

(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2017-514142

(P2017-514142A)

(43) 公表日 平成29年6月1日(2017. 6. 1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	L
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	N
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

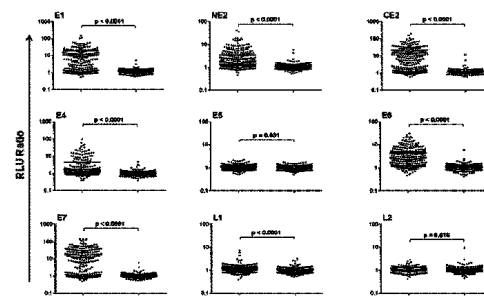
(21) 出願番号	特願2016-565486 (P2016-565486)	(71) 出願人	504318142
(86) (22) 出願日	平成27年3月16日 (2015. 3. 16)		アリゾナ ボード オブ リージェンツ
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月27日 (2016. 12. 27)		オン ビハーフ オブ アリゾナ ステート ユニバーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/020705		アメリカ合衆国, アリゾナ 85257, スコットズデール, ノース スコットズデール
(87) 国際公開番号	W02015/167678		ロード 1475, スカイソングススイート 200
(87) 国際公開日	平成27年11月5日 (2015. 11. 5)	(74) 代理人	100086771
(31) 優先権主張番号	61/985, 357		弁理士 西島 孝喜
(32) 優先日	平成26年4月28日 (2014. 4. 28)	(74) 代理人	100088694
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 弟子丸 健
		(74) 代理人	100094569
			弁理士 田中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HPV関連症状のための新規な方法、バイオアッセイ及びバイオマーカー

(57) 【要約】

本明細書で提供されるものは、抗体を含む患者サンプルでの複数のHPV型（例えばHPV16及びHPV18）に特異的な抗体の迅速な検出方法である。例えば、頭頸部癌を有する患者は、HPVに由来する複数の初期遺伝子に対する検出可能な抗体を有する。これらの抗体はまた、HPV関連悪性疾患及び前悪性状態のためのバイオマーカーとして、診断及び予後判定のために、並びに治療の査定及び癌再発予測の方法のために有用である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

HPVの検出方法であって、

患者由来の抗体含有サンプルを、HPV由来のin vitroで転写及び翻訳されたタンパク質と接触させる工程、及び、

前記タンパク質と結合したHPV抗体のパターンを、HPV関連症状についてのコントロールと比較する工程を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記HPV関連症状が、頭頸部癌又は前悪性増殖の1種以上を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記HPV関連症状が、口腔咽頭癌（OPC）を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記タンパク質が、HPV16 E1、NE2、CE2、E4、E6、E7及びL1の1種以上を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記タンパク質が、HPV18 E1、E2及びL1の1つ以上を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

HPVに由来する1種より多くのタンパク質が、前記サンプルと一緒に利用される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、及び口腔洗浄サンプルから成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

HPV関連症状のための診断アッセイ、予後判定アッセイ、予測アッセイ又はモニタリングアッセイの一部として、HPV由来のin vitroで転写及び翻訳された少なくとも1種のタンパク質を含む物質。

【請求項 9】

HPVの検出方法であって、

患者由来の抗体含有サンプルを、HPVのin vitroで転写及び翻訳されたタンパク質と接触させる工程、

30

前記タンパク質と結合したHPV抗体のパターンを、HPV関連症状についてのコントロールと比較する工程、及び、

前記コントロールと対比した前記タンパク質と結合したHPV抗体の前記パターンに基づいて、前記HPV関連症状を有するものとして患者を同定する工程を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 10】

前記タンパク質が、HPV16 E1、NE2、CE2、E4、E6、E7及びL1の1種以上を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

40

前記タンパク質が、HPV18 E1、E2及びL1の1種以上を含む、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

（関連出願の相互引用）

本出願は、米国仮特許出願61/985,357（2014年4月28日出願、参照によりその全体が本明細書に含まれる）の優先権を主張する。

（政府の権利に関する記載）

本発明は、米国立癌研究所のU01CA117374により政府の支援を受けて達成された。当該政府は本発明で一定の権利を有する。

50

(技術分野)

本明細書に開示される実施態様は、患者サンプルでHPV検出に必要な方法及び材料、より具体的にはHPV関連症状に関して診断的、モニタリング的、予測的、及び予後診断的に使用されるアッセイ及びバイオマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

液性免疫応答の検出は、感染症及び自己免疫の診断並びに予後判定のために必須であり、さらに他の症状、とりわけ癌の検出のためにバイオマーカーを提供することができる。いくつかのプロテオームマルチプレックス免疫アッセイが開発され、これらの抗体の検出を容易にした。特にスライド系アッセイは抗体検出のための優れた発見ツールである。しかしながら、前記は、通常の免疫学検査室では一般的ではない特殊化された高処理能力をもつ装置を必要とする。

ヒトパピローマウイルス（HPV）はもっとも一般的な性行為感染症であり、概算して性的活動人口の75%までが生涯のある時期に感染する。HPVによる生殖器感染は初めての性行為後まもなく発生し、有病率は思春期及び若年成人でもっとも高い。ほとんどの場合、感染は一過性かつ無症状であり、一般的に有病率は年齢とともに低下する。持続的な生殖器感染は新形成の進行と密接に関係する可能性が高く、侵襲的な癌が感染後何年もしてから（一般的には数十年）発生する。

HPV16及び18による感染は、口腔咽頭癌（OPC）、子宮頸癌、肛門癌及び他の悪性疾患と明らかに関連している。実際、西欧ではOPCのほとんどの事例がHPV感染と連関することは疑いのないことであり、その数は増加しつつある。

これまでのところ、HPV関連症状（例えばOPC）に対する免疫の検出又はモニタリングのためのスクリーニング方法及び関連方法は存在しない。

【発明の概要】

【0003】

本明細書に開示される実施態様は、患者サンプルでの複数のHPV型（例えばHPV16及びHPV18）に特異的な抗体の迅速な検出方法に関する。頭頸部癌を有する患者は、HPVに由来する複数の初期遺伝子に対する検出可能な抗体を有する。さらにまた、これらの抗体は、HPVに関連する症状、悪性疾患及び前悪性状態のために、診断及び予後判定のために、並びに治療の査定及び癌再発予測の方法のために、バイオマーカーとして単独又は組み合わせて多様な実施態様で利用することができる。

HPV関連症状（頭頸部癌を含む）の診断的及び予後判定的検出物質として供することができる1つ以上のバイオマーカーが希求されているので、改善されたHPVタンパク質生成方法、並びに、HPV癌のリスクがある患者のスクリーニング並びに早期検出、再発、予測及び予後判定で使用されるバイオマーカーが開示される。いくつかの実施態様は、迅速なプログラム可能ビーズアレイ（ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）もまた利用できる）の構築に関する。

特段の規定がなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、本開示が属する業界の業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。材料、方法及び実施例は単なる例示であり、限定を意図するものではない。全ての刊行物、特許出願、特許、配列データベースへの登録、及び本明細書に記載する他の参考文献は参照によりその全体が本明細書に含まれる。

本発明のその他の特色及び利点は以下の詳細な説明及び図面並びに特許請求の範囲から明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】 HPV関連OPCを有する患者における複数のHPV16抗体の特異的検出。HPV16タンパク質はGST融合タンパク質として発現され、抗GST被覆プレート上で捕捉された。HPV関連OPC血清（n=256）及びコントロール（n=250）で検出されたIgGのRLU比（HPV抗原のRLU/GSTコントロールのRLU）が示される。

【図2】HPV陽性腫瘍を有する症例（n=111）及びコントロール（n=250）におけるOPC癌の早期診断について、（A）2抗体バイオマーカーパネル（E6、E7）及び（B）7抗体バイオマーカーパネル（E1、NE2、CE2、E4、E5、E6、E7）の比較性能を示す受信者動作特性曲線である。実線：トレーニングセット。破線：検証セット。このパネルの最適動作点は98%の特異性で90%であった（AUC=0.94）。

【図3】HPV関連OPCの患者における複数のHPV16抗体の検出である。HPV16タンパク質をGST融合タンパク質として発現させ、磁性ビーズ上で捕捉した。HPV関連OPC血清で検出されたIgGのMFI比（HPV抗原のMFI/GSTコントロールのMFI）が示される。E1、CE2、NE2、E4、E6、E7及びL2に対するHPV16特異的抗体が、コントロールと比較したときHPV関連OPCの患者で検出される。

10

【図4】136のHPV-OPC症例、48人のパートナー、及び81人の健常志願者由来のベースライン血清におけるE6及びE7抗体の検出である。血清で検出されたHPVタンパク質/コントロールGSTタンパク質に特異的なIgGのRLU比が示される。各グループの黒線は当該グループの中央値を表す。各グラフの点線は健常志願者の平均値を超える3標準偏差を示す（陽性のための切り捨て）。血清陽性とみなされた各グループの割合が各グループのX軸の下に示されている。

【図5】209人のOPC患者の無増悪生存である。（A）少なくとも1つのE抗体陽性患者対全E抗体陰性患者（ $P<0.001$ ）。（B）少なくとも1つのL抗体陽性患者対全L抗体陰性患者（ $P=0.657$ ）。

【図6】腫瘍におけるHPV DNAの状況が利用可能な114人のOPC患者の無増悪生存である。

20

（A）少なくとも1つのE抗体陽性患者対全E抗体陰性患者（ $P<0.001$ ）。（B）PCRでHPV16陽性腫瘍をもつ患者対PCRでHPV16陰性腫瘍をもつ患者（ $P=0.016$ ）。

【図7】96人のHPV16陽性OPC患者の無増悪生存である。（A）少なくとも1つのE抗体陽性患者対全E抗体陰性患者（ $P<0.001$ ）。（B）E1抗体陽性患者対E1抗体陰性患者（ $P=0.002$ ）。（C）NE2抗体陽性患者対NE2抗体陰性患者（ $P<0.001$ ）。（D）E6抗体陽性患者対E6抗体陰性患者（ $P=0.005$ ）。

【図8】疾患再発状況によるHPV陽性OPC患者の時間経過下のE1抗体（A）、NE2抗体（B）及びE6抗体（C）の中央値抗体レベルである。再発した8人の陽性患者全員及び最後の追跡まで再発のなかった23人のHPV陽性患者のランダムサブセットを、最初のワークアップ、処置後6カ月、及び6カ月間隔で処置後36カ月まで調べた。

30

【発明を実施するための形態】

【0005】

本明細書に引用される全ての刊行物（特許及び特許出願を含むが、ただしこれらに限定されない）は、本出願であたかも完全に示されたかのように参照により本明細書に含まれる。

ある特徴では、HPVの検出方法が本明細書で提供される。前記方法は、患者由来の抗体含有サンプルをHPVに由来するin vitroで転写及び翻訳されたタンパク質と接触させる工程、及び当該タンパク質と結合したHPV抗体のパターンをHPV関連症状についてのコントロールと比較する工程を含む。HPV関連症状は頭頸部癌又は前悪性増殖の1つ以上を含むことができる。HPV関連症状は口腔咽頭癌（OPC）を含むことができる。いくつかの事例では、当該タンパク質は、HPV16 E1、NE2、CE2、E4、E6、E7及びL1の1つ以上を含む。いくつかの事例では、当該タンパク質はHPV18 E1、E2及びL1の1つ以上を含む。HPVに由来する2つ以上のタンパク質を当該サンプルに関して利用することができる。当該サンプルは、血液サンプル、血清サンプル、及び口腔洗浄サンプルから成る群から選択することができる。

40

別の特徴では、HPV関連症状のための診断アッセイ、予後判定（prognostic）アッセイ、予測（predictive）アッセイ又はモニタリングアッセイの部分として、HPV由来のin vitroで転写及び翻訳された少なくとも1つのタンパク質を含む物質が本明細書で提供される。

さらに別の特徴では、HPVを検出する方法が本明細書で提供される。前記方法は、患者の抗体含有サンプルをHPVに由来するin vitroで転写及び翻訳されたタンパク質と接触さ

50

せる工程、当該タンパク質と結合したHPV抗体のパターンをHPV関連症状についてのコントロールと比較する工程、及び当該コントロールと対比した当該タンパク質と結合したHPV抗体のパターンに基づいてHPV関連症状を有するものとして患者を同定する工程を含む。いくつかの事例では、当該タンパク質は、HPV16 E1、NE2、CE2、E4、E6、E7及びL1の1つ以上を含む。いくつかの事例では、当該タンパク質はHPV18 E1、E2及びL1の1つ以上を含む。

本発明は以下の実施例でさらに記載されるが、これは特許請求の範囲に記載した本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0006】

本明細書のいくつかの実施態様は、新規なプログラム可能ビーズアレイELISAを利用して、HPV16陽性の頭頸部癌を有する患者の血清サンプルでヒトパピローマウイルス16型（HPV16）のプロテオームを検出する。これらのタンパク質は、*in vitro*転写翻訳（IVTT）を用いてリアルタイムで発現され、続いて単一血清サンプル中の複数の抗原の検出のために、シングルプレックス又はマルチプレックスビーズに結合される。患者で検出されたPV16抗原は潜在的な診断及び予後判定バイオマーカーとして機能することができ、疾患の検出に臨床的に用いるとき、症状に基づく診断より2年以前で感度70%及び特異性90%である。

トレーニングセットの患者血清は、頭頸部の状況並びにHPV16又はHPV18陽性に関する公知データを有するブラウン大学（Brown University）から入手した（陽性は、メルクが開発した競合ルミネックス免疫アッセイ（cLIA）によって規定された）。コントロール血清もまた同じ現場から入手し、年齢（±5歳）、住居及び性別を適合させた。続いて、この実験の検証セットをダナ-ファーバー癌研究所（Dana-Farber Cancer Institute）及びジョンズ・ホプキンス大学から入手した。

これらのサンプルは、処置前の頭頸部癌症例から適合コントロール（症例の健常パートナーを含む）とともに入手した。CDCから入手した別のコントロールセットは、HPV16の子宮頸部感染が記載され、ロシュ試作品のラインプロットアッセイを用いた子宮頸部剥離細胞によるHPV16 DNA陽性が確認された女性の血清を含んでいた。全ての血清サンプルは使用まで-80℃で保存された。

HPV16及び18遺伝子E1、E2、E4、E5、E6、E7、L1及びL2はネステッドPCRによって入手した。HPV16 E2は発現が低いことが判明し、したがってN-及びC-末端フラグメントに二分した。最初のPCRは、HPV16及びHPV18精製プラスミド由来の遺伝子特異的プライマーを用いて実施した。プライマー伸長PCRを用いて、組換えクローニングのためにattB部位を付加した。続いて、att PCR生成物を製造業者の推奨にしたがいBPクローナーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いてpDONR221ベクターに挿入し、さらにLRリコンビナーゼ（Invitrogen）を用いてpANT7_GSTベクターに変換した。続いて、標準的マキシプレップ（maxi-prep）を用いてDNAを精製し、その後で配列を確認した。

【0007】

抗GST抗血清をPBSに対して透析してアジ化ナトリウムを除去し、続いてSeroMAP微小球（Luminex Corporation, Austin, TX）に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）を用いて結合させた。上清から微小球を分離するために遠心分離を用いた。微小球保存溶液をまず初めに除去し、続いてこの微小球を滅菌水で洗浄した。微小球を続いて100mMのリン酸一ナトリウム（pH6.2）に再懸濁した。50mg/mLのsulfo-NHSを、続いて50mg/mLのEDCを添加し、室温（RT）で20分間インキュベートして微小球上のカルボキシル基を活性化させた。

続いて、活性化微小球を50mMの2-(N-モルフォリノ)エタンスルファニル酸（MES）で2回洗浄した。MESに再懸濁した後、抗GSTを5 µg/10⁶微小球で添加してからRTで2時間回転させながらインキュベートした。続いて上清を取り除き、結合微小球をPBS-BN（PBS、1% BSA、0.05%アジ化物（pH7.4））に再懸濁し、RTで30分間回転させながらインキュベートした。もう一度上清を取り除き、結合微小球をPBS-0.05%トゥイーン（pH7.4）に再懸濁し合わせて2回洗浄した。結合微小球は光から保護してPBS-BNに4℃で保存した。最終的な微小

10

20

30

40

50

球数は血球計算盤を用いて確認した。

各HPV遺伝子は、T7網状赤血球溶解物の単一バッチを製造業者の推奨にしたがって用い、500ngのDNAを用いGST融合タンパク質として発現させた（Promega Corporation, Madison, WI）。ベクター及びp21-GSTもまたコントロールとして発現させた。in vitro転写翻訳（IVTT）の後で、発現タンパク質をPBS-1% BSA中の40微小球/ μ Lで2000個の抗GST結合微小球上に補足した。

【0008】

続いて、このタンパク質結合微小球と一緒にプールしてマルチプレックスアッセイを形成し、続いて96ウェルのフィルタープレートへ再度小分けし、真空ろ過系を用いてPBS-1% BSAで洗浄した。PBS-1% BSA中のマウス、ウサギ、ヤギ及びラット正常血清のそれぞれ10%；0.5%ポリビニルアルコール；0.8%ポリビニルピロリドン、及び2.5%ケミコン（Millipore Corporation, Billerica, MA）により、前記微小球を振盪しながらRTで1時間ブロックした。血清を同じブロック緩衝液で1：80に希釈し、微小球とともに一晚浸透しながらインキュベートした。ビオチン結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（4 μ g/mL）及びストレプトアビジン-R-PE（4 μ g/mL）を添加した。Luminex200 IS 2.3ソフトを用いて中央値蛍光強度（MFI）を測定した。非特異的及びGST特異的自己抗体バックグラウンドの管理のために、個々のHPV特異的抗体のMFI対コントロールp21-GST抗原のMFIの比を測定した。

結果について、複数のHPV由来初期遺伝子に対する抗体応答が患者血清で検出された。HPV16 E1、E2、E4、E6及びL1抗体レベル（ES又はL2ではなく）は、健常コントロールサンプルと比較して、HPV16 L1抗体＋患者で上昇した（メルクアッセイで規定）。中央値MFI比は以下のとおりであった：E1 39対2.0（ $p<0.0001$ ）；E2 2.7対1.4（ $p<0.0001$ ）；E4 9.1対1.4（ $p<0.001$ ）；E6 10対2.1（ $p<0.0001$ ）；E7 3.9対2.0（ $p<0.01$ ）；及びL1 10.8対2.4（ $p<0.0001$ ）。メルクアッセイでHPV18 L1抗体を有する患者については、HPV18 E1（11.9対2.3、 $p<0.001$ ）、E2（20.7対1.9、 $p=0.0016$ ）及びL1（9.8対2.7、 $p<0.0001$ ）に対する抗体のみが特異的に検出された。HPV16とHPV18特異的抗体間で交差反応性は検出されなかった。

したがって誂えマルチプレックスビーズアレイが、患者血清でのHPV16及びHPV18特異的抗体の迅速検出のために開発された。

【0009】

口腔咽頭癌検出のためのHPV16血清学的バイオマーカー

以下の略語を用いた：CV、変動係数；HPV、ヒトパピローマウイルス；IVTT、in vitro転写/翻訳；OPC、口腔咽頭癌；OR、オッズ比；SD、標準偏差。

ヒトパピローマウイルス（HPV）16型は大半の口腔咽頭癌（OPC）の原因である。HPVプロテオームに対する抗体（Ab）は、HPV関連OPC（HPV-OPC）の潜在的バイオマーカーである。

HPV16抗原E1、E4、E5、E6、E7、L1、L2並びにE2のN-末端及びC-末端フラグメント（NE2、CE2）を、プログラム可能ELISAアッセイを用いて定量した。血清は258人のOPC患者から診断時に及び250人の健常コントロールから入手し、トレーニングセット及び検証セットに分割した。PCRによって測定したHPV16腫瘍状況は137症例で判明していて、そのうちの11人はHPV16について陽性であった。コントロールGSTタンパク質に対する各抗原の平均ルミネセンス比（RLU）値を決定した。P-値はウィルコクソン順位和検定によって計算した。

HPV16 E1、E2、E4、E5、E6、E7及びL1特異的IgGレベルは、健常コントロールと比較してOPC患者で上昇した（ $p<0.05$ ）。SVN分類因子モデリングを用いて、OPC癌の予測診断用7抗体バイオマーカーパネル（E1、NE2、CE2、E4、E5、E6、E7）を認定した。HPV16陽性腫瘍を有することが判明している患者サブセット（ $n=111$ ）について、感度は98%特異性で90%であった（AUC=0.94）。多変数調整後、任意の抗原に対する抗体陽性はOPCリスクと密接な関係があった（OR [95% CI]、65.6 [26.0-165.1]）。症例の中で、抗体陽性は、HPV16陽性腫瘍を有すること（OR [95%CI]、5.3 [1.3-21.2]）及び特にその中では ≤ 10 パック年（pack years）の喫煙（OR [95%CI]、22.7[2.5-208.8]）と強い関係があった。

したがって、HPVOPCの早期検出のためのHPV16 IgG抗体の新規なバイオマーカーパネルが作成された。

【0010】

更なる例示として、テキサス大学、M.D.アンダーソン癌センター（Houston, TX）での治療（n=258）の開始前に以下の分析で使用する血清が選別された。当該生物試料保存施設のサンプルは、2006年1月から2008年9月まで頭部と首の診療所に通院した患者から収集され、人口動態データ、疫学データ及び臨床データと突き合わされた。患者は、標準化した質問票により身上歴及び暴露歴（喫煙及びアルコールの使用を含む）を提供し、さらに生物学的検査のための血液サンプルを提供した。健常コントロール血清はテキサス大学、M.D.アンダーソン癌センターから入手し、年齢、性別及び人種に関する頻度を症例と適合させた（n=250）。症例及びコントロールを先見的任意抽出によりトレーニングセット及び検証セットに割り当てた。標準化サンプル収集プロトコルを用いて全てのサンプルを収集し、使用まで-80℃で保存した。全ての対象者から施設内審査委員会の承認の下に書面によるインフォームドコンセントを得た。

ゲートウェイ適合ドナー系を含む、配列検証済み完全長cDNA発現プラスミド（pANT7_cGST）をDNASUプラスミドレポジトリ（アリゾナ州立大学、バイオデザイン・インスティテュート）から入手した（前記はdnasu.org/DNASU/.でオンライン公開されている）。DNAを精製し、pANT7_cGSTベクターに挿入した。ヒトHeLa細胞溶解物（Thermo Scientific, Waltham, MA）を製造業者の指示にしたがって用い、各HPV16遺伝子をC-末端GST融合タンパク質としてpANT7_cGSTベクターで発現した。HPV16 E2遺伝子は、最適タンパク質発現のためにN-及びC-末端フラグメントとして発現させた。陰性コントロールとしてGSTを発現した。

以下の修正を加えてELISAを実施した：HeLa細胞溶解物によるIVTTを実施して88 µLのタンパク質を200ngの鋳型cDNAから発現し、抗GST抗体（GE Healthcare, Piscataway, NJ）被覆96ウェルプレートにより捕捉した。血清を1：100に希釈し、10%の大腸菌DH5α溶解物で2時間室温にてブロックし、続いて発現タンパク質とともに1時間インキュベートした。ブロック血清及び抗体の添加は以下の自動装置を用いて実施した（BioMek NXP Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter, Brea, CA)）。症例及びコントロールは2組ずつとして同時に分析した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）抗ヒトIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA）を1：10,000で添加し、以下の基質（Supersignal ELISA Femtoケミルミネセンス基質（Thermo Scientific））を用いて検出した。ルミネセンスは以下の装置（Glomax 96 Microplate Luminometer (Promega, Madison, WI)）を用い425nmで相対光単位（RLU）として検出した。非特異的及びGST特異的抗体の管理のために、個々のHPV特異的抗体RLU対コントロールGST抗原RLUの比を測定した。

【0011】

診断用院内パラフィン包埋組織は、腫瘍のHPV状況決定診断を組織病理学的に確認した後で入手した。組織DNA抽出キット（Qiagen Inc., Valencia, CA）を用いてDNAを抽出した。PCRによる型特異的アッセイを用いて、調査対象者の腫瘍組織をHPV E6又はE7領域の存在について試験し、各対象者をこれらの結果に基づいてHPV陽性又はHPV陰性として分類した。陽性（Siha細胞株）及び陰性（TPC-1細胞株）コントロール並びにDNA品質コントロールとしてβ-アクチンとともに、サンプルを3組ずつで用いた。

全てのアッセイを2組ずつで実施し、値は平均値としてプロットする。切り捨て値を確立するために、トレーニングセットのコントロールサンプル（n=125）で（平均+3標準偏差）より大きいRLU比を陽性とした。これらのレベルは以下のとおりであった：E1：2.66、NE2：2.29、CE2：4.35、E4：2.58、E5：1.69、E6：2.01、E7：1.99、L1：1.84、L2：3.58。比較はマン-ホイットニーのノンパラメトリック分析（GraphPad Prismバージョン5.0c (San Diego, CA)）を用いて実施した。二項ロジスティック回帰識別因子モデリングを用い、我々は、抗体セットの全ての組合せのOPC癌早期検出性能を比較する基礎として受信者動作特性曲線（ROC）下の面積を計算した。

Stata 12.0 (StataCorp, College Station, TX) を全ての統計分析に用いた。0.5より大きいp値を有意とみなし、全てが両側検定であった。カテゴリー変数は、試験対象者の身上歴、臨床歴、及び暴露（喫煙及びアルコール）歴を表すために作成した。対象者が、これまでに少なくとも100本のタバコを吸ったことがある場合には経験喫煙者（ever-smoker）とみなし、対象者がこれまで1年以上にわたって少なくとも週に1回アルコール飲料を飲んだことがある場合には経験飲酒者とみなした。以前に喫煙又は飲酒したが診断の前年にはそうではなかった対象者は、それぞれ以前喫煙者又は以前飲酒者とみなした。

【0012】

対象となる身上歴変数及び臨床歴変数を標準的な記述統計方法で分析した。グループ間の相違は、カテゴリー変数についてはカイ二乗検定又はフィッシャーの正確検定（細胞頻度が5未満の時）を用い、さらに連続変数については適切な場合には不等分散を調整しつつスチューデントt検定を用いて比較した。

95%信頼区間（CI）のオッズ比（OR）は、ロジスティック回帰モデルを可能な交絡因子を調整とともに用いて計算し、HPV16を用いて腫瘍のHPV状況と処置前の抗体状況との間の密接な関係を決定した。HPV-と、HPV+で>10パック年の喫煙と、HPV+で≤10パック年の喫煙との間における比較のために、ベースアウトカムとしてHPV-患者を用い多項式ロジスティック回帰を利用した。

主要目標は、新規にOPCと診断された患者で、もし存在するとしてHPV16特異的抗体が検出されるか否かを決定することであった。新規に診断が下され、組織病理学的に確認され、かつ以前に処置されることがない口腔咽頭癌を有する、頭頸部癌の大きな現在進行中の分子疫学調査に参加中の患者が本実験に参加資格があった。HPV16タンパク質及びGSTコントロールタンパク質特異的抗体レベルを、OPCの258症例並びに250の年齢-、性別-及び人種-適合コントロールに由来する、ランダムにトレーニングセット及び検証セットに分割された血清で比較した。2症例が診断時に遠位転移を示したので更なる調査から除外し、サンプルサイズは256症例となった。症例及びコントロールの身上歴は表1に提示されている。

【0013】

表1：症例及びコントロールの身上歴、暴露、及び臨床特性

10

20

	症例	コントロール セット#1	P	症例	コントロール セット#2	P	
年齢、平均 (SD)	N=256 56.5 (9.6)	N=78 51.4 (13.6)	.003a	N=50 55.8 (9.5)	N=50 55.9 (9.6)	0.992	
年齢、中央値	55	51	.012	54	54.5		
	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		
性別			<.001			1.0	
男	220 (85.9)	31 (39.7)		42 (84.0)	42 (84.0)	0.256	
女	36 (14.1)	47 (60.3)		8 (16.0)	8 (16.0)		
人種			.320			1.0	
白人	233 (91.0)	68 (87.2)		46 (92.0)	46 (92.0)		10
その他	23 (9.0)	10 (12.8)		4 (8.0)	4 (8.0)		
喫煙歴			.239			0.078	
非喫煙	116 (45.3)	43 (55.8)		20 (40.0)	31 (62.0)		
以前喫煙	93 (36.3)	21 (27.3)		20 (40.0)	14 (28.0)		
現在喫煙	47 (18.4)	13 (16.9)		10 (20.0)	5 (10.0)		
不明	0	1					
喫煙							
≤10 パック年	149 (59.6)						
>10 パック年	101 (40.4)						
不明	6						
飲酒歴			.025			0.527	
非飲酒	71 (27.7)	23 (29.5)		11 (22.0)	16 (32.0)		20
以前飲酒	66 (25.8)	9 (11.5)		11 (22.0)	10 (20.0)		
現在飲酒	119 (46.5)	46 (59.0)		28 (56.0)	24 (48.0)		
HPV 状況							
陰性	26 (19.0)						
陽性	111 (81.0)						
不明	119						
部位の詳細							
扁桃腺	122 (47.7)						
舌基部	121 (47.3)						
他の口腔咽頭	9 (3.5)						
他の部位 (口腔咽頭以外)	4 (1.6)						30
病期							
I-II	19 (7.4)						
III-IV	237 (92.6)						
T カテゴリー							
0-1	76 (29.7)						
2	110 (43.0)						
3	41 (16.0)						
4	29 (11.3)						
N カテゴリー							
0	29 (11.3)						
1-2a	42 (16.4)						
2b	126 (49.2)						
2c-3	59 (23.1)						40
グレード							
良好から中等度	76 (34.6)						
中等度不良から不良	144 (65.5)						
不明	36						

^a 不等分散を調整

【0 0 1 4】

症例の大半は扁桃腺及び舌基部に由来し（95%）、提示されたときにIII/IV期（92.6%）であった。症例とコントロールとの間に喫煙状況の割合に差はなかったが（表1）、コントロールはより高い現在のアルコール使用傾向を示した（症例で46.5%に対しコントロールで59%、 $p=0.025$ 、表1）。256症例で、HPV状況（E6及びE7についてHPV腫瘍PCRによって決

定)は137症例で利用可能であり、111症例(81%)がHPV16陽性であった。

OPC症例と健常コントロールとの合体セットにおけるHPV16抗原に対する血清IgG抗体についての迅速ELISAの結果は図1に示されている。非特異的及びGST特異的自己抗体バックグラウンドを管理するために、個々のHPV特異的抗体のRLU対コントロールGST抗原のRLU比を測定した。全OPCサンプル(HPV状況について未選別)では、L2を除く全HPV16抗体が健常コントロールよりもOPC患者で有意に高かった($p < 0.05$ 、図1)。

健常コントロールよりも高い割合でOPC患者はこれらの抗体について血性陽性であった(表2)。

【0015】

表2：処置前抗体状況と症例-コントロール状況との密接な関係

	症例	コントロール		P ^b	粗OR (95% CI)	調整OR ^c (95% CI)
	N=256	ル				
	N=250					
	No. + (%)	No. + (%)				
E1	144 (56.3)	2 (0.8)	<0.001	159.4 (38.8-655.1)	170.6 (41.3-705.0)	
NE2	104 (40.6)	2 (0.8)	<0.001	84.8 (20.6-348.8)	85.7 (20.7-354.2)	
CE2	137 (53.5)	2 (0.8)	<0.001	142.8 (34.7-586.5)	157.5 (38.0-653.2)	
NE2 及び /又はCE2 ^a	144 (56.3)	2 (0.8)	<0.001	159.4 (38.8-655.1)	177.5 (42.8-736.9)	
E4	61 (23.8)	3 (1.2)	<0.001	25.8 (8.0-83.3)	26.9 (8.3-87.4)	
E5	9 (3.5)	2 (0.8)	0.063	4.5 (1.0-21.1)	4.7 (1.0-22.8)	
E6	148 (57.8)	3 (1.2)	<0.001	112.8 (35.2-361.8)	130.6 (40.1-425.5)	
E7	148 (57.8)	3 (1.2)	<0.001	112.8 (35.2-361.8)	147.4 (45.0-483.1)	
E6 及び /又はE7 ^a	194 (75.8)	6 (2.4)	<0.001	127.2 (53.9-300.4)	241.4 (92.6-629.4)	
NE2、CE2、E6 及び/又はE7 ^a	203 (79.3)	7 (2.8)	<0.001	133.0 (59.2-298.9)	249.1 (99.3-624.9)	
任意のE ^a	210 (82.0)	10 (4.0)	<0.001	109.6 (53.9-222.5)	243.7 (101.4-586.0)	
L1	15 (5.9)	4 (1.6)	0.017	3.8 (1.3-11.7)	4.0 (1.3-12.3)	
L2	0	1 (0.4)	0.494	NC	NC	
任意のL ^a	15 (5.9)	5 (6.3)	0.038	3.0 (1.1-8.5)	3.1 (1.1-8.8)	
任意のE 及び/又はL ^a	210 (82.0)	12 (4.8)	<0.001	90.5 (46.7-175.5)	193.8 (85.0-441.5)	

^a 任意の陽性対全て陰性

^b フィッシャー正確検定

^c 年齢、喫煙、及びアルコール状況について調整

10

20

30

40

50

NC、細胞が0のため計算不能

【0016】

トレーニングセット健常コントロールから誘導した切り捨て値（平均より $>3SD$ 高い）を用いたとき、少なくとも1つのHPV16初期遺伝子抗体が、健常コントロールの15/250（6.0%）と比較して213/256（84.2%）のOPC症例血清で検出された（表2）。患者の大半が以下に特異的なIgG抗体陽性であった：HPV16 E1（144/256、56.3%）、NE2（104/256、40.6%）、CE2（137/256、53.5%）、E6（148/256、57.8%）、及び/又はE7（148/256、57.8%）。対照的に、わずかに15症例（5.9%）がL1抗体陽性であり、L2抗体陽性はなかった。E1、E2、E4、E5、E6及びE7は、検証セットの症例とコントロールセットとの間で有意に相違した。

OPCのリスクは、年齢と性別を調整しOR（95%CI）を計算することによって概算した（表2）。E1、E2、E6及びE7抗体のORは31.5–335.3の範囲であった。95%CIは大きい、超高リスクOPCが以下に対する血清陽性と結びついていた：E2のN-末端部分（OR >300 ）、E6タンパク質（OR >250 ）、及びE1タンパク質（OR >150 ）。いずれかの抗原に対して血清陽性であることはOPCリスクの66倍増加と結びついていたが、初期タンパク質に対して血清陽性であることはOPCリスクの93倍増加に結びつき、さらに後期タンパク質に対して陽性であることはOPCリスクの5倍増加に結びついていた。

HPV16 E6又はE7 DNAについてPCRで試験された腫瘍組織を有する137症例では、111（81.0%）がHPV腫瘍陽性、26（19.0%）がHPV腫瘍陰性であると決定された。

HPV腫瘍陽性症例のうちで、95/111（85.5%）が少なくとも1つのHPV初期抗原について血性学的に陽性であった。しかしながら、HPV腫瘍陰性症例の16/26（61.5%）もまた少なくとも1つのHPV初期抗原について血性学的に陽性であった。NE2又はE6のどちらかに対する抗体の存在はHPV腫瘍状況と結びつき（OR [95%CI]で、それぞれ5.8 [1.8-19.4] 及び4.5 [1.6-12.6]）、このことは特に10パック年以下の喫煙をした者に当てはまる（OR [95%CI]で、それぞれ22.3 [3.9-26.8] 及び8.9 [2.7-28.9]）。分析タンパク質のいずれかに対して血清陽性であることは、 ≤ 10 パック年の喫煙の症例ではHPV腫瘍状況と強く結びついていたが、この結びつきは、後期タンパク質ではなく主として初期タンパク質についてであった（OR [95% CI]、21.3 [2.3-192.8]）。喫煙者（ >10 パック年）では、血清陽性とHPV腫瘍状況との間に一定の結びつきは認識されなかった。HPV16 E2、E6及びE7の血清学とHPV腫瘍との結びつきは喫煙によって分かれた。

【0017】

HPV腫瘍陽性状況を有する患者サブセット（ $n=111$ ）について、我々は、パネルとしての初期抗原特異的抗体の組合せをそれら個々の抗体のHPV腫瘍状況との強い結びつきを基準にして査定した。切り捨て値を用いるとき、症例の大半は、コントロールと比較してE6及び/又はE7抗体に対して陽性であった（88/111、79.3%）。当該完全パネルの付加（少なくとも1つのHPV16初期遺伝子抗体）は、コントロールと比較して検出の感度を95/111（85.5%）症例に改善した。E1抗体はNE2抗体と強い相関性を示した（ $R^2=0.63$ ）。

我々は、トレーニングセットのHPV16腫瘍陽性状況が判明している患者サブセット（ $n=111$ ）及びをコントロール（ $n=125$ ）用いて患者状況の分類因子を構築し、E6/E7特異的抗体の組み合わせ（図2A、実線）を7つの初期抗原特異的抗体の完全パネル（図2b、実線）と比較した。続いて、我々は当該分類因子を用いて、検証セットの独立したHPV16腫瘍陽性症例（ $n=111$ ）及びコントロール（ $n=125$ ）のための受信者動作特性曲線を構築した。98%特異性で、E6/E7抗体パネルの感度は84%であった（AUC=0.9276）。対照的に、7抗体パネル（E1、NE2、CE2、E4、E5、E6及びE7）は、98%特異性で感度を90%に改善した（AUC=0.9395、図2、破線）。切り捨て値単独と比較して、分類因子の使用は、当該パネルの感度及び特異性の両方を改善した。

【0018】

口腔咽頭癌の大半はヒトパピローマウイルス16型（HPV16）と密接に関係している。HPV-ORCの発生増加のために、これらの患者の早期検出、診断、予後判定及びモニタリングのためのバイオマーカーが臨床で希求されている。先の研究は、HPV-OPCを有する患者のサブセット（約64–74%）が、HPV16 E6及び/又はE7に対する検出可能な抗体をその血清に有

することを示した。パイロット実験で、我々は、OPCを有する患者内でHPV16初期タンパク質に対する個々の血清学的応答パターンに顕著な不均一性を認めた。このことは、複数のHPV16由来タンパク質に対するIgG抗体パネルがHPV-OPCの検出を改善できることを示唆している。本実験で、我々は、過去10年にわたってMDアンダーソンの頭部首の診療所をOPCに関して受診した患者の血清の大きな予測収集物を用いて、OPC診断用潜在的バイオマーカーとして完全なHPV16プロテオームに特異的な抗体を査定した。

我々は、複数のHPV16初期抗原（E1、E2、E4、E5、E6及びE7）に対する抗体は、年齢-、性別-及び人種-適合コントロールと比較して患者血清で特異的に検出されることを示す。HPV16初期抗原の完全パネル（E1、E4、E5、E6、E7並びにE2のN-及びC-末端フラグメント）に対する抗体は、HPV+症例の90%を98%特異性で検出した。我々のデータは、HPV16抗体シグネチャーはHPV-OPCの特異的で臨床的に有用なバイオマーカーであり、さらに他のHPV関連悪性疾患に対して潜在能力を有しうることを示唆している。 10

本実験の1つの限界は、ここ10年（その間にこれらの患者が登録された）における腫瘍組織でのHPVの検出のための方法及び基準が急速に進んだことである。これまでのところHPVの組織バイオマーカーの取り扱いについての基準は存在しないが、IHCによって検出されるp16発現が代替マーカーとして一般的に用いられる（HR HPV核酸のためのISHを伴うことも伴わないこともある）。本実験のHPV状況の割り当てはHPV16のE6及びE7のPCRによって決定された。これらの症例のほんの小さなサブセットだけがp16の免疫組織化学のために利用可能な組織をもっていた（n=22）。したがって、我々はp16検査を用いて組織のHPV状況を確認する能力をもたなかった。 20

【0019】

PCRによって識別される組織HPV16状況を有する症例のサブセット（n=137）では、HPV16初期抗原（E1、E2、E4、E5、E6、E7）に対する抗体は症例の85.6%（前記はまたPCRでHPV16陽性の腫瘍を有する）で検出されたが、組織HPV PCRで陰性の症例の61.5%はなお血清学的に陽性であった。これらの血清学的応答は、組織HPV PCR陽性症例の応答と強度及び抗原特異性で類似していた（データは示されていない）。HPV-OPCの10-15%はHPV16以外のHPVサブタイプと密接に関係しているので、我々は、当該血清学アッセイは、血清陽性でPCR陰性集団における他のHPVサブタイプとの交差反応である可能性を排除できない。第二の可能性は、本実験で用いたHPV16 PCRアッセイには感度に限界があるということで（偽陰性）、これは本実験のp16検査では確認できない。 30

我々のデータは、新規にHPV-OPCと診断された患者におけるE6及びE7抗体の検出を示した発表済み研究を確認しさらにそれを拡張した。ここでは、我々はHPV-OPC患者（n=111）の79.3%でE6及びE7抗体を検出している。我々の結果は、独立したマルチセンターHOTSPOT研究に由来するHPV-OPC患者（n=119）の76.0%における我々のE6及び/又はE7抗体の発見と類似し、HPV-OPCの血清学的検出における限定的な地域的又は技術的変動の存在が示唆される。

これはまた、HPV状況の規定における相違（本実験ではPCR、HOTSPOTではp16/ISHが用いられた）がこれらの結果に顕著には影響しないことを示唆している。ヒト細胞溶解物及びアッセイの広範囲の最適化を利用するin vitroタンパク質発現の技術的改善はプログラム可能ELISAの検出の分析限界を向上させ、一方で変動及びバックグラウンドを最小限にした。初期抗原の完全なパネルを用いるとき、検出感度は98%の特異性で90%に改善され、HPV-OPC検出のために多変数シグネチャーを使用することが強く支持される。 40

【0020】

我々のデータの注目に値する発見はこれらの患者でHPV16に対する血清学的応答の不均一性であり、その生物学的又は臨床的重要性は不明である。患者血清の大半（79.3%）がE6及び/又はE7に対する抗体を有するが、複数の他の初期遺伝子（E1、E2及びE4を含む）に対する抗体もまた特異的に検出される。これはHPVOPCに特有である。なぜならばこれらの抗体は、侵襲的な子宮頸癌の患者の血清ではほとんど検出されないからである。E1抗体はE2抗体と強い相関性を有し、E4抗体はE7抗体を有する患者のサブセット（25.7%）で検出されただけである。患者の5%がE1/E2抗原に対する抗体を単離させ、E6/E7抗体を含まな 50

った。

液性免疫は抗原発現によって誘発されるので、個々のHPV抗原に対する血清学的応答における患者間変動は腫瘍における抗原発現の相違の結果であると我々は推測する。実際、IHCによってE6及びE7発現の変動が観察される。この時点で、OPC組織におけるE1、E2、E4又はE5抗原のタンパク質発現に関するデータは発表されていない。子宮頸部疾患では（この場合、疾患の進行における病因としてのウイルスの動力学的役割はより理解されている）、E2はCIN II/IIIで高度に発現され、さらに発現はウイルスの組み込み及びE6/E7の脱抑制のために減少する。したがって、我々は、E2（及びおそらくE1、E4及びE5）に対する抗体は、HPV-OPCの発達ではE6/E7抗体よりも早期に検出できると予測する。

HPV初期抗原に対する抗体の生物学的帰結は不明である。これらの抗体は、異形成のない子宮頸部（CIN0/1）のHPV感染を有する患者ではほとんど検出されず（Rocheのリニアアレイで測定）、これらの抗体は、急性感染のバイオマーカーではなく癌のバイオマーカーであることを提唱している。2つの実験は、E6及び/又はE7タンパク質に対する抗体はHPV-OPCの臨床的予後判定の改善と密接に関係することを示しているが、これはより大きなHPV-OPCコホートでの今後の確認を待つ。

【0021】

表3：トレーニングセット並びに検証セットの症例及びコントロールにおけるHPV16 IgG検出のためのRLU比及び範囲

RLU比* (範囲)						
トレーニングセット			検証セット			
症例 (N=128)	コントロール (N=125)	p	症例 (N=128)	コントロール (N=125)	p	
中央値 (範囲)			中央値 (範囲)			
E1	2.98 (0.72-108.04)	1.17 (0.63-5.25)	<0.0001	6.17 (0.55-149.09)	1.11 (0.64-3.23)	<0.0001
NE2	1.77 (0.64-35.99)	1.05 (0.56-4.31)	<0.0001	1.75 (0.46-42.11)	1.07 (0.59-5.90)	<0.0001
CE2	4.90 (0.60-161.88)	1.08 (0.65-12.10)	<0.0001	7.07 (0.73-203.62)	1.05 (0.73-5.55)	<0.0001
E4	1.24 (0.41-31.44)	1.04 (0.58-4.82)	<0.0001	1.51 (0.40-98.24)	1.04 (0.38-3.06)	<0.0001
E5	0.99 (0.56-2.28)	0.96 (0.51-1.77)	0.3005	1.04 (0.53-2.12)	0.99 (0.59-1.77)	0.0315
E6	2.43 (0.63-31.22)	1.06 (0.41-2.07)	<0.0001	2.67 (0.46-27.06)	1.04 (0.50-6.01)	<0.0001
E7	6.14 (0.49-137.54)	1.01 (0.54-3.21)	<0.0001	8.07 (0.59-141.79)	0.96 (0.62-5.96)	<0.0001
L1	1.08 (0.55-7.50)	0.99 (0.53-2.56)	0.0035	1.11 (0.39-5.97)	1.00 (0.52-3.16)	<0.0001
L2	1.04 (0.61-2.95)	1.01 (0.47-9.62)	0.4859	1.05 (0.42-2.01)	1.04 (0.55-2.95)	0.9555

【0022】

特異的なHPV16抗体はHPV+の口腔咽頭癌の改善された予後判定の予測を可能にする

ヒトパピローマウイルス16型（HPV16）は口腔咽頭癌（OPC）の大半の原因である。本明細書に記載するように、HPV16タンパク質特異的抗体（Ab）はHPV16+のOPCの改善された予後判定のための潜在的バイオマーカーである。

HPV16抗原E1、E4、E6、E7、L1、L2、並びにE2のN-末端及びC-末端フラグメント（NE2、CE2）を注文プログラムが可能なELISAアッセイを用いて定量した。血清は、診断時にHPV+のOPC患者でPCRによって確認された97人から入手した。各抗原の中央値蛍光強度（MFI）値のコントロールGSTタンパク質に対する比を決定した。臨床所見との関係はCox比例ハザード回帰によって決定した。

HPV16 E1及びNE2特異的IgGレベルの存在は両抗体とも、HPV16+の患者で全生存及び無再発生存の改善と密接な関係にあった（ $p < 0.05$ ）。調査期間の終了時に生存していた患者の追跡期間中央値は、全生存では49カ月で無再発生存では46カ月であった。全生存の場合、喫煙（ >10 パック年対 ≤ 10 パック年）、アルコール使用（経験対なし）、Tカテゴリー（T3-4対T0-2）、及び部位の詳細（T/BOT対他の場所）について調整したとき、ハザード比は、E1抗体陽性で0.2、及びNE2抗体陽性で0.2であった（それぞれ $p = 0.029$ 及び $p = 0.022$ ）。E6抗体陽性は死亡リスクの70%減少と密接な関係を示したが、これは多変数調整後には統計的に有意ではなかった（ $HR = 0.3$ 、 $p = 0.074$ ）。無再発生存の場合、調製されたハザード比は、E1抗体陽性で0.2、及びNE2抗体陽性で0.2であった（それぞれ $p = 0.014$ 及び $p = 0.020$ ）。

したがって、我々は、改善されたHPV16+のOPCの全生存及び無再発生存と密接な関係を

示すHPV16特異的抗体を識別した。

さらに、我々はまた、頭頸部癌のための潜在的診断バイオマーカーであるHPV16抗原パネルを識別した。我々は以前に個々の抗原を識別し、我々は、今やこれらの癌の検出のためにこれらの抗原の最適パネルについてはるかに大きなデータベースを有する詳細な情報を提供する。このパネルに含まれない追加的HPV抗原もまた有益でありうる。

【0023】

これまでのところ、HPV+の頭頸部癌の早期検出のためのバイオマーカーは存在しない。HPV16のE6及びE7タンパク質に対する抗体が潜在的な診断抗原として識別された。我々は、完全なHPV16プロテオームのための新規なアッセイを開発し、癌検出（及び再発の可能な検出又は治療のモニタリング）のためにこれら抗原のパネルの特別な有用性を示した。

我々がHPV+の頭頸部癌のための潜在的な予後判定バイオマーカーとして識別した3つの抗原は、HPV16 E1、E2のN-末端、及びE6タンパク質に対する抗体である。HPV+の頭頸部癌を有する全ての患者が、標準的な頭頸部癌の治療法を受ける。しかしながら、全体として彼らの予後は良好で、低用量の放射線及び/又は化学療法により恩恵を受けることができる。我々はアッセイを開発して、極めて良好な予後を有するこれらの患者のサブセットを識別した。

我々は注文プログラムが可能なELISAアッセイを開発し、迅速抗原タンパク質in situディスプレイ（Rapid Antigenic Protein In situ Display (RAPID)）と名付けた（前記は、患者血清中のHPV抗原に対する抗体の検出用である）。RPID ELISAは、タグ付きタンパク質による抗原ディスプレイのためにin situタンパク質発現及び捕捉を利用して、HPV16のプロテオームとともに腫瘍抗原p53（p53変異癌を有する患者の20%で高度に免疫原性である）の効果的かつ特異的なディスプレイを可能にする。本実験で、我々はHPV+のOPCの診断のためのバイオマーカーとしてHPV16抗体の有用性を精査した。我々は、新規にOPCと診断された患者の血清を過去に遡って広範囲に収集し、HPV16プロテオーム全体の血清学、疾患の状況、年齢、喫煙、及び腫瘍HPV状況間における相関性を査定した。

OPC疾患分析で用いた血清は、テキサス大学M.D.アンダーソン癌センター（Houston, TX）での治療開始前の血清から選別した（n=256）。コントロール患者血清は、オレゴン衛生と科学大学（Oregon Health and Science University, Portland）（OR（セット#1、n=78））及びテキサス大学M.D.アンダーソン癌センター（セット#2、n=50）によって入手した。標準化サンプル収集プロトコルを用いて全てのサンプルを収集し、使用まで-80℃で保存した。全ての対象者から施設内審査委員会の承認の下に書面によるインフォームドコンセントを得た。

【0024】

ゲートウェイ適合ドナー系を含む、配列検証済み完全長cDNA発現プラスミド（pANT7_cGST）をDNASUプラスミドレポジトリ（アリゾナ州立大学、バイオデザイン・インスティテュート）から入手した（前記はdnasu.org/DNASU/.でオンライン公開されている）。DNAを精製し、pANT7_cGSTベクターに挿入した。Magplex(商標)磁性カルボキシル化微小粒子（Luminex Corporation, Austin, TX）を1,000,000ビーズに対して5µgの抗GST抗血清（GE Healthcare, Piscataway, NJ）比で結合させた。ヒトHeLa細胞溶解物（Thermo Scientific, Waltham, MA）を500ngのDNAとともに用い、各HPV遺伝子をGST-融合タンパク質として発現させた。GST-コントロールベクターを陰性コントロールタンパク質として発現させた。HPV16 E2遺伝子は最適タンパク質発現のためにN-及びC-末端フラグメントとして発現させた。

以下の修正を加え、本質的に当業界で公知のビーズアレイELISAを実施した。ヒトHeLa細胞溶解物を用いてin vitro転写/翻訳（IVTT）を実施し、生成物をそれぞれMagPlex(商標)微小球（Luminex）に捕捉し、プールし、さらにSeaBlock（Thermo Scientific, Rockford, IL）で希釈したHeteroBlock(商標)（Omega Biologicals, Bozeman, MT）を用いてブロックした。1：80に希釈した血清をプールしたビーズとともにブロック緩衝液で一晩4℃にてインキュベートした。検出のために、フィコエリトリン標識ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA）を1：10,000で添加し、続

いて中央値蛍光強度（MFI）を検出した。非特異的及びGST特異的抗体を管理するために、個々のHPV特異的抗体のMFI対コントロールGST抗原のMFI比を測定した。

シングルプレックスプログラム可能ELISAは、いくつかの重要な修正を加えながら本質的にはビーズアレイELISAにしたがって実施した。上記に特記したように、*in vitro*転写/翻訳（IVTI）はヒトHeLa細胞溶解物を用いて実施し、生成物をそれぞれ抗GST（供給源）被覆96ウェルプレート（プレートの型）上で捕捉した。血清は1：80に希釈し、超音波で調製した大腸菌DH5a細胞の溶解物でブロックした。結合IgGはヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA）及びECLを用いて検出した。

症例は、腫瘍PCRによってE6及び/又はE7 DNAが存在すればHPV陽性と決定された。

【0025】

Luminex xPONENTソフト（EMD Millipore, Billerica, MA）（50カウント/分析）を用いて、正味のMFI測定をMagpix(商標)マルチプレックスプラットフォーム上で実施した。全アッセイを2組ずつで実施し、値は平均値としてプロットした。切り捨て値を確立するために、78コントロールサンプルの（平均+3標準偏差）を超えるMFI比を陽性とした。これらのレベルは以下のとおりであった：E1：1.4、CE2：2.4、NE2：1.5、E4：2.7、E5：1.5、E6：1.7、E7：2.2、L1：1.4、L2：1.4。比較はマン-ホイットニーのノンパラメトリック分析（GraphPad Prismバージョン5.0c（San Diego, CA））を用いて実施した。二項ロジスティック回帰識別因子モデリングを用い、我々は、抗体セットの全ての組合せのOPC癌早期診断性能を比較する基礎として受信者動作特性曲線（ROC）下の面積を計算した。

OPCを有する患者をこの実験の資格有りと認定した。処置前血液サンプルを症例対象者から入手した。258症例からHPV16の血清学を入手した。2症例は、彼らが遠位転移を示したときに更なる調査から除外した。当該256症例で、HPV腫瘍PCRによって決定されたHPV状況が137症例について得られた。P16免疫染色は22症例で実施され、ISHは55症例で実施された。コントロール（セット#1、n=79）は、オレゴンの頭部首の癌診療所を訪れた健常ドナーから選択した。1人のコントロールは扁桃腺の癌の病歴のために除外した。症例及びコントロールの身上歴は表1に提示されている。年齢、性別及び居住地による潜在的な偏向を管理するために、コントロールサンプルの第二のセット（セット#2、n=50）はMDアンダーソンの健常ドナー集団から選択された。

【0026】

症例の血清は処置前に収集した。コントロールの血清及び質問票は、癌病歴のないポートランド（ORエリア）の健常な男女から収集した。症例及びコントロール血清でHPV16抗原に対する血清IgG抗体をMageProBEによって測定した（図3）。非特異的及びGST特異的自己抗体バックグラウンドの管理のために、個々のHPV特異的抗体のMFI対コントロールp21-GST抗原のMFIの比を取得した。それぞれ個々の抗原に対するこれらの値の平均及び範囲は表3に提示されている。コントロールから得た切り捨て値を用いたとき、少なくとも1つのHPV16抗体が、健常コントロール（11/78（14.1%））と比較してOPCの225/256（87.9%）の血清で検出された。患者の大半は、E1、CE2、NE2、E6及び/又はE7についてそれぞれ69.1%（177/256）、47.3%（121/256）、77.3%（198/256）、74.6%（191/256）、及び64.8%（166/256）のパーセンテージで陽性であった。1つ以上の陽性抗体が存在すれば、症例は血清学的にHPV陽性と決定した。

PCRによってHPV腫瘍状況を試験した137症例で、111人（81.0%）がHPV腫瘍陽性と決定され、26人（19.0%）がHPV腫瘍陰性であった。

血清学の結果及び腫瘍PCRによるHPV状況を比較した。HPV腫瘍陽性症例で、100/111（90.0%）がまた少なくとも1つのHPV抗原について血清学的に陽性であった。HPV腫瘍陰性症例の18/26（69.2%）が少なくとも1つのHPV抗原について血清学的に陽性であった。CE2及び/又はNE2のどちらかに対する抗体の存在はHPV腫瘍陽性OPCと密接な関係を有し（OR、5.8；95%CI）、E6及び/又はE7のどちらかに対する抗体の存在と同様であった（OR、4.1；95%CI）。喫煙について調整したとき、10バック年以下の喫煙をして、かつCE2及び/又はNE2に対して血清陽性だった者は、HPV陽性OPCの確率において22倍（OR、22.3；95%CI）増加と密接な関係を示した。E6及び/又はE7陽性の喫煙者もまた、HPV陽性OPCの確率において12

10

20

30

40

50

倍 (OR、11.8 ; 95%CI) 増加と密接な関係を有した。

我々は、OPC患者及び健常コントロールサンプルでHPV16 E1、E2、E4、E6、E7及びL2抗体レベルを比較した ($p < 0.0001$ 、ウィルコクソン順位和検定)。HPV腫瘍陽性状況のサブセット ($n=113$) について、我々は4抗体バイオマーカーパネル (NE2、CE2、E6、E7) を識別した。このパネルの最適作動点は97%特異性で90%であった ($AUC=0.96$)。このAUCは、偽陽性率がほぼ2.5%の値に相当する。

【0027】

頭頸部癌の予後判定のためのHPV血清学

ヒトパピローマウイルス16型 (HPV16) は大半の口腔咽頭癌 (OPC) の原因である。特異的HPV16タンパク質に対する抗体は、HPV16+のOPCの予後判定の改善のための潜在的バイオマーカーである。

合計209人の患者が最後の分析に含まれた。これらのうちで、114人はサブグループ分析のために利用できる腫瘍HPV16状況を有し、これらの患者のうち96人はHPV16陽性腫瘍を有していた。生存患者の追跡期間の中央値は62.7カ月 (範囲は3.9から96.9カ月) であった。HPV16陽性腫瘍を有する生存患者の追跡期間の中央値は68.9カ月 (範囲は4.1から92.5カ月) であった。利用可能なHPV16状況をもつ患者ともたない患者との間では生存に関して相違はなかった ($P=0.577$)。

無増悪生存はいずれかのE抗体が陽性の患者でより良好であったが (図5A)、いずれかのL抗体で陽性の患者では生存利益は認められなかった (図5B) (それぞれ $P < 0.001$ 及び $P = 0.657$)。したがって、我々はその後の分析ではL抗体状況を除外した。

HPV16 E1及びNE2特異的IgGレベルの存在は両抗体とも、HPV16+の患者で全生存及び無再発生存の改善と極めて密接な関係にあった ($p < 0.05$)。調査期間の終了時に生存していた患者の追跡期間中央値は、全生存では49カ月で無再発生存では46カ月であった。全生存の場合、喫煙 (>10 パック年対 <10 パック年)、アルコール使用 (経験対なし)、Tカテゴリー (T3-4対T0-2)、及び部位の詳細 (T/BOT対他の場所) について調整したとき、ハザード比は、E1抗体陽性で0.2、及びNE2抗体陽性で0.2であった (それぞれ $p = 0.029$ 及び $p = 0.022$)。E6抗体陽性は死亡リスクの70%減少と密接な関係を示したが、これは多変数調整後には統計的に有意ではなかった ($HR=0.3$ 、 $p=0.074$)。無再発生存の場合、調整されたハザード比は、E1抗体陽性で0.2、及びNE2抗体陽性で0.2であった (それぞれ $p = 0.014$ 及び $p = 0.020$)。

【0028】

いずれかのE抗体が陽性の患者は、全てのE抗体が陰性の患者よりも良好な全生存及び無増悪生存を有した：5年全生存の概算はそれぞれ87.4%及び42.2%で、5年無増悪生存の概算はそれぞれ82.9%及び46.1%であった (両方について $P < 0.001$)。多変数Cox比例ハザード回帰では、いずれかのE抗体が陽性の患者は、死亡 (HR 、0.2 ; 95%CI、0.1–0.4) 及び進行リスク (HR 、0.2 ; 95%CI、0.1–0.5) の80%低下を示した (表4)。NE2陽性、E1陽性、及びE6陽性は、死亡リスクを80%まで、さらに進行リスクを70%まで低下させた (表4)。喫煙は生存の強力な予測因子であり、かつHPV陽性腫瘍をもつ患者は非喫煙者又は軽度喫煙者である可能性が高いので、我々はまた10パック年以下の喫煙歴を有する患者のサブセットを評価した。これらの患者 ($n=130$) では、いずれかのE抗体の陽性はまた、死亡リスク (HR 、0.1 ; 95%CI、0–0.7) 及び進行リスク (HR 、0.1 ; 95%CI、0–1.0) の有意な減少と密接に関係していた (表4)。非喫煙者及び軽度喫煙者では、完全なコホートで観察したような個々の抗体との強い結びつきは観察されなかったが、それにもかかわらず、抗体陽性患者間では生存の改善傾向がこのサブセットで認められた。

【0029】

E抗体状況及び腫瘍HPV16 DNA状況による患者間の生存における相違を比較するために、我々は Kaplan-Meier 曲線を作成した (図6)。図6AはE抗体状況による無増悪生存を示し、図6Bは腫瘍HPV16 DNA状況による無増悪生存を示す。E抗体陽性及びHPV16腫瘍陽性はより良好な生存と密接に関係していたが、E抗体状況はより強力な予測因子であるように思われた (E抗体状況では $P < 0.001$ 、及びHPV16では $P = 0.016$)。このことは多変数Cox

比例ハザード回帰で確認された（前記ではE抗体陽性及びHPV16陽性の両方が全生存及び無増悪生存の両方の強力な予測因子であった）。多変数調整後は、E抗体陽性患者は死亡リスクが80%減少し（95%CI、0.1–0.5；年齢、喫煙及び治療について調整）、さらに腫瘍HPV16陽性患者もまた死亡リスクが80%減少した（95%CI、0.1–0.7；年齢、喫煙、治療及びTカテゴリーについて調整）。同様に、E抗体状況及びHPV16状況は両方とも無増悪生存と極めて密接に関係していた（E抗体ではHR、0.2；95%CI、年齢、喫煙及び治療について調整後に0.1–0.5、さらにHPV16ではHR、0.2；95%CI、年齢、喫煙、Tカテゴリー及び部位の詳細について調整後に0.1–0.7）。

我々はROC曲線を用いて、209人の患者の全てについて疾患の再発を予測するためにE抗体の最良の組合せを決定した。NE2、E4、E6及びE7の組み合わせは最高の正確さを示し、最適動作点は70.2%の特異性で71.4%であった（AUC=0.71）。E1、CE2及びE5の添加は前記を改善しなかった。加えて、NE2及びE6単独の正確さは前記組み合わせ抗体と対比して良好であった（AUC=0.69及びAUC=0.61（データは示されていない））。

HPV16陰性腫瘍を有する患者では、E抗体陽性は、全生存又は無増悪生存に対する明白な予測値をもたなかった（データは示されていない）。しかしながら、分析をHPV16腫瘍陽性患者（PCRによる）に制限するとき、血清学的にE抗体陽性患者は、血清学的にE抗体陰性患者に匹敵する生存利益を維持した（図7）。この密接な関係は多変数調整の後でも有意なままであった（HR、0.3；95%CI、0.1–0.9（全生存）、及びHR、0.3；95%CI、0.1–0.8（無増悪生存））。特に、NE2、E1及びE6に対する抗体は全生存及び無増悪生存の強力な予測因子のままであった。

図8は、再発状況に応じた、HPV陽性OPC患者の時間経過におけるE1、NE2及びE6の中央値抗体レベルを示す。再発しなかったランダムに選択された23人の患者のサブセットは、再発した8人の患者よりも高い中央値抗体レベルを有したが、サンプルサイズが小さいために、我々はこれらグループ間で統計的に有意な相違を検出できなかった。

【0030】

考察

我々は、E1、NE2及びE6 HPV16陽性はいずれも、全コホート及び既知のHPV16陽性腫瘍を有する患者で全生存及び無増悪生存の向上と極めて密接に関係していることを見出した（ $P<0.05$ ）。我々はまた、コートタンパク質Lに対する抗体について血清が陽性であることは生存を予測しないことを見出した。したがって、我々は、HPV+のOPCの全生存及び無再発生存の向上と密接に関係する3つのHPV16特異的抗体を識別した。この証拠は、HPV媒介発癌に必要とされる抗原に対する血清学的応答は弁別的に癌の出現を予測できるが、感染プロセスに重要な抗原（Lタンパク質）に対する血清学的応答はそうではないことを提唱している。我々の発見は、癌の出現は部分的には免疫応答によって示され、さらにE抗体は発癌性変化及び予後のバイオマーカーでありうるという結論を支持する。

E6及びE7に対する血清学的応答（前記は大半の調査の焦点である）の査定に加えて、我々は、生存についてのマーカーとして有用でありうる、より広範なHPV16タンパク質アレイに対する血清学的応答を査定した。我々は、以前にE6及びE7抗体陰性のHPV16陽性腫瘍を有する患者の小さなサブセットはE1及びNE2抗体陽性であることを示した（これはHPV16血清学的試験及び診断には複数のマーカーを含むことが必要であることを示している（23））。さらに最近、我々は、256の症例及び250のコントロールを含む調査で、E抗体陽性の個体間でOPCのリスクの劇的な増加を示した（データは示されていない）。我々は、いずれかのE抗体が陽性である者は、全てのE抗体が陰性である者のOPCリスクの244倍のリスクを有することを見出した。さらにまた、HPV16 DNA陽性の腫瘍を有する患者は、HPV16 DNA陰性腫瘍を有する患者よりもいずれかのE抗体が陽性である確率が4倍高く、この密接な関係は、非喫煙者又は軽度喫煙者であるHPV16陽性腫瘍患者で特に強い。

【0031】

表4：処置前抗体状況と全生存及び無増悪生存との密接な関係についてのCox比例ハザード回帰

	全患者 (N=209)		≤10バック年の患者 (N=130)		腫瘍HPV陽性患者 (N=96)	
	粗HR(95%CI)	調整HR(95%CI)	粗HR(95%CI)	調整HR(95%CI)	粗HR(95%CI)	調整HR(95%CI)
全生存(a)						
E1+対E1-	0.3 (0.1-0.5)	0.3 (0.2-0.5)	0.5 (0.2-1.3)	0.5 (0.2-1.4)	0.2 (0.1-0.6)	0.3 (0.1-0.7)
NE2+対NE2-	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.4)	0.3 (0.1-1.2)	0.5 (0.1-1.8)	0.1 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.6)
CE2+対CE2-	0.4 (0.2-0.8)	0.5 (0.2-1.0)	0.8 (0.3-2.1)	0.8 (0.3-2.1)	0.5 (0.2-1.4)	0.6 (0.2-1.6)
E4+対E4-	0.5 (0.2-1.2)	0.4 (0.2-1.0)	0.2 (0-1.4)	0.2 (0-1.6)	0.2 (0-1.6)	0.3 (0-2.2)
E5+対E5-	NC	NC	NC	NC	NC	NC
E6+対E6-	0.2 (0.1-0.4)	0.3 (0.2-0.6)	0.3 (0.1-0.8)	0.5 (0.2-1.3)	0.3 (0.1-0.7)	0.3 (0.1-0.9)
E7+対E7-	0.5 (0.3-1.0)	0.7 (0.3-1.3)	1.3 (0.4-3.9)	1.2 (0.4-3.8)	0.6 (0.2-1.5)	0.9 (0.3-2.6)
任意のE+対全-	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.4)	0.1 (0-0.8)	0.1 (0-0.7)	0.1 (0.1-0.4)	0.3 (0.1-0.9)
無増悪生存(b)						
E1+対E1-	0.3 (0.2-0.6)	0.4 (0.2-0.7)	0.7 (0.3-1.8)	0.7 (0.3-1.9)	0.3 (0.10-0.7)	0.3 (0.1-0.7)
NE2+対NE2-	0.2 (0.1-0.4)	0.3 (0.1-0.5)	0.5 (0.1-1.6)	0.5 (0.1-1.8)	0.1 (0.05-0.3)	0.2 (0.1-0.6)
CE2+対CE2-	0.5 (0.3-0.9)	0.5 (0.3-1.0)	1.0 (0.4-2.4)	1.1 (0.4-2.6)	0.5 (0.19-1.3)	0.5 (0.2-1.4)
E4+対E4-	0.5 (0.2-1.2)	0.4 (0.2-1.0)	0.3 (0.1-1.4)	0.3 (0.1-1.4)	0.4 (0.09-1.8)	0.5 (0.1-2.3)
E5+対E5-	NC	NC	NC	NC	NC	NC
E6+対E6-	0.3 (0.2-0.5)	0.4 (0.2-0.7)	0.4 (0.2-1.0)	0.5 (0.2-1.5)	0.3 (0.11-0.7)	0.3 (0.1-0.9)
E7+対E7-	0.6 (0.3-1.0)	0.6 (0.4-1.2)	1.3 (0.5-3.7)	1.8 (0.6-5.4)	0.5 (0.19-1.2)	0.7 (0.3-1.9)
任意のE+対全-	0.2 (0.1-0.4)	0.2 (0.1-0.5)	0.2 (0-1.3)	0.1 (0-1.0)	0.1 (0.05-0.4)	0.3 (0.1-0.8)

10

^a 全患者：年齢、喫煙及び処置について調整；≤10バック年の患者：年齢及び処置について調整；HPV陽性患者：年齢、喫煙及びTカテゴリーについて調整。

20

^b 全患者：年齢、喫煙及び処置について調整；≤10バック年の患者：年齢、Nカテゴリー及び処置について調整；HPV陽性患者：年齢、喫煙及びTカテゴリーについて調整。

NC：細胞が0のため計算不能

【0032】

口腔ヒトパピローマウイルス (HPV)

以前に記載したPGMY 09/11プライマー及びラインプロットハイブリダイゼーションを用い、36のHPV DNA型について口腔洗浄サンプルを試験した。簡単に記せば、口腔剥離細胞から磁性ビーズ系自動プラットフォーム (QIASymphony SP, Qiagen) を用いてDNAを精製し、続いてPGMY09/11 PCRプライマープール及びβ-グロビンプライマーを用いて36の異なるHPV DNA遺伝子型について分析し、続いてRocheTMリニアアレイに対して逆ラインプロットハイブリダイゼーションを実施した。同じ方法及び検査室を利用して、NHANES 2009-2010の口腔HPV感染データを作成した。提示した全ての口腔洗浄検査の結果はβ-グロビン陽性であった。

30

ベースラインの口腔洗浄サンプルもまた、HPV16ウイルス負荷量について、以前に記載したようにABI 7300リアルタイムPCR系 (Applied Biosystems, Foster City, CA) でTaqMan定量リアルタイムPCR (qPCR) を用いて査定された。口腔剥離細胞におけるHPV DNAの検出は、細胞内DNAに由来する感染性ウイルス粒子を識別することはできない。すなわち、それが伝播されうる活発なHPV感染であるか否か、又はそれが腫瘍細胞 (当該細胞ではDNAは組み込まれてあって感染性ではない) から剥がれ落ちたHPV DNAであるか否かを識別できない。

40

96ウェルプレートのシングルプレックスアッセイとして改変したアンダーソンラブのプログラム可能ELISAによって、血液サンプル (1:100) を、HPV L1、E6及びE7 IgG抗体について中心的に調べた。ヒトHeLa細胞溶解物による転写/翻訳 (IVTT) 系 (Thermo Scientific) を用いてタンパク質を発現させ、超音波によって調製した10%大腸菌DH5αでブロックした。ルミネセンスは、GST-抗原コントロールに対する比として相対的光単位 (RLU) で測定された。陽性血清のための切り捨て値は、健常志願者 (n=81) で観察されるRLU比の平均+3標準偏差と規定した。

in situハイブリダイゼーション (ISH) によるHPV16の集中試験 (n=55)、院内発癌性HPV ISH試験 (n=66)、又は院内p16免疫組織化学 (n=43；そのうちの25例は院内PCR試

50

験を受け、そのうちの88% (22/25) はHPV16陽性であった) を基準にして、164のHPV-OPC症例がHPV陽性と分類されたが、ただしISH及びp16の両方がHPV-OPCの識別のために臨床現場でこれまで用いられていることが条件であった。16の追加症例及びそのパートナーは、HPV16集中試験陰性 (n=8) 又は局在p16陰性 (n=8) 結果により分析から除外された。

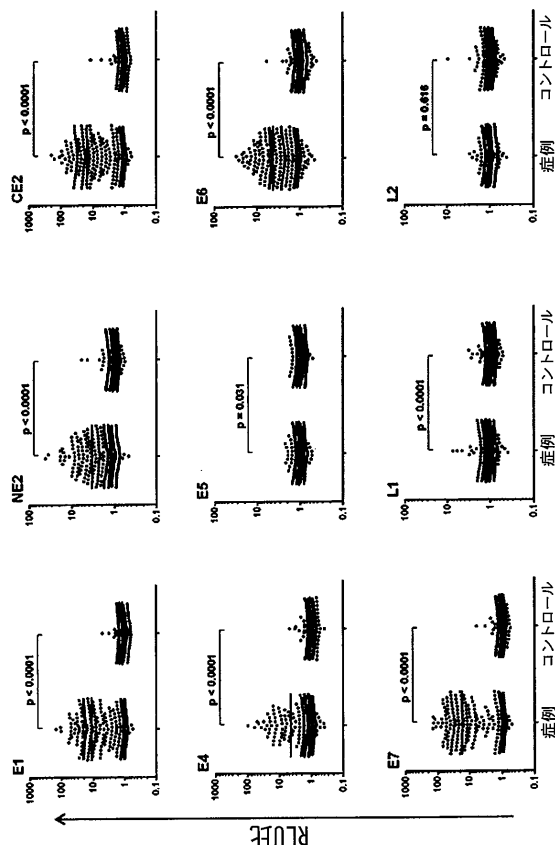
登録パートナーを伴う又は伴わない症例の特性を、カテゴリー変数又は連続変数中央値試験のためのカイ二乗を用いて比較した。症例及びパートナーの口腔HPV有病率を、2009-10 NHANESデータ (本実験患者との適合性のために年齢45-65歳の個体に限定) 由来の人口依拠サンプルの加重有病率と比較した。

口腔洗浄サンプルは、査定した36のHPV型のいずれかがラインプロットで検出されたならば“いずれかの口腔HPV”は陽性とみなされた。“いずれかの発癌性HPV”の罹患は、以下のいずれかの検出と規定された: HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68又は73。HPV16陽性はまた定量的PCR (qPCR) を用いて定量した。このqPCRでは、陽性は通常の検査室カットオフ (被験口腔洗浄サンプル2 μ L中にコピー数が>3コピー) を用いて規定した。コピー数が>0のときには、結果はまた、口腔HPV DNAの可能な低レベル伝播に関する研究仮説のために提示される。

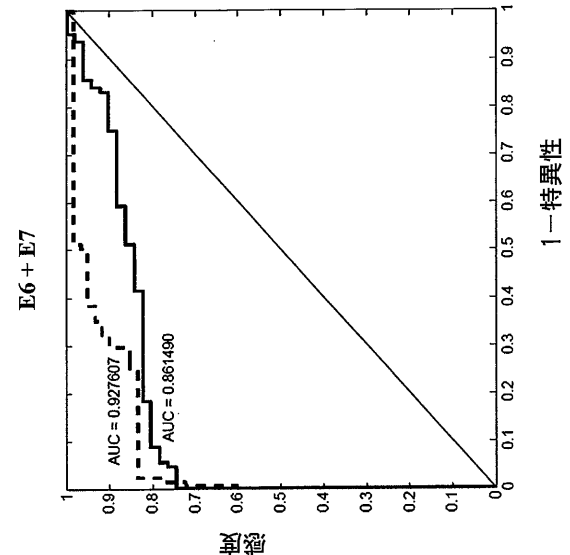
136人のHPV-OPC症例、48人のパートナー及び81人の健常志願者のベースライン血清におけるHPV E6及びE7抗体の検出は図4に示される。血清で検出された特異的HPVタンパク質/コントロールGSTタンパク質に対するIgGのRLU比が示される。

本発明をその詳細な説明と一緒にこれまで述べてきたが、前述の記述は例示を意図し本発明の範囲を限定しようとするものではないことは理解されよう (本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって規定される)。他の特徴、利点及び改変は以下の特許請求の範囲内である。

【図1】

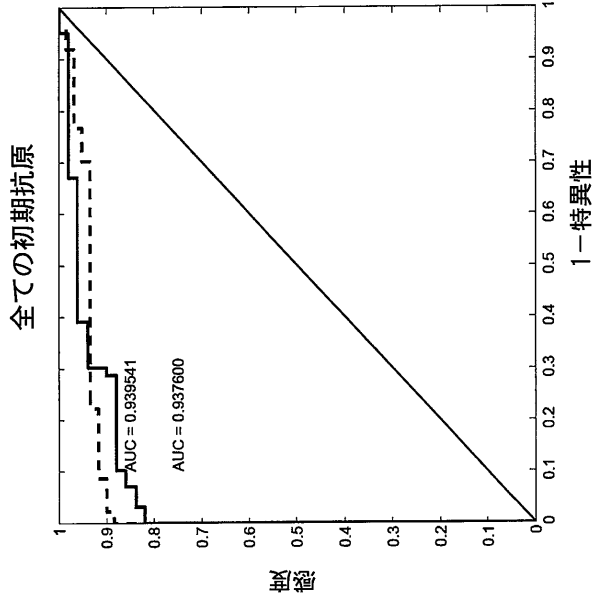


【図2A】



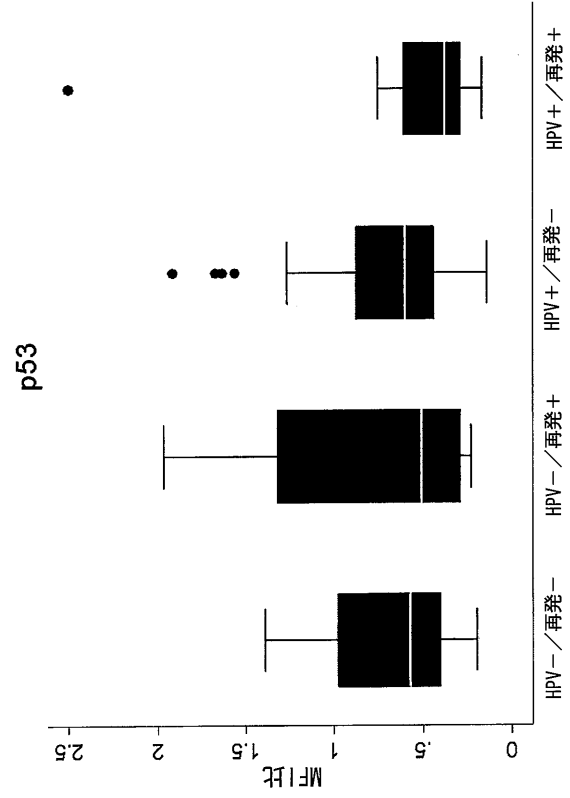
A.

【図 2 B】

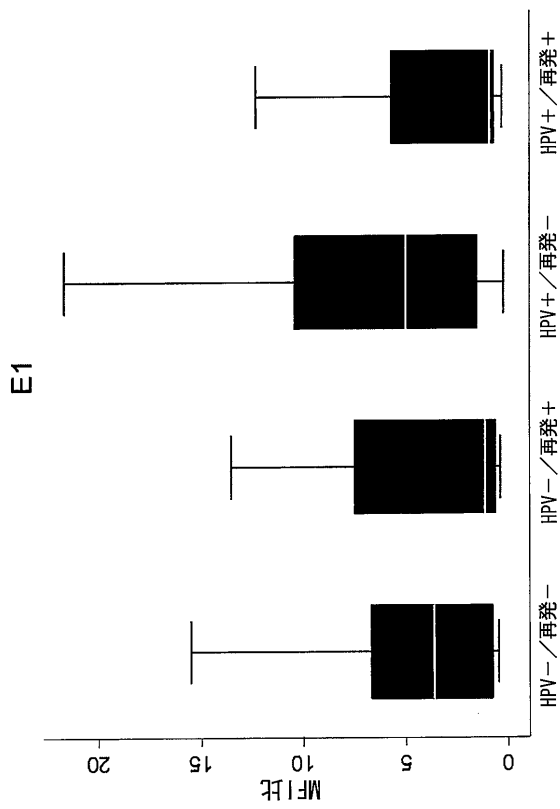


B.

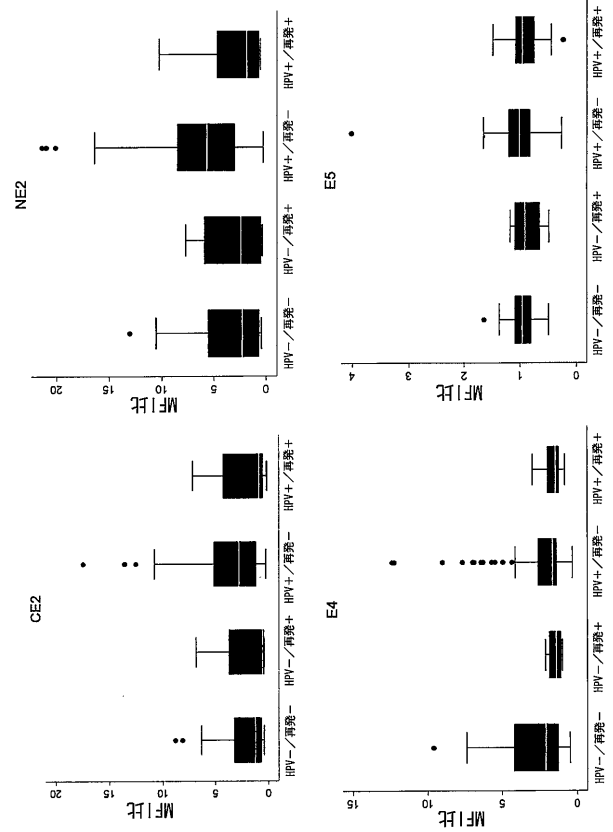
【図 3 - 1】



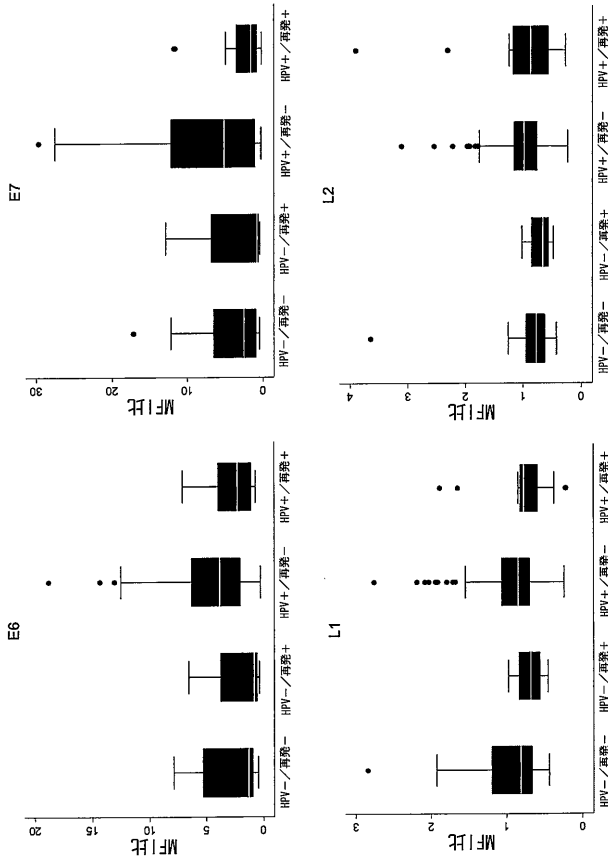
【図 3 - 2】



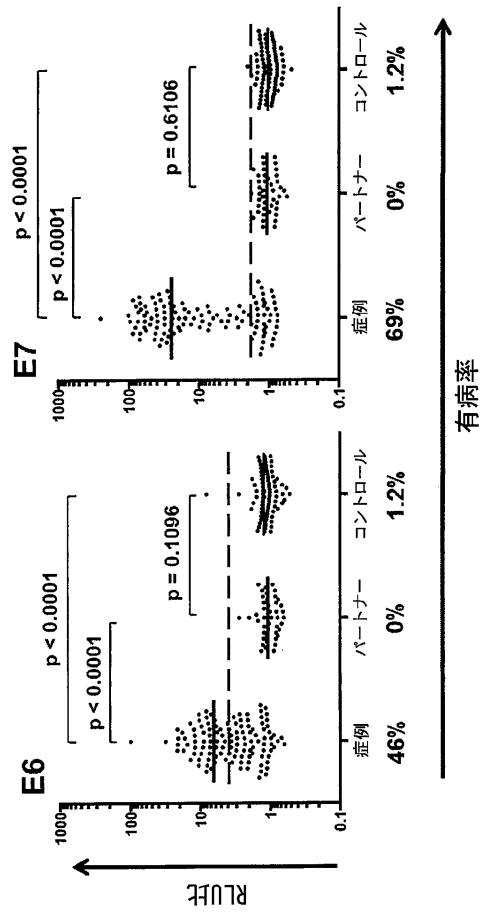
【図 3 - 3】



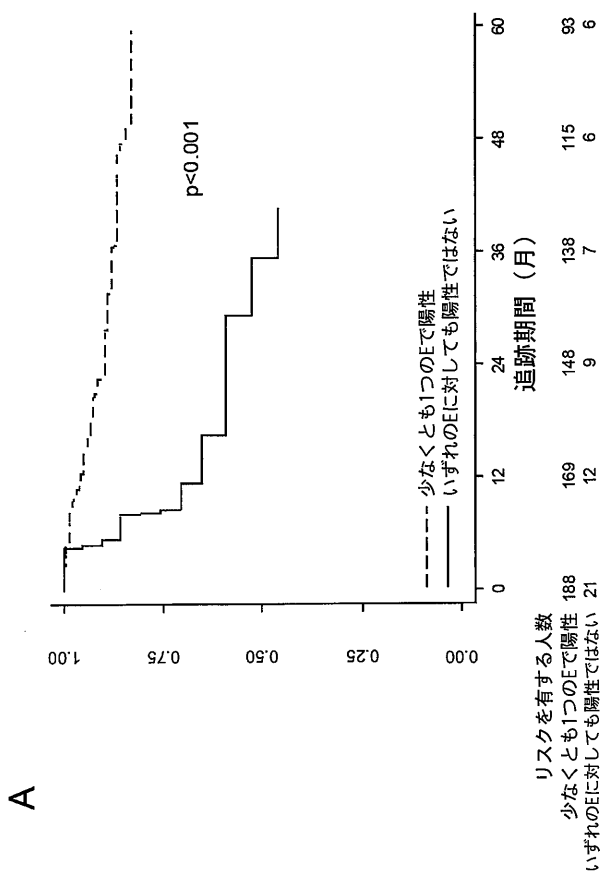
【図 3 - 4】



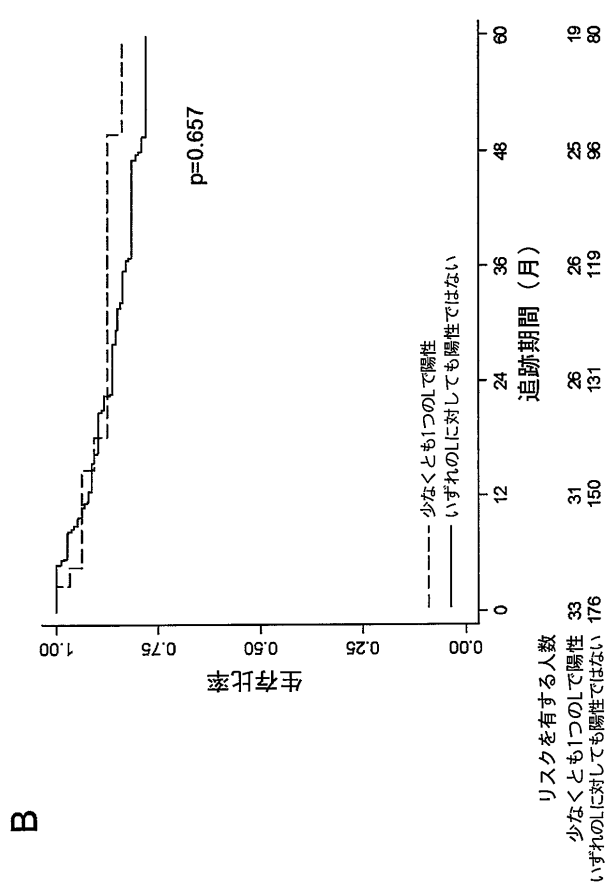
【図 4】



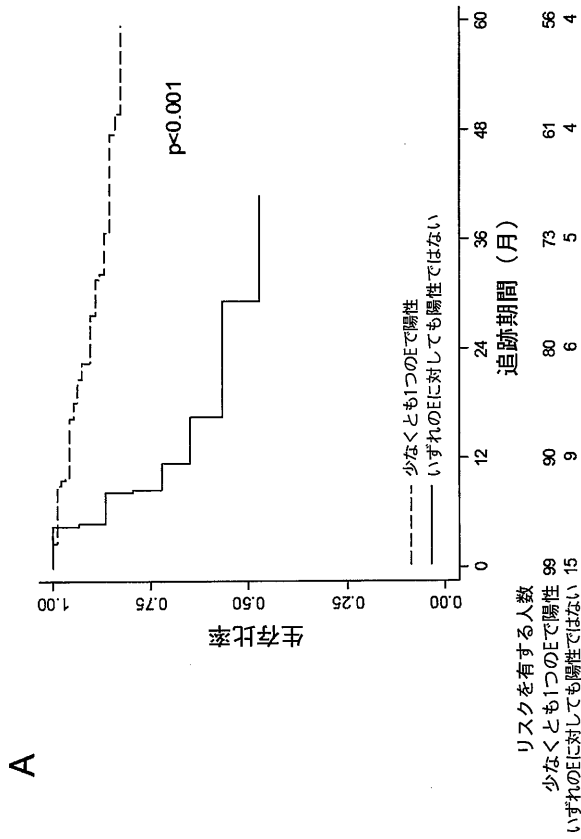
【図 5 A】



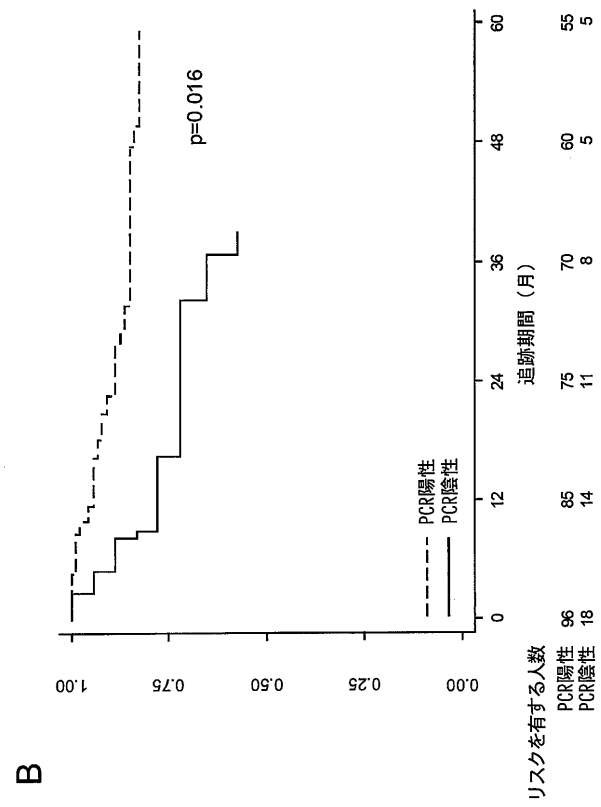
【図 5 B】



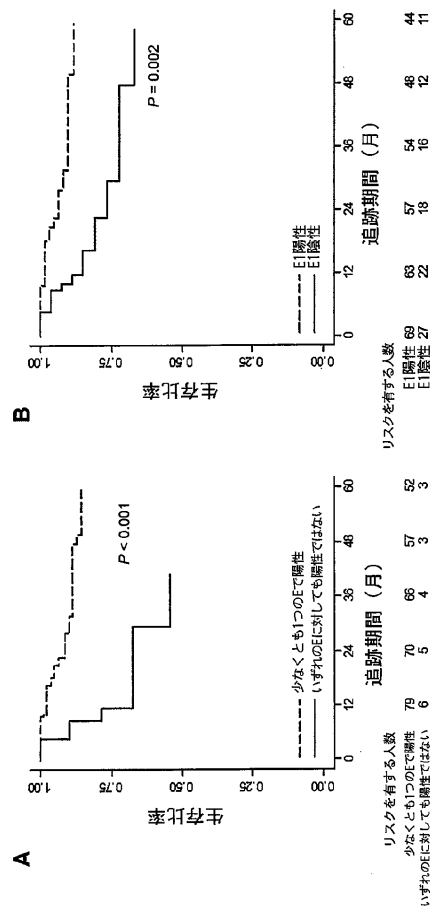
【図 6 A】



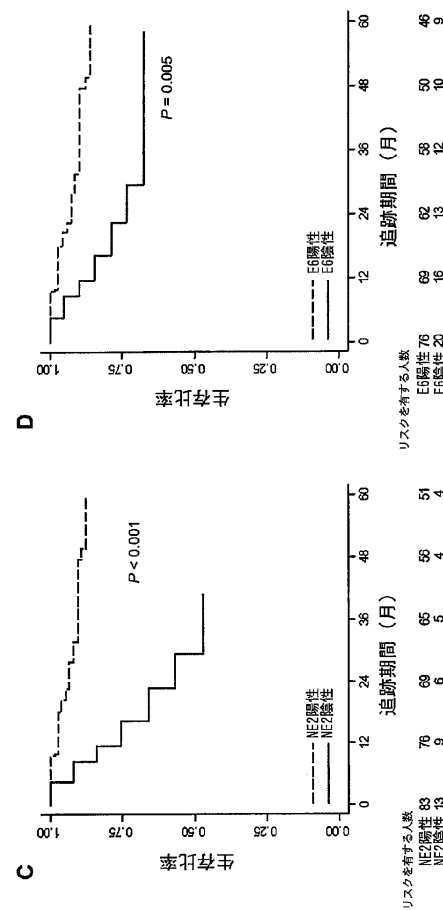
【図 6 B】



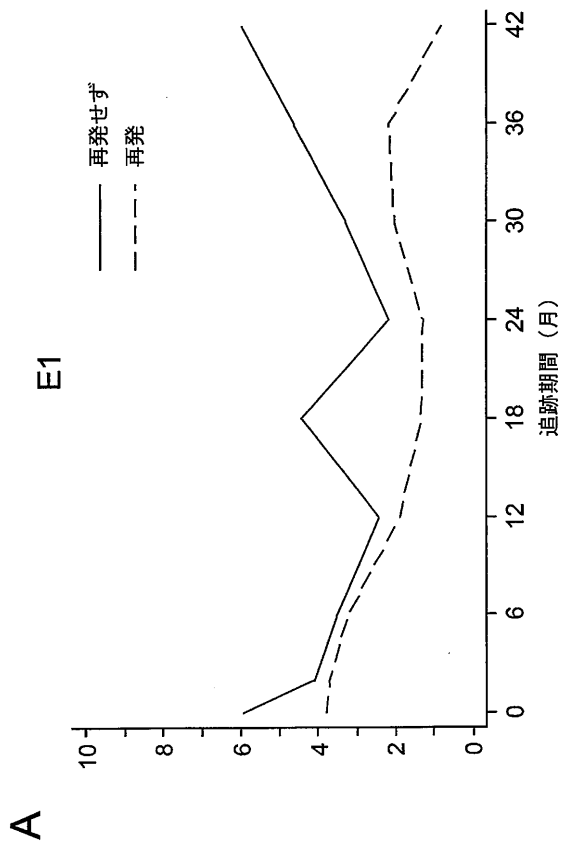
【図 7 A B】



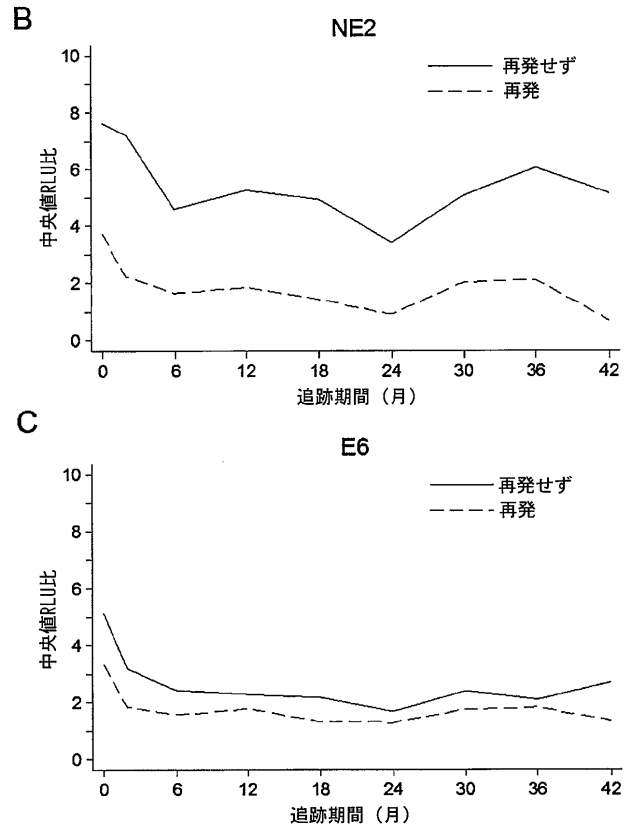
【図 7 C D】



【図 8 A】



【図 8 B C】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/20705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53, 33/574 (2015.01) CPC - G01N 33/53, 33/574 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) IPC(8): G01N 33/574, 33/53 (2015.01) CPC: A61K 38/00; C12Q 1/6886; C07K 16/30; G01N 33/53, 33/574; USPC: 435/7.23, 7.1, 7.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar; PubMed; ScienceDirect; detect, diagnose, 'HPV16,' 'HPV 18,' 'L1,' antibody, 'oropharyngeal carcinoma'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEHR, P et al. HPV Antibody Detection By ELISA With Capsid Protein L1 Fused To Glutathione S-Transferase. Journal of Virological Methods. October 2002; Vol. 106, No. 1; pages 61-70; abstract; page 62, right column, third paragraph; page 63, right column, fourth paragraph; page 65, figure 2; page 65, figure 5. DOI:10.1016/S0166-0934(02)00134-9.	1, 4-11 —
Y	WEINBERGER, P et al. Molecular Classification Identifies A Subset Of Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancers With Favorable Prognosis. Journal of Clinical Oncology. 10 February 2006; Vol. 24, No. 5; pages 736-747; abstract. DOI: 10.1200/JCO.2004.00.3335.	2, 3 2, 3
A	WO 2011/118982 A3 (GYNGEN BIO CO., LTD. et al.) April 5, 2012; abstract	1-11
☐ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 May 2015 (20.05.2015)		Date of mailing of the international search report 19 JUN 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

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

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100196405

弁理士 小松 邦光

(72)発明者 アンダーソン カレン

アメリカ合衆国 アリゾナ州 85251 スコッツデール イースト カーレ ローザ 6135

(72)発明者 ポスナー マーシャル

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10552 マウント ヴァーノン ラポルト アヴェニュー 21

(72)発明者 ラベア ジョシュア

アメリカ合衆国 アリゾナ州 85249-3730 チャンドラー サウス ミラー プレイス 5360