

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6356217号  
(P6356217)

(45) 発行日 平成30年7月11日(2018.7.11)

(24) 登録日 平成30年6月22日(2018.6.22)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12Q 1/6827 (2018.01)	C 12Q 1/6827 Z
C 12Q 1/6809 (2018.01)	C 12Q 1/6809 Z
C 12Q 1/6886 (2018.01)	C 12Q 1/6886 Z
C 12N 15/09 (2006.01)	C 12N 15/09 200

請求項の数 1 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2016-506253 (P2016-506253)
(86) (22) 出願日	平成26年4月7日(2014.4.7)
(65) 公表番号	特表2016-515390 (P2016-515390A)
(43) 公表日	平成28年5月30日(2016.5.30)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/002959
(87) 国際公開番号	W02014/163445
(87) 国際公開日	平成26年10月9日(2014.10.9)
審査請求日	平成27年12月3日(2015.12.3)
(31) 優先権主張番号	10-2013-0037336
(32) 優先日	平成25年4月5日(2013.4.5)
(33) 優先権主張国	韓国(KR)

(73) 特許権者	517227297 ノヴォミクス・カンパニー・リミテッド 大韓民国・ソウル・ヨンドンポーク・タン サンーロ・171・クムガン・ペンテリウ ム・アイティー・タワー・タンサンードン ・4-ガ・306-1、306、305、 304
(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】胃癌に対する予後予測模型の製造方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

胃癌生物学的サンプルから予後予測模型を製造する方法であって、

胃癌と関連して差等的なmRNA発現を示す予後関連遺伝子群を選択する工程、および

胃癌生物学的サンプルにおけるmRNA発現の中間値に基づいて、mRNA発現が1.5倍以上増加するmRNA高発現サンプル群と、mRNA発現が1.5倍以上減少するmRNA低発現サンプル群に分類する工程、および、

ヒトKRAS、METおよびPIK3CA遺伝子における単一塩基多型(SNP)が、mRNA高発現サンプル群およびmRNA低発現サンプル群において発生するかどうかを測定する工程、および、Kaplan-Meier Plotを実施して、log rank testで生存率を評価する工程、

Kaplan-Meier Plotにおいて示された予後の良い群および予後の悪い群それぞれにおける、ヒトKRAS、METおよびPIK3CA遺伝子のSNPが発生したサンプルの数をサンプルの合計数で割り、100をかけることによって、統計的に有意な設定値を決定する工程、

予後が良い群において、ヒトKRASおよびPIK3CA遺伝子の統計的に有意な設定値が3%を超える、および、MET遺伝子の統計的に有意な設定値が7%以下であり、ならびに、予後の悪い群において、ヒトKRASおよびPIK3CA遺伝子の統計的に有意な設定値が3%以下であり、および、MET遺伝子の統計的に有意な設定値が7%を超える

10

20

ことを確認する工程、  
を含み、かつ、

予後が良い群は、TNM病期と関係ない胃癌全体の手術による切除後の、全体生存率(Overall Survival、OS)について5年から10年の期間について肯定的臨床結果の可能性が増加しており、および、

予後が悪い群はTNM病期と関係ない胃癌全体の手術による切除後の、全体生存率(Overall Survival、OS)について5年から10年の期間について肯定的臨床結果の可能性が減少しており、

ヒトKRASの単一塩基多型が、A146PT\_g436ca、G10R\_g28a、  
G12DAV\_g35act、G12SRC\_g34act、G13DAV\_g38act、  
G13SRC\_g37act、Q61EK\_c181ga、Q61HHE\_a183ctg  
及びQ61LPR\_a182tctよりなる群から選択された少なくとも1つであり、  
10

ヒトMETの単一塩基多型が、H1112L\_a3335t、H1112Y\_c3334t、  
M1268T\_t3803c、N375S\_a1124g、R988C\_c2962t、  
T1010I\_c3029t、Y1248HD\_t3742cg及びY1253D\_t3757g  
よりなる群から選択された少なくとも1つであり、ならびに、

ヒトPIK3CAの単一塩基多型が、A1046V\_c3137t、C420R\_t1258c、E110K\_g328a、E418K\_g1252a、E453K\_g1357a、E542KQ\_g1624ac、E542VG\_a1625tg、E545AGV\_a1634cgt、E545D\_g1635ct、E545KQ\_g1633ac、F909L\_c2727g、G1049R\_g3145c、H1047RL\_a3140gt、  
H1047RL\_a3140gt、H1047RL\_a3140gt、H1047Y\_c3139t、H701P\_a2102c、K111N\_g333c、M1043I\_g3129atc、M1043V\_a3127g、N345K\_t1035a、P539R\_c1616g、Q60K\_c178a、Q546EK\_c1636ga、Q546LPR\_a1637tcg、R88Q\_g263a、S405F\_c1214t、T1025SA\_a3073tgc、Y1021C\_a3062g及びY1021HN\_t3061ca  
よりなる群から選択された少なくとも1つであり、  
20

ここで、アルファベット大文字は、アミノ酸1文字コードであり、アルファベット小文字は、塩基を示し、数字は、塩基またはアミノ酸残基の位置を示す。  
30

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、遺伝子突然変異比較分析法を通じて胃癌の予後予測が可能な新規な予後予測模型の製造方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

胃腺腫(Gastric adenocarcinoma)は、2000年に700,349名の死亡において二番目の原因であって、世界で最も一般的に診断された四番目の癌である。いくつかの力学的及び組織病理学的特徴を有する単一異質的疾患として見なしている。胃癌治療は、主に患者を手術だけで、または手術及び化学療法で治療すべきかを決定するTNM(tumor, node, metastasis)病期決定のような臨床的パラメータに基づく。胃癌は、乳房癌や大腸癌などとは異なって、TNM病期システムによって1期から4期まで明確に差異がある。すなわち、1期の場合には、5年生存率が90%以上であり、4期の場合には、20%以下であって、大きい差異を示す。したがって、TNM病期システムの予後予測力に非常に優れていることが分かる[参考文献、7th edition of the AJCC cancer staging Manual: stomach. Ann Surg Oncol 2010; 17: 3077-3079]。上記病期システムによって、胃癌は、通常、早期胃癌(Early Gas  
40

tric Cancer)、局所進行性(Locally Advanced Gastric Cancer)、局所浸潤性(Locally Advanced Invasive Gastric Cancer)及び転移胃癌(Metastatic Gastric Cancer)などに分けられる。

#### 【0003】

たとえ手術が実施可能な胃癌の主要治療ではあるが、進行性の場合、再発率が高い。再発を予防し、胃癌患者の予後を改善するために、化学療法と化学・放射線療法を含む集学的治療が導入された。しかし、これらの治療方法が患者にとって一般的な臨床結果を改善しているが、腫瘍の臨床病理学的異質性と、同じ病期にある患者の異なる結果は、アジュvant化学療法の任務を予測するのに限界があり、個別患者に対する最適接近が不足な状態である。10

#### 【0004】

最近の進展にもかかわらず、発病的に別個の腫瘍類型に対して特異的治療選択を標的化し、究極的に成果を最大化させるために、腫瘍治療を個人化するための癌治療の挑戦課題が残っている。したがって、各種治療選択事項に対する患者反応に関する予測的情報を同時に提供する試験を必要としている。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0005】

【非特許文献1】7th edition of the AJCC cancer staging Manual: stomach. Ann Surg Oncol 2010; 17: 3077 - 307920

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明の目的は、胃癌患者の遺伝子突然変異に基づく新しい予後予測模型の製造方法を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

上記目的を達成するために、本発明は、対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルにおいてK R A S、M E T 及びP I K 3 C Aよりなる群から選択された1つ以上の遺伝子で単一塩基多型性の発現可否を測定する段階と、上記単一塩基多型性の発現頻度によって統計的に有意な設定値の範囲を決定し、上記設定値の範囲によって全体生存率(O v e r a l l Survival、O S)の観点から良い予後群と悪い予後群に分類する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後予測模型を製造する方法を提供する。30

#### 【0008】

上記予後予測模型は、T N M 病期と関係ない全体胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するものであることができる。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明は、T N M 病期と関係ない全体胃癌患者群を対象として分子的特性による遺伝子突然変異の発現頻度による統計的有意値を設定値として定めて、全体生存率の観点から予後が良い群と悪い群に分類することができる予後予測模型を提供することによって、胃癌手術による切除後の臨床結果を予測することができるようとする。40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0010】

【図1】図1は、腫瘍組織のm R N Aマイクロアレイ結果とこれによるグループ分類を示す図である。

【図2】図2は、各グループのK a p l a n - M e i r P l o tを示す図である。

【図3】図3～図5は、グループ2と突然変異の関係を交差分析及びc h i - s q u a r

50

e 分析結果で示す図である。

【図4】図3～図5は、グループ2と突然変異の関係を交差分析及びchi-square分析結果で示す図である。

【図5】図3～図5は、グループ2と突然変異の関係を交差分析及びchi-square分析結果で示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明の構成を具体的に説明する。

本発明は、対象から得た癌細胞を含む生物学的サンプルにおいてKRAS、MET及びPIK3CAよりなる群から選択された1つ以上の遺伝子で单一塩基多型性の発現可否を測定する段階と、上記单一塩基多型性の発現頻度によって統計的に有意な設定値の範囲を決定し、上記設定値の範囲によって全体生存率(Overall Survival、OS)の観点から良い予後群と悪い予後群に分類する段階とを含む、胃癌として診断された対象で予後予測模型を製造する方法を提供する。 10

【0012】

本発明の一具体例によれば、胃癌と関連した差等的なmRNA発現を示す予後関連遺伝子群を選定し、mRNA高発現群と低発現群に分類し、上記分類群において突然変異確率が顕著に高い遺伝子としてKRAS、MET及び/またはPIK3CAを選定し、上記遺伝子を対象として1つ以上の单一塩基多型性の発現可否を測定した結果、上記遺伝子の单一塩基多型性の発現頻度は、mRNA高発現群と低発現群において統計的に有意な程度で相異に現われ、全体生存率の観点から予後が良い群と悪い群に分類することができる分類基準に適用されることを確認した。 20

【0013】

したがって、本発明による方法で、予後予測模型は、胃癌として診断された対象においてKRAS、MET及び/またはPIK3CA遺伝子の单一塩基多型性の発現頻度を分類基準として良い予後群と悪い予後群に分類し、このような分類は、統計的有意値を有することを特徴とする。

【0014】

上記差等的なmRNA発現を示す予後関連遺伝子群は、PCRまたはアレイ基盤方法によって実施される能够である。 30

【0015】

上記差等的なmRNA発現を示す予後関連遺伝子群の分類は、公知された多様な統計的手段を使用して決定することができる。mRNA高発現群と低発現群は、統計的に有意な値、すなわち、約1.5倍以上、約2倍以上、約4倍以上、約6倍以上、約10倍以上の差異がある群を対象に分けることができる。

【0016】

癌は、ゲノム内の遺伝的及び後成的突然変異の蓄積によって誘発される。1つまたは2つの塩基の変化は、アミノ酸置換を誘発し、タンパク質の活性を替えることができる。これらの单一塩基多型性の存在は、癌の診断及び予後と相関関係がある。したがって、本発明は、KRAS、MET及び/またはPIK3CA遺伝子の1つ以上の单一塩基多型性の発現頻度を予後予測模型の製造に適用した。 40

【0017】

上記KRASの单一塩基多型性は、A146PT\_g436ca、G10R\_g28a、G12DAV\_g35act、G12SRC\_g34act、G13DAV\_g38act、G13SRC\_g37act、Q61EK\_c181ga、Q61HHE\_a183ctg及びQ61LPR\_a182tctよりなる群から選択された1つ以上であることができる。設定値の決定には、このような突然変異を1個と計数して、設定値に適用する。

【0018】

ここで、アルファベット大文字は、アミノ酸1文字コードであり、アルファベット小文字

10

20

30

40

50

は、塩基を示し、数字は、塩基またはアミノ酸残基の位置を示す。例えば、A 1 4 6 P T \_ g 4 3 6 c a の場合、遺伝子 4 3 6 位置で g は、c または a に置換されることができ、これにより、アミノ酸 1 4 6 番目の位置でアミノ酸アラニン (A) は、プロリン (P) またはスレオニン (T) に置換されることができるという意味である。以下、M E T 及び P I K 3 C A の突然変異の例示も、このような意味を示す。

#### 【0019】

上記 M E T の突然変異は、H 1 1 1 2 L \_ a 3 3 3 5 t 、 H 1 1 1 2 Y \_ c 3 3 3 4 t 、 M 1 2 6 8 T \_ t 3 8 0 3 c 、 N 3 7 5 S \_ a 1 1 2 4 g 、 R 9 8 8 C \_ c 2 9 6 2 t 、 T 1 0 1 0 I \_ c 3 0 2 9 t 、 Y 1 2 4 8 H D \_ t 3 7 4 2 c g 及び Y 1 2 5 3 D \_ t 3 7 5 7 g よりなる群から選択された 1 つ以上であることができる。設定値の決定には、この 10 ような突然変異を 1 個と計数して、設定値に適用する。

#### 【0020】

上記 P I K 3 C A の突然変異は、A 1 0 4 6 V \_ c 3 1 3 7 t 、 C 4 2 0 R \_ t 1 2 5 8 c 、 E 1 1 0 K \_ g 3 2 8 a 、 E 4 1 8 K \_ g 1 2 5 2 a 、 E 4 5 3 K \_ g 1 3 5 7 a 、 E 5 4 2 K Q \_ g 1 6 2 4 a c 、 E 5 4 2 V G \_ a 1 6 2 5 t g 、 E 5 4 5 A G V \_ a 1 6 3 4 c g t 、 E 5 4 5 D \_ g 1 6 3 5 c t 、 E 5 4 5 K Q \_ g 1 6 3 3 a c 、 F 9 0 9 L \_ c 2 7 2 7 g 、 G 1 0 4 9 R \_ g 3 1 4 5 c 、 H 1 0 4 7 R L \_ a 3 1 4 0 g t 、 H 1 0 4 7 R L \_ a 3 1 4 0 g t 、 H 1 0 4 7 Y \_ c 3 1 3 9 t 、 H 7 0 1 P \_ a 2 1 0 2 c 、 K 1 1 1 N \_ g 3 3 3 c 、 M 1 0 4 3 I \_ g 3 1 2 9 a t c 、 M 1 0 4 3 V \_ a 3 1 2 7 g 、 N 3 4 5 K \_ t 1 0 3 5 a 、 P 5 3 9 R \_ c 1 6 1 6 g 、 Q 6 0 K \_ c 1 7 8 a 、 Q 5 4 6 E K \_ c 1 6 3 6 g a 、 Q 5 4 6 L P R \_ a 1 6 3 7 t c g 、 R 8 8 Q \_ g 2 6 3 a 、 S 4 0 5 F \_ c 1 2 1 4 t 、 T 1 0 2 5 S A \_ a 3 0 7 3 t g 、 Y 1 0 2 1 C \_ a 3 0 6 2 g 及び Y 1 0 2 1 H N \_ t 3 0 6 1 c a よりなる群から選択された 1 つ以上であることができる。設定値の決定には、このような突然変異を 1 個と計数して、設定値に適用する。

#### 【0021】

上記単一塩基多型性を測定する方法は、特に制限されないが、M A L D I - T O F M S (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) を利用することができる。

30

#### 【0022】

本発明の予後予測模型を製造する方法において、単一塩基多型性の発現頻度を予後が良い群と悪い群との分類基準に使用するにあたって、単一塩基多型性の発現頻度によって統計的に有意な設定値の範囲を決定し、上記設定値の範囲を基準として全体生存率の観点から予後が良い群と悪い群に分類することができる。

#### 【0023】

上記設定値の範囲は、全体対象に対する単一塩基多型性の発現可否を百分率で計算して、約 7 %、約 5 %、約 3 % に定めることができるが、これに特に制限されない。

#### 【0024】

例えば、本発明の一具体例によれば、K R A S または P I K 3 C A 遺伝子の単一塩基多型性の発現頻度がそれぞれ 3 % 以下の場合、予後が悪い群に分類し、3 % を超過した場合、予後が良い群に分類することができる。

40

#### 【0025】

本発明の他の具体例によれば、M E T 遺伝子の単一塩基多型性の発現頻度が 7 % 以下の場合、予後が良い群に分類し、7 % を超過した場合、予後が悪い群に分類することができる。

#### 【0026】

本発明の予後予測模型を製造する方法において、予後の良い群は、3 年以上、6 年以上、10 年以上の期間中に、全体生存率が高いことを意味し、予後が悪い群は、上記期間中に全体生存率が低いことを意味する。上記用語「良い予後」は、臨床結果の肯定的臨床結果

50

可能性の増加で表現されることができ、「悪い予後」は、臨床結果の肯定的臨床結果可能性の減少で表現されることがある。

#### 【0027】

本発明の方法による予後予測模型は、TNM病期と関係ない全体胃癌の手術による切除後の臨床結果を予測するのに有用であることができる。

#### 【0028】

別途定義が無い限り、本願に使用された技術及び科学用語は、当業者の水準で一般的に理解するような意味がある。本発明は、いずれの方式でも、説明された方法及び材料に制限されない。本発明の目的上、下記用語が以下で定義される。

#### 【0029】

用語「ポリヌクレオチド」は、一般的に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを言い、例えば、変形または非変形RNAまたはDNAであることができる。本明細書で、「ポリヌクレオチド」は、具体的にcDNAを含む。

#### 【0030】

用語「オリゴヌクレオチド」は、非制限的に一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖または二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド及び二本鎖DNAを含む、比較的短いポリヌクレオチドを言う。オリゴヌクレオチド、例えば一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドは、例えば商業的に入手可能な自動化オリゴヌクレオチド合成器を使用する化学的方法によって合成されることがある。しかし、オリゴヌクレオチドは、試験管内の再組換えDNA媒介技術を含む各種他の方法によって及び細胞及び有機体の中でのDNA発現によって製造されることができる。

10

#### 【0031】

用語「差等的に発現された遺伝子」または「差等的な遺伝子発現」は、正常または対照用対象体の発現に比べて胃癌のような癌を病む対象体のうちさらに高いかまたは低い水準に活性化される遺伝子を言う。また、同一の疾病の異なる病期でさらに高いかまたは低い水準に活性化される遺伝子を含む。差等的に発現される遺伝子は、核酸水準またはタンパク質の水準で活性化または抑制されるか、または他のスプライシングを受けて、異なるポリペプチド産物を引き起こす場合であることができる。このような差異は、例えばポリペプチドのmRNA水準、表面発現、分泌または他の分配における変化によって立証されることができる。本発明の目的上、「差等的な遺伝子発現」は、正常及び疾病にかかった対象体で、または疾病にかかった対象体の多様な病期で与えられた遺伝子の発現の間に約1.5倍以上、約4倍以上、約6倍以上、約10倍以上の差異があるときに存在するものと見なされる。

20

#### 【0032】

遺伝子転写体または遺伝子発現生成物に関する用語「標準化された」は、基準遺伝子セットの転写体／生成物の平均水準に対する転写体または遺伝子発現生成物の水準を言い、ここで、レファレンス遺伝子は、患者、組織または治療にわたってこれらの最小限の変動に基づいて選択されるか(housekeeping genes)、またはレファレンス遺伝子は、試験された遺伝子全体を言う。後者の場合、一般的に「全体標準化(global normalization)」と言及され、試験された遺伝子の総数が比較的大きい、好ましくは、50超過であることが重要である。具体的に、RNA転写体に関する用語「標準化された」は、基準遺伝子セットの転写水準の平均に対する転写水準を言う。

30

#### 【0033】

用語「発現閾値」及び「定義された発現閾値」は、混用して使用し、この水準以上では、遺伝子または遺伝子生成物が患者反応に対する予測マーカーとして使用される当該遺伝子または遺伝子生成物の水準を言う。閾値は、代表的に臨床的研究から実験的に定義される。発現閾値は、最大敏感性、または最大選択性(例えば1つの薬物に対する反応者だけを選択するように)、または最小誤差で選択されることがある。

40

#### 【0034】

50

用語「遺伝子増幅」は、特定細胞または細胞株で遺伝子または遺伝子断片の多数個の複製物が形成される過程を言う。複製された領域（増幅されたDNAの伸長）は、「アンブリコン」と言及されることがある。生産されたmRNAの量、すなわち遺伝子発現度は、また、特定遺伝子の作られた複製数に比例して増加することができる。

#### 【0035】

本明細書で、「予後」は、本願で癌による死亡または胃癌のような新生物性疾患の進行（再発、転移性拡散及び耐薬物性を含む）の可能性の予測を言うのに使用される。用語「予測」は、本願で患者が主要腫瘍の手術除去後に癌再発なしに特定の期間の間に生存するようになる可能性を言うのに使用される。このような予測は、任意の特定患者に対して最も適切な治療技法を選択することによって、治療を決定するのに臨床的に使用することができる。このような予測は、患者が治療摂生、例えば手術施術に対して有利に反応しやすいか、または手術終了後に患者の長期間生存が可能であるかを予測するのにあたって、貴重な手段になる。10

#### 【0036】

別途指示しない限り、分子生物学（再組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学及び生化学の従来技術を使用して本発明を行うことができる。

#### 【0037】

##### 1. 遺伝子発現プロファイル作成（Profiling）

遺伝子発現プロファイル作成方法は、ポリヌクレオチドの混成化分析に基づく方法、ポリヌクレオチドの配列化に基づく方法、及びプロテオミクス基盤方法を含む。例えばmRNA発現の定量化のための方法は、ノーザン blotting（northern blotting）及びインサイチュー混成化（in situ hybridization）；RNAse保護検定試験；及びPCR基盤方法、例えば逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）などを含む。または、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖またはDNA-タンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖を認識することができる抗体が使用されることができる。配列化基盤遺伝子発現分析で代表的な方法は、遺伝子発現の連続分析（Serial Analysis of Gene Expression、SAGE）及び大量並行シグネチャー配列化（massively parallel signature sequencing、MPSS）による遺伝子発現分析を含む。20

#### 【0038】

##### 2. PCR基盤遺伝子発現プロファイル作成方法

###### a. 逆転写酵素PCR（RT-PCR）

最も敏感で且つ最も柔軟な定量的PCR基盤遺伝子発現プロファイル作成方法のうち1つは、RT-PCRであり、これは、薬物治療とともに、または薬物治療なしに、正常組織及び腫瘍組織での異なるサンプル集団におけるmRNA水準を比較して遺伝子発現パターンを特性能化し、密接に関連したmRNAを判別し、RNA構造を分析するのに使用されることができる。

#### 【0039】

第1段階は、標的サンプルからmRNAの単離である。mRNAは、例えば冷凍されるかまたは保管されたパラフィン包埋及び固定された（例えば、ホルマリン固定された）組織サンプルから抽出されることがある。40

#### 【0040】

mRNA抽出のための一般的な方法は、当業界に公知されており、パラフィンに包埋された組織からのRNA抽出方法は、文献（[Rupp and Locker, Lab Invest. 56: A67 (1987)] 及び [De Andres et al., Biotechniques 18: 42044 (1995)]）などに開示されている。特に、RNA単離は、商業的製造メーカー、例えばキアゲン（Qiagen）からの精製キット、緩衝剤セット及びプロテアーゼを使用して製造メーカーのマニュアルによって行うことができる。他の商業的に入手可能なRNA単離キットは、マスタースターブラー（Master50

r P u r e ) (商標) 完全DNA及びRNA精製キット(エピセントレ(EPICENTRE) (登録商標)、ウィスコンシン州メディソン)及びパラフィンブロック(Paraffin Block) RNA単離キット(アンビオン社(Ambion, Inc.))を含む。組織サンプルからの全RNAは、RNA Stat-60(Tel-Test)を使用して単離することができる。腫瘍から製造されたRNAは、例えば塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離することができる。

#### 【0041】

RNAは、PCRのための鋳型として使用されることがないので、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイル作成の第1段階は、RNA鋳型のcDNAへの逆転写であり、その後、当該PCR反応への指数的増幅がつながる。逆転写酵素は、主に鳥類骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素(AMV-RT)及びモロニー(Moloney)鼠白血病ウイルス逆転写酵素(MMLV-RT)を使用することができる。逆転写段階は、代表的に発現プロファイル作成の環境及び目標によって、特定プライマー、無作為ヘキサマー、またはオリゴ-dTプライマーを使用して初回抗原刺激される。例えば、抽出されたRNAは、GeneAmp RNA PCRキット(パークインエルマー(Perkin Elmer)、米国カリフォルニア州)を使用して製造メーカーのマニュアルによって逆転写されることがある。誘導されたcDNAは、引き続いて後続するPCR反応で鋳型として使用されることができる。

#### 【0042】

たとえPCR段階が各種熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼを使用することができる、これは、典型的には、Taq DNAポリメラーゼを使用し、Taq DNAポリメラーゼは、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するが、3'-5'ブルーフリーディング(proofreading)エンドヌクレアーゼ活性は不足である。したがって、TaqMan(登録商標)PCRは、典型的には、TaqまたはTthポリメラーゼの当該標的アンプリコンに結合された混成化プローブを混成化させる5'-ヌクレアーゼ活性を利用するが、5'ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素が使用されることがある。2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用してPCR反応の代表的なアンプリコンを生成させる。第3オリゴヌクレオチドまたはプローブは、2個のPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。プローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって非延伸性であり、レポーター蛍光染料及び消光剤(quencher)蛍光染料で標識される。レポーター染料から任意のレーザー誘導放出は、2個の染料がこれらがプローブ上にあるときのように、一緒に近く位置するとき、消光剤染料によって消去される。增幅反応中に、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、鋳型依存的方式でプローブを切断する。生成されるプローブ断片は、溶液の中で解離され、放出されたレポーター染料からの信号には、第2蛍光団の消去効果がない。レポーター染料の一分子が合成された新しい分子々から放出され、消去されないレポーター染料の検出は、データの定量的解析に対する基準を提供する。

#### 【0043】

TaqMan(登録商標)RT-PCRは、商業的に入手可能な装備、例えばABIプライズム(PRISM)7700TMシーケンス検出システム(Sequence Detection System)(商標)(Perkin-Elmer-Applied Biosystems)、またはライトサイクラ(Lightcycler)(Roche Molecular Biochemicals)を使用して行われることができる。

#### 【0044】

5'-ヌクレアーゼ検定試験データは、初期にCt、または閾値サイクルとして表現される。蛍光値は、毎サイクル中に記録され、増幅反応でその地点にまで増幅された生成物の量を示す。蛍光信号が初めて統計学的に有意なものと記録されるときの地点が閾値サイクル(Ct)である。

#### 【0045】

サンプル間の変動効果及び誤差を最小化するために、RT-PCRは、一般的に基準R

10

20

30

40

50

N A (これは、理想的には異なる組織の間で一定水準に発現される)を使用して行われ、実験治療によって影響を受けない。遺伝子発現パターンを標準化するのに最も頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ(GAPD)及び-アクチン(ACTB)のmRNAである。

#### 【0046】

また、新しいリアルタイム定量的PCRは、二重標識された蛍光源性プローブ(すなわち、TaqMan(登録商標)プローブ)を用いたPCR生成物蓄積を測定する技術であって、定量的競合的PCR(ここでは、各標的配列に対する内部競争者が標準化に使用される)及びサンプル内に含まれた標準化遺伝子またはRT-PCRに対するハウスキーピング遺伝子を使用する定量的比較用PCRの両方と使用可能である。

10

#### 【0047】

##### b. マスアレイ(Mass ARRAY)システム

シーケノム社(Sequenom, Inc.)が開発したマスアレイ基盤遺伝子発現プロファイル作成方法では、RNAの単離及び逆転写後に得られたcDNAを合成DNA分子(競争者)(これは、単一塩基を除いたすべての位置で標的化cDNA区域と一致する)でスパイクし(spike'd)、内部標準として使用する。cDNA/競争者混合物をPCR増幅させ、ポスト-PCRエビアルカリ性ホスファターゼ(SAP)酵素処理を加えて、残っているヌクレオチドのデホスホリル化を引き起こす。アルカリ性ホスファターゼの不活性化後に、競争者及びcDNAからのPCR生成物をプライマー伸長させ、これは、競争者-及びcDNA-由来PCR生成物に対する別途の質量信号を生成させる。精製後、これら生成物をマトリクス-補助レーザー脱着イオン化流れ時間質量分光測定法(MALDI-TOFMS)分析を利用した分析に必要な成分が既にロードされているチップアレイ上に計量分配する。反応に存在するcDNAを引き続いて生成された質量スペクトル内のピーク面積比を分析して定量化する。

20

#### 【0048】

##### c. その他PCR基盤方法

その他視差ディスプレイ；増幅された断片長さ多型性(iAFLP)；ビーズアレイ(Bead Array)TM技術(イルミナ(Illumina)、カリフォルニア州ジェゴ)；遺伝子発現に対する迅速検定試験に商業的に入手可能なルミネックス(LumineRx)100 LabMAPシステム及び多色コーディングされた微小球(LumineX Corp.)を使用する、遺伝子発現検出用ビーズアレイ(Beads Array for Detection of Gene Expression, BADGE)；及び高被覆発現プロファイル作成(HiCEP)分析がある。

30

#### 【0049】

##### 3.マイクロアレイ

新鮮なまたはパラフィンに包埋された腫瘍組織で癌関連遺伝子の発現プロファイルを測定することができる。この方法では、関心を有する配列(cDNA及びオリゴヌクレオチドを含む)をマイクロチップ基板上にプレーティングまたは配列させる。配列された配列を引き続いて関心を有する細胞または組織からの特定DNAプローブと混成化させる。RT-PCR方法と同様に、mRNAの供給源は、典型的に、ヒトの腫瘍または腫瘍細胞株、及び対応する正常組織または細胞株から単離された全体RNAである。したがって、RNAは、各種主要腫瘍または腫瘍細胞株から単離されることができる。マイクロアレイ技術は、cDNAクローンのPCR増幅された挿入物を緻密なアレイで基板上に提供する。好みしくは、10,000以上のヌクレオチド配列を基板に加える。10,000エレメントそれぞれでマイクロチップ上に固定化された微細配列された遺伝子が厳格な条件下での混成化に適している。蛍光的に標識されたcDNAプローブが関心を有する組織から抽出されたRNAの逆転写によって蛍光ヌクレオチドの混入を通じて生成されることがある。チップに加えられた標識されたcDNAプローブは、アレイ上のDNA各スポットに特異性を有するように混成化される。非特異的に結合されたプローブを除去するための厳格な洗浄後、チップを同一焦点レーザー顕微鏡によって、または他の検出方法、例えばCC

40

50

D カメラによって走査する。各配列されたエレメントの混成化に対する定量化は、対応する m R N A 過多の評価を可能にする。このうち、色蛍光の場合、2 個の R N A 供給源から生成された別途に標識された c D N A プローブがアレイに各対別に混成化される。したがって、各明示された遺伝子に対応する 2 個の供給源からの転写体の相対的過多が同時に決定される。小型化規模の混成化が多い数の遺伝子に対する発現パターンの便利で且つ迅速な評価を提供する。このような方法は、稀な転写体（これは、細胞当たり少数個の複製物に発現される）を検出し、且つ発現度において少なくとも略 2 倍の差異で再現可能に検出するのに必要な敏感性を有するものと現われた。マイクロアレイ分析は、商業的に入手可能な装備によって製造メーカーのプロトコルによって、例えばアフィメトリクスジーンチップ (A f f y m e t r i x G e n e C h i p) 技術またはインサイト (I n c y t e ' s) マイクロアレイ技術を使用して行われることができる。10

#### 【 0 0 5 0 】

##### 4 . m R N A 单離、精製及び増幅の一般的な説明

パラフィンに包埋された組織を使用して遺伝子発現プロファイルを作成する技術は、前述した通りである。最終的に得られたデータを分析して観察された腫瘍サンプルで確認された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて患者に利用することができる最上の治療選択事項を判別する。

#### 【 0 0 5 1 】

本発明の重要な特徴は、胃癌組織による特定遺伝子の測定された発現を使用して予後情報を提供するものである。このような目的のために、検定試験された R N A の量、使用された R N A 品質における変動、及び他の因子、例えば機械及び作業者の差異における差異に対して補正する（標準化）ことが必須である。したがって、検定試験は、典型的に、G A P D 及び A C T B のような公知されたハウスキーピング遺伝子から転写されたものを含む、基準 R N A の使用を測定して混入させる。または、標準化は、検定試験された遺伝子またはこれらの多くのサブセット全部の平均または中間信号 (C t ) を基準とすることができる（全体標準化接近法）。下記実施例では、中心標準化戦略を使用したが、これは、標準化のために臨床的成果との相關性不足に基づいて選択されたスクリーニングされた遺伝子のサブセットを利用した。20

#### 【 発明を実施するための形態 】

#### 【 0 0 5 2 】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。但し、下記実施例は、本発明を例示することができるものに過ぎず、本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

#### 【 0 0 5 3 】

##### 実施例 1 予後予測対象選定及び実験設計

S a n g e r I n s t i t u t e が保有している多様な癌腫で同定される体細胞突然変異に対するデータベースを利用して、本発明者は、様々な他の癌で存在するより一般的に発生する単一塩基多型性 ( S N P ) の存在を検出する分析を開発した。

#### 【 0 0 5 4 】

このために、腫瘍組織サンプル 5 3 7 個、正常組織サンプル 1 2 9 個、F F P E 腫瘍サンプル 1 2 5 個 ( 1 9 9 9 年から 2 0 0 6 年まで延世大学校セブランス病院で一次治療として胃の切除術を受けた胃癌患者 ) 及び F F P E 正常組織サンプル 1 2 3 個を対象として、A K T 1 、B R A F 、C T N N B 1 、F B W X 7 、G N A S 、I D H 1 、J A K 2 、K I T 、K R A S 、M E T 、N R A S 、P D G F R A 、P D P K 1 、P H L P P 2 、P I K 3 C A 及び P I K 3 R 1 を選定し、これらで現われる 1 5 9 種類の突然変異を調査した。40

#### 【 0 0 5 5 】

単一塩基多型性検出は、シーケノム M A L D I T O F M a s s A r r a y s y s t e m ( m a t r i x - a s s i s t e d l a s e r d e s o r p t i o n / i o n i z a t i o n t i m e - o f - f l i g h t m a s s s p e c t r o m e t r y ) を使用した。この方法は、D N A 近くに選定された S N P を一次で P C R で増幅してから

50

、プライマー-エクステンション反応を進行し、潜在的 SNP 塩基を測定する。PCR プライマーとエクステンションプライマーを両方ともに Sequenom Assay Design software を利用して設計した。このプログラムは、ウェル当たり 29 個まで異なる SNP の多重反応が可能である。初期 PCR 反応は、製造メーカマニュアルによって 384 ウェルフォーマットで行ってから、Sequenom 社の EXO-SAP を利用して PCR を仕上げた。プライマー-エクステンション反応は、Sequenom's IPLEX 化学を利用してそれらのプロトコルによって行った。その後、IPLEX 反応は、Sequenom's Clean Resin を利用して脱塩処理され、Samsung Nano dispenser を利用して Spectrochip matrix chips 上にスポットティングした。その後、上記チップを Sequenom MassArray させた。Sequenom Typer Software は、生成された質量スペクトルを解析し、期待された質量に基づいて SNP を報告する。生成されたすべてのスペクトルは、2 繰り返しで進行し、目視で確認した。

## 【0056】

結果は、表 1 に示し、各遺伝子で発生する 1 種類以上の突然変異を 1 個と計数し、算出した。

## 【0057】

【表 1】

区分	AKT 1	BRA F	CTN NB1	FBW X7	GNA S	IDH 1	JAK 2	KIT	KRA S	MET	NRA S	PDG FRA	PDP K1	PHL PP2	PIK 3CA	PIK 3R1
腫瘍組織 -537	2	1	6	7	1	1	1	1	33	54	1	7	1	0	42	0
正常組織 -129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0
FFPE- 腫瘍サンプル-125	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	1	1	0	4	3	15
FFPE- 正常サンプル-123	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	0	1	0	4	0	12
G.C 細胞株 -108 -4 繰り返し	0	0	11	4	0	0	0	0	23	4	4	1	0	0	19	0
乳房癌細胞株 -16-4 繰り返し	0	11	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
ETC	0	0	0	0	0	0	0	4	1	6	0	2	0	0	1	0
TOTAL - 1081	2	12	17	11	1	1	1	5	72	99	6	12	1	8	65	27

10

20

30

40

## 【0058】

表 1 に示されたように、KRAS、MET、PIK3CA 突然変異が正常組織に比べて腫瘍で多く現われることが分かった。

## 【0059】

KRAS、MET 及び PIK3CA の単一塩基多型性による突然変異種類は、表 2 に示された通りである。

## 【0060】

【表2】

遺伝子種類	突然変異種類
KRAS	A146PT_g436ca, G10R_g28a, G12DAV_g35act, G12SRC_g34act, G13DAV_g38act, G13SRC_g37act, Q61EK_c181ga, Q61HHE_a183ctg, Q61LPR_a182tct
MET	H1112L_a3335t, H1112Y_c3334t, M1268T_t3803c, N375S_a1124g, R988C_c2962t, T1010I_c3029t, Y1248HD_t3742cg, Y1253D_t3757g
PIK3CA	A1046V_c3137t, C420R_t1258c, E110K_g328a, E418K_g1252a, E453K_g1357a, E542KQ_g1624ac, E542VC_a1625tg, E545AGV_a1634cgt, E545D_g1635ct, E545KQ_g1633ac, F909L_c2727g, G1049R_g3145c, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047RL_a3140gt, H1047Y_c3139t, H701P_a2102c, K111N_g333c, M1043I_g3129atc, M1043V_a3127g, N345K_t1035a, P539R_c1616g, Q60K_c178a, Q546EK_c1636ga, Q546LPR_a1637tcg, R88Q_g263a, S405F_c1214t, T1025SA_a3073tg, Y1021C_a3062g, Y1021HN_t3061ca

アルファベット大文字は、アミノ酸1文字コードであり、大文字間の数字は、アミノ酸位置であって、数字の左側は、置換前のアミノ酸、数字の右側は、置換後のアミノ酸を示す。  
アルファベット小文字は、塩基を示し、小文字間の数字は、遺伝子内の塩基位置であって、数字の左側は、置換前の塩基、数字の右側は、置換後の塩基を示す。

10

20

## 【0061】

上記結果を基盤として、延世大学校セブランス病院で保有中の腫瘍組織サンプル545個と正常組織サンプル129個を対象としてchi-square分析を行った結果、KRAS、MET及びPIK3CAのp値は、0.001以下であった。すなわち、正常組織と腫瘍組織の間には、突然変異可否に対する区分が明確であると認められる。

## 【0062】

上記サンプルのうち腫瘍組織350個を対象としてmRNAマイクロアレイを実施し、mRNAグループで当該予後と関連した突然変異があるかを調査した。このために、350個のmRNAのunsupervised clustering分析を行い、グループに分け、Kaplan-Meier Plot及びlog rank testを実施して、予後関連グループを定めた。すなわち、350個サンプルを元々のローデータで抽出し、四分位数標準化を実施し、ログベース2に切り替えた後、median centeringを実施した。分散濾過方法を通じて予後関連遺伝子をグループ化し、最終的に中間値と比較し、1.5倍以上の増加または減少を示す15個のプローブを使用して5432個の遺伝子を抽出し、Cluster and Treeview(<http://ranalab.gov/EigenSoftware.htm>)でクラスタ分析を行った。

30

## 【0063】

上記グループでKRAS、MET及びPIK3CA突然変異があるサンプルを配置し、chi-square分析技法を通じてグループ間の当該突然変異との関連関係を調査した。腫瘍組織のmRNAマイクロアレイ結果は、図1に示す。

40

## 【0064】

図1及び表3は、2個のグループに区分した場合(CL1、CL2)、3個のグループに区分した場合(CL1、CL2、CL3)、4個のグループに区分した場合(CL1、CL2、CL3、CL4)、5個のグループに区分した場合(CL1、CL2、CL3、CL4、CL5)のp値を記載した。例えば、グループ2は、2個のグループ(CL1、CL2)に区分され、各グループでKRAS、MET及びPIK3CAの突然変異可否を把握することができる。

## 【0065】

50

【表3】

CHI-SQUARE	KRAS	MET	PIK3CA
グループ2	0.046	0.064	0.015
グループ3	0.003	0.180	0.002
グループ4	0.008	0.314	0.005
グループ5	0.016	0.181	0.007

## 【0066】

図2は、各グループの Kaplan - Meier Plot を示す図である。

10

## 【0067】

図3～図5は、グループ2と突然変異関係を交差分析及びchi-square分析結果を示す図である。

図3～図5に示されたように、予後が良いクラス2でKRAS及びPIK3CA遺伝子の突然変異頻度が高く、予後が悪いクラス1では、KRAS及びPIK3CA遺伝子の突然変異頻度が低く現われた。また、予後が良いクラス2でMET遺伝子の突然変異頻度が低く、予後が悪いクラス1では、MET遺伝子の突然変異頻度が高く現われた。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0068】

本発明は、胃癌再発予後予測分野において診断キットとして使用することができる。

20

【図1】

Fig. 1

2個グループ		N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_2=CL1	100	59	44.3	4.86	6.8	
Class_15_15_2=CL2	259	98	112.7	1.91	6.8	
ChiSq= 6.8 on 1 degrees of freedom, p= <b>0.00913</b>						

3個グループ		N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_3=CL1	100	59	44.3	4.859	6.797	
Class_15_15_3=CL2	259	98	112.7	4.079	6.797	
Class_15_15_3=CL3	2	2	4.079	0.00000	0.013	
Class_15_15_3=CL3 158	70	67.3	0.124	0.227	0.227	
ChiSq= 11.8 on 2 degrees of freedom, p= <b>0.00267</b>						

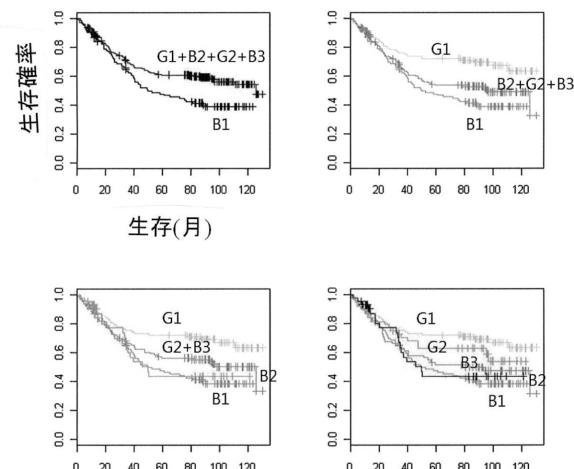
  

4個グループ		N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_4=CL1	100	59	44.3	4.859	6.797	
Class_15_15_4=CL2	92	28	45.6	6.770432	9.613380	
Class_15_15_4=CL3	113	52	51.8	0.000494	0.000737	
Class_15_15_4=CL4	45	18	15.3	0.487515	0.542952	
ChiSq= 12.2 on 3 degrees of freedom, p= <b>0.00663</b>						

5個グループ		N	Observed	Expected	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Class_15_15_5=CL1	100	59	44.3	4.859	6.797	
Class_15_15_5=CL2	2	2	45.6	0.00000	0.013	
Class_15_15_5=CL3	63	33	29.4	0.0531	0.556	
Class_15_15_5=CL4	53	19	22.5	0.0538	0.629	
Class_15_15_5=CL5	45	18	15.3	0.488	0.543	
ChiSq= 13.2 on 4 degrees of freedom, p= <b>0.0104</b>						

【図2】

Fig. 2

【図3】

## &lt;GROUP2 \* KRAS&gt;

			KRAS				
			0	1	Total		
GROUP2	CL1	Count	97	3	100		
		GROUP2 %	97.0%	3.0%	100.0%		
		KRAS %	29.9%	11.5%	28.6%		
	CL2	Count	227	23	250		
		GROUP2 %	90.8%	9.2%	100.0%		
		KRAS %	70.1%	88.5%	71.4%		
Total			324	26	350		
			GROUP2 %	92.6%	7.4%	100.0%	
			KRAS %	100.0%	100.0%	100.0%	

			Chi-Square Tests		
			Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square			3.993 <sup>a</sup>	1	.046
Continuity correction <sup>b</sup>			3.142	1	.076
Likelihood Ratio			4.692	1	.030
Fisher's Exact Test					.068
N of Valid Cases			350		.031

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.43

b. Computed only for a 2x2 table

【図4】

## &lt;GROUP2 \* MET&gt;

			MET				
			0	1	Total		
GROUP2	CL1	Count	86	14	100		
		GROUP2 %	86.0%	14.0%	100.0%		
		MET %	27.1%	42.4%	28.6%		
	CL2	Count	231	19	250		
		GROUP2 %	92.4%	7.6%	100.0%		
		MET %	72.9%	57.6%	71.4%		
Total			317	33	350		
			GROUP2 %	90.6%	9.4%	100.0%	
			MET %	100.0%	100.0%	100.0%	

			Chi-Square Tests		
			Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square			3.426 <sup>a</sup>	1	.064
Continuity correction <sup>b</sup>			2.718	1	.099
Likelihood Ratio			3.202	1	.074
Fisher Exact Test					.071
N of Valid Cases			350		.053

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9.43

b. Computed only for a 2x2 table

【図5】

## &lt;GROUP2 \* PIK3CA&gt;

			PIK3CA				
			0	1	Total		
GROUP2	CL1	Count	97	3	100		
		GROUP2 %	97.0%	3.0%	100.0%		
		PIK3CA %	30.4%	9.7%	28.6%		
	CL2	Count	222	28	250		
		GROUP2 %	88.8%	11.2%	100.0%		
		PIK3CA %	69.6%	90.3%	71.4%		
Total			319	31	350		
			GROUP2 %	91.1%	8.9%	100.0%	
			PIK3CA %	100.0%	100.0%	100.0%	

			Chi-Square Tests		
			Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square			5.950 <sup>a</sup>	1	.015
Continuity Correction <sup>b</sup>			4.977	1	.026
Likelihood Ratio			7.167	1	.007
Fisher's Exact Test					.012
N of Valid Cases			350		.009

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8.86.

b. Computed only for a 2x2 table

---

フロントページの続き

(72)発明者 ヨン・ミン・フ  
大韓民国・ソウル・137-930・ソチョ・グ・シンパンポ - 口・270・140 - 902

(72)発明者 スン・フン・ノ  
大韓民国・ソウル・158-755・ヤンチョン・グ・モクドンドン - 口・350・518 - 30  
6

(72)発明者 ジン・サック・ス  
大韓民国・ソウル・137-910・ソチョ・グ・ヒヨリヨン - 口・68 - ギル・81・102 -  
1002

(72)発明者 ジェ・ホ・チョン  
大韓民国・ソウル・135-280・ガンナム・グ・サムソン - 口・150・ミド・アパート・1  
03 - 808

(72)発明者 ウン・スン・パク  
大韓民国・ソウル・138-891・ソンバ・グ・ジャムシル - 口・62・333 - 2302

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表2010-508025(JP,A)  
特表2007-530017(JP,A)  
韓国公開特許第10-2012-0061010(KR,A)  
Clin. Cancer Res. (2008) Vol.14, No.18, pp.5833-5839  
Cancer Treatment Reviews (2010) Vol.36, pp.550-556  
BMC Cancer (2009) Vol.9:198, pp.1-16  
Journal of Translational Medicine (2011) Vol.9, No.119, pp.1-13

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 Q 1 / 68  
C 12 N 15 / 00  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / W P I X ( S T N  
)  
P u b M e d  
G o o g l e S c h o l a r