(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-533873
(P2023-533873A)
(43)公表日　令和5年8月4日(2023.8.4)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12Q	*1/48 (2006.01)*	C12Q	1/48	Z	2G045
C12Q	*1/68 (2018.01)*	C12Q	1/68	ZNA	4B063
C12Q	*1/6851(2018.01)*	C12Q	1/6851	Z	
C12Q	*1/686(2018.01)*	C12Q	1/686	Z	
C12Q	*1/6827(2018.01)*	C12Q	1/6827	Z	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全51頁）　最終頁に続く

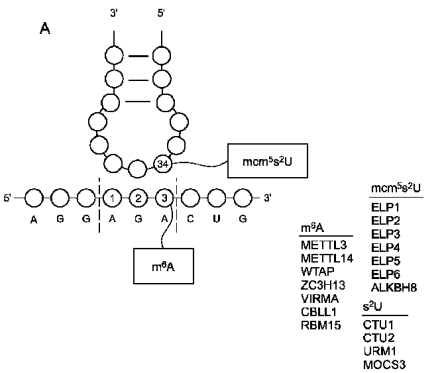
(21)出願番号　特願2023-503145(P2023-503145)
(86)(22)出願日　令和3年7月16日(2021.7.16)
(85)翻訳文提出日　令和5年3月8日(2023.3.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/069952
(87)国際公開番号　WO2022/013420
(87)国際公開日　令和4年1月20日(2022.1.20)
(31)優先権主張番号　20186398.2
(32)優先日　令和2年7月17日(2020.7.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　301076083
ヨーロピアン モレキュラー バイオロジー ラボラトリー
European Molecular Biology Laboratory
ドイツ国、６９１１７ハイデルベルク、メイヤーホフシュトラーセ、１
(71)出願人　519011854
ウニヴェルズィテート ベルン
スイス連邦，３０１２ ベルン，フェア ヴァルトゥングスディレクシオン ホッハシュールストラッセ ６
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司 隆
(74)代理人　100124453
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　癌用の予後バイオマーカー

(57)【要約】
本発明は、対象における障害の予後診断、診断、層別化、及び／又は療法の監視を行う新たな方法に関する。この方法は、組み合わされたバイオマーカーとして、N6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベルの決定と、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の決定とを基礎としている。本発明の新しいバイオマーカーは、患者における障害の診断、そして層別化さえも可能にし、患者の予後を推定し、患者、特に乳癌患者等の癌患者の療法の成功を監視することを可能にする。さらに、対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視するキットが提供される。本発明はまた、疾患、病態、又は障害の治療において使用される化合物であって、細胞内のm6A mRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパ

FIGURE 5:



【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視する方法であって、
（ａ）前記対象の生体試料を準備する工程と、
（ｂ）前記生体試料における細胞内のＮ６-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも１つの第１のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、
（ｃ）前記生体試料における細胞内の５-メトキシカルボニルメチル-２-チオウリジン（ｍｃｍ５ｓ２Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも１つの第２のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、
（ｄ）工程（ｂ）及び工程（ｃ）における前記第１のバイオマーカー及び前記第２のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、参照試料又は参照値と比較する工程と、
を含み、
ここで、前記参照試料若しくは参照値と比較した、前記対象からの生体試料における前記第１のバイオマーカー及び／又は第２のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、疾患、病態、若しくは障害を患っている患者の無増悪生存期間（ＰＦＳ）及び／又は全生存期間（ＯＳ）の時間の低下の指標となるか、又は前記参照試料若しくは参照値と比較した、前記対象からの生体試料における前記第１のバイオマーカー及び／又は第２のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、前記対象における前記疾患、病態、若しくは障害の存在の指標となる、方法。
【請求項２】
（ｉ）前記少なくとも１つの第１のバイオマーカーは、ｍ６Ａメチルトランスフェラーゼ複合体（ｍ６Ａ-ＭＴＣ）、ｍ６Ａリーダータンパク質、及びｍ６Ａイレーサータンパク質の遺伝子、ｍＲＮＡ、又はタンパク質から選択され、好ましくはＭＥＴＴＬ３、ＭＥＴＴＬ１４、ＷＴＡＰ、ＶＩＲＭＡ、ＲＢＭ１５、ＺＣ３Ｈ１３、ＹＴＨＤＦ１、ＹＴＨＤＦ２、ＹＴＨＤＦ３、ＦＴＯ、ＫＩＡＡ１４２９、ＣＢＬＬ１、ＲＢＭ１５、及び／又はＡＬＫＢＨ５であり、及び／又は（ｉｉ）前記少なくとも１つの第２のバイオマーカーは、ＥＬＰ１/ＩＫＢＫＡＰ、ＥＬＰ２、ＥＬＰ３、ＥＬＰ４、ＥＬＰ５、ＥＬＰ６、ＣＴＵ１、ＣＴＵ２、ＭＯＣＳ３、ＵＲＭ１、及び／又はＡＬＫＢＨ８の遺伝子、ｍＲＮＡ、又はタンパク質から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記疾患、病態、又は障害は、癌、及び／又は細胞内のＮ６-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、及び／又は細胞内の５-メトキシカルボニルメチル-２-チオウリジン（ｍｃｍ５ｓ２Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す疾患であり、好ましくは、前記癌は、乳癌、黒色腫、神経膠芽腫、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、甲状腺癌、食道癌、脳癌、結腸直腸癌、胃部癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路の癌、腎癌、癌腫、及び細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾を調節する及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍から選択され、より好ましくは、前記癌は、乳癌である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記生体試料は、腫瘍由来の細胞群、腫瘍組織の試料、ＲＮＡ試料、ＤＮＡ試料、血液試料、血清試料、血漿試料、尿試料、リンパ液試料、胸膜液試料、又は脳液試料、好ましくは腫瘍由来の細胞群又は腫瘍組織の試料等の組織試料又は体液試料を含む対象の試料である、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】

前記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び前記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性は、mRNA分析、DNA分析、タンパク質分析を含む検出方法、及び／又は標的核酸配列中の一塩基多型（SNP）を決定する方法によって決定され、好ましくは、前記方法は、一塩基多型（SNP）のセットを含む多型アレイ等の標的核酸配列中の一塩基多型（SNP）を決定する方法、例えば、Affymetrix GeneChip、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リアルタイム定量的PCR（qPCR）、nanoStringnCounter、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、質量分析、質量分析イムノアッセイ（MSIA）、抗体ベースのタンパク質チップ、2次元ゲル電気泳動、抗ペプチド抗体による安定同位体標準捕捉（SISCAPA）、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、遺伝子検査、ウエスタンブロット、サイトメトリービーズアレイ（CBA）、ラジオイムノアッセイ、及び免疫組織化学染色から選択され、好ましくは、前記検出方法は、標的核酸配列中の一塩基多型（SNP）を決定する多型アレイ、及び／又はリアルタイム定量的PCR（qPCR）である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

前記参照試料又は参照値と比較した、前記対象からの生体試料における前記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は前記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異は、疾患、病態、又は障害を患っている患者の無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の低下の指標となり、かつ前記参照試料又は参照値は、コホート固有の参照試料又は参照値であり、ここで、前記対象からの生体試料と比較した、前記参照試料又は参照値における前記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は前記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性は、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の増加の指標となる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

前記対象からの生体試料における前記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異の結果が、（i）より低いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAの指標となるような場合に、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間は、そのような結果を示さない対象と比較して減少し、及び／又は（ii）より高いレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAの指標となるような場合に、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間が、そのような結果を示さない対象と比較して増える、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

治療について患者を層別化する方法であって、第1の工程として、参照試料又は参照値と比較した、前記患者からの生体試料における少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を特定することと、第2の工程として、前記レベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異に基づいて、前記治療への賛成又は反対を決断することとを含み、ここで、前記レベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異は、

（a）前記患者の生体試料を準備する工程と、

（b）前記生体試料における細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、

（c）前記生体試料における細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、

（d）工程（b）及び工程（c）における前記第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、参照試料又は参照値と比較する工程と、

を含む方法を使用することによって特定される、方法。
【請求項９】
（ｉ）前記少なくとも1つの第1のバイオマーカーは、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択され、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sであり、及び／又は（ii）前記少なくとも1つの第2のバイオマーカーは、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される、請求項8に記載の方法。
【請求項１０】
前記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）は、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルを含み、及び／又は前記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）は、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルからなる、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
工程（d）における前記参照試料又は参照値と比較した、前記対象からの生体試料における前記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異に基づいて、N6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を増強又は阻害すること、及び／又は5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を増強又は阻害することへの賛成を決断する、請求項8又は9に記載の方法。
【請求項１２】
前記治療は、細胞内のm6A-mRNA修飾及び／又は細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を標的化する治療であり、好ましくは、前記治療は、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、m6Aイレーサータンパク質、及び／又はエロンゲーター複合体を阻害又は活性化する、請求項8～10のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記方法は、非侵襲的方法であり、好ましくは、exvivoの方法又はin vitroの方法である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視するキットであって、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を定量化する手段、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を定量化する手段を含む、キット。
【請求項１５】
（ｉ）前記少なくとも1つの第1のバイオマーカーは、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択され、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sであり、及び／又は（ii）前記少なくとも1つの第2のバイオマーカーは、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される、請求項13に記載のキット。
【請求項１６】

疾患、病態、又は障害の治療において使用される化合物であって、該化合物は、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を特異的に低下させ又は増強し、好ましくは、前記疾患、病態、又は障害は、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を特徴とし、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、より好ましくは、前記疾患、病態、又は障害は、乳癌等の癌である、化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、対象における障害の予後診断、診断、層別化、及び／又は療法の監視を行う新たな方法に関する。この方法は、組み合わされたバイオマーカーとして、N6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベルの決定と、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の決定とに基づくものである。本発明の新しいバイオマーカーは、患者の予後を推定し、患者、特に乳癌患者等の癌患者の療法の成功を監視することを可能にする。本発明のバイオマーカーは更に、患者における障害、特に乳癌等の癌の診断、そして層別化さえも可能にする。さらに、個々のm6A／mcm5s2U遺伝子ペアを定量化する手段を含む、対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視するキットが提供される。最後に、本発明はまた、疾患、病態、又は障害の治療において使用される化合物であって、細胞内のm6A mRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質、及び／又は細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を特異的に低下させ又は増強し、それによりm6A／mcm5s2Uのバランスを乱す又は元に戻すことができる、化合物に関する。

【背景技術】

【０００２】

乳癌は、女性の間で最も頻度の高い癌であり、女性の間の癌関連死の最多数の原因である。米国の女性の約12％が一生の間に浸潤性乳癌を発症する。現在、乳癌は毎年およそ210万人の女性に影響を与えている。2018年には、627000人の女性が乳癌で死亡したと推定されており、これは女性の間の癌による死亡全体のおよそ15％である。乳癌は一般に、早期、局所進行、局所再発、及び転移の幾つかの主要な病期に分けることができる。早期乳癌の5年生命予後は一般に60％を上回り、この数値は進行乳癌の場合には40％から60％の間に低下する。

【０００３】

乳癌の治療についての現在の療法的選択肢としては、手術（例えば、切除、自家骨髄移植）、放射線療法、化学療法（例えば、ドキソルビシン等のアントラサイクリン系薬剤、シクロホスファミド及びマイトマイシンC等のアルキル化剤、パクリタキセル及びドセタキセル等のタキサン系薬剤、カペシタビン等の代謝拮抗薬、ビンカアルカロイドのナベルビン等の微小管阻害薬）、内分泌療法（例えば、タモキシフェン等の抗エストロゲン薬、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メガストロール等の黄体ホルモン作用物質、又はアミノグルテタミド及びレトロゾール等のアロマターゼ阻害薬）、及び生物製剤（例えば、サイトカイン、モノクローナル抗体等の免疫療法薬）が挙げられる。

【０００４】

乳癌についての診断的選択肢としては、患者の乳房の患部から得られた患者の試料、す

なわち生検試料の顕微鏡分析が挙げられる。最も一般的に使用される2つの診断的アプローチは、医師による乳房の身体検査及びマンモグラフィである。これらの検査で結論に達しない場合には、通常、しこり中の液の患者試料を顕微鏡分析に送って診断の確定に役立てる。生検に関するその他の選択肢としては、コンピューター断層撮影法（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）、超音波検査及びコア生検若しくは真空補助乳房生検、又は乳房のしこり全体を除去する切除生検が挙げられる。癌の転帰及び生存率を改善するには、乳癌等の癌の早期発見が重要である。

【０００５】

過去数十年の間に、多くの要因が癌患者の予後の予測に役立つことが検証されてきた。例えば、乳癌患者の場合に、ホルモン受容体（エストロゲン／プロゲステロン受容体、ER/PR）陽性及びヒト上皮成長因子受容体2（HER2）陰性の表現型は、ER/PR陰性及び／又はHER2陽性の疾患を伴う女性と比較して、好適な予後転帰と関連していることが文書で十分に立証されている。

【０００６】

特許文献1は、少なくとも5種のバイオマーカー（SLPI、src、PSMB9、p21ras、及びE2F1）の検出を含む、乳癌患者の予後を評価する方法を開示している。

【０００７】

特許文献2は、乳房組織に由来する試料における細胞の核内のWrap53の量を測定すること、及び／又は乳房組織に由来する試料における細胞の細胞質内のWrap53の量を測定することによって、乳癌を有する個体の生存率についての予測を決定する方法であって、Wrap53の核レベル、細胞質レベルの両方、及び／又は核レベルと細胞質レベルとの間の比率が、乳癌の予後診断において単独で又は組み合わせて使用され得る、方法を開示している。しかしながら、この方法の不利点は、切開手術から、又は手術前に細針生検若しくはコア針生検から組織を取得する必要があることである。

【０００８】

これまでのところ、遺伝子調節のエピトランスクリプトーム階層の分析に関連する、癌疾患等の疾患を予後診断及び／又は監視する最小侵襲性でありながら特異的かつ高感度な試験システムについてのアプローチは開発されていない。

【０００９】

その広範な存在にもかかわらず、遺伝子調節の「エピトランスクリプトーム」階層の機能はまだ完全には理解されていない。mRNAの主な機能は、リボソームにおける翻訳の間にタンパク質合成の鋳型となることである。この過程において、遺伝情報は、tRNAのアンチコドンループとmRNAコドンとの塩基対合を介してtRNAによって解読される。mRNA、tRNA、rRNA、及びncRNAを含む様々なRNA種において、200種を超える種々の化学修飾ヌクレオチドが特定されている。この「エピトランスクリプトーム」は、修飾されたRNAの発現及び／又は機能を変化させるため、遺伝子調節の階層に相当する。一例として、tRNAのアンチコドンループはRNA修飾にとっての「ホットスポット」であり、これらはストレス時の遺伝子発現制御に関与している。

【００１０】

全てのアデノシンの最大0.5％の修飾率で、修飾されたmRNAヌクレオチドのN6メチルアデノシン（m6A）は、mRNAにおける最も豊富な修飾である。RNAポリメラーゼIIによる新生RNAの転写の間に、m6Aは、METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13からなるm6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）によって新生RNAに共転写的に堆積する。これにより、m6Aは、tRNAによって読み取られるスプライシング情報をmRNAに刷り込む。

【００１１】

m6Aコンセンサス配列は、「DRACHモチーフ」（Dは、A、G、又はUであり、Rは、G又はAであり、Hは、A、C、又はUである）と呼ばれる。DRACHモチーフは、mRNA中に約57ヌクレオチドごとに1回現れ、その転写によって潜在的メチル化部位（DRACH）が生成される。m6Aでの修飾により、mRNAの半減期が減少する、すなわち、細胞内

の修飾されたｍＲＮＡのターンオーバーが増加する。ｍ６Ａ「リーダー」タンパク質のＹＴＨＤＦ２及びＹＴＨＤＦ３はこのプロセスに関与しているが、分解がどのように惹起されるかは不明である。それにもかかわらず、ｍ６Ａを媒介した分解は、分化又はストレス適応のような細胞転換の間に細胞トランスクリプトームをリモデリングするのに重要であることが示された。したがって、ｍ６Ａは、細胞恒常性が乱される様々な健康状態、例えば、癌、ウイルス感染症、又は心不全に関与している。

【００１２】

ｍ６Ａを媒介したｍＲＮＡ分解の主な機能は、多能性遺伝子を除去して幹細胞の分化を促進することである[1,2]。ｍ６Ａは、膠芽腫、急性骨髄性白血病、膀胱癌、及び肝細胞癌を含む様々な癌に関与することも示された。したがって、ｍ６Ａを標的化することによるエピトランスクリプトームへの投薬は、癌等の疾患についての有望な療法である。現在、ｍ６Ａ生合成因子を標的化する薬物が開発されており、初めてのリード分子は存在するものの、これらの薬物からどの患者が最も便益を受けるかは不明である。また、初期の研究の一部では、ｍ６Ａが腫瘍遺伝子又は腫瘍抑制因子のどちらとして作用するかについて矛盾する結果が報告されたことから、治療転帰を予測し、患者を、ｍ６Ａを活性化する化合物から便益を受ける群及び／又はｍ６Ａを阻害する化合物から便益を受ける患者へと層別化することができる方法を確立する必要性が強調される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１３】

【特許文献１】国際公開第２００６/０３６７２６号

【特許文献２】米国特許出願公開第２０１１/００９７７３２号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１４】

癌等の疾患に関連する調査の多くの側面における主要な工程は、効果的かつ改善された予後診断法、診断法、及び療法の開発に適した高特異度かつ高感度のバイオマーカーを特定することである。上記の背景技術に鑑みて、本発明の目的は、対象における疾患、病態、又は障害の予後診断、診断、及び／又は監視において使用され、かつ新規の療法薬の開発において使用される新規のマーカーを提供することである。迅速であるが高感度かつ高特異度の癌の予後マーカー及び診断マーカーが継続的に必要とされているため、本発明は、癌等の対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視する簡単で最小侵襲性であるが高特異度かつ高感度の試験システムについての新規のアプローチを提供しようとするものである。さらに、本発明は、癌療法等の診療所での療法の進行中の治療の成功を直接的に監視し、療法を受ける癌患者についての予後を評価することを可能にする診断戦略を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

上記の問題は、ｍ６Ａ系と、ｔＲＮＡアンチコドン修飾、すなわち5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ｍｃｍ５ｓ２Ｕ）との相互依存性の分析に基づく、対象における疾患、病態、又は障害の予後診断、診断、及び／又は監視において使用され、かつ新規の療法薬の開発において使用される新規のマーカーを提供することによって解決される。

【００１６】

発明の簡単な説明

概して、簡単な説明により、本発明の主な態様は以下のように説明することができる。

【００１７】

第１の態様においては、本発明は、対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視するマーカーとしての、ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの総合分析の使用に関する。

【００１８】

第２の態様においては、本発明は、対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視するマーカーとしての、個々のｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕ遺伝子ペアの使用に関する。

【００１９】

第３の態様においては、本発明は、ｍ６Ａ経路の阻害又は活性化を必要とする患者、及び／又はｍｃｍ５ｓ２Ｕ経路の阻害又は活性化を必要とする患者へと患者を層別化する方法としての、ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの総合分析の使用に関する。

【００２０】

第４の態様においては、本発明は、ｍ６Ａ経路の阻害又は活性化を必要とする患者、及び／又はｍｃｍ５ｓ２Ｕ経路の阻害又は活性化を必要とする患者へと患者を層別化する方法としての、個々のｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕ遺伝子ペアの使用に関する。

【００２１】

第５の態様においては、本発明は、個々のｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕ遺伝子ペアを定量化する手段を含む、対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視するキットに関する。

【００２２】

第６の態様においては、本発明は、疾患、病態、又は障害の治療において使用される化合物であって、細胞内のｍ６Ａ ｍＲＮＡ修飾を調節する遺伝子、ｍＲＮＡ、又はタンパク質、及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する遺伝子、ｍＲＮＡ、又はタンパク質のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を特異的に低下させ又は増強し、それによりｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕのバランスを乱す又は元に戻すことができる、化合物に関する。

【００２３】

発明の詳細な説明

下記で本発明の要素を記載する。これらの要素は特定の実施形態とともに挙げられているが、更なる実施形態を作成するのに、これらの要素をどのような方法及びどのような数でも組み合わせることができることを理解されたい。多様に記載された実施例及び好ましい実施形態は、本発明を例示的に記載された実施形態のみに限定するものとは解釈されない。本明細書は２つ以上の例示的に記載された実施形態又は１つ以上の例示的に記載された実施形態と、あらゆる数の開示された及び／又は好ましい要素とを組み合わせた実施形態を支持及び包含するものであると理解されたい。さらに文脈上他に指定のない限り、本出願において記載された全ての要素のあらゆる並び替え（ｐｅｒｍｕｔａｔｉｏｎｓ）及び組合せが本出願の明細書により開示されていると見なされる。

【００２４】

上記の問題は、第１の態様において、対象における疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視する方法であって、

（ａ）上記対象の生体試料を準備する工程と、

（ｂ）上記生体試料における細胞内のＮ６-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも１つの第１のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、

（ｃ）上記生体試料における細胞内の５-メトキシカルボニルメチル-２-チオウリジン（ｍｃｍ５ｓ２Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも１つの第２のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、

（ｄ）工程（ｂ）及び工程（ｃ）における上記第１のバイオマーカー及び上記第２のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、参照試料又は参照値と比較する工程と、

を含み、

ここで、上記参照試料若しくは参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第１のバイオマーカー及び／又は第２のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、疾患、病態、若しくは障害を患っている患者の無増悪生存期間（ＰＦＳ

）及び／又は全生存期間（ＯＳ）の時間の低下の指標となるか、又は上記参照試料若しくは参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、上記対象における上記疾患、病態、若しくは障害の存在の指標となる、方法によって解決される。

【００２５】

「予後（診断）」という用語は、疾患の起こり得る転帰、並びに症例の性質及び症状によって示される疾患からの回復の見通しに関する予測を指す。したがって、不良な予後又は予後不良は、より短い治療後生存期間又はより低い治療後生存率によって定義される。反対に、良好な予後又は予後良好は、治療後生存期間の延長又は治療後生存率の上昇によって定義される。通常、予後は、無増悪生存期間（ＰＦＳ）又は全生存期間（ＯＳ）の時間として示される。

【００２６】

本発明の文脈において使用される無増悪生存期間（ＰＦＳ）は、癌等の疾患の治療中及び治療後の、患者が疾患を抱えて生きているが、疾患は悪化しておらず、すなわち、疾患が進行せずに生存している時間の長さとして定義されるものとする。ＰＦＳは更に、例えば臨床試験における無作為な割り付けから、疾患の進行又はあらゆる原因による死亡までの時間として定義されるものとする。臨床試験において、ＰＦＳの測定は、新しい治療がどれだけうまく機能するかを確認する1つの方法である。本発明の文脈において使用される「全生存期間」（ＯＳ）という用語は、特定の疾患の診断日又は治療開始日からの、患者がまだ生きている期間として定義されるものとする。したがって、臨床試験においては、全生存率の尺度は、死亡した患者の数と、死亡しなかった患者の数とを比較することとなる。

【００２７】

本発明の文脈における「診断（ｄｉａｇｎｏｓｉｓ）」又は「診断（ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ）」という用語は、病的状態の存在又は性質を特定することを意味する。診断方法は、それらの感度及び特異度の点で異なる。診断アッセイの「感度」は、試験陽性となる罹患者のパーセンテージ（「真陽性」のパーセント）である。アッセイによって検出されなかった罹患者は「偽陰性」である。罹患しておらず、アッセイにおいて試験陰性となる対象は「真陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異度」は、1から偽陽性率を引いたものであり、ここで、「偽陽性」率は、疾患を伴わないのに試験陽性となる者の割合として定義される。特定の診断方法は、病態の確定診断を提供しない場合があるが、その方法が診断に役立つ良好な兆候を提供すれば、それで十分である。

【００２８】

「疾患、病態、又は障害の監視」という用語は、本発明の目的で、療法を受ける患者における疾患進行を観察することを意味するものとする。言い換えれば、療法の間にある患者を、適用された療法の効果について定期的に監視し、これにより、医師は、指示された治療が有効であるかどうかを療法の初期段階で推定することが可能となるため、それに応じて治療計画を調整することができる。

【００２９】

本発明によれば、本発明の方法を使用して、あらゆる疾患、病態、又は障害を予後診断、診断、及び／又は監視することができる。好ましい実施の形態においては、予後診断、診断、及び／又は監視される上記疾患、病態、又は障害は、癌、ウイルス性疾患、心疾患、神経変性疾患、酸化ストレスに関連する疾患、及び／又は細胞内のＮ6-メチルアデノシン（ｍ6Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ｍｃｍ5ｓ2Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す他の疾患である。

【００３０】

更なる好ましい実施の形態においては、予後診断、診断、及び／又は監視される上記癌は、乳癌、黒色腫、神経膠芽腫、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、

甲状腺癌、食道癌、脳癌、結腸直腸癌、胃部癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路の癌、腎癌、癌腫、及び細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾を調節する及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍から選択され、ここで、好ましくは、上記癌は、乳癌、黒色腫、神経膠芽腫、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、又は細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾を調節する及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍である。最も好ましくは、上記癌は、乳癌である。

【００３１】

「癌」及び「癌細胞」という用語は、多細胞生物の組織又は器官において制御不能な成長を示すあらゆる細胞を指す。「乳癌」という用語は、乳房組織又は乳房組織細胞に関連するあらゆる癌又は癌病変を意味すると理解され、乳癌の前駆体、例えば異型乳管過形成又は非異型過形成を含み得る。癌は、例えば乳癌の場合には1つの乳房又は複数の乳房に1つの原発性腫瘍又は多数の個々の原発性腫瘍が存在する疾患として理解され得る。「腫瘍」という用語は、炎症性ではなく、生理学的機能を有しない異常な良性又は悪性の組織腫瘤を指す。

【００３２】

本明細書において使用される場合に、「対象」又は「患者」という用語は、限定されるものではないが、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類等を含むあらゆる動物（例えば、哺乳動物）を指す。典型的には、「対象」及び「患者」という用語は、本明細書においては、ヒト対象に関して区別なく使用される。本明細書において使用される場合に、「癌を有する疑いのある対象」という用語は、癌の指標となる1つ以上の症状（例えば、顕著なしこり又は腫瘤）を表す対象を指す。癌を有する疑いのある対象は、1つ以上の危険因子を有する場合もある。癌を有する疑いのある対象は、一般に、癌の検査を受けていない。しかしながら、「癌を有する疑いのある対象」には、初期診断（例えば、腫瘤を示すＣＴスキャン）を受けたが、癌のサブタイプ又は病期が不明である個体が包含される。さらに、この用語には、かつて癌に罹った人（例えば、寛解中の個体）、及び癌に罹っていて原発腫瘍の転移拡散を有する疑いのある人が含まれる。

【００３３】

本明細書において記載される発明の好ましい実施の形態においては、上記対象は、哺乳動物、好ましくはヒト、より好ましくは癌と診断されたヒト患者、又は転移性乳癌と診断されたヒト患者である。本発明は更に、乳癌だけでなく、転移性乳癌、そして循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）陽性乳癌さえも診断することを可能にする。したがって、本発明の患者／対象は、疾患の上記病期のどれが診断、予後診断、層別化、又は試験されるかに応じて様々であり得る。当業者は、例えば転移性乳癌と既に診断された患者が、例えば乳癌自体の一般的な存在について試験されないことを承知している。しかしながら、当然、これは本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。それというのも、既に確立された診断も、本明細書に記載される本発明の方法のいずれか1つで検証され得るからである。

【００３４】

特に好ましい実施の形態においては、上記対象は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、サル、又はヒト等の哺乳動物、好ましくはヒト患者等のヒト、より好ましくは、疾患、病態、又は障害を患っていて治療を必要としているヒト患者である。

【００３５】

本明細書において使用される「生体試料」という用語は、得られた試料であって、本発明で開示されるバイオマーカーのいずれか1つ、又はそれらの遺伝子発現についてアッセイされ得る試料を指す。生体試料としては、生体液（例えば、血液、脳脊髄液、尿、血漿、血清）、組織生検試料等を挙げることができる。幾つかの実施の形態においては、試料は、組織試料、例えば、腫瘍組織であり、新鮮な組織、凍結された組織、又は固定パラフィンで包埋された組織であり得る。本発明の目的に好ましい試料は、体液、特に血漿試料

である。

【００３６】

好ましい実施の形態においては、生体試料は、腫瘍由来の細胞群、腫瘍組織の試料、ＲＮＡ試料、ＤＮＡ試料、血液試料、血清試料、血漿試料、尿試料、リンパ液試料、胸膜液試料、又は脳液試料、好ましくは腫瘍由来の細胞群又は腫瘍組織の試料等の組織試料又は体液試料を含む対象の試料である。

【００３７】

本明細書において記載される、試料、コントロール、又は参照における少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び少なくとも1つの第2のバイオマーカーの「レベルを決定する」という用語は、試験される試料における上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーの存在の定量化を指すものとする。例えば、上記試料における第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの濃度は、試験される試料中に存在するタンパク質／ポリペプチド／多糖の量の測定を介して直接的に定量化され得る。さらに、例えば質量分析による、修飾されたＲＮＡヌクレオチドの評価を介して、第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの量を直接的に定量化することも可能である。しかしながら、第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーのコーディング遺伝子の遺伝子発現の評価を介して、例えばそれぞれのバイオマーカーをコードする発現されたｍＲＮＡの定量化によって、第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの量を間接的に定量化することも可能である。特定のバイオマーカーのレベルを決定する方法は、当業者によく知られている。本発明は、所与のバイオマーカーのレベルを決定する特定の方法に何ら限定されるものではなく、直接的又は間接的のいずれかで、上記第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーのレベルの定量化又は推定を可能にするあらゆる手段を包含するものとする。したがって、本発明の文脈における「レベル」は、例えば、絶対重量、体積、若しくはモル量のような所与の試料中のバイオマーカーの絶対量を表すパラメーターであるか、又は代替的には、「レベル」は、相対量、好ましくは試験される試料中の上記バイオマーカーの、例えばｍｏｌ/ｌ、ｇ/ｌ、ｇ/ｍｏｌ等での濃度に関係する。好ましい実施の形態においては、「レベル」は、試験されるバイオマーカーのｇ/ｌでの濃度を指す。

【００３８】

本明細書において記載される、試料、コントロール、又は参照における少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び少なくとも1つの第2のバイオマーカーの「突然変異状態を決定する」という用語は、例えば、Ｎ6-メチルアデノシン（ｍ6Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路の遺伝子における又は5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ｍｃｍ5ｓ2Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路の遺伝子における、生殖細胞系列突然変異及び／又は体細胞突然変異等の突然変異の有無を分析することを指すものとする。特定のバイオマーカーの突然変異状態を決定する方法は、当業者によく知られている。本発明は、所与のバイオマーカーの突然変異状態を決定する特定の方法に何ら限定されるものではなく、直接的又は間接的のいずれかで上記バイオマーカーの突然変異状態の決定を可能にするあらゆる手段を包含するものとする。突然変異の有無は、例えば、細胞から得られた核酸を単離し、核酸を増幅し、増幅された核酸における突然変異の有無を決定することによって決定され得る。実施の形態の幾つかにおいては、突然変異の有無は、アレル特異的ポリメラーゼ連鎖反応（ＡＳ-ＰＣＲ）によって決定される。基準値としては、以下で、野生型、野生型状態、又は参照ＤＮＡとも呼ばれる、突然変異を有しないゲノムＤＮＡの対応する区間の対応する特性、特に塩基配列が適切である。例えば、同じ個体の正常組織、特に健康な組織からのゲノムＤＮＡが野生型として適している。これは、例えば、体細胞突然変異の決定に関して好ましい野生型であり得る。野生型として、参照ゲノムを使用することもできる。適切な参照ゲノムとしては、2015年7月16日時点のゲノム参照コンソーシアムのゲノム参照コンソーシアムヒトビルド38パッチリリース2（GenomeReference Consortium Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2）（GRCh38.p2）のヒトゲノム版が挙げられる。例えば、参照ゲノムは、生殖細胞系列突然変異

及び／又は体細胞突然変異を決定するのに好ましい野生型であり得る。

【００３９】

本発明の少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び少なくとも1つの第2のバイオマーカーの「突然変異状態を決定する」方法は、例えば患者から得られたDNA試料を増幅する又は患者から得られたRNA試料をDNAへと逆転写してDNAを増幅する工程と、増幅されたDNAを分析して、N6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路に関与する及び／又は5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路に関与する遺伝子に関する少なくとも1つの配列異常を決定する工程とを含み得る。突然変異状態の決定は、例えば、サンガーシーケンシングによって行われ得る。本発明の方法は、一塩基多型（SNP）の決定及び／又は一塩基突然変異（すなわち、ヌクレオチドの置換、挿入、欠失）の分析を含み得る。

【００４０】

本明細書において記載される、試料、コントロール、又は参照における少なくとも1つのバイオマーカーの「活性を決定する」という用語は、例えば、m6A-mRNA修飾を調節する経路に関与する及び／又はmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路に関与する酵素又はタンパク質の酵素アッセイを行うことによって、例えば、本発明のバイオマーカーの少なくとも1つの酵素活性を分析することを指すものとする。本発明によれば、少なくとも1つのバイオマーカーの「活性を決定する」という用語は、m6A-mRNA修飾を調節する経路に関与する及び／又はmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路に関与する酵素又はタンパク質のリン酸化状態を分析することを更に含むものとし、ここで、酵素又はタンパク質の活性は、特定の酵素又はタンパク質のアミノ酸の少なくとも1つのリン酸化状態に依存する。特定のバイオマーカーの活性及び／又は酵素及び／又はタンパク質のリン酸化を決定する方法は、当業者によく知られており、1つの特定の実施の形態においては、ウエスタンブロッティング又はELISAを含み得る。しかしながら、本発明は、所与のバイオマーカーの活性を決定する特定の方法に何ら限定されるものではなく、直接的又は間接的のいずれかで上記バイオマーカーの活性の決定を可能にするあらゆる手段を包含するものとする。

【００４１】

本発明による「少なくとも1」という用語は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又はあらゆる他の数値を含むものとする。例えば、本発明による「少なくとも1」つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定するという用語は、1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、又はあらゆる他の数値の可能な第1のバイオマーカー、すなわち、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的なバイオマーカーを決定することを含むものとする。さらに、本発明による「少なくとも1」つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定するという用語は、1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、又はあらゆる他の数値の可能な第2のバイオマーカー、すなわち、細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的なバイオマーカーを決定することを含むものとする。また、本発明による特定の酵素又はタンパク質のアミノ酸の「少なくとも1」つのリン酸化状態を決定するという用語は、特定の酵素又はタンパク質のリン酸化されている可能性のある1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、又はあらゆる他の数値のアミノ酸を決定することを含むものとする。

【００４２】

本発明の文脈における「バイオマーカー」又は「マーカー」は、例えば、或る特定の病態を有する患者から採取された試料において、上記病態を有しない対象（例えば、陰性診

断、正常又は健康な対象）から採取された比較可能な試料と比較して存在の差異がある有機生体分子、特にポリペプチド又は多糖を指す。例えば、マーカーは、転移性乳癌患者の試料において、陰性診断を受けた患者、又は非転移性乳癌患者の試料と比較して上昇したレベル又は減少したレベルで存在する（特定の見かけの分子量を有する）ポリペプチド又は多糖であり得る。試料中のバイオマーカーのレベルの、コントロールと比較した「増加」は、好ましい実施の形態においては、本発明の好ましい態様における統計的に有意な増加を指すものとする。本発明の代替的な実施の形態においては、本明細書において開示される或る特定のバイオマーカーはまた、対象における特定の疾患、病態、又は障害の場合に有意に減少し得る。

【００４３】

本発明の予後診断方法及び／又は診断方法の工程（ｂ）におけるマーカー及び／又は工程（ｃ）におけるマーカーの分析は、試験されたマーカーの少なくとも1つが、少なくとも60％、好ましくは少なくとも65％、又はより好ましくは少なくとも70％の95％信頼区間（CI）で明らかな曲線下面積（AUC）を有することを特徴とするとすることが好ましい。AUCを決定する方法は、当業者に知られている。代替的に又は追加的に、本発明のバイオマーカーは、少なくとも75％、好ましくは少なくとも80％の感度、及び少なくとも40％、好ましくは少なくとも50％、より好ましくは少なくとも60％の特異度を特徴とし得る。

【００４４】

本発明は、mcm5s2U修飾tRNAがm6A修飾mRNAのゆらぎ位置での解読を増強し、それにより遺伝子発現及び細胞分化を調節するという発見に基づくものである。したがって、本発明者らは、m6Aが核mRNAプロセシングをtRNA解読に結び付ける機序を発見した。この機序は、対象における疾患、病態、又は障害の予後診断、診断、及び／又は監視を行い、遺伝子発現がm6A／mcm5s2U軸によって調節不全となっている疾患における治療介入を行う新規のアプローチに相当する。本発明者らは、m6A修飾mRNAの解読がtRNAアンチコドン修飾mcm5s2Uによって促進され得ることを見出したことから、それにより、mRNAとtRNAとの間のエピトランスクリプトームの予想外のつながりが明らかとなった。この系は、mRNAの半減期を翻訳依存的に制御するため、mRNAのエキソン－イントロン構造がそれらのターンオーバーに結び付けられる。

【００４５】

さらに、本発明者らは、細胞がm6A及びmcm5s2Uの生合成機構の発現のバランスを取っており、それを行うことができないことが癌等の疾患と関連していることを発見した。これは、m6A／mcm5s2U軸が遺伝子発現を調節し、細胞分化を制御するエピトランスクリプトーム機序として進化したことを示唆している。健康なヒト組織において、m6A及びmcm5s2Uについての生合成因子の発現は高度に相関している。最も重要なことは、CRISPR遺伝子依存性データは、m6A生合成因子に依存する癌細胞もmcm5s2U生合成因子を必要とし、その逆もまた同様であることを示している。これらの結果は、m6A-エピトランスクリプトーム及びmcm5s2U-エピトランスクリプトームが、複雑にバランスが取られているため、mcm5s2UによるtRNAアンチコドンの修飾がm6Aのバランスの悪さを打ち消し、逆もまた同様であることを示唆している。

【００４６】

m6Aについての生合成因子に関与する遺伝子、mRNA、又はタンパク質を決定するには、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及び／又はm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質を分析することが好ましい。m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）は、METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、及びRBM15、ZC3H13等の多数のタンパク質の構成要素を含む。さらに、m6Aリーダータンパク質YTHDF1（YTH1）、YTHDF2（YTH2）、及びYTHDF3（YTH3）を分析して、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定するこ

とができる。また、m6AデメチラーゼFTO及びALKBH5を分析して、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定することができる。

【００４７】

好ましくは、m6A-MTC、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aデメチラーゼのタンパク質のいずれかを分析して、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定することができる。更なる好ましい実施の形態においては、METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5を分析して、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する。

【００４８】

mcm5s2U生合成因子は、多能性遺伝子の発現及び幹細胞の維持に必要とされており[3,4]、この経路における欠陥は、神経変性、ウイルス感染症、及び癌に関連付けられている。mcm5s2Uの生合成は、エロンゲーター複合体（ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、及びELP6からなる）、メチルトランスフェラーゼALKBH8、MOCS3、URM1、及びCTU1-CTU2チオラーゼ複合体を要する多段階プロセスである。したがって、エロンゲーター複合体及びメチルトランスフェラーゼALKBH8のタンパク質を分析して、mcm5s2U-tRNAについての因子の生合成に関与する遺伝子、mRNA、又はタンパク質を決定することができる。さらに、CTU1-CTU2チオラーゼ複合体（すなわち、CTU1及び／又はCTU2）を分析して、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定することができる。さらに、mcm5sU生合成経路においてCTU1及びCTU2の上流にあるMOCS3及びURM1を分析して、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定することもできる。

【００４９】

5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNAについての生合成因子に関与する遺伝子、mRNA、又はタンパク質を決定するには、細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路の遺伝子、mRNA、又はタンパク質、好ましくはELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8等の遺伝子、mRNA、又はタンパク質が分析される。

【００５０】

特に好ましい実施の形態においては、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な上記少なくとも1つの第1のバイオマーカーは、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択され、好ましくは、METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5である。

【００５１】

細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な上記少なくとも1つの第1のバイオマーカーは更に、METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1

、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及びALKBH5から選択されるような、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される上記第1のバイオマーカーの少なくとも2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、又は14種を含むシグネチャーパネルであり得る。

【００５２】

更なる特に好ましい実施の形態においては、細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーは、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及びALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される。

【００５３】

細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーは更に、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及びALKBH8から選択されるような、細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される上記第2のバイオマーカーの少なくとも2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、又は11種を含むシグネチャーパネルであり得る。

【００５４】

更に別の特に好ましい実施の形態は、細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーに関し、ここで、上記第2のバイオマーカーは、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1の遺伝子、mRNA、若しくはタンパク質、又はそれらの組合せから選択される。

【００５５】

細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーは更に、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される上記第2のバイオマーカーの少なくとも2種、又は3種、又は4種全てを含むシグネチャーパネルであり得る。好ましくは、上記第2のバイオマーカーの少なくとも2種、又は3種、又は4種全てを含む上記パネルは、バイオマーカーの組合せCTU1及びCTU2、CTU1及びMOCS3、CTU1及びURM1、CTU2及びMOCS3、CTU2及びURM1、MOCS3及びURM1、CTU1、CTU2、及びMOCS3、CTU1、CTU2、及びURM1、CTU1、MOCS3、及びURM1、CTU2、MOCS3、及びURM1、並びにCTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1から選択される。特に好ましい実施の形態は、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される第2のバイオマーカーの4種全てを含むパネルに関する。したがって、好ましい例は、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルからなる。

【００５６】

当業者は、多数の方法を使用して、特定のマーカー又は複数のマーカーについての閾値又は参照値を選択することができることを理解するであろう。診断的な態様においては、閾値は、例えば、或る特定の型の癌を有する患者の集団から、及び癌を有しない対象の第2の集団から得られた試料に対してアッセイ方法を実施することによって取得され得る。代替的には、閾値は、例えば、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の低下に関連する侵襲型の癌を有する患者の集団から、及び無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の増加に関連するかなり軽度の癌を有する対象の第2の集団から得られた試料に対してアッセイ方法を実施することによって取得され得る。

【００５７】

上記方法に関連して、上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレ

ベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異の増加又は減少は、無増悪生存期間（ＰＦＳ）及び／又は全生存期間（ＯＳ）の時間の低下の指標となり得る。バイオマーカーのレベルの減少が予後不良と関連している場合には、上記試料中の上記バイオマーカーの減少も、無増悪生存期間（ＰＦＳ）及び／又は全生存期間（ＯＳ）の時間の低下の指標となり得る。

【００５８】

予後診断用途又は治療監視用途の場合には、例えば全てが乳癌を有する患者の集団を、対象となる期間（例えば、それぞれ診断又は治療後の6ヶ月）にわたって追跡した後に、集団を多数の群、例えば2つの群、すなわちエンドポイントまで進行する対象の第1の群（例えば、疾患の再発、及び／又は死亡）、及びエンドポイントまで進行しない対象の第2の群（例えば、疾患の再発なし、及び／又は死亡なし）に分けることができる。これらを使用して、測定されたマーカー（複数の場合もある）についての「低リスク」集団及び「高リスク」集団の値をそれぞれ確立する。他の適切なエンドポイントとしては、限定されるものではないが、5年死亡率又は転移性疾患までの進行が挙げられる。

【００５９】

これらの群が確立されると、予後リスク、診断、治療の成功等を予測する許容可能な能力をもたらす1つ以上の閾値を選択することができる。実際には、受信者操作特性曲線、すなわち「ＲＯＣ」曲線は、典型的には、変数の値を、2つの集団（例えば、任意に「疾患」及び「正常」又は「低リスク」及び「高リスク」と呼ばれる）におけるその相対度数に対してプロットすることによって計算される。あらゆる特定のマーカーについて、疾患を伴う対象及び疾患を伴わない対象についてのマーカーレベルの分布は重複する場合がある。このような条件下では、試験は「疾患」及び「正常」を１００％の精度で完全に区別するわけではなく、重複領域は試験が「疾患」及び「正常」を区別することができない場所を示す。上回ると（又は、マーカーが疾患によってどのように変化するかに応じて、下回ると）試験が「陽性」と見なされ、下回ると試験が「陰性」と見なされる閾値が選択される。ＲＯＣ曲線下面積（ＡＵＣ）は、認識された測定値が状態の正しい識別を可能にし得る確率の尺度である。

【００６０】

さらに、閾値を、同じ患者からより以前のマーカーの結果を得ることによって確立することができ、それと後の結果が比較され得る。幾つかの態様においては、個体はそれら自体の「コントロール群」として機能する。疾患の重症度又は予後リスクに伴って増加するマーカーにおいては、同じ患者における時間の経過に伴う増加は、疾患の悪化又は治療計画の失敗を示す場合があるのに対して、時間の経過に伴う減少は、疾患の寛解又は治療計画の成功を示す場合がある。

【００６１】

幾つかの実施の形態においては、多数の閾値又は参照値を決定することができる。これは、いわゆる「三分位」分析、「四分位」分析、又は「五分位」分析の場合に当てはまり得る。これらの方法においては、「疾患」群及び「正常」群（又は「低リスク」群及び「高リスク」群）をまとめて単一集団と見なすことができ、等しい個体数を有する3つ、4つ、又は5つ（又はそれより多い）「ビン」に分けられる。これらの「ビン」のうちの2つの間の境界が「閾値」と見なされ得る。（例えば、特定の予後診断又は診断の）リスクは、試験対象がどの「ビン」に該当するかに基づいて割り当てられ得る。

【００６２】

本明細書においては、明示的に示されているか否かにかかわらず、全ての数値は「約」という用語によって修飾されていると想定される。「約」という用語は一般に、当業者が列挙された値と同等であると見なす（すなわち、同じ機能又は結果を有する）数の範囲を指す。多くの場合に、「約」という用語は、最も近い有効数字に四捨五入された数を含み得る。本発明の特に好ましい実施の形態においては、「約」という用語は、数値の最大20％のそれぞれの数値の偏差を指す場合があるが、より好ましくは１５％、１０％、５％であり、更により好ましくは４％、３％、２％であり、最も好ましくは１％である。

【００６３】

特に好ましい実施の形態においては、予後診断、診断、及び／又は監視される上記疾患、病態、又は障害は、癌、ウイルス性疾患、心疾患、神経変性疾患、酸化ストレスに関連する疾患、及び／又は細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す他の疾患である。

【００６４】

更に好ましくは、上記癌は、乳癌、黒色腫、神経膠芽腫、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、甲状腺癌、食道癌、脳癌、結腸直腸癌、胃部癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路の癌、腎癌、癌腫、及び細胞内のm6A-mRNA修飾を調節する及び／又は細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍から選択される。

【００６５】

本明細書において使用される「結腸直腸癌」という用語は、小腸より下の腸管（すなわち、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S状結腸、及び直腸を含む大腸（結腸））の細胞の癌によって特徴付けられる医学的状態としての結腸直腸癌を定義する広く受け入れられている医学的定義を含む。さらに、本明細書において使用される場合に、「結腸直腸癌」という用語はまた、十二指腸及び小腸（空腸及び回腸）の細胞の癌によって特徴付けられる医学的状態を更に含む。

【００６６】

本明細書において使用される「胃部癌」又は「胃癌」という用語は、胃の癌を指す。胃部癌の最も一般的な種類は、限定されるものではないが、胃の上皮細胞を冒す腺癌等の癌腫である。さらに、胃癌としては、例えば、胃の結合組織を冒す肉腫、及び胃の芽組織を冒す芽細胞腫を挙げることができる。

【００６７】

本発明による「膵臓癌」という用語は、膵臓癌の良性形態又は悪性形態だけでなく、膵臓の細胞から生ずるあらゆる特定の型の癌（例えば、膵管細胞癌、腺房細胞癌、乳頭癌、腺扁平上皮癌、未分化癌、粘液癌、巨細胞癌、混合型膵癌、小細胞癌、嚢胞腺癌、未分類膵臓癌、膵芽腫、及び乳頭状嚢胞性新生物等）も包含するものとする。

【００６８】

本発明の好ましい実施の形態においては、癌は、好ましくは上皮起源の癌である。上皮癌は、例えば、卵巣、結腸、肺、直腸、乳房、前立腺、膵臓、食道、膀胱、肝臓、子宮、又は脳の上皮癌である。

【００６９】

本発明の更なる好ましい実施の形態においては、工程（b）及び工程（c）における上記第1のバイオマーカー及び上記第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、方法の工程（d）における参照試料又は参照値と比較する。好ましくは、参照試料又は参照値は「コホート固有の」参照値である。特定の実施の形態においては、腫瘍試料のシグネチャーを、n分位（例えば、四分位）へとビン分割する。次に、異なるn分位（例えば、四分位）の生存率を比較する。本発明の更なる実施の形態は、方法の工程（d）における参照試料又は参照値が、健康な個体から得られた又は腫瘍疾患を患っている対象からの腫瘍隣接組織から得られた試料に対応する、本発明の方法に関する。

【００７０】

本発明の特に好ましい実施の形態は、乳癌患者等の癌患者を予後診断する方法であって、

（a）上記対象の生体試料を準備する工程と、

（b）上記生体試料における細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの

第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、
（c）上記生体試料における細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、
（d）工程（b）及び工程（c）における上記第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、参照試料又は参照値と比較する工程と、
を含み、
ここで、上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、疾患、病態、又は障害を患っている患者の無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の低下の指標となる、方法に関する。

【００７１】

本発明の別の好ましい実施の形態のいずれかと組み合わせることができる1つの好ましい実施の形態は、上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性が、mRNA分析、DNA分析、タンパク質分析を含む検出方法、及び／又は標的核酸配列中の一塩基多型（SNP）を決定する方法によって決定される、上記の方法のいずれかに関する。

【００７２】

本発明の全ての態様及び実施の形態において、上記試料における上記少なくとも1つのバイオマーカーのレベルは、核酸検出方法又は免疫学的検出方法によって決定されることが好ましい場合がある。しかしながら、核酸検出方法は、発現されるタンパク質がバイオマーカーである場合にのみ適用可能である。一般に、そのようなタンパク質の発現、突然変異状態、及び／又は活性の定量化を可能にするあらゆる手段が本発明により含まれるものとする。したがって、プロモーター分析、及び本発明のタンパク質バイオマーカーをコードする遺伝子座のエピジェネティック状態を評価する手順も、本明細書において記載される発明により含まれる。代替的に、タンパク質の代謝を調節する酵素の存在又は発現を評価することができ、これはそのタンパク質の存在又はレベルの指標となる。

【００７３】

上記試料における上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する本明細書において記載される発明の文脈において好ましい検出方法は、質量分析、質量分析イムノアッセイ（MSIA）、抗体ベースのタンパク質チップ、2次元ゲル電気泳動、抗ペプチド抗体による安定同位体標準捕捉（stable isotope standard capture with anti-peptide antibodies）（SISCAPA）、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、ウエスタンブロット、サイトメトリービーズアレイ（CBA）、タンパク質免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、リガンド結合アッセイ、及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）からなる群から選択される検出方法の手段を含むものとし、ここで、好ましくは、上記タンパク質検出方法はELISAである。本発明のバイオマーカーを決定するのに適した代替的な検出方法は、当業者に知られている。

【００７４】

特に好ましい実施の形態においては、上記試料における上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の決定に使用される検出方法は、mRNA分析、DNA分析、タンパク質分析を含む検出方法、及び／又は一塩基多型（SNP）のセットを含む多型アレイ等の標的核酸配列中の一塩基多型（SNP）を決定する方法、例えば、Affymetrix GeneChip、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リアルタイム定量的PCR（qPCR）、nanoStringnCounter、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、質量分析、質量分析イムノアッセイ（MSIA）、抗体ベースのタンパク質チップ、2次元ゲル電気泳動、抗ペプチド抗体による安

定同位体標準捕捉（SISCAPA）、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、遺伝子検査、ウエスタンブロット、サイトメトリービーズアレイ（CBA）、ラジオイムノアッセイ、及び免疫組織化学染色から選択され、好ましくは、上記検出方法は、標的核酸配列中の一塩基多型（SNP）を決定する多型アレイ、及び／又はリアルタイム定量的PCR（qPCR）である。

【００７５】

本発明の更に別の好ましい実施の形態は、上記参照試料又は参照値と比較した上記対象からの生体試料における上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異は、疾患、病態、又は障害を患っている患者の無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の低下の指標となり、かつ上記参照試料又は参照値は、コホート固有の参照試料又は参照値であり、ここで、上記対象からの生体試料と比較した、参照試料又は参照値における上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性は、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間の増加の指標となる、方法に関する。

【００７６】

本発明の更なる好ましい実施の形態は、上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が上記対象における癌の存在の指標となり、ここで、好ましくは、該癌が、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、及び／又は子宮内膜癌である、方法に関する。

【００７７】

本発明の更に好ましい実施の形態は、（i）m6A-mRNA修飾を調節する少なくとも1つの遺伝子、mRNA、又はタンパク質のレベルと、（ii）mcm5s2U-tRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質とを比較した比率の差異が疾患、病態、又は障害の指標となる、方法に関する。

【００７８】

本発明の特に好ましい実施の形態においては、細胞内のm6A mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性と、細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性との相対レベルは、

（a）i）m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sから選択される少なくとも1つの第1のバイオマーカー、及びii）ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される少なくとも1つの第2のバイオマーカーを測定する工程と、

（b）上記相対レベルを決定する工程と、

を含む方法によって決定される。

【００７９】

特に好ましい実施の形態においては、（a）において測定される上記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）は、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルを含み、及び／又は上記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）は、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルからなる。

【００８０】

本発明の更なる好ましい実施の形態は、上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象

からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、以下：
（a）健康なコントロールと比較した、より高いレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
（b）健康なコントロールと比較した、より高いレベルのm6A修飾mRNA及び不変／正常なレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
（c）健康なコントロールと比較した、より高いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
（d）健康なコントロールと比較した、より低いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
（e）健康なコントロールと比較した、より低いレベルのm6A修飾mRNA及び不変／正常なレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
（f）健康なコントロールと比較した、より低いレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
（g）健康なコントロールと比較した、不変／正常なレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、又は、
（h）健康なコントロールと比較した、不変／正常なレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害、
のいずれか1つの指標となる、本発明の方法に関する。

【００８１】

本発明の更に好ましい実施の形態においては、健康なコントロールは、健康な対象の比較可能な試料であるか、又はそれから得られた参照値であり、ここで、健康な対象は、m6A修飾mRNA及び／又はmcm5s2U修飾tRNAのレベルの差異に関連する疾患、病態、又は障害を患っていないことが分かっている。

【００８２】

本発明の更なる好ましい実施の形態においては、健康なコントロールは、「コホート固有の」参照値に由来する。特定の実施の形態においては、腫瘍試料のシグネチャーを、n分位（例えば、四分位）へとビン分割する。次に、異なるn分位（例えば、四分位）を比較する。本発明の更なる実施の形態は、健康なコントロールが、最も少ない疾患の症状を示し、及び／又は最良の生存率を示すコホートのn分位として定義される、本発明の方法のいずれか1つに関する。

【００８３】

本発明の更に好ましい実施の形態においては、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異の結果が、（i）より低いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAの指標となるような場合に、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間は、そのような結果を示さない対象と比較して減少し、及び／又は（ii）より高いレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAの指標となるような場合に、無増悪生存期間（PFS）及び／又は全生存期間（OS）の時間が、そのような結果を示さない対象と比較して延長する。

【００８４】

本発明の更なる好ましい実施の形態は、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異の結果が、より低いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記方法における（d）を参照）の指標となるか、より低いレベルのm6A修飾mRNA及び不変／正常なレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記方法における（e）を参照）の指標となるか、又は不変／正常なレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記方法における（h）を参照）の指標となるような場合に、上記疾患、病態、又は障害が、膀胱癌、乳癌、食道癌、肺癌、

及び甲状腺癌から選択される癌疾患である、本発明の方法に関する。
【００８５】
本発明の更に好ましい実施の形態は、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異の結果が、より高いレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記方法における（a）を参照）の指標となるか、より高いレベルのm6A修飾mRNA及び不変／正常なレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記方法における（b）を参照）の指標となるか、又は不変／正常なレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記方法における（g）を参照）の指標となるような場合に、上記疾患、病態、又は障害が、腎臓癌、肝臓癌、及び胃癌から選択される癌疾患であることを特徴とする。
【００８６】
本発明の更に別の態様は、疾患、病態、又は障害について患者を層別化する方法であって、第1の工程として、参照試料又は参照値と比較した、上記患者からの生体試料における少なくとも1つの第1のバイオマーカー及び／又は少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を特定することと、第2の工程として、上記レベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異に基づいて、治療への賛成又は反対を決断することとを含み、ここで、上記レベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異は、
（a）上記患者の生体試料を準備する工程と、
（b）上記生体試料における細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、
（c）上記生体試料における細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、
（d）工程（b）及び工程（c）における上記第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、参照試料又は参照値と比較する工程と、
を含む方法を使用することによって特定される、方法に関する。
【００８７】
本発明の目的での「層別化」という用語は、本発明による方法により、患者の治療及び療法について、患者の入院であるか、1つ以上の薬物、治療措置の使用、効果、及び／又は投薬量であるか、又は疾患の経過及び療法の経過の監視であるか、又は疾患の病因若しくは疾患の、例えば新しいサブタイプ若しくは既存のサブタイプへの分類、又は疾患及びその患者の識別であるかどうかの決定が可能となるという利点を指すものとする。特に乳癌に関して、「層別化」は、この文脈において、転移状態、又は循環腫瘍細胞の有無に関する個々の患者の乳癌疾患の分類を意味する。また、「層別化」という用語は、特に、不良な健康事象の転帰の予後診断によるリスク層別化を含んでいる。特に好ましい実施の形態においては、癌等の病態、障害、又は疾患を、mcm5s2U経路状態によって層別化して、m6A標的化化合物によるm6A生合成の擾乱に対する感度を予測する。さらに、癌等の病態、障害、又は疾患を、mcm5s2U経路の発現状態及び／又は突然変異状態の分析によって層別化して、m6A標的化化合物によるm6A生合成の擾乱に対する感度を予測する方法が好ましい。
【００８８】
更に別の好ましい実施の形態は、癌患者を、m6A標的化化合物を用いた療法に対するレスポンダー及びノンレスポンダーへと層別化する方法に関する。層別化するのに特に好ましい癌は、AML及び神経膠芽腫である。それというのも、以前の結果では、AML及び

神経膠芽腫がm6A経路の擾乱に対して様々な応答を示すことが明らかとなっているからである。したがって、mcm5s2U経路を使用して、m6A標的化合物による療法の転帰を予測することができる。

【００８９】

重要なことには、本発明を使用して、治療に対する患者の奏効を予測することができる。本発明者らは、高いm^{6}A／mcm^{5}s^{2}Uシグネチャーが、ラパチニブ及びゲフィチニブを含むEGFR標的化チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）に対する感度の増加と相関することを観察した（図7）。したがって、m6A／mcm5s2Uの組合せシグネチャーは、EGFR阻害に対する感度についてのバイオマーカーとして機能する。さらに、m6A／mcm5s2Uの組合せシグネチャーは、癌患者における治療の成功を予測するバイオマーカーとして使用され得る。一実施の形態においては、癌患者は、EGFR標的化チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）で治療される。しかしながら、本発明は、EGFR標的化TKIによる治療の成功を予測することに限定されない。代わりに、m6A／mcm5s2Uの組合せシグネチャーをバイオマーカーとして使用して、任意の種類の治療による患者の治療の成功を予測することができる。一実施の形態においては、成功が予測される治療は、エピトランスクリプトームを標的化するものである。

【００９０】

本発明の更に好ましい実施の形態は、患者を治療について層別化する上記の方法であって、（i）上記少なくとも1つの第1のバイオマーカーが、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択され、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sであり、及び／又は（ii）上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーが、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される、方法に関する。

【００９１】

特に好ましくは、上記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）が、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルを含み、及び／又は上記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）が、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルからなる、上記の方法である。

【００９２】

本発明の更なる好ましい実施の形態は、患者を治療について層別化する上記の方法であって、（d）における上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異に基づいて、N6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を増強又は阻害すること、及び／又は5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を増強又は阻害することへの賛成を決断する、方法に関する。

【００９３】

本発明の好ましい一実施の形態は、患者を治療について層別化する上記の方法であって、上記治療は、細胞内のm6A-mRNA修飾及び／又は細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を標的化する治療であり、好ましくは、上記治療は、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、m6Aイレーサータンパク質、及び／又はエロンゲーター複合体を阻害又は活性化する、方法に関する。

【００９４】

本発明の更に好ましい実施の形態においては、（d）における上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異が、上記参照試料又は

参照値と比較して、少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、より好ましくは少なくとも10%、更により好ましくは少なくとも15%、最も好ましくは少なくとも20%高い又は低い場合に、上記治療への賛成が決断される。

【００９５】

しかしながら、絶対濃度レベルは、使用される試料の取り扱い方法及び定量方法に大きく依存する。上記レベルは、実施例の文脈において使用される方法に対応する試料の取り扱いに該当する。したがって、当業者は、過度の実験に直面することなく、試料処理プロトコルの変更に応じて新しい参照値を決定しなければならないことを理解している。

【００９６】

本発明の課題は更に、治療を受けた患者の治療の成功を評価する方法であって、

（a）治療を受けた上記患者の生体試料を準備する工程と、

（b）上記生体試料における細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、

（c）上記生体試料における細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を決定する工程と、

（d）工程（b）及び工程（c）における上記第1のバイオマーカー及び第2のバイオマーカーの決定されたレベル、突然変異状態、及び／又は活性を、参照試料又は参照値と比較する工程と、

を含み、

ここで、上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異の減少又は増加が、上記治療に対する患者の奏効の指標である、方法によって解決される。

【００９７】

更に別の好ましい実施の形態においては、治療を受けた患者の治療の成功を評価する方法であって、上記参照試料又は参照値と比較した、上記対象からの生体試料における上記第1のバイオマーカー及び／又は第2のバイオマーカーの上記レベル、突然変異状態、及び／又は活性の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは25%、更により好ましくは30%、最も好ましくは35%～45%の減少又は増加が、上記治療に対する患者の奏効の指標である、方法が好ましい。

【００９８】

本発明の更に好ましい実施の形態は、（i）上記少なくとも1つの第1のバイオマーカーが、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択され、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sであり、及び／又は（ii）上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーが、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される、本発明の方法に関する。

【００９９】

本明細書に記載される本発明の態様の文脈における「参照」は、好ましくは、上記治療を受ける前に上記患者から得られた提供された生体試料における上記少なくとも1つのバイオマーカーのレベルに対応する。それにより、参照は未治療のコントロールに対応する。更に好ましい実施の形態においては、上記参照は、上記治療を受ける前に上記患者から得られた提供された生体試料における、上記第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性の、上記第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性に対する比率に対応する。

【０１００】
本発明の更なる好ましい実施の形態は、上記治療が、細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を標的化する治療であり、好ましくは、上記治療は、ｍ６Ａメチルトランスフェラーゼ複合体（ｍ６Ａ-ＭＴＣ）、ｍ６Ａリーダータンパク質、ｍ６Ａイレーサータンパク質、及び／又はエロンゲーター複合体を阻害又は活性化する、本発明の方法に関する。
【０１０１】
本発明の更に好ましい実施の形態においては、上記疾患、病態、又は障害は、好ましくは、ｍｃｍ５ｓ２Ｕ対ｍ６Ａのレベル、すなわちｍｃｍ５ｓ２Ｕ対ｍ６Ａの比率を調整することによって治療され、ｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡがｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡの解読を増強し、それにより遺伝子発現及び細胞分化を調節することを特徴とする。
【０１０２】
本発明の好ましい一実施の形態は、非侵襲的方法であり、好ましくは、ex vivoの方法又はin vitroの方法である、上記の方法に関する。本明細書において記載される発明の全ての方法は、好ましくはin-vitroの方法、より好ましくは、ヒト又は動物の身体で行われる方法工程を一切含まないin-vitroの方法である。
【０１０３】
本発明の更なる好ましい実施の形態は、上記疾患、病態、又は障害が、癌、ウイルス性疾患、心疾患、神経変性疾患、酸化ストレスに関連する疾患、及び細胞内のＮ６-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、及び／又は細胞内の５-メトキシカルボニルメチル-２-チオウリジン（ｍｃｍ５ｓ２Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す他の疾患から選択される、本発明の方法に関する。
【０１０４】
本発明の更に好ましい実施の形態においては、上記癌は、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、甲状腺癌、食道癌、脳癌、結腸直腸癌、胃部癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路の癌、腎癌、癌腫、及び細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾を調節する及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍から選択され、ここで、好ましくは、上記癌は、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾を調節する及び／又は細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍である。
【０１０５】
本発明の他の態様及び／又は実施の形態のいずれか1つと組み合わせることができる本発明の更に別の態様においては、本発明は、対象における疾患、病態、又は障害の予後診断、診断、及び／又は監視を補助するキットであって、細胞内のｍ６Ａ-ｍＲＮＡ修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を定量化する手段と、細胞内のｍｃｍ５ｓ２Ｕ-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及びそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を定量化する手段とを含む、キットを提供する。
【０１０６】
本発明の更に好ましい実施の形態は、（ｉ）上記少なくとも1つの第1のバイオマーカーが、ｍ６Ａメチルトランスフェラーゼ複合体（ｍ６Ａ-ＭＴＣ）、ｍ６Ａリーダータンパク質、及びｍ６Ａイレーサータンパク質の遺伝子、ｍＲＮＡ、又はタンパク質から選択され、好ましくはＭＥＴＴＬ３、ＭＥＴＴＬ１４、ＷＴＡＰ、ＶＩＲＭＡ、ＲＢＭ１５、ＺＣ３Ｈ１３、ＹＴＨＤＦ１、ＹＴＨＤＦ２、ＹＴＨＤＦ３、ＦＴＯ、ＫＩＡＡ１４２９、ＣＢＬＬ１、ＲＢＭ１５、及び／又はＡＬＫＢＨ５ｓであり、及び／又は（ｉｉ）上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーが、ＥＬＰ１/ＩＫＢＫＡＰ、

ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される、本発明のキットに関する。

【０１０７】

特に好ましくは、上記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）が、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルを含み、及び／又は上記少なくとも1つの第2のバイオマーカー（ii）が、CTU1、CTU2、MOCS3、及びURM1のパネルからなる、上記のキットである。

【０１０８】

本発明の好ましい一実施の形態は、（i）m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）のタンパク質、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sの少なくとも1つを検出する1つ以上の抗体、それらの誘導体、又は抗原フラグメントを含む、及び／又は（ii）ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の少なくとも1つを検出する1つ以上の抗体、それらの誘導体、又は抗原フラグメントを含む、上記のキットに関する。

【０１０９】

本発明のキットは、多くの用途を有し得る。例えば、キットを使用して、対象が或る特定の疾患、病態、若しくは障害、例えば癌、特に乳癌、例えば転移性乳癌若しくはCTC陽性乳癌を有するか、又は陰性診断を有するかを区別することができるため、或る特定の診断に役立つ。別の例においては、キットを使用して、例えば、乳癌細胞又は、例えば乳癌用のin vivo動物モデル等のin vitro疾患細胞モデル及び／又はin vivo動物モデルにおいてバイオマーカーの発現を調節する化合物を特定することができる。

【０１１０】

任意に、キットは更に、ラベル又は別の添付文書の形で、適切な操作パラメーターについての使用説明書を含み得る。例えば、キットは、血漿の試料がプローブに接触した後にプローブをどのように洗浄するかを消費者に知らせる標準的な使用説明書を有し得る。

【０１１１】

別の実施の形態においては、キットは、（a）マーカーに特異的に結合する抗体と、（b）検出試薬とを含む。このようなキットを上記の材料から調製することができ、材料（例えば、抗体、検出試薬、固定化支持体等）に関する以前の議論はこのセクションに完全に適用可能であり、繰り返す必要はない。

【０１１２】

いずれの実施の形態においても、キットは任意に、標準情報又はコントロール情報を更に含み得るため、試験試料をコントロール情報の標準と比較して、試料中で検出されたマーカーの試験量が、癌、好ましくは乳癌等の疾患、病態、又は障害の診断と一致する診断量であるかどうかを決定することができる。そのような抗体は当該技術分野において知られており、市販されている。

【０１１３】

好ましくは、本発明のキットは、本発明による方法を実施するキットであって、生体試料における細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第1のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を定量化する手段と、生体試料における細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路の状態及び／又は活性の指標となる及び／又はそれらに選択的な少なくとも1つの第2のバイオマーカーのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を定量化する手段とを含む、キットである。

【０１１４】

本発明の課題は、更なる態様においては、本発明による方法の実施における、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、m6Aイレー

サータンパク質、及びチオール化因子、好ましくは、METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、ALKBH5s、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8から選択されるタンパク質バイオマーカーのいずれか1つに対する抗体、それらの誘導体、又は抗原フラグメントの使用によって解決される。

【０１１５】

本発明の更に別の態様は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングするin vitro又はin vivoの方法であって、

（a）試験生体細胞を準備する工程と、

（b）候補化合物を準備する工程と、

（c）上記試験生体細胞と候補化合物とを接触させる工程と、

（d）（i）候補化合物と接触させていない及び（ii）候補化合物と接触させた試験生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルを決定する工程と、

を含み、

ここで、（ii）において決定された試験生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルの（i）と比較した変化により、候補化合物が生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターであることが示される、方法に関する。

【０１１６】

一態様においては、本発明のスクリーニングは、細胞培養物又は動物モデル、例えばマウス若しくはラットの乳癌モデルにおいて行われ得る。上記スクリーニング方法においては、好ましくは、乳癌等の或る特定の疾患を患っている動物の使用が含まれる。本発明のバイオマーカーに基づく上記モデルにおける乳癌等の疾患の進行は、上記モデルを候補乳癌療法薬との接触又は治療計画に応じて監視され得る。したがって、上記スクリーニング方法において、試験化合物が上記少なくとも1つのバイオマーカーの量の減少を引き起こし、上記試験化合物が乳癌等の疾患用の治療分子として使用される候補物である、使用が好ましい。

【０１１７】

上記方法を更に使用して、他の疾患及び／又は他の癌の型において有効な療法薬の試験を行うことができる。したがって、この代替的な実施の形態は、乳癌ではなく、他の疾患及び他の癌、好ましくは他の上皮癌である疾患及び癌を含む。上述の上皮癌が好ましい。

【０１１８】

本発明の更なる好ましい実施の形態は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする上記の方法であって、工程（d）が、試験生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルを決定することを含む、方法に関する。

【０１１９】

本発明の好ましい一実施の形態は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする上記の方法であって、試験生体細胞が、（ii）mcm5s2U-tRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質と比較した、（i）m6A-mRNA修飾を調節する少なくとも1つの遺伝子、mRNA、又はタンパク質のレベルの比率の差異を有する、方法に関する。

【０１２０】

試験生体細胞が、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）修飾tRNAのレベルと比較した、N6-メチルアデノシン（m6A）修飾mRNAの比率の差異を有する、方法が更に好ましい。

【０１２１】

本発明の更に好ましい一実施の形態は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする上記の方法であって、（i）上記少なくとも1つの第1のバイオマーカーが、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、及びm6Aイレーサータンパク質の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択され、好ましくはMETTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、及び／又はALKBH5sであり、及び／又は（ii）上記少なくとも1つの第2のバイオマーカーが、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1、及び／又はALKBH8の遺伝子、mRNA、又はタンパク質から選択される、方法に関する。

【０１２２】

本発明の更に別の好ましい実施の形態は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする上記の方法であって、特定された上記候補化合物が、m6Aメチルトランスフェラーゼ複合体（m6A-MTC）、m6Aリーダータンパク質、m6Aイレーサータンパク質、チオール化因子、エロンゲーター複合体の遺伝子、mRNA、若しくはタンパク質、又はmcm5s2Uと関連する他の遺伝子、mRNA、若しくはタンパク質の発現及び／又は活性を標的化する、方法に関する。

【０１２３】

tRNAにおけるmcm5s2U修飾が、γ-毒素エンドヌクレアーゼ活性又は翻訳非忠実性で誘導されたタンパク質を決定するアッセイを使用して決定される、方法が更に好ましい。

【０１２４】

本発明の好ましい一実施の形態は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする上記の方法であって、特定された上記候補化合物が、小分子化合物、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、ペプチドミメティック、抗原結合コンストラクト（例えば、抗体、抗体様分子、若しくは他の抗原結合誘導体、又はそれらの抗原結合フラグメント）、DNA若しくはRNA、例えば、アンチセンス若しくは阻害性のDNA若しくはRNA、リボザイム、RNAアプタマー若しくはDNAアプタマー、RNAi、siRNA、shRNA等の、ペプチド核酸（PNA）等のそれらの変異体若しくは誘導体を含む核酸、CRISPR/Cas9コンストラクト及び／又はガイド核酸（gRNA又はgDNA）及び／又はtracrRNA等の標的遺伝子編集用の遺伝子コンストラクトから選択される、方法に関する。

【０１２５】

本発明の好ましい一実施の形態は、生体細胞におけるm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする上記の方法であって、特定された上記候補化合物が、疾患、病態、又は障害を治療することができ、ここで、上記疾患が、癌、ウイルス性疾患、心疾患、神経変性疾患、酸化ストレスに関連する疾患、及び細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す他の疾患から選択される、方法に関する。

【０１２６】

上記癌が、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（AML）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、甲状腺癌、食道癌、脳癌、結腸直腸癌、胃部癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路の癌、腎癌、及び癌腫から選択され、好ましくは、上記癌が、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（AML）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウ

リジン（ｍｃｍ5ｓ2Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍である、上記方法が更に好ましい。

【０１２７】

本発明の他の態様及び／又は特定の実施の形態のいずれかと組み合わせることができる本発明の更なる態様は、癌等の疾患、病態、又は障害の予防、治療、及び／又は診断における、特に癌の再発等の上記疾患、病態、又は障害の再発の予防、治療、及び／又は診断のための、本発明による化合物又はキットの使用に関する。

【０１２８】

本発明の他の態様又は特定の実施の形態のいずれかと組み合わせることができる本発明の更に別の態様は、患者における疾患、病態、又は障害を治療する方法であって、本発明による方法を含み、かつ上記患者における疾患、病態、若しくは障害、又は上記疾患、病態、若しくは障害の再発を治療及び／又は予防することを含む、方法に関する。

【０１２９】

本発明の好ましい一実施の形態は、上記疾患、病態、又は障害がｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を増加又は減少させることによって治療され、及び／又は上記疾患、病態、又は障害がｍｃｍ5ｓ2Ｕ修飾ｔＲＮＡのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を増加又は減少させることによって治療される、上記の治療方法に関する。

【０１３０】

治療的有効量のｍｃｍ5ｓ2Ｕ及び／又はｍ６Ａのレベル、突然変異状態、及び／又は活性を特異的に低下させる又は増強する化合物を対象に投与することを含む方法が更に好ましい。

【０１３１】

本発明の更に好ましい一実施の形態は、上記治療が、上記の本発明の生体細胞におけるｍ６Ａ ｍＲＮＡ修飾及び／又はｍｃｍ5ｓ2Ｕ ｔＲＮＡ修飾のレベルのモジュレーターをスクリーニングする方法に従ってスクリーニングされた化合物を上記対象に投与することを含む、上記の方法に関する。

【０１３２】

本発明の好ましい一実施の形態は、上記疾患、病態、又は障害が、癌、ウイルス性疾患、心疾患、神経変性疾患、酸化ストレスに関連する疾患、及び／又は細胞内のＮ6-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示し、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ｍｃｍ5ｓ2Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す他の疾患であり、ここで、上記癌が、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、甲状腺癌、食道癌、脳癌、結腸直腸癌、胃部癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路の癌、腎癌、及び癌腫から選択され、好ましくは、上記癌が、黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、子宮内膜癌、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、肺癌、膀胱癌、肝細胞癌、髄芽腫、細胞内のＮ6-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ｍｃｍ5ｓ2Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す腫瘍である、上記の方法に関する。

【０１３３】

本発明の他の態様又は特定の実施の形態のいずれかと組み合わせることができる本発明の更に別の態様は、疾患、病態、又は障害の治療において使用される化合物であって、上記疾患、病態、又は障害が、細胞内のＮ6-メチルアデノシン（ｍ６Ａ）ｍＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を特徴とし、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ｍｃｍ5ｓ2Ｕ）-ｔＲＮＡ修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す、化合物に関する。

【０１３４】

本発明の他の態様又は特定の実施の形態のいずれかと組み合わせることができる本発明

の更なる態様は、疾患、病態、又は障害の治療において使用される化合物であって、該化合物は、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を特異的に低下させ又は増強し、好ましくは、上記疾患、病態、又は障害は、細胞内のN6-メチルアデノシン（m6A）mRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を特徴とし、及び／又は細胞内の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）-tRNA修飾を調節する経路のレベル、突然変異状態、及び／又は活性の差異を示す、化合物に関する。

【０１３５】

重要なことには、m6Aは、膠芽腫、急性骨髄性白血病、膀胱癌、及び肝細胞癌を含む様々な癌に関連付けられている。さらに、mcm5s2Uは、乳癌、髄芽腫、及び黒色腫を含む多数の癌に関連付けられている。しかしながら、現在、mcm5s2Uの生合成を特異的に標的化する小分子は入手することができない。さらに、エロンゲーター複合体は、mcm5s2U依存性の癌だけではない有用な薬物標的である。したがって、エロンゲーター複合体を直接的に標的化する小分子は、乳癌、髄芽腫、及び黒色腫等のmcm5s2U依存性の癌についての本発明による薬物リードを提供する可能性があり、m6A／mcm5s2Uのバランスの正確な操作を可能にする併用療法の可能性もある。また、エロンゲーター複合体は、mcm5s2U依存性の癌だけではなく、m6Aに関連付けられた癌においても有用な薬物標的である。したがって、エロンゲーター複合体を直接的に標的化する小分子は、mcm5s2U依存性の病態及び疾患についての有望な薬物リードを提供する。本発明によれば、mcm5s2U若しくはm6Aを調節する化合物、又はmcm5s2U及びm6Aの両方を調節する併用療法は、m6Aとmcm5s2Uとの間のバランスの正確な操作を可能にし、それによって様々な病態、疾患、及び障害を治療する可能性がある。

【０１３６】

本発明の他の態様及び／又は特定の実施の形態のいずれかと組み合わせることができる本発明の別の態様は、疾患、病態、又は障害の治療用の医薬の製造のための、本発明による化合物の使用に関する。

【０１３７】

本発明の他の態様又は特定の実施の形態のいずれかと組み合わせることができる本発明の更に別の態様は、疾患、病態、又は障害と関連する細胞内のm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾の異常なレベルと関連する、好ましくはm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾の異常な比率と関連する疾患、病態、又は障害を患っている対象を治療する方法であって、治療を必要とする対象に、治療的有効量のm6A mRNA修飾及び／又はmcm5s2U tRNA修飾のモジュレーターを投与する工程を含む、方法に関する。

【０１３８】

本明細書で使用される場合に、「（本）発明の」、「本発明による」、「本発明によれば（よる）」等の用語は、本明細書に記載される及び／又は特許請求の範囲に記載される本発明の全ての態様及び実施の形態を指すことを意図する。

【０１３９】

本明細書で使用される場合に、「含む（comprising）」という用語は、「含む（including）」及び「からなる（consisting of）」の両方を包含すると解釈すべきであり、どちらも具体的に意図され、ひいては個別に開示される、本発明に従う実施の形態を意味する。本明細書で使用される場合に、「及び／又は」は、他方を含む又は含まない、2つの指定の特徴又は構成要素の各々の具体的な開示とみなすべきである。例えば、「A及び／又はB」は、各々が本明細書に個別に提示されるかのような、（i）A、（ii）B、並びに（iii）A及びBの各々の具体的な開示とみなすべきである。本発明の文脈において、「約」及び「およそ」という用語は、問題となる特徴の技術的効果が依然として確実であると当業者に理解される正確さの区間を表す。この用語は通例、指定の数値からの±20

％、±１５％、±１０％、例えば±５％の偏差を示す。当業者に理解されるように、所与の技術的効果についてのこのような具体的な数値の偏差は、技術的効果の性質に左右される。例えば、自然の又は生物学的な技術的効果は概して、人為的又は工学的な技術的効果についての偏差よりも大きなかかる偏差を有し得る。単数名詞に言及する際に不定冠詞又は定冠詞、例えば「ａ」、「ａｎ」又は「ｔｈｅ」が用いられる場合、何か他の具体的な指定がない限り、複数のその名詞も含まれる。

【０１４０】

特定の問題又は環境への本発明の教示の適用、及び本発明の変形形態又はその付加的な特徴（更なる態様及び実施形態等）の包含は、本明細書に含まれる教示を考慮すれば、当業者の能力の範囲内であることを理解すべきである。

【０１４１】

文脈上他に指示がない限り、上記に提示される特徴の説明及び定義は、発明の任意の特定の態様又は実施形態に限定されず、記載される全ての態様及び実施形態に等しく当てはまる。

【０１４２】

本明細書に引用される全ての参照文献、特許及び刊行物は、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【０１４３】

図面及び配列の簡単な説明

図面は、以下を示す。

【図面の簡単な説明】

【０１４４】

【図１】ｍｃｍ５ｓ２Ｕがｍ６Ａ修飾コドンの解読を調節することを示す図である。Ａ．コドン及びｔＲＮＡアンチコドンループにおける修飾ヌクレオチドの模式図。球体は、ｍＲＮＡ（下）及びｔＲＮＡ（上）のヌクレオチドである。ｔＲＮＡの位置３４及び位置３７での修飾が示されている。コドン位置３でのｍ６Ａが示されており、ＤＲＡＣＨモチーフ（ＡＧＡＣＵ）が線によって強調表示されている。

【図１－１】Ｂ．野生型ＨＥＫ２９３細胞（円形）又はＣＴＵ２がノックアウトされた細胞（三角形）又はＥＬＰ１/ＩＫＢＫＡＰがノックアウトされた細胞（バツ印）におけるリボソームプロファイリングによって決定されたコドンＡ部位占有。ｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡによって解読されるコドンは囲み枠によって示されている。メチル化可能なアデノシンは球体によって示されている。

【図１－２】（同上）

【図２】Ａ～Ｄを示す図である。Ａ．ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの生合成因子における体細胞突然変異の同時存在。少なくとも１つの生合成経路の構成要素において突然変異を有する２４種の癌型についての同時存在及び相互排他的突然変異を示す、ペアでの機能喪失（ＬｏＦ）突然変異パターンのヒートマップ。有意なペアはドットにより印されている（ｐ値〈０．０１、フィッシャーの正確確率検定）。ｍ６Ａについての生合成因子は番号（１）により強調表示されており、カルボキシメチル化（mcm^5U）についての生合成因子は番号（２）により強調表示されており、チオール化（ｍｃｍ５ｓ２Ｕ）についての生合成因子は番号（３）により強調表示されている。ｍ６Ａとｍｃｍ５ｓ２Ｕとの間の生合成の交差経路の同時存在の領域は、破線の囲み枠により示されている。

【図２－１】（同上）

【図２－２】（同上）

【図２－３】Ｂ～Ｄ：ｍ６Ａの生合成は、ｍｃｍ５ｓ２Ｕの生合成よりも生殖細胞系列突然変異に対する耐性が低い。Ｂ．ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの生合成因子についての生殖細胞系列の機能喪失（ＬｏＦ）変異体の観測値対期待値の比率（±９５％信頼区間）（ｇｎｏｍＡＤからのデータ）。

【図２－４】Ｃ．生殖細胞系列のＬｏＦ耐性による遺伝子の順位付けにより、ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの生合成因子が分離される。Ｄ．ｍ６Ａ生合成経路の生殖細胞系列のＬｏＦ耐性はゲ

ノム平均よりも有意に低いのに対して、mcm5及びs2Uの経路は有意差がない（ウィルコクソン検定、**：p≦0.01）。
【図３】m6A及びmcm5s2Uの生合成シグネチャーが正常組織及び腫瘍において異なることを示す図である。A．発現シグネチャーの計算に使用されるm6A及びmcm5s2Uの生合成に関与する遺伝子。
【図３－１】B．m6A／mcm5s2Uシグネチャーの発現バランスは、組織と腫瘍との間で異なる。正規化され、バッチ補正された発現データを使用した。「GTEx」：GTExからの正常組織、「正常」：TCGAからの腫瘍に隣接した正常組織、「腫瘍」：TCGAからの腫瘍組織。
【図４】m6A及びmcm5s2Uの発現シグネチャーにより黒色腫の生存率が予測されることを示す図である。A．TCGA黒色腫コホート（SKCM）におけるm6A及びmcm5s2Uの発現シグネチャーの散布図。番号（1）、（2）、（3）、及び（4）は、シグネチャー発現による層別化を示しており、番号（2）及び（3）は、バランスの取れたm6A／mcm5s2Uを有する腫瘍である。
【図４－１】B．TCGA黒色腫コホートのカプラン－マイヤー生存時間分析。腫瘍をAでのように層別化した。高mcm5s2U対高m6Aについてのハザード比は1.44（95%CI：0.98～2.13）である。
【図５】mcm5s2Uに向けての発現バランスのシフトが、mcm5s2U及びm6Aの生合成因子の殆どの個々のペアについてのハザード比の増加と相関していることを示す図である。A．上のパネル：m6A修飾mRNAコドン及びmcm5s2U修飾tRNAアンチコドンの模式図。下のパネル：m6A並びにmcm5s2Uカルボキシメチル化（mcm^{5}U）及びチオール化（mcm5s2U）についての生合成因子の一覧。
【図５－１】B．mcm5s2U（「s^{2}U」）及びm6A生合成因子の遺伝子ペアの発現比についての単変量Cox比例ハザード。各ペアについて、発現比を計算し、METABRIC及びSCANBの乳癌コホートにおける全生存率を予測するのに使用した（ハザード比±95%信頼区間）。C．両方のコホートにおいて、mcm5s2U（「s^{2}U」）／m6A遺伝子ペアのハザード比は、無作為に選択された1000種の遺伝子ペアよりも有意に高い（****：p≦0.0001、ウィルコクソン検定）。
【図６】カプラン－マイヤー生存曲線により、mcm5s2U生合成因子に向けての遺伝子ペアのバランスのシフトを伴う患者の全生存率不良が確認されることを示す図である。A．METABRICコホートにおける全ての有意な遺伝子ペアについてのカプラン－マイヤー曲線。mcm5s2U（「s^{2}U」）／m6Aの生合成因子の遺伝子ペアの発現比は、高（より多いmcm5s2U、番号（1）により参照される）及び低（より多いm6A、番号（2）により参照される）に分類された。ログランク検定の95%信頼区間及びp値が示されている。
【図６－１】B．（A）と同様であるが、SCANBコホートが対象である。
【図６－２】（同上）
【図６－３】（同上）
【図７】m^{6}A及びmcm^{5}s^{2}Uの組合せシグネチャーにより、特定の抗癌薬の脆弱性が予測されることを示す図である。A．m^{6}A／mcm^{5}s^{2}Uシグネチャーとのゲノム全体の依存性相関におけるEGFRシグナル伝達遺伝子の遺伝子セットエンリッチメント解析。B．m6A／mcm^{5}s^{2}UシグネチャーとCRISPR遺伝子との間の依存性の相関。EGFR経路の構成要素が表示されている。C．m6A／mcm^{5}s^{2}Uシグネチャーと薬物脆弱性との間の相関（EGFR阻害剤が表示されている）。
【図７－１】D及びE．EGFR発現について陰性又は陽性の細胞系統におけるゲフィチニブ（D）及びラパチニブ（E）についての薬物脆弱性に対してプロットされたm6A／mcm^{5}s^{2}U。
【図８】m6A及びmcm5s2Uの生合成経路における腫瘍の体細胞突然変異が、有意差がある全生存率と関連していないことを示す図である。m6A／mcm5s2U（「s^{2}U」）の生合成経路の構成要素における機能喪失（LoF）突然変異の各組合せについて、TCGA癌コホートにおける全生存率を分析した。

【図８－１】（同上）
【図８－２】（同上）
【図８－３】（同上）
【発明を実施するための形態】
【０１４５】
配列番号1～配列番号18の配列は、様々な考えられるDRACHモチーフを示している：
配列番号1: AGACU
配列番号2: GGACU
配列番号3: UGACU
配列番号4: AAACU
配列番号5: GAACU
配列番号6: UAACU
配列番号7: AGACA
配列番号8: GGACA
配列番号9: UGACA
配列番号10: AAACA
配列番号11: GAACA
配列番号12: UAACA
配列番号13: AGACC
配列番号14: GGACC
配列番号15: UGACC
配列番号16 AAACC
配列番号17: GAACC
配列番号18: UAACC
配列番号19: AGGAGACUG
【実施例】
【０１４６】
ここで、本発明の或る特定の態様及び実施形態を例として、本明細書に提示される説明、図面及び表を参照して説明する。本発明の方法、使用及び他の態様のかかる例は、単に代表的なものであり、本発明の範囲をかかる代表的な例にのみ限定するとみなすべきではない。
【０１４７】
実施例は以下を示す。
【０１４８】
実施例1：tRNAアンチコドン修飾はm6A修飾コドンを解読する
m6Aエピトランスクリプトーム遺伝子調節の機能を理解するために、発明者らは転写シャットオフデータセットを使用し、経時的な対数変換された発現データの線形回帰によって分解速度を計算した。入手可能であれば、本発明者らは、前処理された発現値を使用した（表1）。それ以外の場合は、生の配列決定データを使用してアラインメントによって発現を決定し、リードカウントデータ又はマイクロアレイデータをGEOから取得した（表1を参照）。前処理されたデータに遺伝子ごとに2つ以上の測定値が含まれている場合に（すなわち、プローブの種々のアイソフォーム）、遺伝子平均を使用した。相対分解速度しか分析しなかったため、スパイクインの正規化を省略した。SLAM-Seqデータ解析の場合には、公開された変換率（表1を参照）を遺伝子及び分解速度ごとに平均化した。METTL3 KO又はエメチン治療による安定化を、それぞれ、KO分解速度からWT分解速度を差し引くことによって又はエメチン分解速度からコントロール分解速度を差し引くことによって求めた。
【０１４９】
表1：本研究において使用されたデータセットへのリンク及びアクセッション番号

【表１】

Dataset	Accession number(s)	File link(s)
LAIC		https://media.nature.com/original/nature-assets/nmeth/journal/v13/n8/extref/nmeth.3898-S2.xlsx
DRUID		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE99nnn/GSE99517/suppl/GSE99517%5FHEK%2E4SU%2EHL%2EDRUID%2Eone%2Ecsv%2Egz
Ke METTL3 KO mESC decay		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/download/?acc=GSE86336&format=file
Schwartz m6A-IP HEK293	IP = SRR1182595, input = SRR1182596	
Geula m6A-IP	IP = SRR1596085, input = SRR1596086	
Geula METTL3 KO mESC decay		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE61nnn/GSE61994/suppl/GSE61994%5FDGE%5Fnormalized%5Flevels%5FRefSeq%2Etxt%2Egz
Herzog METTL3 KO mESC decay		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/download/?acc=GSE99974&format=file
Riboseq	SRR2433794	
Riboseq	SRR2075925	
Arsenite polysome gradients		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE44nnn/GSE44379/suppl/GSE44379%5Fars%5Fnoars%5Fpolysome%5Fprofiles%2Etxt%2Egz
Arsenite ribosome profiling		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE55nnn/GSE55195/suppl/GSE55195%5FSupplementalTable1%2Exlsx%2Egz

【０１５０】

本発明者らは、３番目のコドン位置のｍ６Ａ部位がマウスとヒトとの間でより保存されているので、コドンの３番目の位置を分析することに焦点を絞った。この位置はまた、最高のＤＲＡＣＨメチル化率を有し、リボソームの一時停止が最も強い。コドンの３番目の位置が更に特別であるのは、ｔＲＮＡアンチコドンとの非ワトソン／クリック（「ゆらぎ」）塩基対合を許容して、遺伝暗号の縮重を可能にするからである。興味深いことに、ｔＲＮＡアンチコドンにおける修飾ヌクレオチドは、しばしばゆらぎ解読（ｗｏｂｂｌｅｄｅｃｏｄｉｎｇ）を調節し、ｔＲＮＡの選択に影響を与えることができる。

【０１５１】

ゆらぎ位置でアデノシンを並置するｔＲＮＡアンチコドンヌクレオチド修飾はｍｃｍ５ｓ２Ｕである。ｍｃｍ５ｓ２Ｕによって修飾されたｔＲＮＡは、酵母及びヒトにおいてコドンＡＡＡ、ＣＡＡ、及びＧＡＡを解読する。最近、ヒトにおいてはＡＧＡもｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡによって解読されることが示された。本発明者らは、ｍｃｍ５ｓ２Ｕがｍ６Ａ修飾されたＡＡＡ、ＧＡＡ、及びＡＧＡのコドンの解読に関与している可能性があるという仮説を立てた。ｍｃｍ５ｓ２Ｕがｍ６Ａの解読に関与しているかどうかを試験するのに、本発明者らは、ＣＲＩＳＰＲを使用してＩＫＢＫＡＰ又はＣＴＵ２をノックアウトして、ｍｃｍ５ｓ２Ｕを効率的に除去したＨＥＫ２９３細胞系統を作製した。

【０１５２】

次に、本発明者らは、リボソームプロファイリングを使用してＡ部位占有を決定し、ＤＲＡＣＨコドンをｍ６Ａ修飾コドンと非修飾コドンとに分類した。生のシーケンシングデータを、ｆｌｅｘｂａｒを用いて適切なアダプター用にトリミングし、ＳＴＡＲによりアラインメントした。２８ヌクレオチド、２９ヌクレオチド、又は３０ヌクレオチドの長さを有するリードを使用した。ＲＰＦ ５'末端からＡ部位コドンまでのオフセットを、開始コドン及び停止コドンでのＲＰＦ ５'末端カバレッジを分析することによって決定したところ、分析された全てのデータセットについて１５ヌクレオチドであることが判明した。正規化されたＡ部位カバレッジを、トランスクリプトームにおける全てのヌクレオチドについて計算した。

このために、生のカウントのzスコアの正規化を、対象となる位置を取り囲む-60ヌクレオチドから+60ヌクレオチドまでのウィンドウにおいて行った。コドンについては、位置1での（すなわち、インフレームでこれを翻訳するリボソームの）正規化されたA部位カバレッジを使用した。ウィンドウカバレッジプロット（window coverageplots）の場合に、各位置での平均zスコアをプロットする。

【０１５３】

生のシーケンシングデータを結合し、完全なデータセットをSTARによりアラインメントし、UMIツールにより重複除去した。アラインメントをエンドツーエンドモードで行って、CからTへの転移のリード内分布を評価したが、最初の2つの位置をm6A部位の呼び出しのために除外した。転移を、Rsamtoolsパイルアップを用いて決定し、m6A部位を少なくとも2つの転移及び4％から40％の間の転移率を要求することによって呼び出した。各m6A修飾コドンについて、本発明者らは、同じCDS内の同じ種類の最も近いメチル化されていないコドンを選択した。これを、DRACHモチーフ内にあるか又はないかのいずれかのメチル化されていないコドンに対して個別に行った。本発明者らは、同じCDS内に一致するコドンを見出すことができないm6A部位を除外しなかったが、これらの部位の割合は小さい。

【０１５４】

ELP1／IKBKAPノックアウト細胞及びCTU2ノックアウト細胞を分析した際に、本発明者らは、IKBKAPノックアウト細胞及びCTU2ノックアウト細胞における殆どのコドンについてA部位占有が変化しないことを見出した（図1B）。しかしながら、最も興味を引く観察は、IKBKAPノックアウト細胞及びCTU2ノックアウト細胞におけるコドンAGA及びGAAのm6A修飾型の非常に高いA部位占有であった（図1B）。これは、これらのメチル化コドンがA部位にあり、かつmcm5s2U修飾された同族tRNAが利用可能でない場合に、リボソームが一時停止することを示していた。したがって、本発明者らは、mcm5s2Uの機能がm6A修飾コドンの解読を容易にすることであると推論した。

【０１５５】

したがって、本発明者らは、m6Aが核mRNAプロセシングをtRNA解読に結び付ける機序を発見した。本発明者らは、mRNAのタンパク質コーディング配列（CDS）に堆積するm6Aの量がこの領域におけるエキソンの長さと相関し、CDS m6Aがin vivoで修飾されたコドンのサブセットの解読を遅くすることを見出した。しかしながら、m6Aがゆらぎ位置にある場合に、解読がtRNAアンチコドン修飾の5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（mcm5s2U）によって促進され得ることから、それにより、mRNAとtRNAとの間のエピトランスクリプトームの予想外のつながりが明らかとなった。m6A-mcm5s2U系は、mRNAの半減期を翻訳依存的に制御するため、mRNAのエキソン－イントロン構造がそれらのターンオーバーに結び付けられる。

【０１５６】

実施例2：m6A及びmcm5s2Uの生合成因子における体細胞突然変異の同時存在

本発明者らは、m6A生合成経路、カルボキシメチル化（mcm^5U）生合成経路、及びチオール化（mcm5s2U）生合成経路の生合成経路の構成要素の少なくとも1つにおいて突然変異を有する24種の癌型を分析した（図2）。本発明者らは更に、癌型特異的プロットにおいてm6Aとmcm5s2Uとの間の生合成因子の突然変異の交差経路の同時存在を分析し、m6Aとmcm5s2Uとの経路の構成要素の間で同時存在する突然変異の有意なエンリッチメントを見出した（図2）、すなわち、m6A経路において突然変異を有する腫瘍は、mcm5s2U経路にも突然変異を有する傾向にあるか、その逆もまた同様である。これは、m6A及びmcm5s2Uが癌における中心的存在であることを示唆している。本発明者らは更に、m6A生合成経路、カルボキシメチル化（mcm^5U）生合成経路、及びチオール化（mcm5s2U）生合成経路の構成要素において、体細胞突然変異を生殖系列変異体と比較したところ（図2）、生殖細胞系列の機能喪失突然変異に対してmcm5s2Uがm6Aよりも耐性であることを見出した。これは、癌の素因に影響を与える可能性がある。

【０１５７】

実施例３：ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの生合成シグネチャーは正常組織及び腫瘍において異なっている

本発明者らは、ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの生合成に関与する遺伝子を使用して、ｍ６Ａ及びｍｃｍ５ｓ２Ｕの発現シグネチャーを計算した（図３Ａ）。次に、ｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕの比率を使用して、ｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕシグネチャーの遺伝子発現のバランスが取られているかどうかを分析した。興味深いことに、ｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕシグネチャーの発現バランスは、正常組織と腫瘍との間で異なっている（図３Ｂ）。

【０１５８】

本発明者らは、ｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕシグネチャーの遺伝子発現比を使用して、疾患、病態、又は障害を以下の群に群分けすることができることを見出した：

（ａ）コントロールと比較した、より高いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより低いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、

（ｂ）コントロールと比較した、より高いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及び不変／正常なレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、

（ｃ）コントロールと比較した、より高いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより高いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、

（ｄ）コントロールと比較した、より低いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより高いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、

（ｅ）コントロールと比較した、より低いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及び不変／正常なレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、

（ｆ）コントロールと比較した、より低いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより低いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、

（ｇ）コントロールと比較した、不変／正常なレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより低いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害、並びに、

（ｈ）コントロールと比較した、不変／正常なレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより高いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、又は障害。

【０１５９】

コントロールは、好ましくは、コホート固有の参照試料である。本発明者らは、ｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕシグネチャーの遺伝子発現比の結果が、

より低いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより高いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記（ｄ）を参照）、

より低いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及び不変／正常なレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記（ｅ）を参照）、又は、

不変／正常なレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより高いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記（ｈ）を参照）、

の指標となるような場合に、疾患、病態、又は障害が、好ましくは、膀胱癌、乳癌、食道癌、肺癌、及び甲状腺癌から選択される癌疾患であることを見出した。

【０１６０】

したがって、本発明の特に好ましい実施形態は、膀胱癌、乳癌、食道癌、肺癌、及び甲状腺癌の治療及び／又は予防におけるｍｃｍ５ｓ２Ｕ阻害剤の使用に関する。最も好ましくは、治療される上記癌は、乳癌である。

【０１６１】

本発明者らは、ｍ６Ａ／ｍｃｍ５ｓ２Ｕシグネチャーの遺伝子発現比の結果が、

より高いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより低いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記（ａ）を参照）、

より高いレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及び不変／正常なレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記（ｂ）を参照）、又は、

不変／正常なレベルのｍ６Ａ修飾ｍＲＮＡ及びより低いレベルのｍｃｍ５ｓ２Ｕ修飾ｔＲＮＡと関連する疾患、病態、若しくは障害（上記（ｇ）を参照）、

の指標となるような場合に、疾患、病態、又は障害が、好ましくは、腎臓癌、肝臓癌、及

び胃癌から選択される癌疾患であることを更に見出した。

【０１６２】

したがって、本発明者らは、細胞がm6A及びmcm5s2Uの生合成機構の発現のバランスを取っており、それを行うことができないことが癌等の特定の疾患と関連していることを発見した。これは、m6A／mcm5s2U軸が遺伝子発現を調節し、細胞分化を制御するエピトランスクリプトーム機序として進化したことを示唆している。健康なヒト組織において、m6A及びmcm5s2Uについての生合成因子の発現は高度に相関している。最も重要なことは、CRISPR遺伝子依存性データは、m6A生合成因子に依存する癌細胞もmcm5s2U生合成因子を必要とし、その逆もまた同様であることを示している。これらの結果は、m6A-エピトランスクリプトーム及びmcm5s2U-エピトランスクリプトームが、複雑にバランスが取られているため、mcm5s2UによるtRNAアンチコドンの修飾がm6Aのバランスの悪さを打ち消し、逆もまた同様であることを示唆している。

【０１６３】

実施例4：m6A及びmcm5s2Uの発現シグネチャーにより、黒色腫及び乳癌のコホートにおける生存率が予測される

TCGA黒色腫コホート（SKCM）におけるm6A及びmcm5s2Uの発現シグネチャーの散布図は、m6A及びmcm5s2Uの発現シグネチャーにより黒色腫の生存率が予測されることを示している（図4）。本発明者らは、m6A／mcm5s2Uシグネチャーの遺伝子発現比の結果が、より低いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAの指標となるような場合に、上記対象についての予後は、同じ疾患、病態、又は障害を患っており、かつより低いレベルのm6A修飾mRNA及びより高いレベルのmcm5s2U修飾tRNAを示さない対象の場合よりも低いことを見出した。さらに、本発明者らは、m6A／mcm5s2Uシグネチャーの遺伝子発現比の結果が、より高いレベルのm6A修飾mRNA及びより低いレベルのmcm5s2U修飾tRNAの指標となるような場合に、上記対象についての予後は、同じ疾患、病態、又は障害を患っており、かつそのような結果を示さない対象の場合よりも高いことを見出した。

【０１６４】

本発明者らは更に、種々のmcm5s2U（「s2U」）／m6Aの生合成因子の遺伝子ペアの発現比を使用して、METABRIC及びSCANBの乳癌コホートにおける全生存率を予測した（図5）。両方のコホートにおいて、mcm5s2U（「s^2U」）／m6A遺伝子ペアのハザード比は、無作為に選択された1000種の遺伝子ペアよりも有意に高い（図5C）。次に、本発明者らは、カプラン－マイヤー生存曲線を使用して、METABRICコホート（図6A）及びSCANBコホート（図6B）におけるmcm5s2U生合成因子に向けての遺伝子ペアのバランスのシフトを伴う患者の全生存率不良を確認した。mcm5s2U（「s^2U」）／m6Aの生合成因子の遺伝子ペアの発現比を、高（より多いmcm5s2U）及び低（より多いm6A）に分類した。

【０１６５】

実施例5：m^6A及びmcm^5s^2Uの組合せシグネチャーにより、特定の癌細胞系統の脆弱性が予測される

本発明者らは、m^6A／mcm^5s^2Uの組合せシグネチャーを使用して、癌細胞系統の脆弱性を調べた。ゲノム全体のCRISPRi遺伝子依存性の分析により、高いm^6A／mcm^5s^2Uシグネチャーを有する細胞系統においてEGFRシグナル伝達経路の構成要素のエンリッチメントが明らかになった（図7A）。これに従って、EGFRは、高いm^6A／mcm^5s^2Uシグネチャーと相関する上位の遺伝子依存性の1つである（図7B）。EGFR/ErbBファミリーの受容体チロシンキナーゼは、腫瘍において頻繁に過剰発現し、ラパチニブ及びゲフィチニブを含む幾つかのFDA承認のチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）によって標的化される。本発明者らは、これらのEGFR標的化TKIに対する感度がm^6A／mcm^5s^2Uのシグネチャーと相関することを観察した（図7C）。これらの薬物の脆弱性の詳細な分析により、高いm^6A／mcm^5s^2Uシグネチャーは、EGFR陽性細胞におけるラパチニブ及びゲフィチニブに対する感度の増加と相関することが明らかになった。最も低いシグネチャー四分

位における細胞系統は、EGFR陰性細胞と同様にEGFR阻害剤に対して非感受性である。したがって、m6A／mcm5s2Uの組合せシグネチャーは、EGFR阻害に対する癌細胞の感度についてのバイオマーカーとして機能する。

【０１６６】

実施例6：m6A及びmcm5s2Uの生合成経路における腫瘍の体細胞突然変異は、有意差がある全生存率と関連していない

本発明者らは、m6A及びmcm5s2Uの生合成経路における腫瘍の体細胞突然変異が、TCGA癌コホートにおける異なる全生存率と関連しているかどうかを分析した。しかしながら、これらの結果は、m6A及びmcm5s2Uの生合成経路における腫瘍の体細胞突然変異が、概して有意差がある全生存率と関連していないことを示している（図8）。一部の癌には、生存率に有意差が認められるが（例えば、乳癌［BRCA］）、これはごく少数の突然変異体の症例に基づいている。したがって、mcm5s2U対m6Aの比率のバランスの悪さが、TCGA癌コホートにおける異なる全生存率への主な引き金となることが更に確認される。

【０１６７】

参考文献

参考文献は、以下のものである：

1. Geula, S.,Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A.A., Kol, N., Salmon-Divon,M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y.S., et al. (2015). m6A mRNAmethylation facilitates resolution of naive pluripotency towarddifferentiation. Science 347, 1002-1006.

2. Aguilo, F.,Zhang, F., Sancho, A., Fidalgo, M., Di Cecilia, S., Vashisht, A., Lee, D.-F.,Chen, C.-H., Rengasamy, M., Andino, B., et al. Coordination of m6A mRNAMethylation and Gene Transcription by ZFP217 Regulates Pluripotency andReprogramming. Cell Stem Cell 0. Available at:http://www.cell.com/article/S1934590915004129/abstract [Accessed November 6,2015].

3. Yoo, H., Son,D., Jang, Y.-J., and Hong, K. (2016). Indispensable role for mouse ELP3 inembryonic stem cell maintenance and early development. Biochemical andBiophysical Research Communications 478, 631-636.

4. Qi, L., Zhang,X., Zhai, H., Liu, J., Wu, F., Li, C., and Chen, Q. (2019). Elongator IsRequired for Root Stem Cell Maintenance by Regulating SHORTROOT Transcription.Plant Physiology 179, 220-232.

5. Delaunay, S.,and Frye, M. (2019). RNA modifications regulating cell fate in cancer. NatureCell Biology 21, 552-559.

6. Delaunay, S.,Rapino, F., Tharun, L., Zhou, Z., Heukamp, L., Termathe, M., Shostak, K.,Klevernic, I., Florin, A., Desmecht, H., et al. (2016). Elp3 links tRNAmodification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis inbreast cancer. Journal of Experimental Medicine 213, 2503-2523.

7. Fry, N.J., Law,B.A., Ilkayeva, O.R., Carraway, K.R., Holley, C.L., and Mansfield, K.D. (2018).N6-methyladenosine contributes to cellular phenotype in a genetically-definedmodel of breast cancer progression. Oncotarget 9, 31231-31243.

8. Goodarzi, H.,Nguyen, H.C.B., Zhang, S., Dill, B.D., Molina, H., and Tavazoie, S.F. (2016).Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and CancerProgression. Cell 165, 1416-1427.

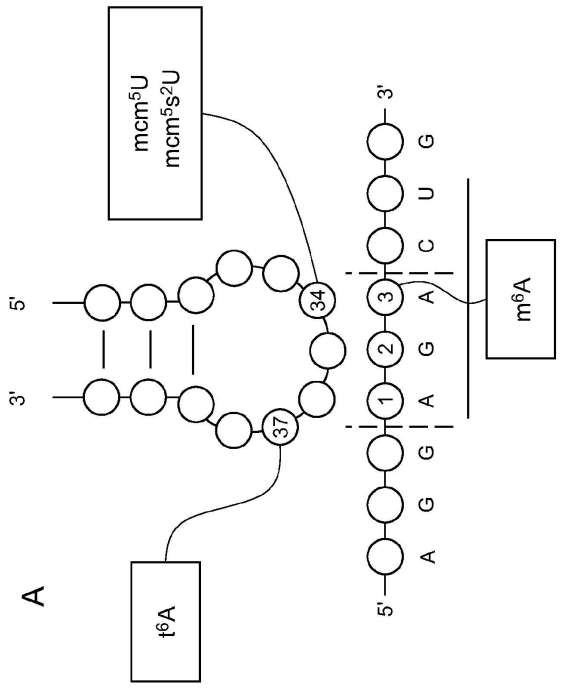
【０１６８】

図面訳

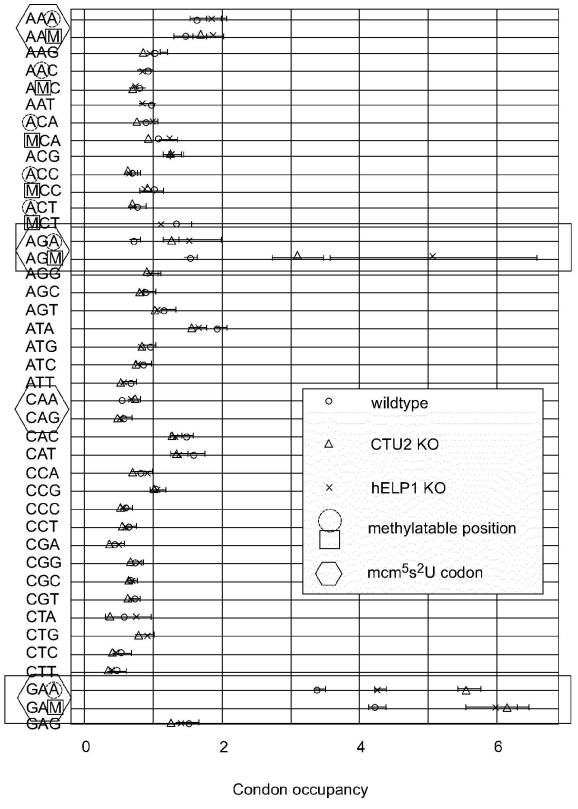
図1

wildtype 野生型
methylatable position メチル化可能な位置
mcm^5s^2U codon mcm^5s^2Uコドン
Condon occupancy コドン占有
図2
LoF Interaction LoF相互作用
Pathway 経路
Observed/expected LoF LoFの観測値／期待値
LoF tolerance LoF耐性
Gene rank 遺伝子ランク
all 全て
Gene pathway 遺伝子経路
図3
signature genes シグネチャー遺伝子
bladder 膀胱
breast 乳房
cervix 子宮頸部
colon 結腸
esophagus 食道
kidney 腎臓
liver 肝臓
lung 肺
prostate 前立腺
stomach 胃
thyroid 甲状腺
Normal 正常
Tumor 腫瘍
図4
mcm5s2U signature mcm5s2Uシグネチャー
m6A signature m6Aシグネチャー
mcm5s2U high & m6A low mcm5s2U高及びm6A低
mcm5s2U high & m6A high mcm5s2U高及びm6A高
mcm5s2U low & m6A low mcm5s2U低及びm6A低
mcm5s2U low & m6A high mcm5s2U低及びm6A高
Survival probability 生存確率
Number at risk リスク人数
Strata 層
Time [years] 時間［年］
図5
Gene pair 遺伝子ペア
expression ratio 発現比
Hazard ratio ハザード比
random 無作為
図6
Survival probability 生存確率
Time [years] 時間［年］
s^2U/m^6A pair s^2U／m^6Aペア
gene expression ratio 遺伝子発現比
high 高
low 低

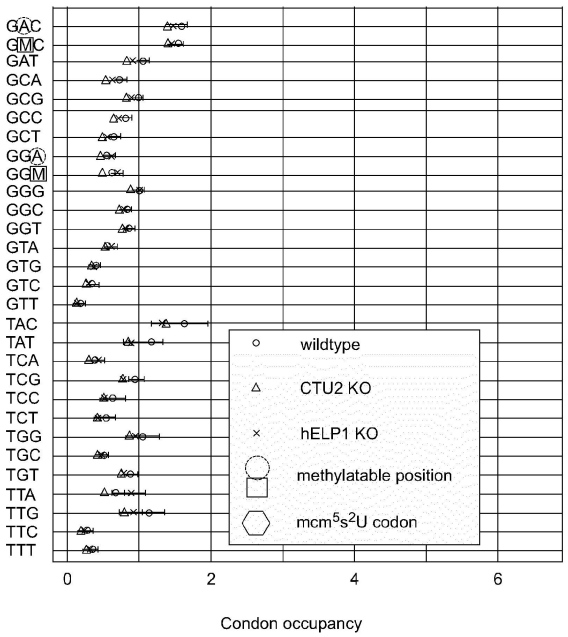
図7
signature correlation rank シグネチャー相関ランク
-log10(p-value) -log10(p値)
Correlation coefficient 相関係数
poziotinib ポジオチニブ
dacomitinib ダコミチニブ
osimertinib オシメルチニブ
lapatinib ラパチニブ
gefitinib ゲフィチニブ
canertinib カネルチニブ
vandetanib バンデタニブ
EGFR negative EGFR陰性
EGFR positive EGFR陽性
gefitinib logFC ゲフィチニブlogFC
m6A/mcm5s2U signature m6A／mcm5s2Uシグネチャー
lapatinib logFC ラパチニブlogFC
図8
Survival probability 生存確率
Time [years] 時間［年］
Pathway LoF mutations 経路LoF突然変異
none なし
【図面】
【図１】



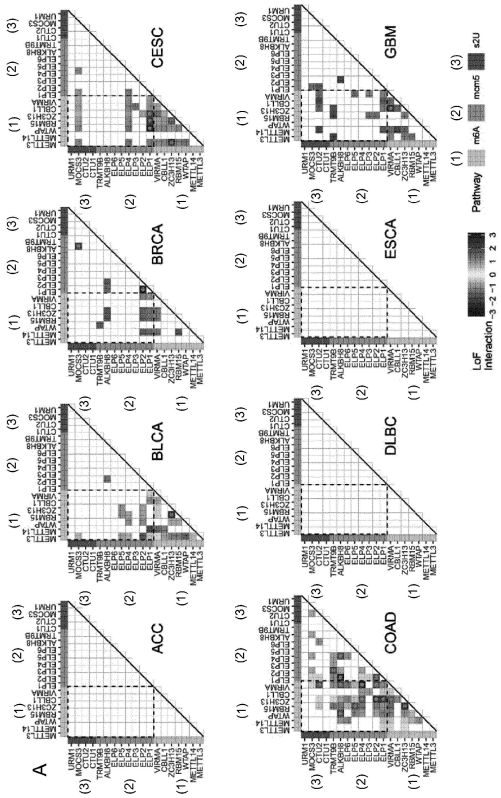
【図１－１】



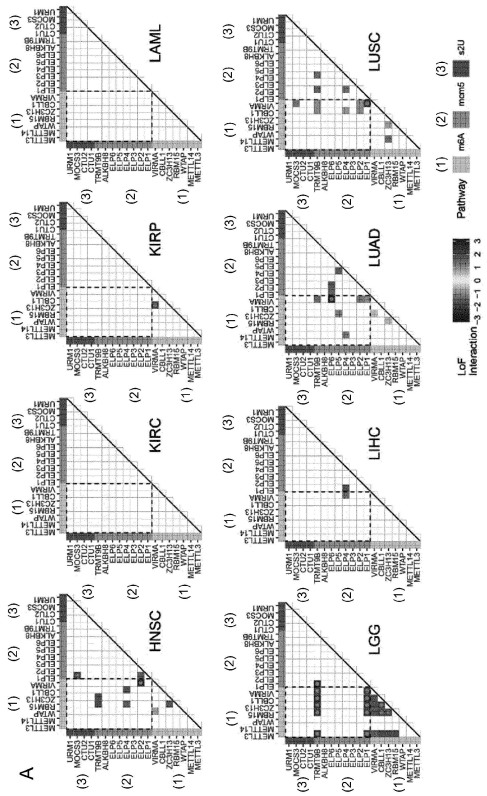
【図１－２】



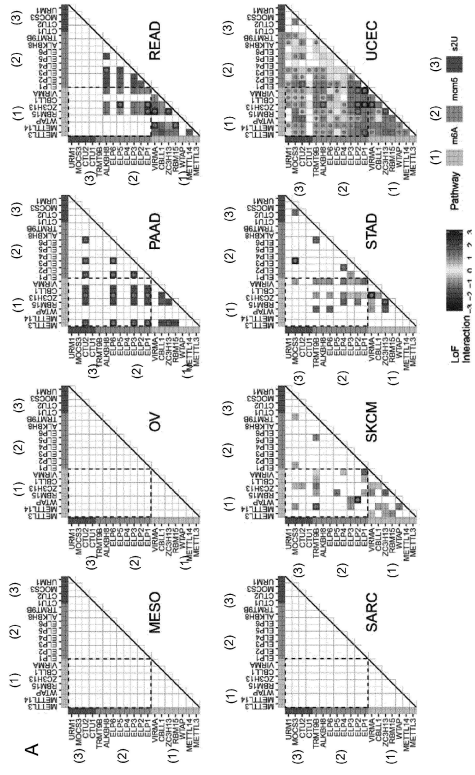
【図２】



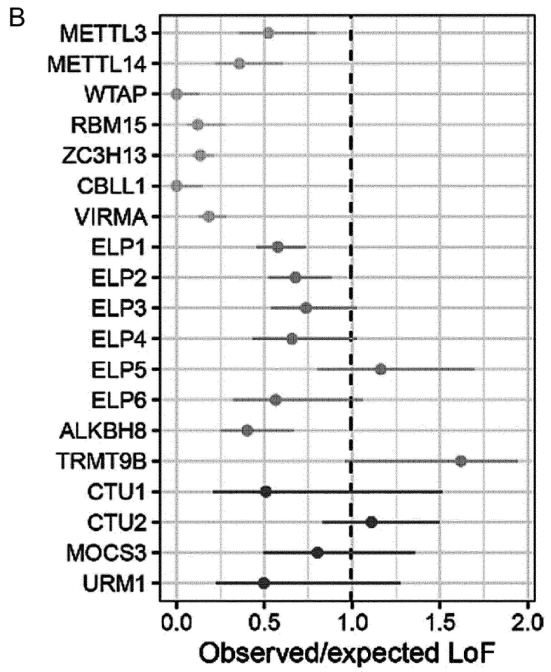
【図２－１】



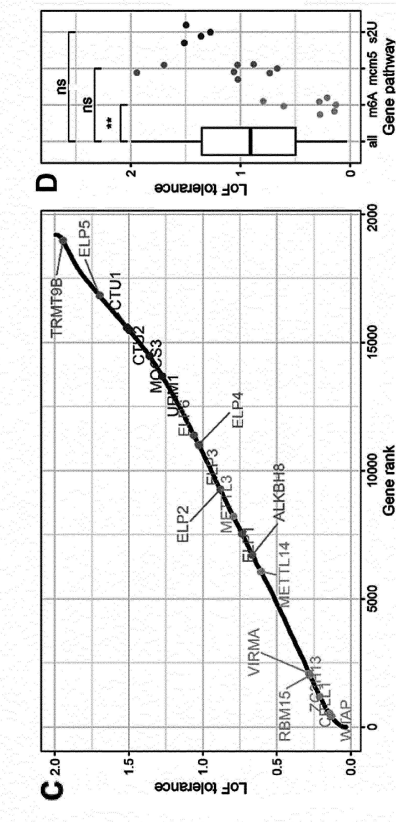
【図２－２】



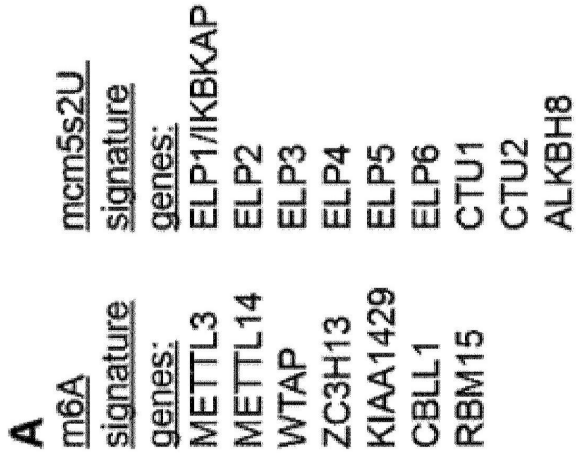
【図２－３】



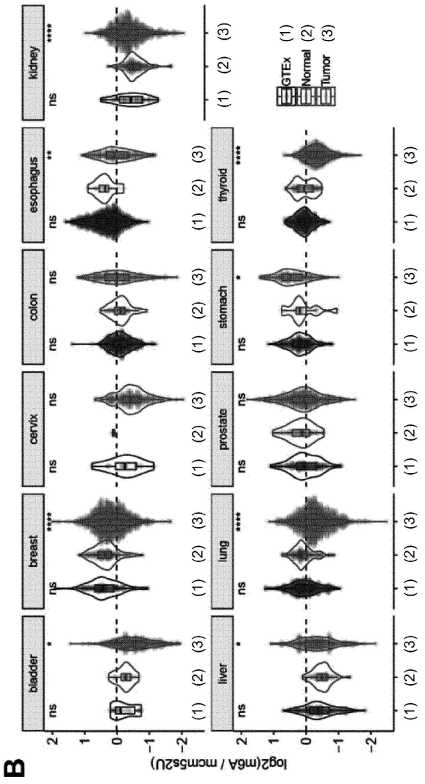
【図２－４】



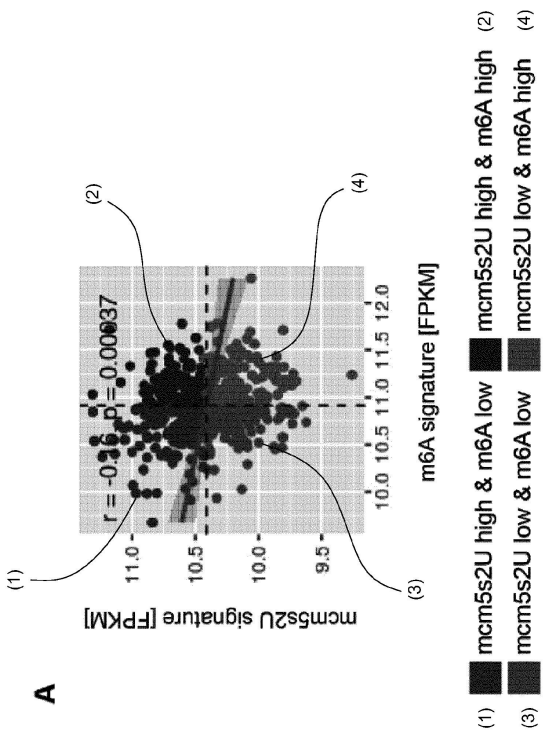
【図３】



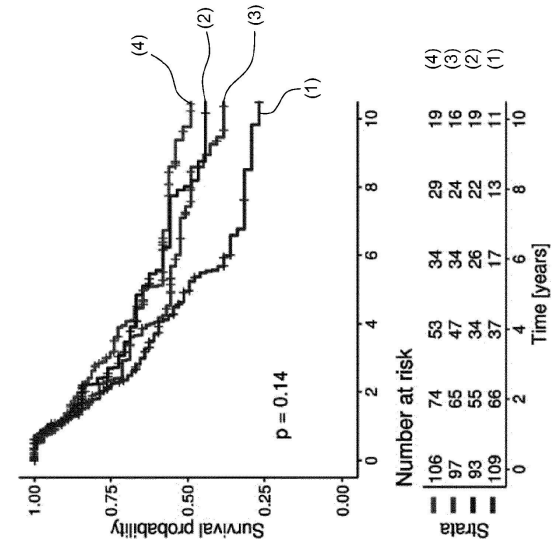
【図３－１】



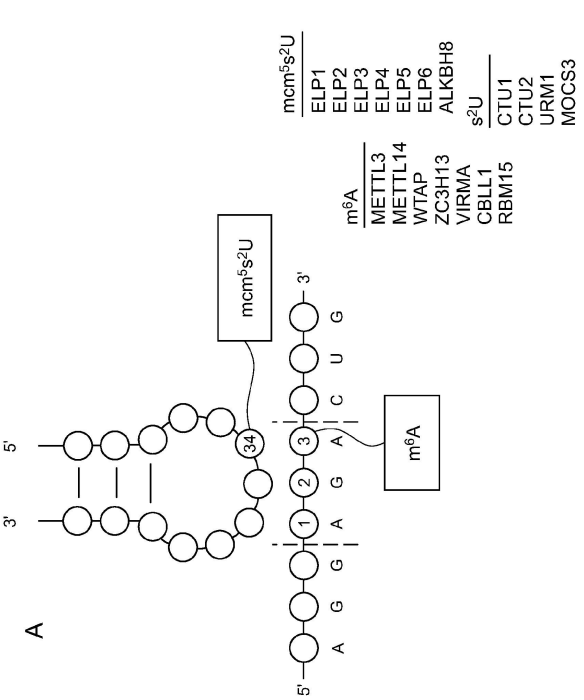
【図４】


A
mcm5s2U signature [FPKM]
m6A signature [FPKM]
r = -0.16, p = 0.00037
(1)
(2)
(3)
(4)
mcm5s2U high & m6A low
mcm5s2U high & m6A high
mcm5s2U low & m6A low
mcm5s2U low & m6A high

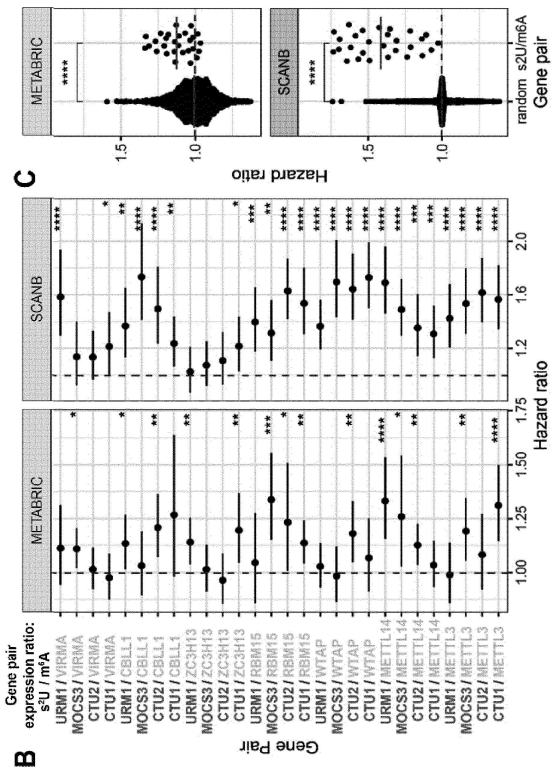
【図４－１】


B
Survival probability
p = 0.14
Number at risk
Strata
Time [years]
(1)
(2)
(3)
(4)

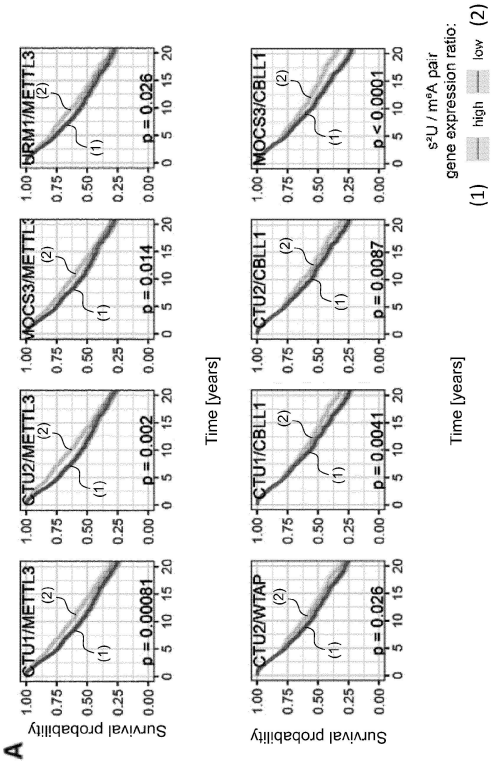
【図５】


A
mcm5s2U
m6A
mcm5s2U
ELP1
ELP2
ELP3
ELP4
ELP5
ELP6
ALKBH8
m6A
METTL3
METTL14
WTAP
ZC3H13
VIRMA
CBLL1
RBM15
s2U
CTU1
CTU2
URM1
MOCS3

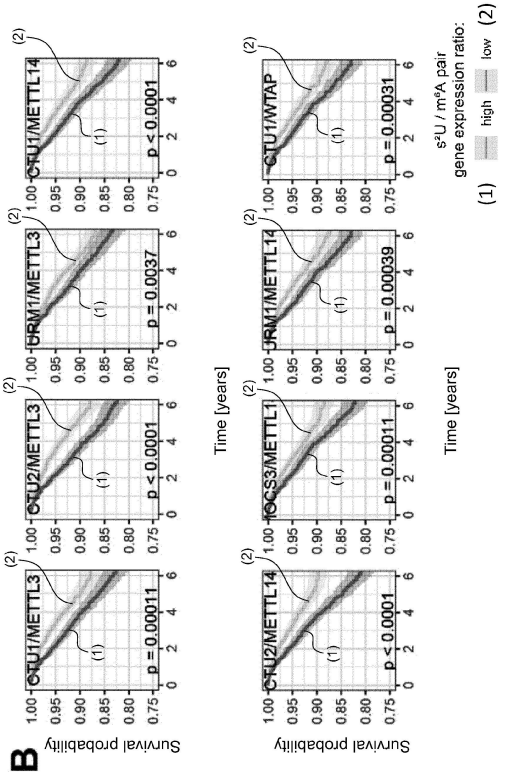
【図５－１】


B
C
METABRIC
SCANB
Hazard ratio
Gene Pair
Gene pair expression ratio: s2U / m6A
random s2U/m6A Gene pair

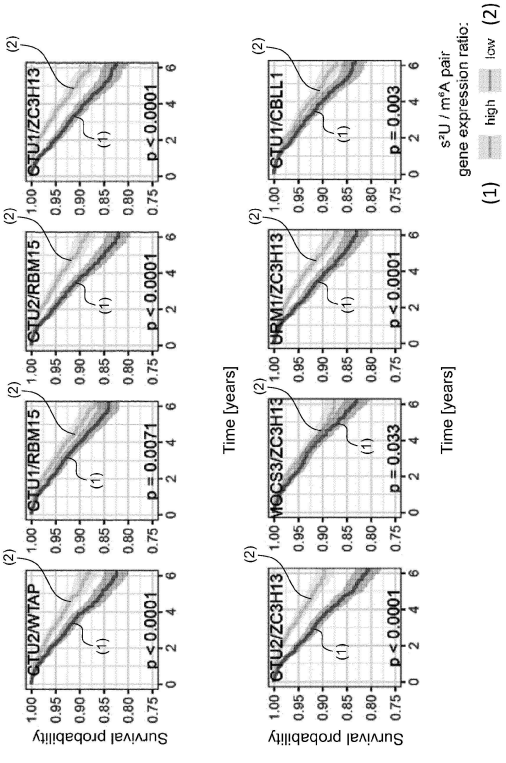
【図６】



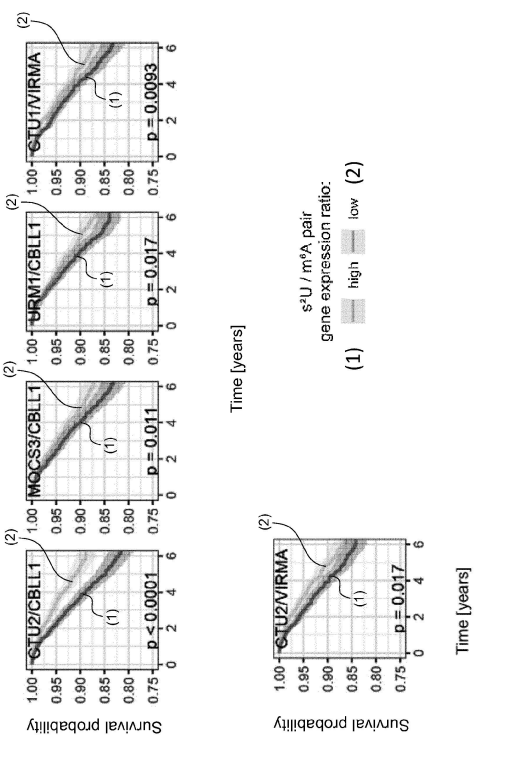
【図６－１】



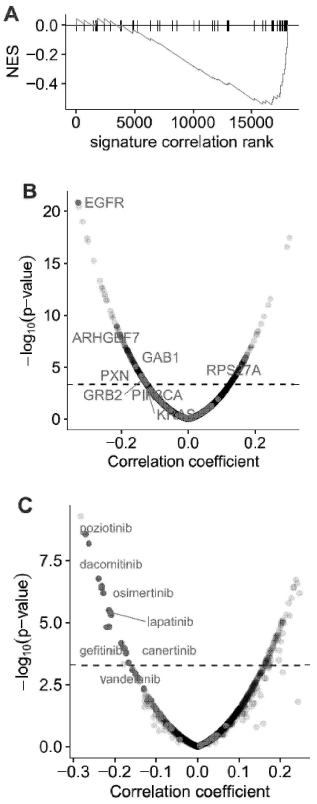
【図６－２】



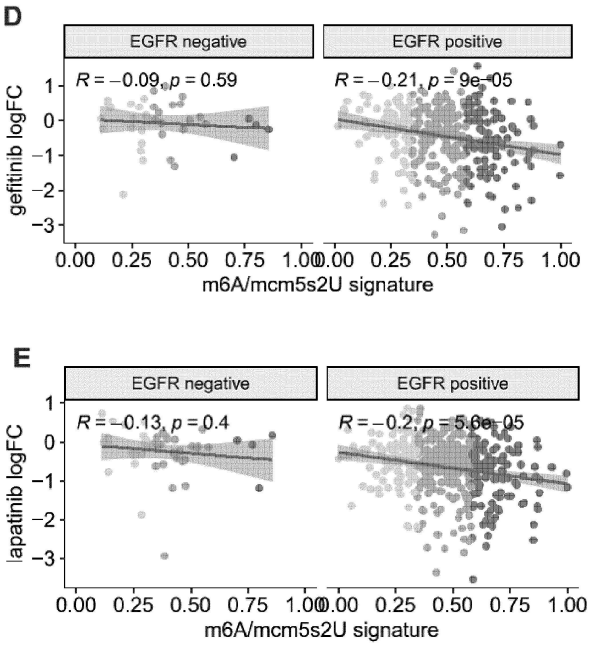
【図６－３】



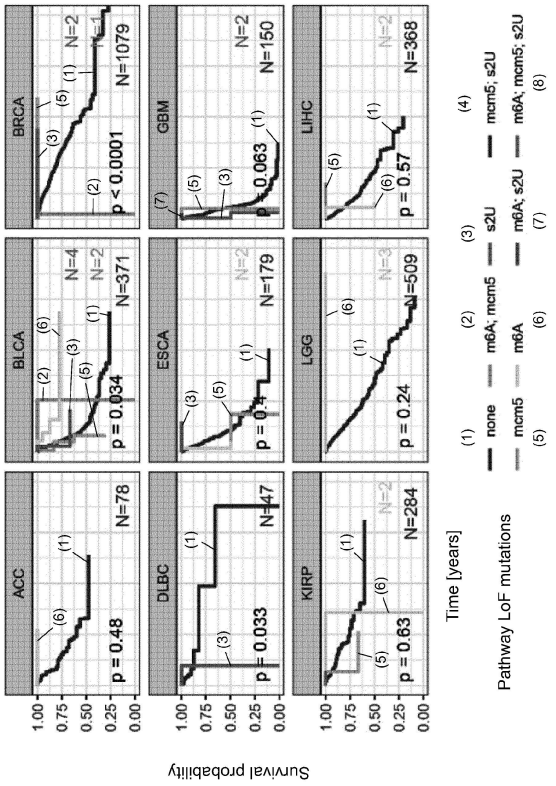
【図７】


A
NES
signature correlation rank
B
EGFR
ARHGEF7
GAB1
PXN
RPS27A
GRB2
PIK3CA
KRAS
−log10(p−value)
Correlation coefficient
C
poziotinib
dacomitinib
osimertinib
lapatinib
gefitinib
canertinib
vandetanib
−log10(p−value)
Correlation coefficient

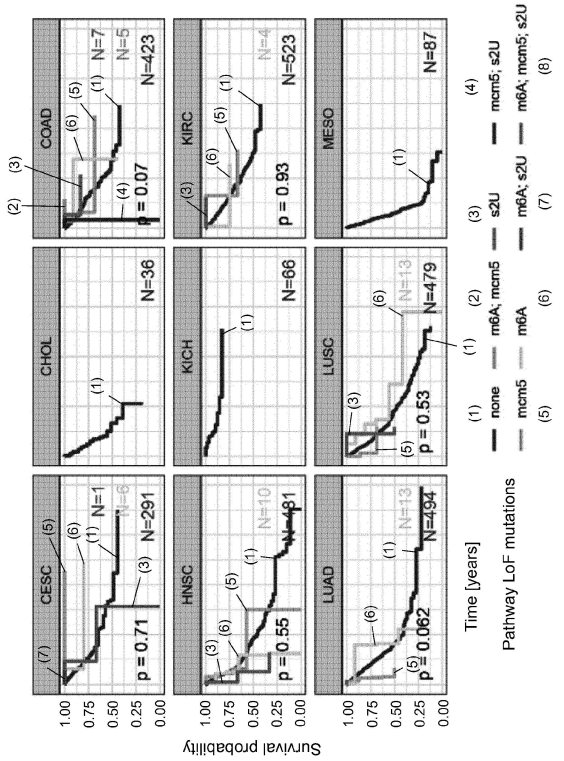
【図７－１】


D
EGFR negative
EGFR positive
R = −0.09, p = 0.59
R = −0.21, p = 9e−05
gefitinib logFC
m6A/mcm5s2U signature
E
EGFR negative
EGFR positive
R = −0.13, p = 0.4
R = −0.2, p = 5.6e−05
lapatinib logFC
m6A/mcm5s2U signature

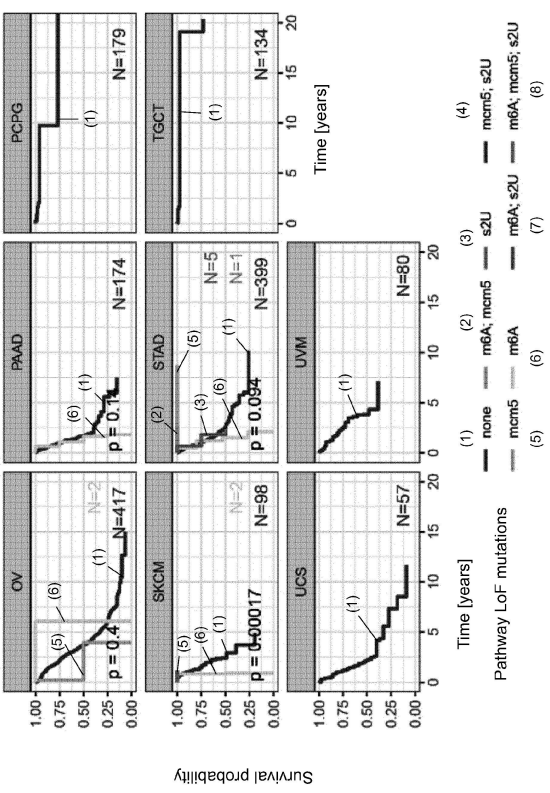
【図８】


BRCA
GBM
LIHC
BLCA
ESCA
LGG
ACC
DLBC
KIRP
Survival probability
Time [years]
Pathway LoF mutations
none
mcm5
m6A; mcm5
m6A
mcm5; s2U
s2U
m6A; s2U
m6A; mcm5; s2U

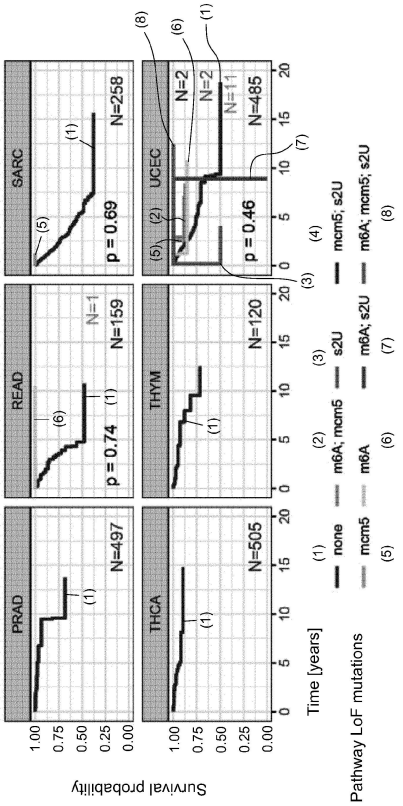
【図８－１】


COAD
KIRC
MESO
CHOL
KICH
LUSC
CESC
HNSC
LUAD
Survival probability
Time [years]
Pathway LoF mutations
none
mcm5
m6A; mcm5
m6A
mcm5; s2U
s2U
m6A; s2U
m6A; mcm5; s2U

【図８－２】



【図８－３】



【配列表】

<u>202353387300000 01.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6886
ADD.

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)
C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/197024 A1 (CHEMESTMED LTD [EE]) 17 October 2019 (2019-10-17) example 4	14-16
X	WO 2019/183417 A1 (ALIOS BIOPHARMA INC [US]) 26 September 2019 (2019-09-26) figures 5, 7A; example 3	14,16
X	WO 2019/178217 A1 (BAYLOR RES INSTITUTE [US]) 19 September 2019 (2019-09-19) paragraph [0210]; claim 169	1,14,15

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
16 September 2021	28/09/2021

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069952

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array [CDF: HGU133Plus2_Hs_ENSG v12.1.0]", GEO , XP002668741, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.gov/geo/quera/acc.cgi?acc=GPL9987 [retrieved on 2010-04-19] the whole document	14,15
A	DUECHLER MARKUS ET AL: "Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol. 73, no. 16, 19 April 2016 (2016-04-19), pages 3075-3095, XP036009158, ISSN: 1420-682X, DOI: 10.1007/S00018-016-2217-Y [retrieved on 2016-04-19]	1-16
A	KAPUR MRIDU ET AL: "mRNA Translation Gone Awry: Translation Fidelity and Neurological Disease", TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 3, 16 January 2018 (2018-01-16), pages 218-231, XP085353605, ISSN: 0168-9525, DOI: 10.1016/J.TIG.2017.12.007 Box 1	1-16

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/069952

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/069952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019197024 A1	17-10-2019	EP 3589745 A1	08-01-2020
		WO 2019197024 A1	17-10-2019
WO 2019183417 A1	26-09-2019	CA 3094508 A1	26-09-2019
		CN 112166191 A	01-01-2021
		EP 3768840 A1	27-01-2021
		JP 2021518372 A	02-08-2021
		MA 52132 A	27-01-2021
		US 2021015884 A1	21-01-2021
		WO 2019183417 A1	26-09-2019
WO 2019178217 A1	19-09-2019	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

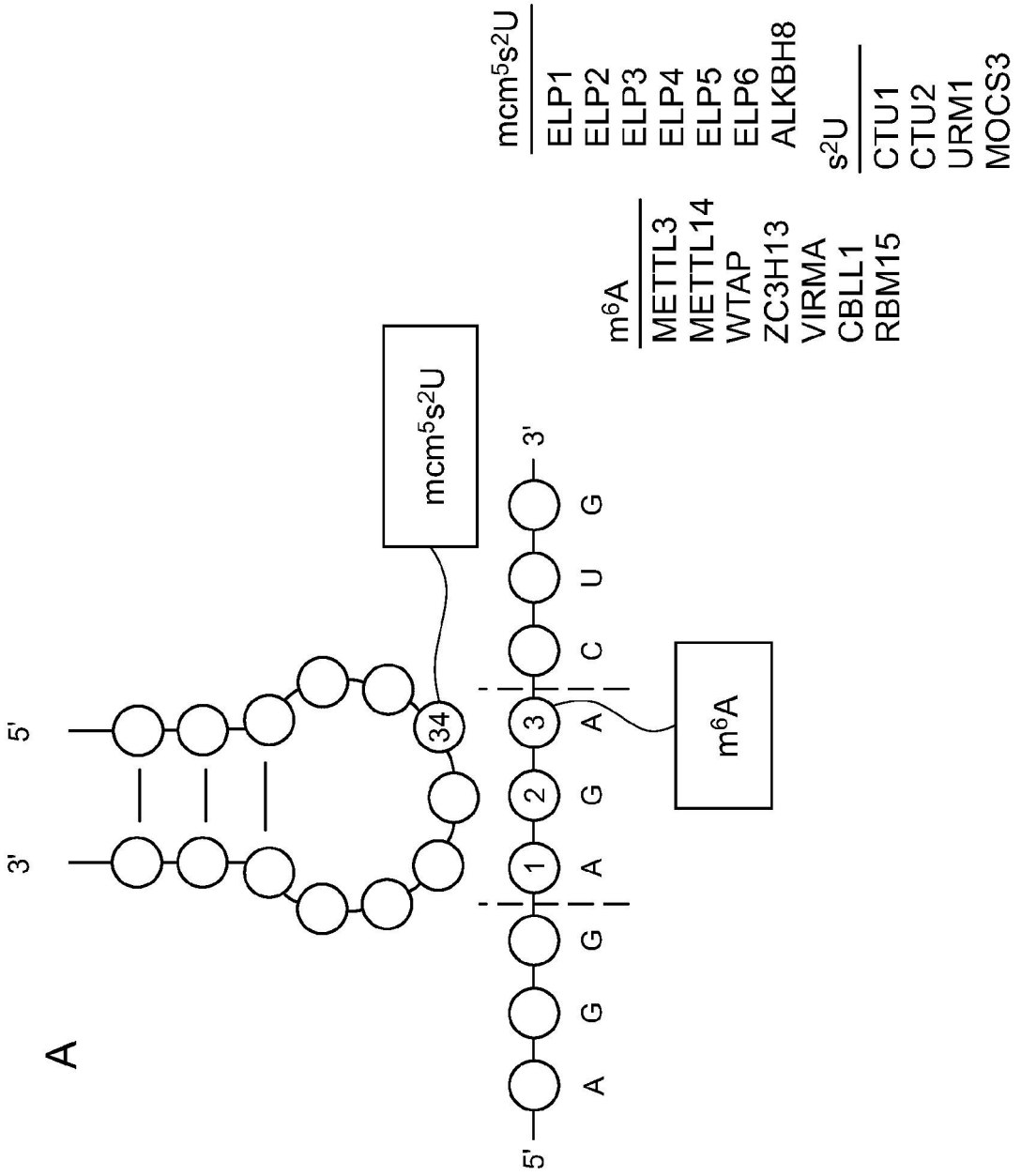
(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6837(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6837	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ	*33/68 (2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/68		
Ｇ０１Ｎ	*33/53 (2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ	*33/50 (2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｐ	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　資延 由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉 卓也
(74)代理人　100183656
弁理士　庄司 晃
(74)代理人　100224786
弁理士　大島 卓之
(74)代理人　100225015
弁理士　中島 彩夏
(72)発明者　リンダー，バスティアン
ドイツ連邦共和国，６９１１７ ハイデルベルク，マイヤーホフシュトラッセ １，スタインメッツ グループ，ゲノム バイオロジー ユニット，シー／オー イーエムビーエル
(72)発明者　シュタインメッツ，ラース
ドイツ連邦共和国，６９１１７ ハイデルベルク，マイヤーホフシュトラッセ １，スタインメッツ グループ，ゲノム バイオロジー ユニット，シー／オー イーエムビーエル
(72)発明者　ライデル，セバスチャン
スイス連邦，３０１２ ベルン，フライシュトラッセ ３，バイオケミストリー アンド ファーマシューティカル サイエンス，デパートメント オブ ケミストリー，シー／オー ユニバーシティー オブ ベルン

Ｆターム（参考）　2G045　CA25 CA26 CB02 CB03 CB30 DA13 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03
4B063　QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ26 QQ42 QQ44 QQ53 QQ79 QR06 QR32 QR36 QR48 QR72 QR77 QS25 QS33 QS34 QS36 QX02

【要約の続き】
ク質、及び／又は細胞内のmcm5s2U-tRNA修飾を調節する遺伝子、mRNA、又はタンパク質のレベル、突然変異状態、及び／又は活性を特異的に低下させ又は増強する、化合物に関する。
【選択図】図5


A
5'
3'
34
mcm5s2U
m6A
1
2
3
A
G
G
A
G
A
C
U
G
5'
3'
m6A
METTL3
METTL14
WTAP
ZC3H13
VIRMA
CBLL1
RBM15
mcm5s2U
ELP1
ELP2
ELP3
ELP4
ELP5
ELP6
ALKBH8
s2U
CTU1
CTU2
URM1
MOCS3