

(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2008-546387

(P2008-546387A)

(43) 公表日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z N A B	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 158 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-517005 (P2008-517005)	(71) 出願人	507286909
(86) (22) 出願日	平成18年6月13日 (2006.6.13)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月30日 (2008.1.30)		ティ オブ ミシガン
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/022934		アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー
(87) 国際公開番号	W02006/138275		サウス ステート ストリート 300
(87) 国際公開日	平成18年12月28日 (2006.12.28)		3
(31) 優先権主張番号	60/690,001	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成17年6月13日 (2005.6.13)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 癌を処置および診断するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、癌を処置、特徴付け、および診断するための組成物および方法に関する。特に、本発明は、固形腫瘍幹細胞に関連する遺伝子の発現プロファイルおよびシグネチャーと共に、固形腫瘍幹細胞の診断、特徴付け、予後、および処置にとって有用な新規幹細胞癌マーカーを提供する。より具体的には、本発明は、癌および癌転移の診断、特徴付け、および処置にとって有用な癌幹細胞の二つのプロファイルを同定する。本発明はまた、癌の診断および管理において用いるための幹細胞遺伝子シグネチャーのような多様な試薬を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、
固形腫瘍幹細胞が、
未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、
腫瘍形成性であり、かつ
α-カテニンまたはe-カドヘリンの検出不能レベルまたは低レベルを発現する、
上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 2】

固形腫瘍幹細胞が、
e-カドヘリンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、および
MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、およびFGFBP1の一つまたは複数の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、
請求項1記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

10

【請求項 3】

固形腫瘍幹細胞が、
e-カドヘリンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ
MMP7、Nov、FOSL1、およびIL1R2の一つまたは複数の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、
請求項1記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

20

【請求項 4】

固形腫瘍幹細胞が、
e-カドヘリンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ
SHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、およびLOC57168の一つまたは複数の上昇レベルを発現する、
請求項1記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 5】

固形腫瘍幹細胞が、
e-カドヘリンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ
SHC1およびFLJ20152の一つまたは複数の上昇レベルを発現する、
請求項1記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

30

【請求項 6】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、
固形腫瘍幹細胞が、
未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、
腫瘍形成性であり、かつ
e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、およびFGFBP1の二つまたはそれ以上の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、
上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 7】

固形腫瘍幹細胞が、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、およびIL1R2の二つまたはそれ以上の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、請求項6記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

40

【請求項 8】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、
固形腫瘍幹細胞が、
未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、
腫瘍形成性であり、かつ
SHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、およびLOC57168の二つまたはそれ以上の上昇レベルを発現する、

50

上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 9】

固形腫瘍幹細胞が、SHC1およびFLJ20152の上昇レベルを発現する、請求項8記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 10】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、

固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、

腫瘍形成性であり、

e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、および 10
FGFBP1の一つまたは複数の検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ

SHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、およびLOC57168の一つまたは複数の上昇レベルを発現する、

上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 11】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、

固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、

腫瘍形成性であり、

α -カテニンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ 20

NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、

上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 12】

固形腫瘍幹細胞が、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、およびRB1の一つまたは複数の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、請求項11記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 13】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、 30

固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、

腫瘍形成性であり、

α -カテニンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ

EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベルを発現する、
上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 14】

固形腫瘍幹細胞が、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1 40
、CDKN2A、CTSL2、およびMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベルを発現する、請求項13記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 15】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、

固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、

腫瘍形成性であり、

α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の二つまたはそれ以上の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、 50

上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 16】

固形腫瘍幹細胞が、 α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、およびRB1の二つまたはそれ以上の検出不能レベルまたは低レベルを発現する、請求項15記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 17】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、
固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、
腫瘍形成性であり、かつ

EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の二つまたはそれ以上の上昇レベルを発現する、

上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 18】

固形腫瘍幹細胞が、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、およびMFHAS1の上昇レベルを発現する、請求項17記載の固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 19】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、
固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、
腫瘍形成性であり、

α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、およびRB1の一つまたは複数の検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ

EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベルを発現する、
上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 20】

集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、
固形腫瘍幹細胞が、

未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍濃縮され、
腫瘍形成性であり、

α -カテニンの検出不能レベルまたは低レベルを発現し、かつ

METの上昇レベルを発現する、

上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団。

【請求項 21】

以下の段階を含む、癌を分類する方法：

(a) 癌試料における α -カテニンシグネチャー2を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階；

(b) 癌試料における遺伝子の発現レベルを α -カテニンシグネチャー2と比較する段階；
および

(c) (b)における比較に基づいて高リスク群または低リスク群のいずれかに癌試料を分類する段階。

【請求項 22】

α -カテニンシグネチャー2を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階が、対応するタンパク質またはポリペプチドの発現を測定することによって行われる、請求項21記載の方法。

【請求項 23】

タンパク質またはポリペプチドが、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を用いる癌試料の免疫組織化学分析によって検出される、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

抗体が抗CD44抗体を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

抗体が抗 β -カテニン抗体を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 26】

タンパク質またはポリペプチドが、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を用いるELISAアッセイによって検出される、請求項22記載の方法。

10

【請求項 27】

抗体が抗CD44抗体を含む、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

抗体が抗 β -カテニン抗体を含む、請求項26記載の方法。

【請求項 29】

タンパク質またはポリペプチドが、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を含むタンパク質アレイを用いて検出される、請求項22記載の方法。

【請求項 30】

抗体が抗CD44抗体を含む、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

抗体が抗 β -カテニン抗体を含む、請求項29記載の方法。

20

【請求項 32】

α -カテニンシグネチャー2を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階が、対応するmRNAの発現を測定することによって行われる、請求項21記載の方法。

【請求項 33】

mRNAが、mRNAとハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドアレイを用いて検出される、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

mRNAが、mRNAを増幅するためのポリヌクレオチドプライマーを含むポリメラーゼ連鎖反応を用いて検出される、請求項32記載の方法。

30

【請求項 35】

(d)における分類に基づいて診断、予後、または予測情報を提供する段階をさらに含む、請求項21記載の方法。

【請求項 36】

以下の段階を含む、癌を分類する方法：

(a) 癌試料における α -カテニンシグネチャー3を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階；

(b) 癌試料における遺伝子の発現レベルを α -カテニンシグネチャー3と比較する段階；
および

(c) (b)における比較に基づいて高リスク群または低リスク群のいずれかに癌試料を分類する段階。

40

【請求項 37】

α -カテニンシグネチャー3を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階が、対応するタンパク質またはポリペプチドの発現を測定することによって行われる、請求項36記載の方法。

【請求項 38】

タンパク質またはポリペプチドが、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を用いる癌試料上での免疫組織化学分析によって検出される、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

抗体が抗CD44抗体を含む、請求項38記載の方法。

50

【請求項 40】

抗体が抗 β -カテニン抗体を含む、請求項38記載の方法。

【請求項 41】

タンパク質またはポリペプチドが、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を用いるELISAアッセイによって検出される、請求項37記載の方法。

【請求項 42】

抗体が抗CD44抗体を含む、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

抗体が抗 β -カテニン抗体を含む、請求項41記載の方法。

【請求項 44】

タンパク質またはポリペプチドが、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を含むタンパク質アレイを用いて検出される、請求項37記載の方法。

【請求項 45】

抗体が抗CD44抗体を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 46】

抗体が抗 β -カテニン抗体を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 47】

α -カテニンシグネチャー3を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階が、対応するmRNAの発現を測定することによって行われる、請求項36記載の方法。

【請求項 48】

mRNAが、mRNAとハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むDNAアレイを用いて検出される、請求項47記載の方法。

【請求項 49】

mRNAが、mRNAを特異的に増幅するポリヌクレオチドプライマーを含むポリメラーゼ連鎖反応を用いて検出される、請求項47記載の方法。

【請求項 50】

(d)における分類に基づいて診断、予後、または予測情報を提供する段階をさらに含む、請求項36記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、癌を処置、特徴付け、および診断するための組成物および方法に関する。特に、本発明は、固形腫瘍幹細胞に関連する遺伝子発現プロファイルおよびシグネチャーを提供すると共に、固形腫瘍幹細胞および癌の診断、特徴付け、予後、および処置にとって有用な新規幹細胞癌マーカーを提供する。

【0002】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2005年6月13日に提出された米国特許出願第60/690,001号の提出日の恩典を主張する。

【0003】

2005年2月3日に提出された米国特許出願第11/050,282号、2004年2月3日に提出された米国特許出願第60/541,527号、および2004年6月9日に提出された米国特許出願第10/864,207号は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0004】

本発明は、米国国立衛生研究所によって与えられた助成金番号第5P01CA07513606号により米国政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0005】

発明の背景

乳癌は、女性の一生のあいだに女性集団の約10%に罹患すると推定されていることから

10

20

30

40

50

、ほとんどの先進国における最も一般的な女性の悪性疾患である。乳癌の死亡率は、より早期の診断および処置の改善によりその発生率と共に増加しないが、それでもなお中年女性における主な死因の一つである。乳癌の早期診断にもかかわらず、新たに乳癌と診断された女性の約1~5%が診断時に遠隔転移を有する。さらに、最初に診断された局所疾患を有する患者の約50%が最終的に転移を伴って再発する。これらの再発の85%が疾患の初回発現後5年以内に起こる。

【0006】

症状発現時、転移性乳癌を有するほとんどの患者は、一つまたは二つのみの臓器系が罹患しているに過ぎない。疾患が時間と共に進行するにつれて、通常、多数の部位が罹患するようになる。実際に、転移は剖検時に体のほぼあらゆる臓器に見いだされうる。観察される最も一般的な転移罹患部位は、胸壁の皮膚および軟組織と共に、腋窩および鎖骨上領域における局所再発である。最も一般的な遠隔転移部位は骨（遠隔転移の30~40%）であり、その後に肺および肝臓が続く。転移性乳癌は、一般的に不治の疾患であると見なされている。しかし、現在利用可能な処置の選択肢によりしばしば、無病状態および全体的な生存率が延長すると共に、クオリティオブライフを増加させる。遠隔転移の発現からの生存の中央値は約3年である。

【0007】

乳癌を診断および進行期分類する現在の方法には、the American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5th ed., 1997, pp 171-180、およびHarris, J R: "Staging of breast carcinoma" in Harris, J. R., Hellman, S., Henderson, I. C, Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases. Philadelphia, Lippincott, 1991において記述されるように、腫瘍の大きさ、リンパ節における腫瘍の存在、および遠隔転移の存在に依存する腫瘍結節転移（TNM）系が含まれる。これらのパラメータは、予後を提供するため、および適当な治療を選択するために用いられる。腫瘍の形態学的外観もまた同様に査定することができるが、類似の組織病理学的外観を有する腫瘍が有意な臨床的多様性を示しうることから、このアプローチは重大な限界を有する。最後に、細胞表面マーカーに関するアッセイを用いて、特定の腫瘍タイプをサブクラスに分類することができる。たとえば、ER陽性乳癌は典型的に、ER陰性腫瘍よりタモキシフェンのようなホルモン治療に対して容易に反応することから、乳癌の予後および処置において検討される一つの要因は、エストロゲン受容体（ER）の存在である。しかし、これらの分析は有用ではあるが、乳癌の臨床挙動をごく部分的に予測するに過ぎず、現在の診断ツールが検出することができない乳癌には多くの表現型多様性が存在する。

【0008】

癌治療の従来の様式には、放射線治療、化学療法、およびホルモン治療が含まれる。しかし、標準的な臨床および病理的特徴から初期の乳癌の臨床経過を予測することが難しいことから、これらの女性の大多数が化学療法を行わなくとも良好な転帰を有しうるが、現在の実践はほとんどの女性に対して全身性化学療法を提供することである。化学療法は重度の副作用を有し、それ自身1%の死亡率を有し、このため患者を高リスクおよび低リスク亜群に分類することができれば不必要な苦痛および死亡を回避することができるであろう。このように、より良好な予後および処置の選択のために、腫瘍を分類する改善された方法に対する必要性が存在する。

【0009】

さらに、高リスク患者において用いる場合、現在の治療はしばしば無病状態および全生存を延長させることができるが、それらは、その特異性の欠如および処置に抵抗性の癌細胞の出現によって制限される。癌を有すると診断された人々の約3分の2がその癌のために5年以内に死亡するであろう。このように、癌の処置のために選択治療として役立ちうるさらなる遺伝子の同定がまさに必要である。

【0010】

結腸直腸癌は、全世界で最も一般的な癌の第3位であり、癌による死亡の第4位である。

全ての結腸直腸癌の約5～10%が遺伝性であり、その主要な型の一つは家族性線腫性ポリポーシス（FAP）であり、これは罹患した個体の約80%が大腸腺腫性ポリポーシス（APC）遺伝子に生殖系列変異を含む常染色体優性疾患である。結腸直腸癌は、周囲の成長により、およびリンパ性、血行性、経腹膜、および神経周囲伝搬のために局所的に浸潤する傾向を有する。最も一般的なリンパ外罹患部位は肝臓であり、肺は最もしばしば罹患する腹部外臓器である。他の血行性伝搬部位には、骨、腎臓、副腎、および脳が含まれる。

【0011】

結腸直腸癌に関する現在の進行期分類システムは、腸壁を通しての腫瘍の貫通の程度および結節の罹患の有無に基づく。この進行期分類システムは、主要な三つのデューク分類によって定義され、デュークA疾患は、結腸または直腸の粘膜下層に限定され、デュークB疾患は、固有筋層の中を浸潤して結腸または直腸壁を貫通することができる腫瘍を有し、およびデュークC疾患には、限局リンパ節転移を有する任意の程度の腸壁浸潤が含まれる。

【0012】

外科的切除は初期段階の結腸直腸癌にとって非常に有効であり、デュークA患者では95%およびデュークB患者では75%の治癒率を提供する。デュークC患者においてリンパ節が陽性であれば、5年以内の再発率60%を予測する。デュークC患者を術後化学療法によって処置すると、再発率は40%～50%に低減され、現在ではこれらの患者の標準治療である。再発率が相対的に低いことから、デュークBにおける術後化学療法の恩典は、検出することがより難しく、なお議論となっている。しかし、デュークB分類は、これらの患者の約20～30%がデュークCにより類似した挙動を示し、5年以内に再発することから不完全である。このように、再発する可能性があって、治療によって恩典が得られるであろうデュークB患者を選択するためのよりよい予後因子を同定することが明らかに必要である。

【0013】

正常な動物の発達において、ほとんどまたは全ての組織の細胞は、幹細胞（Morrison et al., Cell 88(3): 287-98 (1997); Morrison et al., Curr. Opin. Immunol. 9(2): 216-21 (1997); Morrison et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11: 35-71 (1995)) と呼ばれる正常な前駆体に由来する。幹細胞は、(1) 広範な増殖能を有し; 2) 非対称な細胞分裂を行って、増殖能または発達能が低減された一つまたは複数の種類の子孫を生じることができ; および (3) 自己再生または自己維持のために対称な細胞分裂を行うことができる細胞である。成体動物において、いくつかの細胞（血液、腸管、乳管系、および皮膚の細胞を含む）は、それぞれの組織において幹細胞の小さい集団から絶えず補給されている。幹細胞の分化による成体細胞再生の最もよく知られる例は、発達の未成熟な前駆体（造血幹細胞および前駆細胞）が分子シグナルに反応して、様々な血液およびリンパ細胞タイプを形成する造血系である。

【0014】

固形腫瘍は不均一な細胞集団で構成される。たとえば、乳癌は、癌細胞と、間葉（間質）細胞、炎症細胞、および内皮細胞を含む正常細胞の混合物である。古典的な癌のモデルは表現型が異なる癌細胞集団を保持し、それらは全て、増殖して新しい腫瘍を生じる能力を有する。古典的なモデルにおいて、腫瘍細胞の不均一性は、腫瘍形成細胞の多様な集団が起こる癌細胞内での進行中の変異と共に、環境的要因に帰因する。このモデルは、腫瘍細胞の全ての集団がある程度の腫瘍形成能を有するであろうという考え方に基づく（Pandis et al., Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129 (1998); Kuukasjrvi et al., Cancer Res. 57: 1597-1604 (1997); Bonsing et al., Cancer 71: 382-391 (1993); Bonsing et al., Genes Chromosomes & Cancer 82: 173-183 (2000); Beerman H et al., Cytometry. 12(2): 147-54 (1991); Aubele M & Werner M, Analyt. Cell. Path. 19: 53 (1999); Shen L et al., Cancer Res. 60: 3884 (2000))。

【0015】

観察された固形腫瘍細胞の不均一性に関するもう一つのモデルは、固形腫瘍が「固形腫瘍幹細胞」（または固形腫瘍からの「癌幹細胞」）に起因することであり、この細胞はそ

の後細胞分裂の対称なラウンドと非対称なラウンドの双方を通して無秩序な発達を受ける。この幹細胞モデルにおいて、固形腫瘍は、それらが広範囲に増殖して、さらなる固形腫瘍幹細胞（自己再生型）と、腫瘍形成能を欠損する固形腫瘍の腫瘍細胞の大部分との双方を効率的に生じるという点において、正常な「幹細胞」の特性を共有する別個のおよび限定された（おそらくまれでさえある）サブセットの細胞を含む。実際に、長期生存細胞集団における変異は癌幹細胞の形成を開始することができ、この細胞は腫瘍の成長および維持の基礎となり、その存在が現在の治療的アプローチの失敗に寄与する。

【0016】

癌（たとえば、乳癌および結腸直腸癌）に至る遺伝子の変化の理解には大きな進歩が見られたが、デノボヒト癌細胞に関する信頼できる腫瘍アッセイがないことから、これらの変異の効果を細胞レベルで理解することができなかった。同様に、固形腫瘍幹細胞に関して同定された癌マーカーがないために、癌患者（たとえば、乳癌患者）の診断および治療の開発は妨げられた。そのため、固形腫瘍幹細胞に関する癌マーカーの同定と共に信頼できる腫瘍アッセイが必要である。

【発明の開示】

【0017】

発明の概要

本発明は、癌を処置、特徴付け、および診断するための組成物および方法に関する。特に、本発明は固形腫瘍幹細胞に関連する遺伝子発現プロファイルおよびシグネチャーと共に、固形腫瘍幹細胞の診断、特徴付け、予後、および処置に関して有用な新規幹細胞癌マーカーを提供する。本発明はさらに、腫瘍試料において検出された場合に、転移および死亡の高リスクを含む不良な臨床転帰の有意な予測因子として作用する固形腫瘍幹細胞マーカーに由来する癌幹細胞遺伝子シグネチャーを提供する。

【0018】

いくつかの態様において、本発明は、a) 被験者から組織試料を提供する段階、およびb) 組織試料において固形腫瘍幹細胞の有無が決定されるような条件で組織試料において表4~9からの少なくとも一つの幹細胞癌マーカー（たとえば、1、2、3、5、10個等）を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法を提供する。さらなる態様において、本発明は、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) 正常な乳腺上皮細胞と比較してe-カドヘリンまたは α カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法を提供する。いくつかの態様において、マーカーはe-カドヘリンまたは α -カテニンである。e-カドヘリンまたは α カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって、固形腫瘍幹細胞であることが確認される。本発明のさらなる態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現して、同様にMMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法が提供される。e-カドヘリンおよびMMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。本発明のさらなる態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能なレベルを発現し、およびSHC1またはFLJ20152の一つまたは双方の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法が提供される。e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能なレベル、およびSHC1またはFLJ20152の一つまたは双方の上昇レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって、固形腫瘍幹細胞であることが確認される。本発明のさらなる態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) α -カテニンの低レベルまたは検出不能レ

ベルを発現して、同様にNCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法が提供される。α-カテニンの低レベルまたは検出不能レベルおよびNCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。なおもう一つの態様において、本発明は、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) α-カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現して、同様にEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2AまたはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法を提供する。α-カテニンの低レベルまたは検出不能レベルおよびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2AまたはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。本発明のもう一つの態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) α-カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現して、METの上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法が提供される。α-カテニンの低レベルまたは検出不能レベルおよびMETの上昇レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。本発明のさらにさらなる態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞との混合物を得る段階；およびb) α-カテニンの低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する細胞から、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する細胞を分離する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出した後、固形腫瘍幹細胞を固形腫瘍幹細胞の一つまたは複数の集団に分離する方法が提供される。それぞれの場合において、e-カドヘリンまたはα-カテニンのいずれかの低レベルまたは検出不能レベルを発現するそれらの癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって、固形腫瘍幹細胞であることが確認される。

【0019】

本発明のさらなる態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法が提供される。e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。本発明のさらなる態様において、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) α-カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法が提供される。α-カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。なおもう一つの態様において、本発明は、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞および固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；およびb) EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2AまたはMFHAS1の二つまたはそれ以上の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法を提供する。EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2AまたはMFHAS1の二つまたはそれ以上の上昇レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって固形腫瘍幹細胞であることが確認される。もう一つの態様において、本発明

は、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；ならびにb) SHC1およびFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法を提供する。SHC1およびFLJ20152の上昇レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって、固形腫瘍幹細胞であることが確認される。もう一つの態様において、本発明は、a) たとえば被験者の組織試料から固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞の混合物を得る段階；ならびにb) SHC1およびFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する癌細胞を検出する段階を含む、固形腫瘍幹細胞を検出する方法を提供する。SHC1およびFLJ20152の上昇レベルを発現する癌細胞は、その腫瘍形成性を証明することによって、固形腫瘍幹細胞であることが確認される。

10

【0020】

特定の態様において、固形腫瘍幹細胞を検出する段階は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーの有無または発現レベルを決定する段階を含む。他の態様において、検出する段階は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーのmRNA発現を検出する段階を含む。特定の態様において、検出する段階は、幹細胞癌マーカーmRNAと相補的な核酸プローブに幹細胞癌マーカーmRNAを曝露する段階を含む。

【0021】

一定の態様において、検出する段階は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーのポリペプチド発現を検出する段階を含む。他の態様において、検出する段階は、幹細胞癌マーカーポリペプチドに対して特異的な抗体に、幹細胞癌マーカーポリペプチドを曝露する段階、および幹細胞癌ポリペプチドに対する抗体の結合を検出する段階を含む。さらなる態様において、被験者はヒト被験者を含む。さらなる態様において、組織試料は腫瘍組織を含む。いくつかの態様において、腫瘍組織試料は術後の腫瘍組織試料（たとえば、腫瘍生検）である。

20

【0022】

一定の態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、正常上皮と比較してe-カドヘリンまたはαカテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現して、同様にMMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1またはFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現して、MMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1またはFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

30

40

【0023】

もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）と

50

を含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、ならびにSHC1およびFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現し、およびSHC1またはFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

10

【0024】

一定の態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびNCSTN、LNK、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、NCSTN、LNK、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現し、およびMETの上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

20

30

40

【0025】

一定の態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、および α -カテニン、NCSTN、LNK、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現し、およびMETの上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

50

胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の二つまたはそれ以上の上昇レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、またはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

10

【0026】

一定の態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、および正常上皮と比較してe-カドヘリンまたは α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびMMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の一つまたは複数の上昇レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の一つまたは複数の上昇レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

20

30

【0027】

もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞(または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞)とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、SHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の二つまたはそれ以上の上昇レベル(たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル)を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

40

50

なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現し、およびSHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

【0028】

一定の態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、ならびにNCSTN、LNK、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、ならびにEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、NCSTN、LNK、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、ならびにEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびMETの上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

【0029】

一定の態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、ならびに α -カテニン、NCSTN、LNK、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27R

A、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の二つまたはそれ以上の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、少なくとも約75%の固形腫瘍幹細胞と25%未満の固形腫瘍細胞（または少なくとも約90%の固形腫瘍幹細胞と10%未満の固形腫瘍細胞）とを含み、固形腫瘍幹細胞が腫瘍形成性であって、 α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現し、ならびにEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の単離集団を提供する。

【0030】

一定の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、および正常上皮と比較してe-カドヘリンまたは α カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびMMP7、Nov、FOSL、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1またはFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、MMP7、Nov、FOSL、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1またはFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

【0031】

なお他の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL、またはIL1R2の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、SHC1およびFLJ20152の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL、またはIL1R2の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1またはFLJ201

52の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

【0032】

一定の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、および正常上皮と比較してe-カドヘリンまたは α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびMMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

【0033】

なお他の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、SHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168の二つまたはそれ以上の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、e-カドヘリン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SFRP1、KRT6B、GOS2、IL8、B3GNT5、またはFGFBP1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびSHC1、FLJ20152、ARNT、CYFIP2、C17orf27、TAP1、RNASEL、またはLOC57168一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

【0034】

一定の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびN

CSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLULまたはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLULまたはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、またはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびMETの上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

【0035】

一定の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLULまたはRB1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の二つまたはそれ以上の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニン、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLULまたはRB1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、CTSL2、またはMFHAS1の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

【0036】

さらなる態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびNCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニン

の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、NCSTN、LN X、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、
 ならびにEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。もう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニンの低レベルまたは検出不能レベルを発現し、およびMETの上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

10

20

【0037】

一定の態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、ならびに α -カテニン、NCSTN、LN X、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の二つまたはそれ以上の低レベルまたは検出不能レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。さらにもう一つの態様において、本発明は、固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CX
 CL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、SLC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、IMP-3、およびDHRS9二つまたはそれ以上の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。なおもう一つの態様において、本発明は、集団が固形腫瘍幹細胞と固形腫瘍細胞とを含み、固形腫瘍幹細胞が未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも2倍（または5～6倍もしくは10倍）濃縮され、腫瘍形成性であり、 α -カテニン、NCSTN、LN X、ARMCX3、D2S448、TUSC1、GLUL、RB1、BEX2、SLC12A2、GALC、NGFRAP1、FGF13、KIAA1102、SLC1A4、およびDNAJD1の一つまたは複数の低レベルまたは検出不能レベルを発現し、ならびにEDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、MFHAS1、IL27RA、KLRF1、PKCA、UPP1、CTSL2、S
 LC7A5、ARNTL2、PRSS1、PRSS2、PRSS3、VNN1、RAB38、ZBED2、MYEOV、MAL、Hv1P-3、およびDHRS9の一つまたは複数の上昇レベル（たとえば、正常乳腺上皮と比較したレベル）を発現する、上皮由来の固形腫瘍から得られた固形腫瘍幹細胞の濃縮集団を提供する。

30

40

【0038】

他の態様において、本発明は、c) 被験者に対する予後を提供する段階をさらに含む。いくつかの態様において、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーは表8のマーカーである。いくつかの態様において、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーは、Bmi-1、eed、easyhl、easyh2、rnf2、yy1、smarcA3、smarcA5、smarcD3、smarcEl、mllt3、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WNT10B、WNT16、AXIN1、BCL9、MYC、および(TCF4)を含む。いくつかの態様において、少なくとも一つの幹細胞

50

胞マーカーは、e-カドヘリン、 α -カテニン；e-カドヘリンおよびMMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SHC1、またはFLJ20152； α -カテニンおよびNCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、RB1、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、またはMFHAS1を含む。

【0039】

他の態様において、転移および死亡を含む臨床転帰を予測するための試薬および方法が、本発明の癌幹細胞マーカーを用いて提供される。本発明は、本明細書において同定された固形腫瘍幹細胞に関連する試薬を用いて様々な診断法を提供する。本発明の診断法には、以下の段階を含む癌を分類する方法が含まれる：a) 患者からの腫瘍生検を得る段階；b) 固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーから選択されるタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子の一つまたは複数の発現または活性を決定する段階；およびc) (b)の結果に基づいて、腫瘍を高リスクまたは低リスク腫瘍クラスに属すると分類する段階。本発明のもう一つの態様において、方法は、腫瘍の分類に基づいて、診断、予後、治療の選択、または治療をモニターするための手段をさらに提供する段階を含む。本発明の一定の方法に従って、固形腫瘍幹細胞遺伝子によってコードされる遺伝子産物、たとえばポリペプチドまたは核酸の有無または量は、被験者に由来する試料（たとえば、被験者から得られた腫瘍または血液試料から得られた組織または細胞の試料）において検出される。一般的に、被験者はヒトであるが、被験者はもう一つの種の動物となりうる。被験者は腫瘍を有するまたは有しうる個体となりうる。試料は、検出の前、または検出過程において多数の処理段階を受けうる。本発明の一定の態様において、遺伝子産物は、ポリペプチドに結合することができる抗体を用いて検出されるポリペプチドである。本発明の一定の態様において、抗体は、被験者から得られた試料において免疫組織化学染色を行うために用いられる。本発明の一定の態様において、固形腫瘍幹細胞遺伝子mRNA発現は、マイクロアレイを用いて測定される。本発明の他の態様において、固形腫瘍幹細胞遺伝子mRNAは遺伝子の一部を増幅するように設計されたプライマーの組を用いる定量的PCRによって測定される。他の検出手段は、当業者に公知であり、たとえば米国特許第6,057,105号を参照されたい。

【0040】

一定の態様において、本発明は、以下の段階を含む、癌を分類する方法を提供する：(a) 癌試料を提供する段階；(b) 癌試料における α -カテニンシグネチャー2を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階；(c) 癌試料における α -カテニンプロファイルを含む遺伝子の発現レベルを α -カテニンシグネチャー2と比較する段階；および(d) (c)における比較に基づいて、癌試料を高リスクまたは低リスク群のいずれかであると分類する段階。癌を分類する方法はさらに、(d)における分類に基づいて診断的、予後的、または予測的情報を提供する段階をさらに含む。一定の態様において、 α -カテニンシグネチャー2を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する方法は、対応するタンパク質またはポリペプチドの発現を測定することによって行われる。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を用いる癌試料の免疫組織化学分析によって検出される。他の態様において、タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質またはポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いるELISAアッセイによって検出される。さらに他の態様において、タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質またはポリペプチドに特異的に結合する抗体を含むタンパク質アレイを用いて検出される。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体は抗CD44抗体である。他の態様において、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体は、抗 β -カテニン抗体である。他の一定の態様において、 α -カテニンシグネチャー2を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する方法は、対応するmRNAの発現を測定することによって行われる。いくつかの態様において、mRNAはmRNAに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドアレイを用いて検出される。他の態様において、mRNAは、mRNAを特異的に増幅するポリヌクレオチドプライマーを含むポリメラーゼ連鎖反応を用いて検出される。

【0041】

一定の態様において、本発明は、以下の段階を含む、癌を分類する方法を提供する：（a）癌試料を提供する段階；（b）癌試料における α -カテニンシグネチャー3を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する段階；（c）癌試料における α -カテニンプロファイルを含む遺伝子の発現レベルを α -カテニンシグネチャー3と比較する段階；および（d）（c）における比較に基づいて、癌試料を高リスクまたは低リスク群のいずれかであると分類する段階。癌を分類する方法はさらに、（d）における分類に基づいて診断的、予後的、または予測的情報を提供する段階をさらに含む。一定の態様において、 α -カテニンシグネチャー3を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する方法は、対応するタンパク質またはポリペプチドの発現を測定することによって行われる。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体を用いる癌試料の免疫組織化学分析によって検出される。他の態様において、タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質またはポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いるELISAアッセイによって検出される。さらに他の態様において、ポリペプチドは、タンパク質またはポリペプチドに特異的に結合する抗体を含むタンパク質アレイを用いて検出される。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体は、抗CD44抗体である。他の態様において、タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体は、抗 β -カテニン抗体である。他の一定の態様において、 α -カテニンシグネチャー3を含む一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定する方法は、対応するmRNAの発現を測定することによって行われる。いくつかの態様において、mRNAはmRNAに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドアレイを用いて検出される。他の態様において、mRNAは、mRNAを特異的に増幅するポリヌクレオチドプライマーを含むポリメラーゼ連鎖反応を用いて検出される。

【0042】

特定の態様において、本発明は、固形腫瘍の細胞を、表4～9において示される少なくとも一つの幹細胞癌マーカーに対する少なくとも一つの物質を含む組成物の生物学的（または治療的）有効量に接触させる段階を含む、固形腫瘍の大きさを低減させるための方法を提供する。いくつかの態様において、生物学的有効量は、固形腫瘍における（たとえば、研究薬物スクリーニング、または治療薬応用）固形腫瘍幹細胞の細胞死を引き起こすまたは増殖を阻害するために十分な量である。他の態様において、生物学的有効量は、固形腫瘍幹細胞の生存経路（たとえば、notch関連遺伝子）または自己再生経路（たとえば、WNT経路）を妨害する量である。

【0043】

本発明の方法に従って、そこから固形腫瘍幹細胞が単離または濃縮される固形腫瘍の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫のような、しかしこれらに限定されない肉腫および癌腫が含まれるがこれらに限定されるわけではない。本発明は、卵巣癌および乳癌のような肉腫および上皮癌に適用可能である。

【0044】

さらなる態様において、少なくとも一つの物質は、抗体、ペプチド、または低分子である。さらなる態様において、抗体、ペプチド、アンチセンス、siRNA、または低分子は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーの細胞外ドメインに対して向けられる。いくつかの態様において、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーは、Bmi-1、eed、easyh1、easyh2、rnf2、yyl、smarCA3、smarCA5、smarCD3、smarCE1、mllt3、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、

FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WNT10B、WNT16、AXIN1、BCL9、MYC、および(TCF4)からなる群より選択される。さらなる態様において、少なくとも一つの幹細胞マーカーは、e-カドヘリン、 α -カテニン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SHC1、FLJ20152、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、RB1、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、またはMFHAS1からなる群より選択される。

【0045】

他の態様において、本発明は、表4~9において示される少なくとも一つの幹細胞癌マーカーの活性を調節する少なくとも一つの物質を含む組成物の生物学的（たとえば、治療的）有効量に、固形腫瘍の細胞を接触させる段階を含む、固形腫瘍の大きさを低減させるための方法を提供する。いくつかの態様において、本発明は、表4~9において示される少なくとも一つの肝細胞癌マーカーにターゲティングされる少なくとも一つの物質を含む組成物の生物学的有効量に、固形腫瘍幹細胞を接触させる段階を含む、固形腫瘍幹細胞を殺す、またはその増殖を阻害するための方法を提供する。一定の態様において、方法は、接触させる段階の後に固形腫瘍幹細胞の死を同定する、または成長を予防する段階をさらに含む。さらなる態様において、細胞死はアポトーシスによって引き起こされる。他の態様において、生物学的有効量は、固形腫瘍幹細胞の生存経路（たとえば、notch関連遺伝子）または自己再生経路（たとえば、WNT経路）を妨害する量である。他の態様において、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーは、Bmi-1、eed、easyh1、easyh2、rnf2、yyl、smarCA3、smarCA5、smarCD3、smarCE1、mllt3、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WNT10B、WNT16、AXIN1、BCL9、MYC、および(TCF4)からなる群より選択される。さらなる態様において、少なくとも一つの幹細胞マーカーは、e-カドヘリン、 α -カテニン、MMP7、Nov、FOSL1、IL1R2、SHC1、FLJ20152、NCSTN、LNX、ARMCX3、D2S448、GLUL、RB1、EDG2、CAV1、CAV2、DCBLD2、IGFBP3、S100A2、CXCL5、MET、FOXQ1、CDKN2A、およびMFHAS1からなる群より選択される。

【0046】

特定の態様において、固形腫瘍幹細胞は、細胞表面マーカーCD44、ESA、またはB38.1を発現する。他の態様において、固形腫瘍幹細胞は、CD2、CD3、CD10、CD14、CD16、CD31、CD45、CD64、およびCD140bからなる群より選択される少なくとも一つのLINEAGEマーカーを発現することができない（たとえば、いずれも参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第20040037815A1号および第20020119565号を参照されたい）。

【0047】

他の態様において、本発明は、以下の段階を含む、固形腫瘍幹細胞を選択的にターゲティングするための方法を提供する：（a）固形腫瘍幹細胞上に存在する表4~9からの少なくとも一つの幹細胞癌マーカーを同定する段階；および（b）少なくとも一つの幹細胞癌マーカーに選択的に結合する、またはそれを調節する物質または一組の物質を得る段階。いくつかの態様において、物質は、固形腫瘍幹細胞を遺伝的に改変する。特定の態様において、物質は、二重特異的共役体を含む。さらなる態様において、物質はアデノウイルスベクターを含む。

【0048】

いくつかの態様において、本発明は、精製固形腫瘍幹細胞（たとえばその細胞用量を）を動物に導入する段階を含む、動物において腫瘍を形成するための方法であって、（a）固形腫瘍幹細胞が固形腫瘍に由来して、および（b）固形腫瘍幹細胞が、表4~9における少なくとも一つの幹細胞癌マーカーの存在に基づいて未分化腫瘍細胞に対して少なくとも2倍濃縮される、方法を提供する。他の態様において、動物は免疫無防備状態の動物である。一定の態様において、動物は、マウス（たとえば、ヌードマウス、SCIDマウス、NOD/SCIDマウス、ベージュ/SCIDマウス、およびミクログロブリン欠損NOD/SCIDマウス）のような免疫無防備状態の哺乳動物である。特定の態様において、細胞用量における細胞数は、細胞約100個~約 5×10^5 個である。

【0049】

一定の態様において、本発明は、以下を含む、被験者における固形腫瘍幹細胞を検出す

るためのキットを提供する：a) 被験者の組織または細胞試料における表4～9からの少なくとも一つの幹細胞癌マーカーを特異的に検出することができる試薬、および任意でb) 組織試料における固形腫瘍幹細胞の有無を検出するための試薬を用いるための説明書。さらなる態様において、試薬は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーからのmRNAと相補的である核酸プローブを含む。他の態様において、試薬は、抗体または抗体断片を含む。

【0050】

いくつかの態様において、本発明は、以下の段階を含む、化合物をスクリーニングする方法を提供する：a) i) 固形腫瘍幹細胞、およびii) 一つまたは複数の試験化合物、を提供する段階；b) 固形腫瘍幹細胞を試験化合物に接触させる段階；ならびにc) 試験化合物の非存在下と比較して試験化合物の存在下で表4～9に示された少なくとも一つの幹細胞癌マーカーの発現の変化を検出する段階。特定の態様において、検出する段階は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーに関する発現レベルを決定する段階を含む。特定の態様において、検出する段階は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーのmRNA発現を検出する段階を含む。いくつかの態様において、検出する段階は、少なくとも一つの幹細胞癌マーカーのポリペプチド発現を検出する段階を含む。さらなる態様において、固形腫瘍幹細胞はインビトロである。他の態様において、固形腫瘍幹細胞はインビボである。さらなる態様において、試験化合物は薬物（たとえば、低分子、抗体、抗体-毒素共役物、siRNA等）を含む。

10

【0051】

いくつかの態様において、本発明は、物質のそれぞれが、表4～9において示される少なくとも一つの幹細胞癌マーカーの活性を調節する、少なくとも二つの物質（たとえば、低分子、抗体、抗体-毒素共役物、siRNA等）を含む組成物を提供する。さらなる態様において、組成物は少なくとも三つの物質を含む。

20

【0052】

特定の態様において、本発明は、癌細胞における β -カテニンの局在が主に核である、または主に細胞質であると決定されるように、癌細胞における β -カテニンの存在を検出する段階を含む、腫瘍形成性癌細胞を非腫瘍形成性癌細胞と区別する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、 β -カテニンの局在が主に核であれば癌細胞が腫瘍形成性であると同定され、 β -カテニンの局在が主に細胞質であれば、癌細胞が非腫瘍形成性であると同定される段階をさらに含む。

【0053】

一定の態様において、本発明は、以下の段階を含む、腫瘍形成性癌細胞を非腫瘍形成性癌細胞と区別する方法を提供する：a) i) 癌細胞、およびii) β -カテニンに結合するように形成された物質を含む組成物、を提供する段階；b) 癌細胞における β -カテニンの局在が、主に核および細胞質であるか、または主に細胞質および膜会合型であると決定されるような条件で、癌細胞を組成物に接触させる段階；ならびにc) β -カテニンの局在が主に核および細胞質であれば、癌細胞が腫瘍形成性であると同定され、 β -カテニンの局在が主に細胞質および膜会合型であれば、癌細胞が非腫瘍形成性であると同定される段階。

30

【0054】

一般的な説明

本発明は、確立された固形腫瘍の異種細胞集団における明確で限定されたサブセットの細胞として、固形腫瘍幹細胞（固形腫瘍からの癌細胞とも呼ばれる）が発見されたことに基づく。これらの癌幹細胞は、それらが広範囲に増殖して、さらなる固形腫瘍幹細胞（自己再生型）と、腫瘍形成能を欠損する固形腫瘍の腫瘍細胞の大部分の双方を効率的に生じるという点において、正常な幹細胞の特性を共有する。固形腫瘍からの癌幹細胞の同定は、非腫瘍形成性腫瘍細胞のバルクからそれらを単離するために用いることができるであろう細胞表面受容体の独自のパターン、ならびに培養および異種移植動物モデルにおける自己再生および増殖の特性の査定に依存した。未分画の腫瘍細胞と比較して腫瘍の形成能に関して50倍より大きく濃縮されたESA⁺；CD44⁺；CD24⁻ / 低；Lineage⁻ 集団が発見された（Al-Hajj et al., 2003）。

40

【0055】

50

本発明は、癌を処置、特徴付け、および診断するための組成物および方法に関する。特に、本発明は、固形腫瘍幹細胞に関連する遺伝子発現プロファイルを提供すると共に、固形腫瘍幹細胞の診断、特徴付け、および処置にとって有用な新規マーカーを提供する。ターゲティングされうる（たとえば診断、または治療目的のために）適したマーカーは、表4～9において示されるように、固形腫瘍幹細胞において異なるように発現される遺伝子および遺伝子によってコードされるペプチドである。異なるように発現される遺伝子、およびそれによってコードされるペプチドは、固形腫瘍幹細胞の存在を同定するために、ならびに存在する任意の固形腫瘍幹細胞の増殖を低減させるために（または殺すために）、自己再生経路を妨害するために、または生存経路を妨害するために適した分子を決定およびスクリーニングするために（たとえば、定量的に）検出することができる。これらの表において示される異なるように発現される遺伝子、およびそれによってコードされるペプチドは、これらのマーカーの一つまたは複数にターゲティングされる（たとえば、マーカーの活性を阻害または促進するために）治療物質を生成するために有用である。

10

【0056】

固形腫瘍幹細胞マーカーを同定するために、患者5人からの細胞、患者6人からのAML幹細胞および非腫瘍形成性癌細胞、正常造血幹細胞（HSC5）、正常造血細胞、正常結腸上皮細胞、および正常乳腺上皮細胞を、異なる発現に関して分析した。

【0057】

本発明はまた、表4～9において提供されるマーカーの一つまたは複数を他の細胞とは異なるように発現する固形腫瘍幹細胞を提供する。固形腫瘍幹細胞は、ヒトまたは他の動物から単離されうる。発現は、大きい程度または小さい程度のいずれかとなりうる。他の細胞は、正常細胞、造血幹細胞、急性骨髄性白血病（AML）幹細胞、または他の任意のクラス

20

の細胞から選択されうる。

【0058】

本発明は、それによって固形腫瘍幹細胞の精製集団が得られる（たとえば、治療物質を選択または試験するための患者からの細胞は、患者の何らかの細胞である）、集団の細胞を選択する方法を提供する。本発明はまた、非腫瘍形成性（NTG）腫瘍細胞の集団のような、固形腫瘍幹細胞以外の腫瘍細胞の精製集団を選択する方法を提供する。本発明は、選択された細胞に対する抗体を作製する方法を提供する。本発明は、選択された細胞を用いる診断方法を提供する。本発明はまた、治療物質が固形腫瘍幹細胞に向けられる（たとえば、本明細書において直接または間接的に同定された幹細胞癌マーカーの一つに対して向けられる）、治療法を提供する。

30

【0059】

したがって、本発明は、細胞を選択する、疾患を診断する、研究試験を実施する、ならびに所定の経路における特異的遺伝子に向けられる選択法、診断法および治療物質を用いて固形腫瘍を処置する方法を提供する。以下の遺伝子および遺伝子産物の一つまたは複数が含まれる：Bmi-1、eed、easyhi、easyh2、rnf2、yyl、smarcA3、smarcA5、smarcD3、smarcE1、およびmllt3と共に、表4～9において示される遺伝子および遺伝子産物。これらの遺伝子の多くは、本明細書において示されるように、正常細胞および非腫瘍形成性癌細胞と比較して固形腫瘍幹細胞において異なるように発現される。

40

【0060】

本発明は、固形腫瘍から単離された細胞の様々な集団による固形腫瘍幹細胞機能および細胞機能に関するインビボおよびインビトロアッセイを提供する。本発明は、固形腫瘍幹細胞増殖に影響を及ぼす要因を同定するために、固形腫瘍から単離された様々な細胞集団（固形腫瘍幹細胞に関して濃縮された細胞の集団のような）を用いるための方法を提供する。本発明の方法によって、固形腫瘍内の細胞の表現型に関して異種の集団を特徴付けすることができる。特に、広範に増殖する幹細胞特性と、他の全ての腫瘍細胞型を生じる能力とを有する、表現型が異なる細胞集団を腫瘍内で同定、単離、および特徴付けすることができる。固形腫瘍幹細胞は、処置後に腫瘍を再度確立することができる腫瘍形成性細胞である。

50

【0061】

本発明のマイクロアレイデータを用いて、本発明は、シグネチャー1（ α -カテニンシグネチャー）およびシグネチャー2（e-カドヘリンシグネチャー）と呼ばれる癌幹細胞遺伝子発現に関する二つの明らかに定義された分子シグネチャーを同定する（表9および図10、11を参照されたい）。これらのシグネチャーは、癌幹細胞の存在を検出することができ、癌の特徴付け、単離、ターゲティング、および処置を行うことができる。 α -カテニンおよびE-カドヘリン癌幹細胞遺伝子シグネチャーに関する知識を用いて、癌幹細胞の有無に関して診断アッセイを開発する；癌幹細胞の濃縮集団を単離する；研究試験を実施する；癌幹細胞の挙動に影響を及ぼす物質の同定を可能にするアッセイを開発する；癌幹細胞に影響を及ぼす薬物を開発する；選択法、診断法、および治療物質を用いて固形腫瘍を処置する；ならびに癌幹細胞の特異的集団のさらなる単離およびターゲティングのために癌幹細胞のさらなるマーカーを同定することができる。同様に、本発明のシグネチャー1およびシグネチャー2遺伝子発現には、 α -カテニンおよびE-カドヘリンの発現の変化がそれぞれ含まれるという発見は、シグネチャー1およびシグネチャー2癌幹細胞が転移能の変化に関連することを示している。このように、本発明の遺伝子発現シグネチャーは、転移のモニタリングおよび処置をさらに可能にする。

10

【0062】

このように、本発明は、固形腫瘍幹細胞に対して診断物質または治療物質を選択的にターゲティングするための方法を提供する。本発明はまた、固形腫瘍幹細胞に対して選択的にターゲティングされる（たとえば、本明細書に開示の固形腫瘍幹細胞癌マーカーの一つに対して向けられる）、生体分子のような物質を提供する。いくつかの態様において、このようにターゲティングされる幹細胞癌マーカーは、自己再生または細胞生存経路の一部である。そのようなマーカーの一例は、成体の自己再生造血幹細胞の維持にとって必要であることが示されているBmi-1である（たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、Park et al., Nature, 2003, 15; 423(6937): 302- 5を参照されたい）。他のいくつかの態様において、診断またはターゲティングされる癌は、 α -カテニンシグネチャーと高度に相関する α -カテニンまたはE-カドヘリン遺伝子発現パターンを発現する。より具体的には、癌幹細胞は、1) たとえばNicastrin発現の低レベルもしくは検出不能レベル、またはEDG2、DCBLD2、もしくはc-Met発現の増加を含む、一つもしくは複数のシグネチャー1遺伝子マーカーの増加もしくは減少と組み合わせた、 α -カテニン発現の低レベルもしくは検出不能レベル、または2) たとえばMMP7、Nov、もしくはIL1R2発現の低レベルもしくは検出不能レベル、またはSHC1発現の増加を含む、一つもしくは複数のシグネチャー2遺伝子マーカーの増加または減少と組み合わせた、e-カドヘリン発現の低レベルもしくは検出不能レベル、のいずれかを示す。

20

30

【0063】

一定の態様において、本発明は、抗癌剤をスクリーニングするため；抗癌治療を試験するため；新規経路をターゲティングする薬物を開発するため；新規抗癌治療標的を同定するため；病理標本における悪性細胞の同定および診断のため；固形腫瘍幹細胞薬物感受性を試験およびアッセイするため；薬物感受性を予測する特異的要因を測定するため；ならびに患者をスクリーニングするため（たとえば、マンモグラフィーの補助として）の方法を提供する。

40

【0064】

本発明はさらに、転移および全体的な生存を含む臨床転帰を予測する幹細胞マーカーを含む、癌幹細胞遺伝子シグネチャーである α -カテニンシグネチャーを初めて同定する。 α -カテニンシグネチャーと共に、 α -カテニンシグネチャーを含む個々の予測因子遺伝子の一つまたは複数が、予後不良の予測として確立される。本発明のいくつかの態様において、 α -カテニンシグネチャーまたは個々の予測因子遺伝子は、低リスクまたは高リスクであると腫瘍を分類するために、および低リスクまたは高リスク範疇に腫瘍を割付するために臨床的に用いられる。 α -カテニンシグネチャーはさらに、低リスクまたは高リスクとしての腫瘍の分類に基づいて、診断、予後を提供する、および治療を選択するためと共

50

に、診断、予後、および／または治療を経時的にモニターするために用いることができる。もう一つの態様において、 α -カテニンシグネチャーは、たとえば癌を処置するための低分子、siRNA、および抗体を含むリード化合物を試験および査定するために実験的に用いることができる。

【0065】

一定の態様において、 α -カテニン遺伝子プロファイルを含む癌幹細胞プロファイルは、たとえばRT-PCRによってポリヌクレオチドの発現レベルを定量することによって腫瘍試料において検出することができる。RT-PCRによる定量のために選択されるポリヌクレオチドは、癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含むポリヌクレオチドである。または、 α -カテニン遺伝子プロファイルを含む癌幹細胞プロファイルは、たとえば定量的免疫蛍光またはELISAによってタンパク質の発現レベルを定量することによって、腫瘍試料において検出されうる。定量のために選択されるタンパク質は、癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含む遺伝子によってコードされるタンパク質である。いくつかの態様において、 α -カテニン遺伝子プロファイルは、 α -カテニン遺伝子シグネチャーを含むマイクロアレイを用いるマイクロアレイ分析によって腫瘍組織において検出される。これらのマイクロアレイは、患者の試料におけるポリヌクレオチド、たとえばmRNAの発現レベルによって、またはたとえば抗体を用いて患者の試料におけるタンパク質の発現レベルによって、 α -カテニンプロファイルの存在を検出することができる。もう一つのいくつかの態様において、 α -カテニンプロファイルは、癌幹細胞シグネチャーを含む遺伝子の特異的に増幅するプライマーの組を用いるリアルタイムPCRによって、試料において検出される。本発明の他の態様において、予後において用いるための α -カテニンシグネチャーを含む遺伝子の発現を検出するポリヌクレオチドまたはタンパク質（たとえば、抗体）を含むマイクロアレイが提供される。

【0066】

本発明の他の特徴、目的、および長所は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。さらなる指針は、その双方が参照により本明細書に組み入れられる、Regents of the University of MichiganによるWO 02/12447およびWO 03/50502において提供される。

【0067】

定義

本発明の理解を容易にするために、多数の用語および句を以下に定義する。

【0068】

本明細書において用いられるように、「抗体」という用語には、モノクローナル抗体（完全長のモノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体（たとえば、二特異的抗体）、およびそれらが所望の生物活性（たとえば、本明細書において記述されるように幹癌細胞マーカーに対する結合能）を示す限り抗体断片が含まれる。抗体は、他の分子（たとえば、毒素）に共役させることができる。

【0069】

本明細書において用いられるように、「抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部を指す。抗体断片の例には、直線状抗体、一本鎖抗体分子、FcまたはFc'ペプチド、FabおよびFab断片、ならびに抗体断片から形成された多重特異的抗体が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0070】

本明細書において用いられるように、非ヒト（たとえば、マウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む、または配列を含まないキメラ抗体である。たいていの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの高度可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の高度可変領域からの残基によって置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基に置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見いだされない残基を含

みうる。これらの改変は一般的に、抗体の性能をさらに精密にするためになされる。一般的に、ヒト化抗体は、高度可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの高度可変ループに対応し、FR残基の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列の残基である、少なくとも一つ、典型的に二つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むうる。ヒト化抗体を生成するために用いられる方法の例は、Winterらに対する米国特許第5,225,539号において記述されている（参照により本明細書に組み入れられる）。

【0071】

細胞の濃縮集団における場合のような、「濃縮された」とは、未分画の組の細胞におけるマーカーを有する細胞数と比較した場合に、分画された組の細胞における特定のマーカー（たとえば、表4～9において示されるように）を有する細胞数の増加に表現型上基づいて定義されうる。しかし、「濃縮された」という用語は、試験マウスにおいて限界希釈頻度で腫瘍を形成する最小数の細胞として腫瘍形成機能によって機能的に定義されうる。たとえば、腫瘍幹細胞500個が試験動物の63%において腫瘍形成するが、試験動物の63%において腫瘍を形成するために未分画の腫瘍細胞5000個が必要である場合、固形腫瘍幹細胞集団は、腫瘍形成活性に関して10倍濃縮されている。本発明の幹細胞癌マーカーを用いて癌幹細胞の濃縮集団を生成することができる。いくつかの態様において、幹細胞集団は、未分画の腫瘍細胞と比較して少なくとも1.4倍（たとえば、1.4倍、1.5倍、2倍、5倍、10倍・・・20倍・・・）濃縮される。

【0072】

細胞に関して「単離された」とは、その天然の環境（固形腫瘍の場合のような）から切り離されて、単離または分離されて、それと共に天然に存在するがそれに基づいて細胞が単離されるマーカーを欠損する他の細胞を少なくとも約30%、50%、75%含まない、または約90%含まない細胞を指す。本発明の幹細胞癌マーカーは、癌幹細胞の単離集団を生成するために用いることができる。

【0073】

本明細書において用いられるように、遺伝子発現に関して「低レベル」、「減少レベル」、「低い発現」、「低減された発現」、または「減少した発現」という用語は、本明細書において細胞または細胞集団、特に癌幹細胞または癌幹細胞集団における、第二の細胞または細胞集団、たとえば正常乳腺上皮細胞におけるその遺伝子の発現より低いレベルでの遺伝子の発現を指すために互換的に用いられる。遺伝子発現の「低レベル」は、以下のレベルでの癌幹細胞または癌幹細胞集団における遺伝子の発現を指しうる：1) 正常乳腺上皮細胞における同じ遺伝子の発現レベルの半分またはそれより低い；および2) 通常の技術を用いて検出下限。遺伝子発現の「低レベル」は、たとえば定量的RT-PCRまたはマイクロアレイ分析によって、正常乳腺上皮と比較して癌幹細胞におけるポリヌクレオチド（mRNA、cDNA等）のほぼ検出不能な量まで減少した量を検出することによって決定されうる。または、遺伝子発現の「低レベル」は、たとえば、ELISA、ウェスタンブロット、または定量的免疫蛍光によって、正常乳腺上皮と比較して癌幹細胞におけるタンパク質のほぼ検出不能な量まで減少した量を検出することによって決定されうる。

【0074】

遺伝子発現に関連した「高レベル」、「増加レベル」、「高い発現」、「増加した発現」または「上昇レベル」という用語は、本明細書において細胞または細胞集団、特に癌幹細胞または癌幹細胞集団における、第二の細胞または細胞集団、たとえば正常乳腺上皮細胞におけるその遺伝子の発現より高いレベルでの遺伝子の発現を指すために互換的に用いられる。遺伝子発現の「上昇レベル」は、正常乳腺上皮細胞における同じ遺伝子の発現レベルの2倍またはそれより高いレベルでの癌幹細胞または癌幹細胞集団における遺伝子の発現を指しうる。遺伝子発現の「上昇レベル」は、たとえば定量的RT-PCR、またはマイクロアレイ分析によって、正常乳腺上皮と比較した癌幹細胞におけるポリヌクレオチド（mRNA、cDNA等）の増加量を検出することによって決定されうる。または、遺伝子発現の「上

昇レベル」は、たとえばELISA、ウェスタンブロット、定量的免疫蛍光等によって、正常乳腺上皮と比較した癌幹細胞におけるタンパク質の増加量を検出することによって決定されうる。

【0075】

本明細書において用いられるように、遺伝子発現に関連して「検出不能レベル」または「発現の喪失」という用語は、細胞または細胞集団、特に癌幹細胞または癌幹細胞集団において、発現が同定されないように通常の技術を用いてバックグラウンドと区別することができないレベルでの遺伝子発現を指す。遺伝子発現の「検出不能レベル」は、たとえば定量的RT-PCRまたはマイクロアレイ分析によって、癌幹細胞におけるポリヌクレオチド（mRNA、cDNA等）のバックグラウンドより上のレベルのを検出できないことによって決定されうる。または、遺伝子発現の「検出不能レベル」は、たとえばELISA、ウェスタンブロット、または免疫蛍光によって癌幹細胞におけるバックグラウンドより上のタンパク質のレベルを検出できないことによって決定されうる。

10

【0076】

本明細書において用いられるように、「受容体結合ドメイン」という用語は、細胞接着分子を含む受容体に関する任意の本来のリガンド、または対応する本来のリガンドの少なくとも定性的受容体結合能を保持するそのような本来のリガンドの任意の領域もしくは誘導体を指す。

【0077】

本明細書において用いられるように、「抗体-イムノアドヘシンキメラ」という用語は、抗体の少なくとも一つの結合ドメインと少なくとも一つのイムノアドヘシンとを組み合わせた分子を含む。例には、そのいずれも参照により本明細書に組み入れられる、Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991)およびCharnow et al., J. Immunol., 153:4268 (1994)において記述される二重特異的CD4-IgGキメラが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

20

【0078】

本明細書において用いられるように、「癌」および「癌様」という用語は、細胞の集団が制御されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理的状态を指す、または記述する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が含まれるがこれらに限定されるわけではない。そのような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫、頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、および様々なタイプの頭頸部癌が含まれる。

30

【0079】

本明細書において用いられるように、「転移」は、新しい位置での類似の癌様病変の発達を伴う、それによって癌が起源部位から体の他の領域へと伝搬または移動するプロセスを指す。「転移」または「転移する」細胞は、隣接する細胞との接着性の接触を失って、血流またはリンパによって疾患の原発部位から移動して隣接する体構造へと浸潤する細胞である。

40

【0080】

本明細書において用いられるように「エピトープ」という用語は、特定の抗体と接触する抗原のその部分を指す。

【0081】

タンパク質またはタンパク質の断片を用いて宿主動物を免疫する場合、タンパク質の多数の領域が、タンパク質の所定の領域または三次元構造に対して特異的に結合する抗体の産生を誘導することができる；これらの領域または構造は「抗原決定基」と呼ばれる。抗原決定基は、抗体との結合に関して無傷の抗原（すなわち、免疫反応を誘発するために用いられる「免疫原」）と競合することができる。

【0082】

50

抗体およびタンパク質またはペプチドの相互作用を参照して用いる場合の「特異的結合」または「特異的に結合する」は、相互作用がタンパク質上の特定の構造（すなわち、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味し、言い換えれば抗原は、タンパク質全体に対するよりむしろ特異的タンパク質構造を認識して結合する。たとえば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された「A」と抗体とを含む反応にエピトープA（または遊離の非標識A）を含むタンパク質が存在すれば、抗体に結合する標識Aの量を低減させるであろう。

【0083】

本明細書において用いられるように、抗体およびタンパク質またはペプチドの相互作用を参照して用いる場合の「非特異的結合」および「バックグラウンド結合」という用語は、特定の構造の存在に依存しない相互作用を指す（すなわち、抗体は、エピトープのような特定の構造よりむしろタンパク質全体に結合する）。

【0084】

本明細書において用いられるように、「被験者」という用語は、特定の処置のレシピエントであるヒト、非ヒト霊長類、齧歯類等が含まれるがこれらに限定されるわけではない任意の動物（たとえば、哺乳動物）を指す。典型的に、「被験者」および「患者」は、本明細書においてヒト被験者を参照して互換的に用いられる。

【0085】

本明細書において、「癌を有することが疑われる被験者」という用語は、癌を示す一つもしくは複数の症状（たとえば、顕著な塊または腫瘍）を示す、または癌に関してスクリーニングされる（たとえば、通常の身体的スクリーニングの際に）被験者を指す。癌を有することが疑われる被験者はまた、一つまたは複数の危険因子を有しうる。癌を有することが疑われる被験者は一般的に、癌に関して試験されていない。しかし、「癌を有することが疑われる被験者」は、初回診断を受けたがその癌の状態がわかっていない個体を含む。この用語にはさらに、癌に罹ったことがある（たとえば、寛解期の個体）人々が含まれる。

【0086】

本明細書において、「癌のリスクを有する被験者」は、特異的な癌を発症する一つまたは複数の危険因子を有する被験者を指す。危険因子には、性別、年齢、遺伝的素因、環境的曝露、過去の癌の事例、既存の非癌疾患、および生活様式が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0087】

本明細書において用いられるように、「被験者における特徴的な癌」という用語は、良性、前癌様または癌様組織の存在、癌の進行期、および被験者の予後が含まれるがこれらに限定されるわけではない被験者における癌の試料の一つまたは複数の特性の同定を指す。癌は、本明細書に開示の癌マーカーが含まれるがこれらに限定されるわけではない一つまたは複数の癌マーカー遺伝子の発現の同定を特徴としうる。

【0088】

「癌幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「固形腫瘍幹細胞」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、（1）広範な増殖能を有する；（2）低減された増殖または発達能を有する一つまたは複数の種類の分化した子孫を生成するように非対称な細胞分裂を行うことができる；および（3）自己再生または自己維持のために、対称な細胞分裂を行うことができる固形腫瘍からの細胞集団を指す。「癌幹細胞」、「腫瘍幹細胞」または「固形腫瘍幹細胞」のこれらの特性は、腫瘍を形成することができない腫瘍細胞の大多数と比較して、免疫無防備マウスに連続移植すると触診可能な腫瘍を形成する能力をそれらの癌幹細胞に付与する。癌幹細胞は、自己再生対混沌とした分化を受けて、変異が起こるにつれて経時的に変化する異常な細胞タイプを有する腫瘍を形成する。本発明の固形腫瘍幹細胞は、米国特許第6,004,528号によって提供される「癌幹細胞株」とは異なる。その特許において、「癌幹細胞株」は、それ自身少数の変異を有するが、細胞の環境において起こる腫瘍形成性の変化の結果として、非対称の細胞分裂よりむしろ対称な細胞分裂を受け

る遅く成長する前駆細胞タイプとして定義される。このように、この「癌幹細胞株」仮説は、高度に変異した急速に増殖する腫瘍細胞が、ほとんどが、比較的正常な幹細胞を蓄積させて、次にそれらを腫瘍細胞にする変異を受けさせる異常な環境の結果として生じると提唱する。米国特許第6,004,528号は、そのようなモデルを癌の診断を増強するために用いることができると提唱する。固形腫瘍幹細胞モデルは、「癌幹細胞株」モデルとは根本的に異なり、その結果「癌幹細胞株」モデルによって提供されない有用性を示す。第一に、固形腫瘍幹細胞は、「変異を容赦」されない。米国特許第6,004,528号によって記述された「変異を容赦された癌幹細胞株」は、前癌様病変であると見なされうるが、本発明によって記述される固形腫瘍幹細胞は、それ自身、腫瘍形成に関与する変異を含む癌細胞である。すなわち、米国特許第6,004,528号における「癌幹細胞株」とは区別される高度変異細胞の中に、本発明の固形腫瘍幹細胞（「癌幹細胞」）が含まれるであろう。第二に、癌に至る遺伝的変異は、固形腫瘍幹細胞において大きく内因性となりうると共に環境的となりうる。固形腫瘍幹細胞モデルは、単離された固形腫瘍幹細胞が、移植時にさらなる腫瘍を生じることができると予測するが（このように、転移を説明する）、「癌幹細胞株」モデルは、腫瘍形成性であるのはその異常な環境であることから、移植された「癌幹細胞株」細胞が新たな腫瘍を生じることができないであろうと予測するであろう。実際に、解剖されて表現型上単離されたヒト固形腫瘍幹細胞を、それらが新しい腫瘍を形成するマウス（正常な腫瘍の環境とは非常に異なる環境に）に移植できることにより、本発明は「癌幹細胞株」モデルとは区別される。第三に、固形腫瘍幹細胞はおそらく、対称的な細胞分裂が絶対的な特性ではないように、対称的および非対称的に分裂する。第四に、固形腫瘍幹細胞は、遅い増殖速度が明確な特徴ではないように、多くの変数に応じて、急速または遅く分裂することができる。

【0089】

本明細書において用いられるように、「腫瘍形成性」は、自己再生特性（さらなる腫瘍形成性癌幹細胞を生じる）、および固形腫瘍幹細胞に腫瘍を形成させる他の全ての腫瘍細胞の生成するための増殖特性（分化した、そしてこのように非腫瘍形成性の腫瘍細胞を生じる）を含む固形腫瘍幹細胞の機能的特徴を指す。

【0090】

本明細書において用いられるように、「幹細胞癌マーカー」、「癌幹細胞マーカー」、「腫瘍幹細胞マーカー」、または「固形腫瘍幹細胞マーカー」という用語は、単独または他の遺伝子と併用して、非腫瘍形成性細胞と比較して、その発現レベルが単独または他の遺伝子と組み合わせ、腫瘍形成性癌細胞の存在と相関する遺伝子もしくは複数の遺伝子、または遺伝子もしくは複数の遺伝子によって発現されたタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドを指す。相関は、遺伝子の発現の増加または減少のいずれかと相関しうる（たとえば、遺伝子によってコードされるmRNAまたはペプチドのレベルの増加または減少）。

【0091】

「遺伝子発現プロファイル」は、生物試料において発現された少なくとも一つのポリヌクレオチドまたはタンパク質の同定された発現レベルを指す。

【0092】

「遺伝子プロファイル」、「遺伝子パターン」、「発現パターン」、または「発現プロファイル」は、生物学的試料の独自の同定子を提供する特異的遺伝子発現パターン、たとえば乳癌または結腸癌試料を分析することによって得られた乳癌または結腸癌遺伝子発現パターンを指し、それらの場合、「乳癌遺伝子プロファイル」または「結腸癌遺伝子発現」と呼ばれうる。「遺伝子パターン」は、遺伝子パターンを癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較した後に、疾患を診断する、予後を作製する、治療を選択する、および／または疾患または治療をモニターするために用いることができる。

【0093】

「癌幹細胞遺伝子シグネチャー」、「腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャー」、「癌幹細胞シグネチャー」、「腫瘍幹細胞シグネチャー」、「腫瘍形成遺伝子シグネチャー」、および

「TG遺伝子シグネチャー」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、他の細胞または細胞集団、たとえば正常乳腺上皮組織と比較して癌幹細胞において異なるように発現された遺伝子を含む遺伝子シグネチャーを指す。一つのいくつかの態様において、癌幹細胞遺伝子シグネチャーは、癌幹細胞対正常乳腺上皮において、数倍の変化によって、たとえば2倍低減されたおよび／または上昇した発現によって異なるように発現され、たとえば多数の試料に対するt-検定のP値によるような統計分析を用いることによってさらに制限された遺伝子を含む。いくつかの態様において、癌幹細胞において異なるように発現された遺伝子は、その発現変化倍率または発現変化百分率と共に、その発現と選択された遺伝子との相関に基づいて癌幹細胞遺伝子シグネチャーに分類される。

【0094】

本明細書において用いられるように、「α-カテニンシグネチャー」、「α-カテニン遺伝子シグネチャー」、「αカテニン遺伝子発現シグネチャー」、「シグネチャー1」、または「癌幹細胞シグネチャー1」という用語は、癌幹細胞シグネチャーの異なるサブセットを指す。α-カテニン遺伝子シグネチャーを発現する癌幹細胞は、「シグネチャー1遺伝子発現」を示す、または「シグネチャー1」、「シグネチャー1型」、もしくは「α-カテニンシグネチャー」癌幹細胞と呼ばれる。α-カテニンシグネチャーは、1) 正常ヒト乳腺上皮と比較して、alpha-catenin (CTNNA1); nicastrin (NCSTN); ligand of numb-protein X (LNX); armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3); melanoma associated gene (D2S448); tumor suppressor candidate 1 (TUSC1); glutamine synthase (GLUL); retinoblastoma 1 (RB1); brain expressed X-linked 2 (BEX2); solute carrier family 12, member 2 (SLC12A2); galactosylceramidase (GALC); nerve growth factor receptor associated protein 1 (NGFRAP1); fibroblast growth factor 13 (FGF13); KIAA1102; solute carrier family 1, member 4 (SLC1A4); およびDnaJ homolog, subfamily D, member 1 (DNAJD1)を含む異なる組の遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、および／または2) 正常ヒト乳腺上皮と比較して、endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein coupled receptor 2 (EDG2); caveolin 1 (CAV1); caveolin 2 (CAV2); discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2); insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3); S100A2; CXCL5; c-Met (MET); fork head box Q1 (FOXQ1); cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A); malignant fibrous histiocyte amplified sequence 1 (MFHAS1); interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA); killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1 (KLRF1); protein kinase C, alpha (PKCA); uridine phosphorylase 1 (UPP1); cathepsin L2 (CTSL2); solute carrier family 7, member 5 (SLC7A5); aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (ARNTL2); protease, serine, 1, 2, and 3 (PRSS1, PRSS2, PRSS3); vanin 1 (VNN1); RAB38; zinc finger, BED domain containing 2 (ZBED2); myeloma overexpressed gene (MYEOV); MAL; IGF-II mRNA-binding protein 3 (IMP-3); およびdehydrogenase/reductase SDR family, member 9 (DHRS9)を含む異なる組の遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現を含む。本発明のいくつかの態様において、α-カテニン発現の検出不能または低レベルは、1) nicastrin (NCSTN); ligand of numb-protein X (LNX); armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3); melanoma associated gene (D2S448); glutamine synthase (GLUL); およびretinoblastoma 1 (RB1)を含む遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、および／または2) endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein coupled receptor 2 (EDG2); caveolin 1 (CAV1); caveolin 2 (CAV2); discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2); insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3); S100A2; CXCL5; c-Met (MET); forkhead box Q1 (FOXQ1); cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A); cathepsin L2 (CTSL2); およびmalignant fibrous histiocyte amplified sequence 1 (MFHAS1)を含む異なる組の遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現を伴う。もう一つの態様において、α-カテニンシグネチャーは、遺伝子：α-カテニン；NCSTN；LNX；ARMCX3；D2S448；GLUL；およびRB1の二つまたはそれ以上の検出不能または低レベル発現を含む。もう一つ

10

20

30

40

50

の態様において、 α -カテニンシグネチャーは、遺伝子：EDG2；CAV1；CAV2；DCBLD2；IGFBP3；S100A2；CXCL5；MET；FOXQ1；CDKN2A；CTSL2；およびMFHAS1の二つまたはそれ以上の上昇した発現を含む。または、 α -カテニンシグネチャーは、1) 遺伝子： α -カテニン；NCSTN；LNX；ARMCX3；D2S448；GLUL；およびRB1の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、ならびに2) 遺伝子：EDG2；CAV1；CAV2；DCBLD2；IGFBP3；S100A2；CXCL5；MET；FOXQ1；CDKN2A；CTSL2；およびMFHAS1の一つまたは複数の上昇した発現を含む。

【0095】

本明細書において用いられるように、「E-カドヘリンシグネチャー」、「E-カドヘリン遺伝子シグネチャー」、「E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャー」、「シグネチャー2」、または「癌幹細胞シグネチャー2」という用語は、癌幹細胞シグネチャーの異なるサブセットを指す。E-カドヘリン遺伝子シグネチャーを発現する癌幹細胞は、「シグネチャー2遺伝子発現」を示す、または「シグネチャー2」、「シグネチャー2型」、もしくは「E-カドヘリンシグネチャー」癌幹細胞として呼ばれる。E-カドヘリンシグネチャーは、1) 正常乳腺上皮と比較して、e-cadherin (CDH1)；matrix metalloproteinase 7 (MMP7)；nephroblastoma overexpressed gene (Nov)；FOS-like antigen 1 (FOSL1)；interleukin 1 receptor, type II (IL1R2)；secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)；keratin 6B (KRT6B)；putative lymphocyte G0/G1 switch gene (GOS2)；interleukin 8 (IL8)；UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 (B3GNT5)；およびfibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1)を含む遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、および/または2) 正常乳腺上皮と比較して、Src homology 2 domain containing transforming protein 1 (SHC1)；FLJ20152；aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)；cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2)；chromosome 17 open reading frame 27 (C17orf27)；transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (TAP1)；RNASEL；およびsimilar to aspartate beta hydroxylase (LOC57168)を含む遺伝子の一つまたは複数の増加した発現を含む。本発明のいくつかの態様において、E-カドヘリンの検出不能または低レベル発現は、matrix metalloproteinase 7 (MMP7)；nephroblastoma overexpressed gene (Nov)；FOS-like antigen 1 (FOSL1)；およびinterleukin 1 receptor, type II (IL1R2)が含まれる遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現；および/または2) SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (SHC1)およびFLJ20152が含まれる遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現を伴う。もう一つの態様において、E-カドヘリンシグネチャーは、遺伝子：E-カドヘリン；MMP7；Nov；FOSL1；およびIL1R2の二つまたはそれ以上の検出不能レベルまたは低レベル発現を含む。もう一つの態様において、E-カドヘリンシグネチャーは、遺伝子SHC1およびFLJ20152の上昇した発現を含む。または、E-カドヘリンシグネチャーは、1) 遺伝子：E-カドヘリン；MMP7；Nov；FOSL1；およびIL1R2の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、ならびに2) 遺伝子SHC1およびFLJ20152の一つまたは複数の上昇した発現を含む。

【0096】

本明細書において用いられるように、「発現レベルを特異的に検出する試薬」という用語は、一つまたは複数の遺伝子（たとえば、本発明の癌マーカーが含まれるがこれらに限定されるわけではない）の発現を検出するために用いられる試薬を指す。適した試薬の例には、関心対象遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、アプタマー、関心対象遺伝子と特異的に増幅することができるPCRプライマー、および関心対象遺伝子によって発現されるタンパク質に特異的に結合することができる抗体が含まれるがこれらに限定されるわけではない。他の非制限的な例は、以下の説明および実施例において見いだされうる。

【0097】

本明細書において用いられるように、「非癌様対照と比較して発現の減少または増加を検出する」とは、非癌様対照試料におけるレベルと比較して遺伝子の発現レベル（たとえば、mRNAまたはタンパク質レベル）を測定する段階を指す。遺伝子発現は、本明細書に開

示の方法が含まれるがこれらに限定されるわけではない任意の適した方法によって測定されうる。

【0098】

本明細書において用いられるように、「試験化合物の非存在下と比較して試験化合物の存在下で細胞試料における遺伝子発現の変化を検出する段階」という用語は、試験化合物の非存在下と比較して試験化合物の存在下での変化した発現レベル（たとえば、増加または減少）を測定する段階を指す。遺伝子発現は、任意の適した方法を用いて測定することができる。

【0099】

本明細書において用いられるように、「被験者における癌を検出するためのキットを用いるための説明書」という用語には、被験者からの試料における癌の検出および特徴付けのためのキットに含まれる試薬を用いるための説明書が含まれる。

【0100】

本明細書において用いられるように、「診断を提供する」、または「診断情報」は、患者が疾患または状態を有するか否かを決定するため、および／または疾患または状態の処置（一般的な処置または任意の特定の処置のいずれか）の予後またはそれに対する可能性がある反応に関して重要性を有する表現型範疇または任意の範疇に疾患または状態を分類するために有用な任意の情報を指す。同様に、診断は、被験者が状態（腫瘍のような）を有する可能性があるか否か、たとえば高リスク腫瘍または低リスク腫瘍としての腫瘍の性質または分類に関連する情報、予後に関連する情報、および／または適当な処置を選択するために有用な情報が含まれるがこれらに限定されるわけではない、任意のタイプの診断情報を提供する段階を指す。処置の選択には、特定の化学療法剤または手術もしくは放射線のような他の処置様相の選択、または治療を差し控えるもしくは送達するか否かに関する選択が含まれうる。

【0101】

本明細書において用いられるように、「予後を提供する」、「予後の情報」、または「予測情報」という用語は、被験者のさらなる健康（たとえば、予想される罹患率または死亡率、癌に罹る可能性、および転移のリスク）に及ぼす癌の存在の影響（たとえば、本発明の診断法によって決定されるように）に関する情報を提供する段階を指す。

【0102】

腫瘍または癌と診断された患者に関する「低リスク」という用語は、転移の確率がより低い、および／または初回診断の約5年以内に死亡を引き起こす、または死亡する確立が所定の集団内での全ての腫瘍または患者より低い、腫瘍または患者を指す。

【0103】

腫瘍または癌と診断された患者に関する「高リスク」という用語は、転移の確率がより高い、および／または初回診断の約5年以内に死亡を引き起こすまたは死亡する確率が所定の集団内での全ての腫瘍または患者より高い、腫瘍または患者を指す。

【0104】

本明細書において用いられるように、「術後の腫瘍組織」という用語は、被験者から採取された（たとえば、手術中に）癌様組織（たとえば、生検組織）を指す。

【0105】

本明細書において用いられるように、「癌と診断された被験者」という用語は、検査を受けて癌様組織を有することが見いだされた被験者を指す。癌は、生検、x-線、血液検査、および本発明の診断法が含まれるがこれらに限定されるわけではない任意の適した方法を用いて診断されうる。

【0106】

本明細書において用いられるように、「生検組織」、「患者の試料」、「腫瘍試料」、および「癌試料」という用語は、試料が、癌幹細胞を含む癌様組織を有するか否かを決定する、またはその癌様組織の遺伝子発現プロファイルを決定する目的のために被験者から採取された細胞、組織、または液体試料を指す。いくつかの態様において、生検組織また

は液体は、被験者が癌を有することが疑われるために得られる。次に、生検組織または液体は、癌、癌幹細胞、および／または癌幹細胞遺伝子シグネチャー発現の有無に関して試験される。

【0107】

本明細書において用いられるように、「遺伝子移入系」という用語は、核酸配列を含む組成物を細胞または組織に送達する任意の手段を指す。たとえば、遺伝子移入系には、ベクター（たとえば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および他の核酸に基づく送達系）、裸の核酸のマイクロインジェクション、ポリマーに基づく送達系（たとえば、リポソームに基づくおよび金属粒子に基づく系）、バイオリスティック (bi olistic) 注射等が含まれるがこれらに限定されるわけではない。本明細書において用い

10

【0108】

本明細書において用いられるように、「部位特異的組み換え標的配列」という用語は、組み換え因子に関する認識配列および組み換えが起こる位置を提供する核酸配列を指す。

【0109】

本明細書において用いられるように、「核酸分子」という用語は、DNAまたはRNAが含まれるがこれらに限定されるわけではない分子を含む任意の核酸を指す。この用語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブ

ロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、

ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、シュードウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、シュードウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリンが含まれるがこれらに限定されるわけではないDNAおよびRNAの公知の任意の塩基類似体が含まれる配列を含む。

20

30

【0110】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA（たとえば、rRNA、tRNA）の産生にとって必要なコード配列を含む核酸（たとえば、DNA）配列を指す。ポリペプチドは、完全長または断片の所望の活性または機能的特性（たとえば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性等）が保持される限り、完全長のコード配列、またはコード配列の任意の部分によってコードされうる。この用語はまた、構造遺伝子のコード領域、および遺伝子が完全長のmRNAの長さに対応するように、いずれかの末端で約1 kbまたはそれより長い距離で5'および3'末端の双方でコード領域に隣接して存在する配列を含む。コード領域の5'に存在して、mRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'または下流に位置して、mRNA上に存在する配列は、3'-非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNAおよびゲノム型の双方を含む。遺伝子のゲノム型またはクローンは、「イントロン」、「介在領域」、または「介在配列」と呼ばれる非コード配列によって中断されたコード領域を含む。イントロンは、核RNA (hnRNA) に転写される遺伝子のセグメントであり；イントロンは、エンハンサーのような調節要素を含み

40

50

うる。イントロンは、核または一次転写物から「スプライシングにより」除去される；したがってイントロンはメッセンジャーRNA（mRNA）転写物には存在しない。mRNAは、翻訳の際に新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列または順序を明記するように機能する。

【0111】

本明細書において用いられるように、「異種遺伝子」という用語は、その天然の環境に存在しない遺伝子を指す。たとえば、異種遺伝子には、もう一つの種に導入された一つの種からの遺伝子が含まれる。異種遺伝子にはまた、何らかの方法で改変されている（たとえば、変異、多数のコピーの付加、非本来の調節配列に連結している等）、生物に対して本来の遺伝子が含まれる。異種遺伝子は、異種遺伝子配列が、染色体における遺伝子配列に天然に関連して見いだされない、または天然において見いだされない染色体の部分に関連しているDNA配列に典型的に連結されている（例えば遺伝子が通常発現しない座位で発現する遺伝子）という点において、内因性の遺伝子とは区別される。

10

【0112】

本明細書において用いられるように、「遺伝子発現」という用語は、遺伝子においてコードされる遺伝情報を、遺伝子の「転写」を通して（たとえばRNAポリメラーゼの酵素作用によって）RNA（たとえば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA）に変換するプロセス、およびタンパク質をコードする遺伝子の場合、mRNAの「翻訳」を通してタンパク質に変換するプロセスを指す。遺伝子発現はプロセスにおける多くの段階で調節される。「上方制御」または「活性化」は、遺伝子発現産物（たとえば、RNAまたはタンパク質）の産生を増加させる調節を指し、「下方制御」または「抑制」は、産生を減少させる調節を指す。上方制御または下方制御に関係する分子（たとえば、転写因子）はしばしばそれぞれ、「アクチベータ」および「リプレッサー」と呼ばれる。

20

【0113】

イントロンを含むことのほかに、遺伝子のゲノム型にはまた、RNA転写物に存在する配列の5'および3'の双方に存在する配列が含まれる。これらの配列は、「隣接」配列または領域と呼ばれる（これらの隣接配列はmRNA転写物上に存在する非翻訳配列に対して5'または3'に存在する）。5'隣接領域は、遺伝子の転写を制御するまたは影響を及ぼすプロモーターおよびエンハンサーのような調節配列を含みうる。3'隣接領域は、転写の終了、転写後切断、およびポリアダニル化を指示する配列を含みうる。

【0114】

「siRNA」という用語は、低分子干渉RNAを指す。いくつかの態様において、siRNAは、長さが約18~25ヌクレオチドの二本鎖または二本鎖領域を含み、しばしばsiRNAはそれぞれの鎖の3'末端で約2~4個の不對ヌクレオチドを含む。siRNAの二本鎖または二本鎖領域の少なくとも一つの鎖は、標的RNA分子と実質的に相同、または実質的に相補的である。標的RNA分子と相補的な鎖は、「アンチセンス鎖」であり、標的RNA分子と相同な鎖は、「センス鎖」であり、同様にsiRNAアンチセンス鎖と相補的である。siRNAはまた、さらなる配列を含みうる；そのような配列の非制限的な例には、連結配列またはループと共に幹構造および他の折りたたみ構造が含まれる。siRNAは無脊椎動物および脊椎動物においてRNA干渉を誘発するための、および植物における転写後遺伝子沈黙化の際の配列特異的RNA分解を誘発するための重要な中間体として機能するように思われる。

30

40

【0115】

「RNA干渉」または「RNAi」という用語は、siRNAによる遺伝子発現の沈黙化または減少を指す。これは、その二本鎖領域において沈黙化遺伝子の配列と相同なsiRNAによって開始された、動物および植物における配列特異的転写後遺伝子沈黙化プロセスである。遺伝子は、生物にとって内因性もしくは外因性となりえて、染色体に組み込まれて存在することができ、またはゲノムに組み入れられないトランスフェクションベクターにおいて存在することができる。遺伝子の発現は、完全または部分的に阻害される。RNAiはまた、標的RNAの機能を阻害すると考えられうる；標的RNAの機能は完全または部分的となりうる。

【0116】

本明細書において用いられるように、「をコードする核酸分子」、「をコードするDNA

50

」、および「をコードするDNA」という用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、ポリペプチド（タンパク質）鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。このように、DNA配列はアミノ酸配列をコードする。

【0117】

本明細書において用いられるように、「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド」および「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド」という用語は、遺伝子のコード領域を含む核酸配列、または言い換えれば遺伝子産物をコードする核酸配列を意味する。コード領域はcDNA、ゲノムDNA、またはRNA型で存在しうる。DNA型で存在する場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一本鎖（すなわち、センス鎖）または二本鎖となりうる。転写の適切な開始および／または一次RNA転写物の正確なプロセッシングを許容するために必要である場合、エンハンサー／プロモーター、スプライス接合部、ポリアデニル化シグナル等のような適した制御要素を、遺伝子のコード領域の近位に配置することができる。または、本発明の発現ベクターにおいて利用されるコード領域は、内因性のエンハンサー／プロモーター、スプライス接合部、介在配列、ポリアデニル化シグナル等、または内因性および外因性の制御配列の組み合わせを含みうる。

【0118】

本明細書において用いられるように、ヌクレオチド配列を参照する場合（「所定のヌクレオチド配列の一部」のような）の「一部」という用語は、その配列の断片を指す。断片の大きさは、4ヌクレオチドから全ヌクレオチド配列マイナス1ヌクレオチド（10ヌクレオチド、20、30、40、50、100、200等）の範囲となりうる。

【0119】

「ハイブリダイズする」、「選択的にハイブリダイズする」、または「特異的にハイブリダイズする」という句は、その配列が複雑な混合物（たとえばDNAまたはRNAのライブラリ）に存在する場合にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件で特定のヌクレオチド配列に限って分子が結合する、または二本鎖を形成することを指す。たとえば、Andersen (1998) *Nucleic Acid Hybridization* Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) *Nucleic Acid Hybridization* Wileyを参照されたい。

【0120】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という句は、典型的に核酸の複雑な混合物においてプローブがその標的小配列とハイブリダイズするが他の配列とハイブリダイズしないであろう条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる状況では異なるであろう。より長い配列はより高温で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに関する詳しい指針は、Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)において見いだされる。一般的に、ストリンジェントな条件は、既定のイオン強度で特異的配列に関する熱融解点（ T_m ）より約5～10℃低くなるように選択される。 T_m は、標的に対して相補的なプローブの50%が平衡時（ T_m で標的配列が過剰量存在する場合、プローブの50%が平衡時に占有される）に標的配列にハイブリダイズする温度（既定のイオン強度、pH、および核酸濃度）である。ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH 7.0～8.3で約1.0 M未満のナトリウムイオン、典型的に約0.01～1.0 Mナトリウムイオン濃度（または他の塩）、および温度が、短いプローブ（たとえば、10～50ヌクレオチド）に関して少なくとも約30℃であり、長いプローブ（たとえば、50ヌクレオチドより長い）に関して少なくとも約60℃である。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような脱安定化剤を加えることによって達成されうる。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションでは、陽性シグナルは少なくともバックグラウンドの2倍またはバックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍である。例としての高ストリンジェンシーまたはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には：50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDSで42℃でインキュベート

する、または5×SSCおよび1%SDSにおいて65℃でインキュベートして、0.2×SSCおよび0.1%SDSにおいて65℃での洗浄が含まれる。PCRに関して、温度約36℃は、低ストリンジェンシー増幅に関して典型的であるが、アニーリング温度は、プライマーの長さに応じて約32℃～48℃まで変化しうる。高ストリンジェンシーPCR増幅に関して、温度約62℃は典型的であるが、高ストリンジェンシーアニーリング温度は、プライマーの長さおよび特異性に応じて約50～65℃まで変化しうる。高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシー増幅の双方に関する典型的なサイクル条件には、90～95℃で30～120秒の変性相、30～120秒続くアニーリング相、および約72℃で1～2分間の伸長相が含まれる。

【0121】

本明細書において用いられるように、「機能的な組み合わせ」、「機能的順序」、および「機能的に連結した」という用語は、所定の遺伝子の転写を指示することができる核酸分子、および／または所望のタンパク質分子の合成が産生されるように、核酸配列が連結していることを指す。この用語はまた、機能的タンパク質が産生されるようにアミノ酸配列が連結していることを指す。

【0122】

「単離されたオリゴヌクレオチド」または「単離されたポリヌクレオチド」のように、核酸に関連して用いる場合の「単離された」という用語は、その天然の起源において通常会合している少なくとも一つの成分または混入物から同定および分離されている核酸配列を指す。単離された核酸は、天然において見いだされる核酸とは異なる型または状況で存在する核酸である。対照的に、DNAおよびRNAのような核酸としての非単離核酸は、それらが天然に存在する状態で見いだされる。たとえば、所定のDNA配列（たとえば、遺伝子）は、隣接する遺伝子に対して近位の宿主細胞染色体には見いだされない；特異的タンパク質をコードする特異的mRNA配列のようなRNA配列は、多数のタンパク質をコードする多数の他のmRNAとの混合物として細胞において見いだされる。しかし、所定のタンパク質をコードする単離核酸には、例によって、核酸が天然の細胞の位置とは異なる染色体の位置に存在する、またはそうでなければ天然において見いだされるものとは異なる核酸配列によって隣接される、所定のタンパク質を通常発現する細胞におけるそのような核酸が含まれる。単離核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖型で存在しうる。単離核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドがタンパク質を発現するために利用される場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、最小でセンス鎖またはコード鎖を含むであろうが（すなわちオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは一本鎖となりうる）、センス鎖およびアンチセンス鎖の双方を含むうる（すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは二本鎖となりうる）。

【0123】

「アミノ酸配列」および「ポリペプチド」、「タンパク質」、または「ペプチド」のような用語は、アミノ酸配列を、引用されたタンパク質分子に関連する完全な本来のアミノ酸配列に限定することを意味しない。

【0124】

本明細書において用いられるように、「本来のタンパク質」という用語は、タンパク質がベクター配列によってコードされるアミノ酸残基を含まないことを示す；すなわち、本来のタンパク質は、天然に存在するタンパク質において見いだされるアミノ酸のみを含む。本来のタンパク質は、組み換え手段によって産生されうる、または天然に存在する起源から単離されうる。

【0125】

本明細書において用いられるように、タンパク質を参照する場合（「所定のタンパク質の一部」のような）の「一部」という用語は、タンパク質の断片を指す。断片は、大きさがアミノ酸残基4個から全アミノ酸配列マイナスアミノ酸1個までの範囲となりうる。

【0126】

「サザンブロット」という用語は、大きさに従ってDNAを分画した後、ゲルからのDNAをニトロセルロースまたはナイロンメンブレンのような固相支持体に転写するためのアガロ

10

20

30

40

50

ースまたはアクリルアミドゲル上でのDNAの分析を指す。次に、固定されたDNAを標識プローブによってプロービングして、用いたプローブと相補的であるDNA種を検出する。DNAは、電気泳動の前に制限酵素によって切断することができる。電気泳動後、DNAは、固相支持体への転写前または転写の際に部分的に脱プリンされ変性されうる。サザンブロットは、分子生物学者の標準的なツールである（J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, pp 9.31-9.58 [1989]）。

【0127】

本明細書において用いられるように「ノザンブロット」という用語は、大きさに従ってRNAを分画した後、ゲルからのRNAをニトロセルロースまたはナイロンメンブレンのような固相支持体に転写する、アガロースゲル上でのRNAの電気泳動によるRNAの分析を指す。次に、固定されたRNAを標識プローブによってプロービングして、用いたプローブと相補的なRNA種を検出する。ノザンブロットは分子生物学者の標準的なツールである（J. Sambrook, et al, supra, pp 7.39-7.52 [1989]）。

【0128】

「ウェスタンブロット」という用語は、ニトロセルロースまたはナイロンメンブレンのような固相支持体に固定されたタンパク質（またはポリペプチド）の分析を指す。タンパク質をアクリルアミドゲルにおいて泳動させてタンパク質を分離した後、ゲルからのタンパク質をニトロセルロースまたはナイロンメンブレンのような固相支持体に転写する。次に、固定されたタンパク質を関心対象抗原に対して反応性を有する抗体に曝露する。抗体の結合を、放射標識抗体を用いることを含む様々な方法によって検出することができる。

【0129】

本明細書において用いられるように、「トランスジーン」という用語は、たとえば、外来遺伝子を新しい受精卵または初期胚に導入することによって生物に留置された外来遺伝子を指す。「外来遺伝子」という用語は、実験操作によって動物のゲノムに導入され、導入された遺伝子が天然に存在する遺伝子と同じ位置に存在しない限り、その動物において見いだされる遺伝子配列が含まれうる任意の核酸（たとえば、遺伝子配列）を指す。

【0130】

本明細書において用いられるように、「ベクター」という用語は、一つの細胞からもう一つの細胞へとDNAセグメントを移入する核酸分子を参照して用いられる。「媒体」という用語は時に「ベクター」と互換的に用いられる。ベクターはしばしば、プラスミド、バクテリオファージ、または植物もしくは動物ウイルスに由来する。

【0131】

本明細書において用いられるように、「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列、および特定の宿主生物における機能的に連結したコード配列の発現にとって必要な適当な核酸配列を含む組み換え型DNA分子を指す。原核細胞における発現にとって必要な核酸配列には通常、しばしば他の配列と共に、プロモーター、オペレーター（任意）、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、エンハンサー、ならびに終始およびポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

【0132】

「過剰発現」および「過剰発現する」という用語、ならびに文法的同等物は、mRNAのレベルを参照して、対照または非トランスジェニック動物における所定の組織において観察されるレベルより約1.5倍高い（またはそれより大きい）発現レベルを示すために用いられる。mRNAのレベルは、ノザンブロット分析が含まれるがこれらに限定されるわけではない当業者に公知の多数の任意の技術を用いて測定される。ノザンブロットにおいて、分析される各組織からローディングされたRNAの量の差を制御するために、適当な対照が含まれる（たとえば、ノザンブロットにおいて観察されるmRNA特異的シグナルを標準化または統一するための手段として、各試料に存在する全ての組織において本質的に同じ量で存在する豊富なRNA転写物である28S rRNAの量を用いることができる）。正確にスプライシングされたトランスジーンRNAに対して大きさが対応するバンドに存在するmRNAの量を定量する；トランスジーンプローブとハイブリダイズするRNAの他の軽微な種は、トランスジ

ェニックmRNAの発現の定量において考慮されない。

【0133】

本明細書において用いられるように、「インビトロ」という用語は、人工的な環境、および人工的な環境において起こるプロセスまたは反応を指す。インビトロ環境は、試験管および細胞培養からなりうるが、これらに限定されない。「インビボ」という用語は、天然の環境（たとえば、動物または細胞）、および天然の環境において起こるプロセスまたは反応を指す。

【0134】

「試験化合物」および「候補化合物」という用語は、疾患、疾病、病気、または体機能の障害（たとえば、癌）を処置または予防するために用いられる候補物質である任意の化学実体、薬剤、薬物等を指す。試験化合物は、公知のおよび有望な治療化合物の双方を含む。試験化合物は、本発明のスクリーニング法を用いるスクリーニングによって治療的であると決定されうる。本発明のいくつかの態様において、試験化合物には、アンチセンス化合物が含まれる。

【0135】

本明細書において用いられるように、「試料」という用語には、生物学のおよび環境試料と共に任意の起源から得られた標本または培養物が含まれる。生物学の試料は、動物（ヒトを含む）から得ることができ、液体、固体、組織、および気体を含む。生物学の試料には、血漿、血清等のような血液産物が含まれる。環境試料には、表面物質、土壌、水、結晶および工業試料のような環境材料が含まれる。しかし、そのような試料は、本発明に適用可能な試料のタイプを制限すると解釈されない。

【0136】

発明の詳細な説明

本発明は、癌を処置、特徴付け、および診断するための組成物および方法を提供する。特に、本発明は、固形腫瘍幹細胞に関連する遺伝子発現プロファイルを提供すると共に、固形腫瘍幹細胞の診断、特徴付け、および処置にとって有用な新規マーカーを提供する。

【0137】

I. 幹細胞および固形腫瘍幹細胞

一般的な癌は、短命の成熟細胞を補充するために責任を負う大きい増殖細胞亜集団を含む組織において発生する。そのような臓器において、細胞の成熟は、階層的に整列しており、その中で幹細胞のまれな集団が成熟細胞を生じて、自己再生と呼ばれるプロセスを通してそれらを永続させる (Akashi & Weissman, *Developmental Biology of Hematopoiesis*, Oxford Univ. Press, NY, 2001; Spangrude et al., 1988, *Science* 241:58-61; Baum et al., 1992, *PNAS* 89:2804-8; Morrison et al., 1995, *PNAS* 92:10302-6; Morrison et al., 1996, *Immunity* 5:207-16; Morrison et al., 1995, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:35-71; Morrison et al., 1997, *Dev.* 124:1929-39; Morrison & Weissman, 1994, *Immunity* 1:661; Morrison et al., 1997, *Cell* 88:287-98; Uchida et al., 2000, *PNAS* 97:14720-5; Morrison et al., 2000, *Cell* 101:499-510)。その稀少さにより、幹細胞の生物学の、分子的、および生化学的特性を調べるために、幹細胞を単離しなければならない。それらはほとんどの組織を生じる可能性があるが、幹細胞は、ごく少数の組織において厳密に同定および精製されているに過ぎない。造血幹細胞 (HSC) と呼ばれるリンパ造血系を生じる幹細胞が、マウスおよびヒトから単離されており、これらは最も特徴付けのなされた幹細胞である。HSCを含む組織の有用性は、骨髓切除プロトコール後の血液リンパ系を再生するために骨髓移植のために広く用いられる癌治療において証明されている (Baum et al., *Bone Marrow Transplantation*, Blackwell Scientific Publications, Boston, 1994)。患者からのHSCの先を見越した単離によって、自己移植のための癌を含まない集団が得られうる (Tricot et al., 1998, *Blood* 91:4489-95; Negrin et al., 2000, *Biol Blood Marrow Transplantation* 6:262-5; Michallet et al., 2000, *Exp. Hematol.* 28:858-70; Veona et al., 2002, *Br. J. Haematol.* 117:642-5; Barbui et al., 2002, *Br. J. Haematol.* 116:202-10)。

10

20

30

40

50

【0138】

癌が発生する組織の細胞生物学、および具体的にそれらの組織に存在する幹細胞を理解することは、癌の生物学に新しい洞察を提供する。幹細胞生物学のいくつかの局面は癌に関連している。第一に、正常幹細胞と癌幹細胞はいずれも自己再生を受け、増えつつある証拠から、類似の分子メカニズムが正常幹細胞とその悪性相対物における自己再生を調節することが示唆されている。次に、癌に至る変異が正常幹細胞において蓄積する可能性がかなりある。最後に、腫瘍が、腫瘍の成長および転移を促進する無限の増殖能を有する「癌幹細胞」集団を含む可能性がある (Southam & Brunschwig, 1961, *Cancer* 14:971-78; Bruce & Gaag, 1963, *Nature* 199:79-80; Wodinsky et al., 1967, *Cancer Chemother. Rep.* 51:415-21; Bergsagel & Valeriote, 1968, *Cancer Res.* 28:2187-96; Park et al., 1971, *J. Natl. Cancer Inst.* 46:411-22; Hamburger & Salmon, 1977, *Science* 197:461-3; Lagasse & Weissman, 1994, *J. Exp. Med.* 179:1047-52; Reya et al., 2001, *Nature* 414:105-11; Al-Hajj et al., 2002, *PNAS* 100:3983)。

【0139】

HSCは、最も研究され、よく理解されている体性幹細胞集団である (Akashi & Weissman, *Developmental Biology of Hematopoiesis*, Oxford Univ. Press, NY, 2001)。造血は、造血幹細胞のプールが最終的に、形成された血液要素、たとえば赤血球、血小板顆粒球、マクロファージ、ならびにB-およびT-リンパ球からなるリンパ造血系を生じる厳密に制御されたプロセスである。これらの細胞はそれぞれ、酸素添加、出血の予防、免疫性、および感染症にとって重要である。成体において、HSCは二つの根本的な特性を有する。第一に、HSCは幹細胞プールを維持するために自己再生する必要がある; HSCの総数は厳密な遺伝的制御下に置かれている (Morrison et al., 2002, *J. Immunol.* 168:635-42)。第二に、それらは、正常な条件で成熟細胞の一定のプールを維持するために、および出血または感染症のようなストレスに反応して特定の系列の数の増加を生じるように分化を受けなければならない。

【0140】

造血系において、多能性細胞は、マウス骨髄細胞の0.05%を構成し、その自己再生能に関して不均一である。多能性細胞には三つの異なる集団が存在する: 長期自己再生HSC、短期自己再生HSC、および検出可能な自己再生能を有しない多能性前駆細胞 (Morrison & Weissman, 1994, *Immunity* 1:661; Christensen & Weissman, 2001, *PNAS* 98:14541-6)。これらの集団は、その中で長期HSCが短期HSCを生じ、次に、多能性前駆細胞を生じるという階層を形成する (Morrison & Weissman, 1994, *Immunity* 1:661における図1)。HSCが長期自己再生プールから多能性前駆細胞へと成熟すると、それらはより分裂活性となるが、自己再生能を失う。長期HSCのみが動物の生涯にわたって成熟造血細胞を生じることができ、短期HSCおよび多能性前駆細胞は、致死量の放射線を照射されたマウスを8週間未満再構成するに過ぎない (Morrison & Weissman, 1994, *Immunity* 1:661)。

【0141】

マウスおよびヒトHSCの表現型および機能的特性は広く特徴付けされているという事実にもかかわらず (Baum et al., 1992, *PNAS* 89:2804-8)、根本的な幹細胞特性、すなわち自己再生に関する本発明者らの理解はわずかである (Weissman, 2000, *Science* 287:1442; Osawa et al., 1996, *Science* 273:242-5; Reya et al., 2001, *Nature* 414:105-11)。ほとんどの場合において、HSCは長期間の培養において広範な増殖を誘導することができる増殖因子の組み合わせに曝露した場合に分化する (Domen et al., 2000, *J. Exp. Med.* 192:1707-18)。限定された期間の培養においてHSC活性を維持する培養条件を同定する場合には最近進歩が見られたが (たとえば、Miller & Eaves, 1997, *PNAS* 94:13648-53を参照されたい)、移植可能なHSC活性を有する前駆細胞の有意および持続的な拡大を促進する組織培養条件を同定することはきわめて難しいことが証明された。

【0142】

組織または腫瘍の維持は、増殖と細胞死のバランスによって決定される (Hanahan & Weinberg, 2000, *Cell* 100:57-70)。正常な組織において、幹細胞数は、厳密な遺伝的調節

下にあり、それによって臓器において幹細胞の一定数が維持される (Phillips et al., 1992, PNAS 89:11607-11; Muller-Sieburg et al., 2000, Blood 95:2446-8; Morrison et al., 2002, J. Immunol. 168:635-42)。対照的に、癌細胞は、この恒常性の調節を逃れて、自己再生能を有する腫瘍内の細胞数は、絶えず拡大し、それによって腫瘍の必然的な成長が起こる。予想されるように、腫瘍の拡大を促進する変異の多くが、細胞の増殖または生存のいずれかを調節する。たとえば、腫瘍遺伝子Bcl-2の強制的発現によってアポトーシスを予防すると、リンパ腫の発生を促進し、同様にインビボでのHSC数の増加が起こり、このことは細胞死がHSCの恒常性の調節において役割を果たしていることを示唆する (Domen et al., 1998, Blood 91:2272-82; Domen et al., 2000, J. Exp. Med. 191:253-64)。実際に、マウスにおける実験的急性骨髄性白血病への進行は、骨髄細胞のいくつかの内因性に誘発された経路を遮断して、プログラムされた細胞死経路を外因性に誘導するために、少なくとも3個、おそらく4個の独立した事象を必要とする (Traver et al., 1998, Immunity 9:47-57)。腫瘍細胞の増殖を促進するc-mycおよびc-mycのような癌原遺伝子も同様に、HSC発達にとって必須である (Prochowinski & Kukowska, 1986, Nature 322:848-50; Clarke et al., 1988, Mol. Cellular Biol. 8:884-92; Mucenski et al., 1991, Cell 65:677-89; Danish et al., 1992, Oncogene 7:901-7)。

【0143】

癌細胞および正常幹細胞は、自己再生能を共有することから、古典的に癌に関連する多数の遺伝子がまた正常幹細胞発達を制御できることは意外ではない (Reya et al., 2001, Nature 414:105-11における論評、およびTaipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-54)。他の増殖因子と併用すると、Shhシグナル伝達も同様に、ヒト造血幹細胞に関して高度に濃縮された細胞 (CD34⁺Lin⁻CD38⁻) がインビトロでShh刺激に反応して自己再生の増加を示したという知見 (Bhardwaj et al., 2001, Nat. Immunol. 2:172-80) により、自己再生の調節に関係している。腫瘍形成に関連するいくつかの他の遺伝子は、幹細胞機能にとって重要であることが示されている。たとえば、ヒト急性白血病のいくつかの症例において関係しているtal-1/SCLを欠損するマウスは、胚性造血を欠損し (Shivdasani et al., 1995, Nature 373:432-4)、これが造血を開始するために、最も初期の限定的な血球の維持にとって、または胚性HSCの下流の血球を形成するための決定にとって必要であることを示唆している (Shivdasani et al., 1995, Nature 373:432-4; Porcher et al., 1996, Cell 86:47-57)。Hoxファミリーのメンバーもまた、ヒト白血病に関係している。HoxB4の強制的発現は、幹細胞機能に影響を及ぼしうる (Buske et al., 2002, Blood 100:62-681; Antonchuk & Humphries, 2002, Cell 109:39-45)。p53腫瘍抑制因子遺伝子の主要な標的の一つは、p21^{cip1}である。p21^{cip1}欠損マウスからの骨髄は、致死量の放射線を照射されたレシピエントを連続的に再構成する能力が低減されている。連続移入できないことは、幹細胞プールの疲弊、テロメアの喪失、または移植可能性の喪失に起因しうる (Cheng et al., 2000, Science 287:1804-8)。マウスにおいて、c-mycと協調してリンパ腫を誘導する遺伝子であるbmi-1 (van Lohuizen et al., 1991, Nature 353:353-55; van der Lugt et al., 1994, Genes & Dev. 8:757-69) は、成体HSCおよび白血病細胞の維持にとって必要である。このように、幹細胞の運命の決定に関係する多くの遺伝子が同様に悪性の形質転換にも関連している。

【0144】

マウスおよびヒトの双方において腫瘍形成に関係する他の二つのシグナル伝達経路であるWnt/ β -カテニンおよびNotch経路は、正常および癌幹細胞の双方の自己再生において中心的な役割を果たしうる。Notch受容体ファミリーは、ショウジョウバエにおいて初めて同定され、発達および分化において関係している (Artavanis-Tsakonas et al., 1999, Science 284:770-6)。Cエレガンスにおいて、Notchは、生殖細胞の自己再生において役割を果たす (Berry et al., 1997, Dev 124:925-36)。神経の発達において、一過性のNotch活性化は、胚性神経堤幹細胞による神経発生からグリア発生への非可逆的な切り換えを開始する (Morrison et al., 2000, Cell 101:499-510)。NotchリガンドJagged-1またはDeltaのいずれかを用いる培養におけるHSCのNotch活性化は、インビトロおよびインビボ

で観察されうる始原前駆細胞活性を一過性に増加させ、Notch活性化が前駆細胞の多能性の維持、またはHSCの自己再生のいずれかを促進することを示唆している (Shelly et al., 1999, J. Cell Biochem. 73:164-75; Varnum-Finney et al., Nat. Med. 6: 1278-81)。Notch経路は、発達において中心的な役割を果たし、マウスのint-3腫瘍遺伝子は切断型Notch4であるが (Gallahan & Callahan, 1997, Oncogene 14:1883-90)、デノボヒト癌におけるNotchの役割は複雑であり、あまりよく理解されていない。Notchシグナル伝達経路の様々なメンバーが上皮由来の癌において発現され、染色体転座によるNotchの活性化は、白血病のいくつかの症例に関係している (Ellisen et al., 1991, Cell 66:649-61; Zagouras et al., 1995, PNAS 92:6414; Liu et al., 1996, Genomics 31:58-64; Capobianco et al., 1997, Mol. Cell Biol. 17:6265-73; Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4)。マイクロアレイ分析により、Notch経路のメンバーがしばしば腫瘍細胞によって過剰発現されていることが示された (Liu et al., 1996, Genomics 31:58-64; Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4)。切断型Notch4 mRNAはいくつかの乳癌細胞株によって発現されている (Imatani & Callahan, 2000, Oncogene 19:223-31)。Notch1の過剰発現によって、小細胞肺癌細胞株の成長停止が起こるが、Notch1シグナルの阻害は、白血病細胞株を誘導してアポトーシスを受けさせる (Shelly et al., 1999, J. Cell Biol. 73:164-75; Artavanis-Tsakonas, 1999, Science 284:770-6; Jehn et al., 1999, J. Immunol. 162:635-8)。Mieleおよび共同研究者による研究により、Notch-1シグナル伝達の活性化がRas-形質転換ヒト細胞における新生物表現型を維持することが示された (Weizen et al., 2002, Nat. Med. 8:979-86)。彼らはまた、デノボ癌において、活性化Ras変異を有する細胞がまた、Notch-1およびNotch-4の発現の増加を証明することを見いだした。

【0145】

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達はまた、正常幹細胞および悪性形質転換の自己再生において肝要な役割を果たしている (Cadigan et al., 1997, Genes & Dev. 11:3286-305; Austin et al., 1997, Blood 89:3624-35; Spink et al., 2000, EMBO 19:2270-9)。Wnt経路は、Wnt-1の脱調節発現においてプロウイルスの挿入により乳腺腫瘍が起こるMMTV-誘導乳癌に最初に関係した (Tsukamoto et al., 1988, Cell 55:619-25; Nusse et al., 1991, Cell 64:231)。次に、Wntタンパク質は、パターン形成において中心的な役割を有することが示された。Wnt-1はその同源の受容体に結合することによって機能する非常に疎水性の分泌型タンパク質の大きいファミリー、すなわちFrizzled and low-density lipoprotein receptor-related protein familiesメンバーに属し、それによって β -カテニンの活性化が起こる (Cadigan & Nusse, 1997, Dev 11:3286-305; Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4; Reya et al., 2000, Immunity 13:15-24; Wu et al., 2000, Dev. 127:2773-84; Taiple & Beachy, 2001, Nature 411:349-54)。受容体活性化の非存在下では、 β -カテニンは、大腸腺腫性ポリポーシス (APC)、アキシシン、およびグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 β タンパク質からなる複合体による分解に関して顕著である (Austin et al., 1997, Blood 89:3624-35; van den Berg et al., 1998, Blood 92:3189-202; Gat et al., 1998, Cell 95:605-14; Chan et al., 1999, Nat. Genet. 21:410-3; Hedgepeth et al., 1999, Mol Cell Biol. 19:7147-57; Spink et al., 2000, EMBO 19:2270-9; Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4)。Wntタンパク質は、骨髄において発現され、インビトロでのWntタンパク質による、または構成的に活性化された β -カテニンの発現によるWnt/ β -カテニンシグナル伝達の活性化は、組織培養およびインビボでの初期前駆細胞のプールおよび濃縮された正常な移植可能な造血幹細胞を拡大させる (Austin et al., 1997, Blood 89:3624-35; van den Berg et al., 1998, Blood 92:3189-202; Reya et al., 2001, Nature 414: 105-11)。 β -カテニンシグナル伝達の阻害剤であるアキシシンの異所発現によるWnt/ β -カテニンの阻害によって、インビトロおよびインビボの双方における幹細胞増殖の阻害が起こる。他の研究から、Wnt/ β -カテニン経路が、他の組織における幹細胞または前駆細胞の自己再生を媒介することが示唆されている (Gat et al., 1998, Cell 95:605-14; Korinek et al., 1998, Nat. Genet. 19:379-83; Zhu

& Watt, 1999, Dev. 126:2285-98; Chan et al., 1999, Nat. Genet. 21:410-3)。より高レベルの β -カテニンは、より低い増殖能を有するケラチノサイトにおいて認められるより高い増殖能を有するケラチノサイトにおいて認められる (Gat et al., 1998, Cell 95:605-14; Chan et al., 1999, Nat. Genet. 21:410-3; Zhu & Watt, 1999, Dev. 126:2285-98)。その正常な造血幹細胞相対物と同様に、活性化 β -カテニンの強制的発現は、上皮幹細胞の自己再生能を増加させて、その分化能を減少させた。 β -カテニンに結合すると活性化される転写因子の一つであるTCF-4を発現することができないマウスは、やがてその未分化の陰窩上皮前駆細胞を消耗して、Wntシグナル伝達が上皮幹細胞の自己再生に参与していることをさらに示唆している (Korinek et al., 1998, Nat. Genet. 19:379-83; Taipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-54)。

10

【0146】

タンパク質分解経路の不活化による、最も多くはAPCの変異による、結腸癌における β -カテニンの活性化は一般的である (Hedgepeth et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:7147-57; Leethanakul et al., 2000, Oncogene 19:3220-4; Spink et al., 2000, EMBO 19:2270-9; Taipale & Beachy, 2001, Nature 411:349-54)。一定のWnt遺伝子の発現は、いくつかの他の上皮癌において上昇しており、このことは、 β -カテニンの活性化がそのような癌におけるリガンドの活性化に副次的であることを示唆している (Nusse, 1992, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 43:9-12; Cadigan & Nusse, 1997, Genes & Dev. 11:3286-305; Kirkoshi et al., 2001, Int. J. Oncol. 19:997-1001; van de Wetering et al., 2002, Cell 111:241-50; Weeraratna et al., 2002, Cancer Cell 1:279-88; Saitoh et al., 2002, Int. J. Oncology 20:343-8; Saitoh et al., 2002, Int. J. Mol. Med. 9:515-9)。Wnt/ β -カテニン経路の構成的活性化は、癌細胞に幹細胞／前駆細胞表現型を付与することができる証拠が存在する。結腸癌細胞株における β -カテニン/TCF-4の阻害は、細胞周期阻害剤p21^{cip-1}の発現を誘導し、細胞を誘導して増殖を停止させ、より分化した表現型を獲得させる (van de Wetering et al., 2002, Cell 111:241-50)。 β -カテニン/TCF-4によって転写的に活性化される癌原遺伝子c-mycの強制的発現は、p21^{cip-1}の発現を阻害し、 β -カテニン/TCF-4シグナル伝達経路が遮断された場合に結腸癌細胞を増殖させ、細胞増殖および分化の調節においてWntシグナル伝達をc-mycに結びつけた。多くの研究が乳癌におけるWnt/ β -カテニンを暗に意味しているが、 β -カテニンの変異の活性化はこの疾患ではまれであり、この経路をヒト乳癌に明確に結びつける研究はない (Candidus et al., 1996, Cancer Res. 56:49-52; Sorlie et al., 1998, Hum. Mutat. 12:215; Jonsson et al., 2000, Eur. J. Cancer 36:242-8; Schlosshauer et al., 2000, Cancer 21:1453-6; Lin et al., 2000, PNAS 97:4262-6; Wong et al., 2002, J. Pathol. 196:145-53)。

20

30

【0147】

HSCの自己再生およびおそらく多数の組織からの幹細胞の自己再生の調節におけるNotch、Wnt、c-mycおよびShhのような遺伝子の役割が暗に意味するものは、多くのタイプの正常な体性幹細胞および癌幹細胞に共通の自己再生経路が存在しうることを示唆している。これらの経路が作用する分子メカニズムを同定すること、ならびに正常な幹細胞および癌細胞の自己再生を調節するために経路が相互作用するか否かを決定することは重要である。

40

【0148】

Wnt経路は、正常な幹細胞の自己再生に参与しており、Wntの活性化変異はマウスにおいて乳癌を誘導する。この経路は、何人かの患者から単離されたヒト乳癌幹細胞による腫瘍の形成において役割を果たす。さらに、証拠から、乳癌細胞の異なる集団が腫瘍を形成する能力は異なることが示唆されている。興味深いことに、Wnt/Frizzled/ β -カテニン経路は、癌細胞の異なる集団によって不均一に発現され、経路の特定のメンバーの発現は、腫瘍の形成能と相関しうる。

【0149】

癌細胞および腫瘍細胞の異なる集団は、乳癌細胞の増殖を促進する。活性化 β -カテニ

50

ンは、有意な数の患者の癌細胞において認められる。この経路が構成的に活性である癌細胞を含む腫瘍は、 β -カテニンが構成的に活性化されていない腫瘍とは異なる挙動を示す。

【0150】

II. ヒト乳癌の異種移植片モデル

細胞株によって、癌細胞における分子および生化学的变化の理解における顕著な進歩に至ったが、有効な癌治療の同定におけるその使用は幾分制限される。細胞株は、デノボ腫瘍において薬物有効性の不完全な予測因子である (Brown, 1997, *Oncol. Res.* 9:213-5; Hoffman, 1999, *Invest. New Drugs* 17:343-359)。いくつかの要因がおそらくこの欠損を説明する。癌細胞株は、組織培養において成長するように特異的に適合させた癌細胞の亜集団から選択され、これらの細胞株の生物学および機能的特性は劇的に変化しうる (Leglise et al., 1988, *Blood Cells* 13:319-37; Ikeda et al., 1993, *Exp. Hematol.* 21:1686-94; Weidman et al., 1997, *Leukemia* 11:709-13; Dorrell et al., 2000, *Blood* 95:102-10)。さらに、乳癌腫瘍からのごく一部からの癌細胞は、細胞株または異種移植片腫瘍を確立する (Ethier et al., 1993, *Cancer Res.* 53:627-35; Krasna et al., 2002, *Breast Cancer Res Treat.* 71:219-35)。これらの細胞株の表現型および機能的特徴は、インビボでその特性と比較して劇的に変化しうる (Leglise et al., 1988, *Blood Cells* 13:319-37)。たとえば、正常な造血および白血病組織培養細胞の双方のマーカー発現は、組織培養において急激に変化することがあり、しばしば、そこからそれらが由来する当初の幹細胞の発現を反映しない (Furley et al., 1986, *Blood* 68:1101-7; Leglise et al., 1988, *Blood Cells* 13:319-37; Ikeda et al., 1993, *Exp. Hematol.* 21:1686-94; Dorrell et al., 2000, *Blood* 95:102-10)。たとえ培養において正常幹細胞の増殖を許容するように条件を考案するとしても、条件はしばしば、培養幹細胞がインビボで存在する細胞集団の階層を反復することを防止するように、自己再生または分化を促進する。併せて考慮すると、これらの知見は、癌細胞株の生物学特性が、それらが由来する癌細胞とは顕著に異なりうることを示唆する。これはおそらく細胞株がしばしば診療所において薬物の有効性の不良な予測因子である理由を少なくとも部分的に説明する。

【0151】

このように、長期間にわたってインビトロまたはインビボで原発性ヒト乳癌細胞を一貫して成長させるための有効な方法が存在しないために、この疾患の生物学に関する本発明者らの理解は重度に制限されてきた。最も有効な異種移植片モデルにより、SCIDマウスの卵巣の脂肪パッドに約60~75%の時間で乳癌腫瘍の小片が定着するが、乳腺脂肪パッドには定着しないことが報告されている (Sakakibara et al., 1996, *Cancer J. Si Am.* 2:291-300)。解離された細胞の定着は、このモデルでは可能ではないが、胸膜滲出液から単離された癌細胞のみが、免疫欠損マウスにおいて約10%の時間で腫瘍を形成する (Hoffman, 1999, *Invest. New Drugs* 17:343-59)。本発明 (以下の実施例1を参照されたい) は、重度の免疫欠損マウスの乳腺において、腫瘍の注射によって原発性乳腺腫瘍から腫瘍を確立することができる異種移植片モデルを提供する。本発明の異種移植片により、クローン原性の乳癌細胞と共に他の細胞タイプの特徴付けを行うために生物学および分子試験を行うことができる。重要なことは、本発明に従って開発された異種移植片腫瘍は、そこからそれらが由来するヒト腫瘍において見いだされる表現型が多様な癌細胞タイプを含み、癌細胞の異なる集団は、腫瘍の形成能が顕著に異なる点である (Al-Hajj et al., 2003, *PNAS* 100:3983)。

【0152】

本発明に従う有効な異種移植片モデルの開発 (たとえば、実施例1を参照されたい) によって、患者から得られた解離された固形腫瘍細胞が初めて信頼可能に腫瘍を形成することができた。重要なことに、これによって、個々の患者の癌細胞において生化学経路を日常的に分析することができ、およびデノボヒト固形腫瘍癌細胞による腫瘍形成に及ぼす特異的遺伝子経路の細胞結末を理解することができる分子操作を行うことができる。

【0153】

III. 固形腫瘍幹細胞癌マーカー

本発明は、固形腫瘍幹細胞においてその発現が特異的に変化している（たとえば、上方制御または下方制御された）マーカーを提供する。そのようなマーカーは、様々な癌（たとえば、乳癌）の診断、特徴付け、および変化（たとえば、治療的ターゲティング）において有用である。

【0154】

以下に提供する実施例4は、固形腫瘍癌マーカーを同定するために用いられる方法を記述する。いくつかの癌マーカーを、Notch 4と共に以下の表4〜9において提供する。これらの表は、遺伝子の名称を提供するが、本発明は、本発明の治療的および診断法ならびに組成物において、核酸配列と共にそれによってコードされるペプチドと共に、核酸およびペプチドの断片を用いることを企図することに注意されたい。

【0155】

（表4）UPNTGに対するUPTGにおける上方制御

S100A8, KRT18, CEACAM6, IFITM2, HLA-C, S100P, S100A9, H2BFT, HLA-C, FXYD3, S100A10, KRT19, TUBB, HLA-DPA1, CEACAM5, LCN2, FTH1, RPS26, IFITM2, S100A7, CAP, HUMMHCW1A, HLA-DRB3, CD63, S100A6, HSPB1, HLA-B, MGLL, PTS, HLA-A, RAI3, DAF, UBC, HLA-A, KDELR3, SERF2, CTSB, CEACAM6, PDLIM1, SHC1, GOLPH2, GABARAP, AQP3, COL3A1, AHCYL1, FXYD3, ITM2B, BF, RBMS1, DUSP1, PSAP, ARHGDIB, ENO1, ATP6V0E, MUC1, RARRES1, CD81, TRIM44, ASS, CD59, PRG1, HLA-E, TXNIP, INHBA, CSTB, H2AFO, HLA-DRB4, RAB31, P4HB, LOC92689, B2M, CSNK2B, MGST3, DKFZp564H1922, C4B, UCP2, FN1, COL1A2, LOC51186, LTF, TIMP1, NPC2, TSPAN-1, COL1A2, SLPI, CIB1, IQGAP1, SPARC, FN1, CCNI, SPTBN1, H2AFO, BTN3A3, FN1, SEPX1, GFPT1, ANXA11, CD74, RAB25, APP, PSEN1, IFI27, FHL2, CPB1, BACE2, PSMD8, LGALS1, PLAT, EIF3S4, ANXA2P2, PILB, IFI30, ATP6V0E, LOH11CR2A, LBP, HLA-DRB1, MIC2, OPN3, SVIL, FDFT1, PTGIS, ORMDL2, PIG7, ERBB3, GSN, FN1, GOT2, BCL6, WBSCR21, ANXA1, CLU, PIK3R3, TNFSF10, NBL1, PEX11B, CDKN1A, SAS, RIC-8, RABAC1, ADD3, ARPC5, GUK1, NQO1, FER1L3, PPAP2A, TSPAN-3, PLOD2, TGM2, LOC51760, TST, TM9SF1, LGALS3BP, C14orf1, D2S448, OPTN, GPX1, MBC2, PTGES, DPYSL2, PEN-2, DAG1, GM2A, DKFZP564G2022, FAT, SLC21A11, ACADVL, ABLIM1, HLA-DPB1, COPA, PPP1R7, DAF, SSBP2, TES, MUC16, PPL, MGC10765, SECTM1, C3, NNMT, ARF3, SEPW1, H1F2, SERPINB1, KIAA0746, RDGBB, ELF3, TUBB4, VCAM1, FOXO1A, EGFL6, ATP1A1, PLS3, LMNA, TGFB1, DD96, GLRX, PROSC, IL1R1, SERPINB2, KRT7, RGS16, TNFAIP1, SYNGR2, PAFAH1B3, GPI, C6orf37, ATF3, HLA-DMA, FLJ22418, DCN, FOXO3A, HLA-DQB1, CPD, DF, HTATIP2, MUC5B, CTSB, PBEF, H11, CAPNS1, Z39IG, MAGED2, TNFSF13, HLA-DRB3, H2BFQ, SGK, P4HA2, VPS28, NDUFB8, PON3, ENSA, EDF1, SERPINB6, FDPS, RGS3, CREB3, PRNP, YWHAB, A2M, HLA-DQB1, PDGFRA, CLMN, INHBB, SURF1, NFIL3, S100A11, HPGD, CLDN7, DAB2, NT5C2, PLXNB2, GSTP1, AP2B1, COL3A1, HRMT1L1, SRPR, RNASE6PL, ANXA8, PROM1, C1S, GALNT6, BAT3, BC-2, GLS, CD14, FYCO1, SQSTM1, CSPG2, DEFB1, BAT3, GALNT2, SPARC, WT1, DUSP6, MONDOA, MACF1, ATP2C1, THBS2, CD53, PGM3, HLA-DRB6, COL1A1, SCAP2, KIAA0436, CYR61, TNFSF13, SLC6A14, CUGBP2, LAMP1, CCL22, CLU, CD163, ANXA3, MBLL39, IL4R, SERPINB1, CNP, TUBB4, FLJ20265, MAFB, EFEMP1, DPP7, SYNE-2, PLSCR1, PDE4DIP, P2Y5, RAGA, SIAT1, N4WBP5, SPUVE, BPAG1, DEPP, BASP1, CTSB, HLA-E, KIAA0308, GAS1, ABR, ABCA1, GRN, WDR1, PM5, CYFIP2, SGP28, FLRT2, ACACA, LUM, FLJ21432, FEM1C, RIN2, PCDH7, SLC7A7, FLJ21347, SOX9, MB, S100A8, DAP, MVP, SPP1, TM9SF1, DOC1, COL5A2, RNF24, GLB1, GRN, HLA-DRB5, ENPP2, CSG1cA-T, KIAA0937, H2BFT, JUP, KYNU, APOL6, GM2A, C1orf24, SYNGR3, COL6A1, CRYM, LXN, FARP1, p100, ANK1, NPC1, RBPMS, VLDLR, ARHC, UBE1, HDLBP, LYZ, DCN, PLAB, SERPINE2, EGLN3, FSTL1, LAPTM5, TRIM29, ACTN4, MUC1, SH3GLB1, BIK, ZNF91, CLIC4, NARF, LIM, SLC1A1, KIAA0746, APOC1, TYROBP, FLNB, EMP1, UBE2L6, KRT6B, MAN2A1, GCN5L1, APEH, F-LAN-1, PRKCZ, CD163, HLA-DQA1, KIAA1668, MUC5B, LAIR1,

10

20

30

BCL2L13, CXX1, MPZL1, NR3C1, AHR, FLJ12389, ATP6V0C, MD-1, H2BFA, HSPC023, OSBPL8, ZNF36, TRIM14, UGTREL1, CTSL, COL5A1, PDGFC, UBE2N, SF1, ARHGEF10, SH3GLB1, HLA-G, KIAA0084, HT012, SULF1, TTC1, UBAP1, PGLS, M6PR, TEM7, NPR2L, GRN, EXT2, DCN, HLA-DMB, HLA-DQB1, NAGK, MMP19, LBP, ATP10B, CLN3, SP100, CSPG2, VIM, IGFBP3, ANK1, DUSP3, STAT3, CED-6, KIAA0196, SOX9, NKX3-1, TGFBR2, CAV1, TREM1, PTD009, GPX2, LAPTM5, HSPC022, SSA1, ABS, CPD, DXS9928E, DUSP6, PGBD5, CNN3, PIP5K1B, FLJ13840, CLDN4, ABCA3, BPAG1, CAPZB, PPIB, ACTA2, CDH11, FLJ10815, HLA-DPA1, FLJ20539, MUC4, CAV2, ACAA2, CEACAM1, GALNT10, MYO10, C9orf9, PAM, C6orf29, MGC5244, RetSDR2, ATP2B4, DHCR7, GP, LOXL2, MIR, DCTD, BCKDK, RTP801, KIF1B, ENTPD3, PAFAH1B1, LGMN, UBE2L3, PTPRH, RPS6KA2, ALDH1A2, FHL1, GALT, AP1M2, MAF, C4BPA, POLR2J, KIAA0790, TM4SF3, HPGD, THY1, NCALD, PADI2, KIAA0557, SMARCA1, CD83, AZGP1, SMARCA1, MRPS11, RAGD, PIGB, FYN, TM7SF1, HLA-E, BRE, PLA2G4C, NOS1, ID3, HLA-DQB1, SSSCA1, PPP1R14B, HLA-DPA1, ANK1, PRKCH, CALU, PEF, DOK5, COL9A2, ATP2C1, DPH2L1, MUC5B, LOC113146, NDN, PIG3, HLA-DRA, GPS2, CX3CL1, C1QB, TGFBR3, APOC1, BIN1, CBR3, TGIF, EFEMP2, SCDGF-B, TUBB-5, MAP4K4, CCL3, CCR1, RNF10, RGL, CD1C, FBLN1, GW112, ALTE, ALP, PLAC1, ISG20, PTE1, NP009, LOC55893, AP3B1, PRKAR2B, KRT9, COP22, LYN, FLJ21478, DKFZP566C243, NUMA1, ANAPC5, FLJ10134, ADPRTL1, ITGAM, PIP, FLJ22559, IFI16, TMPRSS4, HAIK1, PCSK7, ANK1, FCER1G, IMPA2, HLA-DQA1, IFNAR2, NEO1, PRKCQ, SMARCD3, CECR1, FLJ11286, TBC1D1, MS4A6A, C1orf16, LRRN1, MRPL23, PUM1, SMA3, PDE4B, SLC22A4, MMP2, ICA1, SLC22A1L, RRP22, GBA, TMEM8, DUSP2, TREX1, SLC6A8, C3AR1, BSCL2, ARFGAP3, TRIM2, SERPINB8, TNFRSF6, LDB1, CCND2, RGS2, MEIS1, HRIHFB2122, IF, P1P373C6, UPK1B, WDR10, CGI-49, PSMB8, RARRES1, SLC16A1, DPYD, DNPEP, FLJ20254, COL5A1, FLJ11017, CCR5, MX2, PIAS1, CAPG, CDC42EP3, IL1RL1LG, SCGB2A1, RNH, INPP4B, B3GALT4, PLAU, DFNA5, KIAA0852, CRIP2, TIP-1, ZNF142, HSD17B2, MYO1B, PCOLCE, FLJ22169, APOE, DAB2, CXCR4, NAG, SNCAIP, GBP1, ASRGL1, SLC6A8, REC8, SLC7A11, CPE, MPZL1, TDO2, GALNT12, CDKN2A, KIAA1395, LGALS8, FLNC, NPR2L, GRB10, MGC15523, PTPRC, CAPN9, IFI16, NBL1, CRYL1, PSMC2, IGF1, BIN1, HNOEL-iso, DKFZp566O084, FGB, GPNMB, TLR5, FLJ20686, UROS, CX3CR1, HCA112, PRKCB1, BDKRB2, CLTB, KIAA0652, KIAA1668, DCN, HLA-DQB1, C6orf9, CPR8, TM20452, PSMB10, LTBP2, FLJ20452, HTATIP, LAMA4, GLUL, SH3BP2, HES2, KIAA1115, KDR, PROCR, TNFSF10, FGFR1, ELF4, F8A, BAG1, COL5A1, THY1, H2BFG, TOSO, KRT15, AIF1, LY75, KRT17, CEACAM1, GAK, AGTR1, ASB8, KIAA0792, CDKN1C, C1R, PTGS1, TM4SF6, XT3, HLA-B, DKFZP434B044, ALDH1A3, NID2, U2AF1RS2, H2BFL, FUT3, PVALB, ITPR3, PODXL, QPRT, PTRF, PSMC4, ACATE2, MAP2K1, ATP2B4, CEACAM1, CALB2, TTR, TRIM38, JM5, FLJ21135, FLJ23221, FLJ20452, GATA6, RABL4, KIAA1199, IGFBP7, MGC14376, CITED2, CASP4, MEIS2, PHLDA1, OXA1L, IL1RL1, FLII, EFEMP1, PYGL, LMO4, GPR3, GIP3, APOE, ZNF193, AP1S2, PTGDS, TEM7, LOC51279, SLA, BTG1, INE2, WIT-1, LBH, CXCL1, RAB31, POMZP3, COL6A3, EXTL3, MGC4309, LOC114990, KYNU, NAB1, CYP2J2, SMURF1, BRAF, HLA-DQA1, CAV1, KIAA0779, CHKL, SEC6, CGI1, FLJ20920, CGI-49, EIF3S10, P4HB, GYG, DKK1, MAF, TRIM22, CENTA2, FLJ20113, NR3C1, CYP11B, HSD11B2, RRP46, FOLR1, HHLA1, THY28, H3FB, FOS, GAA, FLJ13171, RHOBTB3, ZNF32, HOXA5, CFLAR, PAX6, KIAA0076, CTSS, ALOX15B, PCOLN3, P3, AKR1B1, LOXL1, HIF3, BIN1, GMDS, FLJ10631, SIAT4A, PIM1, LRMP, SLI, TFPT, RAGD, DSCR1L1, SETMAR, KIAA0657, GPRC5B, TIMM22, ARHGEF6, H2BFA, PPFBP2, SALL2, FLJ21820, ABCD1, CPA3, SNX7, CUTL1, PALMD, ERCC1, MSTP9, PTPN3, GAL3ST-4, C6orf9, PTPRT, RGC32, AD-017, CRELD1, FLJ10097, RNASE1, S100A4, RORC, CMAR, USF2, FLJ13544, CASP3, SMUG1, RAF1, MYL9, GFR, PDGFR, DPP4, ARL7, SLC3A2, RHD, FGL2, RBMS1, EGFR, PRO1580, FCGR3A, PTENP1, H4FH, MSCP, CSG1cA-T, ADAMTS5, TNFAIP6, PRKCDBP, PRKG1, CAPN1, OAS1, H2BFH, SCHIP1, FLJ21736, BMP1, IQGAP2, KRT5, LMO2, HIC, PLAGL1, AQP6, ZNF42, PHLDA1, YBX2, INPP1, CHST6, MGC4171, PL6, SPPL2B, EPHA2, CRYAB, MST1, ZNF211, MD-2, CRII, KIAA0057, PACE4, LOC93349, RALGPS1A, LAMB3, HLX1, RIN3, SERPINB5, PLD1, DLCL1, PIPOX, PTHR2, UBE2G2, CH31L2, KIAA1111, TGFBR2, PLAUR, ID1, ALOX5, IGF1, REPS2, CDH2, BCHE, SNFT, FLJ11286, MAPRE2, MAOA, SERPING1, PTGER3, KIAA0602, PGM3, MATN2, DNASE1L1, PGD, FZD2, PPAP2C, GOLGA1, ADAT1, TEX13B, MGP, FLJ20084, ART1, EVI2A, SART2, RFXANK, FBLN5, DPYSL3, ZNF187, RBMS1, MLN, NRXN3, WASF3, DSC3, PPAP2A, EEF1A2, UBE2H, GABRQ, TFEF, MGC3123, GFPT2, WIG1, FBLN1, PTPRF, MEPE, SLC6A8, IL1B, GAC1, EPHX1, C11orf9, OSF-2, FLJ10111, SRPX, DAPK1, RBM10, MBD4, MECP2, ILVBL, KIAA0375, JAM3, PRSS25, KIAA0913, TNFRSF6, CSRP2, CCL4, C20orf19, CA2, SLC7A8, BNC, PHEMX, ADAMTS1, XRCC1, PEMT, H2AFA, NEU1, OPTN, NRPI, TPM1, WISP3, GPX6, MRPL2, HP, BIKE, PLXN3, FACLS, MGC15419, FLJ11506, GLS, MAPK7, KIAA1053, CDH3, CST3, KIAA0752, ROR1, TAP2, SBLF, AKAP13, USP21, PP35, ELOVL1, CYBA, KHSRP, MRC1, FLJ12057, H2AFN, MSN, TPM1, SLC16A3, ADD1, IL1RAPL1, SPTAN1, FLJ10847, SNAI2, FLJ12986, GSPT2, FLJ10450, MAN1C1, MEF2A, VEGFC, RANBP3, MGC17330, SCD, F5, PIK3CD, SELPLG, LOX, VAX2, MSF, RANGAP1, BIKE, ARHGEF7, FLJ20300, MYLK, GMPR2, CENTD2, PPP1R9A, ANG, DNAJB2, IDH3G, ODAG, ADPRTL3, COG7, KIAA0429, NEDD4L, ALEX2, ATP6IP2, PTGES, MAN1B1, CYP3A43, AP3S2, DEFA6, PTGER3, FCGBP, CPSF1, NNMT, HAMP, CGI-38, BAZ2A, HLA-DRA, SP110, CA5B, UBE1L, BTN3A2, KIAA0842, T1A-2, PTGER4, PTGDS, MARCO, EPB41L1, IL13RA2, CXCL6, APOA1, NPAS2, ETV5, HFL3, EPB41L3, CH31L1, SSB1, EVI2B, KIAA1608, MEIS3, FLJ13385, NQO1, BGN, MOX2, dJ222E13.1, GMFG, TBC1D2, SKIP, RABGGTA, MRPL28, FLJ21034, CRY2, SLC4A2, MGC20727, HAP1, CYBB, GRIT, PTN, FUT2, CDSN, STAF65(gamma), BENE, ENPP2, PAK4, CUBN, ICSBP1, NPAS2, FLJ23516, FLJ23537, AADAC, MFAP2, ERCC4, STK13, MCAM, GPR65, CYP17, FLJ20373, TNS, TRA1, NPY, PTPLA, PNLIPRP1, RBMS1, TM7SF2, MKL1, NCF2, AP4M1, ITGB4, SLC11A1, PSCDBP, NFE2L3, ELAC2, CBFA2T1, S100A12, PACE4, KIAA1395, HLA-G, EDN1, FLJ20730, IGLJ3, UNC93B1, RPL29, RIL, TCF8, RYR3, TCFL4, MCRS1, HML2, FLJ10357, FLJ22405, FLJ20627, HFE, DKFZp564K142, ATP10D, SLC12A4, P311, FLJ13055, ADCY9, EYA1, ACO2, CIAS1, EHD3, ZFPM2, MGC11279, MALT1, NDUFS8, IL10RB, TCF3, HLALS, DKFZp761K1423, DDX8, G0S2, SLC16A3, CCL18, ZDHHC4, FKBP1A, HRH1, GSA7, PTPRM, HBP17, APPBP2, TNRC15, JM1, PSME3, HFL2, BCL11B, SCARA3, APEG1, LHFP, IGF1, PDGFRL, MUC13, IGF1, NXF2, HRMT1L3, ARHD, KIAA0582, KIAA0977, FCN1, LAMP3, DNAJC6, ALDH3B1, TNXB, MAPK3, FLJ13491, APOA1, RBP4, OAS3, CLTB, GP2, MID1, FGR, DISC1, PP1044, PSAP, CHODL, FLJ22173, TPD52L2, DD5, PSIP1, HSPB7, EMP3, KRT6A, C5R1, ENO2, PF4, SYN1, PLSCR3, HMGCS2, BCAR3, LOC51693, ANGPTL2, TAHCCP1, LOC51063, KIAA0561, GJB3, CPVL, PCBD, CGI-96, PKIA, NR3C1, GAS7, FBNI, MPV17, SLC21A3, ARHGAP6, FMO1, CSPG2, FLJ22531, STX7, SCN1B, TETRAN, FGF23, CLECSF12, CDKN1C, HF1, GSTT1, VILL, BLAME, ROD1, TAPBP-R, HLA-G, HT017, CHP, SLC25A10, LST1, FLJ11196, VAMP2, NR0B2, CSNK2A1, SLIT3, MAPK7, CXCL2, GYG2, PGS1, CDYL, VNN2, CLN5, NPAS2, MLL, TRPM4, LYPLA3, MYO7A, PSMB1, PAFAH2, PITX1, GRB10, TIMELESS, APOBEC3G, KIAA0819, GALNT10, PTPRO, NMB, FLJ12298, RAMP1, OR2F1, HPGD, CALB1, CCR7, KIAA1614, SLC2A3, OLFM1, DKFZP564G202, FEZ1, AKR1C3, ACADS, CALB1, PIK4CB, FOXA2, FLJ20581, RRAS, BHLHB3, HUNK, MLLT3, RBMS2, KIAA0620, SLC29A2, SIRT5, SLC27A2, FLJ21458, DTR, ACTN1, KIAA0429, SLC21A9, FLJ10211, LOC63920, FLJ12377, ARPC4, TSSC4, MEF2D, RPL10, NOV, CGI-72, FAIM2, TBX2, GABRD, C1orf24, MGC2615, NR1H3, FLJ14675, AQP5, ZNFN1A3, SSPN, SIGLEC7, COL5A2, HLA-DOB, SLC12A3, Apg4B, HERC3, HEM1, EB12, ZNF323, FLJ20950, FASTK, C6orf32, LILRB2, SPP2, DHPS, UBE2B, MET, ST14, EGR3, SIGLEC5, SAMHD1, PGCP, PTPNS1, SPARCL1, FLJ22160, RANBP2, IL15RA, OXT, FLJ21168, PTPN14, BAIAP3, TPM4, NCR3, TEK, H2BFE, SLC34A2, SLC26A2, KIAA0870, MET, SENP3, PTGER4, CGI-48, PDGFB, CD86, GTF2H4, KIAA0053, PTX3, BIMLEC, CAMK4, PROS1, AOX1, KIAA0931, COL4A1, USF2, PLINP-1, TM6SF1, PTPRG, SNX17, SLC5A4, MSTP032, PCTP, PQBP1, CDV-1, AD037, RNASE6, SNAI1, KIAA0872, MEF2C, ZNF3, LOC157542, FCER1A, PRB1, SIRT3, DKFZP434K046,

10

20

30

40

ABCC6, NPC1L1, BCL2A1, LOC64167, GS3955, UP, CLECSF6, MGC20727, CHN2, CD3D, BAD, KIAA0435, PECAM1, IGSF4, BCAS3, C8A, ZNF131, MGC10771, SEC14L1, SERPINH1, IL1F6, KLF11, THBD, FKSG28, KIAA0173, HKE2, PFTK1, FLJ11560, APO1, CHRM4, ALLC, MS4A4A, SLC1A1, BBP, ILT11, SAMSNI, IGF2R, FLJ20421, PBX2, MAP1LC3B, 37872.00, NCK1, FGFR2, CD86, FLJ23506, SCD, FCGR2B, CYP4A11, S100A2, AP2S1, PLAGL1, PTGIS, PCOLCE2, SLC2A3, DKFZP761N09121, GPR105, OSBPL3, RPLP2, DKFZP586I2223, CD36, BBOX1, VNN3, AKR1B10, ZFH1B, DKFZp434H2215, RoXaN, RSN, GALNS, PROSC, PCDHA3, PLXNA2, CCR8, BACH1, NPAT, SPAG6, DGCR13, CAPN5, OSBPL3, CYP-M, FLJ13902, FLJ13659, ADAMTS3, IL1RAP, ELFI, HYAL1, WNT2, CCS, TREM2, KIAA1036, FLJ20574, FLJ13215, CUGBP2, FLJ20010, GABRE, RCE1, SCIN, HLALS, MGC10940, ADARB1, PLA2G7, KIAA1237, KIAA0889, FLJ22593, CD244, NEK9, TAT, RAP1GDS1, SMA5, MYH11, APAA, MERTK, GJA4, TNFRSF1B, MRPS12, HSF1, COL11A2, DAB2, PCQAP, WDR4, ABCA8, CLPS, ARHN, PHF3, AKAP12, LST1, MGC12904, FLJ11539, ZFP36L2, SERPINF1, MGAM, PRG4, RAB5EP, CASP2, DIPA, AQP3, VAMP5, DXS1283E, COL4A2, MMP10, CD97, MGAT3, FCN2, KIAA0475, FGF9, CTSZ, SQV7L, H326, PLD3, TRPC1, OR7E24P, GRIA2, KIP2, BARX2, MHC2TA, RECQL, NUP214, DHRS2, P2RY1, KIAA1155, HLA-DRB4, CAPN6, TLR7, AHCYL1, TRGC2, NEB, POU2F1, CPSF1, APOB48R, CLDN9, FLJ21276, AEBP1, MN1, PKD2, PACRG, CALM1, TSPAN-3, KIAA0233, ATP6V0E, TRIM34, DKFZP564J102, CNOT8, STC1, NFE2, FCN3, CKIP-1, PLA2G4A, TRGC2, DES, CDC42EP2, HSD3B1, CSN10, PRKACB, RDH5, CDW52, XYLT2, HPN, WIZ, GOLGA2, CSHL1, GLRX, PCDHB11, TNFSF18, KLRD1, 384D8-2, WHSC1, TNFRSF10C, EVPL, TNFRSF5, SIAH2, GYPB, PMM1, DPYSL3, FLJ14297, ZNF42, BSN, OMC, AXL, ACK1, PKD2, KIAA0711, FLJ00060, GUCA1A, PAPP, CBLN1, FRCP1, BTD, FLJ20591, FGG, CXCL14, NPR1, CAMK2G, HLCS, SECP43, BCAT1, MSR1, IGFBP4, C13orf1, PRO2577, KIR2DL4, BAALC, FLJ21919, CNTF, LOC51295, ENTDP1, TAPBP-R, CAP350, PKD2L1, EVX1, NR1H2, FLJ13868, ERCC3, DKFZp434L0850, NR3C1, DMD, BST1, CARD15, SKD3, CASP1, PCDHA6, NR4A1, HAS2, COPEB, R29124_1, THPO, AQP6, MGC10848, RAB6B, ABP1, APOB, UTRN, MICA, SSTR4, FLJ23056, C6orf32, ROM1, FLJ90005, KCNN4, MGA, HSPC219, CGEF2, CDC42BPB, CCR4, GLS, MAGE-E1, PILR(Alpha), PGK2, KIAA0657, SF3A2, NOTCH4, CLECSF2, FBLN2, B4GALT1, WNT2B, NRBP, LTB, FLJ22021, CDH6, TUBGCP2, GCN1L1, ZIC4, HR44, AGA, SIAT9, EMP1, EPOR, IGKC, TAHCCP1, PEGR, FLJ21477, EDG1, MS4A2, BCAS4, FLJ22404, DPYS, PRCC, POLD4, BIKE, GAS7, KIAA1000, ZFP, WNT7B, MUC4, FLJ10477, CD1D, MGC4614, CCR1, NEU3, SIX3, FLJ10640, GPR51, STOM, SERPINE1, HLA-DQB1, PTN, DNCL2, EN2, FLJ20378, IFP38, LOC90326, IGLJ3, NCYM, KIAA1107, GP2, PLAUR, CD47, BIN1, MGC14799, IGFBP1, SSX1, IDUA, RECK, CD6, IGHM, ADD2, AKAP2, HSF4, MDS032, FLJ20086, TNXB, IGFBP3, KLBK1, PRB4, KCNF1, PDE9A, SIPA1, SMARCB1, COL4A6, PDE10A, NFATC1, CDH16, COL6A1, ZNF272, LDB2, HCRTR2, B1, ATP12A, FLJ11710, LOC116150, KIAA1049, HSPC157, FLJ20701, IGSF6, TOMM22, TGFB1, PTGER2, CHML, FAAH, COL6A1, DGUOK, LRRN3, B7, KIAA0876, C1orf22, CYP2A13, CXCL5, CD5L, FBXL6, GALNT2, GJA10, COL15A1, TEX13A, 7h3, TRD@, RIL, OTC, SAST, KLF8, TUBA8, MGC45806, FLJ13479, GRP, LRP4, CD84, WBCSR14, EPOR, BRAP, zizimin1, DNAJC4, FLJ20356, SERPINA2, FLJ10432, CD209L, NRPI, PGDS, PLA2G2A, TNFRSF4, PRO2214, DNAJB6, RDHL, FOSL2, DEPP, FLJ20241, MMP11, HLA-DQB1, RBM10, 8D6A, MAX, CUGBP2, CKTSF1B1, ISL1, CREBBP, ACTA1, NUDT2, OR1A2, GPR86, SH3BP2, APAF1, PRO1386, IGL@, EVI5, KIAA0443, MFNG, XCL1, ITM2A, IGLJ3, SIN3B, CCL18, NRXN3, AQP7, HLF, SEC14L1, DNMI, KIAA0551, STK17B, GNS, IL10, MGC20727, COL5A1, SEMA3B, C11orf30, CASP10, ORM2, NPEPPS, CALCLRL, ALK, SH3BGL3, FOXD1, MNDA, LCP2, ANK1, GSTA1, FLJ20856, ALOX15, L1CAM, DRF1, TM4SF9, SLC24A1, NR4A1, ATP7A, PCLO, TSHR, CAMK1G, MSR1, GLIPR1, KIAA1069, LYN, FLJ00001, MIG2, DLGAP2, TF, SOD2, ELMO1, BMP2, SLC12A5, PSG11, EPB41L3, CAMK2B, TGM4, SCN11A, CALU, F11, GPR75, KIAA1053, SIX1, WBCSR5, RIN3, CCNT2, CABIN1, NR2C2, TRPM1, ABCD2, VDU1, FLJ20811, GJB3, ASAH1, RAB1A, HAND1, BAI2, EDG8, TNFSF13, HPIP, PTPRN2, PRO0618, PRKCI, PSTPIP1, FACI4, ETV4, CACNA1D, WISP1, PRLR, FEZ2, CCL25, PCNX, SXN10, LILRA2, KIAA1086, MKRN3, PRG1, HGC6.1.1, GUCA1B, RIG, FLT1, HLA-C, KIAA0427, LILRB2, MAP2K5, FLJ11125, EFNA5, DUOX1, LIG4, MRE11A, DEFB126, DNAJC9, RQCD1, ABCB8, HPR, MRS3/4, KPI2, NR1I3, FBXW7, HS3ST3B1, LAD1, SHMT1, CITED2, DNALI1, POLYDOM, PFKFB4, KIAA1029, UTY, SCAND2, ZNF215, FOSL1, CDH17, PCSK5, ACE2, ERG, FLJ11619, KIAA1466, KIAA0675, IL18, FLJ21562, BTN3A3, FACI6, FANCA, ANKRD6, CALCR, CSF1, FLJ13262, CALR, TFEC, SSTR2, HBD, MGC10986, GTF3C2, HRC, RHOK, KIAA1117, KIAA0924, ITGB1, DEFCAP, FLJ12525, TBXA2R, GLIPR1, AVPR2, CCNE2, TBXAS1, RGS5, HAGE, FOXO3A, SYK, 384D8-2, ABO, 24432.00, MASS1, PF4V1, CASP5, CNGA1, FLJ14251, SLC9A3, UPK3B, DLG1, COL17A1, PCDHB12, OSIL, HFE, KIAA0495, KCNJ15, KIAA0997, RGS11, PITX3, FLJ13055, UBE2I, PRO2176, CACNB4, FOXH1, RASA2, PML, BCAT1, EDG2, OCRL, ATPAF2, PMS2, POU2F3, PTPN21, SUTP6H, HAN11, ROR1, COPEB, KIAA1654, DKFZP434B204, TNIP3, EPAG, CACNB2, NEK2, XRCC4, IL6ST, TNRC11, CAPN11, 37870.00, PLA2G4B, NPEPL1, RASGRP1, HABP4, CYLD, C15orf5, ITGB3, FLJ23093, NPPC, MCOLN1, GAD2, TRO, LOC51063, OGN, NR1H4, MTRR, SS-56, NT5E, C22orf4, SLC4A5, SGCG, C8orf1, LGALS2, ELK1, TRPM8, MGC2655, NR3C2, PPARG, MXD3, SERPINB3, PRO0461, GNAI1, AVPR2, PEG10, SPINK1, CLDN1, STC1, KIAA1045, F2, GNG11, FY, H4F2, D21S2056E, CAPZB, KIAA0599, C1orf29, RGS12, CGC, NCOA2, FOXL2, UGT1A8, PKLR, NRG1, ITGA7, CNOT3, SPRY2, PIK3R1, ZF, PTPRR, KSR, TCEB3L, IREB2, PRO0899, PAWR, SOX18, Gene Symbol, RPL28, FLJ13352, C20orf114, PIGR, ERAP140, MYO5B, EGR1, LOC124220, TCEB2, BACE2, NMES1, KIAA1324, MGC45416, WASF2, APOA1BP, FLJ32115, ATP6V0E, TIMP2, H2AFJ, C9orf5, RASD1, KIAA1437, H2AFJ, RDH-E2, DKFZp434G171, GUK1, FLJ20671, CAPNS1, KIAA1671, H19, FLJ23153, NDUFB10, FLJ13593, GLTP, TLP19, ENPP5, MGC39329, MRPL41, ARF3, LOC51255, HSPCA, BR13, FLJ14525, LOC113246, RAP2B, FLJ14117, GLCC1, PPP3CA, PHP14, MIR, ADCY4, FLJ11320, MSTP028, Cab45, TNFSF13B, ZNFN2A1, MGC14327, KIAA1404, RAB34, RBMS1, ARHU, SPUVE, LOC54516, SAMHD1, LOC170394, SAMHD1, PIGR, CYP4X1, NFIA, KIAA1715, CTHRC1, DKFZp547A023, KIAA1434, MYBBP1A, MGC4248, H4F2, H4FH, NPD007, MGC14839, FLJ21791, HDLBP, C8orf13, FLJ23393, FLJ11046, DKFZp434C0328, BCAT1, BAT5, FLJ31235, LOXL4, RNF7, MGC2803, CLDN1, KIAA2002, STMN3, MYO5B, CTSS, ATP1B1, MGC4309, UBE2H, DKFZp762H185, LOC115265, MGC13045, SH3KBP1, MGC4604, TRIM47, C9orf5, SDCBP2, AP1S2, C20orf110, LOC51234, SAT, dJ55C23.6, CKLF5F7, PCDHA10, MGC11115, MGC15397, LOC116238, TRIM8, FLJ25157, NAV1, KIAA1870, ALS2CR9, GCNT1, GALNT4, HSCARG, PPP1R1B, PHP14, TGFB3, ARIH2, MGC1842, SELM, AKAP2, MAFB, FLJ23091, MBNL, TEM8, CFL2, KIAA1554, SEMA4B, FLJ10961, SCAP2, KIAA1244, RIG-I, TRABID, TRIM56, MK-STYX, TMEM9, FAD104, GLTSCR2, MGC13379, MGC40555, FLJ14251, NOL6, FLJ23499, DHRSX, DKFZP564D166, CED-6, LOC57168, KIAA1337, CRB3, EMILIN-2, GJB2, ECGF1, CHDH, LOC120224, ZNF75A, EPSTI1, NESHBP, FLJ10210, FBXO25, MS4A6A, NOTCH2, FLJ39885, FOXPI, ORMDL2, MGC11134, MS4A6A, HSPC195, KIAA1913, UACA, C1orf13, USP28, LCMR1, GBA2, DKFZp547D065, TH1L, RORC, PAK1, MGC2555, KIAA0146, FLJ20186, SCAMP2, NGEF, C14orf58, CED-6, LOC55893, GTAR, MGC24103, MS4A6A, DAG1, KIAA1394, FLJ20073, MGC13114, FBXO32, CD44, CTL2, ARNT, C21orf63, CLIC6, C20orf64, FLJ90586, RBPMS, LOC51242, MGC45441, CLMN, FLJ35564, MGC4604, DRCTNNB1A, CGI-125, DKFZp547A023, MGC39325, CD109, FLJ23499, EHD3, MGC4840, USP21, DKFZP761E1824, FLJ22215, IL17D, MGC16028, MS4A7, GALNT2, CDKN2B, LOC90550, CKLF5F3, FS, KIAA1949, MRPL10, MGC45714, MAP4K1, SLC4A11, HP3, DNAJC5, LOC120224, FLJ11036, KIAA1337, FLJ10697, SENP2, SART1, MGC2474, SCD, FLJ14486, KIAA1214, CARD6, KIAA1691, MLL5, C20orf102, FBXW5, RARA, SLC13A3, FLJ33817, NRP2, BACE, LOC55971, FLJ14855, LOC133957, GPR108, MRPL41, MGC10485, CMG2, C8orf2, PIAS3, DKFZp434G118, KIAA1500, APXL2, MGC16028, COG1, UBE2H, CMG2, CTSB, LOC143903, CANX, PAG, CP, FLJ40432, LOC137392, DKFZP586F1524, SAMHD1, DKFZp761A052, HSPC002, C20orf23,

10

20

30

40

DKFZp434N061, SLB, PSMB7, MGC4342, DKFZP434P106, FLJ22678, SYTL4, DKFZP566J2046, LOC51249, PARVA, FLJ23091, YR-29, LOC55893, OGN, CPNE2, KIAA1784, Spir-2, DNAJA4, TMOD4, FLJ30726, C9orf19, SNX8, DUSP16, FLJ34633, FLJ25785, OSAP, B2M, DERMO1, ZNFN1A4, SCYL1, C16orf44, MAF1, MGC12435, MSCP, JAK3, PPP1R16A, MGC4607, G6PT1, MGC16212, FLJ22283, SRA1, HBP1, CTL2, HCC-4, SPTB, C6orf37, KIAA1337, SNCAIP, SMOC2, PYGO2, FLJ12770, FLJ40432, BMF, SLC27A4, C1orf19, SLC5A1, CHRM1, FLJ14457, DKFZp434F054, SES2, MGC45474, BTC, APOA5, DKFZP434P106, KIAA1522, ZNF317, a1/3GTP, PCDHB3, MGC26963, HSPC182, SNX9, NFAT5, C4orf7, NCAG1, KIAA1363, TAF6L, NAV1, KIAA1361, ZDHHC9, MGC2615, PHLDA1, AD-003, LOC90268, FLJ10101, PCDHB16, SLC2A12, CKLFSF2, FLJ23518, SEMA6D, PS1D, SLC31A1, MGC10485, SLC5A2, ARHGAP9, NKD2, ETS1, FLJ90586, REN, FLJ14981, DKFZp761H0421, DKFZp434F2322, MUM2, SPP2, MGC4734, FLJ13687, BANK, CNTN3, TLR8, HM13, FLJ36525, SLC12A6, DAPP1, VANGLI1, MSH5, P5CR2, HAVCR2, CXCL14, GALNT5, ANKH, MGC29463, FLJ00028, TMPRSS6, AMOTL1, ODF3, MGC4604, ARG2, FLJ10052, FLJ13881, PP2135, SLC12A4, MGC10500, MAP1B, DKFZp547I094, FLJ30473, FLJ12886, ST6GALNAC6, ESDN, SEC15B, FLJ33903, LATS2, ZNFN1A1, SLC16A10, DSCR1L2, PSMB5, GPR34, FLJ20557, CGI-85, HCA127, DKFZp434I1930, FLJ90811, LOC113026, FBXO18, MGC8721, BLVRA, MGC10974, PRO1635, MAP4K1, HKE2, FLJ32122, FLJ35867, FLJ10392, WFDC3, C21orf6, FLJ23654, DKFZP586D0824, C21orf91, ENTPD2, RGNEF, GPRC5C, RALBP1, FLJ31052, C11ORF30, FLJ30803, ITGA11, KIAA1053, AGTRAP, NDUFS2, FLJ32069, ACTR1A, SLC2A4RG, PPARBP, FLJ10055, C20orf167, FLJ12649, KIAA1909, IFIT2, EMR2, CD5, HT036, SERPINB9, MAP1LC3A, IGKC, ZD52F10, FLJ32028, BTEB1, FLJ20539, CCL28, MGC21621, KIAA1130, KIAA1554, FLJ31937, RPL29, GSA7, FLJ25067, FLJ20989, LOC92689, FLJ12604, MS4A6A, ELA1, SMOC1, C1QG, MGC14421, KIAA1576, FLJ20245, LOC155066, PRDM6, DAP10, PCDHB14, FLJ25124, SNRK, ADAMTS16, SES2, SECP43, EPSTI1, KIAA1948, NOL6, PALMD, PAG, MGC39807, TTY7, NUDE1, KIAA1210, HRB2, USP21, C9orf19, LOC93589, DKFZp434E1822, MGC10561, RNO2, GLCCI1, MGC3234, AMOTL1, FLJ33868, B3GNT5, FAM11A, SBB131, FLJ23654, SLT, CPM, DKFZp762K222, NSE1, KIAA1817, NYD-SP21, LUC7L, FLJ13063, SIAT6, CASP14, FLJ11896, GPR92, FLJ25027, EVC, HOXA3, HTGN29, MGC4281, MGC15548, GSN, AD023, FLJ14311, TAGAP, KIAA1276, CGN, ZDHHC12, FLJ21736, FGFR2, LOC91461, GNG2, BACH1, KIAA1921, KIAA1957, FLJ10111, KIAA1145, ARHGEF7, STARD4, retSDR3, HBXAP, ARFGAP1, NY-REN-60, RIG-I, X102, AF1Q, SYTL4, ICAP-1A, KIAA0872, LOC148932, SCML1, NOL6, Hes4, LOC57038, TRPM6, ABCC13, CGI-85, DRLM, BCAR1, NR0B1, MCOLN2, KIAA1836, MGC35048, VIL1, LOC124245, MRP63, TTYH2, FLJ14735, PRIC285, KIAA1999, GALNT7, EGR4, DKFZp434F3222, PHACS, LOC51219, LOC132158, PRO0971, SUI1, SKD3, RNF26, TTY6, TNRC18, CTXL, FLJ12666, FLJ39957, FACL5, POLK, SLC25A13, FLJ31318, ZFP91, MGC19825, TPM2, PPP1R14C, LOC142820, ALDOA, EGFR-RS, FBXO27, PRO0038, MGC10992, NPCR, HCMOGT-1, RSP3, PPP1R9A, KCNMB3, GPR55, ZFP28, PRO1635, C20orf154, FLJ32203, MS4A6A, KIAA1647, KIAA1607, BAZ2B, FLJ32752, ZNF216, PP2135, KIAA1357, MGC16207, KIAA1694, GBP1, FLJ10474, FLJ10826, ELAVL3, LOC90668, CPXM, MGC2452, FLJ20273, MIC2L1, FAD104, GPR107, MGC15419, SORCS2, ST6GalNAcI, RP4-622L5, DKFZP434F011, TNKS2, DKFZp761K2222, EILS1, SLC4A11, KIAA1163, CALN1, KIAA1828, MEGF10, GRIN3A, REV1L, BHLHB5, ADMP, DKFZp667I133, MGC13275, KIAA1889, DKFZP434A236, GPS2, FLJ20309, NAV1, MGC2603, ARHU, FLJ33071, NUMBL, CDGAP, FLJ35713, DKFZp761A132, FLJ10300, FLJ12634, GTF3A, NEO1, RRAD, MGC10966, PTPN2, FLJ10292, ACP, CISH, DOT1L, POLRMT, CGI-149, KIAA1202, DKFZp761J139, MGC40178, GATA4, EVIN2, MS4A8B, FLJ10057, NDUFV3, SF3b10, RP2, FLJ21032, CLG, MGC3040, ODZ2, AQP1, DKFZp566F0947, CCL27, TARD9, MGC40222, DKFZp564C236, SDS-RS1, SNCAIP, ENDOGLYX1, CGI-30, FLJ10314, MGC20470, KLHL6, KIAA0212, PRO0899, KIAA1894, FLN29, FLJ20373, GTF2I, GIC1, BHLHB3, CPNE5, GPC6, IL6R, RRN3, DKFZP564J047, C20orf99, CED-6, DKFZP434P1735, TGIF2LY, LOC83690, GPR110, FLJ34922, FLJ20211, FREQ, USP26, MGC15634, ZS1G11, ZFH2, C7, UNKL, LOC151835, MGC21854, FLJ25410, EGLN2, KIF9, KIAA1550, CIP1, DNAJC9, FLJ14768, MGC2599, LOC57018, DDX12, MGC33993, SLC22A3, KIAA1399, DKFZp564C236, EG1, SE70-2, DKFZP564H1171, CDH26, TRPC7, DKFZP566K1924, C20orf60, ROR2, KLHL5, SCARA3, PRO1580, MGC15523, DKFZp434C0328, FLJ31528, CRIL, FLJ32734, NXF3, MGC41906, CLECSF9, SSBP4, ZNFN1A4, FBXO22, NCAG1, MAP2, KIAA1529, TIGD5, SNX9, FLJ32001, RPC5, AK2, KIAA1887, ACK1, FLJ37312, ARSD, FLJ31564, LOC51136, MYEOV, GNAIL, MGC12335, FLJ20356, KIAA1617, HNT, C21orf59, LOC221468, ENAM, PB1, TBXAS1, NMNAT, MGC10204, TNKS1BP1, LOC57401, FLJ32194, ENTH, APOA1, ITGA6, MGC12458, FLJ23403, BCL10, H19, C7orf2, DNER, PDE11A, MAF, FLJ10378, MGC14276, TLE1, SH3GLB2, TTTY8, KCNH3, LOC90693, ENDOGLYX1, LOC144402, CGI-105, LOC153222, ASAH2, MGC4415, KIAA1495, SFRS12, および AGPAT3.

10

20

30

【 0 1 5 6 】

(表5) HSCに対するUPTGにおける上方制御

CFL1, S100A8, SERPINA3, UBC, MUC1, SFN, ANXA2, ANXA2, COX7A2, HSPA1A, KRT18, ANXA2, OAZ1, TMSB10, CA12, DNCL1, CEACAM6, ASAH1, RAC1, ARF4, TACSTD2, MYL6, MSF, JTB, CKAP4, TFF1, IER3, GATA3, IFITM2, SFN, MTCH1, TPM1, CD24, NET-6, MLC-B, MLPH, QP-C, SCGB2A2, S100P, S100A9, COX6A1, CAPN2, COX5B, CD24, H2BFT, XBP1, FXRD3, RNP24, PTS, GSPT1, COX6C, TIP-1, HIG1, RPS16, SAT, HSPCA, TPD52L1, TMSB4X, S100A10, JTB, RBPM5, KRT19, FLJ10830, TUBB, JTB, ITGB1, CEACAM5, MT2A, LIV-1, HN1L, LCN2, LOC51142, LGALS3, RAB13, FTH1, TCTEL1, IFITM2, S100A7, PSMB4, MAGED1, FLJ20151, DBI, COX6B, C20orf24, ARHA, NFIB, PTP4A2, NDUFB2, CALM1, ATP1B1, GNG5, CD63, NAT1, S100A6, EIF4B, ESR1, HSPB1, TAGLN2, ALCAM, NDUFS6, AGR2, C8F6, TXN, HDLBP, NDUFA4, PPIC, GLO1, RAB11A, LPP, HDGF, CALM1, MGLL, PTS, ARF1, DC12, SNRPD2, C4A, RAI3, NDUFA6, ATP6V1D, MLCB, TEGT, DSP, PNN, ACTN1, NIFIE14, NDUFB4, DAF, VAV3, UBC, SSR2, MKNK2, HSPC014, KDELR3, TACSTD1, DKFZP564A2416, ASAH1, DDR1, ENAH, KDELR2, DNC12, PPP1R11, PP, SERF2, CTSS, SSR4, GNAS, PGM1, CEACAM6, PDLIM1, GATA3, MGC3178, SHC1, GOLPH2, GNAS, VAMP3, S100A14, GABARAP, ALDOA, TAX1BP1, LASP1, NFIB, CCT3, AQP3, DBI, VCL, GNAS, ALDOA, COL3A1, ATP5J2, MGC16723, USP9X, TMEM4, MTX1, HSPC134, ZMPSTE24, UOCR, AHCYL1, GOCAP1, HT011, EDF1, CRIP1, FXRD3, MRPL9, RIP60, TIMM17A, BF, RER1, DC50, CTBP2, HEBP2, YIF1P, LOC54499, APMCF1, UGDH, PSAP, SPEC1, FLJ12619, TUFT1, COX5B, LRP10, ATP6V0E, CYP27A1, PON2, NQO1, PTPRK, EIF4EL3, GNAS, CLTA, MDH2, TCEB2UBE3A, TM9SF2, MUC1, RARRES1, PRDX4, MIF, TPD52, CD81, DSTN, HRY, HSPC051, SMBP, HDGF, C14orf2, BRD3, NHP2L1, PPP2CB, DLG5, ASS, ENSA, MAGED1, CD59, SHAPY, CAST, JDP1, HK1FBXO9, RPL38, INHBA, EMS1, HRI, APP, HAX1, FKBP11, GOLGB1, SPINT2, GORASP2, CD24, HSPA1B, FLJ13593, MGC5466, E2F4, PRO1855, UBE2V1, KIAA0882, RPL36AL, CSTB, ATP5I, OASIS, DKFZP564K0822, RCP, MAGED1, PSMB5, NDUFS2, YWHAZ, KIAA0310, RPL38, FLJ20273, RAB3-GAP150, PSMA5, ATP2A2, C20orf97, TUBB2, RAB31, C9orf7, HIG1, INSR, TPM1, GSPT1, PSME2, CSNK1A1, P4HB, EIF2S1, LOC92689, NDUFA3, KIF5B, PAM, MT1H, SHAPY, FLJ10898, GUSB, BNIP3, KIAA0992, FLOT1, PSMB7, TAF10, CSNK2B, EPRS, PIG7, DAP3,

40

ECHS1, AP3D1, COX8, PMP22, LOC54499, ALDH3B2, MGST3, PRDX2, PTD011, COX5B, CAST, LASS2, PSMB2, MT1X, MYD88, DKFZp56411922, FLJ20719, C4B, H2AFL, FLOT1, PIN4, TCEB1, WFDC2, SQRDL, CSTA, PTD009, PTPRF, DAD1, PDEF, FN1, GPX4, DDR1, ARHD, COL1A2, PDEF, HSPC009, MEA, ABCD3, CYB5, MLCB, PRO1489, PDEF, RPS11, IDH1, SLC12A7, H2BFB, SH3BP4, CD24, SLC38A1, RAB31, LTF, TIMP1, SH3YL1, SEMA3F, TSPAN-1, KIAA0852, NDUFA8, COL1A2, SLPI, PSMAD4, RPL27A, GNAS, KIAA0876, DP1, CEBPD, CIB1, IQGAP1, TSG101, MGC3077, CYB5, FN1, LOC51128, EMP2, CETN2, PACSIN2, PBEF, MRPL24, CTSB, SDFR1, MLP, TM4SF1, C20orf3, PRKAR2A, MGC5178, FN1, FLJ20054, MMP24, SEPX1, GFTPT1, ANXA11, ADFP, GMFB, AP3S2, PTBP1, BAG1, FLJ10496, CYB5, CXADR, RAB25, FH, APP, CDR2, PSEN1, RFP, SEC22L1, GGPS1, ARMET, USP7, FLJ20847, EFA6R, HSPA4, RDBP, TNFSF10, DDR1, KIAA0429, PLP2, RABGGTB, BAG3, IFI27, GATA3, LAMP2, CD24, MRPS14, FHL2, CGI-130, CPB1, SCAMP3, NESCA, BACE2, PSMD8, LGALS1, MPHOSPH6, FLJ14154, COPZ1, CALR, HK2, WIRE, PTP4A1, TRA1, DKFZP564G2022, CTSH, CRAT, PLAT, ANXA2P2, YME1L1, PILB, ITGB5, KIAA1026, FKBP4, TBL2, PIGT, WSB2, IFI30, TUBB2, E2IG5, YME1L1, ATP6V0E, RAB4A, LOH11CR2A, PLU-1, KIAA0483, SLC2A1, LBP, MGC11256, FMOD, TLE1, POLR2H, TOB1, NSF, TACC2, OPN3, USP3, PSMB1, TMP21, DUSP4, RAB2, SVIL, FDF1, NFE2L1, PTGIS, RPP20, PGLS, ORMDL2, NR2F6, PIG7, ERBB3, TRAP1, DDR1, SDC4, HSA243666, PLU-1, ATP6V1E1, DAAM1, GSN, MCP, KIAA0143, P17.3, PIN4, WARS, FN1, TFG, COPB2, ERP70, MRPS18A, C22orf5, LYSAL1, POLR2I, SARI, ATP6V0B, TUFM, NDUFB2, BCL6, PDCD6IP, TRIM33, UBE2N, WBSR21, NEDD5, LOC51123, GMFB, PFN2, KRTHB1, NANS, CLU, TOMM20-PENDING, NDUFS8, MT1G, ANK3, PIK3R3, IL13RA1, TNFSF10, DNPEP, TNRC9, NIPSNAP1, BRP44L, PEX11B, FLJ13612, FLJ22028, POLB, ANXA4, SEC61G, PREI3, CDKN1A, MT1L, SAS, PSMD5, COBL, CARD10, UBE2D3, RABAC1, CPD, C21orf97, PAM, MRPS10, CGI-109, GBP2, TC10, NMA, FASTK, P4HA1, GTF2I, COG2, MYO6, LMNA, TCF3, C14orf3, PEA15, PRKCBP1, GALNT3, IRS1, ACP1, GUK1, MBD2, PTD008, RBM4, TNFRSF10B, KIAA0266, NQO1, DNAJA1, FACL3, FER1L3, CD59, PPAP2A, FACL3, KIAA1598, TGM2, MTMR9, LOC51760, TST, TM9SF1, LGALS3BP, P24B, D2S448, RPL27, KDELR2, TJP1, OPTN, NME2, HRI, F12, RABIF, TJP2, ATP1B1, GGPS1, FLJ10116, PTGES, SCO2, PEN-2, PSMB3, CDS2, RAB23B, PPM1A, ARL3, TXNDC4, GOLGA5DDX32, DAG1, VIL2, TPBG, GM2A, EIF2S2, NEUGRIN, DKFZP564G2022, KIAA0934, ADM, CSRP1, GRIM19, FAT, SLC21A11, ACADVL, NDUFA2, GALNAC4S-6ST, EIF5, RAB1B, NME1, ASPH, MUT, ARF4, FBXL11, COPA, UBL5, CSNK1E, ATP5I, CCND1, HT021, PPP1R7, LOC56851, SRP54, DAF, CTBP2, TLE2, HSD17B1, SRD5A1, SLC9A3R1, MUC16, PPL, MGC10765, EPB41L4B, SECTM1, CHPPR, SORD, VTI1B, CRABP2, EFNA1, HERPUD1, CDYL, MRPS17, SGLP1, DUSP14, SSBP1, C20orf35, C3, HSPC163, ATP6V1G1, YF13H12, FLJ13052, ABCB10, STUB1, NNMT, RAB20, CALU, PLCB1, NR2F2, HSP1, TM4SF1, RSN, FLJ20813, TPALR, SEPW1, HIF2, GRHPR, HSPA1A, RAB2L, SARS, FIBP, PSMB6, RER1, BCL10, ATP9A, IDS, PPIB, RAB2, Cab45, PYCR1, GSTM3, SEC24A, MAPT, FLJ10579, ADAM9, FLJ21603, DNAJB1, C20orf116, DKFZP564G2022, RDGBB, RRAS2, AKAP9, KIAA1243, DCI, ELF3, PDE4A, CRIM1, CORO1B, PXMP4, S100A13, DPP3, GTF2H2, PSMB8, TUBB4, MRPL33, STK39, VCAM1, MAOB, DKFZP566C134, CSNK1A1, FLJ20761, EGF6, ATP1A1, APH-1A, FLJ22055, TOP1, RCL, SMT3H2, POLR2K, LMNA, ID4, JTV1, CLN5, AKIP, TGFB1, LLGL2, ITGAVPPP2R5A, IFNGR1, JAG1, DD96, PGRMC2, SNRPE, MGC19606, DJ971N18.2, CKAP1, MGC3180, HYOU1, PACE-1, FLJ22662, KIAA0674, ALS2CR3, EPLIN, MYO1C, CD164, PCMT1, IL1R1, SERPINB2, HSD17B4, FOLR1, HRIHFB2122, FLJ22457, MXI1, CTF1, POR1, FLJ20375, H4FD, KRT7, TFAP2B, MRPL15, SLC5A6, RGS16, TNFAIP1, FLJ14146, HOXB7, PIK4CB, RPS20, C11orf24, SYNGR2, NCKAP1, APG3, HBCDL2, ASC, C1orf9, KIAA0247, HRB, PAFAH1B3, SNK, ASB13, LSM1, GPI, MCJ, CASK, HOXB7, RBBP6, PKIG, SMARCA4, BLVRB, HYPK, SUGL2, KIAA0494, SLC2A10, HIG2, TSTA3, TNRC9, SEC23B, SELENBP1, RAB6C, VAPB, ZNF144, PCNP, SULT1A3, NQO2, SMP1, FLJ30656, NUBP2, FLJ20152, ATP5H, FLJ22418, DCN, SOD2, FLJ20958, YWHAZ, TRPS1, CYP51, SUGL2, CGI-45, ZFP103, MID2, CPD, TFAP2C, C1orf37, dJ22E13.1, ICMT, UNC84A, CALM1, DF, SPTT16H, BZRP, SLC9A1, FLJ13110, ATPI1, MGC5B, CTSB, GJA1, SDHC, SUGL2, MGC3067, PBEF, IL27w, HSD17B7, GRSF1, CD9, H11, FLJ10099, NIT1, LAMC1, HBXIP, NDUFV2, STX12, SDHA, D123, Z39IG, RPL5, PA200, SCAMOL, HSPC171, STXB1, CACNG4, MAGED2, MGC4368, MPZL1, ZDHHC7, RPA40, IGSF3, FLJ22638, SPTLC2, MTRV1, FLJ21016, SGK, NCOA1, MAP4, GLRX2, P4HA2, JAG1, MTRV1, FLJ22940, NDUFB8, ISGF3G, B4GALT5, EMS1, C22orf2, LRPAP1, PON3, EIF5A, ENSADKFZP564F0522, FLJ11273, FESR81, EDF1, ISG20, EPS8R1, FLJ10525, PSMD4, NINJ1, TSSC3, FDPS, RGS3, CREB3, UBE2D1, ProSAP1P1, CAST, WBSR20A, MAPKAPK2, RPP38, YWHAB, A2M, RBX1, PDGFRA, EFS2, RAB9A, RAD23B, BAZ1A, BCL3, SNX4, CLMN, HRY, INHBB, NPD009, AHNK, TNRC9, S100A11, MYO1C, LDLR, KIAA0102SCYE1, LARP, GNA11, NDUFA7, CKAP1, KPNA1, NDUFS7, RDH11, RAP140, MTCH2, HPGD, ITGB4BP, CLDN7, CGI-147, GTF2IRD1, LRRFIP1, DAB2, DKFZp667G2110, LGALS8, MARS, MGC14480, MGC3038, PLXNB2, ZFP36L1, DBI, AP2B1, PLS1, CYC1, PPIF, COL3A1, PDHB, NSAP1, PFDN2, GAS2L1, DMBT1, FZD1, GBA, DNCL2A, VCP, MYO1B, ANXA8, C11orf13, DSS1, KIF13B, CECR5, GARS, COPB, NFE2L1, DLG3, FLJ12443, NALP2, APM2, KIAA0790, C1S, HNI, GALNT6, CLPP, STK24, PP3111, MTAF1, CAMTA2, BAT3, FADD, BC-2, CLOCK, UAP1, AAK1, MGC3121, CD14, CDC2L5, FYCO1, SQSTM1, UBE3B, CSPG2, EIF5, DEFB1, MTMR6, KIAA0643, 101F6, SLC35A2, TNKS2, TPMT, WWPI, LHFP2, NEDD8, PC326, PTK2, FLJ20748, FOXA1, IDE, FLJ20275, CACNB3, CDC42, TEX27, KIF3B, PP3501, CDCP1, HNRPU, TULP1, SPARC, DVL1, GMDS, EZF-2, AP2S1, GNA11, SEMA4C, WT1, KIAA0010, LAMA5, PTDSR, ETFB, KIAA0284, TFF3, GRHPR, RPL37A, G1P2, MGC11242, FLJ23189, FKBP9, MGC35048, RTN1, ASL, PTK9, THBS2, SDHC, HIS1, DSTN, MGC3047, PAFAH1B1, AGPAT1, PGM3, AKR7A3, COL1A1, KIAA0436, GDI1, CYR61, RNPEP, SGLP1, APBA3, GNB2, SOCS5, FGFR3, RGS19P1, ORC5L, SLC6A14, KIAA0229, FLJ22028, LAMP1, SNRPD3, MAPK13, DNJA3, FLJ22471, CKMT1, PSMB4, CCL22, CLU, CD163, ANXA3, ATOX1, GTF2E2, ANXA6, FLJ21127, BMP1A, WBSR20C, MBL39, IL4R, SEC24D, SLC19A2, RNASEH1ALAS1, ACAA1, DPM3, ABL1, TUBB4, EFN2, CALR, ARPC1B, MCP, SH3GL1, ECT2, LOC51619, NEK11, MAFB, EFEMP1, G10, DPP7, FUT2, ATP6V0E, SLC22A5, SSH-3, SYNE-2, PH-4, CTBP2, BATF, PDE4DIP, TRIP6, P2Y5, RNASE4, CANX, CD2AP, HIP1R, FH, ADCY2, SPURVE, FLJ10462, QSCN6, CLTA, SLC31A1, DEPP, CLTB, KIAA0544, CTSB, MARS, PAK4, PHIP, HIP2, FLJ23375, ARHGAP8, TNFRSF12A, KRT8, UBE2V1, PDPK1, KIAA0251, PPGB, GAS1, RAD17, PIAS3, 37872.00, ABCA1, FLJ10375, KIAA0217, SPR, GRN, EIF2B4, ITGB5, RPN1, APLP2, WDR1, SDC1, MGC2963, PM5, MGC5178, TBCE, EEF1D, SGP28, FEM1B, FLJ10829, FLRT2, KIAA0934, PCDHGC3, COPS6, PART1, ACACA, AMPH, LUM, FLJ23338, EPHB4, FBP1, WSB2, HBP1, EVA1, MUS81, POLR2K, KIAA0103, HPS1, LOC55831, FEM1C, RIN2, DKFZP564O092, ENDOFIN, DHCR24, FLJ20604, LOC90141, PCDH7, SLC7A7, SLC12A2, FLJ21047, S100A11P, CGI-115, TOM1L1, C1orf34, SOX9, MB, EIF4EL3, S100A8, APLP2, TDP1, FGF13, URG4, RARRES3, FLJ12910, DAP, RFX5, MVP, FLJ21749, PAXIP1L, FLJ20152, ATF7IP, GPSN2, RIL, VEGF, TM4SF6, SPP1, NVL, CALR, CKAP1, AKAP1, HSPC166, TMPRSS3, TM9SF1, LOC56902, ENT3, GRB2, COG5, DOC1, COL5A2, RLN2, GRN, ADCY9, KIAA0690, ENPP2, ILF1, SLC35A3, SLC39A1, C20orf11, PCDHGA1, CGI-148, WBSR20A, CSGlcA-T, KIAA0937, KIAA0674, LTBP1, H2BFT, SEMA3C, SULT1A1, ERP70, KIAA1078, KIAA0869, PLA2G12, PACE-1, KIAA0984, AUP1, RBSK, AMOTL2, SULT1A3, LANCL2, PAIP1, JUP, PPP3CB, KYNU, SH120, PRKCI, ARG2, OSBPL2, APOL6, GATM, LOC113251, GM2A, FLJ12436, CD24, SYNGR3, HSPA1A, CTNND1, SEC61A1, IFRD2, PCK2, PSMA3, COL6A1, ARHGEF5, RAI, VPS45A, BECN1, GNPI, PA200, PXF, BZW1, KIAA0876, KIAA0471, ATP6V1D, CRYM, KCNS3, FARP1, ANK1, FLJ20234, PLU-1, NPC1, ZNF339, RNF14, RBPM5, SEC13L1, KIAA1630, SIX2, SGSH, RPA3, VLDLR, ENPP1, ITSN1, AP2B1, ARHC, SWAP2, UBE1, MARK4, MK-STYX, HDLBP, ZNF185, KIAA0227, GOLGA3, KIAA0033, RAB26, SHANK2, ALDH3A2, DCN, HT008, PLAB, IMPDH1, GRIT, FARP1, MAPK13, ERBB2, TGOLN2, RALA, ARHE, ABCF2, PRSS11, PLCD1, HSPC111, TRIM29, ARL1, ACTN4,

10

20

30

40

MUC1, DJ434O14.5, FLJ11619, SH3GLB1, TCN1, FLJ11149, BIK, ZNF91, PRSS8, CYB5R1, TRIM16, EPS15R, NARF, SLC11A2, AUTS2, LIM, SLC1A1, ALDH7A1, TC10, SC65, IRF7, HLXB9, RAB17, KIAA0746, PCDHGC3, APOC1, AKAP1, EPS8R1, TBCC, DDAH2, TYROBP, N33, FLNB, DKFZp564A176, PREI3, JAG2, UGCG, OSR2, KRT6B, CDC42EP4, TPD52, C20orf149, FLJ12975, MAN2A1, GCN5L1, MCF2L, FLJ22386, STHM, RAB26, AP1S1, GMPPB, CYP2B6, F-LAN-1, PRKCZ, DC-TM4F2, KIAA0556, FLJ12619, CD163, DAZAP1, TIMM13, MADH2, COL4A5, POGK, FXC1, POP4, NET1, ARHGEF5, NS, KMO, PTP4A2, LOC57228, MUC5B, AUH, BAIAP3, SFMBT, CD44, BYSL, FLJ20085, PARG1, C4.4A, PSMD4, GSK3B, PSMD12, EIF2AK3, SCARB1, DP1, STRN3, FLJ23263, CTSD, HSGP25L2G, TFIP11, MPZL1, SNAPC3, RBM3, PP591, TGFB1I1, GRHPR, AHR, FLJ12389, SORT1, KDELR3, ATP6V0C, MD-1, D8S2298E, XAP135, HSPC023, C9orf7, C21orf97, DNCH1, ZNF36, PPP1R7, VIL2, RAB2, MYH9, TRIM14, UGTREL1, CTSL, KIAA0977, RPC62, UBE2N, DCAMKL1, FUCA1, ATP7B, RBSK, ST5, CGI-90, NOH61, FLJ10925, RAB22A, RTN2, KIAA0089, SH3GLB1, CDS1, MGC5466, WFS1, AMMECR1, COX17, ACOX2, FLJ10101, HT012, LMNA, PRDX2, SULF1, KIAA0923, FLJ22637, SCA1, PAIP1, CAP2, CMT2, ZNF217, CYB561, PAPSS2, STX18, FZD4, DDXX, UBAP1, ITPKC, PTS, PGLS, LAD1, DSC2, STOML1, DDX16, PTP4A1, FLJ10901, SLC12A8, NME3, TEM7, NPR2L, ACY1, GNB1, GRN, PLEK2, KRAS2, ARHGAP8, FLJ11856, DCN, LOC55871, NAGK, FLJ14154, FLJ22709, TP53TG1, STK6, COX5B, MICA, EPPK1, EPS8R2, MMP19, WWP1, TUBG1, LBP, ATP10B, CLN3, UBE2G1, SULF1, FLJ30002, SYN47, CSPG2, CACNB3, IGFBP3ELOVL1, DTNA, ANK1, C12orf22, EPN3, IDE, DKFZp761F2014, SEC22L1, ILF2, ACTR1A, FLJ10052, STAT3, CED-6, FLJ10359, SOX9, PIAS1, KIAA1169, CAV1, HOXB2, FLJ22191, LOC57117, PMVK, BLNK, TREM1, HSRTSBETA, EIF4EBP1, SIGIRR, TSLRP, C20orf44, PTD009, PTG65, FLJ2058, SFXN1, PDE8A, CNM2, GNA11, GPX2, KIAA0599, FLJ13868, DBN1, GEMIN6, PMM2, SPTAN1, PFN1, DCTN1, UBE2A, GPR107, MRPS2, SNARK, SSA1, SH120, UBPH, CPD, HOXC6, DXS9928E, TEAD3, PGBD5, ST14, CNM3, KIAA0256, MGC3262, FLJ13840, CLDN4, FLJ1939, ABCA3, OAZIN, MRPL17, PPP2R4, CGI-135, KIAA0802, AP1M2, SCN10A, PPIB, MRPL40, ZK1, FLJ12517, CDH11, CDC42EP2, CLN3, CGI-152, FLJ10815, C11orf13, MADH1, FLJ20539, HMGE, KIAA0923, LAP1B, PTGDS, FLJ20559, SFXN1, KRTHB6, UNCL13, MUC4, FUT8, NET1, NEBL, BCS1L, RAI16, CAV2, FAAH, CEACAM1, LEF1, GALNT10, NAGA, ABHD3, STOML2, C1orf27, OSTF1, KIAA0227, PCLO, MYO10, THBS1, LANO, HMCS, H3FK, SPS, C9orf9, PITPN, SCRIB, PAM, NPDC1, ASNS, SLC33A1, HSPA6, HMBS, FLJ21918, FLJ11939, C6orf29, PRSS15, ENC1, HTRA4, SSH-3, RECK, NAV2, TRN-SR, MRS2L, FLJ20366, LOC51754, LGALS8, KIAA1040, B4GALT1, FLJ21841, KIAA0237, IL8RA, MLF1, ANXA9, VRP, LOXL2, MIR, ATP5D, KIAA0632, FLJ20174, FRA72, DDX26, BCKDK, ATP6V0A4, KIF1B, ENTDP3, RAB1A, EGLN1, KIAA0268, LGMN, PTPRH, KMO, UGCG11, AKR7A3, RIG-I, CYB5R2, FLJ11773, RPS6KA2, CLCN3, PTPN18, GNG12, PKP3, ALDH1A2, NEK3, UQCRC1, ZNF236, RASAL1, RPL14, FLJ12287, AP1M2, C4BPA, MAF, FLJ10815, FLJ90798, TRAM, POLR2J, TLN2, DNASE2, PEX11A, KIAA0790, TM4SF3, HPGD, TRIP10, THY1, CGI-143, TPR, AQR, CTNND1, HOXC10, CDC42EP4, PLEC1, PSFL, PTP4A1, FLJ22353, NCALD, INPP5E, MKRN4, PAD12, SMARCA1, KIAA0317, EHD1, AZGP1, SMARCA1, NOVA1, MRPS11, FLJ23091, HOXC4, OCRL, CKAP4, CD44, CD2BP2, FLJ10055, TM7SF1, PVRL2, ID4, DJ434O14.5, SLC7A8, DKFZP564I122, MIPEP, PLA2G4C, KPNB2, DAXX, NOS1, ID3, MRC2, SSSCA1, PPP1R14B, MTHFS, HSPA5, ELF5, MARCKS, KIAA0514, RRAS2, ADRM1, ANK1, KIAA1324, PSEN2, UBXD2, CALU, DOK5, KCNMA1, COL9A2, ATP2C1, FGFR2, DPM2, KIAA0895, DPH2L1, MUC5B, SSR1, LOC113146, KIAA0644, LOC51042, DNAL4, PIG3, GPS2, CX3CL1, INHBC, C1QB, PDPK1, RPLP2, HRI, MGC4825, TGFB3, LAMC2, PEX7, HFE, DJ434O14.5, FLJ20296, MGC5347, FLJ10521, RARA, KLC2, SLC21A2, SPTAN1, APOC1, LARGE, STK38, GCC1, SNX13, TNNT1, NTRK3, TGIF, H3FH, KIAA0485, KIAA1416, EFEMP2, SMARCE1, KREMEN2, UMPK, KIAA0268, DDEF2, VAMP3, CGTHBA, OSBPL10, CGI-96, MGC3248, TUBB-5, PXMP3, RBM9, LOC51257, LAMC1, SLC30A5, PPARD, KIAA0349, MAP4K4, GNG4, CCL3, GPRC5C, CCR1DKFZP586B0923, RNF10, SCGB1D2, VIPR1, RGL, TESK1, AK3, KIAA0649, SCARB2, MGC2494, FLJ20048, EPS8, DNAJC1, MOB, FLJ1200, CD1C, AGPAT1, FBLN1, GW112, ICT1, CGI-141, DSCR1, PIP5K1C, PRY, ALP, PRDM4, PLAC1, ISG20, FLJ20457, TCF-3, PTE1, TNK1, MAGED1, FLJ13782, NPD009, UCHL3, PRELP, LOC55893, KIAA0451, AK1, LMCD1, NET-7, AP3B1, OS4, ABI-2, NOTCH3, KRT9, COPZ2, CGI-58, RISC, DKFZP566C243, ATP6V1C1, TRIM38, PTOV1, PDGFB, PIP, IDN3, FLJ10199, BCAT2, HOXA11, PDXK, NEDD4L, MGC29816, TPD52, TMPSR54, HAIK1, SUPT4H1, WNT5A, PCSK7, ANK1, FCER1G, FLJ13397, ERO1L, BPGM, HLA-DQA1, DCXR, KIAA1094, NEO1, FKBP4, SMARCD3, TSPG1, FLJ21940, APBA2BP, TMPSR56, TBC1D1, MS4A6A, U2AF1RS2, MGC11308, MRPL23, PCDHA12, SMA3, CELSR3, SLC22A4, MGEA6, ICA1, STX4A, EFS2, RRP22, X123, GBA, DNAJB1, TGFB3, CRAT, FLJ11159, TMEM8, GALE, FLJ20555, DDX3, TULP3, TACC2, SLC6A8, C3AR1, BSCL2, TRIM2, ELF3, SPTBN5, SERPINB8, FLJ23259, TNFRSF6, MIPEP, CELSR2, LDB1, MOG1, PXF, HP1P, HMOX2, SURB7, HRIHFB2122, FLJ22056, CLASP2, IF, HSKM-B, UPK1B, WDR10, IQGAP1, PSHL, DUSP4, FLJ10856, RARRS1, ALAD, PARVA, KIAA0608, DNPEP, GMPPA, FLJ20254, IDE, COL5A1, GFER, PSMA7, FLJ11017, ZNF144, MYC, PEX14, CCR5, ARL1, NME5, NDUFB7, PPAP2B, C21orf80, CAPG, MRPL52, MIG2, HSPC039, DPH2L2, SRD5A1, SDR1, RAB36, SCGB2A1, PRDM4, ASM3A, FRA, GLUD1, FLJ13187, CARM1, RPS6KB2, LOC55565, B3GALT4, ALOX5AP, PLAUG, DMN, DFNA5, CGI-36, TC10, SLC38A6, KIAA0852, CRIP2, HSPC003, SNFL1C, FLJ20605, GPC1, FLJ10504, MKLN1, TIP-1, SCAM-1, IL13RA1, UPLC1, FLJ20171, LOC88523, HSD17B2, MYO1B, ZNF364, CDK7, MAP7, PCOLCE, IL13RA1, SSNA1, ESRRB, CPS1, APOE, MYO14, CHK, THBS3, DAB2, PCMT1, MAP7, SLC7A4, APPD, ITCH, KIAA0255, BCMP1, AKAP9, SNCAIP, MRPS7, PIGPC1, HIVEP1, SLC6A8, DKFZP564O0823, CRK, BAIAP2, SLC7A11, CPE, MPZL1, TDO2, FUT1, STAB2, CDKN2A, CGI-12, TPM4, IL1RN, MGC4504, KIAA1395, COQ7, CARHSP1, PARVA, FLNC, C11orf24, NFPT1, ARVCF, CAPN9, SRRM2, NBL1, KIAA1078, SURF5, ARHGEF4, F23149_1, FKBP11, KIAA1102, IGF1, RBT1, HNOEL-iso, LAMB2, DKFZp566O084, FGB, GPNMB, TLR5, CX3CR1, THBS1, GORASP1, HCA112, AQP3, BDKRB2, SLC4A7, CLTB, MRPS18A, CTSK, CELSR2, KIAA0652, NKX3-1, MXD4, ALDH4A1, DYSF, ECGF1, DCN, PSME3, TIMP2, HOXB6, EGFR-RS, EPS8R1, ECM1, LTB2P2, PRPS1, CDA08, HUMAUANTIG, MGC955, FLJ22678, LAMA4, GLUL, MAGED2, HES2, FASN, CYB561, IDH3A, MPPE1, PRKARIA, KDR, DICER1, PROCR, TNFSF10, HAGH, FBXO2, TC10, PRKARIA, ZNF20, AK1, ALDH3A2, FSTL3, ZNF408, PTP4A1, PMS2L9, BAG1, DKFZp667G2110, MUC2, KIAA0265, ZFP100, KCNK1, IFI35, THY1, FLJ23186, H2BFG, ARSA, KRT15, ICA1, FLNA, BPHL, PCTK1, TUBA2, KRT17, SHANK2, CEACAM1GAK, VARS2, AGTR1, ASB8, MPZL1, RFPL3, DNMI1, SPUF, KIAA0792, NUCKS, C1R, HRASLS3, TM4SF6, SPINT1, XT3, SLC16A5, FLJ21079, MST1, MMP9, DKFZP434B044, NY-REN-24, ALDH1A3, NID2, KIAA0409, ANKRD5, KIAA0513, U2AF1RS2, IGF2R, H2BFL, FUT3, LEC2, LY6E, CSH2, SRCAP, DKFZp434G2311, CHST4, PPP2R1B, PVALB, FLJ12960, ITPR3, PODXL, PARD3, PRSS22, FLJ10697, MGC2376, SLC39A4, MRPS16, QPRT, GFRA1, BRD2, CNGB3, LAK, C5orf8, PPP2R3A, HCGII-7, ANK1, OAZ3, PSMC4, ACATE2, DKFZP434L0117, EDAR, PPIA3, GRB7, MCM3AP, CALB2, APXL, ABI-2, TTR, CSNK1D, DJ1042K10.2, TRIM38, PSCD2, HSPC134, SREBF1, HUS1, PSK, C12orf5, SPOCK, EDG4, FLJ10769, ANKRD3, FLJ21135, PPP2R4, CED-6, GATA6, MGC10963, ZNF14, CPR2, KIAA0857, FLJ21062, KIAA1096, ARF4L, THBS1, RAB31, SS18, NDRG3, TGOIN2, FLJ10665, COL6A3, TAZ, AGRN, PGC, SOX11, MCP, EXTL3, ACRV1, NELL2, MGC4309, LOC114990, KYNU, SNX11, ANGPTL2, CYP2J2, SMURF1, SDCCAG16, BRAF, NFYA, ADD1, LIG3, CAV1, BIRC1, TJP3, STEAP, NDUFA2, MYBPC3, CINP, KIAA1096, ACLY, TUBB, GREB1, MARK3, TEAD4, CGI1, UNG2, SLC30A5, FLJ20920, ACAA1, EIF3S10, SEC5,

10

20

30

40

SLC31A2, MGC10993, VEGF, P4HB, TFP12, DKK1, ARPC1A, CHST1, MAF, FLJ90798, KIAA0682, GRP58, CACNA2D2, MAPKAP1, GPR27, ICAM1, RPL39L, CYP1B1, PIGO, KIF5B, HSD11B2, CLDN3, FLJ20255, SNX16, FKBP10, STK23, DRD2, SPA17, FOLR1, WNT16, KIAA1010, FLJ11467, EFNA4, H3FB, RAB5C, EHD1, SLC7A11, RHOBTB3, COQ7, SLC21A11, FLJ14827, SPRR1A, PVR, MAST205, CFLAR, PAX6, N33, ADAM10, GNA11, ZFP26, GPR48, KRT4, C2, CRIM1, MGC3121, FLJ23471, GGCCX, PPP4C, PAWR, PTHLH, KIAA1219, SRP72, ETVG, ALOX15B, SLC24A3, SLC25A4, RDS, DAXX, ICAM1, LOXL1, GMDS, TRAF4, NTHL1, LISC7, GAS2L1, TRIM10, SIAT4A, FLJ22584, SLI, ITGB5, TFPT, CD8A, DSCR1L1, KIAA0779, GPRC5B, PP591, SEC31B-1, PPFBP2, CYP27B1, DOC-1R, COP9, KIAA1193, MST1R, HBS1L, RARG-1, FZD7, KIAA0626, SMT3H1, RALGDS, SOX13, FLJ22612, NFE2L1, CST7, KCNJ5, PALMD, KIAA0644, MRPL9, ERCC1, MSTP9, PTPN3, SUPV3L1, GAL3ST-4, SUHW1, PRSS16, C6orf9, PTPRT, CGI-112, TBX3, ARD1, KDELR3, CGA, TSPY, SPAG1, CRELD1, FLJ20967, RNASE1, LRP3, LARP, SOX11, TULIP1, RORC, HARC, RPL5, FLJ13544, MAP3K12, KIAA1096, PLA2G10, RAB2, FLJ12681, FLJ23469, PP1057, MAPT, TMEM4, PSME3, FLJ21963, SGCB, GLI3, PRRG2, MYL9, GFR, HOMER-3, PDGFRA, DPP4, D15Wsu75e, KPNA1, SGCD, RABGGTB, MMP24, FGL2, ATF6, STX10, ARHGEF12, UPK1B, EGFR, MCAM, CYP3A43, FCGR3A, FLJ10534, FLJ12571, FLJ20422, CD80, KIAA1023, C21orf18, H4FH, TEL2, MSCP, PEX10, B4GALT2, ADAMTS5, CSGlcA-T, TNFAIP6, PRKCDP, TRIP11, PTN, FGD1, NPEPPS, CAPN1, H2BFH, LOC51337, FLJ21736, VAV3, FLJ11198, KIAA0923, NONO, ALDOB, AQP6, FLJ20315, PHLDA1, VDR, KIR3DL7, YBX2, DUSP3, MGC11271, CHST6, MGC4171, PL6, SH3BGR, SPPL2B, BPHA2, CRYAB, MST1, RGS16, CLPTM1, MD-2, KIAA0152, PACE4, DKFZp564K142, RALGPS1A, DKFZp564A022, RTN1, LAMB3, PLD1, SERPINB5, ENSA, DKFZp586N0721, PLAA, FKBP14, LRIG1, RARA, BN51T, PTHR2, PPP1R3C, HSPC002, CNTNAP2, HNF4A, CH3L2, TGF2, CGI-58, PPFA1, KIAA0440, PLAUR, SNTB2, ID1, ALOX5, IGF1, OPCML, TAGLN2, UBXD2, M11S1, REPS2, BCHE, SRD5A1, TED, EIF5, KIAA0595, BAIAP1, KIAA1718, TRA@, STS, C11orf17, ASNA1, MAOA, PTGER3, NPY1R, SMARCA4, PGM3, PCTK1, MATN2, FLJ23393, MGC2821, MGC2376, FZD2, SLC7A6, PPAP2C, PHKA1, GOLGA1, WARS, GADD45G, LIV-1, NEK1, C22orf3, VAMP4, C18B11, MGP, KIAA0040, IGLJ3, FLJ21125, BTD, G3BP, CLEC1, NUP98, MLN, NRXN3, FBXL7, DLG1, PLA2G5, CYP26A1, OR52A1, DSC3, PPAP2A, C20orf121, UBE2H, EEF1A2, ATP10A, TFEB, GABRG, GFPT2, WIG1, FBLN1, PTPRF, MEPE, RAMP3, COL13A1, SLC6A8, PPP1R10, COL18A1, GAC1, EPHX1, C11orf9, OSF-2, ETS1, INSIG1, FLJ10111, CEACAM7, DCX, C14orf58, MIRO-2, SRPX, EPHA1, CRK, CPE, TIMM17A, LCN7, CENTG2, FLJ10534, C6orf18, FLJ12671, VEGF, SPANXA1, MECP2, EPHB3, TSTA3, ILVBL, F7, BAZ1B, MGEA5, E4F1, PPP1R13B, PZP, KIAA0913, CSRP2, DKFZp564K2062, CA2, SLC7A8, BNC, ADAMTS1, PIAS1, MGC11061, FER1L4, FKSG28, ZAP128, FLJ21610, ATRN, NEU1, H2AFA, IL10RA, BNIP3, NRP1, WISP3, C8orf4, TGFA, FLJ11526, MRPL2, HP, DHPS, SLC7A8, GPX5, PLXN3, CDC34, POLR3K, FLJ11506, KIAA0980, PDCD8, EVI5, CST3, KIAA0752, C1orf16, CYP4F3, ROR1, MAP3K9, HSPC121CDKN2A, CAPN9, DUSP8, APOD, CCRK, DDX26, USP21, PP35, ABCA1, IGHG3, IL1RL1, ELOVL1, HPIP, FLJ12650, KIAA1078, IL17R, H2AFN, FLJ13352, ELK1, TPM1, TLN2, PPIC, SLC16A3, FZD3, CAR3, TNFSF8, zizimin1, GALGT, DSCR6, TP53TG1, SPTAN1, FBXL2, H2AFX, HMGE, TCEB3, PLN, FLJ10847, SNAI2, STC2, MACF1, ARF1, UGT1A9, PCDH7, MAN1C1, NESG1, EVIN1, FKBP1, KIAA0417, VDR, SPUF, SCGN, IGSF4, ARK5, F5, LIMK2, POP3, RGS5, LOX, ADORA2A, PEX14, VAX2, RANGAP1, MSF, TNFAIP1, C6.1A, ARHGEF7, LPIN1, KIAA0876, ZFX, FLJ22635, PLIN, TRIM2, EDG2, POF1B, IF2, PPP1R9A, ANG, STC1, DNAJB2, ODAG, KIAA0763, FLJ11274, FLJ20151, MARCKS, ECGP, MFNG, COG7, KIAA0429, NEDD4L, ATP6IP2, DONSON, MUC6, PTGES, SOAT1, MAN1B1, TNFRSF9, SEC61A2, KIAA0500, AP3S2, KIAA1089, B4GALT4, PTGER3, TLR2, FCGBP, ZDHHC3, KIAA0716, MMP12, CYP2A6, GRAF, LOC54499, NNMT, COL8A2, OXTR, NOL3, ZNF79, HRASLS, HAMP, AIF1, CGI-38, SPUF, BAZ2A, FLRT3, PDEF, PDK3, SLC4A7, HMOX1, IFNA21, HKE4, CA5B, KLK8, PLUNC, NCBP2, KIAA0703, T1A-2, MSX2, FLJ20374, ANXA2P3, DLG3, PON2, IL17BR, AGRN, PRDM11, TNFRSF6B, STXBP2, PTGDS, MARCO, UBE2G2, EPB41L1, PDGFA, IL13RA2, CXCL6, CGI-96, APOA1, MRF-1, NPAS2, MRPL41, LENG4, FGF1, TRAM, AMBP, GPLD1, CHI3L1, AQP1, SSB1, KIAA1608, MEIS3, FLJ13385, IL1RAPL2, NQO1, MINK, KIAA0843, DKFZp564A176, MOP3, BGN, BIG1, FLJ13110, dJ22E13.1, SWAP70, DKFZp586L151, TBC1D2, MAGEA3, ARF3, CSNK1A1, KRTHA6, FLJ21034, GPR58, KIAA1735, MGAT4A, GNA11, SLC4A2, H41, HAP1, CYBB, MARK1, GRIT, ETFDH, FUS1, PTN, FUT2, CDSN, MAP3K6, CHST8, BENE, ATF5, ENPP2, PEX13, PAK4, CUBN, SLC39A2, MYO6, DRIL1, SELT, SLC25A22, HFE, KIAA0237, PKD1, NPAS2, ZNF3, FLJ23516, SIX2, LIMR, STAM2, NEIL1, VIL2, MATN3, FLJ23537, AADAC, MCAM, GPR65, TP53TG1, CAP350, CYP17, EMS1, DKFZp5470146, TNS, MGC13523, ASTN2, TRA1, NPY, CEBPD, PNLIPRP1, PNMT, TM7SF2, NCF2, AP4M1, ITGB4, SLC11A1, LIM, CBFA2T1, FLJ20184, RAI14, WBSCR20B, BAIAP2, COP57A, PNMA2, KIAA0923, PACE4, FLJ10261, KIAA1395, EDN1, ADAMDEC1, LTBR, KIAA0509, RIL, LPPCALD1, MCRS1, HML2, FLJ22965, FLJ21870, ME1, FLJ22405, RIT1, FLJ11565, KIAA0481, FLJ20627, XLKDI1, RAB5C, AMPD1, PDCD4, BMP1A, SLC26A6, KIAA0939, FLJ10874, KCNK14, ARHGEF9, HDLBP, MCF2L, AQP1, FLJ13055, PVRL3, RNPEPL1, GPC4, ADCY9, PTPN13, MGC2656, TSNAIXIP1, ACO2, IRX5, IF2, CIC, KIAA0976, BDH, ZFPM2, PSEN2, C20orf46, NDUF8, GGA2, FLJ10490, TPD52L1, HLALS, ALFY, FLJ20699, UEV3, AES, DKFZp761K1423, JAG2FLJ13195, DDX8, G0S2, ITPK1, SEMA6B, SLC16A3, CCL18, HUMPPA, EIF4G1, HRH1, GSA7, FASTK, HBP17, FLJ14117, LOC146542, APPBP2, TNRC15, CLDN11, SCARA3, H2BFJ, APEG1, PPP5C, TDRD1, IRS3L, IGF1, PDGFRL, MUC13, DUSP10, KPNA6, FLJ22795, OASL, HRMT1L3, MOS, SCGB1A1, PEX11A, ARHD, KIAA0977, MMP24, FCN1, ACP1, LAMP3, AKAP6, ALDH3B1, TNXB, NF1, APOA1, RBP4, CLTB, GP2, FBXO2, DRG2, DLG3, PCDH3, FOLR2, NCBP1, SOX13, HOXD4, FGR, EFEMP2, KIAA0625, TULP2, GPRK5, EVIN1, CHODL, CDH8, FLJ22173, OR10J1, IFNGR1, PRO1787, ACADSB, LAMP1, HSPB7, PCSK2, KRT6A, CSRI1, DUSP5, MGC1136, TPSD1, HMGS2, BCAR3, MOCS2, KIAA1233, VSNL1, UBD, ANGPTL2, GENX-3414, FLJ12547, HMGCS1, KDELR1, CPT1A, VAMP2, GSTZ1, GJB3, MRPS12, PCBD, FLJ23322, PASK, ARGBP2, SEL1L, FST, FARP2, HSF2BP, CGI-96, MGC2601, PBX2, FZD1, ABAT, TSHB, KIAA0874, RHEB2, FMO1, NCDN, CSPG2, KIAA0844, FLJ22531, COL4A3BP, ACE2, NAV3, SULT2B1, TETRAN, RODH-4, MADHIP, HT009, ACR, CLECSF12, SULT1B1, ELMO3, NICE-1, HSA243396, NDRG2, GSTT1, BLAME, TAPBP-R, SERPINA1, CNM4, TCF3, SSX5, MPDU1, CHP, FLJ11183, NOL6, FLJ23129, FLJ11196, DKFZp761I2123, KNSL3, DTNA, BDKRB1, CSNK2A1, ID4, OCLN, CLCN2, SLIT3, MAPK7, EZF-2, GYG2, K6HF, ALS2CR3, TMEM2, NPAS2, HOXB9, MAN1B1, APOBEC2, HFSE-1, DNAJC7, POU5F1, PSMB1, PAFAH2, FLJ13852, CCK, PITX1, NTE, ABL2, CLN8, KIAA0819, GALNT10, FLJ13841, NEFL, ARHGAP12, APOC2, PTPRO, HSPA6, NMB, OR2F1, MPP2, HPGD, CALB1, ADRBK2, AMBP, PPP1R1A, CCR7, C20orf28, TRA@, EFNA3, CX3CL1, F25965, CD2BP2, CDC42EP1, OLFM1, C20orf31, SNAPC3, MIRO-2, CALB1, PIK4CB, FOXA2, C11ORF4, RRAS, HUNK, TGFB2, RBMS2, MASP1, ATP6V1C1, NMU, PCDHGA1, SLC29A2, PPIE, GGA2, FLJ20535, POU5F1, MGC5509, CITED1, ATP6V0E, LIPE, ACTN1, SLC26A10, SLC21A9, WNT4, RBMS2, MRPS15, P8, KIAA1609, FBXL11, TGM2, CHRNA1, TSSC4, SBB131, KIAA0356, OLFM1, SEMACAP3, CD6, ITGA2, GTF2H1, FAIM2, FLJ21313, STAT5B, TBX2, GABRD, AVIL, MGC2615FJX1, FLJ14675, IL1RL2, AK3, ZNFN143, SSPN, RELN, SIGLEC7, COL5A2, HLA-DOB, SLC12A3, HFE, PLINP-1, Apg4B, MGC39851, HIPK2, TGFB2, PSK-1, ABCA12, MMP15, PKP3, HERC3, RECQL4, DKFZp434C0923, UNC84A, FTS, AZGP1, FASTK, ARFGEF2, DSCAM, MED8, SPP2, P2RY6, RPIP8, DHPS, ST14, SAMHD1, MGC32043, SPARCL1, FLJ22160, GHR, YAP1, MTMR3, SLC20A2, PART1, PTPN14, BAIAP3, EPBB9, ED1, TPM4, TEK, PRO1942, H2BFE, LEPR, NAPG, MGC29761, SLC34A2, ZNF358, GRB14, CMKLR1, KIR-023GB, MET, PBX1, CYP2D6, SLC7A8, IL13RA1, ARNT2, GTF2H4, CD86, BM88, CEACAM1, BIRC1, CAMTA1, PDZK1, MOCS1, GLYAT, ChGn, RQCD1, CRA, BAIAP2, PTX3, CYR61, VAMP4, HSPA4, HUG1, GBL, EPS8R3, PTPRU, DLGAP1, GEMIN7, MADH6, PTPRG, NFX1, KIAA1028, RNASE6, AD037, PI15, SNAI1, LOC157542, ACTG2, SLC35A3, SIRT3, NPR2,

10

20

30

40

NPC1L1, HCK, DDR2, SLC5A2, OASIS, FLJ21511, LRP2, RGS10, ALDH8A1, COL4A3, GS3955, CLECSF6, UP, MKL1, MADH6, PRDM5, WNT1, SPAG4, SORBS1, ASPH, PLK, IGSF1, ARHF, CAPN2, LIG3, SULF1, CCKBR, TEAD4, C8A, MGC10771, FCGR2A, SEC14L1, KLK11, SPIN2, C8orf17, THBD, FKSG28, NEURL, FLJ10647, LTB4R, CHRM4, C3orf4, ALLC, SLC3A1, SLC1A1, MS4A4A, EDNR, ILT11, IGHMBP2, MGC4276, IGF2R, FLJ20421, PBX2, 37872.00, FLJ23604, FOXI1, LUC7L, CD86, PVR, SCD, GPR37, UNC119, NXPH4, FCGR2B, S100A2, MORF, BMPR2, AKT1, FLJ11715, IL13, TADA3L, NFATC4, PPP3CC, CARM1, PTGIS, PLOD, CD36, BBOX1, VNN3, AKR1B10, SEMA6A, E2IG4, HOXC13, RNASE4, DKFZp434H2215, EKII, MGC5356, KIAA0752, RUNX2, ACCN2, GALNS, CABYR, PCDHA3, SSX2, GOTINPAT, CORO2A, DGCR13, CAPN5, GPM6A, GLRB, NPEPPS, RIPK1, CYP-M, GLRA3, BIGM103, UTX, NY-REN-45, ATP1A3, ANXA2P1, IL1RAP, PRO1600, WNT2, HYAL1, SH2D1A, TREM2, TUB, KIAA1036, KCNB1, CNN1, BLAME, PITX1, DXS542, ADORA1, TNXB, GABRE, FAPB3, PGRMC1, FLJ20513, SCIN, FLJ13052, CP, LIMK1, MSF, EDN2, FLJ20623, ESRRG, KIAA1237, INADL, KIAA0889, HS3ST3A1, FLJ22593, ASIC4, FLJ21144, FLJ11827, TAT, FLJ20584, SMA5, NCOA3, GLP1R, PRODH, FAPB3, FDXR, DEFA4, SORBS1, MRPS12, HSF1, EEF1E1, CTLLA4, WDR4, ASB7, ABCA8, CLPS, PSMA7, ARHN, PEG10, AKAP12, MGC12904, FLJ10312, FLJ11539, RAD1, SERPINF1, MGAM, PVT1, PTHLH, STS, PRG4, SYNCOILIN, CASP2, FLJ12168, MARCKS, HTR3B, RECQL, COL4A2, CD97, TRIM36, MGAT3, GRIN1, SOX4, KIAA0475, DKFZP586M1120, SLC2A4RG, CTSZ, SQV7L, PLD3, OR7E24P, CDK5, GRIA2, PRLR, MHC2TA, CST6, LOC56920, NUP214, BET1L, FIGF, THBS4, HLA-DRB4, CAPN6, TLR7, MBTPS1, KIAA0992, BG1, FLJ12681, MAK, APOH, TNFAIP6, CRYAA, PKD2, IGFBP2, TSPAN-3, ATP6V0E, KIAA1579, MGC20727, KIAA1093, LOC55565, HS322B1A, LOC51285, STC1, KIAA0992, CGI-01, TRGC2, EPHB4, DES, CNOT4, MAP4, CDC42EP2, HSD3B1, RDH5, XYLT2, CHRD, SPBPBP, PDP, MSRI1, HPN, GOLGA2, LOC63929, EXO70, PCDHB11, KIAA1036, ANGPTL4, TNFRSF10C, EVPL, TEAD1, SIAH2, PMM1, DPYSL3, FLJ14297, TACSTD2, BSN, FAP, SEMA3A, RER1, AXL, PROL4, CASKIN2, RENT1, CLDN3, DRAP1, ADAMTS7, TCEB2, EPB41L1, GUCA1A, FLJ22659, PAPP, CBLN1, FRCP1, IL1F9, ITC, MMP26, STRN3, CEBPD, COL21A1, BTD, KIAA1034, MIG2, FLJ20591, FGG, ASCL1, CXCL14, PDE1A, OR7C1, HLCS, PTPN21, HUMMLC2B, SECP43, BCAT1, DRD2, TAT, MSRI1, OMD, IGFBP4, C13orf1, FLJ21919, FLJ11807, AMELX, KIAA0346, FLJ21916, OLIG2, L1CAM, TAPBP-R, Cab45, NR1H2, TCP10, KRTHB5, PCDHA9, TNC, DKFZp434L0850, FLJ11011, SKD3, SPINK4, DZIP1, FLJ23548, FLJ23420, TFEB, PCDHA6, LOC160313, FLJ10496, R29124_1, THPO, AQP6, KIR3DL2, MGC10848, C21orf18, ACCN2, TBL1X, RAB6B, BHMT2, APOB, IGSF4, PAPSS2, RBP1, TCF2, R30953_1, CD3G, ZXDA, TNFRSF10C, FLJ21665, CYSLTR2, IL6ST, ZNF214, AICDA, PTAFF, FLJ12806, BA526D8.4, CYP2C9, TWIST, PPP2R5C, MASP2, DUSP9, CGEF2, GABRB1, CDC42BPB, TNFRSF5, CCR4, PYY, PILR(Alpha), BIRC7, LANGERIN, H2AFI, PLCE1, OGG1, TAZ, PDCD5, SE57-1, FKBP2, FBLN2, RBM9, 384D8-2, WNT2B, NRBP, CDH6, G6PD, C1orf22, LSM4, STX6, ZIC4, FPR1, CALCB, AGPAT3, SHB, TOM1, AGA, ZIC1, SIAT9, PTPRZ1, MSC, DKFZP566F0546, FLJ32069, CD28, PPP2R3A, ASTN2, ARHGEF11, JPH3, FLJ21477, GH1, HOXD3, MS4A2, SVIL, DPYS, F2RL1, ECGF1, PRCC, POLD4, OAZIN, CHRNA3, KIAA1000, DKFZP586D2223, DAZ4, WNT7B, MUC4, GCNT3, OR1E1, CLSP, CD1D, CCR1, ORCTL3, EEA1, SIX3, FLJ10140, FLJ10884, HNRNP-THSD3B2, SERPINE1, RHO, MUC4, PTN, DNCL2, TNFRSF10B, LOC90326, NR6A1, NCYM, SCGB1D1, EPHB1, NOX4, DJ12208.2, PLAUR, PDE4C, PIP5K1A, MGC14799, IGFBP1, IDUA, IGHM, NAPA, PARD3, LIM2, ADD2, HSF4, CABP5, TF, TNXB, NET-5, ITGA3, IGFBP3, GDF10, PRB4, KCNF1, ATP11A, KIR2DL2, SMARCB1, MBP, IGL@, NFATC1, CDH16, RHO6, CCL20, FLJ20605, ASIP, LDB2, HCRTR2, HOXD3, GPR87, VCX-8rLOC116150, TPM3, FLR1P, MAGEA6, FLJ20701, PAX3, IGSF6, TOMM22, GALNT3, CHML, COL6A1, FAAH, B7, RANBP1, KIAA0876, CYP2A13, CD5L, C21orf2, RYBP, GJA10, COL15A1, TEX13A, SCNN1B, TRD@, RIL, ITGB8, PLEKHA1, GRIN2A, FSHB, PDK2, SAST, PRPF18, FLJ13479, GRP, SLC4A8, SMURF1, GK2, INSL4, FLJ20311, GLRA3, KIAA0828, DLX2, EPOR, RRBP1, SDC2, zizimin1, CCND1, P2RY2, CD28, B4GALT4, ARHGDIG, TBL3, IL17, FLJ20519, FAT2, UPK1A, SERPINA2, CD209L, NRPI, ACINUS, RREB1, TNFRSF4, PRO2214, DKFZP761O013MAP3K7, SPRR2B, DNAIL, NOVA1, DEPP, LOC51725, SCAMP-4, TLR4, MAX, PRDM16, KRTHA5, PCDHB1, GNAL, P37NB, ISL1, SH2D3A, TFPI2, CREBBP, ACTA1, ALP, OR1A2, CGI-58, SH3BP2, APAF1, CD209, DKK4, IL18RAP, ESM1, PAX2, EVI5, MFNG, ATF5, CUGBP1, FLJ10376, CMKLR1, SLC23A1, MGC34772, FLJ23033, IGLJ3, AMACR, SIN3B, CCL18, CSPG4, FLJ20241, DNM1, FHR-4, GNS, GDF11, PAL, PPPIA2, CASP10, ORM2, SPTAN1, SPUF, CALCR1, USH1C, ALK, FLJ11850, FOXD1, SH3BGR13, MND4, EPB41L4A, MMP16, ANK1, WISP2, GSTA1, FER1L3, MGC33190, DAZ2, CHST3, DRF1, TM4SF9, CDC25C, ACVR1B, LU, SGCE, POP2, PCLO, COL18A1, TSHR, Eu-HMTase1, MSRI, GPD2, CLDN17, KIAA1069, CYLC1, ABCB11, MIG2, LY6H, ARFRP1, BMP2, ACOX1, FZR1, CAMK2B, HUMCYT2A, LILRB5, ENPP3, IL4, SCN11A, CALU, IGKC, THEA, OPRL1, KIAA1053, SIX1CABIN1, SCNTA, THOP1, NR2C2, FLJ23462TRPM1, RAB3D, CREBL1, ABCD2, VDU1, GAL, CPN2, FLJ10408, PHLDA1, RAB1A, HAND1, MGC5347, BAI2, EDG8, GPR30, PCDHB8, TYRO3, PRO618, PRKCI, UCP3, GSG1, PRO1048, HRH3, SARDH, FLJ10803, WISP1, PRLR, RFX, NNAT, SFN, APBB2, TLL1, PCNX, KYNU, MKRN3, HGC6.1.1, PLN, RFX, CDC2L5, ATP11A, SPI1, RIGPDK3, AFAP, KIAA0427, CYP4F12, EFNA5, FLJ11125, DUOX1, FLJ21240, DNAJC9, RQCD1, DLG5, PIGO, ABCB8KCNAS, KIAA0409, FLJ12891, SHMT1, DNALI1, POLYDOM, PKFEB4, SHOX2, DGKE, ELF2, MUC5B, WHN, SCAND2, LOC160313, FLJ23510, AK5, FLJ11871, ITGB5, CPS1, DBT, CDH17, FCGR2B, PCK1, PLXNA2, ACE2, CD7, FLJ11619, ZDHHC11, FLJ21562, FLJ20211, MGC2821, FLJ20624, ICK, PARK2, PNAS-4, CLECSF6, PCDH11XGFR3, PTGER3, PROX1, HRC, EPB41L2, KIAA1117, ATSV, LAMC2, ITGB1, TRA@, PAK2, DKFZp762C186, OCM, HNF4A, AVPR2, FTCD, TNNI3, HR, SLC35A2, PP1665, GA, RGS5, OPLAH, GDF1, OR3A2, FOXO3A, TNRC21ABO, ITS1, PVR, CNGA1, UPK3B, PCDHB12, ALCAM, HFE, KCNJ15, KIAA0997, RGS11, NDUFB7, ADAM28, FLJ13055, PRO2176, CACNB4, RIN3, SLC5A7, FOXH1, PKDREJ, FLJ10232, DGKA, retSDR4, EDG2, SEMA3E, SARCOSIN, THPO, PTPN21, POU2F3, MAP1A, ZFP37, SUPT6H, ADAMTS6, ASMT, DKFZp434C0328, ROR1, FLJ22800, VAMP1, KIAA1654, RBM8A, EPAG, TNIP3, INSM1, XRCC4, IL6ST, UNC84A, UBE4B, CAPN11, NPEPL1, TAS2R10, FLJ23093, NPCC, PTPN21, SLC22A8GAD2, LOC51063, OGN, MAGEA8, GUCY2C, NT5E, SGCG, C8orf1, LGALS2, PRKAR1B, DEDD, PFARG, PDGFB, PRO0461, ALFY, TNFRSF11A, DNAJC9, CCND2, PEG10, SPINK1, GCM1, VHL, CLDN1, PRSS7, H4F2, D21S2056E, CXCR6, LIFR, KIAA0599, TNXB, EHD1, ARNTL2, CGR11, SOCS1, PKLR, ZFP318, ZF, CHRNA1, DKFZp434M0331, DES, TMOD3, SPI40, KSR, BS69, IREB2, PAWR, CACNA2D1, C21orf62, Gene Symbol, OAZ1, CFL1, RPL28, JAM1, CGI-119, NICE-3, RNP24, JTBFLJ12806, ARHA, FLJ13352, SYNE-1, TRPS1CGI-119, NDUFB9C20orf114, JAM1, RALA, FLJ30532, PIGR, MRPS24, MYO5B, LOC155465, STUB1, MGC14353, ARF1, C20orf24, EGR1, ANAPC11, MRPS15, MIR, PIGPC1, MRPS21, CL25084, H41LOC124220, RAB10, B4GALT1, PPP1CB, MGST1, TCEB2, MGC19825, HSPC163BACE2, BRI3BP, FLJ14511, MRPL47, NMES1, FLJ14735, DAD1, KIAA1324, ENAH, PSMB2, RHPN2, HTPAP, DKFZp761P0423, C20orf108, MGC45416, TMEM9, UBQLN1STK35, APOA1BP, GRLF1, SPECIINSR, LOC150678, SMP1, FLJ32115STUB1, HLA-C, ORF1-FL49, TAF10, RAB40C, DPP3, AIBZIP, LOC55971, SSR3, ATP6V0E, SNX6, SNAPAP, ALS2CR9, KPNB2, EPC1, NTN4, C20orf52, H2AFJ, UGCG, IMAGE3451454, EEF2K, MRPL14, E2IG5, MRPL36, GPCR1, E2IG5, MGC14151, RASD1, CGI-141, AGR2, KIAA1437, HSPC210, BTBD6, H2AFJ, MGC14151, FLJ20048PSMB4, MGST1, FLJ31364, EGLN1, MRPL53, LOC88745, IRX3NFKBIEUNC5H2, TAF13, RDH-E2, MGC12966, DKFZp434G171, GUK1, FLJ20671, FLJ20623, CAPNS1, PFN1, KIAA1671, FGG, H19, C20orf149, CAPZA1, RAB18, FLJ23153, CGI-19ABCF1, TCEA3, NDUFB10, NDUFB10, RNF7MAL2, NUCKS, RPL23A, LOC51290, TMEMPA1, APH2, FLJ13593ATP6V0B, ALFY, SLC17A5, ENPP5, C20orf24, AKIP, DIS155E, FLJ20171, MGC39329, MRPL41, NDUFB3, KIAA1096, LRG, BPNT1, LOC51255, CISHPGK1, PLEKHA1, HSPCA, COPZ1, DKFZp434L1435, TMEMPA1, BRI3, AKIP, KIAA1191, LOC92840, CLDN12, FLJ14525, C20orf149, CDC42, TMPPSS3, LOC199692, FLJ22174, LOC113246PKIB, RAP2B, HIBADH,

10

20

30

40

LOC57038, FLJ14117, EDG3, MBC3205MGC2550, RCP, NUDT5, LOC51260, SIPL, KIAA1223, HINT2, HN1, ERdj5, PHP14, MRPS36MRPL32, C6orf49, CAPN13, MIR, RNF19, ATP11A, LOC51128, FLVCR, ADCY4, KIF5B, ARV1, RAB5EP, PX19, RREB1, MIR16, LOC51248SMAP-5, SYTL2, FLJ11320, MSTP028, OCLN, MGC14833, SMBPRDH13, MGC40107, KIAA1165, SPPL2A, Cab45, MGC20781, LOC51241, MGC11266, DKFZP566J2046, FLJ14624, CKLFSF6, LOC147184, DKFZP566F084, FLJ20203, FLJ10856, MGC11034IMUP, CAMK2D, MK-STYX, RAB3D, C20orf142, DNAJB11, MGC23908, FLJ10074SURF4MGC11102HSCARG, MGC14327, HYPK, HSPC121, TOB1SRA1, MGC14832, JAM1, MGC27385, PX19, FNTB, MIR, LOC56932, POSH, MPP5, MRPL52, MIG-6, LTB4DH, ZAK, FLJ22649, SCGB3A1, MGC33974, FLJ21016MGAT4B, KIAA1404RBMS1, DKFZp761H0421, ARHU, FLJ12697, CGI-149, SPUVE, TNF2, RPL17, LOC54516, WTAP, MAGI-3SAMHD1, FLJ11011, FLJ10052FLJ23751UCK1, LOC170394, TP53NP1, HOXD8, XPR1, MGC10540, SORBS1, BCCIPFLRT3, FLJ22558, FLJ11200, SAMHD1, PI3R, FAM3B, CYP4X1, NFIA, KIAA1715, FLJ20160, CTHRC1, DKFZp547A023HSPC121, LOC84661, LOC113386SH120, GNPNTA1, FLJ32499, UBXD1, LOC90120, HBLD1, MGC13186, SPEC1, MYBBP1A, MGC4248, DKFZP434H1735, LOC127018, FLJ37318, FLJ20421, PTGFRN, p25, PIGM, MGC43399, ERdj5, SYT13, IHPK2TH1L, FLJ20727, POLE4ASH1, KIAA1130, LOC55829, MGC10084, ZPR9, KIAA1458, CNN3, WASLFLJ20097, SURF4, HSPC163YAP1, H4FH, MGC40214KIAA1200, C20orf139, PKIB, CGI-36, CLMN, SET7, SEC10L1, MGC22825, FLJ10525, LOC113386SELENBP1, SLMAP, VPS29, KIAA1972, MTCH2, NPD007, OLD35DNCL1MGC14839, SH120 UBPH, APOA1BPLANPL, UBQLN1, FLJ11101, C8orf13, DKFZp434A2417, C14orf31, C14orf100, MMP24, CRIM1, FLJ23393, MGC45714, INADL, SEI1, OPN3, CGI-97, MGC21874, C14orf47, KIF3B, FLJ11046, C(27)-3BETA-HSD, RAB18, IR1899308, MGC17299KIAA1223, KIAA1322, RAB2FLJ32205, DKFZp434K114, EHF, ShrmL, KIAA1434, KIF1B, BRO1L, MGC15397, BAT5, C20orf45, FLJ31235, LOXL4, FLJ20707, Cab45RNF7, MGC2803, FLJ36445, CLDN1, DKFZp761N0624FLJ20308, MGC33338, MYO5BRBM8A, MGC10765, C14orf9, FLJ32642, ATP1B1, MGC4309, KIAA1272, LOC154467KIAA1483, UBE2H, EHD4, UBE2J2, FLJ20085, DKFZp762H185, MGC20486, MGC26847, MGC15854, LOC115265, NEK6, SPRR2AMGC13045, MGC4604, LOC51256, ANKRD9FLJ31208TRIM47, AP1G1DNAJC1DKFZP434I116, LNX, SDCBP2MacGAP, FLJ14957, C20orf110, SURF4, RAB5EPC12orf4, GL004, DC-TM4F2, SAT, DKFZP434A0225, GK003, dJ55C23.6, JUB, LOC89894, LOC115294, C20orf129, PCDHA10, HSPC242RAB18, COX15, MGC11115, MRPL27, MGC15397, FLJ11752, LOC116238, C9orf25, LOC51760, MGC45408TBX3, HSZFP36, TRIM8MGC22793, BAL, FLJ25157, C20orf155, RPL35A, ZNF265ILF2, MGC23166, FBXO6, KIAA1870, DKFZp761D0614, ZNF398, ALS2CR9, MGC26818, EMS1, FLJ90119, GALNT4, LOC54516, BRI3, HSCARG, PPP1R1B, GPR54, FLJ14299, PPP2R2A, MGC5391, SDCCAG28, PHP14, TGFB3, MGC1842, MLLT4, DFFA, SELM, MAPKAP1, MGC10974, AD-003, FLJ10902, MEF-2, MURR1, MGC2541, GSR, MGC19825, MAFB, LOC139231, FLJ23091TEM8, RERGKIAA1553, CFL2, CEBPG, KIAA1554, SEMA4BPDCD4, PNAS-131, MGC31963, HT002, HRD1, MESDC2, PRO2605, PTGFRN, KIAA1244, MGC10999, MGC10715, CGI-85, KIAA0779, NUCKS, FLJ13881, FLJ27829, HR, KIAA1538, KIAA1255, STUB1, KIAA1841, CALM2, RIG-I, HOXB8N4WBP5, HTPAP, CXCL16NAC1, TRABID, LOC135154, TRIM56, MK-STYX, Eu-HMTase1FLJ30794, DIRC2PTPN23, GBP2, TRIM11, KIAA1976, MRPS26, TMEM9, FLJ23420, MGC14817, MK-STYX, IDS, EPI64, KIAA1724, MGC2477, FAD104MGC32065, MRAS, DKFZP761L0424MGC4840, FLJ20739, GFRA1, FLJ23867, MGC40555, FLJ14251, FLJ38628, MGC2941, MGC22805, NOL6, MESDC1, FLJ22865, FLJ25357, DLG5 ARHGEF5, HYPK, DHRSX, PCDHB2, FLJ90165, C17orf26PVR12, DKFZP564D166, NOR1, GLIS2, SPPL3, TTC8, FLJ14502CED-6, MGC14141, MLZE, LOC57168, KIAA1337, KIAA0217, CRB3, KIAA1350, PPM1AFLJ20273CCL28, PDP, MGC14859, GJB2, GPR, ECGF1LOC92399, HOXB9, LOC90522, KIAA1951, MANBAL, MGC11386, RPK1, NLNHCC8LOC115548NUP88, TMEM8, CHDH, FLJ20507FGFR1FLJ30803, KIAA1280, FLJ13089, LOC120224, ZNF75A, DNAJC5, SDOS, MRPS15, MGC2628, FLJ11236, TRIM39, NESHBPFLJ10839SULF2., FLJ10210, METL, FLJ12707, HUMAGCGB, FLJ13195, FLJ21016, BOK, FBXO25, OSBPL5, DKFZP434N1511, KIAA1813, VANGL2, LOC124446, HDCMA18P, C20orf7, MGC1314, MS4A6AANLN, MGC40499, KIAA1337, FLJ10116, NOTCH2, RRP40, PFKFB4FLJ14681, KIAA1026, C1orf6, MGC5384, LOC85865, PHAX, MGC11134, FEM1A, LACTB, TIM50L, ARNT, MS4A6A, PPIL1, C20orf3, MRPS15PGGT1B, CXADR, LBP-32, FLJ22004, FLJ32069, UACA, MGC2747, FLJ13187C1orf28, CBX6, C1orf13, NY-BR-1, FLJ20748, KIAA1821, FLJ31751, LSR68, TRAD, USP28, FLJ10702, GBA2, B7-H3, DKFZp547D065, TH1L, TSGA2, RORC, ETL1, FLJ30634, MGC10702, TEX27MGC33602, MGC2555, LOC55893, LOC128439, EDIL3, KIAA0146, RFXANK, HS6ST1, NEK6, FLJ20186, MGC15416HSPC159, SCAMP2, LOC133619, NGEF, C14orf58LOC91012, MGC12972, MGC11034, CYT19KIAA0819, LOC55893PHCA, KCNK6, CRPT, CDW92MGC3195, GTARPAPOLG, MGC24180, KIAA1126MTA3, MGC24103, moblak, MS4A6A, DAG1, KIAA1394, MGC13114, KIAA1337, FLJ40021, DPP9, KIAA0789ZNF144, TMPIT, MGC13114SYAP1, FBXO32, BOCCD44, LSM10, KIAA1673, CTL2C21orf63MGC2560, ZFP385, TM4SF9, DNAH5, PGGT1B, DKFZp586M1819, ID4, CLIC6, C20orf64, YAP1, FLJ21615, GRP58, LOC149267, C20orf7FLJ37933, FLJ90586, FLJ22626, LOC51242, MGC4604, SDCCAG28, KIAA1321, TEAD2, RPS3A, LOC90701, FLJ32915, FLJ31434, PUNC, TRPS1, MGC45441, LIN7B, DKFZP434H0820FLJ32468, DNALI1, COX4I2, HOXC9, FLJ20337CLMN, BCAA, OPN4, DGAT2, PRDM6, DKFZp761J1523, KIAA1244, ICMT, FGF11, C21orf97, C20orf169, VPS18, SIRT2, MGC15677, MGC4604FHOD2, DKFZp547M072, CGI-125, KLN, MAP1LC3AFLJ31842, PGLYRP, FLJ32069, DKFZp547A023, MGC39325, RRP40, KIAA1880, LOC116254LOC51061SYTL2, KIAA0076, KIAA1580, GPT2MGC4840KIAA1345FLJ12577, Tenr, CCT5, FANCF, USP21, KIAA1273, DKFZP434F091, MGC13007MGC16131, SEC5FLJ22215, FBXO22, MGC16491, MGC16028, MGC2601MGC15906, C20orf45C17orf28, IL17BR, STK11P, SEC61A1, STAU2, FAPP2, FLJ25429, CAC-1, ROCK1, MS4A7, DKFZp434D0215, FLJ20442, HFELOC148523, LOC90353, HIPK2, ERBB2IP, CDKN2B, CGI-09, DPP7, DUSP16, CGN, CLONE24922MSCP, DKFZp547E052, MGC45714, MGC5370, MAP4K1SLC4A11, MGC26568, PPIL2, MGC27034, FBXO30, DKFZp547C195, MIC2L1, DHRSXHTAP, VIK, FLJ23841, DKFZP434D146, HPS3, IPP, SEMA6ADNAJC5, ULBP2, LOC120224, FLJ11036LOC90580, LOC92906, WDR5, RAB35FLJ10697, MAPT, FLJ14825, KIAA1295, MGC2217, ACTR8, SENP2, LMLN, LTB4DH, MGC11257, MGC15476, SART1, TNNI3, LOC128153, SCDPRO1912, KIAA1896, LOC80298, FLJ20533, SMCR7CGI-69LOC114977KIAA1691, C20orf102, VIP, FBXW5, TRIM35, SLC30A5, JAG1SLC13A3, COQ4, OVC0V1, GLI4, RPC8, FLJ31153, C20orf162, NRP2ENAHARH2LOC55971, FLJ20038CerCAM, UBE4B, LOC57168ALS2CR9, SLC21A11, GPR108MRPL41, KIAA0831KIAA1970, DKFZp762I137INPP4B, ZFP67HSPC189, PF1PCDH6C2orf9KIAA1468, FLJ14399, DKFZp434G118, KIAA1500, FLJ14681KIAA0869FLJ22558APXL2, MGC16028, APMCF1, LOC90990, PCDH18, DKFZP564J0863, COG1UBE2H, KIAA1970, CTSB, MGC30052, FLJ90575, MMP28, MASS1, MGC13034, RIPK3, CCT4FLJ12519, GOLGA3RCPCP, MGC20983, FLJ35207 EML4, TRUB1MRPL41ZNF213, RP42, FLJ20813, SAMHD1, KRTAP4-8, C4orf1FBXO8, EPB41L4B, ZNF75A, STK36, PAWR FLII, DKFZp761A052, C20orf23, AKIP, MGC4643, VTI1A, LOC223082, PDK4, PSMB7, KIAA1710, MGC13272, MGC4342, GNG12, N33, FLJ14800, FLJ21924, LOC220074, FLJ22474, DKFZP434P106, FLJ13236, PTENP1, FLJ21159KIAA1441, CGI-85, FAM3D, DKFZP566J2046, LOC116441, TEAD1 LOC51249, PARVA, HSPC230, MGC5442FLJ23091LOC55893, PDCC6IP, OGN, TRIM41, MGC42105, CPNE2, DKFZp547J144, KIAA1784, KIAA1337, SLC30A1RNAC, KIAA0429NRXN3, Spir-2, GGCX, KIAA1694, DNAJA4, CAPN13, NAP1L, RPS27LTMODAKIAA1557, FLJ21415DKFZP564G092, CLN8PARVA, FLJ40021KIAA1708PC326, NOSTRIN, LOC129642, KIAA1301, CGI-85, MGC13102, LZIC, KIAA2025, FAPP2, FLJ22679, SNX8, ZNF76, DUSP16, PANK2, FLJ14834, DKFZp434C0328, ROD1, FLJ34633, FLJ13391, ARHJ, FLJ11753, B29, OSAP, B2M, CYGB, DERMO1, MIR, WDR20, C20orf155, FLJ32919, MGC2408, CLGSCYL1DKFZp761A132, DKFZp451G182, FLJ90119, FLJ36991, SDCCAG43, PPP1R16A, MGC19764, FLJ13263, GNG2FLJ12517, MRPL20, MGC16212, SRA1, GEMIN7, FLJ37953, HBP1,

10

20

30

40

KIAA1737, CTL2, KIAA1754, FOXA1, MGC13096, HDAC3BOC, FLJ30973, BRUNOL5SEL1L, SPTB, POU4F1, KIAA1337, MIZIP, NAGSCG1-72, PRO1853TRAF4, MGC32124, SNCAIPDKFZp43400515, SMOC2, FLJ12770LOC113828, FLJ40432DKFZP434K0427, SFPQ, RNB6, BMF, GSH-2, REV1L, SLC27A4C1orf19, SLC5A1KIAA0478, SPPH1, FZD8, MGC26877LOC150379STK36, LMD1, KIAA1694, FLJ25357ELAVL2, BM-002, ProsteinFLJ20374, STK35, FLJ31434, CHRM1, DLC1, FLJ36155, FLJ21939, MGC21675LOC51320, FCRH3, FLJ10948, MGC27034, MGC14801, MGC11102, SEC14L2KIAA1393, DKFZP434A0225, DKFZp434F054, SHANK2, OSSEP, MGC45474, ARHGAP8, BTCIL1F7GRLF1, DKFZP434B172, MRPL35, PAPOLG, MGC33662, XPO5CTEN, DSCR9, ITGB6FLJ14768, STEAP2KIAA1522, FLJ32069, PCDHB3C20orf136, XRN2MARK1, DKFZp5470146, FLJ12517, FLJ10597GK001, CITED4, IGL@, GALNT13MGC26963, RASAL2FLJ20605, LOC112609, NLGN3, C7orf2, HSPC182, DTNASNX9, ALS2CR9KIAA1219KIAA1190C14orf31HSPC065, KIAA1221, FLJ10252, C4orf7, KIAA1363, NCAG1, NAV1, C14orf28, KLP1, ZDHHC9, MGC2615, SMUG1, PHLDA1, AD-003, BRPF3, ASCL2MGC15523, REL, ROPN1, FZD4, ZDHHC4, KRTAP3-1, PCDHB16KIAA1036, SLC2A12MSTP043, FLJ32731AMID, FLJ30277, CKLFSP2, TLR7, SEMA6DNOPE, DKFZP434P0111, SDS3, KSP37, PDCD6SNX14, A1BG, SLC31A1, MK-STYX, SNTG1LOC80298, FLJ25534, MGC10485, FLJ10035, NEUGRN, BK65A6.2, NKD2, TJP2TRPS1FLJ20753, PPP1R1A, LOC123169, LOC112817, ZNF341, TM4SF9, FLJ90586Spir-1REN, FLJ10210, CEGF3, NOXA1, FLJ14981, RIMS1, PCDH20FLJ20360, DKFZp761H0421, MSX1, DKFZp434F2322FLJ10188, SPP2, MUM2SYT12, plknbeta, MGC11349, RNF40MGC4734, MAP1LC3A, FLJ13687, CNTN3, MGC19604, TLR8, FBXW7, HM13, TLE1AKIP, SMURF2, FLJ21963, MRPL44, PRKAG3, DREV1HSA243666, FENS-1LOC51693, FLJ10486, HAVCR2, HDAC3, AHRR, CXCL14, CGI-09MGC13251DKFZp434E2321, C14orf102KIAA1434, PHCAKIAA1145, FLJ100028, AMOTL1, TMPRSS6, ODF3, MGC4604, D667H12.2, VGL2FLJ10052FLJ13881, UK114, DSG2SLC12A4TBCD, MAP1B, OSBPL10GALNT10, DKFZp5471094MGC35352OSBPL6, TRIM7, FLJ30473, MGC2562, DLG1, DKFZp434P0531, KIAA1554ESDNKIAA1910, SEC15BKIAA1172DSCR1L2, PSMB5OSBP2, GPR34, MGC15854, HDACSLOC90990, DKFZP564B1023, CASP2NUP133Spir-2, LOC151534, C22orf23, FLJ90811, DKFZp434I1930, NET-2, LOC113026, HOOK3MGC8721, BLVRA, PLA2G12, DAPP1, FBG3 MGC10974, LOC114990, DKFZp547M2010, FLJ20542, LOC144455CGI-94BRUNOL5HKE2, PRND, WFDC3FLJ30990, FLJ23654, KIAA0876, NDUFS1 WASL, KRT6IRS, KIAA1684, RU2, DKFZP434K0427, DKFZp434B217, KIAA1549 DKFZp434F2322, MGC4126ENTPD2, GPRC5C, RGNEFFLJ31052CEGF3SYN2, C11ORF30MGC3038, ITGA11KIAA1053LOC57822, LOC130589, RASGRP4, DKFZp434H2111, NFIA DKFZp434C0328, FLJ20209, NDUFS2MGC8SLC2A4RG, p25, C20orf167KIAA1909, MGC4238, MGC16372, CD5, IGKC, KCNQ4, ZD52F10CCL28, FLJ20539KIAA1357, EPB41L4B, MGC14128, SLC1A5RHEB2, HSPC182, FLJ22527, MGC21621, MGC5370KIAA1130, KIAA1554C9orf11 FLJ1937IMP-2C20orf51, KRTAP17-1, DKFZP434E2318, DKFZP564B1162RPL29, PRO1489HSPA9BKIAA1688, KIAA1324NCOA5, AXIN2, LOC92689, KIAA1272FLJ14642, FLJ37440, FLJ12604, RGS8, MS4A6AZNF216, LOC84570, KIAA1126, SMOC1, TSCOTMGC18257, RDH13, C1QKGIAA1576, ZFP28GNA14, FLJ39155FLJ32069LOC155066, MGC19764FLJ10159, MGC16309LOC55862, PCDHB1437867.00, LOC56851, SNRK, MGC13017, ADAMTS16AGMATPCDHB10, LOC113179, NOL6, C20orf55, PALMD, GFER, BNIP-S, KIAA1337AXIN2, MGC39807, LIP8KIAA1053, MGC45378FLJ11273, FLJ23129DKFZp58611420KIAA1210COX7B2, TCF7L2, USP21, DKFZp564O1278, FAHDPCR1NUMBMGC35285JUBEVX1, LMO4AMOTL1, C2orf7TMPRSS3, ARHGEF7CSR2BP SBB131, SSBP4, FLJ23654, CPMDKFZp762K222, DPP9CA5BKIAA1817C14orf92, MYO3A, VIK, CACNG4, NYD-SP21LUC7L, SFRS12, LIPHDIS3, GCC1, FLJ10504, CASP14, KIAA1387, DAB2IP, KIAA2028C20orf40GPR92FLJ32658FLJ25027, UQCRC1, EVC, COG1FLJ25555MOV10 ALDRL6, HTGN29MGC12466, IBA2, MGC15548ADD3, GSN, C14orf50MGC22805MGC39650, KIAA1203FLJ14311, HRMT1L1, MASS1, CGN, IGHG3, ESPN, ZDHHC12, PCDHB4THRSP, FGFR2, LOC91461FLJ25604DRAPC1, ARL8BACH1, KIAA1921, GPR81, KIAA1145ARHGEF7, retSDR3, C20orf6ARFGAP1NSE1TPSG1MRPL4, KIAA1870, X102, KIAA0599, CACNG6, FLJ22301, ZIC2, KIAA0599, MGC4796 HT036, DQX1, SYTL4ICAP-1A, KIAA0350, KIAA0872, GMPPB, FLJ37953, LMLN, NOL6, POLR2J2Hes4, LOC57038, TRPM6, ABCC13, BCAR1FLJ30803FLJ32069KIAA1909, TIMM8BEM4MGC15606MGC35048, NRP2 PCA3, IL17BR, DKFZp727A071, MGC14128, GABRB3, MRP63, PGBD2GATA5, FLJ14735, ENTPD6, SYNE-2PRIC285, MGC2555, LOC90378GLCATS, GGN5L1, DKFZp434F2322, MSCPFLJ30681, ZNFN1A4PRO0971TTY6C14orf47CTXLFTCD, MGC2835MGC12435, STYXFLJ12076C20orf106TEX11MGC19825, TPM2HOXD10, KIAA1554, FLJ20014, FLJ20748, PPP1R14C, ARHV, ALDOAEGFR-RSC20orf92FLJ14594MSCP, PRO0038SLC25A15, RSP3, PPP1R9A, EPHA7MGC35521GFAP, ICEBERGFOX3P, FLJ33516GPR55, ZNF398, PRO1635FLJ33903FLJ32203, ORMDL3, LOC51315, FLJ32752FLJ2LIMD1KIAA1357DOCK1, FLJ14721, STC1ALAS2, HMT-1PAD11, PTPN23FLJ10210, FLJ10826, ELAVL3, LOC90668 FLJ32069, NOL6, LGALS1LOC55971, FLJ20273, SSB1FAD104, GPR107TRA@, SORCS2, LOC91010FGFRL1, UQCR, SEC14L2, DENRST6GalNAc1, KISEGLN1, ZNF219SNAP29, TNKS2QP-CSLC4A11, PURB, KIAA1163, FOXF1, C12orf22, TCF7L2, CDH23, FLJ13955KIAA1828, FLJ33008LOC115704, SLC13A3ASB1, DKFZp762I194, CPNE4, GRIN3A, MSTP043, BHLHB5ADMPRB6, MGC13275, KIAA1889, KRTAP3-3LOXL2, LOC51290, C11orf23FLJ20309, MGC26778NAV1, ARHUF1J23749, FLJ33071NUMBL, PTPNS1L2MGC3040SMAP-5, MGC2835CDGAPCHFR, FLJ90440, DKFZp434G0522FLJ10300, TRIP11, HSFY, HOOK3, GTF3A, FLJ12634, NEO1TEAD2PTPN2, BCL2L1, KIAA1557 KPNB2, ACPP, CISH, DKFZP434P106, ASPH, DOT1L, FLJ22944SRGAP1, OLFM2, SIN3A, ASB12, CECR7MGC40397NFKBIA, POLRMT, CGI-149C21orf84, MTMR9, GATA4, XYLT1, PCDHB7SEC15L, C20orf160 MGC33302C1orf19, COL12A1, EGLN3, FLJ21032MGC3040, ODZ2, ING5, C12orf2HS6ST2AQP1, MGC10981MGC33607FLJ14399PRACDCA1, MGC40222, TMOD3, TEFSDS-RS1, LOC115098KIAA1573MLL3, FLJ14103AK3 ARPM1, CARD14MGC12916, ALS2CR12, FLN29, FLJ12697TOB2, N33GTF2I, BHLHB3GPC6, CAMK2D, KRTAP4-13, BDP1, DKFZp761H079, DKFZP564J047CED-6, EB-1, MGC4659 GPR110, DOCK1, FLJ20211, SCN11A, LOC118471, LOC151568 ZFH2SLA/LP, PCANAP7, HDAC3, POU5F1, GGTL3, C7, FLJ25410, SCAND2, C20orf136, FLJ21616, EB-1, FLJ25067, KIF9KIAA1276, LOC55864, FLJ32771, DKFZp667B1218, DNAJC9LOC51319, FLJ10902, FLJ36525, MESDC2DDX12MGC33993 KIAA1399, LIT1, DKFZP434F091, FLJ12697GPR24, SE70-2, NANSFLJ12571, IL-17RC, TRIM7, NXPB1, ROR2, C20orf60, KLHL5, ZNF265, BECN1SCARA3, PRO1580, MGC35392DKFZP434N178, PEX5R, FLJ31528, LOC135763CLECSF9, MGC41906, FBXO11ZNFN1A4, SPINOFBXO22, IHPK3 C20orf167MAP2FLJ25270, STRBP, MUC13KIAA1878, SNX9MGC26143 KIAA1887, KIAA1712ASB4, BRUNOL4PDE11A, ARG99, FLJ30162, ATP6V1G3, MGC10702, ARSDKCNJ2CAMK2DMGC12335KIAA1617HNTEB-1, GRP58, C21orf59, KIAA1720, LOC221468CCL27CGI-62MGC10204, TNKS1BP1RRP40, FRABINDLX6APOA1FLJ30532, FLJ23403C7orf2 DNER, PDE11A, MAFMGC14276, DLL1, LOC146542, SH3GLB2KIAA1952LOC93109ENDOGLYXIMGC10724, IL4I1, CGI-105, C14orf44, PAX6ASAH2MGC12435, PGA5, および AGPAT3.

【 0 1 5 7 】

(表6) UPNTGに対するUPTGにおける下方制御

CD24, HSPD1, EIF3S6, TIMM17A, DENR, PAI-RBP1, KIAA0101, H2AFZ, SLC38A1, HNRPH1, RPS11, DEK, ZNF131, HSA9761, MGC3077, CD24, CCT6A, RNPC2, ANKT, CSE1L, RABGGTB, HSA9761, SIP, HMGB2, SEMA3F, HINT1, HMGB1, SERP1, RPL27A, FH, DUSP4, SET, KIAA0179, HMGN3, TOP2B, OAT, NUDT4, PCNA, BMI1, SIP, SDCCAG1, PBP, MAC30, SFRS5, ATP1B3, EIF4E, CRABP2, LRPPRC, DKC1, MRP63, STK6, CARD10, MRPS18B, TCF3, TCF3, MGC2747, FLJ20422, IF2, NCL, EIF5, TFAP2B, TIMM9, PPP1CC, ZWINT, HSD17B1, ATP5O, CBX3, CRFG, PXMP4, UBA2, RNASE3L, USP7, LANPL, PTTG1, RANBP7, YES1, CDC2, RBM15, GMPS, PSMD1, TCF3, HSP105B, EMS1, NONO, TOMM20-PENDING, LDHB, DKFZP586L0724, DDX27, JMJ, CENPF, LRPPRC, ID4, EIF1A, PSMC6, ID2, SEC13L, TYMS, LUC7A, SNRPA1, RRM1, RARG-1, SMAP, FEN1, TCN1, ZNF146, ABCE1, DC8, MTCH2, FLJ20152, CCNB1, CKS2, FLJ23445, TDG, DNMT1, MAC30, RPA40, GMNN, APOBEC3B, STMN1, EIF1A, MTHFD1, MGC5560, USP1, ZRF1, EIF5A, WDR3, FLJ20530, RPS21, BAZ1A, MCM6, MICE, OPA1, LAMA5, ECT2, RAD21, RNASEH1, FLJ13081, STXBP3, PAI-RBP1, OSR2, FLJ20006, KIAA0186, C19orf2, NUP107, TAF2, GCSH, FLNB, ZNF363, SEMA4C, RAE1, GSS, NEK2, GTSE1, PAI-RBP1, ABCE1, FLJ20986, MAD2L1, VEGF, LZLP, KIAA1025, KIAA0092, ANP32B, SRRM1, NXT2, TOPBP1, FLJ20485, SFRS7, SMC4L1, CPSF6, LIN7C, FARSL, NDUFB6, FLJ12888, LANPL, ENDOFIN, KR18, FLJ11029, DLG7, WDR12, DC12, CDC5L, SLC35A3, PIGF, PRKRIR, MTO1, CASP6, FLJ11149, FLJ22637, LDHB, PPID, GTPBG3, HMMR, SLC31A1, POLE2, KIAA0984, DJ434O14.5, RAB6KIFL, ASE-1, HNRPA1, FLJ23468, CALR, MELK, SLC25A13, TFDPI, RES4-25, DC13, CGI-111, ARH, FLJ14547, TSN, CYP2B6, PDX1, LCE, FANCG, DHFR, KIAA0020, QDPR, MTIF2, HLXB9, SART3, JAG2, CKAP2, PRC1, SNRPD1, LOC51184, RAN, DLD, PREI3, SRRM2, RAD1, CCNB2, FLJ13657, KIAA1116, RACGAP1, FLJ13576, DKFZp564B0769, RFC3, KIAA1630, CCT6A, TIP120A, RUVBL2, FLJ23277, DDX18, PMSCL1, LEPROTL1, SCGB1D2, TIMM13, C4orf1, KRTHB6, DD5, C1D, PNN, ORC6L, KIAA0170, ASK, DLEU1, SFRS3, SLC19A1, HIP2, PPP2R1B, BIRC5, EPS15, MGC13138, HNRPD, STK6, HSPA8, METAP1, KIAA0776, HSPC128, KIAA0419, MAGOH, CHORDC1, APPBP1, UBL3, RAD51, LOC55871, GLRA2, CUL4A, ARHGAP8, KIAA0648, COX17, SUDD, RAP1GDS1, FLJ14639, BCL9, EZH2, TRIP13, FLJ11210, TOMM70A, PTP4A1, AMD1, DUT, KPNA2, CYP3A4, RFC4, OPA1, RNF6, IBTK, LBR, MGC13138, KIAA0097, HSP70-4, OIP2, VRP, HDAC9, KLC2, FLJ20700, AD24, ALMS1, FLJ21901, DKFZp547P234, FLJ10656, TOP2A, MYC, TAF4, POLR2E, KIAA0528, CRY1, MST4, ETFA, HOXC6, MTX2, HMGCRC, RPC5, TOPK, DKFZP564I052, CENTA1, FLJ20758, KCNMA1, KNSL6, CGI-30, MRS2L, PAICS, ZNF85, DJ434O14.5, RABGGTB, HEY1, KIAA0485, KTN1, KIAA1012, CDC20, DKFZP434L0718, CEPT1, MYNN, FLJ10637, ANXA9, RNPS1, RBBP4, SSH-3, LOC90355, CAMLG, KPNB2, FLJ23259, VRK1, FBXO5, HSP70-4, DNAJC9, MYCBP, S164, NTRK3, TAF9, SPG4, DKFZp667G2110, CDKN3, INHBC, PEX11A, CDC27, HMGB3, THOC1, FLJ12151, DKFZp564B0769, HSU79266, DMN, C10orf3, THOC2, NDUFA6, GCSH, PPAT, RHAG, SMC2L1, SE70-2, KPNB2, LSM6, FLJ10377, IL1RN, KIAA0547, FLJ14007, SCLY, KIAA0379, UBE3A, HTATSF1, LOC51685, AGL, BET1, FLJ13782, UMPK, SMARCE1, LSM5, CENPF, EEF1E1, TPT, FLJ10719, IF2, CGI-12, UCHL5, FLJ20628, ERN2, BLM, FLJ21940, PDCD2, STRIN, UMPS, MRPS30, APBA2BP, TCEB1, MGC9084, NOLA1, BUB1B, MGC10471, RFC5, RRP4, FLJ13187, CCT5, HSA6591, CHAF1A, FACI3, IMPA1, FLJ23558, CDC25A, CDC5L, BTN2A1, FLJ20422, ELF2, DKFZp586F1019, FLJ22624, LOC51659, CRFG, WHSC2, HN1L, OAZ3, CD1A, CLPX, CABCI, CLASP2, HSPA9B, KIAA0007, SLC1A3, NPM3, SUSP1, SLC16A5, M6A, UBE2J1, TBC1D4, C20orf1, TBXA2R, UVVRAG, MLH3, FLJ20331, PEG10, PRPF4B, KIAA0332, MPZL1, KPNB1, FLJ10204, TFAM, FLJ20281, FLJ10604, LAT1-3TM, KIF2, RBM12, MKI67, HRB2, KIAA0056, ZAP3, COX11, SNRPD1, AMD1, TRN-SR, FLJ20641, RB1CC1, KIF4A, FLJ20093, TPR, RAD50, PPP1R12A, HNRPD, PIR51, PSPH, TTC4, HIC2, SLC39A4, RLF, KNSL7, NOL3, ZNF-U69274, EIF4ENIF1, PDCD4, CTSC, CYP2C9, KIAA0677, BCL11A, LOC56906, TIA1, SYN2, RNAC, RDX, FOXM1, HRASLS3, STAG2, HMMR, KIAA0376, CAPN10, CHEK1, NICE-4, MRPL19, TSN, DKFZP434M154, PPID, NEK4, SMC5, MGC1223, SUV39H1, ESPL1, RANBP2, FLJ23018, SNAPC4, LGN, HYA22, JAG2, KIAA0644, NPR3, FOP, PKMYT1, APPBP2, HSPC135, C20orf20, EIF4E, ZNF239, FLJ20909, CNTNAP2, ZNF292, LIPT1, FZD7, KIAA0971, SSH-3, MRE11A, KIAA0090, PAWR, SMC2L1, CGI-112, SOX13, HBB, KIAA1193, CAP350, RRS1, MTCPI, HBA1, GRPR, LCT, RAD51C, PRKDC, SPAG5, POLQ, BRCA1, GNAI3, FLJ14346, ZNF24, CENPA, E2F3, DDX18, SFRS2, PSP1, FLJ14827, BFAR, FANCC, DMXL1, CUL3, C6orf15, BCLG, SIL, LOC133619, MGC2306, KIAA1096, GMEB2, ASCL1, EBP, FZD3, PRDM2, KNSL1, FXJ1, PPP1R3D, SRP72, DKFZP564D0462, CCNF, PAI-RBP1, PRO1496, RBBP6, TEB4, SP192, DCTN4, B4GALT2, SRF, ZNF200, DNCL1, SCYE1, PPI5PIV, FLJ22087, SLC29A1, FLJ12439, VDR, TIMELESS, TAF15, CGA, FLJ21816, SHMT2, SRISNF2L, DKFZP547E2110, OIP5, MGC2603, FLJ11896, C18B11, IGLJ3, PPARBP, DCX, TAF5, MGC5306, LIM, PTER, PPIL2, FLJ10998, NSEPI, KIAA0332, MCM4, DLAT, KIAA0453, RPL23AP7, TTF1, WRN, TTK, MARK3, SF3B3, FLJ20552, TIMM8A, PANK3, LIN7C, FLJ20225, FLJ10287, MFN2, FLJ21908, REV3L, MGC5566, ZNF42, MSH5, HCAP-C, FLJ20591, SPHK1, E2F1, FLJ14054, CCNE2, MGC4701, C1orf33, BITE, MCM5, KCNK15, AGTPBP1, FLJ20274, CLPTM1, LANCL1, FLJ20125, FLJ11785, BARD1, MYOC, RB1CC1, FLJ23151, RFC1, SLC25A12, FLJ10330, TMPO, KIAA0157, STC2, UBCE7IP5, MGC5306, COL13A1, TMSNB, PTTG3, FLJ40452, MADH6, IF2, SRP72, FLJ20003, USP2, YY1, FLJ23053, KIAA0276, TIA1, PRDM10, OXTR, HRASLS, BAZ1B, M96, SLC7A5, CYP26A1, PB1, TCBAPO758, TLE3, POLD3, LIV-1, HNRPL, FLJ10407, CHAT, UPF3B, RAMP3, TIMM17A, G3BP, PCDH7, FLJ90754, MCLC, EPHB3, STXBP6, CSTF2T, GYG2, PRKCBP1, RNR3, FBXL2, MDM1, PNN, SMPD2, TTF2, TFR2, GDAP2, FLJ10989, MATR3, PRO1598, PAF53, OGT, HNRPH3, H326, VDR, KIAA0843, UTX, KIAA1172, RYBP, FLJ20005, SCML2, SF3B1, KLHL3, NOLC1, ING1L, KIAA1467, ROBO1, TGIF2, C8orf4, NUDE1, PDCD4, FLJ11004, AKR1C1, DKC1, COCH, FLJ20666, HSPC121, FLJ10261, PMFBP1, RAD1, SLC4A4, FGFR2, SMARCC1, BAZ1A, CGI-130, NESG1, FLJ13909, GRM6, FLJ13942, SOX12, FDX1, LGN, GRIN1, BTN2A1, NCBP2, NMU, CDC6, OAZ, CDC7L1, CNM4, NOL3, FLJ10038, KIR2DS1, KPNB3, SLC4A4, FLJ22390, SLC6A13, NY-REN-24, KIAA0923, LOC113251, SIP, ERCC6, DKFZP586A0522, RAB11B, ZNF197, WHIP, KIAA0040, KIF5C, GTF2H3, PAPA-1, HNRPH3, NDST1, C9orf12, KIAA1069, MAC30, PPP2R1B, ZNF363, KIAA0931, NFRKB, MGC12760, HSU79274, SELP, RAB33B, MYH11, TIAL1, MCM10, DKFZP434F1735, KIAA0553, SAFB, FLJ12455, DRIM, CFLAR, KIAA0542, HTR1B, SMC4L1, TIMP3, MLLT2, ARHGAP1, KIAA0255, WASF1, POPI, KIAA0286, PASK, DACH, SF3B3, CDC2, RCL, IL2RA, IRX5, DUT, FLJ12684, FLJ20640, NSPC1, ABCG1, T, ZNF174, PPP4R2, SPAG4, FLJ21596, ZNF11B, FLJ13449, HBA1, E2F3, CDC2, BICD1, RAP2A, CSTF2, LSM8, DYRK1A, FLJ21940, H2AFP, DATF1, ANGPT1, C20orf46, FLJ20147, ZAP, CASP2, KIF14, DDX17, TRIAD3, TAX1BP1, PEX7, KIAA0182, TIMM44, CIAO1, FLJ13490, MED6, FBLN1, SMN1, OR10H3, ARP3BETA, DLAT, TXNRD2, RC3, HUMGT198A, MTHFS, CAT56, CRSP6, DCLRE1A, ACRV1, TAF1, PPAT, SEMA4G, CXCL9, CUL2, AGRN, ZFP100, KIR2DS3, RECQL4, PTPN13, LOC93081, IRF4, IGL@, CYP2B7, CLASP1, MCF2L, KLK5, COPS7B, B3GALT3, DKC1, YES1, CHPFR, MGC21654, TROAP, FLJ23311, MKL1, KIAA0650, MRPS34, SMARCC1, PEX11A, ZNF212, GABRR2, NUP98, SIGLEC7, ZFD25, RRM1, TFP11, M96, AD024, AP1S2, TIMM17A, GM2A, TAS2R1, RARG, GDI2, FARSI, ROBO4, RINZF, FOXF2, CASP10, CITED1, RPGRIP1, PHTF1, 37870.00, PP35, MGC4659, KIAA0092, EPHB1, KCNJ10, HOXD4, NUP160, PTPRD, PRODH, PTBP2, PFKFB2, SGK2, ACADSB, BRIX, EML4, EDNRA, CHRN3, NUP155, KIAA0648, SEMACAP3, LOC57406, AND-1, CRSP2, STAG1, SH3BP2, NR6A1, MGC2827, HNRPH3, SIP1, FLJ21986, CTH, PDEF, HAPB2, RPGR, COQ7, TTTY2, FLJ11767, LOC81691, HSPC111, MGC39851, TAP2, NUFIP1, GABRA4, CDH2, SMTN, ZNF305, C8orf1, ULBP1, VAMP1, FLJ20477, LHX6, CD6, NSBP1, KLF3, SLC13A3, LOC55862, LCK, CDC25C, CGI-32, DKFZP434D193, MBD4, GNB3, BAIAP3, FARSI, CHRN1B,

10

20

30

40

GCAT, KIAA0342, STK18, MPHOSPH10, CRMP1, UNC84A, CACNB1, KIAA1053, KIAA0953, SERPINA5, FLJ20433, SIGLEC6, DKFZp762E1312, LAT, SORD, GGA2, FLJ21945, FGFR4, DBR1, LMNB2, ADCYAP1, NR4A1, LIM, AGC1, FDX1, FLJ20244, ZNF24, DCLRE1B, IL23A, EIF2S1, INCENP, FLJ21820, ZNF264, KIAA0964, CASP8, ORC2L, CHAC, TNFRSF13B, MOST2, ABCB9, DIO3, RAB12A, FAIM, DCT, CLCA1, TRIM29, GK, GNA14, TDPGD, FLJ20186, RAD54L, SSX3, FLJ10193, HT010, HEC, KIR2DL5, CASQ2, TRA@, ZNF335, ING3, HSPC055, ITH2, BUB1, MADCAM1, AXOT, KIAA0295, RPL17, NRXN1, P2RX5, GASC1, NUP210, ZNF236, RAD21, ANKTM1, EDNRA, HSPD1, CORO2B, NY-REN-58, FKBP1B, AQP8, KIAA0922, SNRPA1, ARIH2, ASGR2, C6orf35, IL1RN, SLC38A3, NFYC, CACNG4, SEZ6L, GLP1R, NUFIP1, G2AN, FLJ13949, FAPB7, S100A1, TRIM36, LOC93408, API5, PADI3, TADA3L, EPN2, TNFSF4, MIP, RIPK2, F5, KCNJ3, HADHA, MS4A1, NEK3, KIAA0275, DTR, MNAT1, ZNF223, FNIA, NRCAM, POLG2, ADH6, CAP2, KCNJ5, SFRP1, APOBEC3C, IL7R, P125, UGCGL2, ASIC4, AMFR, HSN44A4A, RAB5A, OXCT, RAB3GAP, D6S1101, OTOR, LTBP1, RIN1, LDB1, PRKAB2, KIAA1006, PLK, PRO2000, MOCS1, RGNEF, PDZ-GEF1, INA, MASP2, RSC1A1, RoXan, CLDN6, HSAJ2425, KIAA0469, ING4, REM, KIAA0092, SKP2, OGT, CBL, KIAA1240, QKI, ETPDH, PPP2R1B, MDS031, CED-6, SLC11A2, GPX5, CRKL, PC4, FLJ10858, APOC4, CUGBP1, REG1B, DKFZP564B147, C14orf104, PAX4, TRA@, RECQL5, ENG, CDC2L1, FLJ22087, HYA22, DEFA4, GIOT-3, ASPM, ANK3, TNFAIP2, SLIT2, WBSCR20B, EIF5A, PTHLH, ATPW, CASP8AP2, HSPB3, RPS4Y, UNC84A, FLJ20624, CHST5, STARD5, SSX2, IL22, TAF1B, FEM1B, KCNA1, GPR15, C1orf34, CGI-07, WDR8, SLA, HGC6.2, GRIN1, CXorf6, KIAA1034, EDG4, CUL4B, CSPG3, TFEB, P164RHOGF, FLJ13105, CENPE, APP, MYL6, FLJ23441, PON1, ENDOG, SERPINC1, PGRMC1, TUBB5, CHRD, PAK6, FLJ20045, PELP1, FLJ12735, DXS542, SH2D1A, PRO1728, HOXA6, NEUROD4, CGI-100, FLJ13386, AND-1, TBL3, GZMM, FLJ90005, FGFR1, LOC51231, FNBPI, P11, PPP1R15A, VDR, CPSF6, S164, C20orf14, KIAA0217, SGT, KIAA0332, DKFZP586E1923, FLJ10884, MCF2, MAP4, AAK1, HS3ST3A1, LOC90806, ALDH3A2, MUF1, NCKAP1, FLJ10618, LILRB3, GAGE5, TMEM1, CD6, ADAM22, BM039, NEF3, ITCH, PPP2R2B, PLG, SNAPC1, DXS9879E, MPDZ, CDK3, CD209L, SLC21A9, SHB, Rab11-FIP2, MAP4K5, DGKE, MTMR3, KCNK5, CCLNKA, SGCE, FLJ10565, MCM7, AK5, NCR3, SERPINB4, TPST1, alpha4GnT, NPEPL1, PRLR, MPHOSPH9, IL18RAP, PMSCL1, HS322B1A, TCF2, TPD52, HIVEP2, KRTHB5, KRTAP1-1, DMD, C10ORF6, AGC1, FLJ23436, PTK7, COL9A1, CGI-01, EPHB6, AVIL, LOC54550, NASP, OAZIN, SERPINA6, GPR44, VCY, DIAPH2, 384D8-2, MAPK11, GALNT4, PTGES2, WNT2B, STX6, STK17A, PPFIA1, CALCA, CCNA2, DOC2B, NID, BAZZA, WNT10B, FBXW1B, SPRR3, MINK, B3GNT4, CDK6, BHMT, SRPK2, PGCP, CNK, SSB, CDC6, GART, DLX2, PLEK, PTPN7, UBQLN3, IFI44, TCOF1, FGF16, COPEB, SOCS4, FLJ11222, MRPL12, WDR9, DKFZP434G2226, CLECSF9, NCR3, GPR49, EP400, DKFZP586M0622, PCDHA9, C1QTNF3, STAB1, PRKDC, BEX1, FZD9, CAPN7, BCR, FLJ11577, IGL@, ARR3, PTHLH, AP4S1, ABCG5, SNTG1, CRTAC1, ZNF335, FLJ10979, HSU84971, POLI, KIAA0643, DKFZp434I1916, PPIG, TRG@, MAPK12, ING1L, HIF3A, CDX4, CYHR1, TRAP100, UCHL5, CLOCK, SLC17A7, HFL-EDDG1, ATF7, FLJ20105, HRH4, FALZ, SLC23A1, NFR1, BTN2A2, FLJ20581, DKFZP761H1710, FLJ10376, GLRA3, C20orf30, C4orf6, ELK4, PLCG1, CNR1, KNSL5, KIDINS220, ING4, PPFIBP1, SGSH, PRKAR1B, UBE4B, INSL3, DKFZP434F1735, MTMR8, KRTHA2, MPHOSPH9, SQLE, OGG1, OSMR, AFM, HSPBP1, VGF, HCGIX, U1SNRNPBP, FLJ23447, FLJ10057, SPRR2B, GRIK3, MARK4, WIZ, CORT, MGEA6, BMP7, FLJ10648, BRAP, DKFZP547E1010, C21orf59, STK6, KLK2, GRIN1, HOXB7, SMURF1, PCDH16, BCL11A, SPPH1, FLJ12838, SSR3, KIAA0940, P2RY2, HSU84971, ZNF134, CNTNAP2, ADAM23, MAGEA6, SPAG6, DKFZp761P1010, DTNB, CHAF1B, MLL, DGCR8, MGC3101, SENP3, FLJ12331, LATS1, IPP, FXDY2, FLJ23360, FLJ20898, LUC7A, NDRG4, LIN-28, CXorf15, FLJ13910, ELK1, MGC4294, TBL1Y, FLJ12985, B7H2, FLJ13693, FLJ10945, FLJ20313, DKFZP566C0424, IGHM, TPS1, GFAP, PEX1, NEU3, FLJ10719, NFIC, GTSE1, SIAT7D, PDYN, SELPLG, B7H2, PIGO, SCNN1D, NMBR, NCAM2, YWHAE, SIP1, FLJ14084, PROZ, ATF2, PPM1F, INSM1, CABP5, ZNF124, SP110, SPTA1, MGC2776, BMP8, GAL, SCA7, FLJ11850, FCGR2B, PROSC, PDE4D, MGC11335, AKAP3, CARF, DKKL1-pending, UGT1A1, SHANK2, LSS, GUCY2F, RANBP3, SLC16A7, PIP5K1A, SCAMP-4, LOC92579, SLC7A8, CR2, FLJ20707, FLJ21106, MADH5, CPS1, COL14A1, PROL3, CUL2, CHAF1A, OAS2, SOX10, MFAP4, TCF14, FLJ12618, SUSP1, MAGEA9, KIAA0322, SLC19A3, AKAP11, USP7, DC11, KIAA0616, BC008967, OR7C2, CACNG3, PELI2, FLJ14050, DMPK, FLJ23071, CCL14, IGHM, BM039, GASC1, BIRC4, MGC5601, KCNK10, SLC22A8, MGC14817, GRCC8, LARGE, ZDHHC11, ANXA13, FLJ14107, FLJ10246, C11orf5, POLA2, SILV, PARD3, LW-1, CCL13, CLCA2, MEL, RAD51C, SSTR3, STK12, ADAMTS2, MRPS12, SMCY, TUBA4, KIAA0794, CCL11, WFDC1, TRY6, MAP2K2, ACOX1, KIAA0874, C1orf16, NRGI, RCN2, CLDN18, MYL3, FLJ13150, LNPEP, SLC25A21, PDE10A, STAG3, TNNI3, CHC1, MAP3K7, OSRF, HMX1, HRG, FLJ11292, PAL, KIAA1659, VARS2, HSRTSBETA, IL5RA, CYP3A4, FLJ23556, MAPK4, C16orf3, GPD2, HOXA3, MMP7, FLJ10786, C6.1A, KIAA0892, PCDH11Y, TRB@, METL, PRKAA2, ZNF76, FTSJ1, FLJ90130, FLT3, GNAO1, SCNN1G, TAF9L, PRV1, SNX13, CENPJ, CNM1, FTCD, NEK1, FLJ11336, FLJ14803, C9orf16, HIP1, PPIF, GS3955, NFATC3, DOK1, ROPN1, MAGEC1, HGF, PRLR, CTS2L, NKTR, SAA2, HOXD11, PROX1, MAP3K12, MORF, FLJ10619, SUL2A1, ERF, DKFZP586A0522, KCNQ2, KIAA1387, DFFB, MGC4172, MOCS3, ITGB3, PIB5PA, ZNF117, KCNA4, KIAA0999, HFE, CYP2A6, A2BP1, RASGRP2, AMELY, GABRG3, ITGA8, DUSP3, PTGS1, KIAA0748, CACNA1G, CENPC1, POT1, COL6A1, ST7, FLJ13052, MS4A12, DLG5, TECTA, ETV5, HEY1, NECL1, DICER1, ALOX12P2, KIAA1025, FURIN, WISP2, CSDA, ALDH1A2, USP19, TRG@, SFRS7, CDX2, MRPS31, NSAP1, CUL4B, ABCC2, IQGAP1, WHSC1L1, ALCAM, SERPINB10, MDS028, KOC1, ELF2, DKFZP434A1022, GPM6B, C2GNT3, CYLC1, FLJ11506, CEBPA, LIMK1, CPR2, CLTB, TNF, PLA2G3, GPR30, APOL3, TSKS, HCGIV-6, KCNJ2, MGC5347, MAP1A, PPARD, TMPO, LOC63923, CYP2E1, RYK, PRKAR1B, FLJ11336, FLJ10748, PRO2958, CHN2, CELSR1, LCN1, SLC15A2, USP5, ZFR, CYB5-M, SLC27A5, MJD, KIAA1096, HTR2C, NACA, APC, ELK4, JM1, KCNAB1, GDF2, ST7L, TGT, AMY1A, ESR1, TLX1, TBX1, KIAA0967, KIAA0146, C1QR1, ARHGDIG, KCNIP2, HDAC6, MTHFR, NTRK3, HAVCR1, FLJ22269, PLXNB1, CRACC, EGR4, PMS2L6, POGZ, FLJ21148, FLJ20359, B4GALT1, KIAA1354, CSF3, SLC17A6, PAK2, ZF, CLECSF6, FLJ21120, ZAP3, FLJ20127, VAMP1, DCLRE1C, DRIL2, FLJ11608, SFTPC, GABPB2, ICAM1, PRO2405, TC10, XEDAR, CART, L3MBTL, PMS2L3, R32184_3, TCL1A, MIP-T3, FLJ14639, PLGL, HPGD, MERTK, EIF3S6, PPYR1, RPE, GLS, VAV2, TFAM, SLC6A1, RORA, PLVAP, PCDH16, HDAC7A, MGC10731, ARTN, HAO1, POU4F3, KCNJ4, ATP9B, F10, LSS, MPP6, TGF2, ITGA6, KIAA0682, NUDT13, MGC4293, DKFZP56400523, PACRG, ACLY, FLJ14627, OCM, SLC4A5, HNRPF, KRTHA1, FLJ21940, KIAA0632, SSX3, TNFRSF9, C20orf19, SLC19A1, LSR7, ZFP36L1, SLIT3, DIP13B, C20orf27, ARHGFE2, EST-YD1, PROLS, RAB3B, LAMB4, PPP2R5B, CRYGD, TGM5, ADAM22, AGMAT, PKNOX1, DSC1, TOP1, TU3A, CACNA1G, IDUA, LTBP4, MYRIP, ABLIM1, CALD1, ZNF46, CDKN2C, FLJ20958, RPS8, MAGEB1, KIAA0683, RHAG, BLU, TFF2, XPNPEP2, TYR, FAP48, NCYM, HIF3A, MBNL, LRP16, PLXNC1, LOC51145, C21orf2, ARHGAP8, FLJ32069, FGFR2, NICE-4, PRKWNK1, LOC65243, DIO1, MDM2, PRDM13, CA-11, PSK, TNFSF15, OPRM1, HSPC048, SPN, NBS1, BIRC4, CDC27, HRH2, TRIO, CACNA1I, TFR2, HAN11, NEUROD6, CADPS, MGC12386, ORC5L, TNXB, F2R, PRO2831, CDH18, FLJ11106, DBP, PAX8, DLG1, CDC25A, CEGF3, FLJ10921, HRH4, FLJ20456, IL12B, CACNA1F, E2F5, PRP17, LGALS8, MGC3771, SLC6A3, RAC2, KIAA0286, MGC12488, NR0B1, AD7C-NTP, IGL@, TULP1, PSMD11, COL13A1, UBE3B, FLJ20401, AKAP1, CRTLI, SPF45, FLJ10895, CCL13, COL16A1, CHIA, RAMP2, SSTR1, FYB, TXNDC4, SCAM-1, DYRK1A, KIR3DL2, CNK2, Di-Ras2, MCC2, KRTAP2-4, KIAA0523, IGHM, ODF2, RXRA, GABRA2, CLST11240, POLR2A, SRY, TAS2R7, BLR1, DKFZP586H2123, FLJ21007, SPON1, ENIGMA, KIAA0140, RPL5, DESCI, DNAJC9, PTK9, MGC10715, SNCA, CEZANNE, TBCE, HOOK1, COVA1, C21orf62, AGXT2L1, SLC24A1, SYCP2, C17orf1A, OR5V1, HCN2, KLF12, AIM1L, LOC51336, PRC17, ITGB3, PRO1992, POMC, PRO149, B3GAT3, L3MBTL, APG-1, C12orf2, MOX2, ARHGAP11A, ATP5G2, HLA-DOA, GPC4, LOC57406, COL2A1, GABPA, SCN4A,

10

20

30

40

RBP4, PHF7, GRID2, OSBPL7, MRPL9, MYH2, TFPI, FLJ10159, IPF1, IL20RA, THRA, LOX, CMAH, KIAA0616, CYP1A1, MADH5, FLJ40021, FLJ20069, FBXO22, GABRB3, CYP2D6, TNRC4, FLJ22582, NR2C1, PK428, CBFA2T2, KCNK13, DCT, KCNG1, FLJ10648, CENTB1, ADAR3, HTN1, PDCD1, TRIP, FENB1, TFD2, ATP2B2, TNFRSF7, MRPL4, PTP4A3, SIGLEC8, PPP3CC, ENTPD5, BAG5, FLJ20047, GLI2, CCL21, EPN1, TONDU, RAP2B, CGI-72, ZNF384, C20orf42, MEF2C, RAB28, TAF1C, USP18, GPR42, HTR2A, PDE4DIP, DKFZP564C196, TXK, H2AFJ, FLJ20623, GPM6A, FOXJ1, MGC29761, IGHM, RAI15, CSTF1, KIAA0800, CSH1, KRT20, RAD51, TAF7L, FLJ10849, PTK9, RGS11, CDH20, FLJ20034, RFRP, FOXD2, HSA9761, PQBP1, DGCR6L, FLJ11132, OR2W1, CRYBA1, LMOD1, PDPK1, GPR56, KIAA0296, SERPINB13, KLHL5, ZNF79, BCDO1, PSORT, EPHA7, DKFZP434J046, PRO0800, SV2B, C12orf3, SGCA, BMX, MHC2TA, RAD51L1, CYB5-M, VIL2, FNB2, LEC3, RBM9, BRAL1, NGFR, DDX34, MAPK8IP2, ANKTM1, DDEF1, ARL7, STK18, AQP4, MDM2, SYNE-1, FOXO3A, TNNT2, TITF1, ZIC3, PPBP, FLJ12542, SLC18A1, IGKC, HFE, PRO0038, NPPA, IL-17RC, CXCR3, DOM3Z, GADD45A, GL012, CNOT2, TOB2, TFDPI, FLJ21617, MTRF1, APBA2, TTS-2.2, CNOT4, F9, PRO2133, CRABP1, CACNG1, IGFBP5, CTNND2, DKFZP564D166, MYT2, EVI5, HYA22, CHK, HSPC073, RRB1, FOSL2, FLJ21302, MGC2889, PRKCL1, TSPY, JAG1, NDUFA5, IL1RN, CRH, CXCL11, MYH8, PURG, SLC7A1, KIAA0953, ELAVL2, SP100, KIAA0675, MLLT4, ZNF198, CD38, BHLHB2, LIT1, FLJ10210, PMS2L9, SOCS2, LIN7A, HOXA7, FLJ10661, ELAC2, CYP3A4, P2RX2, MAPK8IP3, ADAM28, NPR3, DEF6, UTRN, PHC3, FBN1, DKFZP566K0524, ZNF132, OR2J2, GJA8, PSIP2, ED1, PP2447, WSX1, LCP1, MAP2K3, KLF12, TFPI, BTN3A1, GCM2, FMR2, DDX3, PRO1768, KIAA1641, HEMK, SLC8A1, LALBA, RBAF600, FLJ10572, MSRI, KPNA4, CIAS1, MEP1B, NR4A2, PKNOX1, GLP1R, FOXF3, dJ222E13.1, KIAA0471, KERA, COL4A3, NPTXR, KIAA0447, ARHGDI, ACACB, KIAA0847, CASP2, BRP1, LRP8, IGL@, PCTK2, TFR2, PLA2G5, HSPC056, IL16, FLJ12178, TBX1, KCNJ13, WT1, PRKACG, DKFZp547G183, MYO3A, DSC2, ANAPC2, ALDH1B1, CD1B, MGC14433, GPHN, IGHM, GUCY1A2, HPSE2, GHRH, BAGE, CYP2E1, GTSE1, MSCP, ADAM8, PAPOLG, CGI-14, SIRPB1, RGN, PGGT1B, ELL, RRP4, APOL2, POU3F1, JAM1, SYP, SERPINI1, FLJ12595, NRG2, PDE3B, HIRA, DDX9, LTBPA, FLJ11783, GABARAPL3, DRD3, XP5, FLJ20190, TRPC6, ADRA1A, DSPG3, KIAA0564, KPNB2, DKFZP564O0523, UGT2B15, AP4E1, RGS7, ZNF10, PIWIL2, HLF, CYP4F2, INVS, ITSN1, FCGR3B, ARF4L, REL, RGS20, EPOR, FLJ21168, MSTP9, ULK1, NRF1, TIGD6, GPR88, DUOX2, GP5, SSB3, FSHPRH1, RHOBTB3, C1QBP, CDSN, FSBP, CFDP1, ELK3, TUBD1, KIRREL, BAAT, CEP2, GGA2, KIAA0874, CRB1, FLJ11726, P2Y10, PCDH11Y, GPM6B, FLJ10715, TRIM9, FCAR, FGF22, FLJ13993, DIM1, GIPC2, KIAA0626, SNIP1, Gene Symbol, LARS, C15orf15, KIAA0783, MGC2714, FLJ10036, HSPC154, FLJ10486, FLJ30596, FKBP5, SERF1A, REC14, OCLN, FLJ21924, LOC51249, FRSB, AD034, CCNB1, FAM3B, MLL3, IBA2, SEPP1, C14orf31, HMGB1, C14orf35, MGC4308, FLJ10407, GRCC8, C20orf129, FLJ20060, Spir-1, LANPL, RBBP7, KPNA4, FLJ10486, MKKS, SNX5, SART3, FLJ14494, FLJ21087, HOXB9, NUCKS, PPP4R2, C14orf47, EHF, MGC14439, LOC55871, AP1S2, TRNT1, FLJ25059, MGC10198, KIAA2024, KIAA1309, HSPC014, LAPTM4A, GPR54, ARL6IP2, DNMT3A, DKFZP564B1023, KIAA0114, ATF7IP, HSCPB, HDAC3, FLJ39370, FLJ20093, PPT447, LOC139231, MGC41917, MGC20262, CSRP2BP, LOC51193, GRP58, HEY2, ANLN, UBL5, CDCA7, KIAA1321, KIAA1323, UHRF1, HDAC3, KIAA1911, FLJ00166, KIAA1453, DKFZP434A0131, NY-BR-1, 37865.00, Rpo1-2, MGC5306, BOC, FLJ25804, FLJ14728, BDP1, PSCD3, AF15Q14, HDCMA18P, PRO2000, LOC152518, GART, TRIPIN, DKFZp313A2432, PANK1, PGGT1B, MGC4832, LOC85028, FIGNL1, PECC, CBFA2T2, HOXC9, CPSF2, SLC25A19, C20orf45, FLJ32915, ZNF367, PSA, LOC131118, FLJ14909, MGEA5, TRIM46, Rpo1-2, DKFZP434C245, AKAP10, CDCA1, H326, DKFZp761A078, FLJ20333, NEDD1, AUTL1, TRAP25, KIAA1143, GPHN, LARS, DKFZP434D193, FANCD2, PRO2000, DKFZp313A2432, FLJ12439, MKI67IP, LOC115004, FLJ11220, MCM10, MRPL1, NDUFS8, PHF5A, OAZIN, LOC92345, KIAA1708, KIAA1982, MGC2628, PXMP4, KIAA1804, ELYS, HNRPD, ZNF6, MRPL42, KIAA1287, TRUB1, TOMM22, FLJ25070, SPPI1, ZIC2, C6.1A, CGI-77, MGC33864, MKI67IP, TUBE, VIK, MGC14798, FLJ20354, KIAA0140, GTF2H3, FLJ12787, DLD, ARIH2, KIAA2023, KIAA0864, CDC23, MGC13096, TRF4-2, OSBPL6, MNAB, ROD1, USH1C, MGC16372, FLJ20333, FZD8, MCM10, FLJ23445, WDR4, OFD1, AK2, REV1L, COQ3, ASCL2, EG1, TRAP-132, CAB56184, FLJ13081, HELLS, FLJ10378, C20orf161, EPHA8, DTNA, HSU53209, NAGS, LOC84524, LOC91120, LZK1, DKFZP434I092, FLJ14431, FLJ20354, HS6ST2, FLJ20333, KIAA0140, FLJ23476, C14orf31, LOC55871, C14orf75, C20orf42, TBX1, CRMP5, Jade-1, CASPR4, FLJ11132, BIKFp547O146, MRPL50, LOC51193, FUT10, FLJ30655, SELB, KIAA1524, FLJ14813, FLJ38608, TRIM7, SYT12, FANCD2, FLJ25078, FLJ11294, KIAA1357, STRIN, pknbeta, NSD1, DKFZP434B1727, BCRP2, FKSG14, EIF3S9, MGC2744, KIAA1595, C14orf106, LOC144455, KLK12, KIAA1374, BCOR, GABRB3, TIMM22, FLJ25416, BRUNOL5, MGC24665, ARX, DKFZP434K0427, KIAA1915, C7orf11, MtfMT, FLJ21439, MAP2K7, DKFZp434H2111, ARFGEF2, PRO1489, PTPN1, MGC13204, FLJ23322, MGC16386, MGC45866, FLJ30626, CML66, ZNF295, ARL8, LOC115106, MGC12466, SNX5, FLJ22344, MGC10850, AKT2, NCOA5, KIAA1713, MGA, FLJ20032, RNPC2, DKFZP434E2318, MLL3, SYNPR, FLJ10989, C2orf7, LOC115827, LOC91862, MGC13016, USF1, DGKZ, LAMA3, DKFZp564B0769, A2BP1, KIAA1560, LOC221002, BG1, ENT4, RNF3, CHAC, ICAM2, FLJ10493, EIF3S6, TRA@, FLJ25604, TUBGCP6, GATA5, PGS1, HT014, C20orf6, NAV2, KIAA1357, GABRB3, FLJ10378, HSPC150, ADCY3, BICM103, MGC3067, APC10, BOC, LOC120379, KPNA4, FKBP7, C14orf50, FLJ22557, NUDT10, DDX17, FLJ22729, TA-NFKBH, FLJ10785, FLJ32745, WHIP, CTLA4, MRPL30, MRPS25, FLJ10498, CDO1, FTCD, SPTB, KIAA1323, DKFZp761F0118, MGC2452, AKAP13, LMLN, LOC112840, FUT10, TP73, PDCD7, KIAA1274, Tenr, CRK9, KIS, SPG7, HSFY, LOC92691, POLH, SMC6, MSCP, FLJ10378, DKFZp434F1819, CSTRF3, CPNE4, HINT3, HSPCA, KIAA0982, P53AIP1, INGS5, DKFZp434D0513, STI2, SEC14L2, BCL11A, EPI64, FLJ25530, GPF49, IRA1, ARHGEF7, USH1C, RBM6, DSCR8, FLJ35863, NXPH1, MGC46719, MGC10981, ZNF398, CYBB, MGC4170, KRTAP9-4, NCOA6IP, HCAP-G, DMRT2, CORO1A, C12orf22, MLL, KIAA1753, DMRT3, KIAA1557, RAD18, FTCD, EIF2C2, KIF13A, DLL3, KRT19, TRA@, SCAND2, FLJ25286, ZDHHC4, SEC13L, GPR92, ZNF207, FLJ14600, USP2, HDAC9, PRKWNK3, DISPB, CENPH, MGC29667, LOC149420, PRPF18, CHD2, KIAA0599, MGC16824, IRTA1, ZFP28, LOC112840, KIAA1411, LOC51194, SLC4A5, LOC115098, KIAA1720, MGC40397, FLJ36874, NESH, TMF1, LGR6, PFI, MGC16943, TUFM, HERC2, DKFZP434N1511, FLJ12697, NLN, FLJ32827, CSRP2BP, RUFY2, RBM11, UBE2I, YAP, LRP15, CFLAR, OSBPL5, NPD007, ZIC4, OR51E2, MGC17301, PAX6, FLJ12697, MGC35366, U2AF1, TU12B1-TY, BAG2, SLA/LP, BICD2, KIAA1465, DKFZp434G0522, ZNF354B, FLJ10420, DARS, KIAA1444, BCR, EPB41L5, RNPC2, HTATIP2, KIAA0436, NS1-BP, LENG3, GLS, MIXL1, WDR9, DKFZP586M0122, KNSL5, G3BP, KCNJ2, PTBP1, DKFZp434N1415, SEMA6D, LOC63929, PTER, NAV1, FLJ39441, MIDORI, MGC14793, BAT4, FLJ12987, SEPP1, NYD-SP17, ZNTL2, FLJ35725, C6orf12, GSBS, MGC40157, KIAA1458, AUTS2, FBXL12, KIAA1453, C20orf44, MGC20533, PGS1, FLJ11053, MRPS10, EML4, MGC14793, POLR3K, RINZF, MOBP, FLJ12298, PIST, DELGEF, MGC2629, NPHP1, DKFZp434D1428, ARNTL2, NDUFB1, DKFZP667C165, FKSG42, HAL, WBSCR22, MRPS25,

10

20

30

40

DHCR24, LY6G6D, LCHN, DKFZp761A052, DKFZP434G156, TBX3, FLJ21839, BRUNOL4, NYD-TSPG, KIAA1706, STYX, MMD, LOC113521, TRIM35, ZNFN1A4, DKFZP586B0319, KIAA1798, FLJ30829, FLJ14281, DKFZP586G1517, MGC2629, DDHD1, CRSP6, FLJ11252, TRB@, GNAS, FLJ12975, KIAA1458, COL12A1, SPINO, KIAA0478, FLJ20085, SOX7, DRF1, TDBN100, BHMT2, ZFP91, SRMS, MGC15523, KIAA1919, FLJ23816, FLJ11125, C20orf151, STK31, RTBDN, FKSG83, GLI4, FLJ22548, KIAA1912, C20orf42, TRIPIN, NDUFS7, HSPC135, MGC20460, YR-29, SCDGF-B, KCNJ15, CLLD8, ZDHHCS, MGC10724, MGC33215, DKFZp547E052, DEFB118, MGC24039, KIAA1046, FLJ10936, ACMSD, B2M, TGM7, MGC3165, TRPM8, WHIP, LZK1, LOC90990, IRTA2, KIAA1560, NXF2, KIAA1317, DXY5155E, FLJ31958, HSPC154, H19, BAP29, PRKRA, PLAC3, LOC58486, FAPB4, LOC130617, JAM3, LOC57019, TF, USP24, FLJ20222, FLJ20354, KIAA1836, MGC3040, SAC2, BARHL1, DSCAML1, STK35, KIAA1337, KIAA1276, LOC115557, FLJ14600, ROCK1, FLJ38359, MGC33215, ATP9B, UBE3B, C7orf3, PRKWNK4, DKFZp434J0617, MAPK1, PRKCE, KIAA2028, GBTS1, KIAA0716, DMRTC2, FLJ10998, FLJ32069, LOC115330, FANCA, DGCR14, KIAA1337, FLJ23577, FLJ22761, FLJ35155, FLJ22329, FLJ14427, FLJ20557, FLJ20321, ROCK1, PPP2R2C, BCOR, FLJ00058, LAMA1, FLJ20898, FLJ31606, PCDHB4, DKFZp547M109, CLASP2, KCNQ5, LOC51240, FKSG79, OAZIN, FLJ13576, MGC4473, LACRT, NAG73, HSA251708, HSI001348, TRA@, DKFZP434A236, MNAB, HAP1, MGC24995, DKFZP566C134, KIAA1501, MGC13090, C8orf13, GGTL3, FLJ35757, CRYPTIC, C14orf35, KIAA2015, FLJ12303, LOC92033, FLJ20171, FLJ31340, TMPRSS2, RIP60, ZNF272, FLJ20641, RP4-622L5, CENTA2, C20orf64, HHLA2, DPM1, PRKCL2, GNG2, および RTN4IP1.

10

【 0 1 5 8 】

(表 7 A) HSC に対して非継代腫瘍形成性において上方制御された遺伝子

KRT19, C3, GOLPH2, CRIP1, PTGIS, BF, RAI3, CA12, S100A8, PPL, TUBB, CXADR, NNMT, ITGB5, COL3A1, FN1, C1S, CD14, EFEMP1, COL1A2, GJA1, FLJ20151, LGALS3, TACSTD2, LGALS1, FN1, MUC16, COL1A2, KRT7, RARRES1, DSP, ID4, HRASLS3, S100A11, CYR61, SLPI, C4A, LGMN, S100A9, SERPINB2, MAFB, COBL, WT1, TGFB1, SPUVE, CD24, DKFZp564A176, ANXA2P2, S100A10, ROR1, EGFL6, FN1, MUC1, ALDH1A3, PARVA, CDH3, FN1, TIMP1, MGP, AGR2, KRT18, DC12, CH13L1, CD24, FLJ20273, ID3, H11, HLA-DQA1, ANXA2, SERPINA3, RAB31, ANXA2, RAB31, EMS1, FER1L3, KIAA1199, CX3CR1, FLJ11619, KLK11, CD24, TIMP2, CCND1, LOC51760, FLRT2, HP, GPRC5B, IL13RA1, APOE, GAS1, PPIC, MAPK13, KIAA0882, APM2, PLAT, MYL9, MYO6, COL3A1, ANXA2, RAB31, IGHG3, PMP22, FAT, S100A8, MARCO, PTPRK, PTPRF, CD163, DF, C4B, COL1A1, IGKC, TFF1, TGM2, CTS1, ITGB5, GALNAC4S-6ST, IF, RARRES2, ADAM9, VCAM1, CD9, ID4, APOC1, PDEF, VIL2, GRIA2, RIG, MET, GNG12, CD163, FLJ22662, CAV1, PRG4, CDH11, IFI27, TM4SF1, NNMT, DUSP4, THBS2, COL6A1, FGFR2, TNXB, A2M, UPK1B, BCHE, IFI30, MAF, KIAA0752, TPD52L1, KRT8, FXYD3, CKAP4, ALDH1A2, ANXA8, BCMPI1, ALDH8A1, ASS, EFEMP1, LTF, FLJ20151, T1A-2, SELENBP1, CTSB, GPR64, TJP1, RARRES1, SYN47, PDGFRA, PRSS11, AQP1, COL5A2, EPHA2, ITSN1, SULF1, PTPN3, LGALS2, OGN, CTSB, IER3, FMO1, SNCAIP, PPAP2A, MGC2376, GATA6, IL1R1, CD1C, MEIS2, TACC2, C1R, AQP3, LR8, SLC7A8, S100A6, ATIP1, MIG2, TNXB, MAOB, DCAMKL1, DPP7, ANXA3, RBP4, zizimin1, CH13L1, FARP1, CLMN, BNC, HCA112, CSPG2, CD24, EMS1, CEBPD, IL13RA1, RIL, COL4A5, KDELRL3, CAP2, MAF, TFFI2, DOC1, CSPG2, LGI2, Z39IG, CYP1B1, CAV1, ALP, ERBB2, LAMA4, CSPG2, LOC113146, LAMP3, ARGBP2, MNDA, DKFZp564I1922, CAV2, MARCKS, TPM2, LOC92689, GFPT1, N33, SECTM1, WFDC2, CLU, ROR1, TST, EFS2, GUK1, C1QB, CPE, CRYAB, TSTA3, CALB2, EGFR-RS, PPAP2A, PTPRG, SAT, TFAP2C, C2, RCP, SULF1, SFN, LAMB1, IL13RA1, PHT2, BMPRIA, LIM, FLNC, N33, ST5, CSRP2, FLJ23091, PAPSS2, IGSF4, TNFRSF6, STEAP, BACE2, SERPINB7, CALU, PDXK, PPIC, TACC2, CLDN4, GPNMB, RIN2, KIAA0599, LUM, KIAA0790, CARD10, MVP, PDGFRL, RRAS2, KIAA1078, AKAP12, ARHE, RNASE6, BLAME, TM4SF1, T1A-2, KIAA0869, MPZL1, NID2, DDR1, DUSP4, LAMA5, SGCE, UBD, LGALS3BP, ENPP2, SGSH, COPE, KRT5, SEMA3C, IGKC, COX5B, ELOVL1, S100A14, APEG1, ALOX5, TM4SF6, LMNA, DSTN, RAB20, DNAJB2, TYROBP, UPK1B, KDR, P4HB, FLJ11856, C1orf34, ADM, NR2F2, PLXNB2, ITPR3, S100B, SOX9, DCN, EPS8, EFA6R, ZFPM2, PPFIBP2, SERPINF1, NQO1, NMA, AADAC, COL6A2, SERPINE1, MT1X, MGC3047, NCKAP1, DDR1, TLE1, EPN3, TBX3, CD31, HSPB1, DPP4, CTSB, NEO1, TMEM8, NFIB, FKBP2, TNFRSF11B, FGR, FMOD, P4HA2, TNFRSF12A, ERBB3, NQO1, LAMC1, PRO1489, IGFBP3, MYO1C, KIAA1026, SLC6A8, PDE4A, HML2, FLJ21562, C8FW, MS4A6A, KCNK1, C3AR1, AK1, MT2A, KLK10, KIAA0429, IGSF3, ARNT2, DCN, C12orf5, CD24, C4.4A, SFN, CRABP2, VIL2, CLECSF6, HCK, SIX2, TSSC3, CCR7, GFPT2, TUBB-5, ENAH, SLC16A4, C11orf9, FLJ20761, SAR1, GPC1, MYO1D, RGS16, DCN, MT1L, PCDHA12, SGSH, RHBDL2, GLUL, CKMT1, NPAS2, EMP2, DAB2, DSCR1L1, MATN2, BLVRB, PLAB, MTIG, WIT-1, OASIS, PPP1R3C, NQO1, AMOTL2, TNNT1, AZGP1, PARG1, SLC7A7, COL5A2, NEDD4L, DCN, SERPINA1, DFNA5, SAMHD1, IQGAP1, THBD, DPYS, ADAMTS5, MGC10848, NEBL, RAL2, TUFT1, KCNJ15, LIF, CD151, DAF, IL1R2, NRXN3, HK3, FCN1, CXCL1, CALD1, PCDH7, C1orf13, TRD@, NFIB, VEGFC, CCL22, CD63, CTSZ, KYNU, ADFF, HRH1, CTGF, GRIK2, ANG, KIAA0790, SNK, CST3, SDRI, KIAA0703, MGC35048, ANXA9, YAP1, ADH1B, CLDN1, TIP-1, COL18A1, DOK5, GPRC5C, IGSF4, ABCA8, KDELRL3, PPAP2C, KIAA0440, IGF2R, VLDLR, OSBPL10, SLC12A8, NPD009, RPL37A, MAPT, FARP1, LAMP1, DAB2, KRT17, SSH-3, ABCA3, PHLDA1, FBXL2, LOC114990, LOX, ALDH3B1, RIG, SDC4, CGI-38, ZFP36L1, FOLR2, DLG5, PFC, BGN, DSC3, WARS, FLJ21610, MGC2494, PCOLCE, FCER1G, FGF13, MD-2, UGCG, BAG3, MAOA, CAPN2, CCR1, TRIM2, CLU, NR2F6, KIAA1598, GPR65, TRD@, PPARD, HSPA6, KIAA0436, DP1, GRN, ABCA1, CD59, ITGA3, NT5E, SLIT3, CDC42BPB, ZNF144, LTBP2, FER1L3, PCOLCE2, FST, CSTA, CLECSF6, HOMER-3, LDB2, SLC34A2, TEAD3, PMM1, EFEMP2, HN1, FLJ20539, TPM1, CXCL6, MPZL1, DKFZP434B044, GS3955, CHST6, RPL5, IL1RL1, RIS1, SN, CDKN1A, PIGPC1, SLC4A2, SMARCA1, GBP2, RNASE4, EFNA1, MCP, DPP4, HSPA1A, LRP10, GRN, SLC39A1, PFN2, BC-2, WNT2, FLJ23186, TPM1, SIAT4A, RNASE1, PLS3, TIMM17A, DDR1, FLJ20366, EFN2B, PSHL, MEOX2, KIAA0429, SDC2, MGC10796, SERPINB5, CAST, MYO6, CRIM1, TFFI2, NCF2, FLJ22531, LISCH7, SLC7A11, MGC11242, PKNOX2, RARRES1, FBPI, CLIC4, CAST, C5R1, SPR, BCL6, RIPX, GRN, KIAA0934, HSPB2, SPARCL1, CTSB, S100A11P, IGF1, BCAR3, ASTN, RRAS2, FLJ21562, KIAA0992, FHL2, HLA-DOB, LAMB1, MAP4K4, EFEMP2, KIAA1029, PP1057, SLC7A8, TLR7, MMP15, WDR1, GHR, TJP1, PCDHGC3, MMP19, ARHD, RIL, NOL3, WNT5A, RAB17, F-LAN-1, IGF1, BMPRIA, TLR2, FTS, EPB41L1, TPM1, CD1D, YKT6, GRIM19, WARS, AXL, MIF, CLIC3, MAPK13, SSB1, SEC61A1, PDGFRB, IL10RA, CLTB, PCNP, SNAI2, SGCB, CYP39A1, FLJ90798, SBB131, FZD2, AMMECR1, SOCS5, KIF1C, S100A13, CLDN7, PBX1, TJP3, RGL, FKBP11, GRP58, EIF5, IGFBP1, FLJ13612, G0S2, TNFAIP1, TIP-1, PSEN2, PPIB, DAG1, ARF4, AHNK, LOC115207, PCDHGA1, MST1R, SH3GLB1, SC65, MGST3, BMP2, CTSB, TMSB10, TRIM38, ITSN1, MPZL1, ARHC, KIAA1078, PLTP, CRIM1, C11orf24, KIAA0746, MGC2376, COLEC12, BBOX1, WNT2B, HUMPPA, PAM, MAP4, FLJ21918, SLC2A6, MYO1B, NFE2L1, DXS9928E, SLC1A1, TUBGCP2, SULT1A1, QSCN6, LOC51159, PSK-1, CYB5R2, RAI14, L1CAM, KCNMA1, CD1E, HOXC6, THY1, PTOV1, EDG2, SUGL2, AQP1, DDR1, TMEM4, EDG2, FLJ22833, KCNK15, KIAA0417, TCF21, ASML3B, HSPC163, LAMA4, APOC1, DKFZp761F2014, SLC21A11, CXCL14, FCGR2A, FLJ20967, MRPS12, FLJ13110, KIAA0913, SHC1, DP1, TLE1, SLC2A10, PON2, SPAG4, ITSN1, ACT17A, RBPI,

20

30

40

IL1RAP, C22orf2, ATP1A1, DES, MST1, PHLDA1, KIAA0934, S100A2, ID4, ITGB4, CASK, SLC31A2, C21orf97, CD86, FBXO9, AP1M2, D2S448, ADCY9, PALMD, PTPN21, TRA@, PP1B, EPB41L4B, PNMA2, RSN, SYNGR2, SLI, FYCO1, CLTB, MGC16723, CKAP4, PLEC1, FLJ10521, B4GALT4, ID1, CDA08, OPTN, PTHLH, MYO1B, LIM, TLR5, FLJ23516, CAST, CTS2L2, CSF2RA, C14orf58, SLC7A8, TREM2, CST6, ARHN, ST14, PTPN13, SLC5A7, DUSP5, B4GALT4, DKFZp667G2110, TWIST, SC65, PPP2R1B, ITGB5, KIAA1096, EVI5, RAB2, CTSD, SLIT3, KIAA0284, NPY1R, HERPUD1, PMM2, HSD3B1, HPIP, UNC119, KDELR2, FLJ10199, PLOD, GTF2IRD1, SQSTM1, BDKRB2, WSB2, DPP3, LOXL1, SEMA5A, TMP21, CLTB, DNALI1, CXCL13, FZD1, CNN3, KDELR3, ADAMTS2, MD-1, TAT, FLJ20234, DKK1, FLJ10856, TM4SF6, KIAA0152, FBXO2, CLECSF12, PRSS16, KIAA0103, UGDH, YIF1P, P8, SNTB2, GOSR2, KDELR2, D4S234E, HAPB4, ANKRD3, CCL18, TEGT, EGFR, ATIP1, EPHB3, H_GS165L15.1, TCEB2, AGRN, NBL1, FLRT3, NPAS2, SCO2, MAOA, NFE2L1, APLP2, MED8, LRP2, SMARCA1, TJP2, p47, FLJ10055, EPS8R1, TGIF, AGRN, SEMACAP3, DSC2, FBLN2, ORMDL2, ADAMTS3, PTGDS, CENTG2, MMP14, SNARK, PTGER3, DPH2L1, PTPN21, DSCR1, PP1665, PTK9, AFFX-HSAC07/X00351_M_at, HAMP, TOB1, FACI3, GMPBP, CSRP2, P4HB, NPC1L1, PIG7, VNN3, ARK5, PODXL, ACADVL, GNPI, FLJ10261, UPLC1, SFN, PEA15, MLCB, SLC31A1, ICAM1, UP, SLC4A4, C11orf17, PTGER3, ZFP103, CYP-M, HMOX1, SLC21A9, TCN1, SLC20A2, RBSK, WNT4, CYBB, ANXA4, DNAJC3, MIRO-2, ARHGEF4, SULT1A3, GOLGA2, PTPRF, NDUFB7, TBC1D2, MSRI, CORO1B, FADD, ATP6V1D, ALDOA, EPLIN, MST1, TDO2, ETV2, CCR5, SERF2, GTPBP1, COL4A2, ASPH, ELMO3, DKFZP564A2416, BAIAP3, APLP2, PDE8A, IFNGR1, GREB1, ANXA2P3, CAPG, PTS, N33, MGC11256, PLA2G4C, HFE, FLJ90798, FLNA, LMNA, IRX5, SRPX, LOC160313, SLC33A1, CSTB, FLJ20152, ATP6V0E, HSPA1A, KRT6A, SAR1, POR, NDUFS8, CCL2, B4GALT1, TMSB4X, FLJ20701, ACTN1, IL4R, F5, CD5L, IGFBP3, ALOX5, AUH, CKAP1, CCR1, KIAA0843, UGTREL1, GAS2L1, AP1M2, RARRES3, PPGB, LY6E, GNB2, CTNND1, FPR1, ALDOA, PC326, KIAA0980, PGM3, DHCR24, PTGDS, LAMB3, ALDH7A1, KIAA0716, TC10, KIAA1096, IL1RN, C11orf24, FDXR, SERPINB3, COL6A1, FLJ20296, DTNA, IGF2R, TRIM36, FLJ22593, IFITM2, ARHD, KIAA0220, OCLR, SDC2, KIF3B, GALNT10, PRKAR1A, VTI1B, PSAP, PTPRO, FGF2, PCSK7, SUCLG2, ERP70, FLJ20254, MLP, CORO2A, IL13RA1, RGS16, MEIS3, FOLR1, LGALS8, LADI, TGFBR3, NDUFA3, LANO, AFAP, SGPL1, UBXD2, GM2A, PCDHGA10, PACSIN3, CFL1, PAM, GOLGA2, GSTM3, CREB3, C14orf92, IGL@, FLJ21313, SYNE-2, EPHX1, MRPL17, PCDHGC3, MAP3K6, DNCH1, TM7SF1, LARGE, VRP, IL6, KIAA1096, SARS, PSMDS, COX17, GPX4, SULF1, NEU1, ISGF3G, PLP2, CYR61, ATP6V1D, EIF5, FLJ20847, DKFZp761K1423, FLJ11526, EHD1, KMO, KIAA1735, RGS3, SDFR1, ASM3A, FGFR2, FCGR3B, TPM4, CPE, FLOT1, CNGA1, SPHK2, FBXL7, SH3GLB1, LAMP2, EHD1, PLXNB1, VCP, SNCB, ITGA5, FLJ21047, STAT3, PSMC4, CALD1, DES, ALDH3A2, VDR, PAPSS2, MGC13523, ARF1, NDUFA2, PPAP2B, FUS1, ASNA1, TUBB4, MGC4504, RGS19P1, ATP5H, TSTA3, Cab45, RDH11, ECGF1, TMEM2, GALE, WSB2, NSAP1, WFS1, HSPC003, GOLGA1, SH2D1A, FLJ20986, KRT17, UNC84A, MYL6, LAMC2, FGF18, HS2ST1, RNPEP, TC10, FLJ14675, MGC3178, TM9SF1, GALNS, SORT1, HSPC019, SULT1A3, ENC1, RAB9A, CED-6, C21orf97, HFE, FUCAL1, KIAA0674, EHD1, PLAUR, CETN2, TPBG, CYP27A1, MAN1C1, PPP1R13B, ATP5J2, THBS3, FKBP10, YKT6, PIGO, CYP4F12, LRPAP1, ITCH, MLF1, ACTN4, EIF2AK3, PDE4DIP, DZIP1, TUBB4, SEC24D, KIAA0143, ITPK1, FLJ13110, AP2B1, IFITM2, SCN8A, STS, CDC42EP4, ARPC1A, CD2BP2, CACNG4, SULT1A2, TAF10, BRD2, TRAM, HSF2BP, UBC, ADAMTS9, AQP9, RALA, COL15A1, DYSE, LAMB2, RPL5, EHD1, CLCN3, ARF4L, HDLBP, NPR2, HRB, SQRDL, MIG, NAV2, TBC1D1, TPD52L1, VTN, ARL1, CYB5, LGALS8, COPZ2, FLJ21916, FLJ20421, P4HA1, TBL1X, ANGPTL2, KIAA0992, NRP1, SLC21A11, ICMT, STS, EIF5, PIP5K1C, RDS, PVRL3, PON2, HIG1, DLAT, LOC64182, RNF3, ACAA1, UQCR, FLOT1, TC10, DSTN, TEAD4, RER1, TREM1, IL17R, PLCE1, SLC6A8, HMAP4, PILR(ALPHA), TRIM38, TXNDC4, CTSK, DSSI, LPHH1, SGCD, PEN-2, KIAA0527, RRAS, CD3D, LANCL2, P2RY6, TUBB, RAC1, AAK1, LOC51762, ALOX5AP, GNB1, FKBP11, RNASEH1, EPB41L1, GPRK5, GPI, HMCS, PTGER3, SSR4, FKBP9, AK3, CBLC, SGPL1, PLCD1, MED8, ALDH3A2, IGSF6, KCNN2, HS3ST3A1, MLCB, TRIM38, FCGR3A, IFI35, ABCA1, DKFZp564A176, FSTL3, MAPKAP1, ENTPD3, FLJ23514, HS3ST1, IGHM, PM5, NDUFB2, TOMM22, ANGPTL2, KRT7, SSH-3, ELOVL1, NPEPL1, NEDD4L, PARVA, PTK2, SEMA3E, NCBP2, KMO, QP-C, ECM2, ATP9A, HMOX2, SMAP, SLC9A3R1, ATP1B1, PCDH7, EDF1, OPCML, NEDD5, FLJ10466, CBX6, CDH6, MAN2B1, CYB5, SLC38A6, FLJ12443, ASPH, MOB, HUMNP1Y20, DC50, PSMDS, LRRFIP1, FLJ22160, PAFAH1B1, DKFZP586L151, BLAME, TAZ, ATP6V0B, APBA2BP, RISC, ADRA1A, PIG3, TNFRSF21, CBFA2T1, EML1, EPIM, APOE, WISP1, CA12, VIL2, RAI, FAAH, ATP6V0D1, CD97, JAG1, STX4A, Cab45, NFE2L2, PPP1R12B, ZMPSTE24, KIAA0500, IL17BR, RRAD, PGM1, CD59, ADAM19, NPEPPS, FXJ1, GAA, SOX13, FLJ22638, BAIAP2, DUOX1, TGFA, FLJ20719, LMCD1, BBS4, MARCKS, GM2A, FLJ11200, MAPK3, WWP1, FLJ20152, SMARCA4, PSCA, MCJ, ARF4, SLC35A2, SKD3, CDC42EP4, SLC22A1L, SSH-3, SMARCD3, PDLIM1, IL27w, CGI-135, COXB5, LOXL2, CRK, GOLGB1, PSMDS, MAGED1, CDC42EP1, HSPC171, SEC13L1, KIAA0265, PSEN2, XLKD1, STAB1, FLJ21079, FBLN1, INSM1, FLJ10252, MPDU1, MGC3067, FLJ11181, TPALR, TULIP1, DUSP8, UBXD2, CPD, HSPA4, FLJ11807, GPR1, CTNND1, TNFAIP2, MAGED1, MMP9, CKAP1, UGCGL1, SMP1, FLJ22678, BZRP, COX8, BDKRB1, HOXC4, H19, NMES1, SMOC2, PIGPC1, TEM8, PTGFRN, FLJ23091, IGKC, ALS2CR9, IMUP, MIG-6, MAL2, SPUE, YAP1, CXCL16, MYO5B, KIAA1244, PARVA, SYNE-1, FGG, AGR2, KIAA1500, RERG, NTN4, TMPRSS3, ARHU, RHPN2, GLIS2, UGCG, SULF2, BOK, OGN, CLDN1, DKFZp434G171, FAD104, KIAA1165, ShrmL, PTGFRN, AD037, OSAP, LOC51760, MS4A6A, FLJ20273, MS4A6A, FLJ23153, NAP1L, LRG, LOC55971, MGC14839, FLJ30532, UNC5H2, FLJ14299, TCEA3, CTL2, ORF1-FL49, LOC155465, ENAH, OSR-1, SBB131, DAG1, EDG3, PSK-1, MGC2615, ALS2CR9, DKFZP761L0424, TBX3, FZD4, FLJ20171, DKFZp761P0423, NGEF, TOB1, CIQG, DNALI1, MGC35048, GUK1, DKFZp586C1021, KIAA1500, LOC83468, p25, CCL26, GNG12, SAMHD1, ID4, B4GALT1, DKFZp434D0215, GJB2, FLJ14957, PRO2605, MGC13040, CHDH, ALDOA, FST, TEAD2, KIAA2028, FLRT3, FLJ31842, CDKN2B, MGC16028, IRX3, TEAD1, MGC33662, MS4A6A, SEMA6D, DKFZp434E2321, PKIB, PKIB, KIAA1671, FLJ22174, LOC128153, COTL1, SAMHD1, MGC24103, UACA, SELM, CGI-85, NAP1L, CAMK2D, C4orf7, BOC, MGC11034, DKFZP564J0863, DKFZP434H0820, PARVA, SPP2, FLJ40432, STEAP2, PDGFA, BACE2, FLJ14834, LOC55971, ANGPTL1, MFI2, KIAA1337, WNT7B, IPP, DKFZp547D065, MGC39325, CTL2, SAMHD1, LNX, MGC26963, KIAA1324, MGC16212, KIAA1921, ALS2CR9, CXCL14, SPPL2A, FLJ14525, ENPP5, MGC29643, TCF21, ECGF1, PCDHB14, CFL2, GRP58, TGFBR3, DKFZp434F2322, FLJ22474, RCP, KIAA1866, MGC10974, PHLDA1, MGC12335, SYTL2, LOC51242, PCDHA10, KIAA1145, KLF15, TMEM41, GRIA2, LOC92689, SIPL, H19, FAD104, C11orf15, MGC39329, MAFB, BCAR1, RDHL, C14orf50, DRAPC1, RORC, MYEOV, GPR92, DUSP16, GFRA3, ZD52F10, FLJ14735, LOC113026, FLJ20048, CLDN11, CDH24, TLR8, FLJ31052, C(27)-3BETA-HSD, YAP1, EMS1, GATA5, FLJ23420, FLJ10035, IL28RA, MAF, HMT-1, DERM01, DIRC2, HSPC163, ARHU, LOC114990, MSTP043, CGN, DUSP16, ODZ2, INMT, GPR, CRBPV, FLJ22558, KIAA1145, TCEB2, LOC55829, SEMA4B, COL12A1, MGC11034, KIAA1576, MTA3, ATP1B1, C20orf155, SDCCAG28, MGC16028, CXADR, CTSEB, KIAA0146, MGC33602, CLDN12, RAB23, DKFZp434F2322, PRO2714, BTBD6, MRPS10, SNX9, IL4I1, DKFZP434I1735, LOC91523, AFFX-HSAC07/X00351_M_at, RERG, FLJ14642, FLJ22833, MYO5B, SDCCAG28, RAB10, LBP-32, C14orf31, DZLG5, FLJ22415, PCDHB16, MGC10204, C21orf63, DKFZP434K0427, NRP2, KIAA1870, TEAD2, SPTB, FLJ33516, SURF4, NPD007, PCDH20, MGC19825, MGC26818, MGC4604, KIAA1337, ESDN, FLJ23091, MacGAP, CGI-85, C8orf13, FLJ40021, MS4A7, LTBA4H, PLEKHA1, SORCS2, CRIM1, FLJ11200, HS6ST2, FLJ10697, WW45, LOC132671, DCAL1, SNX9, DKFZp761K2222, IGSF9, LOC57168, LOC90701, GPCR1, AK2, FLJ31564, KIAA0599, ANGPTL1, FBXO25, KCNK6, MRPL41, FZD8, UGCGL1, COPZ1, RBMS1, C20orf23, Cab45, TRIM7, OAZIN, FLJ10210, SYTL2, FLJ20442, C20orf139, KIAA1394, C20orf110, MGC1314, C20orf52, CNN3, MacGAP, CAC-1, MAP1B, FLJ40021, PRIC285, RAP2B, TMPIT, KIF1B, GFRA1, DKFZp762A217, XPR1,

10

20

30

40

EMILIN-2, FLJ32069, SMUG1, ARF1, NDUFB10, EHF, NT5E, CORTBP2, FLJ32194, FLJ90440, LOC147700, MGC21874, KRT19, PCDHA10, DTNA, RGC32, ULBP2, H2AFJ, CFL1, MGC2601, DKFZP566F084, SLC26A9, KIAA1404, PX19, APOA1BP, WASL, TLR7, FLJ20739, FLJ25157, FLJ22833, MGC14353, DKFZP566J2046, SNX8, BHLHB5, TAF10, FLJ14594, MRAS, FLJ14511, UBXD1, AMID, ANKRD9, ACTR3, TMEM9, DKFZp761N0624, FLJ20748, ROR2, LOC91461, TLE1, SEC14L2, BAT5, SSB1, E2IG5, KIAA1357, MBC3205, FLJ11046, FLJ14681, HSPC242, DKFZp547A023, CED-6, KIAA1715, TNKS1BP1, ATP11A, EHD4, INADL, FLJ11011, KIF3B, DKFZP434K0427, FLJ32069, CSEN, DKFZp761D0614, MRPL41, PXMP4, LOC84518, LOC115265, LOC51255, ATP6V0B, N4WBP5, GGTL3, MAGI-3, MLLT4, LUC7L, ERO1L, MGC13114, MGC39807, CAPNS1, TRIM47, GPR34, KIAA1200, N33, PSCD3, NSE1, BAL, C20orf24, MGC22805, KIAA1337, CDH11, LOC51248, KIAA1126, FLJ90119, PVRL2, ARHC, SSBP4, DNAJC1, E2IG5, FLJ10702, NUMBL, SET7, BRI3, FLJ32069, FLJ20097, KIAA1870, C14orf31, TP53INP1, NCAG1, GSH-2, FLJ21963, KIAA0599, MPP5, SCDGF-B, AXIN2, CGI-149, CGI-97, MGC19825, DNAJA4, SMOC2, MRPL27, KIAA1542, ARHGEF5, CAMK2D, SLC21A11, FLJ37318, C20orf64, D1S155E, UNC84B, MGC26963, dJ55C23.6, GK001, CPNE4, MGC16491, FHOD2, HTPAP, KIAA2002, PRDM6, FGFR1, DKFZP564B1162, HLA-C, PRDX5, FLJ20623, FLJ20719, C14orf47, MYBBP1A, RDH13, DPP3, PCDBH18, NOL6, JAM1, LOC54516, FLJ10210, NRXN3, MRPL53, KIAA1643, MGC15523, LOC115704, BRI3, GTAR, KIAA1434, MGC33510, FRABIN, UBQLN1, MGC3195, FBXO32, SMP1, FLJ10902, C1orf13, CGI-72, MGC45474, TRIM8, HM13, NFKBIE, FLJ22004, AD-003, MMP24, RBM8A, DNAJC5, C20orf169, NOR1, METL, MGC2747, FLJ14251, DKFZp451G182, KIAA1363, FLJ23393, RNF19, STK35, AMID, MGC4604, FLI1, DKFZP566J2046, SNAP29, DKFZp547A023, DKFZp434F2322, SLC17A5, FLJ14117, MGC4342, SLC31A1, MGC2555, KLF2, NKD2, SEC61A1, LOC91012, MSTP028, FLJ20421, MGC40555, KIAA1554, AD-003, SURF4, GALK1, FACL6, DKFZP434D146, GP2T, BRPF3, KIAA1165, SLC30A1, FLJ20542, KIAA1255, JUB, SYNPO2, SURF4, MGC2550, LOC90507, SYNPO2, ARFGAP1, KIAA0599, DNAJB11, UBE2H, C20orf149, PHP14, FLJ23577, FLJ23654, LOC51290, DJ667H12.2, FLJ23277, LOC115098, DKFZp547O146, LACTB, FLJ90575, NEK6, Cab45, MGC13045, SRA1, DPP9, SFRP2, LOC113179, KIAA1784, C20orf149, CGI-09, GBP2, PDK4, HRMT1L1, MGC33993, MESDC2, IDS, RDGBB, RPL17, TEAD2, SEI1, C04F58, HSPC210, KIAA1163, KIAA1223, RAB18, NFKBIA, SEPP1, B7-H3, MGC33607, CAB56184, SDCBP2, PCDH18, SPEC1, RAB18, SH120, MGC11102, MGC19825, LMLN, REN, CALM2, PPP1R14A, NDUFB9, KIAA1026, MGC20486, FLJ30803, AKIP, LTBD4H, DKFZp547A023, C20orf167, FLJ31937, FLJ20186, APXL2, CFL2, CGI-20, KIAA1437, PVRL2, KIAA1295, KIAA1912, DC-TM4F2, CDW92, RPS27L, CAMK2D, RAB18, FLJ21415, MGC10999, KIAA1896, KIAA1337, CGI-69, および STC1.

【0159】

(表7B) HSCに対して非継代腫瘍形成性において下方制御された遺伝子

HSPC053, HOXA9, SPINK2, HOXA9, MPL, KIAA0125, BEX1, FLJ14054, CD69, ANGPT1, AKR1C3, LAGY, TNFSF4, HLA-DQB1, ITM2A, KIT, GUCY1B3, PLAG1, PROM1L1, MYCN, MLC1, LYL1, MPO, HOXA10, PCDH9, PLCL2, HLF, SV2, LOC81691, DLK1, HLF, ERG, SOCS2, MYB, PPM1F, PRSS2, BAALC, NPR3, EREG, MMRN, IQGAP2, C17, MPHOSPH9, LOC51659, SELL, MEF2C, TEK, RAB38, FLJ10178, TRY6, NINJ2, FLJ22746, BM046, ICAM2, MLLT3, BCL11A, HMMR, NAP1L3, MPO, AREG, SATB1, LGN, FLJ10713, ERG, PADIS, IGHM, HLA-DQA1, SCHIP1, ARHGEF6, GUCY1A3, TMSNB, TYMS, TAL1, MS4A3, GMFG, FLI1, LPIN1, 6-Sep, C20orf42, TACC3, LOC81558, MCM5, TRAITS, IL8, CXCR4, KIAA0186, RetSDR2, RAMP, MGC2306, LGN, CDW52, HMGA2, PTGER4, NUDT11, ZNF198, PCDH9, FLJ10468, PSIP2, CRHBP, ICAM3, IL12RB2, KIF4A, DKFZp761P1010, FLJ12428, GPR56, CXCL2, PRIM1, BIRC5, PLAC8, TFPI, H3F3B, HBB, NEFH, LMO2, SV2B, ITM2A, BRRN1, MCM2, MLLT3, H2BFO, DOCK2, UBCE7IP4, ZNFN1A1, BCL11A, DDO, NRIP1, TARBP1, HBB, KIAA1750, F2RL1, NRIP1, FLJ10719, CDC25A, VRK1, DUT, PIP5K1B, NR4A2, BCL11A, BM039, HSPC022, 6-Sep, TOP2A, PDE4B, GIT2, JAM2, KIAA1939, MAP4K1, RUNX3, SELP, ANKT, B4GALT6, BCE-1, HBD, PECAM1, E2F3, FLT3, PIR51, TRAP-1, TFR2, P311, HSU79274, CLDN10, DNMT3B, CDC45L, CDW52, PEL12, MGC861, C1orf29, BRCA1, HHX, LBR, TOX, ITGA2B, FLJ11712, LOC81691, PPM1F, STAC, CRYGD, MAD2L1, KIAA0379, ITGA4, PLAGL1, TAL1, PF4, ELMO1, ITPR1, RNU2, SNTB1, RAD54L, HCGIV.9, LRMP, BRDG1, ZNF22, CABC1, TEC, NR4A1, FLJ20898, FLJ21276, FLJ10038, ITGA2B, ADA, SSBP2, RRM2, STMN1, PSIP2, DSIPI, NR3C1, RAD51, SCML2, STK17B, LCP2, MCM7, NT5M, FANCG, NR4A2, SCGF, KIAA0916, PRKCB1, STK18, PRSS21, SEMA4D, KIAA0101, DLG7, FLJ10493, KOC1, PDZ-GEF1, ASB9, SCN9A, KIAA0820, FLJ23468, PTGS2, HIS1, GABPB2, KLHL3, PRKCB1, HIFX, PDZ-GEF1, TKT, AKAP7, MST4, PER1, CKAP2, GSTM5, KIAA0582, PRKCH, AMD1, AD024, CD34, SLC27A2, FOXM1, RAGD, MEF2C, LOC51334, EDG6, HMGB2, FLJ22690, CPA3, ANP32B, GNA15, PRC1, CXCL3, SAH, CENPF, PRKACB, KIAA0092, RFC5, MAP4K1, SPN, SORL1, RPS21, ALDH1A1, VRP, TFEC, KIAA0769, SERPINB1, CTSW, KNSL1, CBF2A2T3, RNF2, KIAA0711, MSH5, CCNB2, PTPN7, FLJ22794, NASP, WBSCR5, RUNX3, CDC42, NR4A2, MCM6, FLJ10719, HLA-DQB1, C11orf8, BIRC5, NSBP1, PECAM1, WSX1, CCND2, E2F1, UPF3B, LOC129080, STAT5A, KIAA0471, SCARF1, KIAA0239, CASP2, PPBP, SFRS5, MCM5, SERPINB1, HSPC157, DKFZp564B0769, PFAS, C4S-2, BANK, H2BFA, HNRPA1, MPHOSPH9, SMCY, NUDT1, KIAA0841, MFNG, HEC, VWF, TUCAN, RAB33A, FLJ13949, HMMR, SRISNF2L, GNAI1, H4FG, RTP801, DACH, KIAA0918, SYK, CKS2, SLA, HNRPD, EHD3, SPN, TNFAIP3, MDM1, DJ434O14.3, NASP, PMSCL1, PLAGL1, RPIA, FLJ13912, FLJ20005, HERC1, CDC2, DC11, ACYP1, TALDO1, MYB, TIF1, DKFZP564D0462, IL1B, ING3, AMT, FLJ20047, GGH, PLAGL1, PRKG2, DHFR, AND-1, ATP6V0A2, CDH7, RACGAP1, ITGB3BP, RPS14, TK1, POLA, FLJ20456, 6-Sep, SMC4L1, RYBP, CHAF1A, HCAP-G, EZH2, POLE2, USF2, PRO2198, BCL2, NUP98, ATP2A3, FLJ10604, AMD1, SMARCF1, IL3RA, RUNX1, FLJ12673, KIAA0084, KIAA1157, HMGA1, COX11, HDGFRP3, SS-56, POLQ, GRB10, MSH5, DDX28, RRM1, CEB1, AS3, DNMT1, TCF8, C04F58, LSM5, TRIM22, KEO4, NR2C1, KIAA0092, KIAA0332, KIAA0308, PSIP1, RNF8, NR3C1, TAF5, TTK, RBM8A, MGC12760, KIAA0056, DHFR, ZFP36L2, RASGRP2, HEI10, NAB1, KIAA0170, NAP1L2, KIAA0286, ABCF2, HYA22, PRKACB, LAIR1, 24432, DCK, TFDP2, MGC2217, HOXA10, KIAA1028, DKC1, C11orf2, C11orf21, SKP2, USP1, FUS2, DNAJC9, KIAA1110, GAB2, ZNEU1, M6A, DLEU1, MAC30, DUT, HNRPD, SIAH1, FLJ14280, KIAA0179, TRIP-Br2, DKFZp564B0769, TIEG, PTTG1, FANCA, ESPL1, ING1, BIN2, KIAA0721, HYAL3, CENPA, LRBA, MUTYH, CAPRI, PSMD11, FLJ11222, PDE4D, AKR1C2, BZW2, SLC27A2, ALDH5A1, BIN1, SLK, NFATC1, TFAM, MAPRE2, ABCC4, CA1, RBM15, PRSS3, PRV1, FEN1, PCNA, LOC58504, OIP5, SMC2L1, ITS2N2, TOP3A, FLJ23053, TIMM8A, APOBEC3G, TRIM9, RPA1, KNSL7, C5orf6, RBM12, MAC30, UBCE7IP5, CUGBP2, ARHGDI, NRGN, SHCBP1, CGI-30, CDT1, DGKZ, RAC2, FLJ20272, C20orf42, SLA, MPP1, KIAA0682, DKFZP547E2110, ARH1, KIAA1172, KIAA0265, SOS2, HNRPA0, GIPC2, WASF1, MGC14258, HPRT1, KIAA0443, CD164, KIAA1466, FLJ23151, FLJ10450, DKFZP586A011, BUB1B, C20orf59, TFPI, KIAA0841, DATF1, SLC18A2, MGC14258, CBF, UBE1L, SNRK, MGC26766, RAD52, SNCA, CHES1, KHK, LRBA, CG018, MBNL, VAV1, BIN1, HIC2, FLJ23018, HSU53209, ELA2, PTGER2, KIAA0555, CYFIP2, MBNL, CLC, AMPD2, CENTB1, PEPP2, ZFP36L2, CENPF, LEPR, C5, FLJ12888,

IGLL1, TLK1, AKR1C1, IAPP, TIMELESS, DNAJC6, PRO1331, TIF1, SF3B3, RES4-25, FLJ20641, TPST2, CENTB1, DUT, CD244, EP400, ZWINT, SNCA, GIA4, AVP, MRPL16, MAN2A2, HADHSC, 6-Sep, MAPK14, TAF1C, LY75, MELK, GMNN, NSMAF, BUB1, HGF, PRNTN3, AK2, FLJ10335, SFRS5, ZNF215, FLJ12735, MGC5528, GABPB1, GP1BB, MYOZ3, RAB6K1F, RFC3, OXT, SMC1L1, Nup43, PDGFC, RRP4, HTR1F, HPS4, ICAM4, STRIN, 384D8-2, ANKRD6, ING4, JAZ1, KIAA0916, FXD6, KIAA0981, HSPC056, FLJ11294, SPAG5, HSPC047, WDC1, ORC6L, ZAP, GAPCENA, LMNB2, MGC2603, POLQ, SFRS7, MYOM2, FLJ10156, WEE1, DPH2L1, MIRO-1, POLG2, CHEK1, SRPR, ST7, NEK9, ITM2C, JIK, PAICS, KPNB1, CGI-32, FLJ20105, PTEN, CDC7L1, FLJ13262, ATPAF2, FGFR4, STAG2, UBE1L, FLJ14007, KIAA0308, H2AFY, KIAA0451, FLJ21478, NFE2, GTL3, KATNB1, RIN3, ICAM2, CREB1, ABCB1, MGC4701, ATF1, LOC90355, FLJ10290, FLJ23392, FNBP1, SMARCE1, CES1, KIAA0419, FLJ20035, LOC51320, PRDM2, TIMM9, RAD51, PPM1B, HELLS, CHD4, MORF, TRIP13, NTSR1, LPIN1, MAPRE2, ZNF278, HYA22, CG005, NPAT, MONDOA, LAPTM4B, RRM2, C20orf1, FLJ20010, PRKRIR, SFRS3, DKFZp5471014, MCM3, PCNT2, NAP1L1, FLJ23476, MYBPC2, PA26, C6orf32, MGC13024, OPA1, RBBP4, BIN1, CAMLG, cig5, PLA2G3, KIAA0592, FLJ20094, HNRPH3, GEMIN4, FLJ13386, TKT, DKFZP434B168, PMS1, FMR2, C21orf66, C19orf2, TFPI, DKFZP564O0523, LRMP, PPP2R2B, ZNF135, ZNF198, FBL, SCGF, CEL, LRPPRC, FLJ12903, FLJ10858, KIAA1041, KIAA0800, PCDHA10, JRKL, SUPT3H, ITPR1, POT1, C16orf5, CGI-48, FLJ22002, SFRS11, SYPL, MSH6, ZNF85, DLEU2, LIPT1, RFC4, FLJ10539, LZTFL1, BM11, CSF1, COX11, UBE2C, LOC93349, ATP2A3, GPC5, F2R, RPL28, TGT, TCERG1, DDX34, LAMP2, CCNF, MY6, CDC25C, LANPL, ADCYAP1R1, SUV39H1, FLJ14213, DKFZP434L0718, FLJ21269, PRAX-1, ANP32A, SRRM1, CDC6, FANCE, H2AV, C6orf48, TSN, FBXW3, CEP1, ZNF161, SF3B3, CDC23, SFRS11, CYLN2, IMPDH2, PIGL, H2AFJ, KL, TNFAIP3, MGC2306, Jade-1, CDKN3, FLJ10287, CSNK2A2, OPA1, TRAF5, RPP40, HTATIP2, ANP32A, WTAP, ESRRB, LOC51185, MRE11A, H4FJ, KIAA0097, WAS, HMGB3, MCM10, NBR2, RPL3L, LAPTM4B, FLJ23277, HSA250839, C19orf7, MGC19570, C6orf32, APEX1, KIAA1387, FHL3, CGI-49, TMPO, CGI-127, TBC1D5, RBMX, SF3A3, FLJ10379, HADHSC, IGHG3, LOC254531, SFPQ, FLJ10154, DKFZP434H132, KPNB1, WHSC1, PRSS3, CCNB1, CYP3A7, FLJ20244, RAB6IP1, SNRPA, LOC115648, BLM, FLJ20136, SYT11, CAT, USP15, PRPS2, UBE2D2, CENTB2, SRP72, TOPBP1, SIL, MAP2K5, SPG4, RENT2, SCAP1, GP1BA, DNAJC9, TPO, ZNF261, TOP2B, PDCD1, IPW, SNX26, PTTG3, ENO2, CNR1, DDX11, CRLF3, KIAA0092, KIAA0433, NBS1, C20orf67, GP5, KIAA0101, BTBD3, GPRK6, TLK2, FLJ20856, PKD1-like, RECQL5, ARHGFB9, FLJ11210, DKFZP564I052, PLCG2, BITE, HYPH, HNRPA1, ATP11B, LIG1, KIAA1473, PTER, PPP1R16B, FLJ10597, KCND1, FLJ22474, MTMR4, SMC5, FLJ20288, MED6, ULK1, DNMT2, ZFHX1B, RPL16, FLJ1184, RNF38, LOH11CR2A, NEDD4, AND-1, ITGA9, CDK2, PGDS, FLJ11896, FLJ21449, LOC93081, MRPS14, ANP32B, FLJ21272, KIAA0555, CDCA4, KIAA1966, FADS1, PRKCN, OGT, TRIP-Br2, KCNE1L, UQCRB, HIF1, SCA7, RAD51C, HDGFRP3, FLJ10565, HINT1, AKR1C1, PTBP2, TCF12, CG005, MPHOSPH9, KIAA0953, OSRF, C14orf94, PNN, NGLY1, LILRA2, CD79B, LANCL1, C20orf16, CCNE2, MTCPI1, PPAT, KIAA0800, KIAA1039, MGC5149, FLJ22843, FLJ12610, MRPS31, C14orf2, RUFY2, NCOA6IP, FBXO4, PRKAR2B, TOX, HBOA, PMPCB, LOC51275, GFII1, MGC21654, TGIF2, LARS, DKFZp547P234, NR4A1, KIAA0036, PHKA2, MYST1, HSA9761, AIP1, TFAM, CDC20, CLNS1A, THY28, ZNF145, FLJ20509, FLJ10890, MAX, FLJ20312, ZNF305, C21orf45, ESPL1, ZNF292, VIP, FLJ13902, HA-1, ARTS-1, AS3, H4FI, THEA, FRAG1, DNA2L, KIAA0240, OIP2, ZNF16, GOLGIN-67, GPR44, MTHFD1, IMPA1, GNB2L1, CNGB1, SYPL, PASK, PTDSS1, FLJ11342, MRPS31, CBX8, TTF2, DYRK1A, CR2, RANBP2, FLJ20003, APOBEC3B, BCM5UNL, KIAA0725, PDE4D, PRH1, XPO1, CML2, HYA22, IDN3, KIAA0261, ZNF175, YARS, CDC6, MOAP1, GLRX, ATP2B2, PPAT, FLJ20530, ZFR, COIL, KIAA1100, PER1, PSTPIP2, TXNDC, PP2447, FLJ13197, CIAS1, JMJ, SYT11, H2AV, SPS, CUL3, FLJ23306, SNRPD1, FLJ10876, NBR2, DKFZP434F0318, SP100, NIP30, BANP, SMC2L1, GPR21, CSTF2T, HSA9761, SFPQ, EFNA2, GRB10, RPS20, KCNAB1, FLJ32069, PUM2, RPL17, FLJ20499, HGF, CCND3, CTSG, ABCC1, PIAS1, PPARBP, DC13, SPHAR, SUSP1, C14orf10, NPFF, PFKFB1, PAPOLB, H2AFY, SPRP2C, STAG3, C11orf8, D6S2654E, INVS, ANAPC1, GPHN, DKFZP564O043, TM7SF3, UBE2E1, NAP1L4, RASA1, MGC12909, DIAPH2, FAIM, UCHL1, C10orf2, NUMA1, FLJ10706, SSH3BP1, FLJ23560, ZNF137, MTMR2, ZFD25, PIGN, KIAA0252, MEIS1, SSRP1, ZNF363, NUP50, FLJ10315, UNG, COL6A1, ZNF10, ILF3, DDX28, MGC4170, TSC22, MATR3, ARHGAP11A, LAG3, LOC51231, C21orf33, KIAA0376, ZNF42, RERE, GalNac-T10, NSBP1, CLEC2, RNPS1, MAP4K1, ADSL, SYNGR1, RPL22, FLJ10716, LHX6, FLJ10546, XRCC5, SP192, JAZ1, INPP5D, HPIP, LOC57019, DKFZP434N062, DEK, EIF4ENIF1, ZFP36L2, FLJ13920, MDS1, KIAA0404, HMGB1, ILF3, SYNGR1, SIAH1, FADS2, KIAA1074, FLJ12788, TAF7, KCNA3, CL640, KHDRBS1, FLJ12377, EDI, MTCPI1, FNBP1, EPS15, BHC80, CHD1L, DKFZP434L187, FLJ20477, SCOP, KIAA0470, ME3, QKI, SALL2, SON, CSF3R, HDGFRP3, EIF2C1, P53AIP1, PCTK2, PAI-RBP1, ATRX, HTR2C, CHAF1B, NXT2, Nbak2, CDC14B, CCBL1, GTF3C3, DNMT2, SLC24A1, AND-1, FLJ13373, SET, USP4, CRSP2, NFRKB, P2RX1, SE70-2, CALCRL, DKFZP434D1335, OSBPL3, TUBA1, DKFZP434N062, DNAJC8, ALOX12, RTN3, KIAA0543, DNAJC8, AFFX-r2-Bs-phe-M at, AXOT, PSMAL/GCP III, WHSC2, DMRT1, TIC, AF311304, NPR3, C14orf93, FLJ10483, IMPACT, TGIF2, TNS, CAPN3, ZNF292, FLJ22557, KIAA0036, CGI-79, H4FA, TFDP2, UBL3, SLC22A6, CGBP, SNRPD1, SCGF, MRPS27, ZNF335, RBBP9, STK12, MAT2A, FLJ11175, KIAA0528, MXD3, CPSF4, HINT1, PPIH, GNAO1, BRD1, KIAA0368, AP1S2, NAP1L1, ST3GALV1, ZNF287, CYP2C8, ZNF291, KIAA0582, GART, EPM2A, , , LOC51194, FLJ21269, EMCN, MGC41924, USP2, HEMGN, MGC24665, ZNFN1A1, CDCA7, SHANK3, Evi1, CDH26, FLJ20171, C4ST3, MGC21854, ST6GalII, CT2, WHIP, MGC16386, FLJ33957, BCL11A, FLJ33069, DKFZP762L0311, ZNF6, DACH, CENPH, EHZF, NIN283, FLJ39957, DKFZP566N034, PTGS1, DKFZP586D0824, KIAA1218, MMP28, NID67, CYR1, 5'OY11.1, BIC, CDT1, FLJ14503, B3GNT5, SDPR, ITGA4, MGC16179, HOXA7, ROBO4, GNAI1, DJ79P11.1, C1QTNF4, RAD52B, KIAA1726, FLJ30046, ARHGAP9, PRDM16, FANCD2, C21orf91, UHRF1, OAZIN, FKSG14, NIN283, EPB41L5, RAB39B, TFDP2, FLJ12994, PRKACB, FLJ32009, KLHL6, FLJ10493, KIAA0748, FLJ21986, NOG, GPR27, EPC1, STIP-1, CGI-105, MGC12935, FLJ20093, HSAJ1454, EVIN2, KIAA1554, MGC20262, FLJ20354, MGC8721, EKII1, MAML3, SEPP1, TRB@, CHD2, MSI2, DKFZP434A0131, KIAA1554, MGC20262, KIAA1798, TMPO, SYTL4, EHZF, KIAA1337, HNRPD, Rgr, FLJ00026, IRF5, MGC4832, MGC34827, PRAM-1, GAB3, ING3, MGC7036, Ellis1, DKFZP761M1511, PRO1635, ZNF367, MYNN, SH2D3C, FLJ11220, HHGP, MCM10, GNG2, FLJ20280, FLJ11252, RPL13, YR-29, KIAA1805, FLJ14642, FLJ12892, CGI-67, OSM, EIF3S6, DKFZP761D221, PAPOLA, MCLC, LOC159090, FLJ20280, KLF12, LOC144455, ALS2, WHSC1, STRIN, UCC1, FANCA, PTPN22, KIAA1677, FLJ23563, MDS006, HMGB1, MGC10744, TIGA1, IL17D, SNURF, LOC221002, CED-6, 1-Sep, CGI-105, LOC134147, FLJ39370, DRLM, LOC85028, P66, CASP2, SLC25A21, MGC10966, FLJ32234, DCLRE1B, CSTF3, ATPAF1, FLJ00026, C6orf33, NY-REN-58, MGC35274, DKFZp571K0837, BRD7, MGC27085, KIAA1084, DKFZP434G0920, MGC45962, MLL, CYR1, KIAA1387, FLJ23306, AF15Q14, RAMP, CCNB1, HSPC063, FLJ11220, C6orf33, NHP2L1, DKFZP761N1114, CGGBP1, USP16, KIAA1789, DKFZP434C1714, FLJ32194, TIGD3, FLJ32549, MGC20496, Lcx, ARHGAP9, STN2, MCM10, GPR114, PP1L3, MJD, UBE3B, WHSC1, LOC51234, CLLD8, C15orf15, TTC7L1, PRO2000, HEMGN, ELAVL4, KIAA1635, CLYBL, NLK, CLLD8, MDM4, MSI2, ASE-1, LSR7, LOC146853, TIGD7, HELLS, LOC159090, TAF9L, DKFZP762O076, FLJ32370, WDR9, HRB2, TIGD2, GAJ, LOC51193, FLJ13614, BAALC, KCNK17, DKFZP313A2432, ARRB1, DKFZP762N0610, DKFZP564B0769, MGC45866, CGI-30, FLJ23277, ROCK1, TRA@, ARRB1, CUL5, DKFZP727C091, FLJ34817, FKBP5, FLJ00058, FLJ90013, FLJ11275, KIAA1211, FLJ13215, HSA9761, EVIN2, DKFZP434C245, MGC16824, HSPC126, HSP70-4, LOC119392, FLJ35382, MMP28, ARH2, SUV39H2, DKFZP761F0118, FLJ10997, NDUFB1, MNAB, MU, FRSB, KIAA1871, RARA, FLJ11712, MGC5306, FLJ30525, FLJ00005, LOC115330, AMBP, FLJ32942, LOC91768, PEC1, KIAA1959, MGC10744, FLJ90013, 5'OY11.1, LOC116349, TSGA14, KIAA1954, HSPC129, KIAA1194, KIAA1238,

10

20

30

40

KHDRBS1, SNRPE, SGKL, FLJ31818, CNOT6L, KIAA0853, MGC39650, FLJ22955, C11ORF30, CKLFSF7, CGI-30, GRCC8, AP3M1, MGC10946, CRSP6, AGS3, DKFZp564B0769, LOC81023, STAF65(gamma), ZRF1, LOC63929, HYPC, LOC90507, bioref, FLJ21438, MGC22679, HP1-BP74, Jade-1, RGM, CYCS, EG1, C20orf92, TPC2, AUTS2, FLJ21918, ZNFN1A1, MAIL, DC6, AUTL1, TAGAP, STARD4, TBRG1, FLJ20354, LSR7, RARA, FLJ14936, FLJ12975, KIAA0379, RIG-I, PPP2CA, MGC15548, HNRPC, ZNF265, TRAP25, DKFZp564D177, MGC33864, HSPC129, PPHLN1, HSPC195, FLJ32020, WWP1, AKIP, TADA2L, DKFZP564I1171, FIGNL1, GRP58, KIAA0141, LOC151648, FLJ20095, FLJ10997, KIAA1545, TIGD7, PRKRA, FLJ20060, DKFZP434G156, FLJ14775, NAV1, RPLP1, B3GNT1, C21orf45, KIAA1586, ELD/OSA1, LOC51249, KIAA1982, FLJ23309, ANAPC1, HINT1, MGC17919, TSGA14, DRLM, MCM6, KIAA1238, KPNA4, AFFX-r2-Bs-thr-3_s_at, IGHG3, YARS, FLJ20309, LU, FLJ10407, MGC14797, KIAA1554, LOC115827, NRM, DNMT3A, MGC4308, KIAA1554, MGC41917, ATE1, TUFM, ROCK1, MATR3, KIAA1311, FGD3, FLJ10876, KIAA1337, ZNFN1A4, PRO2000, SCAP2, FBXO4, CNTN1, MYH11, TRNT1, TCF7L2, CDK5RAP2, DKFZp313A2432, GTF2H3, MGC14439, MGC4730, MGC19570, EIF2S3, RNF3, MGC13204, CHES1, CNM3, SFRS3, SMBP, TMF1, CSTF3, HBOA, CDCA1, FLJ32745, SPIN, WHSC1L1, DKFZP566I1024, FLJ14906, C20orf24, OSBPL7, NAALADASEL, HSA251708, KIAA0254, LOC144402, FLJ34231, KIAA1228, C20orf72, RANBP2, および NIP30.

【 0 1 6 0 】

(表 7 C) HSCに対して、継代した腫瘍形成性において上方制御された遺伝子

FN1, FN1, RAI3, KRT19, FN1, FN1, ITGB5, S100A8, S100P, CA12, TACSTD2, AGR2, S100A2, DC12, DSP, DUSP4, FLJ20151, IGFBP3, S100A9, CXADR, CYR61, BIK, PTPRK, SERPINA3, zizimin1, CD24, SYN47, HRASLS3, LGALS3, FLJ11619, LCN2, RARRES1, GOLPH2, HRY, TFF1, EFEMP1, STHM, IFI27, SFN, MGC4309, ABCC3, DKFZp564A176, CD24, MYO6, KRT7, MUC1, IER3, CTSL2, S100A11, MET, PRO1489, C8orf4, PPL, CD24, GPRC5B, S100A8, COBL, CDS1, TACSTD1, TACC2, KRT18, IL1R2, SOX9, SPUE, CAV2, TSSC3, C3, CYP1B1, ITGB5, CD9, KRT6A, MAPK13, ARHGAP8, CDKN2A, S100A10, SFN, RDHL, SOX9, CEACAM6, FLJ20273, MGP, CAV1, F3, TGFB1, LGALS1, MYO10, S100A14, INHBA, TM4SF1, CXCL1, TUBB, PPIC, FLJ10052, IL1RN, DPP7, FXYD3, GALNT3, KRT6A, ANXA2, ANXA2, FER1L3, ANXA9, TPD52L1, HRY, PTPN3, EFNA1, C8FW, CDH1, EPS8, CLDN4, PTPRF, CCND1, CALU, GALNAC4S-6ST, DKFZp564I1922, ASS, CAP2, FARP1, CRIP1, LOC51760, HOXA1, MIG2, ANXA2P2, TGM2, MUC16, PAPSS2, SNK, RAI14, CAV1, COL4A5, C4.4A, PTGIS, KIAA1078, SLPI, SAR1, RARRES1, DUSP4, ANXA2, FLJ10901, CD24, KRT6B, EPN3, ADAM9, EPHA2, TPAP2C, BMPR1A, PARVA, SERPINB5, ENAH, MARCKS, FAT, BF, TACC2, FLJ20171, NCKAP1, TONDU, PIGPC1, PARG1, EMS1, CTSL, LIF, EPB41L1, ISG20, ITPR3, LOC90957, CXCL5, PACE4, PHLDA1, HN1, CXCL6, VIL2, C1orf34, GNG12, ALDH1A3, TJP1, TM4SF6, ROR1, FLJ20151, LGMN, DUSP5, IRS1, GFPT1, CD24, ADM, GATA6, LAMC1, NRCAM, CRABP2, ARHE, MCP, YAP1, ADPP, CARD10, COL4A2, EDG2, PTGES, OSBPL10, IGFBP3, KCNK1, RAB20, RIL, NFIB, EFEMP1, CTSH, PDXK, SGK, DEFB1, KRT17, RAB25, HUMPPA, C12orf5, DLG5, KIAA0869, SLC1A1, PPP1R14B, KDELR3, RAB31, DDR1, TSTA3, CDH3, TFP12, PPAP2C, SLC12A8, TM4SF1, FLJ22662, DDR1, S100A6, DD96, KIAA1078, VEGF, ARHGAP8, ELF3, RAB31, RIG, MAL, COL4A1, HBP17, LOC113146, ERBB3, RHCG, NR2F6, EMS1, MUC4, PLAB, STEAP, S100A7, NET1, FLJ11856, MGC5395, GPR48, DLAT, RIN2, NFIB, CEACAM6, CORO2A, TMM17A, CLMN, FLJ13593, FARP1, E2IG4, IL1RL1, DSTN, CYB5B2, TIMP2, KRT8, GFPT2, POLR2J, SLC6A14, ANXA3, LAMB1, FLJ21918, MGC10796, EPB41L4B, G0S2, SDC4, CCL20, TLE1, LAMC2, NMU, SPAG4, TRIM2, RAB31, EGFR, ZNF339, MGC35048, PLAT, PITX1, ZFP36L1, GMFB, PHLDA1, BNC, SLC11A2, LAMB3, TFP12, FLJ22408, SAT, LAMP1, POR, TGFA, MYO6, KCNMA1, TPM2, TUFT1, GPR87, BZW1, KDELR3, ANKRD3, EGFR-RS, AKR1B10, RBP1, CDKN2A, CLDN1, AKAP12, SLC7A5, SEMA3C, ERBB2, GPR64, PLXNB1, COX5B, MGC11242, FACL3, PPAP2, PPAP2A, EMP2, CASK, MTIH, TMPRSS4, PDEF, KDELR2, FLJ21610, TMEM8, GSTT1, KREMEN2, ECT2, PFN2, MT1X, MT2A, HAIK1, CNN3, PTK2, IL1A, S100A13, NDRG1, MID1, TNFRSF11B, SOCS5, MATN2, ME1, SEMA3F, ARHD, PP35, ZNF144, MLPH, PDZK1, SCD, CRYAB, HSPC163, RRAD, IGSF3, PCBD, ITSN1, IL13RA1, UGCG, EDG2, ANXA8, SSSCA1, LAMA5, KIAA0436, KIAA0599, ENDOG, SLC6A8, CALD1, FLJ11183, MGC3101, UMPK, EFA6R, NQO1, PTK9, MTIL, ELF3, CST6, ST5, NETO2, KIAA0802, MYO1B, NOTCH3, PTK6, KIAA1416, MYO1C, SUCLG2, KRT17, RHBDL2, AMOTL2, COL7A1, IL20RA, CD14, CEBPD, SMARCA1, ESDN, TNFRSF6, FLJ20591, PEG10, FOXA1, KIAA1026, FLJ21870, PBEF, TOB1, AQP3, LISCH7, TGIF, MYO1B, MPZL1, DDR1, CP, IQGAP1, P4HA2, BMPR1A, NEBL, PLEK2, EPHB4, AK3, BHLHB3, IL6, TAZ, PLS3, OSR2, SH3YL1, NQO1, PPAP2A, UP, SBB131, KDELR2, KIAA0790, FLJ10292, SLC2A1, AQP6, P2RY2, MTAP, FLJ10718, DAF, MOB, MKLN1, TM4SF6, SQSTM1, OCRL, C21orf97, NMB, FLJ23186, SDC1, RJS1, PTPRF, KKL10, SCEL, MGST3, CSTB, HOMER-3, PON2, CASK, SSH-3, DPP4, HSPB1, MGC2376, LOC92689, RARRES1, LTBP2, BNIP3, HMCS, TGM2, TNC, ITC, MRPS12, CTBS, SUCLG2, PPIC, SLC31A1, MGC14480, KIAA0440, EGFR, AK3, SRD5A1, FBP1, FLJ13984, UBE2H, H2BFL, MGC3103, NPDO09, FCGBP, CDK5, ANG, TEAD3, DPP4, PRRG1, NQO1, KIAA0429, SUCLG2, IF2, ERO1L, CLDN3, SERPINE1, SFN, FHL2, HS3ST1, PDE8A, CLDN8, BAP29, RRAS2, RPL5, PIG11, PPFBP2, DNAJB2, RRS2, NID2, TOPK, MRPL19, NTSE, FN1, KIAA0103, CED-6, MAP4K4, PRSS8, COL13A1, G1P2, ROR1, UGCG, BCAR3, ISG20, CYP24, LIM, LOC57228, SERPINE1, SLC7A8, TJP3, ESR1, NPAS2, CKAP4, CLDN7, UCHL3, KIAA0143, RBSK, FXJ1, NOL3, SLC39A4, FLJ12910, BNIP3, PLP2, FLJ22531, FLJ22028, JAM1, LMNA, KIAA0644, CUGBP1, VNN3, LAMC1, CX3CL1, THBS1, NUP50, SLC31A2, NNMT, THBS1, AMMECR1, KMO, MAPK13, KIAA1695, RCP, GTF2IRD1, ARPC1A, MMP7, DKFZp434E2135, IF2, GLDC, PRSS11, TJP1, ATF3, PAX8, IL13RA1, ATP6V1C1, TST, SHANK2, ANK1, CRIP2, ChGn, GAS2L1, EPHB3, N33, CD59, GEM, EIF5, CENTG2, OAZ3, ASPH, SRPK2, B3GNT3, EDNRA, HSPC159, BACE2, ATP6V1C1, DP1, EHD1, DNAJB1, YKT6, KLF8, DDEF2, SRD5A1, RALA, CYP1B1, GPNMB, DKFZP564A022, FGFR3, ACPI, FLJ20366, TLR5, SCD, KIAA0882, KIAA1028, SC4MOL, MPZL1, RALGPS1A, SAR1, PTCH, SDR1, PDE4A, CELSR1, F12, GGF2, GCNT3, SNCAIP, DDR1, PBEF, MMP14, EGLN1, ADCY9, FST, KIAA0716, HSPA1A, CNGA1, HNMT, KIAA0984, SIRPB2, HRH1, ITGA3, FASTK, LDLR, RGS20, MRPS17, ELMO3, AP1M2, TEGT, SH3GLB1, SMARCA1, UNC84A, GJB3, CAST, DKFZP564F0522, SLC19A2, HK2, ID1, ARNTL2, EVI5, KKL11, KIAA0703, NPAS2, MEIS2, CRIM1, GCLM, PARD3, EML1, RAD23B, AP1M2, S100A11P, YWHAZ, PON2, MTCH2, FLJ23153, TUBB-5, CDH6, SCD, KRT5, RNASEH1, LHX1, UBE2D1, TMEFF1, MGC4171, PGM3, KLC2, TNF, HSKM-B, IDH3A, KIAA0874, FLJ11773, PSMD5, HGD, PPP1R13B, TNFRSF12A, FLJ13841, MBLL39, SH3BP5, FLJ22418, CETN2, CAST, IF2, LLGL2, SPATA2, SYNGR2, SLC16A1, FBXO26, C1orf27, ITGB5, LOC113251, KIAA1029, FLJ20623, SELENBP1, PCDH1, DAG1, TMSB10, SUDD, STK17A, LAD1, SQSTM1, THBS1, ARNT2, CGI-115, TRIP13, DSTN, CTNND1, SOX13, SFTPA2, SLC2A10, CGI-141, MT1G, COL4A6, CTNNAL1, RIL, IL1RAP, SNRPD3, MAOB, G1P3, PIK3R3, FLJ21511, NAV2, CLDN3, VEGF, KIAA1609, MEF2A, SCAR3, CPD, FER1L3, KMO, NY-REN-45, JAG2, OSBPL2, YIFIP, FLJ10055, PSMD12, GRIT, LOC113251, FBXL2, PRSS16, PTPRG, FOXE1, EML1, GUK1, RHO6, TPBG, HRB, H_GS165L15.1, FLJ12571, MGC29643, SBB126, MARCKS, PSMB3, SLC11A2, FZD2, KIAA0220, TMEPAI, MTRR, HMGE, BCL6, STK39, CELSR2, KIAA0895, ACPI, E2IG5, KDELR3, CYP-M, ANXA10,

10

20

30

40

ANK3, CLIC4, KRTHB6, TSTA3, MLF1, TES, ASPH, PAPSS2, SLC20A2, RGS19IP1, NFIB, NPD009, HOXB7, FLJ10134, APOE, KIAA1219, KIAA0173, PODXL, IGFBP1, HSPCA, MAK, C11orf5, HIG2, CRIM1, FKBP2, HSPA1B, FLJ20624, CPD, ITCH, ENSA, UNC84A, KIAA0062, EPPB9, FLJ10851, STK6, PSCA, PTP4A1, DNAJC3, FLJ13782, CKTSF1B1, UAP1, KRT15, AXL, HMGCS1, GNPI, PRKCI, MGC5509, MAGED2, CD63, FLJ11856, ADAM10, KIAA0934, DXS9928E, SYNE-2, IFNGR1, SLC7A11, RIG, PP1057, LOXL2, SPOCK, PTPRF, PACSIN3, ATP11A, STK24, CAPN2, C4BPA, FLJ11149, TMP21, CYP2E1, COL4A1, PTP4A1, KIAA0937, PKP2, ARF4, KLF5, HSPA4, NPC1L1, ATP5J2, MSLN, TLE1, ARK5, SS18, SNARK, LOC56902, KIAA1630, JAG1, KIAA0843, CIS, MAP4K3, TAZ, PTHLH, RHEB2, NEDD5, HOXB7, MGC24447, EIF2AK3, UGTREL1, MIG2, ADK, GAL, FTH1, FTS, PEN-2, TNFRSF11B, CGI-148, MGC11061, LAMP1, MGC39851, CPD, MGC11061, NCOA3, CDC42BPB, C11orf24, MAP3K8, MGC3038, TRA@, IRS3L, CLTB, SC65, KIAA0471, PTS, POLR2K, CED-6, BLZF1, TRIM36, SPR, APIS1, EVA1, LIMK1, TIMP1, KIAA0923, NDUFS8, EMP1, BFSP1, JAG1, GOCAP1, BID, RIL, CGI-90, CLTB, RIG-I, ANGPTL4, ATP11A, ITGAV, IL1RAP, SH2D1A, FLJ22693, INSIG1, FKBP10, FLJ20847, DUSP14, VDR, IFRD1, TOMM22, POLR2K, IGFBP4, HSD11B2, PTHR2, PREI3, FLJ10769, AFAP, ENC1, MFN1, CD24, H2BFT, TRIM2, HIP2, JAG2, DAF, FLJ10099, CRK, YES1, DLG5, RARRES2, LIPG, APXL, FLJ20113, CYP51, CALM1, MKI67, PLS1, VIP32, WARS, ABCA1, RASAL1, CDC42EP4, MYO1D, CRA, H2BFB, KIAA0790, BOP1, TACSTD2, KPNA2, SGSH, RPP20, LAMP2, GRSF1, CBL, ZNF165, SCAMP1, PLOD2, GSTM3, CLTB, C2orf6, MST1R, GSP1, CLCA2, SGCE, CHST3, CDC42EP4, NPC1, TPM4, HEBP2, WBSR21, HMGCR, ARL7, FLJ20623, DHFR, FLJ23548, IL8, DKFZP564F013, SECTM1, RAD23B, CFLAR, POU2F3, ITPK1, IGSF4, CBX3, RHOBTB3, PDP, HSPA4, WFDC2, TRIM16, ARHD, KIAA0632, TCN1, ITGB4, KIF5B, SGPL1, RAD1, EIF2S2, CYC1, IL1R1, HARC, KIAA0779, SLC25A13, PARG, RAB17, PLEC1, DKFZP564A2416, C2orf97, DDX26, ALDH3A2, CGI-12, BAG3, EPB41L1, GS3955, FLJ20986, C14orf92, PP35, BTF, KRT7, FLJ20457, G10, EPS8R2, LOC160313, MGC2376, KIAA0429, GOLGA2, GOSR2, COX17, FLJ21313, FLJ10300, EIF5, SKD3, ADK, NPEPL1, SLC35A3, FLJ20186, YWHAZ, UBE2A, CYB561, NR2F2, ELK1, FLJ13397, LAMP2, SGSH, FDPS, FLJ10534, PIK3R3, SPINT1, FLJ11619, FLJ20989, ATIP1, SORD, PP, HCCS, SLC1A1, FLJ20739, SLC6A8, RBBP8, GRIK3, CALU, KIAA0644, SAA2, KIAA0934, USP18, TXNL2, FLJ10521, FBXO3, SSBP1, MGC3067, CGI-100, MRPL13, PIG7, KIF3B, KIAA1735, DAAM1, ADAM17, IL5RA, TPD52L1, PPP2R3A, RAB9A, PAWR, HIPK3, PPP3CB, EPHA1, GFPT1, KIAA0431, C7orf14, BNP1, LMCD1, ATP6V1G1, COPB2, KIAA0265, RPL5, FLJ20234, OBP2B, MIR16, CTNND1, ATP6V0E, DHCR24, FRK, MGC5178, IQGAP1, HFE, DKFZP434J24, ACTL7A, APBB2, LANO, PMM2, HMGE, ARHGEF4, NPTX1, CTSB, RPA3, NET-7, ARHGAP6, FLJ20637, FLRT3, FLJ10407, TRF801, NR6A1, NR5A2, PTPN12, ZNF217, TEB4, CALD1, HSPC111, DP1, SNAI2, STS, ANXA4, BRD1, MGC16723, MCP, FLJ22055, C1orf28, ACTN1, TMEM4, FLJ20401, SE57-1, SH3GLB1, CDYL, OAZIN, PRO1855, H41, RAB22A, FLJ10326, PEX13, SH3BP5, MIF, SOAT1, MRS2L, CDC6, PEPP3, FLJ14675, TPD52, CTBP2, SPINK1, PPP2R1B, SELT, TNFAIP1, IFRD1, SORT1, ATP1B1, QSCN6, PDK1, SNX16, VIL2, PMM1, CIB1, FLJ22195, SLC27A5, PCNP, TNFRSF10B, CDR2, FLJ21657, MTX1, SLC38A1, BC-2, PEX3, CIAO1, PLXNB2, ROD1, RPL39L, TAF1B, ZF, C12orf22, DDX26, MEI, NPEPPS, DNAJB1, SLC39A1, ATIP1, MGC2742, BBOX1, FAM3C, FBXL11, EGR1, LIN7C, UBE2G1, MCP, TMPPRS3, MARCKS, LOC56902, GRAF, ALS2CR3, KIAA0680, FZD6, SPON1, HSPC111, CCNB1, P2RX5, B4GALT4, GOLGA2, p47, KOC1, RAB2, TM4SF9, MGAT4A, HS2ST1, CD44, FLJ20315, TCFL4, PCMT1, BHLHB2, VRP, RBSK, FLJ10829, HES2, EK1, ZRF1, C2orf6, TUBGCP2, PFTK1, BZW1, CYR61, NOL3, PTCES, CGI-100, BM039, SCRIB, DDX3, SVIL, SMC6, NET-6, KIAA1023, ATOX1, IER5, IL1R2, STX6, PKP3, PITX1, ETV2, MCC2, MRPL33, MGC2494, BRGM, C22orf2, ACTR2, BCL10, TRAM, B7, FLJ12439, DKFZP564A176, PHKA1, SLC33A1, TGOLN2, HRC, LGALS8, FLJ22940, OBP2A, STOML2, IFNGR1, POLR2J2, DKFZP586B0923, SLC2A4RG, NDUFA8, KIAA0964, FLJ11269, TMPPRS2, PLEKHA1, UGT2B28, ARL1, PFDN2, IGLJ3, FLJ23516, KIAA1609, WSB2, KIAA1598, YES1, KIAA0284, ATP6V1D, VMP1, C22orf5, HSPA6, MUC1, MAPK9, PARD3, APG12L, RAB5C, PAK6, LSM1, INSIG1, NDUFS6, ALDH3B2, FLJ20275, CHML, UBE2V1, IGFBP1, IGFBP2, ITGB5, SEC61G, LOC55831, OPTN, ORMDL2, GABRP, DPP3, FLJ20967, POP3, GPC1, ANXA2P3, PRDX4, CHPPR, DKFZP434G2311, LGALS3BP, UEV3, KRAS2, TM4SF11, FLJ10116, CTBP2, CALU, USP3, P4HA1, SLC22A1L, FER, SLC1A7, PCDDHA12, ENCI, FLJ14251, PPP2R3A, FLJ20069, DDXx, STK6, PLA2G5, ZYG, PPIA1, AFFX-HUMGAPDH/M33197_5_at, AK1, GNA11, WWP1, HRY, SMURF1, FOP, DHCR7, GCSH, HDGF, NCBP1, ETEA, KIAA1096, GMPS, TGFBR3, HGF2BP, ZFP103, CD44, C20orf24, PSEN2, PEX7, TNFRSF21, ARHGEF7, CD2AP, ARF4, CHD1L, MGC8974, ZMPSTE24, PSMB5, ACR, GSK3B, NEDD4L, KPNA4, VIL2, CDC42EP2, UNC119, EPS8R1, KIAA0143, FLJ22709, LOC55862, YWHAZ, BAZ1A, WIT-1, IL13RA1, ITGB8, OS4, LRP3, DRIL1, FASN, TXN, RASAL2, NCOA3, JUP, AUH, NEK2, GEMIN6, PSMD11, RECQL, MAP7, SNX4, TPD52, KLK8, INPP5E, KIF1C, ORC5L, CDA, C20orf35, FLJ13189, B4GALT4, CDK5R1, C1orf16, ATP6V1D, KIF5B, CTNND2, CGGBP1, SQLE, PTP4A1, CSNK2A1, LIFR, PLSCR1, SRI, CDC20, PSMB7, C20orf18, NAT1, KLK5, KPNA1, PELI1, TRIM29, YWHAZ, KLF4, FLJ21916, LTF, DAPK2, DHCR7, RNMT, RXRA, SPAG1, DDX21, CKTSF1B1, OXTR, KIAA1096, COL16A1, CELSR2, KIAA0111, TPAL, MLCB, STS, DKFZP586C1619, TPSB2, MEIS3, APBB2, HSPC121, ASK, ABCB6, RBMS2, DKFZP762N1910, CCNE1, FLJ22347, TEAD4, PPIB, NDUFS8, TMG4, BUB1, RRAS2, NOC4, SSH-3, TAX1BP1, EPN2, ISGF3G, MRPL17, AHNAK, TBL1X, EK1, B4GALT1, SPHK1, PPIF, TXNDC4, DSC2, KIAA1096, SSR1, ATP9A, OSBPL1A, COX8, EIF2S1, SIP1, ACPP, FLJ20085, SMARCA4, SSTR1, UNG2, C1GALT1, PRKCL2, CABYR, FLJ10232, SLC4A7, ARHGEF5, GLUD1, MED8, MAP2K1, PPM1B, NET1, PPP2R3A, RHEB2, PME-1, FLJ20591, FLJ22595, SPS, CPSF5, MGC5466, SLC35A2, PLOD2, DKFZP434B103, APPBP2, TFIP11, FLJ10252, MRPS16, KCNK1, GOLGA5, PAIP1, CHPPR, PA200, APP, FLJ23338, FLJ13852, RHEB2, PK428, BAIAP2, LAMC2, C7orf10, LANC2, ITGB1, HCCS, TPM1, FACI3, MRPS15, EPPB9, ITGB1, FLJ10199, CSPG6, COPS7A, KRTHA6, SGPL1, EML4, AHCYL1, TPD52, SHC1, EPLIN, TUBB1, GAS2L1, MPZL1, IDH3A, CYP4B1, CGI-96, TM9SF2, FER1L4, C10orf3, FLJ23537, LGALS8, P2RY6, ALDOA, PEX7, EBNA1BP2, DKFZP566C134, NPEPPS, PDE4DIP, GSG1, FLJ20485, MTIF2, PCTAIRE2BP, FLJ23510, LAMP1, KIAA0020, GMFB, ACTR2, HLCS, P4HB, CYCS, PSMD8, TIMM17A, MFTC, TXNL2, PNAS-4, CGI-60, PMP22, TONDU, GGPS1, FLJ20604, TAT, FLJ10803, CLN5, NRP2, RPN1, KIAA1718, CALM1, NOV, MAOA, TPS1, FLJ20555, KIAA0649, TSLL2, OSBPL11, TPM2, MRPL40, TCF-3, H2BFT, SLC4A7, SURF2, LZ16, KIAA0471, DPM1, DNAJA2, COG5, DKFZP434G2226, DC50, TCEB1, ACLY, DUSP3, ROD1, NCOA3, NFATC4, GAN, UNC84A, UCHL5, FLJ11850, RPP38, MYCBP, PDEF, DKFZP586N0721, KLK6, TP11, PSMC2, SLC16A1, TEAD1, VEGF, NDUFS1, BS69, MAGEA3, TLE2, HSPC051, FN1, BAZ1A, FLJ22584, SEC23B, , , , NMES1, MAL2, PIGPC1, LOC55971, FLJ20171, ShrmL, LOC91523, FLJ22474, H19, RHPN2, MIG-6, NGEF, KIAA1165, YAP1, MGC4309, SYNE-1, CDKN2B, ENAH, CTL2, ALS2CR9, TMEPAI, IMUP, DKFZP564J0863, UGCG, MGC12335, ITGB6, CYP4X1, GLIS2, FLJ20273, FLJ13842, LOC55971, TMEPAI, SYT13, SPUVE, KIAA1244, HSJ001348, MGC29643, BOK, TEM8, FLJ30532, LBP-32, DKFZP761L0424, FLJ23153, EDG3, IL20RA, MYO5B, GJB2, MYO6, PTK2, KIAA2028, SBB131, FLJ10052, AGR2, FGG, FAD104, LOC10224, CLDN1, LOC51760, IRX3, C20orf100, CLDN12, MGC4734, ERO1L, FLJ40432, MGC33630, NTN4, KIAA1522, SLC4A11, ESDN, DKFZP434C0328, PTGFRN, EHF, MF12, PRO1489, TCEA3, GNG12, TMPPRS3, TEAD2, GJB6, ALS2CR9, DDEF1, CFL2, LOC116238, KIAA1671, SDCCAG43, MGC35048, TOB1, LRG, DKFZP761P0423, C20orf129, SMOC2, FZD4, RDHL, WNT7B, MGC14839, DJ667H12.2, TEAD1, RDHL, FLJ14957, ZIC2, HSPC163, DLG5, FLJ14735, FLJ20048, WW45, FLJ90440, LOC92689, DAG1, LOC55971, B4GALT1, HAS3, PIGR, SNX9, AK2, PRO2605, UGCG2, CDH24, GFRA3, FLJ13593, CP, CRBP4, FHOD2, MGC26963, LOC129642, UACA, YAP1, FLJ23420, IL28RA, PSA, DKFZP434D0215, PPP1R14C, PTGFRN, E2IG5, C14orf31, FLJ10052, BCAR1, MGC22805, DKFZP434G171, MGC11034, KIAA1870, FLJ22415, FLJ34633, GPR54, CHDH, FST, KIAA1708, UBE2H, DDEF1, WASL, FLJ14408, CXCL16, PARVA, DKFZP434H0820, CASPR3, RAB10, PDP, ANLN,

10

20

30

40

FLJ25157, NETO2, OLD35, UBQLN1, LOC58489, FLJ23867, E2IG5, ATP11A, CD44, DNAH5, LOC128153, PHLDA1, IPP, DUSP16, COL12A1, MGST1, PLEKHA1, KIAA2025, LTB4DH, FLJ20739, FLJ22174, MGC24180, DKFZp761N0624, IRAK2, ALS2CR9, MGC39329, AKAP2, C14orf50, MGST1, UGCGL1, KKL7, FLJ1937, DIRC2, FLJ10035, MGC11034, SOX7, PARVA, LOC139231, GPCR1, SDCCAG28, GPR92, LOC147184, LOC113026, MGC14798, LOC147700, DKFZP434A1315, FLJ10702, LTB4DH, PYPAF3, RBMS1, SLC30A1, MTA3, ARL8, KIAA1688, RASAL2, PDK1, XPRI, SULF2, STEAP2, H41, METL, FBXO32, TLE1, DDEF1, GPT2, MRPL30, FLJ14117, DKFZp434E2321, MGC26963, SAT, ORF1-FL49, GRP58, MGC33662, NT5E, FLJ31052, RNAC, CGI-85, CTL2, STC1, SCD, DKFZP434K0427, SCARA3, MGC14128, BCCIP, MGC3195, TGFB3, PXMP4, KIAA1500, Spir-1, ARHGEF12, DKFZP434A0225, LOC55829, C20orf24, HSPC242, CAMK2D, FAD104, ZD52F10, HS6ST2, HLCS, FLRT3, SDCCAG28, KLF15, C20orf139, FLJ39155, MGC1314, C20orf24, FLJ14511, CGI-20, EDG8, MGC10765, C7orf3, MGC14801, FLJ10697, ATP1B1, EHF, JUB, FLJ11200, MacGAP, H4FH, MGC11102, RORC, COL12A1, PRO1853, MGC13096, SPTB, FLJ32115, DKFZP566F084, SEMA4B, DKFZP434A0225, BTC, PCDHB14, CGI-09, EMS1, PCDHB16, KIAA1384, SCEL, GRP58, KIAA1357, CAC-1, SURF4, FLJ11011, LMLN, ARL6IP2, OCLN, C17orf28, INPP4B, C14orf31, FLJ22558, FLJ10116, KIAA1363, DAB2IP, MGC35352, GK001, PDGFA, SNX8, MGC22805, LOC114990, ELP2, CXADR, LOC102224, ST6GalNAcI, MGC35403, MGC39350, KPNB2, DSCR1L2, FLJ20333, PPP1R1B, EIF2C2, PX19, BPNT1, AD-003, LACTB, FLJ36445, ULBP2, GUK1, KIAA1321, SPP2, CRB3, FLJ90586, NDUFB9, PDK4, FLJ30973, HSPC228, MacGAP, DEFB118, DKFZp761K2222, ASPH, MGC45474, UBQLN1, TRAF4, DKFZp761K2222, DJ667H12.2, AFFX-HUMGAPDH/M33197_5_at, C12orf22, RHOBTB3, MGC33974, KPNB2, C9orf5, FLJ32421, FLJ25604, COQ4, FLJ20281, FLJ13391, TEAD2, ELL2, RPS3A, FLJ33516, ESPN, DKFZP434A0225, KIAA1684, TRA@, SEC61A1, DKFZP434K0427, PRIC285, KIAA1870, AMN, LOC151242, FLJ20686, FLJ10210, FLJ22415, MGC19764, CGI-97, CDW92, NAT5, KIAA1126, CLMN, RAB18, MRPS15, JAM1, TEAD2, ENAH, KIAA1228, ACTR3, PCDHA10, ATP5A1, GNPAT1, CL25084, LOC51260, CNN3, TFDPI, FLJ31528, KIAA1434, FLJ10902, MGC14289, GGTL3, SYTL2, MGC21874, TIM50L, PHCA, PSCD3, KIAA1026, INADL, DNAJC5, AD037, FLJ11046, KIAA1804, KIAA1337, PPARD, KIF1B, MIR16, ROD1, SLC2A13, CFL2, GDF1, MRPL36, SLC26A9, FLJ21290, CABYR, HSPC159, SPPL2A, ABCC3, BTBD6, SMURF2, STK35, CGI-85, ZAK, DKFZp434B1231, KCNK6, PCDHB2, Spir-1, KIAA0146, ZNF265, COPZ1, FLJ20421, C11orf15, DKFZp761D0614, KRT19, RAB23, MGC16491, FLJ40432, MGC10981, C20orf45, CTEN, MGC30022, NUCKS, MGC13251, MRPL27, FLJ90586, MGC16028, FLJ90165, SHMT1, FLJ14525, BACE2, ABLIM2, FLJ20719, SCGB3A1, MGC2477, FLJ20038, MGC29643, FLJ30829, C20orf155, PGK1, FLJ37440, RBM8A, FBXO22, KIAA1219, KIAA1200, KIF3B, MGC19825, AK5, C20orf20, FLJ10378, INADL, HSPCA, EIF5A2, RAB18, BCL2L13, MBC3205, UBE2H, FLJ20354, SLC5A7, FLJ30532, C14orf47, TMPIT, EHD4, FLJ13089, MGC17299, IDS, CED-6, MGC27277, LOC137392, FXYD6, MGC22825, CPM, SNX9, MGC19764, TLR7, FENS-1, SDCBP2, NUDT5, MGC11102, SEC24A, CGI-141, NKD2, EFG1, ANAPC11, MYO5B, MGC14833, LOC85865, EPB41L4B, FLJ21415, KCNC4, GSBS, TEAD2, LOC115548, MAGI-3, C9orf5, CLONE24922, MRPS15, RGNEF, CORTBP2, FLJ20354, HSPC121, NOC4, KIAA1673, MGC14595, MGC2560, MGC2408, MRPL14, APOA1BF, FLJ14681, MGC13102, KIAA1437, KIAA1126, MGC13034, CSEN, SH120, VIP, PRO2000, SLC31A1, AD-003, CALM2, HT002, RAP2A, EML4, WDR5, MPP5, LOC90990, MGC2560, FLJ14431, ARHGEF5, HCC8, TCEB2, FLJ13187, FLJ90575, FLJ10525, FLJ23393, HOXB9, LOC84661, dJ55C23.6, HFE, MGC13040, WDR20, MRPL4, FLJ25604, DKFZP566C134, LOC55871, CGI-09, MRPS23, MRPL47, MGC13045, ERK8, KIAA1500, HPS3, CRYPTIC, SBB131, MGC14353, CGI-20, FHOD2, PPP1R14A, REPS1, MAPKAP1, V-1, FBXO25, BNIP-8, MGC13114, EKN1, GPR24, RCP, FLJ12806, MGC2747, OBP2A, HM13, C21orf97, FLJ14909, C9orf10, STYX, THOC3, RDGBB, PFKFB4, FLJ21924, KIAA1295, ZDHHC9, STXBP5, RPE, UBE2H, PCDHB18, FLJ20303, NP007, N4WBP5, FLJ20333, FLJ12747, SURF4, C20orf45, FLJ12787, LOC90507, FLJ10839, EPB41L4B, FLJ37953, BAP29, MRPL50, MGC10999, C9orf5, TBDN100, STK35, FRABIN, JUB, PRO2714, MLLT4, MGC40214, CPNE4, FLJ22233, MIZIP, MGC14859, MRPS24, HPS3, FLJ23841, FLJ23577, HSPCA, MRPS10, FLJ14251, SSR3, MGC13186, KIAA1453, HN1, HOOK3, ATP1B3, MRPL50, MAP4K1, LOC90120, D1S155E, DKFZP564O0463, FLJ23816, CFTR, MGC40555, MGC20781, FLJ20085, NOPE, FLJ14825, MSP, LMO7, C7orf2, MRPL32, FLJ10074, MAK3P, KRT6IRS, DKFZp547A023, SAMHD1, HSPC043, FLJ10597, FACL6, LGR6, SORCS2, MGC4840, RAB35, MGC10911, および MLL3.

【 0 1 6 1 】

(表 7 D) HSC に対して、継代した腫瘍形成性において下方制御された遺伝子

MEF2C, HSPC053, HOXA9, PRG1, RetSDR2, GMFG, AIF1, AIF1, HLA-DPB1, PLCL2, ICAM2, HLA-DPA1, PTPRC, SPINK2, SPARC, CUGBP2, PTGER4, CECR1, CDW52, CCND2, LYZ, SELL, CD69, HOXA9, ITM2A, HLA-DQB1, ITM2B, LYL1, KIAA0125, LMO2, ARHGEF6, KIAA0084, MPL, RGS2, LAGY, QKI, EVI2B, ZNFN1A1, DOCK2, HLA-DRB3, NAP1L3, HLA-DPA1, KIT, HFI, HLF, LST1, ANGPT1, CD53, LST1, FLJ14054, SELPLG, LST1, BM046, TUBA3, HLA-DQA1, BCE-1, CDW52, FLJ10178, PRKACB, PRKCB1, IQGAP2, CHES1, GUCY1B3, PSCDBF, HLA-DRA, LAPTM5, PRG1, MEF2C, SLC2A5, LST1, FHL1, MAP4K1, TNFSF4, PLAC8, HLA-DQB1, IGFBP7, PCDH9, MAP4K1, EVI2A, SATB1, MLC1, SSBP2, FLI1, CLIC2, CLECSF2, LY75, NDN, HLA-DRB1, FLJ21276, DLK1, GLUL, NUDT11, BEX1, SH3BGR1, PRKCB1, MPHOSPH9, LST1, HLA-DQB1, FLJ22690, UQCRH, FLJ22746, HLA-DRB3, SLC2A3, NPPI, BCL11A, MPO, RUNX3, ERG, SV2, HLF, MMRN, CYFIP2, HLA-DRB4, PECAM1, CORO1A, MOX2, SEPP1, BAALC, 6-Sep, ITM2B, LCP2, PELI2, C17, IGHM, LRMP, PPP1R16B, HLA-DRB5, HBB, DJ971N18.2, LOC51186, SCGF, ERG, LAPTM5, P311, SAMSN1, ITGA4, DJ434O14.3, IGFBP7, TFEC, HA-1, MAGED1, HSPC022, FBNP1, TCF8, ELMO1, CUGBP2, NGFRAP1, PIP5K1B, DDO, MLLT3, ALCAM, NPR3, CMRF-35H, DPYD, PLAG1, BIN2, ITM2A, MYCN, GSPT2, LXN, ALEX1, PIK3CD, ADAM28, PLAGL1, FLT3, WBSCR5, C6orf37, GUCY1A3, CD74, KIAA0053, TRAITS, HLA-DQB1, MGC2306, ICAM3, PTGS2, H3F3B, TCF4, SNCA, FLJ10713, PROM1, TEK, APOBEC3G, PRO1635, HLA-E, JAM3, UBE1L, BCL11A, GNAI1, LHFP, LST1, CDH2, MYB, FLJ10462, ZFH1B, CBFA2T3, TMSNB, HLA-DMA, PLCB1, SOCS2, CG018, PDE4B, MHC2TA, PADI5, USF2, CUGBP2, VIM, HLA-DRB6, TFPI, BIRC1, PTGS1, HFL2, SCDGF-B, LSP1, NRLN1, MPO, KIAA1939, PTGS1, MS4A3, HPII, FLJ20220, HLA-DPA1, NCF4, MAPRE2, ZFP, BANK, TOX, CXCR4, IGHM, RUNX3, HCLS1, LOC81558, ARHGDI1, TRO, SCHIP1, CRHBP, KIAA1750, BCL2, FLJ20950, FLJ10097, DAB2, BASP1, JAM2, FLJ21616, HHX, ITM2C, SPRY1, SERPING1, SLA, EB12, ZNF42, DSIPI, FLJ10038, PECAM1, 6-Sep, CASP1, RB1, TACC3, 13CDNA73, 6-Sep, MAPRE2, FCER1A, BTK, LOH11CR2A, LRMP, PLAGL1, MICAL, TCF4, CLGN, H1FX, WASPI, LAIR1, ZNF175, INSR, FLJ20456, C11orf8, KIAA0443, AKAP7, TAL1, HLA-DRA, HRB2, PLEK, RAGD, PLAGL1, ALDH1A1, B4GALT6, GLIPR1, GAB2, KIAA1157, PPM1F, WAS, SETBP1, MUF1, C6orf32, MYOZ3, TUCAN, RNU2, KLHL3, TSC, PKIA, MLLT3, NEFH, DKFZp564B0769, PPM1F, SNTB1, PCDH9, CRYGD, MPPI, ABCB1, KIAA1110, ALEX3, ATP2A3, KIAA0308, MAGEH1, BIMLEC, CTSW, SORL1, FLJ20898, MCM5, CD244, PPP1R16B, MAGED1, ASC, GIPC2, RASSF2, LOC81691, SCGF, PTEN, 24432, STAT5A, 6-Sep, SLC24A1, UBE1L, CD83, TAHCCP1, GNA15, NR3C2, KIAA0053, INPP5D, CPA3, GYPC, SYK, PRKACB, RUNX1, RIN3, TRB@, NPPI, CAB1, HLA-B, PGDS, CD34, SPN, LOC58504, MAGEL2, TBXAS1, MFNG, LOC91316,

TRAP-1, RECK, TCEA2, FLJ20136, ARHGAP6, AMT, CAT, ADARB1, PTEN, LCP1, CCL3, SCN9A, RASGRP2, DKFZP586I2223, SS-56, SLA, C4S-2, PDGFC, LILRA2, RAGD, HNRPD, ZNF288, ITGA2B, LOC81691, HBD, SELP, C6orf32, PDZ-GEF1, CPT1A, KLF2, ZNF198, TACC1, HBB, B1, CIAS1, HNRPA0, HLA-DQA1, KIAA0308, MYO1F, PRO1331, RAB33A, TNS, NAP1L2, CERK, MGC4170, ADA, RNASE3, NFE2, ANKRD6, AKRIC3, CDC42, HSI1, TRIM22, BIN1, ICAM4, IL12RB2, CSF2RB, EPB41L3, BRDG1, TNRC5, CIRBP, RPLP2, AMPD2, SFRS7, EDG6, BRCA1, MSN, HLA-DQB1, C5orf5, GSTM5, ITPR1, IL16, AIF1, NFATC1, LILRB2, FGF23, STAC, RPL22, PTEN, LRBA, PFAS, CGI-116, DKFZP586A0522, MGC13024, GALT, ABCG1, MGC45806, ELFI, SAP18, ALDH5A1, ELA2, GATM, CHC1L, KIAA0918, LOC51334, FOSB, PRO2198, TEC, SLC1A4, CAD, KIAA1028, VAV1, LOC57100, C11orf21, SLC1A4, TRPV2, EPB41L2, FBN1, CD48, GIT2, CSF3R, DNAJC6, BIN1, KIAA0582, ARL4, SH3BGR1, GLS, FXYD6, PF4, SCGF, NEK9, PKD2, MATK, BIN1, NSBP1, MSH5, PRKG2, NT5M, PML, CD37, SF3A2, PLSCR4, CSK, HA-1, NUDT1, SIAH1, MEIS1, IGLJ3, HLX1, SV2B, DKFZP586I2223, KEO4, ENPP2, CTSF, IL1B, PSMB10, IL1B, ZFP36L2, SFPQ, FLJ11175, ATP2A3, STK10, FLJ22021, MYOM2, PTENP1, MGC861, HERC1, Jade-1, BTEB1, KIAA1102, NPTX2, UCHL1, LYN, COL5A1, ZNF215, MGC2217, SRISNF2L, LOH11CR2A, RERE, COL5A1, RAP1B, CLDN15, VWF, HHX, SMARCA2, SMCY, UBCE7IP4, LOC115207, KPNB1, ZNF22, STOM, C16orf5, ICAM2, KIAA1102, CENTB1, DKFZP434C171, ITGAM, TFPI, CASP1, CLN2, TAL1, AASS, SAH, FLJ11712, FXYD5, KIAA0303, FBXL5, SFRS5, FNBPI, FLJ11749, MAGE-E1, SNRK, SPN, CTSS, SIAT1, SCARF1, HSPC047, CD38, VAMP5, SF3B3, FLJ10374, FHL1, PTPRCAP, LRBA, DUSP6, PTPRC, KIAA0092, PLA2G4A, RBM5, FLJ21478, PLCB2, GOLGIN-67, RBM8A, OXCT, HEM1, DUSP6, CRI1, RAB6IP1, IMPDH2, C21orf33, LOC93349, EMP3, NASP, MGC40204, PTGER2, COL5A1, SPARC, NISCH, SIGLEC5, CSTF2, HGF, SNX10, DACH, NINJ2, MGC12760, KIAA1332, NPIP, KIAA0379, LYN, H2AFY, PACAP, PLCG2, PDE4D, LOC129080, FLJ11753, KIAA0447, BCL2A1, FUS2, PTPN7, WASF1, ZNF42, C18orf1, UROD, KIAA0303, NRG1, RNASE2, FLJ23056, FYN, DEFCAP, PTPN22, MAPKAPK3, ZFP36L2, AFIQ, NCF4, CDH7, DJ971N18.2, PA26, ANXA6, PHGDH, MCL1, LEPROTL1, HUMMHCW1A, TNFRSF14, STK17B, CGI-49, MGC14258, PSIP2, CRI1, FLJ35827, CCRL2, PTPRN2, CES1, SCA1, FLJ21865, KIAA0798, BIA2, HLA-DQB1, UCP2, DPYSL2, FLJ1259, FLJ20312, KIAA0240, GTL3, C6orf48, AK2, TFR2, FLJ13949, MAX, CHKL, FLJ12668, ALDH2, NUCB2, HPIP, RNF8, C1orf21, AS3, ZNEU1, FLJ11323, FLJ23506, LOC115648, KCND1, STMN1, BTN3A3, MAP4K1, ALG12, ATP5G2, PET112L, TIAF1, KIAA1043, TRPC1, THY28, SYT11, HSU79274, PRPF8, CLC, PCNT2, H2AFY, DAPK1, CCL4, RPL28, IFRG28, CND3, C14orf94, MGC3035, 6-Sep, GNB5, KIAA0916, EIF3S7, LENG4, FACLS, APIS2, MCM5, DKFZP434N062, AIP1, PROS1, CIRBP, REC8, SLK, C11orf2, dJ222E13.1, H2AV, NEK1, BNIP2, FLJ13197, ITGA4, FLJ21269, KIAA0708, IMPA1, FLJ12750, SLC18A2, EMR1, KIAA0239, RPS9, ARHH, MCJ, ALTE, KCNE1L, ABCB1, RPL22, KIAA0841, LOC58486, SNX26, ADAMTS1, USP4, STXBPI, ITGA2B, C5orf6, RBM10, FLJ21439, KHK, OS4, MAPK14, NIP30, KIAA0471, SLC16A7, RN3, DDX28, HPIP, RNASE6, ADSL, ARHG, GNG7, HLA-C, RHOB1, CACNB2, DATF1, PDZ-GEF1, RPL13, TALDO1, DGKG, FLJ22794, PTPN6, SYT11, C5, FLJ22349, GFR4, CGBP, PROL2, LARS, RPL3, JIK, MGC45806, MGC2488, MGC2752, TYMS, PECAM1, NSMAF, ABCC1, LEPR, MYB, LAIR1, LOC57209, EP400, ALCAM, ZNF187, FLJ13386, KPNB1, LTA4H, HGF, PP1628, NRIP1, GNAO1, IL3RA, CD79B, CENTB1, ZNF261, ST18, FGF9, CDK10, RAI17, STARD5, OXT, PML, KATNB1, ASMTL, NEDD4, ACTA2, MBNL, FLJ31821, PER1, MOAP1, DCK, DXS1283E, SNCA, AD7C-NTP, MYBPC2, STX8, ATPAF2, ACYP1, RAD51L1, CLIPR-59, FACLA, AASS, RAC2, MGC2306, SLC27A2, FLJ23018, RGS1, NAP1L1, ELAC2, LOC51185, SGKL, PCDH17, TRAF5, KIAA0682, DGKZ, FLJ10539, PIGN, FLJ10647, NCOA1, LBR, GFI1, MAN2A2, KRTAP2-4, HLA-C, FLJ35827, PCDHA10, HLA-A, APLP2, SFRS5, FLJ13262, WTAP, EFNA2, C12orf8, CCND2, PTPRC, MPPE1, HMGA2, CLK2, SWAP70, PRO1843, FLJ14280, FLJ23277, KIAA1172, PRCP, MADD, SMARCA2, WASF2, MGC5149, CDC42, PLEK, SMARCF1, RCD-8, ATP9B, IHPK2, IGHG3, DHRS4, EEF2, QARS, KIAA0841, ADRA2A, RPL29, GCNT1, UBL3, GRB10, IMP-2, ABCA5, HSPC157, TNFRSF5, H2AV, JM4, TBXA2R, SLC1A4, RPS6KA5, IGLL1, MGC8721, PEPP2, USP7, PSMB8, ARHGDI1, HLA-A, RBM10, NAP1L1, KIAA1393, AVP, KIAA1018, RPL28, RES4-22, NAP1L1, ST13, KIAA0186, MBNL, HEXA, KIAA0555, FLJ20189, MN1, TSPYL, USF2, APLP2, ZNF135, HPS1, RPS21, MAP2K5, HSD17B8, PROSC, NAP1L1, DUT, KIAA0170, TPK1, NY-REN-34, RBIG1, IL16, AKR7A2, STK10, PRP17, WWP2, PTD015, CAPRI, ARHGAP8, FLJ20856, APPBP2, LRRN1, MDM1, HLA-DMB, CGI-30, COX11, DDX28, ACK1, TM7SF3, FLJ23554, SDCCAG8, FLJ20094, MMP28, MUYH, CA1, AKR7A2, WDR6, DYRK1A, DPH2L1, RBPM5, FLJ20005, MAP2K5, C4ST, FLJ22059, FLJ20202, H2BFQ, CAMLG, CHAF1A, ABLIM1, MAPK11, RAP140, DUT, ITS2, EHHADH, DKFZP547E2110, H2AFJ, MGC4659, RPL13, KCNA3, BC008967, CASP1, NMI, NBEA, NUMA1, DEF6, PRAX-1, TBC1D5, KIAA0332, NEW1CP, KIAA0769, CENTB2, CKIP-1, EIF4A2, OAZ, ARH, KIAA0467, C19orf7, KCNAB2, TTL1, FLJ10597, SF3A2, FLJ11222, PSTPIP2, BCL11A, SPHAR, GLIPR1, KIAA0555, MMP2, EIF4A1, STOM, ALOX12, FLJ11588, RBAF600, PROSC, CG005, VILL, FLJ12707, M6A, TCIRG1, HTRIF, RICH1, F13A1, CACNA2D3, RRP4, TAF7, ZNF134, HSU53209, LZTFL1, TKT, LILRA2, ZNF302, FLJ13114, ZNF177, PURA, DKFZp547I014, TXN2, TLR3, BHC80, MGC5139, PTPNS1, ZNF145, THTPA, BTBD3, MDS010, KIAA0924, ZNF292, ITGB2, TJP4, GPRK6, CYLN2, ENPP4, ALB, RPS20, FOXO1A, ADH5, CTSS, FLJ23221, C11orf8, TNFSF13, TOLLIP, KIAA1449, HINT1, GLTSCR2, KIAA1052, FLJ10260, RAB3GAP, HINT1, TABBP, CHD5, LOC57406, TP53TG1, SRP46, MS4A4A, NUP62, PIM1, ZNF42, COG4, ADPRTL1, ZNF289, CATSPER2, TXNIP, PDE4DIP, HSA250839, FUT4, HSPA1L, GALT, MGC4278, APEX1, FN5, STRIN, USP11, SPP1, NPFF, CEP1, GAPCEN, HLA-E, SCAND2, CG005, VRP, BRAP, GPR56, MLH1, GPR105, OGT, C1R, BTN3A1, FLJ14107, PACS1, MGC26766, FLJ22378, APOBEC3C, CG005, CA11, QDPR, DUT, ALDH6A1, FLJ10450, BST1, NGLY1, FLJ12057, FECH, ZNF137, SERPINB1, EZH1, CASP1, MGC3265, CXorf9, TRG@, DKFZp564B0769, KIAA0616, DIS155E, MN7, C18orf1, NSBP1, NXF1, FHL1, TOP3A, TARBP1, KIAA0766, RRAS, SEMA4D, CEBPA, TIP120A, IL15, HADHSC, HIRIP3, CTBP1, DVL2, RBM12, RAD54L, NYD-SP15, PHC1, KIAA1042, IGL@, NPR3, HRMT1L1, FLJ20551, MYST1, LOC51231, TCF12, KIAA0543, MKPX, LOC51157, SYNGR1, AKR1A1, SCOP, LRRN1, FY, AMY1A, PHEMX, KIAA0930, MAP3K3, FLJ10631, ZNF85, APOL3, MAPK12, TRG@, POLD1, LDOC1, POLA, PST2, WASF3, RPL11, MKL1, FLJ22242, PTPRM, AMHR2, FLJ20288, TERF2, DOK4, KCNAB1, DISC1, FLJ22494, LOC91316, VIP, POLR2A, RGS19, C12orf6, RPS9, LIG1, NASP, ARHGEF9, MANBA, SARM, SRPR, CDH9, MRPL16, FLJ20509, SNRPN, HLA-E, NTS, ZNF232, FLJ12903, PHKA2, MSH5, PURA, ATP9B, TRIM28, FLJ12768, ME2, IDS, MPHOSPH9, DIA1, ADAM8, HADHSC, STX12, COX15, RPA2, SHANK1, GGA1, LANCL1, UBE3A, SOX11, LAT, BCL7A, DKFZp434K1210, BRAP, SMARCC2, DKFZP434H132, NHP2L1, FLJ11294, FLJ12270, KIAA1649, SRP46, PSMB9, GGA1, MGC4368, TOP2B, PTK2B, FLJ13912, EZH1, THRA, BAX, NAG, MERTK, HADHA, SRRM2, HNRPH3, GNG7, HSPC018, FLJ22573, HPCAL4, MBC2, MAPK4, FLJ10716, ITGAL, NFRKB, MRP63, DKFZP434L187, GABARAP, CHD4, DKFZP564D172, FGL2, LOC57019, KIAA0478, NTSR1, LPIN1, USP4, KIAA0391, ASGR1, KIAA0174, TBXA2R, TRAP95, FLJ22649, NEK3, ZNF271, SIL1, 76P, CYLD, CD164, TINF2, ZNF220, DAB2, HRIHFB2206, SF3A3, TRO, FLJ13373, UBE4B, GC20, ADAM28, PHKB, BCAS3, MGC14258, RAD52, HLA-F, KIAA0721, MRC1, CHD1L, LMOD1, FLJ10315, CHRNA7, NAP1L1, PIB5PA, GADD45A, RPL35A, LPIN1, TFPI, FLJ14213, KIAA0746, KIAA0981, C22orf4, PP1044, ABCF2, FLJ10379, RASSF1, FLJ23392, RPS8, DAB2, FLJ14011, CDC2L2, GAD1, MGC17330, FLJ23342, HEH10, NPDC1, KIAA0710, BIRC1, KIAA0349, SF3B3, MST4, IRAK3, CD81, LOC57406, FLJ12610, SF1, SLC27A2, KIAA0804, KIAA1055, GTF2F1, SEPX1, SCAMP2, PPP3CB, U5-200KD, HMG2N, F2, PCBP3, FLJ20721, ING4, HADHSC, KIAA0286, TREX1, ATP11B, RUFY2, SUPT3H, SFRS11, PIAS1, HBOA, HAS1, HYMAI, NUP210, TGT, FLJ11896, CIDEB, TRHDE, FLJ90524, TOX, KIAA0261, GSTM2, GAS7, MBD1, KIAA1305, PPP2R2B, CDT1, FLJ11164, TMPPRS2, TYROBP, G6PT1, PRIM1, GP5, DKFZP566H073, RPS14, CCNG1, FANCG, CMAH, SORBS1, KIAA0800, C1QTNF3, UBCE7IP5,

10

20

30

40

FXR1, ZNF334, CNN2, RFC5, ACAA2, GNB1, FLJ22757, CDKN1C, UROD, KIAA1028, HD, CTSG, CLNS1A, P2RX1, TACC1, ADH5, RPL13A, ZNF363, PRKCH, AF020591, LOC51659, PER1, TFPI, TSN, BMI1, KIAA0625, MLLT2, TAF1C, DHFR, SLC23A1, HAGE, NAP1L4, EGFL3, SCA2, FLJ20489, SNAP25, USF2, CRYL1, GG2-1, EDN3, TRPC1, AP1S2, ERCC1, KIAA0582, RPL15, LOC54103, FLJ22557, CGI-127, CSNK2A2, ZNF278, EDG5, IPW, RASGRP2, SAE1, KIAA0725, RTN2, CTNS, FLJ20274, FLJ10276, LTBP4, FLJ10539, HYAL3, MTL5, MGEA6, BNIP3L, PARVB, MGC15523, KCNK7, IGHM, PASK, KIDINS220, PCMI, KIAA0092, ASB9, MAP3K4, CD1B, COL6A1, HCA127, ZNF262, GG2-1, CAPN3, SAP18, EIF3S5, ZNF337, EIF4A1, DBT, CROT, FLJ10474, FLJ10483, CBX8, DKFZP586M1523, CCRL1AP, FLJ14153, KIAA0397, COL2A1, CD164, TLE4, PRO2730, ATM, RFX5, KIAA0515, FLJ20542, HYPH, ERG-1, DBH, SCML2, GNAO1, WDR13, GCA, FLJ23323, FLJ11362, CGBP, MGAT1, HMGB2, NDUFA6, KIAA0515, KIF13A, OPA1, BRD1, ATP2B4, PSME1, KIAA0931, HPS4, KIAA1966, DKFZP564J0123, DBY, HUMNPHY20, MAT2A, DFFB, FLJ20294, ADSL, CSTF2T, ZNFN1A1, LOC51194, FLJ21269, DJ79P11.1, BCAT1, MGC21854, DKFZP586D0824, EMCN, C21orf91, SDPR, PRO1635, ITGA4, FLJ20171, ROBO4, ZNF6, DRLM, TAGAP, PRDM16, ST6GalIII, GNAI1, EHZF, MGC10966, ARHGAP9, HEMGN, GNG2, LOC83690, PTGS1, MGC41924, USP2, FLJ33069, CT2, C4ST3, PRAM-1, FLJ32122, SLC11A3, BIC, TNFSF13B, FLJ37080, FLJ35564, KIAA1913, CDH26, BCL11A, FLJ30046, MGC7036, DKFZP566N034, RARA, C1orf21, PAG, SH2D3C, FLJ00026, STIP-1, FLJ39957, KLHL6, VIK, FLJ34922, SHANK3, FLJ00026, PTPN22, HRB2, ZDHHC2, DKFZP566K1924, SYTL4, DACH, FLJ21986, EVIN2, GAB3, CYYR1, MMP28, EHZF, FLJ00058, LOC93589, KLF12, CLLD8, KIAA1218, MGC16179, HS3ST3B1, ARHGAP9, LOC144402, LOC114928, FLJ39370, PRKACB, MGC13105, Ellis1, CGI-145, EPB41L5, RAB39B, LOC145553, HRB2, SDCCAG33, ARRB1, EEFA1, MGC12992, BBX, DAP10, CMG2, GPR27, GBP5, FLJ20202, UCC1, RAD52B, KIAA1554, AKNA, TBXAS1, al3GTP, JAK3, B2M, MGC20496, CLLD8, ALEX3, FLJ21438, MJD, FLJ22570, AP1S2, TFDP2, P5CR2, C1orf21, KIAA1554, Evi1, MGC8721, FACL5, CYSLTR1, CTSS, Rgr, NID67, FLJ32194, MGC45400, KIAA1789, DCP1B, MGC4251, CPXM, SMBP, PARVG, ESRRBL1, C6orf33, MGC20262, C6orf33, MGC27027, LOC51234, ZNF33A, RGS18, KIAA1607, TIGA1, HOXA7, NAALADASEL, ATP8B2, CLYBL, DKFZP727G051, KIAA1214, WHIP, IRF5, UBL5, KIAA1946, GLTSCR2, CMG2, OSM, KIAA0748, FLJ11113, FLJ12994, ERO1-L(BETA), NUCB2, KIAA1337, DEF6, POLH, FLJ11712, LOC91526, TTYH2, ACRBP, MAML3, FLJ00012, C6orf37, MYH11, C9orf24, HNRPD, CCNDBP1, DKFZP434L0117, GPR114, ANKH, MGC13170, NOG, CXorf10, CIQTNF4, NAV1, RP1B9, DKFZp571K0837, SFXN1, KIAA1497, PHACS, PAPOLA, ELAC1, MDS006, FLJ14167, LOC136895, CGGBP1, MGC45962, CGI-85, AUTS2, FXYD5, FLJ32009, FGD3, HSAJ1454, GRP58, KIAA1954, ELD/OSA1, PRex1, MGC11324, FLJ90013, NIN283, HCA127, DKFZP564D1378, HMGB1, TRB@, MGC4796, ASE-1, YR-29, FLJ25476, CGI-67, STK33, SLC25A21, ZNFN1A1, DRLM, PP2135, STMN3, CAMK2G, MGC16169, DC6, GCNT1, PRO1635, STRIN, DLC1, DKFZp761D221, FLJ10656, ZNFN1A4, SENP7, MGC34827, MGC15619, FLJ32942, RPL28, FLJ00005, FLJ23462, DKFZp762L0311, FLJ30726, MGC3200, ARRB1, EIF3S7, HSA9761, FLJ11896, MGC10744, KIAA1309, WDR9, KIAA1587, MIR, FLJ12953, MGC12921, LOC130617, NAV1, HPSE, FLJ20085, KIAA1982, KCNK17, KIAA1495, LOC64744, AUTL1, LOC91689, SEPP1, PPP2CA, KHDRBS1, DREV1, MGC35274, SNRPE, LOC91689, KIAA0853, FLJ13215, TACC1, MGC20262, MGC17515, MGC40157, DKFZP572C163, PRPF8, HINT1, FUSIP1, MEF2D, C20orf24, TADA2L, NIN283, FS, HSPC063, ALS2, NHP2L1, LGALS12, MGC10986, KIAA1871, DKFZP434A0131, KIAA1949, DTNBP1, GPHN, SUV39H2, BRD7, FLJ32001, HYPC, EEF2K, ESRRB, ZNF226, IL18BP, CSRP2BP, HEMGN, FOXPI, SGK, FLJ11220, TRIM4, FLJ21918, KIAA1545, MGC2474, CDCA7, HSPC002, LOC115294, LOC119710, GTF3A, TAGAP, TCF7L2, FLJ22690, OAZIN, TRAP1, MGC42174, MGC9850, KIAA1632, HSU53209, BIVM, BAALC, WHSC1, C16orf5, KIAA1238, MRS2L, CGI-105, ZDHHC2, LOC143903, DKFZp762N0610, NSE1, OSBPL7, HAVCR2, ASAH1, KIAA1798, TLR4, MGC10946, PRex1, FLJ31340, TAHCCP1, C20orf141, FLJ20313, FAV9L, FRSB, PRKRA, P66, KIAA0141, RARA, BANP, FLJ00007, DTNBP1, LRP5, KIAA1337, MGC29667, WHSC1, MMP28, EVIN2, Cab45, CED-6, PTER, ZNFN2A1, NDP52, CHES1, KIAA1635, NFAT5, FLJ32332, HTRA3, MAP4K1, KIAA1337, AP1S2, FLJ23306, HP1-BP74, KIAA1218, BTBD4, DKFZp761F0118, MGC16703, BAZ2B, MU, FLJ13614, MYO15B, OAZIN, LOC92799, CANX, SUFU, KIAA1954, AGS3, LAPTM4A, HP1-BP74, FLJ23467, FLJ12892, MGC40042, KIAA1143, RPL11, LSR7, CENPJ, NY-REN-58, NRM, FLJ23563, WASF2, AMBP, NIP30, EIF2AK4, MGC15429, TTC7L1, NICN1, FXC1, FLJ20793, SOC, RPL13, HYPC, CLONE24945, MGC24663, TEM7R, FLJ14768, DKFZp667M2411, STARD9, FOXPI, ELP3, KIAA1337, CDA017, PPP6C, PAK1, FLJ10876, EPC1, ZNF397, C21orf63, KIAA1805, MIR, CYYR1, DKFZp564B0769, EPSTI1, MDM4, MGC23947, MGC14421, SDCCAG33, DKFZp762O076, LOC93109, STN2, HSMPP8, FLJ20265, LOC85028, MGC15435, 1-Sep, MGC41917, MSI2, Jade-1, IL17D, MGC2752, MATR3, PRKRA, DKFZp434C1714, MGC4415, DKFZP727C091, MYO38, FLJ35453, FLJ30794, DJ462O23.2, FLJ90130, FLJ22283, EEF2, LOC155066, ATPAF1, FLJ23499, STAM2, LOC85028, FLJ21709, LOC51279, TRA@, JAM3, SIAT6, KIAA1453, EIF2S3, LSR7, ROCK1, DKFZP566I1024, FANCD2, MEF-2, MGC2664, MGC15548, ZNF75A, HSPC126, EIF3S5, RBM7, FLJ20280, GSTA4, SEPP1, TIGD3, DKFZP434A1319, MCLC, MGC14136, DKFZP762N2316, LOC115330, D4ST-1, UCP4, PRMT6, LAK, NIN, FLJ10997, RAB4B, LMO4, RNR3, CENPH, FLJ23277, GBTS1, FLJ90013, LOC115509, PP2135, FLJ36175, SPINO, PAIP2, DKFZp761G0122, ATF7IP, WBP1, MGC29937, MGC9564, CASP2, TIGD7, C4S-2, MGC25181, LOC89887, KIAA1387, FLJ22283, GIT2, MIR, SSBP3, LOC159090, U5-200KD, FLJ10997, ZNF295, PGBD1, HEL308, POLH, AP3M1, NORE1, SEMA6D, PPID, CUL5, LOC91663, FLJ13171, BAT4, RPLP1, KIAA1630, CT2, HSPC182, HMGB1, FLJ20280, FKBP5, EIF3S6, C15orf15, TRPC7, FLJ31153, TA-KRP, MGC17919, AP2A1, C20orf132, SECP43, PPIL2, FLJ14494, YARS, MGC10974, CLN6, C20orf81, UZAF1, KIAA1238, FLJ23861, LOC144455, DKFZp564D177, NIP30, TBC1D1, ZNF265, および PPP4R2.

10

20

30

【 0 1 6 2 】

(表 8) いくつかの固形腫瘍幹細胞癌マーカー

Bmi-1, eed, easyh1, easyh2, mlf2, yy1, smarcA3, smarcA5, smarcD3, smarcE1, mllt3, frizzled 2, frizzled 6, frizzled 7, mlf2, Frizzled 1, Frizzled2, Frizzled4, Frizzled10, Frizzled6, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WNT10B, WNT16, AXIN1, BCL9, MYC, (TCF4), , SLC7A8, IL1RAP, TEM8, TMPRSS4, MUC16, GPRC5B, SLC6A14, SLC4A11, PPAP2C, CAV1, CAV2, PTPN3, EPHA1, SLC1A1, CX3CL1, ADORA2A, MPZL1, FLJ10052, C4.4A, EDG3, RARRES1, TMEM61, PTS, CEACAM6, , NID2, STEAP, ABCA3, CRIM1, IL1R1, OPN3, DAF, MUC1, MCP, CPD, NMA, ADAM9, GJA1, CD14, SLC19A2, ABCA1, PCDH7, ADCY9, SLC39A1, NPC1, ENPP1, N33, GPNMB, LY6E, CELSR1, LRP3, C20orf52, TMEM61, FLVCR, PCDHA10, GPR54, TGFBR3, SEMA4B, および PCDHB2.

10

【 0 1 6 3 】

(表 9) α - カテニンおよびE-カドヘリン癌幹細胞遺伝子シグネチャー

癌 幹細胞 遺伝子 シグネチャー	低～検出不能な 発現		上昇した発現	
CTNNA1 シグネチャー1	CTNNA1, LNX, ARMCX3, D2S448, TUSC1, GLUL, RB1, BEX2, SLC12A2, GALC, NGFRAP1, FGF13, KIAA1102, SLC1A4, DNAJD1		CAV1, CAV2, IGFBP3, S100A2, CXCL5, MET, FOXQ1, CDKN2A, MFHAS1, IL27RA, KLRF1, PKCA, UPP1, SLC7A5, ARNTL2, PRSS1 /// PRSS2 /// PRSS3, PRSS3, VNN1, RAB38, ZBED2, MYEOV, MAL, IMP-3, DHRS9	
CTNNA1 シグネチャー2	CTNNA1, <u>NCSTN</u> , LNX, ARMCX3, D2S448, TUSC1, GLUL, RB1, BEX2, SLC12A2, GALC, NGFRAP1, FGF13, KIAA1102, SLC1A4, DNAJD1		<u>EDG2</u> , CAV1, CAV2, <u>DCBLD2</u> , IGFBP3, S100A2, CXCL5, MET, FOXQ1, CDKN2A, MFHAS1, IL27RA, KLRF1, PKCA, UPP1, <u>CTSL2</u> , SLC7A5, ARNTL2, PRSS1///PRSS2///PRSS3, PRSS3, VNN1, RAB38, ZBED2, MYEOV, MAL, IMP-3, DHRS9	
CTNNA1 シグネチャー3	CTNNA1, <u>NCSTN</u> , LNX, ARMCX3, D2S448, GLUL, RB1		<u>EDG2</u> , CAV1, CAV2, <u>DCBLD2</u> , IGFBP3, S100A2, CXCL5, MET, FOXQ1, CDKN2A, MFHAS1, <u>CTSL2</u>	

20

30

40

CTNNA1 プロファイル 4 (295 アレイ)	CTNNA1, <u>NCSTN</u> , TUSC1, GLUL, FGF13, SLC12A2, GALC, SLC1A4, DNAJD1, RB1, ARMCX3, NGFRAP1, KIAA1102	<u>EDG2</u> , CAV1, CAV2, <u>DCBLD2</u> , CDKN2A, FOXQ1, IGFBP3, S100A2, MFHAS1, IL27RA, <u>CTSL2</u> , MET, PKCA, UPP1, ARNTL2, PRSS3, VNN1, RAB38, MAL, ZBED2, MYEOV, IMP-3, KLRF1, SLC7A5, DHRS9	
CTNNA1 プロファイル 5 (286 アレイ)	CTNNA1, <u>NCSTN</u> , D2S448, GLUL, FGF13, GALC, SLC1A4, DNAJD1, RB1, ARMCX3, NGFRAP1, KIAA1102	<u>EDG2</u> , CAV1, CAV2, CDKN2A, IGFBP3, S100A2, MFHAS1, IL27RA, <u>CTSL2</u> , MET, PKCA, UPP1, PRSS1///PRSS2///PRSS3, PRSS3, VNN1, RAB38, MAL, ZBED2, IMP-3, KLRF1, SLC7A5, CXCL5, DHRS9	10
CDH1 シグネチャー 1	CDH1, MMP7, Nov, FOSL1, IL1R2, SFRP1, KRT6B, G0S2, IL8, B3GNT5, FGFBP1	FLJ20152, ARNT, CYFIP2, C17orf27, TAP1, RNASEL, LOC57168	
			20
CDH1 シグネチャー 2	CDH1, MMP7, Nov, FOSL1, IL1R2, SFRP1, KRT6B, G0S2, IL8, B3GNT5, FGFBP1	<u>SHC1</u> , FLJ20152, ARNT, CYFIP2, C17orf27, TAP1, RNASEL, LOC57168	
CDH1 シグネチャー 3	CDH1, MMP7, Nov, FOSL1, IL1R2	<u>SHC1</u> , FLJ20152	
CDH1 プロファイル 4 (295 アレイ)	CDH1, MMP7, Nov, FOSL1, IL1R2, SFRP1, KRT6B, IL8, B3GNT5, FGFBP1	<u>SHC1</u> , FLJ20152, ARNT, CYFIP2, C17orf27, TAP1, RNASEL, LOC57168	30
CDH1 プロファイル 5 (286 アレイ)	CDH1, MMP7, Nov, FOSL1, IL1R2, SFRP1, KRT6B, G0S2, IL8, FGFBP1	<u>SHC1</u> , FLJ20152, CYFIP2, TAP1	

【 0 1 6 4 】

表9は、 α -カテニンおよびE-カドヘリン癌幹細胞遺伝子シグネチャーを別個のものとして示すが、いずれも、正常なヒト乳腺上皮と比較して、接着接合部として知られる細胞-細胞接触の本質的な成分の喪失を明らかにする。シグネチャー1遺伝子発現を保有する癌幹細胞は、検出不能または低レベルの α -カテニン (CTNNA1) 発現を示し、シグネチャー2遺伝子発現を保有する癌幹細胞は、検出不能または低レベルのe-カドヘリン (CDH1) 発現を示す。E-カドヘリンは、ホモ親和性細胞-細胞接着および上皮極性に関与する細胞表面受容体である。E-カドヘリンは、細胞接合部でのその機能のほかに、Wntシグナル伝達経路の本質的な成分である β -カテニンと直接相互作用する。 β -カテニンは、次に α -カテニンと相互作用して、 α -カテニンは、重合化アクチンに結合して細胞接合部を細胞骨格に繋ぐ (Bienz, 2004, Cur. Biol. 15:R64 ; Kobiela & Fuchs, 2004, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5:614)。 α -カテニンまたはe-カドヘリンタンパク質のいずれかのレベルの低減は、細胞-細胞接着を破壊しえて、マウスにおける α -カテニンの遺伝子欠失により、上

皮極性欠如、および前癌様病変に類似する上皮陥入を伴う表皮過形成が明らかになる。 α -カテニンおよびe-カドヘリンの変異および発現レベルの減少はいずれも、乳腺および結腸の腫瘍を含む異なる多くのヒト癌の特徴である。e-カドヘリンまたは α -カテニンの発現の低減はしばしば、転移と相関する。さらに、e-カドヘリンレベルは β -カテニンによるシグナル伝達に影響を及ぼし、e-カドヘリン発現の喪失は、それ自身本明細書に記述の特定のヒト癌に関係することが周知であるWntシグナル伝達の持続的な活性化を引き起こす可能性がある (Kobielak & Fuchs, 2004, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5:614; Hazan et al., 2004, Annals NY Acad. Science 1014:155-163; Mohammad, 2005, J. Pathol. 205:130-144)。

【0165】

10

α -カテニン癌幹細胞遺伝子シグネチャー

癌幹細胞における α -カテニン発現の検出不能または低レベルのほかに、本発明はさらに、様々な生理的機能を有し、ヒト癌の発達、維持、および／または進行において何らかの程度関係している多様な群の遺伝子の発現が正常乳腺上皮と比較して増加および減少することを同定した。本発明のいくつかの態様において、 α -カテニン発現の検出不能または低レベルは、以下を含む異なる組の遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現：nicastrin (NCSTN); ligand of numb-protein X (LNX); armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3); melanoma associated gene (D2S448); tumor suppressor candidate 1 (TUSC1); glutamine synthase (GLUL); retinoblastoma 1 (RB1), brain expressed X-linked 2 (BEX2); solute carrier family 12, member 2 (SLC12A2); galactosylceramidase (GALC); nerve growth factor receptor associated protein 1 (NGFRAP1); fibroblast growth factor 13 (FGF13); KIAA1102; solute carrier family 1, member 4 (SLC1A4); およびDnaJ homolog, subfamily D, member 1 (DNAJD1)、ならびに以下を含む異なる組の遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現：endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein coupled receptor 2 (EDG2); caveolin 1 (CAV1); caveolin 2 (CAV2); discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2); insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3); S100A2; CXCL5; c-Met (MET); forkhead box Q1 (FOXQ1); cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A); malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 (MFHAS1); interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA); killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1 (KLRF1); protein kinase C, alpha (PKCA); uridine phosphorylase 1 (UPP1); cathepsin L2 (CTSL2); solute carrier family 7, member 5 (SLC7A5); aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (ARNTL2); protease, serine, 1, 2, and 3 (PRSS13 PRSS2, PRSS3); vanin 1 (VNN1); RAB38; zinc finger, BED domain containing 2 (ZBED2); myeloma overexpressed gene (MYEOV); MAL; IGF-II mRNA-binding protein 3 (IMP-3); およびdehydrogenase/reductase SDR family, member 9 (DHRS9)を伴う。もう一つの態様において、 α -カテニン発現の検出不能または低レベルはさらに、以下の遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現を含む：NCSTN; LNX; ARMCX3; D2S448; TUSC1; GLUL; RB1; BEX2; SLC12A2; GALC; NGFRAP1; FGF13; KIAA1102; SLC1A4; およびDNAJD1。もう一つの態様において、 α -カテニンの検出不能または低レベルは、以下の遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現を伴う：EDG2; CAV1; CAV2; DCBLD2; IGFBP3; S100A2; CXCL5; MET; FOXQ1; CDKN2A; MFHAS1; IL27RA; KLRF1; PKCA; UPP1; CTSL2; SLC7A5; ARNTL2; PRSS1; PRSS2; PRSS3; VNN1; RAB38; ZBED2; MYEOV; MAL; IMP-3; およびDHRS9。本発明のさらなる態様において、シグネチャー1癌幹細胞は、以下の遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現：alpha-catenin; NCSTN; LNX; ARMCX3; D2S448; TUSC1; GLUL; RB1; BEX2; SLC12A2; GALC; NGFRAP1; FGF13; KIAA1102; SLC1A4; およびDNAJD1、ならびに以下の遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現：EDG2; CAV1; CAV2; DCBLD2; IGFBP3; S100A2; CXCL5; MET; FOXQ1; CDKN2A; MFHAS1; IL27RA; KLRF1; PKCA; UPP1; CTSL2; SLC7A5; ARNTL2; PRSS1; PRSS2; PRSS3; VNN1; RAB38; ZBED2; MYEOV; MAL; IMP-3; およびDHRS9、を示す。または、シグネチャー1癌幹細胞は、1) 以下の遺伝子の二つもしくはそれ以

20

30

40

50

上の検出不能もしくは低レベル発現：alpha-catenin；NCSTN；LNX；ARMCX3；D2S448；TUSC1；GLUL；RB1；BEX2；SLC12A2；GALC；NGFRAP1；FGF13；KIAA1102；SLC1A4；およびDNAJ D1、または2) 以下の遺伝子の二つもしくはそれ以上の上昇した発現：EDG2；CAV1；CAV2；DCBLD2；IGFBP3；S100A2；CXCL5；MET；FOXQ1；CDKN2A；MFHAS1；IL27RA；KLRF1；PKCA；UPP1；CTSL2；SLC7A5；ARNTL2；PRSS1；PRSS2；PRSS3；VNN1；RAB38；ZBED2；MYEOV；MAL；IMP-3；およびDHRS9を含む。

【0166】

本発明のいくつかの態様において、 α -カテニン発現の検出不能または低レベルは、以下を含む遺伝子の異なる組の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現： nicastrin (NCSTN)；ligand of numb-protein X (LNX)；armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3)；melanoma associated gene (D2S448)；glutamine synthase (GLUL)；および retinoblastoma 1 (RB1)、ならびに以下の遺伝子の異なる組の一つまたは複数の上昇した発現：endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein coupled receptor 2 (EDG2)；caveolin 1 (CAV1)；caveolin 2 (CAV2)；discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2)；insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)；S100A2；CXCL5；c-Met (MET)；forkhead box Q1 (FOXQ1)；cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)；cathepsin L2 (CTSL2)；およびmalignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 (MFHAS1)を伴う。もう一つのいくつかの態様において、 α -カテニン発現の検出不能または低レベルは、遺伝子：NCSTN；LNX；ARMCX3；D2S448；GLUL；およびRB1の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現を伴う。もう一つのいくつかの態様において、 α -カテニンの検出不能または低レベル発現は、遺伝子：EDG2；CAV1；CAV2；DCBLD2；IGFBP3；S100A2；CXCL5；MET；FOXQ1；CDKN2A；CTSL2；およびMFHAS1の一つまたは複数の上昇した発現を伴う。本発明のさらなる態様において、シグネチャー1癌幹細胞は、遺伝子：alpha-catenin；NCSTN；LNX；ARMCX3；D2S448；GLUL；およびRB1の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、ならびに遺伝子：EDG2；CAV1；CAV2；DCBLD2；IGFBP3；S100A2；CXCL5；MET；FOXQ1；CDKN2A；CTSL2；およびMFHAS1の一つまたは複数の増加した発現を示す。または、シグネチャー1癌幹細胞は、1) 遺伝子：alpha-catenin；NCSTN；LNX；ARMCX3；D2S448；GLUL；およびRB1の二つまたはそれ以上の検出不能または低レベル発現、または2) 遺伝子：EDG2；CAV1；CAV2；DCBLD2；IGFBP3；S100A2；CXCL5；MET；FOXQ1；CDKN2A；CTSL2；およびMFHAS1の一つまたは複数の上昇した発現を示す。

【0167】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現は、Nicastrin (NCSTN) の発現の減少を含みうる。ニカストリンは、その触媒サブユニットとしてプレセニリンが含まれる多量体 γ -セクレターゼ複合体の本質的な成分である。 γ -セクレターゼによる膜内タンパク質分解は、組織の発達および再生の際に細胞内シグナル伝達を引き起こすNotch；アルツハイマー病において蓄積するアミロイド β ペプチドの生成に寄与する β -アミロイド前駆体タンパク質 (APP)；ならびに γ -セクレターゼ複合体との相互作用およびそれによる切断の双方が接着接合部の安定性を調節するE-カドヘリン、を含む多くの受容体様タンパク質の正常なプロセシングにとって必要である。ニカストリンは、プレセニリンの安定化に関与して、このように γ -セクレターゼ活性にとって必要である (Baki et al., 2001, PNAS 98:2381；Marambaud et al., EMBO J. 21:1948；Yan et al., 2004, J. Neurosci. 24:2942)。しかし、ヘテロ接合ニカストリンマウスからの線維芽細胞が、ノックアウトマウスにおいて活性が全く存在しないのに対し、 γ -セクレターゼ活性の増加を予想外にも示したことから、ニカストリンはまた、阻害的役割を果たしうる (Li et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:33445)。このように、ニカストリンの発現の減少は、最初、 γ -セクレターゼ活性を増加させて、Notchによる増殖性のシグナル伝達を増加させ、およびE-カドヘリンの切断による細胞接着を減少させることができ、これらは、ニカストリンまたは γ -セクレターゼ阻害剤の発現のさらなる減少が腫瘍の成長を遅らせて、転移を阻害しうることを示唆している。

【0168】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現にはまた、Ligand of numb-protein X (LNX)の発現の減少が含まれる。LNXは、ユビキチン化およびプロテアソーム分解のために細胞運命決定因子Numbを標的とするRINGフィンガー型E3ユビキチンリガーゼである。細胞分裂の際に、Numbは、その非対称局在により一つの娘細胞への細胞の運命およびその後のNotschシグナル伝達の調節を制御する。Numbの分解の減少は、この非対称局在を破壊することが提唱されている(Nie et al., 2002, EMBO J. 21:93; Nie et al., 2004, J. Biol. Chem. 279:20807)。このように、癌幹細胞におけるLNXの発現の減少は、非腫瘍形成性娘細胞の生成より腫瘍形成性幹細胞の自己再生に寄与しうる。

【0169】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、胚形成、組織の維持、および癌に関係するタンパク質のアルマジロリピート (arm) ファミリーメンバーであるARMCX3の発現の減少を含む。armファミリーメンバーの発現は、様々なヒト癌腫において有意に低減されており、上皮由来の腫瘍の抑制において役割を有することを示唆している(Kurochkin et al., 2001, Biochem. Biophys. Res. Commun. 280:340)。

【0170】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現は、さらにMelanoma associated gene (MG50)の発現の減少を含む。MG50は、ヒト細胞溶解性Tリンパ球によって認識されるエピトープをコードして、可能性があるIL-1受容体アンタゴニストである黒色腫抗原である(Mitchell et al., 2000, Cancer Res. 60:6448)。

【0171】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、Glutamine synthase (GLUL)の発現の減少を含む。GLULは、グルタメートおよびアンモニアから、細胞成長にとって必須の豊富なアミノ酸であるグルタミンへのATP依存的変換を触媒する。GLULは、星状細胞のような、ならびにおそらく毒性のグルタメートおよびアンモニアのレベルの制御に関与している、中心周囲に局在する肝細胞のような細胞のサブセットにおいて高度に発現されているが、細胞の大多数は、グルタミンの産生に関して低レベルのGLULを発現する。GLULは β -カテニン変異を有する肝腫瘍において過剰発現され、Wntシグナル伝達経路による調節が示唆されている。しかし、GLULは、その誘導ではあるが腫瘍にとって不可欠な酵素であると考えられ、急速に増殖する腫瘍細胞にグルタミンを提供するために役立ち、腫瘍の成長速度を増強しうる(Medina et al., 2001, Am. Soc. Nut. 131:2539S; Leoppen et al., 2002, Cancer Res. 62:5685)。

【0172】

シグネチャー1癌肝細胞遺伝子発現はまた、遺伝性の網膜芽腫において変異しており、多数の癌において機能的に不活化されている、よく特徴付けのなされた腫瘍抑制因子であるRetinoblastoma 1 (RB1)の発現の減少を含む。RB1は、細胞周期の進行および分化の重要な転写調節因子として作用して、その喪失は制御されない癌肝細胞増殖に寄与しうる(Yamasaki & Pagano, 2004, Curr. Opin. Cell Biol. 16:623)。

【0173】

α -カテニン遺伝子発現シグネチャーはさらに、brain expressed X-linked 2 (BEX2); solute carrier family 12, member 2 (SLC12A2); galactosylceramidase (GALC); nerve growth factor receptor associated protein 1 (NGFRAP1); fibroblast growth factor 13 (FGF13); KIAA1102; solute carrier family 1, member 4 (SLC1A4); DnaJ homolog, subfamily D, member 1 (DNAJD1)およびtumor suppressor candidate 1 (TUSC1)の発現の減少を含む。BEX2 (p75NTR-associated cell death executor 5; NADE5とも呼ばれる)およびNGFRAP1 (NADEおよびBEX3とも呼ばれる)は、p75ニューロトロフィン受容体シグナル伝達に関するアダプタータンパク質であり、アポトーシスの誘導を促進する(Mukai et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:17566-70; Mukai et al., 2003, Vitam. Horm. 66:385-402; Roux & Barker, 2002, Prog. Neurobiol. 67:203-33)。SLC12A2は、上皮の塩分泌、細胞容積調節、およびニューロン膜電位において重要な役割を有する、広く発現されるナトリウム-カリウム-塩素共輸送体であり(Hebert et al., 2004, Pflugers Arch. 447:

580-93)、その機能喪失が出生前および古典的バーター症候群を引き起こすいくつかの遺伝子の一つである(Hebert, 2003, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 12:527-32)。GALCは、ミエリンの主要なグリコスフィンゴリピッドの一つである、ガラクトシルセラミドを含む特異的ガラクトリピッドのライソゾーム加水分解を触媒する β -ガラクトセレブロシダーゼをコードする。GALCは、クラッペ病(球様細胞白質ジストロフィー; GLD)において欠損しており、その患者の90%は、致死的な脳脱髄を有する小児である(Rafi et al., 1995, *Hum. Mol. Genet.* 4:1285-9; Boggs et al., 2004, *Glycoconj. J.* 21:97-110)。FGF13は、増殖、アポトーシス、細胞生存、走化性、細胞接着、分化、および遊走を含む細胞プロセスの多様なアレイに関係している線維芽細胞増殖因子ファミリーのメンバーである(Bottcher & Niehrs, 2005, *Endocr. Rev.* 26:63-77; Greene et al., 1998, *Eur. J. Neurosci.* 10:1911-25)。KIAA1102は、LOC22998での仮説上のヒトタンパク質である。SLC1A4は、遍在性の神経アミノ酸輸送体である(Zerangue & Kavanaugh, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:27991-4)。および最後に、DNAJD1は、熱ショックタンパク質40相同体分子シャペロンである。DNAJD1発現は、多くの原発性卵巣腫瘍において失われており、それらに化学療法剤に対する耐性を付与する(Shridhar et al., 2001, *Cancer Res.* 61:4258-65)。

【0174】

シグネチャー1癌肝細胞遺伝子発現は、Endothelial differentiation gene 2 (EDG2)の発現の増加を含む。EDG2は、分化、形態学的変化、および腫瘍細胞の浸潤より細胞増殖を刺激する生物活性リン脂質である、リゾホスファチジン酸(LPA)に対して高い親和性を有するG-タンパク質共役受容体ファミリーに属する。LPAは、卵巣腫瘍の成長を促進して、卵巣癌を有する患者において高濃度で見いだされており、卵巣癌において重要な役割を有することが示唆されている。LPAの上昇レベルはまた、子宮内膜および子宮頸癌患者においても検出されている(Mills and Moolenaar, 2003, *Nat. Rev. Cancer* 3:582)。癌幹細胞集団におけるEDG2の発現の増加は、腫瘍形成の開始においてより広いLPAに対する反応性を意味する。しかし、EDG2の発現レベルの増加は、アポトーシスのLPA非依存的誘導によって細胞成長速度の減少に関連しており(Fang et al., 2000, *Annals NY Acad. Science* 188)、LPA依存的シグナル伝達の拮抗は、腫瘍細胞の成長に対抗するようにバランスをとられなければならないが、LPA非依存的アポトーシスの増強はそうではないことを示唆している。

【0175】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現は、caveolin-1 (CAV1) and caveolin-2 (CAV2)の双方の発現の増加をさらに含む。カベオリンは、小胞と呼ばれる細胞膜陥入で構造的および調節的役割を果たす肝要な膜タンパク質である。小胞は、小囊輸送、コレステロール恒常性、およびシグナル伝達の分画を含む広範囲の細胞機能に関係している。カベオリン-1は、腫瘍抑制因子特性を有し、いくつかの乳癌において変異または失われている。逆に、カベオリン-2は、消化管および前立腺癌において上方制御されており、後者では転移に関連している。細胞生存率およびクローン性成長の刺激能を有するカベオリンの分泌型が最近同定されたことは、これらの矛盾する結果を説明するために役立つ(Chen et al., 2004, *Physiol. Rev.* 84:1341; Williams & Lisanti, 2005, *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 288:C494-C506)。このように、カベオリンの細胞外型のターゲティングは、これらのタンパク質の発現の増加を伴う癌幹細胞の増殖を阻害する。

【0176】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、ニューロフィリン、VEGFの細胞表面受容体およびセマフォリンと構造的に類似のI型膜貫通タンパク質であるDiscoidin, CUB and LCC domain containing 2 (DCBLD2)の発現の増加を含む。DCBLD2の発現の増加は、転移表現型の獲得により肺癌細胞において、および転移病変を高頻度で有する肺癌において見いだされる(Kobuke et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:34105; Koshikawa et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277:2822-8)。このように、1型腫瘍幹細胞におけるDCBLD2の発現の増加は、転移能の増加を示す。

【0177】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)の発現の増加を含む。IGFBP3は、細胞の増殖および生存を調節するインスリン様増殖因子 (IGF) -1の主な結合パートナーである。IGFBP-3はIGFの分裂効果を直接中和して、他の増殖因子およびホルモンによる成長阻害およびアポトーシスを媒介する。インビトロにおいて、IGFBP-3はまた、EGF受容体とのその相互作用およびマイトゲン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナル伝達を通して細胞増殖を刺激することができる。高レベルの循環中のIGFBP-3は、閉経前乳癌のリスクの増加に関連し、今日までほとんどの証拠が、IGFBP-3が様々な癌に対して保護的役割を果たすことを指摘している (Schedlich & Graham, 2002, 59:12-22; Ali et al., 2003, Horm. Metab. Res. 35:726-33; Re 10
nehan et al., 2004, 363:1346; Vestey et al., 2005, Breast Cancer Res. 7:R119)。

【0178】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はまた、S100A2の発現の増加を含む。S100 Ca²⁺結合タンパク質ファミリーは、Ca²⁺恒常性および細胞成長を含む様々な細胞機能に関係している。さらに、多くのS100タンパク質の発現がヒト癌において変化している。S100A2の発現は、非小細胞肺癌 (NSCLC) を含むいくつかの癌において増加しており、これはしばしばDeltaNp63に関連して、転移能に連結しうる。しかし、癌におけるS100タンパク質の役割および重要性はなお明確ではない (Diederichs et al., 2004, Cancer Res. 64:6654-9; Em 20
berley et al., 2004, Biochem. Cell Biol. 82:508-15; Smith et al., 2004, Br. J. Cancer 91:1515-24)。

【0179】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、免疫系の好中球を動員して前血管新生性であるリポ多糖類誘導型ケモカインであるCXCL5の発現の増加を含む。CXCL5の過剰発現は、ヒト副腎皮質癌の成長に連結しており、造血幹細胞の自己再生に寄与しうる (Keane et al., 2001, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:2239; Schteingart et al., 2001, J 30
. Clin. Endocrinol. Metab. 86:3968; Choong et al., 2004, Cytokine 25:239-45; Pold et al., 2004, Cancer Res. 64:1853)。このように、癌幹細胞によるCXCL5の発現の増加は、幹細胞の自己再生に寄与しえておよび／または血管新生を通して腫瘍を維持するために役立ちうる。

【0180】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現は、分泌型幹細胞増殖因子／散乱因子 (HGF/SF) によって活性化される受容体チロシンキナーゼであるc-Metの発現の増加を含む。c-Metは、胚形成の際の細胞増殖、解離、および遊走を制御して、ヒト癌におけるこれらのプロセスの異常な活性化は腫瘍の成長および転移に寄与する。Metの活性化は、β-カテニンをリン酸化して、この改変は細胞接合部でのα-カテニンとのβカテニンの会合の喪失を促進して、細胞接着を減少させて、β-カテニンをWnt媒介シグナル伝達に関して利用可能にする (Tokunou et al., 2001, Am. J. Pathol. 158:1451; Birchmeier et al., 2003, Nat. Rev. Mol Cell Biol. 4:915; Biez, 2004, Curr. Biol. 15:R64; Boccaccio et al., 2005, Nature 434:396; およびMa et al., 2005, Cancer Res. 65:1479)。

【0181】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、forkhead box Q1 (FOXQ1)の発現の増加を含む。フォークヘッドファミリーは、発達の多数の局面に参与するwinged helix転写因子の多様な群であり、その脱制御はヒト癌に寄与する。FOXQ1は、マウスにおける表皮毛幹の適切な分化にとって必要であり、結腸直腸腺癌および肺癌細胞株と共に膵臓癌において過剰発現されている。FOXQ1の過剰発現が発癌において果たす役割はなお不明確である (Bieller et al., 2001, DNA Cell Biol. 20:555-61; Hong et al., 2001, Genesis 29:163-71; Cao et al., 2004, Cancer Biol. Ther. 3:1081-9)。

【0182】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はまた、cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16INK4)の発現の増加を含む。p16INK4は、哺乳動物細胞周期のG₁チェックポイントを制御 50

する活性化サイクリン-Cdk複合体の阻害剤であり、腫瘍抑制因子タンパク質網膜芽腫 (Rb) のcdk4-媒介リン酸化の強力な阻害剤として同定されている。p16INK4は、多くのヒト癌において不活化される腫瘍抑制因子である (Okamoto et al., 1994, PNAS 91:11045; Kim et al., 2005, Int. J. Oncol. 26:1217-26)。

【0183】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、Malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 (MRHAS1)の発現の増加を含む。MRHAS1は、いくつかの固形腫瘍において増幅され、血液の悪性疾患および頭頸部扁平上皮癌において転座している領域である染色体8p23.1に存在する。MRHAS1自身は、B-細胞リンパ腫細胞株において転座しており、野生型およびキメラMRHAS1はいずれもヌードマウスモデルにおいて腫瘍形成特性を保有する (Tagawa et al., 2005, Oncogene 23:2576-81)。

【0184】

シグネチャー1癌幹細胞遺伝子発現はさらに、cathepsin L2(CTSL2)の発現の増加を含む。CTSL2は、ペプチダーゼC1ファミリーの胸腺および精巣特異的ライソゾームシステインプロテナーゼであり、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、および腎臓癌において誤発現されている (Santamaria et al., 1998, Cancer Res. 58:1624-30)。

【0185】

α -カテニン遺伝子発現シグネチャーはさらに、interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA); killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1 (KLRF1); protein kinase C, alpha (PKCA); uridine phosphorylase 1 (UPP1); solute carrier family 7, member 5 (SLC7A5); aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (ARNTL2); protease, serine, 1, 2, and 3 (PRSS1, PRSS2, PRSS3); vanin 1 (VNN1); RAB38; zinc finger, BED domain containing 2 (ZBED2); myeloma overexpressed gene (MYEOV); MAL; IGF-II mRNA-binding protein 3 (IMP-3); および dehydrogenase/reductase SDR family, member 9 (DHRS9)の上昇した発現を含む。IL27RAは、養子免疫の調節に関与するクラスIサイトカイン受容体であり、Th1反応の生成にとって重要である (Chen et al., 2000, Nature 407:916-20; Robinson & O'Garra, Immunity 16:755-8)。KLRF1は、単一の細胞外C-型レクチン様ドメインを有するII型膜貫通糖タンパク質である。KLRF1は、MHCクラスI分子に結合して腫瘍またはウイルス感染細胞を正常宿主細胞と区別するナチュラルキラー (NK) 細胞および他の造血細胞によって発現される (Roda-Navarro et al., 2001, Biochim. Biophys. Acta. 1520:141-6; Natarajan et al., 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:853-5)。PKCAは、カルシウムおよびジアシルグリセロールによって活性化されるセリンおよびトレオニン特異的タンパク質キナーゼファミリーのメンバーであり、多数の細胞シグナル伝達経路に関与する広範なタンパク質標的をリン酸化する。いくつかのPKCイソ型がヒト癌において上方制御されている (Shen, 2003, Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 3:301-7; Lahn et al., 2004, Oncol. 67:1-10)。ウリジンホスホリラーゼ (UPP1) は、ウリジンのウラシルへの可逆的加リン酸分解を触媒するピリミジンサルベージ経路における重要な酵素である。UPP1は、いくつかの腫瘍細胞株および転移に関連する原発腫瘍において過剰発現されている (Watanabe & Uchida, 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2:265-72; Miyashita et al., 2002, Cancer 94:2959-66; Sahin et al., 2005, Pancreas 30:158-67)。SLC7A5は、陽イオンアミノ酸輸送体である (Closs et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:7538-44)。ARNTL2は、日周リズムおよび細胞増殖を含む多様な生理的プロセスを制御する塩基性のヘリックス-ループ-ヘリックスPER-ARNT-SIM転写因子ファミリーのメンバーである (Schoenhard et al., 2002, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283:C103-14; Yeh et al., 2003, Oncogene 22:5306-14)。PRSS1、PRSS2、およびPRSS3は、PRSS1が症候性遺伝性膵炎を有する患者の80%において変異している膵臓によって分泌されるセリンプロテアーゼである (Szmola et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:48580-9; Howes et al., 2005, Clin. Lab Med. 25:39-59)。VNN1は、バニンタンパク質ファミリーの上皮細胞外酵素メンバーであり、酸化ストレスに対するグルタチオン依存的反応において役割を果たす (Martin et al., 2001, Immunogenet. 53:296-306

10

20

30

40

50

；Berruyer et al., 2004, Mol. Cell Biol. 24:7214-24)。RAB38は、細胞内小囊移動を調節するRAS腫瘍遺伝子ファミリーの低分子GTP結合タンパク質メンバーである。メラノサイトにおけるRAB38のGTP結合ドメインにおける点突然変異は、チョコレートマウスの眼皮膚白皮症を生じる (Loftus et al., 2002, PNAS 99:4471-6；Osanai et al., 2005, Biol. Chem 286:143-53)。ZBED2は、局所染色質構築の変化において役割を果たすことが提唱されているドメインであるBEDフィンガードメインを含むジンクフィンガードメインである (Mahajan et al., 2002, Mol. Cell Biol. 22:6883-94)。MALは、MALプロテオリピッドファミリーの疎水性の肝要な膜タンパク質であり、グリコスフィンゴリピッドに富むミエリンおよび膜微小ドメインの形成、維持、および機能に参与している (Frank, 2000, Prog. Neurobiol. 60:531-44)。IMP-3は、核小体に局在して、そこで哺乳動物の後期発達の際にインスリン様増殖因子IIリーダー-3 mRNAの5' UTRに結合してその翻訳を抑制する。さらに、IMP-3は、膵管上皮の癌腫および悪性度の高い異形成病変の感度のよい特異的マーカーである (Nielsen et al., 1999, Mol. Cell Biol. 19:1262-70；Yantiss et al., 2005, Am. J. Surg. Pathol. 29:188-95)。DHRS9は、レチノールをレチンアルデヒドに変換するSDRスーパーファミリーのレチノールデヒドロゲナーゼ/レダクターゼであり、これは視覚の導入、細胞成長、および胚発達を含むビタミンAの様々な生物学的機能を媒介するオールトランスレチン酸の形成における二つの反応のうち最初の反応である。DHRS9の発現は、結腸腺癌、癌腫、および七つの癌細胞株において低減され、APCによって調節されるように思われる (Markova et al., 2003, Mol Genet. Metab. 78:119-35；Jette et al., 2004, J. Biol. Chem. 279:34397-405)。

【0186】

先に記述したシグネチャーおよび本発明のいくつかのシグネチャーは最適化されると理解すべきである。本発明は、これらの特定のシグネチャーを用いることに限定されない。有用な情報を提供する一つまたは複数のマーカーの任意の組み合わせを本発明の方法において用いることができる。たとえば、シグネチャーが有用な情報を生じる能力を維持しながら (たとえば、試験の非存在下で得られるであろうより多くの情報)、一つまたは複数のマーカーを上記のシグネチャーに加える、またはそこから差し引くことができると理解すべきである。

【0187】

E-カドヘリン癌幹細胞遺伝子シグネチャー

癌幹細胞におけるE-カドヘリン発現の検出不能または低レベルのほかに、本発明は、正常乳腺上皮と比較してヒト癌の発達、維持、および／または進行に関係している広範な生理的機能を有する多様な組の遺伝子の増加または減少した発現をさらに同定する。本発明のいくつかの態様において、E-カドヘリン発現の検出不能または低レベルは、以下の遺伝子の一つまたは複数の検出不能または低レベル：matrix metalloproteinase 7 (MMP7)；nephroblastoma overexpressed gene (Nov)；FOS-like antigen 1 (FOSL1)；interleukin 1 receptor, type II (IL1R2), secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)；keratin 6B (KRT6B)；putative lymphocyte G0/G1 switch gene (GOS2)；interleukin 8 (IL8)；UDP-GlcNAc：betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 (B3GNT5)；およびfibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1)、ならびに以下を含む遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現：SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (SHC1)；FLJ20152；aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)；cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2)；chromosome 17 open reading frame 27 (C17orf27)；transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (TAP1)；RNASEL；およびsimilar to aspartate beta hydroxylase (LOC57168)をさらに含む。もう一つの態様においてE-カドヘリン発現の検出不能または低レベルは、遺伝子：MMP7；Nov；FOSL1；IL1R2；SFRP1；KRT6B；GOS2；IL8；B3GNT5；およびFGFBP1の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現をさらに含む。もう一つの態様において、E-カドヘリンの検出不能または低レベルは、遺伝子：SHC1；FLJ20152；ARNT；CYFIP2；C17orf27；TAP1；RNASEL；およびLOC57168の一つまたは複数の上昇した発現をさらに含む。本発明のさらなる

態様において、シグネチャー2癌幹細胞は、遺伝子： E-cadherin；MMP7；Nov；FOSL1；IL1R2；SFRP1；KRT6B；GOS2；IL8；B3GNT5；およびFGFBP1の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現を含み、ならびに遺伝子：SHC1；FLJ20152；ARNT；CYFIP2；C17orf27；TAP1；RNASEL；およびLOC57168の一つまたは双方の上昇した発現をさらに含む。または、シグネチャー2癌幹細胞は、1) 遺伝子：E-cadherin；MMP7；Nov；FOSL1；IL1R2；SFRP1；KRT6B；GOS2；IL8；B3GNT5；およびFGFBP1の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、ならびに2) 遺伝子：SHC1；FLJ20152；ARNT；CYFIP2；C17orf27；TAP1；RNASEL；およびLOC57168の一つまたは複数の上昇した発現を含む。

【0188】

本発明のいくつかの態様において、E-カドヘリンの検出不能または低レベルは、遺伝子：matrix metalloproteinase 7 (MMP7)；nephroblastoma overexpressed gene (Nov)；FOS-like antigen 1 (FOSL1)；およびinterleukin 1 receptor, type II (IL1R2)の一つまたは複数の検出不能または低レベル、ならびにSHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (SHC1)およびFLJ20152を含む遺伝子の一つまたは複数の上昇した発現をさらに含む。もう一つのよりいくつかの態様において、E-カドヘリン発現の検出不能または低レベルは、遺伝子：MMP7；Nov；FOSL1；およびIL1R2の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現をさらに含む。もう一つの態様において、E-カドヘリン発現の検出不能または低レベル発現は、遺伝子：SHC1およびFLJ20152の一つまたは双方の上昇した発現をさらに含む。本発明のさらにいくつかの態様において、シグネチャー2癌幹細胞は、遺伝子：E-カドヘリン；MMP7；Nov；FOSL1；およびIL1R2の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現を含み、ならびに遺伝子：SHC1およびFLJ20152の一つまたは双方の上昇した発現をさらに含む。または、シグネチャー2癌幹細胞は、1) 遺伝子：E-cadherin；MMP7；Nov；FOSL1；およびIL1R2の一つまたは複数の検出不能または低レベル発現、ならびに2) 遺伝子：SHC1およびFLJ20152の一つまたは双方の上昇した発現を含む。

【0189】

シグネチャー2癌幹細胞遺伝子発現は、matrix metalloproteinase 7 (MMP7)の発現の減少を含む。マトリクスメタロプロテナーゼ (MMP) は、組織形成およびリモデリングの際に細胞外マトリクスの代謝回転に関与する分泌型タンパク質分解酵素である。腫瘍細胞によるMMPの過剰発現および分泌は、細胞外マトリクスおよび基底膜の双方の不適当な分解に寄与すると考えられ、細胞成長を刺激する生物活性分子を放出して、腫瘍細胞の浸潤および転移を手助けする (Hamacher et al., 2004, Dtsch. Med. Wochenschr. 129:1976-80；Mott & Werb, 2004, Curr. Opin Cell Biol. 16:558-64)。

【0190】

シグネチャー2癌幹細胞遺伝子発現はさらに、nephroblastoma overexpressed gene (Nov)の発現の減少を含む。Novは、トリ腎芽細胞腫において骨髄芽球症-関連ウイルス1-Nの挿入部位として同定され、細胞増殖、走化性、および細胞接着を含む様々な生物学的役割を果たす細胞外マトリクスに関連する分泌型タンパク質ファミリーに属する。Novは、細胞周期制御および細胞成長を遅らせることに関係している。この考え方と一致して、高レベルのNov発現はあまり攻撃的でない脳腫瘍に関連し、Novのレベルは副腎皮質腫瘍が悪性状態へと進行するにつれて減少する (Martinerie et al, 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86:3929-40；Gellhaus et al., 2004, J. Biol. Chem. 279:36931)。

【0191】

シグネチャー2癌幹細胞遺伝子発現はさらに、FOS-like antigen 1 (FOSL1)の発現の減少を含む。FOSL1を含むJunおよびFosタンパク質の二量体は、転写因子活性化因子タンパク質-1 (AP-1)を構成する。AP-1は、細胞外および細胞内シグナル伝達経路の複雑なネットワークによって決定される、細胞のトランスフォーメーション、増殖、分化、およびアポトーシスを含むしばしば競合的な多数の細胞機能に連結している。FOSL1は、AP-1によって誘導される細胞のトランスフォーメーションにとって必須のトランス活性化ドメインを含まないという点において、c-Fosとは異なる (Matsuo et al., 2000, Nat. Genet. 24:184-7；Ameyar et al., 2003, Biochimie 85:747-52)。

【0192】

シグネチャー2癌幹細胞遺伝子発現はまた、分泌型および膜結合型の双方のIL-1に関する非シグナル伝達デコイ受容体であるinterleukin 1 receptor, type II (IL1R2)の発現の減少を含む。IL-1は、血管新生および分裂促進性サイトカインIL-8のような前腫瘍形成性サイトカインの産生を刺激することができる強力な前炎症性サイトカインである (Bourke et al., 2003, J. Immunol. 170:5999; Cui et al., 2003, J. Immunol. 171:6814; P antschenko et al., 2003, hit. J. Oncol. 23:269-84)。このように、癌幹細胞のこの集団におけるIL1R2発現レベルの回復は、炎症および腫瘍成長の双方を中和するために役立つ。

【0193】

E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーは、secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1); keratin 6B (KRT6B); putative lymphocyte G0/G1 switch gene (G0S2); interleukin 8 (IL8); UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 (B3GNT5); およびfibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1)の発現の減少をさらに含む。SFRP1は、Wntタンパク質に結合してシグナル伝達を調節する分泌型frizzled関連タンパク質である (Uren et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:4374-82)。SFRP1は、アポトーシスを促進することができ、様々な癌腫において下方制御または高度メチル化されている (Kawano & Kypta, 2003, 116:2527-34において論評)。KRT6Bは、上皮細胞において発現されるケラチン遺伝子ファミリーのメンバーであり、過剰な細胞増殖または異常な分化を受ける階層化上皮において強く誘導される (Takahashi et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:18581-92)。G0S2は、細胞周期のG1期に入るように細胞を拘束する際に役割を果たす低分子塩基性リンタンパク質である (Cristillo et al., 1997, DNA Cell Biol. 16:1449-58)。IL-8は、強力な前炎症性の、化学誘引性の前血管新生CXCケモカインである (Dumitrascu, 1996, Rom J. Intern. Med. 34:159-72; Rosenkilde & Schwartz, 2004, AP MIS 112:481-95)。B3GNT5は、GlcNAcを糖脂質基質に転位させる β -1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼファミリーのII型膜酵素をコードして (Togayachi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:22032-40)、腫瘍の浸潤および転移に強く連結している (Chakraborty & Pawelek, 2003, 20:365-73)。FGFBP1は、増殖、アポトーシス、細胞生存、走化性、細胞接着、分化、および遊走を含む多様なアレイの細胞プロセスに関係している、線維芽細胞増殖因子ファミリーの酸性および塩基性メンバーの双方に結合して活性化 (Bottcher & Niehrs, 2005, Endocr. Rev. 26:63-77)。

【0194】

シグネチャー2癌幹細胞遺伝子発現は、SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (SHC1)の発現の増加をさらに含む。SHC1は、細胞増殖、分化、およびアポトーシスを調節する、インスリン様増殖因子 (IGF-1) および上皮細胞増殖因子 (EGF) 経路の重要な媒介物質であるアダプタータンパク質である。SHC1の三つのイソ型は、同じ遺伝子、すなわちp46 Shc、p52 Shc、およびp66 Shcから発現されるが、p46およびp52イソ型は胃癌において過剰発現される (Yukimasa et al., 2005, Int. J. Oncol. 26:905-11)、p66 Shcの変種対立遺伝子は、乳癌のリスクを減少させることができる (Wagner et al., 2004, Carcinogenesis 25:2473)。

【0195】

シグネチャー2癌幹細胞遺伝子発現は、LOC54463での仮説上のヒトタンパク質FLJ20152の発現の増加をさらに含む。

【0196】

E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーは、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT); cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2); chromosome 17 open reading frame 27 (C17orf27); transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (TAP1); RNASEL; およびsimilar to aspartate beta hydroxylase (LOC57168)の上昇した発現をさらに含む。塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスPER-ARNT-SIM転写因子ファミリーのメンバーであるアリール炭化水素 (Ah) 受容体は、多環式芳香族炭化水素を含む環

境汚染物質に結合し、特異的な生体異物反応要素 (XREs; Reyes et al., 1992, Science 256:1193-5) との相互作用を通して生体異物代謝に関与する遺伝子の発現を調節する。CYFIP2は、ポリソームに関連するRNA結合タンパク質である脆弱X精神遅滞タンパク質 (FMRP) と相互作用して、FMRP機能に拮抗するために、低分子GTP結合タンパク質細胞骨格調節物質であるRac1のエフェクターとして作用する (Schenck et al., 2003, Neuron 38:843-5; Schenck et al., 2001, PNAS 98:8844-9)。TAP1は、ATP-結合カセット (ABC) 輸送体スーパーファミリーのメンバーである。TAP1は、小胞体およびシスゴルジに局在して、分解した細胞質タンパク質ペプチドを細胞性免疫系のMHCクラスI分子に提示することに関与している (Townsend & Trowsdale, 1993, 4:53-61)。RNASELは、インターフェロンによって誘導されるエンドリボヌクレアーゼであり、哺乳動物細胞においてインターフェロンの作用と共に塩基性恒常性RNA安定性の双方に関係している5'リン酸化、2',5'-連結オリゴアデニレートによって活性化される (Zhou et al., 1993, Cell 72:753-65)。RNASELにおける変異は前立腺癌のリスクを増加させうる (Silverman, 2003, Biochem. 42:1805-12)。

10

【0197】

上記のシグネチャーは、最適化されて、本発明のいくつかのシグネチャーを表すことを理解すべきである。本発明は、これらの特定のシグネチャーを用いることに限定されない。有用な情報を提供する一つまたは複数のマーカーの任意の組み合わせを本発明の方法において用いることができる。たとえば、シグネチャーが有用な情報を生じる能力を維持しながら (たとえば、試験の非存在下で得られるであろうより多くの情報)、一つまたは複数のマーカーを上記のシグネチャーに加える、またはそこから差し引くことができる。

20

【0198】

さらなる固形腫瘍幹細胞癌マーカーは、たとえば以下の実施例4において記述される方法を用いて同定されうる。

【0199】

本発明のもう一つの局面は、癌試料の遺伝子発現パターンを癌幹細胞遺伝子発現シグネチャーと比較することによって、固形腫瘍試料のプロファイリングに基づく腫瘍を分類するための手段および方法である。本発明は、遠隔転移および死亡の予測因子である腫瘍幹細胞遺伝子発現シグネチャーを初めて発見した。本発明のマイクロアレイデータは、乳癌および結腸腫瘍のような腫瘍を、たとえば転移および死亡の低リスクまたは高リスクに分類するために有用である個々の予測因子遺伝子および遺伝子シグネチャーを同定しながら、乳癌または結腸癌の発達、進行、および／または維持において役割を果たす可能性がある癌幹細胞マーカーを同定する。癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較した場合に、癌遺伝子プロファイルを含む異なるように発現されたポリヌクレオチドおよび／またはタンパク質の検出に基づく分類を用いて、臨床経過を予測する、化学療法剤に対する感受性を予測する、適当な治療の選択の指針とする、および処置反応をモニターすることができる。さらに、そのような癌幹細胞マーカーを標的とする治療物質の開発後、本明細書において詳細に記述した癌遺伝子シグネチャーの検出により、そのような治療からおそらく恩典を有する患者を同定することができるであろう。

30

【0200】

本明細書において記述されるように、本発明は、二つの異なる細胞または組織試料におけるその発現レベルを決定することによって遺伝子発現プロファイルに遺伝子を集合させるための方法を用いる。本発明はさらに、たとえば転移および死亡を含む臨床転帰を予測するために癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較した場合にこれらの遺伝子プロファイルを用いることを想像する。本発明のマイクロアレイデータは、腫瘍幹細胞と正常乳腺上皮、非腫瘍形成性腫瘍細胞と正常乳腺上皮、および腫瘍幹細胞と非腫瘍形成性腫瘍細胞とのあいだを含む二つの組織試料のあいだで類似のおよび異なるように発現されたAffymetrix HG-U133アレイに含まれる遺伝子を含む遺伝子プロファイルを同定する。次に、これらの広い遺伝子発現プロファイルをさらに精製して、濾過して、発現の変化倍率、統計分析 (たとえば、多重比較試料のt-検定P値)、他の遺伝子の発現との相関、生物機能 (たとえ

40

50

ば、細胞周期調節因子、転写因子、プロテアーゼ等）、いくつかの治療標的（たとえば、抗体に基づく治療にとって適した細胞外膜会合タンパク質をコードする遺伝子）、さらなる患者試料において同定された発現、および臨床転帰の予測能が含まれるがこれらに限定されるわけではない、様々な異なる基準に基づいて遺伝子シグネチャーに細分割する。

【0201】

このように、本発明のいくつかの態様において、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において異なるように発現された遺伝子を、その発現変化倍率に基づいて異なる癌幹細胞遺伝子シグネチャーに細分割する。たとえば、腫瘍幹細胞において発現が2~2.5倍上昇した（または低減された、もしくは上昇および低減の双方）遺伝子は、癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含み、発現が2.5~3倍上昇した（または低減されたもしくは双方）の遺伝子は、もう一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含む。または、一定の発現変化倍率より上の遺伝子は全て、癌幹細胞遺伝子シグネチャーに含まれる。たとえば、腫瘍幹細胞において発現が2倍またはそれ以上低減された（または上昇、もしくは双方）遺伝子は全て、一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みえて、腫瘍幹細胞において発現が3倍またはそれ以上低減（または上昇もしくは双方）された遺伝子は全て、もう一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みうる等である。他の態様において、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において異なるように発現された遺伝子を、統計分析を用いて濾過する。たとえば、試料におけるt-検定のP値が0.01~0.005である上昇した（または低減されたもしくは双方）発現を有する遺伝子は全て、一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みえて、試料におけるt-検定P値が0.005~0.001である上昇した（または低減されたもしくは双方）発現を有する遺伝子は全て、もう一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みうる等である。さらに、独立した患者試料または異なる細胞株の遺伝子発現分析を先に記述したように生成された任意の癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較することができる。癌幹細胞遺伝子シグネチャーは、たとえば記述されるように、所定の癌幹細胞遺伝子シグネチャーの予測力を増加または維持するために、個々の表現型関連指数を計算することによって改変することができる（Glinsky et al., 2004, Clin. Cancer Res. 10:2272）。さらに、癌幹細胞遺伝子シグネチャーは、様々な基準に基づいて遺伝子を除外または含めること（たとえば、いくつかの治療標的を含める、生物学的に無関係な標的に基づいて除外すること）によって遺伝子毎にさらに狭めるまたは広げることができる。

【0202】

なおさらなる態様において、本発明のAffymetrix HG-U133アレイ分析によって生成されたプロファイルのような広い遺伝子発現プロファイルは、二つまたはそれ以上異なる基準に基づいて、さらに精製、濾過、遺伝子シグネチャーに細分割することができる。本発明のいくつかの態様において、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において異なるように発現された遺伝子を、その発現変化倍率と共にその生物学的機能に基づいて異なる癌幹細胞遺伝子シグネチャーに分割する。たとえば、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において3~3.5倍上昇した（または低減されたもしくは双方）発現を有する細胞周期の調節に関与する遺伝子は全て、一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みえて、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において3.5~4倍上昇した（または低減されたもしくは双方）発現を有する細胞周期の調節に関与する遺伝子は全て、もう一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みえて、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において4倍またはそれ以上上昇した（または低減されたもしくは双方）発現を有する細胞外膜関連タンパク質をコードする遺伝子は全て、もう一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みえて、腫瘍幹細胞対正常乳腺上皮において5倍またはそれ以上上昇した（または低減されたもしくは双方）発現を有する細胞外膜会合タンパク質をコードする遺伝子は全て、なおもう一つの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを含みうる。

【0203】

いくつかの態様において、腫瘍幹細胞において異なるように発現された遺伝子は、その発現変化倍率または発現変化百分率と組み合わせて、選択された遺伝子とのその発現の相関に基づいて癌幹細胞遺伝子シグネチャーに分割される。具体的に、いくつかの態様において、本発明のマイクロアレイ分析を用いて、 α -カテニン発現と相関して、正常乳腺組

織および α -カテニン非欠損腫瘍幹細胞と比較して、検出不能または低レベルの α -カテニンを有する腫瘍幹細胞における発現変化倍率または発現変化百分率を示す、発現レベルを有する遺伝子に基づいて固形腫瘍幹細胞シグネチャー、 α -カテニン遺伝子シグネチャーを同定した。低い～検出不能な α -カテニン発現を含む腫瘍幹細胞において検出不能～低い発現を有する遺伝子は、全ての腫瘍幹細胞における α -カテニン発現と0.9～1の正の相関を有すると共に、正常乳腺組織および α -カテニン非欠損腫瘍幹細胞と比較して低～検出不能な α -カテニンを含む腫瘍幹細胞において90%またはそれより低い発現レベルを有すると同定される。低～検出不能な α -カテニン発現を含む腫瘍幹細胞における上昇した発現を有する遺伝子は、全ての腫瘍幹細胞における α -カテニン発現と-0.9～-1の負の相関を有すると共に、正常乳腺組織および α -カテニン非欠損腫瘍幹細胞より9倍またはそれ以上、低～検出不能 α -カテニンを含む腫瘍幹細胞における発現レベルを有すると同定された。併せて、これらの遺伝子は、 α -カテニンシグネチャー1（表9）を含む。次に、先に記述された倍率または発現変化基準にわずかに違反したが、治療的および／または生物学的に関連する遺伝子であると主観的に決定された遺伝子、すなわち検出不能～低い発現を有する遺伝子1個と上昇した発現を有する遺伝子3個（表9において下線で示す）をさらに含めることによって、第二の α -カテニンシグネチャー（ α -カテニンシグネチャー2）を作製した。次に、 α -カテニンシグネチャー2から以下の遺伝子：検出不能～低い発現を有する遺伝子9個および上昇した発現を有する遺伝子15個（表9）を除外することによって、第三の α -カテニンシグネチャー（ α -カテニンシグネチャー3）を作製した。 α -カテニンシグネチャー2を、二つの独立した癌患者集団から遺伝子発現分析に対して比較した： α -カテニンプロファイル4および α -カテニンプロファイル5をそれぞれ生じる、Netherlands Cancer Instituteからの構成的な初期乳癌患者295人およびErasmus Medical Centerからのリンパ節陰性乳癌患者286人（表9）。

【0204】

他の態様において、本発明のマイクロアレイ分析を用いて、E-カドヘリン発現と相関して、正常乳腺組織およびE-カドヘリン非欠損腫瘍幹細胞と比較して、検出不能または低レベルのE-カドヘリンを有する腫瘍幹細胞における発現変化倍率または百分率を示す、発現レベルを有する遺伝子に基づいて固形腫瘍幹細胞シグネチャー、E-カドヘリン遺伝子シグネチャーを同定した。低い～検出不能なE-カドヘリン発現を含む腫瘍幹細胞において検出不能～低い発現を有する遺伝子は、全ての腫瘍幹細胞におけるE-カドヘリン発現と正の相関0.9～1を有すると共に、正常乳腺組織およびE-カドヘリン非欠損腫瘍幹細胞と比較して低い～検出不能なE-カドヘリンを含む腫瘍幹細胞において85%またはそれより低い発現レベルを有すると同定される。低い～検出不能なE-カドヘリン発現を含む腫瘍幹細胞において上昇した発現を有する遺伝子は、全ての腫瘍幹細胞におけるE-カドヘリン発現と-0.9～-1の負の相関を有すると共に、正常乳腺組織およびE-カドヘリン非欠損腫瘍幹細胞より2.5倍またはそれ以上、低い～検出不能E-カドヘリンを含む腫瘍幹細胞における発現レベルを有すると同定された。併せて、これらの遺伝子は、E-カドヘリンシグネチャー1を含む。次に、先に記述された倍率変化または発現変化基準にわずかに違反したが、治療的および／または生物学的に関連する遺伝子であると主観的に決定された遺伝子、すなわち上昇した発現を有する遺伝子1個（表9において下線で示す）をさらに含めることによって、第二のE-カドヘリンシグネチャー（E-カドヘリンシグネチャー2）を作製した。次に、E-カドヘリンシグネチャー2から遺伝子：検出不能～低い発現を有する遺伝子6個および上昇した発現を有する遺伝子6個（表9）を除外することによって第三のE-カドヘリンシグネチャー（E-カドヘリンシグネチャー3）を作製した。E-カドヘリンシグネチャー2を、二つの独立した癌患者集団からの遺伝子発現分析に対して比較した：E-カドヘリンプロファイル4およびE-カドヘリンプロファイル5をそれぞれ生じる、Netherlands Cancer Instituteからの構成的な初期乳癌患者295人およびErasmus Medical Centerからのリンパ節陰性乳癌患者286人（表9）。

【0205】

本発明はさらに、転移および死亡が含まれるがこれらに限定されるわけではない臨床転

帰を予測するためにこれらの癌幹細胞遺伝子シグネチャーを用いることを具体化する。遺伝子発現分析（たとえば、マイクロアレイ分析、免疫組織化学分析等）が含まれる任意の独立した患者集団または遺伝子発現分析にとって適した腫瘍試料（たとえば、凍結組織生検、パラフィン抱埋腫瘍組織試料等）を、決定された臨床パラメータまたはたとえばリンパ節の状態、転移、死亡等を含む臨床パラメータの進行中のモニタリングと共に用いて、癌幹細胞遺伝子シグネチャーが臨床転帰を予測するか否かを査定することができる。いくつかの態様において、本発明は、 α -カテニンおよびE-カドヘリン腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーが、二つの独立した癌患者集団、すなわちNetherlands Cancer Institute (van de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999)からの構成的初期乳癌患者295人およびErasmus Medical Center (Wang et al., 2005, Lancet 365:671)からのリンパ節陰性乳癌患者286人、における転移および死亡を予測するか否かを試験する。多くの統計分析を用いて予測能を決定することができる。これらには、たとえばカプラン-マイヤー生存分析、Cox比例ハザード生存分析、カイ二乗分析、および多変量分析が含まれる。本発明のいくつかの態様において、Netherlands Cancer Instituteからの構成的な初期乳癌患者295人のCox比例ハザード生存分析およびErasmus Medical Centerからのリンパ節陰性乳癌患者286人のカイ二乗分析を用いて、臨床転帰を有意に予測する癌幹細胞遺伝子シグネチャーを同定した。

【0206】

Netherlands Cancer Institute (van de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999)からの構成的初期乳癌患者295人からのマイクロアレイデータの相関およびCox比例ハザード生存分析は、 α -カテニンシグネチャー2と正の相関を示す遺伝子発現プロファイル（ α -カテニンプロファイル4）を有する患者125人の腫瘍を同定し、 α -カテニンシグネチャー2を、相関0.1あたりの単変量ハザード比1.15 ($P=5.9 \times 10^{-4}$)で転移を有意に予測するとして、および相関0.1あたりの単変量ハザード比1.24 ($P=3.7 \times 10^{-7}$)で死亡を有意に予測するとして示した。さらに、Erasmus Medical Center (Wang et al., 2005, Lancet 365:671)からのリンパ節陰性乳癌患者286人からのマイクロアレイデータの相関およびカイ二乗分析は、 α -カテニンシグネチャー2 ($n=77$)と相関する遺伝子発現プロファイル（ α -カテニンプロファイル5）を有する患者の腫瘍が、転移のリスクが増加している ($P=0.67$) ことを明らかにした。このように、 α -カテニン発現シグネチャー2のような腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーは、転移および死亡のリスクが高い腫瘍に関する遺伝子シグネチャーを提供し、このように不良な予後を予測する遺伝子シグネチャーである。 α -カテニン発現シグネチャー2の任意の特定の遺伝子は、腫瘍試料において発現の低減または発現の上昇のいずれかを有しうる、または有しえないが、発現レベルとシグネチャーにおける他の遺伝子との関係は、腫瘍試料を分類するために用いることができる独自の固形腫瘍幹細胞シグネチャーを作製する。

【0207】

上記のE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーを用いる類似の比較を再度用いて、表10において要約するように臨床転帰を査定した。Netherlands Cancer Instituteからの構成的初期乳癌患者295人からのマイクロアレイデータの相関およびCox比例ハザード生存分析は、E-カドヘリンシグネチャー2と正の相関を示す遺伝子発現プロファイル（E-カドヘリンプロファイル4）を有する患者の腫瘍240個を同定し、E-カドヘリンシグネチャー2を、相関0.1あたりの単変量ハザード比0.981 ($P=0.59$)で転移を有意に予測するとして、および相関0.1あたりの単変量ハザード比0.938 ($P=0.1$)で死亡を有意に予測するとして示した。 α -カテニンとE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーを併せると、同様に患者における転移を予測した（転移に関する単変量ハザード比は、相関0.1あたり1.28 ($P=4.2 \times 10^{-4}$)）。さらに、Erasmus Medical Center (Wang et al., 2005, Lancet 365:671)からのリンパ節陰性乳癌患者286人からのマイクロアレイデータの相関およびカイ二乗分析は、E-カドヘリンシグネチャー2 ($n=198$)と相関する遺伝子発現プロファイル（E-カドヘリンプロファイル5）を有する患者の腫瘍が、転移のリスクが増加している ($P=0.57$) ことを明らかにした。

【0208】

(表10) α-カテニンおよびE-カドヘリン遺伝子シグネチャーによる転移および死亡予測の統計的分析

	死亡		転移		転移
	295人の患者 (Netherlands Cancer Institute)		295人の患者 (Netherlands Cancer Institute)		286人の患者 (Erasmus Medical Center)
遺伝子 発現 シグネチャー	P値	危険率 (0.1あたり)	P値	危険率 (0.1あたり)	P値
CDH1	0.1	0.938	0.59	0.981	0.57
CTNNA1	3.7e-7	1.24	0.00059	1.15	0.67
CDH1 + CTNNA1	6.6e-5	1.37	0.00042	1.28	

10

20

【0209】

本発明は、α-カテニン遺伝子シグネチャーを不良臨床転帰の予知するものであると初めて同定する。本発明の特定の態様において、α-カテニンシグネチャーは、腫瘍を低リスクまたは高リスクとして分類するために、および腫瘍を低リスクまたは高リスクカテゴリーに割り当てるために臨床的に用いられる。α-カテニンシグネチャーはさらに、腫瘍の低リスクまたは高リスクとしての分類に基づいて診断、予後診断を提供する、および/または治療を選択するために、加えて、長い期間をかけて診断、予後、および/または治療をモニターするために、用いられうる。患者がα-カテニンシグネチャーを構成する遺伝子を発現する腫瘍を有し、それに従って、予後が不良であることがわかっている場合には、α-カテニンサブクラスの範囲に入っていない腫瘍においてより治療へのより積極的なアプローチが必要とされうる。例えば、リンパ節において疾患の証拠がない患者において(節陰性患者)、腫瘍の外科切除後に化学療法(アジュバント療法)を施すかどうかに関して決定がなされなければならない。いくらかの患者はそのような処置から恩恵を受ける可能性が高いが、それは重大な副作用をもち、低リスクの腫瘍を有する患者により避けられうる。現在、どの患者が恩恵を受けるだろうかを予測することは困難または不可能である。患者が不良予後カテゴリーに分類されることを知ることは、この決定を助けうる。さらになお、本発明のα-カテニンシグネチャーと高く相関しているα-カテニン遺伝子プロファイルの発現を検出することは、腫瘍進行に関連した情報を提供できる。腫瘍が進行するにつれて、それらの表現型特徴は変化しうることは周知である。従って、本発明は、乳房の腫瘍が、治療に応答してかまたは治療の不足に応答してかのいずれかで、癌幹細胞遺伝子シグネチャーと高く相関しているα-カテニン遺伝子プロファイルを発現することから発現しないことへ(または逆に)進化することができる可能性を企図する。従って、α-カテニン遺伝子シグネチャーと相関するかまたは相関しないかのいずれかであるα-カテニン遺伝子プロファイルの検出は、そのような進行を検出し、それに応じて治療を変えるために用いられうる。

30

40

【0210】

特定の治療に応答する腫瘍もあれば、応答しないものもあることは当技術分野におい

50

て周知である。現在、特定の腫瘍が与えられた治療剤に応答するだろうという見込みを処置前に決定するために用いられうる情報は実に少ない。多くの化合物は抗腫瘍活性について試験されており、わずかな比率の腫瘍のみにおいて効果的であると思われる。どの腫瘍が与えられた作用物質に応答するかを予測する現在の能力の欠如のせいで、これらの化合物は市販治療用物質へと開発されていない。この問題は、腫瘍を分類する現在の方法が限定されているという事実を反映している。しかしながら、本発明は、腫瘍亜群を同定すること、および所定の作用物質に対する応答の有意な見込みによって腫瘍を特徴付けることの可能性を提供する。様々な作用物質で治療を受けた患者から得られた組織試料を含む腫瘍試料アーカイブは、そのような治療の結果に関する情報と共に入手可能である。一般的に、そのようなアーカイブは、パラフィンブロックに包埋された腫瘍試料からなる。これらの腫瘍試料は、その後で本発明の α -カテニンシグネチャーを構成する遺伝子によりコードされるポリペプチドと比較される、それらのポリペプチドの発現について分析されうる。例えば、免疫組織化学法が、ポリペプチドに結合する抗体を用いて行われうる。または、これらの腫瘍試料は、その後で本発明の α -カテニンシグネチャーを構成するポリヌクレオチドと比較される、それらのポリヌクレオチドの発現について分析されうる。例えば、RNAは、腫瘍試料から抽出され、その後で α -カテニンシグネチャーを構成するポリヌクレオチドと比較されるmRNAを定量的に増幅するために、RT-PCRが用いられうる。 α -カテニンサブクラスに属する腫瘍は、その後、この情報に基づいて同定されうる。その後、 α -カテニンプロファイルの発現を α -カテニンシグネチャーにより予測された腫瘍の治療に対する応答と相関させ、それにより、腫瘍全体に対する、または α -カテニンサブクラスの範囲に入らない腫瘍に対する効力と比較して、このサブクラスの腫瘍に対してより優れた効力を示す特定の化合物を同定することは可能である。いったんそのような化合物が同定されたならば、これらの化合物を用いるさらなる臨床試験のために腫瘍が α -カテニンサブクラスに分類される患者を選択することは可能になるだろう。選択された患者の群に行われるそのような臨床試験は、効力を実証する可能性がより高い。それゆえに、本明細書に提供された試薬は、後向きおよび前向き試験の両方について価値がある。

【0211】

前向き試験の場合、 α -カテニンシグネチャーのような癌幹細胞シグネチャーと相関する α -カテニンプロファイルのような癌幹細胞プロファイルにおける1つもしくは複数の遺伝子またはコードされたポリペプチドの発現の検出は、試験への参加の前に、または試験に登録されると同時に、患者を層別化するために用いられうる。臨床的研究において、層別化は、特定基準に従って患者集団をより均一な亜集団へと記載する、もしくは分類する過程または結果である。試験後よりむしろ最初に患者を層別化することは、しばしばいくつかあり(薬剤についての承認審査方式に関与するU.S. Food and Drug Administrationのような管理機関によるものを含む)、層別化は、しばしば、試験の結果の統計的分析を行うにおいて有用である。場合によっては、層別化は、研究設計により必要とされうる。様々な層別化基準は、 α -カテニン遺伝子シグネチャーのような癌幹細胞シグネチャーと相関する1つまたは複数の癌幹細胞遺伝子プロファイルの発現の検出と共に用いられうる。一般的に用いられる基準は、年齢、家族歴、リンパ節状態、腫瘍サイズ、腫瘍の異型度などを含む。用いられうる他の基準は、限定されるわけではないが、腫瘍の攻撃性、患者によって受けられた前の治療、エストロゲン受容体(ER)および/もしくはプロゲステロン(PR)陽性、Her2/neu状態、またはp53状態を含む。最終的に、いったん、 α -カテニンシグネチャーのような癌幹細胞遺伝子シグネチャーと高く相関している癌遺伝子プロファイル腫瘍に対して優れた効力を示す化合物が同定されたならば、遺伝子プロファイルの発現を検出するための試薬は、さらなる患者についての適切な治療の選択を導くために用いられうる。従って、癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較される癌遺伝子プロファイルの発現に基づいて腫瘍を分類するための試薬および方法を提供することにより、本発明は、より幅広いまたはより不均一な患者集団に恩恵をもたらすことができないせいで断念されていた潜在的に有望な治療から恩恵を受けることができる患者集団を同定するための手段を提供し、さらに、癌治療を個別化するための手段を提供する。

【0212】

α -カテニンシグネチャー遺伝子のような癌幹細胞シグネチャー遺伝子の発現に関する情報は、このように、腫瘍の発生、進行、および維持におけるそれらの生物学的機能または役割に関する特定の情報の非存在下においてでさえも有用である。本明細書に開示された試薬は乳癌に関して特定の適用を見出すが、本発明はまた、限定されるわけではないが、以下を含む他の癌型について診断的および/または予後診断的情報を提供するためのそれらの使用を企図する：胆道癌；膀胱癌；グリア芽腫および髄芽細胞腫を含む脳腫瘍；子宮頸癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；急性リンパ球性および骨髄性白血病；多発性骨髄腫；AIDS関連白血病および成人T細胞白血病リンパ腫；ボーエン病およびページェット病を含む上皮内新生物；肝臓癌；肺癌；ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫を含むリンパ腫；神経芽細胞腫；扁平上皮細胞癌を含む口腔癌；上皮細胞、間質細胞、胚細胞、および間葉細胞から生じるものを含む卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；直腸癌；平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および骨肉腫を含む肉腫；黒色腫、カポジ肉腫、基底細胞癌、および扁平上皮細胞癌を含む皮膚癌；精上皮腫、非精上皮腫(奇形腫、絨毛癌)、間質腫瘍、および胚細胞腫瘍のような胚腫瘍を含む睾丸癌；甲状腺の腺癌および髄様癌を含む甲状腺癌；ならびに腺癌およびウィルムス腫瘍を含む腎臓癌。

10

【0213】

本発明の他の態様において、 α -カテニンシグネチャーのような癌幹細胞遺伝子シグネチャーは、癌の処置のための、例えば、小分子、siRNA、および抗体を含むリード化合物を試験および評価するために実験的に用いられうる。例えば、患者由来の腫瘍細胞は、 α -カテニン遺伝子シグネチャーのような特定の固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーの発現についてスクリーニングされ、その後、本明細書に記載された異種移植モデルへ移植され、例えば、本明細書に記載された1つまたは複数の癌幹細胞マーカーに対する抗体のような試験化合物の効果が腫瘍増殖および生存への効果について試験されうる。さらになお、癌遺伝子プロファイルは、処置後、測定され、癌遺伝子プロファイルは、治療の有効性を評価し、次に、将来的な処置計画を導くために癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較される。加えて、試験化合物の効力が異なる腫瘍サブクラスに対して評価される。例えば、試験化合物は、癌幹細胞遺伝子シグネチャーと相関しない、または例えば、E-カドヘリン遺伝子シグネチャーのような別の遺伝子シグネチャーを発現する遺伝子プロファイルを有する腫瘍に対比して、 α -カテニン遺伝子シグネチャーのような癌幹細胞シグネチャーと高く相関している癌遺伝子プロファイルを発現する腫瘍の異種移植において用いられうる。試験化合物に対する異なる腫瘍サブクラスの応答における任意の違いが測定され、腫瘍の特定のクラスについて処置を最適化するために用いられる。

20

30

【0214】

α -カテニン遺伝子シグネチャーのような癌幹細胞遺伝子シグネチャーは、正常な乳房上皮と比較して腫瘍幹細胞において減少したレベルで、または上昇したレベルで発現する遺伝子から同定された。従って、特定の態様において、mRNAの発現レベル、またはその増幅されたもしくはクローニングされたバージョンが、癌幹細胞遺伝子シグネチャーを構成する各特定の遺伝子を表すポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションにより腫瘍試料から測定される。この型のいくつかのポリヌクレオチドは、他の遺伝子配列に見出されない遺伝子配列の少なくとも約20個～少なくとも約32個の連続した塩基対を含む。さらに、あるものは、他の遺伝子配列に見出されない遺伝子配列の少なくとも約50個～少なくとも約400個の塩基対のポリヌクレオチドである。そのようなポリヌクレオチドはまた、それらが本明細書に記載された遺伝子またはその固有の部分の配列にハイブリダイズする能力がある点においてポリヌクレオチドプローブとも呼ばれる。配列は、遺伝子によりコードされたmRNAの配列、そのようなmRNAの対応するcDNAの配列、および/またはそのような配列の増幅されたバージョンでありうる。本発明の一つのなかなかの態様において、癌幹細胞遺伝子プロファイルは、アレイ(cDNAマイクロアレイのような)上に固定された α -カテニンシグネチャーのような癌幹細胞遺伝子シグネチャーを構成するポリヌクレオチドプローブにより検出される。

40

50

【0215】

本発明のもう一つのなかなかの態様において、 α -カテニン遺伝子シグネチャーのような癌幹細胞遺伝子シグネチャーの開示されたポリヌクレオチドの全部または一部は、増幅され、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ならびに限定されるわけではないが、定量的PCR(Q-PCR)、逆転写PCR(RT-PCR)、およびリアルタイムPCR(試料における各配列についてのmRNAコピーの最初の量を測定する手段を含む)のようなその変形のような方法により検出される。リアルタイムRT-PCRまたはリアルタイムQ-PCRが用いられうる。そのような方法は、開示された配列の部分と相補的であり、かつハイブリダイズする1つまたは2つのプライマーを利用し、プライマーは核酸合成をプライムするために用いられる。新しく合成された核酸は、任意で標識され、直接的に、または本発明のポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションにより検出される。発現した核酸を検出するための追加の方法は、細胞または組織試料の液相ハイブリダイゼーションおよびインサイチューハイブリダイゼーションを含むRNアーゼプロテクションアッセイを含む。

10

【0216】

本発明のさらに他の態様において、遺伝子発現は、タンパク質発現の分析により決定される。タンパク質発現は、腫瘍試料において、 α -カテニンシグネチャーのような癌幹細胞遺伝子シグネチャーの個々の遺伝子産物(タンパク質)またはそのタンパク分解性断片の1つまたは複数のエピトープに特異的な1つまたは複数の抗体の使用により検出される。本発明の実施において用いるのに適した検出方法は、限定されるわけではないが、腫瘍試料における細胞の免疫組織化学法、腫瘍試料における細胞の抗体サンドイッチアッセイ法を含む酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)、質量分析法、免疫PCR、FACS、およびタンパク質マイクロアレイ法を含む。

20

【0217】

任意の患者腫瘍試料が分析され、腫瘍プロファイルが決定され、その後、癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較されることが構想される。 α -カテニン遺伝子発現シグネチャー、固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーの例、は例えば、正常な乳房組織のような非腫瘍形成性組織に対する癌幹細胞の遺伝子発現の比較から発見され、その予後診断能力は、腫瘍試料の参照セットに対して(van't Veer et al., 2002, Nature 415:530; van de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999)または標的強度に対して(Wang et al., 2005, Lancet 365:671)標準化された、未分画の、およびそれに従って不均一な、乳房腫瘍試料のマイクロアレイ分析から同定された。従って、限定されるわけではないが、固形組織生検、微細針吸引、または胸水を含む未分画腫瘍試料は、腫瘍試料における癌遺伝子プロファイルを作成する、およびプロファイルを癌幹細胞遺伝子シグネチャーと比較するために分析される。例えば、腫瘍形成性癌細胞を単離することによる、またはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションによるような不均一な患者試料から単離されるより選択的な試料もまた用いられうる。または、試料は、各試料についての遺伝子発現パターンが決定され、癌幹細胞シグネチャーと比較されうるように分析のために、癌細胞および正常細胞の収集を可能にできる。

30

【0218】

固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーに加えて、シグネチャーを構成する1つまたは複数の個々の遺伝子は、Netherlands Cancer Instituteからの295人の患者において転移および死亡を有意に予測し、これらの遺伝子の1つまたは複数は、上記のような全体の固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーの代わりに用いられうることを示唆する。 α -カテニン遺伝子シグネチャーの場合、以下の遺伝子、GALC、CTSL2、FOXQ1、MYEOV、RB1、およびSLC7A5は、転移および死亡を有意に予測した。全腫瘍試料に渡る発現の参照セット(van't Veer et al., 2002, Nature 415:530およびvan de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999に記載された)と比較してGALCの低レベル~検出不可能なレベルの発現は、0.1相関あたり0.632の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=8.1 \times 10^{-3}$)、0.1相関あたり0.583の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=5.4 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較したCTSL2の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり1.52の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=1.7 \times 10^{-3}$)。

40

50

0^{-6})、0.1相関あたり1.86の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=4.0 \times 10^{-11}$)。参照セットと比較したFOXQ1の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり1.44の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=1.7 \times 10^{-3}$)、0.1相関あたり1.73の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=1.6 \times 10^{-5}$)。参照セットと比較したMYEOVの上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり1.76の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=2.2 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり2.09の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=5.9 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較したRB1の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり0.72の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=1.6 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり0.664の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=6.8 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較したSCL7A5の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり3の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=2.6 \times 10^{-4}$)、0.1相関あたり3.52の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=1.1 \times 10^{-4}$)。

10

【0219】

加えて、低い～検出不可能な発現をもつもの：IL8およびKRT6B、ならびに上昇した発現をもつもの：RNASELおよびC17orf27を含むE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーを構成する遺伝子のいくつかは、単独で予測した。参照セットと比較したIL8の低い～検出不可能なレベルの発現は、0.1相関あたり1.17の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=5.2 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり1.3の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=3.0 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較したKRT6Bの低い～検出不可能なレベルの発現は、0.1相関あたり1.35の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=3.9 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり1.54の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=4.7 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較したRNASELの上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり0.655の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=3.7 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり0.498の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=1.4 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較したC17orf27の上昇した発現レベルは、0.1相関あたり2.35の一変量危険率で有意に転移を予測し($P=1.5 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり3.19の一変量危険率で有意に死亡を予測した($P=3.1 \times 10^{-3}$)。

20

【0220】

IV. 固形腫瘍幹細胞癌マーカーの検出

いくつかの態様において、本発明は、幹細胞癌マーカー(例えば、乳癌幹細胞癌マーカー)の発現の検出のための方法を提供する。いくつかの態様において、発現は、直接的に(例えば、RNAまたはタンパク質レベルで)測定される。いくつかの態様において、発現は、組織試料(例えば、生検組織)において検出される。他の態様において、発現は体液(例えば、限定されるわけではないが、血漿、血清、全血、粘液、および尿)において検出される。本発明はさらに、マーカーの検出のためのパネルおよびキットを提供する。いくつかの態様において、幹細胞癌マーカーの存在は、被験体に予後診断を提供するために用いられる。提供される情報はまた、処置コースを方向づけるために用いられる。例えば、被験体が固形腫瘍幹細胞を示すマーカーを有することが見出された場合には(例えば、表4～9参照)、追加の治療(例えば、ホルモン治療または放射線治療)が、それらが効果的である可能性がより高いより初期の時点で開始されうる(例えば、転移の前に)。加えて、被験体がホルモン治療に応答しない腫瘍を有することが見出された場合には、そのような治療の費用および不都合が回避されうる。

30

40

【0221】

本発明は上記のマーカーに限定されない。癌または癌の進行と相関する任意の適したマーカーが利用されうる。追加のマーカーもまた、本発明の範囲内であることが企図される。任意の適した方法が、本発明の方法に用いるのに適した癌マーカーを同定し、かつ特徴付けるために利用されることができ、限定されるわけではないが、下の例証となる実施例4に記載されたものを含む。例えば、いくつかの態様において、本発明の遺伝子発現マイクロアレイ方法を用いて固形腫瘍幹細胞において上方制御または下方制御されると同定されたマーカーは、組織マイクロアレイ、免疫組織化学法、ノーザンブロット分析、siRNAまたはアンチセンスRNA阻害、突然変異分析、発現の臨床転帰との調査、加えて本明細書に開示された他の方法を用いてさらに特徴付けられる。

50

【0222】

いくつかの態様において、本発明は、複数のマーカーの分析のためのパネルを提供する。パネルは、発癌および/または転移と関連する複数のマーカーの同時分析を可能にする。被験体に依存して、パネルは、考える最善の診断および予後診断を提供するために単独でまたは組み合わせて分析されうる。パネル上に含まれるマーカーは、限定されるわけではないが、下の例証となる実施例に記載されたものを含む任意の適した方法を用いてそれらの予測値についてスクリーニングすることにより選択される。

【0223】

1. RNAの検出

いくつかの態様において、固形腫瘍幹細胞癌マーカー(例えば、限定されるわけではないが、表4~9に開示されたものを含む)の検出は、組織試料(例えば、乳癌組織)において対応するmRNAの発現を測定することにより検出される。mRNA発現は、限定されるわけではないが、下記のものを含む任意の適した方法により測定されうる。

【0224】

いくつかの態様において、RNAはノーザンブロット分析により検出される。ノーザンブロット分析は、RNAの分離および相補的標識プローブのハイブリダイゼーションを含む。

【0225】

なおさらなる態様において、RNA(または対応するcDNA)はオリゴヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションにより検出される。ハイブリダイゼーションおよび検出についての様々なテクノロジーを用いる様々なハイブリダイゼーションアッセイが利用できる。例えば、いくつかの態様において、TaqManアッセイ(PE Biosystems, Foster City, CA; 例えば、米国特許第5,962,233号および第5,538,848号を参照、それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)が利用される。アッセイはPCR反応中に行われる。TaqManアッセイは、AMPLITAQ GOLD DNAポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を活用する。5'-レポーター色素(例えば、蛍光色素)および3'-クエンチャー色素を有するオリゴヌクレオチドからなるプローブがPCR反応に含まれる。PCR中、プローブがその標的に結合している場合には、AMPLITAQ GOLDポリメラーゼの5'-3'核酸分解活性は、プローブをレポーターとクエンチャー色素の間で切断する。レポーター色素のクエンチャー色素からの分離は、結果として、蛍光の増加を生じる。シグナルはPCRのサイクルごとに蓄積し、蛍光計でモニターされうる。

【0226】

さらに他の態様において、逆転写酵素PCR(RT-PCR)がRNAの発現を検出するために用いられる。RT-PCRにおいて、RNAは、逆転写酵素を用いて酵素的に相補性DNAまたは「cDNA」へ変換される。cDNAは、その後、PCR反応のための鋳型として用いられる。PCR産物は、限定されるわけではないが、ゲル電気泳動およびDNA特異的染料での染色または標識プローブへのハイブリダイゼーションを含む任意の適した方法により検出されうる。いくつかの態様において、米国特許第5,639,606号、第5,643,765号、および第5,876,978号(それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)に記載された、競合的鋳型の標準化混合物での定量的逆転写酵素PCRが利用される。

【0227】

2. タンパク質の検出

他の態様において、幹細胞癌マーカーの遺伝子発現は、対応するタンパク質またはポリペプチドの発現を測定することにより検出される。タンパク質発現は、任意の適した方法により検出されうる。いくつかの態様において、タンパク質は、免疫組織化学法により検出される。他の態様において、タンパク質は、タンパク質に対して産生された抗体へのそれらの結合により検出される。抗体の作製は下に記載されている。

【0228】

抗体結合は、当技術分野において公知の技術(例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、インサイチューイムノアッセイ(例えば、例とし

10

20

30

40

50

て、コロイド金、酵素、または放射性同位元素標識を用いる)、ウエスタンブロット、沈殿反応、凝集アッセイ(例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイなど)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなど)により検出される。

【0229】

いくつかの態様において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することにより検出される。もう一つの態様において、一次抗体は、二次抗体または試薬の一次抗体への結合を検出することにより検出される。さらなる態様において、二次抗体は標識される。イムノアッセイにおいて結合を検出するための多くの方法は当技術分野において公知であり、本発明の範囲内である。

10

【0230】

いくつかの態様において、自動化検出アッセイが利用される。イムノアッセイの自動化のための方法は、それぞれが参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,885,530号、第4,981,785号、第6,159,750号、および第5,358,691号に記載されたものを含む。いくつかの態様において、結果の解析および提示もまた自動化される。例えば、いくつかの態様において、癌マーカーに対応する一連のタンパク質の存在または非存在に基づいて予後診断を作成するソフトウェアが利用される。

【0231】

他の態様において、イムノアッセイは米国特許第5,599,677号および第5,672,480号に記載されており、それぞれは参照により本明細書に組み入れられている。

20

【0232】

3. cDNAマイクロアレイテクノロジー

cDNAマイクロアレイは、ガラス顕微鏡スライドのような固体支持体上に既知の位置へスポットされた(通常には、ロボットスポッティング装置を用いて)多数(通常には、数千個)の異なるcDNAからなる。cDNAは、典型的には、プラスミドのベクターバックボーン部分に、または配列が既知である遺伝子について遺伝子自身に、相補的なプライマーを用いてプラスミドライブラリー挿入部のPCR増幅により得られる。マイクロアレイの作製に適したPCR産物は、典型的には、長さが0.5kbから2.5kbまでである。対象となる任意のライブラリー由来の完全長cDNA、発現配列タグ(EST)、またはランダムに選択されたcDNAが選択される。ESTは、例えば、Hillier, et al., 1996, 6:807-828に記載されているように、部分的にシーケンシングされたcDNAである。いくつかのESTは既知の遺伝子に対応するが、しばしば、任意の特定のESTに関する情報は、少量の3'および/または5'配列ならびに場合により、ESTが由来したmRNAの起源の組織を除けば、ほとんどまたは全く入手できない。当業者により認識されているように、一般的に、cDNAは、ヒトゲノム内で遺伝子を一意的に同定するのに十分な配列情報を含む。さらになお、一般的に、cDNAは、実験のハイブリダイゼーション条件下において、単一遺伝子由来のmRNAから得られたcDNAに、選択的に、特異的に、または一意的に、ハイブリダイズするのに十分な長さである。

30

【0233】

典型的なマイクロアレイ実験において、マイクロアレイは、2つの異なる試料由来の異なって標識されたRNA、DNA、またはcDNA集団とハイブリダイズする。最も一般的なRNA(全RNAまたはポリA+RNA)は、対象となる細胞または組織から単離され、逆転写されてcDNAを生じる。標識は、通常、逆転写中、反応混合物に標識ヌクレオチドを組み入れることにより行われる。様々な標識が用いられうるが、最も一般的には、ヌクレオチドは蛍光色素Cy3またはCy5と結合される。例えば、Cy5-dUTPおよびCy3-dUTPが用いられうる。1つの試料(例えば、特定の細胞型、組織型、または増殖条件を表す)由来のcDNAは1つのフルオロフォアで標識され、一方、第二試料(例えば、異なる細胞型、組織型、または増殖条件を表す)由来のcDNAは第二フルオロフォアで標識される。2つの試料由来の標識材料の類似した量がマイクロアレイへ同時ハイブリダイズする。試料がCy5(赤色の蛍光を発する)およびCy3(緑色の蛍光を発する)で標識されているマイクロアレイの場合、一次データ(蛍光強度を定量的に検出する能力がある検出器を用いてマイクロアレイをスキャンすることにより得

40

50

られる)は蛍光強度の比率(赤/緑、R/G)である。これらの比率は、マイクロアレイ上に表されたcDNAにハイブリダイズするcDNA分子の相対濃度を示し、従って、マイクロアレイ上に表された各cDNA/遺伝子に対応するmRNAの相対発現レベルを反映する。

【0234】

各マイクロアレイ実験は、何万個というデータ点を提供することができ、それぞれの点は2つの試料における特定の遺伝子の相対的発現を示す。データの適切な組織化および解析は、決定的に重要であり、標準統計的ツールを組み入れる様々なコンピュータプログラムがデータ解析を容易にするために開発されている。遺伝子発現データを組織化するための一つの基本は、類似した発現パターンをもつ遺伝子をいっしょにクラスターへグループ化することである。階層的クラスター分析およびマイクロアレイ実験由来のデータのディスプレイを行うための方法は、Eisen et al., 1998, PNAS 95:14863-14868に記載されている。そこに記載されているように、クラスタリングは、各データ点とそのデータ点を定量的および定性的に表す色で表されている、一次データのグラフ表示と組み合わせられる。数の大きな表からのデータを視覚形式へ変換することにより、この過程はデータの直観的解析を促進する。数学的ツールおよび/またはクラスタリングアプローチ自身に関する追加の情報ならびに詳細は、例えば、Sokal & Sneath, Principles of numerical taxonomy, xvi, 359, W.H. Freeman, San Francisco, 1963; Hartigan, Clustering algorithms, xiii, 351, Wiley, New York, 1975; Paull et al., 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81:1088-92; Weinstein et al. 1992, Science 258:447-51; van Osdol et al., 1994, J. Natl. Cancer Inst. 86:1853-9;およびWeinstein et al., 1997, Science, 275:343-9に見出されうる。

【0235】

本発明に用いられる実験方法のさらなる詳細は、実施例に見出される。マイクロアレイを組み立てて、用いるための方法を記載する追加の情報は、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,807,522号に見出される。市販されているパーツを用いてマイクロアレイハードウェア(例えば、アレイヤーおよびスキャナー)を組み立てるための説明書は、参照により本明細書に組み入れられている、「[http://](http://cmgm.stanford.edu/pbr-own/)」続いて「cmgm.stanford.edu/pbr-own/」に、およびCheung et al., 1999, Nat. Genet. Supplement 21:15-19に見出されうる。試料を調製し、かつマイクロアレイ実験を行うためのマイクロアレイテクノロジーおよびプロトコルの追加の考察は、例えば、DNA arrays for analysis of gene expression, Methods Enzymol, 303:179-205, 1999; Fluorescence-based expression monitoring using microarrays, Methods Enzymol. 306:3-18, 1999;およびM. Schena(ed.), DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1999に見出される。アレイヤーおよび関連したソフトウェアの使い方の記載は、参照により本明細書に組み入れられている、「[http://](http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/arrayerHTML/ArrayerDocs.html)」続いて「cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/arrayerHTML/ArrayerDocs.html」に見出される。

【0236】

4. データ解析

いくつかの態様において、コンピューターに基づいた解析プログラムは、臨床医のために検出アッセイにより作成された生データ(例えば、所定のマーカーの存在、非存在、または量)を予測値のデータへ翻訳するために用いられる。臨床医は、任意の適した手段を用いて予測データを評価することができる。従って、いくつかのなかなかの態様において、本発明は、遺伝学または分子生物学の教育を受けている可能性が低い臨床医が生データを理解する必要がないというさらなる利点を提供する。データは、直接的に臨床医へその最も有用な形で提示される。その後、臨床医は、被験体の治療を最適化するためにすぐにその情報を利用することができる。

【0237】

本発明は、アッセイを行う実験室、情報提供者、医療関係者、および被験体へ往復して情報を受ける、処理する、ならびに送信することができる任意の方法を企図する。例えば、本発明のいくつかの態様において、試料(例えば、生検、または血清もしくは尿試料)は

被験体から得られ、生データを作成するために、世界の任意の場所に(例えば、被験体が住む、または情報が最終的に用いられる国とは異なる国に)位置したプロファイリングサービス(例えば、医療施設における臨床検査室、ゲノムプロファイリング会社など)へ提出される。試料が組織または他の生体試料を含む場合、被験体は、試料を採取して、プロファイリングセンターへ送ってもらうために医療センターを訪れることができる、または被験体は、彼ら自身で試料を収集し、それをプロファイリングセンターへ直接送ることができる。試料が以前に測定された生物学的情報を含む場合、情報は、被験体によりプロファイリングサービスへ直接送ることができる(例えば、情報を含む情報カードがコンピューターによりスキャンされ、データは電子通信システムを用いてプロファイリングセンターのコンピューターへ送信されうる)。いったんプロファイリングサービスにより受け取ら

10

【0238】

プロファイルデータは、その後、処置を行う臨床医による解釈に適した形式で調製される。例えば、発現の生データ(例えば、表4~9に記載されたいくつかのマーカーを検査する)を提供するよりむしろ、調製された形式が、特定の処置の選択肢についての推奨と共に、被験体についての診断またはリスク評価を示すことができる。データは、任意の適した方法により臨床医へ示されうる。例えば、いくつかの態様において、プロファイリングサービスは、臨床医のために印刷されうる(例えば、治療時点に)、またはコンピューターモニター上で臨床医へ表示されうるレポートを作成する。

20

【0239】

いくつかの態様において、情報は、治療時点で、または地方施設において、最初に解析される。生データは、その後、さらなる解析のために、および/または生データを臨床医もしくは患者に有用な情報へ変換するために、中央処理施設へ送られる。中央処理施設は、プライバシー(全データは、一律のセキュリティプロトコールで中央施設に保存される)、速さ、およびデータ解析の均一性の優位性を提供する。中央処理施設は、その後、被験体の処置後のデータの行方を管理できる。例えば、電子通信システムを用いて、中央施設は、臨床医、被験体、または研究者へデータを提供できる。

【0240】

いくつかの態様において、被験体は、結果に基づいてさらなる介入またはカウンセリングを選択できる。いくつかの態様において、データは研究用に用いられる。例えば、データは、特定の状態または病期の有用な指標としてマーカーの包含または排除をさらに最適化するために用いられうる。

30

【0241】

5. キット

さらに他の態様において、本発明は、癌の検出および特徴付けのため(例えば、表4~9に示されたマーカーの1つもしくは複数を検出するため、または表4~9に示されたマーカーの1つもしくは複数により発現するペプチドの活性を調節するため)のキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、検出試薬および緩衝液に加えて、癌マーカーに特異的な抗体を含む。他の態様において、キットは、mRNAまたはcDNAの検出に特異的な試薬(例えば、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー)を含む。いくつかの態様において、キットは、全対照、アッセイを行うための説明書、ならびに結果の解析および表示のための任意の必要なソフトウェアを含む、検出アッセイを行うのに必要な、および/または十分な構成要素の全部を含む。

40

【0242】

本発明のもう一つの態様は、 α -カテニンシグネチャーのような固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーの、例えば、組織試料におけるまたは体液における、ポリヌクレオチドまたはタンパク質の存在について試験するためのキットを含む。キットは、例えば、ポリペプチドの検出のための抗体、またはポリヌクレオチドの検出のためのプローブを含みうる。加えて、キットは、参照または対照試料; 試料を処理し、試験を行い、結果を解釈するた

50

めの使用説明書；ならびに試験を行うために必要な緩衝液および他の試薬を含むことができる。特定の態様において、キットは、 α -カテニンシグネチャーの遺伝子によりコードされたタンパク質の1つまたは複数の発現を検出するための抗体のパネルを含む。他の態様において、キットは、固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーの遺伝子の1つまたは複数の発現を検出するためのプライマーの対を含む。他の態様において、キットは、固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーの遺伝子の1つもしくは複数の発現を検出するためのcDNAまたはオリゴヌクレオチドアレイを含む。

【0243】

6. インビボイメージング

いくつかの態様において、インビボイメージング技術は、動物(例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物)において癌マーカーの発現を可視化するために用いられる。例えば、いくつかの態様において、癌マーカーmRNAまたはタンパク質は、癌マーカーに特異的な標識抗体を用いて標識される。特異的に結合し、かつ標識された抗体は、限定されるわけではないが、放射性核種イメージング、陽電子放出断層撮影、コンピューター体軸断層撮影、X線または磁気共鳴イメージング方法、蛍光検出、および化学ルミネセンス検出を含むインビボイメージング方法を用いて個体において検出されうる。本発明の癌マーカーに対する抗体を作製するための方法は下に記載されている。

【0244】

本発明のインビボイメージング方法は、本発明の固形腫瘍幹細胞癌マーカーを発現する癌の診断において有用である(例えば、乳癌において)。インビボイメージングは、癌を示すマーカーの存在を可視化するために用いられる。そのような技術は、不快な生検の使用なしの診断を可能にする。本発明のインビボイメージング方法はまた、癌患者に予後診断を提供するのに有用である。例えば、癌幹細胞を示すマーカーの存在が検出されうる。本発明のインビボイメージング方法はさらに、身体他の部分において転移性癌を検出するために用いられうる。

【0245】

いくつかの態様において、本発明の癌マーカーに特異的な試薬(例えば、抗体)は蛍光標識されている。標識抗体は、被験体へ導入される(例えば、経口で、または非経口で)。蛍光標識抗体は、任意の適した方法を用いて検出される(例えば、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,198,107号に記載された装置を用いて)。

【0246】

他の態様において、抗体は放射性標識されている。インビボ診断のための抗体の使用は当技術分野において周知である。Sumerdon et al., (Nucl. Med. Biol 17:247-254 [1990])は、標識としてインジウム-111を用いる腫瘍の放射免疫シンチグラフィックイメージングのための最適化された抗体-キレート化剤を記載している。Griffin et al., (J Clin Onc 9:631-640 [1991])は、再発結腸直腸癌に罹っているのではないかと疑われる患者において腫瘍を検出するにおいてこの作用物質の使用を記載している。磁気共鳴イメージングのための標識として常磁性イオンを用いる類似した作用物質の使用は、当技術分野において公知である(Lauffer, Magnetic Resonance in Medicine 22:339-342 [1991])。用いられる標識は、選択されるイメージングモダリティに依存する。インジウム-111、テクネチウム-99m、またはヨウ素-131のような放射性標識は、平面スキャンまたは単一光子放出型コンピューター断層撮影(SPECT)に用いられうる。フッ素-19のような陽電子放出性標識もまた、陽電子放出断層撮影(PET)に用いられうる。MRIについて、ガドリニウム(III)またはマンガン(II)のような常磁性イオンが用いられうる。

【0247】

スカンジウム-47(3.5日間)、ガリウム-67(2.8日間)、ガリウム-68(68分間)、テクネチウム-99m(6時間)、およびインジウム-111(3.2日間)のような1時間から3.5日間までの範囲である半減期をもつ放射性金属は、抗体への結合に利用でき、それらのうちで、ガリウム-67、テクネチウム-99m、およびインジウム-111はガンマカメライメージングに好ましく、ならびにガリウム-68は陽電子放出断層撮影に好ましい。

【0248】

そのような放射性金属で抗体を標識する有用な方法は、例えば、In-111およびTc-99mについてKhaw et al. (Science 209:295 [1980])により、ならびにScheinberg et al. (Science 215:1511 [1982])により記載されているように、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)のような二官能性キレート剤を用いることである。他のキレート剤もまた用いられることができるが、1-(p-カルボキシメトキシベンジル)EDTAおよびDTPAのカルボキシ炭酸無水物は、それらの使用が、実質的に抗体の免疫反応性に影響を及ぼすことなく、結合を可能にするため有利である。

【0249】

DTPAをタンパク質に結合させるためのもう一つの方法は、アルブミンのIn-111での標識についてHnatowich et al., (Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33:327 [1982])により記載されているように、DTPAの環状無水物の使用によるが、抗体の標識に適応されうる。DTPAでのキレート化を用いない、抗体をTc-99mで標識する適した方法は、Crockford et al. (参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第4,323,546号)の予備はんだ付け方法である。

【0250】

Tc-99mで免疫グロブリンを標識するある方法は、血漿タンパク質についてWong et al. (Int. J. Appl. Radiat. Isot., 29:251 [1978])により記載されたものであり、最近、抗体を標識することについて、Wong et al. (J. Nucl. Med., 23:229 [1981])により成功裡に適用された。

【0251】

特異的抗体に結合した放射性金属の場合、抗体分子へその免疫特異性を破壊することなくできる限り放射標識の割合を高く導入することが同様に望ましい。抗体上の抗原結合部位が保護されることを保証するために、本発明の特異的な幹細胞癌マーカーの存在下で放射標識を実施することによりさらなる改善が達成されうる。

【0252】

なおさらなる態様において、インビボバイオフォトニックイメージング(Xenogen, Alameda, CA)がインビボイメージングに利用される。このリアルタイムインビボイメージングはルシフェラーゼを利用する。ルシフェラーゼ遺伝子は、細胞、微生物、および動物へ取り込まれる(例えば、本発明の癌マーカーとの融合タンパク質として)。活性がある場合、それは光を放射する反応へ導く。CCDカメラおよびソフトウェアは画像を捕らえ、それを分析するために用いられる。

【0253】

V. 抗体および抗体断片

本発明は、単離された抗体および抗体断片(例えば、Fab)を提供する。いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載された(例えば、表4~9に示されているような)幹細胞癌マーカーの少なくとも5個、または少なくとも15個のアミノ酸残基で構成される単離されたポリペプチドへ特異的に結合するモノクローナル抗体または抗体断片を提供する。これらの抗体または抗体断片は、本明細書に記載された診断、薬物スクリーニング、および治療方法に使用を見出す(例えば、幹細胞癌マーカーペプチドの活性を検出または調節するための)。

【0254】

本発明のタンパク質に対する抗体または抗体断片は、それがタンパク質を認識できる限り、任意のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体でありうる。抗体は、通常の抗体または抗血清調製過程に従って抗原として本発明のタンパク質を用いることにより産生されうる。

【0255】

本発明は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方の使用を企図する。任意の適した方法は、限定されるわけではないが、本明細書に開示されたものを含む本発明の方法および組成物に用いられる抗体を産生するために用いられうる。例えば、モノクロ

ーナル抗体の調製について、タンパク質は、それ自体として、または適した担体もしくは希釈剤と共に、抗体の産生を可能にする条件下で動物(例えば、哺乳動物)へ投与される。抗体産生能力を増強するために、完全または不完全フロイントのアジュバントが投与されうる。通常には、タンパク質は、2週間～6週間ごとに1回、合計で、約2回～約10回、投与される。そのような方法に用いるのに適した動物は、限定されるわけではないが、霊長類、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含む。

【0256】

モノクローナル抗体産生細胞を調製するために、抗体力価が確認されている個々の動物(例えば、マウス)が選択され、最終免疫化から2日～5日後、その脾臓またはリンパ節が採取され、それに含まれる抗体産生細胞は、所望のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製するために骨髓腫細胞と融合される。抗血清における抗体力価の測定は、例えば、下に記載されているような標識タンパク質および抗血清を反応させ、その後、抗体に結合した標識物質の活性を測定することにより、行われうる。細胞融合は、公知の方法、例えば、Koehler and Milstein(Nature 256:495 [1975])により記載された方法、に従って行われうる。融合促進剤として、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)またはセンダイウイルス(HVJ)が用いられうる。

【0257】

骨髓腫細胞の例は、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などを含む。用いられうる抗体産生細胞(脾臓細胞)の数と骨髓腫細胞の数の比率は、約1:1～約20:1でありうる。PEG(例えば、PEG1000～PEG6000)は、約10%～約80%の濃度で加えられうる。細胞融合は、両方の細胞の混合物を約20℃～約40℃、または約30℃～約37℃で、約1分間～10分間、インキュベートすることにより効率的に行われうる。

【0258】

抗体(例えば、本発明の腫瘍抗原または自己抗体に対する)を産生するハイブリドーマについてスクリーニングするために様々な方法が用いられうる。例えば、ハイブリドーマの上清が、抗体が直接的にまたは担体と共に吸着されている固相(例えば、マイクロプレート)へ加えられ、その後、放射性物質もしくは酵素で標識された抗免疫グロブリン抗体(マウス細胞が細胞融合に用いられた場合には、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAが、加えられ、固相に結合したタンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する。または、ハイブリドーマの上清は、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAが吸着している固相へ加えられ、その後、放射性物質または酵素で標識されたタンパク質が、加えられ、固相に結合したタンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する。

【0259】

モノクローナル抗体の選択は、任意の公知の方法またはその改変型に従って行われうる。通常には、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)が添加されている動物細胞用の培地が用いられる。ハイブリドーマが増殖できる限り、任意の選択および増殖培地が用いられうる。例えば、1%～20%または10%～20%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地、1%～10%ウシ胎児血清を含むGIT培地、ハイブリドーマの培養用無血清培地(SFM-101、Nissui Seiyaku)などが用いられうる。通常には、培養は、20℃～40℃、例えば37℃で、約5日間～3週間、例えば1週間～2週間、約5%CO₂ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養の上清の抗体力価は、抗血清における抗タンパク質の抗体力価に関する上記と同じ様式に従って測定されうる。

【0260】

モノクローナル抗体の分離および精製は、免疫グロブリンの分離および精製のような通常のポリクローナル抗体のものと同一様式、例えば、塩析、アルコール沈殿、等電点沈殿、電気泳動、イオン交換体(例えば、DEAE)での吸着および脱離、超遠心分離、ゲル濾過、または抗原結合固相、プロテインA、もしくはプロテインGのような活性吸着剤で抗体のみが収集され、結合を解離して抗体を得る特異的精製方法、に従って行われうる。

【0261】

ポリクローナル抗体は、患者から抗体を得ることを含む、任意の公知の方法またはこれ

らの方法の改変型により調製されうる。例えば、免疫原(そのタンパク質に対する抗原)および担体タンパク質の複合体が調製され、動物は、上記のモノクローナル抗体調製に関して記載されたものと同じ様式に従って複合体により免疫される。抗体を含む物質が免疫動物から回収され、抗体は分離および精製される。

【0262】

動物の免疫化に用いられうる免疫原および担体タンパク質の複合体に関して、担体上で架橋されて、免疫化に用いられるハプテンに対する抗体が効率的に産生される限り、任意の担体タンパク質、および担体とハプテンの任意の混合比が用いられうる。例えば、ウシ血清アルブミン、ウシシクログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが、ハプテンの1あたり約0.1~約20、約1~約5の重量比でハプテンに結合されうる。

10

【0263】

加えて、様々な縮合剤が、ハプテンおよび担体の結合に用いられうる。例えば、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性化エステル、チオール基またはジチオピリジル基を含む活性化エステル試薬などが本発明との使用を見出す。縮合生成物は、それ自体として、または適した担体もしくは希釈剤と共に、抗体産生を可能にする動物の部位へ投与される。抗体産生能力を増強するために、完全または不完全フロイントのアジュバントが投与されうる。通常には、タンパク質は、2週間~6週間ごとに1回、合計で、約3回~約10回、投与される。

【0264】

ポリクローナル抗体は、上記方法により免疫された動物の血液、腹水などから回収される。抗血清における抗体価は、ハイブリドーマ培養物の上清に関して上記のものと同じ様式に従って測定されうる。抗体の分離および精製は、上記のモノクローナル抗体に関して記載されたものと同じの、免疫グロブリンの分離および精製方法に従って行われうる。

20

【0265】

免疫原として本明細書に用いられるタンパク質は、免疫原のいかなる特定の型にも限定されない。例えば、本発明の幹細胞癌マーカー(部分的に変化したヌクレオチド配列を有する遺伝子をさらに含む)は免疫原として用いられうる。さらに、タンパク質の断片が用いられうる。断片は、限定されるわけではないが、遺伝子の断片を発現すること、タンパク質の酵素的処理、化学合成などを含む任意の方法により得られうる。抗体および抗体断片はまた、治療用物質(例えば、癌細胞殺害性化合物)と結合されうる。この点において、幹細胞癌マーカーの一つへ方向づけられた抗体が、治療剤を固形腫瘍癌細胞へ特異的に送達するために用いられる(例えば、そのような細胞の増殖を阻害する、またはそのような細胞を殺すために)。

30

【0266】

VI. 薬物スクリーニング

いくつかの態様において、本発明は、薬物スクリーニングアッセイ(例えば、抗癌薬についてスクリーニングするための)を提供する。本発明のスクリーニング方法は、本発明の方法を用いて同定された幹細胞癌マーカー(例えば、限定されるわけではないが、表4~9に示された幹細胞癌マーカーを含む)を利用する。例えば、いくつかの態様において、本発明は、幹細胞癌マーカー遺伝子の発現を変化させる(例えば、増加させる、または減少させる)化合物についてスクリーニングする方法を提供する。いくつかの態様において、候補化合物は、癌マーカーに対して方向づけられたアンチセンス剤またはsiRNA剤(例えば、オリゴヌクレオチド)である。他の態様において、候補化合物は、本発明の幹細胞癌マーカーへ特異的に結合する抗体である。特定の態様において、小分子の化合物のライブラリーが、本明細書に記載された方法を用いてスクリーニングされる。

40

【0267】

一つのスクリーニング方法において、候補化合物は、化合物を、幹細胞癌マーカーを発現する細胞と接触させ、その後、候補化合物の発現への効果についてアッセイすることにより幹細胞癌マーカー発現を変化させるそれらの能力について評価される。いくつかの態様において、候補化合物の癌マーカー遺伝子の発現への効果は、細胞により発現した癌マ

50

ーカーmRNAのレベルを検出することによりアッセイされる。mRNA発現は、任意の適した方法により検出されうる。他の態様において、候補化合物の癌マーカー遺伝子の発現への効果は、癌マーカーによりコードされるポリペプチドのレベルを測定することによりアッセイされる。発現されたポリペプチドのレベルは、限定されるわけではないが、本明細書に開示されたものを含む任意の適した方法を用いて測定されうる。いくつかの態様において、細胞生物学における他の変化(例えば、アポトーシス)が検出される。

【0268】

具体的には、本発明は、本発明の癌マーカーに結合する、または本発明の癌マーカーに関連したシグナル伝達もしくは機能を変化させる、例えば、幹細胞癌マーカー発現もしくは癌マーカー活性へ阻害性(または刺激性)効果を生じる、または例えば、癌マーカー基質の発現もしくは活性へ刺激性もしくは阻害性効果を生じる、調節物質、すなわち、候補もしくは試験化合物または作用物質(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、ペプトイド、小分子、または他の薬物)を同定するためのスクリーニング方法を提供する。このように同定された化合物は、治療プロトコールにおいて標的遺伝子産物(例えば、幹細胞癌マーカー遺伝子)の活性を直接的かまたは間接的かのいずれかで調節するために、標的遺伝子産物の生物学的機能を変化させるために、または正常な標的遺伝子相互作用を乱す化合物を同定するために、用いられうる。癌マーカーの活性または発現を阻害する化合物は、増殖性障害、例えば、癌、特に転移性癌、の処置、または癌のリスクを防ぐもしくは低下させるために腫瘍幹細胞を除去するもしくは抑制するにおいて有用である。

【0269】

本発明は、癌マーカータンパク質もしくはポリペプチドもしくはその生物活性部分の基質である候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。もう一つの態様において、本発明は、癌マーカータンパク質もしくはポリペプチドもしくはその生物活性部分を結合する、または癌マーカータンパク質もしくはポリペプチドもしくはその生物活性部分の活性を調節する候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

【0270】

本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプトイドライブラリー(ペプチドの機能性を有するが、新規な非ペプチドバックボーンをもつ分子であって、酵素分解に抵抗性であるが、それでもなお生物活性を保持する分子のライブラリー；例えば、Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37:2678-85 [1994]参照)；空間的にアドレス可能な並列固相または溶液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー方法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー方法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法を含む当技術分野において公知のコンビナトリアルライブラリー方法における多数のアプローチのいずれかを用いて得られうる。生物学的ライブラリーおよびペプトイドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーと共に用いるものであるが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー、または小分子ライブラリーに適用できる(Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145)。

【0271】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当技術分野において、例えば、以下に見出されうる：DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909 [1993]；Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422 [1994]；Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37:2678 [1994]；Cho et al., Science 261:1303 [1993]；Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059 [1994]；Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061 [1994]；およびGallop et al., J. Med. Chem. 37:1233 [1994]。

【0272】

化合物のライブラリーは、溶液中に(例えば、Houghten, Biotechniques 13:412-421 [1992])、またはビーズ(Lam, Nature 354:82-84 [1991])、チップ(Fodor, Nature 364:555-556 [1993])、細菌もしくは孢子(米国特許第5,223,409号；参照により本明細書に組み入れられている)、プラスミド(Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 [1

992])上に、またはファージ(Scott and Smith, Science 249:386-390 [1990]; Devlin Science 249:404-406 [1990]; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382 [1990]; Felici, J. Mol. Biol. 222:301 [1991])上に提示されうる。

【0273】

いくつかの態様において、アッセイは、幹細胞癌マーカータンパク質またはその生物活性部分を発現する細胞が試験化合物と接触させられ、癌マーカーの活性を調節する試験化合物の能力が測定される、細胞に基づいたアッセイである。幹細胞癌マーカー活性を調節する試験化合物の能力を測定することは、例えば、酵素活性における変化をモニターすることにより達成されうる。細胞は、例えば、哺乳動物由来でありうる。

【0274】

癌マーカーの化合物、例えば、幹細胞癌マーカー基質、への結合を調節する試験化合物の能力もまた評価されうる。これは、例えば、化合物、例えば基質、の癌マーカーへの結合が複合体における標識化合物、例えば基質、を検出することにより測定されうるように、化合物、例えば基質、を放射性同位元素または酵素標識と結合させることにより達成されうる。

【0275】

または、幹細胞癌マーカーは、複合体における癌マーカーの癌マーカー基質への結合を調節する試験化合物の能力をモニターするために、放射性同位元素または酵素標識と結合される。例えば、化合物(例えば、基質)は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で直接的かまたは間接的かのいずれかで標識されることができ、放射性同位元素は、放射線放出の直接カウンティングにより、またはシンチレーションカウンティングにより、検出されうる。または、化合物は、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、またはルシフェラーゼで酵素的に標識されることができ、酵素標識は、適切な基質の生成物への変換の測定により検出されうる。

【0276】

反応体のいずれかの標識の有無にかかわらず、幹細胞癌マーカーと相互作用する化合物(例えば、幹細胞癌マーカー基質)の能力が評価されうる。例えば、マイクロフィジオメーターは、化合物も癌マーカーのいずれも標識無しで、化合物の癌マーカーとの相互作用を検出するために用いられうる(McConnell et al., Science 257:1906-1912 [1992])。本明細書に用いられる場合、「マイクロフィジオメーター」(例えば、サイトセンサー(Cytosensor))は、細胞がその環境を酸性にする速度を光アドレス可能電位差センサー(LAPS)を用いて測定する分析装置である。この酸性化速度における変化は、化合物と癌マーカーの間の相互作用の指標として用いられうる。

【0277】

さらにもう一つの態様において、癌マーカータンパク質またはその生物活性部分を試験化合物と接触させ、幹細胞癌マーカータンパク質またはその生物活性部分に結合する試験化合物の能力を評価する無細胞アッセイが提供される。本発明のアッセイに用いられうる癌マーカータンパク質のいくつかの生物活性部分は、基質または他のタンパク質との相互作用に参与する断片、例えば高い表面確率スコアをもつ断片、を含む。

【0278】

無細胞アッセイは、標的遺伝子タンパク質および試験化合物の反応混合物を、その2つの成分が相互作用し、かつ結合するのを可能にするのに十分な条件下および時間で調製し、その後、取り出されうるおよび/または検出されうる複合体を形成することを含む。

【0279】

2つの分子間の相互作用は、例えば、蛍光エネルギー移動(FRET)を用いて、検出されうる(例えば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavianopoulos et al., 米国特許第4,968,103号を参照; それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)。フルオロフォア標識は、第一供与体分子の放射された蛍光エネルギーが第二「受容体」分子上の蛍光標識により吸収され、その蛍光標識が、立ち代わって、吸収されたエネルギーにより蛍光を発することができるように選択される。

10

20

30

40

50

【0280】

または、「供与体」タンパク質分子は、単に、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを利用することができる。「受容体」分子標識が「供与体」のそれと区別されうるように、光の異なる波長を放射する標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は、分子を隔てる距離に関連しているため、分子間の空間的關係が評価されう。結合が分子間で起こる状況において、15アッセイにおける「受容体」分子標識の蛍光放射は最大になるはずである。FRET結合事象は、当技術分野において周知の標準蛍光検出手段を通して便利に測定されう(例えば、蛍光計を用いて)。

【0281】

もう一つの態様において、幹細胞癌マーカータンパク質の標的分子に結合する能力は、リアルタイム生体分子相互作用分析(Biomolecular Interaction Analysis)(BIA)を用いて達成されう(例えば、Sjolander and Urbaniczky, Anal. Chem. 63:2338-2345 [1991]およびSzabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 [1995]参照)。「表面プラズモン共鳴」または「BIA」は、反応体のいずれをも標識することなく、生体特異的相互作用をリアルタイムに検出する(例えば、BIAcore)。結合表面における質量の変化は、結果として、表面近くの光の屈折率の変化(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学的現象)を生じ、それが結果として、生体分子間のリアルタイム反応の指標として用いられう検出可能なシグナルを生じる。

【0282】

いくつかの態様において、標的遺伝子産物または試験物質は、固相上に固定される。固相上に固定された標的遺伝子産物/試験化合物複合体は、反応の最後に検出されう。標的遺伝子産物は、固体表面上に固定されることができ、試験化合物(固定されていない)は、本明細書に考察された検出可能な標識で、直接的にかまたは間接的にかのいずれかで標識されることができ。

【0283】

タンパク質の一方または両方の非複合体化型からの複合体化型の分離を容易にするために、加えてアッセイの自動化に対応するために、幹細胞癌マーカー、抗癌マーカー抗体、またはその標的分子を固定することが望ましくありう。候補化合物の存在下もしくは非存在下における、試験化合物の幹細胞癌マーカータンパク質への結合、または癌マーカータンパク質の標的分子との相互作用は、反応物質を含むのに適した任意の容器において達成されう。そのような容器の例は、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管を含む。いくつかの態様において、タンパク質の一方または両方がマトリックスに結合するのを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供されう。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-癌マーカー融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質が、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着されることができ、その後、試験化合物、または試験化合物および非吸着標的タンパク質かまたは癌マーカータンパク質のいずれかと結合し、混合物は、複合体形成にとって助けとなる条件下でインキュベートされる(例えば、塩およびpHについての生理学的条件において)。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは、任意の非結合成分を除去するために洗浄され、ビーズの場合、マトリックスは固定され、複合体は、例えば、上記のように、直接的かまたは間接的にかのいずれかで、測定される。

【0284】

または、複合体はマトリックスから解離され、癌マーカー結合または活性のレベルは標準技術を用いて測定されう。マトリックス上に癌マーカータンパク質かまたは標的分子のいずれかを固定するための他の技術は、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を含む。ビオチン化された癌マーカータンパク質または標的分子は、当技術分野において公知の技術を用いてビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシニミド)から調製され(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, EL)、ストレプトアビジンコーティング化96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定されう。

【0285】

アッセイを行うために、非固定化成分は、固定化成分を含むコーティング化表面へ添加される。反応が完了した後、未反応成分は、形成されたいずれの複合体も固体表面上に固定されたままであるような条件下で除去される(例えば、洗浄により)。固体表面上に固定された複合体の検出は、いくつかの方法で達成されうる。前もって固定されていない成分があらかじめ標識されている場合、表面上に固定された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。前もって固定されていない成分があらかじめ標識されていない場合、間接的標識が、表面上に固定された複合体を検出するために用いられうる；例えば、固定された成分に特異的な標識抗体を用いて(その抗体は、立ち代わって、例えば、標識抗IgG抗体で、直接的にまたは間接的に標識されうる)。

10

【0286】

このアッセイは、幹細胞癌マーカータンパク質または標的分子と反応性であるが、幹細胞癌マーカータンパク質のその標的分子への結合に干渉しない抗体を利用して行われる。そのような抗体は、プレートのウェルへ被覆され、非結合標的または癌マーカータンパク質は抗体結合によりウェルに捕捉されうる。GST固定化複合体について上で記載されたものに加えて、そのような複合体を検出するための方法は、癌マーカータンパク質または標的分子と反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、および癌マーカータンパク質または標的分子と付随した酵素活性を検出することに頼る酵素結合アッセイを含む。

【0287】

または、無細胞アッセイが液相において行われうる。そのようなアッセイにおいて、反応生成物は、限定されるわけではないが、以下を含むいくつかの標準技術のいずれかにより、未反応成分から分離される：分画遠心法(例えば、Rivas and Minton, Trends Biochem Sci 18:284-7 [1993]参照)；クロマトグラフィー(ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー)；電気泳動(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York参照)；および免疫沈降法(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York参照)。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は、当業者に公知である(例えば、Heegaard J. Mol. Recognit 11:141-8 [1998]；Hage and Tweed J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl 699:499-525 [1997]参照)。さらに、蛍光エネルギー移動もまた、溶液からの複合体のさらなる精製なしに結合を検出するために、本明細書に記載されているように、便利に利用されうる。

20

30

【0288】

アッセイは、幹細胞癌マーカータンパク質またはその生物活性部分を、癌マーカーを結合する既知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する段階、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる段階、および癌マーカータンパク質と相互作用する試験化合物の能力を測定する段階であって、癌マーカータンパク質と相互作用する試験化合物の能力を測定する段階は、既知の化合物と比較して、癌マーカーもしくはその生物活性部分に優先的に結合する、または標的分子の活性を調節する、試験化合物の能力を測定することを含む、段階を含むうる。

【0289】

幹細胞癌マーカーが、タンパク質のような1つもしくは複数の細胞または細胞外巨大分子とインビボで相互作用することができる限り、そのような相互作用の阻害剤は有用である。均一アッセイが阻害剤を同定するために用いられうる。

40

【0290】

例えば、標的遺伝子産物および相互作用的な細胞または細胞外結合パートナー産物のあらかじめ形成される複合体は、標的遺伝子産物かまたはそれらの結合パートナーのいずれかが標識されるが、標識により生じるシグナルが複合体形成のために消光されるように調製される(例えば、免疫アッセイについてこのアプローチを利用する、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第4,109,496号参照)。あらかじめ形成された複合体由来の種の1つと競合し、置換する試験物質の添加は、結果として、バックグラウンドを超

50

えるシグナルの発生を生じる。このようにして、標的遺伝子産物-結合パートナー相互作用を乱す試験物質が同定されうる。または、癌マーカータンパク質は、癌マーカーと結合または相互作用し、かつ癌マーカー活性に関与する他のタンパク質(「癌マーカー-結合タンパク質」または「癌マーカー-bp」)を同定するために、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「おとりタンパク質」として用いられうる(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervos et al., Cell 72:223-232 [1993]; Madura et al., J. Biol. Chem. 268:12046-12054 [1993]; Bartel et al., Biotechniques 14:920-924 [1993]; Iwabuchi et al., Oncogene 8:1693-1696 [1993]; およびBrent WO 94/10300参照; それぞれは参照により本明細書に組み入れられている)。そのような癌マーカー-bpは、例えば、癌マーカー媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、癌マーカータンパク質もしくは標的によるシグナルの活性化剤または阻害剤でありうる。

10

【0291】

癌マーカー発現の調節物質もまた同定されうる。例えば、細胞または無細胞混合物が、候補化合物と接触させられ、癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下における幹細胞癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現のレベルに対して評価される。癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の存在下において、その非存在下においてより多い場合、候補化合物は、癌マーカーmRNAまたはタンパク質発現の刺激剤であると同定される。または、癌マーカーmRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の存在下において、その非存在下においてより少ない(すなわち、統計学的に有意に少ない)場合、候補化合物は、癌マーカーmRNAまたはタンパク質発現の阻害剤であると同定される。癌マーカーmRNAまたはタンパク質発現のレベルは、癌マーカーmRNAまたはタンパク質を検出するための本明細書に記載された方法により測定されうる。

20

【0292】

調節物質は、細胞に基づいたアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定されることができ、癌マーカータンパク質の活性を調節する作用物質の能力は、インビボで、例えば、疾患についての動物モデルのような動物(例えば、前立腺癌もしくは転移性前立腺癌をもつ動物; または動物(例えば、ヒト)由来の前立腺癌の異種移植片を有する動物)、または前立腺癌の転移(例えば、リンパ節、骨、または肝臓への)に起因する癌由来の細胞、もしくは前立腺癌細胞系由来の細胞において、確認されうる。

30

【0293】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な作用物質に関する(例えば、癌治療の下記の説明参照)。従って、そのような作用物質での処置の、効力、毒性、副作用、または作用機構を決定するために、適切な動物モデル(本明細書に記載されたもののような)において本明細書に記載されているように同定された作用物質(例えば、癌マーカー調節物質、アンチセンス癌マーカー核酸分子、siRNA分子、癌マーカー特異的抗体、または癌マーカー-結合パートナー)をさらに用いることは、本発明の範囲内である。さらになお、上記スクリーニングアッセイにより同定された新規な作用物質は、例えば、本明細書に記載されているような処置(例えば、癌に罹っているヒト患者を処置するための)に用いられうる。

40

【0294】

VII. 癌治療

いくつかの態様において、本発明は、癌(例えば、乳癌)の治療を提供する。いくつかの態様において、治療は癌マーカー(例えば、限定されるわけではないが、表4~9に示されたものを含む)を標的とする。

【0295】

A. アンチセンス治療

候補治療剤はまた、薬物スクリーニングおよび研究適用に使用を見出す。いくつかの態様において、本発明は、幹細胞癌マーカーの発現を標的とする。例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の幹細胞癌マーカーをコードする核酸分子の機能を調節し、最終的には、発現される癌マーカーの量を調節するのに用いる、オリゴマーアンチセンス

50

化合物、特にオリゴヌクレオチド(例えば、上記の薬物スクリーニング方法で同定されたもの)、を含む組成物を用いる。これは、本発明の癌マーカーをコードする1つまたは複数の核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を提供することにより達成される。オリゴマー化合物のその標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、核酸の正常な機能に干渉する。標的核酸の機能の、それに特異的にハイブリダイズする化合物によるこの調節は、一般的に、「アンチセンス」と呼ばれる。干渉されうるDNAの機能は、複製および転写を含む。干渉されうるRNAの機能は、例えば、RNAのタンパク質翻訳の部位への転位置、RNAからのタンパク質の翻訳、1つまたは複数のmRNA種を生じうるRNAのスプライシング、およびRNAにより関与しうるまたは促進されうる触媒活性のようなすべての生体機能を含む。標的核酸機能へのそのような干渉の全体的効果は、本発明の癌マーカーの発現の調節である。本発明の関連において、「調節」とは、遺伝子の発現における増加(刺激)かまたは減少(阻害)のいずれかを意味する。例えば、発現は、阻害されて、腫瘍増殖を防ぐ可能性がありうる。

10

【0296】

アンチセンスとして特定の核酸を標的にすることはなかなかのものである。本発明の関連において、アンチセンス化合物を特定の核酸へ「ターゲット」することは、多段階過程である。過程は、通常には、機能が調節されることになっている核酸配列の同定から始まる。これは、例えば、発現が特定の障害もしくは疾患状態と関連している細胞遺伝子(または遺伝子から転写されたmRNA)、または感染物質由来の核酸分子でありうる。本発明において、標的は、本発明の幹細胞癌マーカーをコードする核酸分子である。ターゲティング過程はまた、所望の効果、例えば、タンパク質の発現の検出または調節、が結果として生じるように起こるためのアンチセンス相互作用についてのこの遺伝子内の部位の決定を含む。本発明の関連内において、なかなかの遺伝子内部位は、遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の翻訳開始または終結コドンを含む領域である。翻訳開始コドンは、典型的には、5'-AUG(転写されたmRNA分子における；対応するDNA分子における5'-ATG)であるため、翻訳開始コドンはまた、「AUGコドン」、「スタートコドン」、または「AUGスタートコドン」とも呼ばれている。少数派の遺伝子は、RNA配列5'-GUG、5'-UUG、または5'-CUGを有する翻訳開始コドンを有し、5'-AUA、5'-ACG、および5'-CUGはインビボで機能することが示されている。従って、「翻訳開始コドン」および「スタートコドン」という用語は、どの場合にも開始アミノ酸は典型的には、メチオニン(真核生物において)またはホルミルメチオニン(原核生物において)であるとしても、多くのコドン配列を含みうる。真核生物および原核生物遺伝子は、2つまたはそれ以上の選択的スタートコドンを有することができ、それらのいずれかの1つが、特定の細胞型もしくは組織において、または特定の条件セット下において、翻訳開始に優先的に利用されうる。本発明の関連において、「スタートコドン」および「翻訳開始コドン」は、そのようなコドンの配列にかかわらず、本発明の腫瘍抗原をコードする遺伝子から転写されるmRNA分子の翻訳を開始するためにインビボで用いられるコドンを指す。

20

30

【0297】

遺伝子の翻訳終結コドン(または「ストップコドン」)は、3つの配列(すなわち、5'-UAA、5'-UAG、および5'-UGA；対応するDNA配列は、それぞれ、5'-TAA、5'-TAG、および5'-TGAである)のうちの1つを有しうる。「スタートコドン領域」および「翻訳開始コドン領域」という用語は、翻訳開始コドンからどちらかの方向(すなわち、5'または3')での約25個から約50個までの連続したヌクレオチドを包囲するそのようなmRNAまたは遺伝子の部分を指す。同様に、「ストップコドン領域」および「翻訳終結コドン領域」という用語は、翻訳終結コドンからどちらかの方向(すなわち、5'または3')での約25個から約50個までの連続したヌクレオチドを包囲するそのようなmRNAまたは遺伝子の部分を指す。

40

【0298】

翻訳開始コドンと翻訳終結コドンの間の領域を指すオープンリーディングフレーム(ORF)または「コード領域」はまた、効果的に標的にされうる領域である。他の標的領域は、翻訳開始コドンから5'方向のmRNAの部分を指し、それに従って、mRNAの5'キャップ部位と

50

翻訳開始コドンの間のヌクレオチドまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドを含む5'非翻訳領域(5'UTR)、翻訳終結コドンから3'方向のmRNAの部分の指し、それに従って、mRNAの翻訳終結コドンと3'末端の間のヌクレオチドまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドを含む3'非翻訳領域(3'UTR)を含む。mRNAの5'キャップは、mRNAの最も5'側の残基に5'-5'三リン酸結合を介して連結されたN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造自身、加えて、キャップに隣接した最初の50ヌクレオチドを含むと見なされる。キャップ領域もまた、なかなかの標的領域でありうる。

【0299】

いくつかの真核生物mRNA転写産物は直接的に翻訳されるが、多くは、それが翻訳される前に転写産物から切除される「イントロン」として知られた1つまたは複数の領域を含む。残りの(およびそれゆえに翻訳される)領域は「エクソン」として知られており、いっしょにスプライスされて、連続したmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位(すなわち、イントロン-エクソン接合点)もまたなかなかの標的領域であることができ、異常なスプライシングが疾患に結びつけられる、または特定のmRNAスプライス産物の過剰産生が疾患に結びつけられる状況において特に有用である。再編成または欠失による異常な融合接合点もまたなかなかの標的である。イントロンもまた、例えば、DNAまたはプレmRNAヘターゲットされるアンチセンス化合物についての効果的、かつそれゆえに、なかなかの標的領域でありうるが見出されている。

【0300】

いくつかの態様において、アンチセンス阻害についての標的部位は、市販されているソフトウェアプログラム(例えば、Biognostik, Gottingen, Germany; SysArris Software, Bangalore, India; Antisense Research Group, University of Liverpool, Liverpool, England; GeneTrove, Carlsbad, CA)を用いて同定される。他の態様において、アンチセンス阻害についての標的部位は、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許WO 0198537 A2に記載されたアクセス可能部位方法を用いて同定される。

【0301】

いったん1つまたは複数の標的部位が同定されたならば、所望の効果を与えるのに十分に標的に相補的である(すなわち、十分に良くかつ十分な特異性をもってハイブリダイズする)オリゴヌクレオチドが選択される。例えば、本発明のいくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、スタートコドンにまたはスタートコドン近くにターゲットされる。

【0302】

本発明の関連において、アンチセンス組成物および方法に関する「ハイブリダイゼーション」とは、相補的なヌクレシドまたはヌクレオチド塩基間のワトソン-クリック型、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型水素結合でありうる水素結合を意味する。例えば、アデニンおよびチミンは水素結合の形成を通して対形成する相補的な核酸塩基である。アンチセンス化合物の配列は、特異的にハイブリダイズできるようにその標的核酸のそれと100%相補的である必要はないことは理解されている。アンチセンス化合物は、化合物の標的DNAまたはRNA分子への結合が標的DNAまたはRNAの正常な機能に干渉して、有用性の喪失を引き起こし、かつ特異的結合が望まれる条件下で(すなわち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合、生理学的条件下で、およびインビトロアッセイの場合、アッセイが行われる条件下で)アンチセンス化合物の非標的配列への非特異的結合を避けるのに十分な相補度がある場合、特異的にハイブリダイズできる。

【0303】

アンチセンス化合物は一般に、研究試薬および診断法として用いられる。例えば、特異性を以て遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の機能を解明するために用いられうる。アンチセンス化合物はまた、例えば、生物学的経路の様々なメンバーの機能間を区別するために、用いられる。

【0304】

アンチセンスの特異性および感度はまた、治療的使用に適用される。例えば、アンチセ

10

20

30

40

50

ンスオリゴヌクレオチドは、動物およびヒトにおいて疾患状態の処置での治療的部分として用いられている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトへ安全にかつ効果的に投与されており、多数の臨床試験が現在、進行中である。オリゴヌクレオチドが、細胞、組織、および動物、特にヒト、の処置のための処置計画において有用であるように構成される有用な治療方法であることは、このように確立されている。

【0305】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ある種のアンチセンス化合物であるが、本発明は、限定されるわけではないが、下に記載されているようなオリゴヌクレオチド模倣体を含む他のオリゴマーアンチセンス化合物を含む。本発明によるアンチセンス化合物は、約8個から約30個までの核酸塩基(すなわち、約8個から約30個までの連結された塩基)を含みうるが、より長いおよびより短い配列の両方が本発明との使用を見出さう。特にいくつかのアンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、約12個から約25個までの核酸塩基を含むもの、である。

10

【0306】

本発明と共に有用ないくつかのアンチセンス化合物の具体例は、改変バックボーンまたは非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを含む。本明細書に定義されているように、改変バックボーンを有するオリゴヌクレオチドは、バックボーンにリン原子を保持するもの、およびバックボーンにリン原子を有しないものを含む。本明細書の目的として、ヌクレオシド間バックボーンにリン原子を有しない改変オリゴヌクレオチドもまたオリゴヌクレオチドであるとみなされうる。

20

【0307】

いくつかの改変オリゴヌクレオチドバックボーンは、例えば、ホスホロチオネート、キラルホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルならびに他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、およびヌクレオシド単位の隣接対が3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'へ連結されている逆方向性を有するものを含む。様々な塩、混合塩、および遊離酸型もまた含まれる。

30

【0308】

それにリン原子を含まないいくつかの改変オリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式のヌクレオシド間結合により形成されるバックボーンを有する。これらは、モルホリノ結合(ヌクレオシドの糖部分から一部形成された)；シロキサンバックボーン；スルフィド、スルホキシド、およびスルホンバックボーン；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；アルケン含有バックボーン；スルファメートバックボーン；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン；スルホネートおよびスルホンアミドバックボーン；アミドバックボーン；ならびにN、O、S、およびCH₂成分部分を有する他のものを含む。

40

【0309】

他のいくつかのオリゴヌクレオチド模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合(すなわち、バックボーン)の両方は、新規な群と置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。優秀なハイブリダイゼーション性質を有することが示されている一つのそのようなオリゴマー化合物、オリゴヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と呼ばれている。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖-バックボーンは、アミド含有バックボーン、特にアミノエチルグリシンバックボーン、と置換される。核酸塩基は保持され、バックボーンのアミド部分

50

のアザ窒素原子に直接的にまたは間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許は、限定されるわけではないが、それぞれが参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；および第5,719,262号を含む。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science 254:1497 (1991)に見出されうる。

【0310】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオネートバックボーン、ならびに、ヘテロ原子バックボーン、特に、上記の米国特許第5,489,677号の $--CH_2--NH--O--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [メチレン(メチルイミノ)またはMMIバックボーンとして知られた]、 $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ 、および $--O--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [ただし、天然ホスホジエステルバックボーンが $--O--P--O--CH_2--$ として表される]、および上記の米国特許第5,602,240号のアミドバックボーン、をもつオリゴヌクレオチドを有する。いくつかのオリゴヌクレオチドはまた、上記の米国特許第5,034,506号のモルホリノバックボーン構造を有する。

【0311】

改変オリゴヌクレオチドはまた、1つまたは複数の置換された糖部分を含みうる。いくつかのオリゴヌクレオチドは、2'位に以下の1つを含む：OH；F；O-、S-、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；O-、S-、もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、ただし、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは置換型もしくは非置換型 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルまたは $C_2 \sim C_{10}$ アルケニルおよびアルキニルでありうる。特に、いくつかは、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ であって、ここでnおよびmは1から約10までである。他のいくつかのオリゴヌクレオチドは、2'位に以下の1つを含む： $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、またはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断群、レポーター群、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬力学的性質を向上させるための群、および類似した性質を有する他の置換基。なかなかの改変は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られた、2'-O-CH₂CH₂OCH₃)(Martin et al., Helv. Chim. Acta 78:486 [1995])、すなわち、アルコキシアルコキシ基を含む。さらなるなかなかの改変は、2'-DMAOEおよび2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても当技術分野において知られた)、すなわち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂、としても知られた2'-ジメチルアミノオキシエトキシ(すなわち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基)を含む。

【0312】

他のなかなかの改変は、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)を含む。類似した改変はまた、オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位、または2'-5'結合オリゴヌクレオチドにおいては、5'末端ヌクレオチドの5'位、になされうる。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖模倣体を有しうる。

【0313】

オリゴヌクレオチドはまた、核酸塩基(しばしば、当技術分野において単に「塩基」と呼ばれる)修飾または置換を含みうる。本明細書に用いられる場合、「非修飾型」または「天然の」核酸塩基は、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U)を含む。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルならびに他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルならびに他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシン、およびチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシおよび他

の8-置換アデニンならびにグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、および他の5-置換ウラシルならびにシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンを含む。さらなる核酸塩基は、米国特許第3,687,808号に開示されたものを含む。これらの核酸塩基の若干数は、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるために特に有用である。これらは、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、およびO-6置換プリンを含む。5-メチルシトシン置換は、0.6~1.2°Cだけ、核酸二重鎖安定性を増加させることが示されており、現在、さらに特に、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わされた場合、なかなかの塩基置換である。

10

【0314】

本発明のオリゴヌクレオチドのもう一つの改変は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強する1つもしくは複数の部分または結合体をオリゴヌクレオチドへ化学結合することを含む。そのような部分は、限定されるわけではないが、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル(例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖(例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えば、ジ-ヘキサデシル-ラック-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-ラック-グリセロ-3H-ホスホネート)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分を含む。

20

【0315】

関連分野における業者は、上記の改変を含むオリゴヌクレオチドを作製する方法を良く知っている。本発明は、上で記載されたアンチセンスオリゴヌクレオチドに限定されない。任意の適した改変または置換が利用されうる。

【0316】

与えられた化合物におけるすべての位置が、一律に改変される必要はなく、実際、1つより多くの上記の改変が、単一の化合物に、またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオチドにさえも、組み入れられうる。本発明はまた、キメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の関連における「キメラの」アンチセンス化合物または「キメラ」は、2つまたはそれ以上の化学的に別個の領域を含み、それぞれが少なくとも1つの単量体単位、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合、ヌクレオチド、から構成されている、アンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、である。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、少なくとも1つの領域を含み、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性の増加、細胞取り込みの増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増加をオリゴヌクレオチドへ与えるように改変されている。オリゴヌクレオチドの付加的領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断する能力がある酵素についての基質としての役割を果たしうる。例として、RNアーゼHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。RNアーゼHの活性化は、それゆえに、結果として、RNA標的の切断を生じ、それにより、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大いに増強する。従って、同様の結果が、しばしば、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオネートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドが用いられた場合、より短いオリゴヌクレオチドで得られうる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要ならば、当技術分野において公知の関連核酸ハイブリダイゼーション技術により日常的に検出されうる。

30

40

【0317】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、上記のような、2つもしくはそれ以上のオリゴヌクレオチド、改変オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、および/またはオリゴヌクレオチド模倣体の複合構造として形成されうる。

【0318】

50

本発明はまた、下記のような本発明のアンチセンス化合物を含む薬学的組成物および製剤を含む。

【0319】

B. 遺伝子治療

本発明は、本発明の幹細胞癌マーカーの発現を調節するのに用いる任意の遺伝子操作の使用を企図する。遺伝子操作の例は、限定されるわけではないが、遺伝子ノックアウト(例えば、染色体から癌マーカー遺伝子を、例えば組換えを用いて除去すること)、誘導性プロモーターの有りまたは無しでのアンチセンス構築物の発現、異種性遺伝子の付加(例えば、誘導性プロモーターにより制御される)などを含む。インビトロまたはインビボでの核酸構築物の細胞への送達は、任意の適した方法を用いて行われうる。適した方法は、所望の事象が起こる(例えば、アンチセンス構築物の発現)ように核酸構築物を細胞へ導入することである。

10

【0320】

遺伝情報を有する分子の細胞への導入は、限定されるわけではないが、裸のDNA構築物の定方向注入、該構築物を搭載された金粒子での砲撃、および、例えば、リボソーム、バイオポリマーなどを用いる巨大分子媒介型遺伝子移入を含む様々な方法のいずれかにより達成される。いくつかの方法は、限定されるわけではないが、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ随伴ウイルスを含むウイルス由来の遺伝子送達媒体を用いる。レトロウイルスと比較してより高い効率のために、アデノウイルス由来のベクターが、インビボで核酸分子を宿主細胞へ移入するためのなかなかの遺伝子送達媒体である。アデノウイルスベクターは、動物モデルにおいて様々な固形腫瘍への、および免疫不全マウスにおいてヒト固形腫瘍異種移植片への、非常に効率的なインビボ遺伝子移入を提供することが示されている。遺伝子移入のためのアデノウイルスベクターおよび方法の例は、それぞれが全体として参照により本明細書に組み入れられている、WO 00/12738およびWO 00/09675、ならびに米国特許第6,033,908号、第6,019,978号、第6,001,557号、第5,994,132号、第5,994,128号、第5,994,106号、第5,981,225号、第5,885,808号、第5,872,154号、第5,830,730号、および第5,824,544号に記載されている。

20

【0321】

ベクターは、様々な方法で被験体へ投与されうる。例えば、本発明のいくつかの態様において、ベクターは、直接注入を用いて、腫瘍または腫瘍に関連した組織へ投与される。他の態様において、投与は、血液またはリンパ循環経路である(例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられているPCT公開99/02685参照)。アデノウイルスベクターの例示的な用量レベルは、灌流液に加えられる、例えば、 $10^8 \sim 10^{11}$ 個のベクター粒子でありうる。

30

【0322】

C. 抗体治療

いくつかの態様において、本発明は、本発明の幹細胞癌マーカー(例えば、表4~9に示されたもの)を発現する腫瘍を標的にする抗体を提供する。任意の適した抗体(例えば、モノクローナル、ポリクローナル、または合成)が本明細書に開示された治療方法に利用されうる。いくつかの態様において、癌治療に用いられる抗体はヒト化抗体である。抗体をヒト化するための方法は、当技術分野において周知である(例えば、それぞれが参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,180,370号、第5,585,089号、第6,054,297号、および第5,565,332号参照)。

40

【0323】

いくつかの態様において、治療抗体は、本発明の幹細胞癌マーカーに対して産生された抗体を含み、抗体は細胞毒性剤と結合している。そのような態様において、正常細胞を標的にしない腫瘍特異的治療剤が作製され、それに従って、伝統的な化学療法有害な副作用の多くを低減する。特定の適用について、治療剤は、抗体への付着についての有用な作用物質として働く薬理学的物質、特に、細胞毒性または別なふうに内皮細胞の増殖もしくは細胞分裂を絶つもしくは抑制する能力を有する抗細胞性物質、であることが構想される

50

。本発明は、抗体に結合し、かつ活性型で送達されうる任意の薬理学的物質の使用を企図する。例示的な抗細胞性物質は、化学療法剤、放射性同位元素、および細胞毒素を含む。本発明の治療抗体は、限定されるわけではないが、放射性同位元素(例えば、ヨウ素-131、ヨウ素-123、テクネチウム-99m、インジウム-111、レニウム-188、レニウム-186、ガリウム-67、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125、またはアスタチン-211)、ステロイドのようなホルモン、代謝拮抗物質(例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキセート、またはアミノプテリン；アントラサイクリン；マイトマイシンC)、ビンカ・アルカロイド(例えば、デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン)、およびクロラムブシルまたはメルファランのような抗腫瘍アルキル化剤を含む、様々な細胞毒性部分を含みうる。他の態様は、凝固剤、サイトカイン、増殖因子、細菌内毒素または細菌内毒素のリピドA部分のような作用物質を含みうる。例えば、いくつかの態様において、治療剤は、例を挙げるだけでも、A鎖毒素、リボソーム不活性化タンパク質、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、リボヌクレアーゼ、ジフテリア毒素、またはシュードモナス外毒素のような植物由来、真菌由来、または細菌由来の毒素を含む。なかなかのいくつかの態様において、脱グリコシル化リシンA鎖が利用される。

10

【0324】

いずれにしても、これらのような作用物質は、必要に応じて、公知の結合テクノロジーを用いて必要とされるような、それらのターゲティング、内部移行、標的腫瘍細胞の部位での血液成分への放出または提示を可能にする様式で、うまく抗体に結合されることが提案される(例えば、Ghose et al., Methods Enzymol., 93:280 [1983]参照)。

20

【0325】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の幹細胞癌マーカーにターゲットされる免疫毒素を提供する。免疫毒素は、特定のターゲティング剤、典型的には、腫瘍に方向づけられた抗体または断片、の毒素部分のような細胞毒性物質との結合体である。ターゲティング剤は、毒素を、標的抗原を有する細胞に向け、そしてそれにより、選択的に殺す。いくつかの態様において、治療抗体は、高いインビボ安定性を提供する架橋剤を用いる(Thorpe et al., Cancer Res., 48:6396 [1988])。

【0326】

他の態様、特に固形腫瘍の処置を含むもの、において、抗体は、血管内皮細胞の増殖または細胞分裂を抑制することにより腫瘍脈管構造に対して細胞毒性または別なふうな抗細胞性効果を有するように設計される。この攻撃は、腫瘍限局性血管虚脱へ導き、腫瘍細胞、特に脈管構造の遠位の腫瘍細胞、から酸素および栄養分を奪い、最終的には、細胞死および腫瘍壊死へ導くことが意図される。

30

【0327】

いくつかの態様において、抗体に基づいた治療用物質は、下記のように薬学的組成物として製剤化される。いくつかの態様において、本発明の抗体組成物の投与は、結果として、癌における測定可能な減少(例えば、腫瘍の減少または消失)を生じる。

【0328】

D. RNAi治療

他の態様において、RNAiは、本発明の幹細胞癌マーカー(例えば、表4~9に示されたもの)の発現を制御するために用いられる。RNAiは、ヒトを含むたいの真核生物において外来遺伝子の発現を制御するための進化的に保存された細胞防御を表す。RNAiは二本鎖RNA(dsRNA)によって誘発され、dsRNAに応答して、一本鎖標的RNA相同体の配列特異的mRNA分解を引き起こす。mRNA分解の媒介物は、通常には細胞において酵素的切断により長いdsRNAから生成される小さな干渉RNA二重鎖(siRNA)である。siRNAは、一般的に、およそ21ヌクレオチド長(例えば、21~23ヌクレオチド長)であり、2ヌクレオチドの3'-オーバーハングにより特徴付けられる塩基対形成構造を有する。小さなRNA、またはRNAiの細胞への導入後、配列はRISC(RNA誘導サイレンシング複合体)と呼ばれる酵素複合体へ送達されると考えられている。RISCは標的を認識し、それをエンドヌクレアーゼで切断する。より長いRNA配列が細胞へ送達される場合には、RNアーゼIII酵素(ダイサー)はより長いdsRNAを21

40

50

～23nt ds siRNA断片へ変換することは注目される。

【0329】

化学合成されたsiRNAは、培養体細胞における哺乳動物遺伝子機能のゲノムワイド分析のための強力な試薬になっている。遺伝子機能の確証のためのそれらの価値を超えて、siRNAはまた、遺伝子特異的治療剤としての大きな可能性をもっている(参照により本明細書に組み入れられているTuschl and Borkhardt, Molecular Intervent. 2002; 2(3):158-67)。

【0330】

siRNAの動物細胞へのトランスフェクションは、結果として、特定の遺伝子の強力で、長続きする転写後サイレンシングを生じる(Caplen et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001;98:9742-7; Elbashir et al., Nature 2001;411:494-8; Elbashir et al., Genes Dev. 2001;15:188-200;およびElbashir et al., EMBO J. 2001;20:6877-88、すべて参照により本明細書に組み入れられている)。siRNAでRNAiを行うための方法および組成物は、例えば、参照により本明細書に組み入れられている米国特許第6,506,559号に記載されている。

10

【0331】

siRNAは、標的RNA、およびひいては、タンパク質の量を、しばしば検出不可能なレベルまで、低下させるにおいて並はずれて効果的である。サイレンシング効果は数ヶ月続き、標的RNAとsiRNAの中央領域間の1ヌクレオチドミスマッチがしばしば、サイレンシングを阻止するのに十分であるため、並はずれて特異的である(Brummelkamp et al., Science 2002;296:550-3;およびHolen et al., Nucleic Acids Res. 2002;30:1757-66、両方とも参照により本明細書に組み入れられている)。

20

【0332】

E. 薬学的組成物

本発明はさらに、薬学的組成物(例えば、本発明の幹細胞癌マーカーを標的にする小分子、アンチセンス、抗体、またはsiRNAを含む)を提供する。本発明の薬学的組成物は、望まれるのは局所的処置かまたは全身的処置かに、および処置されるべき領域に依存して、いくつかの方法で投与されうる。投与は、局所(眼、ならびに膣および直腸送達を含む粘膜へを含む)、肺(例えば、噴霧器によるを含む粉末もしくはエアゾールの吸入または吹送による；気管内、鼻腔内、表皮、および経皮)、経口、または非経口でありうる。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、もしくは筋肉内注射または注入；または頭蓋内、例えば、髄腔内もしくは脳室内、投与を含む。

30

【0333】

局所投与のための薬学的組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴剤、坐剤、スプレー、液体、および粉末を含みうる。通常の薬学的担体、水性、粉末、または油性基剤、増粘剤などは必要または望ましくありうる。

【0334】

経口投与のための組成物および製剤は、粉末または顆粒、水もしくは非水性媒体における懸濁液または溶液、カプセル、サッシェ、または錠剤を含む。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、または結合剤が望ましくありうる。

40

【0335】

非経口、髄腔内、または脳室内投与のための組成物および製剤は、緩衝剤、希釈剤、ならびに、限定されるわけではないが、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬学的に許容される担体または賦形剤のような他の適した添加剤も含みうる滅菌水溶液を含みうる。

【0336】

本発明の薬学的組成物は、限定されるわけではないが、溶液、乳濁液、およびリポソーム含有製剤を含む。これらの組成物は、限定されるわけではないが、予備成形液体、自己乳化固体、および自己乳化半固体を含む様々な成分から作製されうる。

【0337】

本発明の薬学的製剤は、便利には単位剤形で示されうるが、製薬産業において周知の通

50

常の技術に従って調製されうる。そのような技術は、活性成分を薬学的担体または賦形剤と会合させることを含む。一般的に、製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化固体担体または両方と均一かつ密接に会合させ、その後、必要ならば、生成物を成形することにより調製される。

【0338】

本発明の組成物は、限定されるわけではないが、錠剤、カプセル、液体シロップ、軟ゲル、坐剤、および浣腸剤のような多くの可能な剤形のいずれかに製剤化されうる。本発明の組成物はまた、水性、非水性、または混合媒体における懸濁液として製剤化されうる。水性懸濁液はさらに、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む懸濁液の粘性を増加させる物質を含みうる。懸濁液はまた安定剤を含みうる。

10

【0339】

本発明のいくつかの態様において、薬学的組成物は、発泡体として製剤化されて、用いられうる。薬学的発泡体は、限定されるわけではないが、乳濁液、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリー、およびリポソームのような製剤を含む。基本的には性質は類似しているが、これらの製剤は、最終生成物の成分および粘稠度が異なる。

【0340】

細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを増強する作用物質もまた、本発明の薬学的小および他の組成物に加えられうる。例えば、リボフェクチン(米国特許第5,705,188号)、陽イオン性グリセロール誘導体、およびポリリシン(WO 97/30731)のようなポリカチオン性分子のような陽イオン性液体もまた、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増強する。

20

【0341】

本発明の組成物は、薬学的組成物に通常見出される他の補助成分を追加的に含みうる。従って、例えば、組成物は、例えば、かゆみ止め薬、収斂剤、局部麻酔薬、もしくは抗炎症剤のような追加の適合性薬学的活性材料を含みうる、または染料、香味剤、保存剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤のような本発明の組成物の様々な剤形を物理的に製剤化するにおいて有用な追加の材料を含みうる。しかしながら、そのような材料が、加えられる場合、本発明の組成物の成分の生物活性に過度に干渉しないようにあるべきである。製剤は、滅菌され、必要ならば、製剤の核酸と有害に相互作用しない助剤、例えば、潤滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、香味剤、および/または芳香剤などと混合されうる。

30

【0342】

本発明の特定の態様は、(a)幹細胞癌マーカーの活性を調節する1つまたは複数の化合物(例えば、抗体、小分子、siRNA、アンチセンスなど)、および(b)1つまたは複数の他の化学療法剤を含む薬学的組成物を提供する。そのような化学療法剤の例は、限定されるわけではないが、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ドキシソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェン・マスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン(CA)、5-フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン(5-FUdR)、メトトレキセート(MTX)、コルヒチン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール(DES)のような抗癌薬を含む。限定されるわけではないが、非ステロイド抗炎症薬およびコルチコステロイドを含む抗炎症薬、ならびに、限定されるわけではないが、リビビリン、ビンダラビン、アシクロビル、およびガンシクロビルを含む抗ウイルス薬もまた、本発明の組成物に組み合わせられうる。他の化学療法剤もまた、本発明の範囲内である。2つまたはそれ以上の併用される化合物はいっしょに、または逐次的に用いられうる。

40

【0343】

投薬は、処置されるべき疾患状態の重症度および応答性に依存し、処置過程は数日間から数ヶ月まで、または治癒がもたらされる、もしくは疾患状態の減少が達成される(例え

50

ば、腫瘍サイズにおける縮小)まで、続く。最適な投薬スケジュールは、患者の身体における薬物蓄積の測定から計算されうる。投与医師は、最適な用量、投薬方法、および反復率を容易に決定できる。最適な用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対効力に依存して変わることができ、一般的に、インビトロおよびインビボの動物モデルにおいて有効であることが見出された EC_{50} に基づいて、または本明細書に記載された実施例に基づいて、推定されうる。一般的に、用量は、体重の1kgあたり0.01 μ gから100gまでであり、毎日、毎週、毎月、もしくは毎年1回または複数回、与えられうる。処置医師は、体液または組織における測定された薬物の滞留時間および濃度に基づいて投薬についての反復率を推定できる。処置の成功後、疾患状態の再発を防ぐために患者に維持治療を受けさせることが望ましくありうるが、オリゴヌクレオチドは、体重1kgあたり0.01 μ gから100gまでの範囲の維持用量で、毎日1回または複数回から20年間ごとに1回まで、投与される。

10

【0344】

VIII. 癌マーカー遺伝子を発現するトランスジェニック動物

本発明は、本発明の外因性癌マーカー遺伝子もしくはその突然変異体および変種(例えば、切り詰めまたは一塩基多型)を含むトランスジェニック動物、またはそのノックアウトの作製を企図する。いくつかの態様において、トランスジェニック動物は、野生型動物と比較して変化した表現型(例えば、増加または減少したマーカーの存在)を示す。そのような表現型の存在または非存在を分析するための方法は、限定されるわけではないが、本明細書に開示されたものを含む。いくつかのなかなかの態様において、トランスジェニック動物はさらに、増加もしくは減少した腫瘍の増殖、または癌の証拠を示す。

20

【0345】

本発明のトランスジェニック動物は、薬物(例えば、癌治療)スクリーニングに使用を見出す。いくつかの態様において、試験化合物(例えば、癌を処置するために有用ではないかと疑われる薬物)および対照化合物(例えば、プラシーボ)がトランスジェニック動物および対照動物へ投与され、効果が評価される。

【0346】

トランスジェニック動物は、様々な方法によって作製されうる。いくつかの態様において、様々な発生段階における胚性細胞が、トランスジェニック動物の産生のためにトランスジーンを導入するために用いられる。胚性細胞の発生段階に依存して異なる方法が用いられる。接合子は、微量注入についての最良の標的である。マウスにおいて、雄性前核は、1~2ピコリットル(pL)のDNA溶液の再現可能な注入を可能にする直径が約20マイクロメートルのサイズに達する。遺伝子移入のための標的としての接合子の使用は、たいていの場合、注入されたDNAは最初の切断の前に宿主ゲノムへ組み入れられる点で大きな利点をもつ(Brinster et al., 1985, PNAS 82:4438-4442)。結果として、トランスジェニックの非ヒト動物の全細胞は組み入れられたトランスジーンを有する。これはまた、一般的に、生殖細胞の50%がトランスジーンを有するため、トランスジーンの創始者の子孫への効率的な伝達に反映される。米国特許第4,873,191号は、接合子の微量注入のための方法を記載する；この特許の開示は全体として本明細書に組み入れられている。

30

【0347】

他の態様において、レトロウイルス感染が、トランスジーンを非ヒト動物へ導入するために用いられる。いくつかの態様において、レトロウイルスベクターは、レトロウイルスベクターを卵母細胞の囲卵腔へ注入することにより卵母細胞をトランスフェクションするために利用される(参照により本明細書に組み入れられている米国特許第6,080,912号)。他の態様において、発生中の非ヒト胚は、胞胚期までインビトロで培養されうる。この時間中、卵割球は、レトロウイルス感染のための標的でありうる(Janenich, 1976, PNAS 73:1260)。卵割球の効率的感染は、透明帯を除去するための酵素処理により得られる(Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1986])。トランスジーンを導入するために用いられるウイルスベクター系は、典型的には、トランスジーンを有する複製欠損レトロウイルスである(Jahner et al., 1985, PNAS 82:6927)。トランスフェクションは、ウイルス産生細胞の単層

40

50

上で卵割球を培養することにより容易かつ効率的に得られる(Stewart et al., 1987, EMB O J., 6:383)。

【0348】

または、感染は、後期に行われうる。ウイルスまたはウイルス産生細胞は、胞胚腔へ注入されうる(Jahner et al., 1982, Nature 298:623)。創始者の大部分は、組み入れはトランスジェニック動物を形成する細胞のサブセットにおいてのみ起こるため、トランスジーンについてモザイクである。さらに、創始者は、一般的に子孫で分離するゲノムにおける異なる位置でのトランスジーンの様々なレトロウイルス挿入を含みうる。加えて、トランスジーンを妊娠中期胚の子宮内レトロウイルス感染により、低効率であるにしても、生殖系列へ導入することも可能である(Jahner et al., 前記 [1982])。当技術分野に公知のトランスジェニック動物を作製するためにレトロウイルスまたはレトロウイルスベクターを用いる追加の手段は、レトロウイルス粒子、またはレトロウイルスを産生するマイトマイシンC処理細胞の受精卵または初期胚の囲卵腔への微量注入を含む(PCT国際出願WO 90/08832 [1990], およびHaskell and Bowen, 1995, Mol. Reprod. Dev., 40:386)。

【0349】

他の態様において、トランスジーンは、胚性幹細胞へ導入され、トランスフェクションされた幹細胞は胚を形成するために利用される。ES細胞は、インビトロで適切な条件下で着床前胚を培養することにより得られる(Evans et al., 1981, Nature 292:154; Bradley et al., 1984, Nature 309:255; Gossler et al., 1986, PNAS 83:9065; およびRobertson et al., 1986, Nature 322:445)。トランスジーンは、リン酸カルシウム共沈殿、プロトプラストまたはスフェロプラスト融合、リポフェクション、およびDEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションを含む当技術分野に公知の様々な方法によるDNAトランスフェクションによりES細胞へ効率的に導入されうる。トランスジーンはまた、レトロウイルス媒介性形質導入により、または微量注入により、ES細胞へ導入されうる。その後、そのようなトランスフェクションされたES細胞は、胞胚期胚の胞胚腔へのそれらの導入後、胚を移植し、結果として生じるキメラ動物の生殖細胞系に寄与することができる(概説として、Jaenisch, Science, 1988, 240:1468参照)。トランスフェクションされたES細胞の胞胚腔への導入の前に、トランスフェクションされたES細胞は、トランスジーンが選択のための手段を提供すると仮定してトランスジーンを組み込んでいるES細胞について濃縮するための様々な選択プロトコールに供されうる。または、ポリメラーゼ連鎖反応は、トランスジーンを組み込んでいるES細胞についてスクリーニングするために用いられうる。この技術は、胞胚腔への移入の前に適切な選択条件下でトランスフェクションされたES細胞の増殖の必要性を除去する。

【0350】

さらに他の態様において、相同組換えが、遺伝子機能をノックアウトする、または欠失突然変異体(例えば、切り詰め突然変異体)を作製するために利用される。相同組換えのための方法は、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,614,396号に記載されている。

【0351】

実験

以下の実施例は、本発明の特定のいくつかの態様および局面を実証し、さらに例証するために提供され、その範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0352】

以下に続く実験の開示において、以下の略語が適用される：N(正常)；M(モル濃度)；mM(ミリモル濃度)； μ M(マイクロモル濃度)；mol(モル)；mmol(ミリモル)； μ mol(マイクロモル)；nmol(ナノモル)；pmol(ピコモル)；g(グラム)；mg(ミリグラム)； μ g(マイクログラム)；ng(ナノグラム)；lまたはL(リットル)；ml(ミリリットル)； μ l(マイクロリットル)；cm(センチメートル)；mm(ミリメートル)； μ m(マイクロメートル)；nm(ナノメートル)；および $^{\circ}$ C(摂氏度)。

【0353】

実施例1

固形腫瘍細胞異種移植モデルの確立および分析

この実施例は、ヒト由来のヒト固形腫瘍細胞を用いてマウスにおける腫瘍の発生およびこれらの腫瘍の分析を記載する。

【0354】

材料および方法

マウス調製

8週齢雌NOD-SCIDマウスを、0.2ml ケタミン/キシラジン(4ml容量における、20mgキシラジンと混合された300mgケタミン。20gマウスあたり溶液の0.02mlが用いられた)の腹腔内注射により麻酔した。200 μ lへの希釈は、HBSSを用いて行われた。その後、マウスを腹腔内注射によりVP-16(エトポシド)で処理した(200 μ lの最終注射容量について無血清HBSSに希釈された1kgマウスあたり30mgエトポシド用量)。同時に、エストロゲンペレットを、トロカールを用いてマウスの首の後ろの皮下に置いた。すべての腫瘍注入/移植はこの手順から5日後に行われた。以下の手順において、マウスを上記のように麻酔した。

【0355】

原発腫瘍標本移植

新鮮な標本の移植のために、ヒト乳房腫瘍の試料を手術から1時間以内に受け取った。腫瘍をはさみで小片へ切断し、その後、小片を、2x2mmサイズの小片を生じるように刃で切り刻んだ。切り刻みは、氷上無菌条件下で20%ウシ胎児血清(FBS)を追加された滅菌RPMI 1640培地中で行われた。腫瘍片を、移植前に無血清HBSSで洗浄した。その後、中央腹部領域に2mm切開を行い、トロカールを用いて、1~2個の小さな腫瘍片を、右上および左上の乳房脂肪体(両側の第二乳頭の真下)の領域に移植した。MFP-Nippleの周りを2回、6-0縫合糸で巻き、移植された小片を定位置に保持するのを可能にした。縫合糸を5日後に取り除いた。Nexabanは、切り口を塞ぐために用いられ、マウスは、腫瘍増殖について毎週、モニターされた。

【0356】

胸水注射

胸水の注射のために、胸腔穿刺術後すぐに細胞を受け取り、無血清HBSSで洗浄した。細胞を、その後、無血清RPMI/マトリゲル(Matrigel)混合物(1:1容量)に懸濁し、その後、18 G針を用いて右上および左上乳房脂肪体へ注射した。典型的には、100万~200万個の細胞を含む0.2mlを注射した。針注射の部位は、いかなる細胞の漏出も防ぐためにNexabanで塞がれた。

【0357】

腫瘍細胞の単細胞懸濁液の調製

コラゲナーゼでの消化の前に、異種移植片腫瘍または原発ヒト腫瘍を小片へ切断し、その後、滅菌刃を用いて完全に切り刻んだ。単細胞懸濁液を得るために、胸水細胞または結果として生じた腫瘍片のいずれかをその後、HBSS溶液における超高純度コラゲナーゼIII(1mlあたり200~250Uコラゲナーゼ)と混合し、37℃で3~4時間、インキュベートするようにさせておいた。10mlピペットでのピペッティングを15~20分間ごとに行った。インキュベーションの終わりに、細胞を45 μ lナイロンメッシュを通して濾過し、RPMI-20%FBSで洗浄し、その後、HBSSで2回、洗浄した。注射されうる細胞を、その後、HBSS/マトリゲル混合物(1:1容量)に懸濁し、上記のように乳房脂肪体の領域へ注射した。Nexabanが注射部位を塞ぐために用いられた。

【0358】

フローサイトメトリーのための細胞染色

細胞を数え、その後、5mlチューブへ移し、2%加熱不活性化仔ウシ血清(HICS)を含むHBSSで2回、洗浄し(5 min @ 1000 rpm)、その後、2%HICSを含むHBSSの100 μ l(10^6 細胞あたり)に再懸濁した。Sandoglobin溶液(1mg/ml)の5mlをその後、加え、氷上で10分間、インキュベートし、その後、試料をHBSS 2%HICSで2回、洗浄し、HBSS 2%HICSの100ml(10^6 細胞あたり)に再懸濁した。その後、抗体(抗体につき適切な希釈を用いて)を加え、氷上で20分

間、インキュベートし、その後、HBSS 2%HICSで2回、洗浄した。必要な場合、二次抗体添加が、HBSS 2%HICSの100 μ l (10^6 細胞あたり)に再懸濁し、その後、1~4mlの二次抗体(二次抗体およびその濃度に依存して)を加え、続いて、20分間のインキュベーションを行うことにより実施された。ストレプトアビジンを用いる場合、細胞を、HBSS 2%HICSの100 μ l (10^6 細胞あたり)に再懸濁し、その後、示された蛍光色素と結合したストレプトアビジンの1 μ lを加え、続いて、20分間のインキュベーションを行った。細胞をHBSS 2%加熱不活性化ウシ胎児血清(HICS)で2回、洗浄し、7AAD(1mg/ml最終濃度)を含むHBSS 2%HICSの0.5ml(百万個の細胞あたり)に再懸濁した。

【0359】

フローサイトメトリー

用いられた抗体は、抗CD44(APC、PE、またはビオチン)、抗CD24(PEまたはFITC)、抗B38.1(APC)、抗ESA-FITC(Biomed, CA)、抗H2K^d(Santa Cruz Products, Santa Cruz, CA)であった。Lineageマーカー抗体は、抗CD2、抗CD3、抗CD10、抗CD16、抗CD18、抗CD31、抗CD64、および抗CD140bであった。断りのない限り、抗体は、PharMingen(San Diego, CA)から購入された。抗体を、試験に依存して様々な蛍光色素に直接結合させた。すべての試験において、マウス細胞および/またはLineage⁺細胞は、フローサイトメトリー中、H2K^d(クラスI MHC)細胞またはLineage⁺細胞を捨てることにより排除された。死細胞を、生死判別色素7-AADを用いて排除した。フローサイトメトリーは、FACSVantage(Becton Dickinson, San Jose, CA)上で行われた。側方散乱および前方散乱プロファイルは細胞二重項を排除するために用いられた。細胞は、ルーチンの2回、ソーティングされ、細胞は、典型的には95%より高い、純度について再分析された。

【0360】

固形腫瘍において、腫瘍細胞の小さな割合だけがインビトロのクローン形成アッセイ^{21~24, 101~103}においてコロニーを形成できることは実証されている(Southam & Brunschwig, 1961, Cancer 14:971-8; Wodinsky et al., 1967, Cancer Chemother, Rep. 51:415-21; Bergsagel & Valeriote, 1968, Cancer Res 28:2187-96; Fialkow, 1976, Birth Defects Orig. Artic Ser. 12:123-32; Hamburger & Salmon, 1977, Science 197:461-3; Heppner, 1984, Cancer Res. 44:2259-65; Weisenthal & Lippman, 1985, Cancer Treat. Report 69:615-48)。さらになお、多数の細胞は、典型的には、異種移植モデルにおいて腫瘍を形成するために移植されなければならない。これらの観察についての一つの可能な説明は、腫瘍内のあらゆる細胞が増殖し、かつ新しい腫瘍を形成する能力を有するが、これらのアッセイにおける必要な段階を完了する個々の細胞の可能性は小さいことである。他に採り得る説明は、細胞のまれな、表現型的に異なるサブセットのみが、有意に増殖し、かつ新しい腫瘍を形成する能力を有するが、このサブセット内の細胞はそれほど非常に効率的に行うことである(Reya et al., 2001, Nature 414:105-11)。これらの可能性の間を識別するために、これらの腫瘍におけるクローン原性細胞を、これらの細胞を他の非腫瘍形成性細胞から区別するマーカーを用いて同定することが必要である。これは、急性骨髄性白血病(AML)において達成されており、白血病細胞の特定の亜集団(正常な造血幹細胞と類似したマーカーを発現する)が一貫してNOD/SCID免疫不全マウスにおいてクローン原性活性について濃縮されていたが、他の癌細胞はクローン原性活性を枯渇していた(Lapidot et al., 1994, Nature 17:645-8; Larochelle et al., 1996, Nat. Med. 2:1329-37; Bonnet & Dick, 1997, Nat. Med. 3:730-7)。そのような試験は固形癌において報告されていない。

【0361】

固形腫瘍不均一性の機構を調べるために、ヒト乳癌がマウス乳房脂肪体において効率的に増殖するNOD/SCID免疫不全マウスモデルの改変であるマウスモデルが開発された(Sakakibara et al., 1996, Cancer J. Si. Am. 2:291-300)。本出願において、固形腫瘍が、マウスにおいて腫瘍を形成する排他的能力を有する特徴的な細胞集団を含むことが示された。これらの細胞は、それらが一貫して腫瘍を形成するが、他の癌細胞集団は腫瘍形成の能力がある細胞を枯渇しているため、腫瘍形成性細胞または発癌細胞と呼ばれる。これらの

細胞集団間を区別できる細胞表面マーカーは同定された。これらの発見は、定義された細胞のサブセットが腫瘍形成を作動させ、加えて腫瘍細胞不均一性を生じるという、乳房腫瘍生物学の新しいモデルを提供する。癌細胞のこの腫瘍形成性集団の将来的同定は、その後、癌細胞のこの重要な集団を除去するための標的としての役割を果たすことができるこれらの細胞に発現した分子の同定を可能にする。

【0362】

腫瘍標本および移植率

9人の異なる患者における原発性または転移性部位から得られたヒト乳癌標本(腫瘍1~9; T1~T9と名付けられた)はすべてNOD/SCIDマウスに移植された(表1)。一つの場合において、癌細胞は原発乳房腫瘍から得られたが(T2)、他の場合には、細胞は転移性胸水から得られた(T1、T3~T9)。いくつかの試験は、細胞に、それらがマウスにおいて1回または2回継代された(継代1&2と名付けられた)後で行われたが、他の試験は、患者から直接得られた継代されていない新鮮なまたは凍結した腫瘍試料に行われた。マウスにおいて継代された腫瘍由来のヒト癌細胞を用いる場合、混入しているマウス細胞を、H2K^b細胞[マウス組織適合性クラスI(MHC)]を排除することにより除去した。

【0363】

(表1)

腫瘍	起源	マウスに おける形成	マウスに おける継代	診断
1	転移	あり	あり	浸潤性腺管癌
T2	乳房 原発	あり	あり	腺癌
T3	転移	あり	あり	浸潤性小葉癌
T4	転移	あり	なし	浸潤性小葉癌
T5	転移	あり	あり	浸潤性小葉癌
T6	転移	あり	あり	炎症性乳癌
T7	転移	あり	あり	浸潤性小葉癌
T8	転移	あり	あり	炎症性乳癌
T9	転移	あり	あり	腺癌

【0364】

表1は、ヒト乳癌のNOD/SCIDマウスへの移植の結果を示した。マウスに、選別されていないT1およびT3細胞、ならびにT2の2mm小片を注入した。T4~T9由来の細胞は、図1に記載されているようにフローサイトメトリーにより単離された。試験されるすべての9つの腫瘍は、NOD/SCIDマウスモデルに移植された。原発乳房腫瘍であるT2を除いて、すべての他の腫瘍は転移性であった。腫瘍の全部は、T4を除いてマウスにおいて連続的に継代された。

【0365】

腫瘍形成性マーカーの同定

乳癌細胞は、CD44、CD24、およびB38.1を含む様々な細胞表面マーカーの発現に関して不均一であった。CD24およびCD44は接着分子であり、一方、B38.1は乳房/卵巣癌特異的マーカーとして記載されている(Kufe et al., 1983, Cancer Res. 43:851-7; Uchida et al., 2000, PNAS 97:14720-5; Ahrens et al., 2001, Oncogene 20)。これらのマーカーが腫瘍形成性細胞を非腫瘍形成性細胞から区別できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリーが、第一継代T1またはT2細胞由来の各マーカーについて陽性または陰性であ

る細胞を単離するために用いられた。各集団の $2 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 細胞を注入した場合、 $CD44^+$ 細胞(8/8)、 $B38.1^+$ 細胞(8/8)、または $CD24^- / 低$ 細胞(12/12)が注入から12週間以内に目に見える腫瘍を生じたが、 $CD44^-$ 細胞(0/8)または $B38.1^-$ 細胞(0/8)注入のどれも検出可能な腫瘍を形成しなかった(表2)。 $CD24^+$ 細胞を注入された位置における触診により腫瘍は検出されることができなかったが、 $CD24^+$ 細胞を注入された12匹のマウスのうち2匹は、検視で検出された注入部位における少しの増殖を含んだ。これらの増殖は、選別された $CD24^+$ 細胞に必ず混入する1~3%の $CD24^-$ 細胞から、または代わりに、低下した増殖能力をもつ $CD24^+$ 細胞から生じた可能性が最も高い(表2)。 $CD44^+$ 細胞はもっぱら $B38.1^+$ であったため、本発明者らは次の試験において $CD44$ および $CD24$ マーカーに焦点を合わせた。

【0366】

正常細胞型に関連したいくつかの抗原(Lineageマーカー； $CD2$ 、 $CD3$ 、 $CD10$ 、 $CD16$ 、 $CD18$ 、 $CD31$ 、 $CD64$ 、および $CD140b$)は、マウスにおいて複数回継代されている腫瘍の分析に基づいて癌細胞により発現しないことが見出された。継代されていないまたは初期継代腫瘍細胞からLineage⁺細胞を排除することにより、正常ヒト白血球、内皮細胞、中皮細胞、および線維芽細胞が排除された。顕微鏡試験により、Lineage⁻腫瘍細胞は腫瘍性細胞の外観をもった(図6)。

【0367】

(表2)

腫瘍/注入			
細胞/注入	8×10^5	5×10^5	2×10^5
継代されたT1			
$CD44^-$	0/2	0/2	-
$CD44^+$	2/2	2/2	-
$B38.1^-$	0/2	0/2	-
$B38.1^+$	2/2	2/2	-
$CD24^+$	-	-	1/6
$CD24^-$	-	-	6/6
継代されたT2			
$CD44^-$	0/2	0/2	-
$CD44^+$	2/2	2/2	-
$B38.1^-$	0/2	0/2	-
$B38.1^+$	2/2	2/2	-
$CD24^+$	-	-	1/6
$CD24^-$	-	-	6/6

【0368】

表2は、示されたマーカーの発現に基づいて図1に記載されているようにフローサイトメトリーにより単離され、NOD/SCIDマウスの乳房脂肪体への注入後腫瘍を形成する能力についてアッセイされた細胞の結果を示す。12週間、マウスは観察および触診により腫瘍について毎週、調べられ、その後、すべてのマウスは、触診するには小さすぎた注入部位における増殖を探すために検視された。形成した腫瘍の数/行われた注入の数が各集団について示されている。すべての腫瘍は、検視で検出されただけであった $CD24^+$ 集団由来の腫瘍を除いて、目視検査および触診により容易に明らかであった。

【0369】

腫瘍に依存して、腫瘍または胸水におけるLineage⁻癌細胞の11%~35%は、CD44⁺CD24⁻/_低であった(図4a-1f)。9人の患者から単離されているCD44⁺CD24⁻/_低Lineage⁻細胞またはLineage⁻癌細胞の他の集団を、マウスの乳房脂肪体へ注入した(表3)。選別されず、継代されたT1またはT2細胞を注入する場合、5x10⁴細胞は一貫して腫瘍を生じたが、10⁴細胞は少数の場合においてのみ、腫瘍を生じた。対照的に、少なくとも10³個のT1またはT2 CD44⁺CD24⁻/_低Lineage⁻細胞はすべての場合において腫瘍を生じた(表3)。T1およびT2において、CD44⁺Lineage⁻であるがCD24⁺である2x10⁴個までの細胞は、腫瘍を形成できなかった。これらのデータは、CD44⁺CD24⁻/_低Lineage⁻集団が、未分画腫瘍細胞に対して、NOD/SCIDマウスにおいて腫瘍を形成する能力について10~50倍濃縮されていることを示唆する。CD44⁺CD24⁻/_低Lineage⁻細胞が継代された腫瘍(T1、T2、T3)から単離されようが、患者から直接得られた継代されていない癌細胞(T1、T4~T6、T8、T9)から得られようが、それらは、腫瘍形成性活性について濃縮されていた。T7は、このパターンに適合しなかった、研究された9つの癌のうちの唯一の1つであったことは留意されたい(図4f)。T7以外は、継代されていないおよび継代された腫瘍の両方におけるCD24⁺Lineage⁻癌細胞は新しい腫瘍を形成できなかった(表3)。それゆえに、異種移植片および継代されていない患者腫瘍は、表現型的に多様な癌細胞型の類似した集団で構成され、両方の場合において、CD44⁺CD24⁻/_低Lineage⁻細胞のみが増殖して新しい腫瘍を形成する能力を有した(p<0.001)。

10

【0370】

(表3)

20

注入あたりの 細胞	5×10^5	10^5	5×10^4	2×10^4	10^4	5×10^3	10^3	500	200	100
マウス継代1										
選別されていない	8/8	8/8	10/10		3/12		0/12			
CD44 ⁺ CD24 ⁺				0/10	0/10	0/14	0/10			
CD44 ⁺ CD24 ^{-/低}				10/10	10/10	14/14	10/1 0			
CD44 ⁺ CD24 ⁻ /低ESA ⁺							10/1 0*	4/4	4/4	1/6
CD44 ⁺ CD24 ⁻ /低ESA ⁻							0/10 *	0/4	0/4	0/6
マウス継代2										
CD44 ⁺ CD24 ⁺					0/9					
CD44 ⁺ CD24 ^{-/低}					9/9					
患者の腫瘍細胞										
CD44 ⁺ CD24 ⁺		0/3	0/4	0/8	1/13	0/2				
CD44 ⁺ CD24 ^{-/低}		3/3	4/4		11/13	1/1				
CD44 ⁺ CD24 ⁻ /低ESA ⁺						2/2	2/2			
CD44 ⁺ CD24 ⁻ /低ESA ⁻						2/2 [#]	0/2			

【0371】

表3に示されているように、腫瘍形成性乳癌細胞は、ESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}集団中に高度に濃縮されていた。細胞は、第一継代(マウス継代1と名付けられた)腫瘍1、腫瘍2、および腫瘍3、第二継代(マウス継代2と名付けられた)腫瘍3から単離され、継代されていない細胞は、6人の異なる患者から得られた、T1、T4、T5、T6、T8、およびT9(患者の腫瘍細胞と名付けられた)。CD44⁺CD24⁺Lineage⁻集団およびCD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞は、図1に記載されているようにフローサイトメトリーにより単離された。各表現型の示された数の細胞がNOD/SCIDマウスの乳房へ注入された。改変最大尤度解析方法により計算された腫瘍形成性細胞の頻度は、単一腫瘍形成性細胞が腫瘍を形成する能力があった場合には $\sim 5/10^5$ であり、あらゆる移植された腫瘍形成性細胞は腫瘍を生じた(Porter & Berry, 1964, Br. J. Cancer 17)。それゆえに、この計算は、移植に影響を及ぼすことができる細胞-細胞相互作用および局所的環境因子を考慮しないため、腫瘍形成性細胞の頻度を低く見積もりうる。示されているマーカーに加えて、すべての試験におけるすべての選別された細胞はLineage⁻であり、T1、T2、およびT3由来の腫瘍形成性細胞はB38.1⁺としてさらに選択された。マウスは、4ヶ月~6ヶ月半の間、またはマウスが腫瘍から病気になるまで、毎週観

察された。#T5 $ESA^{-}CD44^{+}CD24^{-/低}Lineage^{-}$ 細胞による腫瘍形成が2~4週間だけ、遅れた。
*2,000細胞がこれらの試験に注入された。

【0372】

図1は、腫瘍形成性細胞の単離を示す。フローサイトメトリーが、NOD/SCIDマウスにおいて腫瘍形成性について試験される腫瘍1(a、b)、腫瘍3(c)、腫瘍5(d)、腫瘍6(e)、および腫瘍7(f)細胞の亜集団を単離するために用いられた。T1(b)およびT3(c)は、NOD/SCIDマウスにおいて1回継代されているが(P)、残りの細胞は、患者からの切除後すぐに得られた凍結または非凍結試料であった(UP)。細胞は、CD44、CD24、Lineageマーカー、およびマウスH2K(マウスから得られる継代された腫瘍について)、および7AADに対する抗体で染色された。死細胞(7AAD+)、マウス細胞(H2K+)、およびLineage⁺正常細胞は全分析から排除された。図1における各プロットは、生きているヒトLineage⁻癌細胞のCD24およびCD44染色パターンを描き、各標本における癌細胞/全細胞のパーセンテージとしての四角で囲まれた腫瘍形成性癌集団の頻度が示されている。

【0373】

腫瘍の3つにおいて、腫瘍形成性活性のさらなる濃縮は、 $CD44^{+}CD24^{-/低}$ 集団のESA⁺サブセットを単離することにより可能であった。ESA(上皮特異的抗原、Ep-CAM)は、良性反応性中皮細胞から上皮癌細胞を区別するためにこれまで用いられている(Packeisen et al., 1999, Hybridoma 18:37-40)。ESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞は継代されたT1から単離され、少なくとも200個の細胞が一貫して、注入から約5~6ヶ月後、およそ1cmの腫瘍を形成したが、2000個のESA⁻CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞または20,000個のCD44⁺CD24⁺細胞はいずれも腫瘍を形成することができなかった(表3)。1万個の選別されていない細胞は12匹のマウスのうちの3匹のみにおいて腫瘍を形成した。これは、ESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻集団が、未分画腫瘍細胞に対して腫瘍を形成する能力について50倍より多く濃縮されたことを示唆する(表3)。ESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻集団は、第一継代T1細胞の2~4%(癌細胞の2.5~5%)を占めた。継代されていないT5細胞由来のESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻集団(癌細胞の0.6%)もまた、ESA⁻CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞と比較して腫瘍形成性活性について濃縮されたが、ESA⁺およびESA⁻画分の両方とも、いくらかの腫瘍形成性活性を有した(表3)。継代されていないT5細胞の中で、少なくとも1000個のESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞が一貫して腫瘍を形成した。

【0374】

細胞集団の腫瘍形成性における違いが細胞周期における違いによるかどうかを決定するために、集団をフローサイトメトリーにより分析した。T1由来の腫瘍形成性および非腫瘍形成性癌細胞の細胞周期状態の比較により、両方とも類似した細胞周期分布を示すことが明らかにされた(図2a、2b)。それゆえに、いずれの集団も細胞周期の特定の時期における細胞について濃縮されておらず、非腫瘍形成性細胞は、異種移植モデルにおいて少なくとも限られた数の分裂を起こすことができた。

【0375】

図2は、腫瘍形成性および非腫瘍形成性乳癌細胞のDNA含量を示す。T1から単離されたESA⁺CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻腫瘍形成性細胞(a)および残りのLineage⁻非腫瘍形成性癌細胞(b)の細胞周期状態は、DNA含量のhoechst 33342染色により測定された(20)。腫瘍形成性および非腫瘍形成性細胞集団は、類似した細胞周期分布を示した。

【0376】

接種から6ヶ月後、20,000個の腫瘍形成性CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞および20,000個のCD44⁺CD24⁺Lineage⁻細胞の注入部位を組織学により調べた。CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻注入部位は直径が約1cmの腫瘍を含んだが、CD44⁺CD24⁺Lineage⁻注入部位は検出可能な腫瘍を含まなかった(図6c)。CD44⁺CD24⁺Lineage⁻注入の部位において組織学により正常なマウス乳房組織のみが見られたが(図3a)、ヘマトキシリンおよびエオシン染色切片により判断されるように、CD44⁺CD24^{-/低}Lineage⁻細胞により形成された腫瘍は、悪性細胞を含んだ(図3b)。それぞれ1,000~50,000個の細胞を投与された58匹のマウス由来のCD44⁺CD24⁺Lineage⁻注入部位が16~29週間後に調べられた時でさえも、腫瘍は検出されなかった。

さらになお、腫瘍形成性および非腫瘍形成性集団は形態学的に区別できなかった。継代および非継代腫瘍由来のLineage⁻細胞の腫瘍形成性および非腫瘍形成性サブセットの両方とも、ライト染色またはパバニコロー染色および顕微鏡分析により判断されるように、>95%癌細胞を含んだ。組織学により、CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻細胞および残りのLineage⁻細胞は、上皮癌細胞の外観をもった(図3d、3e)。

【0377】

図3は、CD24⁺注入部位(a)、(20x対物レンズ倍率)正常なマウス組織のみを現した、一方CD24⁻/低注入部位(b)、(40x対物レンズ倍率)悪性細胞を含んだ、からの組織像を示す。(c)CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻注入部位でのマウスにおける代表的な腫瘍、しかしCD44⁺CD24⁺Lineage⁻注入部位ではなかった。T3細胞は、パバニコロー染色で染色され、顕微鏡(100x対物レンズ)によって調べられた。非腫瘍形成性(c)および腫瘍形成性(d)集団の両方とも腫瘍性外観をもち、大きな核および顕著な核小体を有する細胞を含んだ。

【0378】

腫瘍形成性集団は、初発腫瘍に見出される表現型的不均一性を生じることができる。新しい腫瘍を生じる少数のCD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻腫瘍形成性細胞の能力は、正常な幹細胞の器官形成能力を連想させる。正常幹細胞は自己再生し、低下した増殖能をもつ表現型的に多様な細胞を生じる。腫瘍形成性乳癌細胞もまたこれらの性質を示すかどうかを試験するために、200個のESA⁺CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻T1または1,000個のCD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻T2細胞から生じた腫瘍を解離させ、フローサイトメトリーにより分析した。二次腫瘍におけるESA、CD44、またはCD24の不均一な発現パターンは、それらが由来した腫瘍の表現型的複雑性と似ていた(図7a、7b対7e、7f)。これらの二次腫瘍内において、CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻細胞は腫瘍形成性のままであり、一方、Lineage⁻癌細胞の他の集団は非腫瘍形成性のままであった(表3)。このように、腫瘍形成性細胞は、腫瘍形成性細胞が由来している原発腫瘍の複雑性を繰り返す、追加のCD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻腫瘍形成性細胞および表現型的に多様な非腫瘍性細胞の両方を生じた。T1、T2、およびT3由来のこれらのCD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻腫瘍形成性細胞は、今、マウスにおいて4ラウンドの腫瘍形成を通して連続的に継代されており、腫瘍形成性の減少の証拠も無く各継代において類似した結果を生じている。これらの観察は、CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻腫瘍形成性癌細胞が正常な幹細胞の自己再生および分化に類似した過程を起こすことを示唆している。

【0379】

図4は、CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻細胞から生じた腫瘍における表現型的多様性を示す。プロットは、腫瘍1(a、c、およびe)または腫瘍2(b、d、およびf)由来の生きているヒトLineage⁻癌細胞のCD24およびCD44またはESA染色パターンを描く。T1 CD44⁺Lineage⁻細胞(a)またはT2Lineage⁻細胞(b)はNOD/SCIDマウスにおいて1回継代されている腫瘍から得られた。T1由来のESA⁺CD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻腫瘍形成性細胞(c)またはT2由来のCD44⁺CD24⁻/低Lineage⁻腫瘍形成性細胞(d)は単離され、NOD/SCIDマウスの乳房へ注入された。パネル(e)および(f)は、これらの細胞から生じた腫瘍の分析を描く。両方の場合において、腫瘍形成性細胞は、最初の腫瘍に観察されたものと類似した表現型的に多様な細胞を含んだ腫瘍を形成した。

【0380】

乳癌腫瘍細胞の亜集団におけるWnt経路遺伝子の発現

フリズルド(Frizzled)タンパク質は、Wntファミリーの増殖/生存因子についての受容体である。いくつかの正常幹細胞において、Wntは、増殖、生存、および分化において役割を果たすことが知られている。特定の状況において、Wntの刺激は、幹細胞自己再生を促進することができる。活性化により、Wntはβ-カテニンの安定化を誘導する。β-カテニンに対する抗体を用いるフローサイトメトリーは、腫瘍1細胞がこのタンパク質を発現することを実証している(図5)。免疫組織化学法は、β-カテニンが細胞質および核に位置していることを示しており、そのタンパク質が活性であることを表す(データ非呈示)。異なるWntタンパク質は異なるフリズルド受容体の特異的に活性化する(Taipale & Beachy, 2001, Nature, 411:349)。Wntシグナル伝達経路は、正常細胞および乳癌細胞の両方の増殖

において重要な役割を果たすように思われるため、腫瘍1の腫瘍形成性細胞および非腫瘍形成性細胞におけるWnt経路遺伝子の発現を調べた(図5)。これを行うために、百個のESA⁺B38.1⁺CD24⁻/低Lineage⁻(腫瘍形成性)または非腫瘍形成性腫瘍細胞を単離した。フリズルドタンパク質のそれぞれについて入れ子(nested)プライマーを用いるRT-PCRを行った。これらの結果は、腫瘍形成性細胞はフリズルド2および6を発現したが、非腫瘍形成性細胞はフリズルド2および7を発現したことを実証している(図5)。これらの試験は、同一の結果をもって2回、繰り返されている。次に、乳癌細胞により発現したWntファミリーのメンバーが同定された。RNAを、10,000個の非腫瘍性幹細胞から単離した。Wntファミリーの20個より多い既知のメンバーがあり、乳癌腫瘍において特定のWntの発現を分析することを困難にさせている。それゆえに、RT-PCRを、すべての既知のWnt遺伝子を認識する変性プライマーを用いて行い、クローニングをし、結果として生じたcDNAをシーケンシングした。驚くべきことに、本発明者らは、非腫瘍形成性細胞によるのみのcDNAの発現を検出することができた(図5)。これは、10細胞レベルでのRT-PCRを行って確認された。フリズルド6発現は、10個の腫瘍形成性試料のうちの9個、および10個の非腫瘍形成性細胞試料のうちの1個のみにおいて検出された。cDNAをクローニングし、シーケンシングより、これらの細胞がWnt 3A、4、7A、7B、10B、および11を発現することが明らかにされた。Wntシグナルは、乳癌細胞および正常内皮細胞の両方の増殖に関与している。本発明を実施するために理解する必要はないとはいえ、これは、非腫瘍形成性細胞が、Wnt経路を介しての乳癌幹細胞の刺激および血管形成の両方により腫瘍形成を促進することを示唆する。このモデルは、個々の細胞とは対照的に、組織の小片を用いて乳癌を増殖させることがずっと容易であるという公知の観察と非常に良く一致している(Bergsagel & Valeriote, 1968, Cancer Res. 28:2187-96)。

【0381】

図5は、Wnt(左パネル)およびフリズルド(右パネル)の発現を示す。左パネルに関して、RT-PCRを、示された型の10,000細胞から単離されたRNAで変性Wntプライマーを用いて行った。+または-はRTが用いられたかどうかを示す。右パネル。RNAを、図1に記載されているようにフローサイトメトリーにより単離された百個の乳癌細胞または乳癌幹細胞から単離した。RT-PCRを、示されたmRNAを検出するために入れ子プライマーを用いて行った。RTを省く対照RT-PCR反応が陰性であった。

【0382】

フリズルドタンパク質の発現についてのRT-PCR結果を確認するために、Affymetrixマイクロアレイを、腫瘍1、腫瘍2、および腫瘍3癌幹細胞から作製されたcDNAで探索した。すべての3つの腫瘍はフリズルド2および6を発現した。加えて、腫瘍2および3はフリズルド4を発現するように思われた。

【0383】

腫瘍からの正常細胞の単離

その後、これらの細胞に関する分子研究を行うために十分な正常細胞が腫瘍から単離されるかどうかを決定するために努力がなされた。患者の腫瘍(サイズが約3cm)由来の正常な線維芽細胞および内皮細胞をフローサイトメトリーにより単離した。腫瘍細胞の2%はCD31⁺内皮細胞であり、8%がCD140b⁺線維芽細胞であった(図6)。腫瘍の1/45がフローサイトメトリーに用いられた時、9千個の線維芽細胞および2千個の内皮細胞が収集された。外挿により、腫瘍全体から約90,000個の内皮細胞および405,000個の線維芽細胞を単離することは可能であったろう。

【0384】

図6は、正常な腫瘍線維芽細胞および内皮細胞の単離を示す。腫瘍を、方法セクションに記載されているように解離させ、腫瘍細胞を、CD2、CD3、CD16、CD18、CD45、CD64に対する抗体で標識されたチトクロム、および抗B38.1-APC(造血細胞および腫瘍細胞をそれぞれ、排除するために)、抗CD140b-PE、および抗CD31-FITCで染色した。A: ボックスは、Lineage⁻CD31⁻CD140b⁺細胞である線維芽細胞についてのソーティングゲートを示す。B: ボックスはCD31⁺Lineage⁻細胞である内皮細胞についてのソーティングゲートを示す。

【0385】

乳癌幹細胞のアデノウイルスベクターでの感染

異種移植片腫瘍は組織培養においてのみ短時間で増殖することができるため、通常のトランスフェクション方法は、一般的に、遺伝子発現研究に有用ではなく、ウイルスベクターのみが、乳癌幹細胞に効率的に形質導入する可能性をもっている。それゆえに、T1乳癌幹細胞に感染するアデノウイルスベクターの能力が試験された。これを行うために、10,000個の乳癌幹細胞または対照MCF-7細胞の群に、0個、50個、500個、または5,000個のLacZアデノウイルス粒子を感染させた。図7は、本発明者らが幹細胞の90%より多くに容易に形質導入することができ、それらが、対照MCF-7細胞が感染するより容易にアデノウイルスベクターに感染することを示している。これは、本発明者らが、幹細胞に組換え遺伝子を形質導入するためにアデノウイルスを用いることができることを実証している。

【0386】

図7は、乳癌幹細胞のアデノウイルスベクターでの感染を示す。フローサイトメトリーがCD44⁺CD24⁻/低 Lineage⁻細胞を単離するために用いられた。腫瘍1幹細胞または対照MCF-7細胞に、0個、または500個、または5,000個のLacZアデノウイルス粒子/細胞を感染させた。2日後、細胞をX-galで染色した。腫瘍1幹細胞がアデノウイルスベクターにより容易に感染することに注目されたい。

【0387】

以下のデータは、造血幹細胞を研究している仕事の記載である。それは基本的な幹細胞性質を例証し、それはまた、どのようにして幹細胞の単離が、これらの細胞を初めて特徴付けること、およびその後、それらを機能的に特徴付けるために分子生化学的研究を行うことを可能にするのかを実証している。

【0388】

成体幹細胞数は厳密に制御される

造血幹細胞(HSC)恒常性の制御は良く理解されていない。本発明者らは、骨髄における長期再構築HSCまたは制限前駆体の数におけるマウス系統間の違いに結びつけられる遺伝子多型についてスクリーニングした。AKR/Jマウスは、C57BL/Ka-Thy-1.1マウスよりそれらの骨髄におけるHSCおよび制限前駆体の両方の有意に高い頻度および数を有した。C57BL/Ka-Thy-1.1対立遺伝子は部分的に優性であった。H-2複合体を含む第17染色体上の座位は、長期自己再生HSCの頻度と有意に結びつけられたが、制限前駆体の頻度への連関の証拠を示さなかった。逆に、第1染色体座位は、制限前駆体頻度への示唆的連関を示したが、HSC頻度と結びつけられなかった。これは、インビボでHSCおよび制限前駆体の頻度の別個の遺伝的決定基があることを実証している。AKR/J第17染色体座位は、C57BL背景上へ作り出される場合、HSC頻度を増加させるのに十分ではなかった。これは、HSC頻度に影響を及ぼすために、この座位の産物が非連鎖修飾座位との相互作用に依存する可能性が高いことを示唆している。本発明は、幹細胞増殖が動物において厳しい遺伝的制御下にあることを実証している。

【0389】

造血幹細胞のゲノム分析

造血幹細胞(HSC)は、自己再生能力および多分化発生能を有する。HSCの自己再生を制御する分子機構はまだ大部分、知られていない。HSCにおける遺伝子発現プロファイルを分析するためにバイオインフォマティクスおよびアレイハイブリダイゼーション技術を用いる系統的アプローチが行われた。非拘束細胞系統において主に発現されたmRNAを濃縮するために、HSCの高濃縮化集団ならびに幹細胞および初期多能性前駆細胞(MPP)の混合集団から作製された54,000個のcDNAクローンを、ナイロン膜上に整列させ(マクロアレイまたは高密度アレイ)、脾臓、胸腺、および骨髄を含む成熟系統細胞由来のcDNAプローブで引き算した。非常に低いハイブリダイゼーションシグナルをもつ5千個のcDNAクローンを、シーケンシングおよびガラススライド上のマイクロアレイを用いるさらなる分析のために選択した。細胞の2つの集団、HSCおよびMPP細胞、をマイクロアレイ分析を用いて示差的遺伝子発現について比較した。HSCは自己再生する能力を有するが、MPP細胞は、自己再生

の能力を喪失している。HSCおよびMPP細胞の濃縮化集団により示差的に発現した多数の遺伝子を同定した。これらは、転写因子、シグナル伝達分子、および以前には知られていない遺伝子を含んだ。

【0390】

Bmi-1はHSC自己再生に必要とされる

HSCの遺伝子発現分析は、本発明者らが、自己再生にとって重要である可能性がある遺伝子を同定することを可能にした。遺伝子発現データの解析後、本発明者らは、重要な幹細胞制御遺伝子を同定するために機構研究を始めた。幹細胞生物学における中心的課題は、造血が動物の一生続くために必要とされる、HSCの自己再生を制御する機構を理解することである。本発明者らは、成体およびE14.5胎児マウスならびに成人ヒトの造血幹細胞がプロトオンコジーンbmi-1を発現することを見出した。フローサイトメトリーにより測定される場合の胎児肝臓HSCの数は、機能bmi-1の喪失マウスにおいて正常であり、bmi-1^{-/-}HSCはケモカイン勾配へ正常に移動することができた。出生後のbmi-1^{-/-}マウスにおいて、初期前駆細胞は低下しなかったが、HSCの数は著しく低下した。bmi-1^{-/-}マウスから得られる胎児肝臓細胞および骨髓細胞の両方は、致死的な放射線を浴びたレシピエントへ移植された場合、造血へ一時的のみ寄与することができた。成体造血幹細胞の検出可能な自己再生はなく、bmi-1^{-/-}マウスにおける細胞自律的欠損を示した。この研究は、bmi-1の発現が自己複製する成体造血幹細胞の生成に必須であることを示している。Park et al., 「Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing hematopoietic stem cells」Nature (2003)による論文を参照されたい。

【0391】

要約

この研究室により開発された異種移植モデルは、細胞レベルでのヒト乳癌細胞の分析を可能にさせている。癌細胞系は多くの研究に有用であることを証明されているが、細胞系は、組織培養により課せられる独特の条件に適応させられ、それらの性質の多くは、患者の腫瘍における癌細胞とは明らかに異なる(Porter & Berry, 1964, Br. J. Cancer 17; Brown, 1997, Oncol. Res. 9:213-5)。最近、切除前の原発乳癌腫瘍のサイズが顕著に減少している。これは、患者試料を用いる生物学および生化学的研究を難しくさせている。予備段階の結果に記載された異種移植モデルがこの問題を改善することが企図される。予備段階の結果は、異種移植片腫瘍が、本来の患者の腫瘍に見られる表現型および生物学的多様性を反復するように思われることを示唆している。環境的因子によりマウスおよびヒトの腫瘍においていくつかの違いがありうるが、本明細書に記載されたNOD/SCIDモデルは、ヒト乳癌の最良の利用可能なモデルである。結果は、乳癌細胞がこの異種移植モデルに確実に移植され、初期継代において、本来のヒト腫瘍に見出された細胞性および生物学的多様性を反映することを実証している。これらの試験はまた、癌細胞の異なる集団が腫瘍を形成するそれらの能力において異なりうることを示している。

【0392】

実施例2

本発明の系および方法を用いてのヒト乳癌腫瘍におけるWnt/ β -カテニン経路の特徴付け

この実施例は、本発明の系および方法を用いる例証的スクリーニング方法を提供する。この実施例は、例えば、どのようにして、上記の異種移植モデルを用いてヒト乳癌腫瘍におけるWnt/ β -カテニン経路を特徴付けることができるかを記載する。Wnt/ β -カテニン経路は、正常幹細胞の増殖および自己再生において役割を果たす。ヒト乳癌の有意なパーセンテージがこの重要な経路の恒常的活性化を有すると思われるが、この経路がヒトにおけるこの疾患の病態において何の役割を果たすのかは決定的には確立されていない(Candidus et al., 1996, Cancer Res. 56:49-52; Sorlie et al., 1998, Hum. Mutat. 12:215; Jonsson et al., 2000, Eur. J. Cancer 36:242-8; Schlosshauer et al., 2000, Carcinogenesis 21:1453-6; Lin et al., 2000, PNAS 97:4262-6; Wong et al., 2002, J. Pathol. 196:145-53)。上記の異種移植モデルは、ヒト乳癌腫瘍におけるこの経路の生物学的結果を特徴付けるために用いられうる。これらの試験は、患者からの切除後すぐの癌細胞

胞および初期継代異種移植片腫瘍を用いて行われた。

【0393】

複数の患者の腫瘍におけるWnt/フリズルド/ β -カテニンシグナル伝達経路の機能

原理：結腸癌のほとんど90%が、結果として β -カテニンの活性化を生じる突然変異を含む。最も一般的な突然変異は、 β -カテニンを分解の標的にすることに関与するAPC遺伝子においてである、または β -カテニンタンパク質自身における突然変異である(Webster et al., 2000, Genes Chromosomes Cancer 28:443-53; Taiple & Beachy, 2001, Nature 411:349-54)。これらの後者の突然変異は分解を妨げる。多くの乳房腫瘍における癌細胞は β -カテニンの恒常的活性を有するようと思われるが、結腸癌と対照的に、APC遺伝子または β -カテニン自身における突然変異はこれらの場合のたった6~10%を占めるだけである(Candidus et al., 1996, Cancer Res. 56:49-52; Sorlie et al., 1998, Hum. Mutat. 12:215; Jonsson et al., 2000, Eur. J. Cancer 36:242-8; Schlosshauer et al., 2000, Carcinogenesis 21:1453-6; Lin et al., 2000, PNAS 97:4262-6; Wong et al., 2002, J. Pathol. 196:145-53)。乳癌細胞におけるWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の試験は、この疾患の病因論への新しい洞察へと導くはずである。異なるフリズルド受容体に異なって結合すると考えられる多数のWntタンパク質がある(Nusse et al., 1991, Cell 64:231; Nusse, 1992, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 43:9-12; Cadigan & Nusse, 1997, Genes & Dev. 11:3286-305; Nusse, 1999, Trends Genet. 15:1-3; Taiple & Beachy, 2001, Nature 411:349-54)。Wntのサブセット、および推論によって、フリズルド受容体のみが、 β -カテニンを活性化できる。通常、 β -カテニンは細胞膜でE-カドヘリンに結合している。細胞質 β -カテニンは、APCおよびAxinタンパク質と複合体を形成し、GSK3 β による β -カテニンリン酸化を促進する(Sorlie et al., 1998, Hum. Mutat. 12:215; Jonsson et al., 2000, Eur. J. Cancer 36:242-8; Webster et al., 2000, Genes Chromosomes Cancer 28:443-53)。リン酸化 β -カテニンは、その後、ユビキチン分解経路を介して分解される。しかしながら、Wntによるフリズルド受容体の活性化により、 β -カテニンは安定化される。そのタンパク質は、その後、核へ転位置し、そこでそれは、LGLS/BCL9、PYGO、およびTCFタンパク質と複合体を形成して、転写を活性化する(Korinek et al., 1998, Mol. Cell Biol. 18:1248-56; Kramps et al., 2002, Cell 109:47-60)。本発明者らは、本発明者らの異種移植モデルおよび細胞アッセイがこの重要な経路を理解するための独特かつ強力なツールであると考えている。本発明者らは、恒常的 β -カテニンシグナル伝達を有する10個の腫瘍、および有しない10個を分析する。これらの研究は、Wnt経路が活性化される機構、およびヒト乳癌におけるこの活性化の結果へ新しい洞察を与える。

【0394】

マウスにおいて、様々なWntタンパク質の異所性発現は結果として乳房腫瘍形成を生じるが、ヒトにおいて乳癌細胞における活性化 β -カテニンはサイクリンD1の発現および不良な予後に関連している(Nusse & Varmus, 1982, Cell 31:99-109; Nusse, 1991, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 171:43-65; Nusse, 1996, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 43:9-12; Lin et al., 2000, PNAS 97:4262-6)。しかしながら、持続的 β -カテニンシグナル伝達が腫瘍形成性乳癌細胞が腫瘍を形成するのに必要であるかどうかは知られていない。恒常的 β -カテニンシグナル伝達がヒト乳癌において果たしうるいくつかの可能性のある役割がある。まず、それは、腫瘍形成性癌細胞の持続する増殖および/または生存能力に必要でありうる。次に、それは、腫瘍の発生に必要でありうるが、その後の突然変異は β -カテニンシグナル伝達の必要性を迂回する。第三に、それは、サイクリンD1のような下流標的の活性化により癌細胞を化学療法に対してより抵抗性にさせる。第四に、恒常的 β -カテニンシグナル伝達は癌細胞増殖を促進するが、腫瘍形成性に必要ではない。最後に、腫瘍形成における β -カテニンシグナル伝達の役割は、 β -カテニンの恒常的活性化有りおよび無しで腫瘍において異なる可能性がある。例えば、前者の腫瘍は、 β -カテニンシグナル伝達を必要とする可能性があるが、一方、後者の腫瘍は他の腫瘍細胞からのWntシグナルを必要とする可能性がある、またはそれらは、それらがc-mycおよび/もしくはサイクリンD1のような下流標的の恒常的活性化を有するために、 β -カテニンと無関係

である可能性がある。本明細書に記載された試験は、新規なヒト癌の異種移植モデルを用いてこれらの可能性間を区別するように設計される。データは、異種移植モデルがヒト乳癌腫瘍をほぼ再現することを示している。従って、このモデルは、本発明者らが、できる限りの生理学的状態で新規のヒト腫瘍においてWnt経路を研究することを可能にする。

【0395】

複数の患者から単離された癌細胞による腫瘍形成に β -カテニンシグナル伝達が必要とされるか？

ここでの試験は、 β -カテニン経路が乳癌細胞増殖にとって絶対であるかどうか、または活性化が腫瘍形成に必要とされないが、癌細胞の増殖の速度を増加させるかどうかを決定する。異種移植片腫瘍は、ヒト腫瘍によく似ているように思われるが、時間が経てば、淘汰圧が結果として、マウス環境に順応している腫瘍を生じる。そのような腫瘍における癌細胞は、本来のヒト腫瘍を構成した癌細胞といくつかの点で異なる。本発明者らは、活性化 β -カテニンを有する(免疫組織化学法による細胞質および/または核発現)5つの異なる異種移植片腫瘍および5つの非継代腫瘍由来の癌細胞、ならびに有しない(免疫組織化学法による膜結合型発現)5つの異なる異種移植片腫瘍および5つの非継代腫瘍由来の癌細胞を同定した。本発明者らは、エストロゲン受容体/プロゲステロン受容体(ER/PgR)、原発腫瘍対転移性腫瘍、野生型対突然変異体p53、およびHer2/neuの増幅を含む重要な予後像について不均一である腫瘍を選択する。

【0396】

β -カテニンの恒常的活性化を有する細胞を同定するために、本発明者らは、これが、結果として、 β -カテニンの安定化ならびに細胞質および核におけるそのタンパク質の蓄積を生じるという観察を活用する。活性化されていない場合、 β -カテニンは血漿膜に結合している。それゆえに、本発明者らは、 β -カテニンの細胞下局在性を測定するために免疫組織化学法を用いて、および細胞の各集団によって発現した β -カテニンの量を測定するためにフローサイトメトリーを用いて、腫瘍のそれぞれ由来の乳癌細胞集団を分析する。これを行うために、本発明者らは、複数の腫瘍からLineage⁻癌細胞を単離するためにフローサイトメトリーを用いる。生存可能に凍結した異種移植片または患者腫瘍細胞がこの分析に用いられる。その後、癌細胞を、免疫組織化学法およびフローサイトメトリー分析のために抗 β -カテニン-FITC抗体で、抗体製造会社(Transduction Laboratories)のプロトコルを用いて染色した。活性化 β -カテニンを有する細胞は、細胞質/核局在性およびそのタンパク質のレベルの増加をもつ。

【0397】

腫瘍形成性における β -カテニンシグナル伝達の役割を決定するために、20個の腫瘍のそれぞれから単離されたLineage⁻癌細胞に、ドミナントネガティブな(dn)TCF4-IRES-GFPミニ遺伝子または対照GFPウイルスを含むアデノウイルスまたはレンチウイルスのいずれかを感染させる(ウイルス構築および使用の詳細について、Clarke et al., 1995, PNAS 92:11024-8参照)。アデノウイルスベクターは、1~3週間、dnTCF4を一過性に発現するが、レンチウイルスベクターはdnTCF4を永久に発現する。dnTCF4アデノウイルスはすでに、dnTCF4ミニ遺伝子を用いて作製されている(Eric Fearonからの贈与)。dnTCF4は、 β -カテニンと複合体を形成し、それにより、活性化 β -カテニンによる転写トランス活性化を阻害する。dnTCF4は、 β -カテニンシグナル伝達を媒介するTCFファミリーの全メンバーからのシグナル伝達をブロックすることに留意されたい(Eric Fearon、私信)。限界希釈試験は、インビトロでコロニーを、およびインビボで腫瘍を形成する形質導入された細胞の能力を測定するために行われる。ここでの試験は、患者またはヒト腫瘍のいずれかからフローサイトメトリーにより単離された癌細胞を用いて行われる。正常細胞を排除するために系統カクテルを排除することにより、癌細胞による、組織培養におけるコロニー形成およびマウスにおける腫瘍形成が測定されうる(正常間質細胞の腫瘍形成性細胞の増殖への可能性のある寄与は、下の目的2Bにおいて記載されているように分析される)。 β -カテニンシグナル伝達の癌細胞増殖および生存能力への役割を決定するために、dnTCF4ウイルス(アデノウイルスまたはレンチウイルスベクターのどちらか)および対照ウイルスに感染し

た腫瘍のそれぞれ由来の1,000個、5,000個、20,000個、50,000個、および100,000個のLineage⁺癌細胞の5セットを、Notch ligand Deltaを含む培地でインビトロで培養し、形成するコロニーの数を測定する。対照組織培養プレートにおけるコロニーは、それらが腫瘍性細胞から生じたことを確認するためにサイトケラチンで染色される(Ethier et al., 1993, Cancer Res 53:627-35)。感染から2日後、細胞の90%より多くがウイルスにより形質導入されたことを確認するために細胞を蛍光顕微鏡で調べる。同様に、インビボ限界希釈試験が、dnTCF4ウイルスが、異なる患者から単離された癌細胞による腫瘍形成に影響を及ぼすかどうかを決定するために行われる。感染後、5,000個、20,000個、50,000個、および100,000個のLineage⁺癌細胞の10セットを、フローサイトメトリーにより単離し、その後、dnTCF4アデノウイルスまたは対照アデノウイルスに感染させる。感染した細胞をNOD/SCIDマウスの乳房へ注入する。本発明者らは、その後、各群において腫瘍を形成するのに必要とされる癌細胞の数、各群において腫瘍を形成するのに必要とされる時間、各群の増殖の速度、および各群において形成する腫瘍のサイズを測定する。これは、本発明者らが、恒常的に活性化された β -カテニンを有するまたは有しない癌細胞による腫瘍形成に β -カテニンが必要であるかどうかを決定するのを可能にする。

【0398】

その後の試験は、インビボおよびインビトロの限界希釈試験の結果に依存する。もし β -カテニン転写トランス活性化の障害が腫瘍形成をブロックする、または腫瘍増殖を遅くするならば、本発明者らは、サイクリンD1またはc-mycのような下流 β -カテニン標的が腫瘍形成性に必要とされるかどうかを試験することを始める(Lin et al., 2000, PNAS 97:4262-6; Yu et al., 2001, Nature 411:1017-21; Wong et al., 2002, J. Pathol. 196:145-53)。これを行うために、本発明者らは、フローサイトメトリーにより単離されたLineage⁺癌細胞を感染させ、その細胞に、対照かまたはdnTCF4のいずれか、加えて対照gfpベクター、c-myc-IRES-gfpレトロウイルスベクター、サイクリンD1-IRES-rfpレトロウイルスベクター、またはmyc-IRES-gfpおよびサイクリンD1-IRES-rfpレトロウイルスベクターの両方に感染させる。感染した細胞をフローサイトメトリーにより単離し、その後、各試験群の5,000個、10,000個、20,000個、50,000個、または100,000個のLineage⁺癌細胞の10セットをマウスへ注入する。マウスは、腫瘍の形成、および各試験群の増殖の速度について毎週、分析される。これは、本発明者らが、c-mycおよび/またはサイクリンのいずれかの強制的発現が β -カテニンシグナル伝達の障害から細胞を救出するかどうかを決定することを可能にする。

【0399】

もし β -カテニンの障害が腫瘍形成にいかなる認識できる効果も生じないならば、本発明者らは、まず、ドミナントネガティブなウイルスの両方がdnTCF4ミニ遺伝子の発現を阻害していることを確認する。もしそうでないならば、本発明者らは、 β -カテニン経路を阻害するもう一つの方法を用いる。RNA-iおよびアンチセンスアプローチに加えて(Sazani et al., 2001, Nucl. Acid Res. 29:3965-74; Caplen et al., 2001, PNAS 98:9742-7; Martinez et al., 2002, Cell 110:563-74; Paul et al., 2002, Nat. Biotech. 29:505-8)、Axin(β -カテニンを分解の標的にする)の過剰発現が β -カテニンを阻害するために用いられうる(Hedgepeth et al., 1999, Mol. Cell Biol. 19:7147-57; Spink et al., 2000, EMBO 19:2270-9)。もし β -カテニンシグナル伝達が阻害され、かつ腫瘍形成への効果が最小または無しであったならば、本発明者らは、癌幹細胞上のより微妙な変化があるかどうかを測定する。発現が β -カテニンにより誘導されるサイクリンD1の発現は、化学療法に対する抵抗性と関連している。それゆえに、本発明者らは、 β -カテニンの障害が化学療法の効力を増強するかどうかを決定するために、dnTCF4を形質導入された、または対照癌幹細胞をマウスへ注入してから5日後、アドリマイシン(8mg/kg)またはタキソール(60mg/kg)でマウスを処理する。腫瘍形成および腫瘍増殖速度への効果は上記のように測定される。

【0400】

予想される結果

かなりの数の乳房腫瘍における癌細胞は恒常的に活性の β -カテニンシグナル伝達経路を有するが、この経路が悪性転換に必須であるかどうか知られていない。もしWnt/ β -カテニン経路が癌細胞が腫瘍を形成するのに必要であるならば、ドミナントネガティブな阻害剤は癌細胞の腫瘍を形成する能力をブロックする。もし恒常的 β -カテニンシグナル伝達が、悪性転換後の腫瘍細胞増殖を増強するが、腫瘍形成に必要ではないならば、ドミナントネガティブな阻害剤は腫瘍細胞の増殖を遅くするが、腫瘍形成をブロックしない。もし腫瘍発生の後の発癌性突然変異が細胞をWntシグナル伝達に非依存性にさせるならば、ドミナントネガティブな阻害剤は、腫瘍形成または増殖に影響を及ぼさない。最後に、Wnt経路の恒常的活性化はアポトーシスに対する抵抗性に寄与し、それゆえに、細胞を化学療法に対して抵抗性にさせることは可能性がある。

10

【0401】

マウス癌のモデルにおいて、c-rasまたはc-myc遺伝子により形質転換された癌細胞におけるc-rasまたはc-myc活性の短期阻害は、結果として、腫瘍形成性の永久的喪失を生じた(Chin et al., 1999, Nature 400:468-72; Jain et al., 2002, Science 297:102-4)。もしこれが β -カテニンシグナル伝達についても真実ならば、アデノウイルスによるシグナル伝達の一時的阻害は腫瘍形成を阻害する。もし β -カテニンシグナル伝達の阻害が腫瘍形成性を阻害するが、細胞は生存可能なままで β -カテニンシグナル伝達の回復がそれらが腫瘍を形成するのを可能にするならば、アデノウイルスベクターは腫瘍形成を遅くするが、レンチウイルスベクターは腫瘍形成を阻害する。もし β -カテニンシグナル伝達が増殖の速度を増加させるが、腫瘍形成性にとって絶対ではないならば、両方のウイルスベクターは腫瘍形成を遅らせ、腫瘍の増殖を遅くする。もし、 β -カテニンシグナル伝達に頼る腫瘍もあれば、他の経路に頼る、または β -カテニンシグナル伝達の下流エフェクターの恒常的活性化を有するものもあるならば、ウイルスベクターにより影響を及ぼされる腫瘍もあれば、一方、そうでないものもある。上記の試験は、本発明者らが、ヒト腫瘍を再現する独特なモデルを用いてこれらの重要な質問に答えるのを可能にする。これらの試験は、新規なヒト乳癌における β -カテニンシグナル伝達の生物学的機能を初めて描写している。

20

【0402】

レンチウイルスは、細胞に効率的に感染するものが見出されるまで、他のエンベロープを用いて作製されうる(Hughes et al., 2002, Mol. Ther. 5:16-24; Wang et al., 2002, PNAS 94:10705-10)。

30

【0403】

レンチウイルスベクターでの感染効率は、30~70%の範囲でしかありえないことは留意されたい。これは、腫瘍を形成しうるかなりの数の腫瘍細胞が残存するだろうことを意味する。しかしながら、もし β -カテニンシグナル伝達の阻害が腫瘍形成を阻害するならば、結果として生じた腫瘍は、gfpを発現しないだろう。フローサイトメトリーは、dnTCF4ウイルスおよび対照ウイルスに感染した腫瘍においてgfp発現細胞を測定するために用いられる。dnTCF4群から生じた腫瘍は、もし β -カテニンシグナル伝達が増殖形成において役割を果たしているならば、そのような細胞の顕著な減少がある。

【0404】

40

β -カテニンシグナル伝達の阻害は腫瘍形成性乳癌細胞の表現型を変化させるか？

腫瘍形成性および非腫瘍形成性乳癌細胞の分離に有用な情報を与えるマーカーはCD44である。興味深いことに、CD44は、 β -カテニンにより転写的に上方制御される標的遺伝子の一つであり、上皮幹細胞はこのマーカーを発現するように思われるが、それらの分化した子孫はそうではない(Liu et al., 1997, PNAS 94:10705-10, van de Wetering et al., 2002, Cell 111:241-50)。本発明者らは、 β -カテニンシグナル伝達の阻害が結果として、腫瘍形成性乳癌細胞の分化を生じ、それらにCD44の発現を欠損させることを予想する。本発明者らはさらに、CD44⁻非腫瘍形成性癌細胞が活性 β -カテニンを有しないことを予想する。これを試験するために、本発明者らは、腫瘍1、腫瘍2、および腫瘍3からESA⁺CD44⁺CD24⁻ Lineage⁻癌細胞を単離するためにフローサイトメトリーを用い、それらにdnTCF

50

4アデノウイルスまたは対照アデノウイルスを感染させた。細胞は、可溶性Deltaを含む組織培養培地で培養される。本発明者らは、この培地が、腫瘍形成性細胞が1～3週間、組織培養で増殖するのを可能にすることを見出している。細胞は、3週間の期間に渡ってインビトロで増殖についてモニターされる。加えて、感染から1日、3日、および7日後、dnTCF 4アデノウイルスまたは対照アデノウイルスに感染した細胞は、ESA、CD44、およびCD24の発現についてフローサイトメトリーにより分析される。

【0405】

次に、本発明者らは、腫瘍形成性癌細胞、CD44⁺癌細胞、またはCD44⁻癌細胞においてβ-カテニンシグナル伝達における違いはあるかどうかを決定する。これを行うために、本発明者らは、腫瘍1、腫瘍2、および腫瘍3からESA⁺CD44⁺CD24⁻ / 低 Lineage⁻腫瘍形成性癌細胞、CD44⁺癌細胞、およびCD44⁻非腫瘍形成性癌細胞を単離するためにフローサイトメトリーを用いる。細胞の各集団は、APCに結合している抗β-カテニン抗体で染色される。細胞の各集団は、β-カテニンが膜結合している(恒常的に活性ではない)かどうかを測定するために蛍光顕微鏡により、および細胞におけるタンパク質の量を測定するためにフローサイトメトリーにより、分析される。β-カテニンのレベルは活性と関連している。加えて、本発明者らは、リン酸化および非リン酸化β-カテニンを認識する市販されている抗体を用いる。リン酸化型は分解の運命を定められ、一方非リン酸化型は活性である(van Noort et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:17901-5; van Noort et al., 2002, Exp. Cell Res. 274-72)。これらの試験は、本発明者らが、CD44発現とβ-カテニンシグナル伝達が患者の癌細胞において結びつけられるかどうかを決定するのを可能にする。

【0406】

CD44は腫瘍形成性癌細胞を非腫瘍形成性癌細胞から区別するのを可能にする最良のマーカーの一つである。CD44はβ-カテニンにより転写的に活性化され、ひいては、β-カテニンシグナル伝達の障害が結果として、CD44の下方制御を生じる。

【0407】

腫瘍1においてフリズルドタンパク質の示差的発現が乳癌幹細胞の運命に影響を及ぼすか？

データは、腫瘍1において、腫瘍形成性幹細胞がフリズルド2および6を発現するが、非腫瘍形成性腫瘍性細胞はWnt3、4、7A、7B、10B、および11を発現することを示唆する。これは、非腫瘍形成性細胞が癌幹細胞の増殖を作動させる、この特定の腫瘍における傍分泌系を示唆する。予備データもまた、腫瘍1において、腫瘍形成性幹細胞がフリズルド2および6を発現するが、非腫瘍形成性腫瘍性細胞はフリズルド2および7を発現することを示唆する。フリズルド遺伝子の示差的発現が癌細胞の運命決定において役割を果たすことは、可能性はある。他の可能性は、これらの示差的発現が分化または不死の関数であるが、この腫瘍における細胞運命決定を直接制御しないことである。この実施例は、これらの可能性間を区別するにおいて使用を見出す本発明の系を例証する。

【0408】

腫瘍1腫瘍形成性細胞はフリズルド6を発現し、非腫瘍形成性癌細胞はフリズルド7を発現する。フリズルド6が癌細胞の増殖または自己再生を増強し、かつフリズルド7が阻害することは可能性はある。この可能性を試験するために、インビトロおよびインビボのクローン原性アッセイを行う。腫瘍1腫瘍形成性および非腫瘍形成性癌細胞に、フリズルド6-IRES-GFPまたはフリズルド7-IRES-GFPのいずれかを発現するレンチウイルスベクターを感染させる。レンチウイルスが、アデノウイルスよりむしろ用いられるが、前者ウイルスが高比率の一次細胞に感染して、安定に形質導入することができるが、アデノウイルス形質導入はしばしば一過性であるためである。フリズルド6の発現が癌細胞を自己再生する能力を与えることは考えられる。もしそうならば、フリズルド6-IRES-GFPミニ遺伝子を含むレンチウイルスベクターでの幹細胞および/または非腫瘍形成性細胞の感染は、幹細胞の腫瘍形成性を増強しうる、または以前非腫瘍形成性であった細胞が腫瘍を形成するのを可能にしうる。逆に、フリズルド7の強制的発現は腫瘍形成性を阻害できる。フリズルドウイルスまたは対照ウイルスかのいずれかでの感染後、限界希釈試験を、各遺伝子の強

制的発現が各癌細胞集団の腫瘍を形成する能力を変化させるかどうかを決定するために行う。

【0409】

これらの試験は、本発明者らが、フリズルド6の強制的発現が幹細胞増殖を増加させるかどうか、ならびに/またはフリズルド7の自己再生もしくは発現が腫瘍形成性癌細胞の増殖および/もしくは自己再生を阻害するかどうかを決定するのを可能にする。この可能性を試験するために、本発明者らは、腫瘍形成性 $\text{ESA}^+\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{低}}\text{Lineage}^-$ 癌細胞を単離し、残りの Lineage^- 、非腫瘍形成性癌細胞を各腫瘍からフローサイトメトリーにより単離する。まず、免疫組織化学法が、腫瘍形成性および非腫瘍形成性細胞において活性 β -カテニンの量の違いがあるかどうかを決定するために抗 β -カテニン抗体を用いて行われる。次に、本発明者らは、腫瘍形成性および非腫瘍形成性細胞においてリン酸化(非活性化)および非リン酸化(活性化) β -カテニンの量を測定する(Van Noort et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:17901-5)。

【0410】

次に、インビトロアッセイは、組織培養において腫瘍形成性および非腫瘍形成性癌細胞によるコロニー形成への各遺伝子の影響を測定するように設計される。フローサイトメトリーによる単離後、細胞の各集団に、フリズルド6/GFP、フリズルド7/GRP、または対照GFPウイルスのいずれかの同一MOIを感染させる。100、500、1,000、および5,000細胞の3連培養物を組織培養培地に置く。 GFP^+ コロニーの総数、加えてコロニーの総数、および GFP^+ の数を、3日目、7日目、14日目、21日目、および28日目に数える。21日目の終わりに、本発明者らは、特定のフリズルド遺伝子の発現が自己再生に影響を及ぼすかどうかを決定するために細胞を継代することを試みる。

【0411】

各フリズルド遺伝子の強制的発現の、腫瘍性細胞がNOD/SCIDマウスにおいて腫瘍を形成する能力への影響を測定する。通常には、200個の腫瘍1細胞が腫瘍を形成するのに必要とされる。それゆえに、フリズルド6、フリズルド7、または対照GFPレンチウイルスが、50個、100個、500個、1,000個、5,000個、および10,000個の腫瘍形成性癌細胞または非腫瘍形成性癌細胞に感染させるために用いられる。細胞を免疫不全マウスへ注入する。腫瘍を形成するのに必要とされる細胞の数および腫瘍増殖の速度がモニターされる。腫瘍がサイズが1センチメートルに達した後、それらを切除し、GFPの発現についてフローサイトメトリーにより分析する。GFPウイルスおよびフリズルド/GFPウイルスに感染した細胞のパーセンテージを比較することにより、本発明者らは、感染の効率および後者ウイルスの増殖への影響を推定することができる。これらの試験は3回、繰り返される。

【0412】

予想される結果：腫瘍1において、異なる細胞集団は異なるフリズルドタンパク質を発現し、非腫瘍形成性細胞はWntタンパク質を優先的に発現するように思われる。これは、非腫瘍形成性細胞の特定の集団がWntを通して腫瘍形成を促進することを示唆する。もし β -カテニンシグナル伝達が非腫瘍形成性細胞において下方制御され、腫瘍形成性サブセットにおいて活性であるならば、これは、非腫瘍形成性および腫瘍形成性癌細胞、それぞれにおいて、リン酸化および非リン酸化 β -カテニンの発現パターンの免疫組織化学法により検出される。もし特定のフリズルド/GFPウイルスの影響があるならば、類似したパーセンテージの細胞が各群においてGFPを発現し、腫瘍を形成するのに必要とされる細胞の数に違いはない。もし特定のフリズルドウイルスが腫瘍形成性または増殖を減少または増加させるならば、フリズルド/GFPウイルスに感染した腫瘍は、それぞれ、より少ない、もしくはより多い GFP^+ 細胞を有するだろう、および/または腫瘍を形成するためにより多い、もしくはより少ない細胞を必要とするだろう。

【0413】

必要ならば、ネコ白血病ウイルスのレンチウイルスに基づいたベクター系が用いられる。この後者のベクターは非複製細胞に効率的に形質導入し、結果として、トランスジーンの長期発現を生じる。本発明者らは、遺伝子インシュレータに隣接したtet誘導性dnTCF-I

RES-GFPレンチウイルスまたは対照GFPレンチウイルスを用いて細胞に感染させることができる。腫瘍を採取する1~2日前に、トランスジーンは活性化される。GFP⁺乳癌幹細胞を採取し、NOD/SCIDマウスの乳房へ移植する。本発明者らはマウスにおいてトランスジーンを発現を誘導し続け、本発明者らは腫瘍を形成する細胞の能力についてそれらをモニターすることができる。

【0414】

β-カテニンシグナル伝達経路は、恒常的に活性化されたβ-カテニンの有りおよび無しの癌から単離された癌細胞において異なる

原理：結腸癌と違って、β-カテニンシグナル伝達経路における突然変異は、少数の乳癌細胞のみにおいて検出されている。しかしながら、これらの研究は、APCおよびβ-カテニンにのみ集中している。本発明の系および方法を用いて、本発明者らは、特定の目的1Aにおいて生物学的レベルで分析された腫瘍のそれぞれにおいてβ-カテニン経路を綿密に調べる。

10

【0415】

Wnt経路は異なる腫瘍から単離された癌細胞において異なるか？

これらの実験において、本発明者らは、腫瘍のそれぞれにおいてWnt/β-カテニン経路を特徴付ける。これを行うために、本発明者らは、β-カテニンの恒常的活性化をもつ10個の腫瘍のそれぞれ由来の癌細胞により発現したβ-カテニン、フリズルドタンパク質のそれぞれ、低密度リボタンパク質関連Wnt受容体、APC、TCFファミリーメンバー、Axin、およびBcl-9のコード配列を増幅するためにRT-PCRを用いる。発現した遺伝子のRT-PCR産物は、遺伝子のいずれかに突然変異があるかどうかを決定するためにシーケンシングされる。いかなる可能な突然変異体遺伝子も、独立したRT-PCR試料の繰り返されるシーケンシングにより確認される。もし突然変異が見出されたならば、本発明者らは、突然変異が結果としてWnt/β-カテニン経路の恒常的活性化を生じるかどうかを決定する。これを行うために、突然変異型遺伝子-IRES-GFPは、pCDNA3真核生物発現ベクターへクローニングされる。例えば、もし本発明者らが突然変異体フリズルド2を見出したならば、HEK 293細胞(活性化β-カテニンを有しない; Gazit et al., 1999, Oncogene 18:5959-66)に、突然変異体フリズルド2-IRES-GFP発現ベクターまたは対照IRES-GFPベクターをトランスフェクションする。細胞は、抗β-カテニン-PE抗体で染色され、蛍光顕微鏡法は、突然変異体フリズルド6が、シグナル伝達の活性化を示す、β-カテニンの細胞質/核局在性を引き起こすかどうかを決定するために行われる。このアッセイは、本発明者らが、β-カテニン経路の構成要素の突然変異が結果として、ヒト乳癌幹細胞における異常なシグナル伝達を生じるかどうかを決定するのを可能にする。

20

30

【0416】

予想される結果

恒常的に活性のあるβ-カテニンは、かなりの数の乳癌腫瘍における癌細胞に見られるが、機構は知られていない。これらの研究により検出される異なる腫瘍細胞においてシグナル伝達経路の違いがある。もしWnt受容体またはβ-カテニン修飾因子における突然変異が存在するならば、シーケンシング研究はこの違いを検出する。もし自己分泌刺激が存在するならば、本発明者らは癌細胞によるWntリガンドの一つの発現を見る。

40

【0417】

いくつかの腫瘍における腫瘍細胞の異なる集団によるWnt発現は乳癌細胞増殖を作動させるか？

おそらく癌のいかなる他の型よりももっと、乳癌腫瘍は、腫瘍増殖および浸潤を調節するために悪性細胞と相互作用する、間葉(間質)細胞、炎症細胞、および内皮細胞を含む正常細胞の不均一な集団を含む。目的は、そのような相互作用におけるWnt経路の役割を理解し始めることである。本発明者らは、間葉細胞および内皮細胞を含む正常な基質成分が腫瘍細胞増殖および浸潤に影響を及ぼす異なるWntを産生することを予想する。異種移植片腫瘍は浸潤している正常なマウス間質細胞を有することが予想され、マウス細胞の分析は複雑すぎると思われるため、継代されていない腫瘍だけが分析される。フローサイトメ

50

トリーによるこれらの細胞の精製は、最初に細胞を組織培養に置くことなく、これらの細胞の分子分析および生物学的分析の両方を可能にする。正常細胞はインビトロで培養された場合、遺伝子の発現を変化させることが知られているため、これは特に重要である。

【0418】

正常な間質細胞は、乳癌細胞の増殖において役割を果たすと考えられる。癌細胞間の細胞-細胞相互作用は腫瘍増殖に寄与することもまた可能性が高い。Wntシグナル伝達は、正常な組織細胞がお互いに通信するために用いる主要な経路の一つである。それゆえに、どのようにして、この経路が腫瘍において制御されるのかを理解することは重要である。特定のWntタンパク質は、特定のフリズルド受容体を活性化できる。 β -カテニンを通してシグナル伝達するフリズルド受容体もあれば、異なる経路を通してシグナル伝達するものもある。どのようにして、腫瘍内の腫瘍細胞の様々な集団がこの経路を通して腫瘍形成性乳癌細胞と通信できるのかを理解するために、本発明者らは、まず、どのフリズルドおよびWnt遺伝子が複数の患者の腫瘍由来の正常細胞および癌細胞によって発現しているかを決定しなければならない。それゆえに、本発明者らは、正常細胞、および恒常的 β -カテニンシグナル伝達を有する5人の患者の腫瘍試料から単離された癌細胞、およびこのタンパク質の恒常的活性化を有しない5人の患者の腫瘍由来の癌細胞の各集団によって発現しているWnt経路遺伝子を同定する。

【0419】

本発明者らの証拠は、癌細胞の異なる集団においてWntおよびフリズルド遺伝子の発現に違いがあることを示唆しているため、これらの試験を行うために癌において細胞の異なる表現型サブセットを単離することが重要である。これは、細胞の明らかに腫瘍形成性集団が少数集団であり、これらの細胞が発現する遺伝子がそうしないと、分析において見逃される可能性があるためである。それゆえに、フローサイトメトリーが、患者の本来の腫瘍から腫瘍形成性および非腫瘍形成性乳癌細胞、加えて正常な内皮細胞および線維芽細胞を単離するために用いられる。これは、予備段階の結果および目的1において記載されているように行われる。RNAは、細胞の各集団の35,000個のプールから単離され、その後、マイクロアレイ分析のための十分なプローブを作製するために線形増幅が行われる(Ram alho-Santos et al., 2002, Science 298:597-600; Ivanova et al., 2002, Science 107:3823; Terskikh et al., 2002, Blood 99:488-98; Akashi et al., 2003, Blood 101:383-9)。どのフリズルドおよびWnt遺伝子が、各腫瘍に見出された細胞の各集団によって発現しているかを決定するために、本発明者らは、Wntおよびフリズルド遺伝子を含むAffymetrixマイクロアレイチップ(各細胞型について3つのチップ)を探索する(新たに発表されたU133はこれらの遺伝子の大部分を有する)。結果は、癌細胞における活性化 β -カテニンの有りおよび無しの原発腫瘍から単離された癌細胞の異なる集団の定量的RT-PCRにより確認される。リアルタイムRT-PCRが、正常および腫瘍性腫瘍細胞の異なる集団によるフリズルドおよびWnt遺伝子のそれぞれの発現レベルを測定するために行われる。これを行うために、本発明者らはこれらの遺伝子のそれぞれの検出のためのPCRプライマーを作製する。プライマーの各セットは、RT-PCRが腫瘍細胞の異なる集団においてmRNAの発現を検出するために用いられうるように、少なくとも1つのエクソンに及ぶ。フローサイトメトリーは、腫瘍のそれぞれにおいて同定された細胞の腫瘍形成性集団を単離するために用いられる。リアルタイムPCRは、その後、マイクロアレイ分析で同定された各それぞれの細胞集団によるWnt経路関連RNAのそれぞれの発現を測定するために用いられる(Bustin, 2000, J. Mol. Endocrinol. 25:169-93に概説されている)。リアルタイムPCR遺伝子発現分析を行うために、mRNAは 3×10^4 細胞(フローサイトメトリーにより単離された)から精製される。RNAの一部は、Ribogreen RNA定量的方法(Molecular Probes, Eugene, OR)によりRNA量を直接測定するために用いられ、一部はTaqmanリアルタイムRT-PCRアッセイによってrRNAおよびGAPDH発現(対照ハウスキーピング遺伝子)を測定するために用いられる。総合すれば、これらの対照測定は、本発明者らが、細胞の異なる集団間で対象となる遺伝子の発現を標準化するのを可能にする(Bustin, 2000, J. Mol. Endocrinol. 25:169-93)。より少ない細胞がこのアッセイに用いられうるが、 3×10^4 細胞から単離されたRNAの分析が、遺伝子発

現のより正確な測定を生じるはずである。

【0420】

各腫瘍由来の癌細胞の異なる集団によって発現した各フリズルド受容体は、腫瘍内の細胞の異なる集団によって発現している異なるWnt遺伝子のそれぞれにより刺激された場合、 β -カテニンを活性化し、細胞を癌化する能力について分析される。2つの生物学的系がこれらの研究のために用いられる。まず、本発明者らは、腫瘍形成性細胞によって発現したフリズルドタンパク質を通して β -カテニンを活性化する同定されたWntの能力を試験するために、このスクリーニングで同定された各個々のフリズルドをトランスフェクションされたHEK 293細胞を用いる。次に、本発明者らは、特定のWntまたはフリズルド遺伝子が細胞系を癌化することができるかどうかを決定するために乳房上皮細胞を用いる。

10

【0421】

乳癌細胞によって発現した異なるWntおよびフリズルドタンパク質の生化学的機能を測定するために、本発明者らは、Gazit et al., 1999, Oncogene 18:5959-66により記載されているように一過性トランスフェクションアッセイを用いる。このアッセイにおいて、HEK 293T細胞に、フリズルドミニ遺伝子または対照ミニ遺伝子、およびTCF-ルシフェラーゼまたは対照レポーターミニ遺伝子を一過性にトランスフェクションする。特定のWntタンパク質の β -カテニンシグナル伝達を刺激する能力を試験するために、HEK 293Tの第二群に、腫瘍細胞の様々な集団によって発現したWnt遺伝子のそれぞれをトランスフェクションする。腫瘍細胞の様々な集団の1つによって発現した特定のWntタンパク質により刺激された場合、乳癌幹細胞によって発現した特定のフリズルド受容体の傍分泌活性化が β -

20

【0422】

C57MG細胞系は、特定のWntによる特定のフリズルド受容体の活性化が形態学的癌化を引き起こすかどうかを決定するために用いられる(Wong et al., 1994, Mol. Cell Biol. 14:6278-86)。これらの細胞は、Wnt-1、Wnt-2、Wnt-3A、Wnt-6、およびWnt-7Aに曝された場合、形態学的癌化を起こすが、Wnt-4、Wnt-5A、Wnt-5B、およびWnt-7Bに曝された場合、起こさない。これらのデータは、癌化しないWntは、癌化するWntとは異なってシグナル伝達をすること、またはそれらはC57MG細胞によって発現していない異なる受容体を通してシグナル伝達をすることを示唆する。それゆえに、患者の腫瘍における癌細胞によって発現した異なるフリズルドおよびWntタンパク質の機能を完全に特徴付けるために、本発明者らは、まず、どのフリズルド遺伝子がC57MG細胞によって発現しているかを決定しなければならない。細胞に、腫瘍形成性乳癌細胞によって発現するが、C57MG細胞によって発現しない任意のフリズルド遺伝子を発現するミニ遺伝子をトランスフェクションする。次に、細胞を、腫瘍細胞の異なる集団によって発現した個々のWnt遺伝子をトランスフェクションされた、致死的な放射線を浴びた線維芽細胞またはHEK 293T細胞の存在下で培養する。細胞は、Shimizu et al., 1997, Cell Growth Diff. 8:1349-58により記載されているように形態学的癌化について分析される。

30

【0423】

次に、本発明者らは、異なる患者の腫瘍由来の癌細胞の、腫瘍細胞により生成された異なるWntに対するインビボでの応答を特徴付ける。Wntタンパク質はしばしば、細胞外マトリックスに見出され、可溶型で調製することは困難である。それゆえに、本発明者らは、2人の患者の腫瘍に存在する腫瘍細胞の様々な型により生成されるWntのそれぞれを発現する対照HEK 293細胞系を作製する。これを行うために、本発明者らは、まず、HEK 293細胞を、それらがWntタンパク質のいずれかを恒常的に生成するかどうかを決定するために分析する。次に、本発明者らは、患者の腫瘍細胞により生成されたWntのそれぞれをHEK 293細胞に安定にトランスフェクションする。インビボで乳癌細胞におけるWnt刺激のそのリガンドのそれぞれによる影響を測定するために、0個、10個、50個、100個、200個、500個、および1,000個の腫瘍1幹細胞を、500,000個の致死的な放射線を浴びた対照293細胞、または1つもしくは複数の関連したWntミニ遺伝子をトランスフェクションされた293細胞と

40

50

混合し、その後、免疫不全マウスへ注入する。各注入は5匹のマウスにおいて行われる。マウスは、その後、腫瘍形成について毎週、モニターされる。もし特定のWntが自己再生中の細胞分裂を刺激するならば、腫瘍を発生するのにより少ない細胞が必要とされるか、および/または腫瘍はより迅速に形成するかである。逆に、もしリガンドが分化への傾倒を誘導するならば、腫瘍を形成するのにより多くの細胞が必要とされる、および/または腫瘍は形成するのにより長い時間がかかる。

【0424】

予想される結果

腫瘍における癌細胞の正常間質細胞との相互作用は、腫瘍形成および転移にとって重大な意味をもつと考えられる(Hanahan & Weinberg, 2000, Cell 100:57-70)。Wnt経路は、正常組織における細胞が情報交換する中心的経路の一つである(Cadigan & Nusse, 1997, Genes & Dev. 11:3286-305)。それゆえに、そのような情報交換は腫瘍においてある程度まで維持されることは可能性が高い。この提案に記載されたモデルは、初めて、そのような研究が患者の腫瘍細胞を用いて行われるのを可能にする。もし間質細胞が実際に、腫瘍増殖をWntシグナル伝達を通して促進するならば、間質細胞の様々な集団は、腫瘍形成性癌細胞に増殖性シグナルを与える特定のWntを生成する。

【0425】

これらの問題を最小にするために、すべての試験は異なる数の細胞で3連で行われる。既知量の対照RNAの発現は、データを解析するための標準曲線を作図するために用いられる(Bustin, 2002, J. Mol. Endocrinol. 25:169-193に概説されている)。必要ならば、新しいPCRプライマーを作製する、またはRTを、mRNAの異なる部分を認識する遺伝子特異的プライマーで行う(オリゴdTプライマーは最初にRT反応のために用いられる)。

【0426】

要約：

本発明の系および方法を用いるこれらの試験は、 β -カテニン経路が複数の患者の腫瘍から直接得られた乳癌細胞の腫瘍形成性集団においてインビボで活性化される分子機構、および新規な乳癌細胞におけるこの活性化の生物学的結果の包括的詳細のための手段を提供する。

【0427】

実施例3

腫瘍形成性細胞における β -カテニンの局在性

正常造血細胞において、核 β -カテニンは、幹細胞区画においてのみ見出される。Reya et al.はさらに、 β -カテニンシグナル伝達が正常幹細胞が自己再生するのに必要であることを実証している。腫瘍形成性および非腫瘍形成性腫瘍1乳癌細胞における β -カテニンの細胞下局在性の最近完成された分析はさらにこの概念を支持する。通常には、 β -カテニンの細胞下分布は癌細胞において不均一である。そのタンパク質が主として外膜に位置している細胞もあれば、主として核に位置しているものもある。そのタンパク質の細胞下分布は、腫瘍形成性および非腫瘍形成性癌細胞によって異なる。 β -カテニンは、主として非腫瘍形成性癌細胞の細胞質に位置しており、一方、それは主として腫瘍形成性細胞の核にある(図8)。Wntシグナルによる活性化で、 β -カテニンは、下流標的遺伝子を活性化するために細胞膜から核へ転位置するため、このデータは、Wntシグナル伝達が乳癌幹細胞の自己再生に役割を果たすという仮説を支持する。

【0428】

図8は、 β -カテニンの細胞下局在性を示す。FITC標識抗 β -カテニン抗体は、恒常的に活性化された β -カテニンを有する(A)結腸癌細胞、(B)非腫瘍形成性T1乳癌細胞、および(C)腫瘍形成性乳癌細胞を染色するために用いられた。腫瘍形成性および非腫瘍形成性癌細胞は、Al-Hajj et al.によるPNAS論文に記載されているようにフローサイトメトリーにより単離された。 β -カテニンは主として、結腸癌細胞および乳癌幹細胞の核に位置しているが、それは主として、非腫瘍形成性細胞の表面上に位置していることに注目されたい。

【0429】

10

20

30

40

50

乳癌における β -カテニンシグナル伝達の生物学的結果を理解し始めるために、本発明者らは、いくつかの細胞系において本発明者らのドミナントネガティブなTCF-4(dTCF4)アデノウイルスベクターを試験している。このアデノウイルスは β -カテニンシグナル伝達を阻害するように働く。2つの異なる乳癌細胞系、SKBR3およびMCF7、および胃腸管癌細胞系、RKO、にdTCF4アデノウイルスまたは対照アデノウイルス(空のベクター)を感染させた。感染から4日後、各群における生存可能な細胞の数を測定した。図9に示されているように、dTCF4アデノウイルスに感染した乳癌細胞は死んだが、対照アデノウイルスは死ななかった。これらのデータは、Wnt経路がヒト乳癌において役割を果たすことを示している。

【0430】

図9は、癌細胞における β -カテニンシグナル伝達の阻害を示す。SKBR3細胞(A)、MCF7細胞(B)、およびRKO細胞(C)の3連の培養物に、対照アデノウイルス(空のベクター)かまたはドミナントネガティブなTCF4ミニ遺伝子(dTCF4)を発現するアデノウイルスベクターを感染させた。ウイルス濃度の増加に伴って、SKBR3細胞およびMCF7細胞は生存能力を失ったが、RKO細胞は失わなかった。結果として細胞死を生じるウイルス力価は、対照GFPウイルスを標的細胞の大部分に効率的に感染させるのに必要とされるものであったことに注目されたい(データ非呈示)。この実験は同じ結果を以て繰り返されている。

【0431】

β -カテニンシグナル伝達の阻害が一部の乳癌細胞系の生存能力に影響を及ぼすという観察と考え合わせた β -カテニンは主として腫瘍形成性癌細胞において核に位置しているが、非腫瘍形成性癌細胞においてはそうではないという観察は、正常幹細胞のように、Wntシグナルは癌幹細胞の自己再生に役割を果たすことができることを示している。

【0432】

実施例4

幹細胞癌マーカーの同定

この実施例は、どのようにして、様々な幹細胞癌マーカーがマイクロアレイスクリーニングを用いて同定されたかを記載する。これらのスクリーニングの結果は処理され、示差的に発現した遺伝子の名前は表4~9に報告されている(上記参照)。

【0433】

遺伝子発現プロファイルを作成するために、ヒト乳房腫瘍形成性細胞を最初に単離した。一連の試料は、ヒト乳房腫瘍または正常組織から蓄積された。これらは以下のとおり作製された。3つの継代された乳房腫瘍---患者1、2、3由来の乳房腫瘍細胞をマウスに移植した。各腫瘍は3連の腫瘍を生成するように3匹のマウスに移植された。乳房腫瘍形成性細胞を、その後、これらの腫瘍から単離された。3人の患者由来の2つまたは3つの非継代乳房腫瘍、SUM、PE13、PE15、を標識し、腫瘍形成性細胞(TG)または非腫瘍形成性細胞(NTG)へ選別した。PE15-TGおよびPE15-NTGの両方は3連であった。2つまたは3つの正常乳房試料は乳房縮小患者由来であった。乳房上皮細胞(乳房)をフローサイトメトリーで単離し、マイクロアレイに用いた。2つまたは3つの正常結腸試料は、結腸患者から新鮮に収集された。結腸上皮細胞(結腸)をフローサイトメトリーで単離し、マイクロアレイに用いた。2つまたは3つの正常幹細胞試料(正常骨髄)は骨髄ドナーから収集された。造血幹細胞(HSC)はフローサイトメトリーで単離された。プローブは、マイクロアレイ分析に用いる様々な細胞型から作製された以下のものから作製された。

【0434】

様々なマイクロアレイスクリーニングを行うために、Affymetrix HG-U133遺伝子チップを用いた。標準化遺伝子発現強度は、いくつかの大きな表に収集されるデータを作成するために用いられた。これらの表における結果は処理され、示差的に発現することが見出された遺伝子の名前を提示する表4、5、6、7a、7b、7c、7d、および8を作成するために用いられた。表4~6について、候補癌マーカーは、発現が、非腫瘍形成性細胞または正常幹細胞(HSC)と比較して非継代乳房腫瘍形成性細胞において1.5倍より多い、または1/1.5より少ない遺伝子を同定することにより選別された。表6は、UPNTGに対するUPTGにおいて下方

制御されることが見出されたそれらの遺伝子のみを示す。表5は、HSCに対するUPTGにおいて上方制御されることが見出された遺伝子のみを示す。表4は、UPNTGに対するUPTGにおいて上方制御されることが見出されたもののみを示す。表7a、7b、7c、および7dについて、癌マーカーは、標準t検定によりより大きな表から作成された。これらの表は、Tスコアが<0.01であり、かつ比率が2倍より多いことに基づいて選別された。表7aは、HSCに対するUPTGにおいて上方制御されることが見出されたそれらの遺伝子のみを示す。表7bは、HSCに対するUPTGにおいて下方制御されることが見出されたそれらの遺伝子のみを示す。表7cは、HSCに対するPTGにおいて上方制御されることが見出されたそれらの遺伝子のみを示す。表7dは、HSCに対するPTGにおいて下方制御されることが見出されたそれらの遺伝子のみを示す。

10

【0435】

実施例5

シグネチャー1およびシグネチャー2癌幹細胞マーカーに基づいた癌幹細胞の単離ならびに濃縮

この実施例は、本発明により同定されたシグネチャー1およびシグネチャー2癌幹細胞マーカーの示差的発現に基づいて固形腫瘍由来の腫瘍形成性癌幹細胞について単離および濃縮するための方法を記載する。単離されたシグネチャー1およびシグネチャー2癌幹細胞を用いて追加の癌幹細胞マーカーを同定する方法もまた提供される。

【0436】

患者試料由来または異種移植モデルで継代された固形腫瘍由来の腫瘍細胞を、無菌条件下で取り出す。組織試料を小片へ切断し、その後、滅菌刃を用いて完全に切り刻む。単細胞懸濁液は、その後、酵素消化および機械的破壊により得られる。具体的には、胸水細胞または切り刻まれた腫瘍片を、培地中の超高純度コラゲナーゼIII(1mLあたり200~250ユニットのコラゲナーゼ)と混合し、15~20分間ごとに10-mLピペットを通して上下にピペティングして、3~4時間、37°Cでインキュベートする。消化された細胞を、45ulナイロンメッシュを通して濾過し、RPMI/20%FBSで洗浄し、HBSSで2回、洗浄する。

20

【0437】

単細胞腫瘍懸濁液は、細胞表面マーカーに基づいて腫瘍形成性細胞および非腫瘍形成性細胞へ選別される。細胞を数え、2%加熱不活性化細胞仔ウシ血清(HICS)を含むHBSSで2回洗浄し、100ulあたり 10^6 細胞で再懸濁する。抗体を加え、細胞を、氷上で20分間、抗体とインキュベートし、続いて、HBSS/2%HICSで2回洗浄する。抗体は、抗ESA(Biomed, Foster City, CA)、抗CD44、抗CD24、ならびにLineageマーカー抗CD2、抗CD3、抗CD10、抗CD16、抗CD18、抗CD31、抗CD64、および抗CD140b(Linと集合的に呼ばれる; PharMingen, San Jose, CA)を含む。抗体は、これらのマーカーを発現する細胞をポジティブにまたはネガティブに選択するために蛍光色素へ直接結合される。異種移植片から収集された組織において、マウス細胞は、H2Kd+細胞に反対して選択することにより排除される。死細胞は、生死判別色素7AADを用いることにより排除される。フローサイトメトリーは、FACSVantage(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)上で行われる。側方散乱および前方散乱プロファイルは細胞集塊を排除するために用いられる。

30

【0438】

いくつかの態様において、癌幹細胞は、 α -カテニン遺伝子発現シグネチャーにより同定された膜貫通タンパク質のそれらの発現レベルに基づいて単離および濃縮される。抗体は、標準技術を用いてc-Met、EDG2、およびDCBLD2を含む α -カテニンシグネチャーにおいて増加した遺伝子発現を示す膜貫通タンパク質の細胞外ドメインに対して産生され、産生された抗体は、その後、精製され、蛍光色素で直接標識される。固形腫瘍細胞は解離され、上記のようなESA、CD44、CD24、Lineageマーカー、c-Met、EDG2、およびDCBLD2に対する標識抗体とインキュベートされる。フローサイトメトリーは、その後、高レベルのESA、CD44、c-Met、EDG2、およびDCBLD2を発現する細胞について選択し、かつCD24およびLineageマーカーを発現する細胞に反対して選択するために用いられる。または、ESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、およびLin⁻細胞が上記のようにまず単離され、癌幹細胞のこの集団(Al-Haj

40

50

j et al., 2003)が、c-Met、EDG2、およびDCBLD2に対する標識抗体とインキュベートされ、続いて、高レベルのc-Met、EDG2、およびDCBLD2を発現する細胞をポジティブに選択するようにフローサイトメトリーに供される。このように、ESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、Lin⁻、c-Met⁺、EDG2⁺、およびDCBLD2⁺シグネチャー1型癌幹細胞について濃縮された腫瘍細胞集団が得られる。

【0439】

α-カテニン遺伝子発現シグネチャーに基づいて単離された細胞の腫瘍形成性は、その後測定される。5,000個、1,000個、500個、および100個の単離されたESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、Lin⁻、c-Met⁺、EDG2⁺、およびDCBLD2⁺癌幹細胞対同数のESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、およびLin⁻癌幹細胞または選別されていない解離腫瘍細胞が、NOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入される。細胞注入の5日前に、マウスは、腹腔内注射による30mg/kg VP-16およびエストロゲンペレットの皮下への配置での処理により調製される。マウスにおける一貫した腫瘍形成に必要とされる注入細胞の数が、シグネチャー1癌幹細胞を単離することに基づいた、非腫瘍形成性細胞に対する腫瘍形成性細胞についての倍濃縮を決定するために用いられる。

【0440】

もう一つの態様において、癌幹細胞は、E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーにより同定された膜貫通タンパク質の示差的発現に基づいて単離および濃縮される。抗体は、標準技術を用いてIL1R2およびE-カドヘリンを含むE-カドヘリン遺伝子シグネチャーにおいて減少した遺伝子発現を示す膜貫通タンパク質の細胞外ドメインに対して産生され、いったん産生されたならば、抗体は、精製され、蛍光色素で直接標識される。固形腫瘍細胞は解離され、上記のようなESA、CD44、CD24、Lineageマーカー、IL1R2、およびE-カドヘリンに対する標識抗体とインキュベートされる。フローサイトメトリーは、その後、高レベルのESAおよびCD44を発現する細胞について選択し、かつE-カドヘリン、IL1R2、CD24、およびLineageマーカーを発現する細胞に反対して選択するために用いられる。

【0441】

または、ESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、およびLin⁻細胞が上記のようにまず単離され、癌幹細胞のこの集団(Al-Hajj et al., 2003)が、E-カドヘリンおよびIL1R2に対する標識抗体とインキュベートされ、続いて、高レベルのE-カドヘリンおよびIL1R2を発現する細胞に反対して選択するようにフローサイトメトリーに供される。このように、ESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、Lin⁻、IL1R2⁻、およびE-カドヘリン⁻のシグネチャー2型癌幹細胞について濃縮された腫瘍細胞集団が得られる。

【0442】

E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーに基づいて単離された細胞の腫瘍形成性は、その後測定される。5,000個、1,000個、500個、および100個の単離されたESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、Lin⁻、IL1R2⁻、およびE-カドヘリン⁻の癌幹細胞対同数のESA⁺、CD44⁺、CD24⁻/低、およびLin⁻の癌幹細胞または選別されていない解離腫瘍細胞が、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入される。マウスにおける一貫した腫瘍形成に必要とされる注入細胞の数が、シグネチャー2遺伝子発現で癌幹細胞を単離することに基づいた、非腫瘍形成性細胞に対する腫瘍形成性細胞についての倍濃縮を決定するために用いられる。

【0443】

α-カテニン遺伝子発現シグネチャーにより同定されたα-カテニンを含む細胞質タンパク質に基づいて単離および濃縮された癌幹細胞もまた構想される。α-カテニンに対する抗体が産生され、精製され、蛍光色素で直接標識される。固形腫瘍細胞は上記のように解離され、4%パラホルムアルデヒドに固定され、0.5%Triton-X-100界面活性剤で透過処理される。透過処理された腫瘍細胞は、ESA、CD44、CD24、Lineageマーカー、およびα-カテニンに対する標識抗体とインキュベートされ、フローサイトメトリーは、その後、高レベルのESAおよびCD44を発現する細胞について選択し、かつα-カテニン、CD24、およびLineageマーカーを発現する細胞に反対して選択するために用いられる。または、ESA⁺、CD44⁺

、CD24-/低、およびLin-細胞が上記のようにまず単離され、その後、4%パラホルムアルデヒドに固定され、0.5%Triton-X-100界面活性剤で透過処理される。透過処理された細胞は、 α -カテニンに対する標識抗体とインキュベートされ、フローサイトメトリーは、高レベルの α -カテニンを発現する細胞に反対して選択するために用いられる。このように、ESA+、CD44+、CD24-/低、Lin-、および α -カテニン-/低のシグネチャー1型癌幹細胞について濃縮された腫瘍細胞集団が得られる。

【0444】

癌幹細胞の追加のマーカーを同定するために、 α -カテニンまたはE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーをもつ癌幹細胞の単離された集団は、お互いと、非腫瘍形成性固形腫瘍細胞と、および正常乳房上皮とマイクロアレイ分析を用いて比較される。非腫瘍形成性固形腫瘍細胞および正常乳房上皮は、実施例4に記載されているように、フローサイトメトリーにより単離される。シグネチャー1または2遺伝子発現のいずれかをもつ癌幹細胞は、上記のように、フローサイトメトリーにより単離される。各集団は、マイクロアレイ分析が3連で行われうるように3回、独立して単離される。

【0445】

全RNAは、RNasy(Qiagen, Valencia, CA)を用いて製造会社のプロトコールに従って異なる細胞集団から単離される。マイクロアレイ分析のためのプローブはその後、Affymetrixプロトコール(Affymetrix, Santa Clara, CA)に従って調製される。Affymetrix HG-U133遺伝子チップは、比較されることになっている2つの単離された細胞集団を表すCy3対Cy5標識プローブセットとハイブリダイズされ、標準Affymetrixプロトコールに従って洗浄される。アレイは、アルゴンイオンレーザー共焦点顕微鏡でスキャンされ、アレイ上に設定された各プローブについての強度は、Affymetrix手順に従って、Affymetrix Microarray Suite 4.0ソフトウェアで評価される。

【0446】

実施例6

癌幹細胞の挙動に影響を及ぼす小分子についてのスクリーニング

この実施例は、癌幹細胞増殖を阻害するものを同定するように作用物質をスクリーニングするための方法を記載する。ESA+、CD44+、CD24-/低、Lin-癌幹細胞は、本明細書に記載されているように、患者腫瘍試料から、または免疫不全マウスを通して継代された腫瘍から、単離される。単離された癌幹細胞は、遠心分離により収集され、Ham's F12、2%ウシ胎児血清、およびB27サプリメントの混合物を含む定義済み培地に再懸濁し、その後、癌幹細胞の増殖を可能にする条件下で浮遊状態で培養される。等しい数の細胞が、透明底マイクロタイタープレートにおけるウェルごとに蒔かれる。これらのプレートはアッセイプレートと呼ばれる。化学ライブラリー由来の作用物質は、マイクロタイター希釈プレートにおいて培地に希釈され、その後、3連でアッセイプレートへ加えられる。作用物質が添加されないウェル、およびアニソマイシン、タンパク質合成阻害剤、が添加されるウェルは、それぞれ、正常な増殖および増殖無しについての対照として各アッセイプレートに含まれる。アッセイプレートは、7日間、14日間、および21日間、試験作用物質とインキュベートされる。これらの日数において、ウェルあたりのコロニーの数が光学顕微鏡により測定される。

【0447】

実施例7

癌幹細胞増殖および自己再生を阻害するためのシグネチャー1癌幹細胞マーカーc-Metのターゲティング

この実施例は、本発明の遺伝子発現プロファイルにより同定された癌幹細胞マーカーの発現に基づいて腫瘍をターゲットするための方法、およびこのターゲティングの影響をアッセイするための方法を記載する。本発明の遺伝子発現シグネチャー1は、正常乳房上皮と比較してシグネチャー1型癌幹細胞における増加したc-Met発現を同定する(図11)。c-Metは、異常な活性化が腫瘍形成性および転移に結びつけられている受容体チロシンキナーゼである。癌幹細胞によって発現したc-Metを不活性化する方法は、それらの増殖および/

または自己再生性質を低下させ、それによって、固形腫瘍増殖を阻害することができる。または、高レベルのc-Metを発現する癌幹細胞を排除することは、腫瘍増殖を低下させ、かつ腫瘍再発および/または転移のリスクを低下させることができる。

【0448】

腫瘍、具体的には、増加したレベルのc-Metを発現する癌幹細胞を含む腫瘍をターゲットするために、c-Metの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体が作製される。F1ハイブリッドマウスを、精製された組換え細胞外c-Metタンパク質を用いて免疫し、免疫タンパク質を特異的に認識する循環抗体をもつマウス由来の脾臓を、ハイブリドーマ作製に用いられる。ハイブリドーマを再び、c-Metタンパク質を特異的に認識する抗体についてスクリーニングする。

10

【0449】

c-Metに対して産生された抗体は、細胞増殖についてのアッセイを用いて、c-Metに対するアンタゴニスト対アゴニスト活性について評価される。c-Metを発現するヒト肺筋線維芽細胞系(MRC5)を、10%ウシ胎児血清(FCS)、100U/mlペニシリン、および100ug/mlストレプトマイシンを含むダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)で培養する。細胞を、96ウェル組織培養マイクロプレートにおいてウェルあたり 10^4 細胞の密度で蒔き、24時間、広がるようにさせておく。その後、細胞を、2%FCSを含む新鮮なDMEMでもう12時間、培養し、その時点で、抗c-Met抗体対対照抗体を、c-Metリガンド、HGF/SF、および10umol/L BrdUの存在下または非存在下における培地へ加える。BrdU標識後、培地を除去し、細胞を、エタノール中、室温で30分間、固定し、ペルオキシダーゼ結合モノクローナル抗BrdU抗体(クローンBMG 6H8、Fab断片)と90分間、反応させる。基質を、テトラメチルベンジジンを含む溶液において発色させ、1mol/L H_2SO_4 の25ulで15分後、停止する。色反応は、450nmフィルターを用いる自動ELISAプレートリーダー(UV Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)で測定される。すべての実験は3連で行われる。対照抗体のみとインキュベートされた細胞は、細胞増殖のベースラインレベルについての対照としての役割を果たす。HGF/SFとの細胞のインキュベーションは、c-Met活性化後の細胞増殖についての陽性対照としての役割を果たす。HGF/SFの非存在下において細胞増殖を増加させるようにアゴニストとして働く抗c-Met抗体は、さらに研究されない。細胞増殖のHGF/SF媒介性刺激をブロックするアンタゴニスト抗c-Met抗体、およびc-Metを活性化することができない抗体は、下記のように、癌幹細胞をターゲットするために用いられる。

20

30

【0450】

いくつかの態様において、c-Met抗体の癌幹細胞増殖への効果は培養液中において測定される。患者組織試料由来(固形腫瘍生検、胸水など)、または異種移植マウスモデルにおいて継代された腫瘍由来の腫瘍細胞を、上の実施例5に記載されているように、無菌条件下で取り出して、解離させ、c-Metを過剰発現するシグネチャー1癌幹細胞をフローサイトメトリーにより単離する。加えて、シグネチャー2癌幹細胞および非選別腫瘍細胞もまた比較のために含まれる。選別された癌幹細胞を遠心分離により収集し、腫瘍細胞の増殖を可能にする条件下で、ハムのF12、2%ウシ胎児血清、およびB27サプリメントの混合物を含む定義済み培地に再懸濁する。腫瘍形成性細胞から特異的にコロニー増殖を可能にするように浮遊状態で14日間、腫瘍細胞を培養し(USSN 09/920,517)、その後、腫瘍幹細胞コロニーを遠心分離により収集し、続いて、実施例5に記載されているように、酵素消化および機械的破壊を37°Cで1時間、行うことによりコロニーを継代する。解離細胞を再懸濁し、アンタゴニスト抗c-Met抗体、非アゴニスト抗c-Met抗体、c-Metブロッキングペプチドとプレインキュベートされた抗体、または対照抗体を含む新鮮な培地で等しい数を培養する。継代された非腫瘍形成性細胞は、2~4細胞からなる小さなコロニーを形成することができるだけであるが、腫瘍形成性癌幹細胞は増殖し続け、異なる抗c-Met抗体の効果は、光学顕微鏡によりコロニー増殖の数およびサイズを評価することにより測定される。

40

【0451】

第二態様において、c-Metに対する抗体の腫瘍への、および特に、癌幹細胞増殖への効果は、異種移植片モデルにおいて評価される。患者組織試料由来(固形腫瘍生検、胸水な

50

ど)、または異種移植マウスモデルにおいて継代された腫瘍由来の腫瘍細胞を、上の実施例5に記載されているように、無菌条件下で取り出して、解離させ、c-Metを過剰発現するシグネチャー1癌幹細胞をフローサイトメトリーにより単離する。加えて、シグネチャー2癌幹細胞および非選別腫瘍細胞もまた比較のために含まれる。3連セットにおいて、5,000個、2,500個、1,000個、および200個の選別された癌幹細胞を、アンタゴニスト抗c-Met抗体、非アゴニスト抗c-Met抗体、c-Metブロッキングペプチドとプレインキュベートされた抗c-Met抗体、または対照抗体と37℃で1時間、抗体結合が可能になるようにインキュベートし、その後、NOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。細胞注入の5日前に、マウスは、腹腔内注射による30mg/kg VP-16およびエストロゲンペレットの皮下への配置での処理により調製される。注入の後、注入された腫瘍細胞の腫瘍を形成する能力、腫瘍形成に必要とされる時間の長さ、および腫瘍のサイズが評価される。 10

【0452】

他の態様において、抗c-Met抗体の癌幹細胞自己再生への効果が調べられる。上記のように、浮遊培養下で増殖させ、アンタゴニスト抗c-Met抗体、非アゴニスト抗c-Met抗体、ブロッキングペプチドとプレインキュベートされた抗体、または対照抗体のいずれかで処理された癌幹細胞コロニーを二度目、継代する。解離細胞を、その後、抗体の非存在下で新鮮な培地において培養し、c-Met抗体の存在下における、存在する癌幹細胞の数、およびそれによって、癌幹細胞の自己再生を表す、増殖するコロニーの数が測定される。または、50,000個から下へ5,000個までの範囲である様々な数の解離腫瘍細胞が、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入され、注入された細胞の数について腫瘍形成の頻度率が測定される。 20

【0453】

もう一つの態様において、インビボでのc-Metを過剰発現する癌幹細胞をターゲットすることの腫瘍増殖への効果が測定される。患者組織試料由来（固形腫瘍生検、胸水など）、または異種移植マウスモデルにおいて継代された腫瘍由来の腫瘍細胞を、上の実施例5に記載されているように、無菌条件下で取り出し、単細胞懸濁液として調製し、解離させ、c-Metを過剰発現するシグネチャー1癌幹細胞をフローサイトメトリーにより単離する。加えて、シグネチャー2癌幹細胞および非選別腫瘍細胞もまた比較のために含まれる。3連セットにおいて、5,000個、2,500個、1,000個、および200個の選別された癌幹細胞を、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。腫瘍細胞注入のその日に、または注入された腫瘍細胞が触知可能な腫瘍へ増殖するやいなや、c-Metに対する裸のアンタゴニスト抗体または対照抗体を、腫瘍を有するマウスへ腹腔内に注入する。代替の態様において、抗体は、裸のアンタゴニスト抗体ではなく、ターゲットされた癌幹細胞を殺すための治療用放射性核種ヨウ素-131に結合した非アゴニスト抗c-Met抗体である。注入は、2週間～3週間、週に2回、繰り返され、腫瘍増殖速度およびサイズへの効果が評価される。 30

【0454】

この実施例の態様は、癌幹細胞腫瘍形成性におけるc-Metの役割を調べるための方法を記載する。もしシグネチャー1型癌幹細胞によるc-Metの過剰発現は、それらの腫瘍形成性に寄与するならば、c-Metに対する抗体は腫瘍幹細胞増殖および/または自己再生を阻害するだろう。c-Metをターゲットすることは、細胞増殖を阻害でき、そのため、癌幹細胞はより小さな、培養液中のコロニーまたは異種移植モデルにおける腫瘍を生じる。c-Metをターゲットすることはまた、癌幹細胞自己再生を阻害し、それにより、対照と比較して腫瘍形成の頻度を減少させることができる。さらに、c-Metの過剰発現が腫瘍形成性において果たす役割とは無関係に、ターゲットされたシグネチャー1型癌幹細胞の殺害は、 α -カテニンプロファイルをもつ癌幹細胞が検出される腫瘍に対する治療であることが証明されると予想される。 40

【0455】

実施例8

癌患者を処置するためのシグネチャー1癌幹細胞マーカーc-Metの治療的ターゲティング 50

この実施例は、 α -カテニン遺伝子発現プロファイルが検出されている癌幹細胞を含む腫瘍をターゲットするためにc-Metに対する抗体を用いて癌を処置するための方法を記載する。 α -カテニンシグネチャーに基づいた α -カテニンプロファイルを示す癌幹細胞の存在は、最初、腫瘍生検から決定される。c-Metに対する抗体は、その後、腫瘍がシグネチャー1遺伝子プロファイルを有すると決定された癌患者へ投与される。

【0456】

癌と診断された患者からの生検(固形腫瘍生検または胸水)由来の腫瘍細胞は無菌条件下で取り出される。組織試料を小片へ切断し、その後、滅菌刃を用いて完全に切り刻む。単細胞懸濁液を得るために、細胞を酵素消化および機械的破壊に供す。具体的には、胸水細胞または結果として生じた腫瘍片を、培地中の超高純度コラゲナーゼIII(1mLあたり200～250ユニットのコラゲナーゼ)と混合し、15～20分間ごとに10-mLピペットを通して上下にピペッティングして、3～4時間、37℃でインキュベートする。消化された細胞を、45ulナイロンメッシュを通して濾過し、RPMI/20%FBSで洗浄し、HBSSで2回、洗浄する。解離された腫瘍細胞を、その後、 α -カテニン対E-カドヘリン遺伝子プロファイルを発現する癌幹細胞を検出するために抗体とインキュベートし、 α -カテニンおよび/またはE-カドヘリン遺伝子プロファイルのいずれかを発現する腫瘍幹細胞の存在を、上の実施例5に記載されているように、フローサイトメトリーにより測定する。

【0457】

腫瘍が α -カテニン遺伝子発現プロファイルをもつ癌幹細胞を含むと診断された癌患者は、その後、抗c-Met抗体で処置される。モノクローナル非アゴニスト抗c-Met抗体は上記のように産生され、標準技術を用いてヒト化される。抗体は、精製され、注射用にPBSにおける適した薬学的担体と共に製剤化される。患者は、それらのキメラ型、多量体型、ヘテロマー型、一本鎖型、または断片(Fv、Fab、Fab¹、F(ab¹)₂、または他の抗原結合断片)でありうるのだが、ヒト化抗c-Met抗体で、例えば、少なくとも10週間、週に1回、または少なくとも約14週間、週に1回、処置される。抗体の各投与は、薬学的有効量、例えば、約2mg/ml～約100mg/ml、または約5mg/ml～約40mg/ml、であるべきである。抗体は、オキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコボリン、ストレプトゾシンなどのような1つまたは複数の化学療法剤を用いる標準化学療法計画の前に、化学療法計画と同時に、または化学療法計画の後に、投与されうる。処置された患者は、腫瘍退縮、新しい腫瘍の発生率の低下などについてモニターされる。

【0458】

実施例9

シグネチャー2癌幹細胞における癌幹細胞マーカーIL1R2またはNovの発現の回復

この実施例は、癌幹細胞における下方制御されたタンパク質の発現を回復するための方法、およびタンパク質発現が回復された時の癌幹細胞の挙動への影響をアッセイするための方法を記載する。IL1R2は、正常な乳房上皮と比較してE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーをもつ癌幹細胞において発現の減少を示す、IL-1についての非シグナル伝達性および受容体である(表9；図12)。IL-1は、腫瘍形成性促進性サイトカインの産生を刺激できる強力な炎症促進性サイトカインであり、従って、シグネチャー2型癌幹細胞におけるIL1R2発現を回復することは、腫瘍増殖に対抗するのを助けることができる。

【0459】

いくつかの態様において、癌幹細胞の遺伝子改変は、IL1R2の発現を回復させるために用いられ、遺伝子改変された癌幹細胞は腫瘍形成性について試験される。患者試料由来(固形腫瘍生検、胸水など)、または免疫不全マウスにおいて異種移植片として継代された生検由来の腫瘍細胞を解離し、フローサイトメトリーを用いて、上の実施例5に記載されているように、E-カドヘリン遺伝子シグネチャーを発現する癌幹細胞を単離する。加えて、シグネチャー1癌幹細胞および非選別腫瘍細胞もまた比較のために含まれうる。単離された癌幹細胞を、フローサイトメトリー後に収集し、培地に懸濁する。

【0460】

E-カドヘリン遺伝子シグネチャーに基づいて単離された癌幹細胞は、その後、複製能力

10

20

30

40

50

のないレンチウイルスベクターを用いて遺伝子改変される。適した発現系は、ViraPower(商標)レンチウイルス発現系(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含み、ウイルス粒子は、製造会社のプロトコルに従って作製される。3つの異なるレンチウイルスが、組換えDNAテクノロジーの標準方法を用いて構築される: 1)細胞感染のマーカーとして内部リボソーム侵入部位(IRES)GFPに連結された、組換えIL1R2をコードするレンチウイルスであって、IL-1サイトカインを結合し、不活性化する能力があるIL1R2タンパク質の膜貫通断片かまたは可溶性機能性断片のいずれかが構想される、レンチウイルス(IL1R2-IRES-GFP); 2)IRES GFPに連結された、不活性IL1R2をコードする対照ウイルスであって、コードされたIL1R2が、コードドメインへ導入された欠失、突然変異などのために機能性IL-1結合ドメインを含まない、対照ウイルス(不活性IL1R2-IRES-GFP); および3)GFPのみをコードする対照ウイルス。

10

【0461】

遺伝子改変された癌幹細胞の増殖および自己再生性質は異種移植モデルにおいて測定される。5,000個、1,000個、および200個の単離されたシグネチャー2癌幹細胞の3連セットに、浮遊状態での培地におけるIL1R2-IRES-GFP、不活性IL1R2-IRES-GFP、またはGFPレンチウイルスの等しい感染の多重度(MOI)を感染させる。感染した細胞を、その後、HBSSにおいて洗浄し、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。腫瘍増殖は、異なる遺伝子改変癌幹細胞の増殖能力を評価するためにモニターされる。28日後、マウス由来の異種移植片を、再び単離し、50,000個、25,000個、および5,000個の解離された腫瘍細胞をNOD/SCIDマウスへ再継代する。注入された細胞の数ごとの腫瘍形成の頻度率が、その後、IL1R2-IRES-GFP対不活性IL1R2-IRES-GFPまたはGFPの発現癌幹細胞の自己再生能力を評価するために測定される。

20

【0462】

代替の態様において、E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーをもつ癌幹細胞は、腎芽細胞腫過剰発現遺伝子(Nov)の発現を回復するように遺伝子改変される。Novは、細胞増殖、化学走性、および細胞接着を含む様々な生物学的役割を果たす細胞外マトリックスに結合した分泌性タンパク質である。高レベルのNov発現がより侵襲性の弱い脳腫瘍と関連し、逆に、Novのレベルの減少が副腎皮質腫瘍の悪性状態への進行と関連しているように、Novは細胞周期制御および細胞増殖の減速に関与している。従って、固形腫瘍においてNovタンパク質を回復させることは、それらの増殖を制限するのを助けることができる。

30

【0463】

Nov発現を回復させるために、組換えNovをコードするプラスミドベクターを、シグネチャー2型癌幹細胞へ導入する。CMVプロモーターの制御下でNovを発現するプラスミドベクターが作製される。完全長Novをコードするポリヌクレオチドは、ヒトcDNAライブラリーからPCRにより単離され、トランスフェクションされた細胞にマークを付けるためのIRES GFPの上流のプラスミドベクターpcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA)のマルチクローニング部位へクローニングされる。プラスミドDNAは、陽イオン性脂質と複合体形成し、培地におけるシグネチャー2癌幹細胞をトランスフェクションするために用いられる。GFPのみをコードするプラスミドDNAは対照として用いられる。トランスフェクションされた癌幹細胞を、その後HBSSにおいて洗浄し、GFP発現についてFACsにより選別し、5,000個、1,000個、および200個の細胞の3連セットを、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。腫瘍増殖は、異なる遺伝子改変癌幹細胞の増殖能力を評価するためにモニターされる。28日後、マウス由来の異種移植片を、再び単離し、50,000個、25,000個、および5,000個の解離された腫瘍細胞をNOD/SCIDマウスへ再継代する。注入された細胞の数ごとの腫瘍形成の頻度率が、その後、Nov発現対GFPのみ発現の癌幹細胞の自己再生能力を評価するために測定される。

40

【0464】

これらの方法は、シグネチャー2型癌幹細胞によるIL1R2またはNovの発現の減少がそれらの腫瘍形成性に寄与するかどうかを扱う。IL1R2またはNov発現を回復させることがシグネチャー2癌幹細胞増殖および自己再生を低下させ、それに従って、腫瘍形成性細胞の数

50

の低下したより小さな腫瘍がマウスにおいて増殖するだろうことが構想される。しかしながら、IL1R2およびNovは抗増殖性質を有するため、それらの特定の遺伝子発現プロファイルに関わらず、すべての癌幹細胞においてそれらの発現を増加させることは、腫瘍増殖を阻害するまたは防ぐだろうことはさらに予想される。

【0465】

実施例10

癌患者を処置するためのシグネチャー2癌幹細胞マーカーNovの治療的回復

この実施例は、固形腫瘍においてNovの発現を回復するための遺伝子治療を用いて癌を処置するための方法を記載する。シグネチャー2プロファイルを示す癌幹細胞の存在が、まず、そのような治療に対して最良に応答できる患者を同定するために腫瘍生検から測定される。組換えNovを発現するプラスミドベクターを、その後、腫瘍がシグネチャー2遺伝子プロファイルを発現する癌幹細胞を含む癌患者に投与する。

10

【0466】

癌と診断された患者からの患者試料(固形腫瘍生検または胸水)由来の腫瘍細胞を、無菌条件下で取り出す。組織試料を小片へ切断し、その後、滅菌刃を用いて完全に切り刻む。単細胞懸濁液を得るために、細胞を酵素消化および機械的破壊に供す。胸水細胞または結果として生じた腫瘍片のいずれかを、培地中の超高純度コラゲナーゼIII(1mLあたり200~250ユニットのコラゲナーゼ)と混合し、15~20分間ごとに10-mLピペットを通して上下にピペッティングして、3~4時間、37℃でインキュベートする。消化された細胞を、45ulナイロンメッシュを通して濾過し、RPMI/20%FBSで洗浄し、HBSSで2回、洗浄する。解離された腫瘍細胞を、その後、シグネチャー2対シグネチャー1遺伝子プロファイルを発現する癌幹細胞を検出するために抗体とインキュベートし、シグネチャー2および/またはシグネチャー1遺伝子プロファイルのいずれかを発現する腫瘍幹細胞の存在を、上の実施例5に記載されているように、フローサイトメトリーにより測定する。

20

【0467】

腫瘍がシグネチャー2遺伝子発現プロファイルをもつ癌幹細胞を含むと診断された癌患者を、その後、Novをコードするプラスミドベクターの治療的有効量で処置する。いくつかの態様において、プラスミドベクターは、腫瘍内注射により送達され、カルシウムの生理学的レベル(0.9mM)をもつリン酸緩衝食塩水中に製剤化される。または、DNAは、1mMから2MまでのCa++のより高い量を含む溶液中に製剤化される。DNAは、亜鉛、アルミニウムなどのような他の陽イオンと共に製剤化されうる。プラスミドベクターの治療的有効量は、約0.001ug~約1gの範囲である。最もなかなかの治療的量は、約0.025mg~約5mgの範囲である。プラスミドベクターは、6~12ヶ月間、毎月、その後、維持量として3~12ヶ月ごとに、送達される。代替の処置計画が開発され、疾患の重症度、患者の年齢、およびそのような他の因子に依存して、毎日から、週1回まで、1ヶ月おきに1回まで、年1回まで、1回限りの投与までの範囲であることができる。DNA治療は、オキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコポリン、ストレプトゾシンなどのような1つまたは複数の化学療法剤を用いる標準化学療法計画の前に、化学療法計画と同時に、または化学療法計画の後に、投与されうる。処置された患者は、腫瘍退縮、新しい腫瘍の発生率の低下などについてモニターされる。

30

40

【0468】

実施例11

シグネチャー1および2癌幹細胞の両方を含む腫瘍を有する癌患者を処置するための併用治療

この実施例は、シグネチャー1遺伝子発現プロファイルをもつ癌幹細胞においてc-Metをターゲットし、かつシグネチャー2遺伝子発現プロファイルをもつ癌幹細胞を含む固形腫瘍においてNovの発現を回復させる両方のための抗体および遺伝子併用治療を用いて癌を処置するための方法を記載する。シグネチャー1および2プロファイルの両方を示す癌幹細胞の存在がまず、上記のように腫瘍生検から測定される。c-Metに対する抗体および組換えNovを発現するプラスミドベクターが、その後、上記のように、腫瘍がシグネチャー1お

50

よびシグネチャー2遺伝子プロファイルを発現する癌幹細胞を含む癌患者に投与される。

【0469】

実施例12

癌幹細胞におけるリゾホスファチジン酸(LPA)およびLPA受容体EDG2

この実施例は、LPAシグナル伝達およびLPA受容体EDG2によるシグナル伝達を調節することの癌幹細胞の増殖および自己再生への効果を評価するための方法を記載する。リゾホスファチジン酸(LPA)は、分化を終えての細胞増殖、形態学的変化、および腫瘍細胞浸潤を刺激する生物活性のあるリン脂質である。LPAは、卵巣腫瘍の増殖を促進し、卵巣癌を有する患者において高濃度で見出され、卵巣癌における重要な役割を示唆している。LPAのレベルの上昇はまた、子宮内膜癌および子宮頸癌を有する患者において検出されている(Mills and Moolenaar, 2003)。α 遺伝子発現シグネチャーを示す癌幹細胞は、内皮分化遺伝子2(EDG2)、LPAにより活性化される受容体のファミリーに属するGタンパク質共役型受容体(GPCR)、の発現の増加を含む(表9; 図11)。癌幹細胞におけるEDG2の発現の増加は、LPAに対する応答性を腫瘍形成性により広く関係付けることができる。さらに興味深いことに、EDG2の発現レベルの増加は、LPA非依存性アポトーシス誘導による細胞増殖速度の減少と関連づけられ(Fang et al., 2000)、LPA依存性シグナル伝達に拮抗するが、LPA非依存性アポトーシスを増強することが、腫瘍細胞増殖に対抗するように平衡が保たれているにちがいないことを示唆する。

【0470】

いくつかの態様において、LPAの癌幹細胞挙動への効果が測定される。α -カテニンおよびE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーの両方をもつ癌幹細胞は、上の実施例5に記載されているように、示差的タンパク質発現に基づいてフローサイトメトリーにより単離され、外因性LPAの添加の癌幹細胞増殖への効果が測定される。選別された癌幹細胞を遠心分離により収集し、0.1%(w/v) 脂肪酸未含有BSAを含む定義済み培地に再懸濁する。等しい数の細胞を、0.1μM、1μM、および10μM 1-オレオイルLPA(Sigma)または媒体対照の存在下で、マルチウェル培養皿において最高2週間、浮遊培養下で増殖させる。各条件は3連で行われ、各条件下で生成された腫瘍コロニーの数およびサイズは光学顕微鏡法により評価される。または、等しい数の癌幹細胞をマルチウェル培養皿において浮遊培養下で蒔き、数日間、増殖するようにさせておく。その後、確立された腫瘍コロニーを、0.1μM、1μM、もしくは10μM 1-オレオイルLPAの存在下または非存在下で一晩、処理し、³H]-チミジンを最後の8時間、適用する。³H]-チミジンの取り込みを定量化して細胞増殖に対するLPAの効果を評価する。

【0471】

もう一つの態様において、内因性LPAの存在および癌幹細胞性質への効果が測定される。内因性LPAの一つの可能性のある源は、腫瘍細胞自身であり、その後、癌幹細胞の増殖を促進するように傍分泌様式で作用する。内因的に産生されたLPAの存在を検出するために、腫瘍細胞を、酵素消化により単細胞懸濁液へ解離させ、定義済み培地に再懸濁し、腫瘍コロニーを確立するために数日間、増殖させる。LPAは、馴化培地からブタノール抽出され、前に記載されているように(Saulnier-Blache et al., 2000)、放射酵素アッセイを用いて定量する。

【0472】

もしLPAが培養腫瘍細胞により産生されるならば、この内因性LPAシグナル伝達を低下させることの効果が評価されうる。膜結合型リゾホスファチジン酸ホスファターゼ(ACP6)は、細胞外および膜結合型LPAの両方を分解し、低LPAレベルを維持すること、およびLPAに対する細胞応答を制限することにおいて重要な役割を果たしている(Fang et al., 2000)。腫瘍細胞においてACP6のレベルを増加させることは、従って、LPAレベルを減少させ、内因性LPAの癌幹細胞挙動への効果を明らかにするために用いられる。腫瘍細胞を上記のように単離し、トランスフェクションされた細胞を検出するためのIRES GFPに連結されたACP6を発現する能力があるプラスミドベクターをトランスフェクションする。GFPのみを発現するプラスミドベクターは対照として用いられる。細胞は、リポフェクタミン試薬(I

nvitrogen, Carlsbad, CA)を用いて製造会社のプロトコールに従って一晩、トランスフェクションされ、フローサイトメトリーは、24時間後、トランスフェクションされたGFP陽性腫瘍細胞を単離するために用いられる。等しい数の腫瘍細胞をマルチウェル培養皿において浮遊培養下で蒔き、増殖するようにさせておく。腫瘍コロニーの数およびサイズがその後、評価される。LPA産生は、再び、LPA産生における倍低下を測定するためにACP6発現対照のトランスフェクションされた腫瘍細胞から定量される。または、癌幹細胞を上の実施例5に記載されているように、フローサイトメトリーにより単離し、ACP6発現対照のトランスフェクションされた腫瘍細胞からの培地に再懸濁し、インビトロで腫瘍コロニーを形成するそれらの能力を調べる。

【0473】

10

もう一つの態様において、LPA受容体EDG2をアゴニスト抗体でターゲットすることの癌幹細胞性質への効果が測定される。EDG2は細胞増殖の負の制御因子として働くと考えられており、EDG2選択性アゴニストは腫瘍増殖および生存を制限することができることを示唆する(Fang et al., 2000)。シグネチャー1癌幹細胞におけるEDG2の過剰発現は、このGPCRの制御が癌幹細胞の腫瘍形成性性質において役割を果たすことができることを示唆する。EDG2に対する抗体は、グリコシル化についてのシグナルを欠くEDG2の細胞外ドメイン由来のペプチドを用いて標準免疫化技術により産生され、LPA依存性細胞質Ca⁺⁺増加を活性化できないが、LPA非依存性アポトーシスを活性化するアゴニスト抗体が同定される。

【0474】

20

EDG2の高レベル(シグネチャー1)および低レベル(シグネチャー2)を発現する癌幹細胞へのEDG2アゴニスト抗体の効果は、その後、調べられる。いくつかの態様において、アゴニストEDG2抗体の癌幹細胞性質への効果は、培養液中において測定される。シグネチャー1およびシグネチャー2癌幹細胞を、上の実施例5に記載されているように、患者組織試料(固形腫瘍生検、胸水など)から、または異種移植マウスモデルにおいて継代された腫瘍から単離する。単離された腫瘍幹細胞を遠心分離により収集し、等しい数を、アゴニスト抗EDG2抗体、非アゴニスト抗EDG2抗体、または対照抗体のいずれかを含む定義済み培地に再懸濁する。異なるEDG2抗体または対照抗体の存在下においてシグネチャー1対シグネチャー2癌幹細胞により生成されたコロニーの数およびサイズは、光学顕微鏡法により測定される。

【0475】

30

第二の態様において、EDG2に対するアゴニスト抗体の癌幹細胞増殖への効果は、異種移植モデルにおいて評価される。3連セットにおいて、5,000個、2,500個、1,000個、および200個の単離された癌幹細胞をアゴニスト抗EDG2抗体、非アゴニスト抗EDG2抗体、または対照抗体と、抗体結合を可能にするように37℃で1時間、インキュベートし、その後、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。注入後、癌幹細胞の腫瘍を形成する能力、腫瘍形成に必要とされる時間の長さ、および腫瘍のサイズが評価される。

【0476】

40

もう一つの態様において、インビボでのアゴニスト抗EDG2抗体の腫瘍増殖への効果が測定される。原発腫瘍由来の細胞をはさみで小片へ切断し、その後、その小片を、2x2mmの小片を生じるように氷上で滅菌RPMI培地において刃で切り刻む。腫瘍片を無血清HBSSにおいて洗浄し、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ移植する。胸水由来の細胞を、無血清HBSSで洗浄し、無血清RPMI/マトリゲル混合物(1:1容量)に懸濁し、細胞懸濁液を、NOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。または、腫瘍細胞を解離させ、癌幹細胞を、上の実施例5に記載されているように、フローサイトメトリーにより単離し、5,000個、2,500個、1,000個、および200個の単離された癌幹細胞の3連セットを、NOD/SCIDマウスへ注入する。腫瘍細胞注入のその日に、または代わりに、注入された腫瘍細胞が触知可能な腫瘍へ増殖するやいなや、EDG2に対する裸のアゴニスト抗体または対照抗体を、腫瘍を有するマウスへ腹腔内に注入する。注入は、2~3週間、週に2回、繰り返され、腫瘍増殖速度への効果が評価される。

50

【0477】

この実施例の態様は、癌幹細胞腫瘍形成性におけるLPAおよびLPA受容体EDG2の役割を調べるための方法を記載する。LPA産生またはEDG2をターゲットすることは、癌幹細胞増殖を阻害し、従って、腫瘍増殖に対して治療的に作用することが構想される。

【0478】

実施例13

癌患者を処置するためのシグネチャー1癌幹細胞マーカーEDG2の治療的ターゲティング

この実施例は、癌患者において癌幹細胞の増殖を阻害するためのLPA受容体EDG2に対する抗体を用いて癌を処置するための方法を記載する。モノクローナルアゴニスト抗EDG2抗体は上記のように産生され、標準技術を用いてヒト化される。抗体は精製され、注射用にPBS中の適した薬学的担体と共に製剤化される。患者は、それらのキメラ型、多量体型、ヘテロマー型、一本鎖型、または断片(Fv、Fab、Fab¹、F(ab¹)₂、または他の抗原結合断片)でありうるのだが、ヒト化抗EDG2抗体で、少なくとも10週間、週に1回、または少なくとも約14週間、週に1回のように、処置される。抗体の各投与は、薬学的有効量、例えば、約2mg/ml～約100mg/ml、または約5mg/ml～約40mg/ml、であるべきである。抗体は、オキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコボリン、ストレプトゾシンなどのような1つまたは複数の化学療法剤を用いる標準化学療法計画の前に、化学療法計画と同時に、または化学療法計画の後に、投与されうる。処置された患者は、腫瘍退縮、新しい腫瘍の発生率の低下などについてモニターされる。

【0479】

実施例14

癌幹細胞におけるγ-セクレターゼ活性の阻害

この実施例は、γ-セクレターゼ活性を調節し、それに従って、癌幹細胞においてノッチ(Notch)シグナル伝達を阻害するための方法、およびγ-セクレターゼを阻害することの癌幹細胞の挙動への効果を測定するためのアッセイを記載する。癌幹細胞遺伝子発現シグネチャー1は、ニカストリン(Nicastroin)(NCSTN)、ノッチ受容体をリガンド結合時にタンパク分解性に切断する多量体γ-セクレターゼ複合体の必須構成要素、の発現の減少を示す。ノッチ切断は、結果として、核へ入り、転写を活性化する細胞内ドメイン(NICD)の放出を生じる。ノッチシグナル伝達は、隣接細胞の運命間の側方抑制の過程に関与し、非対称細胞分裂中の細胞運命決定に重要な役割を果たす。さらになお、制御されていないノッチシグナル伝達は、いくつかのヒト癌の形成に結びつけられており、それは腫瘍細胞の発生的運命を変化させて、それらを未分化の増殖状態に維持することができる(Brennan and Brown, 2003)。

【0480】

ニカストリンは、プレセニリン、γ-セクレターゼの触媒性サブユニット、を安定化することに関与し、γ-セクレターゼ活性およびノッチシグナル伝達に必要とされる。しかしながら、ニカストリンはまた、ヘテロ接合体ニカストリンマウス由来の線維芽細胞が予想外にノックアウトマウスにおける活性の完全欠如と比較してγ-セクレターゼ活性の増加を示すように、γ-セクレターゼ活性において阻害性役割を果たすことができ(Li et al., 2003)、シグネチャー1癌幹細胞におけるニカストリン発現の減少は、実際には、これらの癌幹細胞においてγ-セクレターゼ活性およびノッチシグナル伝達を増加させることができることを示唆する。従って、ニカストリン発現を除去するための方法は、癌幹細胞を未分化の増殖状態から分化状態へシフトするにおける治療でありうるが、シグネチャー1癌幹細胞由来の腫瘍は、この型の治療に特に適切でありうる。

【0481】

本発明のいくつかの態様において、小さな干渉RNA(siRNA)は、癌幹細胞においてニカストリンの発現を減少させるために用いられる。ヒトニカストリンを標的にするように設計されたsiRNA(例えば、

5'-GGGCAAGTTTCCCGTGCAGTT-3', SEQ ID NO:1

10

20

30

40

50

)および突然変異型対照は化学合成され、アニールされ、標準技術を用いて腫瘍幹細胞へトランスフェクションされる(Elbashir et al., 2001)。または、pSilencer(Ambion, Austin, TX)のようなプラスミドベクターは、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを用いてsiRNAを転写するために用いられる。ニカストリンのノックダウンは、まず、ニカストリンsiRNA対ニカストリンミスマッチの対照siRNAをトランスフェクションされたヒト線維芽細胞系においてタンパク質発現をウェスタンブロットを用いて分析することにより試験される。ニカストリン発現を最も強く減少させるsiRNAのみがさらなる実験に用いられる。

【0482】

ニカストリンのsiRNAノックダウンが癌幹細胞においてノッチシグナル伝達に影響を及ぼすかどうかを決定するために、NICDの核局在化が、ニカストリン対対照siRNAでのトランスフェクション後測定される。癌幹細胞を実施例5に記載されているように、固形腫瘍から単離し、等しい数の細胞に、浮遊培養下でニカストリンsiRNA対対照siRNAをトランスフェクションする。24時間後、内因性ノッチ1の細胞下局在性が、生化学的細胞分画により測定される。癌幹細胞を抽出し、ショ糖密度勾配において細胞質および核成分へと分離する。各成分由来の等しいタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース上へブロットし、抗ノッチ1.ICで探索する(Ledmond et al., 2000)。核画分におけるノッチ1.ICの相対量は、ノッチシグナル伝達のレベルの指標としての役割を果たす。

【0483】

ニカストリン発現の低下による γ -セクレターゼ活性の減少が癌幹細胞挙動に影響を及ぼすかどうかを決定するために、癌幹細胞の増殖および自己再生が異種移植モデルにおいて測定される。 α -カテニンまたはE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーのいずれかをもつ5,000個、1,000個、および200個の癌幹細胞の3連セットを、実施例5に従って単離し、浮遊状態で培地においてニカストリンまたは対照siRNAでトランスフェクションする。24時間後、トランスフェクションされた細胞をHBSSにおいて洗浄し、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入する。腫瘍増殖は増殖能力を評価するためにモニターされる。28日後、マウス由来の異種移植片を単離し、解離された腫瘍細胞を、1000個の腫瘍細胞あたりに存在するESA⁺、CD44⁺、CD24^{- / 低}、およびLin⁻ ; ESA⁺、CD44⁺、CD24^{- / 低}、Lin⁻、c-Met⁺、EDG2⁺、およびDCBLD2⁺ ; ESA⁺、CD44⁺、CD24^{- / 低}、Lin⁻、E-カドヘリン⁻、およびIL1R2⁻癌幹細胞の数を測定するために、実施例5に記載されているように、フローサイトメトリーにより分析する。

【0484】

代替の態様において、 γ -セクレターゼ活性を小分子阻害剤L-685,458を用いて減少させ(Yan et al., 2004, J. Neurosci. 24:2942)、腫瘍増殖への効果は、異種移植モデルにおいて評価された。20,000個のPE13継代されたヒト乳房腫瘍細胞をNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入した。その後、マウスに、9mg/kg L-685,458(n=5)または媒体対照(n=7)を毎日、25日間、皮下に注入した。11日目を開始して、腫瘍容積を、週に3回、合計48日間、測定した。L-685,458での処置は注入された腫瘍細胞の増殖を有意に阻害し、研究を通じて対照動物と比較して平均腫瘍容積が低下した(図13A)。個々のマウスについての腫瘍容積は図13Bにプロットされている。従って、ノッチシグナル伝達を低下させると予想される小分子 γ -セクレターゼ阻害剤を用いることにより γ -セクレターゼ活性を阻害することは、腫瘍増殖を低下させた。

【0485】

実施例15

結腸癌から単離された癌幹細胞は α -カテニンおよびE-カドヘリンの示差的発現を示す

この研究は、本発明の遺伝子発現シグネチャーにおける α -カテニンおよびE-カドヘリンの示差的発現を結腸癌まで拡大した。リアルタイムPCRは再び、3つの乳癌腫瘍において α -カテニンおよびE-カドヘリンの示差的発現を示した(図14)。結腸癌における α -カテニンおよびE-カドヘリンの発現を調べるために、結腸腫瘍生検由来の腫瘍形成性および非腫瘍形成性細胞を、上記およびAl-Hajj et al., 2003に記載されているように、ESA、CD44、CD24、およびLineageマーカーのそれらの示差的発現に基づいてフローサイトメトリー

により単離した。全RNAを、単離された腫瘍形成性癌幹細胞、非腫瘍形成性腫瘍細胞、および正常結腸上皮から抽出し、 α -カテニンおよびE-カドヘリンをコードするRNAの相対レベルをリアルタイムRT-PCRにより測定した。図15に示されているように、腫瘍形成性癌細胞は、E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーと類似した α -カテニンおよびE-カドヘリンの示差的発現を示し、 α -カテニンのレベルの変化せず～増加、およびE-カドヘリンのレベルの減少であった。この示差的発現は、下で詳細に記載されているように、転移性結腸癌幹細胞を診断および処置するために用いられうる。

【0486】

実施例16

癌幹細胞の存在および転移能を評価するための α -カテニンおよびE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーの使用

この実施例は、本発明の遺伝子発現シグネチャーを用いて癌幹細胞の存在および転移能をモニターするための方法を記載する。いくつかの態様において、癌幹細胞の存在および転移能は、E-カドヘリンおよび α -カテニン発現、ならびにE-カドヘリン、 α -カテニン、および β -カテニンタンパク質局在性を評価することによりモニターされる。E-カドヘリン、 α -カテニン、および/または β -カテニンは、アドヘレンスジャンクション、上皮細胞間の細胞-細胞接着の部位、の必須成分である。アドヘレンスジャンクションの構築は、E-カドヘリンの γ -セクレターゼタンパク分解性切断により制御される。E-カドヘリン切断は、結果として、アドヘレンスジャンクション複合体の分解、ならびに、次に β -カテニンタンパク質の核蓄積およびWntシグナル伝達経路の活性化に寄与できる、細胞質におけるE-カドヘリン、 α -カテニン、および β -カテニンタンパク質のレベルの増加を生じる(Marambaud et al., 2002, EMBO 21:1948)。これと一致して、細胞質E-カドヘリンおよび核局在化 β -カテニンは、腫瘍の侵襲最前線における正常な上皮付着接触を喪失している間葉状細胞と関連している(Brabletz et al., 2001, PNAS 98:10356)。さらになお、これらの間葉状細胞は、増殖活性を示し、腫瘍幹細胞を表すこれらの細胞と一致して、最初の腫瘍を特徴付ける高分化型細胞集団を含む転移を生じることができる。

【0487】

シグネチャー1およびシグネチャー2癌幹細胞、それぞれにおける α -カテニンまたはE-カドヘリンのいずれかの発現の低下の同定はさらに、癌幹細胞が腫瘍形成性および転移性の両方であることを示す。シグネチャー1癌幹細胞におけるニカストリンの下方制御および上で詳細に考察されているように、 γ -セクレターゼの活性化の可能性のある増加はさらに、細胞-細胞接触の喪失を促進し、シグネチャー1型癌幹細胞における転移に寄与することができる。従って、本発明は、E-カドヘリンおよび α -カテニンの示差的発現、ならびにE-カドヘリン、 α -カテニン、および β -カテニンの局在性の使用が、腫瘍幹細胞の転移能をモニターすることを可能にする。

【0488】

本発明のいくつかの態様において、 γ -セクレターゼの活性は阻害され、癌幹細胞における α -カテニン、 β -カテニン、およびE-カドヘリン発現への効果が測定される。 γ -セクレターゼ活性を阻害するために、小分子阻害剤L-685,458が用いられた(Yan et al., 2004, J. Neurosci. 42:2942)。20,000個のPE13腫瘍細胞を、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ注入した。その後、マウスに、9mg/kg L-685,458または媒体対照を毎日、25日間、皮下に注入した。25日後および最後の注入から1週間後、生検をL-685,458処置および対照処置マウスから採取する。生検を液体窒素中に新鮮凍結し、O.C.T.に包埋し、ガラススライド上への10um切片としてクリオスタット上で切断する。または、生検をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ガラススライド上への10um切片としてマイクローム上で切断する。

【0489】

いくつかの態様において、潜在的に転移性の腫瘍細胞におけるE-カドヘリンの細胞質局在性および/または β -カテニンの核局在性(Brabletz et al., 2001)が癌幹細胞を示しているかどうかを決定するために、および γ -セクレターゼ阻害剤L-685,458での処置により

誘導された変化をモニターするために、間接二重免疫組織化学法はレーザーキャプチャーマイクロダイセクションと組み合わされる。腫瘍生検の凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで固定し、3%正常ヤギ血清においてブロックし、ビオチン結合抗 β -カテニン抗体とインキュベートする。ビオチンは、着色基質を用いる西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合アビジンの酵素活性により検出される。次の切片は、アルカリホスファターゼ(AP)結合抗E-カドヘリンまたは α -カテニン抗体とインキュベートされ、AP酵素活性が異なる着色基質を用いて検出される。間葉性形態、E-カドヘリンもしくは α -カテニンのいずれかの細胞質局在性、および/または β -カテニンの核局在性をもつ腫瘍の先端上の細胞は、潜在的に腫瘍形成性および転移性の癌幹細胞であると同定される。これらの細胞が癌幹細胞であることを確認するために、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションが、Leica AS LMD装置を用いて行われる。全RNAは、RNeasy Micro Kit(Qiagen)を用いて製造会社のプロトコールに従って、マイクロダイセクションされた試料から抽出される。単離されたRNAは、標準技術を用いてTaqman定量的RT-PCR分析に用いられる。シグネチャー1、シグネチャー2、CD44、CD24、およびLineageマーカーを含む遺伝子についてのプライマーならびにプローブセットは、エクソン-イントロン境界に渡って設計される。各プライマー/プローブセットは、転移性細胞もまた腫瘍形成性であるかどうか、およびL-685,458での処置が対照と比較して転移性または腫瘍形成性マーカーを変化させるかどうかを決定するために、実施例5に従って単離された癌幹細胞集団または実施例4に従って単離された正常乳房上皮と比較して、レーザーキャプチャーされた転移性細胞からの遺伝子発現のレベルを定量するために用いられる。

【0490】

もう一つの態様において、癌幹細胞において α -カテニンおよびE-カドヘリンの細胞下局在性ならびに発現レベルまたは β -カテニンの核局在性を、それらの転移能およびL-685,458処置に関連した変化を評価するために、測定するのに多色定量的免疫蛍光法が用いられる。腫瘍生検の凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで固定し、3%正常ヤギ血清においてブロックし、CD44、CD24、および交替の隣接切片上において、 α -カテニン、 β -カテニン、またはE-カドヘリンのいずれかに対する蛍光標識抗体とインキュベートする。代替の態様において、 α -カテニンおよび/またはE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーのいずれかの他の癌幹細胞マーカーに対する抗体が用いられうる。例えば、NCSTNおよびMETに対する抗体は、NCSTNの発現の減少およびMETの発現の増加により1型癌幹細胞の存在を評価するために交替の隣接切片上で用いられうる。同様に、IL1R2およびSHC1に対する抗体は、IL1R2の発現の減少およびSHC1の発現の増加により2型癌幹細胞の存在を評価するために用いられうる。

【0491】

癌幹細胞は、それらの腫瘍性形態に基づいたLineage⁻細胞として(Al-Hajj et al., 2003)、および蛍光シグナルの存在および非存在、それぞれによりCD44⁺およびCD24⁻として同定される。 α -カテニンおよびE-カドヘリン、または本発明の1型もしくは2型癌幹細胞マーカーの任意の組み合わせの合計発現レベル、加えて、局在化された膜対細胞質の比率が、12ビットのデジタルデータを作成するEEV 57-10 G1 Chipを備えたQuantics CCDカメラ(Photometrics, Tucson, AZ)を用いる定量的免疫蛍光法(Dunn et al., 1994; Kirchner et al., 2003)により測定される。 β -カテニンの核局在性もまた評価される。

【0492】

細胞質E-カドヘリンおよび核 β -カテニンを有する腫瘍の先端における増殖性間葉細胞もまた腫瘍形成性癌幹細胞であることが証明されることが予想される。もし γ -セクレターゼ活性が、E-カドヘリンの切断を通しての癌幹細胞の転移能に寄与するならば、 γ -セクレターゼ阻害剤が、これらの細胞の数ならびにE-カドヘリンおよび α -カテニンの細胞質発現の両方を低下させるはずであると予想される。

【0493】

実施例17

転移を阻害するためのシグネチャー1癌幹細胞マーカーDCBLD2のターゲティング

この実施例は、本発明の遺伝子発現シグネチャーにより同定された癌幹細胞マーカーの発現に基づいて癌幹細胞をターゲットするための方法、およびこのターゲティングの腫瘍転移能への影響をアッセイするための方法を記載する。具体的には、転移は、腫瘍転移に寄与できる、および癌幹細胞において過剰発現している膜貫通型タンパク質をターゲットした後の、癌幹細胞における α -カテニンおよびE-カドヘリン発現レベル、ならびE-カドヘリン、 α -カテニン、および β -カテニンの細胞下局在性によりモニターされる。本発明の遺伝子発現シグネチャー1は、正常乳房上皮と比較してシグネチャー1癌幹細胞におけるDCBLD2発現の増加を同定する(図11)。DCBLD2は、ニューロフィリン、神経系において軸索反発作用および誘引を媒介するセマフォリンについての細胞表面受容体、と構造的に類似したI型膜貫通タンパク質である。DCBLD2に存在するCUBおよびジスコイジンドメインは、細胞集合および遊走の制御に結びつけられている。さらになお、DCBLD2は、高転移性癌において過剰発現しており、従って、高レベルのDCBLD2を発現する細胞をターゲットすることは、高転移能をもつ癌幹細胞を除去できると思われる。

【0494】

DCBLD2の発現の増加をもつ癌幹細胞をターゲットするために、DCBLD2の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体が産生される。F1ハイブリッドマウスを、精製された組換え細胞外DCBLD2タンパク質を用いて免疫し、免疫タンパク質を特異的に認識する循環抗体を有するマウス由来の脾臓がハイブリドーマ作製に用いられる。

【0495】

DCBLD2の異なるドメインに対する抗体は、その後、マウス異種移植モデルにおいて治療剤として用いられる。原発腫瘍由来の細胞を、はさみで小片へ切断し、その後、その小片を、2x2mmの小片を生じるように氷上で滅菌RPMI培地において刃で切り刻む。腫瘍片を無血清HBSSにおいて洗浄し、VP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体へ移植する。または、 α -カテニン遺伝子発現シグネチャーをもつ癌幹細胞を、上の実施例5に記載されているように単離し、5,000個から下へ200個の単離された細胞をNOD/SCIDマウスへ注入する。触知可能な腫瘍が形成されるやいなや、マウスに、DCBLD2に対する抗体または対照抗体を、3日ごとに2週間、腹腔内へ注入する。マウスは、処置の間、様々な時点で屠殺され、腫瘍は、上で詳細に記載されているように、定性的免疫蛍光法を用いて腫瘍の先端における転移性腫瘍幹細胞の存在および数について評価される。

【0496】

実施例18

患者生検において癌幹細胞の転移能を測定するための、E-カドヘリン、 α -カテニン、癌幹細胞によって示差的に発現する表4および表6の遺伝子、ならびに/ β -カテニンの発現およびタンパク質局在性の使用

この実施例は、E-カドヘリンおよび/ α -カテニンの発現、ならびにE-カドヘリン、 α -カテニン、癌幹細胞および非腫瘍形成性癌細胞により示差的に発現する表4および6に列挙された遺伝子の1つもしくは複数、および/ β -カテニンのタンパク質局在性により患者生検において転移性癌幹細胞の存在をモニターするための方法を記載する。患者腫瘍生検を採取し、O.C.T.に包埋し、ガラススライド上への10 μ m切片としてクリオスタット上で切断する。または、生検をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ガラススライド上への10 μ m切片としてミクロトーム上で切断する。その後、スライドを、上の実施例14に記載されているように、 α -カテニン、E-カドヘリンタンパク質、および/ β -カテニンの発現ならびに局在性についての定量的免疫蛍光法のために処理する。アドヘレンスジャンクションに結合したものに対する細胞質におけるタンパク質の増加と組み合わせ、 α -カテニンまたはE-カドヘリンのいずれかの低発現をもつ癌幹細胞を有する患者は、転移のリスクが高いと評価され、治療はそれに応じて調整される。

【0497】

実施例19

癌患者において循環転移性腫瘍細胞の腫瘍形成性を測定するための癌幹細胞マーカーの使用

10

20

30

40

50

この実施例は、癌患者の末梢血に循環している腫瘍細胞の腫瘍形成性を測定するための方法を記載する。全身腫瘍組織量は、癌患者の臨床転帰における重要な要素であり、転移、再発、および死亡の頻度は、循環腫瘍細胞のレベルと相関するようと思われる(Wong, 2003, Oncol. Reports 10:229)。現在、定量的RT-PCRが、腫瘍細胞の存在を測定するために幅広い範囲の腫瘍マーカーに対して用いられているが、効果がまちまちである(Wong, 2003, Oncol. Reports 10:229)。従って、より集中的な治療介入の必要性を決定するために全身腫瘍組織量を評価しうる感度が高く、特異的で、非侵襲性の血液検査の必要性がある。本発明の癌幹細胞遺伝子シグネチャーはさらに、循環細胞を転移性だけでなく腫瘍形成性であることも同定することを可能にする。患者由来の血液を収集し、癌幹細胞の存在を実施例5に記載されているように、フローサイトメトリーを用いて測定する。さらになお、単離された腫瘍幹細胞を、腫瘍形成性を評価するためにVP-16およびエストロゲン前処理されたNOD/SCIDマウスの乳房脂肪体に注入できる。患者の血液における腫瘍細胞の存在および腫瘍形成性は、癌治療の効果を測定するために長い期間をかけてモニターされる。

10

【0498】

実施例20

α -カテニンシグネチャーは不良臨床転帰を予測する

この実施例は、転移および全生存を含む初期乳癌の臨床転帰を予測するとの α -カテニンシグネチャーの同定を記載する。さらになお、予後および治療選択を目的として低リスクおよび高リスクへ腫瘍試料を分類するための α -カテニン遺伝子シグネチャーの使用が提供される。

20

【0499】

本発明の固形腫瘍幹細胞遺伝子発現のゲノムワイド分析は、腫瘍を細分類する遺伝子プロファイルと同定し、従って、臨床転帰を予測するにおいて有用でありうる。腫瘍幹細胞において示差的に発現する遺伝子は、それらの発現の α -カテニンとの相関に基づいて固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーへ分類され、その後さらに、正常乳房組織および α -カテニン非欠乏腫瘍幹細胞と比較して α -カテニンの検出不可能または低いレベルをもつ腫瘍幹細胞におけるそれらの倍またはパーセンテージ発現変化に基づいて選択された。低い～検出不可能の α -カテニン発現を含む腫瘍幹細胞における検出不可能～低い発現、加えて正常乳房組織および α -カテニン非欠乏腫瘍幹細胞と比較して低い～検出不可能の α -カテニンを含む腫瘍幹細胞における90%またはそれ以上低い発現レベルを有する遺伝子は、全腫瘍幹細胞において α -カテニン発現と0.9から1までの正相関をもつと同定された。低い～検出不可能の α -カテニン発現を含む腫瘍幹細胞における上昇した発現、加えて正常乳房組織および α -カテニン非欠乏腫瘍幹細胞においてより9分の1またはそれ以下である、低い～検出不可能の α -カテニン発現を含む腫瘍幹細胞における発現レベルを有する遺伝子は、全腫瘍幹細胞において α -カテニン発現と-0.9から-1までの負相関をもつと同定された。合わせてこれらの遺伝子は α -カテニンシグネチャー1を構成する(表9)。第二の α -カテニンシグネチャー(α -カテニンシグネチャー2)は、その後、上記の倍または発現変化基準にわずかに違反したが、治療的および/または生物学的に興味深い遺伝子であると主観的に決定された遺伝子をさらに含むことにより作成された：検出不可能～低い発現をもつ1個の遺伝子および上昇した発現をもつ3個の遺伝子(表9において下線の引かれた)。第三の α -カテニンシグネチャー(α -カテニンシグネチャー3)は、その後、 α -カテニンシグネチャー2から遺伝子を排除することにより作成された：検出不可能～低い発現をもつ9個の遺伝子および上昇した発現をもつ15個の遺伝子(表9)。

30

40

【0500】

腫瘍幹細胞において示差的に発現する遺伝子はまた、それらの発現のE-カドヘリンとの相関に基づいて固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーへ分類され、その後さらに、正常乳房組織およびE-カドヘリン非欠乏腫瘍幹細胞と比較してE-カドヘリンの検出不可能または低いレベルをもつ腫瘍幹細胞におけるそれらの倍またはパーセンテージ発現変化に基づいて選択された。低い～検出不可能のE-カドヘリン発現を含む腫瘍幹細胞における検出不可能

50

～低い発現、加えて正常乳房組織およびE-カドヘリン非欠乏腫瘍幹細胞と比較して低い～検出不可能のE-カドヘリンを含む腫瘍幹細胞における85%またはそれ以上低い発現レベルを有する遺伝子は、全腫瘍幹細胞においてE-カドヘリン発現と0.9から1までの正相関をもつと同定された。低い～検出不可能のE-カドヘリン発現を含む腫瘍幹細胞における上昇した発現、加えて正常乳房組織およびE-カドヘリン非欠乏腫瘍幹細胞においてより2.5分の1またはそれ以下である、低い～検出不可能のE-カドヘリン発現を含む腫瘍幹細胞における発現レベルを有する遺伝子は、全腫瘍幹細胞においてE-カドヘリン発現と-0.9から-1までの負相関をもつと同定された。合わせてこれらの遺伝子はE-カドヘリンシグネチャー1を構成する。第二のE-カドヘリンシグネチャー(E-カドヘリンシグネチャー2)は、その後、上記の倍または発現変化基準にわずかに違反したが、治療的および/または生物学的に興味深い遺伝子であると主観的に決定された遺伝子をさらに含むことにより作成された：上昇した発現をもつ1個の遺伝子(表9において下線の引かれた)。第三のE-カドヘリンシグネチャー(E-カドヘリンシグネチャー3)は、その後、治療的および/または生物学的に興味深い遺伝子ではないと主観的に決定された遺伝子をE-カドヘリンシグネチャー2から排除することにより作成された：検出不可能～低い発現をもつ6個の遺伝子および上昇した発現をもつ6個の遺伝子(表9)。

10

【0501】

癌幹細胞遺伝子シグネチャーの転移および死亡を予測する能力を評価するために、2つの独立した癌患者集団が用いられた：Netherlands Cancer Instituteからの295人の続発性初期乳癌患者(van de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999)およびErasmus Medical Centerからの286人のリンパ節無症状性乳癌患者(Wang et al., 2005 Lancet 365:671)。両方の患者集団からの遺伝子発現はマイクロアレイ分析により分析されている。α-カテニンシグネチャー2はこれらの2つの独立した癌患者集団からの遺伝子発現分析に対して比較され、結果として、それぞれ、α-カテニンプロファイル4およびα-カテニンプロファイル5を生じた(表9)。同様に、E-カドヘリンシグネチャー2はこれらの2つの患者集団からの遺伝子発現分析に対して比較され、結果として、それぞれ、E-カドヘリンプロファイル4およびE-カドヘリンプロファイル5を生じた(表9)。

20

【0502】

Netherlands Cancer Instituteからの295人の続発性初期乳癌患者(van de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999)からのマイクロアレイデータの相関およびコックス比例ハザード生存率分析は、α-カテニンシグネチャー2と正に相関した遺伝子発現プロファイル(α-カテニンプロファイル4)をもつ125人の患者腫瘍を同定し、α-カテニンシグネチャー2が、0.1相関あたり1.15の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=5.9 \times 10^{-4}$)、かつ0.1相関あたり1.24の一変量危険率で死亡を有意に予測する($P=3.7 \times 10^{-7}$)ことを示した。さらになお、Erasmus Medical Centerからの286人のリンパ節無症状性乳癌患者(Wang et al., 2005, Lancet 365:671)からのマイクロアレイデータの相関およびカイニ乗分析は、α-カテニンシグネチャー2と相関した遺伝子発現プロファイル(α-カテニンプロファイル5)をもつ患者腫瘍(n=77)が転移のリスクの増加をもつことを明らかにした($P=0.67$)。従って、α-カテニン発現シグネチャー2のような腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーは、転移および死亡の高リスクをもつ腫瘍についての遺伝子シグネチャーを提供し、従って、不良予後を予測する遺伝子シグネチャーである。α-カテニン発現シグネチャーの任意の特定の遺伝子は腫瘍試料において低下した発現もしくは上昇した発現のいずれかを有しうる、またはどちらも有しえないが、発現レベルおよびシグネチャーにおける他の遺伝子とのその関係は、腫瘍試料を分類するために用いられうる固有の固形腫瘍幹細胞シグネチャーを生み出す。

30

40

【0503】

上記のE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーを用いる同様の比較は、再び、表10に要約されているような臨床転帰を評価するために用いられた。Netherlands Cancer Instituteからの295人の続発性初期乳癌患者からのマイクロアレイデータの相関およびコックス比例ハザード生存率分析は、E-カドヘリンシグネチャー2と正に相関した遺伝子発現プロフ

50

ファイル(E-カドヘリンプロファイル4)をもつ240人の患者腫瘍を同定し、E-カドヘリンシグネチャー2が、0.1相関あたり0.981の転移についての一変量危険率で転移を予測し($P=0.59$)、かつ0.1相関あたり0.938の一変量危険率で死亡を予測する($P=0.1$)ことを示した。 α -カテニンおよびE-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーを組み合わせたこともまた、患者において転移を予測した(0.1相関あたり1.28の転移についての一変量危険率($P=4.2 \times 10^{-4}$))。加えて、Erasmus Medical Centerからの286人のリンパ節無症状性乳癌患者(Wang et al., 2005, Lancet 365:671)からのマイクロアレイデータの相関およびカイ二乗分析は、E-カドヘリン遺伝子シグネチャーと相関した遺伝子発現プロファイル(E-カドヘリン遺伝子プロファイル5)をもつ患者腫瘍($n=198$)が転移のリスクの増加をもつことを示した($P=0.57$)。

10

【0504】

臨床転帰の予測におけるそれらの異なる能力のため、 α -カテニンシグネチャー2およびE-カドヘリンシグネチャー2を、異なる腫瘍サブクラスの遺伝子発現パターンに対してさらに相関させた。マイクロアレイ分析は、5つの別個のサブクラス：Luminal A、Luminal B、ERBB2、Basal、およびNormal-like(Luminal Aサブクラスが最良の予後をもち、Basalサブクラスが最悪の予後をもつ)へ遺伝子発現に基づいて乳癌を分離するために用いられている(Sorlie et al., 2001, PNAS 98:10869)。 α -カテニンシグネチャー2のこれらの異なる腫瘍サブクラスとの相関は、Basalサブクラスに対して最も強く、Luminal Aサブクラスに関してマイナスであり(図16)、再び、 α -カテニンシグネチャーを不良予後の優れた予知するものとして際立たせている。対照的に、E-カドヘリンシグネチャーはBasalサブ

20

【0505】

固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーに加えて、固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャーを構成する1つまたは複数の個々の遺伝子は、Netherlands Cancer Instituteからの295人の患者において転移および死亡を有意に予測し、これらの遺伝子の1つまたは複数は、上記のように、固形腫瘍幹細胞遺伝子シグネチャー全体の代わりに用いられうることを示唆する。 α -カテニン遺伝子シグネチャーの場合、以下の遺伝子：GALC、CTSL2、FOXQ1、MYEOV、RB1、およびSLC7A5が転移および死亡を有意に予測することが発見された。全腫瘍試料(van't Veer et al., 2002, Nature 415:530およびvan de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999に記載された)に渡って発現の参照セットを比較してGALCの低い～検出不可能のレベルの発現は、0.1相関あたり0.632の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=8.1 \times 10^{-3}$)、0.1相関あたり0.583の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=5.4 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較してCTSL2の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり1.52の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=1.7 \times 10^{-6}$)、0.1相関あたり1.86の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=4.0 \times 10^{-11}$)。参照セットと比較してFOXQ1の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり1.44の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=1.7 \times 10^{-3}$)、0.1相関あたり1.73の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=1.6 \times 10^{-5}$)。参照セットと比較してMYEOVの上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり1.76の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=2.2 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり2.09の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=5.9 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較してRB1の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり0.72の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=1.6 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり0.664の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=6.8 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較してSLC7A5の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり3の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=2.6 \times 10^{-4}$)、0.1相関あたり3.52の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=1.1 \times 10^{-4}$)。

30

40

【0506】

加えて、E-カドヘリン遺伝子発現シグネチャーを構成する遺伝子の数個は単独で予測し、低い～検出不可能の発現をもついくつか：IL8およびKRT6B、ならびに上昇した発現をもついくつか：RNASELおよびC17orf27を含む。参照セットと比較してIL8の低い～検出不可

50

能のレベルの発現は、0.1相関あたり1.17の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=5.2 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり1.3の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=3.0 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較してKRT6Bの低い～検出不可能のレベルの発現は、0.1相関あたり1.35の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=3.9 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり1.54の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=4.7 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較してRNASELの上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり0.655の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=3.7 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり0.498の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=1.4 \times 10^{-3}$)。参照セットと比較してC17orf27の上昇したレベルの発現は、0.1相関あたり2.35の一変量危険率で転移を有意に予測し($P=1.5 \times 10^{-2}$)、0.1相関あたり3.19の一変量危険率で死亡を有意に予測した($P=3.1 \times 10^{-3}$)。

【0507】

10

α -カテニン遺伝子シグネチャーの不良予後を予測するとの同定は、臨床的に、患者のために予後を提供し、治療を選択することにおけるその使用を示唆する。 α -カテニン遺伝子シグネチャーは、癌幹細胞の正常乳房組織に対する比較から発見され、その予後診断能力は、腫瘍試料の参照セットに対して標準化された(van't Veer et al., 2002, Nature 415:530; van de Vijver et al., 2002, N. Eng. J. Med. 347:1999)、または標的強度に対してスケールされた(Wang et al., 2005, Lancet 365:671)、未分画の、およびそれに従って、不均一な、乳房腫瘍試料のマイクロアレイ分析から同定された。従って、限定されるわけではないが、固形組織生検、微細針吸引、または胸水を含む未分画腫瘍試料は、癌患者において α -カテニンシグネチャーを検出するために用いられうる。

【0508】

20

追加の患者を検査するために、腫瘍試料を採取し、分析の前に -180°C での液体窒素中に貯蔵のために新鮮凍結する。RNAを腫瘍試料から抽出し、蛍光標識cDNAプローブを、当技術分野における標準技術を用いてマイクロアレイ分析のために作製する。患者試料由来のcDNAプローブを、 α -カテニンシグネチャーを構成する遺伝子またはそれらの断片を含むDNAマイクロアレイ上でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは、補色フルオロフォアで標識されたいくつかの腫瘍試料由来のcDNAのプールで構成される参照試料と組み合わせで行われる。ハイブリダイズしたアレイをスキャンし、蛍光強度を定量し、標準化し、補正して、参照試料のシグナルの強度に対する強度比率として各遺伝子の転写産物量を生じる。または、単離されたRNAを、 α -カテニンシグネチャーを構成する遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットを用いる定量的RT-PCRに用いる。患者試料における遺伝子発現プロファイルを、その後、 α -カテニンシグネチャーと相関させる。 α -カテニンシグネチャーとの正相関の検出は、腫瘍を高リスクと分類し、従って、適切な治療が施され、シグネチャーはさらに、選択された治療をモニターするために長い期間をかけて用いられうる。または、もし α -カテニンシグネチャーと相関なし、または負相関が試料において検出されたならば、患者は、シグネチャーの出現について長い期間をかけてモニターされうる。

30

【0509】

上の明細書で言及されたすべての刊行物および特許は、参照により本明細書に組み入れられている。本発明の記載された方法および系の様々な改変ならびにバリエーションは、本発明の範囲および真意から逸脱することなく、当業者にとって明らかであると思われる。本発明は、特定のいくつかの態様に関して記載されているが、主張されているような本発明はそのような特定の態様に不当に限定されるべきではないことは理解されているはずである。実際、関連分野の業者にとって明白である、本発明を行うための記載された様式の様々な改変は、特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

40

【図面の簡単な説明】

【0510】

【図1】腫瘍形成性細胞の単離を示す。

【図2】腫瘍形成性および非腫瘍形成性乳癌細胞のDNA含量を示す。

【図3】CD24⁺注入部位(a)、(20x対物レンズ倍率)正常なマウス組織のみを現した、一方、CD24⁻注入部位(b)、(40x対物レンズ倍率)悪性細胞を含んだ、からの組織像を示す。

50

(c)CD44⁺CD24^{- / 低} Lineage⁻ 注入部位でのマウスにおける代表的腫瘍、しかしCD44⁺CD24⁺Lineage⁻ 注入部位では無し。T3細胞は、パパニコロー染色で染色され、顕微鏡(100x対物レンズ)によって調べられた。非腫瘍形成性(c)および腫瘍形成性(d)集団の両方とも、腫瘍性外観をもち、大きな核および顕著な核小体を有する細胞を含んだ。

【図 4】CD44⁺CD24^{- / 低} Lineage⁻ 細胞から生じた腫瘍における表現型多様性を示す。

【図 5】Wnt(左パネル)およびフリズルド(右パネル)の発現を示す。

【図 6】正常な腫瘍線維芽細胞および内皮細胞の単離を示す。

【図 7】乳癌幹細胞のアデノウイルスベクターでの感染を示す。

【図 8】 β -カテニンの細胞下局在性を示す。

【図 9】癌細胞における β -カテニンシグナル伝達の阻害を示す。

10

【図 10】3つの原発腫瘍：T1、T2、T3、および3つの継代された腫瘍：SUM、PE13、PE15内の腫瘍形成性(TG)、非腫瘍形成性(NTG)、および正常乳房上皮(NBE)におけるマイクロアレイ分析からの α -カテニンおよびE-カドヘリンの発現を示す。

【図 11】A) α -カテニン遺伝子シグネチャーについてマイクロアレイ分析により測定された場合の遺伝子発現レベルを示す。

【図 12】3つの腫瘍試料：SUM、PE13、PE15、T1、T2、およびT3由来の腫瘍形成性細胞(TG)における、ならびに正常乳房上皮におけるE-カドヘリン遺伝子シグネチャーについてマイクロアレイ分析により測定された場合の遺伝子発現レベルを示す。

【図 13】 γ -セクレターゼの小分子阻害剤、L-685,458、の異種移植モデルにおける癌幹細胞から生じる腫瘍の容積への効果を示す。A) L-685,458処置(n=5)対対照(n=7)動物からの平均腫瘍容積が37日間に渡って測定された各日についてプロットされている。B) 個々のL-685,458処置および対照マウスの腫瘍容積が測定された各日についてプロットされている。

20

【図 14】3つの乳房腫瘍：T1、T2、およびT3由来の腫瘍形成性細胞(TG)におけるリアルタイムPCRを用いた α -カテニンおよびE-カドヘリンの発現レベルを示す。

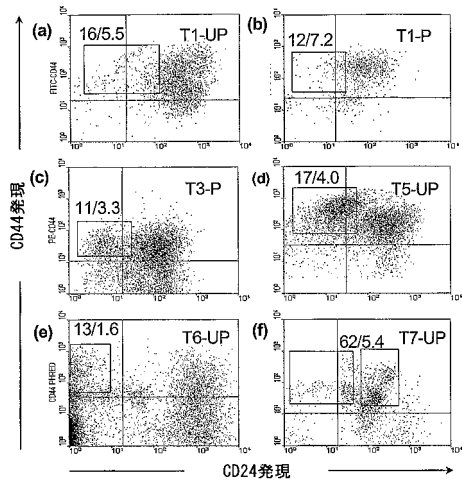
【図 15】正常結腸上皮(NC)と比較した結腸腫瘍試料由来の腫瘍形成性(TG)および非腫瘍形成性(NTG)細胞におけるリアルタイムPCRを用いた α -カテニンおよびE-カドヘリンの発現レベルを示す。

【図 16】A) α -カテニン腫瘍幹細胞シグネチャーの相関を示す。

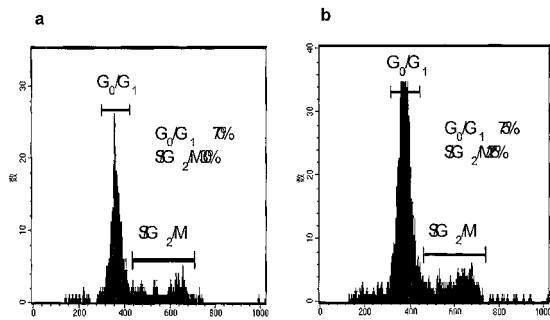
【図 17】E-カドヘリン腫瘍幹細胞シグネチャーの、異なる腫瘍サブクラス：Luminal A、Luminal B、ERBB2、Basal、およびNormal-like、を区別する5つの遺伝子発現パターンとの相関を示す。

30

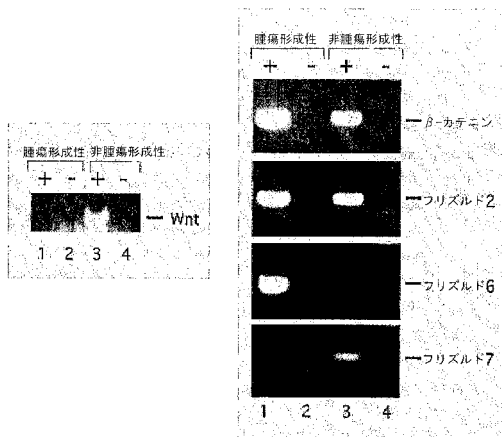
【図 1】



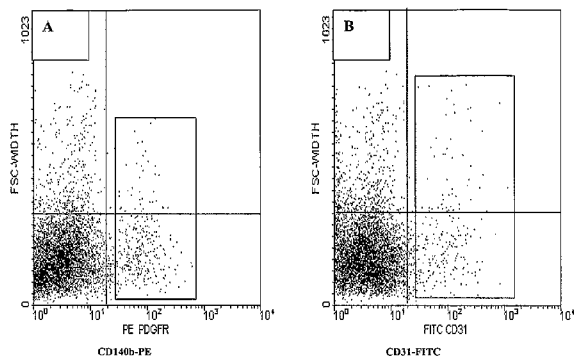
【図 2】



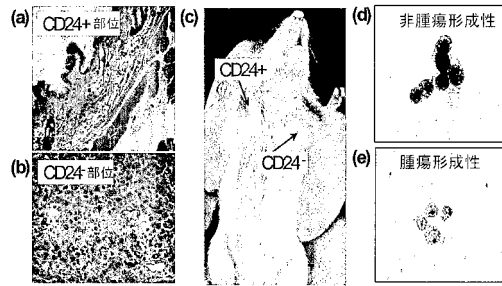
【図 5】



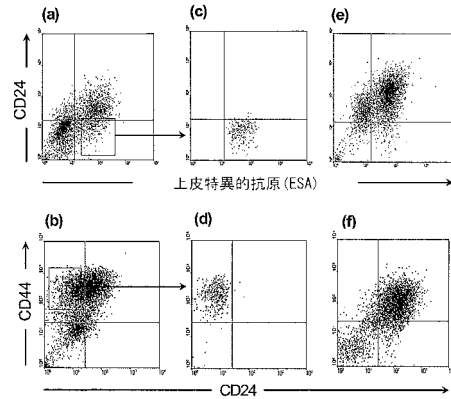
【図 6】



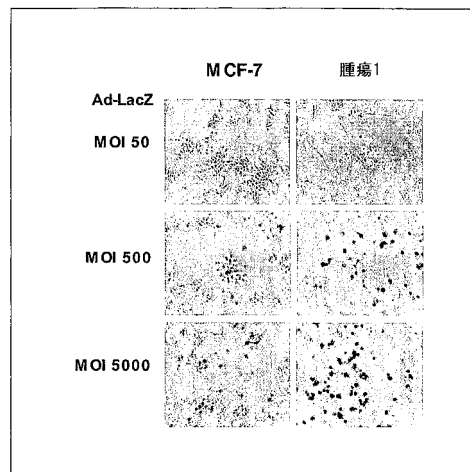
【図 3】



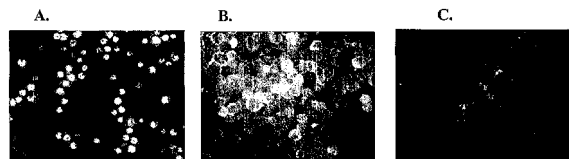
【図 4】



【図 7】

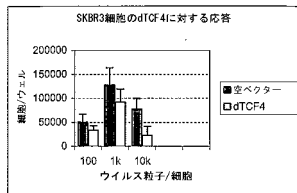


【図 8】

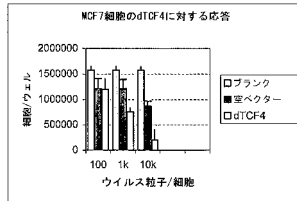


【図 9】

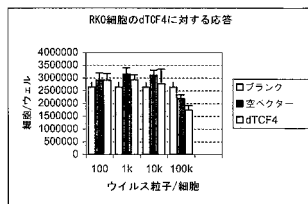
A.



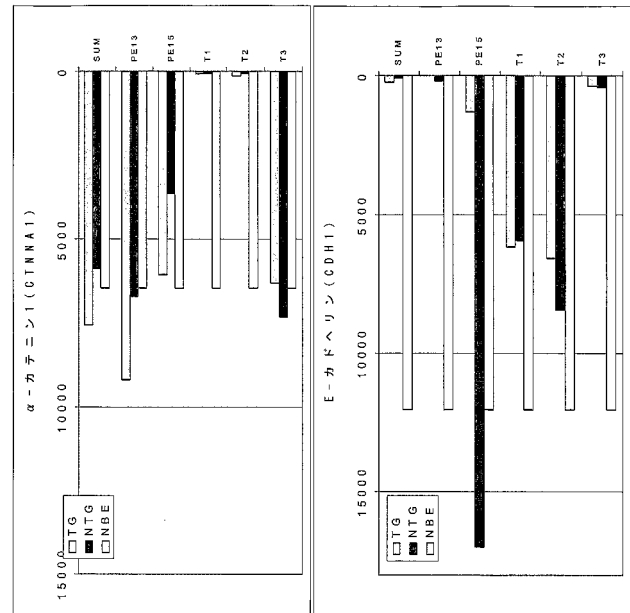
B.



C.



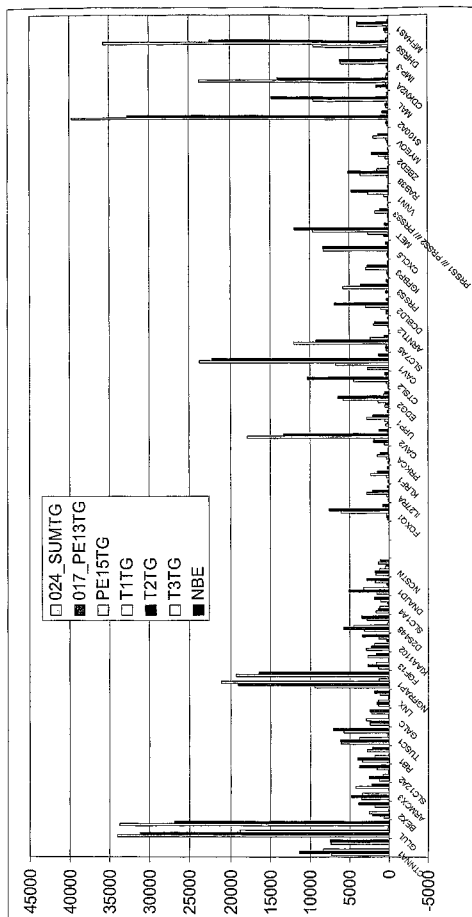
【図 10】



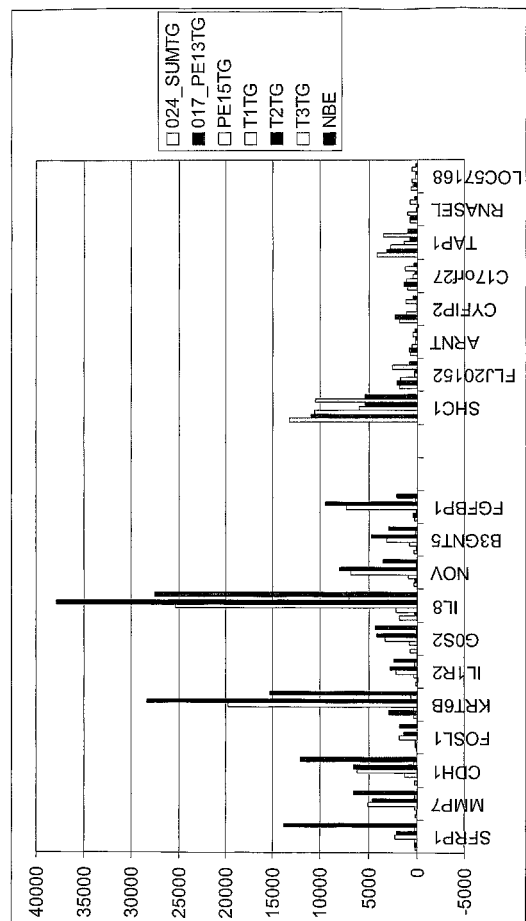
A.

B.

【図 11】

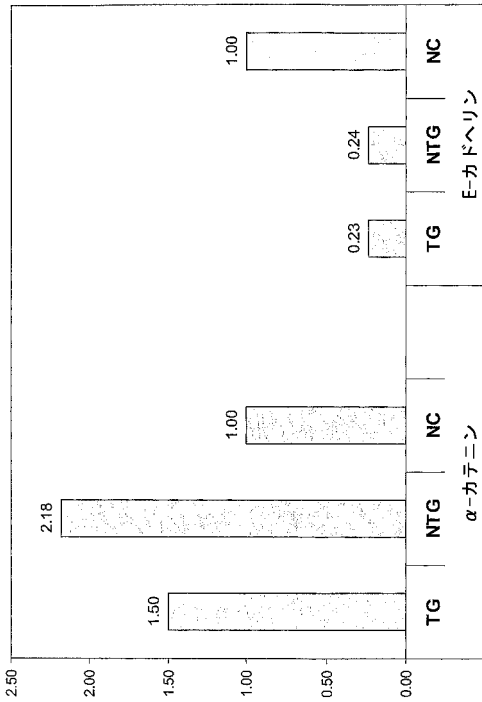


【図 12】



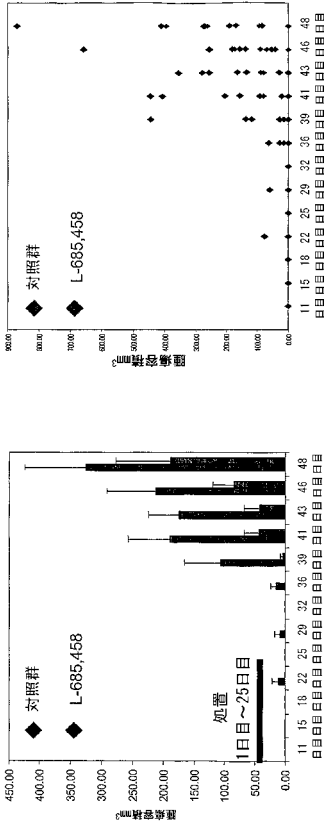
【図 1 5】

リアルタイムPCRは結腸腫瘍におけるα-カテニンおよびE-カドヘリンの示差的発現を示した

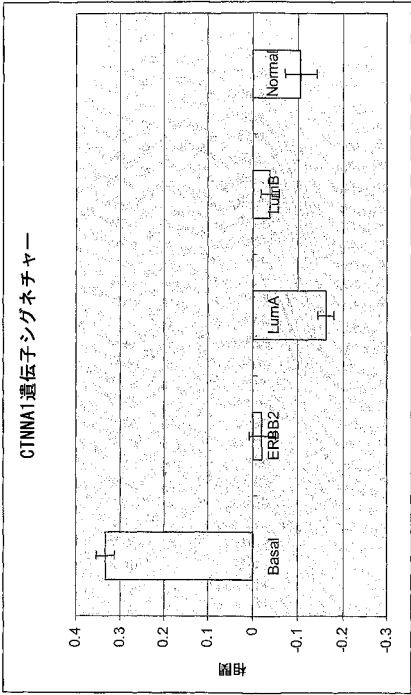


B

A

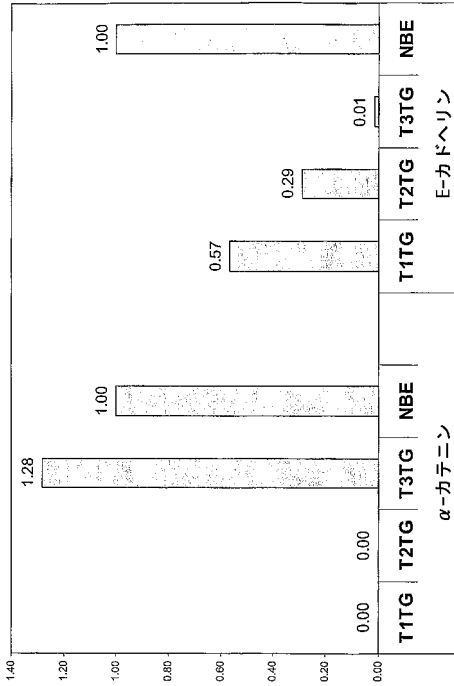


【図 1 6】

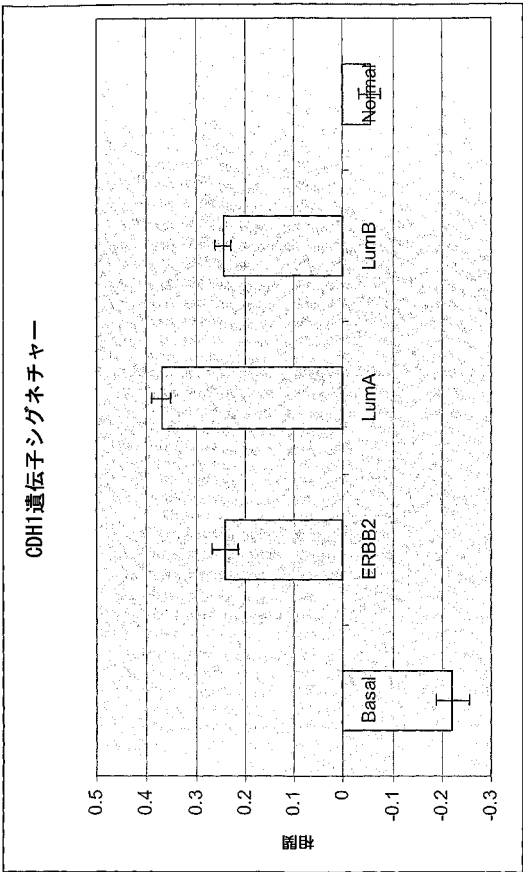


リアルタイムPCRは継代された乳房腫瘍におけるα-カテニンおよびE-カドヘリンの示差的発現を示した

【図 1 4】



【図 17】



【手続補正書】

【提出日】平成20年4月18日(2008.4.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008546387000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/22934

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8)- G01N 33/53, 33/574; C07K 16/00 (2007.01)

USPC- 435/7.23

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)

USPC- 435/7.23

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 435/7.2, 325, 366; 530/387.7, 388.8, 389.7, 828 (text search)

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

PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB);

Search terms: epithelial tumor, microarray, cadherin, tumorigenic, tumor stem cell, catenin, MMP7, FOSL1, IL1R2, SFRP1, KRT6B, GOS2, IL8

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/0119565 A1 (Clarke et al.) 29 August 2002 (29.08.2002), claim 86	1-20
Y	US 2005/0089896 A1 (Roy et al.) 28 April 2005 (28.04.2005), para [0004]	1-20
Y	WO 2005/005601 A2 (Clarke et al.) 20 January 2005 (20.01.2005), Table 4 on p28 In 29; Table 6 on p40 In 38; Table 7B on p44 In 47; Table 7C on p48 In 39, 40, 47, 50, 52; Table 7D on p49 In 22, 37, 41	2-20

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

* 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

12 April 2007 (12.04.2007)

Date of mailing of the international search report

14 SEP 2007

Name and mailing address of the ISA/US

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-1774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/22934

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:

Group I: Claims 1-20.
Group II: Claims 21-50.

While the claims of groups I and II share certain features, like expression levels of alpha-catenin, etc., it will be readily understood that the solid tumor stem cells themselves do not form a unifying feature of the invention. Method claims 21-50, in addition to determining expression levels of certain genes, also involve comparison of expression levels of said genes in a cancer sample as well as classifying the cancer sample as either high or low risk based on said comparison. No such comparison or classification is required in the production of enriched populations of solid tumor stem cells as claimed in claims 1-20.

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 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.:
1-20

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.

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 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	G 0 1 N 33/53	M

(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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ワング シンハオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント ローガン ドライブ 3 8 2 6 5

(72)発明者 レビツキ ジョン エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス ガトス エスコバー アベニュー 3 0 8

(72)発明者 ガーニー オースティン エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート 9 4 6

(72)発明者 クラーク マイケル エフ.

アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー クレイグ ロード 3 3 7 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA11 CA20 DA02 EA02 EA04 HA11 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ53 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34 QS36

QX02

4B065 AA90X AA91X AA95X AB01 BA02 BB25 BB37 BC03 BD45 CA44

CA46

4C084 AA13 AA17 MA01 NA14 ZB262 ZB272

4C085 AA13 AA14 BB01 DD88 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27