

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6807873号
(P6807873)

(45) 発行日 令和3年1月13日 (2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月10日 (2020.12.10)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 B

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6827 Z

C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6886 Z

請求項の数 14 (全 104 頁)

(21) 出願番号 特願2017-562131 (P2017-562131)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月24日 (2016.2.24)
 (65) 公表番号 特表2018-509934 (P2018-509934A)
 (43) 公表日 平成30年4月12日 (2018.4.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/053813
 (87) 国際公開番号 W02016/135168
 (87) 国際公開日 平成28年9月1日 (2016.9.1)
 審査請求日 平成31年2月1日 (2019.2.1)
 (31) 優先権主張番号 15156389.7
 (32) 優先日 平成27年2月24日 (2015.2.24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 514009627
 ルブレクトーカールズーユニベルシタット
 ハイデルベルク
 ドイツ連邦共和国 69117 ハイデル
 ベルク, グラベンガッセ 1
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100163544
 弁理士 平田 緑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の検出のためのバイオマーカーパネル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乳癌の予後判定及び / 又は診断のための指標をインビトロで測定する方法であって、被
 験体から得られた試料において、

a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選
 択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び / 又は発現レベルを測定
 する工程と、及び

b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマ
 ーカーの存在を測定する工程と、

を含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び / 又は発現レベル
 、並びにmiRNAマーカーの存在が、前記被験体の予後及び / 又は診断の指標である、方法
 。

【請求項 2】

乳癌の予後及び / 又は診断には、

i. 乳癌の発症のリスク、

ii. 乳癌の存在、又は、

iii. 乳癌の進行、

が含まれる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

a) メチル化マーカーRPTOR、MGRN1及びRAPSN並びに任意にHYAL2のメチル化状態及び /

10

20

又は発現レベルを測定し、及び、

b) miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの存在を測定する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

a) メチル化マーカーDYRK4、S100P、FUT7及びSLC22A18並びに任意にHYAL2のメチル化状態及び／又は発現レベルを測定し、及び、

b) miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの存在を測定する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項5】

a) メチル化マーカーMGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4及び任意にHYAL2のメチル化状態及び／又は発現レベルを測定し、及び、

b) miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの存在を測定する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項6】

乳癌の変化又は乳癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量の指標をインビトロで測定する方法であって、

被験体の試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマーカーの量を測定し、任意に、参照における、前記と同じメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量を測定し、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量を測定する工程を含み、

対象となる試料における、前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量が医薬品の投与量の指標である、方法。

【請求項7】

乳癌の変化又は乳癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合するための指標をインビトロで測定する方法であって、

(a) 試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量を測定する工程と、及び

(c) 試験される試料を、対象となる試料中に存在する前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、を含み、医薬品の投与量を、対象となる試料における、前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なる場合適合させる指標である、方法。

【請求項8】

乳癌又は乳癌の発症に対する物質の有益な効果及び／又は不利な効果を測定するための検査方法であって、

(a) 第1の試料を前記物質に曝露する工程、

(b) 前記第1の試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(c) 健康又は正常な組織、器官若しくは個体由来の1つ以上の第2の参照又は参照試料に

10

20

30

40

50

おける、前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量を測定する工程と、及び

(d) 前記第1の試料中に存在する前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの量が、前記1つ以上の第2の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、を含む、検査方法。

【請求項 9】

乳癌治療に対する応答者としての患者を特定するための検査方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の増加及び／又は前記少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに前記miRNAマーカーの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、検査方法。

10

【請求項 10】

乳癌治療に対する非応答者としての患者を特定するための検査方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで前記少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び／又は前記少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに前記miRNAマーカーの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、検査方法。

20

【請求項 11】

- i. 乳癌の発症のリスク、
- ii. 乳癌の存在、又は、
- iii. 乳癌の進行、

の予後判定及び／又は診断のための検査手段であって、

a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを検出する1つ以上の検査手段と、

30

b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNAマーカーの量の検出のための1つ以上の検査手段と、を含む、検査手段。

【請求項 12】

請求項11に記載の検査手段を含むキット。

【請求項 13】

請求項11に記載の検査手段又は請求項12に記載のキットの、

- i. 乳癌の発症のリスク、
- ii. 乳癌の存在、及び／又は、
- iii. 乳癌の進行、

40

の予後判定及び／又は診断の判断材料を提供するための使用。

【請求項 14】

乳癌の特定のための検査装置であって、

(a) 被験体の試料における、

(i) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを測定するための検出剤と、

(ii) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bのmiRNA

50

Aの存在を測定するための検出剤と、
を含む分析ユニットと、

(b) 分析ユニットによって測定された量と参照との比較を実施するためのアルゴリズム
が有形に組み込まれたデータプロセッサを含み、かつ前記比較に基づいて確立された診断
を含む出力ファイルを生成することができる評価ユニットと、
を備える、検査装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メチル化マーカー及びmiRNAマーカーのパネル、並びに該パネルの、癌の予
後判定、診断及び／又は治療における使用、上記マーカーを検出するための手段、上記手
段を含むキット、及び上記マーカーのパネルを分析するための装置に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、世界中で最も重要な保健医療問題の一つである。2008年には世界的に主な死亡原因
として、1240万件の新たな癌の症例及び760万件の癌関連死が発生した。世界的な癌由
来の死は増え続けており、2030年には1200万件の死が癌によって引き起こされるものと見
積もられている。乳癌は、女性の間で最も良く起こる癌である。ほぼ9人の女性のうち1人
がその人生の間に乳癌を発症することとなる (Feuer, E.J., et al., The lifetime risk
of developing breast cancer. J Natl Cancer Inst 85, 892-897 (1993))。毎年、世
界的には約130万人の女性が乳癌を発症する。死亡率は、早期診断及び早期治療において
なされるあらゆる努力及び進歩のおかげで、長い年月をかけて減少し続けている (Jemal
A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA C
ancer J Clin 2011; 61:69-90)。それにもかかわらず、何千人もの女性がこの疾患によ
り毎年亡くなっている。米国女性において、全体5年生存率は、該疾患が既に遠隔臓器に
まで広がっている場合の23%と対照的に、早期段階で診断された場合には98%である。この
ように、早期の乳癌検出は、この疾患と戦う上での主たる課題の一つに当たるものである
。マンモグラフィースクリーニングは、最近では診断的標準として適用されている。しか
しながら、マンモグラフィースクリーニングは、それが電離放射線を使用すること、そし
て偽陽性率が、スクリーニングされる個体の年齢にも応じて8%~10%であることから制
約がある (Taplin S, Abraham L, Barlow WE, Fenton JJ, Berns EA, Carney PA, Cutter
GR, Sickles EA, Carl D, Elmore JG. Mammography facility characteristics associa
ted with interpretive accuracy of screening mammography. J Natl Cancer Inst 2008
; 100: 876-87)。

【0003】

ほとんどの乳癌は散発的に生ずるが、家族性乳癌は全ての乳癌症例の約10%にのぼる (F
ackenthal, J.D. & Olopade, O.I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRC
A2 in diverse populations. Nat Rev Cancer 7, 937-948 (2007))。主要な乳癌関連遺
伝子であるBRCA1及びBRCA2における変異は、25%の割合を占め、他の中浸透度及び低浸透
度の遺伝子における変異は、全ての家族性の症例の約5%の割合を占めている (Yang, R. &
Burwinkel, B. (eds.). Familial risk in breast cancer, 251-256 (Springer, 2010)
)。最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS) 及び単一候補遺伝子アプローチは、乳癌に関す
る遺伝的リスク多様体の検出において大きな成功を収めている (Thomas, G., et al. A
multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new ri
sk alleles at 1 p 11.2 and 14q24.1 (RAD51 L1). Nat Genet 41, 579-584 (2009); Cox
, A., et al. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer r
isk. Nat Genet 39, 352-358 (2007); Stacey, S.N., et al. Common variants on chrom
osome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. Na
t Genet 40, 703-706 (2008); Ahmed, S., et al. Newly discovered breast cancer sus
ceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. Nat Genet 41, 585-590 (2009); Easton, D.F.,

et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087-1093 (2007); Milne, R.L., et al. Risk of estrogen receptor-positive and -negative breast cancer and single-nucleotide polymorphism 2q35-rs13387042. *J Natl Cancer Inst* 101, 1012-1018 (2009); Frank, B., et al. Association of a common AKAP9 variant with breast cancer risk: a collaborative analysis. *J Natl Cancer Inst* 100, 437-442 (2008)). しかしながら、多数の乳癌のリスク要因が、依然として調査されている。

【 0 0 0 4 】

BCと比べて、卵巣癌 (OvCa) は、比較的まれにしか起こらないが、その高い悪性度のため婦人科学的な癌による主な死亡原因である。2008年には、世界的に225000人の女性が卵巣癌と診断され、これらの女性のうち140000人が該疾患により亡くなっている。一般的に、OvCaを伴う女性は初期症状をほとんど示さないため、卵巣癌の症例のほぼ四分の三は進行期にあり、その際にその疾患は卵巣を越えて十分に拡がっている。膵臓癌 (PaCa) は、全ての上皮性悪性腫瘍のうちで最も侵襲性が強い。世界的なPaCaの279000件の新たな診断で、PaCa患者の全体5年生存率は、5%未満である。最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、BC、OvCa及びPaCaのリスクと関連した幾つかの遺伝的多様体の検出に成功したが、BCの早期検出のための有用なマーカーは特定されていない。

【 0 0 0 5 】

転移性乳癌 (MBC) は、世界的な主要な健康問題である。最近の治療戦略は、治癒する症例が非常に少ないプライマリ緩和ケア (primary palliative care) にターゲットを絞っている。MBCへの取り組みの一つの代替的なアプローチは、バイオマーカーを適用して高リスク群及び治療応答を特定するスクリーニング法の開発である。これは、臨床医の意思決定をやすくし、患者にとって適切な治療計画を臨床医が採択する助けになると考えられる。

【 0 0 0 6 】

循環腫瘍細胞 (CTC) は、転移に関する、具体的には無増悪生存期間及び全生存期間に関する、FDA認証された独立した予後マーカーとして提案された。7.5 mlの血液あたりに5より大きなCTCの基本カットオフが、CTC陽性として定義されている (Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, et al; Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer; *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781-91)。しかしながら、顕性遠隔転移を伴うかなりの割合の患者がCTCについて陰性であることを留意することが重要である。これはCTCにおける上皮間葉転換の現象に部分的に寄与し得ると考えられるが、その場合にCTCは、EpCAM又はサイトケラチン-8、サイトケラチン-18及びサイトケラチン-19のような上皮マーカーの発現を活用する列挙技術によって見落とされることがある。

【 0 0 0 7 】

CTC以外に、癌胎児性抗原 (CEA) 及び炭水化物抗原15-3 (CA 15-3) のようなタンパク質ベースの循環腫瘍マーカーは、予後マーカーとしてだけでなく、乳癌治療の成功の監視及び追跡において広く使用されている (Uehara M, Kinoshita T, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Iwamoto E, Fukutomi T. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2008;13:447-51; Harris L, Fritsche H, Menell R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287-312)。しかしながら、これらのマーカーの感度は低い。したがって、新たな高感度かつ特異的であるだけでなく侵襲性が最低限となるマーカーが必要とされている。

【 0 0 0 8 】

後成的変化は、ゲノムDNA配列における何らかの変化によるものではない遺伝子発現の変化として定義される。異常な後成的特徴は、ヒトの癌の際だった特徴とみなされている

10

20

30

40

50

(Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet 8, 286-298 (2007).)。最も重要な後成的特徴の一つであるDNAメチル化は、遺伝子活性の制御及び細胞核の構造において重要な役割がある(Weber, M., et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nat Genet 37, 853-862 (2005))。さらに、遺伝子マーカー又は多様体とは異なって、DNAメチル化は原則的に可逆的である。したがって、特定の遺伝子のメチル化プロファイルは、治療ターゲットとして考慮される(Mack, G.S. Epigenetic cancer therapy makes headway. J Natl Cancer Inst 98, 1443-1444 (2006))。一方、その可変的特徴のため、DNAメチル化は、環境因子とゲノムとの間を結びつけるものとして作用し得る。環境因子又は老化によって変化したDNAメチル化は、細胞の決定的な遺伝子の発現を変更することがあり、結果的に細胞の悪性転換、さもなくば癌さえも誘発することがある(Widschwendter, M., et al. Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: a proof of principle study. PLoS One 3, e2656 (2008))。

【0009】

癌の発症における早期の事象として、DNAメチル化の変化は、癌の早期検出のためのマーカーとして特に見込みがある。最近の研究では、血液細胞DNAのメチル化解析が、高信頼性で強力なマーカーとなり得ることが実証された。集中的な研究により、癌において体性レベルではDNAメチル化の特徴が変化することが明らかにされている一方で、ごく僅かな研究だけが、候補遺伝子アプローチにより癌における末梢血DNAでのメチル化の特徴を解析しているにすぎなかった。

【0010】

以前の研究では、腫瘍抑制遺伝子のプロモーター領域における、それらの通常の隣接組織と比較した高メチル化及び乳癌の癌遺伝子のプロモーター領域における、それらの通常の隣接組織と比較した低メチル化が調査されている(Ito, Y., et al. Somatic acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. Hum Mol Genet 17, 2633-2643 (2008); Potapova, A., Hoffman, A.M., Godwin, A.K., Al-Saleem, T. & Cairns, P. Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer. Cancer Res 68, 998-1002 (2008); Radpour, R., et al. Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array. Oncogene 28, 2969-2978 (2009); Widschwendter, M. & Jones, P.A. DNA methylation and breast carcinogenesis. Oncogene 21, 5462-5482 (2002))。非常に僅かな研究だけが、末梢血DNA中のメチル化の特徴及び乳癌リスクに注目しているにすぎない。これらの研究においては、特定の遺伝子、例えばBRCA1(Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y. & Noguchi, S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. Breast Cancer Res Treat 129, 69-77 (2011))、ATM(Flanagan, J.M., et al. Gene-body hypomethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. Hum Mol Genet 18, 1332-1342 (2009))、及び特定の経路における遺伝子(上記Widschwendter et al. (2008))だけが調査されているにすぎない。

【0011】

したがって、当該技術分野においては、乳癌及びその他の癌の更なる後成的マーカー、好ましくは、侵襲性の低い手段によって試料を得ることによって、例えば血液試料を採取することによって罹患した被験体の特定を可能にする後成的マーカーの同定が必要とされている。

【0012】

miRNAは、転写後段階の遺伝子発現をmRNA分子の分解又は該mRNAの翻訳の阻止によって調節する短いノンコーディングRNA(約18ヌクレオチド長から25ヌクレオチド長)である(Bartel DP.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 200

10

20

30

40

50

4; 116: 281-97)。したがって、miRNAは、癌を含む数多くの生物学的プロセスの調節において必須の役割を担っている (Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:15524-9)。標準的な命名系のもとに、実験的に確認されたmiRNAに名前が割り当てられている。頭字語「mir」に続いてダッシュ及び番号が付される。大文字で書かれていない「mir-」は、pre-miRNAを指し、その一方で、大文字で書かれた「miR-」は、成熟形を指す。1ヌクレオチド又は2ヌクレオチドを除いてほぼ同一の配列を有するmiRNAには、追加の小文字で注釈が付される。起源となる種は、三文字頭字語、例えばホモ・サピエンス (ヒト) についてはhsaで示される。同じpre-miRNAの対向するアームに由来する2つの成熟miRNAは、-3p又は-5pの接尾語で示される。

10

【0013】

循環miRNAは、血漿、血清等のような体液の細胞不含成分中に存在するmiRNAとして定義される。Lawrieら (Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol 2008; 141:672-5) によって、体液中のmiRNAの存在が初めて裏付けられた。それ以来、循環miRNAは、種々のタイプの癌、例えば前立腺癌、結腸直腸癌又は食道癌における血漿又は血清において異所性発現されると報告されている (Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T, Beisbarth T, Kuner R, Sultmann H. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. Int J Cancer 2011;128:608-16.; Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel markers for early detection of colorectal cancer. Int J Cancer 2010;127:118-26.; Zhang C, Wang C, Chen X, Yang C, Li K, Wang J, Dai J, Hu Z, Zhou X, Chen L, Zhang Y, Li Y, et al. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. Clin Chem 2010; 56:1871-9.)。循環miRNAの最も重要な利点には、最低限の侵襲性で繰り返し測定される見込み並びに血漿 / 血清におけるそれらの注目すべき安定性が含まれ、その際、循環miRNAは、大抵エキソソームの外側で循環し、それらはアルゴノートタンパク質に結合しているため安定である (Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:10513-8; Turc hinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucleic Acids Res 2011;39:7223-33; Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:5003-8)。

20

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

こうして、当該技術分野においては、乳癌、特に原発性乳癌及び転移性乳癌の診断及び予後判定のための改善された方法が必要に迫られている。これらの方法は、好ましくは見かけ上健康な被験体の予防的スクリーニングにおいても使用されることとなり、侵襲性の程度が低いことが好まれることとなる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

第1の態様では、本発明は、被験体における、癌、特にBC、OvaCa及び / 又はPaCAの予後

50

判定及び／又は診断の方法であって、被験体において、

a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを測定すること、

b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量を測定すること、

を含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの存在が、上記被験体の予後及び／又は診断の指標である、方法に関する。

10

【0016】

第2の態様では、本発明は、被験体における癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を決定する方法であって、

(a) 被験体の試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、任意に、参照における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量と比較する工程と、

(b) 医薬品の投与量を、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量に応じて、任意に、対象となる試料及び参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の比較に応じて決定する工程と、

20

を含む、方法に関する。

【0017】

第3の態様では、本発明は、癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合する方法であって、

(a) 試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

30

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(c) 試験される試料を、上記対象となる試料中に存在する少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、

(d) 医薬品の投与量を、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかに応じて適合させる工程と、

40

を含む、方法に関する。

【0018】

第4の態様では、本発明は、癌又は癌の発症に対する物質の有益な効果及び／又は不利な効果を測定する方法であって、

(a) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(c) 対象となる試料を、上記対象となる試料中に存在する少なくとも1種のメチル化マ

50

カーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、
を含み、ここで対象となる試料が、上記物質に1つ以上の参照又は参照試料とは異なるように曝露されたものである、方法に関する。

【0019】

第5の態様では、本発明は、癌治療に対する応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、方法に関する。

10

【0020】

第6の態様では、本発明は、癌治療に対する非応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、方法に関する。

20

【0021】

第7の態様では、本発明は、癌の治療法であって、
(i) 被験体の第1の試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、
(ii) 1種以上の抗癌剤又は療法を含む第1の治療レジメンで上記患者の治療を開始する工程、
(iii) 上記被験体の引き続き採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、
(iv) 任意に、工程(ii)及び(iii)を1回以上繰り返す工程、
(v) 少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の本質的な増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量の減少若しくは不存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を継続する工程、又は、
(vi) 少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量の増加若しくは存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を修正するか、又は停止し、そしてその代わりに該患者を、第1の治療レジメンに含まれない1種以上の抗癌剤若しくは療法を含む第2の治療レジメンで治療する工程、
を含む、方法に関する。

30

40

【0022】

第8の態様では、本発明は、
i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、
の予後判定及び／又は診断のための手段であって、
a) 少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベルを検出する1つ以上の手段と、

50

b) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の検出のための1つ以上の手段と、を含む、手段に関する。

【0023】

第9の態様では、本発明は、第8の態様に記載の手段を含むキットに関する。

【0024】

第10の態様では、本発明は、第8の態様に記載の手段又は第9の態様に記載のキットの、

i. 癌、特にBC、OvaCa及び / 又はPaCAの発症のリスク、

ii. 癌、特にBC、OvaCa及び / 又はPaCAの存在、及び / 又は、

iii. 癌、特にBC、OvaCa及び / 又はPaCAの進行、

の予後判定及び / 又は診断のための使用に関する。

10

【0025】

第11の態様では、本発明は、癌、特にBC、OvaCa及び / 又はPaCAの特定のための装置であって、

(a) 被験体の試料における、

(i)、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び / 又は発現レベルを測定するための検出剤と、

(ii) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAの存在を測定するための検出剤と、を含む分析ユニットと、

20

(b) 分析ユニットによって測定された量と参照との比較を実施するためのアルゴリズムが有形に (tangibly: タンジブルに) 組み込まれたデータプロセッサを含み、かつ上記比較に基づいて確立された診断を含む出力ファイルを生成することができる評価ユニットと、

を備える、装置に関する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】乳癌の早期検出のための血液ベースのバイオマーカーパネルの試料説明を示す図である。

【図2 - 1】3回のバリデーションラウンドでの8種の遺伝子のメチル化の差異を示す図である。

30

【図2 - 2】同上

【図2 - 3】同上

【図2 - 4】同上

【図2 - 5】同上

【図3 - 1】他センターの試料においてBC症例を健康な対照から区別するためのDNAメチル化マーカーセットの判別力を示す図である。

【図3 - 2】同上

【図4】本発明者らのグループからの試料においてBC症例を健康な対照から区別するためのDNAメチル化マーカーセット及びmiRNAマーカーセットの判別力を示す図である。

40

【図5 - 1】種々の臨床的特徴を有する散发性BC患者における8種の遺伝子のメチル化レベル (2回目のバリデーションラウンドからの場合) を示す図である。

【図5 - 2】同上

【図5 - 3】同上

【図5 - 4】同上

【図5 - 5】同上

【図5 - 6】同上

【図5 - 7】同上

【図5 - 8】同上

【図5 - 9】同上

50

【図6-1】種々の臨床的特徴を有する散発性BC患者における8種の遺伝子のメチル化レベル（本発明者らのグループからの場合）を示す図である。

【図6-2】同上

【図6-3】同上

【図6-4】同上

【図6-5】同上

【図6-6】同上

【図6-7】同上

【図6-8】同上

【図6-9】同上

【図6-10】同上

10

【図7】膵臓癌の早期検出のための血液ベースのバイオマーカーパネルの試料説明を示す図である。

【図8-1】PaCa症例と対照との対比による遺伝子中のメチル化の差異を示す図である。

【図8-2】同上

【図9-1】性別によって層化されたPaCa症例と対照との対比による遺伝子中のメチル化の差異を示す図である。

【図9-2】同上

【図10】PaCa症例を健康な対照から区別するための遺伝子中のメチル化の判別力を示す図である。

20

【図11-1】種々の臨床的特徴を有するPaCa患者における遺伝子のメチル化を示す図である。

【図11-2】同上

【図12-1】卵巣癌の早期検出のための血液ベースのバイオマーカーパネルの試料説明を示す図である。

【図12-2】同上

【図13】OvCa症例と対照との対比による遺伝子中のメチル化の差異を示す図である。

【図14】OvCa症例を健康な対照から区別するための遺伝子中のメチル化の判別力を示す図である。

【図15】HYAL2中の乳癌関連CpGアイランドショアの測定を示す図である。

30

【図16】白血球におけるS100P、SLC22A18及びDYRK4のメチル化と発現との間の逆相関を示す図である。

【図17】Illumina 450KによるHYAL2のCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図18】Illumina 450KによるS100PのCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図19-1】Illumina 450KによるSLC22A18のCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図19-2】同上

【図20】Illumina 450KによるDYRK4のCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図21】Illumina 450KによるFUT7のCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図22】Illumina 450KによるRAPSNのCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

40

【図23-1】Illumina 450KによるRPTORのCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図23-2】同上

【図23-3】同上

【図23-4】同上

【図23-5】同上

【図23-6】同上

【図23-7】同上

【図23-8】同上

【図23-9】同上

50

【図 2 3 - 1 0】同上

【図 2 3 - 1 1】同上

【図 2 3 - 1 2】同上

【図 2 4 - 1】Illumina 450KによるMGRN1のCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。

【図 2 4 - 2】同上

【図 2 5】白血球におけるHYAL2のメチル化と発現との間の逆相関を示す図である。(a) ボックスプロットは、36件の散発性BC症例及び40件の健康な対照からの白血球におけるcg 27091787及びHYAL2-Aアンプリコン中の隣接CpGサイトのメチル化レベルを示している。cg 27091787のボックスプロットは、強調のために四角で囲まれている。(b) ボックスプロットは、散発性BC症例及び健康な対照からの白血球におけるHYAL2の発現レベルを示している。示されたp値は、マン - ホイットニーのU検定によって計算された。丸印は、異常値を示している。(c) 白血球におけるcg27091787のメチル化レベルとHYAL2発現との間の逆相関。

10

【図 2 6】ソーティングされた白血球フラクション中のHYAL2-Aアンプリコンにおける4つのCpGサイトのメチル化レベルを示す図である。そのメチル化レベルは、7件の散発性BC症例及び14件の健康な対照からの試料(全血からのDNA及びソーティングされた白血球フラクションからのDNA)において三重反復試験で測定した。症例と対照との間のメチル化の差異は、t検定によって計算した。cg27091787のメチル化レベルは、ボックス及びウィスカプロットによって表される。丸印は、異常値を示している。

20

【発明を実施するための形態】

【0027】

配列の一覧

配列番号1 hsa-miR-652-3p(MIMAT0003322):aauggcgccacuagguugug

配列番号2 hsa-miR-652-5p(MIMAT0022709):caaccuaggagaggugccauuca

配列番号3 1番染色体:28847698~28847793に位置するmiR-801:gauugcucugcgugcggaucgac

配列番号4 hsa-miR-376c-3p(MIMAT0000720):aacauagaggaaauuccacgu

配列番号5 hsa-miR-376c-5p(MIMAT0022861):gguggauauuccuucuauguu

配列番号6 hsa-miR-376a-3p(MIMAT0000729):aucuagaggaaauuccacgu

配列番号7 hsa-miR-376a-5p(MIMAT0003386):guagauucuccuucuaugagua

配列番号8 hsa-miR-127-3p(MIMAT0000446):ucggauccgucugagcuuggcu

配列番号9 hsa-miR-127-5p(MIMAT0004604):cugaagcucagagggcucugau

配列番号10 hsa-miR-409-3p(MIMAT0001639):gaauguugcucggugaaccccu

配列番号11 hsa-miR-409-5p(MIMAT0001638):agguuacccgagcaacuugcau

配列番号12 hsa-miR-148b-3p(MIMAT0000759):ucagugcaucacagaacuugu

配列番号13 hsa-miR-148b-5p(MIMAT0004699):aaguucuguuauacacucaggc

配列番号14 HYAL2(NM_003773.4)

配列番号15 HYAL2(NM_033158.4)

配列番号16 HYAL2(NP_003764.3)

配列番号17 HYAL2(NP_149348.2)

配列番号18 MGRN1(NM_001142289.2)

配列番号19 MGRN1(NM_001142290.2)

配列番号20 MGRN1(NM_001142291.2)

配列番号21 MGRN1(NM_015246.3)

配列番号22 MGRN1(NP_001135761.2)

配列番号23 MGRN1(NP_001135762.1)

配列番号24 MGRN1(NP_001135763.2)

配列番号25 MGRN1(NP_056061.1)

配列番号26 RPTOR(NM_001163034.1)

30

40

50

配列番号27	RPTOR(NM_020761.2)	
配列番号28	RPTOR(NP_001156506.1)	
配列番号29	RPTOR(NP_065812.1)	
配列番号30	SLC22A18(NM_002555.5)	
配列番号31	SLC22A18(NM_183233.2)	
配列番号32	SLC22A18(NP_002546.3)	
配列番号33	SLC22A18(NP_899056.2)	
配列番号34	FUT7(NM_004479.3)	
配列番号35	FUT7(NP_004470.1)	
配列番号36	RAPSN(NM_005055.4)	10
配列番号37	RAPSN(NM_032645.4)	
配列番号38	RAPSN(NP_005046.2)	
配列番号39	RAPSN(NP_116034.2)	
配列番号40	S100P(NM_005980.2)	
配列番号41	S100P(NP_005971.1)	
配列番号42	DYRK4(NM_001282285.1)	
配列番号43	DYRK4(NM_001282286.1)	
配列番号44	DYRK4(NM_003845.2)	
配列番号45	DYRK4(NP_001269214.1)	
配列番号46	DYRK4(NP_001269215.1)	20
配列番号47	DYRK4(NP_003836.1)	
配列番号33	HYAL2プライマーのセンス配列	
配列番号34	HYAL2プライマーのアンチセンス配列	
配列番号33	HYAL2-is-310プライマーのセンス配列	
配列番号34	HYAL2-is-310プライマーのアンチセンス配列	
配列番号33	HYAL2-is-325プライマーのセンス配列	
配列番号34	HYAL2-is-325プライマーのアンチセンス配列	
配列番号35	MGRN1プライマーのセンス配列	
配列番号36	MGRN1プライマーのアンチセンス配列	
配列番号37	RPTORプライマーのセンス配列	30
配列番号38	RPTORプライマーのアンチセンス配列	
配列番号39	SLC22A18プライマーのセンス配列	
配列番号40	SLC22A18プライマーのアンチセンス配列	
配列番号41	FUT7プライマーのセンス配列	
配列番号42	FUT7プライマーのアンチセンス配列	
配列番号43	RAPSNプライマーのセンス配列	
配列番号44	RAPSNプライマーのアンチセンス配列	
配列番号45	S100Pプライマーのセンス配列	
配列番号46	S100Pプライマーのアンチセンス配列	
配列番号47	DYRK4プライマーのセンス配列	40
配列番号48	DYRK4プライマーのアンチセンス配列	

【 0 0 2 8 】

定義

本発明を下記に詳細に説明する前に、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコル及び試薬は変更することができるため、本発明がこれらに限定されないことを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は特定の実施形態を説明することを目的とするものに過ぎず、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図するものではないことも理解されたい。他に定義のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

【 0 0 2 9 】

幾つかの文献が本明細書の文章全体を通して引用される。本明細書に引用される各々の文献（特許、特許出願、科学出版物、製造者の仕様書、使用説明書等の全てを含む）は、上記又は下記を問わず、その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする。本明細書中のいずれの記載も、本発明が先行発明のためにかかる開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるものではない。本明細書に引用される幾つかの文献は、「引用することにより本明細書の一部をなす」ものと特徴づけられる。そのような本明細書の一部をなす引用文献の規定又は教示と本明細書において詳述される規定又は教示との間に不一致が生じた場合には、本明細書の文章を優先する。

【0030】

下記で本発明の要素を記載する。これらの要素は特定の実施形態とともに挙げられているが、更なる実施形態を作成するのに、これらの要素をどのような方法及びどのような数でも組み合わせることができることを理解されたい。多様に記載された実施例及び好ましい実施形態は、本発明を例示的に記載された実施形態のみに限定するものとは解釈されない。本明細書は例示的に記載された実施形態と、あらゆる数の開示された及び／又は好ましい要素とを組み合わせた実施形態を支持及び包含するものであると理解されたい。さらに文脈上他に指定のない限り、本出願において記載された全ての要素のあらゆる並び替え（permutations）及び組み合わせが本出願の明細書により開示されていると見なされる。

【0031】

本明細書及び添付の特許請求の範囲の全体を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む」という語は（the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising"）、提示の整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を含むが、任意の他の整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を除外しないことを意味するものと理解される。

【0032】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、数量を特定していない単数形（the singular forms "a", "an", and "the"）は、文脈上他に明確に示されていない限り、複数の指示対象を含む。

【0033】

「約」という用語が数値に関連して使用される場合、示される数値よりも5%小さい下限及び示される数値よりも5%大きい上限を有する範囲内に数値が包含されることを意味する。

【0034】

「核酸分子」は、ヌクレオチド単量体からできた多量体又はオリゴマーの巨大分子として理解される。ヌクレオチド単量体は、ヌクレオ塩基、五炭糖（例えば限定されるものではないが、リボース又は2'-デオキシリボース）及び1個～3個のリン酸基から構成される。一般的に、ポリヌクレオチドは、個々のヌクレオチド単量体の間でのホスホジエステル結合によって形成される。本発明の文脈において核酸分子と呼称されるものには、限定されるものではないが、リボ核酸（RNA）、デオキシリボ核酸（DNA）及びそれらの混合物、例えばRNA-DNAハイブリッドが含まれる。用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」及び「核酸分子」は、本明細書では互換的に使用される。核酸は、例えば化学的に、例えばホスホトリエステル法（例えばUhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584を参照）に従って合成することができる。アプタマーは、ポリペプチドに高い親和性をもって結合する核酸、本明細書ではmir146-aである。アプタマーは、SELEmir146-a（例えばJayasena (1999) Clin. Chem., 45, 1628-50; Klug and Famulok (1994) M. Mol. Biol. Rep., 20, 97-107; 米国特許第5,582,981号を参照）のような選択法によって、種々の一本鎖RNA分子の大きなプールから単離することができる。またアプタマーは、それらの鏡像形で、例えばL-リボヌクレオチドとして合成し、選択することもできる（Nolte et al. (1996) Nat. Biotechnol., 14, 1116-9; Klussmann et al. (1996) Nat. Biotechnol., 14, 1112-5）。このようにして単離された形は、天然に存在するリボヌクレアーゼによって分解されず、したがってより高い安定性を有するという利点がある。核酸は、エン

10

20

30

40

50

ドヌクレアーゼ又はエキソヌクレオアーゼによって、特に細胞中に見出すことができるDN
アーゼ及びRNアーゼによって分解され得る。したがって、核酸を分解に対して安定化する
ために該核酸を修飾することが有利であり、それによって細胞中に長期間にわたって高濃
度の核酸が維持される (Beigelman et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23:3989-94 ; 国
際公開第95/11910号 ; 国際公開第98/37240号 ; 国際公開第97/29116号)。一般的に、その
ような安定化は、1つ以上のヌクレオチド間のリン基を導入することによって、又は1つ以
上のヌクレオチド間の非リン基を導入することによって獲得することができる。適切な修
飾されたヌクレオチド間の基は、上述のUhlmann and Peyman (1990) (Beigelman et al.
(1995) Nucleic Acids Res. 23:3989-94 ; 国際公開第95/11910号 ; 国際公開第98/37240号
 ; 国際公開第97/29116号も参照) にまとめられている。本発明による使用の1つで用いる
ことができる核酸における修飾されたヌクレオチド間のリン酸基及び / 又は非リン型の橋
かけ基は、例えばメチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホス
ホロジチオエート及び / 又はホスフェートのエステルを含み、その一方で、ヌクレオチド
間の非リン型類似体は、例えばシロキサン橋かけ基、カーボネート橋かけ基、カルボキシ
メチルエステル橋かけ基、アセトアミデート橋かけ基及び / 又はチオエーテル橋かけ基を
含む。それは、本発明による使用の1つで用いることができる医薬組成物の耐久性をこの
修飾が改善すべきであるという意図でもある。核酸は、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド
核酸 (LNA)、グリコール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、マイクロRNA (miRNA)
及び低分子干渉RNA (siRNA)、ポリヌクレオチドプローブ、1つ以上のプライマー (例え
ばプライマー対)、特にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写 (RT) 反応又はDNAシーケ
ンシングのための1つ以上のプライマーからなる群から選択することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明の種々の態様の文脈においては、核酸という用語は、ゲノムDNA、cDNA、組換えD
NA、cRNA、mRNA、マイクロRNA (miRNA) 及び低分子干渉RNA (siRNA) を含む。核酸は、全
遺伝子又は遺伝子の一部からなっていてよい。また核酸は、人工核酸であってもよい。人
工核酸には、ポリアミド又はペプチド核酸 (PNA)、モルホリノ及びロックド核酸 (LNA)
並びにグリコール核酸 (GNA) 及びトレオース核酸 (TNA) が含まれる。これらの核酸のそ
れぞれは、天然に存在するDNA又はRNAと、当業者によく知られる該分子の骨格との違いに
よって区別される。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される場合に、用語「マイクロRNA」並びに「miRNA」及び「miR」のよ
うな別形は、当業者によれば真核細胞中及び後生動物の体液中に見出される短いリボ核酸
(RNA) 分子に関連すると理解される。miRNAには、ヒトmiRNA、成熟一本鎖miRNA、前駆mi
RNA (pre-miR) 及び天然に存在し得るそれらの多様体が含まれる。幾つかの事例では、用
語「miRNA」には、一次miRNA転写物 (pri-miRNA) 及び二本鎖miRNAも含まれる。特に記載
がない限り、本明細書で使用される場合に、具体的なmiRNAの名称は、成熟miRNAを指す。
miRNA前駆体は、25ヌクレオチド～数千ヌクレオチドからなっており、一般的に40ヌクレ
オチド～130ヌクレオチド、50ヌクレオチド～120ヌクレオチド、又は60ヌクレオチド～11
0ヌクレオチドからなっており、一般的に、成熟miRNAは、5ヌクレオチド～100ヌクレオチ
ドからなり、しばしば10ヌクレオチド～50ヌクレオチド、12ヌクレオチド～40ヌクレオチ
ド、又は18ヌクレオチド～26ヌクレオチドからなる。またmiRNAという用語には、最終的
にRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれる「ガイド」鎖が含まれるだけで
なく、それに相補的な「パッセンジャー」鎖も含まれる。

【 0 0 3 7 】

幾つかのmiRNAの配列は、当該技術分野において既知であり、良く知られた配列デー
タベース、例えばmiRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Griffiths-Jones S., NAR 2004 3
2(Database Issue):D109-D111 ; Kozomara A, Griffiths-Jones S., NAR 2011 39(Database
Issue):D152-D157) を介して当業者であれば容易にアクセス可能である。以下に示され
る個々のmiRNAのデータベースのアクセッション番号は、ヒト起源のmiRNAのアクセッ
ション番号であると理解される。しかしながら、これらのデータベースのエントリは、また異

なる起源のそれぞれのmiRNA、例えば任意の哺乳類起源、爬虫類起源又は鳥類起源、例えば実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類のmiRNAからなる群から選択されるmiRNAのデータベースのアクセッション番号を提供する。また特定のmiRNAに対するその番号による参照（例えばmiR-652）は、同様に-3p配列及び-5p配列（miR-652-3p及びmiR-652-5p）を指すことが理解される。

【 0 0 3 8 】

miR-652の配列は、miRBaseのID、MI0003667で寄託されており、それは、hsa-miR-652-3p(MIMAT0003322)及びhsa-miR-652-5p(MIMAT0022709)を含み、それぞれ本発明の配列番号1及び配列番号2に相当する。

10

【 0 0 3 9 】

miR-801の配列は、miRBaseのID、MI0005202(5'-GAUUGCUCUGCGUGCGGAAUCGAC-3')で寄託されていたが、目下、U11スプライセオソームRNAの断片とみなされているため、miRBaseから削除された。pre-miRNA-801は、1番染色体：28847698～28847793に位置している。その配列は、本発明の配列番号3に相当する。

【 0 0 4 0 】

miR-376cは、miR-368とも呼ばれるが、それは、miRBaseのID、MI0000776で寄託されており、それは、miR-376c-3p(MIMAT0000720)及びhsa-miR-376c-5p(MIMAT0022861)を含み、それぞれ本発明の配列番号4及び配列番号5に相当する。

20

【 0 0 4 1 】

miR-376aの配列は、miRBaseのID、MI0000784で寄託されており、それは、hsa-miR-376a-3p(MIMAT0000729)及びhsa-miR-376a-5p(MIMAT0003386)を含み、それぞれ本発明の配列番号6及び配列番号7に相当する。

【 0 0 4 2 】

miR-127の配列は、miRBaseのID、MI0000472で寄託されており、それは、hsa-miR-127-3p(MIMAT0000446)及びhsa-miR-127-5p(MIMAT0004604)を含み、それぞれ本発明の配列番号8及び配列番号9に相当する。

【 0 0 4 3 】

miR-409の配列は、miRBaseのID、MI0001735で寄託されており、それは、hsa-miR-409-3p(MIMAT0001639)及びhsa-miR-409-5p(MIMAT0001638)を含み、それぞれ本発明の配列番号10及び配列番号11に相当する。

30

【 0 0 4 4 】

miR-148bの配列は、miRBaseのID、MI0000811で寄託されており、それは、hsa-miR-148b-3p(MIMAT0000759)及びhsa-miR-148b-5p(MIMAT0004699)を含み、それぞれ本発明の配列番号12及び配列番号13に相当する。

【 0 0 4 5 】

用語「miRNAの組み合わせ」は、本発明のmiRNAの組み合わせに関連する。miRNAの量は、被験体の試料中で、当該技術分野で良く知られた技術によって測定することができる。試料の性質に応じて、その量は、ポリヌクレオチドの量の定量化のためのPCRベースの技術によって、又は質量分析若しくは（次世代）シーケンシングのようなその他の方法によって、又は実施例に記載される方法（Cissell KA, Deo SK. Trends in microRNA detection. Anal Bioanal Chem. 2009;394(4):1109-1116又はde Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. Anal Chim Acta 2011 Aug 12;699(2):134-52)の1つによって測定することができる。本明細書で使用する語句「miRNAの組み合わせの少なくともそのmiRNAの量を測定する」とは、好ましくは、該組み合わせのそれぞれのmiRNAの量と上記miRNAに特異的な参照とを比較することを可能にするために、該組み合わせのmiRNAのそれぞれの量を別々に測定することに関連している。

40

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用する用語「プローブ」とは、プローブの配列と相補的なターゲットRN

50

A及び/又はDNA配列の検出のために一般的に使用される一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。プローブは、プローブとターゲット配列との間の相補性のためヌクレオチド対合が可能となるヌクレオチド配列を有する一本鎖核酸（DNA又はRNA）にハイブリダイズする。プローブの長さは、意図された用途だけでなく、プローブの必要とされる特異性に依存する。一般的に、プローブは、20ヌクレオチド長～500ヌクレオチド長（すなわち、50ヌクレオチド長、55ヌクレオチド長、60ヌクレオチド長、65ヌクレオチド長、70ヌクレオチド長、75ヌクレオチド長、80ヌクレオチド長、85ヌクレオチド長、90ヌクレオチド長、95ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長、110ヌクレオチド長、120ヌクレオチド長、130ヌクレオチド長、140ヌクレオチド長、150ヌクレオチド長、160ヌクレオチド長、170ヌクレオチド長、180ヌクレオチド長、190ヌクレオチド長、200ヌクレオチド長、300ヌクレオチド長、400ヌクレオチド長、500ヌクレオチド長）、好ましくは、20ヌクレオチド長～100ヌクレオチド長であり、より好ましくは20ヌクレオチド長～50ヌクレオチド長である。マイクロRNAの検出のために、プローブは、12ヌクレオチドから30ヌクレオチドの間である。プローブは、様々な実験構成において、例えば限定されるものではないが、リアルタイムPCRのために、サザンブロット及びノーザンブロットで使用され、同様にマイクロアレイ実験についてのインサイチュハイブリダイゼーション（ISH）において使用される。プローブは、標識されていなくても、直接的に標識されていても、又は間接的に、例えばストレプトアビジン複合体が後に結合し得るビオチンで標識されていてもよい。上記標識は、分光的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、化学的手段又はその他の物理的手段によって検出することができる分子であってよい。例えば、適切な標識には、³²P、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、ELISAで通常使用される）、ビオチン、ジゴキシゲニン又はハプテン及び検出可能な若しくは検出可能にされ得るその他の物が含まれる。標識は、核酸へと、任意の位置で、例えば3'末端、5'末端又は内側で導入することができる。また用語「プローブ」は、その骨格の組成が異なる核酸、例えば限定されるものではないが、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、グリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）を含む。

【0047】

本明細書で使用される用語「プライマー」とは、一般的にDNA複製酵素のための出発点として働く一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、DNA鋳型に結合又はハイブリダイズし、プライマーは、一般的に結合されることになっているDNA配列に相補的な配列を含む。またプライマーは、追加の配列、例えばヌクレアーゼ開裂部位（例えば、BamH1、Hind III等）として働く配列を含んでもよい。プライマーの長さは、意図される用途に依存して選択される。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でDNAの増幅のために使用されるプライマーは、一般的に、少なくとも10ヌクレオチドの長さを有し、好ましくは10ヌクレオチド～50ヌクレオチド（すなわち、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド、30ヌクレオチド、31ヌクレオチド、32ヌクレオチド、33ヌクレオチド、34ヌクレオチド、35ヌクレオチド、36ヌクレオチド、37ヌクレオチド、38ヌクレオチド、39ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド）を有し、より好ましくは、15ヌクレオチドから30ヌクレオチドの間である。少なくとも5ヌクレオチドのより短いプライマーは、DNA鋳型のシーケンシングのために使用される。また用語「プライマー」に含まれるものは、類似しているが、同一ではないプライマーの混合物である「縮重プライマー」である。プライマーは、分光的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、化学的手段又はその他の物理的手段によって検出することができるマーカー分子でタグ付け又は標識されていてよい。

【0048】

用語「発現レベル」とは、体内又は試料中の或る時点で存在する遺伝子産物の量を指す。発現レベルは、例えば遺伝子から発現されるタンパク質又はmRNAによって測定/定量化/検出することができる。発現レベルは、例えば試料中に存在する対象となる遺伝子産物

の量を、同じ試料若しくは参照試料（例えば、同じ個体から同時に採取された試料又は同じ試料の同一の大きさ（重量、容量）の一部）中の同じ部類（全タンパク質又はmRNA）の遺伝子産物の全量で正規化することによって、又は規定の試料の大きさ（重量、容量等）あたりの対象となる遺伝子産物の量を特定することによって定量化することができる。発現レベルは、当該技術分野で知られている任意の方法、例えば対象となる遺伝子産物の直接的な検出及び定量化のための方法（例えば質量分析）又は対象となる遺伝子産物の間接的な検出及び測定のための方法であって、通常、対象となる遺伝子産物と、対象となる遺伝子産物に対して特異的な1つ以上の異なる分子若しくは検出手段（例えば、1つ以上のプライマー、プローブ、抗体、足場タンパク質）との結合によって行われる方法によって測定又は検出することができる。1つ以上の断片の不存在又は存在の測定も含む遺伝子コピーのレベルの測定（例えば核酸プローブ又はプライマーを介して、例えば定量的PCR、多重ライゲーション依存性プローブ増幅（MLPA）PCR）も、当業者の知識の範囲内である。

10

【0049】

用語「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、本明細書では互換的に使用され、そして長さ又は翻訳後修飾にかかわらず、複数のアミノ酸の任意のペプチド結合した鎖を指す。本発明において使用可能なタンパク質（タンパク質誘導体、タンパク質多様体、タンパク質断片、タンパク質セグメント、タンパク質エピトープ及びタンパク質ドメインを含む）は、更に化学的修飾によって修飾することができる。すなわち、そのような化学的修飾されたポリペプチドは、20種の天然に存在するアミノ酸以外の化学基を含む。そのようなそれ以外の化学基の例には、限定されるものではないが、グリコシル化アミノ酸及びリン酸化アミノ酸が含まれる。ポリペプチドの化学的修飾は、親ポリペプチドと比較して有利な特性、例えば安定性の増加、生物学的半減期の増大又は水溶性の増大のうち1つ以上を与え得る。本発明で使用する可以多様体に適用することができる化学的修飾には、限定されるものではないが、PEG化、グリコシル化されていない親ポリペプチドのグリコシル化、又は親ポリペプチド中に存在するグリコシル化パターンの変更が含まれる。

20

【0050】

本発明の種々の態様の文脈においては、用語「ペプチド」とは、ペプチド結合によって結合された複数のアミノ酸の短い多量体を指す。ペプチドは、タンパク質と同じ化学（ペプチド）結合を有するが、通常はより長さが短い。最も短いペプチドは、単独のペプチド結合によって結合された2つのアミノ酸からなるジペプチドである。また、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド等も存在し得る。好ましくは、該ペプチドは、8アミノ酸までの、10アミノ酸までの、12アミノ酸までの、15アミノ酸までの、18アミノ酸までの、又は20アミノ酸までの長さを有する。ペプチドは、それが環状ペプチドではない限り、アミノ末端及びカルボキシル末端を有する。

30

【0051】

本発明の種々の態様の文脈においては、用語「ポリペプチド」とは、ペプチド結合によって共に結合された複数のアミノ酸の単一の直鎖を指し、それは、好ましくは少なくとも約21アミノ酸を含む。ポリペプチドは、2つ以上の鎖から構成されるタンパク質の1つの鎖であってよく、又はポリペプチドは、タンパク質が1つの鎖から構成される場合にはタンパク質自体であってよい。

40

【0052】

本発明の種々の態様の文脈においては、用語「タンパク質」とは、二次構造及び三次構造を取る1つ以上のポリペプチドを含む分子を指し、更に幾つかのポリペプチド、すなわち幾つかのサブユニットからでき、四次構造を形成するタンパク質を指す。該タンパク質は、時々、補欠分子族又は補因子と呼ぶことができる結合された非ペプチド基を有する。タンパク質又はポリペプチドの一次構造は、ポリペプチド鎖における複数のアミノ酸の配列である。タンパク質における二次構造は、タンパク質の局所セグメントの略三次元形である。しかしながら、二次構造は、三次元空間における特定の原子位置を説明するものではなく、それは、三次構造とみなされる。タンパク質においては、二次構造は、骨格のアミド基とカルボキシル基との間の水素結合のパターンによって定義される。タンパク質の

50

三次構造は、原子座標によって決定されるタンパク質の三次元構造である。四次構造は、多重に折り畳まれた又はコイル状のタンパク質又はポリペプチド分子の多重サブユニット複合体における配置である。用語「アミノ酸鎖」及び「ポリペプチド鎖」は、本発明の文脈において同義に使用される。本明細書で使用される用語「翻訳後」とは、ヌクレオチドトリプレットがアミノ酸に翻訳され、配列中の先行するアミノ酸にペプチド結合が形成された後に起こる事象を指す。そのような翻訳後の事象は、全ポリペプチドが形成された後に、又は既に翻訳プロセスの間に、既に翻訳されたポリペプチドのこれらの部分に起こり得る。翻訳後の事象は、一般的に、得られたポリペプチドの化学的特性又は構造的な特性を改変又は変更する。翻訳後の事象の例には、限定されるものではないが、アミノ酸のグリコシル化若しくはリン酸化又はペプチド鎖の、例えばエンドペプチダーゼによる開裂のような事象が含まれる。本明細書で使用される用語「翻訳時 (co-translational)」とは、ヌクレオチドトリプレットがアミノ酸鎖に翻訳されるプロセスの間に起こる事象を指す。これらの事象は、一般的に、得られたアミノ酸鎖の化学的特性又は構造的な特性を改変又は変更する。翻訳時の事象の例には、限定されるものではないが、翻訳プロセスを完全に停止し得る事象、又はペプチド結合形成を中断することで、2つの別々の翻訳産物をもたらす事象が含まれる。

10

【0053】

用語「セグメント」とは、巨大分子（例えば、ポリペプチド、タンパク質又はポリタンパク質）の任意の部分であって、この巨大分子が分割され得る部分を指す。巨大分子は、1つ以上のセグメントからなっていてよい。そのようなセグメント化は、巨大分子及び／又はその個々のセグメントの機能的特性（例えば、免疫反応性の特徴又は膜結合機能）又は構造的な特性（例えば、ヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列、又は二次構造若しくは三次構造）のため存在し得る。本発明の文脈において、用語「セグメント」がタンパク質又はポリタンパク質の一部を指すことが好ましい。そのようなセグメントが、残りのタンパク質又はポリタンパク質とは独立して折り畳まれ、及び／又は機能することが特に好ましい。

20

【0054】

抗原決定基としても知られる「エピトープ」は、巨大分子のセグメントであって、免疫系によって、特に抗体、B細胞又はT細胞によって認識されるセグメントである。そのようなエピトープは、抗体又はその抗原結合フラグメントに結合することができる巨大分子の部分又はセグメントである。この文脈においては、用語「結合」は、好ましくは特異的結合に関連する。本発明の文脈において、用語「エピトープ」は、免疫系によって認識されるタンパク質又はポリタンパク質のセグメントを指すことが好ましい。エピトープは、通常はアミノ酸又は糖側鎖のような分子の化学的に活性な表面の集合からなり、通常は特異的な三次元構造的な特徴だけでなく、特定の電荷特性を有する。コンフォメーションエピトープ及び非コンフォメーションエピトープは、変性溶剤の存在下で前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。

30

【0055】

本明細書で使用される場合に、用語「ドメイン」とは、タンパク質又はポリタンパク質の配列又は構造（又は相応のヌクレオチド配列）のセグメントであって、残りのタンパク質鎖とは独立して発生、機能及び／又は存在することができるセグメントを指す。一般的に、タンパク質は、1つ又は幾つかのドメインからなり、その際、その各々が、安定であり、残りのタンパク質鎖とは独立して折り畳まれている三次元構造である。そのようなドメインは、一般的に、該タンパク質内に独立した機能的単位（例えば、膜間通ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン又はDNA結合ドメイン）を形成する。

40

【0056】

幾つかのペプチド及びタンパク質のアミノ酸配列、並びにそれぞれのペプチド及びタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、当該技術分野で良く知られており、かつ当業者であれば、良く知られた配列データベース、例えばGenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) を介して容易にアクセス可能である。以下に示される個々の配列のデータ

50

ベースのアクセッション番号は、ヒト起源の配列のアクセッション番号であると理解される。しかしながら、これらのデータベースのエントリは、また異なる起源のそれぞれのヌクレオチド配列、例えば任意の哺乳類起源、爬虫類起源又は鳥類起源、例えば実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）のアミノ酸又はヌクレオチド配列又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類のヌクレオチド、アミノ酸又はヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のデータベースのアクセッション番号を提供する。

【 0 0 5 7 】

HYAL2 :

転写多様体1についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_003773.4(GI:289802998)であり、それは、本発明の配列番号14に相当する。

転写多様体2についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_033158.4(GI:289802999)であり、それは、本出願の配列番号15に相当する。

転写多様体1によってコードされるHYAL2ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_003764.3(GI:15022801)であり、それは、本発明の配列番号16に相当する。

転写多様体2によってコードされるHYAL2ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_149348.2(GI:34304377)であり、それは、本発明の配列番号17に相当する。

【 0 0 5 8 】

MGRN1 :

転写多様体2についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_001142289.2であり、それは、本発明の配列番号18に相当する。

転写多様体3についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_001142290.2であり、それは、本発明の配列番号19に相当する。

転写多様体4についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_001142291.2であり、それは、本発明の配列番号20に相当する。

転写多様体1についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_015246.3であり、それは、本発明の配列番号21に相当する。

転写多様体2によってコードされるMGRN1ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_001135761.2であり、それは、本発明の配列番号22に相当する。

転写多様体3によってコードされるMGRN1ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_001135762.1であり、それは、本発明の配列番号23に相当する。

転写多様体4によってコードされるMGRN1ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_001135763.2であり、それは、本発明の配列番号24に相当する。

転写多様体1によってコードされるMGRN1ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_056061.1であり、それは、本発明の配列番号25に相当する。

【 0 0 5 9 】

RPTOR:

転写多様体2についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_001163034.1であり、それは、本発明の配列番号26に相当する。

転写多様体1についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_020761.2であり、それは、本発明の配列番号27に相当する。

転写多様体2によってコードされるRPTORポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_001156506.1であり、それは、本発明の配列番号28に相当する。

転写多様体1によってコードされるRPTORポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_065812.1であり、それは、本発明の配列番号29に相当する。

【 0 0 6 0 】

SLC22A18:

転写多様体1についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_002555.5であり、それは、本発明の配列番号30に相当する。

転写多様体2についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_183233.2であり、それは、本発明の配列番号31に相当する。

転写多様体1によってコードされるSLC22A18ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_002546.3であり、それは、本発明の配列番号32に相当する。

転写多様体2によってコードされるSLC22A18ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_899056.2であり、それは、本発明の配列番号33に相当する。

【 0 0 6 1 】

FUT7:

10

転写多様体についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_004479.3であり、それは、本発明の配列番号34に相当する。

転写多様体によってコードされるFUT7ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_004470.1であり、それは、本発明の配列番号35に相当する。

【 0 0 6 2 】

RAPSN:

転写多様体1についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_005055.4であり、それは、本発明の配列番号36に相当する。

転写多様体2についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_032645.4であり、それは、本発明の配列番号37に相当する。

20

転写多様体1によってコードされるRAPSNポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_005046.2であり、それは、本発明の配列番号38に相当する。

転写多様体1によってコードされるRAPSNポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_116034.2であり、それは、本発明の配列番号39に相当する。

【 0 0 6 3 】

S100P:

転写多様体についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_005980.2であり、それは、本発明の配列番号40に相当する。

転写多様体によってコードされるS100PポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_005971.1であり、それは、本発明の配列番号41に相当する。

30

【 0 0 6 4 】

DYRK4:

転写多様体2についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_001282285.1であり、それは、本発明の配列番号42に相当する。

転写多様体3についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_00128286.1であり、それは、本発明の配列番号43に相当する。

転写多様体1についてのGenbankのアクセッション番号は、NM_003845.2であり、それは、本発明の配列番号44に相当する。

転写多様体2によってコードされるDYRK4ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_001269214.1であり、それは、本発明の配列番号45に相当する。

40

転写多様体3によってコードされるDYRK4ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_001269215.1であり、それは、本発明の配列番号46に相当する。

転写多様体1によってコードされるDYRK4ポリペプチドについてのGenbankのアクセッション番号は、NP_03836.1であり、それは、本発明の配列番号47に相当する。

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される場合に、用語「多様体」は、誘導される前のポリヌクレオチド又はタンパク質と比較して、1つ以上の長さ又は配列の変化だけ異なっているポリヌクレオチド又はタンパク質として理解されるべきである。タンパク質多様体又は核酸多様体が誘導される前のポリペプチド又はポリヌクレオチドは、親ポリペプチド又は親ポリヌクレオチドとしても知られている。用語「多様体」は、親分子の「断片」又は「誘導體」を含む

50

。一般的に、「断片」は、親分子よりも長さ又は大きさが小さいが、「誘導体」は、親分子と比較してその配列に1つ以上の違いを示す。また、修飾された分子、例えば限定されるものではないが、翻訳後修飾されたタンパク質（例えば、グルコシル化、ビオチニル化、リン酸化、ユビキチン化、パルミトイル化、又はタンパク質分解されたタンパク質）及び修飾された核酸、例えばメチル化DNAも包含される。また、異なる分子の混合物、例えば限定されるものではないがRNA-DNAハイブリッドも、用語「多様体」に包含される。一般的に、多様体は、人工的に、好ましくは遺伝子工学的手段によって構築されるが、親ポリペプチド又は親ポリヌクレオチドは、野生型タンパク質又はポリヌクレオチドである。しかしながら、また天然に存在する多様体も、本明細書で使用する用語「多様体」に包含されると理解されるべきである。さらに、本発明で使用する事ができる多様体は、親分子のホモログ、オルソログ若しくはパラログから、又は人工的に構築された多様体から誘導されてもよいが、但し、該多様体は、親分子の少なくとも1つの生物学的活性を示すものとする、すなわち機能的に活性であるものとする。

【0066】

好ましい実施形態においては、本発明で使用する事ができる多様体は、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列中に200個以下（1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、15個以下、20個以下、25個以下、30個以下、35個以下、40個以下、45個以下、50個以下、55個以下、60個以下、65個以下、70個以下、75個以下、80個以下、85個以下、90個以下、95個以下、100個以下、110個以下、120個以下、130個以下、140個以下、150個以下、160個以下、170個以下、180個以下、190個以下又は200個以下）の全数の変化（すなわち、交換、挿入、欠失、5'-末端、3'-末端、N-末端及び/又はC-末端の欠損）を表す。アミノ酸の交換は、保存的及び/又は非保存的であってよい。好ましい実施形態においては、本発明で使用する事ができる多様体は、誘導される前のタンパク質又はポリヌクレオチドと、1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、15個以下、20個以下、25個以下、30個以下、35個以下、40個以下、45個以下、50個以下、55個以下、60個以下、65個以下、70個以下、75個以下、80個以下、85個以下、90個以下、95個以下又は100個以下のアミノ酸交換又は核酸交換だけ異なる。それに代えて又はそれに加えて、本明細書で使用する「多様体」は、誘導される前の親ポリペプチド又は親ポリヌクレオチドとの或る特定の程度の配列同一性を特徴とし得る。より厳密には、本発明の文脈におけるタンパク質多様体は、その親ポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を示す。本発明の文脈におけるポリヌクレオチド多様体は、その親ポリヌクレオチドと少なくとも80%の配列同一性を示す。好ましくは、タンパク質多様体の配列同一性は、20個、30個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個以上のアミノ酸の連続的な範囲にわたっている。好ましくは、ポリヌクレオチド多様体の配列同一性は、60個、90個、120個、135個、150個、180個、210個、240個、270個、300個以上のヌクレオチドの連続的な範囲にわたっている。

【0067】

用語「少なくとも80%の配列同一性」は、明細書全体を通してポリペプチド配列比較及びポリヌクレオチド配列比較に関して使用される。この表現は、好ましくは、それぞれの参照ポリペプチド又はそれぞれの参照ポリヌクレオチドに対して、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を指す。好ましくは、当該ポリペプチド及び参照ポリペプチドは、20個、30個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個以上のアミノ酸の連続的な範囲にわたって、又は参照ポリペプチドの全長にわたって指摘された配列同一性を示す。好ましくは、当該ポリヌクレオチド及び参照ヌクレオチドは、60個、90個、120個、135個、150個、180個、210個、240個、270個、300個以上のヌクレオチドの連続的な範囲にわたって、又は参照ポリペプチド（polypeptide

)の全長にわたって指摘された配列同一性を示す。

【0068】

用語「欠失多様体」及び「断片」は、本明細書では互換的に使用される。断片は、天然に存在するもの(例えば、スプライス多様体)であっても、又は人工的に、好ましくは遺伝子工学的手段によって構築されてもよい。好ましくは、断片(又は欠失多様体)は、親ポリペプチドと比較して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個又は100個以下のアミノ酸又は核酸の欠失を有する。2個の配列が比較される場合であって、配列同一性のパーセンテージが計算される比較対照となるべき参照配列が特定されていない場合に、配列同一性は、特に記載がない限りは、比較されるべき2個の配列のうち長い方を参照して計算されるべきである。参照配列が示される場合に、配列同一性は、特に記載がない限り、配列番号によって指摘される参照配列の全長を基礎として決定される。

10

【0069】

ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の類似性、すなわち配列同一性のパーセンテージは、配列アラインメントを介して決定することができる。そのようなアラインメントは、幾つかの当該技術分野において知られているアルゴリズムを用いて、好ましくはKarlin及びAltschulの数学的アルゴリズム(Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 90: 5873-5877)、hmmalignアルゴリズム(HMMERパッケージ、<http://hmmerr.wustl.edu/>)又はCLUSTALアルゴリズム(Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80)を用いて、例えば<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>又は<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>又はhttp://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_clustalw.htmlで入手することができるアルゴリズムを用いて実施することができる。使用される好ましいパラメータは、<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>又は<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>で設定されるデフォルトパラメータである。配列同一性(配列マッチング)の度合いは、例えばBLAST、BLAT又はBlastZ(又はBlastX)を使用して計算することができる。同様のアルゴリズムは、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410のBLASTNプログラム及びBLASTPプログラム中に組み込まれている。BLASTのポリヌクレオチド検索は、相同のポリヌクレオチド配列を得るために、BLASTNプログラムを用いて、スコア=100、ワード長=12で実施される。

20

30

【0070】

「ハイブリダイゼーション」は、2個の核酸配列の間の配列同一性又は相同性の尺度として使用することもできる。F、N若しくはM2-1又はこれらのいずれかの一部をコードする核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーション技術によるハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。Fプローブ、Nプローブ又はM2-1プローブの、試験起源由来のDNA又はRNAへのハイブリダイゼーションは、試験起源における、FのDNA若しくはRNA、NのDNA若しくはRNA、又はM2-1のDNA若しくはRNAのそれぞれの存在の指標である。ハイブリダイゼーション条件は、当業者に既知であり、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y., 6.3.1-6.3.6, 1991に見出すことができる。「中度ハイブリダイゼーション条件」は、30 において2 Xの塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのハイブリダイゼーションに続き、50 において1 XのSSC、0.1%のSDS中での洗浄と等価であると定義される。「高ストリンジェント条件」は、45 において6 Xの塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのハイブリダイゼーションに続き、65 において0.2 XのSSC、0.1%のSDS中での洗浄と等価であると定義される。

40

【0071】

半保存的、特に保存的アミノ酸置換であって、アミノ酸が化学的に関連したアミノ酸で置換されている置換が好ましい。典型的な置換は、脂肪族アミノ酸の中での、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の中での、酸性残基を有するアミノ酸の中での、アミド誘導体の中での、塩基性残基を有するアミノ酸の中での、又は芳香族残基を有するアミノ酸

50

の中での置換である。典型的な半保存的及び保存的な置換は、以下の通りである。

【 0 0 7 2 】

【表 1】

アミノ酸 <u>Amino acid</u>	保存的置換 <u>Conservative substitution</u>	半保存的置換 <u>Semi-conservative substitution</u>
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

10

20

30

【 0 0 7 3 】

A、F、H、I、L、M、P、V、W又はYのCへの変更は、新たなシステインが遊離チオールとして残る場合に半保存的である。さらに、当業者であれば、グリシンは立体的に嵩高い位置で置換されるべきでないことと、Pは、 α -ヘリックス構造又は β -シート構造を有するタンパク質部分に導入されるべきでないことを推察するであろう。

40

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用される用語「組織」は、特定の機能を協奏的に満たす同じ起源の細胞の集団を指す。組織の例には、限定されるものではないが、結合組織、筋肉組織、神経組織及び上皮組織が含まれる。多数の組織が一緒になって、特定の機能を果たす「器官」を形成する。器官の例には、限定されるものではないが、腺、筋肉、血液、脳、心臓、肝臓、腎臓、胃、骨格、関節及び皮膚が含まれる。

【 0 0 7 5 】

用語「疾患」及び「障害」は、本明細書では互換的に使用され、該用語は、異常な状態

50

、特に異常な医学的状态、例えば組織、器官又は個体がその機能をもはや効果的に満たすこをができない病気又は損傷を指す。典型的には、必ずそうとは言えないが、疾患は、そのような疾患の存在を指示する特定の症候又は徴候と関連している。したがって、そのような症候又は徴候の存在は、疾患を患う組織、器官又は個体のための指標であってよい。これらの症候又は徴候の変化は、そのような疾患の進行に関する指標となり得る。疾患の進行は、一般的には、該疾患の「悪化」又は「好転」を示し得るそのような症候又は徴候の増加又は減少によって特徴付けられる。疾患の「悪化」は、組織、器官又は生物がその機能を効果的に満たす能力の低下によって特徴付けられ、その一方で、疾患の「好転」は、一般的に、組織、器官又は個体がその機能を効果的に満たす能力の増加によって特徴付けられる。疾患を「発症するリスク」がある組織、器官又は個体は、健康な状態にあるが、疾患出現の可能性を示す。典型的には、疾患を発症するリスクは、そのような疾患の早期の又は弱い徴候又は症候と関連している。そのような場合に、疾患の開始は、まだ処置によって予防することができる。疾患の例には、限定されるものではないが、外傷性疾患、炎症性疾患、感染性疾患、皮膚病態、内分泌性疾患、腸疾患、神経障害、関節疾患、遺伝子障害、自己免疫性疾患及び様々なタイプの癌が含まれる。

【0076】

「癌」とは、被験体のその他の組織又は器官にまで侵入又は拡がることのある異常な細胞増殖を伴う増殖障害を指す。癌は、腫瘍細胞に似ており、したがって腫瘍の起源であると推定される細胞のタイプによって分類される。これらのタイプとしては、癌腫（上皮細胞に由来する癌）、肉腫（例えば骨、軟骨、脂肪、神経等の結合組織から生じる癌）、リンパ腫及び白血病（骨髄から遊離し、リンパ節及び血液中で成熟する性質がある造血細胞から生じる癌）、胚細胞腫瘍（多能性細胞に由来する癌）、並びに芽細胞腫（未成熟な「前駆」細胞又は胚組織に由来する癌）が挙げられるが、それらに限定されない。特に癌としては、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄白血病、副腎皮質癌、AIDS関連癌、AIDS関連リンパ腫、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、小児の小脳又は大脳癌、基底細胞癌腫、胆管癌（肝外）、膀胱癌、骨腫瘍、骨肉腫／悪性線維性組織球腫、脳幹神経膠腫、脳癌、脳腫瘍（小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍（supratentorial primitive neuroectodermal tumors）、視経路及び視床下部の神経膠腫）、乳癌、気管支腺腫／カルチノイド、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、子宮頸癌、慢性気管支炎、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸癌、皮膚性T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、ユーイングファミリーの腫瘍のユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、眼癌（眼内黒色腫、網膜芽腫）、胆嚢癌、胃の（胃）癌、胃腸カルチノイド腫瘍、胃腸間質腫瘍（GIST）、胚細胞腫瘍（頭蓋外、性腺外、又は卵巢）、妊娠性絨毛腫瘍、脳幹の神経膠腫、胃カルチノイド、有毛細胞白血病、頭頸部癌、心臓癌、肝細胞（肝臓）癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、視床下部及び視経路の神経膠腫、眼内黒色腫、睪島細胞癌腫（睪内分泌部）、カボジ肉腫、腎臓癌（腎細胞癌）、咽頭癌、白血病（急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病）、口唇及び口腔癌、脂肪肉腫、肝臓癌、肺癌（非小細胞、小細胞）、リンパ腫（AIDS関連リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫）、マクログロブリン血症（ワルデンストレーム）、男性乳癌、骨の悪性線維性組織球腫／骨肉腫、髄芽腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部癌（metastatic squamous neck cancer with occult primary）、口癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、骨髄性白血病（慢性）、骨髄白血病、骨髄腫、骨髄増殖性障害、鼻腔及び副鼻腔の癌、上咽頭癌腫、神経芽腫、乏突起神経膠腫、口腔癌、中咽頭癌、骨髄腫／骨の悪性線維性組織球腫、卵巣癌、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣の低悪性度腫瘍、睪臓癌、副鼻腔及び鼻腔の癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚腫、松果体芽腫及びテント上原始神経外胚葉腫瘍、下垂体腺腫、形質細胞腫／多発性骨髄腫、胸膜肺

10

20

30

40

50

芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌腫、腎盂及び尿管の癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫（ユーイングファミリー腫瘍、カボジ肉腫、軟組織肉腫、子宮肉腫）、セザリ－症候群、皮膚癌（癌腫、黒色腫、非黒色腫性癌、メルケル細胞癌）、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉腫、扁平上皮癌腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫、胸腺腫及び胸腺の癌腫、甲状腺癌、腎盂及び尿管の移行細胞癌、絨毛性腫瘍、尿道癌、子宮癌（子宮内膜癌、肉腫）、腔癌、視経路及び視床下部の神経膠腫、外陰癌、ウィルムス腫瘍（腎臓癌）が挙げられるが、それらに限定されない。

【0077】

本明細書で使用される場合に、用語「乳房腫瘍」は、被験体における乳房組織細胞の異常な過剰増殖に関連するものであり、良性（非癌性）腫瘍又は悪性（癌性）腫瘍であってよい。良性の乳房腫瘍には、好ましくは、線維腺腫、顆粒細胞腫、乳管内乳頭腫、及び葉状腫瘍が含まれる。悪性腫瘍は、本明細書で先に指定された乳癌（BC）である。

10

【0078】

本明細書で使用される場合に、用語「転移性乳癌」（MBC）は、癌細胞が、少なくとも1つの続発部位、すなわち被験体の身体の新規器官又は部分での転移として増殖する乳癌に関連する。

【0079】

本明細書で使用される場合に、用語「卵巣腫瘍」は、被験体における卵巣組織細胞の異常な過剰増殖に関連するものであり、良性（非癌性）腫瘍又は悪性（癌性）腫瘍であってよい。悪性腫瘍は、本明細書で先に指定された卵巣癌（OvaCa）である。

20

【0080】

本明細書で使用される場合に、用語「膵臓腫瘍」は、被験体における卵巣組織細胞（ovary tissue cell）の異常な過剰増殖に関連するものであり、良性（非癌性）腫瘍又は悪性（癌性）腫瘍であってよい。悪性腫瘍は、本明細書で先に指定された膵臓癌（PaCa）である。

【0081】

用語「循環腫瘍細胞」又は「CTC」は、当業者によれば、原発腫瘍又は転移腫瘍から剥離して血液中を循環している腫瘍細胞に関連するものと理解される。CTCの数は、疾患に関する予後マーカーであり、かつ乳癌における治療成果に関する、例えば全生存期間に関する予後マーカーであると理解されるべきである。用語「CTCステータス」は、試料中のCTCの参照量を超える量の存在又は不存在に関連する。好ましくは、CTCの参照量は、7.5 mlの血液あたりに2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7又は7.5のCTCであり、7.5 mlの血液あたりに5のCTCがより好ましい。血液試料が上記CTCの参照量を超える量を含む被験体においては、CTCステータスは好ましくなく、それは、好結果の処置の見込みが低いことと、無増悪生存期間及び全生存期間の見込みが低いことを示している。反対に、血液試料が上記CTCの参照量を下回る量を含む被験体においては、CTCステータスは好ましく、それは、好結果の処置の見込みが高いことと、無増悪生存期間及び全生存期間の見込みが高いことを示している。有利には、本発明においては、本明細書で以下に定義される被験体のCTCステータスを測定するために使用されるmiRNAの量が、被験体のCTCステータスの指標であることが判明した。このように、本明細書で使用される被験体におけるCTCステータスの測定は、上記1種以上のmiRNAの量を測定し、こうして被験体のCTCステータスの示度を得ることに関連している。有利には、該ステータスは、「好ましい」又は「好ましくない」と診断され得る。

30

40

【0082】

疾患の「症候」は、そのような疾患を有する組織、器官又は生物によって知ることができる疾患の影響であり、それには、限定されるものではないが、組織、器官又は個体の疼痛、衰弱、圧痛、歪み、硬直及び痙攣が含まれる。疾患の「徴候」又は「シグナル」には、限定されるものではないが、特定の指標、例えばバイオマーカー若しくは分子マーカーの存在、不存在、増加若しくは上昇、低下若しくは下降、又は症候の発生、存在若しくは悪化のような変化又は変更が含まれる。

50

【0083】

用語「指標」及び「マーカー」は、本明細書では互換的に使用され、状態に関する徴候若しくはシグナルを指すか、又は状態の監視のために使用される。そのような「状態」とは、細胞、組織若しくは器官の生物学的状態、又は個体の健康状態及び/又は疾患状態を指す。指標は、限定されるものではないが、ペプチド、タンパク質及び核酸を含む分子の存在若しくは不存在であってよく、又は細胞中、若しくは組織、器官若しくは個体におけるそのような分子の発現レベル若しくは発現パターンにおける変化であってよい。指標は、個体における疾患の開始、発症若しくは存在についての、又はそのような疾患の更なる進行についての徴候であってよい。また指標は、個体における疾患の発症のリスクについての徴候であってよい。

10

【0084】

本明細書で使用される場合に、用語「遺伝子産物」は、細胞中での存在が上記細胞中の上記遺伝子の発現に依存する、好ましくは巨大分子、物理的実体に関連する。遺伝子発現のメカニズムは、転写、すなわち上記遺伝子若しくはその部分に相当するRNAの形成及び翻訳、すなわち上記RNAによって遺伝暗号に従ってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド分子の産生の基本的メカニズムを含むことが当業者に良く知られており、その他の細胞過程、例えばRNAプロセッシング、RNA編集、タンパク質分解過程、タンパク質編集等が、同様に遺伝子発現に関与し得ることは、当業者に良く知られている。こうして、遺伝子産物という用語には、RNA、好ましくはmRNAだけでなく、上記遺伝子から発現されるポリペプチドが含まれる。上記のことから、遺伝子産物という用語が、上記1種以上のRNAの断片、好ましくは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド又は少なくとも100ヌクレオチドの長さを有する断片、及び上記ポリペプチドからの断片（ペプチド）、好ましくは少なくとも8アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも12アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも20アミノ酸の長さを有する断片が含まれることは明らかである。

20

【0085】

遺伝子産物の量の「測定」は、上記遺伝子産物の量の計測、好ましくは半定量的又は定量的な計測に関連する。計測は、直接的に又は間接的に行うことができる。好ましくは、計測は、処理された試料で行われ、その際、上記処理は、該試料からのポリヌクレオチド又はポリペプチドの抽出を含む。しかしながら、本発明によれば、遺伝子産物をin situで、例えば免疫組織化学（IHC）によって測定することも考えられる。

30

【0086】

本発明のポリヌクレオチドの量は、当該技術分野で良く知られる幾つかの方法で測定することができる。定量化は、好ましくは絶対的、すなわちポリヌクレオチドの具体的な数に関連するものであるか、又はより好ましくは相対的、すなわち任意の正規化された単位で計測されるものである。好ましくは、正規化は、特定のポリヌクレオチドの数と、ポリヌクレオチド又は参照増幅産物の全数との比率を計算することによって実施される。絶対的又は相対的な定量化を可能にする方法は、当該技術分野で良く知られている。例えば、定量的PCR法は、相対的な定量化のための方法であり、校正曲線がそのようなアッセイに組み込まれている場合に、絶対的な定量化を達成するために相対的な定量化が使用され得る。その他の既知の方法は、例えば核酸配列ベース増幅（NASBA）又は分岐DNAシグナル増幅アッセイ法と、増幅されたポリヌクレオチドのドットプロット又はluminex検出との組み合わせである。好ましくは、ポリヌクレオチド量は、正規化されたポリヌクレオチド量であり、すなわち得られるポリヌクレオチド量は、少なくとも1種の参照増幅産物に対して定められ、それによって、好ましくは、ポリヌクレオチド量は、試料中の細胞の数及び/又はポリヌクレオチド増幅の効率に対して定められる。このように、好ましくは、参照増幅産物は、それぞれの細胞中の一定の存在度を有することが知られるポリヌクレオチド、すなわち試料の殆どの、好ましくは全ての細胞中にほぼ同量で含まれるポリヌクレオチドから得られる産物である。より好ましくは、参照増幅産物は、染色体遺伝子若しくはミトコンドリア遺伝子から、又はハウスキーピング遺伝子のmRNAから増幅される。ポリヌク

40

50

レオチドの量は、ショットガンシーケンシング、ブリッジPCR、サンガーシーケンシング、ピロシーケンシング、次世代シーケンシング (sequencing)、一分子リアルタイムシーケンシング、Ion Torrentシーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、超並列シグネチャシーケンシング、Polonyシーケンシング、DNA ナノボールシーケンシング、Heliscope一分子シーケンシング、一分子リアルタイム (SMRT) シーケンシング、ナノポアDNAシーケンシング、トンネル電流DNAシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、質量分析を用いたシーケンシング、マイクロ流体サンガーシーケンシング、透過型電子顕微鏡検査DNAシーケンシング、RNAポリメラーゼシーケンシング、in vitroウイルスハイスループットシーケンシング、RNA精製によるクロマチン単離 (ChIRP-Seq)、Global Run-onシーケンシング (GRO-Seq)、リボソームプロファイリングシーケンシング (Ribo-Seq) / ARTseq、RNA免疫沈降シーケンシング (RIP-Seq)、CLIP cDNAライブラリーのハイスループットシーケンシング (HITS-CLIP)、架橋及び免疫沈降シーケンシング、光励起性リボヌクレオシド増強架橋及び免疫沈降 (PAR-CLIP)、個別ヌクレオチド分解CLIP (iCLIP)、自然伸長転写物シーケンシング (NET-Seq)、ポリソームmRNAの標的精製 (TRAP-Seq)、ハイブリッドの架橋、ライゲーション及びシーケンシング (CLASH-Seq)、RNA末端シーケンシングの平行解析 (PARE-Seq)、非キャップ転写物のゲノム規模でのマッピング (GMUCT)、転写物アイソフォームシーケンシング (TIF-Seq)、TSSのペアエンド解析 (PEAT)、プライマー伸長シーケンシングにより解析される選択的2'-ヒドロキシルアシル化 (SHAPE-Seq)、RNA構造の平行解析 (PARS-Seq)、フラグメンテーションシーケンシング (FRAG-Seq)、CXXC親和性精製シーケンシング (CAP-Seq)、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ - タバコ酸性ピロホスファターゼシーケンシング (CIP-TAP)、イノシンケミカルイレッシングシーケンシング (ICE)、m6A特異的メチル化RNA免疫沈降シーケンシング (MeRIP-Seq)、デジタルRNAシーケンシング、単一細胞についての全転写物増幅 (Quartz-Seq)、設計されたプライマーベースのRNAシーケンシング (DP-Seq)、RNA鋳型の5'末端でのスイッチ機構 (Smart-Seq)、RNA鋳型の5'末端でのスイッチ機構バージョン2 (Smart-Seq2)、固有の分子識別子 (UMI)、線形増幅シーケンシングによる細胞発現 (CEL-Seq)、単一細胞の標識逆転写シーケンシング (STRT-Seq)、一分子の分子反転プロープ (smMIP)、多置換増幅 (MDA)、多重アニーリング及びループ化をベースとする増幅サイクル (MALBAC)、オリゴヌクレオチド選択的シーケンシング (OS-Seq)、二重鎖シーケンシング (Duplex-Seq)、バイサルファイトシーケンシング (BS-Seq)、ポストバイサルファイトアダプタータギング (PBAT)、タグメンテーションベース全ゲノムバイサルファイトシーケンシング (T-WGBS)、酸化バイサルファイトシーケンシング (oxBS-Seq)、Tet支援バイサルファイトシーケンシング (TAB-Seq)、メチル化DNA免疫沈降シーケンシング (MeDIP-Seq)、メチル化キャプチャー (MethylCap) シーケンシング、メチル結合ドメインキャプチャー (MBDCap) シーケンシング、限定表示バイサルファイトシーケンシング (Reduced-Representation Bisulfite Sequencing) (RRBS-Seq)、DNアーゼI高感受性部位シーケンシング (DNase-Seq)、ヌクレオソームシーケンシングのMNアーゼ補助単離 (MAINE-Seq)、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-Seq)、調節エレメントのホルムアルデヒド補助単離 (FAIRE-Seq)、トランスポゼース接近可能クロマチンのシーケンシングアッセイ (ATAC-Seq)、ペアエンドタグシーケンシングによるクロマチン相互作用解析 (ChIA-PET)、クロマチン立体配座捕捉 (Hi-C/3C-Seq)、環状クロマチン立体配座捕捉 (4-C又は4C-Seq)、クロマチン立体配座捕捉カーボンコピー (5-C)、レトロトランスポゾン捕捉シーケンシング (RC-Seq)、トランスポゾンシーケンシング (Tn-Seq) 又は挿入シーケンシング (INSeq)、転位捕捉シーケンシング (TC-Seq)、蛍光ベースの方法 (例えば、マイクロアレイ、リアルタイムPCR)、質量ベースの方法 (質量分析)、制限酵素ベースの方法、抗体 - 免疫沈降ベースの方法、及びデジタルPCRにより決定することができる。

【 0 0 8 7 】

本発明のペプチド又はポリペプチドの量は、様々な方式で測定することができる。直接的な計測は、ペプチド又はポリペプチド自体から得られるシグナル及び試料中に存在する

10

20

30

40

50

ペプチドの分子の数と直接的に相関する強度に基づいてペプチド又はポリペプチドの量を計測することに関連している。そのようなシグナル（時々強度シグナルと呼ばれる）は、例えばペプチド又はポリペプチドの特定の物理的又は化学的な特性の強度値を計測することによって得ることができる。間接的な計測には、二次成分（すなわち、ペプチド又はポリペプチド自体ではない成分）又は生物学的読取り系、例えば計測可能な細胞応答、リガンド、標識若しくは酵素反応産物から得られるシグナルの計測が含まれる。

【0088】

ペプチド又はポリペプチドの量の測定は、試料中のペプチドの量を測定するためのあらゆる既知の手段によって達成することができる。上記手段は、イムノアッセイ及び/又は免疫組織化学的装置を含み、かつ様々なサンドウィッチ形式、競合形式又はその他のアッセイ形式での標識された分子を利用することができる方法を含む。上記アッセイは、ペプチド又はポリペプチドの存在又は不存在のための指標となるシグナルを発生することとなる。さらに、シグナル強度は、好ましくは、試料中に存在するポリペプチドの量に直接的に又は間接的に相関（例えば反比例）し得る。更なる適切な方法は、ペプチド又はポリペプチドについて特異的な物理的又は化学的な特性、例えばその厳密な分子量又はNMRスペクトルを計測することを含む。上記方法は、好ましくはバイオセンサ、イムノアッセイと連結された光学的デバイス、バイオチップ、分析装置、例えば質量分析計、NMRアナライザー又はクロマトグラフィー装置を含む。さらに、それらの方法には、マイクロプレートELISAベースの方法、完全自動化又はロボットによるイムノアッセイ、コバルト結合アッセイ及びラテックス凝集アッセイが含まれる。

【0089】

ペプチド又はポリペプチドの量の測定は、試料中のペプチド又はポリペプチドから得ることができる特定の強度シグナルを計測する工程を含む。上記のように、そのようなシグナルは、ペプチド又はポリペプチドに特異的な質量スペクトル又はNMRスペクトルにおいて観察されるペプチド又はポリペプチドに特異的な m/z 変数で観察されるシグナル強度であってよい。

【0090】

ペプチド又はポリペプチドの量の測定は、好ましくは、(a) ペプチドと特異的なリガンドとを接触させる工程、(b) (任意に) 結合していないリガンドを除去する工程、(c) 結合されたりガンドの量を計測する工程を含む。結合されたりガンドは、強度シグナルを生成することとなる。本発明による結合には、共有結合と非共有結合との両方が含まれる。本発明によるリガンドは、任意の化合物、例えば本明細書に記載されるペプチド又はポリペプチドに結合するペプチド、ポリペプチド、核酸又は小分子であってよい。好ましいリガンドには、抗体、核酸、ペプチド又はポリペプチド、例えば受容体又はペプチド若しくはポリペプチドに対する結合相手、及び該ペプチドに関する結合ドメインを含むその断片、及びアプタマー、例えば核酸又はペプチドアプタマーが含まれる。そのようなリガンドを製造する方法は、当該技術分野で良く知られている。例えば、適切な抗体又はアプタマーの同定及び産生は、販売業者によっても提供される。当業者は、より高い親和性又は特異性を有するそのようなリガンドの誘導体を開発する方法に精通している。例えば、ランダム変異を、核酸、ペプチド又はポリペプチド中に導入することができる。本明細書で使用される用語「抗体」とは、膜貫通領域を欠いているため、血流及び体腔中に放出され得る分泌される免疫グロブリンを指す。抗体は、典型的には、2つの同じ重鎖及び2つの同じ軽鎖を含む4つのポリペプチド鎖でできており、それらは、ジスルフィド結合を介して連結されており、「Y」形状の巨大分子のように見える。抗体のパパイン消化は、単独の抗原結合部位をそれぞれ有する2つの同じ抗原結合フラグメント、いわゆる「Fabフラグメント」（「Fab部」又は「Fab領域」とも呼ばれる）と、その名称が、容易に結晶化する能力を表している残りの「Fcフラグメント」（「Fc部」又は「Fc領域」とも呼ばれる）とを生成する。ヒトIgGのFc領域の結晶構造は、測定されている（Deisenhofer (1981) Biochemistry 20:2361-2370）。IgG、IgA及びIgDのアイソタイプにおいて、Fc領域は、抗体の2つの重鎖のCH2及びCH3ドメインから誘導される2つの同じタンパク質断片から構成されて

おり、IgM及びIgEのアイソタイプにおいては、Fc領域は、それぞれのポリペプチド鎖において3つの重鎖の定常ドメイン(CH2~CH4)を含む。さらに、より小さい免疫グロブリン分子は天然に存在するか、又は人工的に構築されている。用語「Fab'フラグメント」とは、Ig分子のヒンジ領域を更に含むFabフラグメントを指し、その一方で、「F(a')2フラグメント」は、2つのFab'フラグメントであって、それらが化学的に連結されているか又はジスルフィド結合を介して結合されているかのいずれかであるフラグメントを含むと理解される。「シングルドメイン抗体(sdAb)」(Desmyter et al. (1996) Nat. Structure Biol. 3:803-811)及び「ナノボディ」は、単独のVHドメインを含むに過ぎないが、「単鎖Fv(scFv)」フラグメントは、短いリンカーペプチドを介して軽鎖可変ドメインに結合された重鎖可変ドメインを含む(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883)。二価単鎖可変フラグメント(di-scFv)は、2つのscFvを連結することによって作ることができる(scFvA-scFvB)。これは、2つのVH領域及び2つのVL領域を有する単一のペプチド鎖を製造することによって行うことができ、こうして「タンデムscFv」(VHA-VLA-VHB-VLB)が得られる。もう一つの手法は、2つの可変領域が一緒に折り畳まれるには短すぎるリンカーを有するscFvを作製することであり、それによりscFvの二量体化に導かれる。これらの二量体の生成のためには、通常、5残基の長さを有するリンカーが使用される。この種類は、「ダイアボディ」として知られている。更により短いリンカー(1アミノ酸又は2アミノ酸)がVH及びVLドメインの間にあると、一重特異性三量体、いわゆる「トリアボディ」又は「トリボディ」の形成がもたらされる。二重特異性のダイアボディは、VHA-VLB及びVHB-VLA又はVLA-VHB及びVLB-VHAのそれぞれの配置を有する鎖への発現によって形成される。単鎖のダイアボディ(scDb)は、12アミノ酸~20アミノ酸、好ましくは14アミノ酸のリンカーペプチド(P)によって連結されたVHA-VLB及びVHB-VLA断片を含む(VHA-VLB-P-VHB-VLA)。「二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)」は、異なる抗体の2つのscFvからなる融合タンパク質であり、ここでscFvの一方は、CD3受容体を介してT細胞に結合し、かつもう一方は、腫瘍細胞に腫瘍特異的分子を介して結合する(Kufer et al. (2004) Trends Biotechnol. 22:238-244)。二重親和性再標的化分子(「DART」分子)は、C末端のジスルフィド結合を通じて更に安定化されたダイアボディである。また本発明には、単鎖抗体及びヒト化されたハイブリッド抗体であって、所望の抗原特異性を示す非ヒトのドナー抗体のアミノ酸配列が、ヒトのアクセプター抗体の配列と組み合わされている抗体が含まれる。

【0091】

ドナー配列は、通常は、ドナーの抗原結合アミノ酸残基を少なくとも含むが、同様にドナー抗体のその他の構造的に及び/又は機能的に関連するアミノ酸残基を含んでよい。そのようなハイブリッドは、当該技術分野で良く知られた幾つかの方法によって製造することができる。好ましくは、該リガンド又は結合剤は、そのペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する。本発明による特異的な結合とは、リガンド又は作用剤が、分析されるべき試料中に存在する別のペプチド、ポリペプチド又は物質に本質的に結合(「交差反応」)しないべきであることを意味する。好ましくは、特異的に結合されるペプチド又はポリペプチドは、任意のその他の関連のペプチド又はポリペプチドよりも少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも10倍、更により好ましくは少なくとも50倍だけ高い親和性をもって結合されるべきである。非特異的な結合は、それが、例えばウェスタンブロットでそのサイズに従って、又は試料中での相対的により高い存在度によって、まだ明白に区別及び計測することができるのであれば許容することができる。リガンドの結合は、当該技術分野で知られる任意の方法によって計測することができる。好ましくは、上記方法は、半定量的又は定量的である。適切な方法は、以下に記載される。

【0092】

まず第1に、リガンドの結合は、直接的に、例えばNMR又は表面プラズモン共鳴によって計測することができる。第2に、リガンドがまた対象となるペプチド又はポリペプチドの酵素活性の基質として働くのであれば、酵素反応生成物を計測することができる(例えば、プロテアーゼの量は、開裂された基質の量を、例えばウェスタンブロットにおいて計測

することによって計測することができる)。あるいは、リガンド自体が酵素特性を示すことがあり、「リガンド/ペプチド又はポリペプチド」複合体又はペプチド若しくはポリペプチドによってそれぞれ結合されたりガンドを、適切な基質と接触させることで、強度シグナルの生成によって検出を可能にすることができる。酵素反応生成物の測定のために、好ましくは基質の量は飽和状態にする。また基質は、反応前に検出可能な標識で標識することもできる。好ましくは、試料は、適切な時間にわたって基質と接触される。適切な時間とは、生成されるべき生成物の検出可能な、好ましくは計測可能な量のために必要な時間を指す。生成物の量の計測の代わりに、所定の(例えば検出可能な)量の生成物の発生のために必要な時間を計測することができる。第3に、リガンドを、リガンドの検出及び計測を可能にする標識に共有結合又は非共有結合させることができる。標識は、直接的な方法又は間接的な方法によって行うことができる。直接的な標識は、標識をリガンドに直接的に結合(共有結合又は非共有結合)させることを必要とする。間接的な標識は、二次リガンドを一次リガンドに結合(共有結合又は非共有結合)させることを必要とする。二次リガンドは、一次リガンドに特異的に結合すべきである。上記二次リガンドは、適切な標識と結合させることができ、及び/又は二次リガンドに結合する三次リガンドの標的(受容体)であってよい。二次、三次、さもなくばそれより高次のリガンドの使用は、しばしばシグナル強度の増加のために用いられる。適切な二次以上のリガンドには、抗体、二次抗体及び良く知られたストレプトアビジン-ビオチン系(Vector Laboratories, Inc.)が含まれ得る。該リガンド又は基質は、当該技術分野で知られる1つ以上のタグで「タグ付け」されていてもよい。そのようなタグは、その際、高次のリガンドのための標的となり得る。適切なタグには、ビオチン、ジゴキシゲニン、His-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc-タグ、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン(HA)、マルトース結合タンパク質等が含まれる。ペプチド又はポリペプチドの場合には、該タグは、好ましくはN-末端及び/又はC-末端にある。適切な標識は、適切な検出法によって検出することができる任意の標識である。典型的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射活性標識、磁性標識(常磁性及び超常磁性の標識を含む「例えば磁性ビーズ」)及び蛍光標識が含まれる。酵素活性標識には、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ及びそれらの誘導体が含まれる。検出のための適切な基質には、ジアミノベンジジン(DAB)、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-B
CIP(4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリド及び5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート)、CDP-Star(商標)(Amersham Biosciences)、ECF(商標)(Amersham Biosciences)が含まれる。適切な酵素-基質の組み合わせにより、着色された反応生成物、蛍光又は化学発光がもたらされることがあり、それらは、当該技術分野で知られる方法に従って(例えば、感光フィルム又は適切なカメラシステムを使用して)計測することができる。酵素反応の計測のためには、上記基準が同様に当てはまる。典型的な蛍光標識には、蛍光タンパク質(例えば、GFP及びその誘導体)、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセイン及びAlexa色素(例えばAlexa 568)が含まれる。更なる蛍光標識は、例えばMolecular Probes(オレゴン)から入手することができる。また量子ドットの蛍光標識としての使用も検討されている。典型的な放射活性標識には、³⁵S、¹²⁵I、³²P、³³P等が含まれる。放射活性標識は、任意の既知の方法及び適切な、例えば感光フィルム又はホスフォイメージャーによって検出することができる。また本発明による適切な計測法には、沈降法(特に免疫沈降)、電気化学発光法(電気発生化学発光)、RIA法(ラジオイムノアッセイ)、ELISA法(酵素結合免疫吸着アッセイ)、サンドウィッチ酵素免疫試験法、電気化学発光サンドウィッチイムノアッセイ法(ECLIA)、解離増強型ランタニド蛍光イムノアッセイ法(DELFIA)、シンチレーション近接アッセイ法(SPA)、比濁法、ネフェロメトリー法、ラテックス強化型比濁法若しくはネフェロメトリー法、又は固相免疫試験法、例えば逆相タンパク質アレイ法若しくは抗体アレイ法が含まれる。当該技術分野で知られる更なる方法(例えばゲル電気泳動、二次元ゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、ウェスタンブロッティング及び質量分析)は、単独で、又は上記の

10

20

30

40

50

標識法若しくはその他の検出法と組み合わせて使用することができる。

【0093】

ペプチド又はポリペプチドの量は、以下のように、つまり(a)上記のペプチド又はポリペプチドのためのリガンドを含む固体担持体と該ペプチド又はポリペプチドを含む試料とを接触させ、そして(b)担持体に結合されたペプチド又はポリペプチドの量を計測して測定することもできる。リガンド、好ましくは核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体及びアプタマーからなる群から選択されるリガンドは、好ましくは固体担持体上に固定化形態で存在する。固体担持体の製造のための材料は、当該技術分野で良く知られており、それには、とりわけ、市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド状金属粒子、ガラスチップ及び/又はシリコンチップ並びにそれらの表面、ニトロセルロース条片、膜、シート、デュラサイト(duracites)、ウェル及び反応トレー、プラスチックチューブ等の壁部が含まれる。リガンド又は結合剤は、多くの異なる担体に結合されてもよい。良く知られる担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然セルロース及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及びマグネタイトが含まれる。担体の性質は、本発明の目的のために可溶性又は不溶性のいずれであってもよい。上記リガンドを固定/固定化するために適した方法は、良く知られており、それには、限定されるものではないが、イオン性相互作用、疎水性相互作用、共有相互作用等が含まれる。また、本発明によるアレイとして「サスペンションアレイ」を使用することも検討されている(Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。そのようなサスペンションアレイにおいては、担体、例えばマイクロビーズ又は微小球が懸濁されて存在する。該アレイは、種々のリガンドを有する、標識されていてよい種々のマイクロビーズ又は微小球からなる。例えば、固相化学及び感光性保護基を基礎とするそのようなアレイの製造方法は、一般的に既知である(米国特許第5,744,305号)。

【0094】

本明細書で使用される場合に、用語「CpGサイト」は、ポリヌクレオチド中に含まれる、好ましくはDNA中に含まれる、より好ましくは被験体のゲノムDNA中に含まれるジヌクレオチド配列5'-CG-3'に関連する。本発明により解析されるべきCpGサイトは、対象となる遺伝子のイントロン、エキソン又はプロモーター領域に位置するCpGサイトである。CpGサイトがプロモーター領域中に位置している場合に、上記領域は、対象となるそれぞれの遺伝子の翻訳開始部位の、好ましくは3000ヌクレオチド上流、2500ヌクレオチド上流、2100ヌクレオチド上流、又は1750ヌクレオチド上流にある。より好ましくは、本発明により解析されるべきCpGサイトは、対象となる遺伝子の翻訳開始部位の、1750ヌクレオチド~3000ヌクレオチド上流、2100ヌクレオチド~3000ヌクレオチド上流、又は2500ヌクレオチド~3000ヌクレオチド上流の領域に位置するCpGサイトである。

【0095】

したがって、本発明のCpGサイトに相当するCpGサイトの解析も、本発明に包含される。当業者は、本明細書に先に詳説されるCpGサイトに相当する試料中のCpGサイトの測定法、例えば対象となる遺伝子の翻訳開始部位を測定することによる、及び/又は試料からの上記配列の、対象となる遺伝子の配列へのアラインメントによる測定法を熟知している。さらに、本発明によれば、その他のCpGサイトのメチル化状態を、本発明のCpGサイトのメチル化状態の測定に加えて測定することも検討されている。

【0096】

語句「メチル化状態を測定する」とは、メチル基が、ポリヌクレオチド中のシトシンのピリミジン環の5位に存在するかどうかを測定することに関連している。好ましくは、シトシン残基に、3'方向でグアノシン残基が続いており、それら2つの残基がCpGサイトを形成する。上記メチル基の存在は、当業者に良く知られる様々な方法、例えばメチル化特異的PCR(MSP)、全ゲノムバイサルファイトシーケンシング若しくはその他のシーケンシングベースの方法(バイサルファイトシーケンシング(BS-Seq)、ポストバイサルファイトアダプタータギング(PBAT)、タグメンテーションベース全ゲノムバイサルファイトシー

ケンシング (T-WGBS)、酸化バイサルファイトシーケンシング (oxBS-Seq)、Tet支援バイサルファイトシーケンシング (TAB-Seq)、メチル化DNA免疫沈降シーケンシング (MeDIP-Seq)、メチル化キャプチャー (MethylCap) シーケンシング、メチル結合ドメインキャプチャー (MBD Cap) シーケンシング、限定表示バイサルファイトシーケンシング (RRBS-Seq)、バイサルファイト処理されたDNAのリアルタイムPCRベースの方法、例えばメチライト、すなわちメチル化感受性制限酵素での、例えばライゲーション媒介PCRによるHpaII小断片濃縮 (HELP) アッセイにおける制限、バイサルファイト処理されたDNAのピロシーケンシング又はAIMS、つまりメチル化部位間の増幅、BC-seq、つまりバイサルファイト変換に続いてのキャプチャー及びシーケンシング、BiMP、つまりバイサルファイトメチル化プロファイリング、BS、つまりバイサルファイトシーケンシング、BSPP、つまりバイサルファイトパッドロックプローブ、CHARM、つまり相対メチル化のための包括的ハイスループットアレイ、COBRA、つまり混合型バイサルファイト制限分析、DMH、つまりディファレンシャルメチル化ハイブリダイゼーション、HELP、つまりライゲーション媒介PCRによるHpaII小断片濃縮、MCA、つまりメチル化CpGアイランド増幅、MCAM、マイクロアレイハイブリダイゼーションによるMCA、MeDIP、mDIP及びmCIP、つまりメチル化DNA免疫沈降、MIRA、つまりメチル化CpGアイランドリカバリアッセイ、MMASS、単独試料のマイクロアレイベースメチル化評価、MS-AP-PCR、つまりメチル化感受性任意プライムPCR、MSCC、つまりメチル化感受性切断計数、MSP、つまりメチル化特異的PCR、MS-SNuPE、つまりメチル化感受性単独ヌクレオチドプライマー伸長、NGS、つまり次世代シーケンシング、RLGS、つまり制限ランドマークゲノムスキニング、RRBS、つまり限定表示バイサルファイトシーケンシング、-seq、つまり引き続いてのシーケンシング、WGSBS、つまり全ゲノムショットガンバイサルファイトシーケンシング (Manel Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps, Nature, 2007, 8:286-298; Peter W. Laird, Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. Nature Review Genetics, 2010, 11: 191-203) を含む方法によって測定することができる。好ましくは、メチル化状態は、本明細書の以下の実施例に記載される方法、例えばシーケンシングベースのInfinium 27Kメチル化アッセイ又はMALDI-TOF質量分析の質量分析ベースの方法によって測定される。したがって、特定のポリヌクレオチド分子における特定のシトシン残基のメチル化状態は、「非メチル化」(0%のメチル化を意味する)又は「メチル化」(100%のメチル化を意味する)のみであってよい。2つのシトシン残基を含む二本鎖DNA分子におけるCpGサイトの場合において、メチル化状態は、「非メチル化」(0%のメチル化を意味する、すなわち2つのシトシン残基はメチル化されていない)、「半メチル化」(50%のメチル化を意味する、すなわち2つのシトシン残基のうち1つがメチル化されている)、又は「メチル化」若しくは「完全にメチル化」(100%のメチル化を意味する、すなわち両方のシトシン残基がメチル化されている)であり得る。しかしながら、当業者によれば、多数の細胞からのポリヌクレオチドが得られ、上記多数のポリヌクレオチド内の特定のシトシン残基のメチル化状態が測定される場合に、例えば好ましくはパーセンテージ(メチル化の%)として表現することができ、かつ0%から100%の間の任意の値を取り得る平均メチル化状態が測定されると理解される。また、当業者によれば、メチル化状態は、種々の細胞集団の平均メチル化が測定される場合にパーセンテージとして表現することも理解される。例えば、本発明による血液細胞は、様々な細胞型の混合物である。或る特定の細胞型は高いメチル化レベルを有するが、その他の細胞型は、より低いメチル化レベルを有し、かつ最終的に、例えば50%の平均メチル化に至ることが可能である。

【0097】

本明細書で使用される場合に、用語「検出剤」は、対象となる遺伝子の発現レベル、対象となる遺伝子のメチル化状態、又は本発明のmiRNAの存在若しくは量と特異的に相互作用し、こうしてそれらを認識する作用剤に関連する。好ましくは、上記検出剤は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドである。好ましくは、検出剤は、適切な措置による上記検出剤の検出が可能となるように標識されている。標識は、当該技術分野で良く知られる様々な技術によって、使用されるべき標識に依

10

20

30

40

50

存して行うことができる。使用されるべき好ましい標識は、とりわけ蛍光色素、例えばフルオレセイン、ローダミン又はテキサスレッドを含む蛍光標識である。しかしながら、標識は、酵素又は抗体であってもよい。標識として使用されるべき酵素は、基質との反応によって検出可能なシグナルを生成することとなると考えられる。適切な酵素、基質及び技術は、当該技術分野で良く知られている。標識として使用されるべき検出剤は、直接的に（例えば、それ自体蛍光性である標的分子）又は間接的に（例えば、酵素のような検出可能なシグナルを生成する標的分子）検出することができる標的分子を特異的に認識することができる。標識された試料の検出剤は、特定の相互作用をさせるために試料と接触されることとなる。洗浄は、非特異的に結合した検出剤を除去するために必要なことがあり、さもなければ偽値が得られることとなる。この相互作用工程が完了した後に、調査員は、読み取り装置又はスキャナー中に検出デバイスを入れることとなる。蛍光標識の検出のためのデバイスは、好ましくは幾つかのレーザー、好ましくは特殊な顕微鏡及びカメラからなる。蛍光標識を、レーザーによって励起させ、顕微鏡及びカメラと一緒に稼働させて、その試料のデジタル画像を生成する。これらのデータを、次いでコンピュータに記録してよく、そして特殊なプログラムが、例えばバックグラウンドデータを差し引くために使用されることとなる。得られたデータは、好ましくは正規化され、そして共通の数字の単位形式に変換することができる。該データは、試料と参照とを比較して、著しい変化を特定するために分析されることとなる。

【0098】

本明細書で使用される「比較」は、分析される試料に含まれる本明細書で述べられる指標の存在、不存在又は量と、適切な参照試料中の上記指標の存在、不存在又は量とを比較することを包含する。本明細書で使用される比較とは、相応のパラメータ又は値の比較を指し、例えば本明細書で述べられる指標の絶対量が、上記指標の絶対参照量と比較され、該指標の濃度が、上記指標の参照濃度と比較され、本明細書で述べられる試料中の指標から得られる強度シグナルが、参照試料中の上記指標の同じ種類の強度シグナルと比較されることと理解されるべきである。述べられた比較は、手動で、又はコンピュータの支援により行うことができる。コンピュータの支援による比較に関しては、測定された量の値は、コンピュータプログラムによってデータベース中に記録された適切な参照に相当する値と比較され得る。コンピュータプログラムは、さらに、エキスパートシステムによって比較の結果を評価することができる。したがって、本明細書で述べられる確認結果は、適切な出力形式で自動的に提供することができる。

【0099】

用語「試料」又は「対象となる試料」は、本明細書で互換的に使用され、該用語は、組織、器官又は個体の全体を表すことが意図されるそのような組織、器官又は個体よりも一般的に小さい組織、器官又は個体の部分又は小片を指す。分析にあたり、試料は、組織の状態又は器官若しくは個体の健康若しくは罹患状態についての情報を提供する。試料の例には、限定されるものではないが、流体試料、例えば血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び乳腺若しくは前立腺のような腺から得ることができる流体、又は組織試料、例えば腫瘍組織又は腫瘍と隣接した組織から取得した組織抽出物が含まれる。試料の更なる例は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。

【0100】

試料は、良く知られた技術によって得ることができ、該試料には、好ましくは消化管、肝臓、脾臓、肛門管、口腔、上部気道消化管及び表皮からの掻き取り物、ぬぐい液又は生検材料が含まれる。そのような試料は、ブラシ、綿棒（スワブ）（(cotton) swabs）、スパチュラ、すすぎ/洗浄液、パンチ生検デバイス、針又は手術器具による腔の穿刺の使用により得ることができる。組織試料又は器官試料は、任意の組織又は器官から、例えば生検又はその他の手術法により得ることができる。より好ましくは、試料は、体液、例えば好ましくは血液、血漿、血清、尿、唾液、涙液及び乳腺から得ることができる流体、例えば乳汁の試料である。最も好ましくは、体液の試料は、被験体の細胞を含む。分離された

細胞は、体液又は組織若しくは器官から、分離技術、例えば濾過、遠心分離又はセルソーティングによって得ることができる。好ましくは、試料は、本明細書の以下に記載されるこれらの体液から得られる。より好ましくは、細胞は、本明細書の以下に記載されるように上記体液から単離される。

【0101】

試料の分析は、視覚的又は化学的なベースで達成することができる。視覚的分析には、限定されるものではないが、試料の形態学的評価を可能にする、組織、器官又は個体の顕微鏡イメージング又はX線スキャニングが含まれる。化学的分析には、限定されるものではないが、特定の指標又は変化の、その量又はレベルにおける存在又は不存在の検出が含まれる。

10

【0102】

本明細書で使用される用語「参照試料」とは、対象となる試料と本質的に同じようにして分析される試料であって、その情報が対象となる試料と比較される試料を指す。それにより、参照試料は、対象となる試料から得られる情報の評価を可能にする標準を提供する。参照試料は、健康又は正常な組織、器官若しくは個体から得ることができ、したがって、組織、器官又は個体の健康状態の標準を提供する。正常な参照試料の状態と対象となる試料の状態との間の差異は、疾患の発症のリスク又はそのような疾患若しくは障害の存在若しくは更なる進行の指標となり得る。参照試料は、異常な又は罹患した組織、器官若しくは個体から得ることができ、したがって、組織、器官又は個体の罹患状態の標準を提供する。異常な参照試料の状態と対象となる試料の状態との間の差異は、疾患の発症のリスクの低下又はそのような疾患若しくは障害の不存在若しくは好転の指標となり得る。また参照試料は、対象となる試料と同じ組織、器官又は個体から得ることもできるが、より早い時点で採取されたものである。より早い時点で採取された参照試料の状態と対象となる試料の状態との間の差異は、疾患の進行、すなわち疾患の時間に伴う好転又は悪化の指標となり得る。参照試料の採取と対象となる試料の採取との間で時間が経過する場合には、参照試料を、より早い時点又はより遅い時点で採取した。そのような時間は、年単位（例えば、1年、2年、3年、4年、5年、10年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、60年、70年、80年、90年、100年）、月単位（1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月）、週単位（例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間）、日数単位（例えば、1日、2日、3日、4日、5日、10日、15日、20日、25日、30日、35日、40日、45日、50日、60日、70日、80日、90日、100日、200日、300日、400日、500日）、時間単位（1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間）、分単位（例えば、1分間、2分間、3分間、4分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、35分間、40分間、45分間、50分間、60分間）又は秒単位（例えば、1秒間、2秒間、3秒間、4秒間、5秒間、10秒間、15秒間、20秒間、25秒間、30秒間、35秒間、40秒間、45秒間、50秒間、60秒間）であってよい。

20

30

【0103】

参照試料は、両方の試料が単独の要因以外は本質的に同様にして処置される場合に、対象となる試料とは「異なるように処置」又は「異なるように曝露」され得る。そのような単独の要因には、限定されるものではないが、曝露の時間、曝露の濃度、又は特定の物質への曝露の温度が含まれる。したがって、対象となる試料は、参照試料とは異なる適用量の特定の物質に曝露することができるか、又は参照試料とは異なる時間間隔にわたって曝露することができるか、又は参照試料とは異なる温度で曝露することができる。対象となる試料が曝露され得る種々の適用量には、限定されるものではないが、参照試料が曝露される適用量の2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍及び/又は1000倍だけ増加又は減少された適用量が含まれる。対象となる試料が曝露され得る種々の曝露時間には、限定されるものではないが、参照試料の曝露よりも2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍及び/又は1000倍だけ長い又は短い時間が含まれる。対象となる試料が曝露され得る種々の曝露温度には、限定されるものではないが、参照試料の曝露よりも2倍

40

50

、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍及び／又は1000倍だけ増大又は減少された温度が含まれる。限定されるものではないが、一例においては、対象となる試料は、参照試料よりも10倍だけ高められた物質濃度に曝露され得る。次いで、両方の試料の分析が、本質的に同じようにして行われ、こうして、対象となる試料に対するそのような物質の高められた濃度の効果、すなわち有益な効果又は不利な効果を測定することが可能となる。当業者であれば、この例は、必要な変更を加えて、種々の濃度範囲、種々の曝露時間、及び／又は種々の曝露温度に当てはまるものと推察するであろう。

【0104】

指標のレベルの「低下」又は「減少」という用語は、試料中のそのような指標のレベルが、参照又は参照試料と比較して低減されていることを指す。指標のレベルの「上昇」又は「増加」という用語は、試料中のそのような指標のレベルが、参照又は参照試料と比較してより高いことを指す。

【0105】

参照量は、原則的に、本明細書で特定される被験体の群又はコホートについて、所定のmiRNAについての平均値又は中央値に基づき標準的な統計学的手法を適用することによって計算することができる。特に、或る事象であるか否かを診断することを目的とする方法のような試験の精度は、その受信者操作特性（ROC）によって最も良好に説明される（特にZweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577を参照）。ROCグラフは、得られたデータの全範囲にわたって決定閾値を連続的に変動させて得られる全ての感度対特異度の組のプロットである。診断法の臨床的性能は、その精度、すなわち被験体を特定の予後又は診断に正しく割り当てる能力に依存する。ROCプロットは、区別に適した閾値の全範囲にわたって感度対1-特異度をプロットすることによって2つの分布の間で重複を示す。y軸は、感度又は真陽性部分であり、それは、真陽性の試験結果の数の、真陽性の試験結果の数及び偽陰性の試験結果の数の合計に対する比率として定義される。これはまた、疾患又は状態の存在における陽性度とも呼ばれている。その比率は、罹患したサブグループのみから計算される。x軸は、偽陽性部分又は1-特異度であり、それは、偽陽性の結果の数の、真陰性の結果の数及び偽陽性の結果の数の合計に対する比率として定義される。その比率は、特異度の指標であり、罹患していないサブグループ全体から計算される。真陽性部分及び偽陽性部分は、全体的に別々に2つの異なるサブグループからの試験結果を使用して計算されるので、ROCプロットは、そのコホートにおける事象の有病率とは無関係である。ROCプロットにおけるそれぞれの点は、特定の決定閾値に相当する感度／1-特異度の組を表す。完全な判別を伴う試験（2つの結果の分布において重複無し）は、左上隅を通るROCプロットを有し、その際、真陽性部分は、1.0又は100%（完全な感度）であり、かつ偽陽性部分は、0（完全な特異度）である。判別を伴わない試験（2つの群の結果の分布が同じ）の場合の理論上のプロットは、左下隅から右上隅までの45度の斜線である。殆どのプロットは、これらの2つの両極の間にある。ROCプロットが完全に45度の斜線下に含まれる場合に、これは、「陽性」の基準を「～超」から「～未滿」へと逆転させるか又はその逆にすることによって簡単に対処される。定性的には、プロットが左上隅に近くなるほど、試験の全精度は高くなる。所望の信頼区間に依存して、閾値は、ROC曲線から得ることができ、こうして所定の事象の診断又は予測は、感度及び特異度のそれぞれの適切なバランスを伴って可能となる。したがって、本発明の方法のために使用されるべき参照は、好ましくは、上記コホートについてのROCを確立し、そこから閾値量を得ることによって生成することができる。診断法について望ましい感度及び特異度に依存して、ROCプロットは、適切な閾値を得ることを可能にする。好ましくは、参照量は、少なくとも75%の感度及び少なくとも45%の特異度、又は少なくとも80%の感度及び少なくとも40%の特異度、又は少なくとも85%の感度及び少なくとも33%の特異度、又は少なくとも90%の感度及び少なくとも25%の特異度を表す値の範囲内にある。

【0106】

好ましくは、本明細書で使用される参照量は、処置前に得られる被験体の試料から取得されるが、そのためには、そのドナーがBC若しくはMBCに罹患していたか否かは既知であ

10

20

30

40

50

る。この参照量のレベルは、離散的な数値であっても、又は数値範囲であってもよい。明らかに、参照レベル又は参照量は、個々のmiRNA種の間で変動し得る。したがって、測定系は、それぞれの特定のmiRNAの既知の量を含む1つの試料又は一連の試料で較正される。当業者によれば、そのような場合には、miRNAの量は、好ましくは任意単位 (AU) として表現され得ることが理解される。このように、好ましくはmiRNAの量は、試料から得られるシグナルと較正曲線に含まれるシグナルとを比較することによって測定される。個々の被験体に適用することができる参照量は、年齢又は部分母集団のような様々な生理学的パラメータに依存して変動し得る。こうして、適切な参照量は、本発明の方法によって、試験試料と一緒に、すなわち同時に又は引き続いて分析されるべき参照試料から測定することができる。さらに、閾値量は、好ましくは参照量として使用することができる。参照量は、好ましくは、BC又はMBCに罹患しており、BC又はMBCに罹患していないことが既知の被験体又は被験体の群の試料から得ることができる。また参照量は、好ましくは、BC又はMBCに罹患していることが既知の被験体又は被験体の群の試料から得ることもできる。上述の量は、測定の統計及び誤差のため変動し得るものと理解されるべきである。偏差、すなわち本明細書で述べられるmiRNA量の減少又は増加は、好ましくは、統計学的に有意な偏差であり、すなわち統計学的に有意な減少又は統計学的に有意な増加である。

【0107】

本明細書で使用される疾患又は障害の「治療」、それらを「治療する」、又は「治療」は、以下の (a) 障害の重症度を軽減すること、(b) 治療される1つ以上の障害の症候特性の発生を制限又は防止すること、(c) 治療される1つ以上の障害の症候特性の悪化を抑えること、(d) 1つ以上の障害を以前に有していた個体における1つ以上の障害の再発を制限又は防止すること、及び (e) 1つ以上の障害に以前に徴候を有していた個体における症候の再発を制限又は防止することのうちの1つ以上を達成することを意味する。

【0108】

本明細書で使用される場合に、疾患又は障害の「防止」、それらを「防止する」、「防止」又は「予防」は、そのような疾患又は障害が患者において起こることを防止することを意味する。

【0109】

本明細書で使用される場合に、用語「療法」とは、被験体に適用することで、本明細書で述べられた疾患若しくは障害又はそれに伴う症候がかなりの程度まで改善するあらゆる措置を指す。本明細書で使用される上記療法には、本明細書で述べられる疾患又は障害に関する健康の完全な回復を導く措置も含まれる。本発明により使用される療法は、治療されるべき全ての被験体において有効でないこともあると理解されるべきである。しかしながら、その用語は、本明細書で述べられる疾患又は障害に罹患している患者の統計学的に有意な部分が効果的に治療され得ることを必要とするものとする。或る集団が統計学的に有意であるかどうかは、本明細書で先に論じられた様々な良く知られた統計学的評価ツールを用いて、当業者によって難なく決定することができる。

【0110】

本明細書で使用される用語「乳癌療法」は、転移性乳癌を含む乳癌に罹患した被験体に対して、該被験体から癌細胞を除去するための措置、癌細胞の増殖を阻害する措置、癌細胞を死滅させる措置、又は患者の身体を癌細胞の増殖を抑える若しくは癌細胞を死滅させる措置を適用することに関連している。好ましくは、乳癌療法は、化学療法、抗ホルモン療法、標的療法、免疫療法又はそれらの任意の組み合わせである。しかしながら、癌療法は、放射線療法若しくは手術単独か、又はそれとその他の治療レジメンとを組み合わせることが考えられる。当業者によれば、乳癌療法の選択は、被験体の年齢、腫瘍進行度及び腫瘍細胞の受容体状態のような幾つかの要因に依存することが理解される。しかしながら、当業者によれば、乳癌療法の選択は、本発明による方法によって補助することができる。例えばBCがBCの診断方法によって診断されているが、MBCはMBCの診断方法によって診断されていない場合に、腫瘍の手術による除去で十分なことがある。例えばBCがBCの診断方法によって診断され、かつMBCがMBCの診断方法によって診断されている場合に、手術に加

えて療法措置、例えば化学療法及び／又は標的療法が適切なことがある。同様に、例えばBCがBCの診断方法によって診断され、かつ好ましくないCTCステータスがCTCステータスの測定法によって測定される場合に、例えば該治療レジメンに免疫療法を更に加えることが必要となることがある。

【0111】

本明細書で使用される場合に、用語「化学療法」は、抗新生物薬で被験体を処置することに関連する。好ましくは、化学療法は、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）、白金（例えば、カルボプラチン）、アントラサイクリン類（例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン又はダウノルビシン）及びトポイソメラーゼII阻害剤（例えば、エトポシド、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン又はVP16）、非分化リンパ腫キナーゼ（ALK）阻害剤（例えば、クリゾチニブ又はAP26130）、オーロラキナーゼ阻害剤（例えば、N-[4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-6-[(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)アミノ]ピリミジン-2-イル]スルファニルフェニル]シクロプロパンカルボキサミド（VX-680））、抗血管新生薬（例えば、ベバシズマブ）又はヨウ素131-1-(3-ヨードベンジル)グアニジン（治療用メタヨードベンジルグアニジン）、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤を単独又はそれらの任意の適切な組み合わせを含む処置である。化学療法は、好ましくは、完全な処置サイクル、すなわち一連の数回（例えば、4回、6回又は8回）の用量の1種以上の抗新生物薬を、そのような適用を行わない数日又は数週間によって隔てて被験体に適用することに関連する。

【0112】

用語「抗ホルモン療法」は、腫瘍細胞上に発現されるホルモン受容体、例えばエストロゲン受容体若しくはプロゲステロン受容体を遮断することによる、又はエストロゲンの生合成を遮断することによる乳癌療法に関連する。ホルモン受容体の遮断は、好ましくは、化合物、例えばタモキシフェンを投与し、特異的に結合させ、そして上記ホルモン受容体の活性を遮断することによって達成することができる。エストロゲン生合成の遮断は、好ましくは、例えばアナストロゾール又はレトロゾールのようなアロマターゼ阻害剤の投与によって達成される。当業者には、抗ホルモン療法は、腫瘍細胞がホルモン受容体を発現している場合にのみ勧められることは知られている。

【0113】

本明細書で使用される用語「標的療法」は、腫瘍形成又は癌若しくは癌細胞の増殖に必要であることが知られる特定の分子と干渉することによって癌細胞の増殖を遮断することが知られる化学物質を患者に適用することに関連する。当業者に知られる例は、例えばPARP阻害剤（例えばイニパリブ）のような小分子又は、例えばトラスツズマブのようなモノクローナル抗体である。

【0114】

本明細書で使用される用語「免疫療法」は、被験体の免疫応答の調節による癌の治療に関連する。上記調節は、上記免疫応答の誘発、強化又は抑制であってよい。用語「細胞ベース免疫療法」は、免疫細胞、例えばT細胞、好ましくは腫瘍特異的NK細胞を被験体に適用することを含む乳癌療法に関連する。

【0115】

用語「放射線療法」又は「ラジオセラピー」は、当業者に知られている。その用語は、癌の治療又は抑制のための電離放射線の使用に関連する。また当業者は、乳癌治療のための手術的措置、例えば腫瘍組織の切除に関連する用語「手術」も熟知している。

【0116】

本明細書で使用される場合に、用語「療法の監視」は、上記癌に罹患した被験体の癌の状態に対する、癌に対する処置の効果の示度を得ることに関連する。好ましくは、療法の監視は、本発明の方法を、同じ被験体からの2つの試料に適用することを含み、その際、第1の試料は、第2の試料の前の時点で得られる。好ましくは、第1の試料を得る時点は、第2の試料を得る時点から、約1週間だけ、約2週間だけ、約3週間だけ、約4（four）週間だけ、約5週間だけ、約6週間だけ、約7週間だけ、約2ヶ月だけ、約3ヶ月だけ、約5ヶ月だ

10

20

30

40

50

け、約6ヶ月だけ、又は約6ヶ月より長く隔てられる。しかしながら、本発明によれば、療法の監視の方法を、被験体の長期監視、例えば無増悪生存期間等の時間を監視するために使用することも考えられる。そのような場合に、第1の試料を得る時点は、第2の試料を得る時点から、好ましくは少なくとも6ヶ月だけ、少なくとも1年間だけ、少なくとも2年間だけ、少なくとも3年間だけ、少なくとも4年間だけ、少なくとも5年間だけ、又は少なくとも6年間だけ隔てられる。当業者には、第1の試料は、好ましくは癌療法が開始される前に得られるが、第2の試料は、好ましくは療法が開始した後に得られることは知られている。しかしながら、本発明によれば、両方の試料とも療法の開始後に得られることも考えられる。また当業者は、3つ以上の連続的な試料が、本発明の療法の監視のための方法によって得ることができ、そのような場合に、第1の時点で得られた試料が、第2の試料に対する第1の試料として使用することができ、第3の試料についても同様であることを理解している。必要な変更を加えて、第2の時点で得られた試料は、それにもかかわらず、第3の試料に対する第1の試料等として使用することができる。

10

【0117】

本明細書で使用される用語「治療の成功」は、好ましくは本明細書で述べられた疾患若しくは障害又はそれに伴う症候がかなりの程度まで改善することに関連する。より好ましくは、その用語は、上記被験体の完全な治癒、すなわち転移性乳癌の少なくとも5年にわたる進行及び/又は再発の防止に関連している。したがって、「治療の成功の測定」は、被験体が好結果に治療されたという見込みの評価に関連している。好ましくは、その用語は、被験体の、より好ましくは特定の時間にわたる、無増悪生存期間及び/又は全生存期間の予測に関連する。用語「無増悪生存期間の予測」は、特定の時間にわたって、転移性乳癌が再発及び/又は進行せずに被験体が生存する見込みを測定することに関連する。したがって、用語「全生存期間の予測」は、被験体が特定の時間にわたって生存するであろう見込みを測定することに関連する。好ましくは、上記時間は、少なくとも12ヶ月、より好ましくは少なくとも24ヶ月である。

20

【0118】

用語「医薬品」、「医薬」及び「薬剤」は、本明細書では互換的に使用され、それらは、組織状態又は疾患の特定、防止又は治療のために使用される物質及び/又は物質の組み合わせを指す。

【0119】

本明細書で使用される用語「キット」とは、好ましくは別々に又は単独の容器内で提供される、上述の要素の収集物を指す。容器は、好ましくは、本発明の方法の実施のための説明書も含む。そのようなキットの要素及び該キットの使用法の例は、本明細書に示されている。該キットは、好ましくは、上記の要素を、使用準備ができた製剤において含む。好ましくは、該キットは、説明書、例えば要素の調整、検出剤の濃度の調整のため、及び本発明の方法によって提供される診断に関する1つ以上の任意の測定の結果を解釈するための利用者マニュアルを更に含んでよい。特に、そのようなマニュアルは、測定された遺伝子産物の量をその種類の診断に割り当てるための情報を含み得る。詳細は、本明細書の他の箇所に見出されるべきである。さらに、そのような利用者マニュアルは、それぞれのバイオマーカーの1つ以上の量を測定するために該キットの要素を正しく使用することについての解説を提供し得る。利用者マニュアルは、紙又は電子形式で、例えばCD又はCD-ROMに記録した形式で提供することができる。また本発明は、本発明による方法のいずれかにおける上記キットの使用に関する。

30

40

【0120】

本明細書で使用される用語「装置」は、診断が可能となるように互いに作動的に連係された上述の手段を少なくとも含む複数の手段の系に関連している。遺伝子産物のメチル化状態又は量を測定するための好ましい手段及び比較を行うための手段は、本発明の方法と関連して先に開示されている。該手段の作動的な連係の仕方は、該装置中に含まれる手段の型に依存することとなる。例えば、遺伝子産物のメチル化状態又は量を自動的に測定するための手段が適用される場合に、上記自動的に作動する手段によって得られるデータは

50

、例えば診断の確立のためにコンピュータプログラムによって処理され得る。好ましくは、それらの複数の手段は、そのような場合に単独の装置に含まれる。上記装置は、したがって、試料中の遺伝子産物のメチル化状態又は量を測定するための解析ユニット及び診断のために得られたデータを処理するための評価ユニットを含む。検出のために好ましい手段は、上記本発明の方法に関連する実施形態に関連して開示されている。そのような場合において、上記複数の手段は、該系の利用者が量の測定結果を集め、マニュアルに示される解説及び解釈によりその診断値をまとめるように作動的に連係されている。該手段は、そのような実施形態においては別々の装置とみなすことができ、好ましくはキットとして一緒に包装されている。当業者は、該複数の手段を更なる発明技能なくして連係する方法を実現するであろう。好ましい装置は、専門の臨床医の特定の知識を要することなく適用することができる装置、例えば試料をロードすることだけが必要とされる試験条片又は電子素子である。それらの結果は、パラメトリック診断的生データの、好ましくは絶対量又は相対量としての出力として与えることができる。これらのデータは、臨床医による解釈を必要とするであろうことが理解されるべきである。しかしながらまた、出力が処理された診断的生データを含み、その解釈には専門の臨床医が必要とされないエキスパートシステム装置も考えられる。更なる好ましい装置は、本発明の方法に従って先に述べられた分析ユニット／装置（例えば、バイオセンサ、アレイ、ポリペプチドを特異的に認識するリガンドに結合された固体担持体、プラスモン表面共鳴装置、NMR分析計、質量分析計等）又は評価ユニット／装置を含む。

10

【 0 1 2 1 】

20

実施形態

第1の態様では、本発明は、被験体における疾患の予後判定及び／又は診断の方法であって、被験体において、

a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを測定することと、

b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在を測定することと、を含む、方法に関する。

【 0 1 2 2 】

30

特定の実施形態においては、疾患は、増殖性細胞疾患である。特定の実施形態においては、疾患は、癌である。特に、癌は、乳癌、膵臓癌及び卵巣癌からなる群から選択される。

【 0 1 2 3 】

特定の実施形態においては、用語miR-652とは、-3p鎖又は-5p鎖の配列（特にmiR-652-3p）を指し、用語miR-801とは、-3p鎖又は-5p鎖の配列を指し、用語miR-376cとは、-3p鎖又は-5p鎖の配列（特にmiR-376c-3p）を指し、用語miR-376aとは、-3p鎖又は-5p鎖の配列（特にmiR-376a-3p）を指し、用語miR-127とは、-3p鎖又は-5p鎖の配列（特にmiR-127-3p）を指し、用語miR-409とは、-3p鎖又は-5p鎖の配列（特にmiR-409-3p）を指し、用語miR-148bとは、-3p鎖又は-5p鎖の配列（特にmiR-148-3p）を指す。

40

【 0 1 2 4 】

更なる実施形態においては、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態及び／又は発現レベルにおける変化は、組織状態又は疾患における変化、例えば組織状態又は疾患、特に癌の悪化又は好転を示す。特に、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態の減少は、組織状態又は疾患の悪化の指標である。HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態の増加は、組織状態又は疾患の好転の指標である。またHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態の変化は、変化した組織状態又は疾患、特に癌の発症のリスクの指標である。より具体的には、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル

50

化状態の減少は、退行性組織状態又は疾患、特に癌の発症のリスクの指標である。また、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の変化したメチル化状態、特にHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態の減少は、変化した組織状態又は疾患、特に癌を患う個体の指標である。さらに、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の変化したメチル化状態、例えばHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態レベルの上昇又は低下は、被験体における、組織状態又は疾患、特に癌の進行又は段階を示す。特に、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4のメチル化状態の減少は、組織状態又は疾患、特に癌の悪化の指標である。

10

【 0 1 2 5 】

特に、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの増加は、組織状態又は疾患の悪化の指標である。HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの減少は、組織状態又は疾患の好転の指標である。またHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの変化は、変化した組織状態又は疾患、特に癌の発症のリスクの指標である。より具体的には、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの増加は、退行性組織状態又は疾患、特に癌の発症のリスクの指標である。また、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の変化した発現レベル、特にHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの増加は、変化した組織状態又は疾患、特に癌を患う個体の指標である。さらに、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の変化した発現レベル、例えばHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの上昇又は低下は、被験体における、組織状態又は疾患、特に癌の進行又は段階を示す。特に、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及び／又はDYRK4の発現レベルの増加は、組織状態又は疾患、特に癌の悪化の指標である。

20

【 0 1 2 6 】

更なる実施形態においては、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルにおける変化は、組織状態又は疾患における変化、例えば組織状態又は疾患、特に癌の悪化又は好転を示す。

30

【 0 1 2 7 】

特に、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの上昇は、組織状態又は疾患の悪化の指標である。特に、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの低下は、組織状態又は疾患の好転の指標である。またmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの変化は、変化した組織状態又は疾患、特に癌の発症のリスクの指標である。より具体的には、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの上昇は、退行性の組織状態又は疾患、特に癌の発症のリスクの指標である。また、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの変化、特にmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの上昇は、変化した組織状態又は疾患、特に癌を患う個体の指標である。さらに、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの変化、例えばmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの上昇又は低下は、被験体における、組織状態又は疾患の進行又は段階を示す。特に、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及び／又はmiR-148bのレベルの上昇は、組織状態又は疾患、特に癌の悪化の指標である。

40

【 0 1 2 8 】

少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの存在、特にその量は、上記被験体の予後及び／又は診断の指標である

50

。癌の予後及び／又は診断には、
 i. 癌の発症のリスク、
 ii. 癌の存在、及び／又は、
 iii. 癌の進行、特に悪化若しくは好転、
 が含まれる。

【 0 1 2 9 】

特定の実施形態においては、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127p、miR-409及びmiR-148bからなる群から選択される1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量が測定される。

【 0 1 3 0 】

特定の実施形態においては、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルが測定される。

【 0 1 3 1 】

特定の実施形態においては、少なくとも2種、3種、4種、5種、6種、7種又は8種の異なるメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルが測定され、及び／又は少なくとも2種、3種、4種、5種、6種又は7種の異なるmiRNAマーカーの存在、特にその量が測定される。特に、全ての7種のmiRNAマーカーが測定される。全ての7種のmiRNAマーカーが測定される場合に、この組み合わせは、miR-7と呼ばれる(referred)。すなわち、miR-7は、全ての7種のmiRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127p、miR-409及びmiR-148bを含む。

【 0 1 3 2 】

メチル化マーカー及びmiRNAの様々な特定の組み合わせを、癌の予後判定及び／又は診断のために使用することができると理解されるべきである。

【 0 1 3 3 】

特定の実施形態においては、メチル化マーカーの以下の組み合わせの1つ以上のメチル化状態及び／又は発現レベルが測定される。

【 0 1 3 4 】

HYAL2+RAPSN; S100P+RAPSN; RPTOR+HYAL2; MGRN1+HYAL2; SLC22A18+S100P; HYAL2+SLC22A18; RPTOR+S100P; miR-7+DYRK4; RPTOR+RAPSN; FUT7+RAPSN; MGRN1+SLC22A18; RPTOR+FUT7; FUT7+MGRN1; miR-7+MGRN1; MGRN1+S100P; DYRK4+RAPSN; FUT7+S100P; RPTOR+DYRK4; RPTOR+miR-7; DYRK4+MGRN1; FUT7+HYAL2; miR-7+RAPSN; MGRN1+RAPSN; HYAL2+S100P; miR-7+SLC22A18; RPTOR+MGRN1; DYRK4+SLC22A18; SLC22A18+RAPSN; DYRK4+HYAL2; DYRK4+S100P; FUT7+SLC22A18; miR-7+HYAL2; RPTOR+SLC22A18; miR-7+S100P; miR-7+FUT7; DYRK4+FUT7;

miR-7+DYRK4+FUT7; miR-7+MGRN1+HYAL2; RPTOR+MGRN1+RAPSN; MGRN1+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+miR-7+S100P; miR-7+MGRN1+S100P; RPTOR+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+FUT7+HYAL2; FUT7+HYAL2+SLC22A18; FUT7+HYAL2+RAPSN; miR-7+SLC22A18+S100P; miR-7+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+S100P; DYRK4+SLC22A18+S100P; DYRK4+MGRN1+HYAL2; DYRK4+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+MGRN1; miR-7+DYRK4+S100P; DYRK4+S100P+RAPSN; DYRK4+MGRN1+RAPSN; RPTOR+miR-7+MGRN1; DYRK4+FUT7+MGRN1; miR-7+FUT7+RAPSN; miR-7+MGRN1+RAPSN; RPTOR+HYAL2+S100P; HYAL2+S100P+RAPSN; DYRK4+FUT7+RAPSN; MGRN1+HYAL2+SLC22A18; FUT7+MGRN1+S100P; RPTOR+DYRK4+RAPSN; FUT7+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+S100P; DYRK4+HYAL2+RAPSN; FUT7+HYAL2+S100P; RPTOR+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+miR-7+HYAL2; HYAL2+SLC22A18+RAPSN; DYRK4+MGRN1+S100P; miR-7+HYAL2+RAPSN; RPTOR+miR-7+RAPSN; miR-7+FUT7+MGRN1; RPTOR+DYRK4+HYAL2; FUT7+MGRN1+RAPSN; miR-7+DYRK4+MGRN1; FUT7+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+miR-7+DYRK4; miR-7+DYRK4+SLC22A18; RPTOR+S100P+RAPSN; miR-7+DYRK4+RAPSN; RPTOR+HYAL2+SLC22A18; SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+HYAL2+RAPSN; RPTOR+FUT7+MGRN1; RPTOR+SLC22A18+S100P; MGRN1+SLC22A18+S100P; MGRN1+HYAL2+S100P; miR-7+HYAL2+S100P; RPTOR+MGRN1+S100P; RPTOR+FUT7+SLC22A18; MGRN1+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7; DYRK4+FUT7+HYAL2; RPTOR+FUT7+RAPSN; DYRK4+HYAL2+S100P; FUT7+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+miR-7+FUT7; miR-7+FUT7+HYAL2; miR-7+MGRN1+SLC22A18; miR-7+FUT7+SLC22A18; mi

10

20

30

40

50

R-7+DYRK4+HYAL2; MGRN1+HYAL2+RAPS; FUT7+MGRN1+HYAL2; DYRK4+FUT7+SLC22A18; HYAL2+SLC22A18+S100P; DYRK4+FUT7+S100P; RPTOR+DYRK4+SLC22A18; DYRK4+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+MGRN1+HYAL2; DYRK4+SLC22A18+RAPS; FUT7+SLC22A18+S100P; miR-7+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+SLC22A18; miR-7+FUT7+S100P; miR-7+HYAL2+SLC22A18;

RPTOR+MGRN1+HYAL2+S100P; RPTOR+FUT7+SLC22A18+RAPS; DYRK4+FUT7+S100P+RAPS; RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2; DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+FUT7+S100P; miR-7+DYRK4+SLC22A18+RAPS; RPTOR+HYAL2+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+SLC22A18; miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18; DYRK4+FUT7+HYAL2+RAPS; MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P; DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P; MGRN1+HYAL2+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+RAPS; miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18; miR-7+DYRK4+MGRN1+S100P; FUT7+MGRN1+HYAL2+RAPS; RPTOR+FUT7+MGRN1+RAPS; DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2; RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2; miR-7+FUT7+HYAL2+S100P; miR-7+FUT7+SLC22A18+S100P; FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+FUT7+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+miR-7+SLC22A18+RAPS; RPTOR+HYAL2+SLC22A18+RAPS; miR-7+FUT7+S100P+RAPS; FUT7+MGRN1+SLC22A18+RAPS; miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2; RPTOR+miR-7+FUT7+S100P; RPTOR+miR-7+HYAL2+S100P; DYRK4+MGRN1+HYAL2+S100P; FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPS; FUT7+SLC22A18+S100P+RAPS; RPTOR+FUT7+S100P+RAPS; RPTOR+FUT7+HYAL2+SLC22A18; MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPS; miR-7+HYAL2+S100P+RAPS; RPTOR+DYRK4+MGRN1+SLC22A18; DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P; miR-7+DYRK4+HYAL2+RAPS; miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1; DYRK4+MGRN1+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2; miR-7+MGRN1+HYAL2+S100P; RPTOR+DYRK4+SLC22A18+RAPS; miR-7+DYRK4+MGRN1+RAPS; RPTOR+MGRN1+HYAL2+RAPS; RPTOR+DYRK4+FUT7+RAPS; RPTOR+MGRN1+SLC22A18+S100P; DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18; miR-7+DYRK4+SLC22A18+S100P; miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2; miR-7+MGRN1+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+HYAL2+SLC22A18+S100P; miR-7+FUT7+HYAL2+RAPS; HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPS; RPTOR+SLC22A18+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1; RPTOR+miR-7+FUT7+RAPS; FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+S100P+RAPS; DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P; DYRK4+HYAL2+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2; miR-7+FUT7+MGRN1+S100P; miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+HYAL2+S100P; RPTOR+miR-7+SLC22A18+S100P; DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+MGRN1+S100P; FUT7+HYAL2+S100P+RAPS; RPTOR+FUT7+HYAL2+S100P; RPTOR+miR-7+S100P+RAPS; RPTOR+DYRK4+HYAL2+RAPS; miR-7+HYAL2+SLC22A18+RAPS; miR-7+DYRK4+HYAL2+S100P; DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+MGRN1+SLC22A18+RAPS; DYRK4+SLC22A18+S100P+RAPS; RPTOR+DYRK4+HYAL2+SLC22A18; FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P; DYRK4+HYAL2+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+MGRN1+S100P; DYRK4+FUT7+MGRN1+RAPS; miR-7+DYRK4+FUT7+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7; miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18; miR-7+MGRN1+SLC22A18+S100P; miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18; miR-7+MGRN1+S100P+RAPS; miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2; RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1; miR-7+FUT7+MGRN1+RAPS; RPTOR+FUT7+SLC22A18+S100P; FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+miR-7+HYAL2+RAPS; DYRK4+MGRN1+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1; miR-7+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+MGRN1+S100P+RAPS; RPTOR+DYRK4+FUT7+SLC22A18; DYRK4+FUT7+SLC22A18+RAPS; MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+S100P; RPTOR+FUT7+MGRN1+S100P; miR-7+DYRK4+S100P+RAPS; miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18; miR-7+DYRK4+FUT7+S100P; miR-7+FUT7+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+MGRN1+RAPS; miR-7+MGRN1+HYAL2+RAPS; RPTOR+miR-7+FUT7+SLC22A18; FUT7+MGRN1+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2; DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+MGRN1+RAPS; RPTOR+DYRK4+SLC22A18+S100P; DYRK4+MGRN1+HYAL2+RAPS; miR-7+SLC22A18+S100P+RAPS; RPTOR+FUT7+HYAL2+RAPS; RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYAL2;

miR-7+DYRK4+FUT7+S100P+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2; RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18; miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2; RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+S100P; RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+RAPS; DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+S100P; RPTOR+DYRK4+SLC22A18+S100P+RAPS; RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+RAPS; RPTOR+miR-7+FUT7+SLC22A18+RAPS; miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P; RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+RAPS; miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18+RAPS; miR-7+HYAL2+SLC22A18

10

20

30

40

50

8+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+S100P; RPTOR+miR-7+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYAL2+RAPSN; RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P; miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P; FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN; FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+miR-7+HYAL2+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+S100P; RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18; miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100P; miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+S100P; miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+RAPSN; miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+FUT7+S100P+RAPSN; DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1; miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P; miR-7+DYRK4+HYAL2+S100P+RAPSN; DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN; DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN; DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7+SLC22A18+RAPSN; DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18; miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2+RAPSN; miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+RAPSN; miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+RAPSN; miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P; miR-7+DYRK4+MGRN1+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+MGRN1+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+S100P; miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; miR-7+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN; DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P; RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+RAPSN; miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+DYRK4+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+RAPSN; miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+FUT7+S100P+RAPSN; DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P; DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSN; FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN; miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18; RPTOR+miR-7+DYRK4+SLC22A18+RAPSN; miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+RAPSN; RPTOR+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P; miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18+RAPSN; miR-7+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+MGRN1+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2; miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+DYRK4+HYAL2+S100P+RAPSN; miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P; RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P; miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+RAPSN; RPTOR+miR-7+FUT7+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2; DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2+RAPSN; DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+RAPSN; miR-7+FUT7+SLC22A18+S100P+RAPSN; miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100P; MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+MGRN1+S100P+RAPSN; DYRK4+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+SLC22A18+S100P; RPTOR+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P; miR-7+DYRK4+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+FUT7+MGRN1+SLC22A18+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18; miR-7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN; miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18; RPTOR+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYAL2+S100P;

RPTOR+miR-7+DYRK4+SLC22A18+S100P+RAPSN; DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN; RPTOR+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P; RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN; DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN; miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P; RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+S100P+RAPSN; RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P; RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S1

00P;RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+RAPSN;miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;R
 PTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18+RAPSN;RPTO
 R+miR-7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+
 DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+
 FUT7+SLC22A18+S100P+RAPSN;miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+FUT
 7+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P;miR-7+FUT7+MGRN1+HY
 AL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P;miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22
 A18+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+RAPSN;miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A
 18+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A1
 8;RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;m
 iR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+S100P+RAPSN;miR-7+DY
 RK4+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+MGRN1+
 HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYAL2
 +SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+RAPSN;RPTOR+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S1
 00P+RAPSN;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18;DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P
 +RAPSN;miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN;miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S10
 0P;RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+RAPSN;miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSN;miR
 -7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P;miR-7+DYRK
 4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;miR-7+MGRN1+HYAL2
 +SLC22A18+S100P+RAPSN;DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FU
 T7+HYAL2+SLC22A18;RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+
 HYAL2+RAPSN;RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN;miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100P
 +RAPSN;RPTOR+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+R
 APSN;RPTOR+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100
 P;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18;FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RP
 TOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+S100P;RPTOR+FUT7+
 HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18+RAPSN;miR-7+DYRK4+MGR
 N1+HYAL2+S100P+RAPSN;miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+H
 YAL2+S100P;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2;miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RA
 PSN;RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSN;mi
 R-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+RAPSN;DYRK4+FUT
 7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+DYRK4+F
 UT7+MGRN1+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P;miR-7+DYRK4+FUT7+
 MGRN1+HYAL2+RAPSN;
 miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S1
 00P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+
 SLC22A18+RAPSN;miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+DYRK4+MGRN1+HYA
 L2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+DYRK4+
 FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+m
 iR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN;mi
 R-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+SLC22A18+S100P+
 RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S
 100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+M
 GRN1+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSN;RPTOR+FUT7+MGRN1+H
 YAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-
 7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;
 RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+
 RAPSN;RPTOR+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+H
 YAL2+SLC22A18;miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1
 +HYAL2+SLC22A18+RAPSN;RPTOR+miR-7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSN;RPTOR+miR-7+F

UT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSIN;DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN;miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+S100P+RAPSIN;

RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+SLC22A18+S100P+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+S100P+RAPSIN;miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P;RPTOR+miR-7+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN;RPTOR+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN;RPTOR+miR-7+DYRK4+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN;及び

RPTOR+miR-7+DYRK4+FUT7+MGRN1+HYAL2+SLC22A18+S100P+RAPSIN。

【 0 1 3 5 】

特定の実施形態においては、メチル化マーカーRPTOR、MGRN1及びRAPSINのメチル化状態及び／又は発現レベルが測定され、miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p及びmiR-148bの存在、特にその量が測定される。任意に、HYAL2のメチル化状態及び／又は発現レベルも測定される。

【 0 1 3 6 】

特定の実施形態においては、メチル化マーカーDYRK4、S100P、FUT7及びSLC22A18のメチル化状態及び／又は発現レベルが測定され、miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p及びmiR-148bの存在、特にその量が測定される。任意に、HYAL2のメチル化状態及び／又は発現レベルも測定される。

【 0 1 3 7 】

更なる実施形態においては、メチル化マーカーMGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSIN、S100P及びDYRK4のメチル化状態及び／又は発現レベルが測定され、miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p及びmiR-148bの存在が測定される。任意に、HYAL2のメチル化状態及び／又は発現レベルも測定される。

【 0 1 3 8 】

特定の実施形態においては、メチル化状態の測定は、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSIN、S100P及び／又はDYRK4遺伝子内の少なくとも1つのCpGサイトのメチル化の測定を含む。特に、上記遺伝子のプロモーター、イントロン及び／又はエキソン領域のメチル化状態が測定される。

【 0 1 3 9 】

特に、HYAL2遺伝子は、ヒト3番染色体に位置するヒトHYAL2遺伝子（Genbankのアクセッション番号：NC_000003.11 GI：224589815）である。特に、ヒト3番染色体上の位置50334760及び位置50335700の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。より具体的には、特にヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置50335694(cg27091787)、位置50335584(HYAL_CpG_1)、位置50335646(HYAL_CpG_2)若しくは位置50335671(HYAL_CpG_3)、位置50335166(HYAL-is-310 CpG_1)、位置50335180(HYAL-is-310 CpG_2)、位置50335192(HYAL-is-310 CpG_3)、位置50335195(HYAL-is-310 CpG_4)、位置50335227(HYAL-is-310 CpG_5)、位置50335233(HYAL-is-310 CpG_6)、位置50335300(HYAL-is-310 CpG_7)、位置50335315(HYAL-is-310 CpG_8)、位置50335375(HYAL-is-310 CpG_9)、位置50335392(HYAL-is-310 CpG_10)、位置50335401(HYAL-is-310 CpG_11)、位置50334744(HYAL2-is-325_CpG_1)、位置50334761(HYAL2-is-325_CpG_2)、位置50334804(HYAL2-is-325_CpG_3)、位置50334844(HYAL2-is-325_CpG_4)、位置50334853(HYAL2-is-325_CpG_5)、位置50334862(HYAL2-is-325_CpG_6)、位置50334880(HYAL2-is-325_CpG_7)、位置50334906(HYAL2-is-325_CpG_8)、位置50334913(HYAL2-is-325_CpG_9)、位置50334917(HYAL2-is-325_CpG_10)、位置50334928(HYAL2-is-325_CpG_11)、位置50334944(HYAL2-is-325_CpG_12)、位置50334956(HYAL2-is-325_CpG_13)、位置50334980(HYAL2-is-325_CpG_14)、位置50334982(HYAL2-is-325_CpG_15)、位置50335010(HYAL2-is-325_CpG_16)、位置50335014(HYAL2-is-325_CpG_17)、位置50331237(cg08776109)及び位置50330420(cg06721473)に位置するCpGサイトの

10

20

30

40

50

少なくとも1つのメチル化状態が測定される。

【0140】

最も具体的には、少なくとも1つのCpGサイトは、位置50335694のcg27091787、位置50335584のHYAL_CpG_1、位置50335646のHYAL_CpG_2、位置50335671のHYAL_CpG_3からなる群から選択される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるHYAL2プロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。例えば、HYAL2遺伝子は、build37/hg19においては3番染色体：位置50355221～50360337に位置しているが、build36/hg18においては3番染色体：位置50330244～50335146に位置している。

10

【0141】

特に、MGRN1遺伝子は、ヒト16番染色体に位置するヒトMGRN1遺伝子（Genbankアクセス番号：NC_000016.10、範囲：4624824～4690974、参照GRCh38プライマリアセンブリ；Genbankアクセス番号：NC_018927.2、範囲：4674882～4741756、オルタネイトアセンブリCHM1_1.1；Genbankアクセス番号：AC_000148.1、範囲：4641815～4707494、オルタネイトアセンブリHuRef）である。特に、ヒト16番染色体上の位置4654000及び位置4681000の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、1個以上のCpGサイトは、16番染色体の以下の領域：4670069～4670542、4654000～465500、4669000～4674000及び4678000～4681000の1つ以上に位置している。より具体的には、ヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置4670487(MGRN1_CpG_1)、位置4670481(MGRN1_CpG_2)、位置4670466(MGRN1_CpG_3)、位置4670459(MGRN1_CpG_4)、位置4670442(MGRN1_CpG_5)、位置4670440(MGRN1_CpG_6)、位置4670435(MGRN1_CpG_7)、位置4670433(MGRN1_CpG_8)、位置4670422(MGRN1_CpG_9)、位置4670414(MGRN1_CpG_10)、位置4670411(MGRN1_CpG_11)、位置4670402(MGRN1_CpG_12)、位置4670393(MGRN1_CpG_13)、位置4670357(MGRN1_CpG_14)、位置4670352(MGRN1_CpG_15)、位置4670343(MGRN1_CpG_16)、位置4670341(MGRN1_CpG_17)、位置4670336(MGRN1_CpG_18)、位置4670313(MGRN1_CpG_19)、位置4670310(MGRN1_CpG_20)、位置4670301(MGRN1_CpG_21)、位置4670292(MGRN1_CpG_22)、位置4670287(MGRN1_CpG_23)、位置4670281(MGRN1_CpG_24)、位置4670276(MGRN1_CpG_25)、位置4670264(MGRN1_CpG_26)、位置4670234(MGRN1_CpG_27)、位置4670211(MGRN1_CpG_28)、位置4670180(MGRN1_CpG_29)、位置4670174(MGRN1_CpG_30)、位置4670157(MGRN1_CpG_31)、位置4670137(MGRN1_CpG_32)、位置4670123(MGRN1_CpG_33)、位置4670117(MGRN1_CpG_34)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるMGRN1プロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

20

30

【0142】

特に、RPTOR遺伝子は、ヒト17番染色体に位置するヒトRPTOR遺伝子（Genbankアクセス番号：NC_000017.11、範囲：80544825～80966373、GRCh38プライマリアセンブリ；Genbankアクセス番号：NG_013034.1、範囲：5001～426549、RefSeq遺伝子；Genbankアクセス番号：NC_018928.2、範囲：78604958～79026514、オルタネイトアセンブリCHM1_1.1；Genbankアクセス番号：NG_013034.1；Genbankアクセス番号：AC_000149.1、範囲：73954508～74378467、オルタネイトアセンブリHuRef）である。特に、ヒト17番染色体上の位置76297000及び位置76416000の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、1個以上のCpGサイトが、17番染色体の以下の領域：76369937～76370536、76297000～76310000、76333000～76341000、76360000～76380000及び76411000～76416000の1つ以上に位置している。より具体的に、特にヒトゲノ

40

50

ムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置76370001(RPTOR_CpG_1)、位置76370037(RPTOR_CpG_2)、位置76370073(RPTOR_CpG_3)、位置76370092(RPTOR_CpG_4)、位置76370172(RPTOR_CpG_5)、位置76370199(RPTOR_CpG_6)、位置76370220(RPTOR_CpG_7)、位置76370253(RPTOR_CpG_8)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるRPTORプロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

10

【 0 1 4 3 】

特に、SLC22A18遺伝子は、ヒト11番染色体に位置するヒトSLC22A18遺伝子 (Genbankアクセッション番号: NC_000011.10、範囲: 2899721 ~ 2925246、参照GRCh38プライマリアセンブリ; Genbankアクセッション番号: NG_011512.1、範囲: 5001 ~ 30526、RefSeq遺伝子; Genbankアクセッション番号: NT_187585.1、範囲: 131932 ~ 157362、参照GRCh38 ALT_REF_LOCI_1; Genbankアクセッション番号: AC_000143.1、範囲: 2709509 ~ 2734907、オルタネイトアセンブリHuRef; Genbankアクセッション番号: NC_018922.2、範囲: 2919878 ~ 2945340、オルタネイトアセンブリCHM1_1.1) である。特に、ヒト11番染色体上の位置2876000及び位置2883000の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特にCpGサイトは、2877113 ~ 2877442に位置している。より具体的には、11番染色体: 2876000 ~ 11番染色体: 2883000にある7000 bpの癌関連、特にBC、OvaCa及び / 又はPaCA関連の特異的メチル化領域は、SLC22A18 (転写多様体) のプロモーター領域、CpGアイランド及び遺伝子本体領域の部分に及んでいる。より具体的に、特にヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置2877395(SLC22A18_CpG_1)、位置2877375(SLC22A18_CpG_2)、位置2877365(SLC22A18_CpG_3)、位置2877341(SLC22A18_CpG_4)、位置2877323(SLC22A18_CpG_5)、位置2877311(SLC22A18_CpG_6)、位置2877193(SLC22A18_CpG_7)、位置2877140(SLC22A18_CpG_8)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるSLC22A18プロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

20

30

【 0 1 4 4 】

特に、FUT7遺伝子は、ヒト9番染色体に位置するヒトFUT7遺伝子 (Genbankアクセッション番号: NC_000009.12、範囲: 137030174 ~ 137032840、参照GRCh38プライマリアセンブリ; Genbankアクセッション番号: NG_007527.1、範囲: 5001 ~ 7667、RefSeq遺伝子; Genbankアクセッション番号: AC_000141.1、範囲: 109383478 ~ 109386144、オルタネイトアセンブリHuRef; Genbankアクセッション番号: NC_018920.2、範囲: 140073389 ~ 140076055、オルタネイトアセンブリCHM1_1.1) である。特に、ヒト9番染色体上の位置139046000及び139048000の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。より具体的には、2000 bpのBC、OvaCa及び / 又はPaCA関連の特異的メチル化領域は、FUT7のプロモーター領域に位置している。特に、CpGサイトは、139047218 ~ 139047610、139046000 ~ 139048000及び139045065 ~ 139045817に位置している。より具体的に、特にヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置139047253(FUT_CpG_1)、位置139047314(FUT_CpG_2)、位置139047346(FUT_CpG_3)、位置139047427(FUT_CpG_4)、位置139047445(FUT_CpG_5)、位置139047467(FUT_CpG_6)、位置139047483(FUT_CpG_7)、位置139047566(FUT_CpG_8)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11

40

50

個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるFUT7プロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

【0145】

特に、RAPSN遺伝子は、ヒト11番染色体に位置するヒトRAPSN遺伝子（Genbankアクセッション番号：NC_000011.10、範囲：47437757～47449178、参照GRCh38プライマリアセンブリ；Genbankアクセッション番号：NG_008312.1、範囲：5001～16423、RefSeq遺伝子；Genbankアクセッション番号：NC_018922.2、範囲：47458570～47469991、オルタネイトアセンブリCHM1_1.1；Genbankアクセッション番号：AC_000143.1、範囲：47159075～47170494、オルタネイトアセンブリHuRef）である。特に、ヒト11番染色体上の位置47427500及び位置47428500の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。好ましくは、CpGサイトは、47427500～47428300に位置している。より具体的には、1000 bpの癌関連の、好ましくはBC、OvaCa及び／又はPaCA関連の特異的メチル化領域は、RAPSNのプロモーター領域に位置している。より具体的に、特にヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置47427787(RAPSN_CpG_1)、位置47427825(RAPSN_CpG_2)、位置47427883(RAPSN_CpG_3)、位置47427915(RAPSN_CpG_4)、位置47427930(RAPSN_CpG_5)、位置47427976(RAPSN_CpG_6)、位置47428029(RAPSN_CpG_7)、位置47428110(RAPSN_CpG_8)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるRAPSNプロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

【0146】

特に、S100P遺伝子は、ヒト4番染色体に位置するヒトS100P遺伝子（Genbankアクセッション番号：NC_000004.12、範囲：6693839～6697170、参照GRCh38プライマリアセンブリ；Genbankアクセッション番号：AC_000136.1、範囲：6627254～6630595、オルタネイトアセンブリHuRef；Genbankアクセッション番号：NC_018915.2、範囲：6693944～6697285、オルタネイトアセンブリCHM1_1.1）である。特に、ヒト4番染色体上の位置6746000及び位置6747000の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。より具体的には、1000 bpの癌関連の（好ましくはBC、OvaCa及び／又はPaCA関連の）特異的メチル化領域は、S100Pのプロモーター領域からS100Pの第1のエキソンまでに位置している。特にCpGサイトは、6746537～6746823に位置している。より具体的に、特にヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置6746565(S100P_CpG_1)、位置6746599(S100P_CpG_2)、位置6746609(S100P_CpG_3)、位置6746616(S100P_CpG_4)、位置6746623(S100P_CpG_5)、位置6746634(S100P_CpG_6)、位置6746710(S100P_CpG_7)、位置6746728(S100P_CpG_8)、位置6746753(S100P_CpG_9)、位置6746779(S100P_CpG_10)、位置6746788(S100P_CpG_11)、位置6746791(S100P_CpG_12)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるS100Pプロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

【0147】

特に、DYRK4遺伝子は、ヒト12番染色体に位置するヒトDYRK4遺伝子（Genbankアクセッション番号：NC_000012.12、範囲：4590072～4613888、参照GRCh38プライマリアセンブリ；Genbankアクセッション番号：AC_000144.1、範囲：4555932～4579747、オルタネイトアセンブリHuRef；Genbankアクセッション番号：NC_018923.2、範囲：4698860～4722666、

オルタネイトアセンブリCHM1_1.1)である。特に、ヒト12番染色体上の位置4569000及び位置4571000の間に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。より具体的には、2000 bpの癌関連の、好ましくはBC、OvaCa及び/又はPaCa関連の特異的メチル化領域は、DYRK4のプロモーター領域に位置している。特にCpGサイトは、4569448~4569945に位置している。より具体的に、特にヒトゲノムのbuild 36.1/hg18を参照して、位置4569879(DYRK4_CpG_1)、4569809(DYRK4_CpG_2)、4569707(DYRK4_CpG_3)、4569493(DYRK4_CpG_4)に位置するCpGサイトの少なくとも1つのメチル化状態が測定される。特に、本発明の少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個の、少なくとも11個の、少なくとも12個の、又は少なくとも15個のCpGサイトのメチル化状態が測定される。当業者によれば、上記CpGサイトの正確な番号付けは、特定のゲノム配列及び分析されるべき試料中に含まれるDYRK4プロモーター領域の特定の配列に依存し得ることが理解される。

10

【0148】

更なる実施形態においては、癌の予後判定及び/又は診断の方法は、上記被験体における少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量を、1つ以上の参照における少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量と比較する工程を更に含む。特に、参照は、閾値、参照値又は参照試料である。

【0149】

20

参照が閾値である実施形態においては、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種(at least one)のメチル化マーカーのメチル化状態であって、その閾値を下回るメチル化状態は、被験体が癌に罹っていること、癌発症のリスクが高まっていること、又は該疾患が悪化していることの指標であるが、その閾値と等しい又はそれを上回るメチル化状態は、被験体が癌に罹っていないこと、癌発症のリスクが低下していること、又は該疾患が好転していることの指標である。上述のレベルは、測定の統計及び誤差のため変動し得るものと理解されるべきである。

【0150】

参照が閾値である実施形態においては、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルであって、その閾値と等しい又はそれを上回る発現レベルは、被験体が癌に罹っていること、癌発症のリスクが高まっていること、又は該疾患が悪化していることの指標であるが、その閾値を下回る発現レベルは、被験体が癌に罹っていないこと、癌発症のリスクが低下していること、又は該疾患が好転していることの指標である。上述のレベルは、測定の統計及び誤差のため変動し得るものと理解されるべきである。

30

【0151】

参照が閾値である実施形態においては、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量であって、その閾値と等しい又はそれを上回る量は、被験体が癌に罹っていること、癌発症のリスクが高まっていること、又は該疾患が悪化していることの指標であるが、その閾値を下回る量は、被験体が癌に罹っていないこと、癌発症のリスクが低下していること、又は該疾患が好転していることの指標である。上述の量は、測定の統計及び誤差のため変動し得るものと理解されるべきである。

40

【0152】

特定の実施形態においては、被験体が癌に罹っていること、癌発症のリスクが高まっていること、又は該疾患が悪化していることについての閾値は、HYAL2の場合に、対照の90%未満のメチル化状態及び対照よりも1.2倍超高い発現レベルである。特定の実施形態においては、MGRN1の場合の閾値は、対照の90%未満のメチル化状態である。特定の実施形態においては、RPTORの場合の閾値は、対照の95%未満のメチル化状態である。特定の実施形態

50

においては、SLC22A18の場合の閾値は、対照の95%未満のメチル化状態及び対照よりも1.1倍超高い発現レベルである。特定の実施形態においては、FUT7の場合の閾値は、対照の92%未満のメチル化状態である。特定の実施形態においては、RAPSNの場合の閾値は、対照の98%未満のメチル化状態である。特定の実施形態においては、S100Pの場合の閾値は、対照の90%未満のメチル化状態及び対照よりも2倍超高い発現レベルである。特定の実施形態においては、DYRK4の場合の閾値は、対照の85%未満のメチル化状態である。

【0153】

特定の実施形態においては、miR-652の場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.5 Ct値小さい（又は対照よりも1.4倍超高い）量である。特定の実施形態においては、miR-801の場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.6 Ct値小さい（又は対照よりも1.5倍超高い）量である。特定の実施形態においては、miR-376cの場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.5 Ct値小さい（又は対照よりも1.4倍超高い）量である。特定の実施形態においては、miR-376aの場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.6 Ct値小さい（又は対照よりも1.5倍超高い）量である。特定の実施形態においては、miR-127の場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.5 Ct値小さい（又は対照よりも1.4倍超高い）量である。特定の実施形態においては、miR-409の場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.4 Ct値小さい（又は対照よりも1.3倍超高い）量である。特定の実施形態においては、miR-148bの場合の閾値レベルは、対照よりも少なくとも0.3 Ct値小さい（又は対照よりも1.2倍超高い）量である。

【0154】

参照が参照値である実施形態においては、上記参照値は、癌の不存在、癌の存在、又は癌の発症のリスクの増加若しくは低下の代表的な値である。

【0155】

更なる実施形態においては、参照試料は、健康な個体から得られる参照試料、罹患した個体から得られる参照試料、対象となる試料と同じ個体から得られるより早い時点若しくはより遅い時点に採取される参照試料、及び健康な個体について代表的な参照試料、又は癌の存在若しくは不存在について代表的な参照試料、又は癌の発症のリスクの増加若しくは低下について代表的な参照試料からなる群から選択される。

【0156】

参照が健康な被験体又は癌の発症のリスクの低下を伴う被験体又は癌の不存在を表すメチル化マーカーのメチル化状態又はmiRNAの量である実施形態においては、参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化レベルの低下及び／又は発現の増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在又は量の増加は、被験体における、

- i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
 - ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
 - iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、
- を示すものである。

【0157】

参照が罹患した被験体又は癌の発症のリスクの増加を伴う被験体又は癌の存在を表すメチル化マーカーのメチル化状態又はmiRNAの量である実施形態においては、少なくとも1種のメチル化マーカーの同様のメチル化状態又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの同様の量は、被験体における、

- i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
 - ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
 - iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、
- を示すものである。

【0158】

参照試料が、対象となる試料と同じ被験体から得られ、より早い時点で採取されたものである実施形態においては、

- (i) 参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化の低下及び／又は発

現の増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在若しくは量の増加は、被験体における、

- i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
- ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
- iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、

を示すものであり、

(ii) 参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化の増加及び／又はより低い発現、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの不存在若しくは量の減少は、被験体における、

- i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスクの低下、
- ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの不存在、及び／又は、
- iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行の下落、

を示すものであり、

及び／又は、

(iii) 参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化及び／又は発現の同等のレベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの同等の量は、被験体における、

- i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症の同等のリスク、
- ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行の停滞、及び／又は、
- iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの持続、

を示すものである。

【0159】

特定の実施形態においては、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が測定される。特に、対照よりも少なくとも0.5 Ct値小さい（又は対照よりも1.4倍超高い）量のmiR-652は癌の指標である。特定の実施形態においては、対照よりも少なくとも0.6 Ct値小さい（又は対照よりも1.5倍超高い）量のmiR-801は癌の指標である。特定の実施形態においては、対照よりも少なくとも0.5 Ct値小さい（又は対照よりも1.4倍超高い）量のmiR-376cは癌の指標である。特定の実施形態においては、対照よりも少なくとも0.6 Ct値小さい（又は対照よりも1.5倍超高い）量のmiR-376aは癌の指標である。特定の実施形態においては、対照よりも少なくとも0.5 Ct値小さい（又は対照よりも1.4倍超高い）量のmiR-127は癌の指標である。特定の実施形態においては、対照よりも少なくとも0.4 Ct値小さい（又は対照よりも1.3倍超高い）量のmiR-409は癌の指標である。特定の実施形態においては、対照よりも少なくとも0.3 Ct値小さい（又は対照よりも1.2倍超高い）量のmiR-148bは癌の指標である。

【0160】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。更なる実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。特定の実施形態においては、体液は血液である。

【0161】

更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

【0162】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。特に、被験体は、実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒト

からなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

【0163】

第2の態様では、本発明は、被験体における癌の変化又は癌の予防若しくは癌の治療のための医薬品の投与量を決定する方法であって、

(a) 被験体の試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(b) 医薬品の投与量を、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量に応じて決定する工程と、

を含む、方法に関する。

10

【0164】

特定の実施形態においては、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPS N、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、参照において測定され、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量と比較される。

【0165】

特定の実施形態においては、医薬品の投与量は、対象となる試料及び参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の比較に応じて決定される。

20

【0166】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。特定の実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。特定の実施形態においては、体液は血液である。

【0167】

更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

30

【0168】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。好ましくは、被験体は、実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒトからなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

【0169】

第3の態様では、本発明は、癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合する方法であって、

(a) 試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPS N、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

40

50

(c) 試験される試料を、上記対象となる試料中に存在する少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、

(d) 医薬品の投与量を、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかに応じて適合させる工程と、を含む、方法に関する。

【0170】

特定の実施形態においては、医薬品の投与量は、

a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

b) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし減少している場合に、

d) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して増加している場合に、

e) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

f) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし増加している場合に、

g) 少なくとも1種のmiRNAの量が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して増加している場合に、

h) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

i) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等又は増加している場合に、増大される。

【0171】

特定の実施形態においては、医薬品の投与量は、

a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

b) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし減少している場合に、

d) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、

e) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比

10

20

30

40

50

較して減少している場合に、

f) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して減少している場合に、

g) 少なくとも1種のmiRNAの量が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、

h) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

i) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して減少している場合に、減少される。

10

【0172】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。特定の実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。特定の実施形態においては、体液試料は血液試料である。

【0173】

更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

20

【0174】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。特に、被験体は、実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒトからなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

【0175】

30

第4の態様では、本発明は、癌又は癌の発症に対する物質の有益な効果及び／又は不利な効果を測定する方法であって、

(a) 試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPS N、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

40

(c) 対象となる試料を、上記対象となる試料中に存在する少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、

を含み、ここで対象となる試料が、上記物質に1つ以上の参照又は参照試料とは異なるように曝露されたものである、方法に関する。

【0176】

特定の実施形態においては、対象となる試料は、時間及び／又は濃度に関して異なるように上記物質に曝露される。このように、対象となる試料は、より長い若しくはより短い時間にわたって、及び／又は上記物質のより高い若しくはより低い濃度で上記物質に曝露

50

することができる。

【0177】

対象となる試料が、より高い濃度で及び／又はより長い時間にわたって曝露される実施形態においては、物質の不利な効果は、

- a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、
 - b) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、
 - c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし減少している場合に、
 - d) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して増加している場合に、
 - e) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、
 - f) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし増加している場合に、
 - g) 少なくとも1種のmiRNAの量が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して増加している場合に、
 - h) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、
 - i) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等又は増加している場合に、
- 測定される。

【0178】

対象となる試料が、より高い濃度で及び／又はより長い時間にわたって曝露される実施形態においては、物質の有益な効果は、

- a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、
- b) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、
- c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし減少している場合に、
- d) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、
- e) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、
- f) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して減少している場合に、
- g) 少なくとも1種のmiRNAの量が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は減

少ししている場合に、

h) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

i) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して減少している場合に、測定される。

【0179】

対象となる試料が、より低い濃度で及び/又はより短い時間にわたって曝露される実施形態においては、物質の無効果又は不利な効果は、

a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

b) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、

c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし減少している場合に、

d) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して増加している場合に、

e) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

f) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし増加している場合に、

g) 少なくとも1種のmiRNAの量が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して増加している場合に、

h) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

i) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等又は増加している場合に、測定される。

【0180】

対象となる試料が、より低い濃度で及び/又はより短い時間にわたって曝露される実施形態においては、物質の有益な効果は、

a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は増加している場合に、

b) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して同等ないし減少している場合に、

d) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、

e) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、疾患の存在若しくは疾患の発症の

10

20

30

40

50

リスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

f) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルが、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して減少している場合に、

g) 少なくとも1種のmiRNAの量が、疾患の不存在若しくは疾患の発症のリスクの低下を示す参照、又は健康な被験体若しくは該疾患の不存在を表す参照試料と比較して同等又は減少している場合に、

h) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、疾患の存在若しくは疾患の発症のリスクの増加を示す参照、又は罹患した被験体若しくは該疾患の存在を表す参照試料と比較して減少している場合に、

i) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記被験体からより早い時点で得られた参照試料と比較して減少している場合に、測定される。

【0181】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び/又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。特定の実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。特定の実施形態においては、体液試料は血液試料である。

【0182】

更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び/又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び/又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

【0183】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。特に、被験体は、実験動物(例えばマウス又はラット)、家畜(例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む)又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒトからなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

【0184】

第5の態様では、本発明は、癌治療に対する応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて被験体から採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の増加及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、方法に関する。

【0185】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び/又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。特定の実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。特定の実施形態においては、体液試料は血液試料である。

【0186】

更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び/又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物

10

20

30

40

50

である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

【0187】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。特に、被験体は、実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒトからなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

【0188】

第6の態様では、本発明は、癌治療に対する非応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、方法に関する。

【0189】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。特定の実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

【0190】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。特に、被験体は、実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒトからなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

【0191】

第7の態様においては、本発明は、癌の治療方法であって、
(i) 被験体の第1の試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程、
(ii) 1種以上の抗癌剤又は療法を含む第1の治療レジメンで上記被験体の治療を開始する工程、
(iii) 上記被験体の引き続き採取された1つ以上の第2の試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、
(iv) 任意に、工程(ii)及び(iii)を1回以上繰り返す工程、
(v) 少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の本質的な増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量の減少若しくは不存在が見られる場合に、該被験体の第1の治療レジメンによる治療を継続する工程、又は、

(vi) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の増加若しくは存在が見られる場合に、該被験体の第1の治療レジメンによる治療を修正するか、又は停止し、そしてその代わりに該被験体を、第1の治療レジメンに含まれない1種以上の抗癌剤若しくは療法を含む第2の治療レジメンで治療する工程、を含む、方法に関する。

【0192】

特定の実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、体液試料又は組織試料である。特定の実施形態においては、体液試料は、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、リンパ液、涙液及び、例えば乳腺又は前立腺のような腺から得ることができる流体からなる群から選択される。特定の実施形態においては、体液試料は血液試料である。

10

【0193】

更なる実施形態においては、組織試料は、腫瘍組織又は腫瘍に隣接する組織から得られる組織抽出物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、細胞培養物又は組織培養物、例えば限定されるものではないが、様々な癌細胞の培養物である。更なる実施形態においては、対象となる試料及び／又は参照試料は、上記細胞培養物又は組織培養物から得られた培地である。

【0194】

特定の実施形態においては、被験体は、哺乳類、爬虫類又は鳥類である。特に、被験体は、実験動物（例えばマウス又はラット）、家畜（例えば、モルモット、ウサギ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ、ラクダ、ネコ、イヌ、ウミガメ、リクガメ、ヘビ又はトカゲを含む）又はチンパンジー、ボノボ及びゴリラを含む霊長類並びにヒトからなる群から選択される。ヒトが特に好ましい。

20

【0195】

特定の実施形態においては、治療計画は、化学療法、抗ホルモン療法、免疫療法及び放射線療法からなる群から選択される。

【0196】

第8の態様では、本発明は、

- i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
- ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
- iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、

30

の予後判定及び／又は診断のための手段であって、

c) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを検出する1つ以上の手段と、

d) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の検出のための1つ以上の手段と、を含む、手段に関する。

【0197】

特定の実施形態においては、上記手段は、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを検出する。

40

【0198】

更なる実施形態においては、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の検出のための1つ以上の手段は、少なくとも1種のメチル化特異的ポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態においては、メチル化特異的ポリヌクレオチドは、メチル化特異的プライマー及び／又はメチル化特異的プローブである。

【0199】

更なる実施形態においては、少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルを検出するための1つ以上の手段は、結合部分を含む。上記結合部分は、特にポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質又はアプタマーである。更なる実施形態においては、該結合部分は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、Fabフラグメント、Fcフラグメント、Fab'

50

フラグメント、F(ab')₂フラグメント、シングルドメイン抗体 (sdAb)、ナノボディ、単鎖Fv (scFv)、二価の単鎖可変フラグメント (di-scFv)、タンデムscFv、ダイアボディ、トリアボディ、二重特異性ダイアボディ、単鎖ダイアボディ (scDb)、二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) 及び「DART」分子からなる群から選択される。

【0200】

特定の実施形態においては、結合部分は、メチル化マーカーの遺伝子産物の一部に結合する。したがって、結合部分がポリヌクレオチドである実施形態においては、該ポリヌクレオチドは、それぞれのメチル化マーカーの遺伝子、すなわちHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P又はDYRK4の遺伝子から転写されるmRNAに結合する。

【0201】

結合部分がペプチド、タンパク質又はアプタマーである実施形態においては、該ペプチド、タンパク質又はアプタマーは、それぞれのメチル化マーカーの遺伝子、すなわちHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P又はDYRK4の遺伝子から翻訳されるタンパク質の一部、特にエピトープに結合する。

【0202】

特定の実施形態においては、上記手段は、先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーを検出する。

【0203】

更なる実施形態においては、少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の検出のための1つ以上の手段は、少なくとも1種のmiRNA特異的ポリヌクレオチドを含む。

【0204】

特定の実施形態においては、上記少なくとも1種のmiRNA特異的ポリヌクレオチドは、配列番号1～13による配列を有する。

【0205】

特定の実施形態においては、上記手段は、先に詳細に指定された方法において使用される。特に、上記手段は、

(i) 被験体における癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの予後判定及び/又は診断の方法であって、被験体において、(a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベルを測定することと、(b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量を測定することとを含み、ここで、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの存在が、上記被験体の予後及び/又は診断の指標である、方法、

(ii) 被験体における癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を決定する方法であって、(a) 被験体の試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、そして任意に、参照における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量と比較する工程と、(b) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量に応じて、任意に、対象となる試料及び参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の比較に応じて、医薬品の投与量を決定する工程とを含む、方法、

(iii) 癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合する方法であ

10

20

30

40

50

って、(a) 試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(c) 試験される試料を、対象となる上記試料中に存在する、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、(d) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかに応じて医薬品の投与量を適合する工程とを含む、方法、

(iv) 或る物質の癌又は癌の発症に対する有益な及び/又は不利な効果を測定する方法であって、(a) 対象となる試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(c) 対象となる試料を、その対象となる試料中に存在する、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程とを含み、ここで該対象となる試料が、上記物質に1つ以上の参照又は参照試料とは異なるように曝露されたものである、方法、

(v) 癌治療に対する応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の増加及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、方法、

(vi) 癌治療に対する非応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の減少及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、方法、

(vii) 癌の治療方法であって、(i) 被験体の第1の試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程、(ii) 1種以上の抗癌剤又は療法を含む第1の治療レジメンで上記患者の治療を開始する工程、(i

10

20

30

40

50

ii) 上記被験体の引き続き採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、(iv) 任意に、工程(ii)及び(iii)を1回以上繰り返す工程、(v) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の本質的な増加及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の減少若しくは不存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を継続する工程、又は(vi) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の増加若しくは存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を修正するか、又は停止し、そしてその代わりに該患者を、第1の治療レジメンに含まれない1種以上の抗癌剤若しくは療法を含む第2の治療レジメンで治療する工程を含む、方法、
からなる群から選択される方法において使用される。

10

【0206】

第9の態様においては、本発明は、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量を検出するための上記指定の手段を含むキットに関する。

20

【0207】

特定の実施形態においては、上記キットは、
(a) 容器、及び/又は、
(b) データ記憶媒体、
を更に含み、ここで、該データ記憶媒体は、情報、例えば、
(i) 癌の発症についてのリスクを特定する、及び/又は癌の存在を特定する、及び/又は癌の進行を監視するための方法に関する説明、
(ii) 特に試料における、より具体的には個体からの試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出する手段の使用、及び/又はキットの使用のための説明、
(iii) 品質情報、例えば少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出する手段、及び/又はキットのロット/バッチ番号、製造場所若しくは集成場所又は有効期限若しくは品質保持期限についての情報、該キットの正しい貯蔵若しくは取扱いに関する情報、
(iv) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出するための1種以上のバッファー、1種以上の希釈剤、1種以上の試薬の組成、及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出するための手段に関する情報、
(v) 癌の進行を特定及び/又は監視する上述の方法を実施した時に得られる情報の解釈に関する情報、
(vi) 不適切な方法及び/又は不適切な手段を適用した場合の考えられる誤解又は誤った結果に関する警告、及び/又は、
(vii) 1種以上の不適切な試薬及び/又は1種以上のバッファーを使用した場合の考えられる誤解又は誤った結果に関する警告、
を含む。

30

40

【0208】

特定の実施形態においては、上記キット(kit)は、先に詳細に指定された方法において使用される。特に、上記キットは、
(i) 被験体における癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCaの予後判定及び/又は診断の方法

50

であって、被験体において、(a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベルを測定することと、(b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの存在、特にその量を測定することとを含み、ここで、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの存在が、上記被験体の予後及び/又は診断の指標である、方法、

(ii) 被験体における癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を決定する方法であって、(a) 被験体の試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定し、そして任意に、参照における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定し、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量と比較する工程と、(b) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量に応じて、任意に、対象となる試料及び参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量の比較に応じて、医薬品の投与量を決定する工程とを含む、方法、

(iii) 癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合する方法であって、(a) 試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(c) 試験される試料を、対象となる上記試料中に存在する、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、(d) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかに応じて医薬品の投与量を適合する工程とを含む、方法、

(iv) 或る物質の癌又は癌の発症に対する有益な及び/又は不利な効果を測定する方法であって、(a) 対象となる試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、(c) 対象となる試料を、その対象となる試料中に存在する、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程とを含み、ここで該対象となる試料が、上記物質に1つ以上の参照又は参照試料とは異なるように曝露されたものである、方法、

(v) 癌治療に対する応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYA

10

20

30

40

50

L2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、方法、

(vi) 癌治療に対する非応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、方法、

(vii) 癌の治療方法であって、(i) 被験体の第1の試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程、(ii) 1種以上の抗癌剤又は療法を含む第1の治療レジメンで上記患者の治療を開始する工程、(iii) 上記被験体の引き続き採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、(iv) 任意に、工程(ii)及び(iii)を1回以上繰り返す工程、(v) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の本質的な増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の減少若しくは不存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を継続する工程、又は(vi) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の増加若しくは存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を修正するか、又は停止し、そしてその代わりに該患者を、第1の治療レジメンに含まれない1種以上の抗癌剤若しくは療法を含む第2の治療レジメンで治療する工程を含む、方法、
からなる群から選択される方法において使用される。

【0209】

第10の態様においては、本発明は、

i. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
ii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
iii. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、
の予後判定及び／又は診断のための、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量を検出するための手段、又は先に詳細に指定された上記手段を含むキットの使用に関する。

【0210】

特定の実施形態においては、上記手段及び／又は上記キットの使用は、先に詳細に指定された方法の1つにおける使用、特に、

(i) 被験体における癌、好ましくはBC、OvaCa及び／又はPaCAの予後判定及び／又は診断

10

20

30

40

50

の方法であって、被験体において、(a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベルを測定することと、(b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、特にその量を測定することとを含み、ここで、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの存在が、上記被験体の予後及び/又は診断の指標である、方法、

(ii) 被験体における癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を決定する方法であって、(a) 被験体の試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、そして任意に、参照における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量と比較する工程と、(b) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量に応じて、任意に、対象となる試料及び参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の比較に応じて、医薬品の投与量を決定する工程とを含む、方法、

(iii) 癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合する方法であって、(a) 試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、(c) 試験される試料を、対象となる上記試料中に存在する、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、(d) 対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかに応じて医薬品の投与量を適合する工程とを含む、方法、

(iv) 或る物質の癌又は癌の発症に対する有益な及び/又は不利な効果を測定する方法であって、(a) 対象となる試料における、先に詳細に指定された、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに先に詳細に指定された、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、(c) 対象となる試料を、その対象となる試料中に存在する、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、上記1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程とを含み、ここで該対象となる試料が、上記物質に1つ以上の参照又は参照試料とは異なるように曝露されたものである、方法、

(v) 癌治療に対する応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYA

10

20

30

40

50

L2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、方法、

(vi) 癌治療に対する非応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、方法、

(vii) 癌の治療方法であって、(i) 被験体の第1の試料における、先に詳細に指定されたHYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに先に詳細に指定されたmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程、(ii) 1種以上の抗癌剤又は療法を含む第1の治療レジメンで上記患者の治療を開始する工程、(iii) 上記被験体の引き続き採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、(iv) 任意に、工程(ii)及び(iii)を1回以上繰り返す工程、(v) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の本質的な増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の減少若しくは不存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を継続する工程、又は(vi) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の増加若しくは存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を修正するか、又は停止し、そしてその代わりに該患者を、第1の治療レジメンに含まれない1種以上の抗癌剤若しくは療法を含む第2の治療レジメンで治療する工程を含む、方法、
からなる群から選択される方法における使用である。

【0211】

第11の態様では、本発明は、癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの特定のための装置であって、

(a) 被験体の試料における、

(i) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベルを測定するための検出剤と、

(ii) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p及びmiR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAの存在を測定するための検出剤と、を含む分析ユニットと、

(b) 分析ユニットによって測定された量と参照との比較を実施するためのアルゴリズムが有形に組み込まれたデータプロセッサを含み、かつ上記比較に基づいて確立された診断を含む出力ファイルを生成することができる評価ユニットと、
を備える、装置に関する。

【0212】

10

20

30

40

50

特定の実施形態においては、上記検出剤は、先に詳細に指定された手段である。

【0213】

特定の装置は、専門の臨床医の特定の知識を要することなく適用することができる装置、例えば試料をロードすることだけが必要とされる試験条片又は電子素子である。それらの結果は、パラメトリック診断的生データの、特に絶対量又は相対量としての出力として与えることができる。これらのデータは、臨床医による解釈を必要とするであろうことが理解されるべきである。しかしながらまた、出力が処理された診断的生データを含み、その解釈には専門の臨床医が必要とされないエキスパートシステム装置も考えられる。更なる好ましい装置は、分析ユニット/装置（例えば、バイオセンサ、アレイ、本発明のmiRNAを特異的に認識するリガンドに結合された固体担持体、プラズモン表面共鳴装置、NMR分析計、質量分析計等）又は評価ユニット/装置を含む。

10

【0214】

本発明の更なる態様は、以下の通りである。

【0215】

1. 被験体における、癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの予後判定及び/又は診断の方法であって、
被験体において、

a) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベルを測定する工程と、

20

b) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在、好ましくはその量を測定する工程と、
を含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの存在が、上記被験体の予後及び/又は診断の指標である、方法。

【0216】

2. 癌の予後及び/又は診断には、

i. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの発症のリスク、

ii. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの存在、及び/又は、

30

iii. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの進行、好ましくは悪化若しくは好転、
が含まれる、態様1に記載の方法。

【0217】

3. a) 少なくとも2種、3種、4種、5種、6種又は7種の異なるメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベルを測定し、及び/又は、

b) 少なくとも2種、3種、4種、5種、6種又は7種の異なるmiRNAマーカーの存在を測定する、態様1又は2に記載の方法。

【0218】

4. a) メチル化マーカーMGRN1、RPTOR及びRAPSN並びに任意にHYAL2のメチル化状態及び/又は発現レベルを測定し、及び/又は、

40

b) miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの存在を測定する、態様1～3のいずれか一つに記載の方法。

【0219】

5. a) メチル化マーカーSLC22A18、FUT7、S100P及びDYRK4並びに任意にHYAL2のメチル化状態及び/又は発現レベルを測定し、及び/又は、

b) miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの存在を測定する、態様1～3のいずれか一つに記載の方法。

【0220】

6. a) メチル化マーカーMGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4並びに任意にHYAL2のメチル化状態及び/又は発現レベルを測定し、及び/又は、

50

b) miRNAマーカーmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの存在を測定する、態様1~4のいずれか一つに記載の方法。

【0221】

7. メチル化状態の測定が、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4遺伝子内、特に上記遺伝子のプロモーター領域、イントロン領域又はエキソン領域内の少なくとも1つのCpGサイトのメチル化を測定することを含む、態様1~7のいずれか一つに記載の方法。

【0222】

8. 少なくとも1つのCpGサイトが、S100P中のcg22266967、SLC22A18中のcg21019522、DYRK4中のcg09418321及びFUT7中のcg0279745、RPTOR中のcg06418238、MGRN1中のcg00736299、MGRN1中のcg01662869、RAPSN中のcg27466532、HYAL2中のcg27091787からなる群から選択される、態様7に記載の方法。

【0223】

9. c) 上記被験体における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在と、1つ以上の参照における少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び少なくとも1種のmiRNAマーカーの量とを比較する工程を更に含む、態様1~8のいずれか一つに記載の方法。

【0224】

10. 参照が、閾値、参照値又は参照試料である、態様9に記載の方法。

【0225】

11. 参照試料が、健康な個体、罹患した個体若しくは試験される個体と同じであるがより早い時点若しくはより遅い時点での個体、又は癌の不存在、癌の存在における代表的な値、又は癌の発症のリスクの増加若しくは低下についての代表的な値からなる群から選択される、態様10に記載の方法。

【0226】

12. 参照試料が、健康な個体から得られる参照試料、罹患した個体から得られる参照試料、対象となる試料と同じ個体からより早い時点又はより遅い時点に採取することで得られる参照試料、及び健康な個体について代表的な参照試料、又は癌の存在若しくは不存在について代表的な参照試料、又は癌の発症のリスクの増加若しくは低下について代表的な参照試料からなる群から選択される、態様10又は11に記載の方法。

【0227】

13. 参照が、健康な被験体又は癌の発症のリスクの低下を伴う被験体又は癌の不存在を表すメチル化状態又はmiRNAの量であり、ここで、参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化の低下及び/又は過剰発現、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在又は量の増加は、被験体における、

iv. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの発症のリスク、

v. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの存在、及び/又は、

vi. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの進行、

を示すものである、態様10~12のいずれか一つに記載の方法。

【0228】

14. 参照が、罹患した個体又は癌の発症のリスクの増加を伴う個体又は癌の存在を表す値であり、ここで、少なくとも1種のメチル化マーカーの同様のメチル化状態又は発現、及び少なくとも1種のmiRNAマーカーの同様の量は、該被験体における、

iv. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの発症のリスク、

v. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの存在、及び/又は、

vi. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの進行、

を示すものである、態様10~12のいずれか一つに記載の方法。

【0229】

15. 参照試料が、対象となる試料と同じ個体から得られ、より早い時点で採取されたものであり、

(ii) 参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化の低下及び／又は過剰発現、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの存在若しくは量の増加は、被験体における、

- iv. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスク、
 - v. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの存在、及び／又は、
 - vi. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行、
- を示すものであり、

(ii) 参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化の増加及び／又はより低い発現、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの不存在若しくは量の減少は、被験体における、

- iv. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症のリスクの低下、
 - v. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの不存在、及び／又は、
 - vi. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行の下落、
- を示すものであり、及び／又は、

(iii) 参照と比較した、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化及び／又は発現の同等のレベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの同等の量は、被験体における、

- iv. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの発症の同等のリスク、
 - v. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの進行の停滞、及び／又は、
 - vi. 癌、特にBC、OvaCa及び／又はPaCAの持続、
- を示すものである、態様10～12のいずれか一つに記載の方法。

【0230】

16. 被験体における癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を決定する方法であって、

(a) 被験体の試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、任意に、参照における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定し、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量と比較する工程と、

(b) 医薬品の投与量を、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量に応じて、任意に、対象となる試料及び参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の比較に応じて決定する工程と、

を含む、方法。

【0231】

17. 癌の変化又は癌の予防若しくは治療のための医薬品の投与量を適合する方法であって、

(a) 試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を測定する工程と、

(c) 試験される試料を、上記対象となる試料中に存在する少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と

、
(d) 医薬品の投与量を、対象となる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかに応じて適合させる工程と、を含む、方法。

【0232】

18. 癌又は癌の発症に対する物質の有益な効果及び／又は不利な効果を測定する方法であって、

(a) 対象となる試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、

(b) 1つ以上の参照又は参照試料における、少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、

(c) 対象となる試料を、上記対象となる試料中に存在する少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの量が、1つ以上の参照又は参照試料におけるレベルと異なるかどうかについて試験する工程と、

を含み、ここで対象となる試料が、上記物質に1つ以上の参照又は参照試料とは異なるように曝露されたものである、方法。

【0233】

19. 癌治療に対する応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の増加及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの不存在又は量の減少が、治療に対する応答を示す、方法。

【0234】

20. 癌治療に対する非応答者としての患者を特定する方法であって、第1の試料及び該第1の試料に引き続いて採取された1つ以上の更なる試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定することを含み、ここで少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態の減少及び／又は少なくとも1種のメチル化マーカの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカの存在又は量の増加が、治療に対する応答の欠如を示す、方法。

【0235】

21. 癌の治療法であって、

(i) 被験体の第1の試料における、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカのメチル化状態及び／又は発現レベル、並びにmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409、miR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAマーカの量を測定する工程と、

(ii) 1種以上の抗癌剤又は療法を含む第1の治療レジメンで上記患者の治療を開始する工程と、

10

20

30

40

50

(iii) 上記被験体の引き続き採取された1つ以上の更なる試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAの量を測定する工程、
(iv) 任意に、工程(ii)及び(iii)を1回以上繰り返す工程、
(v) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の本質的な増加及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーのより低い発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の減少若しくは不存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を継続する工程、或いは、
(vi) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の減少及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの増加、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の増加若しくは存在が見られる場合に、該患者の第1の治療レジメンによる治療を修正するか、又は停止し、そしてその代わりに該患者を、第1の治療レジメンに含まれない1種以上の抗癌剤若しくは療法を含む第2の治療レジメンで治療する工程、を含む、方法。

10

【0236】

22. 対象となる試料が、組織試料及び/又は体液試料である、態様1~21のいずれか一つに記載の方法。

【0237】

23. 組織試料が、腫瘍試料であり、及び/又は体液試料が、血液、血漿、血清、尿、唾液、涙液及び乳腺から得ることができる流体からなる群から選択される、態様22に記載の方法。

20

【0238】

24. iv. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの発症のリスク、
v. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの存在、及び/又は、
vi. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの進行、
の予後判定及び/又は診断のための手段であって、
a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベルを検出する1つ以上の手段と、
b) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の検出のための1つ以上の手段と、
を含む、手段。

30

【0239】

25. a) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態の検出のための1つ以上の手段が、少なくとも1種のメチル化特異的ポリヌクレオチドを含み、及び/又は、
b) 少なくとも1種のメチル化マーカーの発現レベルの検出のための上記1つ以上の手段が、mRNA特異的ポリヌクレオチド、結合部分、特にタンパク質又はペプチドからなる群から選択される結合部分、より具体的にはモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を含み、かつ、
c) 少なくとも1種のmiRNAマーカーの量の検出のための1つ以上の手段が、少なくとも1種のmiRNA特異的ポリヌクレオチドを含む、態様24に記載の手段。

40

【0240】

26. 態様24又は25に記載の手段を含むキット。

【0241】

27. (a) 容器、及び/又は、
(b) データ記憶媒体、
を更に含み、ここで、該データ記憶媒体は、情報、例えば、
(i) 癌の発症についてのリスクを特定する、及び/又は癌の存在を特定する、及び/又は癌の進行を監視するための方法に関する説明、
(ii) 特に試料における、より具体的には個体からの試料における、少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出する手段の使用、及び/又はキットの使用のための説明、

50

(iii) 品質情報、例えば少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出する手段、及び/又はキットのロット/バッチ番号、製造場所若しくは集成場所又は有効期限若しくは品質保持期限についての情報、該キットの正しい貯蔵若しくは取扱いに関する情報、

(iv) 少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出するための1種以上のバッファー、1種以上の希釈剤、1種以上の試薬の組成、及び/又は少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベル、並びに少なくとも1種のmiRNAマーカーの量を検出するための手段に関する情報、

(v) 癌の進行を特定及び/又は監視する上述の方法を実施した時に得られる情報の解釈に関する情報、

(vi) 不適切な方法及び/又は不適切な手段を適用した場合の考えられる誤解又は誤った結果に関する警告、及び/又は、

(vii) 不適切な1種以上の試薬及び/又は1種以上のバッファーを使用した場合の考えられる誤解又は誤った結果に関する警告、を含む、態様26に記載のキット。

【0242】

28. 態様24若しくは25に記載の手段又は態様26若しくは27に記載のキットの、

iv. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの発症のリスク、

v. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの存在、及び/又は、

vi. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの進行、

の予後判定及び/又は診断のための使用。

【0243】

29. 態様24若しくは25に記載の手段又は態様26若しくは27に記載のキットの、態様1~23のいずれか一つに記載の方法における使用。

【0244】

30. 癌、特にBC、OvaCa及び/又はPaCAの特定のための装置であって、

(a) 被験体の試料における、

(i) HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P、DYRK4からなる群から選択される少なくとも1種のメチル化マーカーのメチル化状態及び/又は発現レベルを測定するための検出剤と、

(ii) miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127-3p、miR-409-3p及びmiR-148bからなる群から選択される少なくとも1種のmiRNAの存在を測定するための検出剤と、を含む分析ユニットと、

(b) 分析ユニットによって測定された量と参照との比較を実施するためのアルゴリズムが有形に組み込まれたデータプロセッサを含み、かつ上記比較に基づいて確立された診断を含む出力ファイルを生成することができる評価ユニットと、を備える、装置。

【0245】

以下の実施例は、本発明を単に説明するものとする。実施例は、決して本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0246】

調査対象母集団

本調査は、ハイデルベルク大学(ドイツ)の倫理委員会によって承認された。全ての癌患者及び健康な対照は、コーカサス人であった。全ての募集した症例及び対照は、当該調査のために書面によるインフォームドコンセントを提出した。ゲノムDNAは、末梢全血からQiagen社製のDNA単離キットを使用して単離した。白血球は、単離後直ちに液体窒素中で凍結させ、使用するまで-80℃で貯蔵した。DNA及びRNAは、白血球からQiagen社製のAll Prep DNA/RNA/Protein Miniキットを使用して単離した。試料についての詳細な情報は、

10

20

30

40

50

表1に示した。散発性BC患者の臨床データは、表5及び表6を参照されたい。

【0247】

BC症例及び適合対照

270人のBRCA1/2変異に陰性の家族性BC患者（1回目のバリデーションラウンド）の末梢血試料は、ハイデルベルク及びケルンにあるドイツ遺伝性乳癌・卵巣癌コンソーシアム（the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer）センターによって収集された。全ての家族性BC症例は、家族歴の基準に従って募集した。350人の散発性BC患者（2回目のバリデーションラウンドで189人及び3回目のバリデーションラウンドで161人）からの末梢血試料は、第1のBC診断の時点で、あらゆるBC治療及び手術の前にハイデルベルク大学病院において収集した。散発性BC患者の臨床的特性は、対癌米国合同委員会（AJCC）の癌病期分類マニュアルに従って定義した。459人の健康な女性の対照（1回目のバリデーションラウンドで251人及び2回目のバリデーションラウンドで189人）からの末梢血試料を、バーデン＝ヴュルテンベルク・ヘッセンのドイツ赤十字血液サービスによる血液ドナーから収集した。151人の健康な女性の対照（3回目のバリデーションラウンド）からの末梢血試料は、ハイデルベルク大学病院で収集した。3回目のバリデーションラウンドにおける全ての症例及び対照は、並行して同様に処理した。白血球は、末梢血から、ハイデルベルク大学病院で血液を収集した後4時間以内に赤血球溶解バッファーを使用して単離した。それらの症例及び対照からの全ての白血球は、並行して処理した。

【0248】

PaCa症例及び適合対照

147人の散発性PaCa患者（80人の男性症例及び67人の女性症例）からの末梢血試料は、ドイツの複数のセンターから収集した。PaCa症例は、早期段階の症例のより高いパーセンテージで特別に選択した。191人の健康な対照（115人の男性症例及び76人の女性症例）からの末梢血試料を、バーデン＝ヴュルテンベルク・ヘッセンのドイツ赤十字血液サービスによる血液ドナーから収集した。

【0249】

OvCa症例及び適合対照

84人の散発性OvCa患者からの末梢血試料は、ハイデルベルク大学病院で収集した。OvCa症例は、早期段階の症例のより高いパーセンテージで特別に選択した。148人の健康な対照からの末梢血試料は、ハイデルベルク大学病院で収集した。

【0250】

実施例1：メチル化マーカーの分析

Infinium 27kメチル化アッセイ及びInfinium 450kメチル化アッセイ

発見ラウンドにおいて、各試料からの500 ngのゲノムDNAを、バイサルファイト変換のためにEZ-96 DNA Methylationキット（Zymo Research）によって処理し、Human Methylation27 BeadChip（Illumina）及びInfinium HumanMethylation450 BeadChipキット（Illumina）によって製造業者の推奨に従ってゲノムワイドメチル化スクリーニングを行った（Steemers FJ, Chang W, Lee G, Barker DL, Shen R, Gunderson KL. Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. Nat Methods 2006;3:31-3. Bork S, Pfister S, Witt H, et al. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. Aging Cell 2009;9:54-63）。全ての試料は、製造業者の説明による品質管理に合格した。

【0251】

Maldi-TOF質量分析法によるメチル化分析

Breitlingら（Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. Am J Hum Genet 2011;88:450-7.）によって記載されるMALDI-TOF質量分析法（Sequenom）を、様々なバリデーションラウンドで使用した。DNAを、EZ-96 DNA Methylation Goldキット（Zymo Research）によってバイサルファイト変換し、バイサルファイト特異的プライマーによって増幅させた（図1）。PCR産物を、Sequenom EpiTyperアッセイの標準的プロトコル

に従って処理し、ナノディスペンサーによって384 SpectroCHIPに分注した。それらのチップを、Sequenom社製の質量分析計システムによって読み取った。データを、SpectroACQUIRE v3.3.1.3ソフトウェアによって収集し、MassArray EpiTyper v1.0ソフトウェアで可視化した。5%の試料を、二重反復分析のために無作為に選択した。

【0252】

RNA発現のための定量的リアルタイムPCR

各試料からの100 ngのトータルRNAを、TaqMan (商標) 逆転写試薬 (Applied Biosystems) によってcDNAへと転写させた。定量的リアルタイムPCRを、LightCycler480 (Roche) を用いて、HYAL2、MGRN1、RPTOR、SLC22A18、FUT7、RAPSN、S100P及びDYRK4遺伝子並びに外因性対照としてのハウスキーピング遺伝子HPRT1に関するTaqMan遺伝子発現アッセイ (Applied Biosystems) と組み合わせて実施した。交点値を、LightCycler 480基本ソフトウェア (Roche) によって二次導関数最大法を使用して計算した。各試料についての遺伝子の相対発現を、Ct法に従って、HPRT1に正規化させることによって計算した。全ての症例及び対照は、並行して処理した。

【0253】

【表2】

種々のアンプリコンのためのバイサルファイト特異的プライマー
Bisulfite-specific primers for different amplicons

Amplicons	Primers	Sequences
S100P	sense	aggaagagagGGAAGGTGGGTTTGAATTTAGTATT
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctCTATCCCTCTTACCTCTAAACCCCT
SLC22A18	sense	aggaagagagTAAGTGAATTTTGGTATTTTGGGA
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctCACTCCAAACCTAAACTCACCTCTA
DYRK4	sense	aggaagagagGGTTTTTTTAAATTTGGTTTTGGAT
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctAAACCCCATTTTTATCCCATAAT
FUT7	sense	aggaagagagGAAGAGGAAGGGATTTAGTTTGAAG
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctACAAACCTTAACCTCCCAAAATACT
RPTOR	sense	aggaagagagGTGGGGTTTTTGTAGTAGTTGAGA
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctTAATAACCCAAACCAACCTAAC
MGRN1	sense	aggaagagagTTTTGGGTATAAGGGAAGTTTAAG
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctCCTAACCAACAAAAACCTAAAAAA
RAPSN	sense	aggaagagagGATTTTTAGTTGGTGAGAGGTTTGA
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctAAAACCACTAAATTACCCAACCAAA
HYAL2	sense	aggaagagagTTTTAAATTTAGTAGGGTGTGAGAGGA
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctCTCATCCATATTATAAAAAACCCCT
HYAL2-310	sense	aggaagagagTTTTTTGGGGTGAGTTTTTTTGT
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctCACCTAATCCTAAACCCATAACCTT
HYAL2-325	sense	aggaagagagTTGTTTAGTTTTTGAGGTTTTTTGG
	antisense	cagtaatacgcactactataggagaaggctATTACACTCCCTCCCTCTCCTAAC

5

【0254】

統計解析

Illumina 27Kアレイのデータを、Illumina BeadStudioソフトウェアによってデフォルト設定で処理した。検出P値>0.01を有するプローブを取り除き、そして試料を分位正規化した。プローブと症例 / 対照の状態との関連を、ベータ回帰モデルによってロジスティックリンク及び関連のWald検定でR package betareg v2.2-3 30を用いて評価した。尤度比検定を用いて、症例 / 対照モデルとネステッドモデルとをチップ差異について比較して、チップ効果による交絡のための考えられる偽の結果を特定した。多重検定の調節を、ベンジャミーニ-ホッホベルク法で行うことで、偽発見率を0.05のレベルに抑えた。全ての解析は、統計学的ソフトウェアR v2.11.1で実施した。

10

20

30

40

50

【0255】

遺伝子発現データの全ての統計解析は、SPSS Statistics 17.0ソフトウェアによって行った。相関は、Spearmanの順位相関係数によって評価した。ロジスティック回帰モデル及び非パラメトリック検定を、2つの群及び多数の群の間の比較のために使用した。ロジスティック回帰の結果は、ロジスティック回帰モデルにおいて追加の共変数を含めることによって、年齢及び異なる測定バッチの考えられる交絡効果について調節した。受信者操作特性（ROC）曲線解析を実施して、メチル化レベルの判別力を評価した。

【0256】

実施例2：miRNAマーカーの分析

血液の処理及び血漿からのmiRNA単離

EDTA血液試料を、症例の個体及び対照の個体から収集し、その収集の2時間以内に血漿へ処理した。最初の皮膚穿刺からの上皮細胞とのコンタミネーションを避けるために、静脈切開の間に収集された最初の血液チューブは、血漿へ処理しなかった。血液を10 で20分間にわたって1300 gで遠心分離した。上清（血漿）を、微小遠心分離チューブ中に移した後に、第2の高速遠心分離工程を10 で10分間にわたって15500 gで行い、細胞デブリ及び破片を除去した。該血漿を、クライオバイアル中でアリコートに分け、液体窒素中で瞬間凍結させ、使用するまで-80 で貯蔵した。トータルRNA（miRNAを含む）を、400 µLの血漿から抽出した。変性及び相分離は、TRIzol LS（Invitrogen、ドイツ）を使用して製造業者のプロトコルに従って、10 fmolのC.エレガンスのmiR-39/miR-238混合物を加えるという最低限の変更を加えて実施した。水相を、別のチューブに移し、1.5容量の無水エタノールを添加し、その混合物を、miRNeasy Mini kitカラム（Qiagen、ドイツ）にかけた。洗浄後にmiRNAを、30 µLのRNアーゼ不含水中で溶出させた。

【0257】

選択された候補マーカーのバリデーション

逆転写（RT）反応を、TaqMan miRNA逆転写キット（Applied Biosystems、ドイツ）及びmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bに関するmiRNA特異的RTプライマー（Applied Biosystems、ドイツ）を使用して実施した。シングルプレックス（原発乳癌）反応又はマルチプレックス（転移性乳癌）反応を、それぞれ7.5 µl又は15 µlの容量で実施した。それぞれの反応物は、1xのRTバッファー、1 mMのdNTP、0.3xのmiRNA特異的RTプライマー、0.25 UのRNアーゼ阻害剤、3.3 UのMultiscribe逆転写酵素及び固定容量のmiRNA鋳型（それぞれ2 µl又は1 µl）を含んでいた。良性乳癌組織試料及び悪性乳癌組織試料に関して、反応は、15 µl中で行い、それは、以下：1xのRTバッファー、1 mMのdNTP、0.6xのmiRNA特異的プライマー及びRNU6B RTプライマー、0.25 UのRNアーゼ阻害剤、3.3 UのMultiscribe逆転写酵素及び5 ngのRNAを含んでいた。試料の盲検化並びに反応プレート上での症例及び対照の無作為な同時の調査は、バリデーションの間のバイアス及びバッチ効果を最小限にすることを目的とするものであった。RTは、G-STORM GS2 PCRサイクラー（Alphamatrix、ドイツ）中で、以下：16 で30分間、42 で30分間、及び85 で5分間に引き続いて、4 で保持という条件下で実施した。

【0258】

TaqManリアルタイムPCR反応を、三重反復試験において、2.5 µLのTaqMan 2xのユニバーサルPCRマスターミックス（AmpErase UNG不含）（Applied Biosystems、ドイツ）、0.25 µLの20xのmiRNA特異的プライマー/プローブミックス（Applied Biosystems、ドイツ）及び2.25 µLの逆転写産物（1:4希釈）を含む規模縮小された反応で実施した。リアルタイムPCRを、LightCycler 480サーモサイクラー（Roche、ドイツ）中で、以下：95 で10分間、次いで95 で15秒、60 で30秒及び72 で30秒を50サイクルに続いて、4 で保持という条件下で実施した。

【0259】

血漿におけるバリデーション結果からの生データを、加えられたcel-miR-39に対して、Krohら（Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating micro RNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR

10

20

30

40

50

(qRT-PCR). Methods 2010;50:298-301)に記載されるようにして正規化した。乳房組織試料からの生Ct値は、RNU6Bに対して、User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)に記載されるようにして正規化した。

【0260】

癌症例と対照との比較

乳癌及び前立腺癌の検出能力を評価するために、受信者操作特性 (ROC) 曲線を構成し、曲線下面積 (AUC) を計算した。95%の信頼区間を有するROC曲線に基づいて、事前に定義された感度 (75%~90%) での最低特異度を、miR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bについて計算した。ROC曲線に基づき、事前に定義された感度 (75%~90%) での最低特異度を、最も有益であり、かつ最も冗長性の低いmiRNAモデルについて、95%の信頼区間の下限として計算した (Tom Fawcett (2006) "An introduction to ROC analysis". Pattern Recognition Letters 27, 861-874. DOI: 10.1016/j.patrec.2005.10.010; using R package pROC v1.3.2)。

10

【0261】

血漿中でのmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの診断能力

ROC曲線分析を、血漿中での乳癌及び前立腺癌の検出についてのmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bの診断能力を評価するために実施した。腫瘍試料と対照試料との間の判別力は、曲線下面積 (AUC) によって示されている。

【0262】

20

miR-148b、miR-376c、miR-409-3p及びmiR-801の種々の組み合わせを調査することによって、本発明者らは、7種全てのmiR-652、miR-801、miR-376c、miR-376a、miR-127、miR-409及びmiR-148bによるROC曲線の組み合わせにより、最も有益であり、かつ最も冗長性の低いmiRNAパネルが0.89のAUCで得られることを見出した。

【0263】

実施例3：メチル化マーカーとmiRNAマーカーとの組み合わせ

試料調製

161人の散発性BC患者 (3回目のバリデーションラウンド) からの末梢血試料は、第1のBC診断の時点で、あらゆるBC治療及び手術の前にハイデルベルク大学病院において収集した。散発性BC患者の臨床的特性は、対癌米国合同委員会 (AJCC) の癌病期分類マニュアルに従って定義した。151人の健康な女性の対照 (3回目のバリデーションラウンド) からの末梢血試料は、ハイデルベルク大学病院で収集した。3回目のバリデーションラウンドにおける全ての症例及び対照は、並行して同様に処理した。全血からのDNA及び血漿からのmiRNAを、各試料から抽出した。

30

【0264】

DNAメチル化レベル及びmiRNAレベルの測定

DNAメチル化レベルを、実施例1に記載されるようにMALDI-TOF質量分析法 (Sequenom) によって測定した。血漿からのmiRNAレベルは、実施例2に記載されるようにリアルタイムPCRによって測定した。

【0265】

40

統計解析

遺伝子発現データの全ての統計解析は、SPSS Statistics 17.0ソフトウェアによって行った。マーカーの組 (DNAメチル化マーカーとmiRNAマーカーとの組み合わせ) の結果を、ロジスティック回帰アルゴリズムを使用して生成した。ロジスティック回帰モデル及び非パラメトリック検定を、2つの群及び多数の群の間の比較のために使用した。ロジスティック回帰の結果は、ロジスティック回帰モデルにおいて追加の共変数を含めることによって、年齢及び異なる測定パッチの考えられる交絡効果について調節した。受信者操作特性 (ROC) 曲線分析を実施して、メチル化レベルの判別力を評価した。

【符号の説明】

【0266】

50

図1

Blood-based biomarker panel for the early detection of breast cancer 乳癌の早期

検出のための血液ベースのバイオマーカーパネル

Table 1. Sample description 表1. 試料説明

Rounds ラウンド

Sample types 試料の種類

Assays アッセイ

Groups 群

Sample resources 試料起源

Target N ターゲット数

10

Median of age 年齢の中央値

Rang of age 年齢の範囲

First validation round 1回目のバリデーションラウンド

Second validation round 2回目のバリデーションラウンド

Third validation round 3回目のバリデーションラウンド

Peripheral blood DNA 末梢血DNA

Controls 対照

Blood donor from Mannheim マンハイムからの血液ドナー
cases 症例

Breast cancer centers in Heidelberg and Cologne ハイデルベルク及びケルンの乳癌
センター

20

University hospital of Heidelberg ハイデルベルク大学病院

Assayed N アッセイ数

call rate % コールレートの%

図2

Table 2. Methylation difference of eight genes in the three validation rounds

表2. 3回のバリデーションラウンドにおける8種の遺伝子のメチル化の差異

CpG sites CpGサイト

First validation round 1回目のバリデーションラウンド

30

Second validation round 2回目のバリデーションラウンド

Third validation round 3回目のバリデーションラウンド

Controls median 対照の中央値

FBC cases median FBC症例の中央値

OR per 10% methylation 10%メチル化あたりのOR

Sporadic BC cases median 散発性BC症例の中央値

p-value p値

図3

Table 3. The discriminatory power of DNA methylation marker sets to distinguish

40

BC cases from healthy controls in samples from other centers (first and second v
alidation rounds) 表3. 他センターからの試料においてBC症例を健康な対照から区別
するためのDNAメチル化マーカーセットの判別力(1回目及び2回目のバリデーションラウ
ンド)

Marker sets マーカーセット

First validation round 1回目のバリデーションラウンド

Second validation round 2回目のバリデーションラウンド

All cases vs. All controls 全ての症例対全ての対照

Stage 0&I vs. All controls ステージ0及びI対全ての対照

N (case vs. control) 症例数対対照数

50

Age < 50 年齢<50

Age >=50 年齢 50

Samples from other centers (1st + 2nd validation rounds) 他センターからの試料 (1回目及び2回目のバリデーションラウンド)

図4

Table 4. The discriminatory power of DNA methylation marker sets and miRNA marker sets to distinguish BC cases from healthy controls in samples from the third validation round 表4. 3回目のバリデーションラウンドからの試料においてBC症例を健康な対照から区別するためのDNAメチル化マーカーセット及びmiRNAマーカーセットの判別力

10

Marker sets マーカーセット

All cases vs. All controls 全ての症例対全ての対照

Stage 0&I vs. All controls ステージ0及びI対全ての対照

N (case vs. control) 症例数対対照数

Age < 50 年齢<50

Age >=50 年齢 50

vs. 対

図5

20

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) 表5. 種々の臨床的特徴を有する散発性BC患者における8種の遺伝子のメチル化レベル (2回目のバリデーションラウンドからの症例)

Clinical characteristics (N) 臨床的特徴 (件数)

Group (N) 群 (数)

Median of age 年齢の中央値

Median of methylation levels メチル化レベルの中央値

Tumour stage 腫瘍ステージ

Stage 0&I ステージ0及びI

Stage II ステージII

Stage III ステージIII

p-value (Kruskal Wallis Test) p値 (クルスカール・ウォリス検定)

Tumour size 腫瘍サイズ

Tis&T1 Tis及びT1

T3 and T4 T3及びT4

Lymph node (LN) involvement リンパ節 (LN) 転移

no involved LN リンパ節転移なし

1-3 involved LN 1個~3個のリンパ節転移

>3 involved LN 3個超のリンパ節転移

Grading グレード分類

Grade グレード

ER status ER状態

ER negative ER陰性

ER positive ER陽性

p-value (Mann-Whitney U) p値 (マン - ホイットニーU検定)

PR status PR状態

PR negative PR陰性

PR positive PR陽性

Her2 status Her2状態

30

40

50

Her2 negative Her2陰性
 Her2 positive Her2陽性
 Three receptor status 3種の受容体の状態
 Tripple negative 三重陰性
 Others それ以外
 Menopause status 閉経状態
 premenopause 閉経前期
 postmenopause 閉経後期
 BC family history BC家族歴
 with BC family history BC家族歴あり
 without BC family history BC家族歴なし

10

図6

Table 6. The methylation leveles of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) 表6
 . 種々の臨床的特徴を有する散発性BC患者における8種の遺伝子のメチル化レベル(3回目のバリデーション調査からの症例)

Clinical characteristics (N) 臨床的特徴(件数)

Group (N) 群(数)

Median of age 年齢の中央値

20

Median of methylation levels メチル化レベルの中央値

Tumour stage 腫瘍ステージ

Stage 0&I ステージ0及びI

Stage II ステージII

Stage III&IV ステージIII及びIV

p-value (Kruskal Wallis Test) p値(クルスカール・ウォリス検定)

Tumour size 腫瘍サイズ

Tis&T1 Tis及びT1

T3 and T4 T3及びT4

Lymph node (LN) involvement リンパ節(LN)転移

30

no involved LN リンパ節転移なし

1-3 involved LN 1個~3個のリンパ節転移

>3 involved LN 3個超のリンパ節転移

Grading グレード分類

Grade グレード

ER status ER状態

ER negative ER陰性

ER positive ER陽性

p-value (Mann-Whitney U) p値(マン・ホイットニーU検定)

PR status PR状態

40

PR negative PR陰性

PR positive PR陽性

Her2 status Her2状態

Her2 negative Her2陰性

Her2 positive Her2陽性

Three receptor status 3種の受容体の状態

Tripple negative 三重陰性

Others それ以外

Menopause status 閉経状態

premenopause 閉経前期

50

postmenopause 閉経後期

図7

Table 7. Sample Description of blood-based biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer 表7. 膵臓癌の早期検出のための血液ベースのバイオマーカーパネルの試料説明

Cohort コホート

Sample types 試料の種類

Assays アッセイ

Groups 群

Target N ターゲット数

Mean of age (range) 年齢の平均 (範囲)

Median of age 年齢の中央値

Assayed N (call rate %) アッセイ数 (コールレートの%)

PaCa case and controls PaCa症例及び対照

Peripheral blood DNA 末梢血液DNA

All controls 全ての対照

All PaCa cases 全てのPaCa症例

Male controls 男性の対照

Male PaCa case 男性のPaCa症例

Femal control 女性の対照

Femal PaCa case 女性のPaCa症例

10

20

図8

Table 8. Methylation differences in genes comparing PaCa cases and controls 表8. PaCa症例と対照との対比による遺伝子中のメチル化の差異

CpG sites CpGサイト

Differences in methylation levels メチル化レベルの差異

Early stage (Stage0&1&2) vs All controls 早期段階 (ステージ0及び1及び2) 対全ての対照

Controls median 対照の中央値

PaCa cases median PaCa症例の中央値

PaCa early cases median PaCa早期症例の中央値

OR (95%CI)* per -10% methylation -10%メチル化あたりのOR (95%のCI)

p-value p値

All CpG panel 全てのCpGパネル

logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements 年齢及び測定のための種々のバッチについて調節されたロジスティック回帰

30

図9

Table 9. Methylation differences in genes comparing PaCa cases and controls stratified by gender 表9. 性別によって層化されたPaCa症例と対照との対比による遺伝子中のメチル化の差異

CpG sites CpGサイト

Male samples 男性試料

male controls median 男性対照の中央値

male PaCa cases median 男性のPaCa症例の中央値

Female samples 女性試料

female controls median 女性対照の中央値

female PaCa cases median 女性のPaCa症例の中央値

40

50

OR (95%CI)* per -10% methylation -10%メチル化あたりのOR (95%のCI)

p-value p値

All CpG panel 全てのCpGパネル

logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements

年齢及び測定のための種々のバッチについて調節されたロジスティック回帰

図10

Table 10. The discriminatory power of the methylation in genes to distinguish PaCa cases from healthy controls 表10. PaCa症例を健康な対照から区別するための遺伝子中のメチル化の判別力

10

CpG sites CpGサイト

Area under curve 曲線下面積

all PaCa cases vs. all controls 全てのPaCa症例対全ての対照

stage 0&I&II PaCa cases vs. all controls ステージ0及びI及びIIのPaCa症例対全ての対照

Male, PaCa cases vs. controls 男性のPaCa症例対対照

Female, PaCa cases vs. controls 女性のPaCa症例対対照

All CpG panel 全てのCpGパネル

図11

20

Table 11. The methylation of genes in PaCa patients with different clinical characteristics 表11. 種々の臨床的特徴を有するPaCa患者における遺伝子のメチル化

Clinical characteristics (N) 臨床的特徴 (件数)

Group (N) 群 (数)

Median of age 年齢の中央値

Median of methylation levels メチル化レベルの中央値

Tumour stage 腫瘍ステージ

Stage 0&I&2 ステージ0及びI及び2

Stage III&IV ステージIII及びIV

p-value p値

30

Tumour size 腫瘍サイズ

T3&T4 T3及びT4

Lymph node リンパ節

metastasis status 転移状態

Grading グレード分類

Grade グレード

Gender (147) cases 性別 (147) による症例

Male 男性

Female 女性

The p-values are calculated by Mann-Whitney Test p値は、マン - ホイットニー検定によって計算される。

40

図12

Table 12. Sample Description of blood-based biomarker panel for the early detection of ovarian cancer 表12. 卵巣癌の早期検出のための血液ベースのバイオマーカーパネルの試料説明

Sample types 試料の種類

Assays アッセイ

Sample resources 試料起源

Groups 群

50

Target N ターゲット数
 mean of age (range) 年齢の平均 (範囲)
 median of age 年齢の中央値
 Assayed N アッセイ数
 call rate % コールレートの%
 DNA from blood pellet 血液ペレットからのDNA
 University hospital of Heidelberg ハイデルベルク大学病院
 controls 対照
 cases 症例

10

図13

Table 13. Methylation differences in genes comparing OvCa cases and controls 表

13. OvCa症例と対照との対比による遺伝子中のメチル化の差異

CpG sites CpGサイト

All samples 全ての試料

controls median 対照の中央値

OvCa cases median OvCa症例の中央値

p-value p値

All CpG panel 全てのCpGパネル

logistic regression, adjusted for different batches for the measurements 測定の
 ための種々のバッチについて調節されたロジスティック回帰

20

図14

Table 14. The discriminatory power of the methylation in genes to distinguish Ov
 Ca cases from healthy controls 表14. OvCa症例を健康な対照から区別するための遺
 伝子中のメチル化の判別力

CpG sites CpGサイト

Area under curve 曲線下面積

All samples 全ての試料

All CpG panel 全てのCpGパネル

30

図15

Table 15. The determination of breast cancer related CpG island shore in HYAL2

表15. HYAL2中の乳癌関連CpGアイランドショアの測定

CpG sites CpGサイト

Differences in methylation levels メチル化レベルの差異

Controls median 対照の中央値

Familial BC cases median 家族性BC症例の中央値

OR (95%CI)* per 10% methylation 10%メチル化あたりのOR (95%のCI)

p-value p値

40

Correlations to HYAL2_CpG_4 HYAL2_CpG_4への相関

Spearman rho Spearmanの

logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements
 年齢及び測定のための種々のバッチについて調節されたロジスティック回帰

図16

Table 16. The inverse correlation between the methylation and expression of S100
 P, SLC22A18 and DYRK4 in leucocytes 表16. 白血球におけるS100P、SLC22A18及びDYR
 K4のメチル化と発現との間の逆相関

CpG sites CpGサイト

50

Difference in methylation or expression levels メチル化レベル又は発現レベルの差異

Controls 対照

Sporadic BC 散発性BC

p-value p値

Correlations to expression 発現への相関

Spearman rho Spearmanの

Relative expression of S100P S100Pの相対発現

Relative expression of SLC22A18 SLC22A18の相対発現

Relative expression of DYRK4 DYRK4の相対発現

10

Mann-Whitney U test マン-ホイットニーU検定

図17

Table 17. The methylation levels of HYAL2 CpG sites by Illumina 450K 表17. Illumina 450KによるHYAL2のCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

20

ENHANCER エンハンサー

1stExon 1番目のエキソン

Body 遺伝子領域内

NA 該当せず

TRUE 該当する

図18

Table 18. The methylation levels of S100P CpG sites by Illumina 450K 表18. Illumina 450KによるS100PのCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

30

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

Body 遺伝子領域内

1stExon 1番目のエキソン

NA 該当せず

図19

40

Table 19. The methylation levels of SLC22A18 CpG sites by Illumina 450K 表19. Illumina 450KによるSLC22A18のCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

Body 遺伝子領域内

1stExon 1番目のエキソン

50

NA 該当せず
TRUE 該当する

図20

Table 20. The methylation levels of DYRK4 CpG sites by Illumina 450K 表20. Illumina 450KによるDYRK4のCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

Body 遺伝子領域内

NA 該当せず

10

図21

Table 21. The methylation levels of FUT7 CpG sites by Illumina 450K 表21. Illumina 450KによるFUT7のCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

Body 遺伝子領域内

1stExon 1番目のエキソン

NA 該当せず

20

図22

Table 22. The methylation levels of RAPSN CpG sites by Illumina 450K 表22. Illumina 450KによるRAPSNのCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

Body 遺伝子領域内

NA 該当せず

30

40

図23

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K 表23. Illumina 450KによるRPTORのCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

Body 遺伝子領域内

50

NA 該当せず
TRUE 該当する

図24

Table 24. The methylation levels of MGRN1 CpG sites by Illumina 450K 表24. Illumina 450KによるMGRN1のCpGサイトのメチル化レベル

pvalWald_Group Wald検定のp値_グループ

meanDiff 平均差

CHR 染色体

MAPINFO マップ情報

LOCATION 位置

ENHANCER エンハンサー

N_Shore N_ショア

Island アイランド

S_Shore S_ショア

S_Shelf S_シェルフ

N_Shelf N_シェルフ

NA 該当せず

TRUE 該当する

10

20

図25

Methylation levels メチル化レベル

control 対照

case 症例

Relative expression of HYAL2 HYAL2の相対発現

Spearman rho Spearmanの

Methylation level of cg27091787 cg27091787のメチル化レベル

図26

Methylation levels of HYAL2_CpG_1 HYAL2_CpG_1のメチル化レベル

Methylation levels of HYAL2_CpG_2 HYAL2_CpG_2のメチル化レベル

Methylation levels of HYAL2_CpG_3 HYAL2_CpG_3のメチル化レベル

Methylation levels of cg27091787 cg27091787のメチル化レベル

control 対照

case 症例

Whole blood 全血

B cells B細胞

T cells T細胞

B/T-lymphocytes-depleted leucocytes B/T-リンパ球を除去した白血球

30

【 1 】

Fig. 1

Blood-based biomarker panel for the early detection of breast cancer

Table 1. Sample description			
Rounds	First validation round		Third validation round
	Peripheral blood DNA MassARRAY	Peripheral blood DNA MassARRAY	Peripheral blood DNA MassARRAY
Sample types	Controls	Controls	Controls
Assays	BC cases	BC cases	BC cases
Groups	Breast cancer cases in Heidelberg and Cologne	Breast cancer cases in Heidelberg and Cologne	Breast cancer cases in Heidelberg and Cologne
Sample resources	Blood donor from Mannheim	Blood donor from Mannheim	Blood donor from Mannheim
Target N	251	189	151
Median of age	43.0	60.0	46.0
Range of age	30-87	31-89	21-77
HYAL2			
Controls	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
BC cases	247 (98.4%)	248 (99.3%)	148 (98.5%)
DYRK4			
Controls	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
BC cases	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
SIRT6			
Controls	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
BC cases	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
SIRT6A18			
Controls	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
BC cases	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
RPTOR			
Controls	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
BC cases	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
MGRN1			
Controls	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
BC cases	251 (100.0%)	189 (100.0%)	151 (100.0%)
Assayed N (call rate %)			
RAPSN	251 (100.0%)	270 (100.0%)	270 (100.0%)
miR-127-3p	—	—	—
miR-148b	—	—	—
miR-376a	—	—	—
miR-376c	—	—	—
miR-409-3p	—	—	—
miR-652	—	—	—
miR-801	—	—	—

【 2 - 2 】

Fig. 2 (continued)

Table 2. Methylation difference of eight genes in the three validation rounds (continued)

CpG sites	First validation round			Second validation round		
	Controls median (IQR)	BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation p-value *	Controls median (IQR)	Sporadic BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation p-value *
FUT7_CpG_1	0.43 (0.35-0.49)	0.31 (0.23-0.39)	2.23 (1.87-2.67)	0.40 (0.30-0.51)	0.31 (0.26-0.38)	1.84 (1.52-2.23)
FUT7_CpG_2	0.26 (0.21-0.32)	0.20 (0.15-0.25)	3.14 (2.36-4.17)	0.21 (0.14-0.28)	0.16 (0.13-0.20)	2.04 (1.56-2.67)
FUT7_CpG_3	0.18 (0.14-0.23)	0.13 (0.09-0.18)	3.18 (2.37-4.28)	0.16 (0.10-0.27)	0.13 (0.09-0.17)	1.73 (1.36-2.21)
FUT7_CpG_4	0.23 (0.19-0.30)	0.19 (0.13-0.26)	1.63 (1.34-1.99)	0.24 (0.18-0.31)	0.21 (0.16-0.25)	1.55 (1.23-1.95)
CDKN2A	0.31 (0.25-0.38)	0.21 (0.15-0.26)	3.28 (2.59-4.16)	0.28 (0.20-0.39)	0.21 (0.16-0.27)	1.98 (1.60-2.45)
FUT7_CpG_7	0.13 (0.09-0.18)	0.08 (0.05-0.12)	3.87 (2.78-5.39)	0.12 (0.06-0.17)	0.09 (0.06-0.13)	1.46 (1.13-1.88)
FUT7_CpG_8	0.40 (0.34-0.48)	0.31 (0.25-0.39)	1.89 (1.60-2.23)	0.38 (0.30-0.49)	0.31 (0.24-0.38)	1.40 (1.21-1.75)
RPTOR_CpG_1	0.11 (0.08-0.18)	0.10 (0.06-0.13)	1.50 (1.12-2.01)	0.05 (0.03-0.17)	0.05 (0.03-0.13)	1.17 (1.02-1.35)
RPTOR_CpG_2	0.34 (0.26-0.43)	0.29 (0.20-0.36)	1.67 (1.36-2.05)	0.26 (0.11-0.45)	0.20 (0.11-0.32)	1.17 (1.05-1.30)
RPTOR_CpG_3	0.71 (0.62-0.80)	0.64 (0.55-0.72)	1.59 (1.31-1.92)	0.70 (0.60-0.80)	0.68 (0.53-0.80)	1.03 (0.95-1.12)
RPTOR_CpG_4	0.97 (0.91-1.00)	0.91 (0.83-0.99)	2.11 (1.57-2.85)	0.85 (0.65-1.00)	0.80 (0.68-0.97)	1.07 (0.92-1.13)
RPTOR_CpG_5	0.83 (0.75-0.90)	0.80 (0.73-0.85)	1.55 (1.21-2.00)	0.85 (0.70-0.97)	0.80 (0.68-0.94)	1.06 (0.95-1.17)
RPTOR_CpG_6	0.78 (0.70-0.86)	0.72 (0.67-0.77)	2.00 (1.52-2.63)	0.80 (0.62-0.96)	0.72 (0.59-0.86)	1.08 (0.98-1.19)
RAPSN_CpG_1	0.95 (0.92-0.96)	0.94 (0.92-0.96)	1.26 (0.93-1.75)	0.97 (0.94-0.99)	0.96 (0.92-0.99)	1.12 (0.93-1.36)
RAPSN_CpG_2	0.67 (0.58-0.78)	0.67 (0.61-0.74)	1.06 (0.90-1.25)	0.73 (0.59-0.90)	0.67 (0.46-0.97)	1.00 (0.91-1.07)
RAPSN_CpG_4	0.50 (0.39-0.63)	0.41 (0.34-0.52)	1.48 (1.26-1.73)	0.48 (0.38-0.62)	0.36 (0.12-0.59)	1.09 (1.02-1.16)
RAPSN_CpG_5	0.82 (0.71-0.88)	0.79 (0.72-0.85)	1.03 (0.85-1.25)	0.91 (0.64-0.99)	0.80 (0.59-0.94)	1.07 (0.99-1.16)
RAPSN_CpG_6	0.67 (0.57-0.78)	0.58 (0.48-0.68)	1.42 (1.21-1.67)	0.64 (0.49-0.95)	0.57 (0.32-0.79)	1.03 (0.95-1.08)
RAPSN_CpG_7	0.74 (0.66-0.83)	0.72 (0.63-0.79)	1.20 (1.00-1.43)	0.95 (0.63-1.00)	0.79 (0.55-0.96)	1.06 (0.99-1.14)
RAPSN_CpG_8	0.98 (0.93-0.97)	0.95 (0.92-0.96)	1.32 (0.79-2.20)	0.97 (0.97-0.98)	0.97 (0.96-0.98)	0.95 (0.79-1.13)

【 2 - 2 】

【 2 - 1 】

Fig. 2

Table 2. Methylation difference of eight genes in the three validation rounds

CpG sites	First validation round			Second validation round		
	Controls median (IQR)	BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation p-value *	Controls median (IQR)	Sporadic BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation p-value *
HYAL2_CpG_1	0.38 (0.33-0.45)	0.30 (0.26-0.37)	1.92 (1.57-2.33)	0.39 (0.32-0.48)	0.3 (0.26-0.37)	1.96 (1.56-2.45)
HYAL2_CpG_2	0.25 (0.20-0.30)	0.18 (0.14-0.23)	3.10 (2.32-4.15)	0.23 (0.18-0.29)	0.17 (0.13-0.2)	5.31 (4.49-6.06)
HYAL2_CpG_3	0.41 (0.36-0.47)	0.32 (0.28-0.38)	4.24 (3.14-5.75)	0.41 (0.36-0.47)	0.32 (0.28-0.36)	5.44 (4.69-6.03)
HYAL2_CpG_4	0.65 (0.59-0.72)	0.53 (0.48-0.60)	4.53 (3.41-6.03)	0.64 (0.58-0.70)	0.5 (0.46-0.54)	8.14 (5.37-12.33)
DYRK4_CpG_1	0.38 (0.19-0.55)	0.25 (0.15-0.38)	1.25 (1.15-1.35)	0.34 (0.23-0.46)	0.26 (0.19-0.33)	1.49 (1.28-1.73)
DYRK4_CpG_3	0.29 (0.16-0.42)	0.20 (0.12-0.30)	1.25 (1.14-1.39)	0.27 (0.18-0.37)	0.22 (0.17-0.27)	1.53 (1.27-1.85)
SIPOX_CpG_2_3	0.68 (0.64-0.72)	0.63 (0.59-0.68)	3.07 (2.31-4.09)	0.68 (0.64-0.72)	0.65 (0.61-0.69)	2.28 (1.59-3.27)
SIPOX_CpG_4	0.89 (0.84-0.95)	0.67 (0.58-0.91)	1.32 (1.19-1.47)	0.86 (0.81-0.94)	0.83 (0.69-0.93)	1.08 (0.96-1.21)
SIPOX_CpG_7	0.58 (0.47-0.72)	0.41 (0.31-0.51)	1.61 (1.43-1.82)	0.49 (0.40-0.67)	0.43 (0.32-0.61)	1.34 (1.16-1.56)
SIPOX_CpG_8	0.52 (0.45-0.59)	0.43 (0.37-0.51)	2.36 (1.93-2.90)	0.48 (0.42-0.58)	0.45 (0.38-0.51)	1.71 (1.37-2.15)
SIPOX_CpG_9	0.58 (0.52-0.64)	0.5 (0.45-0.56)	2.72 (2.14-3.45)	0.56 (0.51-0.62)	0.52 (0.46-0.58)	2.07 (1.58-2.72)
SIPOX_CpG_10	0.21 (0.16-0.26)	0.18 (0.14-0.21)	2.70 (1.98-3.67)	0.19 (0.15-0.24)	0.16 (0.13-0.2)	3.78 (2.45-5.81)
SIPOX_CpG_11	0.26 (0.21-0.35)	0.21 (0.17-0.26)	1.94 (1.57-2.40)	0.26 (0.21-0.32)	0.19 (0.16-0.24)	2.96 (2.15-4.06)
SIPOX_CpG_12	0.29 (0.23-0.36)	0.25 (0.21-0.29)	2.02 (1.61-2.54)	0.27 (0.22-0.32)	0.21 (0.18-0.25)	3.35 (2.34-4.80)
SIPOX_CpG_13	0.65 (0.59-0.70)	0.60 (0.55-0.65)	2.22 (1.73-2.85)	0.62 (0.57-0.67)	0.58 (0.52-0.61)	2.61 (1.90-3.60)

【 2 - 3 】

Fig. 2 (continued)

Table 2. Methylation difference of eight genes in the three validation rounds (continued)

CpG sites	First validation round			Second validation round		
	Controls median (IQR)	BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation p-value *	Controls median (IQR)	Sporadic BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation p-value *
MGRN1_CpG_1	0.35 (0.33-0.52)	0.23 (0.10-0.35)	1.38 (1.22-1.56)	0.33 (0.02-0.63)	0.09 (0.00-0.30)	1.25 (1.15-1.36)
MGRN1_CpG_2	0.65 (0.59-0.73)	0.60 (0.56-0.66)	1.49 (1.19-1.87)	0.58 (0.42-0.75)	0.47 (0.38-0.59)	1.22 (1.11-1.36)
MGRN1_CpG_3	0.52 (0.32-0.67)	0.34 (0.22-0.49)	1.33 (1.19-1.49)	0.48 (0.07-0.83)	0.19 (0.04-0.40)	1.17 (1.10-1.25)
MGRN1_CpG_4	0.44 (0.31-0.63)	0.32 (0.22-0.44)	1.33 (1.19-1.50)	0.45 (0.05-0.74)	0.18 (0.04-0.42)	1.22 (1.14-1.32)
MGRN1_CpG_5	0.46 (0.33-0.56)	0.33 (0.24-0.44)	1.52 (1.30-1.77)	0.46 (0.10-0.62)	0.23 (0.09-0.41)	1.25 (1.15-1.37)
MGRN1_CpG_6	0.35 (0.22-0.50)	0.22 (0.10-0.35)	1.37 (1.21-1.56)	0.31 (0.01-0.63)	0.11 (0.00-0.34)	1.21 (1.12-1.31)
MGRN1_CpG_7	0.50 (0.35-0.66)	0.38 (0.27-0.50)	1.36 (1.21-1.54)	0.51 (0.09-0.83)	0.23 (0.07-0.47)	1.19 (1.11-1.27)
MGRN1_CpG_8	0.65 (0.59-0.73)	0.60 (0.56-0.66)	1.49 (1.19-1.87)	0.58 (0.42-0.76)	0.47 (0.38-0.59)	1.21 (1.11-1.36)
MGRN1_CpG_9	0.40 (0.33-0.53)	0.34 (0.24-0.41)	1.52 (1.28-1.79)	0.41 (0.02-0.67)	0.25 (0.00-0.42)	1.21 (1.12-1.31)
MGRN1_CpG_10	0.50 (0.34-0.61)	0.37 (0.26-0.46)	1.44 (1.26-1.64)	0.53 (0.12-0.84)	0.24 (0.05-0.51)	1.20 (1.12-1.29)
MGRN1_CpG_11	0.48 (0.35-0.62)	0.35 (0.27-0.46)	1.46 (1.27-1.68)	0.49 (0.10-0.79)	0.23 (0.09-0.45)	1.22 (1.13-1.31)
MGRN1_CpG_12	0.53 (0.40-0.67)	0.41 (0.33-0.53)	1.46 (1.26-1.68)	0.52 (0.20-0.79)	0.33 (0.15-0.53)	1.20 (1.11-1.30)
MGRN1_CpG_13	0.40 (0.33-0.53)	0.34 (0.24-0.41)	1.52 (1.28-1.79)	0.41 (0.02-0.67)	0.25 (0.00-0.42)	1.21 (1.12-1.31)
MGRN1_CpG_14	0.40 (0.33-0.53)	0.34 (0.24-0.41)	1.52 (1.28-1.79)	0.41 (0.02-0.67)	0.25 (0.00-0.42)	1.21 (1.12-1.31)
MGRN1_CpG_15	0.50 (0.34-0.61)	0.37 (0.26-0.46)	1.44 (1.26-1.64)	0.53 (0.12-0.84)	0.24 (0.05-0.51)	1.20 (1.12-1.29)
MGRN1_CpG_16	0.48 (0.35-0.62)	0.35 (0.27-0.46)	1.46 (1.27-1.68)	0.49 (0.10-0.79)	0.23 (0.09-0.45)	1.22 (1.13-1.31)
MGRN1_CpG_17	0.53 (0.40-0.67)	0.41 (0.33-0.53)	1.46 (1.26-1.68)	0.52 (0.20-0.79)	0.33 (0.15-0.53)	1.20 (1.11-1.30)
MGRN1_CpG_18	0.49 (0.37-0.59)	0.37 (0.29-0.47)	1.52 (1.30-1.77)	0.46 (0.14-0.71)	0.26 (0.09-0.45)	1.23 (1.14-1.34)
MGRN1_CpG_19	0.51 (0.35-0.65)	0.38 (0.29-0.48)	1.35 (1.17-1.55)	0.44 (0.07-0.74)	0.26 (0.11-0.49)	1.16 (1.08-1.25)
MGRN1_CpG_20	0.45 (0.35-0.56)	0.36 (0.27-0.45)	1.41 (1.22-1.63)	0.47 (0.04-0.79)	0.19 (0.01-0.49)	1.16 (1.08-1.25)
MGRN1_CpG_21	0.56 (0.43-0.69)	0.46 (0.36-0.57)	1.36 (1.19-1.56)	0.44 (0.06-0.74)	0.21 (0.03-0.44)	1.20 (1.12-1.29)
MGRN1_CpG_22	0.48 (0.38-0.51)	0.40 (0.29-0.50)	1.33 (1.15-1.53)	0.52 (0.23-0.84)	0.33 (0.15-0.57)	1.14 (1.05-1.22)
MGRN1_CpG_23	0.39 (0.28-0.51)	0.30 (0.22-0.39)	1.32 (1.15-1.52)	0.38 (0.09-0.76)	0.26 (0.10-0.48)	1.16 (1.08-1.25)
MGRN1_CpG_24	0.48 (0.41-0.60)	0.43 (0.34-0.53)	1.24 (1.07-1.41)	0.51 (0.10-0.76)	0.34 (0.10-0.56)	1.11 (1.04-1.19)

【 2 - 4 】

Fig. 2 (continued)

Table 2. Methylation difference of eight genes in the three validation rounds (continued)

CpG sites	Third validation round			
	Controls median (IQR)	Sporadic BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation	p-value *
HYAL2_CpG_1	0.27 (0.24-0.31)	0.25 (0.21-0.28)	3.01 (1.88-4.85)	5.13E-06
HYAL2_CpG_2	0.19 (0.17-0.23)	0.16 (0.13-0.20)	3.04 (1.89-4.88)	4.48E-06
HYAL2_CpG_3	0.32 (0.28-0.36)	0.28 (0.24-0.32)	3.50 (2.24-5.48)	4.13E-08
HYAL2_CpG_4	0.52 (0.48-0.55)	0.47 (0.42-0.51)	3.28 (2.18-4.94)	1.19E-08
DYRK4_CpG_1	0.32 (0.21-0.40)	0.22 (0.14-0.33)	1.20 (1.06-1.36)	0.003
DYRK4_CpG_3	0.25 (0.17-0.33)	0.19 (0.13-0.28)	1.26 (1.06-1.51)	0.010
S100P_CpG_2,3	0.71 (0.66-0.73)	0.67 (0.62-0.72)	2.86 (1.79-4.55)	9.93E-06
S100P_CpG_4	0.91 (0.63-0.96)	0.89 (0.62-0.96)	1.05 (0.92-1.20)	0.464
S100P_CpG_7	0.54 (0.44-0.61)	0.47 (0.42-0.55)	1.40 (1.16-1.69)	5.60E-04
S100P_CpG_8	0.54 (0.46-0.60)	0.47 (0.39-0.56)	2.00 (1.52-2.64)	9.85E-07
S100P_CpG_9	0.58 (0.54-0.63)	0.52 (0.46-0.59)	2.33 (1.69-3.22)	2.61E-07
SLC22A18_CpG_3	0.18 (0.15-0.22)	0.14 (0.11-0.17)	4.25 (2.56-7.04)	1.95E-08
SLC22A18_CpG_4	0.22 (0.18-0.28)	0.17 (0.13-0.23)	2.60 (1.82-3.70)	1.16E-07
SLC22A18_CpG_6	0.26 (0.21-0.30)	0.20 (0.16-0.25)	2.43 (1.70-3.48)	1.20E-06
SLC22A18_CpG_8	0.64 (0.59-0.70)	0.61 (0.53-0.67)	1.64 (1.23-2.20)	8.40E-04
FUT7_CpG_1	0.38 (0.30-0.46)	0.35 (0.25-0.42)	1.38 (1.13-1.69)	0.002
FUT7_CpG_2	0.23 (0.17-0.30)	0.21 (0.13-0.27)	1.35 (1.04-1.76)	0.025
FUT7_CpG_3	0.16 (0.11-0.21)	0.14 (0.09-0.21)	1.20 (0.95-1.53)	0.132
FUT7_CpG_4	0.22 (0.16-0.29)	0.20 (0.15-0.26)	1.28 (1.01-1.62)	0.037
cg02679745	0.26 (0.20-0.33)	0.23 (0.16-0.32)	1.36 (1.08-1.71)	0.009
FUT7_CpG_7	0.12 (0.08-0.18)	0.09 (0.05-0.14)	1.61 (1.20-2.16)	0.001
FUT7_CpG_8	0.37 (0.27-0.45)	0.31 (0.23-0.40)	1.34 (1.11-1.61)	0.002
RPTOR_CpG_1	0.09 (0.07-0.15)	0.07 (0.03-0.10)	3.42 (2.16-5.43)	1.63E-07
RPTOR_CpG_2	0.27 (0.20-0.35)	0.20 (0.15-0.28)	2.66 (1.96-3.61)	2.90E-10
RPTOR_CpG_3	0.66 (0.59-0.73)	0.60 (0.55-0.68)	1.66 (1.30-2.13)	5.11E-05
RPTOR_CpG_4	0.84 (0.72-0.97)	0.77 (0.68-0.93)	1.86 (1.41-2.45)	1.22E-05
RPTOR_CpG_5	0.78 (0.74-0.84)	0.74 (0.69-0.82)	1.87 (1.41-2.49)	1.74E-05
RPTOR_CpG_8	0.72 (0.66-0.76)	0.68 (0.62-0.73)	2.06 (1.49-2.85)	1.30E-05

【 2 - 5 】

Table 2. Methylation difference of eight genes in the three validation rounds (continued)

CpG sites	Third validation round			
	Controls median (IQR)	Sporadic BC cases median (IQR)	OR per 10% methylation	p-value *
RAPSN_CpG_1	0.96 (0.93-0.98)	0.95 (0.93-0.98)	1.16 (0.71-1.92)	0.551
RAPSN_CpG_2	0.66 (0.59-0.72)	0.62 (0.52-0.70)	1.44 (1.18-1.76)	4.15E-04
RAPSN_CpG_4	0.48 (0.37-0.54)	0.39 (0.32-0.47)	1.49 (1.23-1.80)	5.61E-05
RAPSN_CpG_5	0.79 (0.73-0.84)	0.74 (0.66-0.82)	1.57 (1.25-1.99)	1.34E-04
RAPSN_CpG_6	0.60 (0.51-0.67)	0.53 (0.44-0.61)	1.47 (1.22-1.77)	4.42E-05
RAPSN_CpG_7	0.75 (0.68-0.80)	0.72 (0.65-0.80)	1.19 (0.95-1.48)	0.128
RAPSN_CpG_8	0.95 (0.93-0.97)	0.96 (0.93-0.97)	0.95 (0.53-1.71)	0.871
MGRN1_CpG_1	0.23 (0.13-0.34)	0.14 (0.07-0.28)	1.31 (1.11-1.55)	0.002
MGRN1_CpG_2	0.64 (0.59-0.69)	0.61 (0.56-0.66)	1.46 (1.10-1.94)	0.008
MGRN1_CpG_3	0.40 (0.30-0.50)	0.30 (0.20-0.38)	1.63 (1.35-1.95)	1.85E-07
MGRN1_CpG_4	0.33 (0.25-0.44)	0.26 (0.19-0.35)	1.44 (1.20-1.72)	6.89E-05
MGRN1_CpG_5,6,7,8	0.35 (0.27-0.44)	0.28 (0.21-0.36)	1.74 (1.39-2.18)	1.65E-06
MGRN1_CpG_11	0.17 (0.11-0.31)	0.14 (0.07-0.21)	1.39 (1.15-1.68)	6.48E-04
MGRN1_CpG_12	0.38 (0.295-0.5)	0.32 (0.22-0.39)	1.56 (1.30-1.89)	2.83E-06
MGRN1_CpG_13	0.64 (0.59-0.69)	0.61 (0.56-0.66)	1.29 (1.00-1.67)	0.053
MGRN1_CpG_14	0.34 (0.28-0.42)	0.28 (0.19-0.34)	1.83 (1.45-2.31)	4.59E-07
MGRN1_CpG_15	0.41 (0.33-0.49)	0.32 (0.24-0.42)	1.62 (1.33-1.98)	1.33E-06
MGRN1_CpG_16,17,18	0.37 (0.31-0.47)	0.31 (0.25-0.38)	1.61 (1.29-2.01)	2.11E-05
MGRN1_CpG_19,20	0.44 (0.36-0.54)	0.36 (0.26-0.44)	1.74 (1.41-2.16)	2.56E-07
MGRN1_CpG_21	0.34 (0.28-0.42)	0.28 (0.19-0.34)	1.83 (1.45-2.31)	4.59E-07
MGRN1_CpG_22,23	0.39 (0.31-0.46)	0.33 (0.25-0.39)	1.72 (1.37-2.17)	2.76E-06
MGRN1_CpG_26	0.40 (0.32-0.48)	0.31 (0.25-0.39)	1.77 (1.43-2.20)	2.31E-07
MGRN1_CpG_27	0.40 (0.30-0.49)	0.30 (0.20-0.40)	1.70 (1.40-2.06)	7.99E-08
MGRN1_CpG_28	0.37 (0.29-0.46)	0.31 (0.22-0.38)	1.58 (1.28-1.95)	2.11E-05
MGRN1_CpG_29	0.47 (0.40-0.56)	0.38 (0.32-0.47)	1.83 (1.47-2.29)	7.69E-08
MGRN1_CpG_31	0.39 (0.33-0.48)	0.34 (0.27-0.42)	1.69 (1.35-2.10)	2.83E-06
MGRN1_CpG_32	0.34 (0.26-0.42)	0.27 (0.17-0.36)	1.44 (1.20-1.73)	1.18E-04
MGRN1_CpG_34	0.43 (0.35-0.52)	0.36 (0.29-0.44)	1.50 (1.25-1.81)	1.98E-05

【 3 - 1 】

Fig. 3 (continued)

Table 3. The discriminatory power of DNA methylation marker sets to distinguish BC cases from healthy controls in samples from other centers (first and second validation rounds)(continued)

Marker sets	Samples from other centers (1st+2nd validation rounds)			
	All cases vs. All control	Age < 50	Age >= 50	
	N (case vs. control)	N (case vs. control)	N (case vs. control)	AUC (95% CI)
HYAL2	455 vs. 439	251 vs. 226	204 vs. 213	0.86 (0.83-0.90)
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	454 vs. 435	251 vs. 223	203 vs. 212	0.77 (0.73-0.82)
MGRN1, RPTOR, RAPSN	456 vs. 439	252 vs. 226	204 vs. 213	0.74 (0.69-0.79)
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	453 vs. 434	250 vs. 222	203 vs. 212	0.89 (0.85-0.92)
HYAL2, MGRN1, RPTOR, RAPSN	455 vs. 438	251 vs. 225	204 vs. 213	0.89 (0.86-0.93)
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPSN	454 vs. 434	251 vs. 222	203 vs. 212	0.84 (0.80-0.87)
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPSN	453 vs. 433	250 vs. 221	203 vs. 212	0.92 (0.89-0.94)

Fig. 3

Table 3. The discriminatory power of DNA methylation marker sets to distinguish BC cases from healthy controls in samples from other centers (first and second validation rounds)

Marker sets	First validation round		Second validation round	
	All cases vs. All controls	All cases vs. All controls	Stage 0&1 vs. All controls	
	N (case vs. control)	N (case vs. control)	N (case vs. control)	AUC (95% CI)
HYAL2	267 vs. 250	188 vs. 189	101 vs. 189	0.88 (0.84-0.92)
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	265 vs. 246	189 vs. 189	101 vs. 189	0.78 (0.73-0.83)
MGRN1, RPTOR, RAPSN	267 vs. 250	189 vs. 189	101 vs. 189	0.74 (0.69-0.80)
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	265 vs. 245	188 vs. 189	101 vs. 189	0.90 (0.87-0.94)
HYAL2, MGRN1, RPTOR, RAPSN	267 vs. 249	188 vs. 189	101 vs. 189	0.91 (0.87-0.94)
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPSN	265 vs. 245	189 vs. 189	101 vs. 189	0.84 (0.80-0.89)
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPSN	265 vs. 244	188 vs. 189	101 vs. 189	0.93 (0.90-0.96)

【 3 - 2 】

Fig. 3 (continued)

Table 3. The discriminatory power of DNA methylation marker sets to distinguish BC cases from healthy controls in samples from other centers (first and second validation rounds)(continued)

Marker sets	Samples from other centers (1st+2nd validation rounds)					
	Age < 50			Age >= 50		
	All cases vs. control	N (case vs. control)	AUC (95% CI)	All cases vs. control	N (case vs. control)	AUC (95% CI)
HYAL2	455 vs. 439	251 vs. 226	0.86 (0.84-0.88)	204 vs. 213	204 vs. 213	0.86 (0.83-0.90)
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	454 vs. 435	251 vs. 223	0.81 (0.79-0.84)	203 vs. 212	203 vs. 212	0.77 (0.73-0.82)
MGRN1, RPTOR, RAPS	456 vs. 439	252 vs. 226	0.81 (0.78-0.85)	204 vs. 213	204 vs. 213	0.74 (0.69-0.79)
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	453 vs. 434	250 vs. 222	0.89 (0.87-0.91)	203 vs. 212	203 vs. 212	0.89 (0.85-0.92)
HYAL2, MGRN1, RPTOR, RAPS	455 vs. 438	251 vs. 225	0.90 (0.87-0.93)	204 vs. 213	204 vs. 213	0.89 (0.86-0.93)
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPS	454 vs. 434	251 vs. 222	0.85 (0.82-0.87)	203 vs. 212	203 vs. 212	0.84 (0.80-0.87)
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPS	453 vs. 433	250 vs. 221	0.91 (0.89-0.93)	203 vs. 212	203 vs. 212	0.92 (0.89-0.94)

【 4 】

Fig. 4

Table 4. The discriminatory power of DNA methylation marker sets and miRNA marker sets to distinguish BC cases from healthy controls in samples from the third validation round

Marker sets	All cases vs. All controls			Age < 50			Age >= 50		
	N (case vs. control)	AUC (95% CI)	Stage 0&I vs. All controls	N (case vs. control)	AUC (95% CI)	N (case vs. control)	AUC (95% CI)	N (case vs. control)	AUC (95% CI)
HYAL2	161 vs. 149	0.72 (0.67-0.78)	57 vs. 149	0.79 (0.72-0.85)	116 vs. 98	0.85 (0.80-0.90)	45 vs. 51	0.73 (0.68-0.83)	
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	158 vs. 148	0.76 (0.71-0.82)	55 vs. 148	0.84 (0.77-0.90)	113 vs. 98	0.88 (0.84-0.93)	45 vs. 50	0.85 (0.82-0.93)	
MGRN1, RPTOR, RAPS	159 vs. 147	0.82 (0.77-0.87)	56 vs. 147	0.89 (0.84-0.94)	113 vs. 96	0.93 (0.89-0.96)	45 vs. 51	0.89 (0.86-0.95)	
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7	158 vs. 148	0.77 (0.72-0.83)	55 vs. 148	0.86 (0.80-0.92)	113 vs. 98	0.90 (0.86-0.94)	45 vs. 50	0.87 (0.80-0.95)	
HYAL2, MGRN1, RPTOR, RAPS	158 vs. 147	0.83 (0.78-0.88)	56 vs. 147	0.90 (0.85-0.94)	113 vs. 96	0.94 (0.91-0.97)	45 vs. 51	0.90 (0.84-0.96)	
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPS	155 vs. 146	0.85 (0.81-0.90)	54 vs. 146	0.94 (0.90-0.97)	110 vs. 96	0.96 (0.94-0.99)	45 vs. 50	1.00 (1.00-1.00)	
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPS	155 vs. 146	0.86 (0.82-0.90)	54 vs. 146	0.94 (0.91-0.97)	110 vs. 96	0.98 (0.96-1.00)	45 vs. 50	1.00 (1.00-1.00)	
7miRNA	153 vs. 148	0.82 (0.77-0.86)	53 vs. 148	0.80 (0.73-0.87)	109 vs. 98	0.90 (0.85-0.94)	44 vs. 50	0.84 (0.76-0.92)	
HYAL2, 7miRNA	153 vs. 148	0.86 (0.81-0.90)	53 vs. 148	0.86 (0.81-0.92)	109 vs. 98	0.93 (0.90-0.96)	44 vs. 50	0.86 (0.78-0.93)	
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, 7miRNA	150 vs. 147	0.89 (0.86-0.93)	51 vs. 147	0.91 (0.86-0.96)	106 vs. 98	0.96 (0.94-0.98)	44 vs. 49	0.93 (0.87-0.98)	
MGRN1, RPTOR, RAPS, 7miRNA	149 vs. 144	0.91 (0.88-0.94)	52 vs. 144	0.95 (0.92-0.98)	106 vs. 96	0.97 (0.95-0.99)	44 vs. 50	0.97 (0.94-1.00)	
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, 7miRNA	150 vs. 147	0.90 (0.86-0.93)	51 vs. 147	0.92 (0.88-0.97)	106 vs. 98	0.97 (0.94-0.99)	44 vs. 49	0.94 (0.89-0.98)	
HYAL2, MGRN1, RPTOR, RAPS, 7miRNA	149 vs. 144	0.91 (0.88-0.95)	52 vs. 144	0.96 (0.93-0.99)	106 vs. 96	0.98 (0.96-0.99)	44 vs. 50	1.00 (1.00-1.00)	
S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPS, 7miRNA	146 vs. 143	0.94 (0.91-0.97)	50 vs. 143	1.00 (1.00-1.00)	103 vs. 96	1.00 (1.00-1.00)	44 vs. 49	1.00 (1.00-1.00)	
HYAL2, S100P, SLC22A18, DYRK4, FUT7, MGRN1, RPTOR, RAPS, 7miRNA	146 vs. 143	0.94 (0.92-0.97)	50 vs. 143	1.00 (1.00-1.00)	103 vs. 96	1.00 (1.00-1.00)	44 vs. 49	1.00 (1.00-1.00)	

【 5 - 1 】

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of age	Median of methylation levels					
			HYAL2_CpG_1	HYAL2_CpG_2	HYAL2_CpG_3	DYRK4_CpG_4	DYRK4_CpG_5	DYRK4_CpG_6
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	59.23	0.30	0.17	0.33	0.50	0.25	0.23
	Stage II (61)	57.80	0.31	0.17	0.32	0.50	0.27	0.21
	Stage III (26)	68.11	0.29	0.13	0.28	0.51	0.26	0.21
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.166	0.937	0.008	0.001	0.846	0.726	0.407
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	59.23	0.30	0.17	0.33	0.50	0.26	0.22
	T2 (57)	60.33	0.32	0.16	0.32	0.50	0.26	0.21
	T3 and T4 (12)	71.04	0.26	0.12	0.27	0.52	0.24	0.22
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.191	0.637	0.041	0.001	0.983	0.514	0.681
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	60.00	0.30	0.17	0.33	0.50	0.26	0.22
	1-3 involved LN (30)	55.59	0.30	0.18	0.32	0.52	0.28	0.20
	> 3 involved LN (23)	67.92	0.29	0.12	0.27	0.51	0.27	0.21
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.265	0.875	0.003	0.004	0.661	0.946	0.139
Grading (187)	Grade 1 (35)	58.78	0.30	0.15	0.32	0.51	0.24	0.24
	Grade 2 (114)	61.50	0.29	0.17	0.33	0.50	0.26	0.21
	Grade 3 (38)	60.42	0.32	0.16	0.32	0.50	0.26	0.21
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.731	0.262	0.592	0.970	0.949	0.617	0.777
ER status (185)	ER negative (23)	57.72	0.34	0.16	0.32	0.50	0.26	0.22
	ER positive (162)	60.67	0.29	0.17	0.32	0.50	0.26	0.22
	p-value (Mann-Whitney U)	0.150	0.017	0.371	0.862	0.489	0.303	0.397
PR status (186)	PR negative (38)	60.97	0.33	0.16	0.32	0.51	0.25	0.21
	PR positive (148)	59.24	0.29	0.17	0.32	0.50	0.26	0.22
	p-value (Mann-Whitney U)	0.797	0.014	0.142	0.495	0.124	0.973	0.626
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	60.71	0.30	0.17	0.33	0.51	0.26	0.22
	Her2 positive (19)	51.52	0.30	0.17	0.31	0.49	0.27	0.21
	p-value (Mann-Whitney U)	0.357	0.855	0.386	0.225	0.451	0.504	0.724
Three receptor status (185)	Triple negative (15)	59.67	0.40	0.14	0.32	0.51	0.26	0.22
	Others (170)	59.88	0.30	0.17	0.32	0.50	0.26	0.22
	p-value (Mann-Whitney U)	0.310	0.062	0.072	0.683	0.281	0.358	0.264
Menopause status (180)	premenopause (56)	47.19	0.30	0.17	0.33	0.50	0.27	0.22
	postmenopause (124)	67.64	0.31	0.17	0.32	0.51	0.26	0.22
	p-value (Mann-Whitney U)	—	0.678	0.627	0.558	0.157	0.756	0.294
BC family history (186)	with BC family history (30)	58.96	0.29	0.17	0.32	0.51	0.29	0.26
	without BC family history (156)	60.45	0.30	0.17	0.33	0.51	0.26	0.21
	p-value (Mann-Whitney U)	0.296	0.533	0.243	0.211	0.476	0.202	0.055

【 5 - 2 】

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		S100P_CpG_2_3	S100P_CpG_4	S100P_CpG_7	S100P_CpG_8	S100P_CpG_9	S100P_CpG_10
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.65	0.83	0.40	0.44	0.52	
	Stage II (61)	0.64	0.83	0.45	0.45	0.52	
	Stage III (26)	0.66	0.90	0.47	0.47	0.53	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.427	0.746	0.290	0.843	0.679	
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.65	0.84	0.43	0.44	0.52	
	T2 (57)	0.64	0.69	0.42	0.45	0.51	
	T3 and T4 (12)	0.67	0.92	0.52	0.48	0.56	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.223	0.298	0.306	0.570	0.230	
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.65	0.82	0.41	0.44	0.52	
	1-3 involved LN (30)	0.66	0.85	0.48	0.46	0.52	
	> 3 involved LN (23)	0.66	0.91	0.47	0.47	0.53	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.572	0.549	0.205	0.355	0.429	
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.65	0.65	0.45	0.42	0.52	
	Grade 2 (114)	0.65	0.84	0.41	0.44	0.52	
	Grade 3 (38)	0.66	0.86	0.51	0.47	0.53	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.757	0.490	0.290	0.394	0.500	
ER status (185)	ER negative (23)	0.64	0.89	0.40	0.45	0.52	
	ER positive (162)	0.65	0.83	0.43	0.45	0.52	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.376	0.195	0.988	0.606	0.725	
PR status (186)	PR negative (38)	0.65	0.86	0.42	0.45	0.52	
	PR positive (148)	0.65	0.83	0.44	0.45	0.52	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.232	0.619	0.984	0.474	0.878	
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.66	0.85	0.43	0.45	0.52	
	Her2 positive (19)	0.61	0.69	0.40	0.42	0.49	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.030	0.056	0.679	0.139	0.122	
Three receptor status (185)	Triple negative (15)	0.66	0.91	0.48	0.46	0.52	
	Others (170)	0.65	0.83	0.43	0.44	0.52	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.801	0.172	0.697	0.749	0.774	
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.63	0.84	0.38	0.42	0.49	
	postmenopause (124)	0.66	0.83	0.45	0.46	0.53	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.004	0.790	0.032	0.012	0.004	
BC family history (186)	with BC family history (30)	0.64	0.65	0.42	0.42	0.52	
	without BC family history (156)	0.66	0.84	0.44	0.45	0.52	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.407	0.198	0.932	0.586	0.405	

【図 5 - 3】

Fig. 5 (continued)

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		FUT7_CpG_2	FUT7_CpG_3	FUT7_CpG_4	FUT7_CpG_6	FUT7_CpG_7	FUT7_CpG_8
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.17	0.13	0.22	0.22	0.09	0.34
	Stage II (61)	0.17	0.14	0.21	0.21	0.10	0.31
	Stage III (26)	0.13	0.11	0.17	0.17	0.08	0.30
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.033	0.135	0.169	0.003	0.226	0.790
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.17	0.13	0.21	0.21	0.09	0.34
	T2 (57)	0.16	0.14	0.22	0.21	0.09	0.30
	T3 and T4 (12)	0.12	0.11	0.16	0.14	0.07	0.31
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.220	0.720	0.448	0.010	0.180	0.296
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.17	0.13	0.22	0.21	0.09	0.31
	1-3 involved LN (30)	0.17	0.15	0.22	0.24	0.11	0.33
	> 3 involved LN (23)	0.13	0.11	0.16	0.17	0.08	0.32
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.044	0.207	0.080	0.017	0.194	0.957
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.18	0.13	0.22	0.24	0.11	0.35
	Grade 2 (114)	0.15	0.13	0.21	0.20	0.09	0.30
	Grade 3 (38)	0.18	0.14	0.20	0.22	0.10	0.33
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.019	0.628	0.446	0.110	0.673	0.234
ER status (185)	ER negative (23)	0.16	0.13	0.19	0.20	0.08	0.29
	ER positive (162)	0.17	0.13	0.21	0.21	0.09	0.33
	p-value (Mann-Whitney U)	0.653	0.691	0.378	0.478	0.107	0.607
PR status (186)	PR negative (38)	0.17	0.14	0.22	0.22	0.09	0.32
	PR positive (148)	0.17	0.13	0.21	0.21	0.09	0.31
	p-value (Mann-Whitney U)	0.441	0.553	0.679	0.479	0.761	0.292
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.17	0.13	0.21	0.21	0.09	0.32
	Her2 positive (19)	0.15	0.13	0.19	0.22	0.08	0.31
	p-value (Mann-Whitney U)	0.429	0.756	0.628	0.991	0.464	0.924
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.17	0.11	0.19	0.20	0.08	0.29
	Others (170)	0.17	0.13	0.21	0.21	0.09	0.33
	p-value (Mann-Whitney U)	0.397	0.254	0.327	0.371	0.036	0.323
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.16	0.13	0.20	0.20	0.08	0.27
	postmenopause (124)	0.17	0.14	0.22	0.21	0.09	0.34
	p-value (Mann-Whitney U)	0.490	0.321	0.498	0.549	0.225	0.021
	with BC family history (30)	0.15	0.13	0.23	0.21	0.08	0.29
BC family history (186)	without BC family history (156)	0.17	0.13	0.21	0.21	0.10	0.32
	p-value (Mann-Whitney U)	0.628	0.662	0.817	0.884	0.064	0.347

【図 5 - 5】

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		RPTOR_CpG_1	RPTOR_CpG_2	RPTOR_CpG_3	RPTOR_CpG_4	RPTOR_CpG_5	RPTOR_CpG_8
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.07	0.22	0.70	0.80	0.82	0.74
	Stage II (61)	0.02	0.18	0.67	0.75	0.75	0.72
	Stage III (26)	0.02	0.17	0.61	0.92	0.80	0.69
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.026	0.173	0.197	0.109	0.138	0.260
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.06	0.22	0.72	0.80	0.83	0.74
	T2 (57)	0.02	0.19	0.62	0.76	0.74	0.69
	T3 and T4 (12)	0.03	0.17	0.62	0.92	0.77	0.69
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.095	0.341	0.036	0.171	0.028	0.406
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.05	0.20	0.67	0.78	0.80	0.72
	1-3 involved LN (30)	0.04	0.20	0.75	0.83	0.82	0.76
	> 3 involved LN (23)	0.02	0.15	0.49	0.89	0.79	0.67
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.702	0.377	0.028	0.208	0.934	0.050
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.08	0.18	0.66	0.78	0.82	0.70
	Grade 2 (114)	0.04	0.20	0.68	0.78	0.81	0.72
	Grade 3 (38)	0.05	0.21	0.66	0.93	0.79	0.69
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.231	0.798	0.666	0.052	0.812	0.919
ER status (185)	ER negative (23)	0.07	0.28	0.69	0.85	0.79	0.68
	ER positive (162)	0.04	0.19	0.68	0.79	0.80	0.72
	p-value (Mann-Whitney U)	0.272	0.057	0.705	0.158	0.868	0.557
PR status (186)	PR negative (38)	0.08	0.25	0.65	0.81	0.81	0.68
	PR positive (148)	0.04	0.20	0.68	0.79	0.79	0.73
	p-value (Mann-Whitney U)	0.195	0.471	0.623	0.334	0.241	0.511
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.04	0.20	0.69	0.80	0.80	0.72
	Her2 positive (19)	0.08	0.22	0.63	0.84	0.79	0.68
	p-value (Mann-Whitney U)	0.294	0.305	0.632	0.633	0.885	0.561
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.07	0.28	0.69	0.85	0.75	0.67
	Others (170)	0.04	0.20	0.67	0.79	0.80	0.72
	p-value (Mann-Whitney U)	0.511	0.125	0.948	0.503	0.786	0.401
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.05	0.19	0.69	0.80	0.74	0.70
	postmenopause (124)	0.04	0.22	0.67	0.80	0.83	0.72
	p-value (Mann-Whitney U)	0.896	0.243	0.697	0.555	0.006	0.651
	with BC family history (30)	0.05	0.20	0.73	0.85	0.77	0.73
BC family history (186)	without BC family history (156)	0.05	0.20	0.66	0.79	0.81	0.71
	p-value (Mann-Whitney U)	0.373	0.442	0.113	0.166	0.224	0.973

【図 5 - 4】

Fig. 5 (continued)

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels			
		SLC22A18_CpG_3	SLC22A18_CpG_4	SLC22A18_CpG_6	SLC22A18_CpG_8
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.16	0.21	0.22	0.58
	Stage II (61)	0.16	0.19	0.22	0.57
	Stage III (26)	0.13	0.17	0.20	0.54
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.005	0.010	0.048	0.031
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.16	0.21	0.22	0.58
	T2 (57)	0.16	0.19	0.21	0.59
	T3 and T4 (12)	0.14	0.17	0.20	0.53
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.111	0.022	0.270	0.078
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.16	0.20	0.22	0.58
	1-3 involved LN (30)	0.16	0.22	0.22	0.59
	> 3 involved LN (23)	0.13	0.17	0.18	0.53
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.005	0.048	0.048	0.038
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.16	0.19	0.21	0.60
	Grade 2 (114)	0.16	0.19	0.21	0.57
	Grade 3 (38)	0.16	0.22	0.22	0.58
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.292	0.152	0.533	0.158
ER status (185)	ER negative (23)	0.16	0.21	0.22	0.57
	ER positive (162)	0.16	0.19	0.21	0.58
	p-value (Mann-Whitney U)	0.647	0.558	0.764	0.877
PR status (186)	PR negative (38)	0.15	0.21	0.22	0.57
	PR positive (148)	0.16	0.19	0.21	0.58
	p-value (Mann-Whitney U)	0.787	0.761	0.996	0.837
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.16	0.20	0.22	0.58
	Her2 positive (19)	0.15	0.19	0.19	0.57
	p-value (Mann-Whitney U)	0.606	0.700	0.188	0.809
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.16	0.21	0.22	0.56
	Others (170)	0.16	0.19	0.21	0.58
	p-value (Mann-Whitney U)	0.737	0.581	0.493	0.724
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.15	0.18	0.21	0.59
	postmenopause (124)	0.16	0.21	0.22	0.57
	p-value (Mann-Whitney U)	0.408	0.325	0.236	0.327
BC family history (186)	with BC family history (30)	0.16	0.21	0.22	0.58
	without BC family history (156)	0.16	0.19	0.22	0.58
	p-value (Mann-Whitney U)	0.403	0.391	0.748	0.342

【図 5 - 6】

Fig. 5 (continued)

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		MGRN1_CpG_1	MGRN1_CpG_2	MGRN1_CpG_4	MGRN1_CpG_5.6.7.8	MGRN1_CpG_12	MGRN1_CpG_13
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.12	0.50	0.22	0.23	0.26	0.50
	Stage II (61)	0.09	0.48	0.14	0.19	0.24	0.48
	Stage III (26)	0.12	0.57	0.27	0.33	0.29	0.57
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.553	0.307	0.208	0.126	0.777	0.307
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.12	0.50	0.22	0.24	0.27	0.50
	T2 (57)	0.07	0.50	0.14	0.23	0.23	0.50
	T3 and T4 (12)	0.17	0.54	0.37	0.39	0.39	0.54
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.234	0.960	0.331	0.546	0.786	0.960
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.12	0.50	0.19	0.22	0.24	0.50
	1-3 involved LN (30)	0.06	0.46	0.19	0.25	0.33	0.46
	> 3 involved LN (23)	0.21	0.57	0.28	0.33	0.31	0.57
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.411	0.086	0.291	0.147	0.636	0.086
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.11	0.47	0.18	0.23	0.24	0.47
	Grade 2 (114)	0.12	0.50	0.21	0.23	0.27	0.50
	Grade 3 (38)	0.12	0.52	0.27	0.29	0.34	0.52
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.826	0.609	0.587	0.500	0.877	0.609
ER status (185)	ER negative (23)	0.14	0.48	0.28	0.32	0.33	0.48
	ER positive (162)	0.11	0.50	0.20	0.23	0.26	0.50
	p-value (Mann-Whitney U)	0.568	0.909	0.335	0.730	0.688	0.909
PR status (186)	PR negative (38)	0.14	0.50	0.27	0.31	0.34	0.50
	PR positive (148)	0.11	0.50	0.20	0.23	0.24	0.50
	p-value (Mann-Whitney U)	0.207	0.307	0.081	0.193	0.249	0.307
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.11	0.50	0.21	0.23	0.25	0.50
	Her2 positive (19)	0.12	0.52	0.22	0.26	0.27	0.52
	p-value (Mann-Whitney U)	0.620	0.496	0.991	0.729	0.998	0.496
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.23	0.50	0.28	0.32	0.33	0.50
	Others (170)	0.11	0.50	0.20	0.23	0.26	0.50
	p-value (Mann-Whitney U)	0.263	0.784	0.194	0.629	0.534	0.784
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.08	0.49	0.17	0.20	0.21	0.49
	postmenopause (124)	0.12	0.50	0.22	0.25	0.29	0.50
	p-value (Mann-Whitney U)	0.252	0.348	0.384	0.431	0.207	0.348
BC family history (186)	with BC family history (30)	0.13	0.50	0.23	0.22	0.24	0.50
	without BC family history (156)	0.11	0.50	0.20	0.25	0.27	0.50
	p-value (Mann-Whitney U)	0.415	0.818	0.535	0.818	0.427	0.818

【図 5 - 7】

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		MGRN1_CpG_15	MGRN1_CpG_16.17.18	MGRN1_CpG_19.20	MGRN1_CpG_22.23	MGRN1_CpG_26	MGRN1_CpG_27
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.26	0.28	0.35	0.27	0.30	0.28
	Stage II (61)	0.30	0.24	0.35	0.22	0.28	0.20
	Stage III (26)	0.42	0.32	0.41	0.30	0.39	0.36
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.296	0.355	0.594	0.386	0.356	0.368
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.27	0.29	0.35	0.27	0.30	0.28
	T2 (57)	0.30	0.25	0.33	0.22	0.22	0.20
	T3 and T4 (12)	0.39	0.38	0.46	0.33	0.46	0.45
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.962	0.811	0.655	0.597	0.117	0.717
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.27	0.25	0.35	0.26	0.28	0.25
	1-3 involved LN (30)	0.29	0.26	0.36	0.29	0.32	0.32
	> 3 involved LN (23)	0.45	0.33	0.41	0.30	0.40	0.38
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.099	0.185	0.627	0.588	0.354	0.298
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.28	0.28	0.35	0.24	0.27	0.21
	Grade 2 (114)	0.29	0.26	0.36	0.28	0.29	0.25
	Grade 3 (38)	0.34	0.30	0.36	0.25	0.33	0.34
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.590	0.386	0.805	0.999	0.890	0.381
ER status (185)	ER negative (23)	0.30	0.33	0.37	0.31	0.33	0.35
	ER positive (162)	0.29	0.26	0.35	0.26	0.28	0.26
	p-value (Mann-Whitney U)	0.680	0.545	0.855	0.745	0.907	0.867
PR status (186)	PR negative (38)	0.35	0.34	0.38	0.32	0.34	0.29
	PR positive (148)	0.29	0.26	0.34	0.26	0.28	0.22
	p-value (Mann-Whitney U)	0.166	0.232	0.345	0.183	0.292	0.387
	Her2 negative (166)	0.30	0.28	0.35	0.27	0.28	0.25
Her2 status (185)	Her2 positive (19)	0.26	0.26	0.36	0.28	0.30	0.29
	p-value (Mann-Whitney U)	0.464	0.844	0.977	0.386	0.755	0.922
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.31	0.34	0.41	0.38	0.34	0.35
	Others (170)	0.29	0.26	0.35	0.26	0.28	0.26
	p-value (Mann-Whitney U)	0.882	0.365	0.563	0.096	0.744	0.768
	premenopause (56)	0.18	0.19	0.29	0.23	0.22	0.17
Menopause status (180)	postmenopause (124)	0.33	0.29	0.38	0.29	0.32	0.29
	p-value (Mann-Whitney U)	0.023	0.082	0.187	0.251	0.090	0.141
BC family history (186)	with BC family history (30)	0.28	0.23	0.36	0.27	0.26	0.23
	without BC family history (156)	0.30	0.29	0.35	0.27	0.31	0.28
	p-value (Mann-Whitney U)	0.663	0.764	0.913	0.939	0.425	0.390

【図 5 - 9】

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels							
		RAPSN_CpG_1	RAPSN_CpG_2	RAPSN_CpG_4	RAPSN_CpG_5	RAPSN_CpG_6	RAPSN_CpG_7	RAPSN_CpG_8	RAPSN_CpG_9
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.96	0.67	0.39	0.84	0.58	0.79	0.97	
	Stage II (61)	0.95	0.71	0.36	0.78	0.64	0.79	0.98	
	Stage III (26)	0.96	0.62	0.26	0.74	0.45	0.76	0.97	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.600	0.882	0.413	0.198	0.339	0.770	0.032	
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.96	0.66	0.39	0.84	0.58	0.80	0.97	
	T2 (57)	0.96	0.67	0.36	0.79	0.54	0.78	0.97	
	T3 and T4 (12)	0.94	0.78	0.26	0.72	0.49	0.73	0.97	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.145	0.616	0.711	0.195	0.845	0.940	0.260	
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.96	0.69	0.39	0.84	0.60	0.79	0.97	
	1-3 involved LN (30)	0.97	0.67	0.34	0.71	0.56	0.78	0.97	
	> 3 involved LN (23)	0.95	0.58	0.26	0.73	0.50	0.76	0.97	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.992	0.628	0.544	0.212	0.771	0.961	0.727	
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.96	0.67	0.39	0.84	0.62	0.88	0.97	
	Grade 2 (114)	0.96	0.74	0.36	0.80	0.57	0.77	0.97	
	Grade 3 (38)	0.96	0.59	0.36	0.81	0.49	0.78	0.97	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.904	0.160	0.970	0.678	0.625	0.652	0.330	
ER status (185)	ER negative (23)	0.95	0.63	0.36	0.82	0.50	0.78	0.97	
	ER positive (162)	0.96	0.68	0.36	0.80	0.58	0.79	0.97	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.366	0.739	0.793	0.700	0.482	0.686	0.673	
PR status (186)	PR negative (38)	0.94	0.60	0.36	0.85	0.60	0.80	0.97	
	PR positive (148)	0.96	0.70	0.36	0.80	0.57	0.79	0.97	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.018	0.197	0.603	0.345	0.777	0.638	0.600	
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.96	0.67	0.36	0.80	0.57	0.79	0.97	
	Her2 positive (19)	0.94	0.75	0.44	0.80	0.53	0.70	0.97	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.078	0.443	0.222	0.736	0.957	0.116	0.097	
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.95	0.59	0.35	0.82	0.50	0.76	0.97	
	Others (170)	0.96	0.68	0.36	0.80	0.58	0.79	0.97	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.599	0.323	0.362	0.726	0.213	0.882	0.755	
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.96	0.68	0.39	0.83	0.60	0.79	0.97	
	postmenopause (124)	0.96	0.67	0.36	0.80	0.52	0.79	0.97	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.775	0.629	0.843	0.789	0.572	0.832	0.260	
BC family history (186)	with BC family history (30)	0.96	0.71	0.38	0.76	0.62	0.72	0.97	
	without BC family history (156)	0.96	0.67	0.36	0.82	0.57	0.81	0.97	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.809	0.721	0.657	0.372	0.749	0.305	0.586	

【図 5 - 8】

Table 5. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from second validation round)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		MGRN1_CpG_28	MGRN1_CpG_29	MGRN1_CpG_31	MGRN1_CpG_32	MGRN1_CpG_34	
Tumour stage (188)	Stage 0&I (101)	0.24	0.34	0.30	0.20	0.38	
	Stage II (61)	0.25	0.35	0.25	0.12	0.33	
	Stage III (26)	0.37	0.45	0.36	0.37	0.43	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.379	0.372	0.565	0.049	0.677	
Tumour size (188)	Tis&T1 (119)	0.24	0.36	0.30	0.20	0.36	
	T2 (57)	0.25	0.37	0.30	0.14	0.35	
	T3 and T4 (12)	0.42	0.49	0.44	0.36	0.44	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.363	0.580	0.608	0.576	0.701	
Lymph node (LN) involvement (185)	no involved LN (132)	0.23	0.35	0.30	0.18	0.36	
	1-3 involved LN (30)	0.28	0.37	0.27	0.21	0.27	
	> 3 involved LN (23)	0.38	0.45	0.37	0.38	0.44	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.235	0.199	0.495	0.017	0.504	
Grading (187)	Grade 1 (35)	0.23	0.37	0.29	0.20	0.33	
	Grade 2 (114)	0.25	0.35	0.31	0.18	0.35	
	Grade 3 (38)	0.38	0.43	0.34	0.28	0.43	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.204	0.363	0.370	0.209	0.814	
ER status (185)	ER negative (23)	0.38	0.42	0.36	0.27	0.42	
	ER positive (162)	0.25	0.37	0.30	0.19	0.36	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.388	0.454	0.668	0.511	0.985	
PR status (186)	PR negative (38)	0.32	0.43	0.34	0.28	0.43	
	PR positive (148)	0.25	0.37	0.30	0.18	0.35	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.247	0.200	0.315	0.106	0.452	
Her2 status (185)	Her2 negative (166)	0.25	0.37	0.30	0.19	0.36	
	Her2 positive (19)	0.26	0.39	0.33	0.27	0.35	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.987	0.989	0.858	0.858	0.449	
Three receptor status (185)	Tripple negative (15)	0.38	0.43	0.40	0.30	0.44	
	Others (170)	0.25	0.37	0.30	0.19	0.36	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.271	0.295	0.306	0.365	0.682	
Menopause status (180)	premenopause (56)	0.18	0.27	0.25	0.16	0.32	
	postmenopause (124)	0.28	0.40	0.32	0.20	0.40	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.283	0.054	0.138	0.169	0.314	
BC family history (186)	with BC family history (30)	0.20	0.33	0.28	0.18	0.43	
	without BC family history (156)	0.28	0.39	0.32	0.21	0.36	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.222	0.414	0.522	0.212	0.353	

【図 6 - 1】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of age	Median of methylation levels					
			HYAL2_CpG_1	HYAL2_CpG_2	HYAL2_CpG_3	HYAL2_CpG_4	DYRK4_CpG_1	DYRK4_CpG_3
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	46.22	0.24	0.16	0.27	0.45	0.20	0.18
	Stage II (68)	46.57	0.26	0.16	0.30	0.48	0.22	0.18
	Stage III&IV (18)	47.54	0.25	0.19	0.32	0.49	0.23	0.21
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.271	0.026	0.141	0.062	0.365	0.647	0.582
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	46.31	0.25	0.16	0.28	0.46	0.20	0.18
	T2 (60)	47.12	0.25	0.17	0.30	0.48	0.24	0.19
	T3 and T4 (13)	44.67	0.24	0.16	0.30	0.48	0.22	0.20
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.446	0.416	0.728	0.312	0.543	0.424	0.888
Lymph node (LN) Involvement (139)	no involved LN (96)	46.54	0.24	0.16	0.27	0.45	0.22	0.18
	1-3 involved LN (37)	45.98	0.25	0.17	0.30	0.49	0.22	0.18
	> 3 involved LN (6)	52.38	0.25	0.19	0.31	0.47	0.34	0.31
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.171	0.180	0.717	0.158	0.364	0.492	0.127
Grading (187)	Grade 1 (20)	46.96	0.24	0.16	0.27	0.48	0.20	0.18
	Grade 2 (94)	46.87	0.25	0.17	0.30	0.48	0.23	0.19
	Grade 3 (33)	45.27	0.24	0.16	0.30	0.45	0.25	0.19
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.061	0.801	0.807	0.390	0.195	0.622	0.915
ER status (147)	ER negative (23)	46.19	0.23	0.16	0.27	0.44	0.19	0.19
	ER positive (125)	46.71	0.25	0.16	0.29	0.48	0.24	0.18
	p-value (Mann-Whitney U)	0.184	0.377	0.540	0.220	0.042	0.656	0.815
PR status (148)	PR negative (32)	45.32	0.23	0.15	0.28	0.43	0.23	0.20
	PR positive (116)	46.77	0.25	0.17	0.29	0.48	0.22	0.18
	p-value (Mann-Whitney U)	0.036	0.178	0.276	0.183	0.003	0.580	0.867
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	46.64	0.25	0.16	0.28	0.46	0.22	0.19
	Her2 positive (34)	46.25	0.24	0.17	0.30	0.48	0.24	0.18
	p-value (Mann-Whitney U)	0.626	0.805	0.689	0.310	0.586	0.675	0.731
Three receptor status (148)	Tripple negative (17)	44.76	0.25	0.16	0.25	0.41	0.17	0.18
	Others (131)	46.72	0.25	0.16	0.29	0.48	0.23	0.19
	p-value (Mann-Whitney U)	0.052	0.486	0.332	0.082	0.010	0.308	0.658
Menopause status (148)	premenopause (105)	45.47	0.24	0.16	0.28	0.46	0.22	0.18
	postmenopause (43)	55.93	0.26	0.19	0.30	0.49	0.23	0.22
	p-value (Mann-Whitney U)	—	0.043	0.004	0.093	0.012	0.274	0.145

【図 6 - 2】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels				
		S100P_CpG _2_3	S100P_CpG _4	S100P_CpG _7	S100P_CpG _8	S100P_CpG _9
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.65	0.89	0.45	0.44	0.51
	Stage II (68)	0.69	0.90	0.48	0.50	0.54
	Stage III&IV (18)	0.67	0.88	0.52	0.47	0.57
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.145	0.910	0.049	0.179	0.129
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.66	0.90	0.45	0.46	0.51
	T2 (60)	0.67	0.87	0.48	0.46	0.53
	T3 and T4 (13)	0.68	0.92	0.52	0.50	0.56
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.702	0.460	0.078	0.785	0.597
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.67	0.89	0.46	0.45	0.51
	1-3 involved LN (37)	0.67	0.90	0.50	0.47	0.54
	> 3 involved LN (6)	0.66	0.87	0.49	0.47	0.54
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.896	0.953	0.683	0.937	0.794
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.63	0.91	0.45	0.42	0.49
	Grade 2 (94)	0.68	0.88	0.48	0.48	0.54
	Grade 3 (33)	0.66	0.91	0.49	0.46	0.51
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.234	0.807	0.676	0.368	0.294
ER status (147)	ER negative (23)	0.65	0.94	0.45	0.43	0.49
	ER positive (125)	0.67	0.89	0.48	0.47	0.52
	p-value (Mann-Whitney U)	0.268	0.270	0.361	0.129	0.070
	PR negative (32)	0.66	0.92	0.47	0.44	0.51
PR status (148)	PR positive (116)	0.67	0.89	0.48	0.47	0.52
	p-value (Mann-Whitney U)	0.707	0.177	0.993	0.525	0.296
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.66	0.89	0.47	0.45	0.51
	Her2 positive (34)	0.69	0.90	0.50	0.51	0.55
	p-value (Mann-Whitney U)	0.169	0.534	0.549	0.118	0.188
Three receptor status (148)	Tripple negative (17)	0.65	0.91	0.46	0.43	0.49
	Others (131)	0.67	0.89	0.48	0.47	0.52
	p-value (Mann-Whitney U)	0.584	0.671	0.854	0.257	0.187
	premenopause (105)	0.67	0.91	0.46	0.46	0.51
Menopause status (148)	postmenopause (43)	0.66	0.85	0.50	0.46	0.54
	p-value (Mann-Whitney U)	0.666	0.189	0.037	0.980	0.597

【図 6 - 4】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels			
		SLC22A18_CpG _3	SLC22A18_CpG _4	SLC22A18_CpG _6	SLC22A18_CpG _8
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.13	0.15	0.19	0.61
	Stage II (68)	0.15	0.18	0.22	0.63
	Stage III&IV (18)	0.15	0.20	0.21	0.56
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.183	0.212	0.293	0.284
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.14	0.16	0.20	0.61
	T2 (60)	0.15	0.18	0.22	0.63
	T3 and T4 (13)	0.14	0.16	0.18	0.56
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.276	0.479	0.138	0.308
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.14	0.16	0.20	0.61
	1-3 involved LN (37)	0.14	0.20	0.21	0.63
	> 3 involved LN (6)	0.16	0.20	0.21	0.54
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.491	0.116	0.550	0.115
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.14	0.15	0.19	0.66
	Grade 2 (94)	0.14	0.18	0.21	0.61
	Grade 3 (33)	0.14	0.17	0.21	0.61
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.904	0.683	0.848	0.199
ER status (147)	ER negative (23)	0.14	0.16	0.20	0.60
	ER positive (125)	0.14	0.17	0.21	0.61
	p-value (Mann-Whitney U)	0.202	0.240	0.408	0.153
	PR negative (32)	0.14	0.17	0.20	0.60
PR status (148)	PR positive (116)	0.14	0.17	0.21	0.61
	p-value (Mann-Whitney U)	0.562	0.503	0.439	0.250
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.14	0.17	0.21	0.61
	Her2 positive (34)	0.15	0.20	0.23	0.62
	p-value (Mann-Whitney U)	0.907	0.521	0.430	0.830
Three receptor status (148)	Tripple negative (17)	0.12	0.16	0.19	0.60
	Others (131)	0.14	0.17	0.21	0.61
	p-value (Mann-Whitney U)	0.274	0.391	0.421	0.218
	premenopause (105)	0.14	0.16	0.19	0.62
Menopause status (148)	postmenopause (43)	0.17	0.22	0.23	0.59
	p-value (Mann-Whitney U)	0.002	0.001	0.003	0.112

【図 6 - 3】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		FUT7_CpG _2	FUT7_CpG _3	FUT7_CpG _4	FUT7_CpG _6	FUT7_CpG _7	FUT7_CpG _8
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.19	0.15	0.20	0.24	0.09	0.30
	Stage II (68)	0.21	0.14	0.19	0.22	0.10	0.35
	Stage III&IV (18)	0.22	0.13	0.22	0.23	0.10	0.25
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.895	0.805	0.346	0.956	0.815	0.420
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.21	0.15	0.19	0.24	0.09	0.30
	T2 (60)	0.20	0.13	0.20	0.22	0.10	0.32
	T3 and T4 (13)	0.22	0.17	0.22	0.20	0.11	0.31
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.917	0.427	0.340	0.975	0.616	0.695
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.22	0.14	0.20	0.24	0.09	0.31
	1-3 involved LN (37)	0.20	0.14	0.19	0.22	0.09	0.34
	> 3 involved LN (6)	0.28	0.22	0.31	0.28	0.16	0.27
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.173	0.076	0.239	0.325	0.107	0.976
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.16	0.13	0.18	0.20	0.06	0.26
	Grade 2 (94)	0.22	0.14	0.21	0.25	0.10	0.32
	Grade 3 (33)	0.18	0.14	0.18	0.20	0.10	0.31
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.150	0.574	0.327	0.338	0.243	0.098
ER status (147)	ER negative (23)	0.20	0.12	0.17	0.19	0.10	0.32
	ER positive (125)	0.21	0.14	0.20	0.24	0.09	0.31
	p-value (Mann-Whitney U)	0.793	0.562	0.208	0.204	0.793	0.564
	PR negative (32)	0.23	0.16	0.19	0.23	0.11	0.33
PR status (148)	PR positive (116)	0.21	0.14	0.20	0.23	0.09	0.30
	p-value (Mann-Whitney U)	0.519	0.348	0.744	0.578	0.260	0.285
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.19	0.13	0.20	0.22	0.09	0.30
	Her2 positive (34)	0.26	0.18	0.19	0.27	0.12	0.36
	p-value (Mann-Whitney U)	0.012	0.019	0.495	0.028	0.157	0.172
	Tripple negative (17)	0.18	0.11	0.17	0.17	0.09	0.26
Three receptor status (148)	Others (131)	0.21	0.14	0.20	0.24	0.09	0.31
	p-value (Mann-Whitney U)	0.327	0.206	0.077	0.042	0.800	0.205
Menopause status (148)	premenopause (105)	0.21	0.14	0.20	0.23	0.09	0.31
	postmenopause (43)	0.17	0.14	0.19	0.22	0.11	0.31
	p-value (Mann-Whitney U)	0.167	0.666	0.719	0.944	0.319	0.751

【図 6 - 5】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		RPTOR_CpG _1	RPTOR_CpG _2	RPTOR_CpG _3	RPTOR_CpG _4	RPTOR_CpG _5	RPTOR_CpG _8
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.05	0.18	0.59	0.77	0.73	0.67
	Stage II (68)	0.07	0.19	0.62	0.81	0.72	0.67
	Stage III&IV (18)	0.08	0.24	0.63	0.79	0.77	0.72
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.328	0.152	0.191	0.847	0.527	0.514
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.05	0.18	0.59	0.77	0.72	0.67
	T2 (60)	0.08	0.21	0.62	0.77	0.73	0.69
	T3 and T4 (13)	0.09	0.29	0.66	0.83	0.78	0.67
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.165	0.197	0.130	0.748	0.614	0.232
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.07	0.20	0.60	0.77	0.74	0.68
	1-3 involved LN (37)	0.06	0.19	0.59	0.73	0.70	0.63
	> 3 involved LN (6)	0.06	0.23	0.62	0.76	0.80	0.73
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.955	0.177	0.374	0.487	0.080	0.008
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.07	0.18	0.60	0.78	0.73	0.68
	Grade 2 (94)	0.07	0.20	0.60	0.77	0.74	0.68
	Grade 3 (33)	0.06	0.19	0.62	0.79	0.71	0.68
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.669	0.426	0.456	0.868	0.719	0.987
ER status (147)	ER negative (23)	0.04	0.19	0.59	0.75	0.71	0.69
	ER positive (125)	0.07	0.20	0.60	0.77	0.74	0.67
	p-value (Mann-Whitney U)	0.139	0.449	0.628	0.694	0.525	0.757
	PR negative (32)	0.06	0.19	0.61	0.79	0.72	0.69
PR status (148)	PR positive (116)	0.07	0.20	0.60	0.77	0.73	0.67
	p-value (Mann-Whitney U)	0.267	0.755	0.492	0.812	0.812	0.416
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.07	0.19	0.60	0.75	0.72	0.68
	Her2 positive (34)	0.09	0.23	0.64	0.86	0.78	0.68
	p-value (Mann-Whitney U)	0.463	0.065	0.090	0.002	0.036	0.862
	Tripple negative (17)	0.04	0.17	0.59	0.75	0.69	0.69
Three receptor status (148)	Others (131)	0.07	0.20	0.60	0.77	0.74	0.68
	p-value (Mann-Whitney U)	0.102	0.178	0.496	0.564	0.068	0.817
	premenopause (105)	0.07	0.19	0.59	0.79	0.72	0.67
	postmenopause (43)	0.06	0.20	0.62	0.75	0.77	0.68
	p-value (Mann-Whitney U)	0.687	0.463	0.202	0.090	0.099	0.078

【図 6 - 6】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		MGRN1_CpG_1	MGRN1_CpG_2	MGRN1_CpG_4	MGRN1_CpG_12	MGRN1_CpG_13	
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.12	0.60	0.23	0.23	0.36	0.60
	Stage II (68)	0.14	0.62	0.27	0.29	0.35	0.62
	Stage III&IV (18)	0.21	0.63	0.31	0.34	0.37	0.63
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.136	0.057	0.002	0.002	0.001	0.050
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.14	0.59	0.25	0.26	0.30	0.59
	T2 (60)	0.12	0.61	0.26	0.28	0.32	0.61
	T3 and T4 (13)	0.29	0.69	0.38	0.36	0.46	0.69
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.005	0.003	0.002	0.004	0.001	0.003
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.13	0.61	0.25	0.27	0.30	0.61
	1-3 involved LN (37)	0.14	0.61	0.29	0.29	0.34	0.61
	> 3 involved LN (6)	0.13	0.60	0.28	0.33	0.36	0.60
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.949	0.622	0.171	0.336	0.235	0.710
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.10	0.61	0.25	0.24	0.28	0.61
	Grade 2 (94)	0.14	0.61	0.26	0.29	0.33	0.61
	Grade 3 (33)	0.12	0.62	0.26	0.27	0.31	0.62
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.296	0.815	0.209	0.255	0.350	0.907
ER status (147)	ER negative (23)	0.12	0.62	0.26	0.27	0.30	0.62
	ER positive (125)	0.14	0.61	0.25	0.28	0.33	0.61
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.187	0.739	0.470	0.331	0.577	0.782
PR status (148)	PR negative (32)	0.12	0.62	0.25	0.28	0.31	0.63
	PR positive (116)	0.14	0.61	0.26	0.28	0.33	0.61
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.318	0.815	0.365	0.381	0.666	0.789
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.14	0.61	0.26	0.28	0.33	0.61
	Her2 positive (34)	0.14	0.61	0.25	0.29	0.32	0.61
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.306	0.950	0.535	0.612	0.909	0.669
Three receptor status (148)	Tripple negative (17)	0.13	0.62	0.27	0.28	0.34	0.62
	Others (131)	0.14	0.61	0.25	0.28	0.33	0.61
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.449	0.958	0.851	0.595	0.971	0.885
Menopause status (148)	premenopause (105)	0.14	0.61	0.25	0.27	0.32	0.61
	postmenopause (43)	0.15	0.62	0.27	0.29	0.33	0.64
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.541	0.259	0.190	0.324	0.373	0.127

【図 6 - 8】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels				
		MGRN1_CpG_28	MGRN1_CpG_29	MGRN1_CpG_31	MGRN1_CpG_32	MGRN1_CpG_34
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.26	0.35	0.29	0.24	0.33
	Stage II (68)	0.32	0.40	0.36	0.28	0.39
	Stage III&IV (18)	0.33	0.46	0.40	0.34	0.41
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.006	0.001	0.008	0.007	0.005
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.28	0.37	0.32	0.26	0.35
	T2 (60)	0.31	0.39	0.31	0.27	0.38
	T3 and T4 (13)	0.41	0.49	0.45	0.40	0.42
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.007	0.001	0.004	0.004	0.123
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.28	0.37	0.30	0.27	0.35
	1-3 involved LN (37)	0.31	0.40	0.37	0.27	0.39
	> 3 involved LN (6)	0.33	0.41	0.40	0.31	0.37
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.466	0.374	0.097	0.489	0.122
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.26	0.35	0.29	0.24	0.34
	Grade 2 (94)	0.31	0.39	0.35	0.27	0.37
	Grade 3 (33)	0.29	0.38	0.29	0.28	0.35
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.254	0.319	0.468	0.702	0.422
ER status (147)	ER negative (23)	0.28	0.39	0.33	0.27	0.35
	ER positive (125)	0.31	0.38	0.34	0.27	0.37
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.537	0.835	0.933	0.976	0.254
PR status (148)	PR negative (32)	0.29	0.39	0.36	0.27	0.35
	PR positive (116)	0.30	0.38	0.33	0.27	0.37
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.675	0.656	0.788	0.797	0.240
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.30	0.38	0.33	0.27	0.37
	Her2 positive (34)	0.30	0.38	0.35	0.26	0.37
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.619	0.674	0.678	0.910	0.700
Three receptor status (148)	Tripple negative (17)	0.31	0.40	0.33	0.28	0.36
	Others (131)	0.30	0.38	0.34	0.27	0.37
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.825	0.990	0.858	0.884	0.776
Menopause status (148)	premenopause (105)	0.29	0.38	0.33	0.26	0.36
	postmenopause (43)	0.31	0.38	0.36	0.29	0.39
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.502	0.594	0.652	0.131	0.172

【図 6 - 7】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels					
		MGRN1_CpG_15	MGRN1_CpG_16-17-18	MGRN1_CpG_19-20	MGRN1_CpG_22-23	MGRN1_CpG_26	MGRN1_CpG_27
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.29	0.29	0.32	0.29	0.28	0.26
	Stage II (68)	0.34	0.31	0.37	0.34	0.32	0.32
	Stage III&IV (18)	0.39	0.36	0.42	0.39	0.36	0.38
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.003	0.001	0.002	0.001	0.007	0.003
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.31	0.29	0.34	0.31	0.31	0.29
	T2 (60)	0.33	0.31	0.36	0.33	0.31	0.29
	T3 and T4 (13)	0.43	0.41	0.47	0.44	0.40	0.43
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.002	0.000	0.003	0.000	0.005	0.001
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.31	0.30	0.35	0.31	0.31	0.28
	1-3 involved LN (37)	0.34	0.33	0.38	0.34	0.33	0.31
	> 3 involved LN (6)	0.38	0.36	0.38	0.34	0.33	0.33
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.070	0.179	0.191	0.276	0.494	0.258
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.31	0.29	0.33	0.31	0.31	0.25
	Grade 2 (94)	0.34	0.32	0.37	0.34	0.31	0.30
	Grade 3 (33)	0.32	0.31	0.36	0.32	0.33	0.31
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.581	0.364	0.329	0.422	0.781	0.661
ER status (147)	ER negative (23)	0.32	0.31	0.36	0.32	0.31	0.31
	ER positive (125)	0.33	0.31	0.36	0.33	0.32	0.30
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.689	0.727	0.245	0.530	0.288	0.991
PR status (148)	PR negative (32)	0.33	0.31	0.36	0.33	0.31	0.32
	PR positive (116)	0.32	0.31	0.36	0.33	0.32	0.30
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.795	0.708	0.200	0.600	0.246	0.960
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.33	0.31	0.36	0.33	0.31	0.29
	Her2 positive (34)	0.31	0.31	0.36	0.32	0.31	0.32
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.929	0.686	0.896	0.957	0.892	0.425
Three receptor status (148)	Tripple negative (17)	0.33	0.31	0.37	0.32	0.31	0.34
	Others (131)	0.32	0.31	0.36	0.33	0.32	0.30
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.810	0.801	0.576	0.763	0.381	0.949
Menopause status (148)	premenopause (105)	0.32	0.30	0.36	0.32	0.31	0.30
	postmenopause (43)	0.34	0.33	0.36	0.33	0.33	0.32
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.563	0.202	0.423	0.483	0.279	0.206

【図 6 - 9】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels							
		RAPSN_CpG_1	RAPSN_CpG_2	RAPSN_CpG_4	RAPSN_CpG_5	RAPSN_CpG_6	RAPSN_CpG_7	RAPSN_CpG_8	
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	0.95	0.61	0.38	0.73	0.49	0.73	0.95	
	Stage II (68)	0.94	0.63	0.42	0.77	0.56	0.70	0.96	
	Stage III&IV (18)	0.95	0.63	0.41	0.75	0.56	0.74	0.96	
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.646	0.757	0.370	0.037	0.007	0.441	0.688	
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	0.94	0.61	0.38	0.73	0.51	0.73	0.96	
	T2 (60)	0.95	0.62	0.41	0.78	0.54	0.70	0.96	
	T3 and T4 (13)	0.97	0.64	0.53	0.71	0.65	0.73	0.96	
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.330	0.976	0.044	0.089	0.081	0.413	0.669	
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	0.95	0.62	0.40	0.74	0.51	0.73	0.96	
	1-3 involved LN (37)	0.94	0.62	0.39	0.76	0.55	0.69	0.96	
	> 3 involved LN (6)	0.97	0.59	0.41	0.75	0.59	0.77	0.98	
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.501	0.729	0.880	0.619	0.206	0.051	0.493	
Grading (187)	Grade 1 (20)	0.97	0.61	0.41	0.73	0.52	0.75	0.95	
	Grade 2 (94)	0.94	0.62	0.41	0.75	0.53	0.71	0.96	
	Grade 3 (33)	0.94	0.64	0.37	0.75	0.53	0.70	0.97	
	<i>p</i> -value (Kruskal Wallis Test)	0.264	0.767	0.453	0.827	0.796	0.585	0.082	
ER status (147)	ER negative (23)	0.94	0.64	0.35	0.73	0.47	0.71	0.96	
	ER positive (125)	0.95	0.62	0.41	0.75	0.53	0.72	0.96	
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.794	0.727	0.043	0.520	0.090	0.711	0.917	
PR status (148)	PR negative (32)	0.93	0.66	0.38	0.74	0.49	0.73	0.96	
	PR positive (116)	0.95	0.62	0.41	0.75	0.53	0.71	0.96	
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.137	0.773	0.217	0.818	0.389	0.510	0.891	
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	0.95	0.62	0.39	0.75	0.53	0.72	0.96	
	Her2 positive (34)	0.93	0.64	0.42	0.75	0.53	0.72	0.95	
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.001	0.608	0.553	0.544	0.583	0.798	0.374	
Three receptor status (148)	Triple negative (17)	0.94	0.65	0.35	0.75	0.47	0.72	0.96	
	Others (131)	0.95	0.62	0.41	0.75	0.53	0.71	0.96	
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.990	0.888	0.041	0.734	0.214	0.520	0.281	
Menopausa status (148)	premenopausa (105)	0.94	0.62	0.38	0.75	0.53	0.71	0.96	
	postmenopausa (43)	0.95	0.62	0.43	0.75	0.54	0.74	0.93	
	<i>p</i> -value (Mann-Whitney U)	0.540	0.788	0.016	0.891	0.418	0.234	0.636	

【 図 6 - 10 】

Table 6. The methylation levels of the eight genes in sporadic BC patients with different clinical characteristics (cases from the third validation study) (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels							
		miR1273p	miR148b	miR376a	miR376c	miR4093p	miR652	miR801	
Tumour stage (143)	Stage 0&I (57)	32.97	31.28	35.51	33.17	32.54	29.69	30.33	
	Stage II (68)	32.86	31.11	35.28	33.11	32.67	29.48	30.40	
	Stage III&IV (18)	32.92	31.23	35.07	33.17	32.74	29.71	30.17	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.996	0.571	0.578	0.853	0.736	0.268	0.611	
Tumour size (147)	Tis&T1 (74)	32.88	31.26	35.34	33.07	32.57	29.66	30.32	
	T2 (60)	32.93	31.15	35.19	33.13	32.76	29.55	30.43	
	T3 and T4 (13)	32.99	31.23	35.34	33.50	32.74	29.64	30.18	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.821	0.907	0.604	0.569	0.578	0.503	0.720	
Lymph node (LN) involvement (139)	no involved LN (96)	32.74	31.28	35.35	33.06	32.62	29.64	30.26	
	1-3 involved LN (37)	33.13	31.16	35.34	33.24	32.86	29.56	30.46	
	> 3 involved LN (6)	32.37	31.05	34.67	32.71	32.31	29.09	30.36	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.570	0.827	0.308	0.510	0.791	0.557	0.730	
Grading (187)	Grade 1 (20)	32.84	31.43	35.54	33.37	32.30	29.62	30.75	
	Grade 2 (94)	33.03	31.22	35.32	33.17	32.72	29.64	30.40	
	Grade 3 (33)	32.56	31.10	35.08	32.78	32.35	29.51	30.14	
	p-value (Kruskal Wallis Test)	0.766	0.402	0.988	0.883	0.443	0.607	0.191	
ER status (147)	ER negative (23)	32.65	31.36	35.07	32.98	32.33	29.80	30.25	
	ER positive (125)	32.98	31.22	35.35	33.18	32.71	29.59	30.39	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.657	0.973	0.316	0.706	0.325	0.897	0.460	
	PR negative (32)	32.74	31.36	35.08	33.18	32.41	29.83	30.25	
PR status (148)	PR positive (116)	32.97	31.22	35.34	33.17	32.69	29.57	30.39	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.955	0.732	0.536	0.990	0.788	0.496	0.313	
Her2 status (148)	Her2 negative (114)	32.96	31.23	35.32	33.19	32.70	29.60	30.29	
	Her2 positive (34)	32.82	31.24	35.34	33.07	32.62	29.64	30.58	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.528	0.816	0.698	0.693	0.889	0.643	0.276	
	Tripple negative (17)	32.65	31.22	34.86	33.03	31.89	29.88	30.25	
Three receptor status (148)	Others (131)	32.97	31.23	35.34	33.18	32.71	29.59	30.39	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.831	0.814	0.334	0.814	0.292	0.736	0.409	
Menopause status (148)	premenopause (105)	32.81	31.32	35.32	33.19	32.56	29.72	30.45	
	postmenopause (43)	32.99	31.10	35.36	33.16	33.03	29.52	30.14	
	p-value (Mann-Whitney U)	0.776	0.063	0.792	0.711	0.205	0.331	0.024	

Fig. 7

Table 7. Sample Description of blood-based biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer

Cohort	Sample types	Assays	Groups	Target N	Mean of age (range)	Median of age	HYAL2	S100P	SLC22A18	DYRK4	FUT7
PaCa case and controls	Peripheral blood DNA	MassARRAY	All controls	191	58.7 (21-68)	61	191 (100%)	191 (100%)	191 (99.5%)	191 (100%)	191 (100%)
			All PaCa cases	147	62.9 (19-86)	64	147 (100%)	147 (100%)	147 (100%)	147 (100%)	147 (100%)
			Male controls	115	59.0 (27-67)	58	115 (100%)	115 (100%)	115 (100%)	115 (100%)	115 (100%)
			Male PaCa case	80	62.9 (39-86)	63.5	80 (100%)	80 (100%)	80 (100%)	80 (100%)	80 (100%)
			Femal controls	76	60.0 (21-68)	63	76 (100%)	76 (100%)	75 (98.7%)	76 (100%)	76 (100%)
			Femal PaCa cas	67	62.0 (19-79)	66	67 (100%)	67 (100%)	67 (100%)	67 (100%)	67 (100%)

【 図 8 - 1 】

Table 8. Methylation differences in genes comparing PaCa cases and controls

CpG sites	Differences in methylation levels			
	Controls median (IQR)	PaCa cases median (IQR)	OR (95 % CI) * per -10% methylation	p-value *
HYAL2_CpG_1	0.35 (0.31-0.40)	0.25 (0.19-0.32)	2.09 (1.61-2.71)	2.68E-08
HYAL2_CpG_2	0.27 (0.23-0.31)	0.14 (0.09-0.18)	7.06 (4.58-10.88)	8.01E-19
HYAL2_CpG_3	0.43 (0.38-0.46)	0.29 (0.23-0.34)	7.94 (5.04-12.50)	3.94E-19
HYAL2_CpG_4	0.61 (0.56-0.66)	0.48 (0.43-0.55)	4.24 (3.01-5.98)	1.37E-16
S100P_CpG_2&3	0.73 (0.69-0.77)	0.59 (0.54-0.63)	14.07 (8.04-24.61)	1.97E-20
S100P_CpG_4	0.74 (0.65-0.90)	0.62 (0.55-0.82)	1.55 (1.33-1.82)	4.90E-08
S100P_CpG_7	0.64 (0.54-0.73)	0.31 (0.21-0.42)	4.03 (3.01-5.39)	6.51E-21
S100P_CpG_8	0.54 (0.47-0.61)	0.33 (0.25-0.40)	3.85 (2.87-5.16)	2.45E-19
S100P_CpG_9	0.62 (0.56-0.68)	0.43 (0.36-0.50)	5.02 (3.55-7.09)	6.61E-20
SLC22A18_CpG_1	0.34 (0.26-0.39)	0.17 (0.13-0.23)	5.28 (3.60-7.57)	1.17E-19
SLC22A18_CpG_3	0.23 (0.17-0.27)	0.12 (0.09-0.17)	8.81 (5.48-14.18)	3.03E-19
SLC22A18_CpG_4	0.30 (0.23-0.38)	0.13 (0.08-0.20)	4.23 (3.07-5.83)	1.03E-18
SLC22A18_CpG_6	0.30 (0.25-0.36)	0.17 (0.11-0.23)	5.14 (3.59-7.35)	3.98E-19
SLC22A18_CpG_8	0.68 (0.62-0.74)	0.57 (0.49-0.65)	2.13 (1.70-2.68)	7.17E-11
DYRK4_CpG_1	0.59 (0.37-0.75)	0.18 (0.02-0.49)	1.46 (1.33-1.62)	3.85E-14
DYRK4_CpG_3	0.32 (0.25-0.35)	0.32 (0.14-0.35)	1.20 (1.02-1.41)	0.032
FUT7_CpG_1	0.49 (0.36-0.61)	0.21 (0.15-0.36)	1.99 (1.70-2.33)	1.63E-17
FUT7_CpG_2	0.42 (0.37-0.47)	0.27 (0.22-0.33)	6.95 (4.55-10.61)	2.77E-19
FUT7_CpG_3	0.21 (0.11-0.31)	0.06 (0.03-0.16)	2.77 (2.10-3.66)	6.21E-13
FUT7_CpG_4	0.40 (0.33-0.66)	0.26 (0.21-0.35)	2.00 (1.66-2.41)	3.13E-13
FUT7_CpG_6	0.31 (0.22-0.39)	0.14 (0.08-0.22)	2.36 (1.88-2.98)	3.12E-13
FUT7_CpG_7	0.15 (0.09-0.22)	0.05 (0.01-0.10)	3.65 (2.54-5.25)	2.28E-12
FUT7_CpG_8	0.30 (0.20-0.39)	0.15 (0.10-0.25)	2.05 (1.65-2.53)	4.25E-11
All CpG panel				2.157E-26

* logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements

【 図 8 - 2 】

Table 8. Methylation differences in genes comparing PaCa cases and controls (continued)

CpG sites	Early stage (Stage0&1&2) vs All controls			
	Controls median (IQR)	PaCa early cases median (IQR)	OR (95 % CI) * per -10% methylation	p-value *
HYAL2_CpG_1	0.35 (0.31-0.40)	0.27 (0.20-0.33)	2.04 (1.46-2.84)	2.93E-05
HYAL2_CpG_2	0.27 (0.23-0.31)	0.14 (0.08-0.18)	6.29 (3.88-10.18)	7.83E-14
HYAL2_CpG_3	0.43 (0.38-0.46)	0.28 (0.23-0.34)	7.37 (4.41-12.29)	2.01E-14
HYAL2_CpG_4	0.61 (0.56-0.66)	0.47 (0.42-0.54)	5.54 (3.54-8.70)	8.71E-14
S100P_CpG_2&3	0.73 (0.69-0.77)	0.59 (0.54-0.63)	15.48 (7.84-30.55)	2.86E-15
S100P_CpG_4	0.74 (0.65-0.90)	0.63 (0.56-0.81)	1.58 (1.29-1.94)	1.12E-05
S100P_CpG_7	0.64 (0.54-0.73)	0.31 (0.21-0.47)	3.77 (2.72-5.23)	1.50E-15
S100P_CpG_8	0.54 (0.47-0.61)	0.34 (0.26-0.40)	4.00 (2.80-5.71)	2.26E-14
S100P_CpG_9	0.62 (0.56-0.68)	0.43 (0.36-0.52)	5.17 (3.43-7.80)	4.15E-15
SLC22A18_CpG_1	0.34 (0.26-0.39)	0.18 (0.14-0.23)	5.48 (3.50-8.56)	8.53E-14
SLC22A18_CpG_3	0.23 (0.17-0.27)	0.11 (0.08-0.15)	13.25 (6.89-25.48)	9.63E-15
SLC22A18_CpG_4	0.30 (0.23-0.38)	0.10 (0.07-0.18)	5.49 (3.56-8.49)	1.64E-14
SLC22A18_CpG_6	0.30 (0.25-0.36)	0.14 (0.11-0.22)	5.47 (3.54-8.47)	2.28E-14
SLC22A18_CpG_8	0.68 (0.62-0.74)	0.57 (0.48-0.65)	2.35 (1.76-3.14)	7.50E-09
DYRK4_CpG_1	0.59 (0.37-0.75)	0.17 (0.02-0.49)	1.50 (1.33-1.70)	2.06E-10
DYRK4_CpG_3	0.32 (0.25-0.35)	0.32 (0.12-0.35)	1.32 (1.05-1.65)	0.019
FUT7_CpG_1	0.49 (0.36-0.61)	0.21 (0.12-0.31)	1.94 (1.61-2.34)	5.49E-12
FUT7_CpG_2	0.42 (0.37-0.47)	0.27 (0.22-0.35)	6.23 (3.87-10.04)	5.65E-14
FUT7_CpG_3	0.21 (0.11-0.31)	0.08 (0.04-0.18)	2.31 (1.69-3.16)	1.29E-07
FUT7_CpG_4	0.40 (0.33-0.66)	0.27 (0.21-0.36)	2.01 (1.59-2.55)	5.86E-09
FUT7_CpG_6	0.31 (0.22-0.39)	0.14 (0.09-0.26)	2.10 (1.61-2.75)	4.41E-08
FUT7_CpG_7	0.15 (0.09-0.22)	0.05 (0.01-0.09)	3.25 (2.14-4.95)	3.68E-08
FUT7_CpG_8	0.30 (0.20-0.39)	0.15 (0.10-0.26)	1.92 (1.50-2.46)	2.74E-07
All CpG panel				2.166E-18

* logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements

【 9 - 1 】

Table 9. Methylation differences in genes comparing PaCa cases and controls stratified by gender

CpG sites	Male samples			
	male controls median (IQR)	male PaCa cases median (IQR)	OR (95 % CI) * per -10% methylation	p-value *
HYAL2_CpG_1	0.36 (0.31-0.41)	0.25 (0.20-0.32)	2.43 (1.68-3.53)	2.60E-06
HYAL2_CpG_2	0.28 (0.23-0.31)	0.14 (0.10-0.18)	20.70 (8.69-49.27)	7.56E-12
HYAL2_CpG_3	0.43 (0.39-0.47)	0.28 (0.23-0.34)	9.60 (5.00-18.43)	1.10E-11
HYAL2_CpG_4	0.63 (0.56-0.68)	0.47 (0.42-0.54)	4.95 (3.07-7.98)	5.35E-11
S100P_CpG_2&3	0.74 (0.69-0.77)	0.59 (0.54-0.63)	14.72 (6.98-31.04)	1.59E-12
S100P_CpG_4	0.78 (0.67-0.91)	0.63 (0.56-0.83)	1.63 (1.32-2.02)	6.10E-06
S100P_CpG_7	0.65 (0.59-0.76)	0.34 (0.21-0.43)	5.25 (3.24-8.48)	1.39E-11
S100P_CpG_8	0.56 (0.49-0.63)	0.35 (0.25-0.42)	4.27 (2.81-6.47)	8.94E-12
S100P_CpG_9	0.64 (0.58-0.68)	0.44 (0.36-0.51)	6.56 (3.85-11.19)	4.75E-12
SLC22A18_CpG_1	0.35 (0.27-0.40)	0.17 (0.12-0.25)	4.39 (2.86-6.75)	1.46E-11
SLC22A18_CpG_3	0.23 (0.17-0.27)	0.12 (0.08-0.17)	6.08 (3.52-10.52)	9.95E-11
SLC22A18_CpG_4	0.30 (0.23-0.39)	0.13 (0.09-0.22)	4.56 (2.94-7.08)	1.17E-11
SLC22A18_CpG_6	0.30 (0.25-0.37)	0.17 (0.13-0.26)	4.11 (2.66-6.34)	1.68E-10
SLC22A18_CpG_8	0.68 (0.63-0.76)	0.61 (0.52-0.67)	1.87 (1.41-2.47)	1.21E-05
DYRK4_CpG_1	0.62 (0.39-0.75)	0.24 (0.03-0.56)	1.38 (1.22-1.57)	2.77E-07
DYRK4_CpG_3	0.32 (0.26-0.35)	0.31 (0.09-0.35)	1.21 (0.99-1.49)	0.068
FUT7_CpG_1	0.52 (0.40-0.64)	0.21 (0.15-0.31)	2.14 (1.72-2.67)	8.28E-12
FUT7_CpG_2	0.44 (0.39-0.49)	0.27 (0.22-0.33)	6.44 (3.73-11.12)	2.26E-11
FUT7_CpG_3	0.22 (0.12-0.33)	0.07 (0.04-0.13)	3.15 (2.12-4.70)	1.58E-08
FUT7_CpG_4	0.42 (0.32-0.69)	0.26 (0.21-0.36)	2.12 (1.64-2.74)	1.08E-08
FUT7_CpG_6	0.32 (0.25-0.39)	0.14 (0.08-0.22)	2.27 (1.70-3.04)	3.40E-08
FUT7_CpG_7	0.17 (0.09-0.22)	0.05 (0.01-0.10)	3.32 (2.11-5.20)	1.91E-07
FUT7_CpG_8	0.33 (0.21-0.41)	0.15 (0.09-0.23)	2.21 (1.66-2.93)	5.82E-08
All CpG panel				8.28E-12

* logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements

【 9 - 2 】

Table 9. Methylation differences in genes comparing PaCa cases and controls stratified by gender (continued)

CpG sites	Female samples			
	female controls median (IQR)	female PaCa cases median	OR (95 % CI) * per -10% methylation	p-value *
HYAL2_CpG_1	0.35 (0.30-0.38)	0.25 (0.19-0.33)	1.76 (1.22-2.54)	0.002
HYAL2_CpG_2	0.25 (0.21-0.30)	0.14 (0.08-0.18)	3.44 (2.09-5.66)	1.00E-06
HYAL2_CpG_3	0.41 (0.37-0.44)	0.30 (0.23-0.34)	6.88 (3.52-13.46)	1.73E-08
HYAL2_CpG_4	0.60 (0.55-0.64)	0.48 (0.43-0.55)	3.41 (2.09-5.58)	1.02E-06
S100P_CpG_2&3	0.72 (0.68-0.75)	0.60 (0.53-0.63)	13.61 (5.72-32.39)	3.55E-09
S100P_CpG_4	0.69 (0.63-0.88)	0.61 (0.55-0.80)	1.45 (1.14-1.84)	0.003
S100P_CpG_7	0.60 (0.51-0.68)	0.29 (0.20-0.37)	3.23 (2.24-4.67)	4.19E-10
S100P_CpG_8	0.51 (0.46-0.58)	0.31 (0.25-0.39)	3.39 (2.23-5.15)	1.14E-08
S100P_CpG_9	0.59 (0.54-0.66)	0.43 (0.35-0.49)	3.84 (2.43-6.06)	8.97E-09
SLC22A18_CpG_1	0.32 (0.24-0.37)	0.17 (0.14-0.21)	8.59 (4.28-17.23)	1.44E-09
SLC22A18_CpG_3	0.22 (0.17-0.26)	0.11 (0.08-0.15)	19.70 (7.63-50.83)	7.22E-10
SLC22A18_CpG_4	0.29 (0.22-0.37)	0.13 (0.06-0.19)	4.24 (2.58-6.98)	1.25E-08
SLC22A18_CpG_6	0.28 (0.25-0.34)	0.14 (0.11-0.21)	8.75 (4.40-17.38)	6.06E-10
SLC22A18_CpG_8	0.65 (0.61-0.71)	0.55 (0.47-0.63)	2.76 (1.83-4.16)	1.32E-06
DYRK4_CpG_1	0.56 (0.35-0.73)	0.16 (0.02-0.37)	1.62 (1.36-1.92)	3.33E-08
DYRK4_CpG_3	0.32 (0.24-0.35)	0.32 (0.23-0.35)	1.20 (0.90-1.59)	0.215
FUT7_CpG_1	0.47 (0.30-0.54)	0.19 (0.09-0.36)	1.82 (1.44-2.30)	5.16E-07
FUT7_CpG_2	0.40 (0.35-0.45)	0.26 (0.22-0.33)	7.99 (4.03-15.86)	2.81E-09
FUT7_CpG_3	0.17 (0.09-0.25)	0.06 (0.03-0.17)	2.37 (1.58-3.53)	2.61E-05
FUT7_CpG_4	0.40 (0.34-0.60)	0.26 (0.19-0.35)	1.89 (1.44-2.48)	4.88E-06
FUT7_CpG_6	0.26 (0.18-0.39)	0.13 (0.08-0.20)	2.50 (1.71-3.68)	2.79E-06
FUT7_CpG_7	0.13 (0.09-0.22)	0.05 (0.02-0.09)	4.17 (2.27-7.68)	4.28E-06
FUT7_CpG_8	0.27 (0.18-0.36)	0.15 (0.10-0.26)	1.86 (1.34-2.57)	1.75E-04
All CpG panel				7.24E-12

* logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements

【 10 】

Table 10. The discriminatory power of the methylation in genes to distinguish PaCa cases from healthy controls

CpG sites	Area under curve (AUC), 95% CI			
	all PaCa cases vs. all controls	stage 0&I&II PaCa cases vs. all controls	Male, PaCa cases vs. controls	Female, PaCa cases vs. controls
HYAL2_CpG_1	0.77 (0.72-0.83)	0.76 (0.68-0.83)	0.79 (0.72-0.86)	0.75 (0.66-0.83)
HYAL2_CpG_2	0.90 (0.86-0.94)	0.90 (0.85-0.95)	0.94 (0.90-0.97)	0.86 (0.79-0.92)
HYAL2_CpG_3	0.90 (0.86-0.94)	0.90 (0.85-0.94)	0.92 (0.88-0.96)	0.87 (0.81-0.94)
HYAL2_CpG_4	0.86 (0.82-0.90)	0.87 (0.82-0.93)	0.89 (0.83-0.94)	0.83 (0.75-0.90)
S100P_CpG_2&3	0.93 (0.89-0.96)	0.92 (0.87-0.96)	0.93 (0.89-0.97)	0.92 (0.87-0.97)
S100P_CpG_4	0.74 (0.68-0.79)	0.75 (0.67-0.82)	0.75 (0.68-0.83)	0.71 (0.63-0.80)
S100P_CpG_7	0.94 (0.91-0.96)	0.92 (0.88-0.96)	0.96 (0.93-0.98)	0.92 (0.87-0.97)
S100P_CpG_8	0.90 (0.86-0.94)	0.88 (0.83-0.94)	0.91 (0.86-0.96)	0.89 (0.83-0.96)
S100P_CpG_9	0.90 (0.86-0.94)	0.89 (0.84-0.94)	0.93 (0.88-0.97)	0.87 (0.80-0.93)
SLC22A18_CpG_1	0.88 (0.84-0.91)	0.87 (0.82-0.92)	0.87 (0.81-0.92)	0.90 (0.85-0.95)
SLC22A18_CpG_3	0.87 (0.84-0.91)	0.89 (0.84-0.93)	0.85 (0.80-0.91)	0.91 (0.86-0.96)
SLC22A18_CpG_4	0.88 (0.84-0.92)	0.89 (0.84-0.93)	0.88 (0.83-0.93)	0.90 (0.85-0.96)
SLC22A18_CpG_6	0.86 (0.82-0.90)	0.85 (0.80-0.90)	0.85 (0.79-0.90)	0.89 (0.84-0.95)
SLC22A18_CpG_8	0.77 (0.72-0.82)	0.77 (0.71-0.84)	0.76 (0.69-0.83)	0.80 (0.73-0.88)
DYRK4_CpG_1	0.79 (0.74-0.84)	0.79 (0.72-0.85)	0.78 (0.71-0.85)	0.82 (0.75-0.89)
DYRK4_CpG_3	0.67 (0.60-0.73)	0.67 (0.59-0.75)	0.69 (0.61-0.77)	0.63 (0.53-0.72)
FUT7_CpG_1	0.85 (0.81-0.89)	0.84 (0.78-0.90)	0.88 (0.83-0.93)	0.80 (0.73-0.88)
FUT7_CpG_2	0.90 (0.87-0.94)	0.88 (0.83-0.93)	0.90 (0.86-0.95)	0.90 (0.85-0.96)
FUT7_CpG_3	0.81 (0.77-0.86)	0.77 (0.71-0.84)	0.84 (0.79-0.90)	0.77 (0.69-0.85)
FUT7_CpG_4	0.83 (0.78-0.87)	0.82 (0.76-0.87)	0.85 (0.79-0.90)	0.81 (0.73-0.88)
FUT7_CpG_6	0.82 (0.77-0.86)	0.78 (0.72-0.85)	0.82 (0.76-0.88)	0.80 (0.72-0.87)
FUT7_CpG_7	0.83 (0.78-0.87)	0.80 (0.74-0.87)	0.83 (0.77-0.89)	0.81 (0.74-0.88)
FUT7_CpG_8	0.78 (0.74-0.83)	0.77 (0.71-0.83)	0.81 (0.75-0.87)	0.76 (0.68-0.83)
All CpG panel	0.98 (0.96-0.99)	0.98 (0.96-0.99)	0.99 (0.97-1.00)	0.98 (0.96-1.00)

【 11 - 1 】

Table 11. The methylation of genes in PaCa patients with different clinical characteristics

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of age											
		HYAL2_CpG_1	HYAL2_CpG_2	HYAL2_CpG_3	HYAL2_CpG_4	HYAL2_CpG_6	HYAL2_CpG_8	HYAL2_CpG_9	DYRK4_CpG_1	DYRK4_CpG_3	S100P_CpG_2&3	S100P_CpG_4	S100P_CpG_7
Tumour stage (108)	Stage 0&I&II (79)	63.56	0.27	0.14	0.28	0.47	0.17	0.32	0.59	0.63	0.31	0.34	0.43
	Stage III&IV (29)	67.55	0.25	0.14	0.30	0.48	0.18	0.29	0.59	0.61	0.34	0.35	0.45
	p-value*	0.294	0.635	0.477	0.519	0.703	0.903	0.873	0.771	0.558	0.718	0.972	0.642
Tumour size (98)	< T3 (10)	63.67	0.27	0.14	0.31	0.49	0.25	0.30	0.61	0.77	0.32	0.37	0.44
	T3 & T4 (88)	64.15	0.25	0.13	0.28	0.47	0.16	0.32	0.59	0.61	0.31	0.34	0.44
	p-value*	0.699	0.729	0.647	0.304	0.327	0.507	0.298	0.259	0.043	0.860	0.967	0.842
Lymph node (14)	NO (28)	63.67	0.27	0.15	0.29	0.47	0.22	0.32	0.61	0.61	0.35	0.37	0.44
	NI (71)	63.92	0.24	0.13	0.28	0.47	0.16	0.33	0.58	0.63	0.30	0.31	0.42
	p-value*	0.907	0.189	0.834	0.292	0.602	0.750	0.362	0.423	0.386	0.950	0.771	0.809
metastasis status	M0 (91)	63.56	0.26	0.14	0.28	0.47	0.17	0.32	0.59	0.62	0.31	0.34	0.43
	M1 (20)	67.84	0.25	0.15	0.31	0.49	0.29	0.31	0.60	0.62	0.34	0.35	0.46
	p-value*	0.199	0.687	0.659	0.478	0.343	0.562	0.875	0.942	0.800	0.602	0.939	0.461
Grading (83)	Grade 1&2 (53)	64.20	0.26	0.14	0.28	0.45	0.16	0.32	0.57	0.63	0.29	0.31	0.44
	Grade 3 (30)	63.41	0.21	0.14	0.29	0.49	0.17	0.33	0.59	0.61	0.33	0.35	0.42
	p-value*	0.798	0.013	0.939	0.367	0.292	0.943	0.562	0.189	0.791	0.290	0.448	0.974
Gender (147) cases	Male (80)	63.50	0.25	0.14	0.28	0.47	0.24	0.31	0.59	0.63	0.34	0.35	0.44
	Female (67)	66.33	0.25	0.14	0.30	0.48	0.16	0.32	0.60	0.61	0.29	0.31	0.43
	p-value*	0.605	0.853	0.933	0.784	0.301	0.134	0.239	0.907	0.491	0.234	0.425	0.713

* The p-values are calculated by Mann-Whitney Test

【 1 1 - 2 】

Table 11. The methylation of genes in PaCa patients with different clinical characteristics (continued)

Clinical characteristics (N)	Group (N)	Median of methylation levels													
		SLC22A18_CpG_1	SLC22A18_CpG_2	SLC22A18_CpG_3	SLC22A18_CpG_4	SLC22A18_CpG_5	SLC22A18_CpG_6	SLC22A18_CpG_7	SLC22A18_CpG_8	FUT7_CpG_1	FUT7_CpG_2	FUT7_CpG_3	FUT7_CpG_4	FUT7_CpG_5	FUT7_CpG_6
Tumour stage (108)	Stage I&II (79)	0.18	0.12	0.13	0.16	0.57	0.22	0.27	0.08	0.27	0.14	0.05	0.15	0.15	0.15
	Stage III&IV (29)	0.19	0.12	0.15	0.17	0.59	0.17	0.24	0.05	0.25	0.11	0.03	0.13	0.13	0.13
	p-value*	0.530	0.555	0.910	0.586	0.182	0.272	0.419	0.047	0.952	0.114	0.340	0.298	0.11	0.11
Tumour size (98)	< T3 (10)	0.17	0.10	0.12	0.14	0.54	0.19	0.25	0.06	0.24	0.09	0.03	0.11	0.15	0.15
	T3 & T4 (88)	0.19	0.12	0.15	0.17	0.60	0.21	0.27	0.07	0.26	0.15	0.04	0.15	0.15	0.15
	p-value*	0.468	0.264	0.288	0.092	0.068	0.253	0.191	0.601	0.235	0.008	0.336	0.130	0.130	0.130
Lymph node (LN)	N0 (28)	0.17	0.12	0.14	0.17	0.61	0.17	0.22	0.08	0.27	0.12	0.04	0.13	0.13	0.13
	N1 (71)	0.19	0.12	0.14	0.17	0.58	0.23	0.27	0.07	0.25	0.14	0.04	0.17	0.17	0.17
	p-value*	0.789	0.235	0.793	0.679	0.954	0.039	0.106	0.837	0.227	0.189	0.634	0.098	0.098	0.098
metastasis status	N0 (91)	0.18	0.12	0.14	0.17	0.59	0.21	0.27	0.07	0.26	0.14	0.04	0.15	0.15	0.15
	M1 (20)	0.19	0.12	0.14	0.17	0.58	0.21	0.27	0.06	0.24	0.12	0.05	0.14	0.14	0.14
	p-value*	0.712	0.794	0.443	0.933	0.651	0.771	0.519	0.236	0.822	0.933	0.717	0.985	0.985	0.985
Grading (83)	Grade 1&2 (53)	0.17	0.11	0.14	0.14	0.57	0.18	0.25	0.06	0.25	0.13	0.03	0.14	0.14	0.14
	Grade 3 (30)	0.19	0.13	0.19	0.20	0.63	0.22	0.28	0.07	0.25	0.16	0.07	0.17	0.17	0.17
	p-value*	0.120	0.065	0.060	0.103	0.288	0.090	0.123	0.180	0.795	0.072	0.068	0.144	0.144	0.144
Gender (147) cases	Male (80)	0.17	0.13	0.13	0.17	0.61	0.21	0.27	0.07	0.26	0.14	0.05	0.15	0.15	0.15
	Female (67)	0.17	0.11	0.13	0.14	0.55	0.24	0.26	0.06	0.26	0.13	0.05	0.15	0.15	0.15
	p-value*	0.502	0.057	0.639	0.117	0.003	0.784	0.648	0.700	0.791	0.745	0.953	0.994	0.994	0.994

* The p-values are calculated by Mann-Whitney Test

【 1 2 - 1 】

Fig. 12

Table 12. Sample Description of blood-based biomarker panel for the early detection of ovarian cancer

Sample types	Assays	Sample resources	Groups	Target N	mean of age (range)	median of age	HYAL2	S100P	SLC22A18	FUT7
DNA from blood pellet	MassARRAY	University hospital of Heidelberg	controls	148	37.9 (21-63)	38	147 (99.3%)	147 (99.3%)	147 (99.3%)	144 (97.3%)
		University hospital of Heidelberg	OvCa cases	84	61.8 (37-80)	61.5	84 (100.0%)	78 (92.9%)	84 (100.0%)	82 (97.6%)

【 1 2 - 2 】

Table 19. The methylation levels of SLC22A18 CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald	Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg10943932	0.5082	0.000	36	11	2879409	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA	NA
cg02081198	0.6399	0.000	36	11	2879421	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA	NA
cg05385260	0.0511	-0.005	36	11	2879428	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA	NA
cg16035277	0.4744	0.005	36	11	2879940	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA	NA
cg09781437	0.0128	0.002	36	11	2879986	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA	NA
cg02200456	0.4292	-0.001	36	11	2880012	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA	NA
cg13671930	0.6034	0.003	36	11	2880014	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA	NA
cg22132309	0.7142	0.001	36	11	2880066	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA	NA
cg16184736	0.2003	-0.001	36	11	2880074	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA	NA
cg03829241	0.4543	0.001	36	11	2880080	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA	NA
cg17992161	0.0850	0.006	36	11	2880101	5'UTR;1stExon;5'UTR;5'UTR	NA	NA
cg12733707	0.0846	0.005	36	11	2880123	5'UTR;1stExon;5'UTR;5'UTR	NA	NA
cg24139421	0.9971	0.001	36	11	2880154	5'UTR;1stExon;5'UTR;5'UTR	NA	NA
cg06211616	0.8977	0.002	36	11	2880235	5'UTR;5'UTR;5'UTR	NA	NA
cg24528523	0.7157	0.000	36	11	2880384	5'UTR;5'UTR;5'UTR	NA	NA
cg12911952	0.0388	-0.007	36	11	2881099	5'UTR;5'UTR;5'UTR	NA	NA
cg02719634	0.0932	-0.019	36	11	2881475	1stExon;Body;5'UTR;Body	TRUE	TRUE
cg15729154	0.0364	-0.018	36	11	2881602	1stExon;Body;5'UTR;Body	TRUE	TRUE
cg07161669	0.2605	0.000	36	11	2881763	Body;Body;TSS200	TRUE	TRUE
cg24724917	0.4820	-0.002	36	11	2882015	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg06495763	0.8721	-0.001	36	11	2882046	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg06048910	0.2015	-0.001	36	11	2882049	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg08472797	0.2778	-0.003	36	11	2882146	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg14101500	0.4686	0.000	36	11	2882170	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg22833478	0.5602	-0.001	36	11	2882199	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg26137286	0.0522	-0.006	36	11	2882210	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg02390725	0.0040	-0.010	36	11	2882344	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg20716202	0.0779	-0.005	36	11	2882423	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg08999895	0.2548	-0.005	36	11	2882445	Body;Body;TSS1500	TRUE	TRUE
cg16530128	0.5740	-0.002	36	11	2882527	Body;Body;TSS1500	NA	NA
cg08827700	0.0045	-0.008	36	11	2882545	Body;Body;TSS1500	NA	NA
cg22272492	0.0009	-0.010	36	11	2882572	Body;Body;TSS1500	NA	NA
cg21991825	0.6773	0.002	36	11	2882719	Body;Body;TSS1500	NA	NA
cg23912877	0.6175	0.000	36	11	2882913	Body;Body;TSS1500	NA	NA
cg06981073	0.5191	-0.001	36	11	2882920	Body;Body;TSS1500	NA	NA
cg06669405	0.0170	-0.010	36	11	2882937	Body;Body;TSS1500	NA	NA

【 1 3 】

Table 13. Methylation differences in genes comparing OvCa cases and controls

CpG sites	All samples		
	controls median (IQR)	OvCa cases median (IQR)	p-value *
HYAL2_CpG_1	0.33 (0.29-0.37)	0.25 (0.20-0.32)	1.57E-08
HYAL2_CpG_2	0.21 (0.18-0.24)	0.15 (0.11-0.20)	1.57E-09
HYAL2_CpG_3	0.37 (0.32-0.40)	0.32 (0.25-0.36)	4.08E-07
HYAL2_CpG_4	0.53 (0.50-0.58)	0.47 (0.41-0.54)	2.51E-07
S100P_CpG_2&3	0.66 (0.63-0.69)	0.63 (0.58-0.67)	0.008
S100P_CpG_4	0.65 (0.60-0.86)	0.63 (0.57-0.86)	0.351
S100P_CpG_7	0.44 (0.38-0.51)	0.33 (0.23-0.41)	3.53E-09
S100P_CpG_8	0.43 (0.40-0.49)	0.39 (0.31-0.46)	3.92E-04
S100P_CpG_9	0.49 (0.44-0.52)	0.43 (0.37-0.48)	3.32E-06
SLC22A18_CpG_3	0.19 (0.16-0.23)	0.13 (0.10-0.18)	4.50E-11
SLC22A18_CpG_4	0.25 (0.22-0.30)	0.16 (0.12-0.25)	2.74E-10
SLC22A18_CpG_6	0.24 (0.22-0.28)	0.16 (0.12-0.24)	9.47E-12
SLC22A18_CpG_8	0.66 (0.62-0.70)	0.57 (0.48-0.62)	3.43E-12
FUT7_CpG_1	0.41 (0.34-0.46)	0.28 (0.20-0.39)	3.13E-10
FUT7_CpG_2	0.21 (0.17-0.25)	0.14 (0.11-0.19)	8.80E-09
FUT7_CpG_3	0.16 (0.11-0.20)	0.10 (0.05-0.16)	8.31E-08
FUT7_CpG_4	0.20 (0.16-0.23)	0.16 (0.11-0.22)	0.001
FUT7_CpG_6	0.28 (0.21-0.34)	0.14 (0.11-0.24)	2.79E-10
FUT7_CpG_7	0.14 (0.10-0.17)	0.07 (0.04-0.12)	2.02E-09
FUT7_CpG_8	0.38 (0.31-0.42)	0.24 (0.15-0.35)	2.57E-10
All CpG panel			7.42E-16

* logistic regression, adjusted for different batches for the measurements

【図 14】

Table 14. The discriminatory power of the methylation in genes to distinguish OvCa cases from healthy controls

CpG sites	Area under curve (AUC), 95% CI
	All samples
HYAL2_CpG_1	0.77 (0.70-0.84)
HYAL2_CpG_2	0.77 (0.70-0.83)
HYAL2_CpG_3	0.72 (0.65-0.79)
HYAL2_CpG_4	0.70 (0.63-0.78)
S100P_CpG_2&3	0.62 (0.54-0.71)
S100P_CpG_4	0.56 (0.48-0.64)
S100P_CpG_7	0.77 (0.70-0.84)
S100P_CpG_8	0.66 (0.58-0.75)
S100P_CpG_9	0.70 (0.62-0.77)
SLC22A18_CpG_3	0.79 (0.72-0.85)
SLC22A18_CpG_4	0.77 (0.70-0.84)
SLC22A18_CpG_6	0.79 (0.72-0.86)
SLC22A18_CpG_8	0.82 (0.76-0.88)
FUT7_CpG_1	0.76 (0.69-0.83)
FUT7_CpG_2	0.76 (0.69-0.82)
FUT7_CpG_3	0.73 (0.66-0.80)
FUT7_CpG_4	0.64 (0.56-0.72)
FUT7_CpG_6	0.78 (0.71-0.85)
FUT7_CpG_7	0.77 (0.70-0.84)
FUT7_CpG_8	0.77 (0.70-0.84)
All CpG panel	0.91 (0.87-0.95)

【図 15】

Table 15. The determination of breast cancer related CpG island shore in HYAL2

CpG sites	Differences in methylation levels				Correlations to HYAL2_CpG_4	
	Controls median (IQR)	Familial BC cases median (IQR)	OR (95 % CI) * per 10% methylation	p-value*	Spearman rho	p-value
HYAL2-C_cpG_1	0.66 (0.60-0.71)	0.63 (0.56-0.67)	1.66 (1.15-2.41)	0.007	0.393	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_2	0.52 (0.47-0.59)	0.53 (0.46-0.61)	1.07 (0.81-1.43)	0.623	0.248	0.001
HYAL2-C_cpG_3	0.63 (0.58-0.66)	0.59 (0.56-0.64)	1.39 (0.93-2.08)	0.113	0.357	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_4	0.63 (0.58-0.66)	0.59 (0.56-0.64)	1.39 (0.93-2.08)	0.113	0.357	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_5	0.73 (0.70-0.76)	0.72 (0.69-0.76)	1.19 (0.71-2.00)	0.505	0.253	0.0005
HYAL2-C_cpG_6	0.63 (0.58-0.66)	0.59 (0.56-0.64)	1.39 (0.93-2.08)	0.113	0.357	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_7	0.40 (0.34-0.45)	0.39 (0.35-0.44)	1.26 (0.82-1.95)	0.291	0.287	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_8	0.82 (0.76-0.88)	0.79 (0.71-0.84)	1.63 (1.15-2.31)	0.007	0.410	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_9,10	0.70 (0.51-0.77)	0.71 (0.57-0.76)	0.94 (0.79-1.12)	0.484	0.198	0.007
HYAL2-C_cpG_11	0.74 (0.70-0.77)	0.70 (0.66-0.75)	1.88 (1.16-3.03)	0.010	0.463	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_12,13	0.90 (0.88-0.92)	0.89 (0.86-0.91)	1.21 (0.87-1.69)	0.258	0.270	0.0002
HYAL2-C_cpG_14,15	0.83 (0.78-0.86)	0.80 (0.75-0.84)	1.41 (0.93-2.12)	0.103	0.381	< 0.0001
HYAL2-C_cpG_16,17	0.75 (0.72-0.78)	0.73 (0.70-0.75)	2.24 (1.21-4.16)	0.011	0.348	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_1	0.66 (0.62-0.69)	0.61 (0.59-0.65)	1.77 (1.11-2.84)	0.017	0.534	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_2	0.56 (0.49-0.62)	0.49 (0.43-0.54)	2.16 (1.51-3.09)	< 0.0001	0.621	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_3,4	0.63 (0.61-0.66)	0.59 (0.56-0.63)	3.50 (1.87-6.56)	< 0.0001	0.566	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_5,6	0.77 (0.74-0.83)	0.71 (0.66-0.77)	3.52 (2.17-5.71)	< 0.0001	0.649	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_7	0.57 (0.50-0.62)	0.50 (0.42-0.57)	2.08 (1.47-2.95)	< 0.0001	0.569	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_8	0.66 (0.62-0.69)	0.61 (0.59-0.65)	1.77 (1.11-2.84)	0.017	0.534	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_9	0.36 (0.31-0.41)	0.30 (0.26-0.37)	1.88 (1.28-2.76)	0.001	0.482	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_10	0.63 (0.59-0.69)	0.58 (0.52-0.65)	1.94 (1.35-2.78)	0.0004	0.634	< 0.0001
HYAL2-B_cpG_11	0.53 (0.48-0.59)	0.47 (0.41-0.52)	3.05 (1.94-4.78)	< 0.0001	0.602	< 0.0001
HYAL2_CpG_1	0.36 (0.31-0.43)	0.31 (0.26-0.39)	1.41 (1.08-1.86)	0.013	0.584	< 0.0001
HYAL2_CpG_2	0.24 (0.19-0.28)	0.16 (0.13-0.21)	4.40 (2.56-7.57)	< 0.0001	0.691	< 0.0001
HYAL2_CpG_3	0.41 (0.36-0.46)	0.32 (0.28-0.38)	4.14 (2.51-6.85)	< 0.0001	0.774	< 0.0001
HYAL2_CpG_4	0.65 (0.59-0.69)	0.50 (0.47-0.57)	8.13 (4.53-14.59)	< 0.0001	1.000	—

* logistic regression, adjusted for age and different batches for the measurements

【図 16】

Table 16. The inverse correlation between the methylation and expression of S100P, SLC22A18 and DYRK4 in leucocytes

CpG sites	Difference in methylation or expression levels			Correlations to expression	
	Controls	Sporadic BC	p-value *	Spearman rho	p-value
S100P_CpG_2&3	0.63 (0.58-0.65)	0.59 (0.56-0.62)	0.006	-0.551	1.12E-06
S100P_CpG_4	0.60 (0.55-0.87)	0.61 (0.53-0.83)	0.445	-0.147	0.226
S100P_CpG_7	0.36 (0.30-0.40)	0.29 (0.24-0.33)	0.001	-0.501	8.55E-06
S100P_CpG_8	0.44 (0.38-0.48)	0.35 (0.32-0.39)	7.76E-06	-0.653	9.27E-10
S100P_CpG_9	0.49 (0.44-0.54)	0.45 (0.40-0.47)	0.001	-0.555	5.07E-07
Relative expression of S100P	1.31 (0.72-2.07)	3.47 (1.23-20.77)	0.001	1.000	—
SLC22A18_CpG_3	0.19 (0.15-0.23)	0.16 (0.14-0.19)	0.006	-0.507	5.53E-06
SLC22A18_CpG_4	0.26 (0.20-0.31)	0.21 (0.17-0.24)	0.006	-0.536	1.21E-06
SLC22A18_CpG_6	0.25 (0.20-0.28)	0.19 (0.17-0.23)	0.001	-0.565	2.29E-07
SLC22A18_CpG_8	0.64 (0.60-0.70)	0.59 (0.53-0.63)	0.001	-0.525	2.15E-06
Relative expression of SLC22A18	0.69 (0.55-0.87)	0.76 (0.54-1.23)	0.311	1.000	—
DYRK4_CpG_1	0.33 (0.25-0.41)	0.26 (0.20-0.33)	0.018	-0.074	0.540
DYRK4_CpG_3	0.29 (0.22-0.34)	0.24 (0.18-0.28)	0.023	-0.075	0.536
Relative expression of DYRK4	0.36 (0.31-0.41)	0.37 (0.29-0.46)	0.919	1.000	—

* Mann-Whitney U test

【図 17】

Table 17. The methylation levels of HYAL2 CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg06721473	0.0008	-0.020	36	3	50330420	3'UTR;3'UTR	NA
cg08776109	0.0006	-0.022	36	3	50331237	Body;Body	NA
cg00575896	0.1133	-0.007	36	3	50332175	Body;Body	TRUE
cg25630588	0.9482	-0.001	36	3	50332326	Body;Body	TRUE
cg09412061	0.9466	-0.002	36	3	50332470	Body;Body	NA
cg26794477	0.8988	-0.001	36	3	50332596	Body;Body	NA
cg00467652	0.3265	-0.004	36	3	50332648	Body;Body	NA
cg05164052	0.2727	0.002	36	3	50333326	5'UTR;5'UTR	NA
cg16563178	0.4019	0.005	36	3	50333447	5'UTR;5'UTR	NA
cg10109442	0.9007	0.000	36	3	50333891	5'UTR;1stExon;5'UTR	NA
cg04884420	0.0674	0.003	36	3	50333976	TSS200;5'UTR	NA
cg22280173	0.3091	-0.001	36	3	50333985	TSS200;5'UTR	NA
cg08173110	0.5201	0.001	36	3	50334009	TSS200;5'UTR	NA
cg23515942	0.7374	0.001	36	3	50334023	TSS200;5'UTR	NA
cg06211164	0.7758	0.000	36	3	50334069	TSS200;5'UTR	NA
cg13580654	0.6497	0.001	36	3	50334101	TSS200;5'UTR	NA
cg07271561	0.7449	-0.003	36	3	50334367	5'UTR;TSS1500	NA
cg12976582	0.0253	-0.015	36	3	50334587	5'UTR;TSS1500	NA
cg12150256	0.4194	-0.004	36	3	50334853	5'UTR;TSS1500	NA
cg13341668	0.0938	-0.008	36	3	50334913	5'UTR;TSS1500	NA
cg05118960	0.1069	-0.005	36	3	50334982	5'UTR;TSS1500	NA
cg03721058	0.0046	-0.010	36	3	50335045	5'UTR;TSS1500	NA
cg00840516	0.0074	-0.014	36	3	50335101	5'UTR;1stExon;TSS1500	NA
cg03051392	0.0005	-0.017	36	3	50335180	5'UTR;1stExon;TSS1500	NA
cg26460678	0.0029	-0.020	36	3	50335671	TSS1500	NA
cg27091787	0.0044	-0.028	36	3	50335694	TSS1500	NA
cg24335984	0.0507	-0.007	36	3	50336558	TSS1500	NA

【図 18】

Table 18. The methylation levels of S100P CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg02883621	0.6312	-0.003	36	4	6745824	TSS1500	NA
cg14323984	0.7019	-0.002	36	4	6746104	TSS1500	NA
cg27027375	0.0233	-0.017	36	4	6746220	TSS1500	NA
cg14900031	0.0010	-0.021	36	4	6746278	TSS200	NA
cg14140379	0.0011	-0.029	36	4	6746281	TSS200	NA
cg25083732	0.0534	-0.027	36	4	6746365	TSS200	NA
cg07210669	0.0117	-0.028	36	4	6746376	TSS200	NA
cg26233331	0.0002	-0.040	36	4	6746515	1stExon;5'UTR	NA
cg22266967	0.0014	-0.033	36	4	6746599	1stExon	NA
cg02104700	0.3792	-0.003	36	4	6749069	Body	NA

【図 19 - 1】

Table 19. The methylation levels of SLC22A18 CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg23335134	0.8641	0.001	36	11	2866266	Body	NA
cg26874323	0.6378	0.001	36	11	2866285	Body	NA
cg08222610	0.0833	-0.001	36	11	2866291	Body	NA
cg12240761	0.6550	0.002	36	11	2869910	Body	TRUE
cg14449910	0.1298	-0.008	36	11	2876265	Body;TSS1500	TRUE
cg26665035	0.0426	-0.023	36	11	2876339	Body;TSS1500	TRUE
cg22040301	0.2417	-0.012	36	11	2876374	Body;TSS1500	TRUE
cg05457684	0.0562	-0.017	36	11	2876384	Body;TSS1500	TRUE
cg18419977	0.8110	0.000	36	11	2876628	Body;TSS1500	TRUE
cg24033661	0.4585	0.000	36	11	2876631	Body;TSS1500	TRUE
cg13485320	0.6519	0.003	36	11	2876704	Body;TSS1500	TRUE
cg21853021	0.9589	0.002	36	11	2876722	Body;TSS1500	TRUE
cg18458509	0.0170	-0.019	36	11	2876765	Body;TSS1500	TRUE
cg23190089	0.0047	-0.019	36	11	2876785	Body;TSS1500	TRUE
cg16587707	0.0004	-0.022	36	11	2876841	Body;TSS1500	TRUE
cg02462487	0.0404	-0.015	36	11	2876926	Body;TSS1500	TRUE
cg16129800	0.0008	-0.023	36	11	2876990	Body;TSS1500	TRUE
cg21599100	0.0018	-0.022	36	11	2877013	Body;TSS1500	TRUE
cg05752118	0.0310	-0.016	36	11	2877140	Body;TSS1500	TRUE
cg11785933	0.0023	-0.041	36	11	2877193	Body;TSS1500	NA
cg25427871	0.0137	-0.032	36	11	2877311	Body;TSS1500	NA
cg22315192	0.0044	-0.016	36	11	2877341	TSS200;Body	NA
cg21019522	0.0042	-0.018	36	11	2877365	TSS200;Body	NA
cg16346422	0.0001	-0.042	36	11	2877395	TSS200;Body	NA
cg16873863	0.1148	-0.009	36	11	2877752	5'UTR;5'UTR	NA
cg22680591	0.5778	-0.002	36	11	2878627	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg15904130	0.1653	0.003	36	11	2878639	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg25073813	0.0276	-0.008	36	11	2878644	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg24205453	0.4111	-0.001	36	11	2878910	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg18471235	0.0055	0.011	36	11	2878971	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg15739881	0.0966	-0.008	36	11	2879040	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg12563184	0.2446	-0.004	36	11	2879067	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg04665867	0.3414	-0.003	36	11	2879093	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg24041239	0.1391	-0.006	36	11	2879211	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg09198782	0.3067	-0.004	36	11	2879338	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg07291601	0.4683	-0.002	36	11	2879383	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg25548316	0.7994	0.001	36	11	2879388	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA

【図 19 - 2】

Table 19. The methylation levels of SLC22A18 CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg09731124	0.4994	-0.004	36	11	2882998	Body;Body;TSS1500	NA
cg02025860	0.4916	-0.002	36	11	2883177	Body;Body;TSS1500	NA
cg14168614	0.6637	-0.005	36	11	2883823	Body;Body	NA
cg02660089	0.9102	0.003	36	11	2886017	Body;Body	NA
cg22858288	0.4478	0.002	36	11	2886898	Body;Body	NA
cg04726200	0.6860	-0.007	36	11	2887061	Body;Body	NA
cg19497444	0.7053	-0.009	36	11	2887370	Body;Body	NA
cg03336167	0.9821	-0.005	36	11	2887571	Body;Body	NA
cg23698969	0.3834	-0.003	36	11	2887741	Body;Body	NA
cg24409566	0.6945	-0.002	36	11	2890543	Body;Body	TRUE
cg05351334	0.6395	-0.003	36	11	2896968	Body;Body	NA
cg14275836	0.7743	-0.002	36	11	2897889	Body;Body	NA
cg19240938	0.2782	0.002	36	11	2898612	Body;Body	NA
cg18655584	0.9972	-0.002	36	11	2898669	Body;Body	NA
cg12510502	0.5312	-0.002	36	11	2898752	Body;Body	NA
cg13328151	0.2459	0.004	36	11	2899615	Body;Body	NA
cg03010425	0.9510	0.002	36	11	2901347	Body;Body	NA
cg26595893	0.8941	0.002	36	11	2903050	3'UTR;3'UTR	NA

【図 20】

Table 20. The methylation levels of DYRK4 CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg24707294	0.8090	-0.003	36	12	4568380	TSS1500	NA
cg08977032	0.5921	-0.001	36	12	4568578	TSS1500	NA
cg06270401	0.0000	-0.047	36	12	4569346	TSS200	NA
cg09581911	0.8105	-0.014	36	12	4569493	TSS200	NA
cg09418321	0.0011	-0.031	36	12	4569879	5'UTR	NA
cg01218945	0.4078	0.001	36	12	4584370	Body	NA
cg24337818	0.0539	-0.002	36	12	4584440	Body	NA
cg00532413	0.2381	0.000	36	12	4584588	Body	NA

Fig. 19 (continued)

Table 19. The methylation levels of SLC22A18 CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg10943932	0.5082	0.000	36	11	2879409	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg02081198	0.6399	0.000	36	11	2879421	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg05385260	0.0511	-0.005	36	11	2879428	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg16035277	0.4744	0.005	36	11	2879840	5'UTR;5'UTR;TSS1500	NA
cg09781437	0.0128	0.002	36	11	2879986	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA
cg02200456	0.4292	-0.001	36	11	2880012	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA
cg13671930	0.6034	0.003	36	11	2880014	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA
cg22132309	0.7142	0.001	36	11	2880066	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA
cg16184736	0.2003	-0.001	36	11	2880074	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA
cg03829241	0.4543	0.001	36	11	2880080	5'UTR;5'UTR;TSS200	NA
cg17992161	0.0850	0.006	36	11	2880101	5'UTR;1stExon;5'UTR;5'UTR	NA
cg12733707	0.0846	0.005	36	11	2880123	5'UTR;1stExon;5'UTR;5'UTR	NA
cg24139421	0.9971	0.001	36	11	2880154	5'UTR;1stExon;5'UTR;5'UTR	NA
cg06211616	0.8977	0.002	36	11	2880235	5'UTR;5'UTR;5'UTR	NA
cg24528523	0.7157	0.000	36	11	2880384	5'UTR;5'UTR;5'UTR	NA
cg12911952	0.0388	-0.007	36	11	2881099	5'UTR;5'UTR;5'UTR	NA
cg02719634	0.0932	-0.019	36	11	2881475	1stExon;Body;5'UTR;Body	TRUE
cg15729154	0.0364	-0.018	36	11	2881602	1stExon;Body;5'UTR;Body	TRUE
cg07161669	0.2605	0.000	36	11	2881763	Body;Body;TSS200	TRUE
cg24724917	0.4820	-0.002	36	11	2882015	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg06495763	0.8721	-0.001	36	11	2882046	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg06048910	0.2015	-0.001	36	11	2882049	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg08472797	0.2778	-0.003	36	11	2882146	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg14101500	0.4686	0.000	36	11	2882170	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg22833478	0.5602	-0.001	36	11	2882199	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg26137286	0.0522	-0.006	36	11	2882210	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg20390725	0.0040	-0.010	36	11	2882344	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg20716202	0.0779	-0.005	36	11	2882423	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg08998995	0.2548	-0.005	36	11	2882445	Body;Body;TSS1500	TRUE
cg16530128	0.5740	-0.002	36	11	2882527	Body;Body;TSS1500	NA
cg08827700	0.0045	-0.008	36	11	2882545	Body;Body;TSS1500	NA
cg22272492	0.0009	-0.010	36	11	2882572	Body;Body;TSS1500	NA
cg21991825	0.6773	0.002	36	11	2882719	Body;Body;TSS1500	NA
cg23912877	0.6175	0.000	36	11	2882913	Body;Body;TSS1500	NA
cg06981073	0.5191	-0.001	36	11	2882920	Body;Body;TSS1500	NA
cg06669405	0.0170	-0.010	36	11	2882937	Body;Body;TSS1500	NA

【図 21】

Table 21. The methylation levels of FUT7 CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg02971262	0.0031	-0.011	36	9	139045216	5'UTR;Body	NA
cg14205519	0.5871	0.002	36	9	139045571	5'UTR;Body	NA
cg03630596	0.6632	-0.003	36	9	139045677	5'UTR;Body	NA
cg13757845	0.0082	-0.023	36	9	139046561	5'UTR;1stExon;5'UTR	NA
cg09305224	0.0001	-0.030	36	9	139047066	5'UTR;1stExon;5'UTR	NA
cg02679745	0.0000	-0.036	36	9	139047467	Body;TSS1500	NA

【図 22】

Table 22. The methylation levels of RAPSN CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg26738160	0.6801	0.001	36	11	47416086	3'UTR;3'UTR	NA
cg24812582	0.3992	0.002	36	11	47419939	Body;Body	NA
cg17614165	0.8996	-0.001	36	11	47425239	Body;Body	NA
cg15270729	0.1291	0.006	36	11	47425474	Body;Body	NA
cg09163021	0.7317	-0.005	36	11	47427344	TSS200;TSS200	NA
cg07407499	0.0904	-0.008	36	11	47427367	TSS200;TSS200	NA
cg14407987	0.9251	-0.002	36	11	47427369	TSS200;TSS200	NA
cg26454662	0.7520	-0.006	36	11	47427379	TSS200;TSS200	NA
cg03400491	0.2005	-0.005	36	11	47427463	TSS200;TSS200	NA
cg19771781	0.9445	-0.001	36	11	47427476	TSS200;TSS200	NA
cg13047308	0.0021	-0.033	36	11	47427915	TSS1500;TSS1500	NA
cg27466532	0.0000	-0.045	36	11	47427976	TSS1500;TSS1500	NA
cg02321133	0.9396	-0.006	36	11	47428365	TSS1500;TSS1500	NA

【 図 2 3 - 1 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg03140026	0.1675	0.002	36	17	76131746	TSS1500;TSS1500	NA
cg14406501	0.1416	-0.015	36	17	76132775	TSS1500;TSS1500	NA
cg02352203	0.2860	0.001	36	17	76133032	TSS200;TSS200	NA
cg13515774	0.0979	0.000	36	17	76133067	TSS200;TSS200	NA
cg15600835	0.0368	-0.001	36	17	76133151	TSS200;TSS200	NA
cg00815931	0.1649	-0.002	36	17	76133168	TSS200;TSS200	NA
cg03172060	0.0707	-0.007	36	17	76133208	TSS200;TSS200	NA
cg12045294	0.1752	0.002	36	17	76133211	TSS200;TSS200	NA
cg20758492	0.4765	0.000	36	17	76134834	Body;Body	NA
cg02082642	0.8956	-0.002	36	17	76137204	Body;Body	NA
cg22652378	0.0006	-0.032	36	17	76148437	Body;Body	TRUE
cg25514328	0.5802	0.004	36	17	76163919	Body;Body	NA
cg11329058	0.0369	0.012	36	17	76163953	Body;Body	NA
cg18576374	0.5514	-0.001	36	17	76163966	Body;Body	NA
cg06799305	0.3461	0.000	36	17	76165965	Body;Body	TRUE
cg08129331	0.0079	-0.022	36	17	76175073	Body;Body	NA
cg01561259	0.8979	-0.003	36	17	76175376	Body;Body	NA
cg09929238	0.0443	-0.024	36	17	76175511	Body;Body	NA
cg27210166	0.9688	0.001	36	17	76189287	Body;Body	NA
cg12088417	0.6881	0.012	36	17	76189311	Body;Body	NA
cg10162696	0.9502	0.002	36	17	76191173	Body;Body	NA
cg09133154	0.6328	-0.001	36	17	76191267	Body;Body	NA
cg03520496	0.2563	0.007	36	17	76191285	Body;Body	NA
cg08732594	0.0311	-0.003	36	17	76196984	Body;Body	NA
cg04687939	0.2909	-0.003	36	17	76197144	Body;Body	NA
cg22280406	0.8201	0.000	36	17	76197242	Body;Body	NA
cg16027727	0.7303	-0.006	36	17	76200923	Body;Body	NA
cg04951638	0.7431	0.000	36	17	76208376	Body;Body	TRUE
cg00143364	0.2604	-0.006	36	17	76219939	Body;Body	TRUE
cg20462129	0.1050	-0.002	36	17	76221690	Body;Body	TRUE
cg02462904	0.2293	-0.005	36	17	76221850	Body;Body	NA
cg21925688	0.3817	0.001	36	17	76221963	Body;Body	NA
cg03637703	0.1905	0.001	36	17	76232333	Body;Body	NA
cg27551440	0.1464	-0.001	36	17	76232340	Body;Body	NA
cg27313007	0.0351	-0.007	36	17	76232345	Body;Body	NA
cg08811817	0.0927	0.009	36	17	76237232	Body;Body	TRUE
cg18758433	0.0001	0.046	36	17	76238196	Body;Body	TRUE
cg26170499	0.4804	0.000	36	17	76249958	Body;Body	TRUE

【 図 2 3 - 3 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg25288455	0.2248	0.009	36	17	76315501	Body;Body	NA
cg06975080	0.0168	0.012	36	17	76315523	Body;Body	NA
cg10790704	0.2922	0.000	36	17	76315679	Body;Body	NA
cg18406924	0.0116	0.018	36	17	76315852	Body;Body	NA
cg19857461	0.3144	0.002	36	17	76317643	Body;Body	NA
cg18026826	0.2440	0.001	36	17	76318962	Body;Body	NA
cg26723185	0.1380	0.001	36	17	76319016	Body;Body	NA
cg03513049	0.5379	0.003	36	17	76319516	Body;Body	TRUE
cg06872548	0.1960	-0.010	36	17	76331578	Body;Body	TRUE
cg11757444	0.0126	-0.074	36	17	76333768	Body;Body	NA
cg10281768	0.0040	0.010	36	17	76334821	Body;Body	NA
cg05337636	0.2022	0.002	36	17	76335132	Body;Body	NA
cg17060157	0.0009	-0.023	36	17	76338722	Body;Body	NA
cg00701918	0.3726	-0.004	36	17	76339590	Body;Body	NA
cg24394819	0.6679	-0.001	36	17	76339644	Body;Body	NA
cg00549398	0.9789	-0.002	36	17	76339796	Body;Body	TRUE
cg16841014	0.0766	-0.019	36	17	76339970	Body;Body	TRUE
cg21143224	0.0344	-0.026	36	17	76340065	Body;Body	TRUE
cg18951390	0.7521	0.000	36	17	76349863	Body;Body	TRUE
cg11499091	0.4517	0.006	36	17	76349897	Body;Body	TRUE
cg09516200	0.5475	-0.007	36	17	76349919	Body;Body	TRUE
cg06412669	0.5255	-0.006	36	17	76350145	Body;Body	TRUE
cg16565901	0.0031	-0.022	36	17	76350191	Body;Body	NA
cg20797905	0.8335	0.009	36	17	76361822	Body;Body	TRUE
cg02675920	0.6275	-0.006	36	17	76362529	Body;Body	NA
cg11222173	0.0048	-0.029	36	17	76362614	Body;Body	NA
cg11153071	0.0000	-0.048	36	17	76362672	Body;Body	NA
cg15096353	0.9324	0.000	36	17	76362886	Body;Body	NA
cg00523683	0.8102	0.016	36	17	76363066	Body;Body	NA
cg02185248	0.1758	-0.014	36	17	76363089	Body;Body	NA
cg14343513	0.0000	-0.046	36	17	76367868	Body;Body	NA
cg05098037	0.0000	-0.027	36	17	76367922	Body;Body	NA
cg22386583	0.0001	-0.043	36	17	76368351	Body;Body	TRUE
cg12654199	0.0000	-0.047	36	17	76368421	Body;Body	TRUE
cg15230985	0.0024	-0.014	36	17	76368482	Body;Body	TRUE
cg05651511	0.0000	-0.052	36	17	76368685	Body;Body	TRUE
cg04662369	0.0004	-0.059	36	17	76368913	Body;Body	TRUE
cg14780427	0.0171	-0.031	36	17	76368967	Body;Body	TRUE

【 図 2 3 - 2 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald_Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg17442961	0.0068	-0.005	36	17	76250023	Body;Body	TRUE
cg00406039	0.3183	-0.005	36	17	76250229	Body;Body	TRUE
cg01432609	0.0032	-0.026	36	17	76253149	Body;Body	TRUE
cg13303377	0.5077	-0.003	36	17	76254840	Body;Body	NA
cg17944774	0.7632	-0.002	36	17	76258841	Body;Body	NA
cg17051395	0.1054	0.002	36	17	76258887	Body;Body	NA
cg27454679	0.8016	-0.003	36	17	76259128	Body;Body	NA
cg04681879	0.9956	-0.002	36	17	76259241	Body;Body	NA
cg17434577	0.7843	-0.004	36	17	76259361	Body;Body	NA
cg09592546	0.0053	0.044	36	17	76267497	Body;Body	TRUE
cg22882460	0.4555	0.001	36	17	76269243	Body;Body	NA
cg13311292	0.2817	-0.004	36	17	76269258	Body;Body	NA
cg06443231	0.6011	-0.002	36	17	76269860	Body;Body	NA
cg22838354	0.7433	-0.002	36	17	76269879	Body;Body	NA
cg09596252	0.2242	-0.003	36	17	76270088	Body;Body	NA
cg11303920	0.5721	0.001	36	17	76271618	Body;Body	NA
cg23238734	0.3909	-0.003	36	17	76272602	Body;Body	NA
cg17956530	0.7764	-0.002	36	17	76282294	Body;Body	NA
cg01500570	0.0109	-0.003	36	17	76282362	Body;Body	NA
cg13102028	0.2568	0.002	36	17	76282603	Body;Body	NA
cg04136113	0.9874	0.000	36	17	76282617	Body;Body	NA
cg09141931	0.9642	0.000	36	17	76282804	Body;Body	TRUE
cg06673969	0.4171	-0.009	36	17	76283457	Body;Body	TRUE
cg15116918	0.1751	0.002	36	17	76284147	Body;Body	TRUE
cg20562478	0.6685	-0.003	36	17	76284834	Body;Body	TRUE
cg20937981	0.2068	0.004	36	17	76294225	Body;Body	TRUE
cg18780100	0.0267	-0.027	36	17	76297380	Body;Body	NA
cg01498832	0.0002	-0.042	36	17	76297529	Body;Body	NA
cg07786220	0.0000	-0.047	36	17	76297677	Body;Body	NA
cg02240665	0.5351	-0.001	36	17	76297867	Body;Body	NA
cg25985643	0.1559	-0.008	36	17	76298052	Body;Body	TRUE
cg27511181	0.0108	-0.037	36	17	76299819	Body;Body	TRUE
cg11790527	0.0069	-0.022	36	17	76300748	Body;Body	TRUE
cg26733897	0.0009	0.018	36	17	76309187	Body;Body	NA
cg16918327	0.0511	0.013	36	17	76309246	Body;Body	NA
cg25673241	0.0453	0.014	36	17	76309451	Body;Body	NA
cg24667756	0.1747	0.004	36	17	76313417	Body;Body	TRUE
cg18965980	0.5135	-0.004	36	17	76313643	Body;Body	TRUE

【 図 2 3 - 4 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg06153925	0.0000	-0.061	36	17	76369974	Body;Body	NA
cg08454507	0.0000	-0.039	36	17	76370001	Body;Body	NA
cg06418238	0.0000	-0.075	36	17	76370037	Body;Body	NA
cg22878693	0.0079	-0.021	36	17	76370199	Body;Body	NA
cg18469159	0.1941	-0.003	36	17	76370436	Body;Body	NA
cg16115689	0.0015	0.021	36	17	76378851	Body;Body	TRUE
cg12592365	0.0061	0.012	36	17	76380543	Body;Body	TRUE
cg15547672	0.7579	-0.002	36	17	76383535	Body;Body	TRUE
cg04566233	0.5072	-0.005	36	17	76385838	Body;Body	TRUE
cg10693767	0.4266	0.001	36	17	76387719	Body;Body	NA
cg23463786	0.2379	0.001	36	17	76387740	Body;Body	NA
cg04803424	0.2824	-0.003	36	17	76387797	Body;Body	NA
cg10585621	0.7002	-0.002	36	17	76388048	Body;Body	NA
cg15946337	0.6325	-0.003	36	17	76388093	Body;Body	NA
cg15815120	0.4312	0.001	36	17	76388256	Body;Body	NA
cg01476242	0.2066	-0.002	36	17	76388625	Body;Body	NA
cg17888563	0.2956	0.000	36	17	76388653	Body;Body	NA
cg18605975	0.6097	-0.002	36	17	76389318	Body;Body	NA
cg06675781	0.4149	0.001	36	17	76390230	Body;Body	NA
cg05548508	0.3504	0.001	36	17	76390392	Body;Body	NA
cg13098428	0.1352	-0.053	36	17	76390409	Body;Body	NA
cg27025953	0.6318	-0.004	36	17	76391155	Body;Body	NA
cg17703078	0.8596	0.000	36	17	76391181	Body;Body	NA
cg14596352	0.5598	-0.002	36	17	76391776	Body;Body	NA
cg00463485	0.1882	-0.006	36	17	76392152	Body;Body	NA
cg16896879	0.8665	0.000	36	17	76392689	Body;Body	NA
cg06343673	0.5419	0.002	36	17	76392827	Body;Body	NA
cg03533386	0.8783	0.000	36	17	76393148	Body;Body	TRUE
cg01516792	0.0487	-0.012	36	17	76393735	Body;Body	TRUE
cg04162316	0.0005	0.018	36	17	76400950	Body;Body	NA
cg12028455	0.4921	-0.003	36	17	76403673	Body;Body	NA
cg23542426	0.2420	-0.002	36	17	76404215	Body;Body	NA
cg16980736	0.5232	0.001	36	17	76404301	Body;Body	NA
cg27460531	0.0717	-0.010	36	17	76406318	Body;Body	TRUE
cg16015295	0.0110	-0.021	36	17	76408074	Body;Body	TRUE
cg13526488	0.0051	-0.025	36	17	76408402	Body;Body	TRUE
cg15616522	0.6877	-0.004	36	17	76408843	Body;Body	TRUE
cg12785535	0.6830	0.000	36	17	76409987	Body;Body	NA

【 図 2 3 - 5 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg18430553	0.9679	0.001	36	17	76410136	Body;Body	NA
cg04295549	0.9501	0.000	36	17	76410264	Body;Body	NA
cg25705936	0.6954	-0.001	36	17	76410459	Body;Body	NA
cg06444734	0.3604	-0.004	36	17	76410674	Body;Body	NA
cg17602102	0.5131	0.000	36	17	76410754	Body;Body	NA
cg02910299	0.0594	-0.002	36	17	76410761	Body;Body	NA
cg14073057	0.1024	0.001	36	17	76410958	Body;Body	NA
cg03794617	0.0045	-0.025	36	17	76411594	Body;Body	NA
cg08329754	0.0008	-0.021	36	17	76411610	Body;Body	NA
cg09001356	0.0240	-0.023	36	17	76411656	Body;Body	NA
cg26419477	0.6306	-0.001	36	17	76413754	Body;Body	NA
cg23245933	0.0615	-0.007	36	17	76414205	Body;Body	NA
cg23261154	0.5801	0.000	36	17	76414316	Body;Body	NA
cg09175325	0.0019	-0.014	36	17	76414794	Body;Body	TRUE
cg14955617	0.5025	0.001	36	17	76414859	Body;Body	TRUE
cg21550504	0.6946	-0.003	36	17	76414916	Body;Body	TRUE
cg16636468	0.6225	0.000	36	17	76415169	Body;Body	TRUE
cg25337513	0.8629	0.000	36	17	76415226	Body;Body	TRUE
cg07126783	0.0130	-0.019	36	17	76415362	Body;Body	TRUE
cg16638092	0.0070	-0.021	36	17	76415369	Body;Body	TRUE
cg08939850	0.0289	-0.024	36	17	76415401	Body;Body	TRUE
cg23715732	0.9932	-0.004	36	17	76416446	Body;Body	NA
cg05113898	0.7910	-0.001	36	17	76416564	Body;Body	NA
cg08219486	0.2564	0.001	36	17	76416699	Body;Body	NA
cg26633077	0.9590	0.000	36	17	76417720	Body;Body	NA
cg22984380	0.1903	-0.010	36	17	76417744	Body;Body	NA
cg24155025	0.1009	0.000	36	17	76417774	Body;Body	NA
cg26332535	0.6365	0.006	36	17	76417779	Body;Body	NA
cg06919800	0.2502	-0.003	36	17	76417915	Body;Body	NA
cg18607849	0.2512	-0.001	36	17	76418030	Body;Body	NA
cg23210522	0.2427	0.001	36	17	76418069	Body;Body	NA
cg19287064	0.7106	0.002	36	17	76418916	Body;Body	NA
cg21876181	0.3520	-0.001	36	17	76419031	Body;Body	NA
cg15826479	0.0414	0.014	36	17	76421088	Body;Body	TRUE
cg02386420	0.3306	0.000	36	17	76421465	Body;Body	TRUE
cg18516619	0.5753	0.003	36	17	76421486	Body;Body	TRUE
cg11637695	0.6786	-0.002	36	17	76422655	Body;Body	NA
cg22644320	0.6042	-0.001	36	17	76422782	Body;Body	NA

【 図 2 3 - 7 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg14647957	0.3152	-0.004	36	17	76442838	Body;Body	NA
cg25024459	0.7461	-0.003	36	17	76444221	Body;Body	NA
cg15097361	0.0070	-0.017	36	17	76444296	Body;Body	NA
cg15228441	0.9427	-0.002	36	17	76444525	Body;Body	TRUE
cg04470054	0.1395	-0.003	36	17	76445067	Body;Body	TRUE
cg25512107	0.0106	0.002	36	17	76445762	Body;Body	NA
cg17323298	0.7979	-0.001	36	17	76445825	Body;Body	NA
cg22809418	0.3980	0.000	36	17	76445905	Body;Body	NA
cg08905415	0.7213	-0.003	36	17	76446113	Body;Body	NA
cg04494230	0.6880	0.000	36	17	76446239	Body;Body	NA
cg00516616	0.8101	-0.004	36	17	76446458	Body;Body	NA
cg24832218	0.7079	-0.003	36	17	76447543	Body;Body	TRUE
cg04191427	0.7525	-0.005	36	17	76447854	Body;Body	NA
cg05707492	0.3740	0.000	36	17	76448079	Body;Body	TRUE
cg05249744	0.0233	-0.027	36	17	76449305	Body;Body	NA
cg23625086	0.0284	0.002	36	17	76450934	Body;Body	NA
cg15476425	0.2539	0.001	36	17	76450998	Body;Body	NA
cg22161269	0.9634	-0.002	36	17	76451108	Body;Body	NA
cg01886663	0.1208	-0.014	36	17	76460774	Body;Body	TRUE
cg02878831	0.2833	-0.010	36	17	76462347	Body;Body	NA
cg27129144	0.3659	-0.002	36	17	76463128	Body;Body	NA
cg27394817	0.6181	-0.001	36	17	76463274	Body;Body	NA
cg07434008	0.5516	0.000	36	17	76463361	Body;Body	NA
cg06617879	0.0058	0.005	36	17	76464026	Body;Body	NA
cg13979266	0.3848	-0.007	36	17	76464322	Body;Body	NA
cg15358690	0.9109	0.000	36	17	76464505	Body;Body	NA
cg16116279	0.1482	-0.004	36	17	76464511	Body;Body	NA
cg16721879	0.3823	-0.002	36	17	76464566	Body;Body	NA
cg03119454	0.7343	0.000	36	17	76465075	Body;Body	NA
cg16886414	0.1244	0.012	36	17	76465744	Body;Body	NA
cg08314949	0.1652	0.018	36	17	76465808	Body;Body	NA
cg12078154	0.3725	0.016	36	17	76465857	Body;Body	NA
cg02251850	0.0008	0.035	36	17	76466098	Body;Body	NA
cg22091236	0.0033	-0.028	36	17	76468561	Body;Body	TRUE
cg27457201	0.0153	-0.020	36	17	76468827	Body;Body	NA
cg09977718	0.0499	-0.016	36	17	76468868	Body;Body	NA
cg22255288	0.0954	0.003	36	17	76469013	Body;Body	NA
cg09964933	0.6074	0.000	36	17	76470841	Body;Body	NA

【 図 2 3 - 6 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg07530194	0.8677	-0.003	36	17	76423045	Body;Body	NA
cg19122260	0.5822	0.000	36	17	76423165	Body;Body	NA
cg20502501	0.5128	-0.007	36	17	76423998	Body;Body	NA
cg23248537	0.2625	-0.004	36	17	76424293	Body;Body	NA
cg03443590	0.4310	-0.002	36	17	76424447	Body;Body	NA
cg01464730	0.8055	-0.001	36	17	76424468	Body;Body	NA
cg12100537	0.4647	-0.002	36	17	76426131	Body;Body	NA
cg27101023	0.9609	0.006	36	17	76426276	Body;Body	NA
cg07475546	0.9147	-0.002	36	17	76426423	Body;Body	NA
cg21005054	0.7539	-0.001	36	17	76426710	Body;Body	NA
cg11824764	0.3056	0.000	36	17	76427082	Body;Body	NA
cg26263310	0.4535	-0.004	36	17	76428708	Body;Body	NA
cg18173185	0.1652	-0.003	36	17	76429257	Body;Body	NA
cg12434898	0.0064	-0.004	36	17	76432237	Body;Body	NA
cg25899969	0.5357	-0.002	36	17	76432533	Body;Body	NA
cg01911440	0.0600	0.001	36	17	76432640	Body;Body	NA
cg18648066	0.7551	-0.001	36	17	76433036	Body;Body	NA
cg02284802	0.1548	-0.006	36	17	76433173	Body;Body	NA
cg20500836	0.2073	0.002	36	17	76433240	Body;Body	NA
cg21507958	0.9498	0.000	36	17	76433466	Body;Body	NA
cg18091083	0.0381	0.022	36	17	76433687	Body;Body	NA
cg22888023	0.8116	-0.003	36	17	76434599	Body;Body	NA
cg23019125	0.5344	0.002	36	17	76434986	Body;Body	NA
cg16826504	0.3110	-0.003	36	17	76435176	Body;Body	NA
cg06756931	0.7339	-0.001	36	17	76435488	Body;Body	NA
cg14202916	0.5049	0.001	36	17	76435519	Body;Body	NA
cg01767927	0.7192	-0.003	36	17	76435619	Body;Body	NA
cg26360197	0.0010	0.030	36	17	76436199	Body;Body	NA
cg16541275	0.0432	0.017	36	17	76436349	Body;Body	NA
cg24844295	0.7784	0.001	36	17	76436523	Body;Body	NA
cg01518942	0.2359	-0.003	36	17	76437001	Body;Body	NA
cg12284870	0.2283	-0.005	36	17	76437026	Body;Body	NA
cg17481637	0.9598	0.001	36	17	76437125	Body;Body	NA
cg13945540	0.4211	0.001	36	17	76437320	Body;Body	NA
cg04102793	0.9524	-0.002	36	17	76437518	Body;Body	NA
cg04515258	0.8550	-0.001	36	17	76440007	Body;Body	NA
cg05815404	0.4279	0.000	36	17	76440096	Body;Body	NA
cg14271651	0.0295	-0.009	36	17	76440964	Body;Body	TRUE

【 図 2 3 - 8 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg21343406	0.3031	-0.002	36	17	76470926	Body;Body	NA
cg09318637	0.8519	-0.001	36	17	76471009	Body;Body	NA
cg08588357	0.0125	0.003	36	17	76471270	Body;Body	NA
cg17872658	0.0631	0.006	36	17	76471456	Body;Body	NA
cg05887890	0.2151	-0.005	36	17	76471606	Body;Body	NA
cg17585356	0.7787	-0.002	36	17	76471716	Body;Body	NA
cg04166962	0.5127	-0.002	36	17	76471833	Body;Body	NA
cg19185574	0.8236	-0.002	36	17	76472226	Body;Body	NA
cg23630758	0.2275	-0.002	36	17	76472307	Body;Body	NA
cg13831388	0.4582	-0.002	36	17	76472454	Body;Body	NA
cg18224819	0.8864	0.002	36	17	76472571	Body;Body	NA
cg02933375	0.8242	-0.001	36	17	76473423	Body;Body	NA
cg08150315	0.5730	0.001	36	17	76473562	Body;Body	NA
cg11623293	0.2144	-0.004	36	17	76473655	Body;Body	NA
cg124181389	0.9718	-0.002	36	17	76474340	Body;Body	NA
cg02243479	0.6669	0.000	36	17	76474554	Body;Body	NA
cg16660971	0.8045	-0.003	36	17	76474624	Body;Body	NA
cg13549638	0.0781	-0.014	36	17	76474671	Body;Body	NA
cg26954228	0.5258	-0.002	36	17	76475078	Body;Body	NA
cg26714263	0.3528	-0.002	36	17	76475106	Body;Body	NA
cg06154633	0.7570	0.000	36	17	76475200	Body;Body	NA
cg18562896	0.3348	-0.002	36	17	76477462	Body;Body	NA
cg24963810	0.7351	0.000	36	17	76477488	Body;Body	NA
cg16018154	0.3427	-0.009	36	17	76478165	Body;Body	NA
cg09891288	0.9173	0.006	36	17	76478269	Body;Body	NA
cg25902229	0.7244	0.009	36	17	76478683	Body;Body	NA
cg05774614	0.0449	-0.019	36	17	76479134	Body;Body	NA
cg10035831	0.2491	0.010	36	17	76479682	Body;Body	NA

【 2 3 - 9 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg21289763	0.6645	-0.004	36	17	76483430	Body;Body	NA
cg17180011	0.9825	0.000	36	17	76483873	Body;Body	NA
cg15022015	0.3763	0.001	36	17	76484122	Body;Body	NA
cg05064567	0.2731	-0.006	36	17	76484733	Body;Body	NA
cg04919811	0.7690	0.000	36	17	76484897	Body;Body	NA
cg16578291	0.0447	0.003	36	17	76485004	Body;Body	NA
cg19292222	0.7272	-0.006	36	17	76486006	Body;Body	NA
cg23938645	0.5029	-0.001	36	17	76487158	Body;Body	NA
cg06053702	0.0003	-0.010	36	17	76487304	Body;Body	NA
cg10538214	0.7647	-0.003	36	17	76487470	Body;Body	NA
cg16780847	0.3163	-0.004	36	17	76488294	Body;Body	NA
cg10880603	0.7098	-0.002	36	17	76488349	Body;Body	NA
cg11274148	0.2864	-0.001	36	17	76491251	Body;Body	NA
cg01412400	0.5867	0.001	36	17	76491321	Body;Body	NA
cg12131324	0.2116	-0.005	36	17	76491389	Body;Body	NA
cg19494960	0.0803	-0.002	36	17	76491556	Body;Body	NA
cg00474943	0.7289	-0.001	36	17	76491671	Body;Body	NA
cg24683534	0.4077	-0.005	36	17	76491800	Body;Body	NA
cg04163696	0.8307	0.000	36	17	76492566	Body;Body	NA
cg16895810	0.0604	-0.003	36	17	76492646	Body;Body	NA
cg09173565	0.3509	0.000	36	17	76492873	Body;Body	NA
cg22673070	0.9268	-0.004	36	17	76493125	Body;Body	NA
cg16218910	0.6600	-0.002	36	17	76493174	Body;Body	NA
cg19296258	0.8778	-0.001	36	17	76493394	Body;Body	NA
cg05580441	0.3368	0.000	36	17	76493439	Body;Body	NA
cg08992574	0.3860	-0.002	36	17	76494240	Body;Body	NA
cg02257048	0.7990	0.000	36	17	76494626	Body;Body	NA
cg07870603	0.8592	0.001	36	17	76494739	Body;Body	NA
cg01000996	0.9730	-0.002	36	17	76494821	Body;Body	NA
cg00554570	0.9383	-0.001	36	17	76494823	Body;Body	NA
cg06980852	0.9305	-0.001	36	17	76494991	Body;Body	NA
cg10462529	0.4569	-0.001	36	17	76495343	Body;Body	NA
cg06485000	0.1252	-0.005	36	17	76496316	Body;Body	NA
cg10508138	0.5197	-0.003	36	17	76496608	Body;Body	NA
cg02671711	0.7700	0.000	36	17	76496795	Body;Body	NA
cg19984991	0.2472	0.002	36	17	76497089	Body;Body	NA
cg00248805	0.1761	0.002	36	17	76497144	Body;Body	NA
cg19707379	0.9561	0.000	36	17	76497288	Body;Body	NA

【 2 3 - 1 1 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg24315876	0.3700	0.009	36	17	76527706	Body;Body	NA
cg02580745	0.1085	0.002	36	17	76528696	Body;Body	NA
cg02266055	0.7714	-0.001	36	17	76528924	Body;Body	NA
cg00648660	0.7319	-0.001	36	17	76528951	Body;Body	NA
cg06469955	0.3871	-0.002	36	17	76529741	Body;Body	NA
cg13643509	0.4705	0.001	36	17	76530250	Body;Body	TRUE
cg19060120	0.1430	-0.007	36	17	76530473	Body;Body	TRUE
cg23736297	0.5482	-0.004	36	17	76530476	Body;Body	TRUE
cg13005428	0.0522	-0.036	36	17	76530973	Body;Body	TRUE
cg16438182	0.5382	0.000	36	17	76531162	Body;Body	TRUE
cg02033669	0.6037	0.001	36	17	76531614	Body;Body	NA
cg21238376	0.2941	0.003	36	17	76534371	Body;Body	NA
cg08999272	0.7934	-0.002	36	17	76536073	Body;Body	NA
cg11782601	0.8057	-0.002	36	17	76536493	Body;Body	NA
cg26729320	0.7299	-0.002	36	17	76536639	Body;Body	NA
cg14600877	0.6821	-0.002	36	17	76536815	Body;Body	NA
cg13597013	0.8713	-0.001	36	17	76537122	Body;Body	NA
cg13762486	0.2658	-0.007	36	17	76537745	Body;Body	NA
cg06420480	0.9135	-0.001	36	17	76537839	Body;Body	NA
cg19443023	0.6000	0.000	36	17	76537939	Body;Body	NA
cg07081946	0.8550	-0.001	36	17	76538447	Body;Body	NA
cg26469982	0.7033	-0.003	36	17	76538527	Body;Body	NA
cg02254800	0.1718	-0.004	36	17	76538681	Body;Body	NA
cg24343322	0.9926	-0.002	36	17	76539767	Body;Body	NA
cg25057221	0.2770	0.002	36	17	76539827	Body;Body	NA
cg18425700	0.3988	-0.004	36	17	76539873	Body;Body	NA
cg03052541	0.7777	-0.001	36	17	76540138	Body;Body	NA
cg18815595	0.7748	-0.001	36	17	76540402	Body;Body	NA
cg17779026	0.8527	-0.001	36	17	76540405	Body;Body	NA
cg21831512	0.1568	-0.009	36	17	76540686	Body;Body	NA
cg26932839	0.7133	-0.001	36	17	76540725	Body;Body	NA
cg24180621	0.0940	-0.003	36	17	76540780	Body;Body	NA
cg17831694	0.3741	-0.003	36	17	76544495	Body;Body	NA
cg11762703	0.0912	0.011	36	17	76544533	Body;Body	NA
cg02403929	0.3404	0.001	36	17	76544901	Body;Body	NA
cg22486214	0.4842	-0.001	36	17	76545061	Body;Body	NA
cg02047211	0.9318	-0.002	36	17	76547292	Body;Body	NA
cg02864619	0.8175	0.000	36	17	76548556	Body;Body	TRUE

【 2 3 - 1 0 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg14003223	0.6147	0.000	36	17	76497315	Body;Body	NA
cg14289594	0.3493	-0.003	36	17	76497349	Body;Body	NA
cg16892887	0.8649	0.003	36	17	76506807	Body;Body	NA
cg04789650	0.6675	-0.003	36	17	76506890	Body;Body	NA
cg21000762	0.7766	-0.001	36	17	76507445	Body;Body	NA
cg14059665	0.9123	-0.002	36	17	76507480	Body;Body	NA
cg15331383	0.2774	-0.004	36	17	76507958	Body;Body	NA
cg01525498	0.5356	-0.003	36	17	76508024	Body;Body	NA
cg07078467	0.5535	0.002	36	17	76508207	Body;Body	NA
cg15694704	0.2755	-0.009	36	17	76508959	Body;Body	NA
cg06096901	0.9803	0.000	36	17	76508988	Body;Body	NA
cg21818807	0.4883	0.000	36	17	76509072	Body;Body	NA
cg09790523	0.4747	-0.003	36	17	76509659	Body;Body	NA
cg09794615	0.1099	0.010	36	17	76509801	Body;Body	NA
cg05395366	0.2359	0.005	36	17	76509868	Body;Body	NA
cg17052885	0.0947	-0.005	36	17	76510607	Body;Body	NA
cg21734751	0.4560	0.000	36	17	76511032	Body;Body	NA
cg12044293	0.4862	-0.001	36	17	76511264	Body;Body	NA
cg17144164	0.0500	-0.002	36	17	76511295	Body;Body	NA
cg24744721	0.5349	-0.001	36	17	76511564	Body;Body	NA
cg06358794	0.6246	0.001	36	17	76511697	Body;Body	NA
cg26290973	0.3413	0.001	36	17	76511732	Body;Body	NA
cg02346006	0.3890	-0.001	36	17	76512072	Body;Body	NA
cg21219851	0.7685	-0.001	36	17	76512784	Body;Body	NA
cg07450393	0.8688	0.000	36	17	76512857	Body;Body	NA
cg16732367	0.2475	0.001	36	17	76512964	Body;Body	NA
cg09139509	0.5410	0.001	36	17	76513611	Body;Body	NA
cg06091647	0.0260	0.005	36	17	76513987	Body;Body	NA
cg05814100	0.9118	-0.003	36	17	76514392	Body;Body	NA
cg25739309	0.9893	-0.007	36	17	76515047	Body;Body	TRUE
cg02638755	0.3795	-0.006	36	17	76516964	Body;Body	NA
cg11188237	0.5847	-0.001	36	17	76516991	Body;Body	NA
cg18802706	0.3898	-0.001	36	17	76517029	Body;Body	NA
cg18612040	0.0580	-0.005	36	17	76519080	Body;Body	TRUE
cg07584637	0.1946	-0.005	36	17	76526172	Body;Body	NA
cg19394169	0.2908	-0.005	36	17	76526269	Body;Body	NA
cg03641032	0.6363	-0.002	36	17	76526363	Body;Body	NA
cg11949518	0.3498	0.048	36	17	76527360	Body;Body	NA

【 2 3 - 1 2 】

Table 23. The methylation levels of RPTOR CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg17906851	0.2149	-0.036	36	17	76549665	Body;Body	NA
cg21879029	0.7815	0.000	36	17	76549770	Body;Body	NA
cg09491897	0.2438	-0.001	36	17	76549864	Body;Body	NA
cg07964113	0.1756	0.001	36	17	76549884	Body;Body	NA
cg09361653	0.9428	0.000	36	17	76550887	Body;Body	NA
cg17408291	0.7710	-0.001	36	17	76550967	Body;Body	NA
cg04275040	0.2387	0.000	36	17	76551223	Body;Body	NA
cg03800447	0.4430	0.000	36	17	76551344	Body;Body	NA
cg08804421	0.4328	0.003	36	17	76551392	Body;Body	NA
cg26886231	0.4056	0.000	36	17	76551484	Body;Body	NA
cg13136721	0.5328	0.003	36	17	76551778	Body;Body	NA
cg10278297	0.3103	-0.003	36	17	76552433	Body;Body	NA
cg10752731	0.3004	0.000	36	17	76552729	3'UTR;3'UTR	NA
cg03890538	0.5621	-0.003	36	17	76552939	3'UTR;3'UTR	NA
cg18732855	0.0473	0.001	36	17	76553701	3'UTR;3'UTR	NA
cg03389944	0.4000	-0.002	36	17	76554181	3'UTR;3'UTR	NA
cg15432510	0.2292	-0.002	36	17	76554265	3'UTR;3'UTR	NA
cg09439604	0.9534	-0.002	36	17	76554624	3'UTR;3'UTR	NA
cg15406978	0.4216	0.002	36	17	76554688	3'UTR;3'UTR	NA
cg25290617	0.0035	-0.012	36	17	76554705	3'UTR;3'UTR	NA
cg23051282	0.0132	-0.002	36	17	76554756	3'UTR;3'UTR	NA

【 図 2 4 - 1 】

Table 24. The methylation levels of MGRN1 CpG sites by Illumina 450K

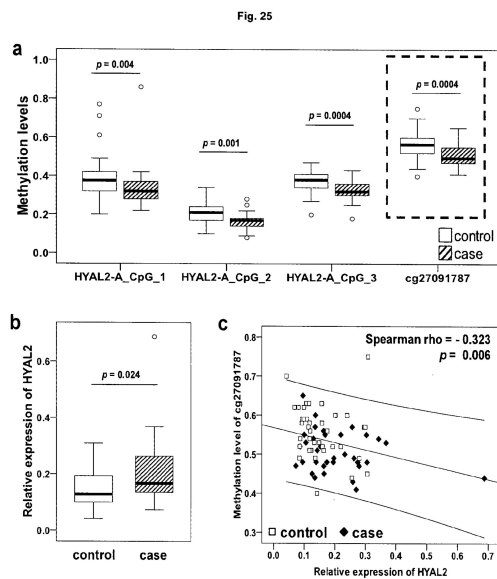
CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg03819286	0.0003	-0.024	36	16	4613975	N_Shore	NA
cg01678580	0.0839	-0.007	36	16	4614019	N_Shore	NA
cg08058836	0.9419	0.001	36	16	4614353	N_Shore	NA
cg00369126	0.7741	0.001	36	16	4614643	N_Shore	NA
cg00203035	0.9047	0.000	36	16	4614660	N_Shore	NA
cg02283436	0.3901	0.003	36	16	4614678	N_Shore	NA
cg04367464	0.9647	0.001	36	16	4614717	Island	NA
cg01482556	0.5192	0.001	36	16	4614719	Island	NA
cg00588858	0.2908	-0.001	36	16	4615007	Island	NA
cg10442572	0.4991	0.001	36	16	4615385	Island	NA
cg16118148	0.7137	0.001	36	16	4615388	Island	NA
cg08142943	0.8882	0.001	36	16	4615652	S_Shore	NA
cg08147187	0.9335	-0.001	36	16	4619397	S_Shelf	NA
cg00693240	0.6552	0.000	36	16	4624508	NA	NA
cg02404489	0.9706	0.000	36	16	4624597	NA	NA
cg08524372	0.8553	-0.002	36	16	4624732	NA	NA
cg05459609	0.0097	-0.004	36	16	4629951	TRUE	TRUE
cg07741192	0.8363	0.000	36	16	4630014	TRUE	TRUE
cg02968175	0.4863	-0.001	36	16	4630021	TRUE	TRUE
cg03336832	0.9156	-0.002	36	16	4636109	N_Shelf	NA
cg03427191	0.0004	0.024	36	16	4637113	N_Shore	NA
cg23233631	0.1891	-0.004	36	16	4638221	Island	NA
cg09440989	0.0021	-0.007	36	16	4639882	S_Shore	NA
cg04071866	0.0023	-0.020	36	16	4640738	N_Shore	NA
cg00639215	0.1100	0.001	36	16	4642770	Island	NA
cg5782454	0.2161	-0.005	36	16	4642835	Island	NA
cg26700932	0.2518	-0.004	36	16	4643004	S_Shore	NA
cg05287064	0.4451	-0.003	36	16	4645946	S_Shelf	NA
cg02647929	0.0001	-0.029	36	16	4654081	NA	NA
cg06323332	0.0000	-0.032	36	16	4654230	NA	NA
cg27193519	0.0001	-0.042	36	16	4654444	NA	NA
cg01922891	0.0000	-0.031	36	16	4654648	NA	NA
cg04962621	0.0001	-0.034	36	16	4654734	NA	NA
cg01156249	0.0244	-0.018	36	16	4654795	NA	NA
cg07635227	0.0124	-0.014	36	16	4654816	NA	NA
cg09250423	0.2256	0.002	36	16	4657753	NA	NA
cg03420907	0.4692	0.001	36	16	4657773	NA	NA
cg08760128	0.3017	-0.001	36	16	4663508	NA	NA

【 図 2 4 - 2 】

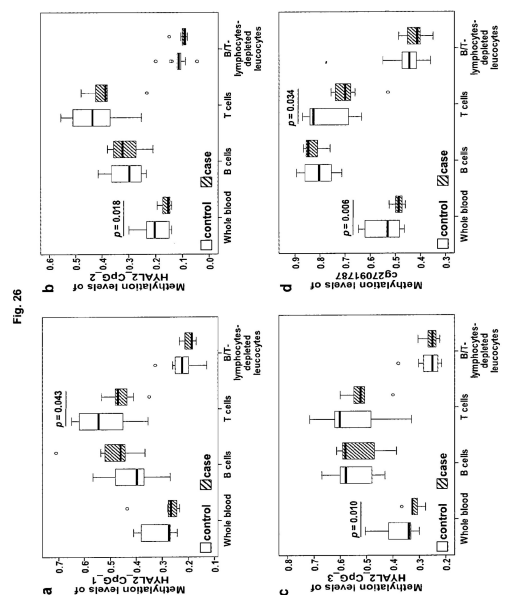
Table 24. The methylation levels of MGRN1 CpG sites by Illumina 450K (continued)

CpG ID	pvalWald Group	meanDiff	BUILD	CHR	MAPINFO	LOCATION	ENHANCER
cg27004760	0.7278	-0.002	36	16	4663623	NA	NA
cg03693714	0.1679	-0.004	36	16	4663817	NA	NA
cg05383524	0.7179	-0.001	36	16	4666971	N_Shelf	NA
cg04087057	0.7062	-0.003	36	16	4668188	N_Shelf	NA
cg27436118	0.0002	-0.031	36	16	4669906	N_Shore	NA
cg08782022	0.0048	-0.048	36	16	4670137	N_Shore	TRUE
cg01662869	0.0000	-0.045	36	16	4670411	Island	TRUE
cg00736299	0.0000	-0.043	36	16	4670466	Island	TRUE
cg02074956	0.0000	-0.032	36	16	4670658	N_Shore	TRUE
cg10505257	0.0003	-0.030	36	16	4671640	Island	NA
cg07812289	0.6799	0.000	36	16	4671719	Island	NA
cg05901634	0.3634	0.003	36	16	4671822	Island	NA
cg00504410	0.0025	-0.014	36	16	4672263	Island	NA
cg03963853	0.1509	-0.002	36	16	4672370	Island	NA
cg07248377	0.0109	-0.015	36	16	4672407	Island	NA
cg10908196	0.0021	-0.018	36	16	4672912	Island	NA
cg01861603	0.8633	-0.002	36	16	4672974	Island	NA
cg16520815	0.0002	-0.030	36	16	4673182	Island	NA
cg09306188	0.0000	-0.057	36	16	4673254	S_Shore	NA
cg04208175	0.8742	-0.002	36	16	4674630	S_Shore	NA
cg04083430	0.0087	-0.035	36	16	4676064	S_Shelf	NA
cg16778018	0.0922	-0.006	36	16	4676226	S_Shelf	NA
cg26627888	0.1955	0.002	36	16	4676420	S_Shelf	NA
cg16576106	0.8006	0.000	36	16	4676779	S_Shelf	NA
cg02072002	0.8181	0.000	36	16	4676796	S_Shelf	NA
cg16420089	0.6085	-0.002	36	16	4676870	S_Shelf	NA
cg02352612	0.1408	-0.005	36	16	4677994	NA	NA
cg00033551	0.0179	-0.012	36	16	4678569	NA	NA
cg03157150	0.8802	-0.002	36	16	4678681	NA	NA
cg09005651	0.0003	-0.013	36	16	4680695	N_Shelf	NA
cg10090769	0.0093	-0.013	36	16	4680792	N_Shelf	NA

【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【配列表】

0006807873000001.app

 フロントページの続き

- (72)発明者 ブルヴィンケル, バーバラ
ドイツ, 69115 ハイデルベルク, モントペリアーエステーエル. 13
- (72)発明者 ヤン, ロンシ
ドイツ, 69117 ハイデルベルク, カールエステーエル. 12
- (72)発明者 シュネーヴァイス, アンドレアス
ドイツ, 69226 ヌスロッホ, シュライフブファット 13

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 国際公開第2013/190091(WO, A1)
特表2012-508577(JP, A)
特開2014-036672(JP, A)
特開2013-027387(JP, A)
特開2011-229532(JP, A)
国際公開第2014/020048(WO, A1)
特表2007-531494(JP, A)
特開2014-036637(JP, A)
国際公開第2009/067655(WO, A1)
国際公開第2011/105570(WO, A1)
国際公開第2003/095679(WO, A1)
特表2014-519340(JP, A)
ALVI, M. A. et al, DNA Methylation as an Adjunct to Histopathology to Detect Prevalent , Inconspicuous Dysplasia and Early-Stage Neoplasia in Barrett's Esophagus , Clinical Cancer Research , 2013年, Vol.19(4), pp.878-888
MACIEJCZYK, A. et al, Elevated nuclear S100P expression is associated with poor survival in early breast cancer patients , Histol Histopathol , 2013年, Vol.28, pp.513-524

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68
C12M 1/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)