(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年7月2日(02.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/137076 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6869 (2018.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/039415

(22) 国際出願日： 2019年10月4日(04.10.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

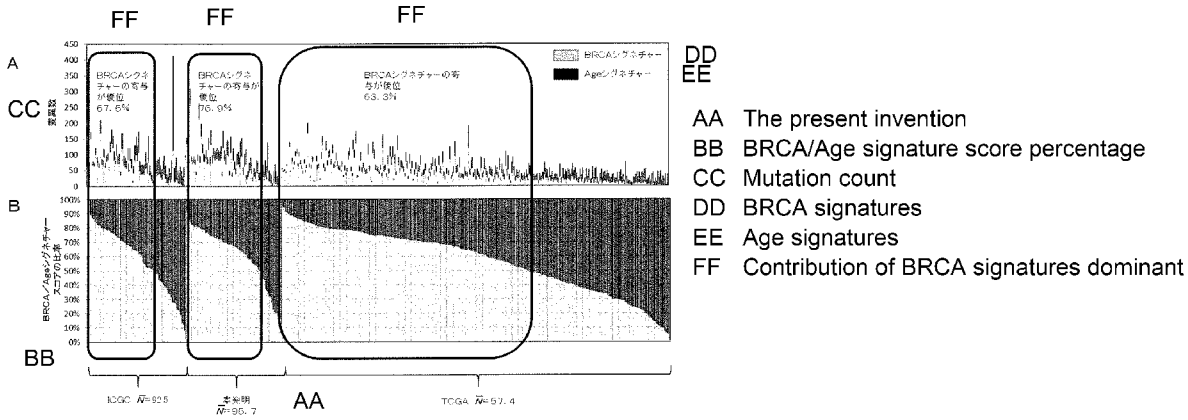
(30) 優先権データ：
特願 2018-248619 2018年12月28日(28.12.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP). 学校法人埼玉医科大学 (**SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷３８ Saitama (JP).

(72) 発明者: 織田 克利 (**ODA Katsutoshi**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 油谷 浩幸 (**ABURATANI Hiroyuki**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 山本 尚吾 (**YAMAMOTO Shogo**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 長谷川 幸清 (**HASEGAWA Kosei**); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷３８ 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).

(54) **Title:** METHOD FOR PREDICTING SUSCEPTIBILITY OF CANCER TO PARP INHIBITORS, AND METHOD FOR DETECTING CANCER HAVING HOMOLOGOUS RECOMBINATION REPAIR DEFICIENCY

(54) 発明の名称： ＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性の予測方法および相同組換修復不全を有する癌の検出方法



(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a method for predicting the susceptibility of a target cancer to PARP inhibitors. The present invention provides a method for predicting the susceptibility of a cancer to PARP inhibitors. The method includes a step for creating a mutation catalog by performing a sequence analysis on nucleic acid samples obtained from cancer cells. The presence of a cancer that is susceptible to PARP inhibitors is indicated by the contribution of BRCA signatures to the mutation catalog being greater than the contribution of Age signatures to the mutation catalog and by an absence of cyclin E1 amplification.

(57) 要約：本発明はＰＡＲＰ阻害剤に対する対象の癌の感受性の予測方法の提供を目的とする。本発明によれば、ＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性を予測する方法であって、癌細胞から得られた核酸試料について配列解析を実施して変異カタログを作成する工程を含んでなり、変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回り、かつサイクリンＥ１増幅が不存在であることが、ＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌の存在を示す予測方法が提供される。

WO 2020/137076 A1

［続葉有］

(74) 代理人: 横田 修孝, 外 (YOKOTA Nobutaka et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町２丁目１７－１７ アイオス永田町６１３ フィールズ国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て：

一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)）

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

ＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性の予測方法および相同組換修復不全を有する癌の検出方法

関連出願の参照

[0001] 本願は、先行する日本国出願である特願２０１８－２４８６１９（出願日：２０１８年１２月２８日）の優先権の利益を享受するものであり、その開示内容全体は引用することにより本明細書の一部とされる。

技術分野

[0002] 本発明は、ＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性の予測方法および相同組換修復不全を有する癌の検出方法に関する。

背景技術

[0003] 近年、癌細胞特異的に生じている遺伝子やタンパク質の変化を標的とした分子標的薬が開発されている。このような分子標的薬は癌細胞を標的とし、正常細胞は傷害しないため、副作用が低減された抗癌剤として注目されている。分子標的薬を投与するためには、癌種の診断だけではなく、分子レベルで遺伝子変異やタンパクの変化を検出することが必要となる。

[0004] 分子標的薬のうち、相同組換修復異常（Homologous Recombination Deficiency：ＨＲＤ）を標的として開発されたポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ（Poly（ADP-ribose）polymerase1：ＰＡＲＰ）阻害剤であるオラパリブは、２０１４年に米食品医薬品局（ＦＤＡ）により生殖細胞系列ＢＲＣＡ突然変異を有する再発卵巣癌について承認された。ＰＡＲＰは、ＤＮＡの一本鎖切断および二本鎖切断の修復に関与する酵素であり、二本鎖切断の修復は相同組換え（homologous recombination：ＨＲ）によって行われる。一方、ＢＲＣＡ１／２遺伝子は、ＤＮＡの二本鎖切断修復におけるＨＲに重要な役割を持つ。ＢＲＣＡ１／２変異を有する細胞においてＰＡＲＰ阻害剤を作用させると、相同組換えによるＤＮＡ修復が阻害され、その結果細胞死が起こ

り、抗腫瘍効果が得られる。

[0005] 漿液性卵巣癌において、生殖細胞系列ＢＲＣＡ１／２突然変異は約２割であるのに対し、ＨＲＤは約５割であることが報告されている（非特許文献１）。ＰＡＲＰ阻害剤はＨＲＤを標的とする薬剤であるため、生殖細胞系列ＢＲＣＡ１／２突然変異を有する対象に限定することなく、ＨＲＤを有する癌を有する患者へ広く投与することが望ましい。しかし、これまで、ＨＲＤを過不足なく評価する適切なバイオマーカーが存在しなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature, 474: 609-615 (2011)

発明の概要

[0007] 本発明は、ＰＡＲＰ阻害剤に対する対象の癌の感受性の予測方法と、相同組換修復不全を有する癌の検出方法を提供することを目的とする。

[0008] 本発明者らは今般、卵巣漿液性癌の症例について全エクソンシークエンス解析に基づく変異シグネチャー解析を実施したところ、変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、Ａｇｅシグネチャーの寄与を上回る症例が７７％であることを見出した。本発明者らはまた、相同組換修復不全を有する癌の存在を示すバイオマーカー（ＭＳＢＭ）を設定し、全エクソンシークエンス解析および非負値行列因子分解（ＮＭＦ）等を行ったところ、ＭＳＢＭ陽性症例が６８％であることを見出した。本発明者らはさらに、癌遺伝子パネル検査を用いたＭＳＢＭ判定を実施し、ＭＳＢＭ陽性が相同組換修復不全やＰＡＲＰ阻害剤の感受性の指標となりうることを見出した。本発明者らはさらにまた、変異カタログに対する３０種の変異シグネチャーの寄与度をｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析により算出し、その解析結果に基づいてＭＳＢＭ判定を実施できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

[0009] 本発明によれば以下の発明が提供される。

［１］ＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性を予測する方法であって、

癌細胞から得られた核酸試料について配列解析を実施して変異カタログを作成する工程を含んでなり、（Ａ）（ａ１）変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回り、かつ（ａ２）サイクリンＥ１増幅が不存在であることが、ＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌の存在を示す、予測方法。

［２］前記癌細胞が癌患者から得られた細胞である、上記［１］に記載の方法。

［３］前記癌が相同組換修復異常を示す可能性がある癌である、上記［１］または［２］に記載の方法。

［４］前記ＰＡＲＰ阻害剤が、オラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、ベリパリブまたはタラゾパリブである、上記［１］～［３］のいずれかに記載の方法。

［５］前記配列解析が配列決定手順および配列データ解析手順を含んでなる、上記［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］前記配列解析により図１に記載の９６種の置換分類に従って体細胞遺伝子変異を同定し、変異カタログを作成する、上記［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］前記配列解析を全エクソンシークエンス解析により行う、上記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］前記配列解析を癌遺伝子パネル検査により行う、上記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［９］下記工程（１）～（３）：

（１）ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを準備すること、

（２）変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの寄与を評価すること、および

（３）Ａｇｅシグネチャーの寄与に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価すること

をさらに含んでなる、上記［１］～［８］のいずれかに記載の方法。

［１０］前記工程（１）において、感受性を予測する癌を患う複数の癌患者について変異シグネチャー解析を実施し、Ａｇｅシグネチャーおよび／またはＢＲＣＡシグネチャーの置換変異の変異率を特定することによりＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを準備する、上記［９］に記載の方法。

［１１］前記工程（２）において、変異カタログについて、Ａｇｅシグネチャースコアおよびシグネチャースコアを算出することにより寄与を評価する、上記［９］に記載の方法。

［１２］Ａｇｅシグネチャースコアが下記式（１）：

[数1]

$$\mathrm{SCORE(AGE)}=\sum_{i=1}^{n} KAi \times Mi \cdots \text{式(1)}$$

（上記式中、ｎ＝９６であり、ｉは、図１に記載の９６種の置換分類のうちｉ番目の置換変異を意味し、Ｍｉは、前記変異カタログのｉ番目の置換変異の変異率または変異数であり、ＫＡｉは、Ａｇｅシグネチャーのｉ番目の置換変異の変異率である。）

により算出される、上記［１１］に記載の方法。

［１３］ＢＲＣＡシグネチャースコアが下記式（２）：

[数2]

$$\mathrm{SCORE(BRCA)}=\sum_{i=1}^{n} KBi \times Mi \cdots \text{式(2)}$$

（上記式中、ｎ＝９６であり、ｉは、図１に記載の９６種の置換分類のうちｉ番目の置換変異を意味し、Ｍｉは、前記変異カタログのｉ番目の置換変異の変異率または変異数であり、ＫＢｉは、ＢＲＣＡシグネチャーのｉ番目の置換変異の変異率である。）

により算出される、上記［１１］に記載の方法。

［１４］前記工程（３）において、Ａｇｅシグネチャースコアと、ＢＲＣＡシグネチャースコアとの和に対するＢＲＣＡシグネチャースコアの比率Ａ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価する、上記［９］および［１１］～［１３］のいずれかに記載の方法。

［１５］前記工程（３）において、ＣからＴへの置換以外の置換変異のスコア（ＢＲＣＡシグネチャースコア）と、ＣからＴへの置換変異のスコア（Ａｇｅシグネチャースコア）との和に対するＣからＴへの置換以外の置換変異のスコアの比率Ｂ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価する、上記［９］および［１１］～［１３］のいずれかに記載の方法。

［１６］比率Ａ（％）が５０％を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、上記［１４］に記載の方法。

［１７］比率Ｂ（％）が５０％を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、上記［１５］に記載の方法。

［１８］下記工程（４）～（６）：

（４）Ａｇｅシグネチャーおよびシグネチャーを少なくとも含む変異シグネチャーを準備すること、

（５）変異カタログに対する変異シグネチャーそれぞれの寄与度を評価すること、および

（６）Ａｇｅシグネチャーの寄与度に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価すること

をさらに含んでなる、上記［１］～［８］のいずれかに記載の方法。

［１９］（７）前記変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度を評価することをさらに含んでなる、上記［１８］に記載の方法。

［２０］前記変異シグネチャーが、ＣＯＳＭＩＣデータベースの３０種の変異シグネチャーの全部または一部を含む、上記［１８］に記載の方法。

［２１］前記工程（５）において、変異カタログに対する変異シグネチャーの寄与度をｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析により評価する、上記［１

８］に記載の方法。

［２２］前記工程（６）において、Ａｇｅシグネチャーの寄与度と、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度との和に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｃ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価する、上記［１８］に記載の方法。

［２３］前記工程（６）において、Ａｇｅシグネチャーの寄与度と、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度との和に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｃ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価し、かつ、

前記工程（７）において、前記変異シグネチャーの寄与度の和（１）に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｄ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度を評価する、上記［１９］に記載の方法。

［２４］比率Ｃ（％）が５０％を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、上記［２２］に記載の方法。

［２５］比率Ｃ（％）が５０％を超え、かつ、比率Ｄ（％）がｋ％（ｋ＝２０～３０）を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、上記［２３］に記載の方法。

［２６］条件（Ａ）の（ａ１）および（ａ２）の両方が満たされる場合に、前記癌細胞がＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌細胞集団を含むと判定する工程を含む、上記［１］～［２５］のいずれかに記載の方法。

［２７］対象の被験試料について網羅的メチル化解析を実施する工程をさらに含んでなり、（Ｂ）ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化がＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌の存在を示す、上記［１］～［２６］のいずれかに記載の方法。

［２８］相同組換修復不全（ＨＲＤ）を有する癌を検出する方法であって、

癌細胞から得られた核酸試料について配列解析を実施して変異カタログを作成する工程を含んでなり、（Ａ）（ａ１）変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を

上回り、かつ（ａ２）サイクリンＥ１増幅が不存在であることが、相同組換修復不全を有する癌の存在を示す、検出方法。

［２９］対象の被験試料について網羅的メチル化解析を実施する工程をさらに含んでなり、（Ｂ）ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化が相同組換修復不全を有する癌の存在を示す、上記［２８］に記載の検出方法。

［３０］ＰＡＲＰ阻害剤による癌患者の治療方法であって、上記［１］～［２７］のいずれかに記載の方法を実施してＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌を有する癌患者を特定するか、あるいは上記［２８］または［２９］に記載の方法を実施して相同組換修復不全を有する癌を有する癌患者を特定し、次いで、該患者に有効量のＰＡＲＰ阻害剤を投与することを含んでなる、治療方法。

［３１］ＰＡＲＰ阻害剤を有効成分として含んでなる癌治療剤であって、前記治療が上記［３０］に記載の方法により行われることを特徴とする、癌治療剤。

[0010] 上記［１］～［２７］の予測方法と上記［２８］および［２９］の検出方法を、以下「本発明の方法」ということがある。

[0011] 本発明の方法によれば、相同組換修復不全を有する癌を過不足なく検出することができる点において有利である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、ヒト癌における体細胞遺伝子置換変異の６クラス９６種の置換分類を示す図である。各クラスには変異した塩基の１塩基手前のヌクレオチド４種類と１塩基後ろのヌクレオチド４種類の１６のトリヌクレオチド配列が含まれ、６クラスの置換変異は９６種類のトリヌクレオチド配列に分類される。

[図2]図２は、例１（１）における、卵巣漿液性癌７８例の新鮮凍結検体について全エクソンシークエンス解析を用いて行った変異シグネチャー解析を示す図である。（Ａ）非負値行列因子分解（ＮＭＦ）によるシグネチャー数と安定性および振れ幅との関係を示す。（Ｂ）卵巣漿液性癌７８例の遺伝子変

異（変異カタログ）を統合し、非負値行列因子分解（ＮＭＦ）を行うことにより抽出したＡｇｅシグネチャーとＢＲＣＡシグネチャーを示す。各シグネチャーは９６置換分類によって示される。横軸は変異型（９６種の置換分類、図１参照）を示し、縦軸は特定の変異型の変異の割合を示す。変異シグネチャーは、ヒトゲノムのトリヌクレオチド頻度に基づいて表示される。

[図3]図３は、例１（２）における、卵巣漿液性癌７８例の新鮮凍結検体について全エクソンシークエンス解析による各症例の変異カタログへの変異シグネチャーの寄与を示す図である。各棒グラフは各症例を示し、（Ａ）と（Ｂ）で各症例を対応させて配置した。（Ａ）各症例の変異カタログへのＢＲＣＡシグネチャーとＡｇｅシグネチャーの寄与を非負値行列因子分解（ＮＭＦ）により解析した結果を示す。縦軸は変異数を表す。ＢＲＣＡシグネチャースコアとＡｇｅシグネチャースコアとの和に対する各シグネチャースコアの比率を各症例で算出した。（Ｂ）（Ａ）における各症例の変異数を１００％としたときのシグネチャースコアの比率に基づいてソートした図を示す。ＢＲＣＡシグネチャーが優位に寄与する症例は７６．９％（７８例中６０例）であり、平均変異数は９５．７であった。

[図4]図４は、例１（２）における、ＴＣＧＡ、ＩＣＧＣおよび高異型度卵巣癌７８例における各症例の変異カタログへの変異シグネチャーの寄与を示す図である。各縦線は各症例を示し、（Ａ）と（Ｂ）で各症例を対応させて配置した。（Ａ）各症例の体細胞変異へのＢＲＣＡシグネチャーとＡｇｅシグネチャーの寄与を非負値行列因子分解（ＮＭＦ）により解析した結果を示す。縦軸は変異数を表す。ＢＲＣＡシグネチャーの寄与の比率とＡｇｅシグネチャーの寄与の比率との総和に対する各シグネチャーの寄与の比率を各症例で算出した。（Ｂ）（Ａ）における各症例の変異数を１００％としたときの各シグネチャーの寄与の比率に基づいてソートした図を示す。ＢＲＣＡシグネチャーが優位に寄与する症例は、ＩＣＧＣでは６７．５％（８０例中５４例、平均変異数は９２．５）であり、ＴＣＧＡでは６３．３％（３１６例中２００例、平均変異数は５７．４）であった。

[図5]図５は、例２（２）において、卵巣漿液性癌７８例の新鮮凍結検体について全エクソンシークエンス解析、非負値行列因子分解（ＮＭＦ）、網羅的メチル化解析およびサイクリンＥ１増幅の解析を行い、その結果（優位に寄与するシグネチャー、ＢＲＣＡ１プロモーター領域のメチル化の有無およびサイクリンＥ１増幅の有無）を示した図である。ＭＳＢＭによる判定を行った結果、６８％の症例がＭＳＢＭ陽性と判定された。灰色のマスは、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与が優位な症例、ＢＲＣＡ１プロモーター領域のメチル化を有する症例あるいはサイクリンＥ１増幅の不存在の症例を表す。

[図6]図６は、例３における、癌遺伝子パネル検査による各症例の変異カタログを示す。症例Ｘは、ｇＢＲＣＡ１／２変異陽性であり、かつ、ＭＳＢＭ陽性であった。

[図7]図７は、例３における、癌遺伝子パネル検査による各症例の変異カタログを示す。症例Ｙは、ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性であり、かつ、ＭＳＢＭ陽性であった。

[図8]図８は、例３における、癌遺伝子パネル検査による各症例の変異カタログを示す。症例Ｚは、ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性であり、かつ、ＭＳＢＭ陰性であった。

[図9]図９は、ＴＣＧＡ、ＩＣＧＣおよび高異型度卵巣癌７８例について、例１（２）におけるＮＭＦ解析の結果と、例４におけるｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析の結果の比較を示す図である。（Ａ）各症例の体細胞変異へのＢＲＣＡシグネチャーとＡｇｅシグネチャーの寄与を非負値行列因子分解（ＮＭＦ）により解析した結果を示す。ＢＲＣＡシグネチャーの寄与の比率とＡｇｅシグネチャーの寄与の比率との総和に対する各シグネチャーの寄与の比率を各症例で算出し、各症例の変異数を１００％としたときの各シグネチャーの寄与の比率に基づいてソートした図を示す（図４Ｂ参照）。（Ｂ）各症例の体細胞変異へのＢＲＣＡシグネチャーとＡｇｅシグネチャーの寄与度をｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓにより解析した結果を示す。ＢＲＣＡシグネチャーとＡｇｅシグネチャーの寄与度のみ表示し、これら２種以外の

シグネチャーの寄与は表示していないため、各症例において寄与度の合計が１とはならない。

[図10]図１０は、ＴＣＧＡ、ＩＣＧＣおよび高異型度卵巣癌７８例について、例１（２）におけるＮＭＦ解析と、例４におけるｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析による、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与を示す散布図である。

[図11]図１１は、ＴＣＧＡ、ＩＣＧＣおよび高異型度卵巣癌７８例について、例１（２）におけるＮＭＦ解析と、例４におけるｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析による、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与を示す散布図である。

[図12]図１２は、高異型度卵巣癌７８例について、例１（２）におけるＮＭＦ解析と、例４におけるｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析による、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与を示す散布図である。

発明の具体的説明

[0013] 本発明において「ＰＡＲＰ阻害剤」とは、ポリ（ＡＤＰリボース）ポリメラーゼ－１の機能を阻害する薬剤をいい、例えば、オラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、ベリパリブおよびタラゾパリブが挙げられる。

[0014] 本発明において癌細胞は癌患者から得られた細胞とすることができる。頻度は稀ながら、ＢＲＣＡ遺伝子の生殖細胞系列変異は広く固形癌にもみられることから（Mandelker D et al., JAMA. 318:825-835(2017)）、本発明において癌は、血液の腫瘍を除く癌、あるいは固形癌とすることができる。本発明の好ましい態様においては、癌は、相同組換修復異常を示す可能性がある癌とすることができ、そのような癌としては、例えば、卵巣癌（特に、卵巣漿液性癌、類内膜癌、癌肉腫、混合癌、未分化癌等の高異型度卵巣癌）、乳癌、前立腺癌、膵臓癌が挙げられる。

[0015] 本発明において「感受性」とは、薬剤の標準的な用量または標準的な治療手順に対する応答を意味する。

[0016] 本発明において「Ａｇｅシグネチャー」（Age Signature）とは、癌細胞において加齢と相関を示す変異シグネチャーである。本発明において、「ＢＲＣＡシグネチャー」（BRCA Signature）とは、癌細胞においてＢＲＣＡ１／

２変異およびＢＲＣＡ１／２不活性化を含む要因による相同組換修復異常と相関を示す変異シグネチャーである。

[0017] 本発明において「変異シグネチャー」とは、複数のヒト癌における体細胞遺伝子置換変異から抽出される特徴的な変異パターンないしプロフィールであり、６クラス９６種の置換分類（Ｃ→Ａ、Ｃ→Ｇ、Ｃ→Ｔ、Ｔ→Ａ、Ｔ→Ｃ、Ｔ→Ｇそれぞれについて１６種の塩基置換トリヌクレオチド、図１参照）に従って分類し、変異型を横軸に、特定の変異型に寄与する変異の比率を縦軸に表示することができる（Alexandrov LB et al., Nature, 500:415-421 (2013)）。

[0018] 本発明において「変異カタログ」とは、被験核酸試料について特定された体細胞遺伝子置換変異を６クラス９６種の置換分類（Ｃ→Ａ、Ｃ→Ｇ、Ｃ→Ｔ、Ｔ→Ａ、Ｔ→Ｃ、Ｔ→Ｇそれぞれについて１６種の塩基置換トリヌクレオチド、図１参照）に従って分類ないし整理したものである。分類ないし整理された置換変異は変異率（％）（すべての置換変異に対する割合）あるいは変異数で表現することができる。

[0019] 本発明の方法は、癌細胞から得られた核酸試料について配列解析を実施する工程を含む。配列解析は、ＤＮＡシークエンス解析、ＲＮＡシークエンス解析、全エクソンシークエンス解析、全ゲノムシークエンス解析が挙げられ、本発明においてはＰＡＲＰ阻害剤に対する対象の癌の感受性を予測でき、相同組換修復不全を有する癌を検出できる限り特に制限なく使用することができる。配列解析はまた、癌遺伝子パネル検査により実施してもよく、本発明に使用可能な癌遺伝子パネル検査としては、東大オンコパネル（Todai OncoPanel）（東京大学医学部附属病院）、MSK-IMPACT、Foundation Oneが挙げられる。なお、本発明が全エクソンシークエンス解析や全ゲノムシークエンス解析との関係で薬事承認された場合には、本発明はＰＡＲＰ阻害剤の感受性を正確に判定できる体外診断薬として位置づけられるため有利である。

[0020] 本発明において配列解析は、配列決定手順と配列データ解析手順とから構成されていてもよく、例えば、核酸試料について配列決定手順を実施し、配

列決定手順により得られた配列データに基づいて配列データ解析手順を実施することができる。

[0021] 配列決定手順では、対象から得られた核酸試料について配列を決定し、核酸試料の配列データを得る工程を含むことができる。配列決定は、例えば、次世代シークエンサーを用いて実施することができる。

[0022] 配列データ解析手順では、得られた配列データを解析し、所望の解析結果を得る工程を含むことができる。配列データの解析は、変異カタログの作成のための解析、条件（Ａ）や条件（Ｂ）の判定のための解析、シグネチャー解析を含むことができる。

[0023] 変異カタログの作成のための解析は、例えば、以下のようにして行うことができる。すなわち、配列データ解析により被験核酸試料について体細胞遺伝子変異を同定し、同定した体細胞遺伝子変異を図１に記載の９６種の置換分類に従って分類ないし整理することにより被験核酸試料の変異カタログを作成することができる。ここで、体細胞遺伝子変異の同定は、癌患者の正常組織（例えば、血液中の白血球、非腫瘍部分の手術・生検組織検体）の配列データと、癌患者の腫瘍組織（例えば、癌細胞）の配列データとの対比により行うことができる。このような配列データの比較と体細胞遺伝子変異の同定は公知のアルゴリズム（例えば、Totoki et al., Nat Genet. 2014 Dec;46(12):1267-73）に従って実施することができる。また、同定される変異としては、塩基の置換、欠失、挿入および付加、コピー数変化、逆位、転座、融合遺伝子が挙げられる。

[0024] 条件（Ａ）のうち条件（ａ１）の判定のための解析では、評価対象となる症例について得られた変異カタログがＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーのいずれに類似しているかを、すなわち、Ａｇｅシグネチャーの寄与に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性の程度を分析することができる。このような分析は非負値行列因子分解（ＮＭＦ）等のパターン認識のための公知のアルゴリズムを用いて実施することができ、あるいは、以下（１）～（３）のように実施することもできる。

[0025] （１）ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの準備

（１）では図１に記載の９６種の置換分類に従って、Ａｇｅシグネチャーおよび／またはＢＲＣＡシグネチャーの置換変異の変異率を準備する。例えば、感受性を予測する癌を患う複数の癌患者の核酸試料について予め変異シグネチャー解析を実施し、図１に記載の９６種の置換分類について、Ａｇｅシグネチャーおよび／またはＢＲＣＡシグネチャーの置換変異の変異率を特定することができる。変異シグネチャー解析は、例えば、Alexandrov LB et al., Nature, 500:415-21(2013)の記載に従って実施することができ、その中で非負値行列因子分解（ＮＭＦ）により変異シグネチャー解析を実施することができる。また、シグネチャー解析は変異カタログの解析手法と同じ手法を使用することが好ましい。例えば、全エクソンシークエンス解析により変異カタログを作成したときは、変異シグネチャー解析も全エクソンシークエンス解析により実施することができる。

[0026] （１）ではまた、変異シグネチャー解析を実施する代わりに、公知のＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの置換変異の変異率を使用してもよい（例えば、Alexandrov LB et al., Nature, 500:415-421(2013)参照）。ここで、変異率は、ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを特徴付ける、置換分類ごとの重み付け（係数）と言い換えることができる。また、変異シグネチャー解析により得られた変異率あるいは公知の変異率はそのまま後記（２）に使用することができるが、よりよい判定を実施するために変異率の一部または全部を任意で変更してもよい。

[0027] （２）変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの寄与の評価

（２）では被験核酸試料の変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーのそれぞれの寄与を評価する。Ａｇｅシグネチャーの寄与およびＢＲＣＡシグネチャーの寄与は、非負値行列因子分解（ＮＭＦ）により解析することができる。Ａｇｅシグネチャーの寄与およびＢＲＣＡシグネチャーの寄与の評価はまた、変異カタログについて、Ａｇｅシグネチ

ャースコアおよびＢＲＣＡシグネチャースコアを算出することにより行うことができる。具体的には、Ａｇｅシグネチャースコアおよびシグネチャースコアは、９６種の置換変異すべてについて、変異カタログを構成する置換変異量（変異率あるいは個数）に上記（１）で得られた置換変異の変異率を乗じて積を算出し、９６種の置換変異について得られた積の合計値を求めることにより算出することができる。

[0028] 例えば、Ａｇｅシグネチャースコアは下記のように算出することができる。

[数3]

$$SCORE(AGE)=KA_1\times M_1+KA_2\times M_2+\cdots+KA_{95}\times M_{95}+KA_{96}\times M_{96}$$

$$=\sum_{i=1}^{n} KAi\times Mi\cdots式(1)$$

（上記式中、ｎ＝９６（すなわちｉ＝１～９６）であり、ｉは、図１に記載の９６種の置換分類のうちｉ番目の置換変異を意味し、Ｍｉは、前記変異カタログのｉ番目の置換変異の変異率または変異数であり、ＫＡｉは、Ａｇｅシグネチャーのｉ番目の置換変異の変異率である。）

[0029] またＢＲＣＡシグネチャースコアは、例えば、下記のように算出することができる。

[数4]

$$SCORE(BRCA)=KB_1\times M_1+KB_2\times M_2+\cdots+KB_{95}\times M_{95}+KB_{96}\times M_{96}$$

$$=\sum_{i=1}^{n} KBi\times Mi\cdots式(2)$$

（上記式中、ｎ＝９６（すなわちｉ＝１～９６）であり、ｉは、図１に記載の９６種の置換分類のうちｉ番目の置換変異を意味し、Ｍｉは、前記変異カタログのｉ番目の置換変異の変異率であり、ＫＢｉは、ＢＲＣＡシグネチャーのｉ番目の置換変異の変異率である。）

[0030] （３）Ａｇｅシグネチャーの寄与に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優

位性の評価

（３）ではＡｇｅシグネチャーの寄与に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価する。具体的には、上記（２）で算出したＡｇｅシグネチャースコアとＢＲＣＡシグネチャースコアに基づいてどちらのシグネチャーが変異カタログに対して優位であるかを評価する。例えば、Ａｇｅシグネチャースコアと、ＢＲＣＡシグネチャースコアとの和に対するＢＲＣＡシグネチャースコアの比率Ａ（％）を算出し、該比率Ａに基づいて優位性を評価することができる。得られた比率Ａが５０％を超える場合には、変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回ると、すなわち、条件（ａ１）を満たすと判定することができる。

[0031] 配列解析を全エクソンシークエンス解析または全ゲノムシークエンス解析により実施する場合には、ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの変異率はAlexandrov LB et al., Nature, 500:415-421(2013)に記載されたＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーに基づいて決定することができ、あるいは、シグネチャー解析を行ってＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを設定し、それに基づいて変異率を決定してもよい。

[0032] 配列解析を癌遺伝子パネル検査により実施する場合には、シグネチャー解析を行ってＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを設定し、それに基づいて変異率を決定することができ、あるいは、ＣからＴへの置換変異以外の置換変異（図１のｉ＝１～３２および４９～９６の置換変異に対応）がＢＲＣＡシグネチャーを反映し、ＣからＴへの置換変異（図１のｉ＝３３～４８の置換変異に対応）がＡｇｅシグネチャーを反映することを前提として、Ａｇｅシグネチャースコアおよびシグネチャースコアを算出してもよい。後者の場合には、Ａｇｅシグネチャースコアは、前記式（１）（ここで、ｉ＝３３～４８のときはＫＡｉ＝１であり、ｉ＝１～３２および４９～９６のときはＫＡｉ＝０である）により算出することができ、ＢＲＣＡシグネチャースコアは、前記式（２）（ここで、ｉ＝１～３２および４９～

９６のときはＫＢｉ＝１であり、ｉ＝３３～４８のときはＫＢｉ＝０である）により算出することができる。例えば、ＣからＴへの置換以外の置換変異のスコア（ＢＲＣＡシグネチャースコア）と、ＣからＴへの置換変異のスコア（Ａｇｅシグネチャースコア）との和に対するＣからＴへの置換以外の置換変異のスコアの比率Ｂ（％）を算出し、該比率Ｂに基づいて優位性を評価することができる。得られた比率Ｂが５０％を超える場合には、変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回ると、すなわち、条件（ａ１）を満たすと判定することができる。

[0033] 条件（Ａ）のうち条件（ａ１）の判定のための解析はまた、以下（４）～（６）のように実施することもできる。

[0034] （４）変異シグネチャーの準備

（４）では図１に記載の９６種の置換分類に従って、Ａｇｅシグネチャーおよびシグネチャーを少なくとも含む複数の変異シグネチャーを準備する。（４）で準備する変異シグネチャーの個数の下限値は１０種または２０種とすることができ、個数の上限値は７０個、６０個、５０個または４０個とすることができる。これらの下限値および上限値はそれぞれ任意に組み合わせることができ、上記個数の範囲は、例えば、１０～７０種または２０～４０種とすることができる。

[0035] Ａｇｅシグネチャーおよびシグネチャーを少なくとも含む変異シグネチャーは、公知の変異シグネチャーのセットを利用することができ、例えば、英国サンガー研究所のＣＯＳＭＩＣ（Catalogue of somatic mutations in cancer）データベースに登録されている３０種の変異シグネチャー（COSMIC version 2）の全部または一部や、同研究所のＣＯＳＭＩＣデータベースに登録されている変異シグネチャー（COSMIC version 3）のうちSBS（Single Base Substitution）シグネチャー（６７種）、Doublet Base Substitution（DBS）シグネチャー（１１種）またはSmall Insertion and Deletion（ID）シグネチャー（１７種）の全部または一部を使用することができる。

[0036] （５）変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の評価

（５）では被験核酸試料の変異カタログに対する変異シグネチャーそれぞれの寄与度を評価する。例えば、３０種の変異シグネチャーを準備した場合には、変異カタログの変異プロフィールを再構築できるような、３０種の変異シグネチャーそれぞれに対する最適な重み（寄与度）を計算することにより寄与度を評価することができる。このような寄与度の計算は公知のプログラムを利用して実施することができ、例えば、ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析（Rosenthal et al., Genome Biology, 17:31 (2016)）により実施することができる。

[0037] （６）Ａｇｅシグネチャーの寄与度に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性の評価

（６）ではＡｇｅシグネチャーの寄与度に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価する。具体的には、上記（５）で算出したＡｇｅシグネチャーの寄与度とＢＲＣＡシグネチャーの寄与度に基づいてどちらのシグネチャーが変異カタログに対して優位であるかを評価する。例えば、Ａｇｅシグネチャーの寄与度と、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度との和に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｃ（％）を算出し、該比率に基づいて優位性を評価することができる。得られた比率Ｃが５０％を超える場合には、変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与度を上回ると、すなわち、条件（ａ１）を満たすと判定することができる。

[0038] 条件（Ａ）のうち条件（ａ１）の判定のための解析では、上記（４）～（６）に加えて以下（７）をさらに実施することができる。

（７）変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の評価

（７）では変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度を評価する。具体的には、上記（５）で算出したＢＲＣＡシグネチャーの寄与度に基づいて、準備した変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチ

ャーが占める割合を評価する。例えば、準備したすべての変異シグネチャーの寄与度の和（１００％）に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｄ（％）を算出し、該比率Ｄに基づいてＢＲＣＡシグネチャーの寄与度を評価することができる。前記（６）で得られた比率Ｃが５０％を超え、かつ、（７）で得られた比率Ｄがｋ％（ｋ＝１５～４０、好ましくは２０～３０）を超える場合には、変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与度を上回ると、すなわち、条件（ａ１）を満たすと判定することができる。

[0039] 条件（Ａ）のうち条件（ａ２）の判定のための解析では、サイクリンＥ１のゲノム領域のプローブ（ＳＮＰ）を指標にして染色体コピー数を解析することができる。サイクリンＥ１の染色体数コピー数が２以下である場合に条件（ａ２）を満たすと判定することができる。

[0040] 条件（Ｂ）の判定のための解析では、網羅的メチル化解析を実施し、被験試料におけるＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化を同定することができる。網羅的メチル化解析の手法は公知であり、例えば、The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature, 474: 609-615 (2011)に従って実施することができる。

[0041] 本発明においては、下記条件（Ａ）を満たす場合（すなわち、条件（ａ１）および（ａ２）の両方を満たす場合）に、対象の癌が、ＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌である可能性が高い、あるいは、相同組換修復不全を有する癌である可能性が高いと判断することができる。

条件（Ａ）：（ａ１）変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回り、かつ（ａ２）サイクリンＥ１増幅が不存在であること

[0042] 本明細書では、条件（Ａ）の特徴ないしプロフィールをMutational Signature-based BioMarker（ＭＳＢＭ）といい、少なくとも条件（Ａ）を満たす場合をＭＳＢＭ陽性と、条件（Ａ）を満たさない場合をＭＳＢＭ陰性と、それぞれいうことがある。条件（Ａ）を満たす場合、すなわち、シークエンス解

析の結果、条件（ａ１）と条件（ａ２）の両方が満たされると判断される場合には、ＭＳＢＭ陽性と判定することができる。なお、条件（ａ１）の判定のための解析を工程（４）～（６）により実施する場合には、正確な判定の観点から、工程（７）をさらに実施するとともに、条件（Ａ）を下記条件とすることができる。

条件（Ａ）：（ａ１）変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回るとともに、変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がｋ％（ｋ＝１５～４０）を超え、かつ（ａ２）サイクリンＥ１増幅が不存在であること

[0043] 本発明においては、下記条件（Ｂ）を補助的に用いることができ、下記条件（Ｂ）を満たす場合に、対象の癌が、ＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌である可能性が高い、あるいは、相同組換修復不全を有する癌である可能性が高いと判断することができる。

条件（Ｂ）：ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化

[0044] 条件（Ｂ）を満たす場合、すなわち、網羅的メチル化解析の結果、ＢＲＣＡ１のプロモーター領域がメチル化されていると判断される場合には、条件（Ａ）が満たされることを条件に、ＭＳＢＭ陽性と判定することができる。この意味において、条件（Ｂ）のプロフィールを場合によってはＭＳＢＭということがある。

[0045] 本発明においてはＭＳＢＭの陽性・陰性の判断はｇＢＲＣＡ変異の解析結果に左右されない。従って、対象がｇＢＲＣＡ変異１／２陰性であっても、条件（Ａ）が満たされれば、ＭＳＢＭの陽性と判定することができる。

[0046] 条件（ａ１）の「Ａｇｅシグネチャーに対するＢＲＣＡシグネチャーの優位性」は、核酸試料について得られたＡｇｅシグネチャースコアの総計と、ＢＲＣＡシグネチャースコアの総計との和に対するＢＲＣＡシグネチャースコアの総計の比率（％）に基づいて決定することができ、該比率が５０％を超える場合に、条件（ａ１）を満たすと判定することができる。

[0047] 条件（ａ２）の「サイクリンＥ１増幅の不存在」は、サイクリンＥ１の染

色体数コピー数が２以下である場合に条件（ａ２）を満たすと判定することができ、染色体数が２を上回る場合には条件（ａ２）を満たさないと判定することができる。

[0048] 本発明の方法では、感受性を予測する癌を患う複数の癌患者の核酸試料について予め変異シグネチャー解析を実施し、図１に記載の９６種の置換分類について、ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの置換変異の変異率を特定することができる。すなわち、本発明の方法によれば、配列解析の種別ごとにＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを設定し、最適な検査方法を構築することができる。例えば、特定の癌遺伝子パネル検査においてシグネチャー解析を実施してＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを準備し、その癌遺伝子パネル検査において予め準備したＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを用いて、本発明の方法に従ってＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性を正確かつ簡便に予測するとともに、相同組換修復不全（ＨＲＤ）を有する癌を正確かつ簡便に検出することができる。なお、癌遺伝子パネル検査においてシグネチャー解析を実施する場合にはアーカイブ検体を利用して実施してもよい。

[0049] 本発明によれば、ＰＡＲＰ阻害剤による癌患者の治療方法であって、本発明の予測方法を実施してＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌を有する癌患者を特定するか、あるいは本発明の検出方法を実施して相同組換修復不全を有する癌を有する癌患者を特定し、次いで、該患者に有効量のＰＡＲＰ阻害剤を投与することを含んでなる、治療方法が提供される。本発明によればまた、ＰＡＲＰ阻害剤を有効成分として含んでなる癌治療剤であって、前記治療が本発明の治療方法の手順により行われることを特徴とする、癌治療剤が提供される。本発明の治療方法において、ＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌を有する癌患者を特定することや、相同組換修復不全を有する癌を有する癌患者を特定することは、本発明の予測方法や検出方法に関する記載に従って実施することができる。ＰＡＲＰ阻害剤の治療上の有効量はその薬剤の標準的な用量とすることができる。例えば、オラパリブについては

、６００ｍｇ（有害事象により適宜漸減する場合がある）を成人の１日分の有効投与量（経口投与）とすることができ、例えば、１回３００ｍｇを１日２回（３００ｍｇ×２回／日）（有害事象により、２５０ｍｇ×２回／日、２００ｍｇ×２回／日など漸減する場合がある）投与することができる。本発明の治療方法および本発明の治療剤によれば、ＰＡＲＰ阻害剤の奏効可能性が高い癌患者に対してＰＡＲＰ阻害剤を投与することができるため、癌患者（特にＨＲＤを示す癌患者）に適した治療選択肢を提供できる点で有利である。

実施例

[0050] 以下の例に基づき本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

[0051] 例１：全エクソンシークエンス解析による変異シグネチャー解析

（１）高異型度卵巣癌における変異シグネチャー解析

高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例における癌細胞および正常細胞（血液）の新鮮凍結検体について、全エクソンシークエンス解析を実施（東京大学先端科学技術研究センター）し、Alexandrov LB et al., Nature, 500:415-21(2013)の記載に従って変異シグネチャー解析（Mutational signature）を行った。全エクソンシークエンス解析における各症例の変異カタログを統合し、非負値行列因子分解（Nonnegative Matrix Factorization；NMF、Lee DD and Seung HS, Nature, 401(6755):1999）を用いてクラスタリングを行い、クラスター数（変異シグネチャー数）による安定性（Stability）および振れ幅（Reconstruction Error）を算出した（Sawada et al., Gastroenterology, 150:1171-1182(2016)、Rosales RA et al., Bioinformatics, 33:8-16（2017)、Patch et al., Nature, 521:489-94（2015））。ここで、安定性が高く振れ幅が低いほど、クラスタリングが安定しているとみなされる。

[0052] 結果は、図２に示される通りであった。図２Ａの結果から、シグネチャー数を増やすほど振れ幅の値が下がるが安定性はシグネチャー数３の場合は０．５であるのに対し、シグネチャー数２の場合では１．０に近い値となり、

シグネチャー数２とする方が、安定性が顕著に高い結果となった。安定性と振れ幅との比が大きいほど安定であることから、２つのシグネチャー（Ａｇｅシグネチャーとｂｒｃａシグネチャー）に分ける妥当性が示された。また、図２Ｂの結果から、Ａｇｅシグネチャーではｃからｔへの置換、ｂｒｃａシグネチャーでは塩基置換の変異が均一、といったそれぞれのシグネチャーにおける遺伝子変異の特徴的なパターン（Alexandrov LB et al., Nature, 500:415-421(2013)）が確認された。

[0053] （２）全エクソンシークエンス解析を用いた高異型度卵巣癌に優位に寄与するシグネチャーの判定

高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例について、上記（１）における全エクソンシークエンス解析による各症例の変異カタログについてｂｒｃａシグネチャーとＡｇｅシグネチャーの寄与（contribution）を非負値行列因子分解（ＮＭＦ）に基づいて解析した。具体的には、各症例の体細胞遺伝子変異の各塩基置換の変異数を同定した。ここで、塩基置換は６クラス（Ｃ→Ａ、Ｃ→Ｇ、Ｃ→Ｔ、Ｔ→Ａ、Ｔ→ＣおよびＴ→Ｇ）に分類することができ、さらに各置換塩基の５’および３’に隣接する塩基を含めると各クラスは１６のトリヌクレオチド配列を含むため全体では９６種の塩基置換トリヌクレオチドに分類することができる（Serena Nki-Zainal et al., Cell 149:979-993(2012)）。各症例について９６種の置換分類に従って、変異したトリヌクレオチド配列の数（変異数）と変異率を同定して、変異カタログを作成し、スコア化した。スコア化は、置換分類ごとに、変異率と、上記（１）で算出されたＡｇｅシグネチャーまたはｂｒｃａシグネチャーにおける変異したトリヌクレオチド配列の変異率（図２Ｂ参照）との乗法による積を算出することにより行った。Ａｇｅシグネチャーまたはｂｒｃａシグネチャーとの関係で算出した積の和をＡｇｅシグネチャースコアまたはｂｒｃａシグネチャースコアとした。各症例について、Ａｇｅシグネチャースコアとｂｒｃａシグネチャースコアとの和に対するＡｇｅシグネチャースコアまたはｂｒｃａシグネチャースコアの比率（％）を算出した。また、公的なデータセットであ

るＴＣＧＡおよびＩＣＧＣにおける変異カタログについても同様にして比率を算出しソートした。

[0054] 結果は、図３および図４に示される通りであった。Ａｇｅシグネチャーの寄与に対してＢＲＣＡシグネチャーの寄与が優位な症例が７６．９％であることが確認された。また、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与が優位な群ではＡｇｅシグネチャーの寄与が優位な群と比較して有意に変異数が多い（ｐ＜０．０００１）ことが確認された（図３参照）。ＴＣＧＡまたはＩＣＧＣにおける非負値行列因子分解（ＮＭＦ）では、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与が優位な症例がそれぞれ６３．３％および６７．５％であることが確認された（図４参照）。

[0055] 例２：全エクソンシークエンス解析におけるバイオマーカー（ＭＳＢＭ）の設定

（１）ＭＳＢＭの設定

卵巣漿液性癌では、サイクリンＥ１（Cyclin E1；ＣＣＮＥ１）の増幅はＡｇｅシグネチャーと正に相関すること（Etemadmoghadam, D. et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 110:9489-94 (2013)、Patch AM et al., Nature, 521:489-94 (2015)）が知られている。従って、「変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回り、かつ、サイクリンＥ１の増幅が不存在である」を条件（Ａ）とし、条件（Ａ）に対応するプロフィールを、相同組換修復異常を標的としたＰＡＲＰ阻害剤への感受性を予測するバイオマーカーおよび相同組換修復異常を検出するバイオマーカーと設定した。また、ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化はＢＲＣＡ１失活の要因となり相同組換修復異常をもたらすことが知られている（The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature, 474: 609-615 (2011)、Moschetta M et al., Ann Oncol, 8:1449-55 (2016)）。そこで、「ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化を有する」を条件（Ｂ）とした。

[0056] 条件（Ａ）については、さらに条件（ａ１）：「変異カタログに対するＢ

ＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回る」と条件（ａ２）：「サイクリンＥ１の増幅が不存在である」とに分け、条件（ａ１）および条件（ａ２）の両方を満たす場合に条件Ａを満たすとした。条件（ａ１）は全エクソンシークエンス解析および非負値行列因子分解（ＮＭＦ）により、具体的には、各症例の変異カタログについてＢＲＣＡシグネチャースコアとＡｇｅシグネチャースコアを例１（２）に記載の方法に従って算出し、ＢＲＣＡシグネチャースコアとＡｇｅシグネチャースコアの和に対するＢＲＣＡシグネチャースコアの比率が５０％を超える場合に条件（ａ１）を満たすと判定した。条件（ａ２）は、サイクリンＥ１のゲノム領域のプローブ（ＳＮＰ）を調べることにより染色体コピー数を解析し、サイクリンＥ１の染色体コピー数が２以下である場合に条件（ａ２）を満たすと判定した（Ohshima et al., Sci Rep, 7:641 (2017)）。

[0057] 条件（Ｂ）については、網羅的メチル化解析（Ouchi K et al., Cancer Sci., 106:1722-9 (2015)）を実施した。具体的には、メチル化アレイ（Infinium Human Methylation450 BeadChip、イルミナ社製）をもとに、ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化プローブ６～１２個を抽出し、メチル化の値に基づいてクラスタリングを行い、高メチル化群と低メチル化群に分けた。高メチル化群を条件（Ｂ）を満たすと判定した。

[0058] （２）卵巣漿液性癌におけるＭＳＢＭによる判定

高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例において上記（１）に記載の方法および基準に従ってＭＳＢＭによる判定を行った。結果は、図５に示される通りであった。高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例のうち、６８％の症例がＭＳＢＭ陽性であることが示された。

[0059] 例３：癌遺伝子パネル検査におけるＭＳＢＭの設定

（１）変異カタログに対して優位に寄与するシグネチャーの判定

例２（２）において実施した高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例の全エクソンシークエンス解析および非負値行列因子分解（ＮＭＦ）によるＭＳＢＭ判定に続いて、７症例について、癌遺伝子パネル検査を用いてＭＳＢＭ

判定を実施した。具体的には卵巣漿液性癌（漿液性腹膜癌を含む）７例において、患者から採取した腫瘍組織と血液からＤＮＡを抽出し、Todai OncoPanel（東京大学医学部附属病院）を用いて配列決定および配列データ解析を実施し、各症例の変異カタログを作成した。変異カタログは、図１に記載の９６種の置換分類と置換変異ごとの変異率に基づいて作成した。

[0060] さらに、生殖細胞系列ＢＲＣＡ（germline BRCA；ｇＢＲＣＡ）突然変異は、既知のデータベースであるＣｌｉｎＶａｒ（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/）、COSMIC（http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/）およびOncoKB（https://oncokb.org/#/）を参照して、病的意義づけを判定した。具体的には、データベースにおいて「病原性あり」または「その可能性が高い」という判定の場合に、生殖細胞系列ＢＲＣＡ突然変異陽性とした。ＶＵＳ（意義不明）という判定の場合には、生殖細胞系列ＢＲＣＡ突然変異陽性とした。

[0061]（２）結果

各症例の変異カタログとｇＢＲＣＡ変異解析の結果をＸ、ＹおよびＺに分類し、結果を図６～８に示した。なお、いずれの症例についてもサイクリンＥ１増幅は認められなかった（データ示さず）。

[0062] 分類Ｘ

図６は分類Ｘの結果について示す。ｇＢＲＣＡ変異の解析によると、症例Ｘ１（子宮体部　卵巣癌　低分化類内膜腺癌）、症例Ｘ２（リンパ節　卵巣癌のリンパ節転移、症例Ｘ１と同一患者）および症例Ｘ３（脾臓　卵巣癌の脾門部への播種）は、いずれもｇＢＲＣＡ１／２変異陽性であった。従って、症例Ｘ１、Ｘ２およびＸ３の変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与はＡｇｅシグネチャーの寄与を上回ることが予測された。症例Ｘ１、症例Ｘ２および症例Ｘ３のいずれの変異カタログにおいても、ＣからＴへの置換をＡｇｅシグネチャーとした場合のＡｇｅシグネチャーのスコア（前記式（１）（ここで、ｉ＝３３～４８のときはＫＡｉ＝１であり、ｉ＝１～３２および４９～９６のときはＫＡｉ＝０である）に従って算出できる。例３

において以下同様。）と、ＣからＴへの置換以外の置換（ＣからＡ、ＣからＧ、ＴからＡ、ＴからＣおよびＴからＧへの置換、以下同様）のスコア（前記式（２）（ここで、ｉ＝１～３２および４９～９６のときはＫＢｉ＝１であり、ｉ＝３３～４８のときはＫＢｉ＝０である）に従って算出できる。例３において以下同様。）との和に対するＣからＴへの置換以外の置換のスコアが５０％を超えることが確認された。以上の結果から、ＣからＴへの置換以外の置換をＢＲＣＡシグネチャーと設定できる可能性が示唆された。すなわち、Todai OncoPanelの検査では、ＢＲＣＡシグネチャー（ＣからＴへの置換以外の置換に対応）の寄与がＡｇｅシグネチャー（ＣからＴへの置換に対応）の寄与を上回ることは相同組換修復不全を有する癌の指標となりうると考えられる。

[0063] また、ｇＢＲＣＡ変異の解析によると症例Ｘ１、Ｘ２およびＸ３は、ｇＢＲＣＡ１／２変異陽性であった。これらの結果から、分類Ｘの症例は「ｇＢＲＣＡ１／２変異陽性」であり、かつ、「ＭＳＢＭ陽性」であるといえる。症例Ｘ３では、ＰＡＲＰ阻害剤オラパリブの投与により無増悪生存が維持されることが確認された。上記から、ＭＳＢＭによる判定により相同組換修復異常（ＨＲＤ）を有する癌を検出でき、ＰＡＲＰ阻害剤に対する感受性を予測できることが確認された。

[0064] 分類Ｙ

図７は症例Ｙの結果について示す。症例Ｙ１（卵巣癌、転移性乳癌）および症例Ｙ２（卵巣癌、転移性乳癌）のいずれにおいても、分類Ｘに記載の方法と同様に計算して、ＢＲＣＡシグネチャー（ＣからＴへの置換以外の置換に対応）スコアとＡｇｅシグネチャー（ＣからＴへの置換に対応）スコアとの和に対するＢＲＣＡシグネチャースコアが５０％を超えることが確認された。さらに、分類Ｘと分類Ｙとの結果から、Todai OncoPanelにおける解析では、ＢＲＣＡシグネチャーがＴからＣへの置換パターンを示す傾向を有する可能性が示唆された。このように、今後の症例の蓄積により、Todai OncoPanelにおけるＢＲＣＡシグネチャーおよびＡｇｅシグネチャーをより詳細に決

定できることが確認された。

[0065] また、ｇＢＲＣＡ変異の解析によると症例Ｙ１およびＹ２は、ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性であった。これらの結果から、分類Ｙの症例は「ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性」であり、かつ、「ＭＳＢＭ陽性」であることが確認された。上記から、ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性であっても、ＭＳＢＭによる判定により相同組換修復異常（ＨＲＤ）を有する癌を検出でき、ＰＡＲＰ阻害剤に対する感受性を予測できる可能性が確認された。

[0066] 分類Ｚ

図８は症例Ｚの結果について示す。症例Ｚ１（卵巣癌再発）および症例Ｚ２（両側付属器摘出術後の腹膜癌）のいずれにおいても、Ａｇｅシグネチャー（ＣからＴへの置換に対応）スコアとＢＲＣＡシグネチャー（ＣからＴへの置換以外の置換に対応）スコアとの和に対するＡｇｅシグネチャースコアが５０％を超えることが確認された。ここで、症例Ｚ１は、卵巣癌に対する主要薬剤であるプラチナ製剤に抵抗性であった。プラチナ製剤の感受性は、ＨＲＤを有する症例において高いことが示されており、ＰＡＲＰ阻害剤の感受性と相関することが知られている（De Picciotto N et al., Crit Rev Oncol Hematol., 101:50-9 (2016)）（本邦におけるＰＡＲＰ阻害剤オラパリブの適応は、プラチナ製剤感受性再発に限定されている）。従って、症例Ｚ１は、ＰＡＲＰ阻害剤オラパリブに対して低感受性である可能性が高い症例といえた。また、ｇＢＲＣＡ変異の解析によると症例Ｚ１およびＺ２は、ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性であった。これらは、Todai OncoPanelにおけるＣからＴへの置換以外の置換がＢＲＣＡシグネチャーを反映し、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与がＡｇｅシグネチャーの寄与を上回る場合に相同組換修復異常（ＨＲＤ）の指標となるという、分類Ｘおよび分類Ｙの考察と整合する。これらの結果から、分類Ｚの症例は「ｇＢＲＣＡ１／２変異陰性」であり、かつ、「ＭＳＢＭ陰性」であることが確認された。

[0067] 例４：ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓを用いたＭＳＢＭの設定とそれを用いた判定

（１）ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析

ア　全エクソンシークエンス解析

症例の、腫瘍組織（ＦＦＰＥ）と正常組織（末梢血）からＤＮＡ抽出し、エクソーム（Ｅｘｏｍｅ）キャプチャーキット（Agilent SureSelect Human All Exon V6 (S07604514)、イルミナ社）を用いてエクソン配列を濃縮し、付属のプロトコルに従いライブラリーを調製した。ＮｅｘｔＳｅｑ（イルミナ社）を用いて、１５１塩基ペアエンドで配列を取得した。取得したデータは、ライブラリー毎に付加したインデックス配列に基づき、サンプル毎にｆａｓｔｑファイルに変換し、以降のデータ処理に用いる計算機内のストレージに保存した。ｆａｓｔｑファイルはＤＮＡなどの塩基配列とそのクオリティスコアを１つのファイルに一緒に保存する際に用いられ、次世代シーケンサー等から出力された塩基配列のデータを保存する際のフォーマットである。

[0068] イ　リファレンスゲノムへのマッピング

上記アで得られたｆａｓｔｑファイルを、ｂｗａ－ｍｅｍ（マッピングソフトウエアｂｗａ(http://www.liheng.org)に実装されたゲノム解析用アルゴリズム）を用いて、ヒトゲノム配列（ヒトレファレンスゲノム配列：ＧＲＣｈ３８）へマッピングした。

[0069] ウ　変異検出

マッピング結果（ｂａｍファイル）を、同一症例の腫瘍部と正常部を組にして、変異検出プログラムｋａｒｋｉｎｏｓ（https://github.com/genome-rcast/karkinosにて入手）にて処理し、体細胞変異のリストを作成した。

[0070] エ　９６塩基置換パターンの頻度データ

得られた変異リストから、１塩基置換とその前後の１塩基を抽出し、塩基置換パターン毎に頻度を集計した。具体的には、ゲノムＤＮＡの＋／－鎖を区別せずに、変化前の塩基がＣまたはＴである鎖に揃える（例えば、ＣＧＴ＞ＣＡＴはＡＣＧ＞ＡＴＧと同じものとして集計する）ことにより、９６種の置換分類と置換変異ごとの変異率を集計し、変異カタログを作成した。

[0071] オ　変異シグネチャーの推定

上記エで得られた９６種の変異パターン（すなわち変異カタログ）の変異頻度を入力とし、変異シグネチャーの重みを推定するプログラムであるｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓを用いて、既存の３０種類のシグネチャーの寄与度を推計した。上記３０種類の変異シグネチャーのセット（ｖｅｒｓｉｏｎ２、Ｍａｒｃｈ　２０１５）は、英国サンガー研究所のCOSMICデータベース（https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures_v2）に登録されている３０種の変異シグネチャー（COSMIC version 2）を用いた。３０種類のシグネチャーのうち、ＢＲＣＡシグネチャー（COSMICデータベースのSignature 3）およびＡＧＥシグネチャー（COSMICデータベースのSignature 1）の寄与度について詳細に解析した。

[0072] ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓは、各サンプルについて、既存の変異シグネチャーの重み（寄与度）を推計するプログラムであり、計算された重みから再構築された変異プロファイルと元の入力を比較し、推計の適否を判断する（Rosenthal et al., Genome Biology, 17:31 (2016)）。本実施例では、個々の腫瘍サンプルの９６変異パターンの頻度［Ｔ：１ｘ９６］（括弧内は、行列を示す記号：行列サイズ（ｒｏｗ　ｘ　ｃｏｌ）を示す。以下同様）と、既存の変異シグネチャー行列［Ｓ：３０ｘ９６］を入力とし、各シグネチャーの寄与度Ｗｉ（ｉ＝１～３０）を計算した。Ｔを最適に再作成する重みWを決定するために、まず、対象の腫瘍サンプルの変異プロファイルに最も近い初期シグネチャーＳｉを既存の変異シグネチャーから１つ選択し、Ｓｉが再構築された腫瘍変異プロファイルに寄与する唯一のシグネチャーであるようにWを決定した。次に、重み行列［W］を変化させながら反復計算することにより、Ｔ－（ＳＷ）として計算される再構築エラーが最小化するような重み（寄与度）行列を決定した。

[0073] （２）ＮＭＦ解析とｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析におけるシグネチャーの寄与の比較

ア　方法

ＴＣＧＡ、ＩＣＧＣおよび高異型度卵巣癌７８例について、上記（１）に

記載のｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓによる解析を行った。ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓによる解析を行った結果と例１（２）に記載の非負値行列因子分解（ＮＭＦ）に基づく解析（ＮＭＦ解析）の結果を比較した。

[0074] イ　結果

結果は、図９に示される通りであった。図９の結果から、ＮＭＦ解析とｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析とにおいて、ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーの寄与は、全体的には同じ傾向がみられることが確認された。一方で、例えば、ＮＭＦ解析においてＢＲＣＡシグネチャーの寄与率０．５で区切った場合（図９中の縦線を参照）、ＮＭＦ解析ではＢＲＣＡシグネチャーが優位である（＞０．５）もののｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析ではＢＲＣＡシグネチャーが優位でない（＜０．２）症例や、反対に、ＮＭＦ解析ではＢＲＣＡシグネチャーが優位でない（＜０．５）もののｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析ではＢＲＣＡシグネチャーがそれほど低くない（＞０．３）症例等の、ＮＭＦ解析とｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析とではシグネチャーの寄与の傾向が一致しない症例が一定数存在することが確認された。

[0075] （３）ＮＭＦ解析とｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析におけるＢＲＣＡシグネチャーの寄与の比較

ア　方法

ＴＣＧＡ、ＩＣＧＣおよび高異型度卵巣癌７８例について、上記（１）に記載のｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析を行った。ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析によるＢＲＣＡシグネチャー（COSMICデータベースのSignature 3）の寄与度と、例１（２）に記載のＮＭＦ解析によるＢＲＣＡシグネチャーの寄与率を散布図に示し、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度について、ＮＭＦ解析で定めた閾値（０．５）に相当するｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析のＢＲＣＡシグネチャー（COSMICデータベースのSignature 3）の閾値を求めた。

[0076] イ　結果

結果は、図１０および図１１に示される通りであった。図１０の結果から、ＮＭＦ解析で定めた閾値（０．５）に相当するｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析の閾値は０．２５であった。図１１の結果から、ＮＭＦ解析の閾値（０．５）を用いた場合、６６％の症例がＢＲＣＡシグネチャー優位であることが示された。また、ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析の閾値（０．２５）を用いた場合、５４％の症例でＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５以上であることが示された。

[0077] （４）ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析におけるバイオマーカー（ＭＳＢＭ）の設定

ア　方法

高異型度卵巣癌７８例について、上記（１）に記載のｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析を行った。具体的には、各症例の変異カタログについて、ＢＲＣＡシグネチャーとＡｇｅシグネチャーを含む３０種の変異シグネチャーの寄与度を上記（１）に記載の方法に従って算出し、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５（２５％）以上で、かつ、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っている場合に条件（ａ１）を満たすと判定した以外は、例２（１）に記載の方法および基準に従って条件（Ａ）（条件（ａ２）：「サイクリンＥ１の増幅が不存在である」を含む）を定めた。

[0078] イ　結果

ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析の結果、７３％（５７／７８）の症例においてＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っていることが示され、また、７３％（５７／７８）の症例において変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５（２５％）以上であることが示された。また、変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５（２５％）以上であり、かつ、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っている症例が７３％（５７／７８）であった。さらに、変異シグネチャー全体に対す

るＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５（２５％）以上であり、かつ、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っている症例であって、サイクリンＥ１増幅の不存在が確認された症例は６８％（５３／７８）であった。すなわち、高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例のうち、６８％の症例がＭＳＢＭ陽性であることが示された。

[0079] ここで、生殖細胞系列ＨＲＤ突然変異（HRD genes’ germline mutation；生殖細胞系列のＢＲＣＡ１／２突然変異、ＲＡＤ５１Ｃ突然変異およびＲＡＤ５１Ｄ突然変異を含む）は、高異型度卵巣癌（卵巣漿液性癌）７８例のうち２３例存在しているところ（図１２）、変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５（２５％）以上である症例において１８例存在し（７８％）、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っている症例において１３例（５７％）存在していた。これらの結果から、ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析によるＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っている場合に条件（ａ１）を満たすと判定できるが、より正確な判定のためには、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度が０．２５（２５％）以上で、かつ、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度がＡＧＥシグネチャーの寄与度を上回っている場合に条件（ａ１）を満たすと判定することができる。以上から、ｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析に基づくＭＳＢＭによる判定により相同組換修復異常（ＨＲＤ）を有する癌を検出でき、ＰＡＲＰ阻害剤に対する感受性を予測できる可能性が示された。

請求の範囲

[請求項1] ＰＡＲＰ阻害剤に対する癌の感受性を予測する方法であって、

癌細胞から得られた核酸試料について配列解析を実施して変異カタログを作成する工程を含んでなり、（Ａ）（ａ１）変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回り、かつ（ａ２）サイクリンＥ１増幅が不存在であることが、ＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌の存在を示す、予測方法。

[請求項2] 前記癌細胞が癌患者から得られた細胞である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記癌が相同組換修復異常を示す可能性がある癌である、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記ＰＡＲＰ阻害剤が、オラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、ベリパリブまたはタラゾパリブである、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 前記配列解析が配列決定手順および配列データ解析手順を含んでなる、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 前記配列解析により図１に記載の９６種の置換分類に従って体細胞遺伝子変異を同定し、変異カタログを作成する、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] 前記配列解析を全エクソンシークエンス解析により行う、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 前記配列解析を癌遺伝子パネル検査により行う、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 下記工程（１）～（３）：

（１）ＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを準備すること、

（２）変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグ

ネチャーの寄与を評価すること、および

（３）Ａｇｅシグネチャーの寄与に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価すること

をさらに含んでなる、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 前記工程（１）において、感受性を予測する癌を患う複数の癌患者について変異シグネチャー解析を実施し、Ａｇｅシグネチャーおよび／またはＢＲＣＡシグネチャーの置換変異の変異率を特定することによりＡｇｅシグネチャーおよびＢＲＣＡシグネチャーを準備する、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 前記工程（２）において、変異カタログについて、ＡｇｅシグネチャースコアおよびＢＲＣＡシグネチャースコアを算出することにより寄与を評価する、請求項９に記載の方法。

[請求項12] Ａｇｅシグネチャースコアが下記式（１）：

[数1]

$$\mathrm{SCORE(AGE)}=\sum_{i=1}^{n} KAi \times Mi \cdots \text{式(1)}$$

（上記式中、ｎ＝９６であり、ｉは、図１に記載の９６種の置換分類のうちｉ番目の置換変異を意味し、Ｍｉは、前記変異カタログのｉ番目の置換変異の変異率または変異数であり、ＫＡｉは、Ａｇｅシグネチャーのｉ番目の置換変異の変異率である。）

により算出される、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] ＢＲＣＡシグネチャースコアが下記式（２）：

[数2]

$$\mathrm{SCORE(BRCA)}=\sum_{i=1}^{n} KBi \times Mi \cdots \text{式(2)}$$

（上記式中、ｎ＝９６であり、ｉは、図１に記載の９６種の置換分類のうちｉ番目の置換変異を意味し、Ｍｉは、前記変異カタログのｉ番

目の置換変異の変異率または変異数であり、ＫＢｉは、ＢＲＣＡシグネチャーのｉ番目の置換変異の変異率である。）
により算出される、請求項１１に記載の方法。

[請求項14] 前記工程（３）において、Ａｇｅシグネチャースコアと、ＢＲＣＡシグネチャースコアとの和に対するＢＲＣＡシグネチャースコアの比率Ａ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価する、請求項９および１１～１３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項15] 前記工程（３）において、ＣからＴへの置換以外の置換変異のスコア（ＢＲＣＡシグネチャースコア）と、ＣからＴへの置換変異のスコア（Ａｇｅシグネチャースコア）との和に対するＣからＴへの置換以外の置換変異のスコアの比率Ｂ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与の優位性を評価する、請求項９および１１～１３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 比率Ａ（％）が５０％を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、請求項１４に記載の方法。

[請求項17] 比率Ｂ（％）が５０％を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、請求項１５に記載の方法。

[請求項18] 下記工程（４）～（６）：
（４）Ａｇｅシグネチャーおよびシグネチャーを少なくとも含む変異シグネチャーを準備すること、
（５）変異カタログに対する変異シグネチャーそれぞれの寄与度を評価すること、および
（６）Ａｇｅシグネチャーの寄与度に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価すること
をさらに含んでなる、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] （７）前記変異シグネチャー全体に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度を評価することをさらに含んでなる、請求項１８に記載の方法

。

[請求項20] 前記変異シグネチャーが、ＣＯＳＭＩＣデータベースの３０種の変異シグネチャー（COSMIC version 2）の全部または一部を含む、請求項１８に記載の方法。

[請求項21] 前記工程（５）において、変異カタログに対する変異シグネチャーの寄与度をｄｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔＳｉｇｓ解析により評価する、請求項１８に記載の方法。

[請求項22] 前記工程（６）において、Ａｇｅシグネチャーの寄与度と、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度との和に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｃ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価する、請求項１８に記載の方法。

[請求項23] 前記工程（６）において、Ａｇｅシグネチャーの寄与度と、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度との和に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｃ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の優位性を評価し、かつ、

前記工程（７）において、前記変異シグネチャーの寄与度の和（１）に対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与度の比率Ｄ（％）を算出することにより、ＢＲＣＡシグネチャーの寄与度を評価する、請求項１９に記載の方法。

[請求項24] 比率Ｃ（％）が５０％を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、請求項２２に記載の方法。

[請求項25] 比率Ｃ（％）が５０％を超え、かつ、比率Ｄ（％）がｋ％（ｋ＝１５～４０）を超える場合に、前記（ａ１）を満たすと判定する、請求項２３に記載の方法。

[請求項26] 条件（Ａ）の（ａ１）および（ａ２）の両方が満たされる場合に、前記癌細胞がＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌細胞集団を含むと判定する工程を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項27] 対象の被験試料について網羅的メチル化解析を実施する工程をさらに含んでなり、（Ｂ）ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化がＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌の存在を示す、請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項28] 相同組換修復不全（ＨＲＤ）を有する癌を検出する方法であって、

癌細胞から得られた核酸試料について配列解析を実施して変異カタログを作成する工程を含んでなり、（Ａ）（ａ１）変異カタログに対するＢＲＣＡシグネチャーの寄与が、変異カタログに対するＡｇｅシグネチャーの寄与を上回り、かつ（ａ２）サイクリンＥ１増幅が不存在であることが、相同組換修復不全を有する癌の存在を示す、検出方法。

[請求項29] 対象の被験試料について網羅的メチル化解析を実施する工程をさらに含んでなり、（Ｂ）ＢＲＣＡ１のプロモーター領域のメチル化が相同組換修復不全を有する癌の存在を示す、請求項２８に記載の検出方法。

[請求項30] ＰＡＲＰ阻害剤による癌患者の治療方法であって、請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法を実施してＰＡＲＰ阻害剤に対して感受性を有する癌を有する癌患者を特定するか、あるいは請求項２８または２９に記載の方法を実施して相同組換修復不全を有する癌を有する癌患者を特定し、次いで、該患者に有効量のＰＡＲＰ阻害剤を投与することを含んでなる、治療方法。

[請求項31] ＰＡＲＰ阻害剤を有効成分として含んでなる癌治療剤であって、前記治療が請求項３０に記載の方法により行われることを特徴とする、癌治療剤。

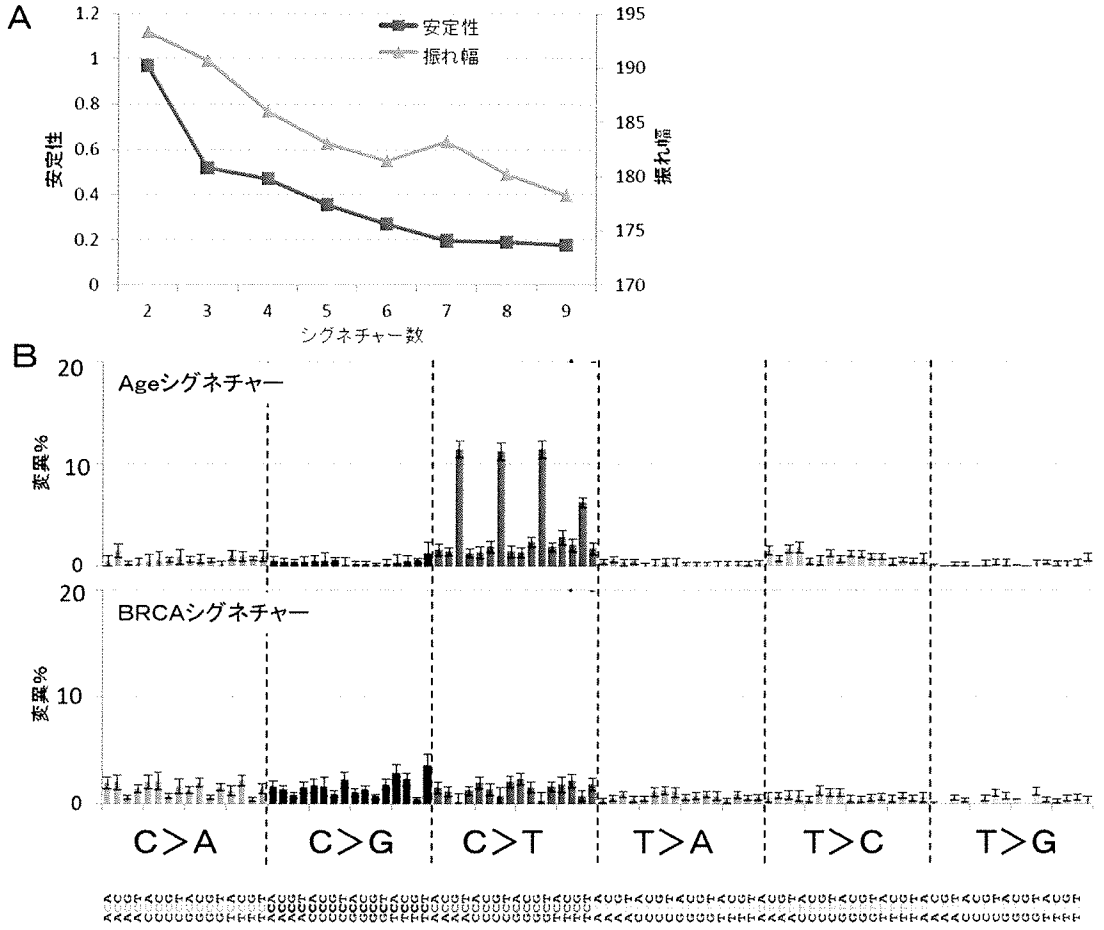
[図1]

6クラスの分類	C→A																C→G															
96種の置換分類	ACA	ACC	ACG	ACT	CCA	CCC	CCG	CCT	GCA	GCC	GCG	GCT	TCA	TCC	TCG	TCT	ACA	ACC	ACG	ACT	CCA	CCC	CCG	CCT	GCA	GCC	GCG	GCT	TCA	TCC	TCG	TCT
i番目の置換変異	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32

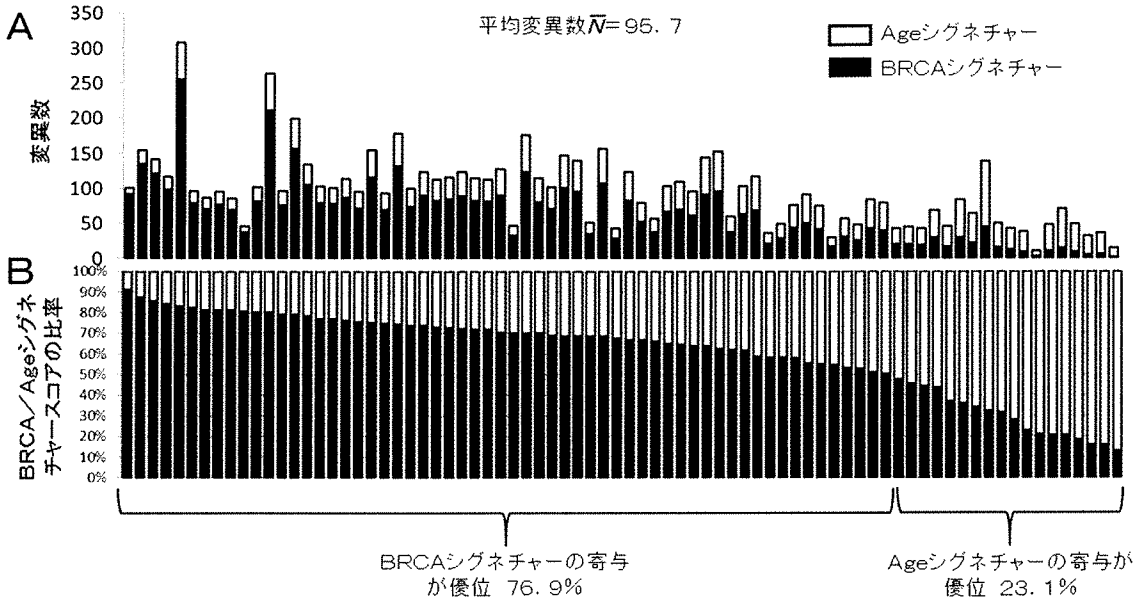
6クラスの分類	C→T																T→A															
96種の置換分類	ACA	ACC	ACG	ACT	CCA	CCC	CCG	CCT	GCA	GCC	GCG	GCT	TCA	TCC	TCG	TCT	ATA	ATC	ATG	ATT	CTA	CTC	CTG	CTT	GTA	GTC	GTG	GTT	TTA	TTC	TTG	TTT
i番目の置換変異	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64

6クラスの分類	T→C																T→G															
96種の置換分類	ATA	ATC	ATG	ATT	CTA	CTC	CTG	CTT	GTA	GTC	GTG	GTT	TTA	TTC	TTG	TTT	ATA	ATC	ATG	ATT	CTA	CTC	CTG	CTT	GTA	GTC	GTG	GTT	TTA	TTC	TTG	TTT
i番目の置換変異	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

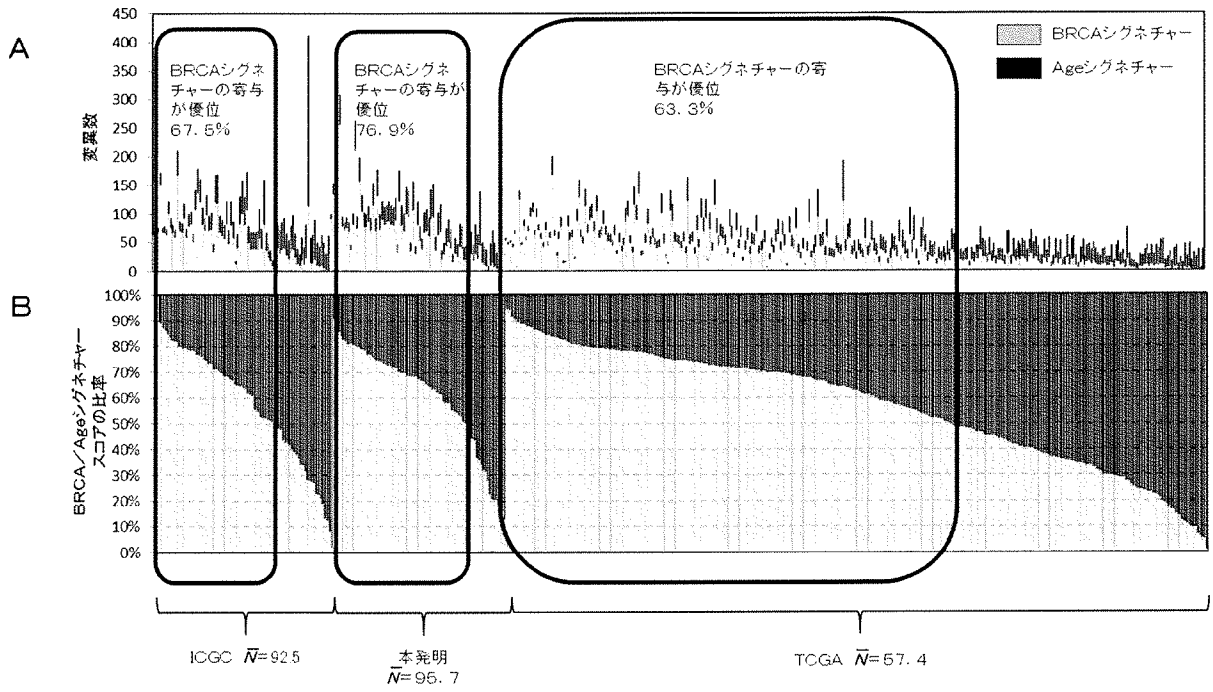
[図2]



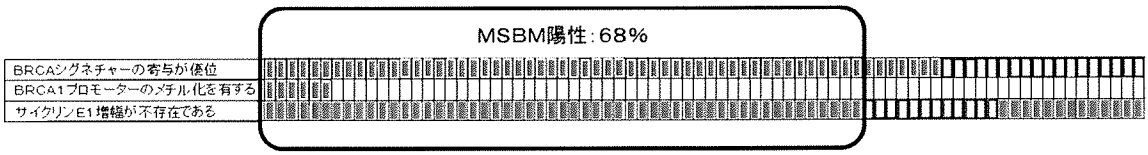
[図3]


A
B
平均変異数$\bar{N}$=95.7
Ageシグネチャー
BRCAシグネチャー
変異数
BRCA／Ageシグネチャースコアの比率
BRCAシグネチャーの寄与が優位 76.9%
Ageシグネチャーの寄与が優位 23.1%

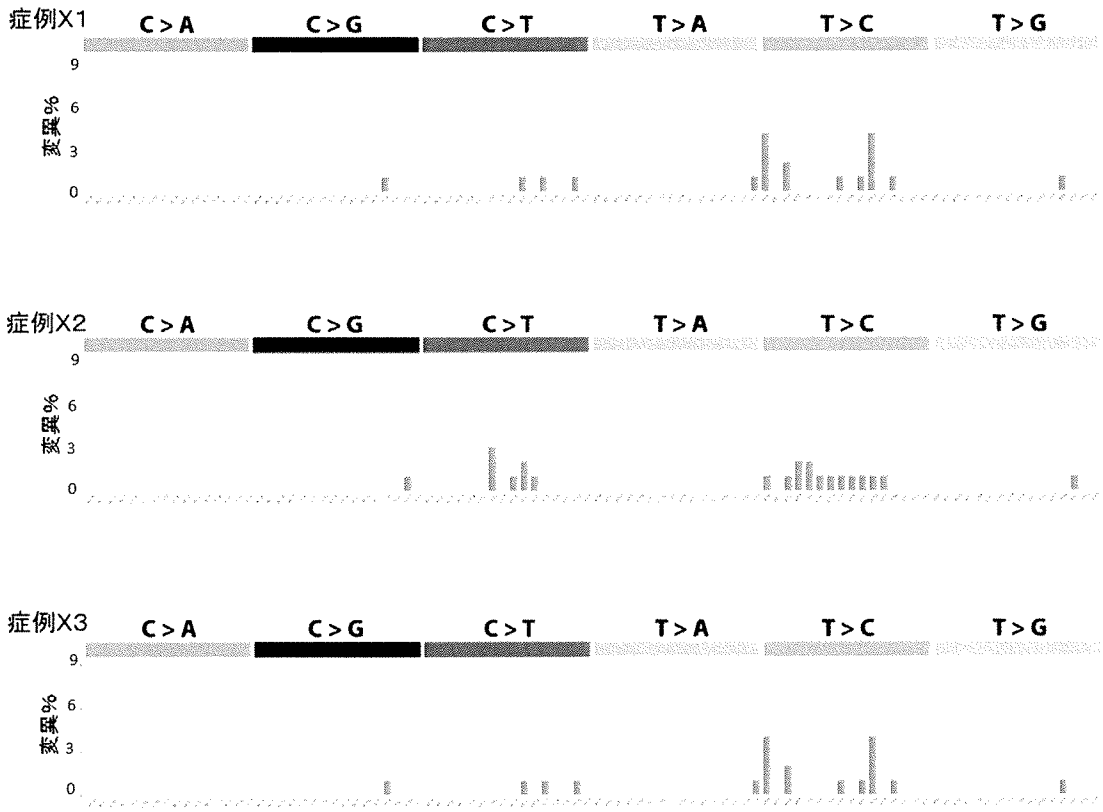
[図4]


A
B
BRCAシグネチャー
Ageシグネチャー
変異数
BRCA／Ageシグネチャースコアの比率
BRCAシグネチャーの寄与が優位 67.5%
BRCAシグネチャーの寄与が優位 76.9%
BRCAシグネチャーの寄与が優位 63.3%
ICGC $\bar{N}$=92.5
本発明 $\bar{N}$=95.7
TCGA $\bar{N}$=57.4

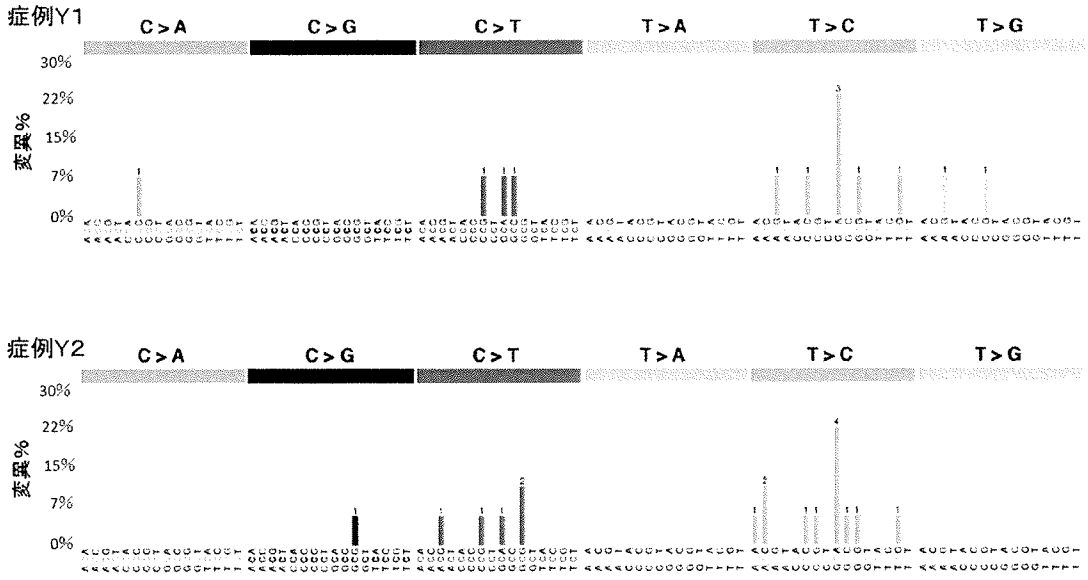
[図5]


MSBM陽性：68%
BRCAシグネチャーの寄与が優位
BRCA1プロモーターのメチル化を有する
サイクリンE1増幅が不存在である

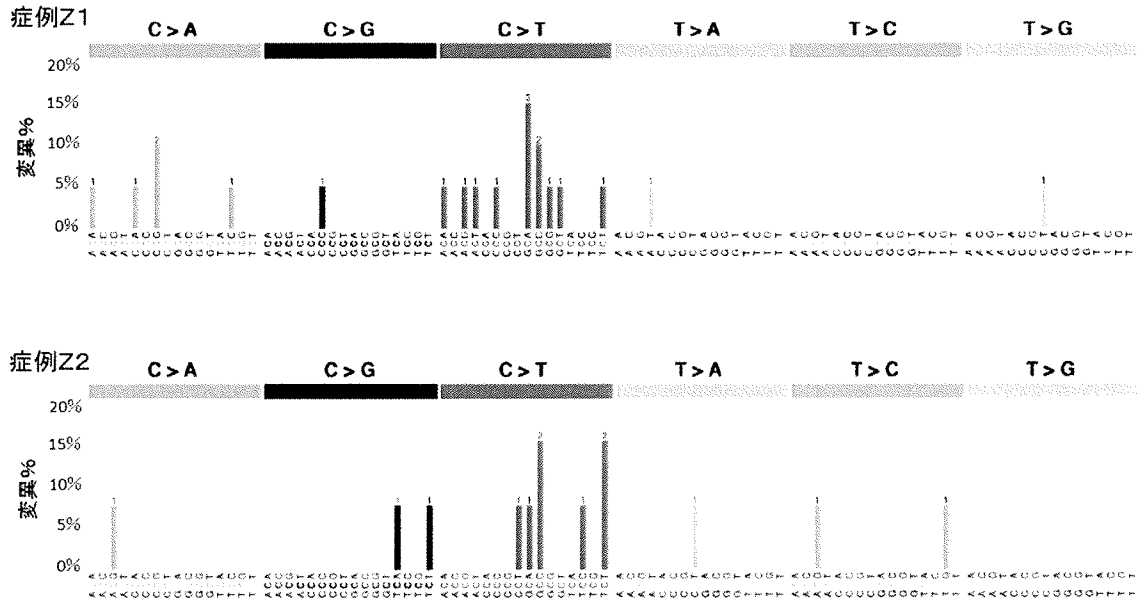
[図6]


症例X1
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
9
6
3
0
症例X2
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
9
6
3
0
症例X3
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
9
6
3
0

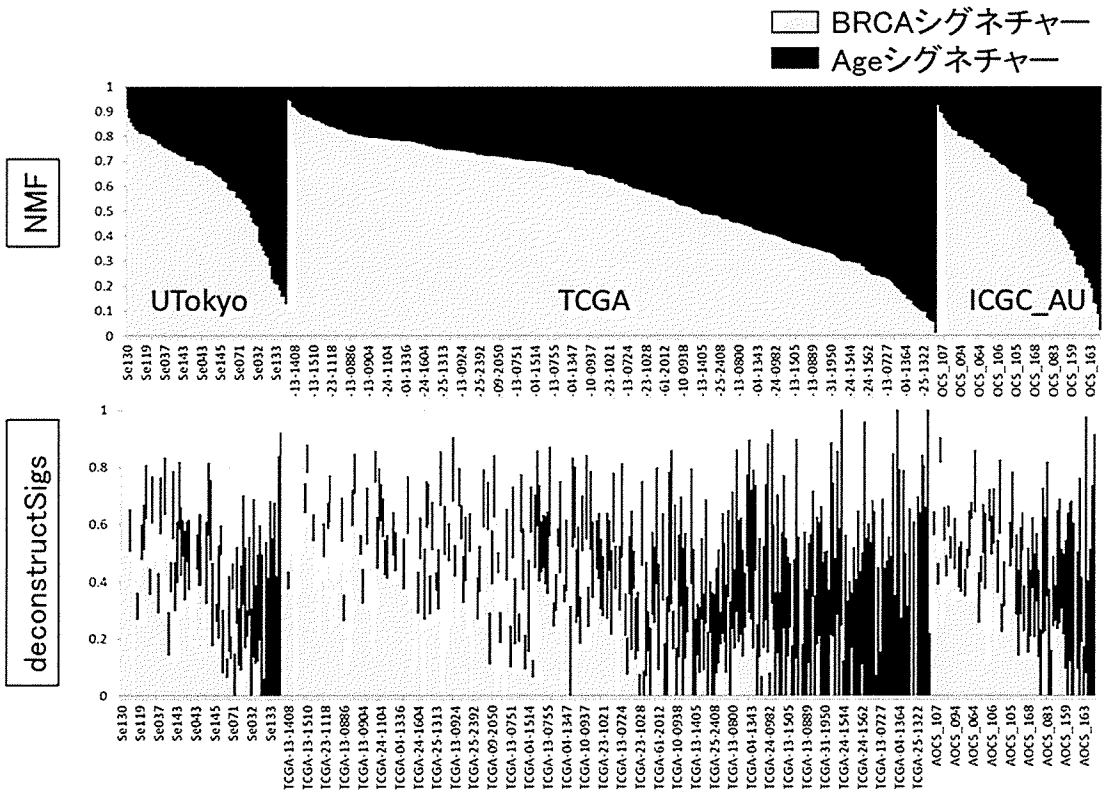
[図7]


症例Y1
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
30%
22%
15%
7%
0%
症例Y2
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
30%
22%
15%
7%
0%

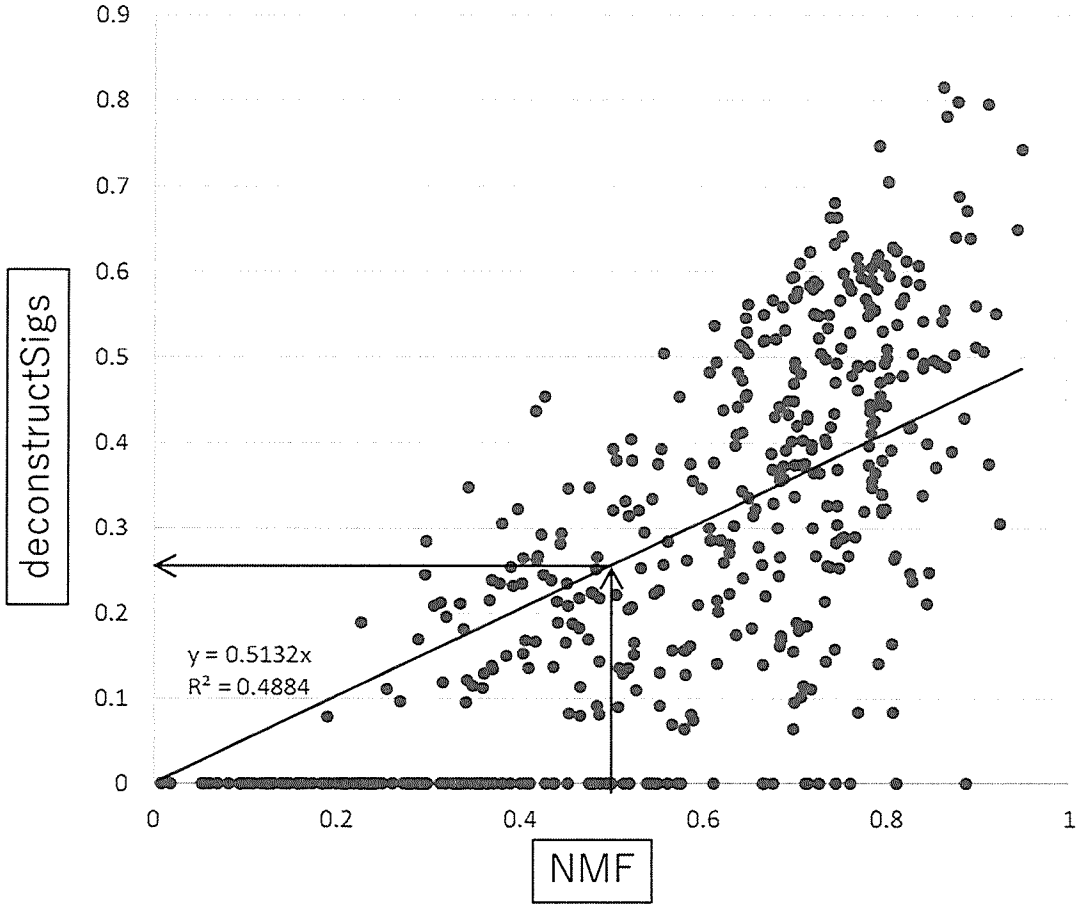
[図8]


症例Z1
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
20%
15%
10%
5%
0%
症例Z2
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
変異%
20%
15%
10%
5%
0%

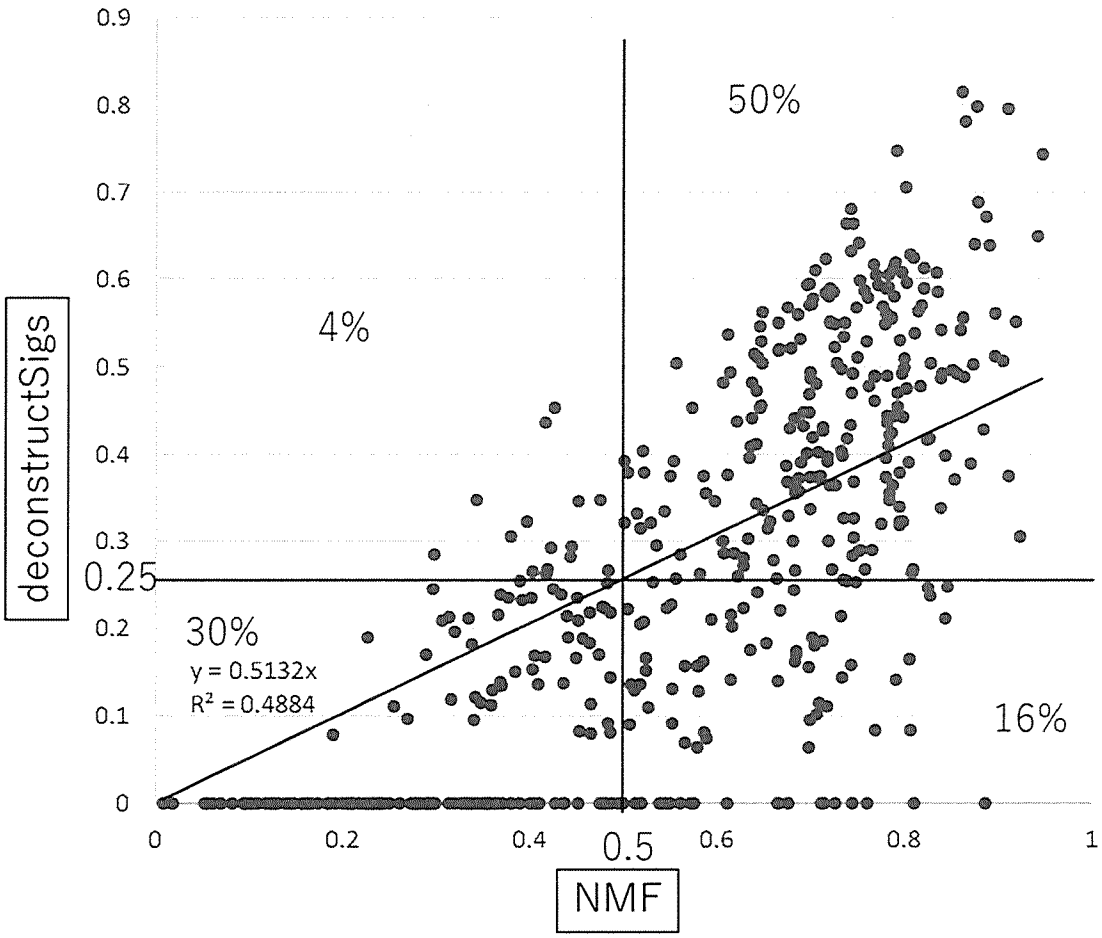
[図9]


BRCAシグネチャー
Ageシグネチャー
NMF
UTokyo
TCGA
ICGC_AU
deconstructSigs

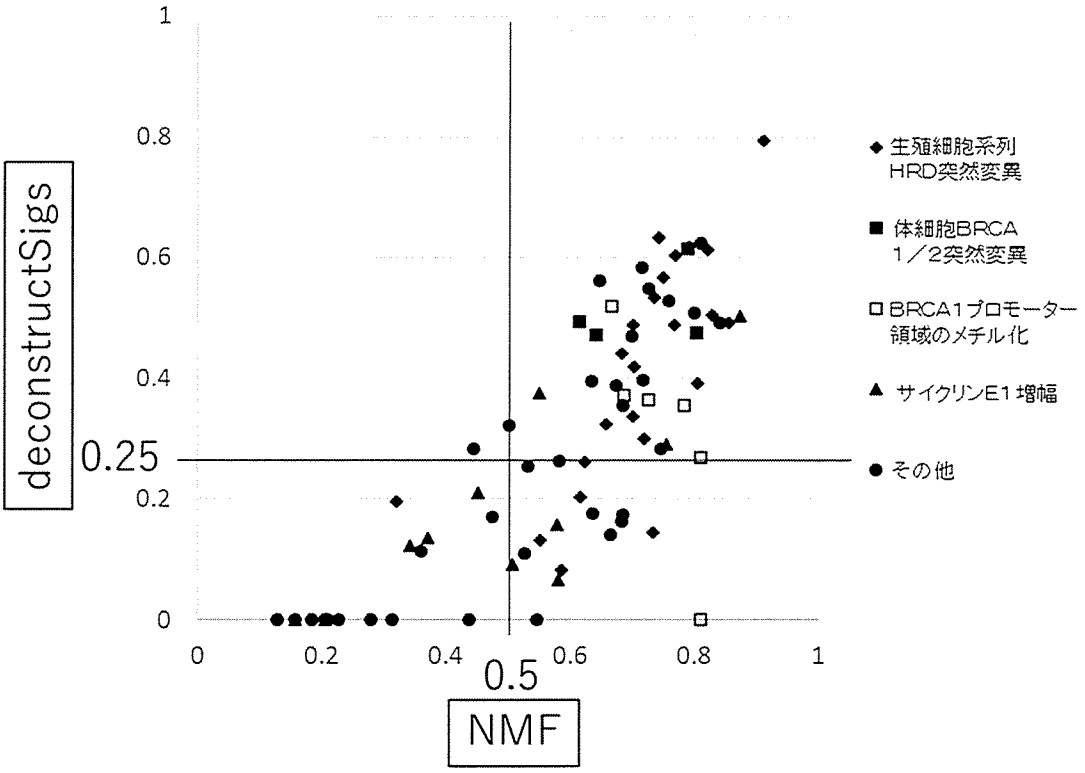
[図10]


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
deconstructSigs
y = 0.5132x
R² = 0.4884
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
NMF

[図11]


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.25
0.2
0.1
0
0
0.2
0.4
0.5
0.6
0.8
1
deconstructSigs
NMF
50%
4%
30%
y = 0.5132x
R² = 0.4884
16%

[図12]


1
0.8
0.6
0.4
0.25
0.2
0
0
0.2
0.4
0.5
0.6
0.8
1
deconstructSigs
NMF
◆生殖細胞系列
HRD突然変異
■体細胞BRCA
1／2突然変異
□BRCA1プロモーター
領域のメチル化
▲サイクリンE1増幅
●その他

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/039415

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12Q1/6869(2018.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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)
Int.Cl. C12Q1/6869, A61K45/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019
Registered utility model specifications of Japan 1996-2019
Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HODGSON, D. R. et al., Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes. Br. J. Cancer, November 2018, vol. 119, no. 11, pp. 1401-1409, drawings, tables	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18.12.2019	07.01.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/039415

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STRONACH, E. A. et al., Biomarker assessment of HR deficiency, tumor BRCA1/2 mutations, and CCNE1 copy number in ovarian cancer: associations with clinical outcome following platinum monotherapy. Mol. Cancer Res., July 2018, vol. 16, no. 7, pp. 1103-1111, drawings, tables	1-31
A	JP 2016-523511 A (MYRIAD GENETICS, INC.) 12 August 2016, claims, examples & US 2014/0363521 A1, claims, examples & WO 2014/165785 A2 & EP 2981624 A2	1-31
A	織田克利 外，全エクソンシークエンス解析によるPARP阻害薬の新規バイオマーカーの提唱．第56回日本癌治療学会学術集会抄録，October 2018, no. SSY5-4, (ODA, Katsutoshi et al., A multi-center, phase II study of Olaparib (a PARP inhibitor) maintenance therapy in primary ovarian cancer patients, using an exome sequencing-based biomarker for homologous recombination deficiency), non-official translation (Abstracts for the 56th Annual Meeting of Japan Society of Clinical Oncology)	1-31

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３９４１５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/6869(2018.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/6869, A61K45/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　　１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報　　１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報　　１９９４－２０１９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	HODGSON D.R. et al., Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the *BRCA* genes. Br. J. Cancer, 2018 Nov., vol.119, no.11, pp.1401-1409 (Figs., Tables)	1-31

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１８．１２．２０１９	０７．０１．２０２０

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	４Ｂ　３９６４ 戸来　幸男	
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８	

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	STRONACH E.A. et al., Biomarker assessment of HR deficiency, tumor *BRCA1/2* mutations, and *CCNE1* copy number in ovarian cancer: associations with clinical outcome following platinum monotherapy. Mol. Cancer Res., 2018 Jul., vol.16, no.7, pp.1103-1111 (Figures, Tables)	1-31
A	JP 2016-523511 A（ミリアド・ジェネティックス・インコーポレイテッド）2016.08.12（請求項、実施例） & US 2014/0363521 A1 (Claims, Examples) & WO 2014/165785 A2 & EP 2981624 A2	1-31
A	織田克利 外，全エクソンシークエンス解析によるＰＡＲＰ阻害薬の新規バイオマーカーの提唱. 第５６回日本癌治療学会学術集会抄録，2018 Oct., no.SSY5-4	1-31