NM_058197 ;
CDKN2B	CDKN2B		サイクリン-依存性キナーゼインヒビター2B(p15、CDK4を抑制)	NM_004936
CEACAM1	(CD66a)	腫瘍		NM_001024912 NM_001712
COL4A5	コラーゲンIV(COL4A5)	コラーゲンIV(COL4A5)		NM_033381.1、 NM_033380.1、 NM_000495.3

表 9 (続き 8)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CREBBP		CK経路	ヒストン アセチルトランス フェラーゼ	NM_004380
CRLF2	TSLP R	適応的免疫		NM_022148 N M_001012288
CSF1	コロニー刺激因子1 (マクロファージ)		CSF-1	NM_000757
CSF2	CSF-2		CSF-2	NM_000758
CSF3	CSF-3		CSF-3	NM_000759
CTLA4	CD152	適応的免疫	CD152	NM_005214
CTNNB1	ベータ-カテ ニンwnt経 路カテニン (カドヘリン 関連タンパ ク質)、ベータ1、88kDa	wnt経路	カテニン(カドヘリ ン関連タンパク質) 、ベータ1、88kDa	NM_001904
CTSC		適応的免疫	DNAマイクロアレ ーT	NM_148170.2 NM_001814.2
CX3CL1	フラクタル カイン	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X3- Cモチーフ)リガン ド1	NM_002996
CX3CR1	CX3CR1	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X3- Cモチーフ)レセプ ター1	NM_001337
CXCL1	GROアルフ ァ	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 1(メラノーマ増殖 刺激活性、アルフ ァ)	NM_001511

10

20

30

表 9 (続き 9)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CXCL10	IP10	ケモカイン経路	SCYB11	NM_001565
CXCL11	ITAC	ケモカイン経路	SCYB11	NM_005409
CXCL12	SDF-1	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 12(間質細胞-派生 因子1)	NM_199168 N M_000609
CXCL13	BLC	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 13(B-細胞化学誘引 物質)	NM_006419
CXCL14	BRAK	ケモカイン経路	CXCケモカインお よびレセプター	NM_004887
CXCL16	CXCR6リガ ンド、Th1	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 16	NM_022059
CXCL2	GROベータ	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 2	NM_002089
CXCL3	GROガンマ	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 3	NM_002090
CXCL5	ENA	ケモカイン 経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 5	NM_002994

10

20

表 9 (続き 10)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
CXCL6	GCP-2	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 6(顆粒球化学走化 性タンパク質2)	NM_002993
CXCL9	MIG	ケモカイン経路	CXCケモカインお よびレセプター	NM_002416
CXCR3	CXCR3	ケモカイン経路	GPR9	NM_001504
CXCR4	CXCR4	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)レセプタ ー4	NM_003467
CXCR6	CXCR6	ケモカイン経路	ケモカイン(C-X-C モチーフ)レセプタ ー6	NM_006564
CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2		NM_000761
CYP7A1	CYP7A1	CYP7A1		NM_000780
DCC	直腸結腸癌 では欠落、 遺伝子hCG 1811785(Ce lera社注釈)	転移		NM_005215.1
DCN	DCN	TGF経路	デコリン Inh TG F	NM_133503 N M_133504 NM _133505 NM_0 01920
DEFA6	デフェンシ ンアルファ6 、コロンK 中で過発現	防御	コロンK中で過発 現	NM_001926
DICER1	ダイサー1、 Dcr-1ホモロ グ(ショウジ ョウバエ)	MRNA経路		NM_030621; N M_177438
DKK1		wnt経路	Dickkopfホモログ 1 (アフリカツメガ エル)	NM_012242

10

20

30

表9(続き11)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
Dok-1	p62Dok	TCR経路	造血細胞で発現、 Ink(イノチキト・ラジド) 増殖T機能	NM_001381
Dok-2	P56Dok-2, FRIP	TCR経路	Tで発現、Ink(イノ チキト・ラジド) 増 殖T機能	NM_201349 N M_003974
DOK6				NM_152721
DVL1	DHS1ホモ ログ(ディシ ェベルド)	DHS1ホモログ(ディシェベルド)		NM_181870 N M_182779 NM _004421
E2F4	E2F4	TGF 経路	E2F転写因子4、p 107/p130-結合性	NM_001950
EBI3				NM_005755
ECE1	ECE-1	ECE-1	ECE	NM_001397
ECGF1	転移	転移		NM_001953
EDN1	エンドセリ ン1、遺伝子 hCG37405(Celera社注 釈)	EDN1、hCG37405		NM_001955.2
EGF			上皮細胞増殖因子(ベータ-ウロガスト ロン)	NM_001963
EGFR		予測STRING	上皮細胞増殖因子 レセプター(赤芽球 性白血病ウイルス(v-erb-b)腫瘍遺伝子 ホモログ、鳥類)	NM_005228
EIF4E			真核細胞翻訳開始因子4E	
CD105	血管形成エ ンドグリン	血管形成		NM_000118

10

20

30

表9(続き12)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
ENPEP	グルタミル アミノペプ チダーゼ(ア ミノペプチ ダーゼA)、 遺伝子hCG 21423 (Cel era社注釈)	ENPEP、hCG21423		NM_001977.2
ERBB2				NM_001005862 NM_004448
EREG	エピレグリン、遺伝子 hCG14966 (Celera社注 釈)	EREG、hCG14966		NM_001432.1
FCGR3A 、FCGR3 B	CD16	CD16		NM_000569、N M_000570
FN1	フィブロネ クチン (FNプレカ ーサー)	フィブロネクチン (FNプレカーサー)	FN、CIG、FINC 、LETS	NM_002026.1、 NM_054034.1
FOXP3	FOXP3	適応的免疫	フォークヘッドボ ックスP3	NM_014009
FYN	FYN	TCR経路	SRC、FGR、YES に関連するFYN腫 瘍遺伝子	NM_153047 N M_153048 NM _002037
FZD1	frizzled	frizzled	frizzledホモログ1 (ショウジョウバエ)	NM_003505
GAPD	GAPDH	内在性制御	内在性制御	NM_002046
GLI2		ヘッジホッグ経路 GLI-Kruppel群、 メンバーGLI2	GLI-Kruppel群、 メンバーGLI2	NM_030379 N M_030380 NM _030381 NM_0 05270

10

20

30

表9(続き13)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
GNLY	グラニュリ シン(GNLY)	Cytotox経路	519、LAG2、NK G5、LAG-2、D2S 69E、TLA519	NM_012483.1、 NM_006433.2
GOLPH4	ゴルジホス ホタンパク 質4	ゴルジトランスポ ーター	小胞体からゴルジ 複合体へのタンパ ク質移送のために 必要	NM_014498 U55853
GRB2		TCR経路		NM_203506 N M_002086
GSK3B		wnt経路	グリコーゲン合成 酵素キナーゼ3ベータ	NM_002093
GSTP1	酸化防止剤	酸化防止剤		NM_000852
GUSB	GUSB	内在性制御	内在性制御	NM_000181
GZMA		適応的免疫	DNAマイクロアレ ーT	NM_006144.2
GZMB	グランザイ ムB(GZMB)	Cytotox経路	CCPI、CSPB、C GL-1、CSP-B、C TLA1	NM_004131
GZMH		適応的免疫	DNAマイクロアレ ーT	NM_033423.2
GZMK	グランザイムK(グランザイム3； トリプターゼII)、遺伝子hCG404 47 (Celera社注釈)		DNAマイクロアレ ーT	NM_002104.1
HLA-B	HLA-B	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスI、B	NM_005514
HLA-C	HLA-C	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスI、C	NM_002117

表9(続き14)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
HLA-DM A	HLA-DMA	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスII、D Mアルファ	NM_006120
HLA-DM B	HLA-DMB	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスII、D Mベータ	NM_002118
HLA-DO A	HLA-DOA	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスII、D Oアルファ	NM_002119
HLA-DO B	HLA-DOB	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスII、D Oベータ	NM_002120
HLA-DP A1	HLA-DPA1	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスII、D Pアルファ1	NM_033554
HLA-DQ A2	HLA-DQA2	MHC経路	主要組織適合性複 合体、クラスII、D Qアルファ2	NM_020056
HLA-DR A	HLA-DRA	MHC経路	HLA-DRA	NM_019111

表9(続き15)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
HLX1	H2.0様ホメオボックス1 (ショウジョウバエ)、遺 伝子hCG25 119 (Celera 社注釈)	Th1	Th1	NM_021958.2
HMOX1	HO-1	HO-1		NM_002133
HRAS	V12 HRAS HRASの構 造的に活性 な(従って腫 瘍遺伝子性 の)変異体 の高レベル の発現は、 ヒト細胞が 複製配列68 に達すると きに観察さ れる停止に 多くの点で 類似する早 期増殖停止 をもたらす	突然変異およびメ チル化	v-Ha-ras ハーペイ ラット肉腫ウイル ス腫瘍遺伝子ホモ ログ	NM_176795
HSPB3	ヒートショック27kDa タンパク質3			NM_006308
HUWE1	UREB1、タ ンパク質分 解：タンパ ク質代謝お よび修飾	MHC経路	ユビキチン、arf、 タンパク質分解： タンパク質代謝お よび修飾	NM_031407
ICAM1	転移	転移		NM_000201
ICAM2	CD102	適応的免疫		NM_000873
ICOS	ICOS	適応的免疫		NM_012092

10

20

表9(続き16)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
ID1	DNA結合性 インヒビタ ー1、優性ネ ガティブヘ リカル・ル ープ・ヘリ カルタンパ ク質、遺伝 子hCG3714 3 (Celera社 注釈)	ID1、hCG37143	転移伝達(metastasis signature)	NM_002165.2
ifna1	Ifna1	インターフェロン 経路	インターフェロン 、アルファ1	NM_024013
ifna17	Ifna17	インターフェロン 経路	インターフェロン 、アルファ17	NM_021268
ifna2	Ifna2	インターフェロン 経路	インターフェロン 、アルファ2	NM_000605
ifna5	Ifna5	インターフェロン 経路	インターフェロン 、アルファ5	NM_002169
ifna6	Ifna6	インターフェロン 経路	インターフェロン 、アルファ6	NM_021002
ifna8	Ifna8	インターフェロン 経路	インターフェロン 、アルファ8	NM_002170
IFNAR1	ifnar1	インターフェロン 経路	インターフェロン(アルファ、ベータ およびオメガ)レセ プター1	NM_000629
IFNAR2	ifnar2	インターフェロン 経路	インターフェロン(アルファ、ベータ およびオメガ)レセ プター2	NM_207584(NM_207585(NM_000874
IFNG	IFN-g	インターフェロン 経路	IFG、IFI	NM_000619
IFNGR1	IFN-ガンマ R1	インターフェロン経路		NM_000416
IFNGR2	IFN-ガンマ R2	インターフェロン経路		NM_005534
IGF1	インスリン 様増殖因子1 (ソマトメジ ンC)	増殖経路		NM_000618

30

40

表9(続き17)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
IHH		ヘッジホッグ経路 インディアンヘッジ ホッグホモログ(ショウジョウバエ)	インディアンヘッジ ホッグホモログ(ショウジョウバエ)	NM_002181
IKBKB	Ikb2	CK経路		AF080158
IL10	IL-10	CK経路		NM_000572
IL12A	IL-12p35	CK経路	インターロイキン1 2	NM_000882
IL12B	IL-12p40	CK経路	インターロイキン1 2	NM_002187
IL12RB1	IL-12 Rベ ータ1	適応的免疫	インターロイキン1 2レセプター、ベ ータ1	NM_153701 N M_005535
IL12RB2	IL12RB2	CK経路	インターロイキン1 2レセプター、ベ ータ2	NM_001559
IL13	IL-13	CK経路		NM_002188
IL13RA2	インターロ イキン13レ セプター、 アルファ2、 遺伝子hCG 20596 (Cel era社特許)	IL13RA2、hCG20 596	転移伝達	NM_000640.2
IL15	IL-15	CK経路		NM_000585
IL15RA	IL-15 Rア ルファ	CK経路	インターロイキン1 5レセプター、アル ファ	NM_002189
IL17	IL-17	CK経路	インターロイキン1 7(細胞毒性Tリン パ球関連セリンエ ステラーゼ8)	NM_002190
IL17R	IL17R	CK経路	インターロイキン1 7レセプター	NM_014339
IL17RB	IL17RB	CK経路	インターロイキン1 7レセプターB	NM_018725 N M_172234
IL18	IL-18	CK経路		NM_001562

10

20

表9(続き18)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
IL1A	IL-1a	CK経路		NM_000575
IL1B	IL-1b	CK経路		NM_000576
IL1R1	IL-1 RI	適応的免疫		NM_000877
IL2	IL-2	CK経路		NM_000586
IL21	IL-21	CK経路	共通ガンマ鎖レセ プター群	NM_021803
IL21R	IL-21 R	CK経路	共通ガンマ鎖レセ プター群	NM_181078 N M_181079 NM 021798
IL23A	IL-23	CK経路	インターロイキン2 3、アルファサブユ ニットp19	NM_016584
IL23R	IL-23R	CK経路	インターロイキン2 3レセプター	NM_144701
IL24	IL24	CK経路	インターロイキン2 4	NM_006850
IL27	IL27	CK経路	インターロイキン2 7	NM_145659
IL2RA	CD25	CK経路		NM_000417
IL2RB	IL-2 Rベ ータ、CD122	CK経路	適応的免疫	NM_000878
IL2RG	IL-2 Rガン マ、CD132	CK経路	適応的免疫	NM_000206
IL3	IL-3	CK経路		NM_000588
IL31RA	IL31RA	CK経路	インターロイキン3 1レセプターA	NM_139017
IL4	IL-4	CK経路		NM_000589
IL4RA	IL-4 R	CK経路	Th1/Th2細胞	NM_001008699 NM_000418
IL5	IL-5	CK経路		NM_000879
IL6	IL-6	CK経路		NM_000600
IL7	IL-7	CK経路		NM_000880
IL7RA	IL-7 Rアル ファ	CK経路	適応的免疫	NM_002185

30

表9(続き19)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
IL8	CXCL8	炎症経路	CK経路	NM_000584
CXCR1	IL-8 RA	適応的免疫		NM_000634
CXCR2	IL-8 RB	ケモカイン経路	CXCケモカインおよびレセプター	NM_001557
IL9	IL-9	CK経路		NM_000590
IL9R	IL-9 R	CK経路	共通ガンマ鎖レセプター群	NM_176786
IRF1	インターフェロン調節因子1	適応的免疫		NM_002198
ISGF3G	インターフェロン刺激性転写調節因子3、ガンマ 48kDa	インターフェロン経路	インターフェロン刺激性転写調節因子3、ガンマ 48kDa	NM_006084 ;
ITGA4	インテグリンα4b7	接着、転移	インテグリン、アルファ4(抗原CD49D、VLA-4レセプターのアルファ4サブユニット)	NM_000885
ITGA7	インテグリン、アルファ7	接着、転移		NM_002206
インテグリン、アルファE(抗原CD103、ヒト粘膜リンパ球抗原 1 ; アルファポリリペプチド)、遺伝子hCG33203 (Celera社注釈)	CD103	適応的免疫		NM_002208.3

10

表9(続き20)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
ITGB3	インテグリン、ベータ3(血小板糖タンパク質IIIa、抗原CD61)、遺伝子hCG27604 (Celera社注釈)	転移		NM_000212.2
JAK2	ヤヌスキナーゼ2(タンパク質チロシンキナーゼ)、遺伝子hCG31308 (Celera社注釈)	JAK2、hCG31308		NM_004972.2
JAK3		サイトカイン経路		NM_000215
KLRB1		適応的免疫	DNAマイクロアレイ	NM_002258.2
KLRC4	キラー細胞レクチン様レセプター下位群C、メンバー4、キラー細胞レクチン様レセプター下位群K、メンバー1、遺伝子hCG2009644 (Celera社注釈)	AF030313		NM_007360.1
KLRF1		適応的免疫	DNAマイクロアレイ	NM_016523.1
KLRG1	キラー細胞レクチン様レセプター下位群G、メンバー1、遺伝子hCG25214 (Celera社注釈)	AF097367		NM_005810.3

20

30

40

表9(続き2.1)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
KRAS				NM_004985
LAG3	免疫	適応的免疫	リンパ球活性化遺伝子3	NM_002286
LAIR2		適応的免疫		NM_002288 NM_021270
LEF1	リンパエンハンサー結合因子1	リンパエンハンサー結合因子1		NM_016269
LGALS9	レクチン、ガラクトシド結合性、可溶性9(ガレクチン9)、遺伝子hCG1749919 (Celera社注釈)			NM_009587.1 NM_002308.2
LILRB3	白血球イムノグロブリン様レセプター、下位群B(TMおよびTIMドメインを有する)、メンバー3	IRT5 Wangマイクロアレー	免疫抑制	
LRP2	MEGALIN		MEGALIN	NM_004525
LTA	TNF-b	CK経路	LT、TNFB、TNFSF1	NM_000596
SLAMF3	CD229	適応的免疫		NM_002348
MADCAM1	粘膜血管アドレス細胞接着分子1、遺伝子hCG20569 (Celera社注釈)	MADCAM1、hCG20569		NM_130760.1 NM_130761.1
MADH3	MADH-3	TCF経路	SMAD3、JV15-2	NM_005902
MADH7	MADH-7	TCF経路	MADH8、SMAD7	NM_005904
MAF	c-maf Th2	CK経路	v-maf 筋腱膜線維肉腫腫瘍遺伝子ホモログ(鳥類)	NM_005360

10

表9(続き2.2)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
MAP2K1				NM_002755
MDM2	Mdm2、形質転換3T3細胞二重微小体2、p53結合性タンパク質(マウス)	p53経路		NM_002392 ; NM_006878 ; NM_006879 ; NM_006880 ; NM_006881 ; NM_006882 ;
MICA	MHCクラスIポリペプチド関連配列A	MHC経路	腫瘍細胞および中程度の細胞毒に存在	NM_000247
MICB	MHCクラスIポリペプチド関連配列B	MHC経路	腫瘍細胞および中程度の細胞毒に存在	NM_005931
MKI67	増殖	増殖		NM_002417
MMP12	マトリックスメタロプロテナーゼ12(マクロファージエラスターゼ)	接着、転移		NM_002426 L23808
MMP9	マトリックスメタロプロテナーゼ9(ゼラチナーゼB、92kDaゼラチナーゼ、92kDaタイプIVコラゲナーゼ)	接着、転移		NM_004994
MTA1	転移関連1、遺伝子hCG19442 (Celera社注釈)	転移		NM_004689.2

20

30

表9(続き2 3)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
MTSS1	転移サプレッサー1、遺伝子hCG2009512 (Celera社注釈)	転移		NM_014751.2
MYC	MYC	TGF経路	v-myc 骨髄球種増加症ウィルス腫瘍遺伝子ホモログ(鳥類)	NM_002467
MYD88		Toll様経路		NM_002468
MYH6	MYH6	MYH6		D00943(遺伝子カード)
NCAM1		適応的免疫		
NFATC1	活性化T	活性化T		NM_172387 NM_172388 NM_172389 NM_172390 NM_006162
NKG7		適応的免疫	DNAマイクロアレイ	NM_005601.3
NLK		wnt経路	ネモ様キナーゼ	NM_016231
NOS2A	iNos(Nos2A)	iNos(Nos2A)		NM_000625
P2X7	プリンレセプターP2X、リガンドゲートイオンチャネル、7、遺伝子hCG1641456 (Celera社注釈)	P2RX7、hCG1641456		NM_177427.2 NM_002562.4
PDCD1	PD-1	適応的免疫		NM_005018
PECAM-1	CD31	適応的免疫		NM_000442
CXCL4	PF4	ケモカイン経路	CXCケモカインおよびレセプター	NM_002619
PGK1	PGK1	内在性制御	内在性制御	NM_000291

10

20

表9(続き2 4)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
PIAS1		CK経路	活性化STATのタンパク質インヒビター、1	NM_016166
PIAS2		CK経路	活性化STATのタンパク質インヒビター、2	NM_173206 NM_004671
PIAS3		CK経路	活性化STATのタンパク質インヒビター、3	NM_006099
PIAS4		CK経路	活性化STATのタンパク質インヒビター、4	NM_015897
PLAT	プラスミノーゲンアクチベーター、組織、遺伝子hCG17154 (Celera社注釈)	PLAT、hCG17154		NM_033011.1 NM_000930.2 NM_000931.2
PML	腫瘍サプレッサー、インターフェロン伝達性			NM_033238 NM_033239 NM_033240 NM_033242 NM_033244 NM_033245 NM_033246 NM_033247 NM_033249 NM_033250 NM_002675
PP1A	PP1	PP1		NM_021130
CXCL7	NAP-2	ケモカイン経路		NM_002704
PPP2CA	PP2A			NM_002715
PRF1	パーフォリン(PRF1)	Cytotox経路	P1、PFP、HPLH2	NM_005041

30

表 9 (続き 2 5)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
PROM1	CD133、プロミン1、ペンタス パン膜貫通性糖タンパク質		ヒト骨髄、臍帯血 および末梢血のCD 133陽性画分は、 異種移植モデル中 に有効に移植し得 ることが証明され 、また、顆粒球/マ クロファージプレ カーサーの大部分 を含有することが 証明されている	NM_006017
PSMB5	プロテアソ ーム(プロソ ーム、マク ロペイン)サ ブユニット 、ベータタ イプ、5	MHC経路		NM_002797
PTCH		ヘッジホッグ経路パッチ型ホモログ(シ ョウジョウバエ)		NM_000264
PTGS2	COX-2	炎症経路		NM_000963
PTP4A3	タンパク質 チロシンホ スファター ゼタイプIV A、メンバ ー3	転移		NM_032611.1
PTPN6		CK経路	タンパク質チロシ ンホスファターゼ 、非レセプタータ イプ6	NM_080548 N M_080549 NM _002831
PTPRC	CD45	CD45		NM_002838、N M_080922、NM _080923、NM_ 080921
RAB23		ヘッジホッグ経路RAB23、RAS腫瘍遺 伝子群のメンバー		NM_183227 N M_016277

10

20

表 9 (続き 2 6)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
RAC/RH O				NM_018890
RAC2	RAC2	RAC2	ras-関連C3ポツリ ヌス毒素基質2(rho 群、小GTP結合性 タンパク質Rac2)	NM_002872
RAF				NM_002880
RB1	網膜芽腫1 (骨肉腫を含 む)	突然変異およびメ チル化	細胞周期	NM_000321 ;
RBL1	網膜芽腫様1 (p107)	網膜芽腫様1 (p107)		NM_183404 N M_002895
REN	レニン(REN)		レニン(REN)	NM_000537
Drosha	RNASEN、 Drosha ミ クロRNA	マイクロRNA		AJ242976
SELE	CD62E (SE LE)	転移		NM_000450
SELL	CD62L			NM_000655
SELP	CD62E (SE LP)	転移		NM_003005
SERPIN E1	セルピンペ プチダーゼ インヒビタ ー、クレー ドE(ネキシ ン、プラス ミノゲン アクチベ ーターイン ヒビタータ イプ1)、メン バー1、遺伝 子 hCG173 53 (Celera 社注釈)	セルピンE1、hCG17353		NM_000602.1

30

表9(続き27)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
SFRP1	分泌性 縮れ性	分泌性、縮れ性		NM_003012
SIRPベータ1		適応的免疫		NM_006065
SKI	e-ski(SKI)	e-ski(SKI)	SKV	NM_003036
SLAMF1		適応的免疫		NM_003037
SLAMF6	NTB-A	適応的免疫		NM_052931
SLAMF7	CRACC	適応的免疫		NM_021181
SLAMF8	BLAME	適応的免疫		NM_020125
SMAD2	SMAD2	TGF経路	SMAD、DPPホモ ログ2(ショウジョウ バエ)に対する起源	NM_00100365 2 NM_005901
SMAD4	SMAD4	TGF経路	SMAD、DPPホモ ログ2(ショウジョウ バエ)に対する起源	NM_005359
SMO、S MOH	SMO	SMO	平滑化ホモログ(シ ョウジョウバエ)	NM_005631
SMURF1	SMURF1	SMURF1	SMAD特異性E3ユ ビキチンタンパク質 リガーゼ1	NM_181349 N M_020429
SOCS1		CK経路	サイトカイン信号経 路のサブレッサ1	NM_003745
SOCS2		CK経路	サイトカインシグナ ル経路のサブレッサ 2	NM_003877
SOCS3		CK経路	サイトカインシグナ ル経路のサブレッサ 3	NM_003955
SOCS4		CK経路	サイトカインシグナ ル経路のサブレッサ 4	NM_199421 N M_080867

10

表9(続き28)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
SOCS5		CK経路	サイトカインシグナ ル経路のサブレッサ 5	NM_014011
SOCS6		CK経路	サイトカインシグナ ル経路のサブレッサ 6	NM_004232
SOCS7		CK経路	サイトカインシグナ ル経路のサブレッサ 7	NM_014598
SOD1	酸化防止剤	酸化防止剤		NM_000454
SOD2	酸化防止剤	酸化防止剤		NM_00102446 51 NM_001024 466 NM_0006 36
SOD3	酸化防止剤	酸化防止剤		NM_003102
SOS1		TCR経路		NM_005633
SOX17	SOX17	SOX17	SRY(性別判定領域) トボックス17	NM_022454
CD43		適応的免疫		NM_003123
ST14	発がん性14(結腸癌、マ トリプター ゼ、エピシ ンの抑制)	プロテアーゼ、サイトトックス(cytotox)		NM_021978
STAM	STAM	STAM	シグナル変換アダプ ター分子(SH3ドメ インおよびITAMモ チーフ)1	NM_003473

20

30

表9(続き29)

遺伝子名 (旧)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
STAT1	STAT1	STAT1	転写1のシグナルト ランスデューサおよ びアクチベーター、 91kDa	NM_139266 N M_007315
STAT2	STAT2	STAT2	転写2のシグナルト ランスデューサおよ びアクチベーター2、 113kDa	
STAT3	STAT3	STAT3	転写3のシグナルト ランスデューサおよ びアクチベーター3(急性期応答因子)	NM_213662 N M_139276 N M_003150
STAT4	STAT4	STAT4	転写4のシグナルト ランスデューサおよ びアクチベーター	NM_003151
STAT5A	STAT5A	STAT5A	転写5Aのシグナル トランスデューサお よびアクチベーター	NM_003152
STAT5B	STAT5B	STAT5B	転写5Bのシグナル トランスデューサお よびアクチベーター	NM_012448

40

表9(続き30)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
STAT6	STAT6	STAT6	転写6のシグナルトランスデューサおよびアクチベーター、誘発されたインターロイキン4	NM_003153
STK36	STK36	STK36	セリン/スレオニンキナーゼ36(融合ホモログ、ショウジョウバエ)	NM_015690
TAP1	トランスポーター1、ATP-結合性カセット、下位群B(MDR/TAP)	MHC経路		NM_000593
TAP2	トランスポーター2、ATP-結合性カセット、下位群B(MDR/TAP)	MHC経路	トランスポーター2、ATP-結合性カセット、下位群B(MDR/TAP)	NM_000544
TBX21	T-bet (TBX21)	適応的免疫		NM_013351
TCF7	TCF7	wnt経路	転写調節因子7(T細胞特異性、HMG-ボックス)	NM_201633 NM_201632 NM_201634 NM_213648 NM_003202
TERT				NM_198255 NM_003219
TFR3	CD71	内在性制御	内在性制御	NM_003234
TGFA				NM_003236

10

表9(続き31)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
TGFB1	TGF- β /BIGH3	TGF経路		NM_000660
TGFBR1	TGFBR1	TGF経路	形質転換成長因子、ペクチンAレセプタータイプII様キナーゼ、53kDa	NM_004612
TGFBR2	TGFBR2	TGF経路	形質転換成長因子、ペクチンAレセプターII(70/80kDa)	NM_00102484 NM_003242
TIMP3	TIMPメタロペプチダーゼインヒビター3(Sorby基底ジストロフィー、擬似炎症)	TGF経路	接着、転移	NM_000362
TLR1	TLR1	Toll様経路	toll様レセプター1	NM_003263
TLR10	TLR10	Toll様経路	toll様レセプター10	NM_030956
TLR2	TLR2	Toll様経路	toll様レセプター2	NM_003264
TLR3	TLR3	Toll様経路	toll様レセプター3	NM_003265
TLR4	TLR4	Toll様経路	toll様レセプター4	NM_138554 NM_003266
TLR5	TLR5	Toll様経路	toll様レセプター5	NM_003268
TLR6	TLR6	Toll様経路	toll様レセプター6	NM_006068
TLR7	TLR7	Toll様経路	toll様レセプター7	NM_016562
TLR8	TLR8	Toll様経路	toll様レセプター8	NM_138636

20

30

表9(続き32)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
TLR9	TLR9	Toll様経路	toll様レセプター-9	NM_017442 NM_138688
TNF	TNF-a	TNF-a	DIF, TNFA, TNFSF2, CACHECTIN	NM_000594
TNFRSF10A	TRAILR1	アポトーシス経路		NM_003844
TNFRSF11A	RANK	適応的免疫		NM_003839
TNFRSF18	GITR(TNFRSF18)	適応的免疫		NM_004195
TNFRSF1A	TNF RI	適応的免疫		NM_001065
TNFRSF1B	TNF RII	適応的免疫		NM_001066
OX40				NM_003327
TNFRSF5	CD40	適応的免疫		NM_001250, NM_152854
TNFRSF6	Fas	アポトーシス経路	Fas, APT1, CD95, APO-1, FASTM	NM_000043
TNFRSF7	CD27	適応的免疫		NM_001242
TNFRSF8	CD30	適応的免疫		NM_152942 NM_001243
TNFRSF9	4-1BB	適応的免疫		NM_001561
TNFSF10	TRAIL		腫瘍壊死因子(リガンド)上科、メンバー10	NM_003810
TNFSF6	FasL	アポトーシス経路	FASL, FasL, CD178, CD95L, APT1LG1	NM_000639
TOB1	ERBB2のトランスデュース	TCR経路	ERBB2のトランスデュース、1	NM_005749
TP53	腫瘍タンパク質p53(リフラウメニ症候群)	p53経路		NM_000546

10

20

表9(続き33)

遺伝子名 (ID)	別名	遺伝子経路	遺伝子概要	公表参照配列
TSLP		適応的免疫		NM_033035 NM_138551
VCAM1	血管細胞接着分子1、遺伝子hCG32384 (Celera社注釈)	MGC99561, INCAM-100, DKFZp779G2333, HGNC: 12663	転移伝達	NM_001078.2
VEGF	VEGF A	VEGF A		NM_003376
WIF1		wnt経路	抑制因子1	NM_007191
WNT1		wnt経路	ウイングレス-タイプMMTV統合部位群、メンバー1	NM_005430
WNT4	無翼タイプのMMTV統合部位群、メンバー4	wnt経路	ウイングレス-タイプMMTV統合部位群、メンバー4	NM_030761
XCL1	リンフォタクチン	ケモカイン経路	ケモカイン(Cモチーフ)リガンド1	NM_002995
XCR1		ケモカイン経路	ケモカイン(Cモチーフ)レセプター1	NM_00102464 NM_005283
ZAP70	ZAP70	TCR経路	ゼータ-鎖(TCR)関連タンパク質キナーゼ 70kDa	NM_001079
ZIC2		ヘッジホッグ経路 Zic群メンバー2(odd対ホモログ、ショウジョウバエ)	Zic群メンバー2(odd対ホモログ、ショウジョウバエ)	NM_007129

30

表 1 0

受託番号	名称	概要	タイプ	位置
2 転写物	TNFRSF6B	腫瘍壊死因子レセプター上科、メンバー6b、おとり	hCG22751 : 7 転写物	20q13.3
NM_001712	CEACAM1	癌胎児性抗原関連細胞接着分子1(胆汁糖タンパク質)	hCG21881 : 2 転写物	19q13.2
NM_014143	PDZD1LG1	プログラム細胞死1リガンド1	hCG27938 : 1 転写物	9p24
2 転写物	CD8A	CD8抗原、アルファポリペプチド(p32)	hCG34192 : 3 転写物	2p12
NM_000963	PTGS2	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ2(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	hCG39885 : 1 転写物	1q25.2-q25.3
NM_001168	BIRC5	バキュロウイルスIAP模返し含有b(サバイビン)	hCG27811 : 4 転写物	17q25
NM_000655	SELL	セレクトリンL(リンパ球接着分子1)	hCG37088 : 5 転写物	1q23-q25
NM_002164	INDO	インドールアミン-ピロール2,3ジオキシゲナーゼ	hCG27061 : 2 転写物	8p12-p11
NM_016123	IRAK4	インターロイキン-1レセプター関連キナーゼ 4	hCG39494 : 1 転写物	4
NM_000594	TNF	腫瘍壊死因子(TNF上科、メンバー2)	hCG43716 : 1 転写物	6p21.3
NM_003844	TNFRSF10A	腫瘍壊死因子レセプター上科、メンバー10a	hCG31588 : 1 転写物	8p21
NM_002423	MMP7	マトリックスメタロプロテイナーゼ7(マトリリン、子宮)	hCG1640914 : 1 転写物	11q21-q22
NM_006864	LILRB3	白血球イムノグロブリン様レセプター、下位群B(TMおよびTIMドメインを有する)、メンバー3	hCG2009348 : 1 転写物	19q13.4
2 転写物	CD3Z	CD3Z抗原、ゼータポリペプチド(TYT3複合体)	hCG1769040 : 2 転写物	1q22-q23

10

表 1 0 (続き 1)

受託番号	名称	概要	タイプ	位置
2 転写物	TNFRSF8	腫瘍壊死因子レセプター上科、メンバー8	hCG25063 : 1 転写物	1p36
NM_002046	GAPD	グリセアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	hCG2005673 : 1 転写物	12p13
NM_001565	CXCL10	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド10	hCG23842 : 2 転写物	4q21
2 転写物	EBAG9	エストロゲンレセプター結合部位関連、抗原9	hCG15046 : 2 転写物	8q23
NM_000584	IL8	インターロイキン8	hCG16372 : 2 転写物	4q13-q21
2 転写物	STAT1	転写 1 のシグナルトランスデュサーおよびアクチベーター、91kDa	hCG25794 : 6 転写物	2q32.2
NM_001504	CXCR3	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)レセプター3	hCG19964 : 1 転写物	Xq13
NM_000660	TGFB1	形質転換成長因子、ベータ1(カラムチ・エンゲルマン病)	hCG22321 : 2 転写物	19q13.2
NM_012092	ICOS	誘発性T細胞共刺激ミューレクター	hCG1642889 : 1 転写物	2q33
NM_002416	CXCL9	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド9	hCG1781951 : 1 転写物	4q21
2 転写物	CD97	CD97抗原	hCG27517 : 5 転写物	19p13
NM_003853	IL18RAP	インターロイキン18レセプター補助タンパク質	hCG28161 : 1 転写物	2p24.3-p24.1
NM_006564	CXCR6	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)レセプター6	hCG15326 : 1 転写物	3p21
NM_004314	ART1	ADP-リボシルトランスフェラーゼ1	hCG16165 : 1 転写物	11p15
NM_002198	TRF1	インターフェロン調節因子1	hCG24115 : 1 転写物	5q31.1
NM_025240	B7H3	B7ホモログ3	hCG40826 : 1 転写物	15q23-q24
3 転写物	ACE	アンギオテンシンI変換酵素(ペプチジル-ジペプチダーゼA)1	hCG41821 : 5 転写物	17q23
NM_003855	IL18R1	インターロイキン18レセプター1	hCG28160 : 3 転写物	2q12

20

30

表10(続き2)

受託番号	名称	概要	タイプ	位置
NM_013351	TBX21	T-ボックス21	hCG27200 : 1転写物	17q21.2
NM_001562	IL18	インターロイキン18(インターフェロン・ガンマ誘導因子)	hCG39294 : 2転写物	11q22.2-q22.3
NM_005018	PDCD1	プログラム細胞死1	hCG1776289 : 1転写物	2q37.3
NM_000619	IFNG	インターフェロン・ガンマ	hCG15987 : 1転写物	12q14
2転写物	GNLY	グラニユリン	hCG32948 : 3転写物	2p12-q11
NM_002051	GATA3	GATA結合性タンパク質3	hCG23634 : 3転写物	10p15
NM_003376	VEGF	血管内皮増殖因子	hCG18998 : 7転写物	6p12
NM_004131	GZMB	グランザイムB(グランザイム2、細胞毒性Tリンパ球関連セリンエステラーゼ)	hCG40183 : 1転写物	14q11.2
NM_014387	LAT	T細胞の活性化用リンカー	hCG2039637 : 5転写物	16q13
NM_000616	CD4	CD4抗原(p55)	hCG25949 : 2転写物	12pter-p12
NM_031281	IRTA2	イムノグロブリン上科レセプター転位関連2	hCG39827 : 3転写物	1q21
NM_000572	IL10	インターロイキン10	hCG22208 : 1転写物	1q31-q32
NM_003326	TNFSF4	腫瘍壊死因子(リガンド)上科、メンバー4(tax-転写活性化糖タンパク質1、34kDa)	hCG37644 : 2転写物	1q25
NM_018676	THSD1	トロンボスポンジンタイプ1、ドメイン1	hCG29569 : 4転写物	13q14.13
NM_025239	PDCD1LG2	プログラム細胞死1リガンド2	hCG1641650 : 1転写物	9p24.2

10

表11

表S1: 3つの患者コホートの特徴

特性	HEGP	コホート Avicenne 患者数	HEGP-2
腫瘍(T)病期+			
pT1	23	3	2
pT2	69	13	7
pT3	218	76	57
pT4	97	27	9
結節(N)状態			
陰性	241	48	30
陽性	166	71	43
Nx*			2
遠隔転移(M)			
検出せず	313	93	47
検出	94	26	28
UICC-TNM分類(25)			
I	75	12	6
II	137	33	17
III	100	48	24
IV	95	26	28
性別			
男性	216	57	42
女性	191	62	33
位置			
結腸	162	35	41
S字結腸	114	53	25
直腸	131	31	9
分化			
良好	312	78	47
不良	95	41	28

+: 病期は、病理(p)検査によって判定した。T1: 粘膜下組織を浸潤している腫瘍、T2: 固有筋層を浸潤している腫瘍、T3: 固有筋層を貫通し漿膜下組織を浸潤している腫瘍、T4: 腫瘍浸潤性他の臓器または組織を浸潤しているか或いは臓器漿膜を穿孔している腫瘍。
*: 2名の患者の結節状態は判定できなかった。

20

30

表12

表S3: 最小P値カットオフによる全患者における無病生存率解析

全患者における無病生存率(DFS)						
患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)	P値*	P値**
GZMB _{cr}					1.78 10 ⁻⁴	9.70 10 ⁻⁵ 4.85 10 ⁻⁵
Lo	191	34.6	53.8	46.1		
Hi	163	NR	76.6	73.1		
GZMB _{nc}					1.99 10 ⁻⁵	1.28 10 ⁻⁵ 5.38 10 ⁻⁶
Lo	109	20.1	47.1	41.0		
Hi	195	NR	75.4	70.9		
CD45RO _{cr}					4.33 10 ⁻⁵	9.81 10 ⁻⁵ 1.27 10 ⁻⁴

40

Lo	45	11.5	27.5	24.0	24.0			
Hi	261	NR	72.0	65.5	64.9			
CD45RO _{IM}						3.71 10 ³	4.29 10 ⁴	4.41 10 ⁴
Lo	168	41.5	55.4	47.3	47.3			
Hi	145	NR	76.8	72.9	71.9			
CD8 _{CT}						5.19 10 ⁶	3.44 10 ⁶	1.45 10 ⁶
Lo	132	21.0	46.0	39.1	39.1			
Hi	227	NR	74.9	69.5	68.8			
CD8 _{IM}						1.08 10 ³	1.11 10 ³	8.09 10 ³
Lo	186	45.5	56.4	49.1	49.1			
Hi	128	NR	77.8	73.5	72.3			
CD3 _{CT}						5.48 10 ⁶	1.38 10 ⁶	1.09 10 ⁶
Lo	165	23.1	48.2	43.4	43.4			
Hi	192	NR	79.8	72.4	71.6			
CD3 _{IM}						4.78 10 ⁶	6.23 10 ⁶	6.32 10 ⁶
Lo	175	31.1	51.8	43.5	43.5			
Hi	178	NR	78.7	74.7	73.9			
GZMB _{CTIM}						3.32 10 ⁴	8.34 10 ⁵	5.45 10 ⁵
LoLo	70	20.1	46.3	39.1	39.1			
Het	98	77.5	62.2	54.4	54.4			
HiHi	102	NR	80.6	77.8	76.3			
CD45RO _{CTIM}						6.61 10 ⁶	1.05 10 ⁶	1.69 10 ⁶
LoLo	32	5.85	24.2	24.2	24.2			
Het	141	63.28	61.2	50.7	50.7			
HiHi	127	NR	80.3	78.1	76.9			
CD8 _{CTIM}						3.80 10 ⁵	7.70 10 ⁵	5.52 10 ⁵
LoLo	93	20.1	44.3	35.9	35.9			
Het	94	NR	63.8	58.9	58.9			
HiHi	96	NR	81.6	76.1	74.6			
CD3 _{CTIM}						7.56 10 ⁶	1.22 10 ⁷	1.16 10 ⁷
LoLo	93	17.3	42.8	37.4	37.4			
Het	116	68.7	61.7	51.8	51.8			
HiHi	109	NR	87.6	84.0	82.7			

*: 補正したログランクP値(Allman等、1994年)、P値中央値100*CVログランク

** : P値中央値、100*CV階層化ログランク

NR : 到達していない、Het : Hi/LoおよびLo/Hi.

表 1.3

表S4 : 最小P値カットオフによる全患者における全生存率解析

全患者における全生存率(OS)								
	患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)	P値*	P値	P値**
GZMB _{CT}						8.18 10 ⁷	1.29 10 ⁵	1.16 10 ⁵
Lo	191	42.7	62.2	47.3	40.1			
Hi	163	NR	83.8	76.0	68.4			
GZMB _{IM}						5.55 10 ³	8.39 10 ²	6.77 10 ²
Lo	109	43	68.6	47.3	39.9			
Hi	195	NR	74.6	66.7	57.8			
CD45RO _{CT}						5.77 10 ⁷	8.99 10 ⁵	6.57 10 ⁵

Lo	45	25.6	55.5	26.9	20.9			
Hi	261	100.7	74.9	66.3	58.7			
CD45RO _{IM}						1.65 10 ³	8.20 10 ⁶	1.07 10 ²
Lo	168	46.9	67.1	49.4	42.0			
Hi	145	NR	78.6	73.3	65.5			
CD8 _{CT}						2.66 10 ⁷	6.66 10 ⁶	3.79 10 ⁶
Lo	132	35.1	60.3	41.8	36.5			
Hi	227	NR	79.8	71.0	62.3			
CD8 _{IM}						1.22 10 ³	1.51 10 ³	1.50 10 ²
Lo	186	51.3	70.2	51.6	43.0			
Hi	128	NR	78.4	72.6	66.1			
CD3 _{CT}						7.86 10 ⁶	1.35 10 ⁶	9.65 10 ⁶
Lo	165	33.5	57.9	42.4	35.6			
Hi	192	NR	83.2	74.3	66.4			
CD3 _{IM}						9.08 10 ⁵	1.83 10 ⁴	1.46 10 ⁴
Lo	175	46.9	65.9	49.3	40.3			
Hi	178	NR	77.3	70.2	64.0			
GZMB _{CTIM}						2.00 10 ⁴	1.67 10 ²	1.60 10 ²
LoLo	70	50.8	72.4	50.7	45.2			
Het	98	40.3	60.8	48.0	35.4			
HiHi	102	NR	84.1	77.8	70.8			
CD45RO _{CTIM}						8.56 10 ⁶	3.34 10 ⁴	2.91 10 ⁴
LoLo	32	28.4	60.6	22.5	22.5			
Het	141	51.5	66.3	54.5	44.1			
HiHi	127	NR	81.2	76.1	70.5			
CD8 _{CTIM}						6.25 10 ⁶	4.69 10 ⁴	4.28 10 ⁴
LoLo	93	35.1	61.2	40.0	33.8			
Het	94	59.6	74.6	61.0	49.3			
HiHi	96	NR	82.3	75.9	69.2			
CD3 _{CTIM}						3.97 10 ⁷	2.11 10 ⁶	1.37 10 ⁶
LoLo	93	35.1	59.3	40.7	29.9			
Het	116	57.8	68.0	54.7	49.5			
HiHi	109	NR	86.4	80.8	72.6			

*: 補正したログランクP値(Allman等、1994年)、P値中央値100*CVログランク

** : P値中央値、100*CV階層化ログランク

NR : 到達していない、Het : Hi/LoおよびLo/Hi.

表 1.4

表S5 : 中央値カットオフによる全患者における無病生存率解析

全患者における無病生存率(DFS)						
	患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)	P値*
GZMB _{CT}						9.94 10 ⁷
Lo	190	34.6	53.5	45.7	45.7	
Hi	164	NR	76.8	73.2	72.3	
GZMB _{IM}						1.99 10 ⁶
Lo	152	31.1	51.0	46.6	46.6	
Hi	152	NR	79.5	73.6	72.5	
CD45RO _{CT}						2.21 10 ²

10

20

30

40

50

Lo	153	77.4	59.3	54.2	54.2	
Hi	153	NR	72.9	65.8	64.8	
CD45RO _{DM}						1.85 10 ⁻⁴
Lo	158	36.0	53.7	48.0	48.0	
Hi	155	NR	77.0	70.7	69.7	
CD8 _{CT}						3.06 10 ⁻⁷
Lo	180	31.3	51.1	45.4	45.4	
Hi	179	NR	78.0	72.1	71.2	
CD8 _{DM}						2.72 10 ⁻⁴
Lo	157	36.0	56.3	47.7	47.7	
Hi	157	NR	74.3	70.7	69.7	
CD3 _{CT}						1.65 10 ⁻⁶
Lo	179	31.3	52.0	46.7	46.7	
Hi	178	NR	78.7	71.6	70.8	
CD3 _{DM}						2.98 10 ⁻⁸
Lo	177	31.1	51.8	43.6	43.6	
Hi	176	NR	79.1	75.1	74.2	
GZMB _{CTDM}						5.07 10 ⁻⁶
LoLo	91	23.0	46.6	40.9	40.9	
Het	93	NR	67.2	59.2	59.2	
HiHi	86	NR	82.1	78.7	77.0	
CD45RO _{CTDM}						7.60 10 ⁻⁴
LoLo	92	35.8	52.6	49.5	49.5	
Het	119	100.2	63.7	54.4	54.4	
HiHi	89	NR	81.7	77.3	75.8	
CD8 _{CTDM}						7.75 10 ⁻⁷
LoLo	98	20.8	44.9	37.3	37.3	
Het	92	NR	67.8	61.1	61.1	
HiHi	93	NR	79.7	75.4	73.8	
CD3 _{CTDM}						3.52 10 ⁻⁹
LoLo	98	18.2	44.9	39.7	39.7	
Het	119	68.7	62.5	53.2	53.2	
HiHi	101	NR	87.8	84.0	82.5	

* : 中央値カットオフに対するログランクP値
NR : 到達していない、Het : Hi/LoおよびLo/Hi。

表15

表S6 : 中央値カットオフによる全患者における全生存率解析

		全患者における全生存率(OS)			
	患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)
GZMB _{CT}					
Lo	191	42.7	62.2	47.3	40.1
Hi	163	NR	83.8	76.0	68.4
GZMB _{DM}					
Lo	152	50.8	67.4	50.7	44.3
Hi	152	100.8	77.5	68.9	58.2
CD45RO _{CT}					
Lo	153	46.9	65.7	49.1	43.6
Hi	153	111.3	78.6	72.0	62.9

10

20

30

CD45RO _{DM}						1.49 10 ³
Lo	158	43.1	66.3	48.4	41.5	
Hi	155	115.0	78.6	72.8	64.6	
CD8 _{CT}						2.05 10 ³
Lo	180	41.7	65.8	45.7	41.1	
Hi	179	NR	79.6	74.9	64.8	
CD8 _{DM}						2.16 10 ³
Lo	157	50.8	71.9	51.0	42.0	
Hi	157	NR	75.3	69.5	63.2	
CD3 _{CT}						7.04 10 ³
Lo	179	39.2	61.5	45.6	38.5	
Hi	178	115.1	82.5	73.7	66.1	
CD3 _{DM}						9.38 10 ³
Lo	177	46.9	66.4	49.3	40.5	
Hi	176	NR	77.0	70.5	64.2	
GZMB _{CTDM}						2.88 10 ³
LoLo	92	46.9	67.4	49.6	45.4	
Het	92	51.3	66.9	54.4	39.3	
HiHi	86	115.1	83.9	76.5	69.9	
CD45RO _{CTDM}						7.43 10 ³
LoLo	92	40.3	65.2	45.3	41.0	
Het	119	52.9	66.7	55.1	45.3	
HiHi	89	NR	85.9	83.0	75.4	
CD8 _{CTDM}						1.04 10 ⁴
LoLo	98	36.4	66.0	42.3	36.8	
Het	92	59.6	72.6	58.7	46.9	
HiHi	93	NR	80.2	77.5	70.3	
CD3 _{CTDM}						2.08 10 ⁴
LoLo	98	35.1	60.3	41.3	31.0	
Het	119	60.0	69.7	56.7	50.5	
HiHi	101	NR	85.4	80.6	73.0	

* : 中央値カットオフに対するログランクP値
NR : 到達していない, Het : Hi/LoおよびLo/Hi.

表1.6

表S7 : 最小P値カットオフによるUICC-TNM, I, II, III患者における無病生存率解析

		UICC-TNM, I, II, III患者における無病生存率(DFS)						
	患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)	P値*	P値	P値**
GZMB _{CT}						9.17 10 ¹	3.87 10 ¹	3.99 10 ¹
Lo	166	NR	77.0	68.2	68.2			
Hi	107	NR	87.7	83.7	83.7			
GZMB _{DM}						3.47 10 ¹	1.51 10 ¹	1.46 10 ¹
Lo	126	NR	74.1	68.7	68.7			
Hi	112	NR	89.1	82.5	82.5			
CD45RO _{CT}						3.58 10 ³	2.01 10 ³	1.69 10 ³
Lo	25	23.1	42.4	37.1	37.1			
Hi	218	NR	84.4	77.3	77.3			
CD45RO _{DM}						3.49 10 ¹	1.68 10 ¹	1.73 10 ¹
Lo	121	NR	74.2	64.4	64.4			

Hi	125	NR	85.9	81.5	81.5	5.62 10 ⁴	1.76 10 ⁴	1.58 10 ⁴
CD8 _{CT}								
Lo	85	77.5	64.1	55.7	55.7			
Hi	193	NR	88.3	82.0	82.0			
CD8 _{DM}						2.20 10 ¹	1.43 10 ¹	1.81 10 ¹
Lo	138	NR	74.0	65.5	65.5			
Hi	111	NR	87.9	82.9	82.9			
CD3 _{CT}						1.93 10 ⁴	1.22 10 ³	1.16 10 ³
Lo	69	68.7	62.6	53.8	53.8			
Hi	209	NR	87.9	80.9	80.9			
CD3 _{DM}						4.78 10 ⁶	6.23 10 ⁶	6.32 10 ⁶
Lo	103	NR	72.0	60.5	60.5			
Hi	171	NR	88.1	83.3	83.3			
GZMB _{CTDM}						7.81 10 ¹	3.33 10 ¹	3.42 10 ¹
LoLo	87	NR	70.4	64.3	64.3			
Het	69	NR	81.7	73.2	73.2			
HiHi	58	NR	90.8	85.9	85.9			
CD45RO _{CTDM}						1.45 10 ²	4.04 10 ²	4.14 10 ²
LoLo	16	20.1	40.2	40.2	40.2			
Het	110	NR	76.8	64.8	64.8			
HiHi	112	NR	88.3	85.9	85.9			
CD8 _{CTDM}						1.94 10 ³	3.52 10 ³	3.84 10 ³
LoLo	61	35.8	59.0	48.9	48.9			
Het	76	NR	82.2	76.2	76.2			
HiHi	87	NR	87.8	81.6	81.6			
CD3 _{CTDM}						8.57 10 ⁷	2.49 10 ⁴	2.93 10 ⁴
LoLo	30	23.1	49.9	38.0	38.0			
Het	95	NR	76.4	65.8	65.6			
HiHi	124	NR	91.3	87.1	87.1			

* : 補正したログランクP値(Allman等, 1994年), P値中央値100*CVログランク

** : P値中央値, 100*CV階層化ログランク

NR : 到達していない, Het : Hi/LoおよびLo/Hi.

表1.7

表S8 : 最小P値カットオフによるUICC-TNM, I, II, III患者における全生存率解析

		UICC-TNM, I, II, III患者における全生存率(OS)						
	患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)	P値*	P値	P値**
GZMB _{CT}						1.52 10 ¹	1.13 10 ¹	8.16 10 ²
Lo	166	89.0	83.5	69.2	61.1			
Hi	107	NR	85.9	79.7	71.5			
GZMB _{DM}						5.38 10 ¹	7.30 10 ¹	7.16 10 ¹
Lo	126	101.0	81.7	69.1	61.8			
Hi	112	115.0	85.6	76.2	64.5			
CD45RO _{CT}						2.53 10 ⁴	2.92 10 ³	2.25 10 ³
Lo	25	43.0	69.7	41.8	32.5			
Hi	218	NR	83.9	75.4	67.8			
CD45RO _{DM}						1.22 10 ¹	3.85 10 ¹	4.33 10 ¹
Lo	121	101.0	80.1	64.2	56.5			

10

20

30

40

50

Hi	125	NR	84.3	79.4	70.8			
CD8 _{CT}						6.00 10 ⁴	1.09 10 ⁻⁴	1.03 10 ⁻⁴
Lo	85	65.3	74.8	56.1	50.2			
Hi	193	NR	88.2	81	71.8			
CD8 _{IM}						3.03 10 ⁴	4.32 10 ⁻¹	4.20 10 ⁻¹
Lo	138	76.1	82.4	66.3	57			
Hi	111	NR	86.8	81.2	73.7			
CD3 _{CT}						2.51 10 ⁷	1.65 10 ⁻⁵	1.47 10 ⁻⁵
Lo	69	33.5	69.5	47.6	40.1			
Hi	209	NR	88.5	81.4	73.2			
CD3 _{IM}						7.35 10 ⁴	7.61 10 ⁻²	6.25 10 ⁻²
Lo	103	69.3	80.7	65	53.7			
Hi	171	NR	85.9	78.7	71.7			
GZMB _{CTIM}						8.29 10 ²	5.30 10 ⁻¹	4.99 10 ⁻¹
LoLo	87	NR	83.2	69.2	63.3			
Het	69	69.3	80.8	67.7	51.8			
HiHi	58	NR	85.6	79.2	71.8			
CD45RO _{CTIM}						1.02 10 ²	4.39 10 ⁻²	3.72 10 ⁻²
LoLo	16	43.0	73.1	36.5	36.5			
Het	110	37.3	80.1	67.3	56.3			
HiHi	112	NR	85.3	80.8	74.8			
CD8 _{CTIM}						7.02 10 ⁻⁴	1.60 10 ⁻²	1.96 10 ⁻²
LoLo	61	56.2	72.7	52.2	45.3			
Het	76	111.4	88.6	77.3	65.1			
HiHi	87	NR	86.7	81.1	73.6			
CD3 _{CTIM}						2.90 10 ⁶	2.72 10 ⁻⁴	1.21 10 ⁻⁴
LoLo	30	35.5	71.4	43.4	32.6			
Het	95	72.1	76.6	64.6	54.8			
HiHi	124	NR	90.8	85.9	78.6			

* : ログラックP値、P値中央値100*CVログランク

** : P値中央値、100*CV階層化ログランク

NR : 到達していない、Het : Hi/LoおよびLo/Hi.

表18

表S9 : 中央値カットオフによるUICC-TNM、I、II、III患者におけるDFS解析

UICC-TNM、I、II、III患者におけるDFS解析						
	患者数	中央値 月数	2年時 生存率 (%)	4年時 生存率 (%)	5年時 生存率 (%)	P値*
GZMB _{CT}						8.07 10 ⁻²
Lo	140	NR	77.8	68.1	68.1	
Hi	133	NR	84.8	80.6	80.6	
GZMB _{IM}						2.26 10 ⁻²
Lo	119	NR	74.7	69.1	69.1	
Hi	119	NR	87.9	81.6	81.5	
CD45RO _{CT}						2.27 10 ⁻¹
Lo	122	NR	76.5	70.7	70.7	
Hi	121	NR	84.1	75.9	75.9	
CD45RO _{IM}						1.96 10 ⁻²
Lo	124	NR	74.6	65.1	65.1	
Hi	122	NR	85.6	81.1	81.1	

10

20

30

CD8 _{CT}						6.53 10 ⁻⁴
Lo	139	NR	73.3	65.1	65.1	
Hi	139	NR	89.4	83.9	83.9	
CD8 _{BM}						3.99 10 ⁻²
Lo	125	NR	75.9	66.5	66.5	
Hi	124	NR	84.7	80.1	80.1	
CD3 _{CT}						4.48 10 ⁻⁴
Lo	139	NR	72.6	66.1	66.1	
Hi	139	NR	91.1	83.1	83.1	
CD3 _{BM}						4.42 10 ⁻⁴
Lo	138	NR	74.4	65.4	65.4	
Hi	136	NR	90.1	84.9	84.9	
GZMB _{CTNM}						5.63 10 ⁻²
LoLo	72	NR	69.4	61.9	61.9	
Het	74	NR	85.6	77.8	77.8	
HiHi	68	NR	84.1	79.8	79.8	
CD45RO _{CTNM}						6.94 10 ⁻²
LoLo	71	NR	72.9	67.0	67.0	
Het	100	NR	79.4	68.9	68.9	
HiHi	67	NR	87.6	85.6	85.6	
CD8 _{CTNM}						3.36 10 ⁻³
LoLo	80	100.3	66.8	57.8	57.8	
Het	65	NR	82.9	75.6	75.6	
HiHi	79	NR	86.4	81.3	81.3	
CD3 _{CTNM}						6.20 10 ⁻⁵
LoLo	73	100.3	65.4	58.8	58.8	
Het	102	NR	82.4	73.1	73.1	
HiHi	74	NR	94.2	89.1	89.1	

**：中央値カットオフに対するログランク検定

NR：到達していない、Het：Hi/LoおよびLo/Hi。

表19

表S10：中央値カットオフによるUICC-TNM、I、II、III患者におけるOS解析

UICC-TNM、I、II、III患者における全体生存者(OS)						
	患者数	中央値月数	2年時生存率(%)	4年時生存率(%)	5年時生存率(%)	P値*
GZMB _{CT}						5.06 10 ⁻²
低	140	27.1	81.2	66.7	59.0	
高	133	NR	87.8	80.0	71.5	
GZMB _{BM}						7.28 10 ⁻¹
低	119	30.4	83.3	70.2	62.5	
高	119	115.1	83.7	74.8	63.7	
CD45RO _{CT}						2.13 10 ⁻²
低	122	21.4	79.0	63.5	57.1	
高	121	NR	86.0	80.8	71.4	
CD45RO _{BM}						1.31 10 ⁻¹
低	124	21.4	79.8	64.3	58.8	
高	122	NR	84.7	79.7	70.8	
CD8 _{CT}						8.49 10 ⁻³
低	139	24.8	82.5	63.9	55.7	

高	139	NR	85.9	82.9	74.6	
CD8 _{BM}						7.20 10 ⁻²
低	125	30.0	84.2	67.6	57.3	
高	124	NR	84.6	78.5	71.8	
CD3 _{CT}						9.15 10 ⁻³
低	139	18.9	78.0	62.5	54.8	
高	139	NR	89.4	83.0	74.6	
CD3 _{BM}						2.80 10 ⁻²
低	138	26.0	82.7	67.1	58.7	
高	136	NR	85.3	80.5	72.3	
GZMB _{CTNM}						6.09 10 ⁻¹
LoLo	72	111.4	82.6	66.9	63.3	
Het	74	76.1	82.3	72.3	54.7	
HiHi	68	115.1	84.5	75.5	69.2	
CD45RO _{CTNM}						2.48 10 ⁻²
LoLo	71	87.3	78.4	59.2	55.8	
Het	100	74.2	81.1	71.1	58.1	
HiHi	67	NR	87.7	85.7	79.9	
CD8 _{CTNM}						1.56 10 ⁻²
LoLo	80	59.6	79.3	60.4	49.6	
Het	65	NR	88.5	73.4	64.1	
HiHi	79	NR	83.7	82.2	75.5	
CD3 _{CTNM}						5.35 10 ⁻³
LoLo	73	59.6	76.0	57.1	48.4	
Het	102	78.8	82.9	73.6	65.0	
HiHi	74	NR	90.3	87.1	78.8	

*：中央値カットオフに対するログランク検定

NR：到達していない、Het：Hi/LoおよびLo/Hi。

表20(S11)および21(S12)

表S11a：最小によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変数	危険率	95% CI	P値
T病期	1.574	(1.09~2.26)	0.02
N病期***	1.398	(0.83~2.36)	0.21
分化	0.77	(0.42~1.43)	0.41
CD3 _{CT} /CD3 _{BM} パターン*	2.391*	(1.68~3.41)*	1.4 10 ⁻³
	2.379**	(1.67~3.39)**	

*：3群(HiHi、LoLo、Het)による最小P値カットオフ

**：リープ・ワン・アウト(leave-one-out)法^{26,45,53,54}を使用して補正。(発見的縮小係数、Hollander等)、同様なxブートストラップ。

***注記：Nは、比例ハザード仮説に違反する。このファクターは、階層化T = 0.01；Diff = 0.34039.410 *Ames-at-risk* 病気のための単独予後因子_{CD3_{CT}-CD3_{BM}}により達成される。

階層化モデルからのHR：T = 1.572(1.10~2.25)；D CD3_{CT}/CD3_{BM} = 2.451(1.71~3.51)。縮小係数：c = 0.9；

表S11b：最小によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変数	危険率	95% CI	P値
T病期	1.370	(0.86~2.19)	0.19
N病期***	1.210	(0.60~2.47)	0.59

10

20

30

40

50

分化	1.020	(0.50~2.08)	0.97
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	6.200*	(2.96~12.99)*	1.3 10 ⁻⁵
	5.940**	(2.83~12.43)**	

*: 2群(HiHi、LoLo)による最小P値カットオフ

** : リーブ・ワン・アウト(leave-one-out)法、 $\Delta_{\text{CD3CT/CD3M}}$ を使用して補正。(発見的縮小係数、Hollander等)、同様なrプットストラップ。

***注記: Nは、比例ハザード仮説に違反する。このファクターは、階層化T = 0.02; Diff = 0.97; $\Delta_{\text{CD3CT/CD3M}}$ 病気のための単独予後因子 $\Delta_{\text{CD3CT/CD3M}}$ により達成される。

階層化モデルからのHR; T = 1.408(0.88~2.26); D CD3_{CT}/CD3_M = 6.322(2.99~13.35)、縮合因子: c =

表S11c: 中央値 によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変量	危険率	95% CI	P 値
T 病期	1.560	(1.074~2.26)	0.02
N 病期	1.490	(0.882~2.53)	0.14
分化	1.290	(0.682~2.45)	0.43
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	1.870	(1.311~2.66)	5.5 10 ⁻⁴

*3群(HiHi、LoLo、HeL)による中央値でのカットオフ

表S11d: 中央値 によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量割合の危険Co

変量	危険率	95% CI	P 値
T 病期	1.484	(0.361~6.10)	0.58
N 病期	2.065	(0.736~5.80)	0.17
分化	1.532	(0.571~4.11)	0.40
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	4.626	(1.736~12.33)	2.2 10 ⁻³

*2群(HiHi、LoLo)による中央値でのカットオフ

表S12a: 最小 によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変量	危険率	95% CI	P 値
T 病期	1.170	(0.90~1.52)	0.25
N 病期	1.370	(0.90~2.11)	0.15
分化	1.050	(0.68~1.62)	0.84
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	1.890	(1.42~2.51)	1.2 10 ⁻⁵

*3群(HiHi、LoLo、HeL)による最小P値カットオフ

表S12b: 最小 によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変量	危険率	95% CI	P 値
T 病期	0.980	(0.69~1.39)	0.91
N 病期	1.370	(0.75~2.52)	0.31
分化	1.590	(0.97~2.61)	0.07
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	3.710	(1.97~6.97)	4.7 10 ⁻⁵

*2群(HiHi、LoLo)による最小P値カットオフ

表S12c: 中央値 によるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変量	危険率	95% CI	P 値
T 病期	1.200	(0.912~1.57)	0.20
N 病期	1.450	(0.940~2.22)	0.09

分化	1.080	(0.689~1.68)	0.75
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	1.460	(1.107~1.92)	7.2 10 ⁻³

*3群(HiHi、LoLo、HeL)による中央値カットオフ

表S12d: 中央値カットオフによるUICC-TNM、I、II、III患者における多変量比例ハザードCo

変量	危険率	95% CI	P 値
T 病期	1.160	(0.818~1.66)	0.40
N 病期	1.240	(0.696~2.19)	0.47
分化	1.480	(0.892~2.45)	0.13
CD3 _{CT} /CD3 _M パターン*	2.200	(1.219~3.97)	8.8 10 ⁻³

*2群(HiHi、LoLo)による中央値カットオフ

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】 1群の75の結腸直腸癌の、VELIPI状態および再発による炎症-、免疫抑制-または免疫適応関連遺伝子の発現結果を示す。各相対的mRNA発現量を、各サンプルにおける18S mRNAの量に標準化した。各量を、再発を経験した浸潤陽性(VELIPI+)患者の参照群と比較した折り畳み(fold)増大(%)として示している。*: 参照群と比較してP<0.05。

【図2】 種々の群の患者(AJCC/UICC TNM病期決定に従うNおよびM病期、na: 該当せず)におけるCD45RO+細胞数/mm²の平均±SEMを示す。統計解析は、マン・ウィットニー検定を使用して行った。*有意差を示す(P<0.05)。

10

20

30

40

50

【図3】CD45RO-hi (>250 CD45RO+細胞数/mm², n=176、上の線)およびCD45RO-lo (<250 CD45RO+細胞数/mm², n=160、下の線)におけるカプラン・メイヤー全生存率(OS)および無病生存率(DFS)曲線を示す。

【図4】再発有り(黒のヒストグラム)または再発無し(白のヒストグラム)患者由来の腫瘍の中心(CT)および浸潤性周辺部(IM)における免疫集団密度の比較を示す。

【図5】カットオフ全ての有意性を、全生存におけるCD3_{CT}数/mm² (黒線)およびCD3_{IM}数/mm² (緑線)の関数としてプロットしている。また、コホートの25、50および75%におけるカットオフ値も双方の領域について示している。水平線(P=0.05)よりも上のP値は、全て有意である。

【図6】各腫瘍領域(CTまたはIM)における高密度(下のヒストグラム)または低密度(上のヒストグラム)の適応的免疫細胞を有する患者の中央値DFSを示す。

【図7】415名の結腸直腸癌患者における、腫瘍中心における高CD3密度(CD3_{CT}^{Hi})および浸潤性周辺部における高CD3密度(CD3_{IM}^{Hi}) (太灰色線)、高CD3_{CT}および低CD3_{IM} (細灰色線)、低CD3_{CT}および高CD3_{IM} (太黒線)、並びに低CD3_{CT}および低CD3_{IM} (細黒線)の存在に従う、DFS (図7A)およびOS (図7B)期間中のカプラン・メイヤー曲線を示す(ログランク統計検定: OSにおいて $P<10^{-4}$; DFSにおいて、** $P<10^{-4}$ 、* $P<0.05$)。図7Cは、適応的免疫マーカーの腫瘍領域合計分析を示す。両腫瘍領域(CTプラスIM)における高密度(下のヒストグラム)または低密度(上のヒストグラム)の適応的免疫細胞を有する患者の中央値DFSを示す。

【図8】下記を示す: 図8a: 415名の結腸直腸癌患者におけるデュークス病期(デュークスA: 赤線(n=75)、B: 緑線(n=137)、C: 青線(n=99)、およびD: 黒線(n=95))に従うDFS期間のカプラン・メイヤー曲線; 図8b: デュークス病期(図8aのような)に従い且つ低CD3_{CT}プラス低CD3_{IM} (太線、n=93)または高CD3_{CT}プラス高CD3_{IM} (細線、n=109)の存在に従うDFS期間のカプラン・メイヤー曲線; 図8c: デュークス病期に従い且つ低CD3_{CT}プラス低CD3_{IM}プラス低CD45RO_{CT}プラス低CD45RO_{IM} (太線、n=25)または高CD3_{CT}プラス高CD3_{IM}プラス高CD45RO_{CT}プラス高CD45RO_{IM} (細線、n=87)の存在に従うDFS期間のカプラン・メイヤー曲線、** $P<10^{-4}$ 。図8d: デュークス病期に従い且つ低CD3_{CT}プラス低CD3_{IM}プラス低CD45RO_{CT}プラス低CD45RO_{IM} (太線、n=25)または高CD3_{CT}プラス高CD3_{IM}プラス高CD45RO_{CT}プラス高CD45RO_{IM} (細線、n=87)の存在に従うOS期間のカプラン・メイヤー曲線。

【図9】腫瘍中心(黒線)および腫瘍浸潤周辺部(灰色線)における高CD3+密度(CD3^{Hi}、群A)および低高CD3+密度(CD3^{Lo}、群B)の存在によるDFS期間におけるログランクP値を示す。CD3+細胞密度(細胞数/mm²)および各群(AおよびB)における患者数を示している。P値は、カットオフ値の大きな間隔(腫瘍中心において50~1000細胞/mm²、腫瘍浸潤周辺部においては80~1300細胞/mm²)において有意である。得られた結果は、大きい範囲のカットオフ値(判定した最小P値カットオフを中心とした)として、他の群により容易に再現可能であり、患者転帰を判別する。

【図10】下記を示す: 図10-A: CRCを有する患者におけるUICC-TNM病期(病期I: 赤線(n=75)、II: 緑線(n=137)、III: 青線(n=99)、およびIV: 黒線(n=95))に従う無病生存期間のカプラン・メイヤー曲線。図10-B: UICC-TNM病期(パネルAに置けるような)に従い且つ合計腫瘍領域でのCD3+細胞密度(CD3_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo}、太線、n=93; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi}、細線、n=109)による無病生存期間のカプラン・メイヤー曲線。腫瘍領域内で調和した現場免疫反応を有していないような下位群の患者(CD3+細胞密度におけるHi/LoまたはLo/Hi)も、コホート全体として、同様なカプラン・メイヤー曲線を示していた。図10-C: UICC-TNM病期に従い且つ合計腫瘍領域でのCD3+およびCD45RO+細胞密度(CD3_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo}プラスCD45RO_{CT}^{Lo}CD45RO_{IM}^{Lo}、太線、n=16; CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi}プラスCD45RO_{CT}^{Hi}CD45RO_{IM}^{Hi}、細線、n=88)による無病生存期間のカプラン・メイヤー曲線。カットオフ値は、CD3_{CT}、CD3_{IM}、CD45RO_{CT}およびCD45RO_{IM}において、それぞれ、250、640、60および190であった。ログランク統計検定、** $P<10^{-4}$ 。

【図11】腫瘍領域(CTおよびIM)内でのCD8+細胞の組織化による無病生存(A)、疾患特異性生存(B)および全生存(C)期間を示すカプラン・メイヤー曲線を示す。病期I/IIの結腸癌

10

20

30

40

50

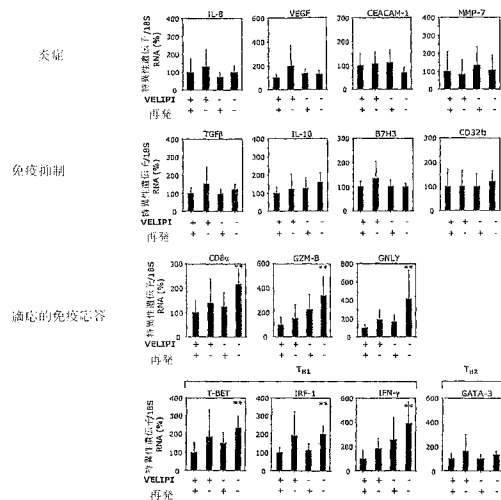
(左側)および直腸癌(右側)を有する患者における、両腫瘍領域における高密度のCD8+細胞(CD8-CT/IM-hi、赤線)、両腫瘍領域における不均質密度のCD8+細胞(CD8-CT/IM-het、緑線)、両腫瘍領域における低密度のCD8+細胞(CD8-CT/IM-lo、黒線)の存在(ログランク統計検定、全比較において $P<0.001$)。

【図12】腫瘍領域(CTおよびIM)内でのCD45RO+細胞の組織化による無病生存(A)、疾患特異性生存(B)および全生存(C)期間を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。病期I/IIの結腸癌(左側)および直腸癌(右側)を有する患者における、両腫瘍領域における高密度のCD45RO+細胞(CD8-CT/IM-hi、赤線)、両腫瘍領域における不均質密度のCD45RO+細胞(CD45RO-CT/IM-het、緑線)、両腫瘍領域における低密度のCD45RO+細胞(CD45RO-CT/IM-lo、黒線)の存在(ログランク統計検定、全比較において $P<0.001$)。

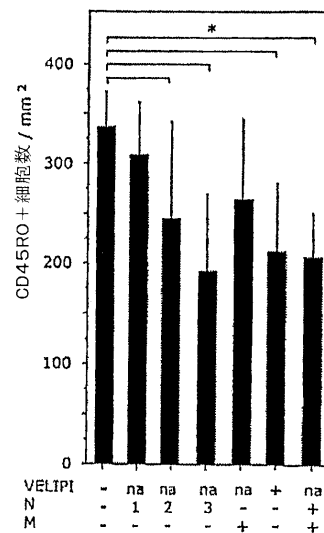
【図13】腫瘍領域(CTおよびIM)内でのCD45RO+およびCD8+細胞の組織化による無病生存期間を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。病期I/IIの結腸癌を有する272名の患者における、両腫瘍領域における高密度のCD45RO+およびCD8+細胞(CD45RO/CD8-CT/IM-hi、赤線)、両腫瘍領域における不均質密度のCD45RO+およびCD8+細胞(CD45RO/CD8-CT/IM-het、緑線)、CT領域における低密度のCD45RO+およびCD8+細胞(CD45RO-CT-lo/CD8-CT-lo、青線)、両腫瘍領域における低密度のCD45RO+およびCD8+細胞(CD45RO/CD8-CT/IM-lo、黒線)の存在(ログランク統計検定、全比較において $P<0.001$)。病期I/II結腸直腸癌を有する患者の全コホートを示している(黒点線)。即ち、 $>95\%$ CD45RO/CD8-CT/IM-hiの患者は、18年後も無病であり、一方、 0% CD45RO/CD8-CT/IM-loの患者は、2年後のみ無病であった。

【図14】6種のマーカー(PDCD1LG1、VEGF、TNFRSF6B、IRF1、IL18RA、SELL)の遺伝子発現レベルによる無病生存期間を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。4通りの組合せを示している。(ログランク統計検定、全比較において $P<0.001$)。

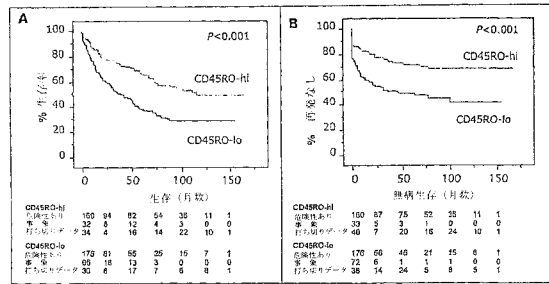
【図1】



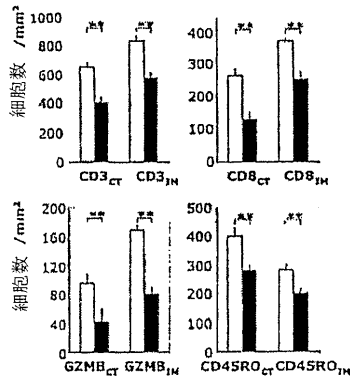
【図2】



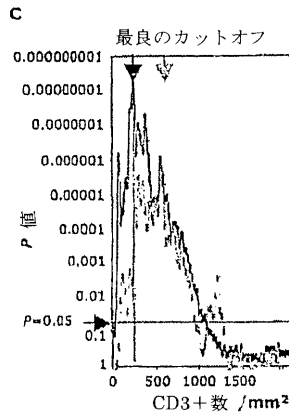
【図 3】



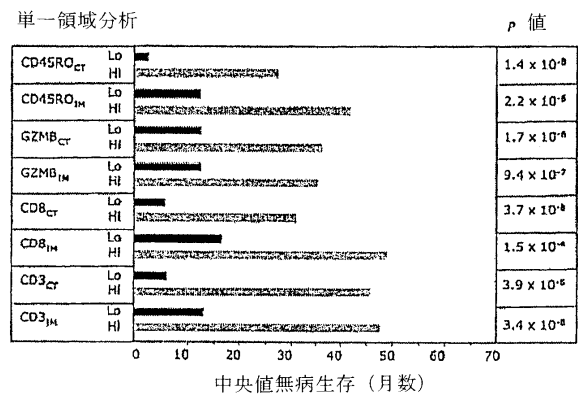
【図 4】



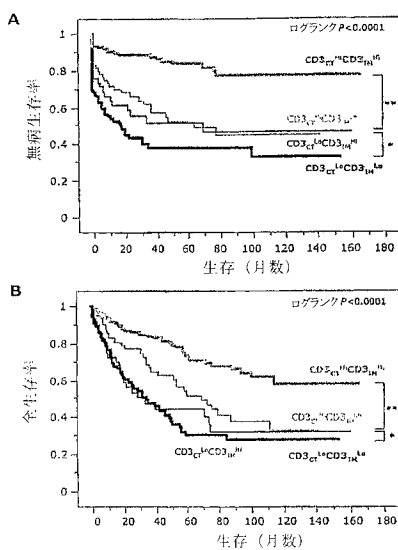
【図 5】



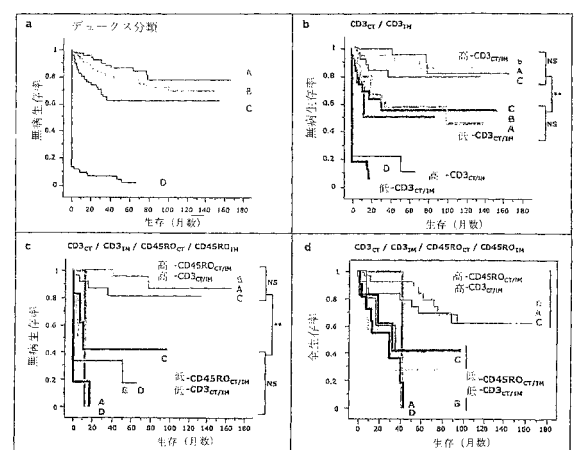
【図 6】



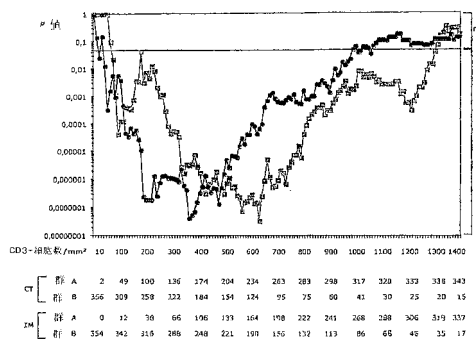
【図 7】



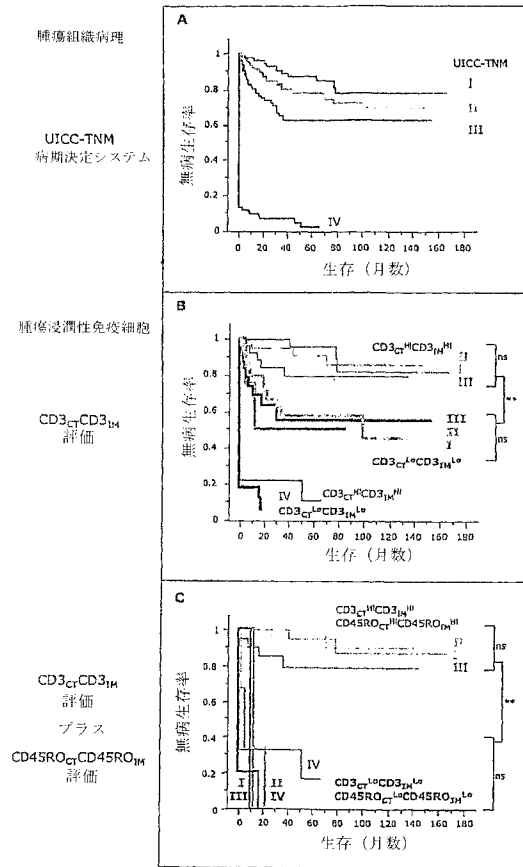
【図 8】



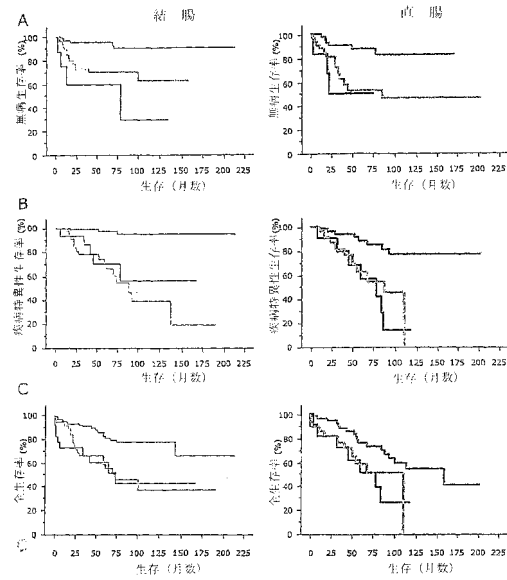
【図 9】



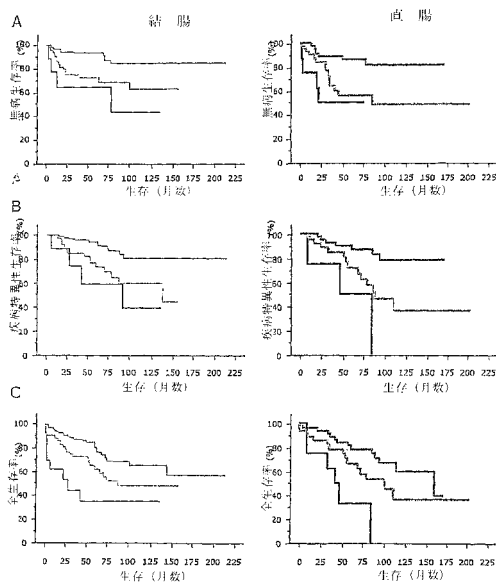
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【図 13】

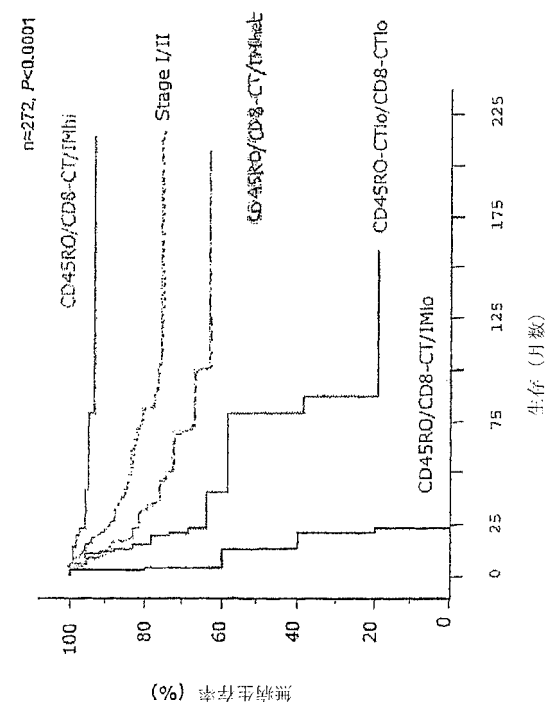
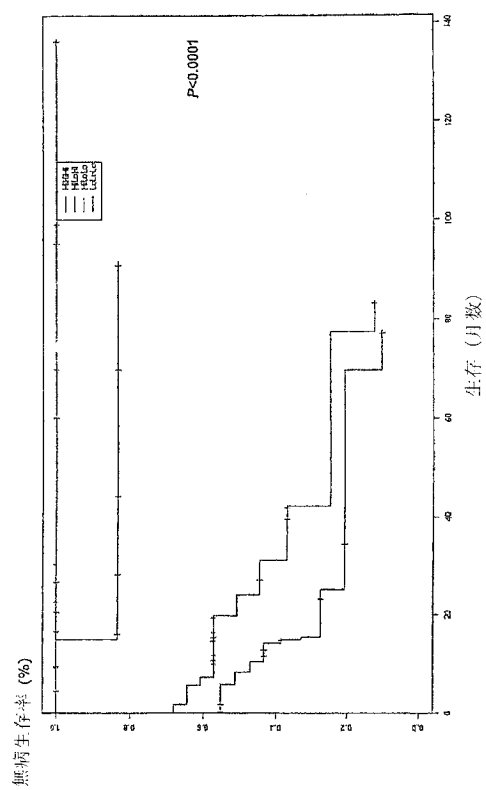


FIGURE 13

【図 14】



フロントページの続き

(74)代理人 100141357

弁理士 鈴木 音哉

(72)発明者 ガロン ジェローム

フランス国 エフー75015 パリ リュ プリュメ 6

(72)発明者 パージュ フランク

フランス国 エフー92100 ブーローニュービランクール リュ ドゥ シリー 11

(72)発明者 フリドマン ヴォルフーエルマン

フランス国 エフー75005 パリ リュ ドゥ ベルトーレ 27

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 Ishigami, S. et al., CD3-zetachain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients., Cancer, 2002年, Vol.94(5), p.1437-42

Nistico P. et al., Host immunosurveillance contributes to the control of erbB-2 overexpression in HLA-A2-breast-cancer patients. , Int.J .Cancer, 1999年, Vol.84(6), p.598-603

Mortarini R. et al., Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma., Cancer Res. , 2003年, Vol.63(10), p.2535-45

CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease., Cancer Res. , 2004年, Vol.64(21), p.7697-701

Ishigami S. et al., CD3-zetachain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients., Cancer, 2002年, Vol.94(5), p.1437-42

Johnson S.K. et al., Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung., Lung Cancer. , 2000年, Vol.27(1), p.27-35

Nagtegaal et al., Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study., BMC Cancer, 2001年, Vol.1, p.7

Nijman H.W. et al., T cell infiltration and MHC I and II expression in the presence of tumor antigens: An immunohistochemical study in patients with serous epithelial ovarian cancer., Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol., 2001年, Vol.94(1), p.114-20

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

PubMed