

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-526693

(P2011-526693A)

(43) 公表日 平成23年10月13日 (2011. 10. 13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 Z N A A	2 G O 4 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 2 4
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-516713 (P2011-516713)	(71) 出願人	399052796
(86) (22) 出願日	平成21年6月26日 (2009. 6. 26)		ディナ ファーバー キャンサー インス
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月1日 (2011. 2. 1)		ティチュート, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/048862		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02009/158620		2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
(87) 国際公開日	平成21年12月30日 (2009. 12. 30)		ベニュー 4 5 0
(31) 優先権主張番号	61/075, 933	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成20年6月26日 (2008. 6. 26)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 転移に関連する徴候および決定因子、ならびにそれらの使用方法

(57) 【要約】

本発明は、生物マーカーを使用して癌を検出する方法を提供する。本発明は、1つには、タンパク質、核酸、多型、代謝産物、およびその他の分析物などの、ある生物学的マーカー（本明細書では、「DETERMINANT」と呼ぶ）、ならびにある生理学的条件および状態が、転移性腫瘍を発症するリスクの高い被験体において存在し、または変化するという発見に関する。したがって、一態様では、本発明は、被験体における転移性腫瘍を発症するリスクを評価するための方法を提供する。

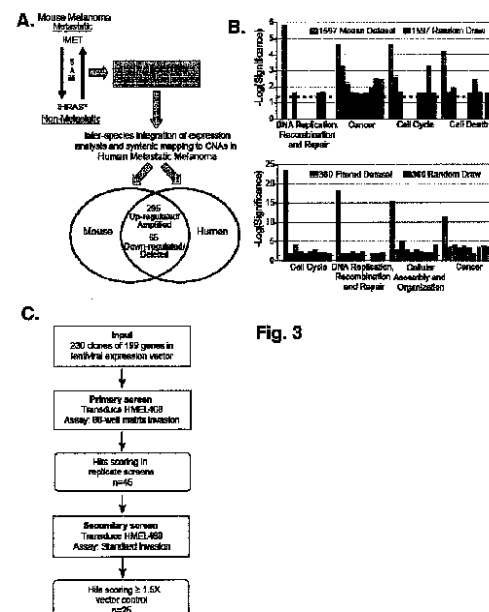


Fig. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所定レベルの予測精度を用いて、被験体における転移性腫瘍を発症するリスクを評価するための方法であって、

a. 前記被験体から得たサンプル中の、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271からなる群から選択された2個以上のDETERMINANTのレベルを測定するステップと、

b. 前記サンプル中の前記2個以上のDETERMINANTのレベルの臨床的に有意な変化を測定するステップであって、前記変化が、前記被験体において転移性腫瘍を発症するリスクが高いことを示しているステップとを含む方法。

10

【請求項 2】

DETERMINANT 26～40、42～60、64、65、67～73、75～95、97、98、100～102、104～125、127～134、136、139～176、178～189、191～209、211、213～216、219～226、228～238、240～260、262～270、272～360からなる群から選択された1個または複数のDETERMINANTの有効量を測定するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記腫瘍に関連する少なくとも1つの標準的なパラメータを測定するステップをさらに含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

DETERMINANTのレベルが、電気泳動または免疫化学的手法によって測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫化学的検出が、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光アッセイ、または酵素結合免疫吸着アッセイによって行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記被験体が、原発性腫瘍、再発性腫瘍、または転移性腫瘍を有する、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記サンプルが腫瘍生検標本である、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記生検標本が、コア生検標本、切除組織生検標本、または切開組織生検標本である、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

5個以上のDETERMINANTの発現レベルを測定する、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

所定レベルの予測精度を用いて、被験体における転移性腫瘍を発症するリスクを評価するための方法であって、

a. 前記被験体から得たサンプル中の、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271からなる群から選択された2個以上のDETERMINANTのレベルを測定するステップと、

b. 前記2個以上のDETERMINANTのレベルを基準値と比較するステップとを含む方法。

40

【請求項 11】

50

前記基準値が指標値である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

所定レベルの予測精度を用いて、被験体における腫瘍の進行を評価するための方法であって、

a. 第 1 の期間で、前記被験体から得た第 1 のサンプル中の、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および 271 からなる群から選択された 2 個以上の DETERMINANT のレベルを検出するステップと、

b. 第 2 の期間で、前記被験体から得た第 2 のサンプル中の 2 個以上の DETERMINANT のレベルを検出するステップと、

c. ステップ (a) で検出された前記 2 個以上の DETERMINANT のレベルを、ステップ (b) で検出された量または基準値と比較するステップとを含む方法。

【請求項 13】

前記第 1 のサンプルが、前記腫瘍の治療前に前記被験体から採取される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 のサンプルが、前記腫瘍の治療後に前記被験体から採取される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 15】

所定レベルの予測精度を用いて、転移性腫瘍の治療の有効性をモニタするための方法であって、

a. 第 1 の期間で、被験体から得た第 1 のサンプル中の、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および 271 からなる群から選択された 2 個以上の DETERMINANT のレベルを検出するステップと、

b. 第 2 の期間で、前記被験体から得た第 2 のサンプル中の、2 個以上の DETERMINANT のレベルを検出するステップと、

c. ステップ (a) で検出された前記 2 個以上の DETERMINANT のレベルを、ステップ (b) で検出された量または基準値と比較するステップであって、治療の有効性が、前記被験体から得た 2 個以上の DETERMINANT のレベルの変化によってモニタされるステップとを含む方法。

【請求項 16】

前記被験体が、前記転移性腫瘍の治療を事前に受けている、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 のサンプルが、前記転移性腫瘍の治療前に前記被験体から採取される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 2 のサンプルが、前記転移性腫瘍の治療後に前記被験体から採取される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

所定レベルの予測精度を用いて、腫瘍であると診断された被験体に関する治療レジメンを選択するための方法であって、

a. 第 1 の期間で、前記被験体から得た第 1 のサンプル中の、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および 271 からなる群から選択された 2 個以上の DETERMINANT の

有効量のレベルを検出するステップと、

b. 任意選択で第2の期間で、前記被験体から得た第2のサンプル中の2個以上のDETERMINANTの有効量のレベルを検出するステップと、

c. ステップ(a)で検出された前記2個以上のDETERMINANTのレベルを、基準値または任意選択でステップ(b)で検出された量と比較するステップとを含む方法。

【請求項20】

前記被験体が、前記腫瘍の治療を事前に受けている、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記第1のサンプルを、前記腫瘍を治療する前に前記被験体から採取する、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記第2のサンプルを、前記腫瘍を治療した後に前記被験体から採取する、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271からなる群から選択された2個以上のマーカーの有効量の、マーカーレベルのパターンを含む、転移性腫瘍基準発現プロファイル。

【請求項24】

請求項20に記載のプロファイルを作成するのに十分な、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271からなる群から選択された対応するDETERMINANTを検出する複数のDETERMINANT検出試薬を含むキット。

【請求項25】

前記検出試薬が、1つもしくは複数の抗体またはその断片を含む、請求項24に記載のキット。

【請求項26】

前記検出試薬が1種または複数のオリゴヌクレオチドを含む、請求項24に記載のキット。

【請求項27】

前記検出試薬が1種または複数のアプタマーを含む、請求項24に記載のキット。

【請求項28】

請求項23に記載の1つまたは複数の転移性腫瘍基準発現プロファイルと、任意選択で追加の試験結果および被験体情報とを含有する機械可読媒体。

【請求項29】

生理学的または生化学的な経路に関連した転移を示す1個または複数のDETERMINANTを含む、DETERMINANTパネル。

【請求項30】

前記生理学的または生化学的な経路が、細胞移動、新脈管形成、細胞外マトリックス分解、またはアノイキスを含む、請求項26に記載のパネル。

【請求項31】

腫瘍の進行を示す1個または複数のDETERMINANTを含む、DETERMINANTパネル。

【請求項32】

疾患の予後を示す生物マーカーを同定する方法であって、

a) 対照と比較して前記疾患において示差的に発現する1つまたは複数の遺伝子を同定して、遺伝子標的リストを作成するステップと、

b) 前記疾患の進行の機能的局面に関連した前記標的リストの1つまたは複数の遺伝子を同定するステップと

を含み、それによって前記疾患の予後を示す生物マーカーを同定する方法。

【請求項33】

進化的に保存された変化を含む、前記遺伝子標的リストの1つまたは複数の遺伝子を同定して、第2の遺伝子標的リストを作成するステップ

をさらに含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記疾患が癌である、請求項32に記載の方法。

【請求項35】

前記癌が転移性癌である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記機能的局面が、細胞移動、新脈管形成、細胞外マトリックス分解、またはアノイキスである、請求項32に記載の方法。

【請求項37】

DETERMINANTの活性または発現を調節する化合物を同定する方法であって、

(a) 前記DETERMINANTを発現する細胞を提供するステップと、

(b) 前記細胞を、候補化合物を含む組成物と接触させるステップと、

(c) 物質が前記DETERMINANTの発現または活性を変化させるか否かを決定するステップと

を含み、それにより、前記化合物の存在下で観察された前記変化が、前記細胞を、前記化合物を含まない組成物と接触させたときに観察されない場合、前記同定された化合物は、前記DETERMINANTの活性または発現を調節する方法。

【請求項38】

前記細胞を、インビボ、エキソビボ、またはインビトロで接触させる、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

被験体の癌を治療する方法であって、DETERMINANTの活性または発現を調節する化合物を前記被験体に投与するステップを含む方法。

【請求項40】

被験体の癌を治療する方法であって、DETERMINANTにより調節される化合物の活性または発現を調節する薬剤を前記被験体に投与するステップを含む方法。

【請求項41】

前記化合物がTGFβまたはCXCR4である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記薬剤がTGFβ阻害剤またはCXCR4阻害剤である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

腫瘍を有する患者を治療する方法であって、

DETERMINANT1～360の2個以上が、前記腫瘍から得たサンプルにおいて測定して臨床的に有意な形で変化する場合に、患者が腫瘍を有していると特定するステップと、

腫瘍転移を予防または低減する治療レジメンで前記患者を治療するステップとを含む方法。

【請求項44】

アジュバント治療を必要とする腫瘍患者を選択する方法であって、

DETERMINANT1～360の2個以上を測定することにより、前記患者における転移のリスクを評価するステップであって、前記患者から得た腫瘍サンプル中の前記2個以上のDETERMINANTの臨床的に有意な変化は、前記患者がアジュバント治療を必要としていることを示すステップを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 45】

腫瘍患者に治療決定を知らせる方法であって、

前記患者から得た腫瘍サンプル中の、DETERMINANT 1～360の2個以上に
関する情報を得るステップと、

前記2個以上のDETERMINANTが臨床的に有意な様式で変化する場合に、前記
患者における腫瘍転移を予防または低減する治療レジメンを選択するステップと
を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

(関連出願)

本出願は、2008年6月26日に出願された米国出願第61/075,933号の利
益を主張し、この内容は、本明細書においてその全体が参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、一般に、癌転移に伴う生物学的徴候および癌転移をもたらす遺伝的決定因子
の同定と、そのような生物学的徴候および決定因子を癌のスクリーニング、予防、診断、
治療、モニタリング、および予後に使用する方法とに関する。

【背景技術】

【0003】

20

(発明の背景)

転移は、ほとんどの致死性固形腫瘍の主な特徴であり、局所制御を飛び越えかつ周囲の
マトリックスを通して浸潤する能力を腫瘍細胞に与え、脈管構造またはリンパ管内に移行
して生存し、最終的には外来の土壌でコロニー化し成長する、遺伝的なまたは後成的な変
質によって誘導される複雑な多段階の生物学的プロセスを示す(Gaorav P. Gu
ptaおよびJoan Massague(2006年)Cell)。そのような転移を
もたらす遺伝的事象が、腫瘍が成長し拡大するにつれて確率的に獲得できることに
関しては、全体として意見の一致が見られるものであり、確かに、全身腫瘍組織量は転移のリス
クに関する正の予測子である。一方、山のような証拠は、一部の腫瘍がその最も早い段階
から転移する能力を得ている可能性がある(またはない)という主張を普及させた。一部の
腫瘍がその生活史の初期において、転移に関して「生来のものである」という考えは、
同等に初期段階の腫瘍(すなわち、同様の腫瘍組織量)に関する広く様々な結果の臨床観
察によって裏付けされる。これに対して、転移の転写状態は、他の転移よりもそれに一致
した原発性のものにより類似していることが示されてきた(Perouら、2000年)
。さらに、癌ゲノムにおける大規模なゲノム異常は、良性から悪性の状態に移行する初期
に生じることが、実証されている(非特許文献1；非特許文献2)。その他の著者にはM
arcus Bosenbergが含まれ、その進化の初期段階に獲得された遺伝的事象
の特定の補体が、少なくとも一部では、その転移能を含む腫瘍の生物学的挙動を最終的に
は決定することになることを示唆している。したがって本発明者らは、腫瘍の転移能の遺
伝的決定因子が、初期段階の原発性悪性腫瘍において以前から存在しており、そのような
決定因子は、転移性播種に寄与するまさにそのプロセスにおいて機能的に活性であると推
論する。したがって、そのような転移決定因子は、可能性ある治療標的であるだけでなく
癌性疾患の攻撃性の決定因子でもあり、したがって転移決定因子は、予後決定因子でもあ
る。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Chin, K.、de Solorzano, C. O.、Knowle
s, D.、Jones, A.、Chou, W.、Rodriguez, E. G.、Kuo
, W. L.、Ljung, B. M.、Chew, K.、Myambo, K. ら(2004

50

年)、In situ analyses of genome instability in breast cancer、Nat Genet 36 巻、984～988 頁
【非特許文献 2】Rudolph, K. L.、Millard, M.、Bosenberg, M. W.、および DePinho, R. A. (2001 年)、Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans、Nat Genet 28 巻、155～159 頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

本発明は、1 つには、タンパク質、核酸、多型、代謝産物、およびその他の分析物などの、ある生物学的マーカー（本明細書では、「DETERMINANT」と呼ぶ）、ならびにある生理学的条件および状態が、転移性腫瘍を発症するリスクの高い被験体において存在し、または変化するという発見に関する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

したがって、一態様では、本発明は、被験体における転移性腫瘍を発症するリスクを評価するための方法を提供する。転移性腫瘍を発症するリスクは、被験体から得たサンプル中の DETERMINANT の有効量のレベルを測定することによって決定される。被験体が転移性腫瘍を発症するリスクが高いことは、サンプル中の DETERMINANT のレベルの臨床的に有意な変化を測定することによって決定される。あるいは、被験体が転移性腫瘍を発症するリスクが高いことは、有効量の DETERMINANT のレベルを基準値と比較することによって決定される。いくつかの態様では、この基準値が指標である。

20

【0007】

別の態様では、本発明は、第 1 の期間で、被験体から得た第 1 のサンプル中の DETERMINANT の有効量のレベルを検出し、第 2 の期間で、被験体から得た第 2 のサンプル中の DETERMINANT の有効量のレベルを検出し、検出された DETERMINANT のレベルを基準値と比較することによって、被験体における腫瘍の進行を評価するための方法を提供する。いくつかの態様では、第 1 のサンプルは、腫瘍の治療前に被験体から採取され、第 2 のサンプルは、腫瘍の治療後に被験体から採取される。

30

【0008】

さらなる態様では、本発明は、第 1 の期間で、被験体から得た第 1 のサンプル中の DETERMINANT の有効量のレベルを検出し、任意選択で第 2 の期間で、被験体から得た第 2 のサンプル中の DETERMINANT の有効量のレベルを検出することによって、治療の有効性をモニタし、または転移性腫瘍の治療レジメンを選択するための方法を提供する。第 1 の期間で検出された DETERMINANT の有効量のレベルを、第 2 の期間で検出されたレベルまたは基準値と比較する。治療の有効性は、被験体から得た DETERMINANT の有効量のレベルの変化によってモニタされる。

【0009】

40

さらに別の態様では、本発明は、DETERMINANT の有効量が、腫瘍から得たサンプルにおいて測定して臨床的に有意に変化した場合に、患者が腫瘍を有していると特定し、腫瘍転移を予防または低減する治療レジメンで患者を治療することによって、腫瘍を有する患者を治療する方法を提供する。

【0010】

一態様では、本発明は、DETERMINANT の有効量を測定することにより、患者における転移のリスクを評価することによって、アジュバント治療を必要とする腫瘍患者を選択する方法であって、患者から得た腫瘍サンプル中の 2 個以上の DETERMINANT の臨床的に有意な変化は、患者がアジュバント治療を必要としていることを示す方法を提供する。

50

【0011】

別の態様では、本発明は、患者から得た腫瘍サンプル中のDETERMINANTの有効量に関する情報を得、2個以上のDETERMINANTが臨床的に有意に変化した場合に、患者における腫瘍転移を予防または低減する治療レジメンを選択することによって、腫瘍患者に治療決定を知らせる方法を提供する。

【0012】

様々な実施形態では、評価／モニタリングは、所定レベルの予測性により実現される。所定レベルの予測性とは、その方法が、許容されるレベルの臨床または診断精度を提供することを意味する。臨床および診断精度は、本明細書に記述される方法など、当技術分野で公知の方法によって決定される。

10

【0013】

DETERMINANTには、例えば、本明細書に記述されるDETERMINANT 1～360が含まれる。1、2、3、4、5、10、またはそれ以上のDETERMINANTが測定される。好ましくは、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271から選択された少なくとも2個のDETERMINANTが測定される。任意選択で、本発明の方法は、腫瘍に関連する少なくとも1つの標準的なパラメータを測定するステップをさらに含む。

【0014】

DETERMINANTのレベルは、電気泳動または免疫化学的手法によって測定される。例えば、決定因子のレベルは、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光アッセイ、または酵素結合免疫吸着アッセイによって検出される。

20

【0015】

被験体は、原発性腫瘍、再発性腫瘍、または転移性腫瘍を有する。いくつかの態様では、サンプルは、腫瘍の治療を事前に受けている被験体から採取される。あるいは、サンプルは、腫瘍の治療前に被験体から採取される。サンプルは、コア生検標本、切除組織生検標本、もしくは切開組織生検標本などの腫瘍生検標本、または循環腫瘍細胞を有する血液サンプルである。

【0016】

本発明には、DETERMINANT 1～360から選択された2個以上のマーカーの有効量の、マーカーレベルのパターンを含有する、転移性腫瘍基準発現プロファイルも含まれる。好ましくは、このプロファイルは、DETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271のマーカーレベルのパターンを含有する。1つまたは複数の転移性腫瘍基準発現プロファイルと、任意選択で追加の試験結果および被験体情報とを含有する機械可読媒体も含まれる。別の態様では、本発明は、対応するDETERMINANTを検出する複数のDETERMINANT検出試薬を含むキットを提供する。検出試薬は、例えば、抗体またはその断片、オリゴヌクレオチド、またはアプタマーである。

30

40

【0017】

別の態様では、本発明は、生理学的または生化学的な経路に関連した腫瘍の転移または進行を示す1個または複数のDETERMINANTを含有するDETERMINANTパネルを提供する。生理学的または生化学的経路には、例えば、含まれる。

【0018】

さらに別の態様では、本発明は、対照と比較して疾患において示差的に発現した1つまたは複数の遺伝子を同定して、遺伝子標的リストが作成し；疾患の進行の機能的局面に関連した標的リストの1つまたは複数の遺伝子を同定することによって、疾患の予後を示す生物マーカーを同定する方法を提供する。機能的局面は、例えば、細胞移動、血管新生、細胞外マトリックス分解、またはアノイキス耐性である。任意選択で、この方法は、進化

50

的に保存された変化を含む、遺伝子標的リストの1つまたは複数の遺伝子を同定して、第2の遺伝子標的リストが作成するステップを含む。この疾患は、例えば、転移性癌などの癌である。

【0019】

DETERMINANTを発現する細胞を提供し、細胞を、候補化合物を含む組成物と接触させ（例えば、インビボ、エキソビボ、またはインビトロ）、物質がDETERMINANTの活性または発現を変化させるか否かを決定することによって、DETERMINANTの活性または発現を調節する化合物が同定される。化合物の存在下で観察された変化が、細胞を、化合物を含まない組成物と接触させたときに観察されない場合、同定された化合物は、DETERMINANTの活性または発現を調節する。

10

【0020】

DETERMINANTの活性もしくは発現を調節する化合物を被験体に投与することによって、またはDETERMINANTにより調節された化合物の活性もしくは発現を調節する薬剤を被験体に投与することによって、被験体の癌が治療される。化合物は、例えば、(i) DETERMINANTポリペプチド；(ii) DETERMINANTをコードする核酸；(iii) DETERMINANTをコードする核酸の発現または活性を低下させる核酸、その誘導体、断片、類似体、および相同体；(iv) DETERMINANTに特異的な抗体などのDETERMINANTの発現または活性を低下させるポリペプチドであってもよい。本明細書で使用される「抗体」(Ab)という用語は、所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例えば、2重特異的抗体）、ヒト化またはヒト抗体、Fv抗体、ダイアボディ、および抗体断片を含む。例えば、化合物はTGFβであり、薬剤はTGFβ阻害剤である。別の例は、CXCR4であり、薬剤はCXCR4拮抗薬である。

20

【0021】

他に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本発明が関係する当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記述されるものと同様のまたは均等な方法および材料を、本発明の実施に際して使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記述する。本明細書に記述される全ての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、その全体が参照により明らかに組み込まれる。矛盾する場合、定義を含めた本発明の明細書が優先する。さらに、本明細書に記述される材料、方法、および実施例は、単なる例示であり、限定しようとするものではない。

30

【0022】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な記述および特許請求の範囲から明らかにされ、そのような記述および範囲に包含されることになる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1-1】図1は、メラノサイト特異的MET発現が、皮膚メラノーマの形成を促進させることを示す図である。(A)メラノサイトを、指示される動物から収集し、培養に適應させた。total RNAを、デオキシサイクリン(DOX)の存在下でまたは存在させない状態で成長させた培養メラノサイトから抽出し、METの発現(Tg MET)を、導入遺伝子特異的プライマーを使用するRT-PCRにより評価した。R15、リボソームタンパク質R15内部対照；-RT、逆転写酵素PCR対照なし。(B)原発性腫瘍(T1~T6)を、デオキシサイクリンに関してiMet動物から収集し、遺伝子特異的プライマーを使用したRT-PCRによって、メラノサイトマーカーチロシナーゼ、TRP1、およびDctの発現を評価した。XB2、マウスメラノサイト細胞系；B16F10、マウスメラノーマ細胞系；R15、リボソームタンパク質R15内部対照；-RT、逆転写酵素PCR対照なし。(C)MET誘発性原発性メラノーマにおける、S100のメラノサイト特異的免疫組織化学的染色。t、腫瘍；f、濾胞；fm、濾胞性メラノサイト；a、脂肪細胞。(D)MET誘発性原発性メラノーマにおける、total c-Metおよびリン酸化c-Metの免疫組織化学的染色。(E)RT-qPCRは、ME

40

50

T誘発性原発性メラノーマにおけるHGF発現を分析するために行った(T1~T6)。腫瘍発現データは、2種のInk4a/Arfメラノサイト細胞系での発現に対して正規化される。

【図1-2】図1は、メラノサイト特異的MET発現が、皮膚メラノーマの形成を促進させることを示す図である。(A)メラノサイトを、指示される動物から収集し、培養に適応させた。total RNAを、デオキシサイクリン(DOX)の存在下でまたは存在させない状態で成長させた培養メラノサイトから抽出し、METの発現(Tg MET)を、導入遺伝子特異的プライマーを使用するRT-PCRにより評価した。R15、リボソームタンパク質R15内部対照；-RT、逆転写酵素PCR対照なし。(B)原発性腫瘍(T1~T6)を、ドキシサイクリンに関してiMet動物から収集し、遺伝子特異的プライマーを使用したRT-PCRによって、メラノサイトマーカーチロシナーゼ、TRP1、およびDctの発現を評価した。XB2、マウスメラチノサイト細胞系；B16F10、マウスメラノーマ細胞系；R15、リボソームタンパク質R15内部対照；-RT、逆転写酵素PCR対照なし。(C)MET誘発性原発性メラノーマにおける、S100のメラノサイト特異的免疫組織化学的染色。t、腫瘍；f、濾胞；fm、濾胞性メラノサイト；a、脂肪細胞。(D)MET誘発性原発性メラノーマにおける、total c-Metおよびリン酸化c-Metの免疫組織化学的染色。(E)RT-qPCRは、MET誘発性原発性メラノーマにおけるHGF発現を分析するために行った(T1~T6)。腫瘍発現データは、2種のInk4a/Arfメラノサイト細胞系での発現に対して正規化される。

【図2-1】図2は、Met活性化が転移性メラノーマの発症を誘導させ、肺への播種を促進させることを示す図である。(A)Boydénチャンバに、無血清媒体に加えた 5×10^4 iMet腫瘍細胞(系BC014)を播いた。チャンバを、 50 ng/ml の組換えHGFを含まないおよび含む化学誘引物質(10%の血清を含有する媒体)内に置き、24時間インキュベートした。浸潤性細胞を、クリスタルバイオレットで染色することにより可視化した。(B)ドキシサイクリンで誘発させたiMetトランスジェニックマウスの背部皮膚の原発性皮膚紡錘体細胞メラノーマのH&E染色切片であり、遠位転移がリンパ節副腎および肺に存在している。(C) 5×10^5 細胞を、SCIDおよびマウスの尾部静脈に注射し、肺結節の形成を追跡し、転移性播種を相関させた。左パネル：HRAS*メラノーマ細胞系を注射した(0/4マウス)SCID動物の尾部静脈から収集した無結節肺組織のH&E染色切片；右パネル：MET誘導BC014細胞系(iMet)(3/4マウス)を注射したSCID尾部静脈から収集した、結節浸潤肺組織のH&E染色切片。t、腫瘍。

【図2-2】図2は、Met活性化が転移性メラノーマの発症を誘導させ、肺への播種を促進させることを示す図である。(A)Boydénチャンバに、無血清媒体に加えた 5×10^4 iMet腫瘍細胞(系BC014)を播いた。チャンバを、 50 ng/ml の組換えHGFを含まないおよび含む化学誘引物質(10%の血清を含有する媒体)内に置き、24時間インキュベートした。浸潤性細胞を、クリスタルバイオレットで染色することにより可視化した。(B)ドキシサイクリンで誘発させたiMetトランスジェニックマウスの背部皮膚の原発性皮膚紡錘体細胞メラノーマのH&E染色切片であり、遠位転移がリンパ節副腎および肺に存在している。(C) 5×10^5 細胞を、SCIDおよびマウスの尾部静脈に注射し、肺結節の形成を追跡し、転移性播種を相関させた。左パネル：HRAS*メラノーマ細胞系を注射した(0/4マウス)SCID動物の尾部静脈から収集した無結節肺組織のH&E染色切片；右パネル：MET誘導BC014細胞系(iMet)(3/4マウス)を注射したSCID尾部静脈から収集した、結節浸潤肺組織のH&E染色切片。t、腫瘍。

【図3-1】図3は、細胞浸潤に関する低複雑性の機能的遺伝的スクリーニングと結びつけた多次元異種間ゲノム分析により、転移DETERMINEANTが同定されることを示す図である。(A)iHRAS*およびiMet皮膚メラノーマから作成された発現プロファイルのSAM分析によって差別的に発現した遺伝子(1597プローブ集合)を、ヒ

ト転移性メラノーマにおける増幅および欠失領域内に存在する遺伝子でまたはヒト原発性および転移性メラノーマの間で差別的に発現した遺伝子を用いたオルソログマッピングで二分して、360候補を定めた。(B) iHRA S * および iMe t マウスメラノーマの間で差別的に発現した遺伝子の Ingenu it y 経路分析 (1597プローブ集合、上部) と、異種間積算遺伝子リスト (360のフィルタリング済み遺伝子リスト、下部) とを、等サイズの9個のランダムに引き出した遺伝子集合と比較した。上位4つの有意な機能的分類を示す。破線は、IPAによる有意性を示す。(C) 浸潤に関して低複雑性の遺伝子スクリーニングを示すフローチャート。レンチウイルス系で発現した295の上方制御／増幅候補のうち199を表す230クローンを、TERT不死化ヒト原発性メラノサイト (HME L 468) に個々に形質導入し、96ウエルマトリゲル浸潤プレートで浸潤に関してアッセイをした。浸潤性は、蛍光媒介定量を介して測定し、値をGFP対照に対して正規化した。2つの独立したスクリーニングでベクター対照から2×標準偏差だけ大きいスコアを示す候補 (n=45) を、標準的な24ウエルマトリゲル浸潤チャンバを使用するHME L 468またはWM3211での2次確認スクリーニング用を選択した。(D) 浸潤前遺伝子に関する低複雑性の遺伝子スクリーニングのヒストグラム概要。HME L 468プライム化メラノサイトに個々の転移前候補cDNAウイルスを形質導入し、その後、96ウエルトランスウエル浸潤アッセイプレートに投入した。浸潤性を、蛍光媒介定量を介して測定し、値を空ベクター対照に対して正規化した。2つの独立したスクリーニングの試みにおいて、GFP対照から2×標準偏差の浸潤を誘導する候補cDNAは、プライマリースクリーニングヒット (n=45) と見なした。(E) 対照31に対する浸潤活性の倍数増加のサマリーヒストグラムは、転移DETERMINANTを確認した。

【図3-2】図3は、細胞浸潤に関する低複雑性の機能的遺伝的スクリーニングと結びつけた多次元異種間ゲノム分析により、転移DETERMINANTが同定されることを示す図である。(A) iHRA S * および iMe t 皮膚メラノーマから作成された発現プロファイルのSAM分析によって差別的に発現した遺伝子 (1597プローブ集合) を、ヒト転移性メラノーマにおける増幅および欠失領域内に存在する遺伝子でまたはヒト原発性および転移性メラノーマの間で差別的に発現した遺伝子を用いたオルソログマッピングで二分して、360候補を定めた。(B) iHRA S * および iMe t マウスメラノーマの間で差別的に発現した遺伝子の Ingenu it y 経路分析 (1597プローブ集合、上部) と、異種間積算遺伝子リスト (360のフィルタリング済み遺伝子リスト、下部) とを、等サイズの9個のランダムに引き出した遺伝子集合と比較した。上位4つの有意な機能的分類を示す。破線は、IPAによる有意性を示す。(C) 浸潤に関して低複雑性の遺伝子スクリーニングを示すフローチャート。レンチウイルス系で発現した295の上方制御／増幅候補のうち199を表す230クローンを、TERT不死化ヒト原発性メラノサイト (HME L 468) に個々に形質導入し、96ウエルマトリゲル浸潤プレートで浸潤に関してアッセイをした。浸潤性は、蛍光媒介定量を介して測定し、値をGFP対照に対して正規化した。2つの独立したスクリーニングでベクター対照から2×標準偏差だけ大きいスコアを示す候補 (n=45) を、標準的な24ウエルマトリゲル浸潤チャンバを使用するHME L 468またはWM3211での2次確認スクリーニング用を選択した。(D) 浸潤前遺伝子に関する低複雑性の遺伝子スクリーニングのヒストグラム概要。HME L 468プライム化メラノサイトに個々の転移前候補cDNAウイルスを形質導入し、その後、96ウエルトランスウエル浸潤アッセイプレートに投入した。浸潤性を、蛍光媒介定量を介して測定し、値を空ベクター対照に対して正規化した。2つの独立したスクリーニングの試みにおいて、GFP対照から2×標準偏差の浸潤を誘導する候補cDNAは、プライマリースクリーニングヒット (n=45) と見なした。(E) 対照31に対する浸潤活性の倍数増加のサマリーヒストグラムは、転移DETERMINANTを確認した。

【図4】図4は、記述されるnevi、原発性、および転移性メラノーマ腫瘍試験片の組織マイクロアレイ (TMA) で行われた代表的なDETERMINANT (A) Fascin1 (FSCN1) および (B) HS F1に関する、タンパク質発現の自動化定量分析 (AQUA (登録商標)) を示す図である [Camp, R. L.、Chung, G. G.

、および Rimm, D. L.、Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. Nat Med 8 (11 巻)、1323～1327 頁 (2002 年)]。情報コアは、それぞれ細胞質および核細胞区画が染色される FSCN1 および HSF1 の AQUA (登録商標) スコアに関して評価した。有意性 (S ; 5 %) は、Fisher 検定に基づく。結果の概要に関しては表 2 を参照されたい。

【図 5】図 5 は、(A) K 平均階層クラスタリングと、(B) 295 のステージ I～II の乳癌のコホートにおける上記から得た 2 つのサブクラスの全体 (上部) および転移無し (下部) の生存に関する Kaplan-Meier 分析とを示す図である [乳癌のデータは : van de Vijver, M. J. ら、A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med 347 (25 巻)、1999～2009 頁 (2002 年) ; van't Veer, L. J. ら、Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 415 (6871 巻)、530～536 頁 (2002 年)]。

【図 6】図 6 は、インビトロアノイクススクリーニング法を示す図である。(A) インビトロアノイクススクリーニング戦略。(B) ラット腸上皮 (RIE) 細胞は、低接着プレートに塗布したときに生存度が低下した。RIE 細胞は、96 ウェル ULC プレートまたは接着プレートに 24 時間塗布した。ATP レベルを、細胞生存度に関して測定し、24 時 / 0 時の時間でのレベルの比として得た。(C) RIE は V5-mTrkB を発現する。RIE 細胞を感染させ、48 時間で細胞溶解物を単離し、SDS-PAGE により分解した。ウェスタンブロット分析を、 α -V5 抗体で行った。

【図 7】図 7 は、様々な遺伝子が RIE 細胞にアノイクス耐性を与えることを示す図である。RIE 細胞を、候補遺伝子の 1 種を発現するレトロウイルスに感染させ、超低クラスタープレートに塗布し、細胞の生存度を塗布後 24 時間で測定した。値を、0 時間の生存度に対して示す。全ての読取りは、3 回ずつ行った。強調されているのは、空ベクター、BDNF、または mTrkB (正の対照) の読取りである。

【図 8】図 8 は、中央値よりも 2 標準偏差大きいラット腸上皮 (RIE) 細胞にアノイクス耐性を与えた 20 個の候補遺伝子を示す図である。9 個の候補遺伝子 (HNRPR、CDC20、PRIM2A、HRSP12、ENY2、MGC14141、RECQL、STK3、および MX2) は、2 つの独立したスクリーニングに関して中央値よりも 1 標準偏差大きい値を与えた。これらの遺伝子は、指示された染色体上に位置付けられる。

【図 9】図 9 は、遺伝子によって、RIE 細胞が懸濁液中に維持された後に付着するという能力が与えられることを示す図である。候補遺伝子を発現する RIE 細胞を、ULC プレート上に 24 時間塗布した。懸濁液中の細胞を接着プレートに移し、24 時間後に接着した細胞をクリスタルバイオレットで染色した。細胞生存度を、24 時間 / 0 時間として示す。全ての読取りは、それぞれ 3 回行った。

【図 10】図 10 は、転移 DETERMINANT が、腫瘍原性を促進させる状態を示す図である。(A) GFP または示された転移 DETERMINANT を安定に発現する HME L468 細胞を、SCID マウス (n=6) に皮下注射し、これらを臨床試験によって腫瘍形成をモニタした。周囲の筋線維 (m) および脂肪細胞 (a) を通した局所浸潤を示す、代表的な H&E 染色原発性腫瘍 (t) が示されている。(B) DETERMINANT 誘導腫瘍原性アッセイから収集されたデータをまとめた表である。

【図 11-1】図 11 は、DETERMINANT HOXA1 が、細胞浸潤および肺播種能を促進させる状態を示す。(A) HME L468 における HOXA1 の異所性発現は、FAK (Ty r397 ; 左パネル) の高い活性化をもたらし、それに応じてトランスウェル浸潤アッセイでのマトリゲルを通し浸潤の増大をもたらした (右パネル ; 図 11 C において定量化されている)。(B) 図 11 C で定量化された、WM115 および WM3

10

20

30

40

50

2 1 1 形質導入細胞系での H O X A 1 発現を確認するための、H O X A 1 - V 5 に関するウェスタンブロット分析（左パネル）、およびトランスウエル浸潤アッセイの代表的な画像（右パネル）。（C）図 1 1 A ~ B に示された浸潤チャンバデータの定量化。（D）G F P または H O X A 1 を安定に発現する H M E L 4 6 8 細胞を、S C I D マウス（ $n = 6$ ）の尾部静脈に静脈内注射し、注射後 1 2 週での肺結節に関して剖検により試験をした。巨視的（および微視的）な肺結節を、H O X A 1 コホート（ $n = 3$ ）の 5 0 % で検出したが、対照では検出されなかった。1 匹の、H M E L 4 6 8 - H O X A 1 を注射した動物から切除した、肺結節（t）および周囲の肺実質（l）の代表的な H & E 顕微鏡写真。（E）空ベクター（E V）または H O X A 1 を発現する W M 1 1 5 メラノーマ細胞を、ヌードマウスに皮下注射し、注射後 4 6 日目に測定した。（F）皮内注射された W M 1 1 5 - H O X A 1 細胞を保持するヌードマウスから単離した肺の、代表的な転移。

【図 1 1 - 2】図 1 1 は、D E T E R M I N A N T H O X A 1 が、細胞浸潤および肺播種能を促進させる状態を示す。（A）H M E L 4 6 8 における H O X A 1 の異所性発現は、F A K（T y r 3 9 7；左パネル）の高い活性化をもたらし、それに応じてトランスウエル浸潤アッセイでのマトリゲルを通し浸潤の増大をもたらした（右パネル；図 1 1 C において定量化されている。）。（B）図 1 1 C で定量化された、W M 1 1 5 および W M 3 2 1 1 形質導入細胞系での H O X A 1 発現を確認するための、H O X A 1 - V 5 に関するウェスタンブロット分析（左パネル）、およびトランスウエル浸潤アッセイの代表的な画像（右パネル）。（C）図 1 1 A ~ B に示された浸潤チャンバデータの定量化。（D）G F P または H O X A 1 を安定に発現する H M E L 4 6 8 細胞を、S C I D マウス（ $n = 6$ ）の尾部静脈に静脈内注射し、注射後 1 2 週での肺結節に関して剖検により試験をした。巨視的（および微視的）な肺結節を、H O X A 1 コホート（ $n = 3$ ）の 5 0 % で検出したが、対照では検出されなかった。1 匹の、H M E L 4 6 8 - H O X A 1 を注射した動物から切除した、肺結節（t）および周囲の肺実質（l）の代表的な H & E 顕微鏡写真。（E）空ベクター（E V）または H O X A 1 を発現する W M 1 1 5 メラノーマ細胞を、ヌードマウスに皮下注射し、注射後 4 6 日目に測定した。（F）皮内注射された W M 1 1 5 - H O X A 1 細胞を保持するヌードマウスから単離した肺の、代表的な転移。

【図 1 2】図 1 2 は、H O X A 1 により誘導されたトランスクリプトーム分析により、I n g e n u i t y 経路分析によって定義された S m a d 3 網状組織を特定した状態を示す図である。分子網状構造は、I n g e n u i t y 経路分析（I n g e n u i t y S y s t e m s I n c.）を使用して生成された。網状構造は、結節（遺伝子）および縁部（結節間の生物学的関係）として、グラフにより示す。実線は、直接的な相互作用を示し、破線は、間接的な相互作用を示す。赤および緑色は、それぞれトランスクリプトーム分析で過発現または未発現した遺伝子を示す。物体の形状は、タンパク質が属する機能的ファミリーを示す。遺伝子のファミリーおよび内容については、補助的な表 s 3 を参照されたい。（B）示される H O X A 1 形質導入細胞系を、R T - q P C R を使用して S M A D 3 発現に関して評価した。値は、G A P D H 内部対照および G F P 実験対照に対して計算した。誤差棒は、標準誤差を示す。

【図 1 3 - 1】図 1 3 は、H O X A 1 の異所性発現が、T G F β 情報伝達応答の上方制御を通して細胞浸潤を強化することを示す。（A）H O X A 1 を異所的に発現する W M 1 1 5 細胞を、T G F β 誘発性 3 T P - L u x ルシフェラーゼ受容体でトランスフェクトし、その後、T G F β を用いてまたは用いずに処理することにより、G F P 発現対照と比較した応答性を評価した。誤差棒は、標準誤差を示す；両側 t 検定：- T G F β 、 $p = 0.003$ ；+ T G F β 、 $p < 0.0001$ 。（B）T G F β と共にまたは T G F β 無しで 1 0 % 血清または 1 % 血清中に繁殖させた W M 1 1 5 細胞を安定に発現する G F P または H O X A 1 からの全細胞溶解物を、指示される抗体を使用してウェスタンブロットにより分析した。（C）H O X A 1 を安定に発現する W M 1 1 5 細胞に、S M A D 3 s h R N A（s h S M A D 3）または非標的 s h R N A（s h N T）を形質導入し、マトリゲルトランスウエル浸潤チャンバに投入して、G F P 対照ウイルス（G F P）が形質導入された W M 1 1 5 親細胞系と比較した細胞浸潤のアッセイを行った。浸潤チャンバの代表的な画像を

右パネルに示す、両側 t 検定：GFP 対 shNT、 $p = 0.0008$ ；shNT 対 shSNA D3、 $p = 0.0022$ 。(D) 空ベクター (EV) または HOXA1 を発現する WM115 メラノーマ細胞を、ヌードマウスに皮下注射した。得られた異種移植腫瘍切片を、抗ホスホ SMAD3 で免疫染色することにより、HOXA1 腫瘍試験片での SMAD3 活性化を確認した。

【図 13-2】図 13 は、HOXA1 の異所性発現が、TGF β 情報伝達応答の上方制御を通して細胞浸潤を強化することを示す。(A) HOXA1 を異所的に発現する WM115 細胞を、TGF β 誘発性 3TP-Lux ルシフェラーゼ受容体でトランスフェクトし、その後、TGF β を用いてまたは用いずに処理することにより、GFP 発現対照と比較した応答性を評価した。誤差棒は、標準誤差を示す；両側 t 検定：-TGF β 、 $p = 0.003$ ；+TGF β 、 $p < 0.0001$ 。(B) TGF β と共にまたは TGF β 無しで 10 % 血清または 1 % 血清中に繁殖させた WM115 細胞を安定に発現する GFP または HOXA1 からの全細胞溶解物を、指示される抗体を使用してウェスタンブロットにより分析した。(C) HOXA1 を安定に発現する WM115 細胞に、SMAD3 shRNA (shSMAD3) または非標的 shRNA (shNT) を形質導入し、マトリゲルトランスウエル浸潤チャンバに投入して、GFP 対照ウイルス (GFP) が形質導入された WM115 親細胞系と比較した細胞浸潤のアッセイを行った。浸潤チャンバの代表的な画像を右パネルに示す、両側 t 検定：GFP 対 shNT、 $p = 0.0008$ ；shNT 対 shSNA D3、 $p = 0.0022$ 。(D) 空ベクター (EV) または HOXA1 を発現する WM115 メラノーマ細胞を、ヌードマウスに皮下注射した。得られた異種移植腫瘍切片を、抗ホスホ SMAD3 で免疫染色することにより、HOXA1 腫瘍試験片での SMAD3 活性化を確認した。

【図 14】図 14 は、FSCN1 または HOXA1 を過発現する HRAS* (M3HRAS) が形質導入された Ink4a/Arf-マウス誘導メラノサイトを示す図である。(A) トランスウエル浸潤アッセイでマトリゲルを通して高められた浸潤。(B) ニードマウスで高められた皮下腫瘍成長。(C) SCID マウスに静脈内尾部静脈注射をした後の、高い肺結節形成。C において、FSCN1 コホートの肺/肥満度指数の差は、極めて病的な HOXA1 コホートによって要求されたアッセイ終点でのこれら動物の比較的良好な健康状態により、有意ではないことに留意されたい。

【図 15-1】図 15 は、空ベクター (対照群) または HOXA1 (群 1) を発現する (A) WM115 メラノーマ細胞および (B) 形質転換されたヒトメラノサイト (HME L468) から抽出された RNA を、RT² プロファイラー PCR アレイ (Super array) を使用する定量的 qPCR 分析に使用して、転移に関連する遺伝子のパネルの発現を分析した。得られる異種移植腫瘍切片を、抗 CXCR4 で免疫染色して、HOXA1 腫瘍試験片 (図 13) の過発現を確認した。対照と実験群との間の閾値差次発現を満足する遺伝子が示されている。

【図 15-2】図 15 は、空ベクター (対照群) または HOXA1 (群 1) を発現する (A) WM115 メラノーマ細胞および (B) 形質転換されたヒトメラノサイト (HME L468) から抽出された RNA を、RT² プロファイラー PCR アレイ (Super array) を使用する定量的 qPCR 分析に使用して、転移に関連する遺伝子のパネルの発現を分析した。得られる異種移植腫瘍切片を、抗 CXCR4 で免疫染色して、HOXA1 腫瘍試験片 (図 13) の過発現を確認した。対照と実験群との間の閾値差次発現を満足する遺伝子が示されている。

【図 16】図 16 は、空ベクター (EV) または HOXA1 を発現する WM115 メラノーマ細胞および形質転換したヒトメラノサイト (HME L468) を、ヌードマウスに皮下注射した状態を示す。得られる異種移植切片を、抗 CXCR4 で免疫染色することにより、HOXA1 腫瘍試験片での過発現を確認した。

【図 17】図 17 (A) は、スピッツ母斑およびメラノーマ FFPE 試験片のコホートにおける UBE2C の RNA 発現の Quant iGene 分析を示す。(B) 原発性 Ink4a/Arf 欠損 MEF に、HRAS V12、MYC、および UBE2C を発現する示さ

れたベクターをトランスフェクトした。Vcc=LacZベクター対照；棒は±S.D.を示す。

【図18】図18(A)は、空ベクター(ev)、Geminin、またはNedd9(正の対照)を安定に発現するWM3211メラノーマ細胞を、トランスウエル浸潤アッセイでのマトリゲルを通して、浸潤に関してアッセイを行った。(B)空ベクター(ev)、Geminin、またはCaveolin 1(負の対照)を安定に発現するWM3211細胞から抽出した全細胞溶解物の免疫ブロット分析。抗ホスホFAKおよび抗ホスホERKは、それぞれ活性化したFAKおよびERK種を示す。(C)空ベクター(EV)またはGeminin(GEMN)を安定に発現するWM3211細胞を、ホスホFAK(P-FAK；赤)に関して免疫染色することにより、図18Bで観察された高いFAK活性化を確認した。

10

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、転移性腫瘍を有し、または転移性腫瘍を発症するリスクのある被験体に関連した徴候、およびそのような被験体をもたらす決定因子の同定に関する。

【0025】

ヒトおよびマウスのデータ集合同士の異種間比較によれば、ヒトメラノーマの生物学に関する偶発的癌遺伝子を同定するための生物学的フィルタをもたらすことが証明されている。本発明の研究において、その原発性腫瘍が転移する明白な可能性を示すメラノーマの2匹のマウスモデルを使用して、転移において示差的に発現する遺伝子を同定した。転移性(iMet)および非転移性(iHRAS*)GEMモデル由来の原発性腫瘍の発現プロファイル比較では、異種間分析による生物学的フィルタリングによって優先順位が付けられかつアレイCGHにより得られた増幅および欠失のパターンに重ねられた、1597個の示差的に発現した遺伝子のリストが明らかにされた。進化的に保存された変化(例えば、マウスおよびヒトにおいて)は、より本質的なものであると仮定され；したがって、ヒト転移性腫瘍から得たゲノムデータを有するGEMモデル(定義された遺伝的背景の利点および明らかな表現型相関を有する。)から得た発現データの三角法は、優先順位付けを可能にし、ヒトの関連性を1597個の候補に割り当てた。

20

【0026】

295個の上方制御され/増幅された、および65個の下方制御され/欠失された遺伝子の、表現型により誘導される進化的に保存された転移候補リストは、示差的転移性を有する皮膚メラノーマの2つの遺伝子組換えマウスモデルのトランスクリプトームを比較し、その後、ヒト原発性および転移性メラノーマのゲノムおよびトランスクリプトームのプロファイルに関して三角法を行うことによって、明らかにされた。これらの候補は、転移拡散での3つの主なステップ(すなわち、原発性腫瘍部位からの回避、循環、最後に遠位異種部位でコロニー化および増殖する。)に対応する、循環およびコロニー化における浸潤、アノキス耐性、または生存に関する低複雑性遺伝子スクリーニングに入れられた。これまで、浸潤スクリーニングは、TERT固定化ヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞に浸潤促進活性を与えることが可能な31個の確認された転移DETERMINANTを定めてきた。転移候補の独立した部分集合は、仮にそうであるとしても一部だけが浸潤スクリーニングのDETERMINANTと重なり合う、アノキス耐性またはコロニー化スクリーニングから得た追加のDETERMINANTとして定義されることになると予測される。これまで、アノキス耐性スクリーニングは、浸潤DETERMINANTと重なることなく懸濁液中に生存を与えることが可能な、定義された9個の確認されたDETERMINANTを有している。これらのDETERMINANTは一緒にまたはその部分集合として、転移性播種に関与する主なステップを包含することになる。

30

40

【0027】

原発性腫瘍は、遺伝的に不均質であると認識される。原発性腫瘍内の副集団における転移DETERMINANTが増殖上の利点を与え最終的に遠位部位への播種を誘導させる場合、転移性誘導体は、その原発性の対応物よりも均質になり、したがってそのような転

50

移 D E T E R M I N A N T の発現の進行相関パターンを示すことが予測される。これら D E T E R M I N A N T の 25 個の発現パターンを評価するために、本発明者らは、O n c o m i n e の発現プロファイリングデータの概要を利用した (R h o d e s D . R . ら、O N C O M I N E : a c a n c e r m i c r o a r r a y d a t a b a s e a n d i n t e g r a t e d d a t a - m i n i n g p l a t f o r m . N e o p l a s i a 6 巻、1 ~ 6 頁、2004 年)。しかし、これら 25 個の転移 D E T E R M I N A N T の大多数は、浸潤または転移に特異的に結び付けられていないが、これらの全ては、メラノーマおよび非メラノーマ固形腫瘍の両方で進行する腫瘍グレードまたは予後に有意に相関した発現パターンを示す。例えば、25 個の D E T E R M I N A N T のうち 12 個は、原発性疾患よりも転移において高い発現を示す。脳 (グリオーマ) 腫瘍、メラノーマのような別の間葉腫瘍では、転移 D E T E R M I N A N T の 13 個が、進行相関発現パターンを示し、すなわち、より高いグレードのグリオーマで発現が増大した。これらの中で 6 個は、結果に対して正の相関を示した。前立腺癌では、転移 D E T E R M I N A N T の 10 個が、原発性から転移まで発現の有意な増加を示した。肺では、5 個が、高い腫瘍グレードと相関を示した。最も有意な重なり合いは、乳腺癌で観察され、25 個の転移 D E T E R M I N A N T のうち 13 個は、腫瘍進行のステージまたはグレードと相関を示した。さらに、D E T E R M I N A N T の 13 個は、予後と相関することが報告された。

10

【0028】

したがって本発明は、転移性腫瘍に関連した D E T E R M I N A N T を検出することによって、転移性腫瘍を持ちまたは転移性腫瘍を経験するリスクのある、転移性腫瘍に対して無症候性の被験体も含めた被験体を、同定するための方法を提供する。これらの徴候および D E T E R M I N A N T は、癌の治療および療法を受けた被験体をモニタし、癌を有する被験体で有効となり得る療法および治療を選択しもしくは修正するのにも有用であり、そのような治療および療法の選択および使用は、腫瘍の進行を遅くし、またはその発症を実質的に遅延させもしくは予防し、または腫瘍転移の発生を低下させもしくは予防するものである。

20

【0029】

(定義)

「精度」は、測定されまたは計算された量 (試験で報告された値) と、その実際の (または真の) 値との適合性の程度を指す。臨床精度は、真の結果 (真陽性 (T P) または真陰性 (T N)) 対誤判別された結果 (偽陽性 (F P) または偽陰性 (F N)) の割合に関係し、感受性、特異性、陽性的中率 (P P V) 、もしくは陰性的中率 (N P V) 、またはその他の尺度の中でも可能性、オッズ比と言える。

30

【0030】

本発明の文脈における「D E T E R M I N A N T」は、限定するものではないが、タンパク質、核酸、および代謝産物を、これらの多型、変異、変種、修飾、サブ単位、断片、タンパク質ーリガンド複合体、および分解生成物、タンパク質ーリガンド複合体、元素、関連する代謝産物、およびその他の分析物またはサンプル由来の尺度と共に包含する。D E T E R M I N A N T は、変異タンパク質または変異核酸を含むこともできる。D E T E R M I N A N T は、非血液感染性因子または健康状態の非分析的生理学的マーカー、例えば本明細書で定義された「臨床パラメータ」、ならびに本明細書でも定義される「伝統的な実験室でのリスク因子」も包含する。D E T E R M I N A N T は、数学的に生成された任意の計算された指標、または、時間的傾向および差を含む前述の測定のいずれか 1 つもしくは複数の組合せも含む。利用可能な場合には、および本明細書で他に記述されない場合、遺伝子産物である D E T E R M I N A N T は、公文書での略称、または t h e i n t e r n a t i o n a l H u m a n G e n o m e O r g a n i z a t i o n N a m i n g C o m m i t t e e (H G N C) によって割り当てられかつ t h e U S N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (N C B I) ウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.n>

40

50

ih.gov/sites/entrez?db=gene) にこの出願日に列挙された遺伝子記号をベースにして同定され、Entrez Geneとも呼ばれる。

【0031】

「(1個または複数の) DETERMINANT」は、そのレベルが転移性腫瘍を有しまたは転移性腫瘍を発症し易くなりまたは転移性腫瘍のリスクのある被験体において変化する、全ての核酸またはポリペプチドの1種または複数を包含する。個々のDETERMINANTを表1にまとめ、これらをまとめて本明細書では、とりわけ「転移性腫瘍関連タンパク質」、「DETERMINANTポリペプチド」、または「DETERMINANTタンパク質」と呼ぶ。ポリペプチドをコードする、対応する核酸を、「転移性腫瘍関連核酸」、「転移性腫瘍関連遺伝子」、「DETERMINANT核酸」、または「DETERMINANT遺伝子」と呼ぶ。他に指示しない限り、「DETERMINANT」、「転移性腫瘍関連タンパク質」、「転移性腫瘍関連核酸」は、本明細書に開示される配列のいずれかを指すことを意味する。DETERMINANTタンパク質または核酸の、対応する代謝産物も、前述の伝統的なリスクマーカー代謝産物と同様に測定することができる。

10

【0032】

健康状態(例えば、年齢、家族歴、および伝統的なリスク因子として一般に使用されるその他の測定値)の生理学的マーカーを、「DETERMINANT生理機能」と呼ぶ。DETERMINANTの前述の種類の1つまたは複数、好ましくは2つ以上を数学的に組み合わせた測定値から得た計算された指標を、「DETERMINANT指標」と呼ぶ。

20

【0033】

「臨床パラメータ」は、限定するものではないが、年齢(Age)、人種(RACE)、性別(Sex)、または家族歴(FamHX)など、被験体の健康状態またはその他の特徴の全ての非サンプルまたは非分析物生物マーカーを包含する。

【0034】

「循環内皮細胞」(「CEC」)は、炎症を含めたある状況で、血流に剥落する血管内皮からの内皮細胞であり、癌の病因に関連した新しい脈管構造の形成に寄与する。CECは、腫瘍進行および/または抗新脈管形成療法に対する応答のマーカーとして役立つことができる。

30

【0035】

「循環腫瘍細胞」(「CTC」)は、原発性腫瘍から転移に剥落する上皮由来の腫瘍細胞であり、循環内に進入する。末梢血中の循環腫瘍細胞の数は、転移性癌を有する患者の予後に関連する。これらの細胞は、上皮細胞を検出する免疫学的方法を使用して、分離し定量することができる。

【0036】

「FN」は、偽陽性であり、疾患状態の試験では、疾患被験体を誤って非疾患または正常であると分類することを意味する。

【0037】

「FP」は、偽陽性であり、疾患状態の試験では、正常な被験体を誤って疾患を有すると分類することを意味する。

40

【0038】

「式」、「アルゴリズム」、または「モデル」は、任意の数学的方程式、アルゴリズム的、分析的、もしくはプログラムされたプロセス、または1つもしくは複数の連続したもしくはカテゴリー的入力(本明細書では、「パラメータ」と呼ぶ。)を得、かつ出力値を計算する統計的技法であり、時々「指標」または「指標値」と呼ばれる。「式」の非限定的な例には、合計、比、および回帰演算子が含まれ、例えば、係数または指数、生物マーカー値の変換および正規化(限定するものではないが、性別、年齢、または人種などの臨床パラメータをベースにした正規化スキームを含む。)、規則および指針、統計的分類モデル、および歴史的集団で訓練された神経回路網がある。DETERMINANTおよび

50

その他のDETERMINANTを組み合わせる際に特に使用されるものは、被験体サンプルで検出されたDETERMINANTのレベルと転移性疾患の被験体のリスクとの関係を決定するための、1次および非1次方程式と統計的分類分析である。パネルおよび組合せ構成において、特に興味深いものは、構造的および共同統計分類アルゴリズムであり、リスク指標構成の方法であり、とりわけ、相互相関、主成分分析、(PCA)、因子軸回転、ロジスティック回帰(Log Reg)、線形判別分析(LDA)、Eigengene線形判別分析(ELDA)、サポートベクターマシン(SVM)、ランダム予報(RF)、帰納的分配木(RPART)、ならびにその他の関連ある決定木分類技法、収縮重心(SC)、StepAIC、Kth最短隣接、ブースティング、判別木、神経回路網、Bayesianネットワーク、サポートベクターマシン、および隠れマルコフモデルなどの確立された技法を含む、パターン認識フィーチャーを利用するものである。その他の技法は、当業者に周知のCox、Weibull、Kaplan-Meier、およびGreenwoodモデルも含めた、生存および時間事象ハザード分析で使用することができる。これら技法の多くは、順方向選択、逆方向選択、または段階的選択などのDETERMINANT選択技法、所与のサイズの遺伝的アルゴリズムの全ての可能性あるパネルの全数調査と組み合わせて有用であり、またはこれら技法そのものは、それ自体の技法において生物マーカー選択法を含んでいてもよい。これらは、追加の生物マーカーとモデル改良とのトレードオフを定量するために、かつ過剰適合を最小限に抑えるのを助けるために、Akaike情報基準(AIC)またはBayer情報基準(BIC)と結合してもよい。得られる予測モデルは、ブートストラップ、リーブワンアウト(LOO)、および10倍クロス確認(10倍CV)などの技法を使用して、その他の研究で確認することができる。様々なステップで、誤検出率(false discovery rate)は、当技術分野で公知の技法により、値の順列によって推定することができる。「医療経済効用関数」は、ケア基準に診断または治療の介入を導入する前後で理想化された適用可能な患者集団での臨床結果範囲の予測された確率の組合せから得られた式である。これは、そのような介入の精度、有効性、および性能特性の推測値と、各結果に関連した費用および/または値の測定(有用性)であって、ケアの実際の医療制度コスト(サービス、サプライ、装置、および薬物など)から得ることができ、かつ/または各結果をもたらす生活の質で調整した年数(QALY)当たりの推定許容値として包含する。全ての予測された結果全体を通して、ある結果に関して予測される集団サイズとそれぞれの結果の期待効用との積の合計は、ケアの所与の基準の全医療経済効用である。(i)介入のあるケア基準に関して計算された全医療経済効用と、(ii)介入の無いケア基準に関する全医療経済効用との差は、医療経済コストまたは介入の値の全体的な尺度をもたらす。これは、それ自体が分析される全患者群の中で(または介入群の中でのみ)分割されて、単位介入当たりのコストに到達し、市場ポジショニング、価格決定、および医療制度の受入れの前提事項として、そのような決定を案内する。そのような医療経済効用関数は、介入の費用効果を比較するのに一般に使用されるが、保険制度が支払いをしようとするQALY当たりの許容される値、または、新しい介入に必要な許容される費用効果のある臨床性能特性を推定するのに変換してもよい。

【0039】

本発明の診断(または予後)介入では、各結果(疾患分類診断試験では、TP、FP、TN、またはFNであってもよい。)が異なるコストを有するので、医療経済効用関数は、特異性よりも感受性を、またはNPVよりもPPVを、臨床状況および個々の結果のコストおよび値に基づいて優先的に支持してもよく、したがって、より直接的な臨床または分析性能尺度とは異なる可能性のある医療経済性能および値の別の尺度をもたらす。これらの異なる測定および相対的なトレードオフは、一般に、全ての性能尺度が不完全を好むことになるが異なる程度まで、エラー率0の完全試験(0予測被験体結果誤判別またはFPおよびFNとも呼ばれる。)の場合でのみ集中することになる。

【0040】

「測定する」または「測定」、あるいは「検出する」または「検出」は、そのような物

質の定性的または定量的な濃度レベルの誘導を含めた、臨床または被験体由来サンプル中の、所与の物質の存在、不存在、定量、活性、または量（有効量にすることができる。）を評価すること、または、被験体の非分析物臨床パラメータの値もしくは分類を別の方法で評価することを意味する。

【0041】

「陰性予測値」または「NPV」は、 $TN / (TN + FN)$ または全ての陰性試験結果の真陰性率によって計算される。これは、試験をしようとする集団の、疾患の有病率および試験前確率によっても本質的に影響を受ける。

【0042】

例えば、臨床診断試験などの試験の特異性、感受性と、陽性および陰性予測値について論じている、O' Mar caigh AS、Jacobson RM、「Estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results」、Clin. Ped. 1993年、32（8巻）：485～491頁を参照されたい。しばしば、連続診断試験測定を使用する2元疾患状態分類アプローチでは、感受性および特異性は、Pepeら、「Limitations of the Odds Ratio in Gauging the Performance of a Diagnostic, Prognostic, or Screening Marker」、Am. J. Epidemiol.、2004年、159（9巻）：882～890頁による受信者動作特性（ROC）曲線によってまとめられ、また、曲線下面積（AUC）またはc統計、すなわち、単一の値でのみ試験（またはアッセイ）カットポイントの全範囲にわたって試験、アッセイ、または方法の感受性および特異性の表示を可能にする指標によってまとめられる。例えば、Shultz、「Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures」、14章、Teitz、Fundamentals of Clinical Chemistry、BurtisおよびAshwood（編）、4版、1996年、W. B. Saunders Company、192～199頁；およびZweigら、「ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Subjects With Coronary Artery Disease」、Clin. Chem.、1992年、38（8巻）：1425～1428頁も参照されたい。尤度関数、オッズ比、情報理論、予測値、較正（適合度を含む。）、および再分類決定を使用する代替の手法は、Cook、「Use and Misuse of the Receiver Operating Characteristic Curve in Risk Prediction」、Circulation、2007年、115巻：928～935頁に要約されている。

【0043】

最後に、試験によって定義された被験体コホートでのハザード率と絶対および相対リスク率は、臨床精度および有効性のさらなる測定値である。基準限界、識別限界、およびリスク閾値を含めた異常なまたは疾患値を定義するのに、多数の方法が頻繁に使用されている。

【0044】

「分析精度」は、測定プロセスそのものの再現性および予測精度を指し、変動係数などの測定値と、異なる時間、使用者、装置、および／または試薬を用いた同じサンプルまたは対照の一致および較正の試験にまとめることができる。新しい生物マーカーを評価する際のこれらおよびその他の課題は、Vasan、2006年にもまとめられている。

【0045】

「性能」は、とりわけ臨床および分析精度、使用特性（例えば、安定性、使い易さ）、医療経済値、および試験の成分の相対コストなどのその他の分析およびプロセス特性も含

10

20

30

40

50

めた、診断または予後試験の全体的な有用性および質に関する用語である。これら因子のいずれかは、優れた性能の源であってよく、したがって試験に役立てることができ、関連あるものとしてAUCや結果までの時間、寿命などの、適切な「性能マトリックス」によって測定してもよい。

【0046】

「陽性予測値」または「PPV」は、 $TP / (TP + FP)$ または全ての陽性試験結果の真陽性率によって計算される。これは疾患の有病率および試験がなされる集団の試験前確率の影響を本質的に受ける。

【0047】

本発明の文脈における「リスク」は、転移性事象への変換のように、ある事象が特定の期間にわたって生じる確率に関し、対照の「絶対」リスクまたは「相対」リスクを意味することができる。絶対リスクは、関連ある時間コホートに関する測定後の実際の観察を参照しながら、または関連ある期間に関して追跡された統計的に有効な歴史コホートから明らかにされた指標値を参照しながら、測定することができる。相対リスクは、低リスクコホートの絶対リスクまたは平均集団リスクと比較した被験体の絶対リスクの比を指し、これは臨床リスク因子がどのように評価されるかによって変動する可能性がある。オッズ比、すなわち所与の試験結果に関する陽性事象と陰性事象との割合も、非変換に一般に使用される（オッズは、式 $p / (1 - p)$ に従い、但し p は事象の確率であり、 $(1 - p)$ は非事象の確率である。）。

【0048】

本発明の文脈における「リスク評価」または「リスクの評価」は、事象または疾患状態が生じる可能性がある確率、オッズ、または尤度、事象または1つの疾患状態から別の状態への変換、すなわち原発性腫瘍から転移性腫瘍または転移を発症するリスクへの変換、または1次的な転移性事象のリスクから2次的な転移性事象への変換の発生率を予測することを包含する。リスク評価は、予め測定した集団に対する絶対的なまたは相対的な意味で、将来の臨床パラメータ、伝統的な実験室リスク因子の値、またはその他の癌の指標の予測を含むこともできる。本発明の方法は、転移性腫瘍のリスクの連続的またはカテゴリー的測定を行うのに、したがって転移性腫瘍のリスクがあると定義された被験体のカテゴリーのリスクスペクトルを診断し定義するのに使用してもよい。カテゴリー的シナリオでは、本発明は、正常なおよび転移性腫瘍のより高いリスクにあるその他の被験体コホートを区別するのに使用することができる。そのような異なる使用は、異なるDETERMINANTの組合せおよび個別的なパネル、数学的アルゴリズム、および／またはカットオフポイントを必要とする可能性があるが、それぞれの意図される用途には精度および性能に関して同じである前述の測定にかけてもよい。

【0049】

本発明の文脈における「サンプル」は、被験体から単離された生体サンプルであり、例としてかつ限定することなく、組織生検標本、全血、血清、血漿、血液細胞、内皮細胞、リンパ液、腹水、間質液（「細胞外液」とも呼ばれ、細胞間の空間に見出される流体を包含し、とりわけ歯肉溝滲出液が含まれる。）、骨髓、脳脊髄液（CSF）、唾液、粘液、痰、汗、尿、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、または任意のその他の分泌液、排出物、またはその他の体液を含むことができる。

【0050】

「感受性」は、 $TP / (TP + FN)$ または疾患被験体の真陽性率によって計算される。

【0051】

「特異性」は、 $TN / (TN + FP)$ または非疾患もしくはは正常な被験体の真陰性率によって計算される。

【0052】

「統計的に有意な」とは、変化が、偶然によってのみ生じると予測され得るもの（「偽陽性」の可能性もある。）よりも大きいことを意味する。統計的有意は、当技術分野で公

知の任意の方法によって決定することができる。一般に使用される有意性の尺度には、少なくとも所与のデータポイントのように極端な結果を得る確率を示す p 値が含まれ、このデータポイントは、偶然でのみ得られた結果であると想定される。結果はしばしば、0.05 以下の p 値で非常に有意であると見なされる。

【0053】

本発明の文脈における「被験体」は、好ましくは哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシにすることができるが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、腫瘍転移の動物モデルを代表する被験体として、有利に使用することができる。被験体は、オスまたはメスにすることができる。被験体は、原発性腫瘍または転移性腫瘍を有するものと、また任意選択で腫瘍の治療介入を既に受けておりまたは受けているものと予め診断されまたは特定されたものにすることができる。あるいは被験体は、転移性腫瘍を有するものと予め診断されていないものにもすることができる。例えば被験体は、転移性腫瘍に関する 1 つまたは複数のリスク因子を示すものにすることができる。

【0054】

「TN」は真陰性であり、疾患状態の試験において、非疾患または正常な被験体を正確に分類することを意味する。

【0055】

「TP」は、真陽性であり、疾患状態の試験において、疾患被験体を正確に分類することを意味する。

【0056】

「伝統的な実験室のリスク因子」は、被験体サンプルから単離されまたは得られた生物マーカーに対応するもので、臨床実験室で現在評価されておりかつ伝統的なグローバルリスクアセスメントアルゴリズムで使用されている。腫瘍転移に関する伝統的な実験室のリスク因子には、例えば、b r e s l o w 厚、潰瘍化、増殖指標、腫瘍浸潤リンパ球が含まれる。腫瘍転移に関するその他の伝統的な実験室のリスク因子は、当業者に公知である。

【0057】

(本発明の方法および使用)

本明細書に開示される方法は、転移性腫瘍を発症するリスクがある被験体、転移性腫瘍を有すると既に診断されたまたは診断されていない被験体、および原発性腫瘍または転移性腫瘍の治療および／療法を受けている被験体で使用される。本発明の方法は、原発性腫瘍または転移性腫瘍を有する被験体の治療レジメンをモニタしまたは選択するのに、および転移のリスク因子を示す被験体など、転移性腫瘍を有すると予め診断されていない被験体をスクリーニングするのに使用することもできる。好ましくは、本発明の方法は、転移性腫瘍に関して無症候性の被験体を特定および／または診断するのに使用される。「無症候性」は、伝統的な症状を示さないことを意味する。

【0058】

本発明の方法は、伝統的なリスク因子のみをベースにして、既に転移性腫瘍を発症するリスクがより高い被験体を特定および／または診断するのに使用してもよい。

【0059】

転移性腫瘍を有する被験体は、被験体由来サンプル中の D E T E R M I N A N T の有効数 (2 個以上にすることができる。) の量 (存在または不存在を含む。) を測定し、次いでこの量を基準値と比較することによって、特定することができる。次いでタンパク質、ポリペプチド、核酸、およびポリヌクレオチドと、タンパク質、ポリペプチド、核酸、およびポリヌクレオチドの多型、変異したタンパク質、ポリペプチド、核酸、およびポリヌクレオチドなどの生物マーカーの発現の量およびパターンの変化、または、被験体サンプル中の代謝産物もしくは他の分析物の分子量の変化を基準値と比較したものが、特定される。

【0060】

基準値は、同じ癌を有する被験体、同じまたは類似する年齢範囲を有する被験体、同じ

10

20

30

40

50

または類似する人種群の被験体、癌の家族歴を有する被験体などを含むがこれに限定するものではない集団研究から得られた数または値に対するもの、または、癌の治療を受けている被験体の出発サンプルに対するものにする事ができる。そのような基準値は、癌転移の数学的アルゴリズムおよび計算された指標から得られた、集団の統計分析および／またはリスク予測データから得ることができる。基準 D E T E R M I N A N T 指標は、統計的および構造的分類のアルゴリズムおよびその他の方法を使用して構成し使用することもできる。

【0061】

本発明の一実施形態では、基準値は、転移性腫瘍を発症するリスクが無いかまたはそのようなリスクが低い1つまたは複数の被験体から得られた対照サンプル中の D E T E R M I N A N T の量である。本発明の別の実施形態では、基準値は、転移性腫瘍に関して無症候性のおよび／または伝統的なリスク因子に欠けている、1つまたは複数の被験体から得られた対照サンプル中の D E T E R M I N A N T の量である。別の実施形態では、そのような被験体は、診断上関連ある期間に関してモニタされかつ／または定期的に再試験され（「長期的研究」）、そのような試験の後に、転移性腫瘍が継続して存在しないことを確認する（疾患または事象がない生存）。そのような期間は、基準値を決定するための初期試験データから1年、2年、2から5年、5年、5から10年、10年、または10年以上であってもよい。さらに、適正に保存された歴史的被験体サンプル中の D E T E R M I N A N T の遡及的測定を、これら基準値を確立するのに使用してもよく、したがって必要とされる研究時間が短縮される。

【0062】

基準値は、癌の治療および／または療法の結果として転移性リスク因子の改善を示す被験体から得られた D E T E R M I N A N T の量を含むこともできる。基準値は、公知の浸潤性または非浸潤性技法によって疾患であることが確認された、または転移性腫瘍を発症するリスクが高い、または転移性腫瘍に罹患している被験体から得られた D E T E R M I N A N T の量を含むこともできる。

【0063】

別の実施形態では、基準値は、指標値または基礎値である。指標値または基礎値は、転移性腫瘍を有していない、または転移に対して無症候性の、1つまたは複数の被験体からの D E T E R M I N A N T の有効量の複合サンプルである。基礎値は、癌の治療または療法の結果として転移性腫瘍リスク因子の改善が示された被験体から得たサンプル中に、ある量の D E T E R M I N A N T を含むこともできる。この実施形態では、被験体由来サンプルとの比較を行うために、D E T E R M I N A N T の量は同様に計算されかつ指標値と比較される。任意選択で、転移性腫瘍を有しまたは転移性腫瘍を発症するリスクが高いことが明らかにされた被験体は、癌の進行を遅らせまたは転移性腫瘍を発症するリスクを低下もしくは予防する治療レジメンを受けるように選択される。

【0064】

転移性腫瘍の進行、または癌治療レジメンの有効性は、経時的に被験体から得た有効量（2つ以上であってもよい。）のサンプル中の D E T E R M I N A N T を検出し、検出された D E T E R M I N A N T の量を比較することによって、モニタすることができる。例えば、第1のサンプルは、被験体が治療を受ける前に得ることができ、1つまたは複数の後続サンプルは、被験体の治療後または治療中に採取される。癌は、D E T E R M I N A N T の量が基準値に対して経時的に変化する場合、進行性（または、あるいは、治療が進行を予防しない。）と見なされ、それに対して癌は、D E T E R M I N A N T の量が経時的に一定（基準集団に対して、すなわち本明細書で使用される「一定」）である場合には進行性ではない。本発明の文脈で使用される「一定」という用語は、基準値に対する経時的な変化を含むと解釈される。

【0065】

例えば、本発明の方法は、腫瘍の攻撃性を区別しかつ／または腫瘍の病期（例えば、I期、II期、III期、またはIV期）を評価するのに使用することができる。この方法に

より、患者を、高または低リスク群に階層化し、それに応じて治療することが可能になる。

【0066】

さらに、特定の被験体への投与に適した治療または予防薬は、被験体から得られたサンプル中に有効量（2個以上でよい。）のDETERMINANTを検出し、この被験体由来サンプルを、被験体由来サンプル中のDETERMINANTの量（2個以上でよい。）を決定する試験化合物に曝すことによって、特定することができる。このように、癌を有する被験体または転移性腫瘍を発症するリスクがある被験体において使用される治療または治療レジメンは、被験体から得られたサンプル中のDETERMINANTの量に基づいて選択することができ、基準値と比較することができる。2つ以上の治療または治療レジメンに関しては、癌の発症を遅延させまたは進行を遅くするよう被験体で使用するに

10

【0067】

本発明はさらに、被験体由来サンプル中のDETERMINANTの量（2個以上でよい。）を決定し、基準サンプル中のDETERMINANTの量と比較し、被験体サンプル中の量の変化を基準サンプルと比較して特定することによって、転移性腫瘍に関連するマーカー発現の変化をスクリーニングするための方法を提供する。

【0068】

本発明はさらに、DETERMINANTの有効量が、腫瘍から得たサンプルにおいて測定して臨床的に有意に変化した場合に、患者が腫瘍を有していると特定し、腫瘍転移を予防または低減する治療レジメンで患者を治療することによって、腫瘍を有する患者を治療する方法を提供する。

20

【0069】

さらに本発明は、DETERMINANTの有効量を測定することにより、患者における転移のリスクを評価することによって、アジュバント治療を必要とする腫瘍患者を選択する方法であって、患者からの腫瘍サンプル中の2個以上のDETERMINANTの臨床的に有意な変化は、患者がアジュバント治療を必要としていることを示す方法を提供する。

【0070】

患者から得た腫瘍サンプル中のDETERMINANTの有効量に関する情報を得、2個以上のDETERMINANTが臨床的に有意に変化する場合に、患者における腫瘍転移を予防または低減する治療レジメンを選択することによる、腫瘍患者の治療決定に関する情報。

30

【0071】

基準サンプル、例えば対照サンプルが、転移性癌を有していない対照から得たものである場合、または基準サンプルが、転移性腫瘍への急速な進行の高い尤度を有する者に対する値を反映する場合、試験サンプルおよび基準サンプル中のDETERMINANTの量が類似していることは、治療が効果的であることを示す。しかし、試験サンプルおよび基準サンプル中のDETERMINANTの量が異なることは、臨床結果または予後がそれほど好ましくないことを示す。

40

【0072】

「効果的」とは、治療が、DETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、またはその他の分析物の量または活性の減少をもたらすことを意味する。本明細書に開示されるリスク因子の評価は、標準的な臨床プロトコルを使用して実現することができる。有効性は、転移性疾患を診断し、特定し、または治療するための任意の公知の方法に関連して決定することができる。

【0073】

本発明は、転移に関連した一般的な生理学的経路を示す1個または複数のDETERMINANT、例えば、転移に関連した異なる疾患状態または後遺症を排除しまたはこれら

50

を区別するのに使用することができる１個または複数のDETERMINANTを含む、DETERMINANTパネルも提供する。単一のDETERMINANTは、本発明による前述の特徴のいくつかを有していてもよく、あるいは、本発明の所与の適用例に向けて適切な場合には１個または複数のその他のDETERMINANTの代わりに使用してもよい。

【００７４】

本発明は、２個以上のDETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、またはその他の分析物を結合させる検出試薬を有するキットも含む。本発明によって、検出試薬、例えば２個以上のDETERMINANTタンパク質または核酸をそれぞれ結合することができる抗体および／またはオリゴヌクレオチドのアレイも提供される。一実施形態では、DETERMINANTがタンパク質であり、アレイは、DETERMINANT発現における統計的に有意な変化を基準値と比較して測定するのに十分な、有効量のDETERMINANT 1～360を結合する抗体を含有する。別の実施形態では、DETERMINANTが核酸であり、アレイは、DETERMINANT発現における統計的に優位な変化を基準値と比較して測定するのに十分な、有効量のDETERMINANT 1～360を結合するオリゴヌクレオチドまたはアプタマーを含有する。

10

【００７５】

別の実施形態では、DETERMINANTがタンパク質であり、アレイは、DETERMINANT発現における統計的に有意な変化を基準値と比較して測定するのに十分な、有効量のDETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271を結合する抗体を含有する。別の実施形態では、DETERMINANTが核酸であり、アレイは、DETERMINANT発現における統計的に有意な変化を基準値と比較して測定するのに十分な、有効量のDETERMINANT 1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271を結合するオリゴヌクレオチドまたはアプタマーを含有する。

20

【００７６】

本発明によれば、転移性腫瘍を発症するリスクがある１つまたは複数の被験体を治療するための方法であって、１つまたは複数の被験体からのサンプル中に存在するDETERMINANTの有効量の変化量の存在を検出し；転移性疾患を発症するリスクが低い１つまたは複数の被験体であるいは転移性疾患の伝統的なリスク因子のいずれかを示さない被験体で測定された基礎値に、DETERMINANTの変化量または活性が戻るまで、１種または複数の癌調節剤で１つまたは複数の被験体を治療する方法も提供される。

30

【００７７】

本発明によれば、転移性腫瘍を有する１つまたは複数の被験体を治療するための方法であって、１つまたは複数の被験体からのサンプル中に存在するDETERMINANTの有効量の変化レベルの存在を検出し；転移性腫瘍を発症するリスクが低い１つまたは複数の被験体で測定された基礎値に、DETERMINANTの変化量または活性が戻るまで、１種または複数の癌調節剤で１つまたは複数の被験体を治療することによる方法も提供される。

40

【００７８】

本発明によれば、癌と診断された被験体における転移性腫瘍を発症するリスクの変化を評価するための方法であって、第１の期間で、被験体から得た第１のサンプル中のDETERMINANTの有効量（２個以上でよい。）を検出し、第２の期間で、被験体から得た第２のサンプル中のDETERMINANTの有効量を検出し、第１と第２の期間で検出されたDETERMINANTの量を比較する方法も提供される。

【００７９】

（本発明の診断および予後指標）

50

本発明によれば、転移性腫瘍の診断および予後が可能になる。転移性腫瘍を発症するリスクは、試験サンプル（例えば、被験体由来サンプル）中のDETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、およびその他の分析物の有効量（2個以上でよい。）を測定し、多数の個々のDETERMINANTの結果からおおよび非分析物臨床パラメータからの情報を単一の測定値または指標へと組み合わせるために数学的アルゴリズムまたは式をしばしば利用して、有効量を基準または指標値と比較することによって、検出することができる。転移性腫瘍のリスクが高いことが明らかにされた被験体は、任意選択で、転移性腫瘍を発症を予防または遅延させるための予防または治療化合物の投与などの治療レジメンを受けるように選択することができる。

【0080】

DETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、またはその他の分析物の量は、試験サンプル中で測定することができ、基準限界、識別限界、またはカットオフポイントもしくは異常値を定義するリスク画定閾値などの技法を利用して「正常対照レベル」と比較することができる。「正常対照レベル」は、転移性腫瘍に罹患していない被験体で典型的に見出される、1個もしくは複数のDETERMINANTまたは組み合わせたDETERMINANTの指標のレベルを意味する。そのような正常対照レベルおよびカットオフポイントは、DETERMINANTが単独で使用されるのかまたはその他のDETERMINANTと組み合わせた方式で1つの指標として使用されるのかに基づいて、変化してもよい。あるいは正常対照レベルは、臨床的に関連ある対象期間を通して転移性腫瘍を発症することのない予め試験された被験体からの、DETERMINANTパターンのデータベースにすることができる。

【0081】

本発明は、転移性腫瘍に変換されるリスクの連続的またはカテゴリー的測定を行うのに使用してもよく、したがって、転移性事象を有するリスクがあると定義された被験体のカテゴリーのリスクスペクトルを診断し定義するのに使用してもよい。カテゴリー的シナリオでは、本発明の方法は、正常および疾患被験体コホートを区別するのに使用することができる。その他の実施形態では、本発明は、転移性事象を有するリスクにあるものと、転移性事象にさらに急速に進行するもの（あるいは、転移性事象までの推定される対象期間がより短いもの）、よりゆっくり進行するもの（または、転移性事象までの対象期間がより長いもの）、または転移性腫瘍を有するもの、正常なものとは区別されるように使用してもよい。そのような異なる使用は、個々のパネル、数学的アルゴリズム、および／またはカットオフポイントで、異なるDETERMINANTの組合せを必要とする可能性があるが、前述の同じ精度測定と、意図される用途に関連したその他の性能マトリックスの下に置いてよい。

【0082】

転移性事象を有するリスクがある被験体を特定することによって、この被験体が転移性疾患状態に変換されるのを遅延させ、低減させ、または予防するために、様々な治療介入または治療レジメンを選択し開始することが可能になる。DETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、またはその他の分析物の有効量のレベルは、転移性疾患または転移性事象の治療経過をモニタすることも可能にする。この方法では、生体サンプルを、癌の治療レジメン、例えば薬物治療を受けた被験体から得ることができる。必要に応じて、生体サンプルは、治療の前、間、または後の様々な時点で被験体から得られる。

【0083】

機能的に活性なDETERMINANTに基づいて、その機能を明らかにすることにより、例えば多くのDETERMINANTを有する被験体は、そのような経路、例えばTGFβシグナル伝達を通して機能するHOXA1を優先的に標的とする薬剤／薬物で管理することができ、したがって、高HOXA1被験体は、TGFβ阻害剤で治療することができる。またはHOXA1は、CXCR4、転移に関与しかつTGFβの上流で作用することが報告されているケモカイン軸を活性化し、したがって、CXCR4と拮抗する薬物／薬剤を使用することができる。

【0084】

本発明は、患者または被験体集団を、任意の数のセッティングでスクリーニングするのに使用することもできる。例えば、健康管理組織、公衆衛生団体、または学校保健プログラムは、上述のような介入が必要なものを特定するために、または疫学的データを収集するために、被験体群をスクリーニングすることができる。保険会社（例えば、健康、生命、または障害）は、補償範囲または価格設定を決定する過程で申込者を、または可能性ある介入を目的として既存のクライアントを、スクリーニングしてもよい。そのような集団スクリーニングで収集されたデータは、特に癌または転移性事象のような状態への任意の臨床的進行と関係している場合、例えば健康管理組織、公衆衛生団体、および保険会社の運用において、価値あるものになる。そのようなデータアレイまたは収集は、機械可読媒体に記憶させることができ、改善されたヘルスケアサービス、費用効果のあるヘルスケア、改善された保険運用などを提供するために、任意の数の健康関連データ管理システムで使用することができる。例えば、米国特許出願第2002/0038227号；米国特許出願第2004/0122296号；米国特許出願第2004/0122297号；および米国特許第5,018,067号を参照されたい。そのようなシステムは、以下にさらに詳述するように、内部データストレージから直接、または遠隔にある1つもしくは複数のデータストレージ部位から、データにアクセスすることができる。

10

【0085】

機械可読記憶媒体は、前記データを使用するための命令によってプログラムされた機械を使用したときに、経時的なまたは薬物療法に応答した転移性疾患リスク因子に関連する被験体情報などであるがこれに限定されない様々な目的で使用することが可能な、機械可読データまたはデータアレイでコードされたデータ記憶材料を含むことができる。本発明の生物マーカーの有効量の測定および／またはこれら生物マーカーからのリスクに関して得られる評価は、とりわけプロセッサ、データ記憶システム（揮発性および不揮発性メモリおよび／または記憶素子を含む。）、少なくとも1つの入力装置、および少なくとも1つの出力装置を含む、プログラマブルコンピュータで実行される、コンピュータプログラムで実施することができる。プログラムコードは、上述の機能を実行し出力情報を生成するために、入力データに適用することができる。出力情報は、当技術分野で公知の方法により、1つまたは複数の出力装置に適用することができる。コンピュータは、例えば、従来設計のパーソナルコンピュータ、マイクロコンピュータ、またはワークステーションであってよい。

20

30

【0086】

各プログラムは、コンピュータシステムと通信するための高レベル手続き型またはオブジェクト指向プログラミング言語で実行することができる。しかし、プログラムは、必要に応じてアセンブリまたは機械言語で実行することができる。言語は、コンパイラ型またはインタプリタ型言語である。そのようなコンピュータプログラムのそれぞれは、本明細書に記述される手順を実行するために記憶媒体または装置がコンピュータによって読まれるときに、コンピュータを設定し操作するための汎用または専用目的のプログラマブルコンピュータで読取り可能な記憶媒体または装置（例えば、ROMまたは磁気ディスクまたはこの開示の他の箇所で定義されるようなその他のもの）に記憶することができる。本発明の健康関連データ管理システムは、コンピュータプログラムで構成されたコンピュータ可読記憶媒体として実装されると見なしてもよく、そのように構成されたこの記憶媒体によれば、コンピュータは、本明細書に記述される様々な機能を実効するために特定のおよび所定の手法で操作される。

40

【0087】

次いでDETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、またはその他の分析物の有効量のレベルを決定し、基準値、例えばその転移状態が知られている対照の被験体または集団と、または指標値もしくは基礎値と比較することができる。基準サンプルまたは指標値もしくは基礎値は、治療が行われた1つまたは複数の被験体から得てもよくまたは導き出してもよく、または、癌もしくは転移性事象を発症するリスクが低い1つまた

50

は複数の被験体から得てもよくまたは導き出してもよく、または、治療を行った結果として改善が見られた被験体から得てもよくまたは導き出してもよい。あるいは、基準サンプルまたは指標値もしくは基礎値は、治療が行われていない1つまたは複数の被験体から得てもよくまたは導き出してもよい。例えばサンプルは、治療の進行をモニタするために、癌または転移性事象の初期治療と癌または転移性事象の後続の治療を受けた被験体から収集してもよい。基準値は、本明細書に開示されるような、集団研究からのリスク予測アルゴリズムまたは計算された指標から得られた値を含むこともできる。

【0088】

したがって本発明のDETERMINANTは、癌を持たずまたは転移性事象を有するリスクがなく、癌または転移性事象を発症することが予測されない被験体の、「基準DETERMINANTプロファイル」を生成するのに使用することができる。本明細書に開示されたDETERMINANTは、癌を有し、または転移性事象を有するリスクがある被験体から得られた「被験体DETERMINANTプロファイル」を生成するのに使用することもできる。被験体DETERMINANTプロファイルは、癌または転移性事象を発症するリスクがある被験体を診断しまたは特定するために、疾患の進行ならびに疾患の進行の速さをモニタするために、また治療法の有効性をモニタするために、基準DETERMINANTプロファイルと比較することができる。本発明の基準および被験体DETERMINANTプロファイルは、とりわけVCRによって読取り可能であるようなアナログテープ、CD-ROM、DVD-ROM、USBフラッシュ媒体などであるがこれらに限定されない機械可読媒体に入れることができる。そのような機械可読媒体は、臨床パラメータおよび伝統的な実験室リスク因子の測定値などであるがこれらに限定されない追加の試験結果を含むこともできる。あるいは、またはさらに、機械可読媒体は、病歴および任意の関連ある家族歴などの被験体情報を含むこともできる。機械可読媒体は、本明細書に開示されるようなその他の疾患リスクアルゴリズムおよび計算された指標に関する情報を含有することもできる。

【0089】

被験体の遺伝子構造の相違は、それらが様々な薬物代謝する相対的な能力の相違をもたらす可能性があり、癌または転移性事象の症状またはリスク因子を調節することができる。癌を有しまたは癌もしくは転移性事象を発症するリスクがある被験体は、年齢、人種、およびその他のパラメータを様々にすることができる。したがって、本明細書に開示されるDETERMINANTの使用は、単独での使用および薬物代謝の公知の遺伝的要因と一緒に組み合わせた使用の両方において、選択された被験体で試験される推定上の治療または予防薬が被験体の癌または転移性事象を治療しまたは予防するのに適したものになる所定レベルの予測精度を可能にする。

【0090】

特定の被験体に適した治療薬または薬物を特定するために、被験体からの試験サンプルを治療薬または薬物に曝すこともでき、DETERMINANTタンパク質、核酸、多型、代謝産物、またはその他の分析物の1種または複数のレベルを決定することができる。1個または複数のDETERMINANTのレベルは、治療または治療薬もしくは薬物への曝露の前および後に被験体から得られたサンプルと比較することができ、または、そのような治療もしくは曝露の結果としてリスク因子（例えば、臨床パラメータまたは伝統的な実験室リスク因子）に改善が見られた1つまたは複数の被験体から得られたサンプルと比較することができる。

【0091】

被験体細胞（すなわち、被験体から単離された細胞）は、候補薬剤の存在下でインキュベートすることができ、試験サンプル中のDETERMINANT発現のパターンを測定して基準プロファイル、例えば転移性疾患基準発現プロファイルまたは非疾患基準発現プロファイルまたは指標値または基礎値と比較する。試験薬剤は、栄養補助食品を含めた任意の化合物または組成物またはこれらの組合せにすることができる。例えば、試験薬剤は、癌治療レジメンで頻繁に使用され、その薬剤を本明細書に記述する。

【0092】

本発明の前述の方法は、癌であると診断された、および外科的介入を受けた被験体の、進行および／または改善を評価またはモニタするのに使用することができる。

【0093】

(本発明の性能および精密測定)

本発明の性能、したがって絶対的および相対的臨床有用性は、上述のように多数の方法で評価してもよい。性能の様々な評価の中で、本発明は、臨床診断および予後に精度をもたらすものである。診断または予後試験、アッセイ、また方法の精度は、これらの試験、アッセイ、または方法によって、癌を有しまたは癌もしくは転移性事象のリスクがある被験体を区別できる能力に関係し、被験体が、「有意な変化」(例えば、臨床的に有意な「診断的に有意な」)をDETERMINANTのレベルに有するか否かに基づく。「有効量」とは、(1個または複数の)DETERMINANTに関する所定のカットオフポイント(または閾値)とは異なり、したがって被験体が(1個または複数の)DETERMINANTがDETERMINANTである癌を有しまたは転移性事象を有するリスクがあることを示す「有意な変化」(例えば、DETERMINANTの発現または活性レベル)をもたらすためのDETERMINANTの適切な数(1個または複数でよい。)の測定値を意味する。正常と異常との間のDETERMINANTレベルの相違は、好ましくは統計的に有意である。以下に示すようにかつ本発明を全く限定することなく、統計的有意性の実現、したがって好ましい分析、診断、および臨床精度は、一般に、統計的に有意なDETERMINANT指標を実現するための、いくつかのDETERMINANTの組合せをパネル内で一緒に使用し数学的アルゴリズムと組み合わせるが、必ずしも必要というわけではない。

【0094】

疾患状態のカテゴリー的診断では、試験(またはアッセイ)のカットポイントまたは閾値を変化させることによって、通常は感受性および特異性を変化させるが、定性的に逆相関にある。したがって、被験体の状態を評価するために提案された医学的試験、アッセイ、または方法の精度および有用性の評価の際には、感受性および特異性の両方を常に考慮すべきであり、感受性および特異性はカットポイントの範囲全体にわたって有意に変化し得ることから、感受性および特異性が報告されるカットポイントが何か心に留めておくべきである。全ての潜在的なカットポイント値を包含するAUCなどの統計の使用は、本発明を使用するほとんどのカテゴリー的リスク測定に好ましいが、連続リスク測定の場合、観察された結果またはその他の判断基準に対する適合度および校正の統計が好ましい。

【0095】

所定レベルの予測精度とは、この方法が、許容可能なレベルの臨床または診断精度を提供することを意味する。そのような統計、すなわち「許容可能な程度の診断精度」の使用は、本明細書では、AUC(試験またはアッセイ用のROC曲線下面積)が少なくとも0.60、望ましくは少なくとも0.65、より望ましくは少なくとも0.70、好ましくは少なくとも0.75、より好ましくは少なくとも0.80、最も好ましくは少なくとも0.85である、試験またはアッセイ(DETERMINANTの臨床的に有意な存在を決定するための本発明の試験などであり、それによって、癌の存在および／または転移性事象を有するリスクが示される。)と定義される。

【0096】

「非常に高度な診断精度」とは、AUC(試験またはアッセイ用のROC曲線下面積)が少なくとも0.75、0.80、望ましくは少なくとも0.85、より望ましくは少なくとも0.875、好ましくは少なくとも0.90、より好ましくは少なくとも0.925、最も好ましくは少なくとも0.95である、試験またはアッセイを意味する。

【0097】

あるいは、この方法は、癌、転移性癌、または治療に対する応答の存在または不存在を、少なくとも75%の精度で、より好ましくは80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上の精度で予測する。

【0098】

任意の試験の予測値は、試験の感受性および特異性と、試験がなされる集団の状態の有病率に依存する。ベイズの定理に基づくこの概念によれば、スクリーニングされる状態が個々にまたは集団に存在する可能性が高くなるほど（試験前の確率）、陽性試験の妥当性は高くなり、かつその結果が真陽性である可能性が高くなる。したがって、状態が存在する可能性が低い任意の集団で試験を使用する際の問題は、陽性結果が限られた値を有することである（すなわち、偽陽性になり易い。）。同様に、非常に高いリスクの集団では、陰性試験結果は偽陰性になり易い。

【0099】

その結果、ROCおよびAUCは、低疾患有病率を試験した集団（毎年1%未満の発生率（出現率）を有するもの、または指定された対象期間全体を通して10%未満の累積有病率を有するものと定義される。）での、試験の臨床的有用性に関して、誤った方向に導く可能性がある。あるいは、この開示の中の別の場所で定義された絶対リスクおよび相対リスクを用いて、臨床的有用性の程度を決定することができる。試験がなされる被験体の集団は、試験の測定値により4分の1ずつに分類することもでき、その上位4分の1（集団の25%）は、癌または転移性事象を発症する最高相対リスクを有する被験体の群を含み、下位4分の1は、癌または転移性事象を発症する最低相対リスクを有する被験体の群を含む。一般に、低罹患率集団において上位から下位4分の1までの相対リスクの2.5倍超を有する試験またはアッセイから得られた値は、「高度な診断精度」を有すると見なされ、各4分の1に関して相対リスクの5から7倍を有する値は、「非常に高い程度の診断精度」を有すると見なされる。それにも関わらず、臨床的に有用な各4分の1に関する相対リスクの単に1.2から2.5倍を有する試験またはアッセイから得られた値は、疾患のリスク因子として広く使用され；それらは、将来の転移性事象の予測に関して総コレステロールを有した多くの炎症性生物マーカーに関するような場合である。しばしば、そのようなより低い診断精度試験は、前述のグローバルリスク評価指標で行われたように、治療的介入に関して意味のある臨床閾値を得るために追加のパラメータと組み合わせなければならない。

【0100】

医療経済効用関数は、所要の試験の性能および臨床値を測定する、さらに別の手段であり、それぞれの臨床的および経済的値の実際の測定を基にして、潜在的なカテゴリー的試験結果の重み付けからなる。医療経済動向は、医療経済効用関数が特に、試験をした被験体の正確な判別の利益と誤判別のコストとに関する経済的値を与えるので、精度に密に関係している。性能測定として、試験の標的価格を超えた、試験当たりの医療経済値（試験コストの前）の増加をもたらす性能レベルを実現する試験を必要とすることは、異常ではない。

【0101】

一般に、診断精度を決定する代替方法は、疾患カテゴリーまたはリスクカテゴリー（転移性事象を有するリスクにあるものなど）が、治療用途での閾値がまだ確立されておらずまたは病気に罹る前の診断に関する判断基準が存在していないような、関連ある医師会および医療活動によってまだ明確に定義されていない場合に、連続測定で一般に使用される。リスクの連続測定では、計算された指標に関する診断精度の測定は、典型的には予測連続値および実測値（または歴史的指標計算値）との間の曲線の当て嵌めと較正とを基にし、R平方、Hosmer-LemeshowのP値統計、および信頼区間などの測定値を利用する。そのようなアルゴリズムを使用する予測値を、Genomic Health, Inc. (Redwood City, California)により商用化された将来の乳癌再発リスクに関する試験の場合のように、歴史的観察コホート予測を基にした信頼区間（通常は90%または95%CI）を含めて報告することは、異常ではない。

【0102】

一般に、診断精度の程度、すなわちROC曲線のカットポイントを定義し、許容可能なAUC値を定義し、本発明のDETERMINANTの有効量を構成するものの相対濃度

の許容可能な範囲を決定することによって、当業者は、所定レベルの予測精度および性能を有する被験体を特定し、診断し、見通しを立てるために、DETERMINANTを使用することが可能になる。

【0103】

(本発明のリスクマーカー (DETERMINANT))

本発明の生物マーカーおよび方法によれば、当業者は、癌または転移性事象のいかなる症状も示さないにも関わらず癌または転移性事象を発症するリスクがあり得る被験体を、特定し、診断し、またはその他の手法で評価することが可能になる。

【0104】

1593個の生物マーカーは、転移性疾患を有する被験体において変化しまたは修正された存在または濃度レベルを有することがわかったことが、明らかにされた。

10

【0105】

表1は、本発明の、360個の過発現／増幅または下方制御／欠失がなされた表現型によって誘導された、進化的に保存されたDETERMINANTを含む。DETERMINANT1～25、41、61、62、63、66、74、96、99、103、126、135、137、138、177、190、210、212、217、218、227、239、261、および271は、浸潤前決定因子として特定された。

【0106】

【表 1 - 1】

表I

遺伝子ID	遺伝子記号	決定因子 No:
54	ACP5	1
54443	ANLN	2
55723	ASF1B	3
23397	BRRN1	4
699	BUB1	5
79019	CENPM	6
55635	DEPDC1	7
64123	ELTD1	8
6624	FSCN1	9
64151	HCAP-G	10
3146	HMGB1	11
3198	HOXA1	12
3297	HSF1	13
23421	ITGB3BP	14
10112	KIF20A	15
11004	KIF2C	16
10403	KNTC2	17
4176	MCM7	18
10797	MTHFD2	19
11156	PTP4A3	20
6045	RNF2	21
10615	SPAG5	22
11065	UBE2C	23
51377	UCHL5	24
11326	VSIG4	25
79575	ABHD8	26
1636	ACE	27
8038	ADAM12	28
101	ADAM8	29
23600	AMACR	30
80833	APOL3	31
410	ARSA	32
22901	ARSG	33
259266	ASPM	34
477	ATP1A2	35
6790	AURKA	36
9212	AURKB	37

10

20

30

【 0 1 0 7 】

【表 1 - 2】

26053	AUTS2	38
627	BDNF	39
638	BIK	40
332	BIRC5	41
672	BRCA1	42
701	BUB1B	43
80135	BXDC5	44
29902	C12ORF24	45
55839	C16ORF60	46
56942	C16ORF61	47
116496	C1ORF24	48
719	C3AR1	49
57002	C7ORF36	50
84933	C8ORF76	51
152007	C9ORF19	52
781	CACNA2D1	53
857	CAV1	54
6357	CCL13	55
6347	CCL2	56
6354	CCL7	57
890	CCNA2	58
947	CD34	59
948	CD36	60
983	CDC2	61
991	CDC20	62
995	CDC25C	63
990	CDC6	64
8317	CDC7	65
83540	CDCA1	66
83461	CDCA3	67
55536	CDCA7L	68
81620	CDT1	69
1058	CENPA	70
1062	CENPE	71
1063	CENPF	72
55165	CEP55	73
23177	CEP68	74
1070	CETN3	75
1111	CHEK1	76
26586	CKAP2	77
1163	CKS1B	78
1164	CKS2	79
1180	CLCN1	80
7122	CLDN5	81
23601	CLEC5A	82
9918	CNAP1	83
10664	CTCF	84
1565	CYP2D6	85

10

20

30

【 0 1 0 8 】

40

【表 1 - 3】

1601	DAB2	86
10926	DBF4	87
23564	DDAH2	88
1719	DHFR	89
55355	DKFZP762E1312	90
27122	DKK3	91
9787	DLG7	92
1769	DNAH8	93
30836	DNTTIP2	94
51514	DTL	95
1854	DUT	96
1894	ECT2	97
51162	EGFL7	98
56943	ENY2	99
54749	EPDR1	100
51327	ERAF	101
2115	ETV1	102
2131	EXT1	103
2162	F13A1	104
51647	FAM96B	105
2230	FDX1	106
2235	FECH	107
63979	FIGNL1	108
51303	FKBP11	109
2289	FKBP5	110
55110	FLJ10292	111
79805	FLJ12505	112
84935	FLJ14834	113
54908	FLJ20364	114
54962	FLJ20516	115
2350	FOLR2	116
2305	FOXMI	117
2530	FUT8	118
51809	GALNT7	119
64096	GFRA4	120
2740	GLP1R	121
51053	GMNN	122
2775	GNAO1	123
2792	GNGT1	124
4076	GPIAP1	125
2894	GRID1	126
2936	GSR	127
2966	GTF2H2	128
51512	GTSE1	129
3045	HBD	130
50810	HDGFRP3	131
3082	HGF	132
3012	HIST1H2AB	133

【 0 1 0 9 】

【表 1 - 4】

3142	HLX1	134
3148	HMGB2	135
3161	HMMR	136
10236	HNRPR	137
10247	HRSP12	138
3313	HSPA9B	139
51501	HSPC138	140
10808	HSPH1	141
25998	IBTK	142
3384	ICAM2	143
80173	IFT74	144
3570	IL6R	145
3684	ITGAM	146
6453	ITSN1	147
10008	KCNE3	148
3776	KCNK2	149
9768	KIAA0101	150
9694	KIAA0103	151
56243	KIAA1217	152
84629	KIAA1856	153
3832	KIF11	154
81930	KIF18A	155
3833	KIFC1	156
55220	KLHDC8A	157
3912	LAMB1	158
3915	LAMC1	159
55915	LANCL2	160
11025	LILRB3	161
4005	LMO2	162
150084	LOC150084	163
345711	LOC345711	164
91614	LOC91614	165
26018	LRIG1	166
54892	LUZP5	167
4085	MAD2L1	168
6300	MAPK12	169
4147	MATN2	170
4172	MCM3	171
4174	MCM5	172
4175	MCM6	173
9833	MELK	174
4232	MEST	175
4233	MET	176
85014	MGC14141	177
79971	MIER1	178
4288	MKI67	179
8028	MLLT10	180
4317	MMP8	181

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

【表 1 - 5】

4318	MMP9	182
4353	MPO	183
51678	MPP6	184
219928	MRGPRF	185
64968	MRPS6	186
10335	MRV11	187
10232	MSLN	188
4600	MX2	189
4678	NASP	190
4751	NEK2	191
23530	NNT	192
4846	NOS3	193
4855	NOTCH4	194
84955	NUDCD1	195
11163	NUDT4	196
53371	NUP54	197
4928	NUP98	198
51203	NUSAP1	199
4999	ORC2L	200
116039	OSR2	201
5019	OXCT1	202
56288	PARD3	203
55872	PBK	204
11333	PDAP1	205
5138	PDE2A	206
5156	PDGFRA	207
5175	PECAM1	208
5218	PFTK1	209
25776	PGEA1	210
26227	PHGDH	211
83483	PLVAP	212
57125	PLXDC1	213
5425	POLD2	214
5427	POLE2	215
5446	PON3	216
5557	PRIM1	217
5558	PRIM2A	218
5578	PRKCA	219
23627	PRND	220
9265	PSCD3	221
5743	PTGS2	222
5885	RAD21	223
5888	RAD51	224
5889	RAD51C	225
3516	RBPSUH	226
5965	RECQL	227
5984	RFC4	228
5985	RFC5	229

10

20

30

【 0 1 1 1 】

40

【表 1 - 6】

23179	RGL1	230
64407	RGS18	231
5997	RGS2	232
8490	RGS5	233
9584	RNPC2	234
6091	ROBO1	235
6118	RPA2	236
6119	RPA3	237
6222	RPS18	238
6236	RRAD	239
22800	RRAS2	240
6240	RRM1	241
6241	RRM2	242
340419	RSPO2	243
10371	SEMA3A	244
143686	SESN3	245
85358	SHANK3	246
79801	SHCBP1	247
8036	SHOC2	248
23517	SKIV2L2	249
7884	SLBP	250
6509	SLC1A4	251
115286	SLC25A26	252
6526	SLC5A3	253
8467	SMARCA5	254
8243	SMC1L1	255
10592	SMC2L1	256
10051	SMC4L1	257
6629	SNRPB2	258
64321	SOX17	259
6662	SOX9	260
57405	SPBC25	261
60559	SPCS3	262
6741	SSB	263
6742	SSBP1	264
26872	STEAP1	265
6788	STK3	266
10460	TACC3	267
23435	TARDBP	268
25771	TBC1D22A	269
6899	TBX1	270
7052	TGM2	271
90390	THRAP6	272
8914	TIMELESS	273
7077	TIMP2	274
7083	TK1	275
55273	TMEM100	276
55161	TMEM33	277

【 0 1 1 2 】

【表 1 - 7】

55706	TMEM48	278
54543	TOMM7	279
7153	TOP2A	280
22974	TPX2	281
54209	TREM2	282
4591	TRIM37	283
9319	TRIP13	284
95681	TSGA14	285
7371	UCK2	286
83878	USHBP1	287
10894	XLKD1	288
51776	ZAK	289
221527	ZBTB12	290
346171	ZFP57	291
23414	ZFPM2	292
79830	ZMYM1	293
7705	ZNF146	294
84858	ZNF503	295
79026	AHNAK	296
360	AQP3	297
622	BDH1	298
219738	C10ORF35	299
726	CAPN5	300
999	CDH1	301
51673	CGI-38	302
1159	CKMT1B	303
85445	CNTNAP4	304
1303	COL12A1	305
9244	CRLF1	306
1410	CRYAB	307
1428	CRYM	308
113878	DTX2	309
10278	EFS	310
79993	ELOVL7	311
2041	EPHA1	312
2045	EPHA7	313
2051	EPHB6	314
10205	EVA1	315
2125	EVPL	316
2159	F10	317
375061	FAM89A	318
8857	FCGBP	319
2261	FGFR3	320
56776	FMN2	321
2770	GNAI1	322
7107	GPR137B	323
64388	GREM2	324
3098	HK1	325

【 0 1 1 3 】

10

20

30

40

【表 1－8】

688	KLF5	326
5655	KLK10	327
11202	KLK8	328
10748	KLRA1	329
10219	KLRG1	330
4135	MAP6	331
5603	MAPK13	332
4312	MMP1	333
4486	MST1R	334
4692	NDN	335
5092	PCBD1	336
10158	PDZK1IP1	337
5317	PKP1	338
26499	PLEK2	339
58473	PLEKHB1	340
5366	PMAIP1	341
79983	POF1B	342
5453	POU3F1	343
5579	PRKCB1	344
5745	PTHR1	345
5792	PTPRF	346
57111	RAB25	347
6095	RORA	348
6337	SCNN1A	349
6382	SDC1	350
5268	SERPINB5	351
11254	SLC6A14	352
6578	SLCO2A1	353
6586	SLIT3	354
10653	SPINT2	355
6768	ST14	356
7070	THY1	357
23650	TRIM29	358
23555	TSPAN15	359
11197	WIF1	360

10

20

当業者なら、本明細書に示される D E T E R M I N A N T は、多型、イソフォーム、変異体、誘導体、核酸および前駆タンパク質を含む前駆体、切断産物、受容体（可溶性および膜貫通受容体を含む。）、リガンド、タンパク質ーリガンド複合体、および翻訳後修飾変種（架橋またはグリコシル化など）、断片、および分解産物、ならびに任意の多単位核酸、タンパク質、および糖タンパク質構造であって、完全に組み立てられた構造の構成サブ単位として D E T E R M I N A N T のいずれかを含んだものを含むが、これらに限定されない全ての形および変種を包含することを理解するであろう。

30

【0114】

当業者なら、上記列挙された D E T E R M I N A N T は、転移性疾患に関連するとは一般に認められない多くを含めた生理学および生物学的経路の多様な集合から得られることに、留意するであろう。種々の D E T E R M I N A N T のこれらのグループ分けは、高い有意性のセグメント内にあっても、疾患の進行の病期または速度の種々のシグナルを前もって知らせることができる。D E T E R M I N A N T のそのような明らかなグループ分けによって、D E T E R M I N A N T からのより生物学的に詳細なかつ臨床的に有用なシグナルが可能になり、それと共に、多数の D E T E R M I N A N T シグナルと組み合わせた D E T E R M I N A N T アルゴリズム内でのパターン認識の機会も可能になる。

40

【0115】

本発明は、一態様では、D E T E R M I N A N T の部分集合に関し；その他の D E T E R M I N A N T および上記表 1 に列挙されておらずこれら生理学および生物学的経路に関連している生物マーカーも、シグナルおよび情報がこれらの研究から得られたものであることを考えれば有用であると証明することができる。その他の生物マーカー経路関与因

50

子（すなわち、上記表 1 の D E T E R M I N A N T のリストに含まれた生物マーカーを有する共通経路におけるその他の生物マーカー関与因子）が癌または転移性事象における関連ある経路関与因子でもあるような程度まで、これらの因子は、表 1 でこれまで開示されてきたように、例えば C X C R 4 などの生物マーカーと機能的に均等であってもよい。これらのその他の経路関与因子は、本発明の文脈において D E T E R M I N A N T とも見なされ、但しこれらの因子は、良好なバイオマーカーのある定義された特徴をさらに共有し、本明細書に開示された生物学的プロセスおよび有用なシグナル対雑音比での前記生物マーカーのバイオアベイラビリティなどの分析的に重要な特徴と、血清などの有用でアクセス可能なサンプルマトリックスとの両方への関与を含む可能性がある。そのような要件は、典型的には、生物学的経路の多くのメンバーの診断有用性を限定し、分泌物質を構成する経路メンバーでのみ頻繁に生ずるが、これらは、癌または転移性事象の疾患進行に関連してもしなくても、アポトーシスまたは内皮リモデリングもしくはその他の細胞代謝回転もしくは細胞壊死性経過などのその他の理由により、細胞の原形質膜でアクセス可能なものならびに細胞死により血清中に放出されるものである。しかし、D E T E R M I N A N T に関するこの高い基準を満たす、残されたおよび将来の生物マーカーは、非常に価値あるものとなるようである。

10

【0116】

さらに、その他の列挙されていない生物マーカーは、表 1 の D E T E R M I N A N T として列挙された生物マーカーに、非常に高度に相関することになる（本出願の目的では、任意の 2 個の変数は、0.5 以上の決定係数（ R^2 ）を有する場合、「非常に高度に相関した」と見なされることになる。）。本発明は、前述の D E T E R M I N A N T に対するそのような機能的および統計的均等物を包含する。さらに、そのような追加の D E T E R M I N A N T の統計的有用性は、多数の生物マーカーと任意の新しい生物マーカーとの間の相互相関に実質的に依存し、しばしば、基礎をなす生物学の意味を詳述するためにパネル内での操作を必要とすることになる。

20

【0117】

列挙された D E T E R M I N A N T の 1 個または複数、好ましくは 2 個以上は、本発明の実施に際して検出することができる。例えば、2 個、3 個、4 個、5 個、10 個、15 個、20 個、40 個、50 個、75 個、100 個、125 個、150 個、175 個、200 個、210 個、220 個、230 個、240 個、250 個、260 個以上、270 個以上、280 個以上、290 個以上の D E T E R M I N A N T を検出することができる。

30

【0118】

いくつかの態様では、本明細書に記述される 360 個の全ての D E T E R M I N A N T を検出することができる。D E T E R M I N A N T の数を検出することができる好ましい範囲は、1 から 360 個、特に 2、5、10、20、50、75、100、125、150、175、200、210、220、230、240、250 個の間から選択された任意の最小値であって、公知の全 D E T E R M I N A N T、特に 5、10、20、50、および 75 個までの任意の最大値と組み合わせたものによって結び付けられた範囲を含む。特に好ましい範囲には、2～5 個、2～10 個、2～50 個、2～75 個、2～100 個、5～10 個、5～20 個、5～50 個、5～75 個、5～100 個、10～20 個、10～50 個、10～75 個、10～100 個、20～50 個、20～75 個、20～100 個、50～75 個、50～100 個、100～125 個、125～150 個、150～175 個、175～200 個、200～210 個、210～220 個、220～230 個、230～240 個、240 個～250 個、250～260 個が含まれる。

40

【0119】

（D E T E R M I N A N T パネルの構造）

D E T E R M I N A N T のグループ化は、「パネル」に含めることができる。本発明の文脈における「パネル」は、複数の D E T E R M I N A N T を含む生物マーカーの群（これらが D E T E R M I N A N T、臨床パラメータ、または伝統的な実験室リスク因子であるか否かに関わらず）を意味する。パネルは、追加の生物マーカー、例えば臨床パラメー

50

タ、伝統的な実験室リスク因子であって、癌または癌転移と共に存在したはこれらに関連することが公知であるものを、表1に列挙されたDETERMINANTの選択された群と組み合わせて含むこともできる。

【0120】

上述のように、列挙された個々のDETERMINANT、臨床パラメータ、および伝統的な実験室リスク因子の多くは、単独で使
用しかつDETERMINANTの多数の生物マ
ーカーパネルのメンバーとしてではない状
態で使用する場合、個々の正常な被験
体、転移性事象を有するリスクにある被
験体、および癌を有する被験体を、選
択された一般集団において互いに信頼
性をもって区別する際に、ほとんどま
たは全く臨床的な用途がなく、したが
って、これら3つの状態の間で任意の
被験体を分類するのに、単独で信頼性
をもって使用することができない。これ
ら集団のそれぞれにおいて、十分に行
われた研究で一般に生じるように、そ
れらの平均測定値に統計的に有意な差
がある場合であっても、そのような生
物マーカーは、個々の被験体に対する
それらの適用可能性を制約し続ける可
能性があり、その被験体に関する診断
または予後予測にほとんど寄与しない。
統計的有意性の一般的尺度は、観察が
偶然によってのみ引き起こされた可能
性を示すp値であり；好ましくは、そ
のようなp値は0.05以下であり、問
題の観察が偶然によって生じた機会が
5%以下であることを表す。そのような
p値は、行われた研究のパワーに著し
く依存する。

10

【0121】

この個々のDETERMINANT性能と、伝
統的な臨床パラメータおよび2〜3個
の伝統的な実験室危険因子だけを組
み合わせる式の一般的な性能とも関
わらず、本発明は、2個以上のDETE
RMINANTのある特定の組合せを、1
つまたは複数の生理学的または生物
学的経路に関与することが公知である
DETERMINANTの組合せを含んだ
多数の生物マーカーパネルとして使
用することもでき、また、そのような
情報を組み合わせて、個々のDETE
RMINANTを超えた組合せの性能特
性を組み合わせかつ多くの場合はそ
の性能特性を拡張する、統計的分類
アルゴリズムおよびその他を含めた
様々な式の使用を通して臨床的に有
用なものにできることに留意した。こ
れら特定の組合せは、許容可能なレ
ベルの診断精度を示し、多数のDETE
RMINANTからの十分な情報が導
かれた式と組み合わせられた場合、1
つの集団から別の集団へと移すこと
が可能な高レベルの診断精度が、信
頼性をもってしばしば実現される。

20

【0122】

2個よりも少ない特定のまたはより
低い性能のDETERMINANTを、意
図される徴候に向けて新規なおよび
より有用な組合せへとどのように組
み合わせるかという一般概念は、本
発明の重要な態様である。多数の生
物マーカーは、しばしば、適正な数
学的および臨床的アルゴリズムが使
用される場合、個々の構成要素より
も良好な性能をもたらすことができ
；これは、感受性および特異性の両
方でしばしば明らかであり、より大
きなAUCをもたらす。第2に、既存
の生物マーカーには、改善されたレ
ベルの感受性または特異性を新しい
式を通して実現するために必要であ
ったように、新規な感知できない情
報がしばしば存在する。この隠され
た情報は、次善の臨床性能を独自に
有すると一般に見なされる生物マ
ーカーの場合であっても、有効になり
得る。事実、単独で測定された単一
の生物マーカーに対する高偽陽性率
に関する次善の性能は、一部の重要
な追加の情報が、第2の生物マ
ーカーおよび数式との組合せが存在
しないことが明らかではない生物マ
ーカーの結果の情報内に含まれる指
標になり得ると考えられる。

30

40

【0123】

当技術分野で公知のいくつかの統計
的およびモデリングアルゴリズムを
使用して、DETERMINANTの選
択を支援すると共に、これらの選択
を組み合わせたアルゴリズムを最適
化することができる。因子および交
差生物マーカー相関／共分散分析
などの統計的ツールは、パネル構造
へのより合理的なアプローチを可能
にする。DETERMINANT間のEucl
idean標準化距離を示す、数学的
クラスタリングおよび分類木は、有
利に使用することができる。その
ような統計的分類技法の、経路によ
って知らされた播種は、特定の経
路または生理学的機能の全体への
寄与を基にした個々のDETERMINA

50

N Tの選択に基づく合理的な手法となり得るので、用いてもよい。

【0124】

最終的に、統計的分類アルゴリズムなどの式は、D E T E R M I N A N Tを選択するためにかつ多数のD E T E R M I N A N Tからの結果を単一指標へと組み合わせるのに必要な最適な式を作成し導き出すために、直接使用することができる。しばしば、前進的（Oポテンシャル説明パラメータ）および後退的選択（全ての利用可能なポテンシャル説明パラメータ）などの技法が使用され、A I CまたはB I Cなどの情報基準は、パネルの性能および診断精度と使用されるD E T E R M I N A N Tの数との間のトレードオフを定量するのに使用される。前進的または後退的選択パネルにおける個々のD E T E R M I N A N Tの位置は、そのアルゴリズム用の漸増的情報内容の提供に密接に関連付けることができ、したがって、寄与のオーダーは、パネル内のその他の構成要素であるD E T E R M I N A N Tに非常に依存している。

10

【0125】

臨床アルゴリズムの構築

任意の式を使用して、D E T E R M I N A N Tの結果を組み合わせ、本発明の実行に有用な指標となすことができる。上記したように、そのような指標は、種々のその他の指示のうちとりわけ、ある疾患状況が別の疾患状況へ変換する確率、尤度、絶対的もしくは相対的なリスク、時間もしくは速度を示してもよく、または転移性疾患の将来の生物マーカーの測定値を予測してもよいが、これらに限定されない。これは、特定の期間もしくは範囲について、または残りの生涯リスクについてであってもよく、あるいは単に別の基準被験体集団と比べた指標として提供してもよい。

20

【0126】

種々の好ましい式を本明細書に記載するが、本明細書および上記の定義において言及するもの以外のいくつかのその他のモデルおよび式の型が、当業者には周知である。使用される実際のモデルの型または式自体は、トレーニング集団におけるその結果の性能および診断の精度の特徴に基づいて、見込みがあるモデルの領域から選択され得る。その式自体の詳細は通常、関連のあるトレーニング集団におけるD E T E R M I N A N Tの結果から得ることができる。その他の用途のうちとりわけ、そのような式によって、一連の被験体クラスへの、1つまたは複数のD E T E R M I N A N Tのインプットから得られた（例えば、被験体が、正常なクラス、転移性事象を有するリスクがあるクラス、癌を有するリスクがあるクラスの一員であることを予測するのに有用である）フィーチャーの空間を位置付けて、ベイズのアプローチを使用してリスクの確率関数の推定値（例えば、癌もしくは転移性事象のリスク）を得ること、またはクラス条件付き確率を推定し、次いで、先の場合と同様に、ベイズの規則を使用してクラスの確率関数を求めることを意図することができる。

30

【0127】

好ましい式には、広いクラスの統計学的分類アルゴリズム、特に、判別分析の使用がある。判別分析の目標は、以前に同定されたフィーチャーのセットから、クラスの一員であることを予測することである。線形判別分析（L D A）の場合、いくつかの判断基準による群間における分離を最大化するフィーチャーの線形の組合せを同定する。異なる閾値を用いる、固有遺伝子（e i g e n g e n e）に基づいたアプローチを使用するL D A（E L D A）、または多変量分散分析（M A N O V A）に基づいた踏み石アルゴリズムのために、フィーチャーを同定することができる。ホテリングローリーの統計量に基づいて非分離の確率を最小化する前向きアルゴリズム、後向きアルゴリズムおよびステップワイズアルゴリズムを実施することができる。

40

【0128】

固有遺伝子に基づいた線形判別分析（E L D A）は、S h e nら、（2006年）によって開発された、フィーチャーを選択する技法である。この式は、改変された固有値解析（e i g e n a n a l y s i s）を使用して、多変量のフレームワーク中のフィーチャー（例えば、生物マーカー）を選択して、最も重要な固有ベクター（e i g e n v e c t

50

or) と関連性があるフィーチャーを同定する。「重要な」は、何らかの閾値と比べて分類しようとするサンプル間における差の最大の分散を説明する固有ベクターと定義される。

【0129】

サポートベクターマシン (SVM) は、2つのクラスを分離する超平面を見出そうとする分類式である。この超平面は、サポートベクター、すなわち、この超平面からまさしくマージンの距離だけ離れているデータ点を含有する。現在のデータ寸法では分離超表面が存在しそうでない事象においては、元々の変数の非線形関数をとることにより、データをより大きな寸法に投影することによって、次元を大きく拡大する (Venables および Ripley、2002 年)。必要ではないが、SVM のためのフィーチャーにフィルターをかけることによってしばしば、予測が改善される。最も良好な一変量のフィーチャーを選択するために非パラメトリックなクラスカルーワリス (KW) 検定を使用して、サポートベクターマシンためのフィーチャー (例えば、バイオマーカー) を同定することができる。また、ランダムフォレスト (RF、Breiman、2001 年) または再帰分割 (RPART、Breiman ら、1984 年) も別個にまたは組み合わせて使用して、最も重要である生物マーカーの組合せを同定することができる。KW および RF の両方では、全フィーチャーからいくつかのフィーチャーを選択する必要がある。RPART は、利用可能な生物マーカーのサブセットを使用して、単一の分類木を生み出す。

【0130】

予測式に当てはめる前に、個々の DETERMINANT の測定値の結果に前処理をして、より貴重な形態の情報となすために、その他の式を使用することができる。最も注目すべきは、対数関数またはロジスティック関数等のいずれかの通常の数学的変換を使用して、生物マーカーの結果を、集団の平均値等に関して、正規またはその他の分布状態として正規化することはいずれも当業者には周知である。特に興味深いのは、年齢、性別 (gender)、人種または性 (sex) 等の臨床パラメータに基づいた一連の正規化であり、特定の式が、あるクラスに属する被験体に対してもっぱら使用されるか、または臨床パラメータをインプットとして連続的に組み合わせる。その他の場合には、分析対象に基づいた生物マーカーを組み合わせ、計算した変数となし、これらを、それに続いて、式に当てはめる。

【0131】

正規化される見込みがある一被験体の個々のパラメータ値に加えて、D'Agostino ら、(2001 年) JAMA 286 巻: 180~187 頁に概要が述べられている技法、またはその他の類似の正規化および再校正の技法に従って、全ての被験体または任意の公知のクラスの被験体についての全体的な予測式自体を、再校正するかまたは別の場合には集団の予想有病率および平均生物マーカーパラメータ値についての調整に基づいて調整することができる。そのような疫学的調整統計量は、モデルに当てはめる過去のデータの登録簿によって、連続的に捕捉、確認、改善およびアップデートすることができ、これらのデータは、機械可読性であってもよく、もしくはそうではなくてもよく、またはこれらの統計量の補足、確認、改善およびアップデートは時には、保管サンプルの遡及的クエリーもしくはそのようなパラメータおよび統計量の過去の研究を参照することによって行ってもよい。式の再校正またはその他の調整の対象であり得る追加の例として、オッズ比の限界についての Pepe, M. S. ら、2004 年による研究; ROC 曲線に関する Cook, N. R.、2007 年による研究において使用されている統計量が挙げられる。最後に、絶対的なリスクに対して校正し、分類子またはリスクの式の各種の数値結果についての信頼区間を提供するために、実際の臨床集団ならびに研究結果および観察されたエンドポイントを参照することにより、分類子の式自体の数値結果を処理後に変換することができる。この例が、Genomic Health, Inc. (Redwood City, CA) の Oncotype Dx 製品における再発スコアの式のアウトプットに関して選ばれた実際の臨床研究を使用して得られた絶対的なリスクの提示、およびそのリスクについての信頼区間である。さらなる改変は、分類子またはリスクの式のアウト

プットに基づき、年齢または性等のそれらの臨床パラメータによって定義かつ選択された、研究のより小さな亜集団についての調整である。

【0132】

臨床パラメータとの組合せ、および伝統的な実験室リスク因子

本発明の実行に際しては、上記の臨床パラメータのうちのいずれかを、ある式への DETERMINANT のインプットとして、または特定の DETERMINANT のパネルおよび式を使用して測定しようとする関連のある集団を定義する事前選択の判断基準として使用することができる。また、上記で注目したように、臨床パラメータは、生物マーカーの正規化および前処理において、または DETERMINANT の選択、パネルの構築、式の型の選択および誘導、ならびに式の結果の後処理においても有用な場合がある。伝統的な実験室リスク因子についても、ある式へのインプットまたは事前選択の判断基準のいずれかとして、類似アプローチをとることができる。

10

【0133】

DETERMINANT の測定

DETERMINANT のレベルまたは量の実際の測定値を、タンパク質または核酸のレベルにおいて、当技術分野で公知の任意の方法を使用して決定することができる。例えば、核酸レベルにおいては、これらの配列のうちの 1 つまたは複数を特異的に認識するプローブを使用するノーザンハイブリダイゼーション解析およびサザンハイブリダイゼーション解析、ならびにリボヌクレアーゼプロテクションアッセイを使用して、遺伝子発現を決定することができる。あるいは、例えば、遺伝子の示差的に発現した配列に対して特異的なプライマーを使用する逆転写に基づいた PCR アッセイ (RT-PCR) を使用して、または Panomics, Inc. による、分枝鎖 RNA を増幅および検出する方法によって、DETERMINANT の量を測定することもできる。また、タンパク質レベルにおいても、例えば、本明細書に記載する遺伝子産物がコードするペプチドのレベルを測定することによって、またはそれらの細胞内における局在化もしくは活性を、例えば、AQUA 等の技術プラットフォームを使用して測定することによって、DETERMINANT の量を決定することができる。そのような方法は、当技術分野では周知であり、そのような方法として、例えば、遺伝子がコードするタンパク質に対する抗体に基づいたイムノアッセイ、アプタマー、または分子インプリントが挙げられる。任意の生物学的な材料を、タンパク質またはその活性の検出／定量化のために使用することができる。あるいは、適切な方法を選択して、分析した各タンパク質の活性によって、マーカー遺伝子がコードするタンパク質の活性を決定することもできる。

20

30

【0134】

DETERMINANT であるタンパク質、ポリペプチド、突然変異およびそれらの多型を、任意の適切な様式で検出することができるが、典型的には、被験体由来のサンプルを、DETERMINANT であるタンパク質、ポリペプチド、突然変異または多型に結合する抗体と接触させ、次いで、反応産物の有無を検出することによって検出する。抗体は、上記で詳細に論じたように、前述の抗体のモノクローナル、ポリクローナル、キメラまたは断片であってよく、反応産物を検出するステップは、任意の適切なイムノアッセイを用いて実施することができる。被験体由来のサンプルは典型的には、上記したように、生物学的液体であり、上記の方法を実施するために使用した生物学的液体と同じサンプルであってよい。

40

【0135】

本発明に従って実施するイムノアッセイは、均一アッセイであっても、または不均一アッセイであってもよい。均一アッセイの場合、免疫学的反応は通常、特異的抗体 (例えば、抗 DETERMINANT タンパク質抗体)、標識された分析対象、目的のサンプルを含む。抗体が標識された分析対象に結合すると、標識から発生するシグナルが直接的または間接的に改変される。免疫学的反応およびその程度の検出の両方を、均一溶液中で実施することができる。利用することができる免疫化学標識には、フリーラジカル、放射性同位体、蛍光染料、酵素、バクテリオファージまたは補酵素がある。

50

【0136】

不均一アッセイのアプローチの場合、試薬は通常、サンプル、抗体および検出可能なシグナルを発生させるための手段である。上記のサンプルを使用することができる。抗体を、ビーズ（プロテインAおよびプロテインGのアガロースビーズ等）、プレートまたはスライド等の支持体上に固定化し、液相中で、抗原を含有することが疑われる検体と接触させることができる。次いで、支持体を液相から分離し、支持相または液相のいずれかを検出可能なシグナルについて、そのようなシグナルを発生させるための手段を利用して調べる。シグナルは、サンプル中の分析対象の存在と関係がある。検出可能なシグナルを発生させるための手段は、放射性標識、蛍光標識または酵素標識の使用を含む。例えば、検出すべき抗原が、第2の結合部位を含有する場合、その部位に結合する抗体を、検出可能な基にコンジュゲートさせ、分離ステップの前に、液相の反応溶液に添加することができる。固体の支持体上の検出可能な基の存在によって、試験サンプル中の抗原の存在が示される。適切なイムノアッセイの例は、オリゴヌクレオチド、免疫プロット、免疫蛍光法、免疫沈降、化学発光法、電気化学発光（ECL）または酵素結合免疫アッセイである。

10

【0137】

当業者であれば、本明細書に開示する方法を実施するのに有用であり得る多数の特異的なイムノアッセイのフォーマットおよびそれらの変更形態に精通しているであろう。一般に、E. Maggio、Enzyme-immunoassay、(1980年) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.) を参照されたい。また、Skoldらに対する米国特許第4,727,022号、標題「Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application」、Forrestらに対する米国特許第4,659,678号、標題「Immunoassay of Antigens」、Davidらに対する米国特許第4,376,110、標題「Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies」、Litmanらに対する米国特許第4,275,149号、標題「Macromolecular Environment Control in Specific Receptor Assays」、Maggioらに対する米国特許第4,233,402号、標題「Reagents and Method Employing Channeling」、およびBoguslaskiらに対する米国特許第4,230,767号、標題「Heterogenous Specific Binding Assay Employing a Coenzyme as Label」も参照されたい。

20

30

【0138】

受動結合等の公知の技法に従って、抗体を、診断アッセイに適した固体の支持体（例えば、プロテインAまたはプロテインGのアガロース等のビーズ、ラテックスまたはポリスチレン等の材料から形成されたマイクロスフェア、プレート、スライドまたはウェル）にコンジュゲートさせることができる。同様に、公知の技法に従って、本明細書に記載する抗体を、検出可能な標識または基、例として、放射標識（例えば、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{31}I ）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、および蛍光標識（例えば、フルオレセイン、Alexa、緑色蛍光タンパク質、ローダミン）にコンジュゲートさせることもできる。

40

【0139】

また、抗体は、DETERMINANTであるタンパク質、ポリペプチド、突然変異および多型の翻訳後修飾、例として、チロシンリン酸化、スレオニンリン酸化、セリンリン酸化、グリコシル化（例えば、O-GlcNAc）を検出するのに有用な場合もある。そのような抗体は、1つまたは複数の目的のタンパク質中のリン酸化されたアミノ酸を特異的に検出し、本明細書に記載するイムノプロット、免疫蛍光法およびELISAアッセイにおいて使用され得る。これらの抗体は、当業者には周知であり、市販されている。また、翻訳後修飾は、反射マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析（reflecto

50

n ionization-time of flight mass spectrometry) (MALDI-TOF)における準安定イオンを使用して決定することもできる (Wirth, U. ら (2002年) Proteomics 2巻 (10号) : 1445~51頁)。

【0140】

酵素活性を示すことが知られている DETERMINANT のタンパク質、ポリペプチド、突然変異および多型については、インビトロにおいて当技術分野で公知の酵素アッセイを使用して、それらの活性を決定することができる。そのようなアッセイとして、多くの中でもとりわけ、キナーゼアッセイ、ホスファターゼアッセイ、レダクターゼアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。公知のアルゴリズム、例として、ヒルプロット、ミカエリス-メンテン式、ラインウィーバー-バーク解析等の線形回帰プロット、およびスキャッチャードプロットを使用して速度定数 K_M を測定することによって、酵素活性の動態調節を決定することができる。

10

【0141】

DETERMINANT の配列についてのデータベースエントリーによって提供される配列情報を使用し、当業者に周知の技法を使用して、DETERMINANT の配列の発現を、(それらが存在する場合) 検出し、測定することができる。例えば、DETERMINANT の配列に対応する、配列データベースエントリーに属する配列、または本明細書に開示する配列に属する配列を使用して、例えば、ノーザンブロットハイブリダイゼーション解析または特定の核酸配列を特異的にかつ好ましくは定量的に増幅する方法において DETERMINANT の RNA 配列を検出するためのプローブを構築することができる。別の例として、これらの配列を使用して、例えば、増幅に基づいた検出方法、例として、逆転写に基づいたポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) において DETERMINANT の配列を特異的に増幅するためのプライマーを構築することもできる。遺伝子発現の変化に、遺伝子の増幅、欠失、多型および突然変異が伴う場合、試験集団と基準集団との配列比較を、試験細胞集団および基準細胞集団において調べた DNA 配列の相対的な量を比較することによって行うことができる。

20

【0142】

本明細書に開示する遺伝子の発現を、当技術分野で公知の任意の方法を使用して RNA レベルで測定することができる。例えば、これらの配列のうちの 1 つまたは複数の特異的に認識するプローブを使用するノーザンハイブリダイゼーション解析を使用して、遺伝子の発現を決定することができる。あるいは、例えば、示差的に発現した配列に対して特異的なプライマーを使用する逆転写に基づいた PCR アッセイ (RT-PCR) を使用して、発現を測定することもできる。また、例えば、その他の標的増幅の方法 (例えば、TMA、SDA、NASBA)、またはシグナル増幅の方法 (例えば、bDNA) 等を使用して、RNA を定量化することもできる。

30

【0143】

あるいは、DETERMINANT のタンパク質および核酸の代謝産物を測定することもできる。用語「代謝産物」は、代謝過程の任意の化学的または生化学的な産物、例として、生物学的分子 (例えば、タンパク質、核酸、炭水化物または脂質) のプロセッシング、切断または消費によって産生された任意の化合物を含む。代謝産物は、当業者に公知の多様な方法で検出することができ、それらには、屈折率分光法 (RI)、紫外分光法 (UV)、蛍光分析、放射化学分析、近赤外分光法 (near-IR)、核磁気共鳴分光法 (NMR)、光散乱分析 (LS)、質量分析、熱分解質量分析、比濁分析、分散型ラマン分光法、質量分析と組み合わせたガスクロマトグラフィー、質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィー、質量分析と組み合わせたマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間 (MALDI-TOF)、質量分析と組み合わせたイオンスプレー分光法、キャピラリー電気泳動、NMR、および IR 検出がある。(W004/056456 および W004/088309 を参照されたい。これらは、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれている。) この点に関しては、上記で言及した検出方法、または当業者に公知の

40

50

その他の方法を使用して、その他のDETERMINANTの分析対象を測定することができる。例えば、サンプル中の循環カルシウムイオン (Ca^{2+}) を、蛍光染料、例として、Fluoシリーズ、とりわけ、Fura-2A、Rhod-2を使用して検出することができる。その他のDETERMINANTの代謝産物も同様に、そのような代謝産物を検出するために特異的に設計または手直しした試薬を使用して検出することができる。

【0144】

キット

また、本発明は、キットの形態として一緒に包装されたDETERMINANTの検出試薬、例えば、DETERMINANT核酸の一部に対して相補性を示す相同な核酸配列、例として、オリゴヌクレオチド配列を有することによって、1つまたは複数のDETERMINANT核酸を特異的に同定する核酸、またはDETERMINANT核酸がコードするタンパク質に対する抗体も含む。これらのオリゴヌクレオチドは、DETERMINANT遺伝子の断片であってよい。例えば、これらのオリゴヌクレオチドは、200、150、100、50、25または10ヌクレオチド長以下であってよい。キットは、別個の容器中に、核酸または抗体（固体のマトリックスにすでに結合しているか、またはそれらをマトリックスに結合させる試薬が別個に包装されているかのいずれか）、（正および／もしくは負の）対照処方、ならびに／または検出可能な標識、例として、とりわけ、フルオレセイン、緑色蛍光タンパク質、ローダミン、シアニン染料、Alexa染料、ルシフェラーゼ、放射標識を含有することができる。アッセイを実施するための指示（例えば、書類、テープ、VCR、CD-ROM等）を、キット中に含めることができる。アッセイは、例えば、当技術分野で公知のノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAの形態であってよい。

【0145】

例えば、DETERMINANTの検出試薬を、多孔性条片等の固体のマトリックス上に固定化して、少なくとも1つのDETERMINANTの検出部位を形成することができる。多孔性条片の測定または検出の領域は、核酸を含有する複数の部位を含むことができる。また、試験条片は、負および／または正の対照のための部位も含有することができる。あるいは、対照部位を、試験条片とは別個の条片上に設けてもよい。場合により、異なる検出部位が、異なる量の固定化核酸、例えば、第1の検出部位においてはより多い量を、かつそれに続く部位ではより少ない量を含有してもよい。試験サンプルを添加すると、検出可能なシグナルを示す部位の数によって、サンプル中に存在するDETERMINANTの量の定量的な指示が得られる。検出部位は、任意の適切に検出可能な形状に構成することができるが、典型的には、試験条片の幅にわたる棒状または点状の形状をとる。

【0146】

あるいは、キットは、1つまたは複数の核酸配列を含む核酸基板アレイを含有する。アレイ上の核酸は、DETERMINANT1~360によって示される1つまたは複数の核酸配列を特異的に同定する。種々の実施形態では、DETERMINANT1~360によって示される配列のうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、50、100、125、150、175、200、250または275個以上の発現を、アレイに対する結合によって同定することができる。基板アレイは、例えば、固体の基板、例えば、米国特許第5,744,305号に記載されている「チップ」であってよい。あるいは、基板アレイは、溶液アレイ、例えば、xMAP (Luminex, Austin, TX)、Cyvera (Illumina, San Diego, CA)、CellCard (Vitro Bioscience, Mountain View, CA)、およびQuantum Dots' Mosaic (Invitrogen, Carlsbad, CA) であってもよい。

【0147】

DETERMINANTの検出のための抗体の適切な供給元として、例えば、Abazyme、Abnova、Affinity Biologicals、Antibody Shop、Biogenesis、Biosense Laboratories、Ca

l biochem、Cell Sciences、Chemicon International、Chemokine、Clontech、Cytolab、DAKO、Diagnostic BioSystems、eBioscience、Endocrine Technologies、Enzo Biochem、Eurogentec、Fusion Antibodies、Genesis Biotech、GloboZymes、Haematologic Technologies、Immunodetect、Immunodiagnostik、Immunometrics、Immunostar、Immunovision、Biogenex、Invitrogen、Jackson ImmunoResearch Laboratory、KMI Diagnostics、Koma Biotech、LabFrontier Life Science Institute、Lee Laboratories、Lifescriven、Maine Biotechnology Services、Mediclon、MicroPharm Ltd.、ModiQuest、Molecular Innovations、Molecular Probes、Neoclone、Neuromics、New England Biolabs、Novocastrol、Novus Biologicals、Oncogene Research Products、Orbigen、Oxford Biotechnology、Panvera、PerkinElmer Life Sciences、Pharmingen、Phoenix Pharmaceuticals、Pierce Chemical Company、Polymun Scientific、Polysciences, Inc.、Promega Corporation、Proteogenix、Protos Immunorescarch、QED Biosciences, Inc.、R&D Systems、Repligen、Research Diagnostics、Roboscreen、Santa Cruz Biotechnology、Seikagaku America、Serological Corporation、Serotec、SigmaAldrich、StemCell Technologies、Synaptic Systems GmbH、Technopharm、Terra Nova Biotechnology、TiterMax、Trillium Diagnostics、Upstate Biotechnology、US Biological、Vector Laboratories、Wako Pure Chemical Industries、および Zeptomatrix 等の商業的な供給元が挙げられる。しかし、当業者であれば、表1のDETERMINANTのうちのいずれかに対する抗体、核酸プローブ、例えば、オリゴヌクレオチド、アプタマー、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドを日常的に作製することができる。

【実施例】

【0148】

(実施例1)

一般的な方法

トランスジェニックマウスおよび原発性腫瘍

リバーステトラサイクリントランス活性化因子、Tetプロモーター、およびチロシナーゼエンハンサー／プロモーター導入遺伝子を、(Ganss, Montoliuら1994年; Chin, Pomcrantzら1997年; Chin, Tamら1999年)の記載に従って使用した。マウスc-Met cDNA (George F Vande-Woude, Grand Rapids, MIにより寄贈された)を、(Chin, Nature 1999年)の記載に準じて、Tetプロモーターの制御下でクローニングした。複数の導入遺伝子樹立系統を、予想される頻度で得た。明確に定義された活性化因子系統(Tyr/rtTA、系統37、Chin, Nature 1999年)ならびに3つの独立したレポーター系統(Met15、Met28およびMet40)を、これらの研究のために使用した。

【0149】

インビボにおける導入遺伝子の発現を活性化するために、離乳年齢のMETトランスジェニックマウスに、飲料水からドキシサイクリンを与え（ $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、スクロース水中）、自発的な腫瘍の発生について観察した。サブセットの動物（3週齢）にavertin（ $0.5\text{g}/\text{kg}$ 体重）を用いて腹腔内麻酔を施し、背部に20mmの長方形の創傷を設け、続いて縫合した。動物を、腫瘍の発生、または健康不良の出現について2週に1回観察した。瀕死状態に近い動物または腫瘍の負担を顕著に示す動物を屠殺し、続いて、詳細な剖検を行った。（Chin, L.ら Genes and Dev、1997年）の以前の記載に従って、組織学的解析のために、腫瘍検体を10%ホルマリン中に固定し、パラフィン中に包埋した。十分な検体が入手可能である場合には、原発性腫瘍を急速冷凍して、それに続く解析に供し、細胞系を生成した。

10

【0150】

細胞培養。メラノーマ細胞系を、マウス腫瘍から、コラーゲナーゼ+ヒアルロニダーゼ（ $2\text{mg}/\text{ml}$ ；Sigma）を用いて2時間消化し、続いて、10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するRPMI 1640培地（Gibco BRL）を用いて培養することによって得た。メラニン形成細胞培養物を、記載¹⁰に従って新生仔マウスの表皮から生成し、5%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、200pMコレラ毒素、200nM 12-Oテトラデカノイルホルボール-13-アセテート（TPA）を含有するRPMI 1640中に維持した。トランスジェニックc-Met発現を、培養細胞中で、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のドキシサイクリンを添加することによって誘導した。M3 BRAFメラニン形成細胞、HME L468予備刺激メラニン形成細胞、WM3211およびWM115を、10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するRPMI 1640中に維持した。HME L468は、Garrawayら¹¹に記載されているように、PMEL/hTERT/CDK4（R24C）/p53DD/BRAF^{V600E}細胞のサブクローンを同定する。

20

【0151】

組織学的解析および免疫組織化学的染色。マウスを機関のガイドラインに従って屠殺し、臓器を10%緩衝ホルマリン中に固定し、パラフィン包埋した。病変の分類および腫瘍転移の検出を可能にするために、組織切片を、H&Eを用いて染色した。c-Metタンパク質を検出し、その活性化の状況を決定するために、腫瘍サンプルを、Cell Signaling Technology製の全c-Met抗体およびリン酸c-Met（Tyrl349）抗体を用いて免疫染色した。腫瘍は、Sigma製のS100抗体を用いて免疫染色した。

30

【0152】

RT-PCRおよびリアルタイム定量的PCRによる遺伝子発現。遺伝子発現を解析するために、全RNAを、原発性皮膚黒色腫または培養細胞から、Trizol（Gibco BRL）を使用して、製造元のプロトコールに従って単離した。全RNAを、RQ1デオキシリボヌクレアーゼ（Promega）で処理し、オリゴ（dT）をプライマーとして用い、Superscript IIポリメラーゼ（Invitrogen）を使用する逆転写反応のために、 $1\mu\text{g}$ の全RNAを使用した。コード領域を、PCR、またはMx3000リアルタイムPCRシステム（Stratagene）上でのSYBR Green（Applied Biosystems）を使用する定量的リアルタイムPCRにより増幅した。リボソームタンパク質R15を、内部発現対照として使用した。プライマー配列を以下に示す：

40

【0153】

【化 1】

c-Met: 5'-TCTGTTGCCATCCCAAGACAACATTGATGG, 5'-
 AAATCTCTGGAGGAGGTTGG; HGF: 5'-CAAGGCCAAGGAGAAGGTTA, 5'-
 TTTGAAGTTCTCGGGAGTGA; Tyr: 5'-CCAGAAGCCAATGCACCTAT, 5'-
 AGCAATAACAGCTCCACCA; TRP1: 5'-ATTCTGGCCTCCAGTTACCA, 5'-
 GGCTTCATTCTTGGTGCTTC; DCT: 5'-AACAACCCTTCCACAGATGC, 5'-
 TCTCCATTAAGGGCGCATAG; R15: 5'-CTTCCGCAAGTTCACCTACC, リバース-
 TACTTGAGGGGGATGAATCG.

10

S M A D 3 プライマーは、S u p e r a r r a y 製であった。

【0154】

遺伝子発現プロファイリングおよびデータ解析。Met 誘導型およびH R a s 誘導型のマウス腫瘍RNAを、上記の記載に従って抽出し、標識し、D a n a - F a r b e r C a n c e r I n s t i t u t e M i c r o a r r a y C o r e F a c i l i t y において、A f f y m e t r i x G e n e C h i p M o u s e G e n o m e 4 3 0 2 . 0 A r r a y に製造元のプロトコールに従ってハイブリダイズさせた。発現データを、R / b i o c o n d u c t o r パッケージ (www. b i o c o n d u c t o r . o r g) を使用して処理した。解析を、記載^{1 2}に従って実施した。手短に述べると、バックグラウンドの補正方法はM A S (v 4 . 5) であり、正規化の方法は一定とし、P M の調整方法はM A S (v 5) であり、発現値の略式は中央値分散分析 (RMA) であった。P / M / A 呼び出し方法はM A S 5 であった。全部で12個の腫瘍サンプルのうち、少なくとも2つの現在の呼び出しを有するプローブセット (16, 434個のプローブセット) を、6つのi M e t 腫瘍と6つのi H R a s 腫瘍との間におけるさらなる示差的発現解析のために選択した。S i g n i f i c a n c e A n a l y s i s o f M i c r o a r r a y (S A M 2 . 0 ; http://www-stat. stanford. edu/~t i b s / S A M /) を、示差的発現解析のために使用した^{1 3}。2つのクラスの対応のない標本の解析を実施し、続いて、最小2倍の変化についてフィルターをかけ、誤検出率が0.05未満となるようにデルタ値を調整した。G F P またはH O X A 1 のいずれかを形質導入した細胞 (H M E L 4 6 8、W M 1 1 5、W M 3 2 1 1) から抽出し、続いて、標識したcDNAを、D a n a - F a r b e r C a n c e r I n s t i t u t e M i c r o a r r a y C o r e F a c i l i t y において、A f f y m e t r i x G e n e C h i p H u m a n G e n o m e U 1 3 3 P l u s 2 . 0 に製造元のプロトコールに従ってハイブリダイズさせて、上記のSAMにより、H O X A 1 誘導性転写の解析を実施した。I n g e n u i t y P a t h w a y s A n a l y s i s プログラム (http://www. i n g e n u i t y . c o m / i n d e x . h t m l) を使用して、転移性メラノーマ中において顕著に調節されている細胞の機能および経路をさらに解析した。

20

30

【0155】

マウス遺伝子発現とヒトアレイCGHデータとの比較。(上記した)マウス腫瘍の発現解析から得た非冗長性の示差的発現プローブセットを、アレイCGH (GEOアクセッション番号G S E 7 6 0 6) によって同定されたヒト転移性メラノーマ中においてコピー数異常を示したヒトオルソログに位置付けた。相同遺伝子 (h o m o l o g e n e) データベース (N C B 1) を使用して、i M e t 腫瘍対i R a s 腫瘍において示差的に発現した遺伝子について、オルソログなヒト遺伝子を同定した。(i R a s 腫瘍と比べて) i M e t 腫瘍中において上方制御または下方制御され、ヒトでの転移においてそれぞれ増幅または欠失している遺伝子を選択した。

40

【0156】

目的変数なしのクラスター化および Kaplan-Meier の生存解析。転移性決定因子の発現プロファイルを使用して、R を使用する K 平均法クラスター化 (http://ww

50

w. r - p r o j e e t . o r g /) により、295個の乳腺腫瘍^{14; 15}を2つの群にクラスター化した。これら2つのクラスター化された群についての Kaplan-Meier の生存解析を、Rにおける生存パッケージを使用して実施し、P値を、Rにおける生存統計パッケージを使用して計算した。

【0157】

DNA構築物および低複雑度ライブラリー。pRetrosuperSmad3およびp3TPLuxは、Addgene製であった(それぞれ、15726番および11767番)。低複雑度cDNAライブラリーのために、199個の遺伝子に相当する230個のcDNAを、ORFeomeコレクション(Dana-Farber Cancer Institute)から入手し、pLenti6/V5 DEST (Invitrogen) にGateway組換えにより、製造元の提案に従って高スループットに導入した。浸潤スクリーニングにおいて良好なスコアを示した候補cDNAは、V5エピトープを使用して配列および発現を確かめ、同種のクローン調製物を、全ての浸潤検証研究のために使用した。

【0158】

96ウェル上でのウイルスの産生、形質導入およびトランスウェル浸潤アッセイ。96ウェルの平底プレート中、DMEM+10%FBS(抗菌性)中に、各ウェルにつき、100μl中およそ 3×10^4 個の293T細胞を播種し、24時間後(約90%コンフルエント)にトランスフェクションを行った。各ウェルにおけるトランスフェクションのために、150ngのウイルス骨格および110ngのレンチウイルスパッケージングベクターを、Opti-MEM(Invitrogen)を使用して15μlに希釈した。得られたベクターのミックスを、0.6μlのLipofectamine 2000(Invitrogen)を含有するOpti-MEM15μlと組合せ、室温で20分間インキュベートし、293T細胞を覆う100μlの培地に添加した。トランスフェクションのおよそ10時間後に、培地をDMEM+10%FBS+P/Sで交換し、4回のウイルス上清の収集を、トランスフェクションの36時間後から開始し、それらを組み合わせた。感染の24時間前に96ウェルの平底プレート中に播種した標的細胞(HMEL468)(70~80%コンフルエント)に、8μg/mlポリブレンを含有するウイルス上清150μlを添加した。細胞を2回感染させ、第2の感染後、RPMI+10%FBS+P/S中で24時間回復させ、その後、細胞をトリプシン処理し(trypsinized)、96ウェルの腫瘍浸潤プレート(BD Bioscience)に製造元の推奨に従って適用した。浸潤細胞を、4μM Calcein AM(BD Bioscience)を使用してインビボにおいて標識して検出し、494/517nm(Abs/Em)における蛍光によって測定した。正のスコアを示す候補を、ベクター対照から2×標準偏差のスコアを示すものとして同定した。

【0159】

トランスウェル浸潤アッセイ。標準的な24ウェル浸潤チャンバー(BD Biosciences)を活用して、浸潤性を、製造元の提案に従って評価した。手短に述べると、細胞をトリプシン処理し、PBSを用いて2回濯ぎ、無血清RPMI1640培地中に再懸濁させ、HMEL468は 7.5×10^4 細胞/ウェルで、WM3211は 2.0×10^4 で、WM115は 5.0×10^4 で播種した。チャンバーを、三つ組または四つ組で播種し、化学誘引物質としての10%血清含有培地中に置き、さらに、インプット対照として、チャンバーを二つ組で細胞培養プレート中に置いた。22時間のインキュベーション後に、チャンバーを10%ホルマリン中に固定し、クリスタルバイオレットを用いて染色して、手作業で数えるか、またはAdobe Photoshop(Adobe)を用いてピクセルの定量化を行った。細胞数の差について、データを、対照に対するインプット細胞について正規化した(添加対照)。HOXA1媒介型浸潤に対するSMAD3のノックダウンを評価するために、SMAD3を標的にすることが検証されたshRNA構築物(pSUPER-shSMAD3)、およびウイルスを、標準的なレトロウイルス産生プロトコルを使用して得た。浸潤を比較するために、並行して、対照細胞には、非標

的 shRNA (pSUPER-shNT) を形質導入した。

【0160】

異種移植研究および尾静脈注射研究。HME L 4 6 8 細胞に、GFPウイルスまたはHOXA1ウイルスのいずれかを安定に形質導入した。異種移植研究のために、細胞を、CB-17-scld (C. B-Igh-1b/lcrTac-Prkdcscl; Taconic) マウスの両側腹部中に、 1×10^6 細胞/部位で皮下に移植した。肺への播種能力を評価するために、 5.0×10^5 個の細胞を、CB-17-scld マウスの尾静脈中に注射した。全ての動物を、腫瘍の発生についてモニタし、続いて、死体解剖および腫瘍の組織学的解析を行った。

【0161】

TGFβ レポーターアッセイ。6 ウエルプレート中に、細胞を、三つ組で、 2×10^5 細胞/ウエルで播種し、24 時間後に、p3TPLux レポーター ($1 \mu\text{g}$ /ウエル) および対照レポーター (Renilla, 20 ng /ウエル) によるトランスフェクションを行った。24 時間のインキュベーション後、細胞を、TGFβ (20 ng/ml , R&D Systems) を用いて 24 時間処理し、Lumat LB9507 Luminometer を使用してルシフェラーゼ解析 (Promega) を製造元のプロトコールに従って行って、firefly/Renilla の比によって示されるレポーターの活性化を得た。p 値を、両側 T 検定を使用して計算した。

【0162】

イムノブロット解析。細胞を、 20 ng/ml TGFβ (R&D Systems) を用いて表示に従って処理し、続いて、PBS 中で 2 回洗浄し、 1 mM PMSF、 $1 \times$ プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) および $1 \times$ ホスファターゼ阻害剤 (Calbiochem) を含有する RIPA 緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, $500 \mu\text{M}$ EDTA, $100 \mu\text{M}$ EGTA, 1.0% Triton X-100 および 1% デオキシコール酸ナトリウム) を使用して溶解させた。溶解用緩衝液中、 4°C での 30 分間のインキュベーション後、分離した全細胞抽出物を、 10°C 、 4°C で 10 分間遠心分離することによって清澄化し、次いで、タンパク質濃度を、DC Protein Assay (BioRad) によって決定した。タンパク質を、NuPAGE 4~12% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) 上で分離することによって可視化し、PBS+ツイーン-20 中の 5% ミルクでブロックした PVD F (Millipore, Billerica, MA) 上にブロットし、次いで、表示する抗体と共にインキュベートした。以下の抗体を、イムノブロットのために使用した: pSmad3 および全 Smad3 (Cell Signaling Technology)、アルファチューブリン (Sigma)、V5 (Invitrogen)、ホスホFAK (pY397: Invitrogen)。

【0163】

Panomics technology による RNA に基づいた発現アッセイ。タンパク質に基づいた発現解析の代替として、また、Quantigene Plex 技術 (Panomics) を活用して、PD の RNA 発現も評価した。配列ではなくレポーターシグナルを増幅することによって、RNA を検出および定量化するための独特のアプローチを提供する Quantigene プラットフォームは、分枝 DNA 技術、すなわち、サンドイッチ核酸ハイブリダイゼーションアッセイに基づいている (Flagella, M., Bui, S., Zheng, Z., Nguyen, C. T., Zhang, A., Pastor, L., Ma, Y., Yang, W., Crawford, K. L., McMaster, G. K. ら (2006 年) A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling, Anal Biochem 352 巻、50~60 頁)。この技術によって、新鮮組織、凍結組織またはホルマリン固定、パラフィン包埋 (FFPE) 組織のホモジネート中の RNA 発現を定量的に確実に測定することができる (Knudsen, B. S., Allen, A. N.,

10

20

30

40

50

McLerran, D. F.、Vessella, R. I、Karademos, J.、Davies, J. E.、Maqsodi, B.、McMaster, G. K. およびKristal, A. R (2008年) Evaluation of the branched-chain DNA assay for measurement of RNA in formalin-fixed tissues、J Mol Diagn 10巻、169～176頁)。図17Aに示すように、実現可能性パイロットから、FFPEブロック中にある21個のスビッツ母斑検体および22個の悪性のメラノーマ検体中のUBE2CのRNA発現を確実に測定できることが示されている。各遺伝子の解析は、優れた再現性を達成し、変動係数(CV)の値は8～9%の範囲であり、したがって、最高の品質管理基準を満たした。したがって、この方法は、入手可能な抗体がない目的の候補の発現パターンに関する最初の洞察を探り出すための理想的な代替方法を我々にもたらす。注目すべきことに、UBE2CのQuantigene Plex解析は、UBE2Cの発癌活性を示す結果を裏付けた。具体的には、我々は、古典的な同時形質転換アッセイを使用して、Ink4a/Arf欠損初代マウス胚性線維芽細胞中において、UBE2Cが活性化されたHRAS^{v12}と連携して、形質転換病巣の形成を増加させることを示している(図17B)。

10

【0164】

他の箇所でも詳細に記載したように、自動化定量的解析(AQUA(登録商標))によって、細胞内コンパートメント内部のタンパク質濃度の正確な測定が可能になる[Camp, R. L.、Chung, G. G. およびRimm, D. L.、Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays、Nat Med 8巻(11号)、1323～1327頁(2002年)]。手短に述べると、一連の高解像度の単色像を、PM-2000顕微鏡によって撮影した。各薄片試料について、DAPI、サイトケラチンおよび一次抗体に特異的なシグナルからのシグナルを使用して、焦点が合っている像および焦点が合っていない像を得た。サイトケラチンとS100とのシグナルから腫瘍「マスク」を生み出すことによって、腫瘍を、間質性および非間質性の要素とは区別した。これによって、薄片試料の目視検査によって設定した強度閾値に基づいた二成分マスク(各ピクセルが、「オン」または「オフ」のいずれかである)が生み出された。シグナル強度(0～255の規模でスコア化した)を、特定のコンパートメントの面積で割ることによって、各細胞内コンパートメント中の目的のタンパク質のAQUA(登録商標)のスコアを計算した。1スポット当たり5%未満の腫瘍面積を示す検体は、対応する腫瘍検体には相当しないことから、自動化定量的解析に含めなかった。

20

30

【0165】

(実施例2)

表現型から誘導した進化的に保存されている転移徴候の同定

ここでは、非常に異なる転移の可能性を有する遺伝子工学的に作製されたマウス(GEM)モデルを、とりわけ、微小転移またはマクロ転移の記載および追跡期間に関する変数を含む、ヒト癌の解析に内在する当惑させられる不確実性を軽減するための1つの生物学的な系として使用した。活用した2つのマウスメラノーマモデルは、(i) Ink4a/Arf欠損バックグラウンドにおいてチロシナーゼ誘導型のrtTAおよびtet-Metの導入遺伝子から構成される新たに開発されたMet誘導型GEMモデル(Tyr-rtTA; Tet-Met; Ink4a/Arf^{-/-}、以下、「iMet」)、および(ii)以前に記載されているHRAS^{v12G}誘導型マウスメラノーマモデル(Tyr-rtTA; Tet-HRAS^{v12G}; Ink4a/Arf^{-/-}、以下、「iHRAS^{*}」)¹²であった。表現型の特徴付けから、75%のiMetマウスが、生検部位においてメラノーマを発症し、平均潜伏期間は12週間であることが示されている。これらの腫瘍は、メラニン形成細胞マーカー陽性であり、リン酸活性化(phosphor-activated)Met受容体およびHGFの発現を示す(図5A～E)；さらに、派生

40

50

した i M e t メラノーマ細胞は、トランスウエルチャンバー浸潤アッセイにおいて、組換え H G F に応答してロバストな浸潤活性を示す (図 2 A)。ヒトにおける進行した転移性メラノーマ中の H G F - M E T シグナル伝達の活性化^{1 3}と同様、新規のトランスジェニック動物における i M e t メラノーマも、リンパ節に一樣に転移し、それに加えて、それぞれヒトメラノーマの場合の転移性播種の一般的な部位である副腎および肺実質にも時には広がる (図 2 B)。この浸透性の高い転移性表現型は、非転移性の原発性皮膚黒色腫によって特徴付けられる i H R A S * メラノーマモデル^{1 2 ; 1 4}とは著しく対照的である。尾静脈アッセイにおいて、原発性メラノーマから得られた細胞系のうち、i H R A S * ではなく i M e t が、肺に播種することができることが実証されたことによって、この対照的な転移の可能性が補強された (図 2 C)。

10

【0166】

i H R A S * と i M e t との間の転移性傾向の疑いの余地のない差によって、i H R A S * モデルおよび i M e t モデルに由来する原発性皮膚黒色腫のトランスクリプトームの比較に基づいて表現型誘導型原発性腫瘍転移徴候を生成することが可能になった。＜0.05の誤発見率で≥2倍の示差的発現を示す1597個のプローブセットから構成されるこのマウス転移徴候を、次には、(i)ヒト転移性メラノーマにおいて、コピー数異常(CNA)中に存在し、かつ／または(ii)ヒトの原発性メラノーマと転移性メラノーマとの間で示差的発現を示す、非常に多数の遺伝子と整合させて、295個の上方制御された／増幅している遺伝子と、65個の下方制御された／欠失している遺伝子を得た (図3A; 表4)。これらの遺伝子から得られる生物学的活性の型に関する早期の洞察を探り出すために、我々は、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA) を使用して、知識ベース経路解析を実施して、360個の遺伝子のリストについて、より大型の1597個のマウス転移徴候に対してフィルターをかけることによって、どの遺伝子機能が顕著なスコアを示すかを定義した。IPAの呼び出しの有意性を評価するために、我々は、同一サイズの無作為抽出リストを生成して、平行分析を行った。図3Bに示すように、我々は、マウス転移発現徴候が、この無作為抽出リストと比べて、DNAの複製および組換え、癌、細胞サイクル、ならびに細胞死に関与する遺伝子機能の何らの過剰描写を示すことを見出した。それと比較して、種間／プラットフォーム間でフィルターをかけたリストは、これらの同じ機能の著しくより強力な強化を示し、それに加えて、マウス発現徴候のみの場合には明らかでなかった新しい機能のネットワーク、すなわち、「細胞の集合および組織化」の出現も示した (図3B)。この比較から、表現型誘導型転移徴候と種間比較とにおける三角測量が、腫瘍の形成および転移のプロセスと強力につながる遺伝子ネットワークの強化に役立ち得ることが示唆された。

20

30

【0167】

(実施例3)

転移性 D E T E R M I N A N T についての機能性遺伝子のスクリーニング

特に、癌細胞を広げる必須の能力である細胞の動きおよび浸潤との関連性を考えると、細胞の集合および組織化の遺伝子の強力な強化には勇気付けられた。この観察に刺激されて、我々は、浸潤を引き起こす遺伝子を同定するための低複雑度遺伝子スクリーニングを実行した (図3C)。さらに、これらのスクリーニングは、上方制御された遺伝子には治療の可能性が予想されることから、それらにもっぱら焦点を当てた。具体的には、295個の独特の上方制御された／増幅している候補のうちの199個に対応する230個の利用可能なORF (表5)を、ヒトORFeome (<http://horfdb.dfci.harvard.edu/>) から入手し、レンチウイルスの発現系に導入して、H M E L 4 6 8、すなわち、T E R T 不死化初代ヒトメラニン形成細胞系^{1 5}に形質導入した。一次スクリーニングのために、我々は、96ウエルのトランスウエル浸潤アッセイを活用し、蛍光定量的読取りを行って、マトリゲルを通るH M E L 4 6 8の遊走および浸潤を増強する、候補の決定因子遺伝子の能力を測定した。マトリゲルは、細胞外マトリックスを刺激する。負および正の対照として、G F P レンチウイルスおよびN E D D 9^{1 6} レン

40

50

チウイルスをそれぞれ使用した。一次スクリーニングを2回繰り返し、GFP対照から2標準偏差のスコアを再現性よく示した45個の候補を、一次スクリーニングのヒットと見なした(図3C~D)。次いで、これら45個の一次ヒットの二次検証スクリーニングを、三つ組で、標準的な24ウェルマトリゲルのトランスウェル浸潤チャンバーを使用して実施し、HME L 468メラニン形成細胞中で、浸潤を、GFP対照と比較して、少なくとも1.5倍増強することができる25個の遺伝子を得た(図3Eおよび表3)。さらにまた、関連の遺伝子またはこれら25個の決定因子のうちの1つと複合することが知られている遺伝子も、機能アッセイに加えて、追加の6個の決定因子を同定した。

【0168】

(実施例4)

ヒトの原発性および転移性のメラノーマのTMAにおける発現の進行相関性

転移決定因子の発現を、悪性メラノーマの進行と相関させるための努力において、我々は、AQUAにより、(Camp, R. L., Dolled-Filhart, M., King, B. L. および Rimm, D. L. (2003年) Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows that both high and normal levels of HER2 expression are associated with poor outcome, Cancer Res 63巻、1445~1448頁)の記載に従って、代表的な決定因子に対する市販されている抗体を使用して、良性母斑、原発性メラノーマおよびメラノーマ転移の検体を含有する組織マイクロアレイ(TMA)のIHC解析を実施した。表2、および図4A~Bの代表的なデータに要約されているように、BRRN1を除いて、全てのその他の試験した決定因子(HSF1、MCM7、HOXA1、FSCN1、ACP5、UBF2CおよびKNTC2)が、原発性または転移対良性母斑では、有意により高い発現を示す。

【0169】

【表2】

表2

決定因子	母斑 対 原発性	母斑 対 転移	原発性 対 転移	抗体	発現の概要
HSF1	0.0236*	0.0024*	0.3537	abnova; H00003297-A01	転移/原発性が、 母斑より高い
HOXA1	<0.0001 *	<0.0001 *	0.9017	abnova; H00003198-B01P	転移/原発性が、 母斑より高い
FASCIN	0.2669	0.2621	0.0264*	santa cruz; sc21743	転移が、原発性/ 母斑より高い
ACP5	0.2502	0.0014*	0.0262*	Abcam; ab49507	転移が原発性より高く、 原発性は母斑より高い 傾向を示す
UBE2C	0.0046*	0.7833	0.0162*	Abcam; 12290	興味深い傾向を示し、 転移が最も高く、 原発性が母斑より高い
KNTC2	0.2248	0.3579	0.0338*	abnova; H00010403-M01	転移が、原発性/ 母斑より高い
MCM7	0.0246*	0.0025*	0.3527	abnova; H00004176-M01	転移/原発性が、 母斑より高い
BRRN1	0.0349*	0.0607*	0.8057	Bethyl; A300-603A	母斑が、原発性より高い
値は、表示したAQUA(登録商標)スコアの比較のP値検定を示す					
* =フィッシャー検定により有意、5%。					

(実施例5)

転移DETERMINANTは、非系列特異的であり、予後を示す

ゲノムの不安定性が腫瘍形成を引き起こして、共通の明確に異なる遺伝子プロファイルを示す、不均一な細胞亜集団から構成される原発性腫瘍を生み出すことは十分に確立されている。したがって、原発性腫瘍中の転移決定因子－発現の亜集団には増殖上の利点を与えられ、そうした亜集団が究極的に広がる場合、転移決定因子の発現が、より均一に派生した転移病変においては、強化されて現れることに起因して増加することは理にかなっている。そのような進行関連発現を評価するために、25個の決定因子を、Oncomine^{2,4}上の非常に多数の発現プロファイリングデータにおいて調べた。これら25個の転移決定因子の大多数は以前には、腫瘍の進行に関係があると見なされたことがないにもかかわらず、転移性メラノーマにおいて原発性メラノーマと比べて発現の増加を示した7個の決定因子に加えて、これら25個全てが、1つまたは複数の非メラノーマ固形腫瘍において進行相関性発現パターンを示した（表3）。例えば、9個の決定因子は、より高いグレードの神経膠腫において統計学的に有意な発現増加を示した。前立腺腺癌においては、転移決定因子のうちの9個が、原発性から転移への発現の有意な増加を示した。同様に、肺においても、5個が、腫瘍グレードの増加との相関性を示した。最も顕著なオーバーラップを、乳房腺癌について観察し、25個の転移決定因子のうちの12個が、腫瘍進行の段階またはグレードとの相関性を示した。

【0170】

次に、乳房腺癌プロファイルにおいて顕著なオーバーラップを得たことから、我々は、公開されている乳房における治療成果アノテートトランスクリプトームデータ^{5,6}を使用して、これらの決定因子がより広く予後を示す可能性を探索した。乳癌トランスクリプトームデータセットは、これら20個の転移決定因子のうちの19個についてのプローブを含み、これらを徴候として使用して、K平均目的変数なしの分類アルゴリズムによって、295個の乳房腫瘍のコホートを階層化した（図5A；表7）。得られたサブグループは、全体的生存（ $p = 2.6 \times 10^{-9}$ ）および無転移生存（ $p = 2.1 \times 10^{-6}$ ）において有意な差を示すことが見出された（図5B）。階層クラスタリングを使用して分類を実施した場合にも、類似の分離を得た。（未公開のデータ）。

【0171】

早期段階の乳癌においてロバストな予後を示す可能性、および複数の非メラノーマ癌型における進行相関性発現の広いパターンから、これら25個の転移決定因子は、系列特異的ではなく、多種多様な腫瘍型において作動する中心的なプロセスを引き起こす可能性が高いことが示されているが、これらの大部分は文献中では、浸潤または転移に関係があると見なされたことがない。それに代わって、多くは、遺伝子－オントロジー上で、紡錘体チェックポイント制御または染色体凝縮における公知の役割を有する細胞サイクルまたは増殖の遺伝子としてアノテートされている。例えば、いくつかの決定因子（例えば、BRRN1、KNTC2、SPAG5、UBE2C、CENPMおよびMCM7）は、DNA有糸分裂の進行、紡錘体およびDNA複製のプロセスを調節することが公知である。他方、BRRN1、KNTC2およびUBE2Cは、転移しない原発性乳房腫瘍^{2,5}と比べて、転移した原発性腫瘍と関連性がある転移性乳癌徴候において強化された20個の遺伝子による機能性モジュール（20-genes functional module）中に含まれる。同様に、MCM7は、前立腺癌を含めた、複数の浸潤性癌について芳しくない予後を示すマーカーとして同定されたことがある^{2,6}。総合すると、これらのタンパク質が、細胞の浸潤および転移の誘導に直接的または間接的に寄与する仕組みは依然として不明であるが、我々は、これらの有糸分裂チェックポイントタンパク質が、細胞の動きのための細胞骨格機構の制御において二重の役割を果たし得ると憶測している。

【0172】

（実施例6）

アノキス耐性を付与する遺伝子の同定

転移は、複雑な多段階プロセスである（Gupta, G. P. およびMassague, J. (2006年) Cancer metastasis: building a framework, Cell 127巻、679～69頁）。完全な転移が生じ

るためには、腫瘍細胞は、原発性腫瘍部位において増殖し、循環系またはリンパ系内に浸入し、循環する間生存し、浸出し、二次腫瘍を形成することができなければならない。これを達成するために、循環する腫瘍細胞は、アノイキスまたはマトリックス付着の喪失により誘導されるアポトーシスを克服することができなければならない (Simpson, C. D.、Anyiwe, K. および Schimmer, A. D. (2008 年) *Anoikis resistance and tumor metastasis*、*Cancer Lett* 272 巻、177～185 頁)。アノイキス耐性をアノイキス感受性細胞に付与する遺伝子を同定するために、我々は、アノイキス感受性についてのインビトロにおけるスクリーニングを最適化した (図 6 A)。我々は、細胞表面付着を阻止するヒドロゲル層でコートしたプレート上に播種した細胞 (超低クラスター) が、インビボにおいて循環している細胞懸濁液を、インビトロにおいて部分的に再現するであろうと仮定した。

10

【0173】

パイロット研究において、我々は、メラノーマ細胞系のコホートをスクリーニングし、メラノーマ段階 (例えば、局在化、浸潤性) に関わらず、全てがアノイキス耐性であることを見出した。それに代わって、我々および他者は、ラット腸上皮 (RIE) 細胞は、接着性が喪失すると生存を低下させることを見出した (図 6 B) (Douma, S.、Van Laar, T.、Zevenhoven, J.、Meuwissen, R.、Van Garderen, E. および Peeper, D. S. (2004 年) *Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB*、*Nature* 430 巻、1034～1039 頁)。RIE 細胞は不死化しているが、形質転換されていない細胞系である。アノイキスを被る細胞は、アポトーシス経路を開始し、一方、付着が喪失しても生存可能である細胞は、アノイキス耐性を示す。したがって、我々は、細胞代謝の指標である ATP 生成を、細胞生存率の定量化可能な感度のよい尺度として測定した。

20

【0174】

Gateway 組換えシステムを使用して、種間癌ゲノミクス解析によって同定した候補 ORF のうちの 199 個を、レトロウイルスベクター MSCV/V5 中にクローニングした。ウェスタンブロットによる解析によれば、mTrkB、および無作為抽出した異なる cDNA サイズのクローンが RIE 中で発現し、したがって、我々の発現システムの機能性が実証された (図 6 C、未公開のデータ)。

30

【0175】

アノイキス耐性をスクリーニングするために、293T 細胞を、6 ウェルプレート上に蒔き、1 つの ORF を含有する MSCV/V5 およびパッケージングベクター pCL-Eco によりコトランスフェクトした (図 6 A)。細胞に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクトし、ウイルスを複数の時点で収集した。RIE 細胞を 6 つのウェル上に蒔き、プレーティングの 24 時間後に、これらの細胞に、48 時間目および 72 時間目のウイルス上清を連続的に感染させた。RIE を、最後の感染の 24 時間後に収集し、単一細胞懸濁液 (single-cell suspension) を生成して、96 ウェルの ULC プレート上に、7000 細胞/ウェルを三つ組で蒔いた (0 時間)。ベースライン細胞数を決定するために、細胞を、0 時間において溶解し、ATP レベルを測定した (Cell Titer Glo、Promega)。ULC プレーティングの 24 時間後に、細胞を、Cell Titer Glo を用いて溶解し、溶解液を、読取りのために、96 ウェルの、不透明なウェルを有するルミノメーター用プレートに移した。我々の解析では、ATP レベルを 24 時間目に 0 時間目と比較し、したがって、ATP レベルの変化の倍数を求めた (図 7)。

40

【0176】

神経栄養因子受容体 TrkB は、インビトロにおいては、アノイキス耐性をアノイキス感受性細胞に付与し、インビボにおいては、腫瘍形成および肺における播種を促すことが

50

示されたことがある(3)。マウスTrkB(mTrkB)およびTrkBに対するヒトリリガンドであるBDNFが、ベクター単独よりも大きなアノキス耐性をRIEに付与したことから、我々は、我々のスクリーニングについて自信を高めるに至った(図7)。同一の二つ組のスクリーニングにおいて、遺伝子のうちの平均21%が、全ての候補遺伝子の中央値から1標準偏差超を示した。20個の遺伝子は、スクリーニングのうちの少なくとも一方において、中央値から2標準偏差超を示した(図8)。これらの遺伝子のうちの9個は、両方のスクリーニングにおいて、中央値から1標準偏差超を示し、一方、これら9個のうちの7個の遺伝子は、スクリーニングのうちの少なくとも一方において、中央値から2標準偏差超を示した(HNRPR、CDC20、PRIM2A、HRSP12、ENY2、MGC14141、RECQL)。興味深いことに、これら9個の遺伝子のうち、STK3、PRIM2A、CDC20、RECQL、HNRPR、ENY2およびMGC14141は、メラノーマサンプル中で、正常対メラノーマ、または原発性対転移のいずれかにおいて、より高い発現を示したことがある(Oncomine、GEO)。さらに、9個の遺伝子全てが、乳房、肺または脳のいずれかの腫瘍において発現増加を示したこともあり、このことから、我々の優先順位リストがその他の癌型において妥当性を有することが実証されている(Oncomine)。

10

【0177】

我々の9個の候補遺伝子を発現する細胞の生存率の増加を、非接着性状態において確認するために、我々は、付着喪失期間後の付着能力の保持を調べた。目的の遺伝子を発現するRIEをULCプレートに移し、24時間後に、懸濁液中の全ての細胞を接着プレートに移した。接着性細胞を、クリスタルバイオレットを用いて染色し、生存細胞を定量化した。図9に示すように、RIE細胞は、懸濁液中に24時間置くと、接着プレートに付着する能力を低下させた。しかし、9個の遺伝子は全て、細胞を懸濁液中に置いた後、RIEの、再付着し、生存し続ける能力を増加させた(図9)。そのような能力は、二次部位においてコロニー形成するように運命付けられた循環腫瘍細胞に必要な特徴であろう。

20

【0178】

(実施例7)

転移DETERMINANTは発癌性である

転移決定因子は、形質転換プロセスの早期に獲得され、原発性腫瘍中に先在することから、これらの転移遺伝子もまた、増殖性の利点を原発性腫瘍にもたらす本物の癌遺伝子であり得るであろうと想定されたことがある^{2; 22}。これに対処するために、我々は、これらの転移決定因子が、明らかな腫瘍形成能をTERT不死化メラニン形成細胞であるHME1468に付与することができるかどうかを調べた。HOXA1に加えてまた、我々は、3個のその他の決定因子、すなわち、ANLN、BRRN1およびKNTC2も選択して、試験を行った。これは、それらが、メラノーマにおける無転移生存と負に相関する254個の遺伝子による徴候(245-gene signature)上に含まれるからである²³。実際に、HOXA1形質導入HME1468は、大型の腫瘍(2cm)を発生させ、局所的な浸潤の組織病理学的証拠を示し(図10A)、浸透率は12週間後には33%(6つの皮下移植部位中、n=2)であり、一方、ベクター形質導入対照は、注入の21週間後まで、いずれの腫瘍も発生させなかった(図10B)。同様に、ANLN、BRRN1およびKNTC2を形質導入した細胞も、ベクター対照と比べて、腫瘍形成能の増強を示した(図3B)。総合して、我々は、転移決定因子は実際にそれら自体が本物の癌遺伝子であり、またこれらは浸潤性の挙動を引き起こすこともできると結論付けた。

30

40

【0179】

(実施例8)

インビトロおよびインビボにおけるHOXA1およびFSCN1についての検証データ次に、転移決定因子を同定する手段としてのこの統合的アプローチをさらに検証するために、我々は、ホメオボックス転写因子であるHOXA1の綿密な検証を実施した。HOXA1の上方制御が、乳房、NSCLCおよびメラノーマを含めた、複数の癌において報

50

告されている¹⁷；¹⁸；¹⁹が、浸潤および転移における役割が示唆されたことはない。過剰発現研究において、H O X A 1は強制されると、接着斑キナーゼであるF A Kのリン酸化の増加を劇的に惹起した（図11A）。F A Kは、増殖因子およびインテグリンによって刺激される細胞の運動性および浸潤の調節における主要なシグナル伝達分子である²⁰。したがって、H O X A 1過剰発現H M E L 4 6 8は、インビトロにおいては、10倍の浸潤増加を示し、インビボにおいては、肺における播種能力を獲得した（図11A、D）。重要なことに、この浸潤促進活性は、H M E L 4 6 8メラニン形成細胞系に特異的ではなかった。これは、H O X A 1が、W M 1 1 5ヒトメラノーマ細胞およびW M 3 2 1 1ヒトメラノーマ細胞の浸潤も同様に増強することができたことによる（図11B～C）。実際にまた、表3に要約するように、W M 1 1 5メラノーマ細胞およびW M 3 2 1 1メラノーマ細胞中で浸潤アッセイを行った決定因子のうちの多くも、H M E L 4 6 8メラニン形成細胞を上回る浸潤促進活性を示した。H O X A 1の発癌および転移の可能性を、弱い発癌性を示すメラノーマ細胞系W M 1 1 5を使用して試験した追加の検証アッセイから、ヌードマウスにおいては、H O X A 1の過剰発現が、異種移植された細胞の腫瘍増殖を著しく増強することが示されており（図11E）、これは、その他のヒトおよびマウスの細胞系を使用したデータと一致する。また、H O X A 1の過剰発現によって、ヌードマウスの側腹部内に皮内移植した場合のW M 1 1 5細胞の腫瘍増殖の増加も生じ、生じた原発性腫瘍は、腫瘍の発生に続いて容易に肺に転移し（図11F）、一方、対照（空のベクター細胞）は、原発性腫瘍を形成しない。

【0180】

ヒト細胞系におけるこれらの研究に加えて、また、我々は、H O X A 1およびF a s c i n 1（F S C N 1）の、マウス細胞系を使用する試験も行った。ヒト細胞系を使用した浸潤の結果（図11A～C）と同様、両方の候補の発現によって、H R A S *を形質導入したI n k 4 a / A r f^{-/-}マウス由来メラニン形成細胞（M 3 H R A S細胞として知られている。Kim, M.、Gans, J. D.、Nogueira, C.、Wang, A.、Paik, J. H.、Feng, B.、Brennan, C.、Hahn, W. C.、Cordon-Cardo, C.、Wagner, S. N.ら（2006年）、Comparative oncogenomics identifies N E D D 9 as a melanoma metastasis gene、Cell 125巻、1269～1281頁）のマトリックス浸潤能力が著しく増加した（図12A）。さらに、H O X A 1およびF a s c i n 1の両方の過剰発現によって、ヌードマウスの側腹部上に異種移植した場合、M 3 H R A S細胞の増殖する能力（図12B）、および尾静脈への静脈内注射に続いて、眼に見える肺小結節を形成する能力（図12C）も顕著に増強された。尾静脈への静脈内注射は、転移についての代理アッセイである。

【0181】

（実施例9）

H O X A 1は、T G F βシグナル伝達の調節を介して浸潤を促す癌遺伝子である

次に、H O X A 1の浸潤活性の分子基盤を探索するために、我々は、対照およびH O X A 1を形質導入したH M E L 4 6 8細胞、W M 1 1 5細胞およびW M 3 2 1 1細胞の発現プロファイリングに基づいて、H O X A 1トランスクリプトームを決定した（図11B）。示差的に発現した遺伝子リストの知識ベース経路解析によって、多重ノードとしてのS M A D 3上に中心を置く、T G F βシグナル伝達遺伝子のネットワークが明らかになった（図13Aおよび表6）。したがって、我々は、T G F βシグナル伝達の転移における公知の役割を考慮して、T G F βシグナル伝達がH O X A 1によって調節されるかどうかを評価した。我々は、T G F β応答性レポーター構築物（p 3 T P - L u x）を使用して、H O X A 1の異所発現が、基礎レポーター活性を増強する（11.0倍、p = 0.003）ことのみならず、また、T G F βリガンドに応答して、対照と比較して9.3倍の増加ももたらす（p = 0.0001；図14A）ことを見出した。それに対応して、10%および1%の両方の血清培養条件下では、活性化p - S M A D 3および全S M A D 3が、T

G F β 刺激によって上昇し（図 1 4 B）、このことは、R N A 発現解析により裏付けられた（図 1 3 B）。さらに、H O X A 1 媒介型浸潤は、S M A D 3 のノックダウンにより抑止され（図 1 4 C）、したがって、H O X A 1 の浸潤促進活性は、T G F β - S M A D のシグナル伝達に機能的につながっていた。T G F β - S M A D のシグナル伝達は、癌の転移を司る中心経路である^{2 1}。

【0182】

腫瘍において、H O X A 1 の過剰発現が S M A D 3 リン酸化の状況に影響を与えるかどうかを調べるために、我々は、空のベクターまたは H O X A 1 を発現する W M 1 1 5 メラノーマ細胞に由来する異種移植腫瘍検体を活用して（図 1 1 E）、S M A D 3 に対するリン酸特異的抗体を使用して免疫組織化学解析を行った。H O X A 1 の過剰発現により S M A D 3 のリン酸化の増加が生じた我々の観察（図 1 4 B）と同様、我々は、H O X A 1 過剰発現腫瘍においても、S M A D 3 のリン酸化の増加を見出した（図 1 4 D）。

【0183】

（実施例）

C X C R 4

H O X A 1 の生物学的機能に関する洞察を得るために、我々は、空のベクターおよび H O X A 1 を過剰発現する W M 1 1 5 メラノーマ細胞および H M E L 4 6 8 メラニン形成細胞から c D N A を調製して R T² P r o f i l e r P C R A r r a y（S u p p e r a r r a y）上で使用し、転移と関連性がある遺伝子のパネルの発現を解析した。これら 2 つの細胞系間で共有される、最も多く過剰発現した遺伝子は、ケモカイン受容体 C X C R 4 であった（図 1 5）。これは、ケモカインであるストロマ由来因子-1（S D F - 1）に対して特異的な受容体である。多くの型の癌において、腫瘍細胞による C X C R 4 の発現と、芳しくない予後とが相関付けられたことがあり、こうした発現は、細胞転移において、S D F - 1 を発現する臓器に対する走化性勾配の確立を通して決定的な役割を果たす（F u l t o n A M、C u r r O n c o l R e p. 2 0 0 9 年 3 月；11 巻（2 号）：1 2 5 ~ 3 1 頁）。H O X A 1 と C X C R 4 との間の関係をさらに調べるために、我々は、空のベクターおよび H O X A 1 を過剰発現する異種移植腫瘍における C X C R 4 の発現を、免疫組織化学を使用して評価した。R T² P r o f i l e r 解析と同様、我々は、W M 1 1 5 - H O X A 1 異種移植腫瘍および H M E L 4 6 8 - H O X A 1 異種移植腫瘍の両方においても、C X C R 4 の発現が著しく増加することを見出した（図 1 6）。これらのデータは、H O X A 1 により C X C R 4 の発現の増加が生じ、それに続いて、C X C R 4 が、H O X A 1 の過剰発現によって開始された転移シグナル伝達プログラムに影響を与えるモデルと一致する。

【0184】

要約すると、統合的機能ゲノミクスのアプローチによって、浸潤を能動的に引き起こすものでもあり、かつ本物の癌遺伝子でもある転移決定因子の同定を可能にするに至った。メラノーマの状況において発見されたこれらの転移決定因子は、早期乳房腺癌において予後を示すことが分かり、多種多様な非メラノーマ腫瘍型において進行相関発現を示した。これらの知見から、転移決定因子は、いくつかの早期段階の原発性腫瘍中に存在し、これらの腫瘍を攻撃的に振舞うようにプログラムすることができ、したがって、芳しくない臨床治療成果をもたらすという実験的証拠が得られている。これらの決定因子のほとんどが、癌または転移に関連付けられたことがないことから、これらは、機能ベースの予後を示す生物マーカーおよび新しい治療的侵略の道のための基礎を提供することができる。

【0185】

【表 3 - 1】

表3

遺伝子記号	遺伝子ID	浸潤スクリーニング* HMLE468	浸潤アッセイ		Oncomine 相関性				
			WM115	WM3211	メラノーマ	脳	乳房	前立腺	肺
ACP5	54	6.5X	2.1X	増加なし				+	
ANLN	54443	2.6X	--	2.6X			+		
ASF1B	55723	4.7X	2.0X	2.3X	+	+	+	+	
BRRN1	23397	3.5X	2.1X	4.0X	+		+	+	
BUB1	699	3.1X	-	-	+		+		
CDC2	983	1.6X	-	-	+	+	+	+	+
CENPM	79019	6.9X	-	-			+	+	
DEPDC1	55635	2.3X	-	-		+	+		
ELTD1	64123	2.1X	5.0X	増加なし		+			
EXT1	2131	1.5X	--	--		+	+		
FSCN1	6624	2.4X	2.2X	1.8X				+	+
HCAP-G	64151	1.5X	-	-	+	+	+		
HMGB1	3146	3.4X	--	--	+			+	+
HMGB2	3148	1.5X	--	--		+	+	+	
HOXA1	3198	7.8X	6.1X	5.1X		+			

【 0 1 8 6 】

10

20

30

【表 3 - 2】

HSF1	3297	2.8X	4.4X	--	+		+	+	
ITGB3BP	23421	4.2X	--	--		+			
KIF20A	10112	1.5X	-	-	+	+	+		
KIF2C	11004	1.6X	-	-	+	+	+		
KNTC2	10403	2.4X	2.2X	3.5X		+	+		
MCM7	4176	9.4X	--	--	+	+	+		
MTHFD2	10797	2.4X	2.5X	--			+	+	+
NASP	4678	3.7X	--	--		+	+		
PLVAP	83483	1.5X	--	--			+	+	+
PTP4A3	11156	1.9X	-	-	+	+	+		
RNF2	6045	2.9X	3.4X	5.7X					+
SPAG5	10615	3.7X	2.5X	3.1X	+		+		
TGM2	7052	1.7X	--	--	+				+
UBE2C	11065	3.9X	--	--	+	+	+	+	+
UCHL5	51377	4.1X	増加なし	1.9X			+	+	
VSIG4	11326	4.8X	2.1X	1.5X		+			

【 0 1 8 7 】

10

20

30

【表 4 - 1】

表4. 360個の見込みがある転移決定因子を含む統合データセットの概要。			
65個の過小発現/欠失の候補		295個の過剰発現/増幅の候補	
遺伝子ID	遺伝子記号	遺伝子ID	遺伝子記号
79026	AHNAK	79575	ABHD8
360	AQP3	1636	ACE
622	BDH1	54	ACP5
219738	C10ORF35	8038	ADAM12
726	CAPN5	101	ADAM8
999	CDH1	23600	AMACR
51673	CGI-38	54443	ANLN
1159	CKMT1B	80833	APOL3
85445	CNTNAP4	410	ARSA
1303	COL12A1	22901	ARSG
9244	CRLF1	55723	ASF1B
1410	CRYAB	259266	ASPM
1428	CRYM	477	ATP1A2
113878	DTX2	6790	AURKA
10278	EFS	9212	AURKB
79993	ELOVL7	26053	AUTS2
2041	EPHA1	627	BDNF
2045	EPHA7	636	BIK
2051	EPHB6	332	BIRC5
10205	EVA1	672	BRCA1
2125	EVPL	23397	BRRN1
2159	F10	699	BUB1
375061	FAM89A	701	BUB1B
8857	FCGBP	80135	BXDC5
2261	FGFR3	29902	C12ORF24
56776	FMN2	55839	C16ORF60
2770	GNAI1	56942	C16ORF61
7107	GPR137B	116496	C1ORF24
64388	GREM2	719	C3AR1
3098	HK1	57002	C7ORF36
688	KLF5	84933	C8ORF76
5655	KLK10	152007	C9ORF19
11202	KLK8	781	CACNA2D1
10748	KLRA1	857	CAV1
10219	KLRG1	6357	CCL13
4135	MAP6	6347	CCL2
5603	MAPK13	6354	CCL7
4312	MMP1	890	CCNA2
4486	MST1R	947	CD34
4692	NDN	948	CD36
5092	PCBD1	983	CDC2

【 0 1 8 8 】

【表 4 - 2】

10158	PDZK1IP1	991	CDC20
5317	PKP1	995	CDC25C
26499	PLEK2	990	CDC6
58473	PLEKHB1	8317	CDC7
5366	PMAIP1	83540	CDCA1
79983	POF1B	83461	CDCA3
5453	POU3F1	55536	CDCA7L
5579	PRKCB1	81620	CDT1
5745	PTHR1	1058	CENPA
5792	PTPRF	1062	CENPE
57111	RAB25	1063	CENPF
6095	RORA	79019	CENPM
6337	SCNN1A	55165	CEP55
6382	SDC1	23177	CEP68
5268	SERPINB5	1070	CETN3
11254	SLC6A14	1111	CHEK1
6578	SLCO2A1	26586	CKAP2
6586	SLIT3	1163	CKS1B
10653	SPINT2	1164	CKS2
6768	ST14	1180	CLCN1
7070	THY1	7122	CLDN5
23650	TRIM29	23601	CLEC5A
23555	TSPAN15	9918	CNAP1
11197	WIF1	10664	CTCF
		1565	CYP2D6
		1601	DAB2
		10926	DBF4
		23564	DDAH2
		55635	DEPDC1
		1719	DHFR
		55355	DKFZP762E1312
		27122	DKK3
		9787	DLG7
		1769	DNAH8
		30836	DNTTIP2
		51514	DTL
		1854	DUT
		1894	ECT2
		51162	EGFL7
		64123	ELTD1
		56943	ENY2
		54749	EPDR1
		51327	ERAF
		2115	ETV1
		2131	EXT1
		2162	F13A1
		51647	FAM96B
		2230	FDX1

【 0 1 8 9 】

【表 4 - 3】

	2235	FECH
	63979	FIGNL1
	51303	FKBP11
	2289	FKBP5
	55110	FLJ10292
	79805	FLJ12505
	84935	FLJ14834
	54908	FLJ20364
	54962	FLJ20516
	2350	FOLR2
	2305	FOXMI
	6624	FSCN1
	2530	FUT8
	51809	GALNT7
	64096	GFRA4
	2740	GLP1R
	51053	GMNN
	2775	GNAO1
	2792	GNGT1
	4076	GPIAP1
	2894	GRID1
	2936	GSR
	2966	GTF2H2
	51512	GTSE1
	3045	HBD
	64151	HCAP-G
	50810	HDGFRP3
	3082	HGF
	3012	HIST1H2AB
	3142	HLX1
	3146	HMGB1
	3148	HMGB2
	3161	HMMR
	10236	HNRPR
	3198	HOXA1
	10247	HRSP12
	3297	HSF1
	3313	HSPA9B
	51501	HSPC138
	10808	HSPH1
	25998	IBTK
	3384	ICAM2
	80173	IFT74
	3570	IL6R
	3684	ITGAM
	23421	ITGB3BP
	6453	ITSN1
	10008	KCNE3

10

20

30

【 0 1 9 0 】

【表 4 - 4】

	3776	KCNK2
	9768	KIAA0101
	9694	KIAA0103
	56243	KIAA1217
	84629	KIAA1856
	3832	KIF11
	81930	KIF18A
	10112	KIF20A
	11004	KIF2C
	3833	KIFC1
	55220	KLHDC8A
	10403	KNTC2
	3912	LAMB1
	3915	LAMC1
	55915	LANCL2
	11025	LILRB3
	4005	LMO2
	150084	LOC150084
	345711	LOC345711
	91614	LOC91614
	26018	LRIG1
	54892	LUZP5
	4085	MAD2L1
	6300	MAPK12
	4147	MATN2
	4172	MCM3
	4174	MCM5
	4175	MCM6
	4176	MCM7
	9833	MELK
	4232	MEST
	4233	MET
	85014	MGC14141
	79971	MIER1
	4288	MKI67
	8028	MLLT10
	4317	MMP8
	4318	MMP9
	4353	MPO
	51678	MPP6
	219928	MRGPRF
	64968	MRPS6
	10335	MRVI1
	10232	MSLN
	10797	MTHFD2
	4600	MX2
	4678	NASP
	4751	NEK2

10

20

30

【 0 1 9 1】

40

【表 4 - 5】

		23530	NNT
		4846	NOS3
		4855	NOTCH4
		84955	NUDCD1
		11163	NUDT4
		53371	NUP54
		4928	NUP98
		51203	NUSAP1
		4999	ORC2L
		116039	OSR2
		5019	OXCT1
		56288	PARD3
		55872	PBK
		11333	PDAP1
		5138	PDE2A
		5156	PDGFRA
		5175	PECAM1
		5218	PFTK1
		25776	PGEA1
		26227	PHGDH
		83483	PLVAP
		57125	PLXDC1
		5425	POLD2
		5427	POLE2
		5446	PON3
		5557	PRIM1
		5558	PRIM2A
		5578	PRKCA
		23627	PRND
		9265	PSCD3
		5743	PTGS2
		11156	PTP4A3
		5885	RAD21
		5888	RAD51
		5889	RAD51C
		3516	RBPSUH
		5965	RECQL
		5984	RFC4
		5985	RFC5
		23179	RGL1
		64407	RGS18
		5997	RGS2
		8490	RGS5
		6045	RNF2
		9584	RNPC2
		6091	ROBO1
		6118	RPA2
		6119	RPA3

10

20

30

【 0 1 9 2 】

40

【表 4 - 6】

	6222	RPS18
	6236	RRAD
	22800	RRAS2
	6240	RRM1
	6241	RRM2
	340419	RSPO2
	10371	SEMA3A
	143686	SESN3
	85358	SHANK3
	79801	SHCBP1
	8036	SHOC2
	23517	SKIV2L2
	7884	SLBP
	6509	SLC1A4
	115286	SLC25A26
	6526	SLC5A3
	8467	SMARCA5
	8243	SMC1L1
	10592	SMC2L1
	10051	SMC4L1
	6629	SNRPB2
	64321	SOX17
	6662	SOX9
	10615	SPAG5
	57405	SPBC25
	60559	SPCS3
	6741	SSB
	6742	SSBP1
	26872	STEAP1
	6788	STK3
	10460	TACC3
	23435	TARDBP
	25771	TBC1D22A
	6899	TBX1
	7052	TGM2
	90390	THRAP6
	8914	TIMELESS
	7077	TIMP2
	7083	TK1
	55273	TMEM100
	55161	TMEM33
	55706	TMEM48
	54543	TOMM7
	7153	TOP2A
	22974	TPX2
	54209	TREM2
	4591	TRIM37
	9319	TRIP13

10

20

30

【 0 1 9 3 】

40

【表 4 - 7】

	95681	TSGA14
	11065	UBE2C
	51377	UCHL5
	7371	UCK2
	83878	USHBP1
	11326	VSIG4
	10894	XLKD1
	51776	ZAK
	221527	ZBTB12
	346171	ZFP57
	23414	ZFPM2
	79830	ZMYM1
	7705	ZNF146
	84858	ZNF503

【 0 1 9 4 】

【表 5 - 1】

表5. 浸潤促進性遺伝子についての低複雑度遺伝子スクリーニングにおいて、スクリーニングした候補cDNA、および同定した一次ヒット。

199個のスクリーニングした候補		46個の一次スクリーニングの ヒット(2回のスクリーニングに おいて、2 × SD)
遺伝子ID	遺伝子記号	遺伝子記号
54	ACP5	ACP5
54443	ANLN	ANLN
410	ARSA	ARSA
55723	ASF1B	ASF1B
9212	AURKB	AURKB
23397	BRRN1	BRRN1
80135	BXDC5	BXDC5
947	CD34	CD34
55536	CDCA7L	CDCA7L
79019	CENPM	CENPM
55635	DEPDC1	DEPDC1
51514	DTL	DTL
64123	ELTD1	ELTD1
2131	EXT1	EXT1
63979	FIGNL1	FIGNL1
55220	KLHDC8A	FLJ10748
6624	FSCN1	FSCN1
2775	GNAO1	GNAO1
2792	GNGT1	GNGT1
2894	GRID1	GRID1
50810	HDGFRP3	HDGFRP3
3146	HMGB1	HMGB1
3148	HMGB2	HMGB2
3198	HOXA1	HOXA1
3297	HSF1	HSF1
10808	HSPH1	HSPH1

【 0 1 9 5 】

【表 5 - 2】

23421	ITGB3BP	ITGB3BP
10403	KNTC2	KNTC2
4174	MCM5	MCM5
4176	MCM7	MCM7
10797	MTHFD2	MTHFD2
4855	NOTCH4	NOTCH4
53371	NUP54	NUP54
4999	ORC2L	ORC2L
83483	PLVAP	PLVAP
9265	PSCD3	PSCD3
6045	RNF2	RNF2
10615	SPAG5	SPAG5
26872	STEAP1	STEAP1
7052	TGM2	TGM2
54543	TOMM7	TOMM7
22974	TPX2	TPX2
11065	UBE2C	UBE2C
51377	UCHL5	UCHL5
11326	VSIG4	VSIG4
23600	AMACR	
10926	DBF4	
259266	ASPM	
477	ATP1A2	
627	BDNF	
638	BIK	
332	BIRC5	
55839	C16ORF60	
672	BRCA1	
699	BUB1	
701	BUB1B	
55165	CEP55	
79971	MIER1	
116496	C10RF24	
719	C3AR1	
57002	C7ORF36	
84933	C8ORF76	
152007	C9ORF19	
857	CAV1	
6357	CCL13	
6347	CCL2	
948	CD36	
983	CDC2	
991	CDC20	
995	CDC25C	
83540	CDCA1	
83461	CDCA3	
1058	CENPA	
1070	CETN3	

10

20

30

【 0 1 9 6 】

40

【表 5 - 3】

26586	CKAP2	
1163	CKS1B	
1164	CKS2	
9918	CNAP1	
10664	CTCF	
1601	DAB2	
56942	C16ORF61	
23564	DDAH2	
1719	DHFR	
55355	DKFZP762E1312	
27122	DKK3	
9787	DLG7	
30836	DNTTIP2	
1854	DUT	
51162	EGFL7	
56943	ENY2	
54749	EPDR1	
2162	F13A1	
51303	FKBP11	
55110	FLJ10292	
55273	TMEM100	
79805	FLJ12505	
84935	FLJ14834	
54962	FLJ20516	
2305	FOXN1	
51809	GALNT7	
51053	GMNN	
2936	GSR	
2966	GTF2H2	
51512	GTSE1	
3045	HBD	
64151	HCAP-G	
3082	HGF	
3142	HLX1	
10236	HNRPR	
10247	HRSP12	
3313	HSPA9B	
51501	HSPC138	
29902	C12ORF24	
3384	ICAM2	
10008	KCNE3	
9768	KIAA0101	
9694	KIAA0103	
23177	CEP68	
22901	ARSG	
56243	KIAA1217	
10112	KIF20A	
11004	KIF2C	

10

20

30

【 0 1 9 7 】

40

【表 5 - 4】

3915	LAMC1	
55915	LANCL2	
4005	LMO2	
91614	LOC91614	
4076	GPIAP1	
4085	MAD2L1	
6300	MAPK12	
4172	MCM3	
4175	MCM6	
4232	MEST	
85014	MGC14141	
4318	MMP9	
219928	MRGPRF	
64968	MRPS6	
10232	MSLN	
4600	MX2	
4678	NASP	
4751	NEK2	
23530	NNT	
4846	NOS3	
11163	NUDT4	
51203	NUSAP1	
116039	OSR2	
5019	OXCT1	
56288	PARD3	
55872	PBK	
11333	PDAP1	
5156	PDGFRA	
25776	PGEA1	
57125	PLXDC1	
5425	POLD2	
5446	PON3	
5557	PRIM1	
5558	PRIM2A	
23627	PRND	
5743	PTGS2	
11156	PTP4A3	
5885	RAD21	
5889	RAD51C	
3516	RBPSUH	
5965	RECQL	
5984	RFC4	
5985	RFC5	
64407	RGS18	
5997	RGS2	
8490	RGS5	
6118	RPA2	
6119	RPA3	

10

20

30

【 0 1 9 8 】

40

【表 5 - 5】

6236	RRAD	
22800	RRAS2	
6240	RRM1	
6241	RRM2	
340419	RSPO2	
79801	SHCBP1	
8036	SHOC2	
7884	SLBP	
115286	SLC25A26	
8467	SMARCA5	
6629	SNRPB2	
57405	SPBC25	
60559	SPCS3	
6742	SSBP1	
6788	STK3	
23435	TARDBP	
25771	TBC1D22A	
90390	THRAP6	
8914	TIMELESS	
7077	TIMP2	
7083	TK1	
4591	TRIM37	
9319	TRIP13	
7371	UCK2	
83878	USHBP1	
10894	XLKD1	
51776	ZAK	
79830	ZMYM1	
84858	ZNF503	

10

20

【 0 1 9 9 】

【表 6】

表6. 図13AのSmad3関連生物学的ネットワーク中の遺伝子の完全な説明

遺伝子ID	名前	説明	ファミリー
	Akt		群
	アルカリホスファターゼ		群
250	ALPP	アルカリホスファターゼ、胎盤(Reganアイソザイム)	ホスファターゼ
1052	CEBPD	CCAAT/エンハンサー結合性タンパク質(C/EBP)、デルタ	転写制御因子
1513	CTSK	カテプシンK	ペプチダーゼ
1893	ECM1	細胞外マトリックスタンパク質1	輸送体
2047	EPHB1	EPH受容体B1	キナーゼ
2065	ERBB3	v-erb-b2 赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子3	キナーゼ
	Fgf		群
9518	GDF15	増殖分化因子15	増殖因子
2707	GJB3	ギャップ結合タンパク質、ベータ3、31kDa	輸送体
3039	HBA1	ヘモグロビン、アルファ1	輸送体
3040	HBA2	ヘモグロビン、アルファ2	輸送体
8091	HMGA2	高移動度群AT-フック2 (high mobility group AT-hook 2)	その他
	インテグリン		複合体
3910	LAMA4	ラミニン、アルファ4	酵素
51176	LEF1	リンパ系エンハンサー結合因子1	転写制御因子
4147	MATN2	マトリリン2	その他
4162	MCAM	メラノーマ細胞接着分子	その他
	Mek1/2		群
4286	MITF	小眼球症関連転写因子	転写制御因子
2660	MSTN	ミオスタチン	増殖因子
4751	NEK2	NIMA(never in mitosis gene a)関連キナーゼ2	キナーゼ
56034	PDGFC	血小板由来増殖因子C	増殖因子
8613	PPAP2B	ホスファチジン酸 ホスファターゼ2B型	ホスファターゼ
	Rb		群
860	RUNX2	runt関連転写因子2	転写制御因子
6285	S100B	S100カルシウム結合性タンパク質B	その他
4088	SMAD3	SMADファミリーメンバー3	転写制御因子
6662	SOX9	SRY(性決定領域Y)-ボックス9	転写制御因子
10253	SPRY2	sprouty ホモログ2(ショウジョウバエ)	その他
81848	SPRY4	sprouty ホモログ4(ショウジョウバエ)	その他
6781	STC1	スタニオカルシン1	キナーゼ
80328	ULBP2	UL16結合性タンパク質2	膜貫通受容体
9839	ZEB2	ジンクフィンガーE-ボックス結合ホモオボックス2	転写制御因子

【 0 2 0 0 】

【表 7 - 1】

表7. 公開されている乳癌295症例のK平均クラス割当て^{5,6}

患者ID	全体的な生存		無転移生存		k平均群
	時間	状況	時間	状況	
4	12.9965777	生存	12.99658	転移なし	2
6	11.156742	生存	11.15674	転移なし	2
7	10.1382615	生存	10.13826	転移なし	2
8	8.80219028	生存	8.80219	転移なし	1
9	10.294319	生存	10.29432	転移なし	2
11	5.80424367	生存	5.804244	転移なし	1
12	7.85763176	生存	7.857632	転移なし	1
13	8.1670089	生存	8.167009	転移なし	1
14	8.23271732	生存	8.232717	転移なし	2
17	7.86584531	生存	7.86584	転移なし	2

10

【 0 2 0 1 】

20

【表 7 - 2】

			5		
26	6.9705681	生存	6.970568	転移なし	2
27	5.18548939	生存	5.185489	転移なし	2
28	6.24503765	生存	6.245038	転移なし	2
29	11.3894593	生存	11.38946	転移なし	2
36	10.1081451	生存	10.10815	転移なし	2
38	7.35386721	生存	7.353867	転移なし	2
39	11.0171116	生存	11.01711	転移なし	2
45	4.7315	生存	1.089665	転移あり	1
48	2.1726	死亡	1.026694	転移あり	1
51	9.526	死亡	4.906229	転移あり	2
56	8.4658	死亡	4.695414	転移あり	2
57	5.1508	死亡	2.297057	転移あり	1
58	5.3562	死亡	1.122519	転移あり	1
59	4.9946	生存	4.629706	転移あり	1
60	7.9288	死亡	4.892539	転移あり	2
61	4.1178	生存	2.680356	転移あり	2
62	2.7096	死亡	0.807666	転移あり	1
71	2.6083	死亡	1.982204	転移あり	1
72	5.5041	死亡	3.028063	転移あり	1
73	2.6192	死亡	2.149213	転移あり	2
75	2.2905	死亡	2.209446	転移あり	1
76	3.737	死亡	2.12731	転移あり	2
103	5.77960301	死亡	4.952772	転移あり	1
107	3.45516769	死亡	2.543463	転移あり	1
109	3.225188	生存	3.195072	転移あり	1
110	2.310746	生存	2.168378	転移あり	1
111	3.25256674	死亡	1.270363	転移あり	1

【 0 2 0 2 】

【表 7 - 3】

113	3.24161533	死亡	0.99657 8	転移あり	2
117	5.30321698	生存	5.30321 7	転移なし	2
118	5.23203285	生存	5.23203 3	転移なし	2
120	10.0971937	生存	10.0971 9	転移なし	2
122	14.8172485	生存	14.8172 5	転移なし	2
123	14.2614648	生存	14.2614 6	転移なし	2
124	6.64476386	生存	6.64476 4	転移なし	2
125	7.74811773	生存	7.74811 8	転移なし	2
126	6.4366872	生存	6.31896	転移あり	1
127	5.03764545	生存	4.66256	転移あり	1
128	8.73921971	生存	8.73922	転移なし	1
129	7.56741958	生存	7.56742	転移なし	2
130	7.29637235	生存	7.29637 2	転移なし	1
131	4.66255989	死亡	4.66256	転移なし	1
132	6.71868583	生存	6.71868 6	転移なし	1
133	8.64887064	生存	8.64887 1	転移なし	2
134	7.09377139	死亡	6.99520 9	転移あり	2
135	9.33059548	生存	9.33059 5	転移なし	1
136	3.8220397	死亡	3.43874 1	転移あり	1
137	15.3292266	生存	15.3292 3	転移なし	2
138	3.84941821	死亡	3.47433 3	転移あり	2
139	12.7665982	生存	12.7666	転移なし	1
140	5.55509925	生存	5.55509 9	転移なし	2
141	2.06433949	死亡	1.40178	転移あり	1
142	15.1348392	生存	15.1348 4	転移なし	2
144	14.1273101	生存	14.1273 1	転移なし	1
145	5.48665298	生存	5.48665 3	転移なし	2
146	9.40725531	死亡	3.65503 1	転移あり	2
147	2.70773443	死亡	1.60985 6	転移あり	1
148	18.3408624	生存	18.3408 6	転移なし	2

【 0 2 0 3 】

【表 7 - 4】

149	17.2402464	生存	17.2402 5	転移なし	1
150	1.48665298	死亡	0.96098 6	転移あり	1
151	17.5742642	生存	14.0123 2	転移あり	2
153	3.03627652	死亡	1.17727 6	転移あり	1
154	15.1047228	生存	15.1047 2	転移なし	2
155	1.84804928	死亡	0.93086 9	転移あり	2
156	17.6591376	生存	17.6591 4	転移なし	2
157	7.87405886	生存	7.87405 9	転移なし	2
158	3.90691307	死亡	2.81177 3	転移あり	1
159	5.41546886	死亡	4.44627	転移あり	1
160	16.1478439	生存	16.1478 4	転移なし	2
161	13.4045175	死亡	8.12867 9	転移あり	2
162	15.3127995	生存	15.3128	転移なし	1
163	15.8193019	生存	15.8193	転移なし	1
164	5.66461328	生存	5.66461 3	転移なし	1
165	11.0171116	死亡	10.4421 6	転移あり	1
166	3.62217659	死亡	1.61259 4	転移あり	1
167	15.3237509	生存	15.3237 5	転移なし	2
169	14.8856947	生存	14.8856 9	転移なし	1
170	13.3497604	生存	13.3497 6	転移なし	2
172	1.63449692	死亡	1.38809	転移あり	1
174	13.7494867	生存	13.7494 9	転移なし	1
175	7.67419576	死亡	7.59479 8	転移あり	1
176	12.5722108	生存	12.5722 1	転移なし	2
177	9.71115674	死亡	8.92539 4	転移あり	1
178	13.174538	生存	13.1745 4	転移なし	2
179	12.7638604	生存	12.7638 6	転移なし	1
180	5.28678987	死亡	2.61464 8	転移あり	1
181	11.8001369	生存	11.8001 4	転移なし	1

【 0 2 0 4 】

10

20

30

40

【表 7 - 5】

182	11.3182752	生存	11.3182 8	転移なし	2
183	11.8603696	生存	11.8603 7	転移なし	2
184	4.40520192	死亡	1.21013	転移あり	1
185	7.33470226	死亡	7.33470 2	転移なし	2
186	11.7399042	死亡	11.7399	転移なし	1
187	12.5037645	生存	12.5037 6	転移なし	2
188	11.2635181	生存	11.2635 2	転移なし	2
189	12.073922	生存	12.0739 2	転移なし	1
190	11.9233402	生存	11.9233 4	転移なし	2
191	12.7364819	生存	12.7364 8	転移なし	2
192	6.29705681	死亡	2.69678 3	転移あり	1
193	11.8329911	生存	11.8329 9	転移なし	2
194	13.0677618	生存	12.4654 3	転移あり	2
195	11.5455168	生存	11.5455 2	転移なし	1
196	11.1950719	生存	11.1950 7	転移なし	2
197	11.0472279	生存	11.0472 3	転移なし	2
198	11.1430527	生存	11.1430 5	転移なし	2
199	10.9075975	生存	10.9076	転移なし	1
200	10.7679672	生存	10.7679 7	転移なし	2
201	11.2005476	生存	11.2005 5	転移なし	2
202	4.84599589	死亡	3.37844 5	転移あり	1
203	11.0362765	生存	11.0362 8	転移なし	1
205	10.1382615	生存	10.1382 6	転移なし	1
207	9.65366188	生存	9.65366 2	転移なし	2
208	10.6748802	生存	10.6748 8	転移なし	1
209	11.4414784	生存	6.56536 6	転移あり	2
210	11.2032854	生存	11.2032 9	転移なし	1
212	12.1451061	死亡	12.1451 1	転移なし	1
213	3.24709103	死亡	1.97399	転移あり	1

【 0 2 0 5 】

10

20

30

40

【表 7 - 6】

214	10.45859	生存	7.47707 1	転移あり	2
215	10.3518138	生存	10.3518 1	転移なし	1
217	1.94661191	死亡	1.71663 2	転移あり	1
218	2.94592745	死亡	2.34086 2	転移あり	1
219	9.83162218	生存	9.83162 2	転移なし	2
220	10.3271732	生存	10.3271 7	転移なし	2
221	10.3764545	生存	10.3764 5	転移なし	2
222	3.30732375	死亡	2.25325 1	転移あり	1
224	10.0205339	生存	10.0205 3	転移なし	1
226	8.79123888	生存	8.79123 9	転移なし	1
227	7.21423682	死亡	3.35660 5	転移あり	1
228	1.43463381	死亡	1.22381 9	転移あり	1
229	2.85831622	死亡	1.61807	転移あり	2
230	0.71184121	死亡	0.27104 7	転移あり	1
231	11.156742	生存	3.58110 9	転移あり	2
233	14.1218344	生存	14.1218 3	転移なし	2
235	6.51608487	生存	6.51608 5	転移なし	2
236	2.48323066	生存	2.48323 1	転移なし	1
237	1.31690623	死亡	1.15263 5	転移あり	1
238	2.15195072	死亡	1.84531 1	転移あり	1
239	8.09308693	生存	8.09308 7	転移なし	2
240	6.97330596	生存	4.09582 5	転移あり	1
241	2.13278576	死亡	2.00410 7	転移あり	1
243	9.98220397	生存	9.98220 4	転移なし	2
245	11.5455168	生存	11.5455 2	転移なし	1
246	11.449692	生存	11.4496 9	転移なし	2
247	5.63723477	生存	5.63723 5	転移なし	1
248	4.93360712	生存	4.93360	転移なし	1

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

【表 7 - 7】

			7		
249	5.31690623	生存	5.316906	転移なし	1
250	11.3648186	生存	11.36482	転移なし	2
251	9.40725531	生存	9.407255	転移なし	1
252	9.91649555	生存	9.122519	転移あり	1
254	4.66803559	死亡	4.588638	転移あり	1
256	9.50581793	生存	8.988364	転移あり	2
257	2.58726899	死亡	2.297057	転移あり	2
258	5.35249829	死亡	5.117043	転移あり	1
259	8.96372348	生存	5.516769	転移あり	2
260	8.81314168	生存	8.303901	転移あり	2
261	8.59411362	生存	8.594114	転移なし	2
263	4.5284052	死亡	2.223135	転移あり	1
264	7.25256674	生存	7.252567	転移なし	2
265	6.78986995	生存	6.78987	転移なし	1
266	7.01163587	生存	7.011636	転移なし	1
267	6.92950034	生存	6.9295	転移なし	1
268	7.08829569	生存	7.088296	転移なし	1
269	1.35249829	死亡	0.936328	転移あり	1
270	2.96235455	死亡	2.962355	転移なし	1
271	7.02258727	生存	7.022587	転移なし	2
272	7.25256674	生存	7.252567	転移なし	2
273	6.99794661	生存	6.997947	転移なし	1
274	5.9247091	生存	5.924709	転移なし	2
275	0.05475702	生存	0.054757	転移なし	2
276	1.07323751	死亡	0.648871	転移あり	1
277	5.11430527	生存	5.114305	転移なし	2
278	5.31143053	生存	5.311431	転移なし	2
280	5.29226557	生存	5.29226	転移なし	2

【 0 2 0 7 】

10

20

30

40

【表 7 - 8】

			6		
281	7.34017796	生存	7.34017 8	転移なし	2
282	5.74401095	生存	5.74401 1	転移なし	2
283	5.32511978	生存	5.32512	転移なし	1
284	5.32238193	死亡	3.91512 7	転移あり	1
285	5.77138946	生存	5.77138 9	転移なし	2
286	4.94455852	生存	4.94455 9	転移なし	1
287	6.06707734	生存	6.06707 7	転移なし	2
288	1.86721424	死亡	0.35318 3	転移あり	1
290	4.97193703	生存	4.97193 7	転移なし	2
291	11.652293	生存	11.6522 9	転移なし	1
292	8.36687201	生存	8.36687 2	転移なし	2
293	6.31348392	生存	6.31348 4	転移なし	1
294	6.14373717	生存	6.14373 7	転移なし	1
295	5.55509925	生存	5.55509 9	転移なし	2
296	5.08692676	生存	5.08692 7	転移なし	1
297	9.59616701	生存	9.59616 7	転移なし	2
298	9.45653662	生存	9.45653 7	転移なし	2
300	3.78370979	死亡	2.85284 1	転移あり	1
301	9.33059548	生存	9.33059 5	転移なし	2
302	1.78234086	生存	1.78234 1	転移なし	1
303	9.19370294	生存	9.19370 3	転移なし	2
304	9.67008898	生存	6.71047 2	転移あり	2
305	9.54962355	生存	9.54962 4	転移なし	2
306	10.201232	生存	10.2012 3	転移なし	2
307	2.80629706	死亡	1.96577 7	転移あり	1
308	9.32238193	生存	9.32238 2	転移なし	1
309	9.31416838	生存	8.56125 9	転移あり	2

【 0 2 0 8 】

【表 7 - 9】

310	9.09787817	生存	9.09787 8	転移なし	1
311	4.54757016	死亡	4.21902 8	転移あり	1
312	9.10335387	生存	9.10335 4	転移なし	2
313	9.03216975	生存	6.05612 6	転移あり	2
314	5.05954826	死亡	3.21971 3	転移あり	1
315	8.24093087	生存	8.24093 1	転移なし	2
317	5.60438056	死亡	2.13826 1	転移あり	2
318	2.43394935	生存	2.33538 7	転移あり	2
319	6.49965777	死亡	6.37097 9	転移あり	1
320	9.89459275	生存	9.89459 3	転移なし	1
321	1.78507871	生存	1.50034 2	転移あり	2
322	6.70499658	生存	6.70499 7	転移なし	1
323	8.80219028	生存	8.80219	転移なし	2
324	8.85968515	生存	8.85968 5	転移なし	1
325	8.85420945	生存	8.85420 9	転移なし	2
326	8.29842574	生存	8.29842 6	転移なし	1
327	6.09445585	生存	4.62149 2	転移あり	1
328	5.57700205	生存	5.57700 2	転移なし	2
329	5.80424367	生存	5.80424 4	転移なし	1
330	5.19917865	生存	5.19917 9	転移なし	1
331	2.50787132	死亡	2.15742 6	転移あり	1
332	7.99178645	生存	7.99178 6	転移なし	1
333	8.49555099	生存	8.49555 1	転移なし	1
334	7.69336071	生存	7.69336 1	転移なし	2
335	7.4770705	生存	7.47707 1	転移なし	1
336	7.40862423	生存	7.40862 4	転移なし	2
337	6.81998631	生存	6.81998 6	転移なし	1
338	6.34360027	生存	6.3436	転移なし	1

【 0 2 0 9 】

10

20

30

40

【表 7 - 1 0】

339	16.5913758	生存	16.5913 8	転移なし	1
340	5.85900068	死亡	3.12115	転移あり	1
341	2.36276523	死亡	1.73306	転移あり	1
342	15.3511294	生存	15.3511 3	転移なし	2
343	6.6091718	生存	6.60917 2	転移なし	2
344	6.87474333	生存	6.87474 3	転移なし	1
345	6.99520876	生存	6.99520 9	転移なし	2
346	7.1211499	生存	7.12115	転移なし	2
347	4.72005476	生存	4.72005 5	転移なし	2
348	6.17111567	生存	6.17111 6	転移なし	2
349	6.46406571	生存	6.46406 6	転移なし	1
350	3.28542095	生存	3.28542 1	転移なし	1
351	6.52703628	生存	6.52703 6	転移なし	1
352	5.80971937	生存	5.80971 9	転移なし	2
353	6.55167693	生存	6.55167 7	転移なし	1
354	6.16016427	生存	6.16016 4	転移なし	2
355	6.04517454	生存	6.04517 5	転移なし	2
356	6.21492129	生存	6.21492 1	転移なし	2
357	5.82340862	生存	5.82340 9	転移なし	2
358	6.23956194	生存	6.23956 2	転移なし	2
359	6.01779603	生存	6.01779 6	転移なし	2
360	5.54962355	生存	5.54962 4	転移なし	2
361	5.34702259	生存	5.34702 3	転移なし	2
362	5.25941136	生存	5.25941 1	転移なし	1
363	6.00958248	生存	4.97193 7	転移あり	1
364	18.0807666	生存	18.0807 7	転移なし	1
365	17.486653	生存	17.4866 5	転移なし	2
366	17.1526352	生存	17.1526 4	転移なし	2
367	0.97467488	死亡	0.57221	転移あり	1

【 0 2 1 0 】

10

20

30

40

【表 7 - 1 1】

			1		
368	16.8706366	生存	9.56878 9	転移あり	2
369	6.57084189	死亡	3.25804 2	転移あり	2
370	14.3600274	死亡	9.99863 1	転移あり	2
371	2.40657084	死亡	1.96851 5	転移あり	2
373	7.77275839	生存	7.77275 8	転移なし	2
374	5.75496236	死亡	2.68035 6	転移あり	1
375	17.4209446	生存	17.4209 4	転移なし	1
377	9.53045859	死亡	8.52840 5	転移あり	1
378	13.9192334	生存	13.9192 3	転移なし	1
379	13.8644764	生存	13.8644 8	転移なし	1
380	12.7392197	生存	12.7392 2	転移なし	2
381	12.2600958	生存	12.2601	転移なし	2
383	11.08282	生存	11.0828 2	転移なし	2
385	2.88843258	死亡	1.94661 2	転移あり	1
387	8.21355236	生存	8.21355 2	転移なし	2
388	7.22518823	生存	7.22518 8	転移なし	2
389	4.94729637	死亡	3.41957 6	転移あり	1
390	6.80355921	生存	6.80355 9	転移なし	2
391	6.02053388	生存	6.02053 4	転移なし	2
392	6.17111567	生存	6.17111 6	転移なし	1
393	5.5742642	生存	5.57426 4	転移なし	1
394	5.70841889	生存	5.70841 9	転移なし	2
395	15.0773443	生存	11.2115	転移あり	2
396	10.2313484	生存	10.2313 5	転移なし	1
397	8.77207392	死亡	4.76659 8	転移あり	2
398	8.42436687	生存	8.42436 7	転移なし	1
401	10.0314853	生存	1.52772 1	転移あり	1
402	7.37850787	生存	7.37850	転移なし	1

【 0 2 1 1 】

【表 7 - 1 2】

			8		
403	6.75427789	生存	6.75427 8	転移なし	2
404	7.57015743	生存	7.57015 7	転移なし	2

【 0 2 1 2 】

10

20

30

40

【数 1】

参考文献

1. Gupta, G. P. & Massague, J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-95 (2006).
2. Bernards, R. & Weinberg, R. A. A progression puzzle. *Nature* 418, 823 (2002).
3. Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52 (2000).
4. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 49-54 (2003). 10
5. van 't Veer, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-6 (2002).
6. van de Vijver, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347, 1999-2009 (2002).
7. Chin, K. et al. In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 36, 984-8 (2004).
8. Rudolph, K. L., Millard, M., Bosenberg, M. W. & DePinho, R. A. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 28, 155-9 (2001). 20
9. Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172, 902-8 (1970).
10. Gimotty, P. A. et al. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 23, 8048-56 (2005).
11. Gimotty, P. A. et al. Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas. *J Clin Oncol* 25, 1129-34 (2007). 30

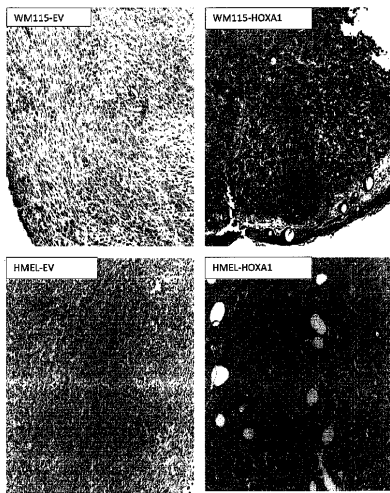
【 0 2 1 3 】

【数 2】

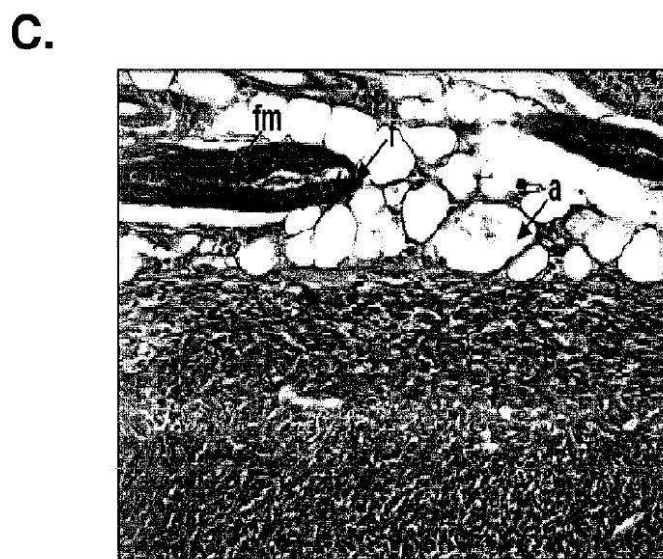
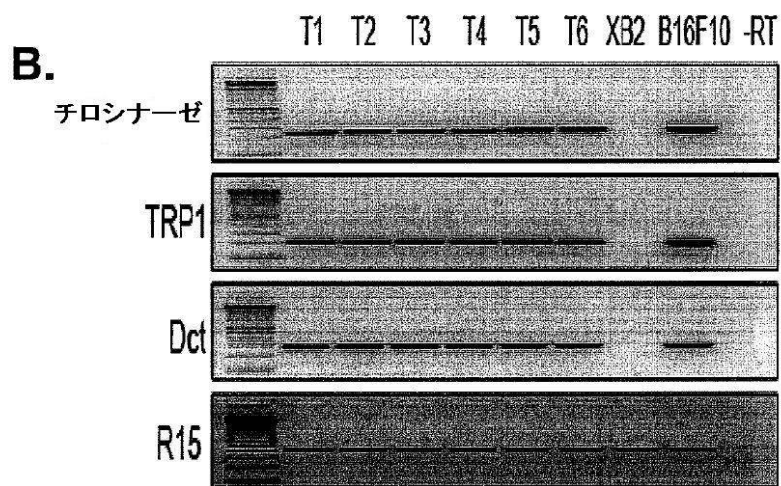
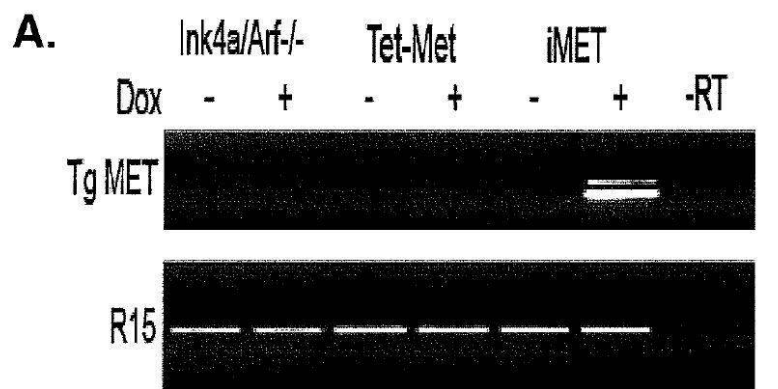
12. Chin, L. et al. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes and Development* 11, 2822-34 (1997).
13. Natali, P. G. et al. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer* 68, 746-50 (1993).
14. Chin, L. et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-72 (1999).
15. Garraway, L. A. et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-22 (2005).
16. Kim, M. et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 125, 1269-81 (2006).
17. Chariot, A. & Castronovo, V. Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 292-7 (1996).
18. Maeda, K. et al. Altered expressions of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* 114, 436-41 (2005).
19. Abe, M. et al. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 15, 797-802 (2006).
20. Schlaepfer, D. D. & Mitra, S. K. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 14, 92-101 (2004).
21. Bierie, B. & Moses, H. L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 506-20 (2006).
22. Weinberg, R. A. Mechanisms of Malignant Progression. *Carcinogenesis* (2008).
23. Winnepenninckx, V. et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 98, 472-82 (2006).
24. Rhodes, D. R. et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6, 1-6 (2004).
25. Rhodes, D. R. & Chinnaiyan, A. M. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nat Genet* 37 Suppl, S31-7 (2005).
26. Ren, B. et al. MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene* 25, 1090-8 (2006).

【図 16】

Fig. 16



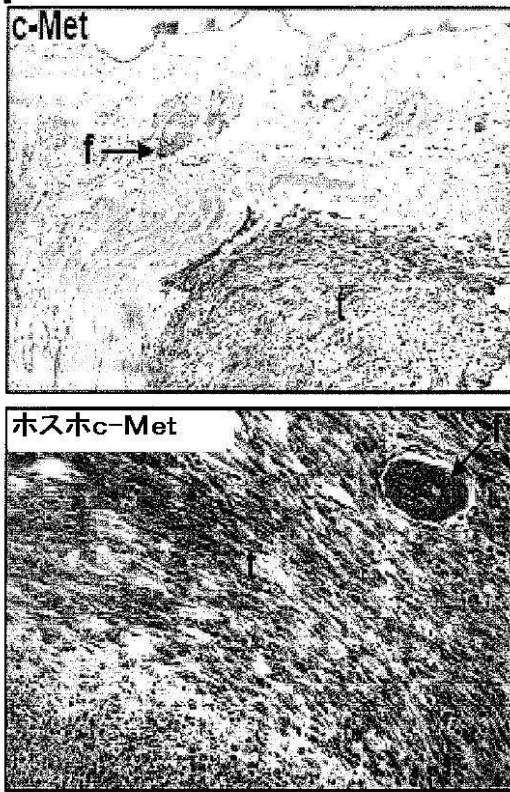
【図 1 - 1】

Fig. 1

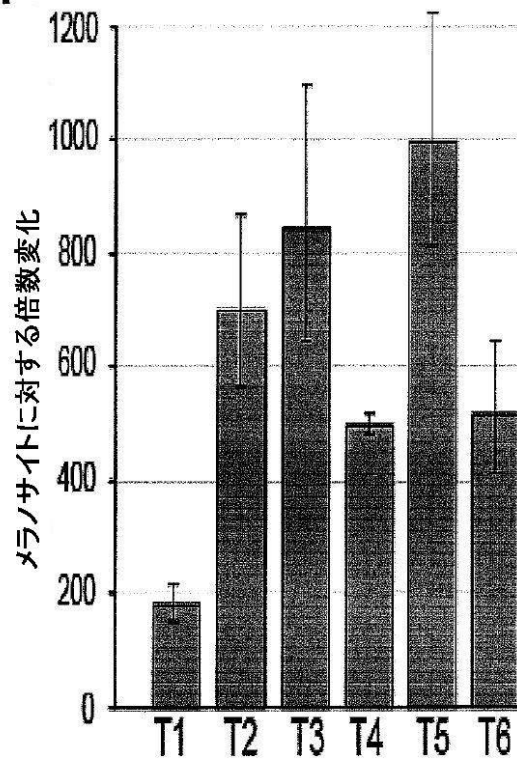
【図 1 - 2】

Fig. 1 続き

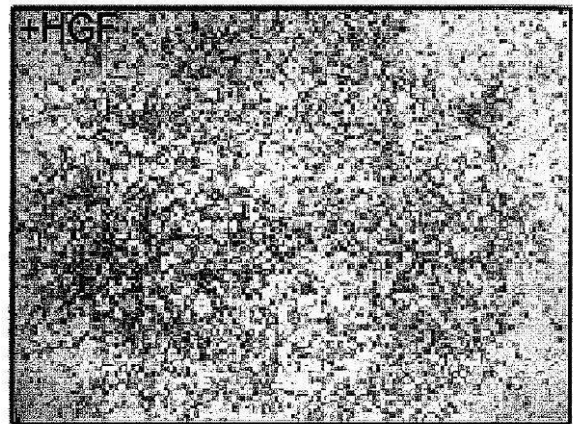
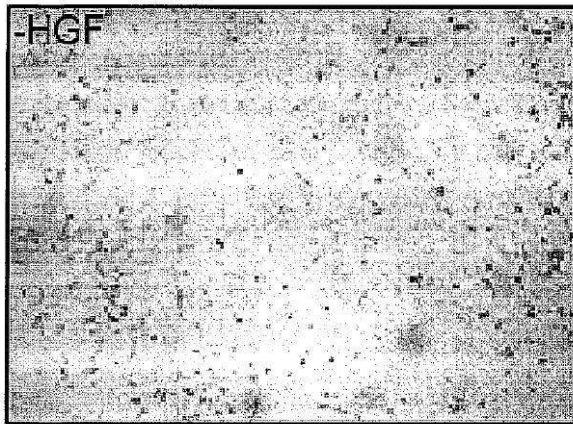
D.



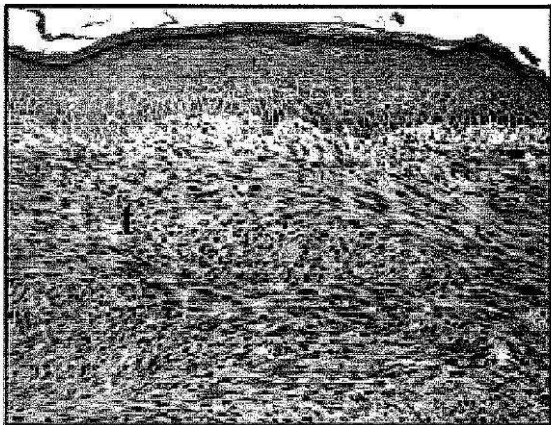
E.



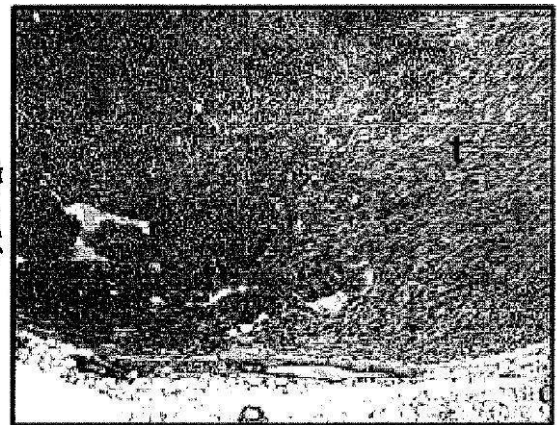
【図 2 - 1】

Fig. 2**A.****B.**

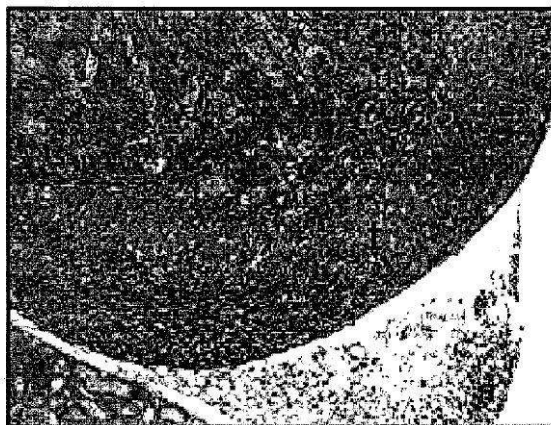
原発性腫瘍



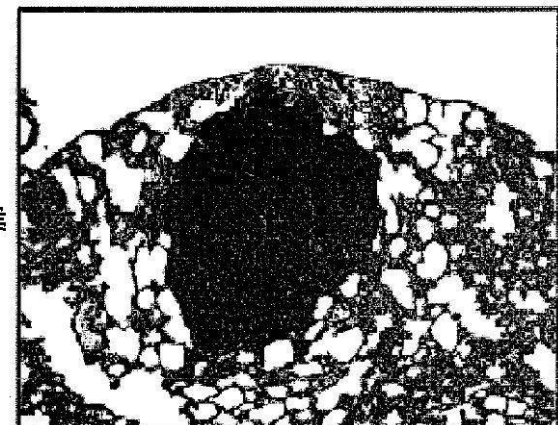
リンパ節



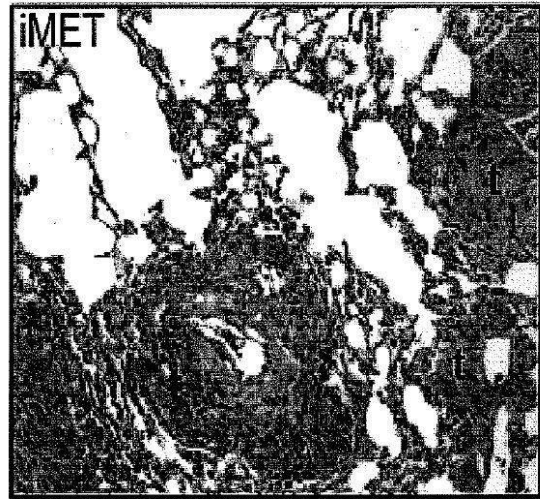
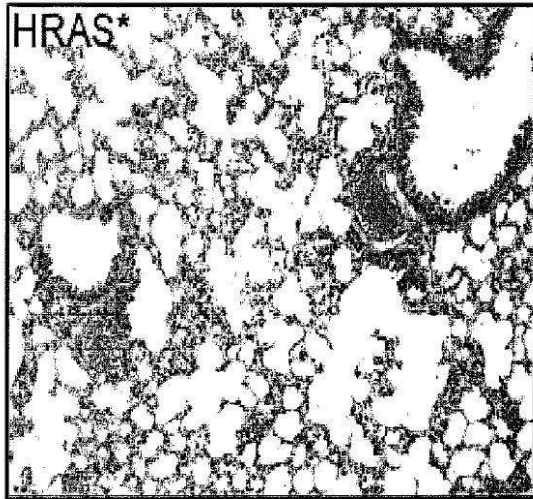
副腎



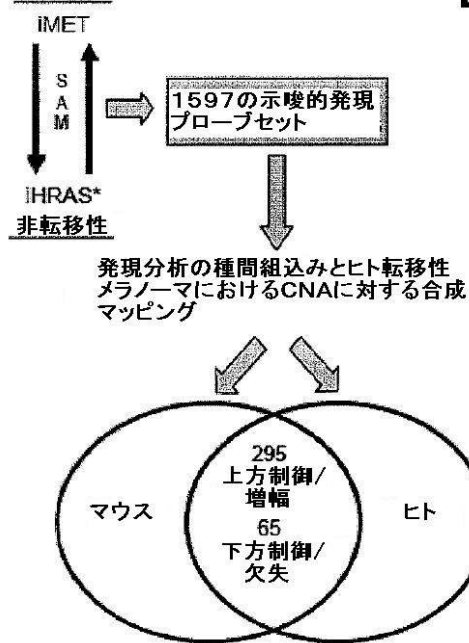
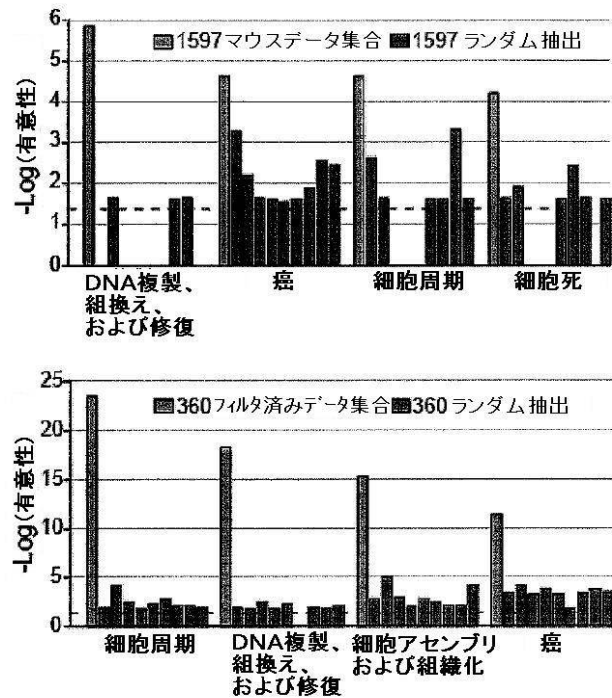
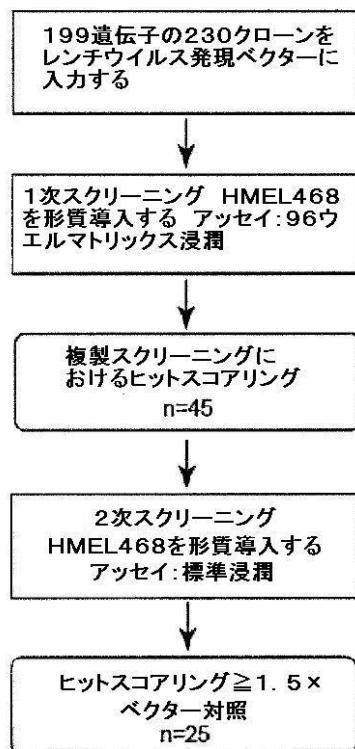
肺



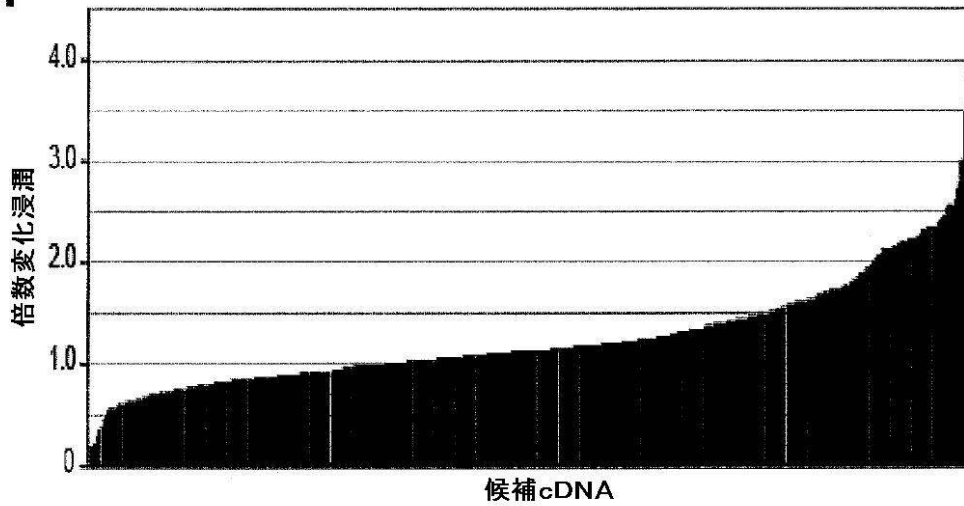
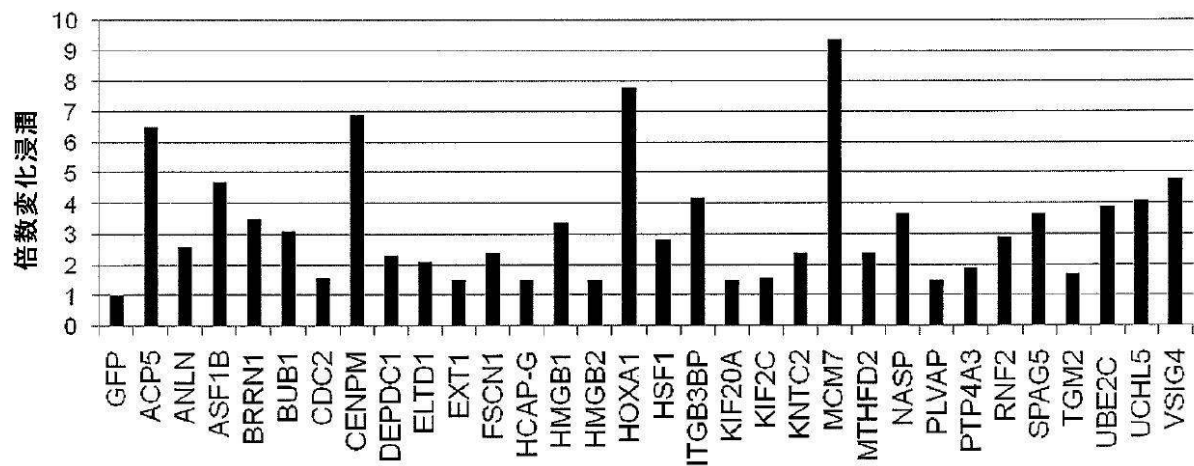
【図 2 - 2】

Fig. 2 続き**C.**

【図 3 - 1】

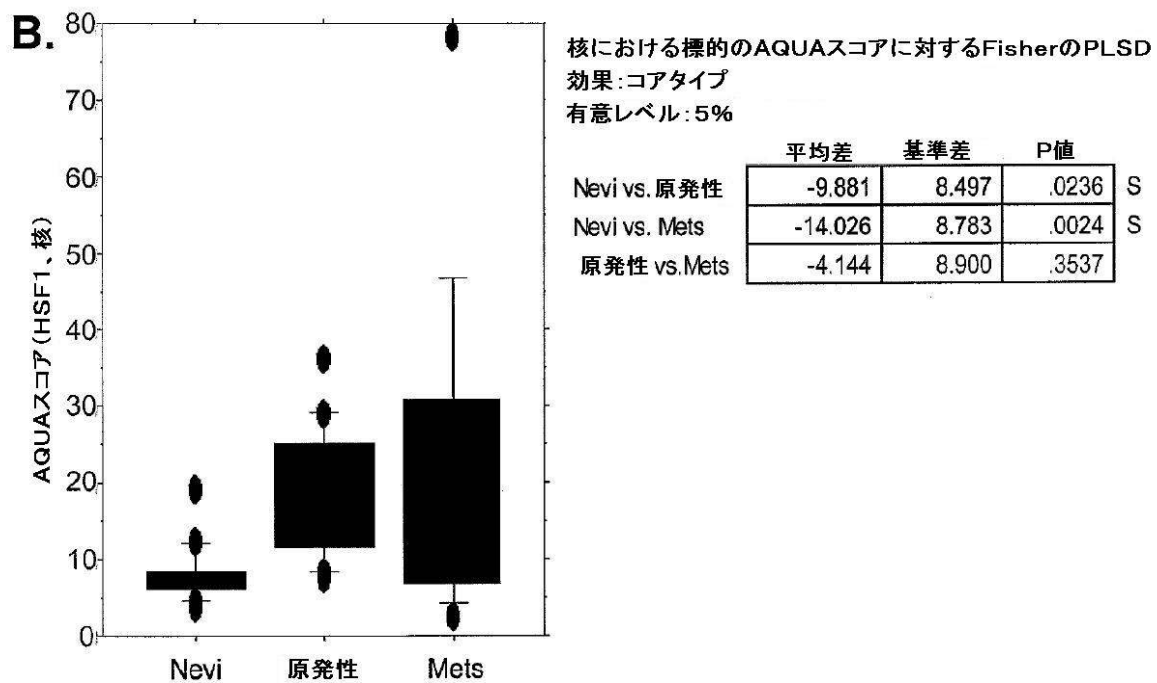
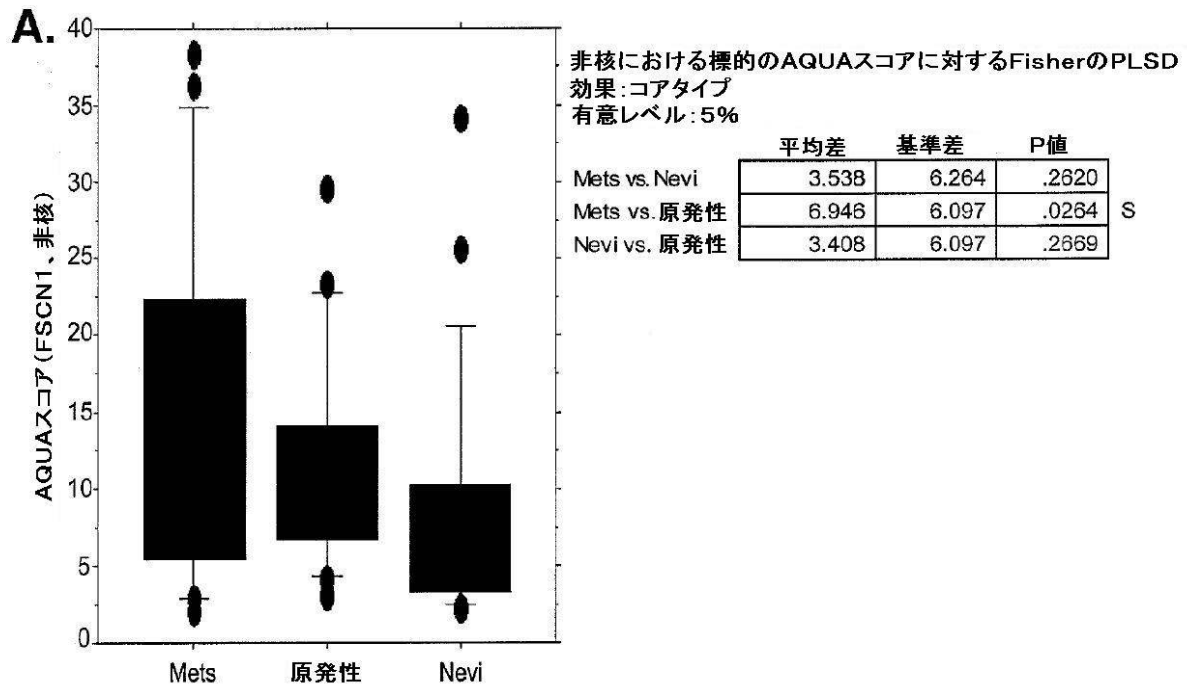
Fig. 3**A. マウスメラノーマ
転移性****B.****C.**

【図 3 - 2】

Fig. 3 続き**D.****E.**

【図 4】

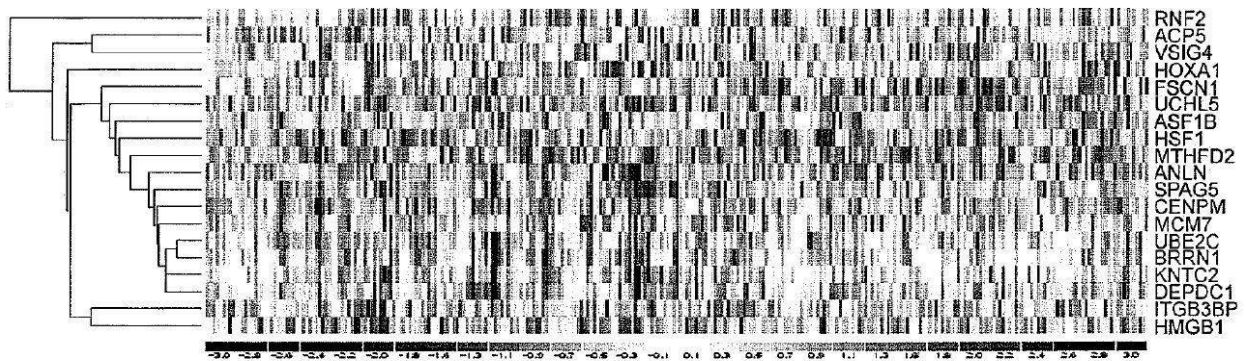
Fig. 4



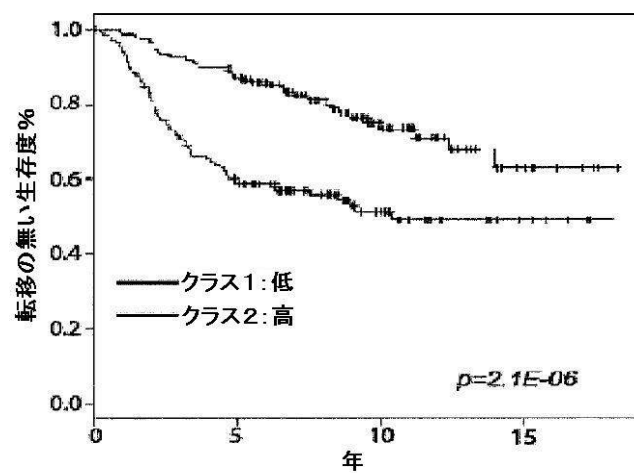
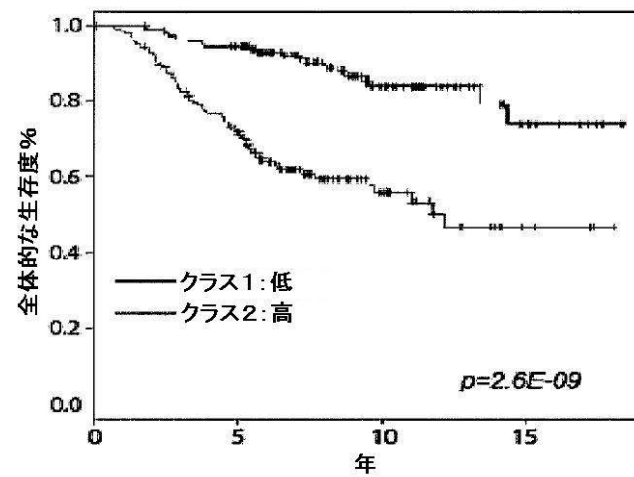
【図5】

Fig. 5

A.

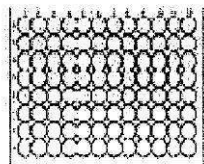
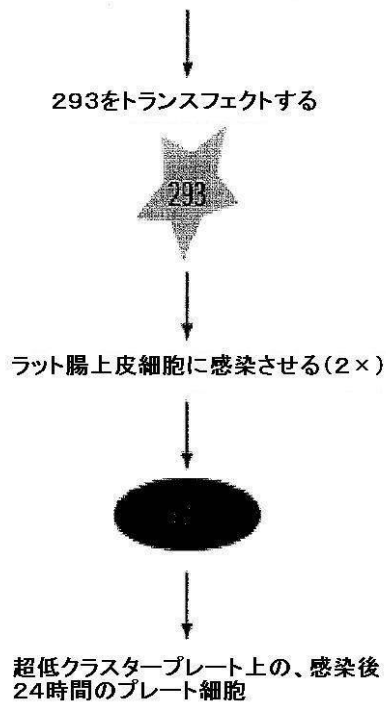


B.



【図6】

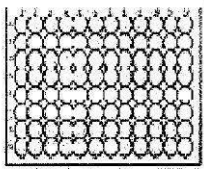
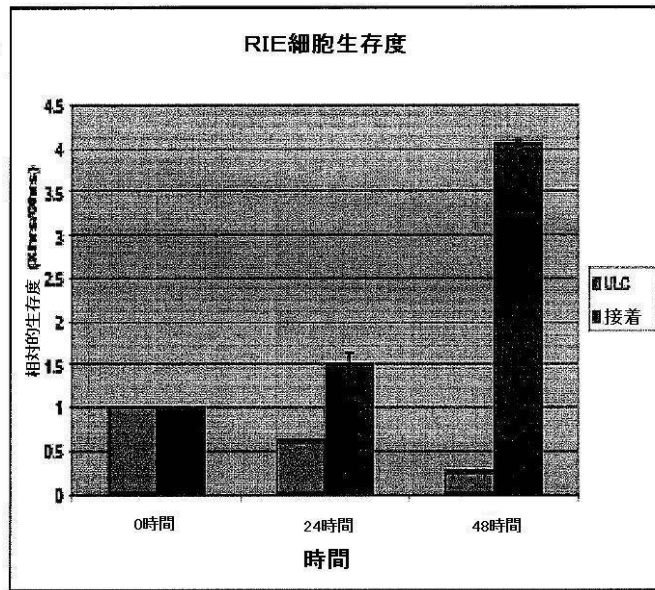
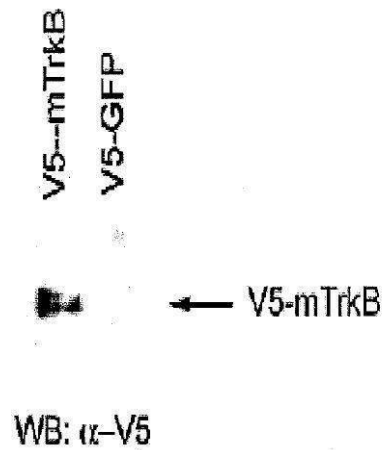
Fig. 6

A. 候補遺伝子を有するMSCV/V5

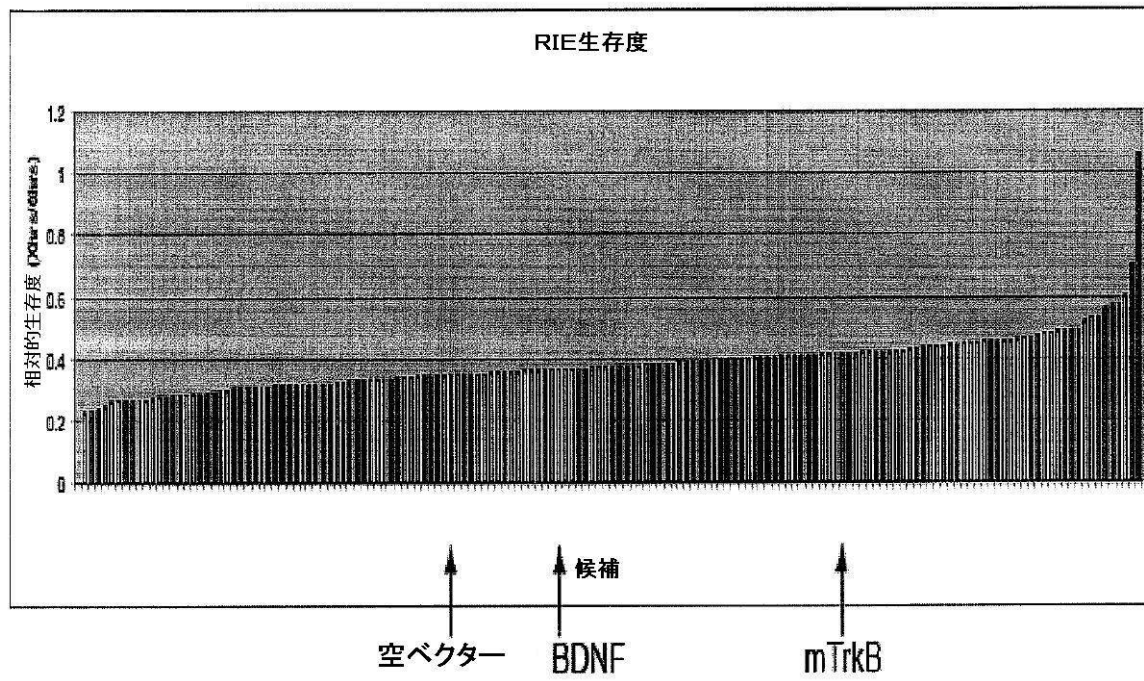
96ウェル(3重ウェル)

↓

24時間で不透明なプレートに移し、細胞生存度を測定する

**B.****C.**

【図 7】
Fig. 7



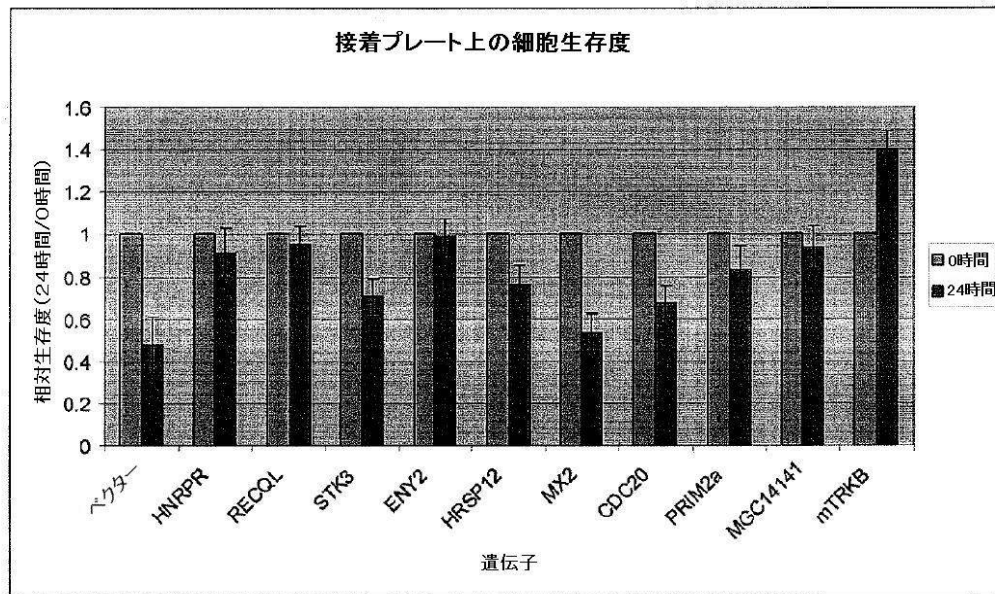
【図 8】

Fig. 8

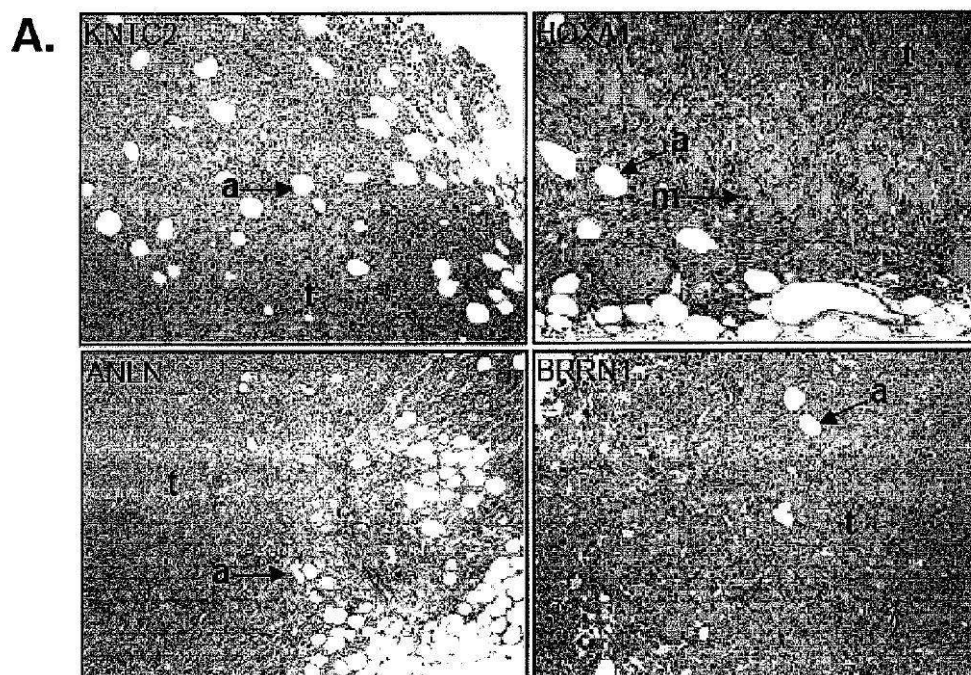
遺伝子	詳細	染色体
ANLN	アニリン、アクチン結合タンパク質	Chr. 7p15
BIRC5	バキュロウイルスIAP反復-含有5	Chr. 17q25
CDC20	細胞分裂周期20	Chr. 1p34
CDC25C	細胞分裂周期25ホモログC	Chr. 5q31
CDCA1	NDC80キネトコア複合体成分	Chr. 1q23
DUT	デオキシユリジントリホスファターゼ	Chr. 15q15
ENY2	黄色転写因子のエンハンサー	Chr. 8q23
GRID1	グルタミン酸受容体	Chr. 10q22
HCAP-G	非SMCコンデンシンI複合体、サブユニットG	Chr. 4p15
HNRPR	不均質核リボヌクレオタンパク質	Chr. 1p36
HRSP12	感熱性タンパク質12	Chr. 8q22
CEP68	中心体タンパク質	Chr. 2p14
KNTC2	NDC80ホモログ、キネトコア複合体成分	Chr. 18p11
PGEA1	Chibbyホモログ1	Chr. 22q12
PRIM1	プライマーゼ、ポリペプチド1	Chr. 12q13
PRIM2A	DNAプライマーゼサブユニット	Chr. 6p12
RECQL	DNAヘリカーゼ	Chr. 12p12
RRAD	糖尿病に関連したRas関連	Chr. 16q22
SPBC25	NDC80キネトコア複合体成分	Chr. 2q24
MGC14141	膜貫通タンパク質	Chr. 9q34

【図 9】

Fig. 9



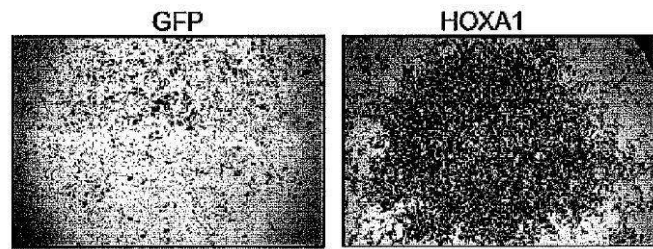
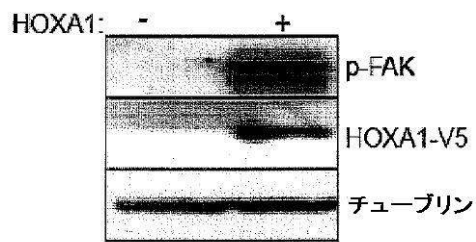
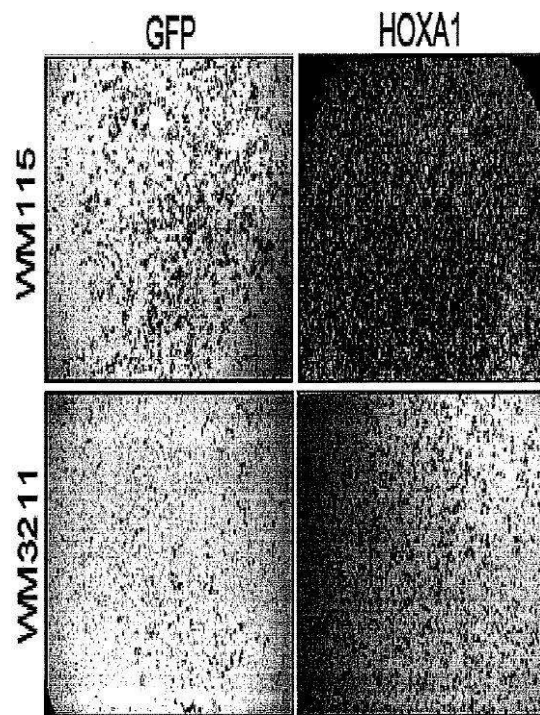
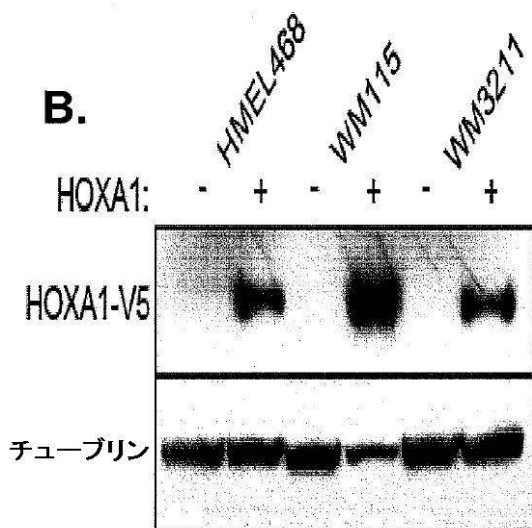
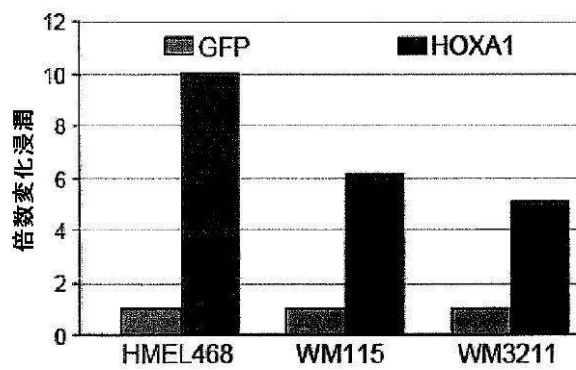
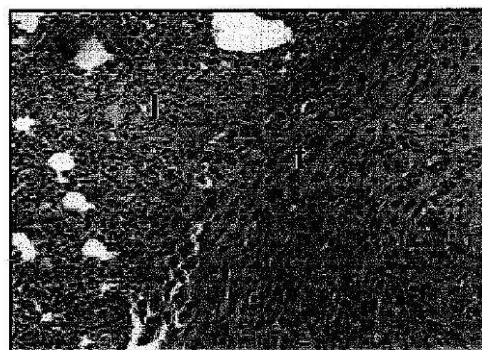
【図 10】

Fig. 10

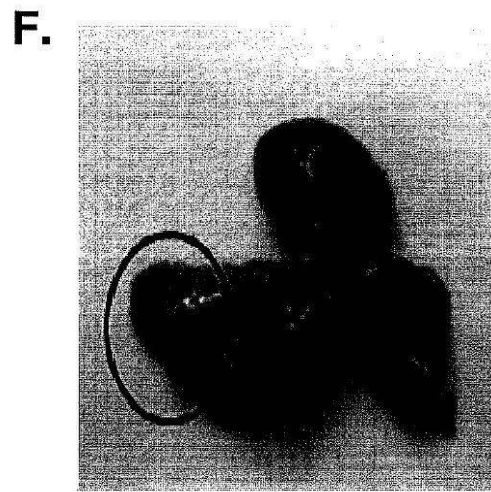
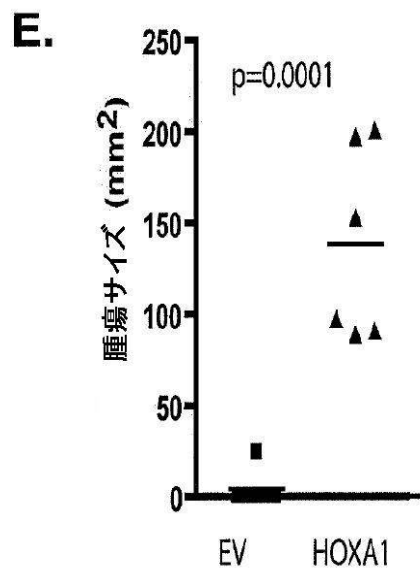
B.

Determinant	腫瘍%			
	12週	15週	18週	21週
EV-GFP	0%	0%	0%	17%
HOXA1	33%	33%	33%	67%
BRRN1	0%	17%	33%	33%
KNTC2	0%	0%	33%	50%
ANLN	33%	33%	50%	50%

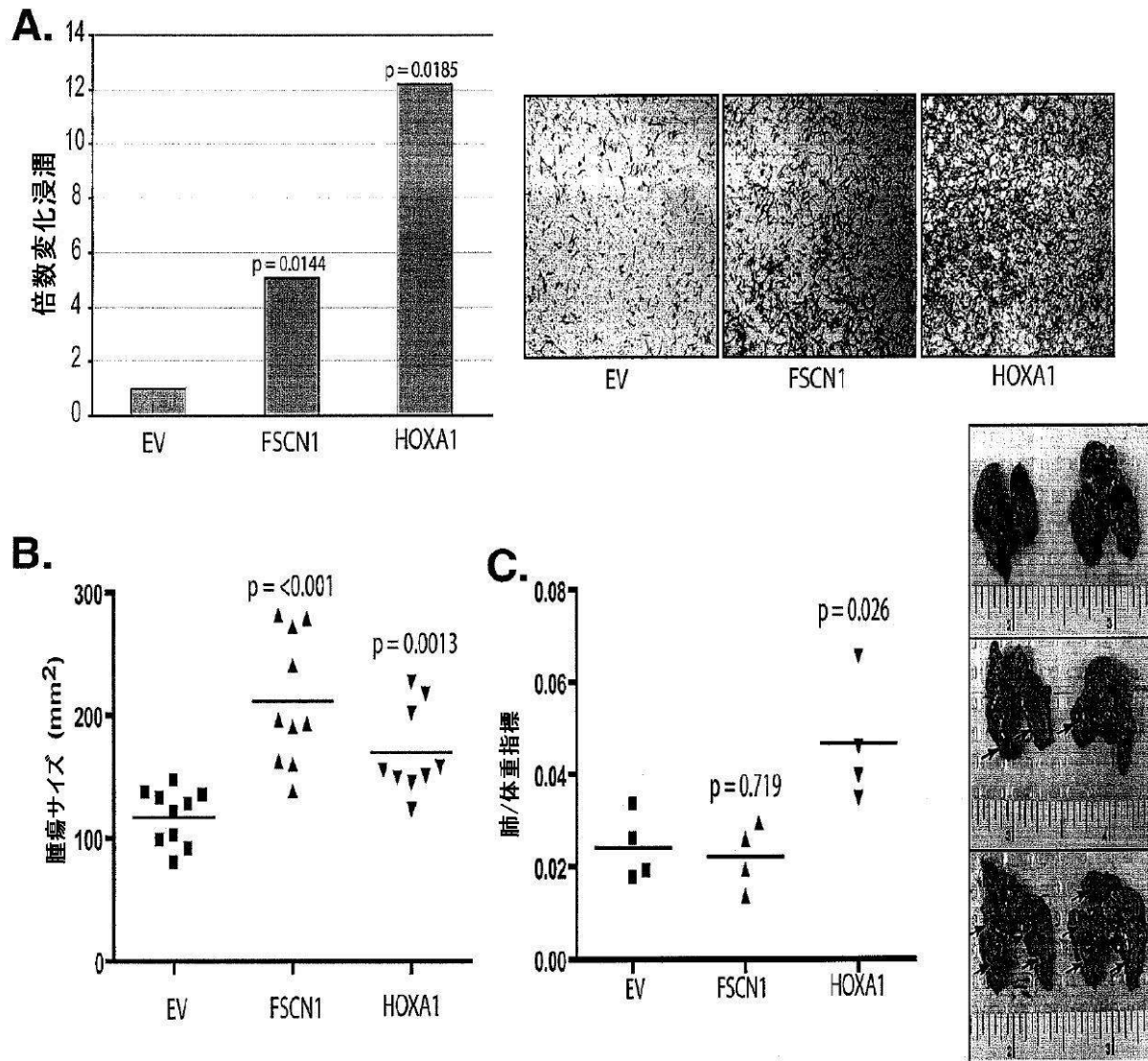
【図 11 - 1】

Fig. 11**A.****B.****C.****D.**

【図 1 1 - 2】

Fig. 11 続き

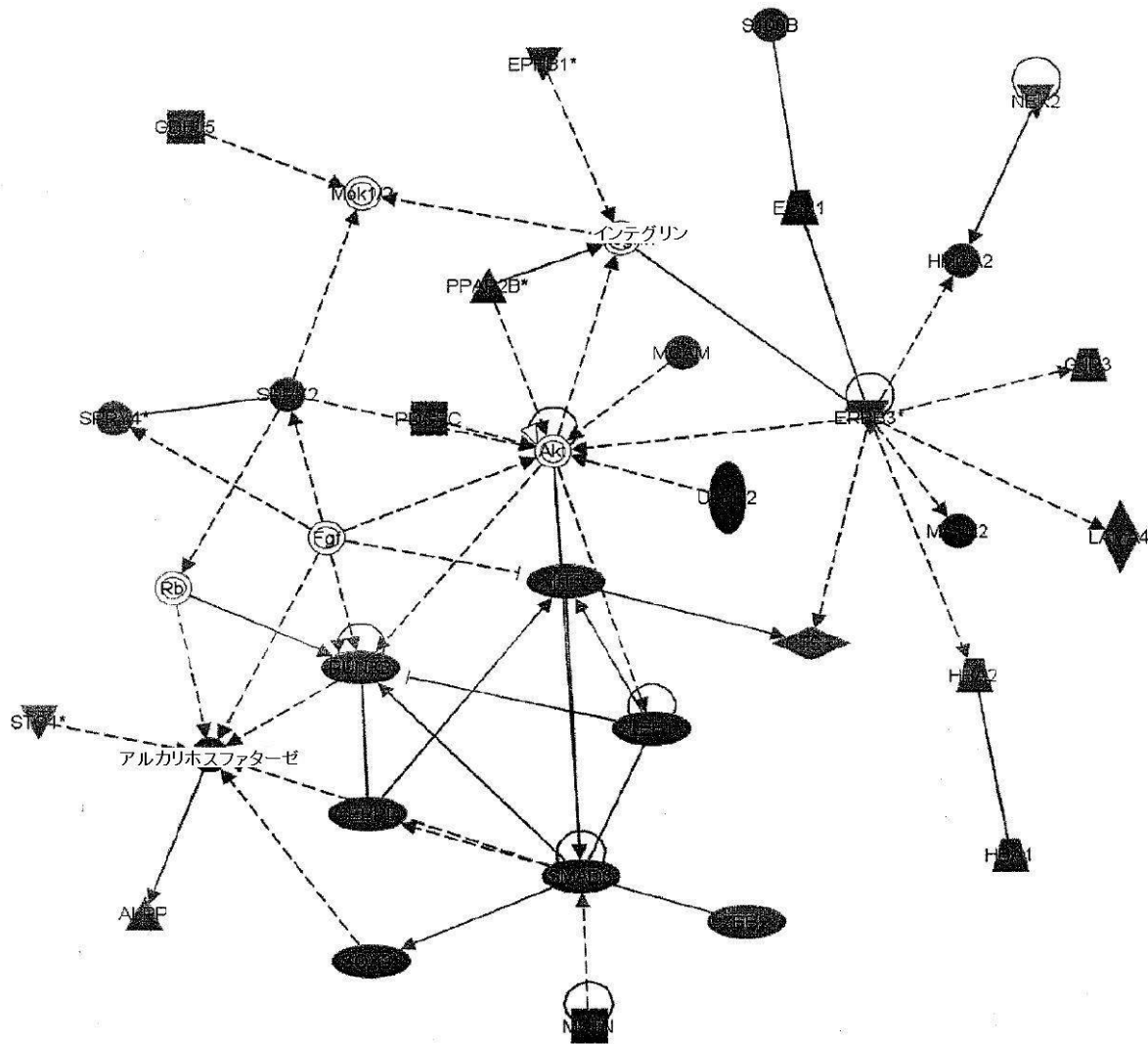
【図 1 2】

Fig. 12

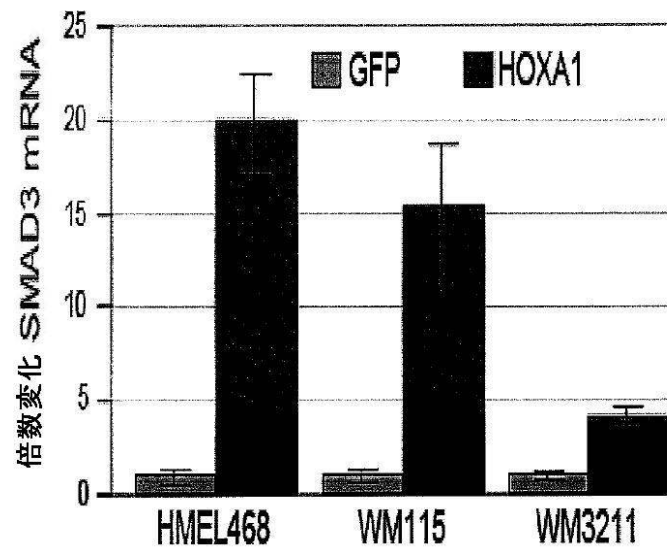
【図 13-1】

Fig. 13

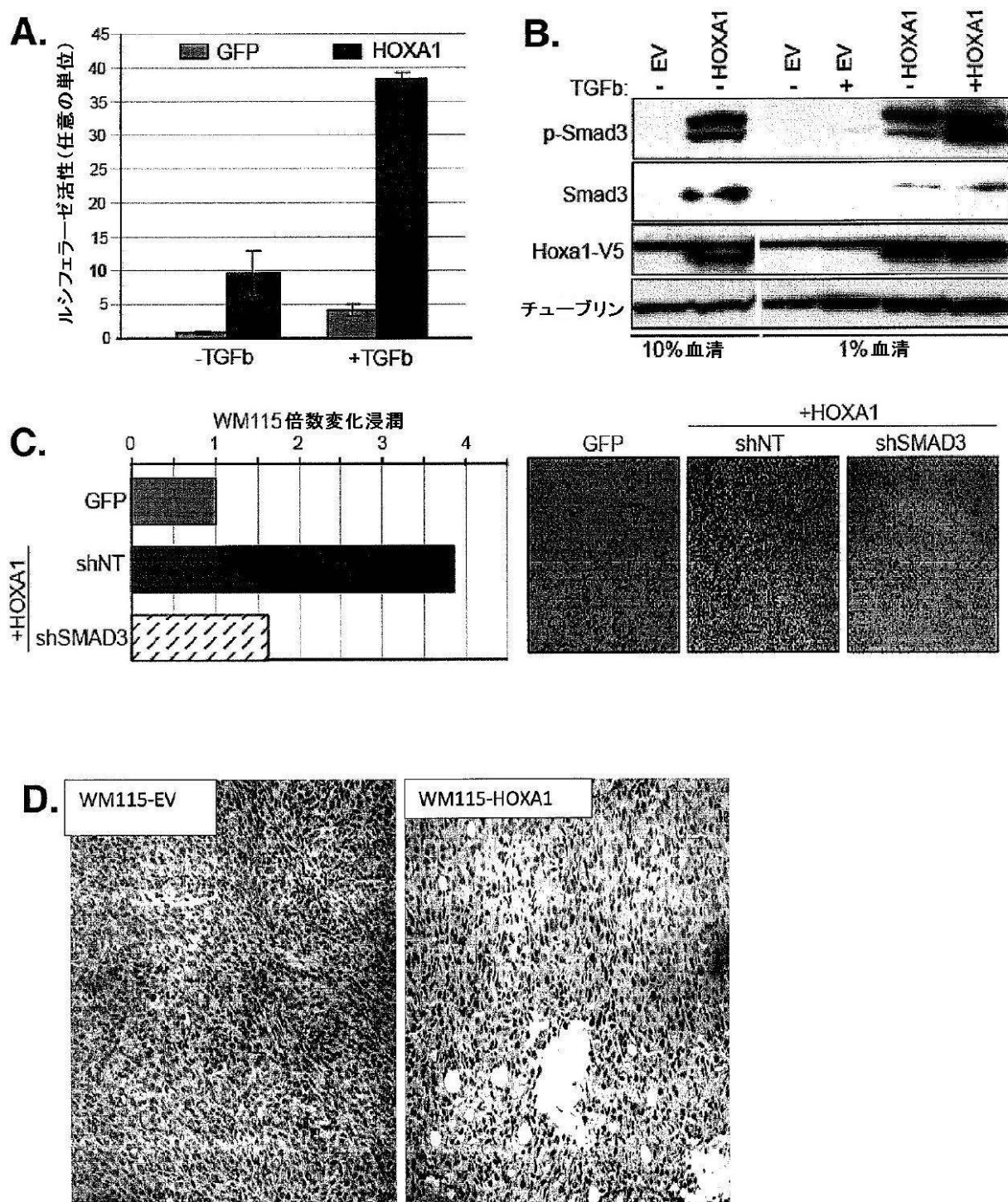
A.



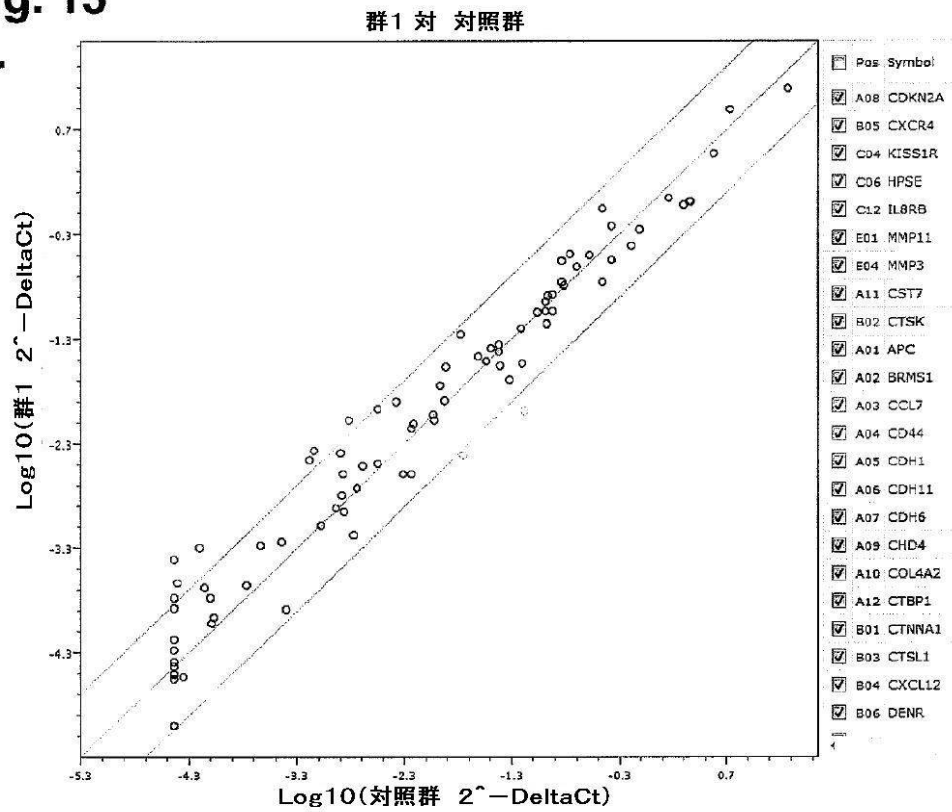
【図 13 - 2】

Fig. 13 続き**B.**

【図 14】

Fig. 14

【図 15 - 1】

Fig. 15**A.**HOXA1で過発現した遺伝子
対 対照群(WM115細胞)

位置	遺伝子記号	倍数制御
A08	CDKN2A	5.9299
B05	CXCR4	10.6886
C04	KISS1R	8.0445
C06	HPSE	5.4189
C12	IL8RB	4.5253
E01	MMP11	5.4566
E04	MMP3	5.8889

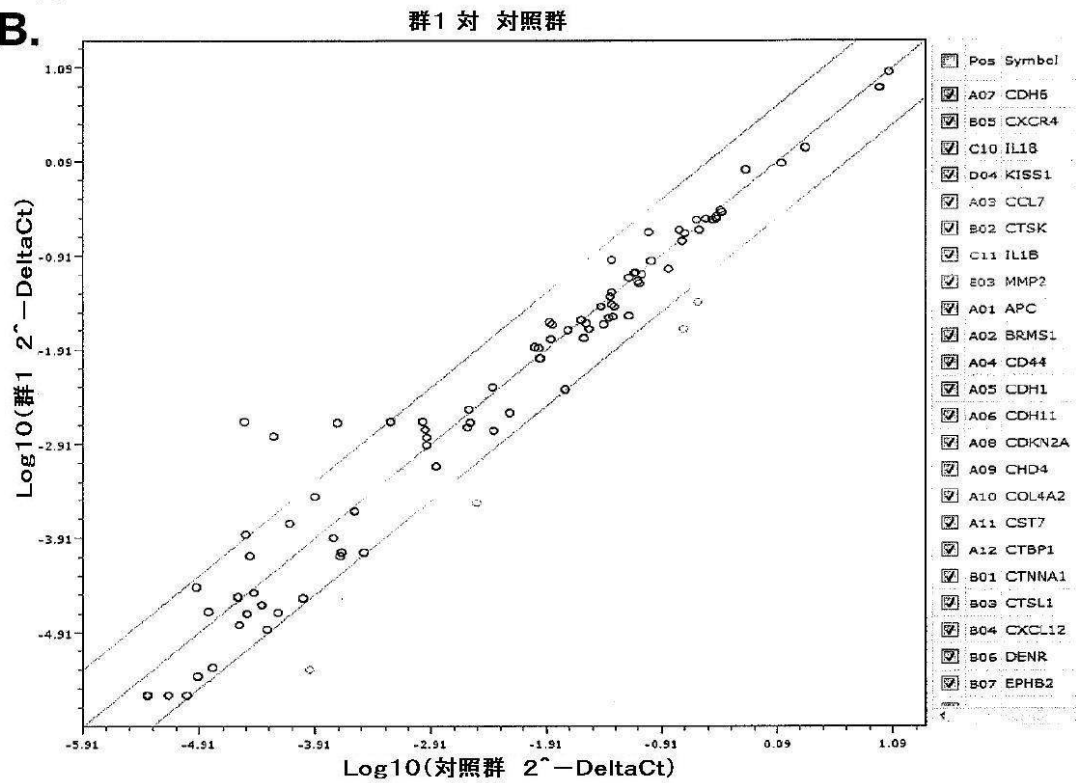
HOXA1で低発現した遺伝子
対 対照群(WM115細胞)

位置	遺伝子記号	倍数制御
A11	CST7	-6.507
B02	CTSK	-4.6332

【図 15 - 2】

Fig. 15 続き

B.

HOXA1で過発現した遺伝子
対 対照群(HMEL468細胞)

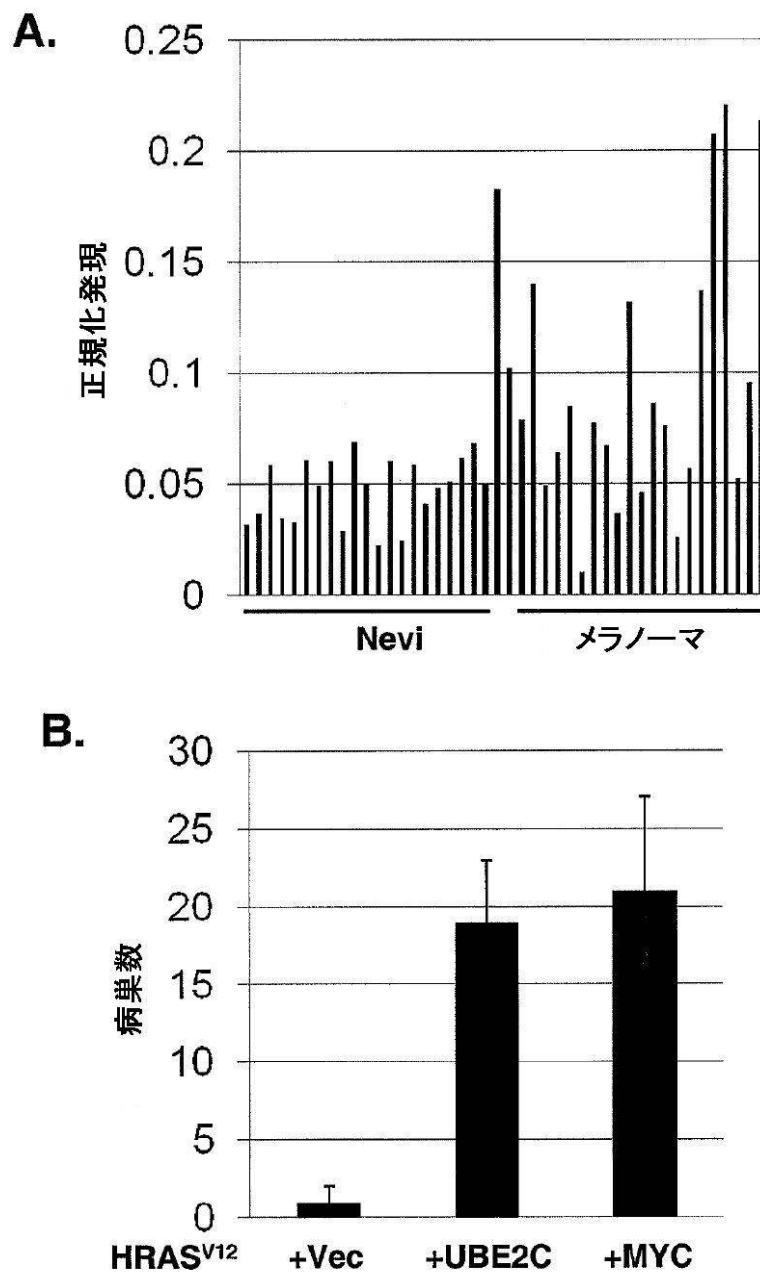
位置	遺伝子記号	倍数制御
A07	CDH6	10.659
B05	CXCR4	69.2624
C10	IL18	27.3601
D04	KISS1	4.299

HOXA1で低発現した遺伝子
対 対照群(HMEL468細胞)

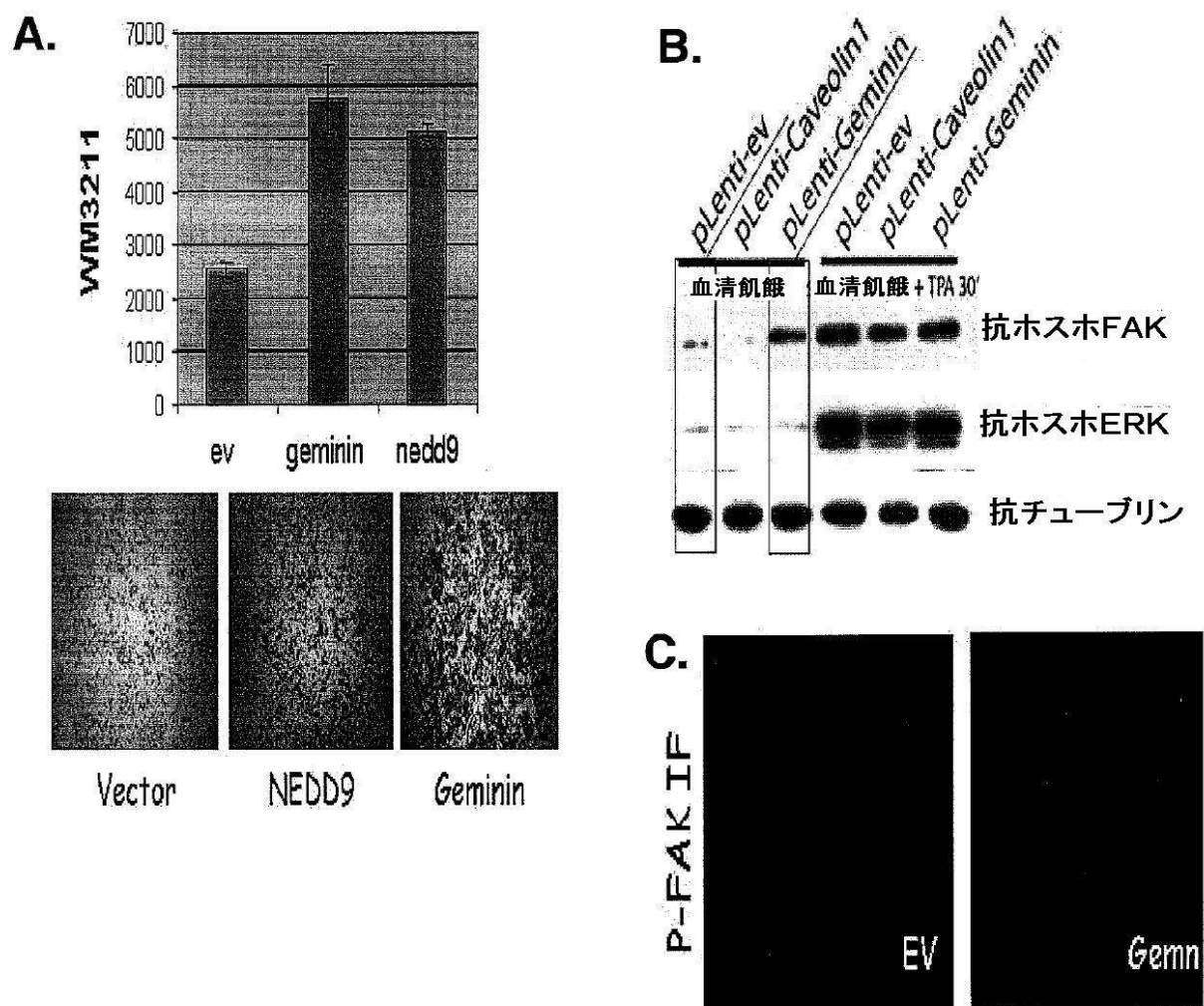
位置	遺伝子記号	倍数制御
A03	CCL7	-22.2541
B02	CTSK	-9.2279
C11	IL1B	-10.4541
E03	MMP2	-6.5251

【図 17】

Fig. 17



【図 18】

Fig. 18

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/048862

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/574

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/059313 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER [US]; BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; MOSES MARSHA) 24 May 2007 (2007-05-24) the whole document In particular: paragraphs 4, 12-14, 17, 20-28; claims 1-21.	1
Y	US 2004/002071 A1 (RALPH DAVID [US] ET AL) 1 January 2004 (2004-01-01) the whole document In particular: paragraphs 3, 8-9, 13; claims 1 and 2.	1
Y	US 2006/063190 A1 (FISCHER TIMOTHY J [US] ET AL) 23 March 2006 (2006-03-23) the whole document In particular: paragraphs 1, 14-23, 64-68, 81; p. 9, table 1; claims 1-55.	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2010

Date of mailing of the international search report

14/04/2010

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

C.F. Angioni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/048862

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/282196 A1 (COSTA JOSE [US]) 22 December 2005 (2005-12-22) the whole document In particular: paragraphs 2, 12-15; claims 1-27.	1
Y	US 2003/232398 A1 (MACMURRAY JAMES P [US] ET AL) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document In particular: paragraphs 2, 9, 18, 32-33, 50-51, 55-56; claims 1-12.	1
X	WO 2004/079014 A2 (ARCTURUS BIOSCIENCE INC; ERLANDER MARK G [US]; MA XIAO-JUN [US]; WANG) 16 September 2004 (2004-09-16) the whole document In particular: p. 1, l. 8-16; p. 4, l. 5 - p. 6, l. 18; p. 11, l. 1-20; p. 12, l. 4-16; p. 14, l. 22-28; p. 16, l. 27 - p. 17, l. 19; p. 34, ACP5; p. 123 and p. 177, ANLN; p. 208, ACP5 as AI524385; p. 214, ANLN as AW575162; claims 1-21.	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/048862

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; It is covered by claims Nos.:

1(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2009 /048862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention: 1; Claims: 1(partially)

The subject-matter of claim 1 limited to the specific combination of at least ACP5 and ANLN.

Inventions: 2-1128; Claims: 1(partially)

The subject-matter of claim 1 limited to the specific combination of two DETERMINANTS as listed in claim 1.

Inventions: 1129-353064; Claims: 2(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 2 limited to the specific combination of three DETERMINANTS as listed in claim 1 and claim 2.

Invention: 353065; Claims: 3(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 3.

Invention: 353066; Claims: 4(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 4.

Invention: 353067; Claims: 5(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 5.

Invention: 353068; Claims: 6(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 6.

Invention: 353069; Claims: 7(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 7.

Invention: 353070; Claims: 8(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 8.

Inventions: 353071-2065375; Claims: 9(completely); 1(partially)

International Application No. PCT/US2009 /048862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claim 9 limited to the specific combination of five DETERMINANTS as listed in claim 1.

Inventions: 2065376-2066503; Claims: 10(completely); 1(partially)

The subject-matter of claim 10 limited to the specific combination of two DETERMINANTS as listed in claim 10.

Invention: 2066504; Claims: 12-14

A method for assessing the progression of a metastatic tumour in a subject.

Invention: 2066505; Claims: 15-18

A method for monitoring the effectiveness of treatment of a metastatic tumour in a subject.

Invention: 2066506; Claims: 19-22

A method for selecting a treatment regimen for a subject diagnosed with a tumour.

Invention: 2066507; Claims: 23, 28

5 (claims 23 and 28): A metastatic tumour reference expression profile and a machine readable media containing one or more metastatic tumour reference expression profiles.

Invention: 2066508; Claims: 24-27

A kit comprising a plurality of DETERMINANT detection reagents.

Invention: 2066509; Claims: 29-31

A DETERMINANT panel.

Invention: 2066510; Claims: 32-36

A method of identifying a biomarker that is prognostic for a disease.

Invention: 2066511; Claims: 37-38

International Application No. PCT/US2009 /048862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method of identifying a compound that modulates the
activity or expression of a DETERMINANT.

Invention: 2066512; Claims: 39-43

A method of treating a tumour or a cancer in a subject.

Invention: 2066513; Claims: 44

A method of selecting a tumour patient in need of adjuvant
treatment.

Invention: 2066514; Claims: 45

A method of informing a treatment decision for a tumour
patient.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/048862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007059313 A1	24-05-2007	AU 2006315348 A1 CA 2629793 A1 EP 1938105 A1 JP 2009515556 T US 2009215102 A1	24-05-2007 24-05-2007 02-07-2008 16-04-2009 27-08-2009
US 2004002071 A1	01-01-2004	US 2006240450 A1 US 2009263808 A1	26-10-2006 22-10-2009
US 2006063190 A1	23-03-2006	US 2009269856 A1	29-10-2009
US 2005282196 A1	22-12-2005	NONE	
US 2003232398 A1	18-12-2003	NONE	
WO 2004079014 A2	16-09-2004	EP 1599607 A2 JP 2006519620 T	30-11-2005 31-08-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(72)発明者 チン, リンダ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 5, ブルックライン, ボイルストン ストリート 5 6 5

(72)発明者 スコット, ケネス エル.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, コモン ストリート 3 1 3, ナンバー 1

(72)発明者 ゴーシュ, パピア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 2 1 5, ボストン, ピーターボロー ストリート 1 2 5, アpartment 3 4

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB20 CB01 CB02 DA13 DA14 DA36 FB01 FB02
FB03 FB05 JA06
4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 CA20 DA02 EA02 EA04 GA13
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ42 QR32 QR62 QR77 QR80 QS25
QS34 QS38 QX02
4C084 AA17 NA05 ZB26 ZC02