

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5117852号
(P5117852)

(45) 発行日 平成25年1月16日(2013.1.16)

(24) 登録日 平成24年10月26日(2012.10.26)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N	33/574	(2006.01)	G O 1 N 33/574 A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N	37/00	(2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 F

請求項の数 19 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2007-525333 (P2007-525333)	(73) 特許権者	508083541
(86) (22) 出願日	平成17年7月27日 (2005.7.27)		カーディフ バイオロジカルズ リミテッド
(65) 公表番号	特表2008-508895 (P2008-508895A)		イギリス国 カーディフ シーエフ24
(43) 公表日	平成20年3月27日 (2008.3.27)		4エーワイ、センゲンネズ ロード、カー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2005/002971		ディフ ビジネス テクノロジー センタ
(87) 国際公開番号	W02006/016110	(74) 代理人	100087398
(87) 国際公開日	平成18年2月16日 (2006.2.16)		弁理士 水野 勝文
審査請求日	平成20年7月22日 (2008.7.22)	(74) 代理人	100067541
(31) 優先権主張番号	0417740.8		弁理士 岸田 正行
(32) 優先日	平成16年8月10日 (2004.8.10)	(74) 代理人	100103506
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 高野 弘晋
(31) 優先権主張番号	0426777.9	(74) 代理人	100105072
(32) 優先日	平成16年12月7日 (2004.12.7)		弁理士 小川 英宣
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌の予後診断方法およびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳類の乳癌の予後の判定を助ける方法であって、

(a) 第1の分子マーカーのセットである AMF、ATF4、Cyr61、ER、マトリプターゼ2、MET、MLN64、MMP7、ネクチン4、PAR1A、Psoriasis、Pttg1、Rho-C、Scotin、SDF1、SEMP1、SPF45、SST1、ST15、TACC2、TBD10、TCF2、TEM6、TEM7R、およびZO-3をコードする遺伝子の発現レベルと、第2の分子マーカーのセットである ARP2、Atf-3、HuR、MEN1、パラセリン、PTP-RKおよびラディキシンをコードする遺伝子の発現レベル並びにgdiGをコードする遺伝子の発現レベルに対する RHO8をコードする遺伝子の発現レベルの比を測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

(b) 第1の分子マーカーのセットについて穏やかな予後であると推定される患者における同一マーカーの発現レベルよりも高レベルの発現が測定される場合、且つ第2の分子マーカーのセットについて穏やかな予後であると推定される患者における同一マーカーの発現レベルよりも低レベルの発現が測定される場合、

(c) 前記組織の試料を採取した前記個体が52.3ヶ月以上生存できるのが14.4%以下の確率であると予測することを含む方法。

【請求項2】

(a)の部分は、第3の分子マーカーのセットであるバシジン(Basigin)、ペ

ータカテニン、BMP1、BMP10、カルパインラーゼ、CD44、CX43、サイクリンD2、EHMS、FAK、FAP、GIRK、HAVR1、アイソトポ3、JAK1、LOX12、NET-2、PAR1A2、PTHrP、Rho-G、S100A4、SPARC、TCF3、VECAD、Vilip、およびWave2をコードする遺伝子の発現レベルと、第4の分子マーカーのセットであるaMOT、Atf-1、Claudin-1、IL22R、Rock2、およびVeg1をコードする遺伝子の発現レベルを測定し、

第1の分子マーカーのセットおよび第3の分子マーカーセットについて穏やかな予後であると推定される患者における同一マーカーの発現レベルよりも高レベルの発現が見られ、且つ第2の分子マーカーのセット第4の分子マーカーセットについて穏やかな予後であると推定される患者における同一マーカーの発現レベルよりも低レベルの発現が測定される場合、前記組織の試料を採取した前記個体が40ヶ月以上生存できるのが8.3%以下の確率であると予測することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記癌組織はヒト由来である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記癌組織は女性由来である、請求項1から3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項5】

前記発現のレベルは、RNAまたはmRNAの存在を分析することにより決定される、請求項1から4のいずれかひとつに記載の方法。

20

【請求項6】

前記発現のレベルは、分子マーカーによってコードされるタンパク質に対しての分析によって決定される、請求項1から5のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項7】

前記方法は、関連タンパク質に結合し、該タンパク質を同定する物質を使用することを伴うことを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記物質は、抗体であることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】

部分(a)の実施前に、選択されたマーカーを増幅することを特徴とする請求項1から4のいずれか1つに記載の方法。

30

【請求項10】

前記マーカーはPCRによって増幅されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

所与の分子マーカーの発現レベルは、対照試料を考慮して決定されるとともに、前記対照試料は、癌を有しない乳房組織の試料、癌が存在しない個体から採取した乳房組織の試料、または、健常な個体における各関連分子マーカーの認識されている標準の発現レベルのいずれかである、請求項1から10のいずれか1つに記載の方法。

【請求項12】

哺乳類の乳癌の予後を判定するキットであって、

40

(a) AMF、ATF4、Cyr61、ER、マトリプターゼ2、MET、MLN64、MMP7、ネクチン4、PAR1A、Psoriasis、Pttg1、Rho-C、Scotin、SDF1、SEMP1、SPF45、SST1、ST15、TACC2、TBD10、TCF2、TEM6、TEM7R、およびZO-3からなる第1のマーカー組内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) ARP2、Atf-3、HuR、MEN1、パラセリン、PTP-RK、ラディキシン、RHO8およびgdiGからなる第2のマーカー組内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、を含むキット。

【請求項13】

前記各遺伝子の発現レベルを決定する、または決定の仕方を示す試薬および説明書をさ

50

らに含む請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

前記キットは、

(a) バシジン、ベータカテニン、BMP 1、BMP 1 0、カルパインラージ、CD 4 4、CX 4 3、サイクリン D 2、EHMS、FAK、FAP、GIRK、HAVR 1、アイソトポ 3、JAK 1、LOX 1 2、NET - 2、PAR 1 A 2、PTHrP、Rho - G、S 1 0 0 A 4、SPARC、TCF 3、VECAD、Vilip、および Wave 2 からなる第 3 のマーカー組内の全遺伝子からの少なくとも 1 つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) aMOT、Atf - 1、Claudin - 1、IL 2 2 R、Rock 2 および Veg 1 からなる第 4 のマーカー組内の全遺伝子からの少なくとも 1 つの転写産物を同定する複数のプローブと、をさらに含む請求項 1 2 に記載のキット。

10

【請求項 1 5】

前記各遺伝子の発現レベルを決定する試薬および説明書をさらに含む請求項 1 4 に記載のキット。

【請求項 1 6】

患者の乳癌での生存可能性を判定するキットであって、

請求項 1 または 2 に記載の分子マーカーを含む分子マーカーの組を同定するための少なくとも 1 組のプローブからなる少なくとも 1 つのマイクロアレイを含むキット。

【請求項 1 7】

20

癌を有しない個体または穏やかな予後であると推定される患者のいずれかにおける前記マーカーの発現レベルを示す内部標準において同じ分子マーカーの組を同定するための複数のプローブからなる第 2 のマイクロアレイをさらに含む請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 に記載の哺乳類の乳癌の予後を判定するためのマイクロアレイ。

【請求項 1 9】

請求項 1 2 から 1 6 のいずれかに記載の哺乳類の乳癌の予後を判定するためのプローブ組。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

本発明は、乳癌の予後診断のための方法およびキット、またはその一部に関する。特に、本方法は、乳癌患者の生存可能性および / または乳癌の治療中またはすでに治療を受けた患者における疾病の再発の可能性および / または癌の転移特性を示す遺伝子発現パターンを同定することを包含する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

乳癌は、英国、米国およびデンマークにおいて最も一般的に見られる女性の癌である。また、工業化された世界において、女性に影響を与える最も一般的な癌の形態でもある。乳癌の発生率は徐々に増加してきており、米国においては、癌による二番目に多い死亡原因ともなっている。実際のところ、1997年には、米国においては推定181,000件の新しい報告がされており、毎年、40,000人が乳癌で死亡していると推定される。この状態に対抗するために行われてきた世界的な努力にも拘わらず、早期の検出と新しい治療法により生存率はここ20~30年のあいだに辛うじて向上してきているが、乳癌の発生率には僅かな変化しか見られない。

40

【0 0 0 3】

殆どの乳癌について腫瘍発生機構はあまり知られていないが、女性を進行性乳癌にかかりやすくする要因は多く存在する。そうした要因としては、出産歴、月経状態、腫瘍の異型度、ER状態、腫瘍の大きさおよび診断および手術のときのリンパ節の障害が挙げられる。さらに、予後は、マンモグラフィまたは他のX線撮影法を用いて、様々な程度まで判

50

定することができる。しかしながら、マンモグラムに危険を伴わないわけではなく、検査中に用いられる放射線のイオン化特性により、乳腫瘍が誘起されることもある。加えて、このような方法は費用が高く、また、技術者によって結果の解釈が異なることもある。たとえば、ある研究では、放射線技師のグループによって解釈された一連のマンモグラムの約3分の1において、大きな臨床的な意見の相違が認められた。さらに、多くの女性が、マンモグラムを受けることを痛い経験として感じている。

【0004】

疾病の予後診断の臨床的实施は、その後に行うべき治療を決定することから、重要である。正確な予後診断により、癌専門医は、たとえば、ホルモン療法または化学療法のいずれを行った方がよいかを選んだり、癌の最も侵襲性の高い場合にのみ手術を勧めることができるようになる。

10

【0005】

しかしながら、非常に早期の段階の疾病を示す患者 (patient) の数は増えてきているため、乳癌においては、早期診断が通常的な特徴となってきた。そのため、癌の結果を評価する従来の方法がより困難となっており、患者の反応の良し悪しには、癌の種類だけではなく、治療のタイミングも鍵となることは、ますます明白になってきている。たとえば、多くの患者が、現在、しばしば毒性のある副作用を引き起こす不要な治療を受けていたり、癌が実際は予測よりも進んでいるにもかかわらず、温存治療の方針が示されていたりする。したがって、適切かつ正確な予後診断を早期に行うことが極めて肝要であると考えられる。

20

【0006】

これまで、臨床情報だけに基づいた予後診断のための満足な予測セットは同定されていなかった。その結果、研究の方向性は、癌を診断および予後診断できることよりも、分子サインの考察に変わってきた。W002/103320は、その発現が臨床予後診断に関連づけられた何千もの遺伝的マーカーを開示しており、それらの遺伝マーカーは、予後の良い患者と予後の良くない患者とを見分けるために用いることができる。発現の判定方法には、患者から採取した組織の試験試料の発現パターンを、良好な予後を示す患者から採取した組織の試料の発現パターン、および既知の予後の良くない患者から採取した試料の発現パターンと比較することと、試験試料が、これらの試料のいずれに、より類似しているかを判定することが含まれる。

30

【0007】

この方法は、予後診断の伝統的な臨床方法よりも進歩したものではあるが、多くの欠点も有している。たとえば、何百もの遺伝子マーカーを解析するには相当の時間がかかり、本質的に実用的ではない。さらに、良好な予後マーカーのいくつかと不良な予後マーカーのいくつかを発現する試料が、一方または他方のいずれの選択肢の予後診断を与えるかが明確でない。このような方法の複雑さ故に、他方の群よりも一方の群に属する遺伝子を多く発現するために患者が間違った予後群に入れられてしまうという意味で不正確となるか、または、明確な答えを提供することができないことがある。前述したように、適切かつ有効な治療のためには、早期かつ正確な予後診断が極めて重要である。したがって、より簡単で、より明確な分子サインが必要であることは明らかである。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

よって、我々は、比較的容易に実施でき、効率的に実行でき、疾病の起こりそうな結果を正確に示す、所与の乳癌の予後を判定するための方法を開発した。我々の方法は、少ないが高い指示性を有し、したがって所与の癌の起こりうる結果を判定する際に特に正確なマーカー試料を使用する。さらに、我々の方法は、次の3つの要素に分割することができる。第1の要素は、乳癌の診察に来た個体の生存可能性を予測することであり、第2の要素は、乳癌の診察に来た個体における癌の再発の可能性を予測することであり、第3の要素は、癌の転移特性を予測することである。当業者には明らかであるように、第2の要素

50

は、乳癌の診察に来た患者(patient)の無発症生存可能性を示し、第3の要素は、疾病の侵襲性を示す。まとめると、我々は、所与の乳癌の予後の判定するときに関連性を有する複数の分子サインを同定した。各分子サインは、その発現レベルが穏やかな予後(後述)の患者からの組織に関して高いか低いかのいずれかであり、所与の結果を示す、複数の遺伝的マーカーからなる。これに加えて、我々は、どの遺伝マーカーが所与の疾病の結果に対して最良の指標となるか、すなわち、分子サインの予測能力に最も寄与するかを同定するために、各分子サインについて分析した。このマーカーのサブセットは、正確な分子サインとして、まとめて知られる。

【0009】

たとえば、高発現が低生存率と相関する2組の分子マーカーからなる第1の分子サインが提供され、第1の組は、本願においては、第1の一次分子サイン[組(A)](AMF、ATF4、Cyr61、ER、マトリプターゼ(Matrilptase)2、MET、MLN64、MMP7、ネクチン(Nectin)4、PAR1A、Psoriasis、Pttg1、Rho-C、Scotin、SDF1、SEMP1、SPF45、SST1、ST15、TACC2、TBD10、TCF2、TEM6、TEM7R、ZO-3)と総称される、低生存率の最も統計的に有意な指標である分子マーカーを含み、第2の組は、前記のものに加えて、第1の二次分子サイン[組(B)](バシジン(Basigin)、ベータカテニン(Beta-catenin)、BMP1、BMP10、カルパイン・ラージ(Calpain large)、CD44、CX43、サイクリン(cyclin)D2、EHMS、FAK、FAP、GIRK、HAVR1、アイソトポ(Isotopo)3、JAK1、LOX12、NET-2、PAR1A2、PTHrP、Rho-G、S100A4、SPARC、TCF3、VECAD、Vilip、Wave2)と総称される分子マーカーのうち少なくとも1つを含む。

【0010】

上記および下記を参照願う。マーカーは、www.NCBI.LM.NIH.govデータベース上で完全な素性が入手できる命名済タンパク質が参照されるか、または当業者に周知である。

【0011】

本文中で用いる高または低発現とは、穏やかな予後を示すと推定される患者、すなわち標準予後指数であるノッティングム予後指数(NPI)が3.4~5.4である患者における同一マーカーの発現レベルのことをいうが、ここで、 $NPI = 0.2 \times \text{腫瘍サイズ} + \text{腫瘍グレード} + \text{結節状態}$ であり、NPI(低)は、3.4未満であり、86%の患者が15年間生き延び、NPI(中)は、3.4~5.4であり、42%の患者が15年間生き延び、NPI(高)は、5.4を超えるものであり、13%の患者しか15年間生き延びられない。

【0012】

さらに、低発現が低生存率と相関する2組の分子マーカーからなる第2の分子サインが提供され、その第1の組は、本願においては、第2の一次分子サイン[組(C)](ARP2、Atf-3、HuR、MEN1、パラセリン(Paracellin)、PTP-RKラディキシン(Radixin)、RHO8/gdiG-Ratio)と総称される低生存率の最も統計的に有意な指標である分子マーカーを含み、第2の組は、前記のものに加えて、第2の二次分子サイン[組(D)](aMOT、Atf-1、Claudin-1、IL22R、Rock2、Veg1)と総称される分子マーカーのうち少なくとも1つを含む。

【0013】

さらに、高発現が低い癌無発症生存率と相関する2組の分子マーカーからなる第3の分子サインが提供され、その第1の組は、本願においては、第3の一次分子サイン[組(E)](AAMP、AMFR、Bmp8、BMP9、ベータカテニン(Beta-catenin)、CAR、Creb12、DRIM、EHMS、エンドムスチン(Endomuscin)2、FAK、FAP、アイソトポ(Isotopo)1、Kiss1/ck1

10

20

30

40

50

9、Notch1、PAR1A、Par1A2、PLC-デルタ(delta)、Psoriasisin、PTTG1、RhoC、Rock1、SDF1、SST1、ST15、TEM6、TEM7R)と総称される、低い癌無発症生存率の最も統計的に有意な指標である分子マーカを含み、第2の組は、前記のものに加えて、第3の二次分子サイン[組(F)](アンジオテンシン(Angiotensin)2R1、ATF4、Bmp10、CASM、カセプシン(cathepsin)S、CX43、エラスターゼ(Elastase)PMN、GIRK、HAVR1、HIN、アイソトポ(Isotopo)3、Kiss1、LOX12、NOS3、PMSA、S100A4、SEMP1、TACC2、ユビキチン(Ubiquitin)、WISP2)と総称される分子マーカのうち少なくとも1つを含む。

10

【0014】

さらに、低発現が低い癌無発症生存率と相関する2組の分子マーカからなる第4の分子サインが提供され、その第1の組は、本願においては、第4の一次分子サイン[組(G)](Bmp3、IL22R、IL24、JAK1、PTP-RK、Rho8/GdiG、Snail、WASP)と総称される、低い癌無発症生存率の最も統計的に有意な指標である分子マーカを含み、第2の組は、前記のものに加えて、第4の二次分子サイン[組(H)](ATF3、Bmp4、BMPR1A、MEN1、パラセリン(Paracellin))と総称される、分子マーカのうち少なくとも1つを含む。

【0015】

さらに、高発現が転移性癌と相関する2組の分子マーカからなる第5の分子サインが提供され、その第1の組は、本願においては、第5の一次分子サイン[組(I)](BAF57、BNDF、CAR1、CASM、カセプシン(Cathepsin)-L、Creb1/2、CXCR10、DRIM、HERG、IL7R、IL-11、Kiss1、MKK1、PMNエラスターゼ(elastase)、PTTP1、SDF5、TACC2、ユビキチン(Ubiquitin)、VIPR1、VUDP)と総称される、転移性癌の最も統計的に有意な指標である分子マーカを含み、第2の組は、前記のものに加えて、第5の二次分子サイン[組(J)](アンジオモチン(Angiomotin)、BMP7、サイクリン(cyclin)D1、DNAリガーゼ(ligase)-1、IGFBP7、LYVE1、NET2、RHO8、SRBC、Stath4、トランスグルタミナーゼ(TGase)-3、ピンクリン(Vinculin)、WAVE2)と総称される、分子マーカのうち少なくとも1つを含む。

20

30

【0016】

最後に、さらに、低発現が転移性癌と相関する2組の分子マーカからなる第6の分子サインが提供され、第1の組は、本願においては、第6の一次分子サイン[組(K)](パラセリン(Paracellin))と総称される、転移性癌の最も統計的に有意な指標である分子マーカを含み、第2の組は、前記のものに加えて、第6の二次分子サイン[組(L)](ALCAM、Eplin、ERベータ(beta)、Glypic3、JAK1、MAGI-1、PEDF、PKC-イータ(eta)、Stathlin、WVWX)と総称される分子マーカのうち少なくとも1つを含む。

【0017】

40

したがって、我々は、乳癌の予後診断における用途を有する、12組の(6組の一次と6組の二次)分子マーカからなる少なくとも6つの分子サインを決定した。これらのサインの解明には、10年以上の研究が伴い、この間に我々は数百の乳癌組織の試料とさらに数百単位の遺伝的分子マーカを体系的かつ注意深く調べてきた。しかしながら、この大きな労力を要する作業を終えたところで、我々は驚くべきことに、所与の乳癌組織の試料に対する正確な予後診断を行うためには、少数の遺伝子しか調べる必要はないことを見いだした。さらに驚くべきことに、我々の分子サインの予測結果に最も寄与する分子マーカを同定することにより、この数をさらに減らすことができた。たとえば、転移性癌に関連する分子サインの場合、20または21遺伝子しか調べる必要がない。このことは、我々の方法が迅速な適用性を持ち、臨床状況において迅速かつ常套的に実施可能であるこ

50

とを意味する。実際、我々が提案するのは、我々の方法が乳癌患者の標準的な治療形態の一部を成すことにより、関係する癌専門医が早期段階において特定の疾病の結果を判断し、それに応じた治療を行えるようにすることである。このように、たとえば、低生存率または結節転移の指標となるサインを示す個体の場合（すなわち、癌が広がっている可能性のある）、迅速かつ攻撃的な形の治療を処方する必要がある。同様に、個体が低い無病生存率の指標となるサインを示す場合、したがって、疾病の再発の可能性がより高い場合には、より頻繁な追跡訪問と検査が必要となる場合もある。反対に、個体が、転移が無いことの指標となるサインを示す場合には、癌専門医は、侵襲性と攻撃性のより少ない治療を処方して、患者を、不要な苦痛と望ましくない副作用から救うようにすることができる。したがって、我々の方法は、個体が各々の遺伝的構成に合わせられた治療を受けられるようにするだけでなく、必要な状態にある者だけに攻撃的な治療を処方することにより、治療中の患者の生活の質を改善することもできる。

10

【 0 0 1 8 】

したがって、本発明の1つの態様において、哺乳類乳癌の予後の判定方法が提供され、該方法は、

(a) 組 (A) 内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

(b) 該マーカーについて高レベルの発現が測定される場合、

(c) 組織の試料を採取した個体の生存可能性が低いと結論づけることを含む。

【 0 0 1 9 】

20

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その (a) の部分において、当該遺伝子が高い発現レベルを有するかどうかを判定するために、組 (B) 内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、および/または当該遺伝子が抑制発現されているかを判定するために、組 (C) 内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、および/または、当該遺伝子が抑制発現されているかを判定するために、組 (D) 内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、上記発現パターンが確認された場合に、当該個体の生存可能性が低いと結論づけることをさらに含む。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらなる態様において、哺乳類乳癌の予後の判定方法が提供され、該方法は、 (a) 組 (C) 内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

30

(b) 該マーカーについて低レベルの発現が測定される場合、

(c) 組織の試料を採取した個体の生存可能性が低いと結論づけることを含む。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その (a) の部分において、当該遺伝子が抑制発現されているか否かを判定するために、組 (D) 内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、されている場合、当該個体の生存可能性が低いと結論づけることを、付加的にまたは代替的に含む。

【 0 0 2 2 】

40

本発明の本態様のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その (a) の部分において、当該遺伝子が過剰発現されているか否かを判定するために、組 (A) 内の遺伝子および/または組 (B) 内の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定することと、されている場合、当該個体の生存可能性が低いと結論づけることをさらに含む。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらなる態様において、哺乳類乳癌の予後の判定方法が提供され、該方法は、 (a) 組 (E) 内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

(b) 該マーカーについて高レベルの発現が測定される場合、

(c) 組織の試料を採取した個体の癌再発可能性が高いと結論づけることを含む。

50

【0024】

本文中で用いる癌再発という用語は、胸部内での局所的または遠隔部位における癌の再発、または転移を含む。

【0025】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その(a)の部分において、当該遺伝子が高い発現レベルを有するかどうかを判定するために、組(F)内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、および/または当該遺伝子が抑制発現されているかを判定するために、組(G)内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定すること、および/または、当該遺伝子が抑制発現されているかを判定するために、組(H)内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、上記発現パターンが確認された場合に、当該個体の癌再発可能性が高いと結論づけることをさらに含む。

10

【0026】

本発明のさらなる態様において、哺乳類乳癌の予後の判定方法が提供され、該方法は、(a)組(G)内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

(b)該マーカーについて低レベルの発現が測定される場合、

(c)組織の試料を採取した個体の癌再発可能性が高いと結論づけることを含む。

【0027】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その(a)の部分において、当該遺伝子が抑制発現されているか否かを判定するために、組(H)内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、されている場合、当該個体の癌再発可能性が高いと結論づけることを、付加的にまたは代替的に含む。

20

【0028】

本発明の本態様のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その(a)の部分において、当該遺伝子が過剰発現されているか否かを判定するために、組(E)内の遺伝子および/または組(F)内の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定することと、されている場合、当該個体の癌再発可能性が高いと結論づけることをさらに含む。

【0029】

本発明のさらなる態様において、哺乳類乳癌の予後の判定方法が提供され、該方法は、(a)組(I)内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

(b)該マーカーについて高レベルの発現が測定される場合、

(c)組織の試料を採取した個体が転移型の癌を有すると結論づけることを含む。

30

【0030】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その(a)の部分において、当該遺伝子が高い発現レベルを有するかどうかを判定するために、組(J)内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、および/または当該遺伝子が抑制発現されているかを判定するために、組(K)内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、および/または、当該遺伝子が抑制発現されているかを判定するために、組(L)内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、上記発現パターンが確認された場合に、当該個体が転移型の癌を有すると結論づけることをさらに含む。

40

【0031】

本発明のさらなる態様において、哺乳類乳癌の予後の判定方法が提供され、該方法は、(a)組(K)内の分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定するために、個体からの乳癌組織の試料を検査することと、

(b)該マーカーについて低レベルの発現が測定される場合、

(c)組織の試料を採取した個体が転移型の癌を有すると結論づけることを含む。

【0032】

50

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その(a)の部分において、当該遺伝子が抑制発現されているか否かを判定するために、組(L)内の少なくとも1つの分子マーカーをコードする遺伝子の発現レベルを測定することと、されている場合、当該個体が転移型の癌を有すると結論づけることを付加的にまたは代替的に含む。

【0033】

本発明の本態様のさらなる好ましい実施形態において、前記方法は、その(a)の部分において、当該遺伝子が過剰発現されているか否かを判定するために、組(I)内の遺伝子および/または組(J)内の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定することと、されている場合、当該個体が転移型の癌を有すると結論づけることをさらに含む。

【0034】

本発明のさらなる態様において、前記すべての方法の任意の組み合わせが提供される。

【0035】

本発明の上記方法のそれぞれにおいて、分析は、理想的にはヒト乳癌組織、さらに好ましくは女性のヒト乳癌組織に対して行われる。

【0036】

本発明の上記方法のそれぞれにおいて、分析される組織の試料は、理想的にはRNAの存在、好ましくは全RNA、さらにより好ましくはmRNAの量について分析される。RNA含量を測定するために利用できる技術は周知であり、実際のところ、臨床診断分野の当業者によって常套的に実施されているものであることが当業者には明らかである。

【0037】

本発明の代替実施形態において、本方法は、分子マーカーのそれぞれによってコードされるタンパク質を分析することを包含し、したがって、典型的には、限定されるものではないが、当該タンパク質に結合する物質を使用して該タンパク質を同定することを包含する。一般的な物質は抗体であり、特に理想的には、有益には適切なタグによって標識され、結合した抗体の存在を判定できるようにしたモノクローナル抗体である。タンパク質同定のための分析の技術は、当業者によって周知であり、実際のところ、臨床診断の分野の従事者によって日常的に使用されているものである。

【0038】

さらに、本発明の方法は、選択されたマーカーをその同定前に増幅することを含んでもよく、この場合、典型的には、増幅は、該マーカーの存在と、増幅度を考慮した量とを決定する前に該マーカーを増幅させるために、関心のある分子マーカーに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたPCR反応によって行われる。

【0039】

本発明を行うさらなる好ましい方法において、所与の分子マーカーの発現レベルは、対照試料を考慮して決定され、対照試料は、癌を有さない乳房組織の試料であるか、ここで同定されるように穏やかな予後を示す患者に由来する試料である。より理想的には、乳房組織のこの試料は、この疾病を示さない個体から採取される。あるいは、対照は、正常な個体における各関連遺伝子の発現の、認識されている標準である。

【0040】

遺伝子発現のレベルは、Jiangら2003aまたはParrおよびJiang、2004に開示される方法を用いて、リアルタイム定量的PCRによって測定してもよい。

【0041】

生存可能性は、患者が今後10年間に生存するであろう可能性を意味する。再発可能性は、癌が10年以内に再発する可能性を意味する。転移型癌とは、その癌が元の器官または組織から、体の他の部位に広がるであろうことを意味する。

【0042】

本発明のさらなる態様によれば、前記方法の任意の1つ以上を実施するキットが提供され、前記キットは、

(a) 前記方法において記載される分子マーカーの少なくとも1組を検出する複数のプローブと、

10

20

30

40

50

(b) 随意で、前記プローブの使用に関する試薬および説明書とを含む。

【0043】

本発明のさらなる好ましい態様において、哺乳類の乳癌の予後を判定するキットが提供され、該キットは、

(a) 組(A)内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) 随意で、前記各遺伝子の発現レベルを測定するか、または決定方法を示す試薬および説明書とを含む。

【0044】

本発明のさらなる実施形態において、前記キットは、

(a) 組(C)内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物、および/または組(B)または(D)内の少なくとも1つの遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) 随意で、前記各遺伝子の発現レベルを測定するか、または決定方法を示す試薬および説明書とをさらに含む。

【0045】

本発明のさらなる好ましい態様において、哺乳類の乳癌の予後を判定するキットが提供され、該キットは、

(a) 組(E)内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) 随意で、前記各遺伝子の発現レベルを測定するか、または決定方法を示す試薬および説明書とを含む。

【0046】

本発明のさらなる実施形態において、前記キットは、

(a) 組(G)内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物、および/または、組(F)または(H)内の少なくとも1つの遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) 随意で、前記各遺伝子の発現レベルを測定するか、または決定方法を示す試薬および説明書とをさらに含む。

【0047】

本発明のさらなる好ましい態様において、哺乳類の乳癌の予後を判定するキットが提供され、該キットは、

(a) 組(I)内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) 随意で、前記各遺伝子の発現レベルを測定するか、または決定方法を示す試薬および説明書とを含む。

【0048】

本発明のさらなる実施形態において、前記キットは、

(a) 組(K)内の各遺伝子からの少なくとも1つの転写産物、および/または、組(J)または(L)内の少なくとも1つの遺伝子からの少なくとも1つの転写産物を同定する複数のプローブと、

(b) 随意で、前記各遺伝子の発現レベルを測定するか、または決定方法を示す試薬および説明書とをさらに含む。

【0049】

本発明のさらなる態様によれば、前記分子マーカーを同定するために、前記プローブの組の任意の選択された組み合わせを含むキットが提供される。

【0050】

本発明のさらなる態様によれば、前記分子マーカーの組の任意の1つ以上の発現レベルを同定するために、前記プローブの組の任意の1つ以上を含むマイクロアレイが提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

本発明の別の態様において、生存可能性、および/または、乳癌の再発、および/または、患者内の癌の転移性を判定するキットが提供され、該キットは、
 (a) 上記方法に記載の分子マーカーの少なくとも 1 組を同定するための複数のプローブを含む少なくとも 1 つのマイクロアレイと、随意で、
 (b) 前記マーカーの正常な発現レベルを示す内部標準において、同じ分子マーカーの組を同定するための複数のプローブを含む第 2 のマイクロアレイとを含む。

【 0 0 5 2 】

本発明は、上述のようなマイクロアレイまたはプローブ組をも提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【 0 0 5 3 】

本発明は、表 1 ~ 3 および図 1 ~ 4 を参照して、以下の実施例によって説明する。

【 0 0 5 4 】

組織と細胞

乳房腫瘍組織および関連する正常組織は、外科手術後に迅速に回収し、使用まで冷凍した。これは、地元の倫理委員会の承認の下に、主に 1991 ~ 1994 年に行い、限られた数のものについては、1995 ~ 1996 年に行った。本解析は、2004 年 6 月における 10 年間の追跡の中央値 (median) に基づいている。本研究では、乳癌組織 (n = 120) と正常なバックグラウンド組織 (n = 32) とを用いた。ヒト乳癌細胞系列 MCF - 7 および MDA MB 231、ヒト線維芽細胞系列 MRC - 5 は、the European Collection of Animal Cell Cultures (E C A C C , Salisbury, England) から購入した。ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) は、TCS Biologicals (Oxford, England) より購入した。外科手術の最中および後の病状についての情報、臨床情報、患者の臨床結果は、外科手術の直後または追跡のときに得た。

20

【 0 0 5 5 】

組織処理

乳房組織は凍結切片化した。切片は、常套的組織学に供する部分と、免疫組織化学に供する部分と、RNA の調製に供する部分との 3 つの部分に分割した。

【 0 0 5 6 】

細胞および組織からの RNA 抽出および cDNA 合成

組織の凍結切片は、5 ~ 10 μ m の厚みに裁断し、免疫組織化学および常套的組織学のために保存した (Jiang et al, 2003a)。さらに 15 ~ 20 枚の切片を手持ち式ホモジナイザーを用いて氷冷 RNA 抽出溶液中でホモジナイズした。RNA の濃度は、UV 分光光度計を用いて決定した。逆転写は、AbGene (商標) によって供給されるアンカードオリゴ d t プライマー付の RT キットを用いて、1 μ g の全 RNA を用いて、96 ウェルプレート中で行った。cDNA の質は、- アクチンプライマーを用いて確認した。RNA 抽出キットおよび RT キットは、AbGene Ltd (Surry, England, UK) より得た。PCR プライマーは、Beacon Designer (California, USA) を用いて設計し、合成は Invitrogen (商標) Ltd (Paisley, Scotland, UK) で行われた。分子生物学グレードアガロースおよび DNA ラダーは、Invitrogen より得た。常套的な PCR および定量的 PCR 用のマスターミックスは AbGene より得た。

30

40

【 0 0 5 7 】

遺伝的マーカーの定量分析

上記調製した cDNA の CCN ファミリーメンバーの転写産物のレベルは、以前に報告された方法 (Jiang et al, 2003a および 2003b) に修正を加えた Amplifluor (商標) 技術 (Nazarenko et al, 1997) に基づいて、リアルタイム定量的 PCR を用いて決定した。すなわち、Beacon Designer ソフトウェア (バージョン 2, California, USA) を用いて PCR プライマー対を設計した。プ

50

ライマーの1つに対して、(我々の研究室では常套的にアンチセンスプライマーに対して)、ユニバーサルZプローブ(Nazarenko et al, 1997)(Intergen Inc., England, UK)に相補的なZ配列(5' act ga acc t g acc g t a c a ' 3)として知られる付加的配列を加えた。アクチン検出用のTaqman(商標)検出キットは、Perkin-Elmer(商標)より購入した。

【0058】

反応は、ホットスタートQ-マスターミックス(Abgene)、10 pmolの特異的順方向プライマー、1 pmolのZ配列を有した逆方向プライマー、10 pmolのFAM-標識プローブ(Intergen Inc.)、および約50 ng(RT反応における出発RNAから計算)RNAからのcDNAを用いて行った。反応は、96反応のリアルタイム検出を可能にする光学ユニットを備えたIcycler IQ(商標)(Bio-Rad(商標))を用いて、94 12時間、94 15秒間と55 40秒間と72 20秒間からなるサイクルを50サイクル(Jiang et al, 2003b、2003c、ParrおよびJiang、2004)の条件で行った。転写産物のレベルは、試料を用いて同時に増幅させた内部標準(Jiang et al, 2003a)から得た。結果は、等量のRNAに基づいた転写産物の濃度、または標的/CK19比の二通りの方法で示す。

10

【0059】

分子の適時免疫組織化学的染色

乳房腫瘍およびバックグラウンド組織の凍結切片は、クリオスタットを用いて6 μmの厚みに裁断した(Jiang et al, 2003c)。切片をスーパーフロストプラス顕微鏡スライド上に載せ、風乾し、50%アセトンと50%メタノールの混合物中で固定した。次に切片を「Optimax」洗浄バッファ中に5~10分間放置して再水和させた。切片を0.6%BSAブロッキング溶液中で20分間インキュベートし、一次抗体を用いて検証した。よく洗浄した後、切片を二次ビオチン化抗体(マルチリンクブタ抗ヤギ/マウス/ウサギ免疫グロブリン、Dako Inc.)中で30分間インキュベートした。洗浄に続いて、Avidin Biotin Complex(Vector Laboratories)を切片に塗布し、よく洗浄した。Diaminobenzidine chromogen(Vector Labs)を切片に加えて、5分間暗中でインキュベートした。その後切片をGill's Haematoxylin中で対比染色して、キシレン中で洗浄する前にメタノールのグレードを上げながら再水和させて、カバースリップを被せた。それぞれのタンパク質の細胞質染色は、我々が以前に開示(Davies et al, 2000、King et al, 2004)したOptimas 6.0ソフトウェアを用いて定量化し、本願では相対染色強度として示す。

20

30

【0060】

統計的解析

統計的解析は、Mann-Whitney UテストとKruskal-Wallisテストとを用いて行った。生存率解析は、 Kaplan-Meier生存曲線と単変量解析(SPS S11)を用いて行った。

【0061】

結果

スクリーニング対象分子

我々は453の分子について、10年間の追跡を含む完全な臨床情報に対しての定量化を行った。生存率および疾病の再発の発生に対する解析に続いて、我々は3つのサイン、すなわち生存分子サインおよび発症予測分子サインおよび転移性分子サインを開発した。

40

【0062】

生存の分子サイン

表1に示すように、51個の分子が低生存率との正相関を有し、14個の分子が低生存率との逆相関を有することが判明した。図1は、本願で「良好なサイン」(表1の左列の分子に高い発現が見られず、表1の右列の分子に抑制発現が見られない)と称されるもの

50

を有する個体の92.2%が、148.9ヶ月まで生き延びると予測されるが、本願で「不良なサイン」（表1の左列の分子に高い発現が見られ、表1の右列の分子に抑制発現が見られる）と呼ぶものを有する個体の8.3%しか、40ヶ月まで生き延びられないと予測されることを示す。この結果は、p値が0.00001未満であり、統計的に有意である。

【0063】

Kaplan-Meier生存曲線と単変量解析を用いて、統計的精度に最も寄与する分子を同定することにより、我々は分子サインを絞り込んだ（表1において*で識別される）。我々は、低生存率と正の相関性を有する25個と、低生存率と負の相関性を有する8個との合計33個の一次分子マーカーが、統計的有意性の大部分を占めることを発見した。図2は、第1の一次および第2の一次分子サインを用いた予測生存曲線を示しており、良好なサインを有する個体の93.2%が、149.69ヶ月まで生き延びると予測され、不良なサインを有する個体のわずか14.4%しか、52.3ヶ月まで生き延びないと予測される（ $p < 0.000001$ ）。

【0064】

無発症予測分子サイン

表2に示すように、48個の分子が発症の発生（再発および転移）との正相関を有し、13個の分子が発症の発生との逆相関を有することが判明した。図3は、本願で「良好なサイン」（表2の左列の分子に高い発現が見られず、表2の右列の分子に抑制発現が見られない）と称されるものを有する個体のうちの94.5%が、150.4ヶ月まで疾病の再発がない（すなわち、無疾病生存）と予測されるが、一方で、本願で「不良なサイン」（表2の左列の分子に高い発現が見られ、表2の右列の分子に抑制発現が見られる）と称されるものを有する個体のうち34.5%だけしか、72.4ヶ月まで無疾病で生きられないと予測されることを示す（ $p < 0.00001$ ）。

【0065】

上記生存率サインと同様に、我々は本サインについても絞り込みを行い、再発と正の相関性を有する28個と、再発と負の相関性を有する8個との合計36個の一次分子マーカー（表2において*で識別）が、統計的有意性の大部分を占めることを発見した。図4は、本願で「良好なサイン」と称されるものを有する個体のうちの91.7%が、148.4ヶ月まで疾病の再発がないと予測されるが、本願で「不良なサイン」と称されるものを有する個体のわずか5.88%しか、44.2ヶ月まで無疾病で生きられないと予測されることを示す。（ $p < 0.000001$ ）。

結節転移の分子サイン

表3に示すように、37個の分子が結節転移との正相関を有し、10個の分子が結節転移との逆相関を有することが判明した。これらの37個の分子の組み合わせでは、不良なサインを示した（すなわち、表3の左列の分子に高い発現が見られ、表3の右列の分子に抑制発現が見られる）腫瘍の91%が、結節転移に進展した。さらに、良好なサインを示した（すなわち、表3の左列の分子に高い発現が見られず、表3の右列の分子に抑制発現が見られない）腫瘍の88.9%に、一切の結節転移が認められなかった。（ $p = 0.00024$ ）。

【0066】

上述のように、我々は組み合わせを絞り込むことによりこのサインを修正し、結節転移と正の相関性を有する20組と、結節転移と負の相関性を有する1組との合計21組の一次遺伝子（表3において*で識別）が、よく予測していたことを発見した。不良なサインを有する腫瘍の89.1%が結節転移を有し、良好なサインを有する腫瘍の86.8%が結節転移を全く有しなかった（ $p = 0.000025$ ）。

【0067】

参考文献

Daviesら、2000：Davies G, Jiang WG, Mason MD. 「ヒトプロテアーゼ癌における細胞間付着とシグナリング中間体（Cell-cell

10

20

30

40

50

adhesion and signalling intermediates in human prostate cancer)」Journal of Urology, 2000, 163, 985~992頁。

Jiangら、2003a: Jiang WG, Watkins G, Lane J, Douglas-Jones A, Cunnick GH, Mokbel M, Mansel RE. 「Rhoファミリーの予後診断価値および乳癌におけるrho-GDI (Prognostic value of Rho family and rho-GDIs in breast cancer)」Clinical Cancer Research, 2003, 9(17), 6432~6440頁。

Jiangら、2003b: Jiang WG, Douglas-Jones A, およ
10
びMansel RE. 「ヒト乳癌におけるPPAR-ガンマの発現レベルと、そのコアクチベータ(PPAR-GCA) (Level of expression of PPAR-gamma and its co-activator (PPAR-GCA) in human breast cancer)」International Journal of Cancer, 2003, 106, 752~757頁。

Jiangら、2003c: Jiang WG, Grimshaw D, Lane J, Martin TA, Parr C, Davies G, Latterra J, およ
20
びMansel RE. 「cMETへのレトロウイルスハンマーヘッド導入遺伝子および線維芽細胞によって誘導される乳房腫瘍のHGF/SF阻害増殖(Retroviral hammerhead transgenes to cMET and HGF/SF inhibited growth of breast tumour, induced by fibroblasts)」Clinical Cancer Research, 2003, 9, 4274~4281頁。

Kingら、2004: King JAC, Ofori-Acquah AF, Stevens T, Al-Mehdi AB, Fodstad O, Jiang WG. 「ヒト乳癌におけるALCAMの予後診断価値(Prognostic value of ALCAM in human breast cancer)」Breast Cancer Research, 2004, R478~487頁。

Nazarenkoら、1997: Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. 「エネルギー転移に基づいたDNAの増幅および検出のための閉管方式(A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer)」Nucleic Acids Res 1997; 25: 2516~2521頁。

ParrおよびJiang 2004: Parr C and Jiang WG. 「ヒト乳癌におけるノッチ受容体、ノッチ-1およびノッチ-2(The Notch receptors, Notch-1 and Notch-2, in human breast cancers)」International Journal of Molecular Medicine, 2004 Nov; 14(5): 779~786頁。

【0068】

10

20

30

40

【表 1】

全生存率に対する分子サイン		発症により低発現	
発症により高発現			
オリジナルキット (図 1 に生存曲線)	修正キット (遺伝子 *で識別、図 2 に生存曲線)	オリジナルキット (図 1)	修正キット (遺伝子 *で識別、図 2 に生存曲線)
AMF	*	aMOT	
ATF4	*	ARP2	*
Basigin		Atf-1	
Beta-catenin		Atf-3	*
BMP1		Claudin-1	
BMP10		HuR (0.05)	*
Calpain large		IL22R	
CD44		MEN1 (0.02)	*
CX43		Paracellin	*
cyclinD2		PTP-RK	*
Cyr61	*	Radixin	*
EHMS		RHO8/gdiG-Ratio	*
ER	*	Rock 2	
FAK		VEG1	
FAP			
GIRK			
HAVR1			
Isotopo3			
JAK1			
LOX12			
Matriptase2	*		
MET	*		
MLN64	*		
MMP7	*		
Nectin4	*		
NET-2			
PAR1A	*		
PAR1A2			
Psoriasis	*		
PTHrP			
Pttg1	*		
Rho-C	*		
Rho-G			
S100A4			
Scotin	*		
SDF1	*		
SEMP1	*		
SPARC			
SPF45	*		
SST1	*		
ST15	*		
TACC2	*		
TBD10	*		
TCF2	*		
TCF3			
TEM6	*		
TEM7R	*		
VECAD			
Vilip			
Wave2			
ZO-3	*		

10

20

30

【 0 0 6 9 】

40

【表 2】

ヒト乳癌における無発症生存率に対する分子サイン
 オリジナルキット、遺伝子=61
 修正キット、遺伝子=36

発症により高発現		発症により低発現	
オリジナルキット (図3 に生存曲線)	修正キット (遺伝子 (*で識別、図4に 生存曲線)	オリジナルキット (図3)	修正キット (遺伝子 (*で識別、図 4に生存曲線)
AAMP	*	ATF3	
AMFR	*	Bmp3	*
Angiotensin2R1		Bmp4	
ATF4		BMPR1A	
Bmp8	*	IL22R	*
BMP9	*	IL24	*
Bmp10		JAK1	*
Beta-catenin	*	MEN1	
CAR	*	Paracellin	
CASM		PTP-RK	*
cathepsinS		Rho8/GdiG	*
Creb12	*	Snail	*
CX43		WASP	*
DRIM	*		
EHMS	*		
Elastase PMN			
Endomuscin2	*		
FAK	*		
FAP	*		
GIRK			
HAVR1			
HIN			
Isotopo1	*		
Isotopo3			
Kiss1			
Kiss1/ck19	*		
LOX12			
NOS3			
Notch1	*		
PAR1A	*		
Par1A2	*		
PLC-delta	*		
PMSA			
Psoriasin	*		
PTTG1	*		
RhoC	*		
Rock1	*		
S100A4			
SDF1	*		
SEMP1			
SST1	*		
ST15	*		
TACC2			
TEM6	*		
TEM7R	*		
Ubiquitin			
WISP2			

10

20

30

【 0 0 7 0 】

【表 3】

結節転移予測に対する分子サイン		発症により有意に低発現	
初期ファイリング	修正サイン (*)	初期ファイリング	修正サイン (*)
Angiomotin		ALCAM	
BAF57	*	Eplin	
BMP7		ERbeta	
BDNF	*	Glypic3	
CAR1	*	JAK1	
CASM	*	MAGI-1	
Cathepsin-L	*	Paracellin	*
Creb1/2	*	PEDF	
CXCR10	*	PKC-eta	
cyclinD1		Stathlin	
DNA ligase-1		WWOX	
DRIM	*		
HERG	*		
IGFBP7			
IL7R	*		
IL-11	*		
Kiss1	*		
LYVE1			
MKK1	*		
NET2			
PMN-elastase	*		
PTTP1	*		
RHO8			
SDF5	*		
SRBC			
Stath4			
TACC2	*		
TGase-3			
Ubiquitin	*		
Vinculin			
VIPR1	*		
VUDP	*		
WAVE2			

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0071】

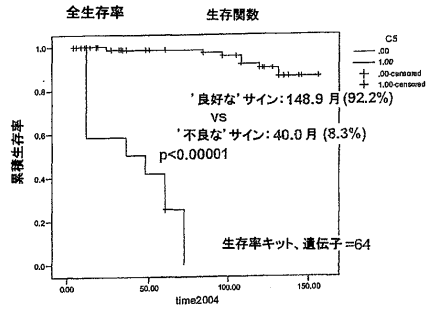
【図1】図1は、表1中のすべてのマーカーに対する Kaplan-Meier 生存曲線を示す。

【図2】図2は、表1において「*」で示したマーカーに対する Kaplan-Meier 生存曲線を示す。

【図3】図3は、表2中のすべてのマーカーに対する Kaplan-Meier 生存曲線を示す。

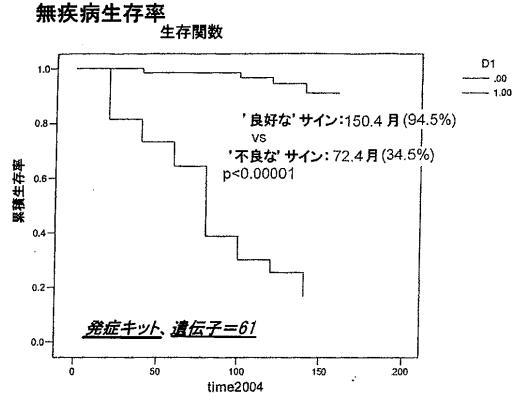
【図4】図4は、表2において「*」で示したマーカーに対する Kaplan-Meier 生存曲線を示す。

【 図 1 】



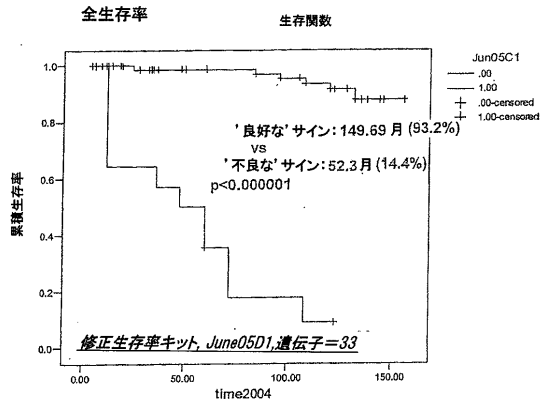
オリジナルキットに対するカプランマイヤー生存率キット

【 図 3 】



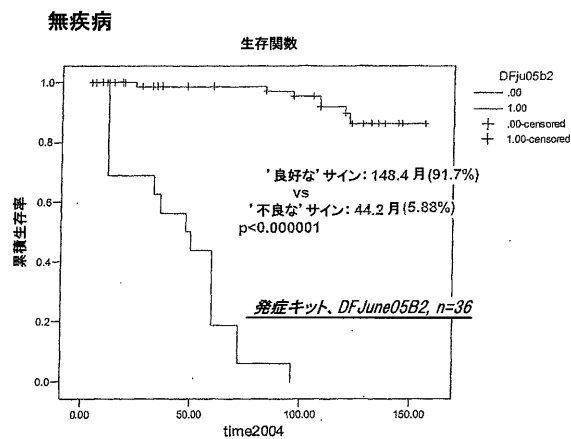
オリジナルキットに基づく、カプランマイヤー生存率曲線(無疾病生存率)

【 図 2 】



修正キットに対するカプランマイヤー生存率キット

【 図 4 】



修正キットに基づくカプランマイヤー生存率キット

フロントページの続き

(74)代理人 100160886

弁理士 久松 洋輔

(72)発明者 ジェン, ウェン グオ

イギリス国 カーディフ シーエフ14 4エックスエヌ, ヒース パーク, カーディフ ユニバーシティ, ウェールズ カレッジ オブ メディシン, ユニバーシティ デパートメント オブ サージェリー

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第03/083141(WO, A1)

国際公開第03/054165(WO, A1)

国際公開第02/059377(WO, A1)

米国特許第05872217(US, A)

国際公開第03/050307(WO, A1)

WITTLIFF JAMES L, JOURNAL OF CLINICAL LIGAND ASSAY, 2003年 4月, V26 N1, P45-49

Laboratory Investigation, Feb. 2004, Vol.84, pp.513-522

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

PubMed