

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-516501

(P2017-516501A)

(43) 公表日 平成29年6月22日(2017.6.22)

| | | |
|--------------------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 4 B O 6 3 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁)

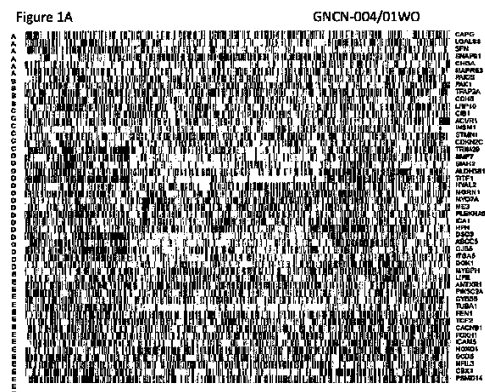
| | |
|---|--|
| (21) 出願番号 特願2017-515878 (P2017-515878) (86) (22) 出願日 平成27年6月1日 (2015.6.1) (85) 翻訳文提出日 平成29年1月27日 (2017.1.27) (86) 国際出願番号 PCT/US2015/033611 (87) 国際公開番号 W02015/184461 (87) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015.12.3) (31) 優先権主張番号 62/005, 229 (32) 優先日 平成26年5月30日 (2014.5.30) (33) 優先権主張国 米国 (US) | (71) 出願人 516357122 ジーンセントリック ダイアグノスティクス、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27701, ダーハム, エス. マンガム ストリート 280, スイート 350 (71) 出願人 514299550 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27517, チャペル ヒル, ヨーロッパ ドライブ 100, スイート 430 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 |
|---|--|

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺がんのタイピング法

(57) 【要約】

肺がん試料の分子サブタイピングのための方法および組成物が提供されている。具体的には、患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌（小細胞癌およびカルチノイドの両方を包含する）であるかどうかを評価する方法が、本明細書に提供されている。患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、またはカルチノイド肺がんであるかどうかを評価する方法も提供されている。本明細書に提供した方法は、患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで、表1～表6のクラシファイヤーバイオマーカーまたはこれらのサブセットのレベルをプローブすることを必要とする。クラシファイヤーバイオマーカーのレベルに基づいて、肺がん試料は、特定の肺がんサブタイプとして分類される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌（小細胞癌およびカルチノイドの両方を包含する）であるかどうかを評価する方法であって、

（a）該患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのレベルをプローブするステップであって、

（i）該試料を、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の該少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーの核酸分子の部分に実質的に相補的である 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドと、該 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドをこれらの相補体または実質的な相補体にハイブリダイズするのに適した条件下で混合すること；

（i i）ハイブリダイゼーションが、該 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドとこれらの相補体または実質的な相補体との間で起こるかどうかを検出すること；

（i i i）該検出するステップに基づいて該少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を得ることを含むステップと；

（b）該少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーの該ハイブリダイゼーション値を、少なくとも 1 つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値（複数可）と比較するステップであって、該少なくとも 1 つの試料訓練セットは、参照腺癌試料からのハイブリダイゼーション値、参照扁平上皮癌試料からのハイブリダイゼーション値、参照神経内分泌試料からのハイブリダイゼーション値、またはこれらの組合せを含む、ステップと；

該比較するステップの結果に基づいて該肺がん試料を腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌サブタイプとして分類するステップとを含む方法。

【請求項 2】

患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、またはカルチノイドであるかどうかを評価する方法であって、

（a）該患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのレベルをプローブするステップであって、

（i）該試料を、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の該少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーの核酸分子の部分に実質的に相補的である 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドと、該 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドをこれらの相補体または実質的な相補体にハイブリダイズするのに適した条件下で混合すること；

（i i）ハイブリダイゼーションが、該 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドとこれらの相補体または実質的な相補体との間で起こるかどうかを検出すること；

（i i i）該検出するステップに基づいて該少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を得ることを含むステップと；

（b）該少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーの該ハイブリダイゼーション値を、少なくとも 1 つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値（複数可）と比較するステップであって、該少なくとも 1 つの試料訓練セットは、参照腺癌試料からのハイブリダイゼーション値、参照扁平上皮癌試料からのハイブリダイゼーション値、参照小細胞癌試料からのハイブリダイゼーション値、参照カルチノイド試料からのハイブリダイゼーション値、またはこれらの組合せを含む、ステップと；

該比較するステップの結果に基づいて該肺がん試料を腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、またはカルチノイドサブタイプとして分類するステップと

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 3】

前記比較するステップが、前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカの前記ハイブリダイゼーション値と、前記参照ハイブリダイゼーション値との間の相関を決定することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記比較するステップが、前記少なくとも 5 種のバイオマーカの平均発現比を決定することと、該平均発現比を、前記試料訓練セットにおける前記参照値から得られる該少なくとも 5 種のバイオマーカの平均発現比と比較することとをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記プローブするステップが、前記混合するステップの前に前記核酸またはその部分を単離することを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ハイブリダイゼーションが、cDNA プローブを cDNA バイオマーカにハイブリダイズし、それによって非天然複合体を形成することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ハイブリダイゼーションが、cDNA プローブを mRNA バイオマーカにハイブリダイズし、それによって非天然複合体を形成することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記プローブするステップが、前記試料中の前記核酸を増幅することを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 1 A、表 1 B、または表 1 C の少なくとも 10 のバイオマーカ、少なくとも 20 のバイオマーカ、または少なくとも 30 のバイオマーカを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 2 の少なくとも 10 のバイオマーカ、少なくとも 20 のバイオマーカ、または少なくとも 30 のバイオマーカを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 3 の少なくとも 10 のバイオマーカ、少なくとも 20 のバイオマーカ、または少なくとも 30 のバイオマーカを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 4 の 6 つのバイオマーカを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 5 の 6 つのバイオマーカを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 6 の少なくとも 10 のバイオマーカ、少なくとも 20 のバイオマーカ、または少なくとも 30 のバイオマーカを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカが、表 1 A、表 1 B、または表 1 C の約 5 ~ 約 20 のクラシファイヤーバイオマーカ、約 10 ~ 約 30 のクラシファイヤーバイオマーカ、約 10 ~ 約 40 のクラシファイヤーバイオマーカ、または約 20

50

～約 40 クラシファイヤーバイオマーカーを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 2 の約 5 ～約 20 のクラシファイヤーバイオマーカー、約 10 ～約 30 のクラシファイヤーバイオマーカー、約 10 ～約 40 のクラシファイヤーバイオマーカー、または約 20 ～約 40 のクラシファイヤーバイオマーカーを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 3 の約 5 ～約 20 のクラシファイヤーバイオマーカー、約 10 ～約 30 のクラシファイヤーバイオマーカー、約 10 ～約 40 のクラシファイヤーバイオマーカー、または約 20 ～約 40 のクラシファイヤーバイオマーカーを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 6 の約 5 ～約 30 のクラシファイヤーバイオマーカー、約 10 ～約 30 のクラシファイヤーバイオマーカー、約 50 ～約 20 のクラシファイヤーバイオマーカー、または約 20 ～約 30 のクラシファイヤーバイオマーカーを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 1 A、表 1 B、または表 1 C に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 2 に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 3 に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 6 に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記試料が、パラフィンに包埋された肺細胞を含む、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記試料が、新鮮凍結試料である、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

肺組織試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織試料、新鮮および凍結組織試料から選択される、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 1 A に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 27】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 1 B に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 28】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 1 C に示したクラシファイヤーバイオマーカーのそれぞれを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 14 に示したクラシファイヤーバイオマーカーである、請求項 1 から 8 および 23 から 25 のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 30】

前記少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーが、表 15 に示したクラシファイヤーバイオマーカーである、請求項 1 から 8 および 23 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2014 年 5 月 30 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 005 , 229 号からの優先権を主張し、その全体が全ての目的について本明細書中に組み込まれる。

10

【0002】

配列表に関する陳述

本願と関連した配列表は、紙のコピーの代わりにテキストフォーマットで提供されており、本明細書に参照により組み込まれている。配列表を含有するテキストファイルの名称は、GNCN__004__01WO.txt である。テキストファイルは、17KB であり、2015 年 5 月 30 日に作成され、EFS-Web を介して電子的に提出されている。

【背景技術】

【0003】

肺がんは、米国におけるがん死の主要原因であり、220,000 を超える新しい肺がん症例が毎年同定されている。肺がんは、組織診断によって一般に決定されるサブタイプ（小細胞癌、非小細胞癌、カルチノイド、腺癌、および扁平上皮癌）を有する異種疾患である。肺がんの様々な形態的サブタイプの区別が患者管理の指導において重要であり、追加の分子検査が特異的な治療標的マーカーを同定するのに使用される。形態のばらつき、限られた組織試料、および治療的に標的とされるマーカーの、長くなる一方のリストの評価の必要性は、現在の診断基準にとっての難題となっている。組織学的診断再現性の試験は、同じ病理学者における合致および病理学者間の合致が限定的であることを示している。

20

【0004】

新しい療法が肺がんの特定のサブタイプにますます向けられている一方（ペバシズマブおよびペメトレキセド）、組織学的診断再現性の試験は、同じ病理学者における合致が限定的であること、および病理学者間ではさらに合致することが少ないことを示している。低分化型腫瘍、矛盾する免疫組織化学検査結果、およびほんの限られた数の染色しか実施することができない小体積生検は依然として、現在の診断基準にとっての難題である（Travis および Rekhtman, Sem Resp and Crit Care Med、2011 年；32 巻（1 号）：22～31 頁；Travis ら、Arch Pathol Lab Med、2013 年；137 巻（5 号）：668～84 頁；Tang ら、J Thorac Dis、2014 年；6 巻（S5 号）：S489～S501 頁）。

30

【0005】

TCGA 肺がんゲノムプロジェクトに提出された肺がん試料の専門的な病理学的再レビューを伴う最近の例では、提出された肺腫瘍の 15～20% が再分類されており、このことから、形態に基づく診断が難題であり続けていることが確認された。（Cancer Genome Atlas Research Network、「Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers.」、Nature、489 巻、7417 号（2012 年）：519～525 頁；Cancer Genome Atlas Research Network、Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma、Nature、511 巻、7511 号（2014 年）：543～550 頁、これらのそれぞれは、その全体が本明細書に参照により組み込まれている）。したがって、肺がんサブタイプを決定するためのより信頼できる手段の必要性が存在する。本発明は、この必要性および他の必要性に対処するものである。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】Travis および Rekhtman、Sem Resp and Crit Care Med、2011 年；32 巻（1 号）：22～31 頁

【非特許文献 2】Travis ら、Arch Pathol Lab Med、2013 年；137 巻（5 号）：668～84 頁

【非特許文献 3】Tang ら、J Thorac Dis、2014 年；6 巻（S5 号）：S489～S501 頁

【非特許文献 4】「Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers.」、Nature、489 巻、7417 号（2012 年）：519～525 頁

【非特許文献 5】Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma、Nature、511 巻、7511 号（2014 年）：543～550 頁 10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

一態様では、患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌（neuroendocrine）（小細胞癌およびカルチノイドの両方を包含する）であるかどうかを評価する方法。一実施形態では、本方法は、患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカー（classifier biomarker）のレベルをプローブすることを含む。プローブするステップは、一実施形態では、試料を、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーの核酸分子の部分に実質的に相補的である 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドと、これらの 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドをこれらの相補体または実質的な相補体にハイブリダイズするのに適した条件下で混合すること；ハイブリダイゼーションが、これらの 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドとこれらの相補体または実質的な相補体との間で起こるかどうかを検出すること；および検出するステップに基づいて少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を得ることを含む。次いで、少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を、少なくとも 1 つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値（複数可）と比較し、ここで、少なくとも 1 つの試料訓練セットは、参照腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌試料からのハイブリダイゼーション値を含む。比較するステップの結果に基づいて肺がん試料を腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌試料として分類する。 20 30

【 0 0 0 8 】

別の態様では、患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、またはカルチノイドであるかどうかを評価する方法が提供されている。一実施形態では、本方法は、患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのレベルをプローブすることを含む。プローブするステップは、一実施形態では、試料を、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、または表 6 の少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーの核酸分子（nucleic molecules）の部分に実質的に相補的である 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドと、これらの 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドをこれらの相補体または実質的な相補体にハイブリダイズするのに適した条件下で混合すること；ハイブリダイゼーションが、これらの 5 種またはそれ超のオリゴヌクレオチドとこれらの相補体または実質的な相補体との間で起こるかどうかを検出すること；および検出するステップに基づいて少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を得ることを含む。次いで、少なくとも 5 種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を、少なくとも 1 つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値（複数可）と比較し、ここで、少なくとも 1 つの試料訓練セットは、参照腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌またはカルチノイド試料からのハイブリダイゼーション値を含む。比較するステップの結果に基づいて肺がん試料を腺癌、扁平上皮癌 40 50

、小細胞癌、またはカルチノイドとして分類する。

【0009】

さらに別の態様では、患者の非小細胞肺癌（NSCLC）サブタイプが、腺癌または扁平上皮癌であるかどうかを評価する方法が提供されている。一実施形態では、本方法は、患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカのレベルをプローブすることを含む。プローブするステップは、一実施形態では、試料を、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカのcDNA分子の部分に実質的に相補的である5種またはそれ超のオリゴヌクレオチドと、これらの5種またはそれ超のオリゴヌクレオチドをこれらの相補体または実質的な相補体にハイブリダイズするのに適した条件下で混合すること；ハイブリダイゼーションが、これらの5種またはそれ超のオリゴヌクレオチドとこれらの相補体または実質的な相補体との間で起こるかどうかを検出すること；および検出するステップに基づいて少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカのハイブリダイゼーション値を得ることを含む。次いで、少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカのハイブリダイゼーション値を、少なくとも1つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値（複数可）と比較し、ここで、少なくとも1つの試料訓練セットは、参照腺癌および/または扁平上皮癌試料からのハイブリダイゼーション値を含む。比較するステップの結果に基づいてNSCLC試料を腺癌または扁平上皮癌として分類する。

10

【0010】

一実施形態では、比較するステップは、少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカのハイブリダイゼーション値と、参照ハイブリダイゼーション値との間の相関を決定することを含む。

20

【0011】

一実施形態では、プローブするステップは、混合するステップの前に核酸またはその部分を単離することを含む。さらなる実施形態では、ハイブリダイゼーションは、cDNAをcDNAにハイブリダイズし、それによって非天然複合体を形成すること、またはcDNAをmRNAにハイブリダイズし、それによって非天然複合体を形成することを含む。なおさらなる実施形態では、プローブするステップは、試料中の核酸を増幅することを含む。

30

【0012】

一実施形態では、少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカは、約5～約50、約10～約50、約15～約50、約20～約50、または約25～約50のバイオマーカを含む。別の実施形態では、少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカは、約5～約30、約10～約30、約15～約30、約20～約30のクラシファイヤーバイオマーカを含む。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1A～1Dは、腺癌（図1A）、扁平上皮癌（図1B）、小細胞癌（図1C）、およびカルチノイド（図1D）についての例示的な遺伝子発現ヒートマップを例示する。

40

【0014】

【図2】図2は、FFPE RT-PCR遺伝子発現データセットについての遺伝子発現階層的クラスタリングのヒートマップである。

【0015】

【図3】図3は、77のFFPE試料についての病理学的レビューおよびLSP予測の比較である。各矩形は、試料数によって並べられた単一試料を表す。矢印は、病理学的レビューおよび遺伝子発現の両方によって元の診断と合致しなかった6つの試料を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

50

本明細書で使用される場合、「発現プロファイル」は、弁別的遺伝子 (discriminative gene) の相対存在量、レベル、発現の存在または非存在の測定に対応する1つまたは複数の値を含む。発現プロファイルは、肺がんの診断の前もしくは後の被験体に由来するものであってもよく、処置もしくは療法の前もしくは後の1つもしくは複数の時点で被験体から収集される生体試料に由来するものであってもよく、処置もしくは療法がない (例えば、肺がんが診断され、もしくは肺がんのリスクにあると診断された被験体における疾患の進行をモニターするため、もしくは疾患の発生を評価するために) 間の1つもしくは複数の時点で被験体から収集される生体試料に由来するものであってもよく、または健康な被験体から収集してもよい。

【0017】

10

本明細書に提供するバイオマーカーパネルおよび方法は、様々な態様では、(i) 患者のNSCLCサブタイプが、腺癌もしくは扁平上皮癌であるかどうか、(ii) 患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、もしくは神経内分泌 (小細胞癌、およびカルチノイドの両方を包含する) であるかどうか、かつ/または (iii) 患者の肺がんサブタイプが、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、もしくはカルチノイドであるかどうかを評価するのに使用される。

【0018】

例えば、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、および表6に開示したバイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、様々な実施形態では、患者の肺がんサブタイプを評価および分類するのに使用される。一実施形態では、表14または表15のバイオマーカーパネルまたはそのサブセットが、患者の肺がんサブタイプを評価および分類するのに使用される。

20

【0019】

一般に、本明細書に提供する方法は、特定の肺がんサブタイプとして肺がん試料を分類するのに使用される。一実施形態では、本方法は、患者から得られる肺がん試料において、核酸レベルで表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーのレベルをプローブするステップを含む。プローブするステップは、一実施形態では、試料を、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーの核酸分子、例えば、cDNA分子またはmRNA分子の部分に実質的に相補的である5種またはそれ超のオリゴヌクレオチドと、これらの5種またはそれ超のオリゴヌクレオチドをこれらの相補体または実質的な相補体にハイブリダイズするのに適した条件下で混合すること; ハイブリダイゼーションが、これらの5種またはそれ超のオリゴヌクレオチドとこれらの相補体または実質的な相補体との間で起こるかどうかを検出すること; および検出するステップに基づいて少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を得ることを含む。次いで、少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を、少なくとも1つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値 (複数可) と比較する。例えば、少なくとも1つの試料訓練セットは、参照腺癌、扁平上皮癌、神経内分泌試料、小細胞癌試料からのハイブリダイゼーション値を含む。例えば、比較するステップの結果に基づいて肺がん試料を腺癌、扁平上皮癌、神経内分泌、または小細胞癌として分類する。

30

40

【0020】

肺組織試料は、ヒト被験体から単離される任意の試料であり得る。例えば、一実施形態では、分析は、パラフィンワックスに包埋された肺生検で実施される。本発明のこの態様は、小さい生検からでも主要な組織型を正確に同定することによって現在の診断を改善する手段を提供する。RT-PCR法を含む本発明の方法は、感度がよく、正確であり、パラフィン包埋試料を用いて使用するためのマルチアナライト能力を有する。例えば、参照により本明細書に組み込まれている、Croninら (2004年)、Am. J. Pathol., 164巻 (1号): 35~42頁を参照。

【0021】

50

ホルマリン固定およびパラフィンワックス中の組織包埋は、光学顕微鏡評価の前に組織を処理するためのユニバーサル手法である。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本によって与えられる主要な利点は、組織切片における細胞形態学的詳細および構造的形態学的詳細の保存である。(Foxら (1985年)、J Histochem Cytochem、33巻 : 845 ~ 853頁)。生検標本が処理される標準的な緩衝ホルマリン固定液は、典型的には、37%ホルムアルデヒドおよび10 ~ 15%メチルアルコールを含有する水溶液である。ホルムアルデヒドは、*in vitro*でタンパク質 - 核酸架橋およびタンパク質 - タンパク質架橋の形成をもたらす高度に反応性の双極性化合物である (Clarkら (1986年)、J Histochem Cytochem、34巻 : 1509 ~ 1512頁; McGheeおよびvon Hippel (1975年)、Biochemistry、14巻 : 1281 ~ 1296頁、それぞれ本明細書に参照により組み込まれている)。

【0022】

一実施形態では、本明細書で使用される試料は、個体から得られ、新鮮凍結パラフィン包埋 (FFPE) 組織を含む。しかし、他の組織および試料タイプも本明細書で使用するのに適用できる。

【0023】

FFPE組織からRNAを単離するための方法は、当技術分野で公知である。一実施形態では、トータルRNAは、参照により本明細書に組み込まれているBibikovaら (2004年)、American Journal of Pathology、165巻 : 1799 ~ 1807頁によって記載されているようにFFPE組織から単離することができる。同様に、High Pure RNA Paraffin Kit (Roche)を使用することができる。パラフィン抽出、その後のエタノール洗浄によって除去される。RNAは、DNase I処理ステップが含まれる、Master Pure Purification Kit (Epicenter、Madison、Wis.)を使用して、切片にされた組織ブロックから単離することができる。RNAは、供給業者の指示に従ってトリゾール試薬 (Invitrogen Life Technologies、Carlsbad、Calif.)を使用して凍結試料から抽出することができる。測定可能な残留するゲノムDNAを有する試料を、DNase I処理に再び付し、DNA混入についてアッセイすることができる。すべての精製、DNase処理、および他のステップは、製造者のプロトコールに従って実施され得る。トータルRNAを単離した後、試料を、使用するまで - 80 で貯蔵することができる。

【0024】

mRNA抽出のための一般的な方法は、当技術分野で周知であり、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、1987 ~ 1999年を含めた分子生物学の標準的な教科書に開示されている。パラフィン包埋組織からRNAを抽出するための方法は、例えば、RuppおよびLocker (Lab Invest.、56巻 : A67頁、1987年)ならびにDe Andresら (Biotechniques、18巻 : 42 ~ 44頁、1995年)に開示されている。特に、RNA単離は、製造者の指示に従って、Qiagen (Valencia、Calif.)などの商業的製造者製の精製キット、バッファセット、およびプロテアーゼを使用して実施され得る。例えば、培養物中の細胞由来するトータルRNAは、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離することができる。他の市販のRNA単離キットとしては、Master Pure (商標) Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre、Madison、Wis.)およびParaffin Block RNA Isolation Kit (Ambion、Austin、Tex.)が挙げられる。組織試料からのトータルRNAは、例えば、RNA Stat-60 (Tel-Test、Friendswood、Tex.)を使用して単離することができる。腫瘍から調製される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。さらに、多数の組織試料を、例えば、Chomczynskiの単一ステップRNA単離プロセス (米国特許第4,843,155号、すべての目的に関してその全体が参照により組

10

20

30

40

50

み込まれている)などの当業者に周知の技法を使用して容易に処理することができる。

【0025】

一実施形態では、試料は、肺組織試料、例えば、腺癌試料から回収される細胞を含む。細胞は、当技術分野で公知の標準技法を使用して生体試料から回収され得る。例えば、一実施形態では、細胞は、細胞試料を遠心分離し、ペレット化された細胞を再懸濁することによって回収される。細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの緩衝液中に再懸濁することができる。細胞懸濁液を遠心分離して細胞ペレットを得た後、細胞を溶解させて、核酸、例えば、メッセンジャーRNAを抽出することができる。任意の種類のさらなる処理に付されたものを含めて、被験体から得られるすべての試料は、被験体から得られていると見なされる。

10

【0026】

試料は、一実施形態では、本明細書に示したバイオマーカーの組合せのバイオマーカーレベルを検出する前にさらに処理される。例えば、細胞試料または組織試料中のmRNAは、試料の他の成分から分離され得る。試料を濃縮および/または精製してmRNAをその非天然状態で単離することができ、その理由は、mRNAは、その天然環境にないためである。例えば、研究により、in vivoでのmRNAの高次構造は、同じ配列のin vitro構造と異なることが示されている(例えば、すべての目的に関してその全体が本明細書に組み込まれている、Rouskinら(2014年)、Nature、505巻、701~705頁を参照)。

【0027】

20

試料に由来するmRNAは、一実施形態では、合成DNAプローブにハイブリダイズされ、このプローブは、一部の実施形態では、検出部分(例えば、検出可能標識、捕捉配列、バーコード報告配列)を含む。したがって、これらの実施形態では、非天然mRNA-cDNA複合体が、バイオマーカーを検出するために最終的に作製および使用される。別の実施形態では、試料に由来するmRNAは、検出可能標識、例えば、フルオロフォアで直接標識される。さらなる実施形態では、非天然標識mRNA分子は、cDNAプローブにハイブリダイズされ、複合体が検出される。

【0028】

一実施形態では、mRNAが試料から得られると、それは、ハイブリダイゼーション反応において相補的DNA(cDNA)に変換され、または1種または複数種のcDNAプローブと一緒にハイブリダイゼーション反応において使用される。cDNAは、in vivoで存在せず、したがって、非天然分子である。さらに、cDNA-mRNAハイブリッドは、合成のものであり、in vivoで存在しない。cDNAがin vivoで存在しないことに加えて、cDNAは、mRNAと必然的に異なり、その理由は、それがデオキシリボ核酸を含み、リボ核酸を含まないためである。次いでcDNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または当業者に公知の他の増幅法によって増幅される。例えば、採用され得る他の増幅法としては、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれているリガーゼ連鎖反応(LCR)(すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、WuおよびWallace、Genomics、4巻:560頁(1989年)、Landegrenら、Science、241巻:1077頁(1988年))、転写増幅(すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻:1173頁(1989年))、自己持続配列複製(すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Guatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻:1874頁(1990年))、ならびに核酸ベース配列増幅(NASBA)が挙げられる。PCR増幅のためのプライマーを選択するためのガイドラインは、当業者に公知である。例えば、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、McPhersonら、PCR Basics: From Background to Bench、Springer-Verlag、2000年を参照。この増幅反応の産物、すなわち、増幅されたcDNAは、必然的に非天然産物である。第1に、上述したように、cDNAは、非天然分子である。第2に、PCRの場合では、増幅プロセスは、出発材料のあらゆる個々のcDNA分子について数億のc

30

40

50

DNAコピーを作り出す機能を果たす。生成されるコピーの数は、*in vivo*で存在するmRNAのコピーの数からはるかにかけ離れている。

【0029】

一実施形態では、cDNAは、断片に追加のDNA配列（例えば、アダプター、レポーター、捕捉配列もしくは部分、バーコード）を導入するプライマーで増幅され（例えば、アダプター特異的プライマーを使用して）、またはmRNAもしくはcDNAバイオマーカ配列は、追加の配列（例えば、アダプター、レポーター、捕捉配列もしくは部分、バーコード）を含むcDNAプローブに直接ハイブリダイズされる。したがって、増幅および/またはmRNAのcDNAプローブへのハイブリダイゼーションは、追加の配列を導入し、非天然ハイブリッドを形成することによって、非天然一本鎖cDNA、またはmRNAから非天然二本鎖分子を作り出す機能を果たす。さらに、当業者に公知であるように、増幅手順は、これらと関連した誤り率を有する。したがって、増幅により、cDNA分子にさらなる修飾が導入される。一実施形態では、アダプター特異的プライマーを用いた増幅中に、検出可能標識、例えば、フルオロフォアが一本鎖cDNA分子に付加される。したがって、増幅はまた、少なくとも(i) cDNAは、*in vivo*で存在しないこと、(i) アダプター配列がcDNA分子の両端に付加されて、*in vivo*で存在しないDNA配列が作製されること、(ii) 増幅と関連した誤り率により、*in vivo*で存在しないDNA配列がさらに作り出されること、(iii) 自然において存在するものと比較した場合のcDNA分子の異種構造、および(iv) cDNA分子への検出可能標識の化学的付加のために、自然において存在しないDNA複合体を作り出す機能を果たす。

10

20

【0030】

一実施形態では、目的のバイオマーカの発現は、非天然cDNA分子の検出を介して核酸レベルで検出される。

【0031】

一実施形態では、肺がんサブタイピングのための方法は、クラシファイヤーバイオマーカセットの発現レベルを検出することを含む。一実施形態では、検出することは、核酸レベルでの表1A、1B、もしくは1C、表2、表3、表4、表5、または表6のクラシファイヤーバイオマーカのすべてを含む。別の実施形態では、表1A、1B、または1Cのクラシファイヤーバイオマーカのサブセットが、例えば、約5～約20についてプローブされる。一実施形態では、プローブされるバイオマーカのサブセットは、表1A、1B、もしくは1C、表2、表3、表4、表5、または表6のクラシファイヤーバイオマーカのうちの約5～約50、約5～約40、約5～約30、または約5～約25を含む。別の実施形態では、プローブされるバイオマーカのサブセットは、表1A、1B、もしくは1C、表2、表3、表4、表5、または表6のクラシファイヤーバイオマーカのうちの約10～約50、約10～約40、約10～約30、または約10～約25を含む。さらに別の実施形態では、プローブされるバイオマーカのサブセットは、表1A、1B、もしくは1C、表2、表3、表4、表5、または表6のクラシファイヤーバイオマーカのうちの5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を含む。なお別の実施形態では、プローブされるバイオマーカのサブセットは、表1A、1B、もしくは1C、表2、表3、表4、表5、または表6のクラシファイヤーバイオマーカのうちの少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、または少なくとも約50を含む。プローブされるバイオマーカ数は、本明細書に提供する方法で最初に使用されるオリゴヌクレオチドの数を指示することが理解されるべきである。例えば、表1A、1B、もしくは1C、表2、表3、表4、表5、または表6のバイオマーカのうちの5または10がプローブされる場合、それぞれ5オリゴヌクレオチドまたは10オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドをバイオマーカまたはこれらの断片にハイブリダイズするのに適した条件下で試料と混合される。

30

40

50

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、および表 6 のいずれかにおけるバイオマーカーのうちの約 5 ～約 1 0、約 5 ～約 1 5、約 5 ～約 2 0、約 5 ～約 2 5、約 5 ～約 3 0、約 5 ～約 3 5、約 5 ～約 4 0、約 5 ～約 4 5、約 5 ～約 5 0 が、肺がんサブタイプを決定する方法においてプローブされる。別の実施形態では、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5 のうちのいずれか 1 つからの、または表 6 からのバイオマーカーのそれぞれが、患者の肺がん試料の肺がんサブタイプを決定する方法においてプローブされる。

【 0 0 3 3 】

検出することは、それだけに限らないが、RNA-seq、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ、または別のハイブリダイゼーションアッセイ、例えば、クラシファイヤーバイオマーカーに特異的なプライマーおよび/もしくはプローブを用いた、例えば、NanoStringアッセイなどを含めた任意の適当な技法によって実施することができる。表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 2、表 3、表 4、表 5、および表 6 に提供されたプライマーは、単に例示的な目的のためであり、本発明を限定すると解釈されるべきでないことが留意されるべきである。

【 0 0 3 4 】

本明細書に記載のバイオマーカーは、目的の核酸配列、または逆転写反応において *in vitro* で合成的に得られるこれらの非天然 cDNA 産物のいずれかの全配列または部分配列を含む RNA を含む。用語「断片」は、一般に、少なくとも 1 0、1 5、2 0、5 0、7 5、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、3 0 0、3 5 0、4 0 0、4 5 0、5 0 0、5 5 0、6 0 0、6 5 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1, 0 0 0、1, 2 0 0、もしくは 1, 5 0 0 の連続したヌクレオチド、または最大で、本明細書に開示の全長バイオマーカーポリヌクレオチド中に存在するヌクレオチドの数を含むポリヌクレオチドの部分を指すように意図されている。バイオマーカーポリヌクレオチドの断片は、一般に、少なくとも 1 5、2 5、3 0、5 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、もしくは 2 5 0 の連続したアミノ酸、または最大で、本発明の全長バイオマーカータンパク質中に存在するアミノ酸の総数をコードする。

【 0 0 3 5 】

一部の実施形態では、RNA 転写物またはその発現産物などの過剰発現は、試料中のすべての測定される転写物 (もしくはこれらの産物) であり得る参照 RNA 転写物もしくはこれらの発現産物、または RNA 転写物 (もしくはこれらの非天然 cDNA 産物) の特定の参照セットのレベルに正規化することによって決定される。正規化は、アッセイされる RNA または cDNA の量、および使用される RNA または cDNA の品質のばらつきの両方の差異を補正し、または正規化するために実施される。したがって、アッセイは、典型的には、周知のハウスキーピング遺伝子、例えば、GAPDH および/または β -アクチンなどを含めたある特定の正規化遺伝子の発現を測定し、組み込む。代わりに、正規化は、アッセイされるバイオマーカーのすべて、またはその大きいサブセットの平均シグナルまたは中央値シグナルに基づくことができる (グローバル正規化手法)。

10

20

30

【表 1 A - 1】

| 表 1A | | | | | |
|--------|--|----------------------------|------|------------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CDH5 | カドヘリン 5、タイプ 2、VE-カドヘリン (血管上皮) | AAGAGAGATTG GATTTGGAACC | 1 | TTCTTGCGACTCACGCT | 58 |
| CLEC3B | C 型レクチンドメインファミリー3、メンバー B | CCAGAAGCCCA AGAAGATTGTA | 2 | GCTCCTCAAACAT CTTTGTGTTCA | 59 |
| PAICS | ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼ、 ホスホリボシルアミノイミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素 | AATCCTGGTGT CAAGGAAG | 3 | GACCACTGTGGG TCATTATT | 60 |
| PAK1 | p21/Cdc42/Rac1- 活性化キナーゼ 1(STE20 相同体、酵母) | GGACCGATTTT ACCGATCC | 4 | GAAATCTCTGGC CGCTC | 61 |
| PECAM1 | 血小板/内皮細胞接着分子(CD31 抗原) | ACAGTCCAGAT AGTCGTATGT | 5 | ACTGGGCATCAT AAGAAATCC | 62 |
| TFAP2A | 転写因子 AP-2 アルファ (活性化エンハンサー結合タンパク質 2 アルファ) | GTCTCCGCCATC CCTAT | 6 | ACTGAACAGAAG ACTTCGT | 63 |
| ACVR1 | アクチビン A 受容体、1 型 | ACTGGTGTAAC AGGAACAT | 7 | AACCTCCAAGTG GAAATTCT | 64 |
| CDKN2C | サイクリン依存性キナーゼインヒビター 2C(p18、CDK4 を阻害する) | TTTGGAAGGAC TGCGCT | 8 | TCGGTCTTTCAA TCGGGATTA | 65 |
| CIB1 | カルシウムおよびインテグリン結合 1(カルミリン) | CACGTCATCTCC CGTTC | 9 | CTGCTGTACAG GACAAT | 66 66 |
| INSM1 | インスリノーマ関連 1 | ATTGAACTTCCC ACACGA | 10 | AAGGTAAAGCCA GACTCCA | 67 67 |

10

20

30

40

【表 1 A - 2】

| 表 1A | | | | | |
|---------|---|-----------------------------|----------|------------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列 番号 | 逆方向プライマー | 配列 番号 |
| LRP10 | 低密度リポタンパク質 受容体関連タンパク質 10 | GGAACAGACTG TCACCAT | 11 | GGGAGCGTAGGG TTAAG | 68 |
| STMN1 | スタスミン 1/腫瘍性タ ンパク質 18 | TCAGAGTGTGTG G TCAGGC | 12 | CAGTGTATTCTGC ACAATCAAC | 69 |
| CAPG | キャッピングタンパク 質(アクチンフィラメン ト)、ゲルゾリン様 | GGGACAGCTTC AACACT | 13 | GTTCCAGGATGTT GGACTTTC | 70 |
| CHGA | クロモグラニン A(副甲 状腺分泌タンパク質 1) | CCTGTGAACAG CCCTATG | 14 | GGAAAGTGTGTC GGAGAT | 71 |
| LGALS3 | レクチン、ガラクトシ ド結合、可溶性 3(ガレ クチン 3) | TTCTGGGCACG GTGAAG | 15 | AGGCAACATCAT TCCCTC | 72 |
| MAPRE3 | 微小管関連タンパク 質、RP/EB ファミリ ー、メンバー3 | GGCCAAACTAG AGCACGAATA | 16 | GTCAACACCCAT CTTCTTGAAA | 73 |
| SFN | ストラティフィン | TCAGCAAGAAG GAGATGCC | 17 | CGTAGTGGAAGA CGGAAA | 74 |
| SNAP91 | シナプトソーム-関連タ ンパク質、91kDa 相同 体(マウス) | GTGCTCCCTCTC CATTAAGTA | 18 | CTGGTGTAGAATT AGGAGACGTA | 75 |
| ABCC5 | ATP-結合カセット、サ ブファミリー C(CFTR/MRP)、メンバ ー5 | CAAGTTCAGGA GAACTCGAC | 19 | GGCATCAAGAGA GAGGC | 76 |
| ALDH3B1 | アルデヒドデヒドロゲ ナーゼ 3 ファミリー、 メンバーB1 | GGCTGTGGTTA TGCGATAG | 20 | GATAAAGAGTTA CAAGCTCCTCTG | 77 |
| ANTXR1 | 炭疽毒素受容体 1 | ACCCGAGGAAC AACCTTA | 21 | TCTAGGCCTTGAC GGAT | 78 |
| BMP7 | 骨形態形成タンパク質 7(骨形成タンパク質 1) | CCCTCTCCATTCC CTACA | 22 | TTTGGGCAAACCTCGGTA A | 79 |
| CACNB1 | カルシウムチャネル、 電位依存性、ベータ 1 サブユニット | CAGAGCGCCAG GCATTA | 23 | GCACAGCAAATG CCACT | 80 |

10

20

30

40

【表 1 A - 3】

| 表 1A | | | | | |
|-------|-------------------------------------|--------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CBX1 | クロモボックス相同体 1(HP1 ベータ相同体 Drosophila) | CCACTGGCTGA GGTGTA | 24 | CTTGICTTTCCCT ACTGTCTTAC | 81 |
| CYB5B | シトクロム b5 B 型(ミトコンドリア外膜) | TGGGCGAGTCT ACGATG | 25 | CTTGTTCCAGCAG AACCT | 82 |
| DOK1 | ドッキングタンパク質 1、62kDa(チロシンキナーゼ 1 の下流) | CTTTCTGCCCTG GAGATG | 26 | CAGTCCTCTGCAC CGTTA | 83 |
| DSC3 | デスモコリン 3 | GCGCCATTGCT AGAGATA | 27 | CATCCAGATCCCT CACAT | 84 |
| FEN1 | フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1 | AGAGAAGATGG GCAGAAAG | 28 | CCAAGACACAGC CAGTAAT | 85 |
| FOXH1 | フォークヘッドボックス H1 | GCCCAGATCAT CCGTCA | 29 | TTTCCAGCCCTCG TAGTC | 86 |
| GJB5 | ギャップジャンクションタンパク質、ベータ 5(コネクシン 31.1) | ACCACAAGGAC TTCGAC | 30 | GGGACACAGGGA AGAAC | 87 |
| HOXD1 | ホメオボックス D1 | GCTCCGCTGCT ATCTTT | 31 | GTCTGCCACTCTG CAAC | 88 |
| HPN | ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン 1) | AGCGGCCAGGT GGATTA | 32 | GTCGGCTGACGC TTTGA | 89 |
| HYAL2 | ヒアルロノグルコサミニダーゼ 2 | ATGGGCTTTGG GAGCATA | 33 | GAACAAGTCAGT CTAGGGAATAC | 90 |
| ICA1 | 島細胞自己抗原 1、69kDa | GACCTGGATGC CAAGCTA | 34 | TGCTTTTCGATAAG TCCAGACA | 91 |
| ICAM5 | 細胞間接着分子 5、テレノセファリン | CCGGCTCTTGG AAGTTG | 35 | CCTCTGAGGCTG GAAACA | 92 |
| ITGA6 | インテグリン、アルファ 6 | ACGCGGATCGA GTTTGATAA | 36 | ATCCACTGATCTT CCTTGC | 93 |
| LIPE | リパーゼ、ホルモン感受性 | CGCAAGTCCCA GAAGAT | 37 | CAGTGCTGCTTCA GACACA | 94 |
| ME3 | リンゴ酸酵素 3、NADP(+)依存性、ミト | CGCGGATACGA TGTCAC | 38 | CCTTTCTTCAAGG GTAAAGGC | 95 |

10

20

30

40

【表 1 A - 4】

| 表 1A | | | | | |
|---------|---|----------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列 番号 | 逆方向プライマー | 配列 番号 |
| | コンドリア | | | | |
| MGRN1 | マホグニン (mahogunin)、リング フィンガー1 | GAATCTGGCCT ATCGCT | 39 | TCGAATTTCTCTC CTCCCAT | 96 |
| MYBPH | ミオシン結合タンパク 質 H | TCTGACCTCATC ATCGGCAA | 40 | CTGAGTCCACAC AGGTTT | 97 |
| MYO7A | ミオシン VIIA | GAGGTGAAGCA AACTACGGA | 41 | CCCATACTTGTTG ATGGCAATTA | 98 |
| NFIL3 | 核因子、インターロイ キン 3 調節 | ACTCTCCACAA AGCTCG | 42 | TCCTGCGTGTGTT CTACT | 99 |
| PIK3C2A | ホスホイノシチド-3-キ ナーゼ、クラス 2、アル ファポリペプチド | GGATTTCAGCT ACCAGTACTT | 43 | AGTCATCATGTAC CCAGCA | 100 |
| PLEKHA6 | プレクストリン相同性 ドメイン含有、ファミ リーAメンバー6 | TTCGTCCTGGTG GATCG | 44 | CCCAGGATACTCT CTTCCTT | 101 |
| PSMD14 | プロテアソーム(プロソ ーム、マクロパイン)26S サブユニット、非 ATPase、14 | AGTGATTGATG TGTTTGCTATG | 45 | CACTGGATCAAC TGCCTC | 102 |
| SCD5 | ステアロイル-CoA デサ チュラーゼ 5 | CAAAGCCAAGC CACTCACTC | 46 | CAGCTGTCACAC CCAGAGC | 103 |
| SIAH2 | seven in absentia homolog 2 (Drosophila) | CTCGGCAGTCC TGTTTC | 47 | CGTATGGTGCAG GGTCA | 104 |
| TCF2 | 転写因子 2、肝臓 LFB3; バリエーション肝臓核因 子 | ACACCTGGTAC GTCAGAA | 48 | TCTGGACTGTCTG GTTGAAT | 105 |
| TCP1 | t-複合体 1 | ATGCCCAAGAG AATCGTAAA | 49 | CCTGTACACCAA GCTTCAT | 106 |
| TTF1 | 甲状腺転写因子 1 | ATGAGTCCAAA GCACACGA | 50 | CCATGCCCACTTT CTTGTA | 107 |

10

20

30

40

【表 1 A - 5】

| 表 1A | | | | | |
|--------|------------------------|----------------------------|------|---------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| TRIM29 | トリパータイトモチーフ含有 29 | TGAGATTGAGG ATGAAGCTGAG | 51 | CATTGGTGGTGA AGCTCTTG | 108 |
| TUBA1 | チューブリン、アルファ 1 | CCGACTCAACG TGAGAC | 52 | CGTGGACTGAGA TGCATT | 109 |
| CFL1 | コフィリン 1(非筋肉) | GTGCCCTCTCCT TTTCG | 53 | TTCATGTCGTTGA ACACCTTG | 110 |
| EEF1A1 | 真核生物翻訳伸長因子 1 アルファ 1 | CGTTCTTTTCG CAACGG | 54 | CATTTTGGCTTTT AGGGGTAG | 111 |
| RPL10 | リボソームタンパク質 L10 | GGTGTGCCACT GAAGAT | 55 | GGCAGAAGCGAG ACTTT | 112 |
| RPL28 | リボソームタンパク質 L28 | GTGTCGTGGTG GTCATT | 56 | GCACATAGGAGG TGGCA | 113 |
| RPL37A | リボソームタンパク質 L37a | GCATGAAGACA GTGGCT | 57 | GCGGACTTTACC GTGAC | 114 |

10

20

【表 1 B - 1】

| 表 1B | | | | | |
|--------|--|----------------------------|------|-----------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CDH5 | カドヘリン 5、2 型、 VE-カドヘリン (血管上皮) | AAGAGAGATTG GATTTGGAACC | 1 | TTCTTGCGACTCACGCT | 58 |
| CLEC3B | C 型レクチンドメイン ファミリー3、メンバー B | CCAGAAGCCCA AGAAGATTGTA | 2 | GCTCCTCAAACAT CTTTGTGTTC | 59 |
| PAICS | ホスホリボシルアミノ イミダゾールカルボキ シラーゼ、 ホスホリボシルアミノ イミダゾールスクシノ カルボキサミド合成酵 素 | AATCCTGGTGT CAAGGAAG | 3 | GACCACTGTGGG TCATTATT | 60 |
| PAK1 | p21/Cdc42/Rac1- 活性化 キナーゼ 1(STE20 相同 体、酵母) | GGACCGATTTT ACCGATCC | 4 | GAAATCTCTGGC CGCTC | 61 |
| PECAM1 | 血小板/内皮細胞接着分 子(CD31 抗原) | ACAGTCCAGAT AGTCGTATGT | 5 | ACTGGGCATCAT AAGAAATCC | 62 |
| TFAP2A | 転写因子 AP-2 アルファ (活性化エンハンサー結 合タンパク質 2 アルフ ア) | GTCTCCGCCATC CCTAT | 6 | ACTGAACAGAAG ACTTCGT | 63 |
| ACVR1 | アクチビン A 受容体、1 型 | ACTGGTGTAAAC AGGAACAT | 7 | AACCTCCAAGTG GAAATTCT | 64 |
| CDKN2C | サイクリン依存性キナ ーゼインヒビター 2C(p18、CDK4 を阻害す る) | TTTGAAGGAC TGCGCT | 8 | TCGGTCTTTCAAA TCGGGATTA | 65 |
| CIB1 | カルシウムおよびイン テグリン結合 1(カルミ リン) | CACGTCATCTCC CGTTC | 9 | CTGCTGTCACAG GACAAT | 66 66 |
| INSM1 | インスリノーマ関連 1 | ATTGAACTTCCC ACACGA | 10 | AAGGTAAAGCCA GACTCCA | 67 67 |
| LRP10 | 低密度リポタンパク質 受容体関連タンパク質 | GGAACAGACTG TCACCAT | 11 | GGGAGCGTAGGG TTAAG | 68 |

10

20

30

40

【表 1 B - 2】

| 表 1B | | | | | |
|---------|--------------------------------------|-----------------------------|------|------------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| | 10 | | | | |
| STMN1 | スタスミン 1/腫瘍性タンパク質 18 | TCAGAGTGTGTG G TCAGGC | 12 | CAGTGTATTCTGC ACAATCAAC | 69 |
| CAPG | キャッピングタンパク質(アクチンフィラメント)、ゲルゾリン様 | GGGACAGCTTC AACACT | 13 | GTTCCAGGATGTT GGACTTTC | 70 |
| CHGA | クロモグラニン A(副甲状腺分泌タンパク質 1) | CCTGTGAACAG CCCTATG | 14 | GGAAAGTGTGTC GGAGAT | 71 |
| LGALS3 | レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3(ガレクチン 3) | TTCTGGGCACG GTGAAG | 15 | AGGCAACATCAT TCCCTC | 72 |
| MAPRE3 | 微小管関連タンパク質、RP/EB ファミリー、メンバー3 | GGCCAAACTAG AGCACGAATA | 16 | GTCAACACCCAT CTTCTTGAAA | 73 |
| SFN | ストラティフィン | TCAGCAAGAAG GAGATGCC | 17 | CGTAGTGGAAGA CGGAAA | 74 |
| SNAP91 | シナプトソーム関連タンパク質、91kDa 相同体(マウス) | GTGCTCCCTCTC CATTAAGTA | 18 | CTGGTGTAGAATT AGGAGACGTA | 75 |
| ABCC5 | ATP 結合カセット、サブファミリー C(CFTR/MRP)、メンバー5 | CAAGTTCAGGA GAACTCGAC | 19 | GGCATCAAGAGA GAGGC | 76 |
| ALDH3B1 | アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリー、メンバーB1 | GGCTGTGGTTA TGCGATAG | 20 | GATAAAGAGTTA CAAGCTCCTCTG | 77 |
| ANTXR1 | 炭疽毒素受容体 1 | ACCCGAGGAAC AACCTTA | 21 | TCTAGGCCTTGAC GGAT | 78 |
| CACNB1 | カルシウムチャネル、電位依存性、ベータ 1 サブユニット | CAGAGCGCCAG GCATTA | 23 | GCACAGCAAATG CCACT | 80 |
| CBX1 | クロモボックス相同体 1(HP1 ベータ相同体 Drosophila) | CCACTGGCTGA GGTGTTA | 24 | CTTGICTTTCCCT ACTGTCTTAC | 81 |

10

20

30

40

【表 1 B - 3】

| 表 1B | | | | | |
|-------|------------------------------------|--------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CYB5B | シトクロム b5 B 型(ミトコンドリア外膜) | TGGGCGAGTCT ACGATG | 25 | CTTGTTCAGCAG AACCT | 82 |
| DOK1 | ドッキングタンパク質 1、62kDa(チロシンキナーゼ 1 の下流) | CTTCTGCCCTG GAGATG | 26 | CAGTCCTCTGCAC CGTGA | 83 |
| DSC3 | デスモコリン 3 | GCGCCATTGCT AGAGATA | 27 | CATCCAGATCCCT CACAT | 84 |
| FEN1 | フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1 | AGAGAAGATGG GCAGAAAG | 28 | CCAAGACACAGC CAGTAAT | 85 |
| FOXH1 | フォークヘッドボックス H1 | GCCCAGATCAT CCGTCA | 29 | TTCCAGCCCTCG TAGTC | 86 |
| GJB5 | ギャップジャンクションタンパク質、ベータ 5(コネキシン 31.1) | ACCACAAGGAC TTCGAC | 30 | GGGACACAGGGA AGAAC | 87 |
| HOXD1 | ホメオボックス D1 | GCTCCGCTGCT ATCTTT | 31 | GTCTGCCACTCTG CAAC | 88 |
| HPN | ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン 1) | AGCGGCCAGGT GGATTA | 32 | GTCGGCTGACGC TTTGA | 89 |
| HYAL2 | ヒアルロノグルコサミニダーゼ 2 | ATGGGCTTTGG GAGCATA | 33 | GAACAAGTCAGT CTAGGGAATAC | 90 |
| ICA1 | 島細胞自己抗原 1、69kDa | GACCTGGATGC CAAGCTA | 34 | TGCTTTCGATAAG TCCAGACA | 91 |
| ICAM5 | 細胞間接着分子 5、テレノセファリン | CCGGCTCTTGG AAGTTG | 35 | CCTCTGAGGCTG GAAACA | 92 |
| ITGA6 | インテグリン、アルファ 6 | ACGCGGATCGA GTTTGATAA | 36 | ATCCACTGATCTT CCTTGC | 93 |
| LIPE | リパーゼ、ホルモン感受性 | CGCAAGTCCCA GAAGAT | 37 | CAGTGCTGCTTCA GACACA | 94 |
| ME3 | リンゴ酸酵素 3、NADP(+)依存性、ミトコンドリア | CGCGGATACGA TGTCAC | 38 | CCTTCTTCAAGG GTAAAGGC | 95 |
| MGRN1 | マホグニン、リングフィンガー 1 | GAACCTCGGCCT ATCGCT | 39 | TCGAATTTCTCTC CTCCCAT | 96 |
| MYBPH | ミオシン結合タンパク | TCTGACCTCATC | 40 | CTGAGTCCACAC | 97 |

10

20

30

40

【表 1 B - 4】

| 表 1B | | | | | |
|---------|---|----------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| | 質 H | ATCGGCAA | | AGGTTT | |
| MYO7A | ミオシン VIIA | GAGGTGAAGCA AACTACGGA | 41 | CCCATACTTGTTG ATGGCAATTA | 98 |
| NFIL3 | 核因子、インターロイキン 3 調節 | ACTCTCCACAA AGCTCG | 42 | TCCTGCGTGTGTT CTACT | 99 |
| PIK3C2A | ホスホイノシチド-3-キナーゼ、クラス 2、アルファポリペプチド | GGATTTCAGCT ACCAGTTACTT | 43 | AGTCATCATGTAC CCAGCA | 100 |
| PLEKHA6 | プレクストリン相同性ドメイン含有、ファミリーAメンバー6 | TTCGTCCTGGTG GATCG | 44 | CCCAGGATACTCT CTTCCTT | 101 |
| PSMD14 | プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン)26Sサブユニット、非ATPase、14 | AGTGATTGATG TGTTTGCTATG | 45 | CACTGGATCAAC TGCCCTC | 102 |
| SCD5 | ステアロイル-CoA デサチュラーゼ 5 | CAAAGCCAAGC CACTCACTC | 46 | CAGCTGTCACAC CCAGAGC | 103 |
| SIAH2 | seven in absentia homolog 2(Drosophila) | CTCGGCAGTCC TGTTTC | 47 | CGTATGGTGCAG GGTCA | 104 |
| TCF2 | 転写因子 2、肝臓;LF-B3;バリエント肝臓核因子 | ACACCTGGTAC GTCAGAA | 48 | TCTGGACTGTCTG GTTGAAT | 105 |
| TCP1 | t-複合体 1 | ATGCCCAAGAG AATCGTAAA | 49 | CCTGTACACCAA GCTTCAT | 106 |
| TTF1 | 甲状腺転写因子 1 | ATGAGTCCAAA GCACACGA | 50 | CCATGCCCACTTT CTTGTA | 107 |
| TRIM29 | トリパートタイトモチーフ含有 29 | TGAGATTGAGG ATGAAGCTGAG | 51 | CATTGGTGGTGA AGCTCTTG | 108 |
| TUBA1 | チューブリン、アルファ 1 | CCGACTCAACG TGAGAC | 52 | CGTGGACTGAGA TGCATT | 109 |
| CFL1 | コフィリン 1(非筋肉) | GTGCCCTCTCCT TTTCG | 53 | TTCATGTCGTTGA ACACCTTG | 110 |

10

20

30

40

【表 1 B - 5】

| 表 1B | | | | | |
|--------|------------------------|------------------------|----------|---------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列 番号 | 逆方向プライマー | 配列 番号 |
| EEF1A1 | 真核生物翻訳伸長因子 1 アルファ 1 | CGTTCCTTTTCG CAACGG | 54 | CATTTTGGCTTTT AGGGGTAG | 111 |
| RPL10 | リボソームタンパク質 L10 | GGTGTGCCACT GAAGAT | 55 | GGCAGAAGCGAG ACTTT | 112 |
| RPL28 | リボソームタンパク質 L28 | GTGTCGTGGTG GTCATT | 56 | GCACATAGGAGG TGGCA | 113 |
| RPL37A | リボソームタンパク質 L37a | GCATGAAGACA GTGGCT | 57 | GCGGACTTTACC GTGAC | 114 |

【表 1 C - 1】

| 表 1C | | | | | |
|--------|--|----------------------------|------|-----------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CDH5 | カドヘリン 5、2 型、 VE-カドヘリン(血管上皮) | AAGAGAGATTG GATTTGGAACC | 1 | TTCTTGCGACTCACGCT | 58 |
| CLEC3B | C 型レクチンドメイン ファミリー3、メンバー B | CCAGAAGCCCA AGAAGATTGTA | 2 | GCTCCTCAAACAT CTTTGTGTTC | 59 |
| PAICS | ホスホリボシルアミノ イミダゾールカルボキ シラーゼ、 ホスホリボシルアミノ イミダゾールスクシノ カルボキサミド合成酵 素 | AATCCTGGTGT CAAGGAAG | 3 | GACCACTGTGGG TCATTATT | 60 |
| PAK1 | p21/Cdc42/Rac1- 活性化 キナーゼ 1(STE20 相同 体、酵母) | GGACCGATTTT ACCGATCC | 4 | GAAATCTCTGGC CGCTC | 61 |
| PECAM1 | 血小板/内皮細胞接着分 子(CD31 抗原) | ACAGTCCAGAT AGTCGTATGT | 5 | ACTGGGCATCAT AAGAAATCC | 62 |
| TFAP2A | 転写因子 AP-2 アルファ (活性化エンハンサー結 合タンパク質 2 アルフ ア) | GTCTCCGCCATC CCTAT | 6 | ACTGAACAGAAG ACTTCGT | 63 |
| ACVR1 | アクチビン A 受容体、1 型 | ACTGGTGTAAC AGGAACAT | 7 | AACCTCCAAGTG GAAATTCT | 64 |
| CDKN2C | サイクリン依存性キナ ーゼインヒビター 2C(p18、CDK4 を阻害す る) | TTTGGAAGGAC TGCGCT | 8 | TCGGTCTTTCAAA TCGGGATTA | 65 |
| CIB1 | カルシウムおよびイン テグリン結合 1(カルミ リン) | CACGTCATCTCC CGTTC | 9 | CTGCTGTCACAG GACAAT | 66 66 |
| INSM1 | インスリノーマ関連 1 | ATTGAACTTCCC ACACGA | 10 | AAGGTAAAGCCA GACTCCA | 67 67 |

10

20

30

40

【表 1 C - 2】

| 表 1C | | | | | |
|---------|---|-----------------------------|----------|------------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列 番号 | 逆方向プライマー | 配列 番号 |
| LRP10 | 低密度リポタンパク質 受容体関連タンパク質 10 | GGAACAGACTG TCACCAT | 11 | GGGAGCGTAGGG TTAAG | 68 |
| STMN1 | スタスミン 1/腫瘍性タ ンパク質 18 | TCAGAGTGTGTG G TCAGGC | 12 | CAGTGTATTCTGC ACAATCAAC | 69 |
| CAPG | キャッピングタンパク 質(アクチンフィラメン ト)、ゲルゾリン様 | GGGACAGCTTC AACACT | 13 | GTTCCAGGATGTT GGACTTTC | 70 |
| CHGA | クロモグラニン A(副甲 状腺分泌タンパク質 1) | CCTGTGAACAG CCCTATG | 14 | GGAAAGTGTGTC GGAGAT | 71 |
| LGALS3 | レクチン、ガラクトシ ド結合、可溶性、3(ガレ クチン 3) | TTCTGGGCACG GTGAAG | 15 | AGGCAACATCAT TCCCTC | 72 |
| MAPRE3 | 微小管関連タンパク 質、RP/EB ファミリ ー、メンバー3 | GGCCAAACTAG AGCACGAATA | 16 | GTCAACACCCAT CTTCTTGAAA | 73 |
| SFN | ストラティフィニン | TCAGCAAGAAG GAGATGCC | 17 | CGTAGTGGAAGA CGGAAA | 74 |
| SNAP91 | シナプトソーム関連タ ンパク質、91kDa 相同 体(マウス) | GTGCTCCCTCTC CATTAAGTA | 18 | CTGGTGTAGAATT AGGAGACGTA | 75 |
| ABCC5 | ATP 結合カセット、サ ブファミリー C(CFTR/MRP)、メンバ ー5 | CAAGTTCAGGA GAACTCGAC | 19 | GGCATCAAGAGA GAGGC | 76 |
| ALDH3B1 | アルデヒドデヒドロゲ ナーゼ 3 ファミリー、 メンバーB1 | GGCTGTGGTTA TGCGATAG | 20 | GATAAAGAGTTA CAAGCTCCTCTG | 77 |
| ANTXR1 | 炭疽毒素受容体 1 | ACCCGAGGAAC AACCTTA | 21 | TCTAGGCCTTGAC GGAT | 78 |
| BMP7 | 骨形態形成タンパク質 7(骨形成タンパク質 1) | CCCTCTCCATTCC CTACA | 22 | TTTGGGCAAACCTCGGTA A | 79 |
| CACNB1 | カルシウムチャネル、 電位依存性、ベータ 1 サブユニット | CAGAGCGCCAG GCATTA | 23 | GCACAGCAAATG CCACT | 80 |

10

20

30

40

【表 1 C - 3】

| 表 1C | | | | | |
|-------|---|--------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CBX1 | クロモボックス相同体 1(HPI ベータ相同体 <i>Drosophila</i>) | CCACTGGCTGA GGTGTTA | 24 | CTTGTCTTCCCT ACTGICTTAC | 81 |
| CYB5B | シトクロム b5 B 型(ミトコンドリア外膜) | TGGGCGAGTCT ACGATG | 25 | CTTGTCCAGCAG AACCT | 82 |
| DOK1 | ドッキングタンパク質 1、62kDa(チロシンキナーゼ 1 の下流) | CTTCTGCCCTG GAGATG | 26 | CAGTCCTCTGCAC CGTTA | 83 |
| DSC3 | デスモコリン 3 | GCGCCATTGCT AGAGATA | 27 | CATCCAGATCCCT CACAT | 84 |
| FEN1 | フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1 | AGAGAAGATGG GCAGAAAG | 28 | CCAAGACACAGC CAGTAAT | 85 |
| FOXH1 | フォークヘッドボックス H1 | GCCCAGATCAT CCGTCA | 29 | TTTCCAGCCCTCG TAGTC | 86 |
| GJB5 | ギャップジャンクションタンパク質、ベータ 5(コネクシン 31.1) | ACCACAAGGAC TTCGAC | 30 | GGGACACAGGGA AGAAC | 87 |
| HOXD1 | ホメオボックス D1 | GCTCCGCTGCT ATCTTT | 31 | GTCTGCCACTCTG CAAC | 88 |
| HPN | ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン 1) | AGCGGCCAGGT GGATTA | 32 | GTCGGCTGACGC TTTGA | 89 |
| HYAL2 | ヒアルロノグルコサミニダーゼ 2 | ATGGGCTTTGG GAGCATA | 33 | GAACAAGTCAGT CTAGGGAATAC | 90 |
| ICA1 | 島細胞自己抗原 1、69kDa | GACCTGGATGC CAAGCTA | 34 | TGCTTTCGATAAG TCCAGACA | 91 |
| ICAM5 | 細胞間接着分子 5、テレノセファリン | CCGGCTCTTGG AAGTTG | 35 | CCTCTGAGGCTG GAAACA | 92 |
| ITGA6 | インテグリン、アルファ 6 | ACGCGGATCGA GTTTGATAA | 36 | ATCCACTGATCTT CCTTGC | 93 |
| LIPE | リパーゼ、ホルモン感受性 | CGCAAGTCCCA GAAGAT | 37 | CAGTGCTGCTTCA GACACA | 94 |
| ME3 | リンゴ酸酵素 3、NADP(+)依存性、ミトコンドリア | CGCGGATACGA TGTCAC | 38 | CCTTTCTTCAAGG GTAAAGGC | 95 |

10

20

30

40

【表 1 C - 4】

| 表 1C | | | | | |
|---------|--|-----------------------------|------|----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| MGRN1 | マホグニン、リングフィンガー1 | GAAGTCGGCCT ATCGCT | 39 | TCGAATTCTCTC CTCCCAT | 96 |
| MYBPH | ミオシン結合タンパク質 H | TCTGACCTCATC ATCGGCAA | 40 | CTGAGTCCACAC AGGTTT | 97 |
| MYO7A | ミオシン VIIA | GAGGTGAAGCA AACTACGGA | 41 | CCCATACTTGTG ATGGCAATTA | 98 |
| NFIL3 | 核因子、インターロイキン 3 調節 | ACTCTCCACAA AGCTCG | 42 | TCCTGCGTGTGTT CTACT | 99 |
| PIK3C2A | ホスホイノシチド-3-キナーゼ、クラス 2、アルファポリペプチド | GGATTTACAGCT ACCAGTTACTT | 43 | AGTCATCATGTAC CCAGCA | 100 |
| PLEKHA6 | プレクストリン相同性ドメイン含有、ファミリーA メンバー6 | TTCGTCCTGGTG GATCG | 44 | CCCAGGATACTCT CTTCCTT | 101 |
| PSMD14 | プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン)26S サブユニット、非ATPase、14 | AGTGATTGATG TGTTTGCTATG | 45 | CACTGGATCAAC TGCCTC | 102 |
| SCD5 | ステアロイル-CoA デサチュラーゼ 5 | CAAAGCCAAGC CACTCACTC | 46 | CAGCTGTCACAC CCAGAGC | 103 |
| SIAH2 | seven in absentia homolog 2(Drosophila) | CTCGGCAGTCC TGTTTC | 47 | CGTATGGTGCAG GGTCA | 104 |
| TCF2 | 転写因子 2、肝臓:LF-B3;バリエーション肝臓核因子 | ACACCTGGTAC GTCAGAA | 48 | TCTGGACTGTCTG GTTGAAT | 105 |
| TCPI | t-複合体 1 | ATGCCCAAGAG AATCGTAAA | 49 | CCTGTACACCAA GCTTCAT | 106 |
| TTF1 | 甲状腺転写因子 1 | ATGAGTCCAAA GCACACGA | 50 | CCATGCCCACTTT CTTGTA | 107 |
| TRIM29 | トリパータイトモチーフ含有 29 | TGAGATTGAGG ATGAAGCTGAG | 51 | CATTGGTGGTGA AGCTCTTG | 108 |
| TUBA1 | チューブリン、アルファ 1 | CCGACTCAACG TGAGAC | 52 | CGTGGACTGAGA TGCATT | 109 |

10

20

30

40

【表 2 - 1】

| 表 2 | | | | | |
|--------|--|----------------------------|------|----------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CDH5 | カドヘリン 5、2 型、 VE-カドヘリン(血管上皮) | AAGAGAGATTG GATTTGGAACC | 1 | TTCTTGCGACTCACGCT | 58 |
| PAICS | ホスホリボシルアミノ イミダゾールカルボキ シラーゼ、 ホスホリボシルアミノ イミダゾールスクシノ カルボキサミド合成酵 素 | AATCCTGGTGT CAAGGAAG | 3 | GACCACTGTGGG TCATTATT | 60 |
| PAK1 | p21/Cdc42/Rac1- 活性化 キナーゼ 1(STE20 相同 体、酵母) | GGACCGATTTT ACCGATCC | 4 | GAAATCTCTGGC CGCTC | 61 |
| PECAM1 | 血小板/内皮細胞接着分 子(CD31 抗原) | ACAGTCCAGAT AGTCGTATGT | 5 | ACTGGGCATCAT AAGAAATCC | 62 |
| TFAP2A | 転写因子 AP-2 アルファ (活性化エンハンサー結 合タンパク質 2 アルフ ア) | GTCTCCGCCATC CCTAT | 6 | ACTGAACAGAAG ACTTCGT | 63 |
| ACVR1 | アクチビン A 受容体、1 型 | ACTGGTGTAAC AGGAACAT | 7 | AACCTCCAAGTG GAAATTCT | 64 |
| CDKN2C | サイクリン依存性キナ ーゼインヒビター 2C(p18、CDK4 を阻害す る) | TTTGGAAGGAC TGCGCT | 8 | TCGGTCTTTCAA TCGGGATTA | 65 |
| CIB1 | カルシウムおよびイン テグリン結合 1(カルミ リン) | CACGTCACTCC CGTTC | 9 | CTGCTGTCACAG GACAAT | 66 66 |
| INSM1 | インスリノーマ関連 1 | ATTGAACTTCCC ACACGA | 10 | AAGGTAAAGCCA GACTCCA | 67 67 |
| LRP10 | 低密度リボタンパク質 受容体関連タンパク質 10 | GGAACAGACTG TCACCAT | 11 | GGGAGCGTAGGG TTAAG | 68 |
| STMN1 | スタスミン 1/腫瘍性タ ンパク質 18 | TCAGAGTGTGTG G | 12 | CAGTGTATTCTGC ACAATCAAC | 69 |

10

20

30

40

【表 2 - 2】

| 表 2 | | | | | |
|---------|---|---------------------------|------|------------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| | | TCAGGC | | | |
| CAPG | キャッピングタンパク質(アクチンフィラメント)、グルゾリン様 | GGGACAGCTTC AACACT | 13 | GTTCCAGGATGTT GGACTTTC | 70 |
| CHGA | クロモグラニン A(副甲状腺分泌タンパク質 1) | CCTGTGAACAG CCCTATG | 14 | GGAAAAGTGTGTC GGAGAT | 71 |
| LGALS3 | レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3(ガレクチン 3) | TTCTGGGCACG GTGAAG | 15 | AGGCAACATCAT TCCCTC | 72 |
| MAPRE3 | 微小管関連タンパク質、RP/EB ファミリー、メンバー3 | GGCCAAACTAG AGCACGAATA | 16 | GTCAACACCCAT CTTCTTGAAA | 73 |
| SFN | ストラティフィン | TCAGCAAGAAG GAGATGCC | 17 | CGTAGTGGAAGA CGGAAA | 74 |
| SNAP91 | シナプトソーム関連タンパク質、91kDa 相同体(マウス) | GTGCTCCCTCTC CATTAAGTA | 18 | CTGGTGTAGAATT AGGAGACGTA | 75 |
| ABCC5 | ATP 結合カセット、サブファミリー C(CFTR/MRP)、メンバー5 | CAAGTTCAGGA GAACTCGAC | 19 | GGCATCAAGAGA GAGGC | 76 |
| ALDH3B1 | アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリー、メンバーB1 | GGCTGTGGTTA TGCGATAG | 20 | GATAAAGAGTTA CAAGCTCCTCTG | 77 |
| ANTXR1 | 炭疽毒素受容体 1 | ACCCGAGGAAC AACCTTA | 21 | TCTAGGCCTTGAC GGAT | 78 |
| CACNB1 | カルシウムチャネル、電位依存性、ベータ 1 サブユニット | CAGAGCGCCAG GCATTA | 23 | GCACAGCAAATG CCACT | 80 |
| CBX1 | クロモボックス相同体 1(HP1 ベータ相同体 <i>Drosophila</i>) | CCACTGGCTGA GGTGTTA | 24 | CTTGCTTTCCCT ACTGTCTTAC | 81 |
| CYB5B | シトクロム b5 B 型(ミトコンドリア外膜) | TGGGCGAGTCT ACGATG | 25 | CTTGTTCCAGCAG AACCT | 82 |

10

20

30

40

【表 2 - 3】

| 表 2 | | | | | |
|-------|------------------------------------|--------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| DOK1 | ドッキングタンパク質 1、62kDa(チロシンキナーゼ 1 の下流) | CTTCTGCCCTG GAGATG | 26 | CAGTCCTCTGCAC CGTTA | 83 |
| DSC3 | デスモコリン 3 | GCGCCATTTGCT AGAGATA | 27 | CATCCAGATCCCT CACAT | 84 |
| FEN1 | フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1 | AGAGAAGATGG GCAGAAAG | 28 | CCAAGACACAGC CAGTAAT | 85 |
| FOXH1 | フォークヘッドボックス H1 | GCCCAGATCAT CCGTCA | 29 | TTTCCAGCCCTCG TAGTC | 86 |
| GJB5 | ギャップジャンクションタンパク質、ベータ 5(コネクシン 31.1) | ACCACAAGGAC TTCGAC | 30 | GGGACACAGGGA AGAAC | 87 |
| HOXD1 | ホメオボックス D1 | GCTCCGCTGCT ATCTTT | 31 | GTCTGCCACTCTG CAAC | 88 |
| HPN | ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン 1) | AGCGGCCAGGT GGATTA | 32 | GTCGGCTGACGC TTTGA | 89 |
| HYAL2 | ヒアルロノグルコサミニダーゼ 2 | ATGGGCTTTGG GAGCATA | 33 | GAACAAGTCAGT CTAGGGAATAC | 90 |
| ICA1 | 島細胞自己抗原 1、69kDa | GACCTGGATGC CAAGCTA | 34 | TGCTTTCGATAAG TCCAGACA | 91 |
| ICAM5 | 細胞間接着分子 5、テレノセフェリン | CCGGCTCTTGG AAGTTG | 35 | CCTCTGAGGCTG GAAACA | 92 |
| ITGA6 | インテグリン、アルファ 6 | ACGCGGATCGA GTTTGATAA | 36 | ATCCACTGATCTT CCTTGC | 93 |
| LIPE | リパーゼ、ホルモン感受性 | CGCAAGTCCCA GAAGAT | 37 | CAGTGCTGCTTCA GACACA | 94 |
| ME3 | リンゴ酸酵素 3、NADP(+)依存性、ミトコンドリア | CGCGGATACGA TGTCAC | 38 | CCTTTCTTCAAGG GTAAAGGC | 95 |
| MGRN1 | マホグニン、リングフィンガー1 | GAAC TCGGCCT ATCGCT | 39 | TCGAATTTCTCTC CTCCCAT | 96 |
| MYBPH | ミオシン結合タンパク質 H | TCTGACCTCATC ATCGGCAA | 40 | CTGAGTCCACAC AGGTTT | 97 |

10

20

30

40

【表 2 - 4】

| 表 2 | | | | | |
|---------|---|----------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| MYO7A | ミオシン VIIA | GAGGTGAAGCA AACTACGGA | 41 | CCCATACTTGTTG ATGGCAATTA | 98 |
| NFIL3 | 核因子、インターロイ キン 3 調節 | ACTCTCCACAA AGCTCG | 42 | TCCTGCGTGTGTT CTACT | 99 |
| PIK3C2A | ホスホイノシチド-3-キ ナーゼ、クラス 2、アル ファポリペプチド | GGATTTCAGCT ACCAGTTACTT | 43 | AGTCATCATGTAC CCAGCA | 100 |
| PLEKHA6 | プレクストリン相同性 ドメイン含有、ファミ リーA メンバー6 | TTCGTCCTGGTG GATCG | 44 | CCCAGGATACTCT CTTCCTT | 101 |
| PSMD14 | プロテアソーム(プロソ ーム、マクロパイン)26S サブユニット、非 ATPase、14 | AGTGATTGATG TGTTTGCTATG | 45 | CACTGGATCAAC TGCCTC | 102 |
| SCD5 | ステアロイル-CoA デサ チュラーゼ 5 | CAAAGCCAAGC CACTCACTC | 46 | CAGCTGTCACAC CCAGAGC | 103 |
| SIAH2 | seven in absentia homolog 2(Drosophila) | CTCGGCAGTCC TGTTTC | 47 | CGTATGGTGCAG GGTCA | 104 |
| TCF2 | 転写因子 2、肝臓:LF- B3;バリエント肝臓核因 子 | ACACCTGGTAC GTCAGAA | 48 | TCTGGACTGTCTG GTTGAAT | 105 |
| TTF1 | 甲状腺転写因子 1 | ATGAGTCCAAA GCACACGA | 50 | CCATGCCCCACTTT CTTGTA | 107 |
| TRIM29 | トリパータイトモチー フ含有 29 | TGAGATTGAGG ATGAAGCTGAG | 51 | CATTGGTGGTGA AGCTCTTG | 108 |
| TUBA1 | チューブリン、アルファ 1 | CCGACTCAACG TGAGAC | 52 | CGTGGACTGAGA TGCAAT | 109 |
| CFL1 | コフィリン 1(非筋肉) | GTGCCCTCTCCT TTTCG | 53 | TTCATGTCGTTGA ACACCTTG | 110 |
| EEF1A1 | 真核生物翻訳伸長因子 1 アルファ 1 | CGTTCTTTTTCG CAACGG | 54 | CATTTTGGCTTTT AGGGGTAG | 111 |
| RPL10 | リボソームタンパク質 L10 | GGTGTGCCACT GAAGAT | 55 | GGCAGAAGCGAG ACTTT | 112 |

10

20

30

40

【表 2 - 5】

| 表 2 | | | | | |
|--------|--------------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列 番号 | 逆方向プライマー | 配列 番号 |
| | | | | | |
| RPL28 | リボソームタンパク質 L28 | GTGTCGTGGTG GTCATT | 56 | GCACATAGGAGG TGGCA | 113 |
| RPL37A | リボソームタンパク質 L37a | GCATGAAGACA GTGGCT | 57 | GCGGACTTTACC GTGAC | 114 |

【表 3 - 1】

| 表 3 | | | | | |
|--------|--|-----------------------------|------|-----------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CDH5 | カドヘリン 5、2 型、 VE-カドヘリン(血管上皮) | AAGAGAGATTG GATTTGGAACC | 1 | TTCTTGCGACTCACGCT | 58 |
| CLEC3B | C 型レクチンドメイン ファミリー3、メンバー B | CCAGAAGCCCA AGAAGATTGTA | 2 | GCTCCTCAAACAT CTTTGTGTTC | 59 |
| PAICS | ホスホリボシルアミノ イミダゾールカルボキ シラーゼ、 ホスホリボシルアミノ イミダゾールスクシノ カルボキサミド合成酵 素 | AATCCTGGTGT CAAGGAAG | 3 | GACCACTGTGGG TCATTATT | 60 |
| PAK1 | p21/Cdc42/Rac1- 活性化 キナーゼ 1(STE20 相同 体、酵母) | GGACCGATTTT ACCGATCC | 4 | GAAATCTCTGGC CGCTC | 61 |
| TFAP2A | 転写因子 AP-2 アルファ (活性化エンハンサー結 合タンパク質 2 アルフ ア) | GTCTCCGCCATC CCTAT | 6 | ACTGAACAGAAG ACTTCGT | 63 |
| ACVR1 | アクチビン A 受容体、1 型 | ACTGGTGTAAC AGGAACAT | 7 | AACCTCCAAGTG GAAATCTCT | 64 |
| CDKN2C | サイクリン依存性キナ ーゼインヒビター 2C(p18、CDK4 を阻害す る) | TTTGGAAGGAC TGCGCT | 8 | TCGGTCTTTCAAA TCGGGATTA | 65 |
| INSM1 | インスリノーマ関連 1 | ATTGAAGTCCC ACACGA | 10 | AAGGTAAAGCCA GACTCCA | 67 67 |
| LRP10 | 低密度リボタンパク質 受容体関連タンパク質 10 | GGAACAGACTG TCACCAT | 11 | GGGAGCGTAGGG TTAAG | 68 |
| STMN1 | スタスミン 1/腫瘍性タ ンパク質 18 | TCAGAGTGTGTG G TCAGGC | 12 | CAGTGTATTCTGC ACAATCAAC | 69 |
| CAPG | キャッピングタンパク 質(アクチンフィラメン ト)、ゲルゾリン様 | GGGACAGCTTC AACACT | 13 | GTTCCAGGATGTT GGACTTTC | 70 |

10

20

30

40

【表 3 - 2】

| 表 3 | | | | | |
|---------|---|----------------------------|------|------------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CHGA | クロモグラニン A(副甲状腺分泌タンパク質 1) | CCTGTGAACAG CCCTATG | 14 | GGAAAGTGTGTC GGAGAT | 71 |
| LGALS3 | レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3(ガレクチン 3) | TTCTGGGCACG GTGAAG | 15 | AGGCAACATCAT TCCCTC | 72 |
| MAPRE3 | 微小管関連タンパク質、RP/EB ファミリー、メンバー3 | GGCCAAACTAG AGCACGAATA | 16 | GTCAACACCCAT CTTCTTGAAA | 73 |
| SFN | ストラティフィン | TCAGCAAGAAG GAGATGCC | 17 | CGTAGTGGAAGA CGGAAA | 74 |
| SNAP91 | シナプトソーム関連タンパク質、91kDa 相同体(マウス) | GTGCTCCCTCTC CATTAAAGTA | 18 | CTGGTGTAGAATT AGGAGACGTA | 75 |
| ABCC5 | ATP 結合カセット、サブファミリー C(CFTR/MRP)、メンバー5 | CAAGTTCAGGA GAACTCGAC | 19 | GGCATCAAGAGA GAGGC | 76 |
| ALDH3B1 | アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリー、メンバーB1 | GGCTGTGGTTA TGCGATAG | 20 | GATAAAGAGTTA CAAGCTCCTCTG | 77 |
| ANTXR1 | 炭疽毒素受容体 1 | ACCCGAGGAAC AACCTTA | 21 | TCTAGGCCTTGAC GGAT | 78 |
| CACNB1 | カルシウムチャネル、電位依存性、ベータ 1 サブユニット | CAGAGCGCCAG GCATTA | 23 | GCACAGCAAATG CCACT | 80 |
| CBX1 | クロモボックス相同体 1(HP1 ベータ相同体 <i>Drosophila</i>) | CCACTGGCTGA GGTGTTA | 24 | CTTGCTTTCCCT ACTGTCTTAC | 81 |
| CYB5B | シトクロム b5 B 型(ミトコンドリア外膜) | TGGGCGAGICT ACGATG | 25 | CTTGTTCCAGCAG AACCT | 82 |
| DOK1 | ドッキングタンパク質 1、62kDa(チロシンキナーゼ 1 の下流) | CTTTCTGCCCTG GAGATG | 26 | CAGTCCTCTGCAC CGTTA | 83 |
| DSC3 | デスモコリン 3 | GCGCCATTIGCT AGAGATA | 27 | CATCCAGATCCCT CACAT | 84 |
| FEN1 | フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1 | AGAGAAGATGG GCAGAAAG | 28 | CCAAGACACAGC CAGTAAT | 85 |

10

20

30

40

【表 3 - 3】

| 表 3 | | | | | |
|---------|----------------------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| GJB5 | ギャップジャンクションタンパク質、ベータ5(コネキシン31.1) | ACCACAAGGAC TTCGAC | 30 | GGGACACAGGGA AGAAC | 87 |
| HOXD1 | ホメオボックス D1 | GCTCCGCTGCT ATCTTT | 31 | GTCTGCCACTCTG CAAC | 88 |
| HPN | ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン1) | AGCGGCCAGGT GGATTA | 32 | GTCGGCTGACGC TTTGA | 89 |
| HYAL2 | ヒアルロノグルコサミニダーゼ2 | ATGGGCTTTGG GAGCATA | 33 | GAACAAGTCAGT CTAGGGAATAC | 90 |
| ICA1 | 島細胞自己抗原1、69kDa | GACCTGGATGC CAAGCTA | 34 | TGCTTTCGATAAG TCCAGACA | 91 |
| ICAM5 | 細胞間接着分子5、テレノセファリン | CCGGCTCTTGG AAGTTG | 35 | CCTCTGAGGCTG GAAACA | 92 |
| ITGA6 | インテグリン、アルファ6 | ACGCGGATCGA GTTTGATAA | 36 | ATCCACTGATCTT CCTTGC | 93 |
| ME3 | リンゴ酸酵素3、NADP(+)依存性、ミトコンドリア | CGCGGATACGA TGTCAC | 38 | CCTTTCTTCAAGG GTAAAGGC | 95 |
| MGRN1 | マホグニン、リングフィンガー1 | GAACCTCGGCCT ATCGCT | 39 | TCGAATTTCTCTC CTCCCAT | 96 |
| MYBPH | ミオシン結合タンパク質H | TCTGACCTCATC ATCGGCAA | 40 | CTGAGTCCACAC AGGTTT | 97 |
| MYO7A | ミオシン VIIA | GAGGTGAAGCA AACTACGGA | 41 | CCCATACTTGTTG ATGGCAATTA | 98 |
| NFIL3 | 核因子、インターロイキン3調節 | ACTCTCCACAA AGCTCG | 42 | TCCTGCGTGTGTT CTACT | 99 |
| PIK3C2A | ホスホイノシチド-3-キナーゼ、クラス2、アルファポリペプチド | GGATTTACAGCT ACCAGTTACTT | 43 | AGTCATCATGTAC CCAGCA | 100 |
| PLEKHA6 | プレクストリン相同性ドメイン含有、ファミリーAメンバー6 | TTCGTCCTGGTG GATCG | 44 | CCCAGGATACTCT CTTCCTT | 101 |

10

20

30

40

【表 3 - 4】

| 表 3 | | | | | |
|--------|--|----------------------------|------|---------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| PSMD14 | プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン)26S サブユニット、非ATPase、14 | AGTGATTGATG TGTTTGCTATG | 45 | CACTGGATCAAC TGCCTC | 102 |
| SCD5 | ステアロイル-CoA デサチュラーゼ 5 | CAAAGCCAAGC CACTCACTC | 46 | CAGCTGTCACAC CCAGAGC | 103 |
| SIAH2 | seven in absentia homolog 2(Drosophila) | CTCGGCAGTCC TGTTTC | 47 | CGTATGGTGCAG GGTCA | 104 |
| TCF2 | 転写因子 2、肝臓、LF-B3;バリエント肝臓核因子 | ACACCTGGTAC GTCAGAA | 48 | TCTGGACTGTCTG GTTGAAT | 105 |
| TCP1 | t-複合体 1 | ATGCCCAAGAG AATCGTAAA | 49 | CCTGTACACCAA GCTTCAT | 106 |
| TTF1 | 甲状腺転写因子 1 | ATGAGTCCAAA GCACACGA | 50 | CCATGCCCACTTT CTTGTA | 107 |
| TRIM29 | トリパートタイトモチーフ含有 29 | TGAGATTGAGG ATGAAGCTGAG | 51 | CATTGGTGGTGA AGCTCTTG | 108 |
| CFL1 | コフィリン 1(非筋肉) | GTGCCCTCTCCT TTTCG | 53 | TTCATGTCGTTGA ACACCTTG | 110 |
| EEF1A1 | 真核生物翻訳伸長因子 1 アルファ 1 | CGTTCTTTTCG CAACGG | 54 | CATTTTGGCTTTT AGGGGTAG | 111 |
| RPL10 | リボソームタンパク質 L10 | GGTGTGCCACT GAAGAT | 55 | GGCAGAAGCGAG ACTTT | 112 |
| RPL28 | リボソームタンパク質 L28 | GTGTCGTGGTG GTCATT | 56 | GCACATAGGAGG TGGCA | 113 |
| RPL37A | リボソームタンパク質 L37a | GCATGAAGACA GTGGCT | 57 | GCGGACTTTACC GTGAC | 114 |

10

20

30

40

【表 4】

| 表 4 | | | | | |
|--------|--|-----------------------------|----------|----------------------------|----------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列 番号 | 逆方向プライマー | 配列 番号 |
| ACVR1 | アクチビン A 受容体、1 型 | ACTGGTGTAAC AGGAACAT | 7 | AACCTCCAAGTG GAAATTCT | 64 |
| CDKN2C | サイクリン依存性キナー ゼインヒビター 2C(p18、CDK4 を阻害す る) | TTTGGAAGGAC TGCGCT | 8 | TCGGTCTTTCAAA TCGGGATTA | 65 |
| CIB1 | カルシウムおよびイン テグリン結合 1(カルミ リン) | CACGTCATCTCC CGTTC | 9 | CTGCTGTCACAG GACAAT | 66 66 |
| INSM1 | インスリノーマ関連 1 | ATTGAACTTCCC ACACGA | 10 | AAGGTAAAGCCA GACTCCA | 67 67 |
| LRP10 | 低密度リボタンパク質 受容体関連タンパク質 10 | GGAACAGACTG TCACCAT | 11 | GGGAGCGTAGGG TTAAG | 68 |
| STMN1 | スタスミン 1/腫瘍性タ ンパク質 18 | TCAGAGTGTGTG G TCAGGC | 12 | CAGTGTATTCTGC ACAATCAAC | 69 |

10

20

【表 5】

| 表 5 | | | | | |
|--------|--------------------------------|---------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| CAPG | キャッピングタンパク質(アクチンフィラメント)、ゲルゾリン様 | GGGACAGCTTC AACACT | 13 | GTTCCAGGATGTT GGACTTTC | 70 |
| CHGA | クロモグラニン A(副甲状腺分泌タンパク質 1) | CCTGTGAACAG CCCTATG | 14 | GGAAAGTGTGTC GGAGAT | 71 |
| LGALS3 | レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3(ガレクチン 3) | TTCTGGGCACG GTGAAG | 15 | AGGCAACATCAT TCCCTC | 72 |
| MAPRE3 | 微小管関連タンパク質、RP/EB ファミリー、メンバー3 | GGCCAAACTAG AGCACGAATA | 16 | GTCAACACCCAT CTTCTTGAAA | 73 |
| SFN | ストラティフィン | TCAGCAAGAAG GAGATGCC | 17 | CGTAGTGGAAGA CGGAAA | 74 |
| SNAP91 | シナプトソーム関連タンパク質、91kDa 相同体(マウス) | GTGCTCCCTCTC CATTAAGTA | 18 | CTGGTGTAGAATT AGGAGACGTA | 75 |

10

20

【表 6 - 1】

| 表 6 | | | | | |
|---------|--------------------------------------|--------------------------|------|------------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| ABCC5 | ATP 結合カセット、サブファミリー C(CFTR/MRP)、メンバー5 | CAAGTTCAGGA GAACTCGAC | 19 | GGCATCAAGAGA GAGGC | 76 |
| ALDH3B1 | アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリー、メンバーB1 | GGCTGTGGTTA TGCGATAG | 20 | GATAAAGAGTTA CAAGCTCCTCTG | 77 |
| ANTXR1 | 炭疽毒素受容体 1 | ACCCGAGGAAC AACCTTA | 21 | TCTAGGCCTTGAC GGAT | 78 |
| BMP7 | 骨形態形成タンパク質 7(骨形成タンパク質 1) | CCCTCTCCATTC CCTACA | 22 | TTTGGGCAAACCT CGGTAA | 79 |
| CACNB1 | カルシウムチャネル、電位依存性、ベータ 1 サブユニット | CAGAGCGCCAG GCATTA | 23 | GCACAGCAAATG CCACT | 80 |
| CBX1 | クロモボックス相同体 1(HP1 ベータ相同体 Drosophila) | CCACTGGGCTGA GGTGITA | 24 | CTTGICTTTCCCT ACTGTCTTAC | 81 |
| CYB5B | シトクロム b5 B 型(ミトコンドリア外膜) | TGGGCGAGTCT ACGATG | 25 | CTTGTTCCAGCAG AACCT | 82 |
| DOK1 | ドッキングタンパク質 1、62kDa(チロシンキナーゼ 1 の下流) | CTTCTGCCCCTG GAGATG | 26 | CAGTCCTCTGCAC CGTTA | 83 |
| DSC3 | デスモコリン 3 | GCGCCATTGCT AGAGATA | 27 | CATCCAGATCCCT CACAT | 84 |
| FEN1 | フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1 | AGAGAAGATGG GCAGAAAG | 28 | CCAAGACACAGC CAGTAAT | 85 |
| FOXH1 | フォークヘッドボックス H1 | GCCCAGATCAT CCGTCA | 29 | TTTCCAGCCCTCG TAGTC | 86 |
| GJB5 | ギャップジャンクションタンパク質、ベータ 5(コネキシン 31.1) | ACCACAAGGAC TTCGAC | 30 | GGGACACAGGGA AGAAC | 87 |
| HOXD1 | ホメオボックス D1 | GCTCCGCTGCT ATCTTT | 31 | GTCTGCCACTCTG CAAC | 88 |
| HPN | ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン 1) | AGCGGCCAGGT GGATTA | 32 | GTCGGCTGACGC TTTGA | 89 |

10

20

30

40

【表 6 - 2】

| 表 6 | | | | | |
|---------|---|-----------------------------|------|-----------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| HYAL2 | ヒアルロノグルコサミニダーゼ 2 | ATGGGCTTTGG GAGCATA | 33 | GAACAAGTCAGT CTAGGGAATAC | 90 |
| ICA1 | 島細胞自己抗原 1、 69kDa | GACCTGGATGC CAAGCTA | 34 | TGCTTTCGATAAG TCCAGACA | 91 |
| ICAM5 | 細胞間接着分子 5、テレ ンセファリン | CCGGCTCTTGG AAGTTG | 35 | CCTCTGAGGCTG GAAACA | 92 |
| ITGA6 | インテグリン、アルファ 6 | ACGCGGATCGA GTTTGATAA | 36 | ATCCACTGATCTT CCTTGC | 93 |
| LIPE | リパーゼ、ホルモン感 受性 | CGCAAGTCCCA GAAGAT | 37 | CAGTGCTGCTTCA GACACA | 94 |
| ME3 | リンゴ酸酵素 3、 NADP(+)依存性、ミト コンドリア | CGCGGATACGA TGTCAC | 38 | CCTTCTTCAAGG GTAAAGGC | 95 |
| MGRN1 | マホグニン、リングフ インガー1 | GAACCTGGCCT ATCGCT | 39 | TCGAATTCTCTC CTCCCAT | 96 |
| MYBPH | ミオシン結合タンパク 質 H | TCTGACCTCATC ATCGGCAA | 40 | CTGAGTCCACAC AGGTTT | 97 |
| MYO7A | ミオシン VIIA | GAGGTGAAGCA AACTACGGA | 41 | CCCATACTTGTTG ATGGCAATTA | 98 |
| NFIL3 | 核因子、インターロイ キン 3 調節 | ACTCTCCACAA AGCTCG | 42 | TCCTGCGTGTGTT CTACT | 99 |
| PIK3C2A | ホスホイノシチド-3-キ ナーゼ、クラス 2、アル ファポリペプチド | GGATTTTCAGCT ACCAGTTACTT | 43 | AGTCATCATGTAC CCAGCA | 100 |
| PLEKHA6 | プレクストリン相同性 ドメイン含有、ファミ リーA メンバー6 | TTCGTCCTGGTG GATCG | 44 | CCCAGGATACTCT CTTCCTT | 101 |
| PSMD14 | プロテアソーム(プロソ ーム、マクロパイン)26S サブユニット、非 ATPase、14 | AGTGATTGATG TGTTTGCTATG | 45 | CACTGGATCAAC TGCCTC | 102 |
| SCD5 | ステアロイル-CoA デサ チュラーゼ 5 | CAAAGCCAAGC CACTCACTC | 46 | CAGCTGTCACAC CCAGAGC | 103 |

10

20

30

40

【表 6 - 3】

| 表 6 | | | | | |
|--------|---|----------------------------|------|--------------------------|------|
| 遺伝子記号 | 遺伝子名 | 順方向プライマー | 配列番号 | 逆方向プライマー | 配列番号 |
| SIAH2 | seven in absentia homolog 2(Drosophila) | CTCGGCAGTCC TGTTTC | 47 | CGTATGGTGCAG GGTCA | 104 |
| TCF2 | 転写因子 2、肝臓:LF-B3;バリエーション肝臓核因子 | ACACCTGGTAC GTCAGAA | 48 | TCTGGACTGTCTG GTTGAAT | 105 |
| TCP1 | t-複合体 1 | ATGCCCAAGAG AAATCGTAAA | 49 | CCTGTACACCAA GCTTCAT | 106 |
| TTF1 | 甲状腺転写因子 1 | ATGAGTCCAAA GCACACGA | 50 | CCATGCCCACTTT CTTGTA | 107 |
| TRIM29 | トリパータイトモチーフ含有 29 | TGAGATTGAGG ATGAAGCTGAG | 51 | CATTGGTGGTGA AGCTCTTG | 108 |
| TUBA1 | チューブリン、アルファ 1 | CCGACTCAACG TGAGAC | 52 | CGTGGACTGAGA TGCATT | 109 |

10

20

【0036】

単離 mRNA を、それだけに限らないが、サザン分析もしくはノーザン分析、PCR 分析、およびプローブアレイ、NanoString アッセイを含むハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて使用することができる。mRNA レベルを検出するための一方法では、単離 mRNA または合成 cDNA を、検出されている遺伝子によってコードされる mRNA にハイブリダイズすることができる核酸分子（プローブ）と接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、長さが少なくとも 7、15、30、50、100、250、または 500 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドなどの cDNA またはその部分であり、本発明の非天然 cDNA または mRNA バイオマーカーにストリンジントな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分であり得る。

30

【0037】

上記に説明したように、一実施形態では、mRNA が試料から得られると、それは、ハイブリダイゼーション反応で相補的 DNA (cDNA) に変換される。cDNA は、in vivo で存在せず、したがって非天然分子である。さらなる実施形態では、次いで cDNA は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または当業者に公知の他の増幅法によって増幅される。この増幅反応の産物、すなわち、増幅された cDNA は、必然的に非天然産物である。上述したように、cDNA は、非天然分子である。第 2 に、PCR の場合では、増幅プロセスは、出発材料のあらゆる個々の cDNA 分子について数億の cDNA コピーを作り出す機能を果たす。生成されるコピーの数は、in vivo で存在する mRNA のコピーの数からはるかにかけ離れている。

40

【0038】

一実施形態では、cDNA は、断片に追加の DNA 配列（アダプター配列）を導入するプライマーで増幅される（アダプター特異的プライマーを使用して）。したがって増幅は、既に非天然の cDNA にバーコード、アダプター、および/またはレポーター配列を導入することによって、非天然一本鎖 cDNA から非天然二本鎖分子を作り出す機能を果たす。一実施形態では、アダプター特異的プライマーを用いた増幅中に、検出可能標識、例えば、フルオロフォアが、一本鎖 cDNA 分子に付加される。したがって、増幅はまた、少なくとも (i) cDNA は、in vivo で存在しないこと、(i) アダプター配列

50

が c D N A 分子の両端に付加されて、i n v i v o で存在しない D N A 配列が作製されること、(i i) 増幅と関連した誤り率により、i n v i v o で存在しない D N A 配列がさらに作り出されること、(i i i) 自然において存在するものと比較した場合の c D N A 分子の異種構造、および (i v) c D N A 分子への検出可能標識の化学的付加のために、自然において存在しない D N A 複合体を作り出す機能を果たす。

【 0 0 3 9 】

一実施形態では、合成 c D N A (例えば、増幅された c D N A) は、例えば、マイクロアレイを介して、プローブを用いたハイブリダイゼーションを介して固体表面に固定化される。別の実施形態では、c D N A 産物は、c D N A 産物とハイブリダイズする蛍光プローブの導入を介するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を介して検出される。例えば、一実施形態では、バイオマーカー検出は、定量的蛍光発生 R T - P C R (例えば、T a q M a n (登録商標) プローブを用いた) によって評価される。P C R 分析については、周知の方法が、分析で使用するためのプライマー配列の決定について当技術分野で利用可能である。

10

【 0 0 4 0 】

本明細書に提供されるバイオマーカーは、一実施形態では、捕捉プローブおよび/またはレポータープローブを使用するハイブリダイゼーション反応を介して検出される。例えば、ハイブリダイゼーションプローブは、ビーズ、ガラス、またはシリコン基板などの固体表面に誘導体化されたプローブである。別の実施形態では、捕捉プローブが溶液中に存在し、患者の試料と混合され、その後、例えば、ビオチン- アビジン相互作用 (例えば、ビオチンが捕捉プローブの一部であり、アビジンが表面上にある場合) を介した表面へのハイブリダイゼーション産物の付着が続く。ハイブリダイゼーションアッセイは、一実施形態では、捕捉プローブおよびレポータープローブの両方を採用する。レポータープローブは、捕捉プローブまたはバイオマーカー核酸のいずれかにハイブリダイズすることができる。次いで例えばレポータープローブは、試料中のバイオマーカー (複数可) のレベルを決定するためにカウントおよび検出される。捕捉プローブおよび/またはレポータープローブは、一実施形態では、検出可能標識、および/または表面への官能化を可能にする基を含有する。

20

【 0 0 4 1 】

例えば、n C o u n t e r 遺伝子分析システム (例えば、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Geissら (2008年)、Nat. Biotechnol.、26巻、317~325頁を参照) を、本明細書に提供する方法とともに使用するのに適用できる。

30

【 0 0 4 2 】

その開示全体がすべての目的に関して参照により組み込まれている米国特許第7,473,767号および同第8,492,094号に記載されたハイブリダイゼーションアッセイを、本明細書に提供する方法で使用するのに、すなわち、本明細書に記載のバイオマーカーおよびバイオマーカー組合せを検出するのに適用できる。

【 0 0 4 3 】

バイオマーカーレベルは、膜プロット (ハイブリダイゼーション分析、例えば、ノーザン、サザン、ドットなどで使用されるものなど)、またはマイクロウェル、試料チューブ、ゲル、ビーズ、または繊維 (もしくは結合した核酸を含む任意の固体支持体) を使用してモニターすることができる。例えば、それぞれその全体が参照により組み込まれている、米国特許第5,770,722号、同第5,874,219号、同第5,744,305号、同第5,677,195号、および同第5,445,934号を参照。

40

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、マイクロアレイがバイオマーカーレベルを検出するのに使用される。マイクロアレイは、異なる実験間の再現性のためにこの目的に特に非常に適している。D N A マイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルを同時に測定するための一方法をもたらす。各アレイは、固体支持体に付着された捕捉プローブの再現可能なパターンからなる

50

。標識されたRNAまたはDNAは、アレイ上の相補的プローブにハイブリダイズされ、次いでレーザースキャニングによって検出される。アレイ上の各プローブのハイブリダイゼーション強度が決定され、相対的な遺伝子発現レベルを表す定量的値に変換される。例えば、それぞれその全体が参照により組み込まれている、米国特許第6,040,138号、同第5,800,992号、および同第6,020,135号、同第6,033,860号、および同第6,344,316号を参照。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、試料中の多数のRNAについてのバイオマーカープロファイルを決定するのに特に有用である。

【0045】

機械的合成法を使用してこれらのアレイを合成するための技法は、例えば、米国特許第5,384,261号に記載されている。平面アレイ表面が一般に使用されるが、アレイは、実質的に任意の形状の表面、またはさらには多数の表面上に製作することができる。アレイは、ビーズ、ゲル、ポリマー表面、繊維（光ファイバーなど）、ガラス、または任意の他の適切な基板上の核酸（またはペプチド）であり得る。例えば、それぞれその全体が参照により組み込まれている、米国特許第5,770,358号、同第5,789,162号、同第5,708,153号、同第6,040,193号、および同第5,800,992号を参照。アレイは、診断またはすべてを含むデバイスの他の操作を可能にするような様式で包装され得る。例えば、それぞれその全体が参照により組み込まれている、米国特許第5,856,174号および同第5,922,591号を参照。

【0046】

遺伝子発現の連続分析（SAGE）が、一実施形態では、本明細書に記載の方法において採用される。SAGEは、各転写物のために個々のハイブリダイゼーションプローブを準備する必要なく、多数の遺伝子転写物の同時かつ定量的な分析を可能にする方法である。最初に、転写物をユニークに同定するのに十分な情報を含む短い配列タグ（約10～14bp）が生成され、ただし、タグは、各転写物内のユニークな位置から得られる。次いで、多くの転写物が一緒に連結されて長い連続分子が形成され、それを配列決定し、同時に複数のタグの実体（identity）を明らかにすることができる。転写物の任意の集団の発現パターンを、個々のタグの存在量を決定し、各タグに対応する遺伝子を同定することによって定量的に評価することができる。その全体が参照により組み込まれている、Velculescuら、Science、270巻：484～87頁、1995年；Cell、88巻：243～51頁、1997年を参照。

【0047】

核酸レベルでのバイオマーカーレベル分析の追加の方法は、Brennerら（その全体が参照により組み込まれている、Nat. Biotech.、18巻：630～34頁、2000年）によって記載されているような、配列決定法、例えば、RNAseq、次世代配列決定、および大規模並列処理特徴配列決定（MPSS）の使用である。これは、非ゲルベースシグネチャー配列決定を、別個の直径5μmのマイクロビーズ上の数百万の鋳型のin vitroクローニングと組み合わせる配列決定手法である。最初に、DNA鋳型のマイクロビーズライブラリーが、in vitroクローニングによって構築される。この後に、高密度で（典型的には 3.0×10^6 マイクロビーズ/cm² 超）、フローセル内で鋳型含有マイクロビーズの平面アレイがアセンブルされる。各マイクロビーズ上のクローニングされた鋳型の遊離端が、DNA断片分離を必要としない蛍光ベースシグネチャー配列決定法を使用して同時に分析される。この方法は、酵母cDNAライブラリーから数十万の遺伝子シグネチャー配列を単一のオペレーションで同時かつ正確にもたらすことを示した。

【0048】

免疫組織化学検査法も本発明のバイオマーカーのレベルを検出するのに適している。試料を後の調製のために凍結させ、または固定液中に直ちにを入れることができる。組織試料を、試薬、例えば、ホルマリン、グルタルアルデヒド（gluteraldehyde）、メタノールなどで処理することによって固定し、パラフィンに包埋することができる。ホルマリン固定

パラフィン包埋組織試料から免疫組織化学的分析のためのスライドを調製するための方法は、当技術分野で周知である。

【0049】

一実施形態では、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6のバイオマーカー（またはそのサブセット、例えば、5～20、5～30、5～40のバイオマーカー）のレベルは、試料中のすべてのRNA転写物、もしくはこれらの非天然cDNA発現産物、もしくはタンパク質産物、または試料中のRNA転写物の参照セット、もしくはこれらの非天然cDNA発現産物の参照セット、もしくはこれらのタンパク質産物の参照セットの発現レベルに対して正規化される。

【0050】

全体にわたって示されているように、本明細書に示した方法は、患者の肺がんサブタイプを決定するための方法を提供する。バイオマーカーレベルが、例えば、非天然cDNAバイオマーカーレベルまたは非天然mRNA-cDNAバイオマーカー複合体を測定することによって決定されると、バイオマーカーレベルを、例えば、検出されたレベルの統計的方法または直接比較を使用して参照値または参照試料と比較することで、肺がん分子サブタイプの決定が行われる。比較に基づいて、患者の肺がん試料は、例えば、神経内分泌、扁平上皮癌、腺癌として分類される。別の実施形態では、比較に基づいて、患者の肺がん試料は、扁平上皮癌、腺癌、または小細胞癌として分類される。別の実施形態では、比較に基づいて、患者の肺がん試料は、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、またはカルチノイド肺がんとして分類される。

【0051】

一実施形態では、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値は、少なくとも1つの試料訓練セットからの参照ハイブリダイゼーション値（複数可）と比較され、ここで、少なくとも1つの試料訓練セットは、参照試料（複数可）からのハイブリダイゼーション値を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの試料訓練セットは、腺癌試料、扁平上皮癌試料、神経内分泌試料、小細胞肺癌試料、カルチノイド肺がん試料、またはこれらの組合せからの、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、または表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を含む。別の実施形態では、少なくとも1つの試料訓練セットは、以下の表Aに提供した参照試料からの、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、表6の少なくとも5種のクラシファイヤーバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を含む。

【表 A】

| 表A.本発明の様々な試料訓練セット実施形態 | | |
|-----------------------|---|--|
| 少なくとも1つの試料訓練セット | 参照試料ハイブリダイゼーション値の起源 | 肺がんサブタイピング法 |
| 実施形態1 | 腺癌参照試料および/または扁平上皮癌参照試料 | 患者試料が腺癌または扁平上皮癌であるかどうかの評価 |
| 実施形態2 | 腺癌参照試料、扁平上皮癌参照試料、および/または神経内分泌参照試料 | 患者試料が腺癌、扁平上皮癌、または神経内分泌試料であるかどうかの評価 |
| 実施形態3 | 腺癌参照試料、扁平上皮癌参照試料、小細胞癌参照、および/またはカルチノイド参照試料 | 患者試料が腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌試料、またはカルチノイドであるかどうかの評価 |

10

【0052】

20

バイオマーカーの検出されたレベルを参照値および/または参照試料と比較するための方法が、本明細書に提供されている。この比較に基づいて、一実施形態では、被験体の試料から得たバイオマーカーレベルと参照値との間の相関が得られる。次いで肺がんサブタイプの評価が行われる。

【0053】

様々な統計的方法を、患者から得られるバイオマーカーレベルと、例えば、少なくとも1つの試料訓練セットからの参照バイオマーカーレベルとの比較を助けるのに使用することができる。

【0054】

一実施形態では、教師ありパターン認識法 (supervised pattern recognition method) が採用される。教師ありパターン認識法の例として、それだけに限らないが、最短重心法 (nearest centroid method) (Dabney (2005年)、Bioinformatics、21巻(22号): 4148~4154頁、およびTibshiraniら(2002年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99巻(10号): 6576~6572頁); クラス分析のソフト独立型モデリング (SIMCA) (例えば、Wold、1976年を参照); 部分最小二乗分析 (PLS) (例えば、Wold、1966年; Joreskog、1982年; Frank、1984年; Bro, R.、1997年を参照); 線形判別分析 (LDA) (例えば、Nillson、1965年を参照); K - 最近接分析 (KNN) (例えば、Brownら、1996年を参照); 人工ニューラルネットワーク (ANN) (例えば、Wasserman、1989年; Ankerら、1992年; Hare、1994年を参照); 確率的ニューラルネットワーク (PNN) (例えば、Parzen、1962年; Bishop、1995年; Speckt、1990年; Broomheadら、1988年; Patterson、1996年を参照); 規則誘導 (RI) (例えば、Quinlan、1986年を参照); およびベイジアン法 (例えば、Bretthorst、1990年a、1990年b、1988年を参照) を挙げることができる。一実施形態では、遺伝子発現データに基づいて腫瘍サブタイプを同定するためのクラシファイヤーは、そのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれている、Mullinsら(2007年)、Clin Chem.、53巻(7号): 1273~9頁に記載された重心ベース法である。

30

40

【0055】

他の実施形態では、教師なし訓練手法が採用され、したがって、訓練セットは使用されない。

50

【0056】

再び教師あり学習手法について試料訓練セットに言及すると、一部の実施形態では、試料訓練セット（複数可）は、腺癌試料からのクラシファイヤーバイオマーカーのすべて（例えば、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、表6のいずれかのすべてのクラシファイヤーバイオマーカー）の発現データを含むことができる。一部の実施形態では、試料訓練セット（複数可）は、扁平上皮癌試料、腺癌試料、および/または神経内分泌試料からのクラシファイヤーバイオマーカーのすべて（例えば、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、表6のいずれかのすべてのクラシファイヤーバイオマーカー）の発現データを含むことができる。一部の実施形態では、試料訓練セット（複数可）は、試料間変動を除去するために正規化される。

10

【0057】

一部の実施形態では、比較することは、パラメトリックであってもノンパラメトリックであってもよい、例えば任意の適当な多変量統計分析モデルなどの統計的アルゴリズムを適用することを含み得る。一部の実施形態では、統計的なアルゴリズムを適用することは、ヒト肺組織試料から得た発現データと、腺癌および扁平上皮癌訓練セット（複数可）からの発現データとの間の相関を決定することを含むことができる。一部の実施形態では、（例えば）、一個抜き交差検証（LOOCV）などの交差検証が実施される。一部の実施形態では、積分相関が実施される。一部の実施形態では、スピアマン相関が実施される。一部の実施形態では、重心ベース法が、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Mullinsら（2007年）、Clin Chem.、53巻（7号）：1273～9頁に記載されているように、かつ遺伝子発現データに基づいて統計的アルゴリズムのために採用される。

20

【0058】

被験体に由来する試料（検査試料）に対して実施された遺伝子発現の結果は、生体試料（複数可）、または正常であると分かっている、もしくは疑われる生体試料（複数可）（「参照試料」もしくは「正常試料」、例えば、非腺癌試料）に由来するデータと比較することができる。別の実施形態では、参照試料または参照バイオマーカーレベルデータは、肺がんサブタイプ、例えば、腺癌、扁平上皮癌、神経内分泌、小細胞癌、および/またはカルチノイドを有することが分かっている個体から得られ、またはそれに由来する。

【0059】

参照試料は、検査試料と同じ時間または異なる時間にアッセイされ得る。代わりに、参照試料からのバイオマーカーレベル情報を、後日アクセスするためにデータベースまたは他の手段に保管してもよい。

30

【0060】

検査試料に対するアッセイのバイオマーカーレベル結果を、参照試料に対する同じアッセイの結果と比較することができる。一部の 경우에는、参照試料に対するアッセイの結果は、データベースまたは参照値（複数可）からのものである。一部の 경우에는、参照試料に対するアッセイの結果は、当業者によって公知の、または一般に認められている値または値の範囲である。一部の 경우에는、比較は定性的である。他の 경우에는、比較は定量的である。一部の 경우에는、定性的比較または定量的比較は、それだけに限らないが、以下の1つまたは複数を伴い得る：蛍光値、スポット強度、吸光度値、化学発光シグナル、ヒストグラム、臨界閾値、統計的有意性値、本明細書に記載の遺伝子の発現レベル、mRNAコピー数を比較すること。

40

【0061】

一実施形態では、オッズ比（OR）が、各バイオマーカーレベルパネル測定値について計算される。ここで、ORは、患者の測定されたバイオマーカー値とアウトカム、例えば、肺がんサブタイプとの間の関連性の尺度である。例えば、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry、2010年；19巻（3号）：227～229頁を参照。

【0062】

50

一実施形態では、指定された統計的信頼水準が、肺がんサブタイプに関する信頼水準をもたらすために決定され得る。例えば、90%超の信頼水準が、肺がんサブタイプの有用な予測因子であり得ると決定される場合がある。他の実施形態では、ある程度ストリンジエントな信頼水準が選択され得る。例えば、約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、または99.9%または少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、または99.9%の信頼水準が選択され得る。もたらされる信頼水準は、一部の 경우에는、試料の品質、データの品質、分析の品質、使用される具体的な方法、および/または分析される遺伝子発現値の数(すなわち、遺伝子の数)に関連している場合がある。応答の尤度をもたらすための指定された信頼水準は、偽陽性または偽陰性の予期された数に基づいて選択され得る。指定された信頼水準を実現し、または診断力を伴ったマーカーを同定するためにパラメーターを選択するための方法は、それだけに限らないが、受信者動作特性(ROC)曲線分析、バイノーマルROC、主成分分析、オッズ比分析、部分最小二乗分析、特異値分解、最小絶対収縮および選択演算子分析(selection operator analysis)、最小角回帰、および閾値勾配による正則化(threshold gradient directed regularization)法が挙げられる。

10

【0063】

肺がんサブタイプの決定は、一部の 경우에는、バイオマーカーレベルデータを正規化するおよび/またはバイオマーカーレベルデータの信頼性を改善するように設計されたアルゴリズムの適用によって改善される。本発明の一部の実施形態では、データ分析は、処理される個々のデータ点が多数であることに起因して、本明細書に記載の様々なアルゴリズムを適用するために、コンピューターまたは他のデバイス、機械または装置を利用する。「機械学習アルゴリズム」は、例えば、肺がんサブタイプを決定するために1つまたは複数のバイオマーカーレベルプロファイルの特徴付けるのに採用される、「クラシファイヤー」としても当業者に公知の計算ベースの予測方法を指す。例えば、マイクロアレイベースハイブリダイゼーションアッセイ、配列決定アッセイ、NanoStringアッセイなどによって決定されるバイオマーカーレベルは、一実施形態では、プロファイルを分類するためにアルゴリズムにかけられる。教師あり学習では、一般に、クラスの中の相違(例えば、腺癌陽性、腺癌陰性、扁平上皮癌陽性、扁平上皮癌陰性、神経内分泌陽性、神経内分泌陰性、小細胞癌陽性、小細胞癌陰性、カルチノイド陽性、カルチノイド陰性)を認識するためにクラシファイヤーを「訓練し」、次いで独立した検査セットでクラシファイヤーの精度を「検査する」。新しい未知の試料について、クラシファイヤーを使用して、例えば、1つまたは複数の特定の試料が属するクラス(例えば、(i)腺癌対扁平上皮癌対神経内分泌、または(ii)腺癌対扁平上皮癌対小細胞癌対カルチノイドなど)を予測することができる。

20

30

【0064】

一部の実施形態では、ロバストなマルチアレイ平均(RMA)法が、未加工データを正規化するのに使用される場合がある。RMA法は、いくつかのマイクロアレイ上のそれぞれのマッチしたセルについてバックグラウンド補正した強度を計算することによって始まる。一実施形態では、バックグラウンド補正值は、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Irizarryら(2003年)、Biostatistics、4月、4巻(2号):249~64頁によって記載されているように正の値に制限される。バックグラウンド補正後、次いで、それぞれのバックグラウンド補正されたマッチしたセルの強度の底2の対数が得られる。次いで、各マイクロアレイについてバックグラウンド補正され、対数変換され、マッチした強度は、分位数正規化法を使用して正規化される。分位数正規化法では、各入力アレイおよび各プローブ値について、アレイパーセンタイルプローブ値が、すべてのアレイパーセンタイル点の平均で置き換えられる。この方法は、その全体が参照により組み込まれている、Bolstadら、Bioinformatics、2003年によってより完全に記載されている。分位数正規化の後、次いで正規化されたデータを線形モデルにフィッ

40

50

ディングして、各マイクロアレイの各プローブについての強度尺度を得ることができる。次いで、Tukeyのメディアンポリッシュアルゴリズム（すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Tukey, J. W., Exploratory Data Analysis, 1977年）を使用して、正規化されたプローブセットデータについて対数スケール強度レベルを決定することができる。

【0065】

様々な他のソフトウェアプログラムを実装することができる。ある特定の方法では、特徴選択およびモデル推定を、glmnetを使用してlassoペナルティを用いてロジスティック回帰によって実施することができる（その全体が参照により組み込まれている、Friedmanら（2010年）、Journal of statistical software、33巻（1号）：1～22頁）。未加工の読みは、TopHatを使用してアラインできる（その全体が参照により組み込まれている、Trapnellら（2009年）、Bioinformatics、25巻（9号）：1105～11頁）。諸方法では、上位の特徴（10～200の範囲のN）が、e1071ライブラリー（その全体が参照により組み込まれている、Meyer D., Support vector machines: the interface to libsvm in package e1071., 2014年）を使用して線形サポートベクターマシン（SVM）（その全体が参照により組み込まれている、Suykens JAK, Vandewalle J., Least Squares Support Vector Machine Classifiers, Neural Processing Letters, 1999年；9巻（3号）：293～300頁）を訓練するのに使用される。信頼区間は、一実施形態では、pROCパッケージ（その全体が参照により組み込まれている、Robin X, Turck N, Hainard Aら、pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves, BMC bioinformatics, 2011年；12巻：77頁）を使用して計算される。

【0066】

さらに、データをフィルタリングして、疑わしいと見なされ得るデータを除去してもよい。一実施形態では、約4、5、6、7、または8未満のグアノシン+シトシンヌクレオチドを有するマイクロアレイプローブに由来するデータは、これらの異常なハイブリダイゼーション傾向または二次構造問題に起因して信頼できないと見なされる場合がある。同様に、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22超のグアノシン+シトシンヌクレオチドを有するマイクロアレイプローブに由来するデータは、これらの異常なハイブリダイゼーション傾向または二次構造問題に起因して信頼できないと一実施形態では見なされる場合がある。

【0067】

本発明の一部の実施形態では、プローブセットからのデータは、これらが検出可能なレベル（バックグラウンドより上）で同定されない場合、分析から除外され得る。

【0068】

本開示の一部の実施形態では、分散を呈さない、または低い分散を呈するプローブセットは、さらなる分析から除外され得る。低分散プローブセットは、カイ二乗検定を介して分析から除外される。一実施形態では、プローブセットは、その変換された分散が、 $(N-1)$ 自由度を有するカイ二乗分布の99パーセント信頼区間の左にある場合、低分散であると見なされる。 $(N-1) * \text{プローブセット分散} / (\text{遺伝子プローブセット分散})$ 。Chi-Sq $(N-1)$ について、Nが、入力CELファイルの数である場合、 $(N-1)$ は、カイ二乗分布の自由度であり、「遺伝子についてのプローブセット分散」は、遺伝子にわたるプローブセット分散の平均である。本発明の一部の実施形態では、所与のmRNAまたはmRNAの群についてのプローブセットは、これらが、GC含有量、信頼性、分散などについて以前に記載したフィルターステップを通過する最小数未満のプローブを含有する場合、さらなる分析から除外される場合がある。例えば、一部の実施形態では、所与の遺伝子または転写物クラスターについてのプローブセットは、これらが、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15未満、または約20未満のプローブを含有する場合、さらなる分析から除外され得る。

【0069】

10

20

30

40

50

バイオマーカーレベルデータ分析の方法は、一実施形態では、本明細書に提供される特徴選択アルゴリズムの使用をさらに含む。本発明の一部の実施形態では、特徴選択は、LIMMAソフトウェアパッケージ（すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Smyth, G. K. (2005年)、Limma: linear models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber(編)、Springer, New York、397～420頁）を使用することによってもたらされる。

【0070】

バイオマーカーレベルデータ分析の方法は、一実施形態では、プレクラシファイヤーアルゴリズム (pre-classifier algorithm) の使用を含む。例えば、アルゴリズムは、特異的分子フィンガープリントを使用して、試料をこれらの組成に従って予め分類し、次いで補正/正規化因子を適用することができる。次いでこのデータ/情報を、最終的な分類アルゴリズムに送ることができ、このアルゴリズムは、その情報を組み込んで最終的な診断を助ける。

【0071】

バイオマーカーレベルデータ分析の方法は、一実施形態では、本明細書に提供されるクラシファイヤーアルゴリズムの使用をさらに含む。本発明の一実施形態では、対角線形判別分析 (diagonal linear discriminant analysis)、k - 近傍法、サポートベクターマシン (SVM) アルゴリズム、線形サポートベクターマシン、ランダムフォレストアルゴリズム、もしくは確率モデルベース法、またはこれらの組合せが、マイクロアレイデータを分類するために提供される。一部の実施形態では、試料（例えば、様々なバイオマーカーレベルプロファイルの、様々な肺がんサブタイプの、および/または腺癌の様々な分子サブタイプの）を区別する同定されたマーカーは、目的のクラス間のバイオマーカーレベルの差異の統計的有意性に基づいて選択される。一部の 경우에는、統計的有意性は、偽発見率 (FDR) についての Benjamin Hochberg または別の補正を適用することによって調整される。

【0072】

一部の 場合には、クラシファイヤーアルゴリズムは、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Fishel および Kaufman ら、2007 年、Bioinformatics、23 巻 (13 号) : 1599～606 頁に記載されたものなどのメタ分析手法を追加されている場合がある。一部の 場合には、クラシファイヤーアルゴリズムは、再現性分析などのメタ分析手法を追加されている場合がある。

【0073】

バイオマーカーレベルデータの分析に事後確率を導出および適用するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、すべての目的に関してその全体が参照により組み込まれている、Smyth, G. K.、2004 年、Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.、3 巻 : 論文 3 に記載されている。一部の 場合には、事後確率を本発明の方法において使用して、クラシファイヤーアルゴリズムによって提供されるマーカーをランク付けすることができる。

【0074】

バイオマーカーレベルプロファイリングの結果の統計的評価は、肺がんサブタイプ（例えば、腺癌、扁平上皮癌、神経内分泌、小細胞癌、カルチノイド）を示す 1 つまたは複数の定量的値をもたらし得る。一実施形態では、データは、患者ケアを指導するのにその最も有用な形態で医師に直接提示され、または臨床試験における患者集団もしくは所与の薬物投与についての患者集団を定義するのに使用される。分子プロファイリングの結果は、それだけに限らないが、スチューデント T 検定、両側 T 検定、ピアソン順位和分析、隠れマルコフモデル分析、q - q プロットの分析、主成分分析、一元配置 ANOVA、二元配置 ANOVA、LIMMA などを含めた当技術分野で公知のいくつかの方法を使用して統計的に評価することができる。

【0075】

一部の場合では、精度は、元の診断の精度を決定するために経時的に被験体を追跡することによって決定され得る。他の場合では、精度は、確定的な様式で、または統計的方法を使用して確立され得る。例えば、受信者動作特性（ROC）分析を使用することによって、最適なアッセイパラメーターを決定して、具体的なレベルの精度、特異性、正の予測値、負の予測値、および/または偽発見率を実現することができる。

【0076】

一部の場合では、バイオマーカーレベルプロファイリングアッセイの結果は、分子プロファイリング事業、個人、医療提供者、または保険提供者の代表またはエージェントによるアクセスのためにデータベースに入力される。一部の場合では、アッセイ結果は、医療専門家などの事業の代表、エージェント、またはコンサルタントによる試料分類、同定、または診断を含む。他の場合では、データのコンピューター分析またはアルゴリズム分析は、自動的に提供される。一部の場合では、分子プロファイリング事業は、個人、保険提供者、医療提供者、研究者、または政府機関に、実施される分子プロファイリングアッセイ、コンサルティングサービス、データ分析、結果の報告、またはデータベースアクセスのうちの1つまたは複数について対価請求する場合がある。

【0077】

本発明の一部の実施形態では、バイオマーカーレベルプロファイリングアッセイの結果は、コンピュータースクリーンでの報告として、または紙の記録として提示される。一部の実施形態では、報告は、それだけに限らないが、参照試料または参照値（複数可）と比較したバイオマーカーのレベル（例えば、コピー数または蛍光強度などによって報告される）；肺がんサブタイプ、提案される療法のうちの1つまたは複数などの情報を含み得る。

【0078】

一実施形態では、クラシファイヤーバイオマーカープロファイリングの結果は、腺癌陽性、腺癌陰性、扁平上皮癌陽性、扁平上皮癌陰性、神経内分泌陽性、神経内分泌陰性、小細胞癌陽性、小細胞癌陰性、カルチノイド陽性、カルチノイド陰性、またはこれらの組合せのうちの1つまたは複数に分類することができる。

【0079】

本発明の一部の実施形態では、結果は、訓練されたアルゴリズムを使用して分類される。本発明の訓練されたアルゴリズムには、既知の遺伝子発現値および/または正常試料、例えば、腺癌の特定の分子サブタイプと診断された個体からの試料の参照セットを使用して開発されたアルゴリズムが含まれる。一部の場合では、既知の遺伝子発現値の参照セットは、肺がんの特定の分子サブタイプと診断された個体から得られる。

【0080】

試料のカテゴリー化に適したアルゴリズムとしては、それだけに限らないが、k-近傍法、サポートベクターマシン、線形判別分析、対角線形判別分析、アップダウン、ナイーブベジアンアルゴリズム、ニューラルネットワークアルゴリズム、隠れマルコフモデルアルゴリズム、遺伝的アルゴリズム、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

【0081】

バイナリークラシファイヤーが実際の真の値（例えば、生体試料からの値）と比較されるとき、典型的には4つの可能なアウトカムがある。予測からのアウトカムが、p（「p」は、欠失症候群または重複症候群の存在などの陽性のクラシファイヤー出力である）であり、実際の値もpである場合、それは、真の陽性（TP）と呼ばれるが、実際の値がnである場合、それは、偽陽性（FP）と言われる。反対に、予測アウトカムおよび実際の値の両方がn（「n」は、欠失症候群または重複症候群なしなどの陰性のクラシファイヤー出力である）であるとき、真の陰性が起こっており、偽陰性は、予測アウトカムがnであり、一方、実際の値がpであるときである。一実施形態では、肺がんの分子サブタイプを決定しようとする検査を考慮されたい。この場合において偽陽性は、人が、彼または彼女が実際には有していない分子サブタイプについて検査結果を得るとき起こる。他方において偽陰性は、試料が実際には特定の肺がんサブタイプとして特徴付けられるべきである

肺がん試料であるのに、人が陰性の検査結果を得、試料が特定の肺がんサブタイプでないと示唆されるとき起こる。

【0082】

陽性予測値 (P P V)、または精密度 (precision rate)、または疾患の検査後確率は、正しい肺がんサブタイプと診断される被験体の割合である。これは、陽性の検査が、検査されている基礎状態を反映する確率を反映する。しかしその値は、変動し得る疾患の有病率に依存する。一例では、以下の特性が提供される： F P (偽陽性)； T N (真の陰性)； T P (真の陽性)； F N (偽陰性)。偽陽性率 () = $F P / (F P + T N)$ - 特異性；偽陰性率 () = $F N / (T P + F N)$ - 感度；検出力 = 感度 = $1 -$ ；尤度比陽性 = 感度 / ($1 -$ 特異性)；尤度比陰性 = ($1 -$ 感度) / 特異性。陰性予測値 (N P V) は、正しく診断されている陰性試験結果を有する被験体の割合である。

10

【0083】

一部の実施形態では、主題方法のバイオマーカーレベル分析の結果は、所与の診断が正しい統計的信頼水準をもたらす。一部の実施形態では、このような統計的信頼水準は、少なくとも約 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、または約 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % 超、またはそれ超である。

【0084】

一部の実施形態では、本方法は、試料中のバイオマーカーレベルと、例えば、少なくとも 1 つの訓練セット中に存在する参照バイオマーカーレベルとの比較に基づいて特定の肺がんサブタイプとして肺組織試料を分類することをさらに含む。一部の実施形態では、肺組織試料は、比較の結果が、1 つまたは複数の判定基準、例えば、例えば、最小パーセント合致、(例えば) カッパ統計量などのパーセンテージ合致に基づいて計算される統計量の値、最小相関 (例えば、ピアソン相関) などを満たす場合、特定のサブタイプとして分類される。

20

【0085】

本明細書に記載の方法は、ソフトウェア (メモリーに記憶され、かつ / もしくはハードウェアで実行される)、ハードウェア、またはこれらの組合せによって実施され得ることが意図されている。ハードウェアモジュールは、例えば、汎用プロセッサ、フィールドプログラマブルゲートアレイ (F P G A)、および / もしくは特定用途向け集積回路 (A S I C) を含む得る。ソフトウェアモジュール (ハードウェアで実行される) は、U n i x ユーティリティ (登録商標)、C、C + +、J a v a (登録商標)、R u b y、S Q L、S A S (登録商標)、R プログラミング言語 / ソフトウェア環境、ビジュアルベーシック (商標)、ならびに他のオブジェクト指向の、手続型の、または他のプログラミング言語および開発ツールを含めた様々なソフトウェア言語 (例えば、コンピューターコード) で表現することができる。コンピューターコードの例としては、それだけに限らないが、コンパイラによって生成されるものなどの、マイクロコードまたはマイクロインストラクション、マシンインストラクション、ウェブサービスを作製するのに使用されるコード、およびインタープリターを使用してコンピューターによって実行されるより高いレベルのインストラクションを含有するファイルが挙げられる。コンピューターコードの追加の例としては、それだけに限らないが、制御信号、暗号化されたコード、および圧縮コードが挙げられる。

30

40

【0086】

本明細書に記載の一部の実施形態は、本明細書に開示の様々なコンピューターで実装される操作および / もしくは方法を実施するためにインストラクションまたはコンピューターコードを有する非一時的なコンピューター可読媒体 (非一時的プロセッサ可読媒体またはメモリーと呼ぶこともできる) を伴ったデバイスに関する。コンピューター可読媒体 (またはプロセッサ可読媒体) は、それがそれ自体で一時的伝搬信号 (例えば、空間またはケーブルなどの伝送媒体で情報を搬送する伝搬電磁波) を含まないという意味で非一時的である。媒体およびコンピューターコード (コードと呼ぶこともできる) は、1 つまた

50

は複数の具体的な目的のために設計および構築されたものであり得る。非一時的コンピューター可読媒体の例としては、それだけに限らないが、磁気記憶媒体、例えば、ハードディスク、フロッピーディスク（登録商標）、および磁気テープ；コンパクトディスク/デジタルビデオディスク（CD/DVD）などの光記憶媒体、コンパクトディスク-リードオンリーメモリー（CD-ROM）、およびホログラフィックデバイス；光ディスクなどの光磁気記憶媒体；搬送波信号処理モジュール（carrier wave signal processing module）；ならびにプログラムコードを記憶および実行するように特別に構成されているハードウェアデバイス、例えば、特定用途向け集積回路（ASIC）、プログラマブルロジックデバイス（PLD）、リードオンリーメモリー（ROM）、およびランダムアクセスメモリー（RAM）デバイスが挙げられる。本明細書に記載の他の実施形態は、例えば、本明細書に論じたインストラクションおよび/またはコンピューターコードを含むことができるコンピュータープログラム産物に関する。

10

【0087】

一部の実施形態では、少なくとも5種のバイオマーカー、約5～約20種のバイオマーカー、約5～約50種のバイオマーカー、約5～約40種のバイオマーカー、または約5～約30種のバイオマーカー（例えば、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、および表6に開示したような）は、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大で100%、および間のすべての値の予測成功率で肺がんのタイプおよび/またはサブタイプを分類することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示のバイオマーカーの任意の組合せ（例えば、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、および表6、ならびにこれらのサブコンビネーションにおける）を使用して、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大で100%、および間のすべての値の予測成功率を得ることができる。

20

30

【0088】

一部の実施形態では、少なくとも5種のバイオマーカー、約5～約20種のバイオマーカー、約5～約50種のバイオマーカー、約5～約40種のバイオマーカー、または約5～約30種のバイオマーカー（例えば、表1A、表1B、表1C、表2、表3、表4、表5、および表6に開示したような）は、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大で100%、および間のすべての値の感度または特異性で肺がんタイプおよび/またはサブタイプを分類することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示のバイオマーカーの任意の組合せを使用して、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大で100%、および間のすべての値の感度または特異性を得ることができる。

40

【0089】

一部の実施形態では、本発明の方法を实践するための1つまたは複数のキットがさらに提供されている。キットは、クラシファイヤーバイオマーカーのバイオマーカーレベルを

50

検出するための少なくとも１種の試薬、例えば、抗体、核酸プローブまたはプライマーを含む任意の製造品（例えば、パッケージまたは容器）を包含することができる。キットは、本発明の方法を実施するためのユニットとして販売促進し、流通させ、または販売することができる。さらに、キットは、キットおよびその使用のための方法を記載している添付文書を含むことができる。

【００９０】

一実施形態では、患者の肺がんサブタイプを決定すると、患者は、適当な療法、例えば、血管新生阻害剤を用いた化学療法または薬物療法について選択される。一実施形態では、療法は、血管新生阻害剤療法であり、血管新生阻害剤は、血管内皮成長因子（VEGF）阻害剤、VEGF受容体阻害剤、血小板由来成長因子（PDGF）阻害剤、またはPDGF受容体阻害剤である。

10

【００９１】

別の実施形態では、血管新生阻害剤は、インテグリンアンタゴニスト、セレクトインアンタゴニスト、接着分子アンタゴニスト（例えば、細胞間接着分子（ICAM）- 1、ICAM - 2、ICAM - 3、血小板内皮接着分子（PCAM）、血管細胞接着分子（VCAM）のアンタゴニスト）、リンパ球機能関連抗原 1（LFA - 1）のアンタゴニスト）、塩基性線維芽細胞成長因子アンタゴニスト、血管内皮成長因子（VEGF）モジュレーター、または血小板由来成長因子（PDGF）モジュレーター（例えば、PDGFアンタゴニスト）である。

【００９２】

一実施形態では、上記に示したように、患者の肺がんサブタイプを決定すると、患者は、適当な療法、例えば、血管新生阻害剤を用いた化学療法または薬物療法について選択される。一実施形態では、血管新生阻害剤は、インターフェロンガンマ 1、ビルフェニドンを伴ったインターフェロンガンマ 1（Actimmune（登録商標））、ACUHTR028、V 5、アミノ安息香酸カリウム、アミロイド P、ANG1122、ANG1170、ANG3062、ANG3281、ANG3298、ANG4011、抗CTGF RNAi、アブリジン、サルビアおよびチョウセンゴミシ（schisandra chinensis）を伴ったキバナオウギ（astragalus membranaceus）抽出物、アテローム硬化性プラークブロッカー、アゾル（Azol）、AZX100、BB3、結合組織成長因子抗体、CT140、ダナゾール、エスプリエット、EXC001、EXC002、EXC003、EXC004、EXC005、F647、FG3019、フィブロコリン、フォリスタチン、FT011、ガレクチン - 3 阻害剤、GKT137831、GMCT01、GMCT02、GRMD01、GRMD02、GRN510、ヘベロン（Heberon）アルファ R、インターフェロン - 2、ITMN520、JKB119、JKB121、JKB122、KRX168、LPA1 受容体アンタゴニスト、MGN4220、MIA2、マイクロRNA 29a オリゴヌクレオチド、MMI0100、ノスカピン、PBI4050、PBI4419、PDGFR 阻害剤、PF - 06473871、PGN0052、ピレスバ、ビルフェネックス、ビルフェニドン、プリチデブシン、PRM151、Px102、PYN17、PYN17 を伴った PYN22、レリベルゲン、rhPTX2 融合タンパク質、RXI109、セクレチン、STX100、TGF - 阻害剤、トランスフォーミング成長因子、 - 受容体 2 オリゴヌクレオチド、VA999260、XV615、エンドスタチン、XVII型コラーゲンに由来する 20kDa C 末端断片、アンギオスタチン（プラスミンの 38kDa 断片）、またはタンパク質のトロンボスポンジン（TSP）ファミリーのメンバーのうちの 1 種または複数種である。さらなる実施形態では、血管新生阻害剤は、TSP - 1、TSP - 2、TSP - 3、TSP - 4、および TSP - 5 である。

20

30

40

【００９３】

一実施形態では、療法は、可溶性 VEGF 受容体、例えば、可溶性 VEGFR - 1 およびニューロピリン 1（NPR1）、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2、バソスタチン、カルレティキュリン、血小板因子 - 4、メタロプロテイナーゼの組織阻害剤（

50

TIMP) (例えば、TIMP 1、TIMP 2、TIMP 3、TIMP 4)、軟骨由来血管新生阻害剤 (例えば、ペプチドトロポニン I およびコンドロモジュリン I (chondromodulin I)、トロンボスポンジンモチーフ 1 を伴ったディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ、インターフェロン (IFN) (例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、ケモカイン、例えば、C-X-C モチーフを有するケモカイン (例えば、インターフェロンガンマ誘導タンパク質 10 または小誘導性サイトカイン B 10 としても公知の CXCL10)、インターロイキンサイトカイン (例えば、IL-4、IL-12、IL-18)、プロトンピン、抗プロトンピン II 断片、プロラクチン、TNFSF15 遺伝子によってコードされるタンパク質、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンギオスタチン、エンドスタチン、バソスタチン、トロンボスポンジン、カルレティキュリン、血小板因子-4、TIMP、CD41、インターフェロン α 、インターフェロン β 、血管内皮成長因子阻害剤 (VEGF) メタ-1、メタ-2、プロラクチン、VEGF、SPARC、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質 (PRP)、レスチン、TSP-1、TSP-2、インターフェロンガンマ1、ACUHTR028、V β 5、アミノ安息香酸カリウム、アミロイド P、ANG1122、ANG1170、ANG3062、ANG3281、ANG3298、ANG4011、抗CTGFRNAi、アブリジン、サルビアおよびチョウセンゴミシを伴ったキバナオウギ抽出物、アテローム硬化性プラークブロッカー、アゾル、AZX100、BB3、結合組織成長因子抗体、CT140、ダナゾール、エスプリエット、EXC001、EXC002、EXC003、EXC004、EXC005、F647、FG3019、フィブロコリン、フォリスタチン、FT011、ガレクチン-3 阻害剤、GKT137831、GMCT01、GMCT02、GRMD01、GRMD02、GRN510、ヘベロンアルファ R、インターフェロン γ -2、ITMN520、JKB119、JKB121、JKB122、KRX168、LPA1 受容体アンタゴニスト、MGN4220、MIA2、マイクロRNA 29a オリゴヌクレオチド、MMI0100、ノスカピン、PBI4050、PBI4419、PDGFR 阻害剤、PF-06473871、PGN0052、ピレスパ、ピルフェネックス、ピルフェニドン、プリチデブシン、PRM151、Px102、PYN17、PYN17 を伴った PYN22、レリベルゲン、rhPTX2 融合タンパク質、RXI109、セクレチン、STX100、TGF- β 阻害剤、トランスフォーミング成長因子、 α -受容体 2 オリゴヌクレオチド、VA999260、XV615、またはこれらの組合せである。

10

20

30

40

50

【0094】

さらに別の実施形態では、患者の肺がんサブタイプを決定すると、患者は、パゾパニブ (ヴォトリエント)、スニチニブ (スーテント)、ソラフェニブ (ネクサバル)、アキシチニブ (インライタ)、ボナチニブ (アイクルシグ)、バンデタニブ (カブレルサ)、カボザンチニブ (コメトリク (Cometrig))、ラムシルマブ (サイラムザ)、レゴラフェニブ (スチパーガ)、ziv-アフリベルセプト (ザルトラップ)、またはこれらの組合せを用いた適当な療法について選択される。さらに別の実施形態では、患者の肺がんサブタイプを決定すると、患者は、VEGF 阻害剤を用いた適当な療法について選択される。さらなる実施形態では、VEGF 阻害剤は、アキシチニブ、カボザンチニブ、アフリベルセプト、プリバニブ、チボザニブ、ラムシルマブ、またはモテサニブである。なおさらなる実施形態では、VEGF 阻害剤は、モテサニブである。

【0095】

さらに別の実施形態では、患者の肺がんサブタイプを決定すると、患者は、血小板由来成長因子 (PDGF) アンタゴニストを用いた適当な療法について選択される。例えば、PDGF アンタゴニストは、一実施形態では、抗 PDGF アプタマー、抗 PDGF 抗体もしくはその断片、抗 PDGF 受容体抗体もしくはその断片、または低分子アンタゴニストである。一実施形態では、PDGF アンタゴニストは、PDGFR- α または PDGFR- β のアンタゴニストである。一実施形態では、PDGF アンタゴニストは、抗 PDGF

- アブタマー E 1 0 0 3 0、スニチニブ、アキシチニブ、ソラフェニブ (sorefenib)、イマチニブ、イマチニブメシル酸塩、ニンテダニブ、パゾパニブ H C 1、ボナチニブ、M K - 2 4 6 1、ドビチニブ、パゾパニブ、クレノラニブ、P P - 1 2 1、テラチニブ、イマチニブ、K R N 6 3 3、C P 6 7 3 4 5 1、T S U - 6 8、K i 8 7 5 1、アムバチニブ、チボザニブ、マシチニブ、モテサニブニリン酸塩、ドビチニブニ乳酸、リニファニブ (A B T - 8 6 9) である。

【実施例】

【0096】

本発明を、以下の実施例を参照することによってさらに例示する。しかし、これらの実施例は、上述した実施形態のように、例示的であり、本発明の範囲を制限すると決して解釈されるべきでないことに留意されるべきである。

方法

【0097】

2, 168の肺がん試料を含むいくつかの公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データセット (TCGA、NCI、UNC、Duke、Expo、Seoul、Tokyo、およびFrance) をアセンブルして、肺腫瘍の形態学的分類を補完するように開発された57の遺伝子発現肺サブタイプパネル (LSP) をバリデートした。LSPは、52の肺腫瘍分類遺伝子+5つのハウスキーピング遺伝子を含んでいた。遺伝子発現データおよび肺腫瘍形態学的分類の両方を有するデータセットを選択した。ゲノムデータの3つのカテゴリーを、データセット: Affymetrix U133+2 (n=883) (「A-833」とも呼ばれる)、Agilent 44K (n=334) (「A-334」とも呼ばれる)、およびIllumina RNAseq (n=951) (「I-951」とも呼ばれる) で表した。データソースを表7に提供し、正規化法を表8に提供する。腺癌、カルチノイド、小細胞癌、および扁平上皮癌の確定診断を有する試料を、分析で使用した。

10

20

【表 7 - 1】

| 表 7.公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データのデータソース | | | | |
|--|-------------------|-----|-------------------------|--|
| ソース | プラットフォーム (複数可) | N | サブタイプ | 参考文献 |
| TCGA ¹ | RNASeq (LUAD) | 528 | 腺癌 | TCGA-DCC |
| TCGA ² | RNASeq (LUSC) | 534 | 扁平上皮 | TCGA-DCC |
| UNC ³ | Agilent_44K | 56 | 56 の扁平上皮 | CCR (2010) PMID: 20643781 |
| UNC ⁴ | Agilent_44K | 116 | 116 の腺癌 | PLoS One (2012) PMID: 22590557 |
| NCI ⁵ | Agilent_44K | 172 | 56 の腺癌、92 の扁平上皮、10 の大細胞 | CCR (2009) |
| Korea ⁶ | HG-U133+2 | 138 | 63 の腺癌、75 の扁平上皮 | CCR (2008) PMID: 19010856 |
| Expo ⁷ | HG-U133+2 | 130 | すべての組織診断サブタイプ | GSE2109 |
| French ⁸ | HG-U133+2 | 307 | すべての組織診断サブタイプ | Sci Transl Med (2013) PMID: 23698379 |
| Duke ⁹ | HG-U133+2 | 118 | 腺癌および扁平上皮 | Nature (2006) PMID: 16273092 |
| Tokyo ¹⁰ | HG-U133+2 | 246 | 腺癌 | PLoS One (2012) PMID: 22080568, 23028479 |
| ¹ https://tcga-data.nci.nih.gov/tcgafiles/ftp_auth/distro_ftpusers/anonymous/tumor/luad/cgcc/unc.edu/illumina_hiseq_rnaseqv2/rnaseqv2/?C=S;O=A ² https://tcga-data.nci.nih.gov/tcgafiles/ftp_auth/distro_ftpusers/anonymous/tumor/lusc/cgcc/unc.edu/illumina_hiseq_rnaseqv2/rnaseqv2/ ³ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17710 ⁴ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26939 ⁵ http://research.agendia.com/ ⁶ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE8894 ⁷ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE2109 ⁸ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30219 ⁹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE3141 | | | | |

10

20

30

40

【表 7 - 2】

| 表 7.公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データのデータソース | | | | |
|---|-------------------|---|-------|------|
| ソース | プラットフォーム (複数可) | N | サブタイプ | 参考文献 |
| ¹⁰ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE31210 | | | | |

10

【表 8】

| 表 8.3 つの公的な遺伝子発現データセットについて使用した正規化法 | | |
|------------------------------------|-------------|---|
| ソース | プラットフォーム | データ前処理/正規化 |
| TCGA | RNASeq | RSEM 発現推定値を、遺伝子レベルについて 1000 で上位四分位数を設定するように正規化し、底 2 の対数変換を行い、データ行列は、中央値を中心にした行(遺伝子)、標準化された列(試料)である。 |
| UNC+NKI | Agilent_44K | 2 つのチャンネル強度の底 2 の対数比を LOWESS 正規化し、データ行列は、中央値を中心にした行(遺伝子)、標準化された列(試料)である。 |
| Affy | HG-U133+2 | MAS5 正規化された 1 つのチャンネル強度を、底 2 の対数変換を行い、データ行列は、中央値を中心にした行(遺伝子)、標準化された列(試料)である。 |

20

30

【0098】

A - 833 データセットを、以前に記載した方法に従って、腺癌、カルチノイド、小細胞癌、および扁平上皮癌遺伝子重心 (gene centroid) を計算するための訓練として使用した。次いで、A - 833 データで訓練された遺伝子重心を正規化された TCGA および A - 334 データセットに適用して、公的に利用可能な遺伝子発現データを使用して肺腫瘍を分類する LSP の能力を調査した。A - 833 訓練重心 (training centroid) を A - 833 データセットに適用するために、評価を、一個抜き (LOO) 交差検証を使用して実施した。スピアマン相関を、A - 833 遺伝子発現訓練重心に対する腫瘍試料遺伝子発現結果について計算した。腫瘍に、最大に相関した重心に対応するゲノム定義の組織学的型 (カルチノイド、小細胞癌、腺癌、および扁平上皮癌) を割り当てた。2 クラス、3 クラス、および 4 クラス予測を探索した。正しい予測を、腫瘍の組織学的診断にマッチする LSP コールとして定義した。パーセント合致を、すべての予測の数によって除した正しい予測の数として定義し、合致カッパ統計量を計算した。

40

【0099】

50

10の肺腫瘍RNA発現データセットを組み合わせて、3つのプラットフォーム特異的データセット（A-833、A-334、およびI-951）にした。患者集団は、多様であり、病期1～病期IVの範囲の腫瘍を有する喫煙者および非喫煙者を含んでいた。3つのデータセットの試料特性および肺がん診断は、表9に含まれている。

【表9】

| 表9.試料特性 | | | |
|-----------------|--------------|------------|------------|
| 特性 | TCGA RNA seq | Agilent | Affymetrix |
| 試料の総数 | 1062 | 334 | 875 |
| 腫瘍標本組織診断 | | | |
| 腺癌 | 468 | 174 | 490 |
| カルチノイド | 0 | 0 | 23 |
| 神経内分泌 (NOS) | 0 | 0 | 6 |
| 扁平上皮癌 | 483 | 148 | 227 |
| その他(分析から除外した) | 111 | 12 | 105 |
| 性別 | | | |
| 女性/男性/NA | 285/366/300 | 87/85/150 | 272/491/7 |
| 診断時の年齢 | | | |
| 中央値/(範囲) | 67/(38-88) | 66/(37-90) | 63/(13-85) |
| 年齢不明 | 323 | 150 | 7 |
| 病期 | | | |
| I | 355 | NA | NA |
| II | 146 | NA | NA |
| III | 119 | NA | NA |
| IV | 26 | NA | NA |
| 病期不明 | 305 | 322 | 770 |
| 喫煙 | | | |
| 喫煙者 | 386 | NA | NA |
| 非喫煙者 | 39 | NA | NA |
| 喫煙状態不明 | 526 | 322 | 770 |

10

20

30

40

【0100】

2クラス、3クラス、および4クラス予測因子について予測された腫瘍型を、腫瘍形態学的分類およびパーセント合致と比較し、Fleissカッパを各予測因子について計算

50

した（表 10 a、10 b、および 10 c）。

【表 10 a】

| 表 10a.肺腫瘍型の 2 クラス予測について 2 つの他の公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データベース (TCGA および A-334)に適用した A-833 データセット訓練遺伝子重心。LOO 交差検証を A-833 データセットについて実施した。 | | | | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-----|-----------|-----------|-----|----------------|-----------|-----|
| | 予測 | | | | | | | | |
| 組織診断 | TCGA RNAseq | | | Agilent | | | Affymetrix LOO | | |
| | <u>AD</u> | <u>SQ</u> | 合計 | <u>AD</u> | <u>SQ</u> | 合計 | <u>AD</u> | <u>SQ</u> | 合計 |
| 腺癌(AD) | 452 | 16 | 468 | 151 | 23 | 174 | 423 | 67 | 490 |
| 扁平上皮癌(SQ) | 37 | 446 | 483 | 39 | 109 | 148 | 41 | 186 | 227 |
| 合計 | 489 | 462 | 951 | 190 | 132 | 322 | 464 | 253 | 717 |
| %合致 | 94% | | | 81% | | | 85% | | |
| カッパ | 0.89 | | | 0.61 | | | 0.66 | | |

10

【表 10 b】

| 表 10b.肺腫瘍型の 3 クラス予測について 2 つの他の公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データベース (TCGA および A-334)に適用した A-833 データセット訓練遺伝子重心。LOO 交差検証を A-833 データセットについて実施した。 | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-----------|-----|-----------|-----------|-----------|-----|----------------|-----------|-----------|-----|
| | 予測 | | | | | | | | | | | |
| 組織診断 | TCGA RNAseq | | | | Agilent | | | | Affymetrix LOO | | | |
| | <u>AD</u> | <u>NE</u> | <u>SQ</u> | 合計 | <u>AD</u> | <u>NE</u> | <u>SQ</u> | 合計 | <u>AD</u> | <u>NE</u> | <u>SQ</u> | 合計 |
| 腺癌(AD) | 419 | 29 | 29 | 468 | 141 | 6 | 27 | 174 | 399 | 3 | 88 | 490 |
| 神経内分泌 (NE) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 2 | 49 | 2 | 53 |
| 扁平上皮癌(SQ) | 23 | 15 | 445 | 483 | 28 | 3 | 117 | 148 | 25 | 7 | 195 | 227 |
| 合計 | 442 | 44 | 465 | 951 | 169 | 9 | 144 | 322 | 426 | 59 | 285 | 770 |
| %合致 | 91% | | | | 80% | | | | 84% | | | |
| カッパ | 0.82 | | | | 0.61 | | | | 0.69 | | | |

20

30

40

【表 10 c】

| 表 10c.肺腫瘍型の 4 クラス予測について 2 つの他の公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データベース (TCGA および A-334)からのデータに適用した A-833 データセット訓練遺伝子重心。LOO 交差検証を A-833 データセットについて実施した。 | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 予測 | | | | | | | | | | | | | | |
| 組織診断 | TCGA RNAseq | | | | | Agilent | | | | | Affymetrix LOO | | | | |
| | <u>AD</u> | <u>CA</u> | <u>SC</u> | <u>SQ</u> | <u>合計</u> | <u>AD</u> | <u>CA</u> | <u>SC</u> | <u>SQ</u> | <u>合計</u> | <u>AD</u> | <u>CA</u> | <u>SC</u> | <u>SQ</u> | <u>合計</u> |
| 腺癌(AD) | 428 | 2 | 20 | 18 | 468 | 138 | 2 | 5 | 29 | 174 | 389 | 1 | 3 | 97 | 490 |
| カルチノイド(CA) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 1 | 22 | 0 | 0 | 23 |
| 小細胞 (SC) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 27 | 1 | 5 | 194 | 227 |
| 扁平上皮癌 (SQ) | 23 | 2 | 15 | 443 | 483 | 27 | 0 | 3 | 118 | 148 | 27 | 1 | 5 | 194 | 227 |
| 合計 | 451 | 4 | 35 | 461 | 951 | 165 | 2 | 8 | 147 | 322 | 418 | 25 | 28 | 293 | 764 |
| %合致 | 92% | | | | | 80% | | | | | 82% | | | | |
| カッパ | 0.84 | | | | | 0.60 | | | | | 0.65 | | | | |

【0101】

形態学的分類単独に基づく肺がん診断の観察者間再現性の評価は、以前に公開されている。全体的な観察者間合致は、タイピングスキームの単純化で改善した。包括的な 2004 世界保健機関分類システムを使用して、観察者間合致は低かった ($k = 0.25$)。合致は、治療上意味がある扁平上皮 / 非扁平上皮の 2 タイプ区別に診断を単純化すると改善した ($k = 0.55$)。観察者間診断の合致を、本バリデーション試験における 2、3、および 4 クラス LSP 診断の合致と比較する (表 11)。

【表 1 1】

| 表 11. カッパ統計量を使用して測定した観察者間合致(3)および複数の遺伝子発現データセットにおける組織学的診断との LSP 合致。 | | | | | |
|---|-------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | WHO 2004 分類 | 2 クラス 扁平上皮/非扁平上皮癌 | | 3 クラス | 4 クラス |
| 合致 | 観察者間合致 | 観察者間合致 | 組織学的診断との LSP 合致 | 組織学的診断との LSP 合致 | 組織学的診断との LSP 合致 |
| カッパ ^a | 0.25 | 0.55 | 0.61~0.89 | 0.61~0.82 | 0.60~0.84 |

10

【0 1 0 2】

肺がんの様々な形態学的なサブタイプの間の区別は、ますます重要になっており、その理由は、治療剤開発および患者管理が、各腫瘍のユニークな特徴により特異的に標的化された状態になっているためである。組織学的診断は、挑戦的であり得、いくつかの試験は、形態学的な診断の再現性が限定的であることを実証している。p 6 3 および T T F - 1 などのいくつかの免疫組織化学検査マーカーを加えると、診断的精密さが改善されるが、多くの肺がん生検は、サイズおよび/または細胞充実度が限られており、複数の I H C マーカーを使用する完全な特徴付けを妨げている。合致は、組織学的診断のより大きい精度および/または R N A 発現結果のより大きな精密さにおそらく起因して、他のデータセットと比較して T C G A R N A s e q データセットにおけるすべてのクラシファイヤー(2、3、および 4 タイプ)について著しくより良好であった(%合致範囲 9 1 % ~ 9 4 %)。以下に記載するいくつかの限定事項にもかかわらず、本試験は、L S P が肺腫瘍のタイピングにおける組織診断の貴重な補助となるものであり得ることを実証する。

20

【0 1 0 3】

数百の肺がん試料を有する複数のデータセットでは、肺サブタイプパネル(L S P)を使用する分子プロファイリングは、光学顕微鏡で得られる診断と有利には匹敵し、病理学者の再評価より高いレベルの合致を示した。R N A ベース腫瘍サブタイピングは、特に、組織が限定的であり、形態学的診断が不明確なままであるとき、診療所において貴重な情報を提供することができる。

30

【0 1 0 4】

以下の参考文献の開示は、すべての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれている。

- a . American Cancer Society. Cancer Facts and Figures、2 0 1 4 年。
- b . National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guideline in Oncology. Non-Small Cell Lung Cancer.、2 版、2 0 1 3 年。
- c . Grilley Olson JE、Hayes DN、Moore DTら、Arch Pathol Lab Med、2 0 1 3 年 ; 1 3 7 巻 : 3 2 ~ 4 0 頁
- d . Thunnissen E、Boers E、Heideman DAら、Virchows Arch、2 0 1 2 年 ; 4 6 1 巻 : 6 2 9 ~ 3 8 頁。
- e . Wilkerson MD、Schallheim JM、Hayes DNら、J Molec Diagn、2 0 1 3 年 ; 1 5 巻 : 4 8 5 ~ 4 9 7 頁。
- f . Li B、Dewey CN、BMC Bioinformatics、2 0 1 1 年、1 2 巻 : 3 2 3 頁、doi:10.1186/1471-2105-12-323
- g . Yang YH、Dudoit S、Luu Pら、Nucleic Acids Research、2 0 0 2 年、3 0 巻 : e 1 5 頁。
- h . Hubbell E、Liu、W、Mei R、Bioinformatics、(2 0 0 2 年) 1 8 巻 (1 2 号) :

40

50

1585 ~ 1592 頁、doi:10.1093/bioinformatics/18.12.1585。

i .Travis WD、Brambilla E、Muller-Hermelink HK、Harris CC、Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart.、3 版、Lyon、France : IARC Press ; 2004 年、World Health Organization Classification of Tumors : 10 巻。

j .Travis WD および Rekhtman N、Sem Resp and Crit Care Med、2011 年 ; 32 巻 (1 号) : 22 ~ 31 頁。

(実施例 2)

複数の新鮮凍結およびホルマリン固定パラフィン包埋肺腫瘍遺伝子発現データセットの肺がんサブタイピング

10

【 0105 】

2,177 の試料を含む複数のデータセットをアセンブルして、肺サブタイプパネル (LSP) 遺伝子発現クラシファイヤーを評価した。データセットは、2,099 の新鮮凍結肺がん試料を含むいくつかの公的に利用可能な肺がん遺伝子発現データセット (TCGA、NCI、UNC、Duke、Expo、Seoul、および France)、ならびに 78 の FFPE 試料から新しく収集された遺伝子発現データを含んでいた。データソースを以下の表 12 に提供する。78 の FFPE 試料は、IRB 承認プロトコールを使用してノースカロライナ大学チャペルヒル校 (UNC - CH) で収集された、アーカイブされた残留する肺腫瘍試料であった。AD、カルチノイド、小細胞癌 (SCC)、または SQC の確定診断を有する試料のみを、分析で使用した。ゲノムデータの合計 4 カテゴリーが分析に利用可能であった : Affymetrix U133+2 (n = 693)、Agilent 44K (n = 344)、Illumina (登録商標) RNAseq (n = 1,062)、および新しく収集された qRT - PCR (n = 78) データ。

20

【 0106 】

アーカイブされた FFPE 肺腫瘍試料 (n = 78) を、以下の改変とともに、以前に記載された qRT - PCR 遺伝子発現アッセイ (すべての目的に関してその全体が本明細書に参照により組み込まれている、Wilkerson ら、J Molec Diagn、2013 年 ; 15 巻 : 485 ~ 497 頁) を使用して分析した。RNA を、High Pure RNA Purification Kit (Roche Applied Science、Indianapolis、IN) を使用して、FFPE 組織の 1 つの 10 μ m の切片から抽出した。抽出した RNA を 5 ng / μ L に希釈し、第 1 の鎖の cDNA を、ランダム六量体 (Superscript III (登録商標)、Invitrogen (登録商標)、Thermo Fisher Scientific Corp、Waltham、MA) と組み合わせて遺伝子特異的 3' プライマーを使用して合成した。ABI7900 (Applied Biosystems、Thermo Fisher Scientific Corp、Waltham、MA) を qRT - PCR に使用して、SYBR 緑色蛍光 (530 nm) を連続的にモニターした。ABI7900 定量ソフトウェアは、増幅曲線および関連した閾値サイクル (Ct) 値を生成した。試料とともに集めた元の臨床診断は、表 13 にある。

30

【表 1 2】

表12

| ソース | プラットフォーム | N | サブタイプ | 使用した正規化法 | データソース |
|--------|------------------|-----|-----------------------------|--|---|
| TCGA | RNASeq {LUP} | 533 | 腺癌 | RSEM発現推定値を、遺伝子レベルについて1000で上位四分位数を設定するように正規化し、底2の対数変換を行い、データ行列は、中央値を中心にした行(遺伝子)、標準化された列(試料)である。 ²⁸ | 参考文献16 TCGA |
| TCGA | RNASeq {LUSC} | 534 | 扁平上皮癌 | | 参考文献15 TCGA |
| UNC | Agilent_44K | 56 | 扁平上皮癌 | | 参考文献19 GSE17730 |
| UNC | Agilent_44K | 115 | 腺癌 | 2つのチャンネル強度の底2の対数比をLOWESS正規化し、データ行列は、中央値を中心にした行(遺伝子)、標準化された列(試料)である。 ²⁹ | 参考文献20 GSE26932 |
| NCI | Agilent_44K | 172 | 腺癌、扁平上皮癌、および大細胞 | | 参考文献22 http://researcher.agilent.com/ |
| Korea | HC-U133+2 | 132 | 腺癌、扁平上皮癌 | | 参考文献23 GSE3834 |
| Expo | HC-U133+2 | 135 | すべての組織診断サブタイプ | MAS5正規化された1つのチャンネル強度を、底2の対数変換を行い、データ行列は、中央値を中心にした行(遺伝子)、標準化された列(試料)である。 ³⁰ | 参考文献24 GSE2132 |
| French | HC-U133+2 | 307 | すべての組織診断サブタイプ | | 参考文献25 GSE30333 |
| Duke | HC-U133+2 | 113 | 腺癌、扁平上皮癌 | | 参考文献26 GSE3141 |
| UNC | FFPE組織 RT-PCR | 78 | 腺癌、扁平上皮癌、 小細胞癌、およびカルチノイド | FFPE試料遺伝子発現データをスケール変更して、遺伝子分散をWilcoxonのデータとアライメント ²¹ 。データセット間の標識頻度の差異を考慮に入れた遺伝子特異的な換算係数(scaling factor)を計算した。 | 参考文献27 追加のファイル#1 |

10

20

30

40

【表 1 3 - 1】

| 表13 | |
|---------|-------|
| 試料 | 標識 |
| VELO001 | 扁平上皮癌 |
| VELO002 | 扁平上皮癌 |
| VELO004 | 腺癌 |
| VELO006 | 扁平上皮癌 |
| VELO007 | 扁平上皮癌 |
| VELO008 | 扁平上皮癌 |
| VELO010 | 扁平上皮癌 |
| VELO011 | 扁平上皮癌 |
| VELO012 | 扁平上皮癌 |
| VELO013 | 扁平上皮癌 |
| VELO014 | 扁平上皮癌 |
| VELO015 | 腺癌 |
| VELO016 | 扁平上皮癌 |
| VELO017 | 扁平上皮癌 |
| VELO018 | 扁平上皮癌 |
| VELO019 | 扁平上皮癌 |
| VELO020 | 腺癌 |
| VELO021 | 腺癌 |
| VELO022 | 腺癌 |
| VELO023 | 腺癌 |
| VELO024 | 腺癌 |
| VELO025 | 腺癌 |
| VELO026 | 腺癌 |
| VELO027 | 腺癌 |
| VELO028 | 腺癌 |
| VELO029 | 腺癌 |
| VELO030 | 腺癌 |
| VELO031 | 腺癌 |
| VELO032 | 腺癌 |
| VELO033 | 腺癌 |
| VELO034 | 腺癌 |
| VELO035 | 腺癌 |

10

20

30

【表 1 3 - 2】

| 表13 | |
|---------|-------|
| VELO036 | 腺癌 |
| VELO037 | 腺癌 |
| VELO038 | 扁平上皮癌 |
| VELO039 | 扁平上皮癌 |
| VELO040 | 扁平上皮癌 |
| VELO042 | 扁平上皮癌 |
| VELO044 | 扁平上皮癌 |
| VELO046 | 扁平上皮癌 |
| VELO048 | 扁平上皮癌 |
| VELO049 | 扁平上皮癌 |
| VELO050 | 腺癌 |
| VELO041 | 扁平上皮癌 |
| VELO043 | 扁平上皮癌 |
| VELO045 | 扁平上皮癌 |
| VELO055 | 神経内分泌 |
| VELO056 | 神経内分泌 |
| VELO057 | 神経内分泌 |
| VELO058 | 神経内分泌 |
| VELO059 | 神経内分泌 |
| VELO060 | 神経内分泌 |
| VELO061 | 神経内分泌 |
| VELO062 | 神経内分泌 |
| VELO063 | 神経内分泌 |
| VELO064 | 神経内分泌 |
| VELO065 | 神経内分泌 |
| VELO066 | 神経内分泌 |
| VELO067 | 神経内分泌 |
| VELO068 | 神経内分泌 |
| VELO069 | 神経内分泌 |
| VELO070 | 神経内分泌 |
| VELO071 | 神経内分泌 |
| VELO072 | 神経内分泌 |
| VELO073 | 神経内分泌 |
| VELO074 | 神経内分泌 |

10

20

30

【表 1 3 - 3】

| 表13 | |
|---------|-------|
| VELO075 | 神経内分泌 |
| VELO076 | 神経内分泌 |
| VELO077 | 神経内分泌 |
| VELO078 | 神経内分泌 |
| VELO079 | 神経内分泌 |
| VELO080 | 神経内分泌 |
| VELO081 | 神経内分泌 |
| VELO082 | 神経内分泌 |
| VELO083 | 神経内分泌 |
| VELO084 | 神経内分泌 |
| VELO085 | 神経内分泌 |

10

20

【 0 1 0 7】

病理学的レビューは、追加の切片を収集および画像化した F F P E 肺腫瘍コホートについてのみ可能であった。各試料からの 2 つの連続した切片を、ヘマトキシリン & エオシン (H & E) 染色し、A p e r i o (商標) S c a n S c o p e (登録商標) スライドスキャナー (A p e r i o T e c h n o l o g i e s、V i s t a、C A) を使用してスキャンした。バーチャルスライドは、32 ~ 320 対物レンズ (340 拡大鏡) に等価な拡大率で観察することができた。病理学者レビューを元の臨床診断および遺伝子発現ベースサブタイプ分類に対して盲検化した。病理学的レビューベース組織学的サブタイプコールを元の診断と比較した (n = 78)。病理学的レビューの合致は、両方のスライドが元の診断と同じサブタイプに割り当てられた試料として定義した。

30

【 0 1 0 8】

すべての統計分析は、R 3 . 0 . 2 ソフトウェア (<http://cran.R-project.org>) を使用して行った。データ分析は、F F について、および F F P E 腫瘍試料について別個に行った。

【 0 1 0 9】

新鮮凍結データセット分析：データセットを表 1 2 に記載したように正規化した。A f f y m e t r i x データセットは、以前に記載された方法 (Wilkerson ら、P L o S O N E、2012 年 ; 7 巻 (5 号) e 3 6 5 3 0 頁、Doi:10.1371/journal.pone.0036530 ; Wilkerson ら、J M o l e c D i a g n、2013 年 ; 15 巻 : 485 ~ 497 頁、そのそれぞれは、すべての目的に関してその全体が本明細書に参照により組み込まれている) に従って A D、カルチノイド、S C C、および S Q C 遺伝子重心を計算するための訓練セットとして機能を果たした。

40

【 0 1 1 0】

A f f y m e t r i x 訓練遺伝子重心を表 1 4 に提供する。訓練セット遺伝子重心を、正規化された T C G A R N A s e q 遺伝子発現データセットおよび A g i l e n t マイクロアレイ遺伝子発現データセットにおいて検査した。公的な A g i l e n t データセットからの欠損したデータに起因して、A g i l e n t 評価は、C I B 1、F O X H 1、L I P E、P C A M 1、T U B A 1 の遺伝子を除外して 52 の遺伝子パネルではなく、47 の遺伝子クラシファイヤーを用いて実施した。

【表 1 4 - 1】

| 表14. | | | |
|---------|---------|---------|---------|
| 遺伝子 | 腺癌 | 神経内分泌 | 扁平上皮癌 |
| ABCC5 | -0.453 | 0.3715 | 1.1245 |
| ACVR1 | 0.0475 | 0.3455 | -0.0465 |
| ALDH3B1 | 0.4025 | -0.638 | -0.401 |
| ANTXR1 | -0.0705 | -0.478 | 0.014 |
| BMP7 | -0.532 | -0.6265 | 0.6245 |
| CACNB1 | 0.024 | 0.157 | -0.039 |
| CAPG | 0.109 | -1.9355 | -0.0605 |
| CBX1 | -0.2045 | 0.745 | 0.187 |
| CDH5 | 0.391 | 0.145 | -0.352 |
| CDKN2C | -0.0045 | 1.496 | 0.004 |
| CHGA | -0.143 | 5.7285 | 0.1075 |
| CIB1 | 0.1955 | -0.261 | -0.065 |
| CLEC3B | 0.449 | 0.6815 | -0.3085 |
| CYB5B | 0.058 | 1.487 | -0.03 |
| DOK1 | 0.233 | -0.355 | -0.183 |
| DSC3 | -0.781 | -0.8175 | 4.3445 |
| FEN1 | -0.5025 | -0.0195 | 0.4035 |
| FOXH1 | -0.0405 | 0.1315 | -0.0105 |
| GJB5 | -1.388 | -1.5505 | 0.7685 |
| HOXD1 | 0.17 | -0.462 | -0.288 |
| HPN | 0.5335 | 0.444 | -0.736 |
| HYAL2 | 0.1775 | 0.073 | -0.143 |
| ICA1 | 0.3455 | 1.048 | -0.233 |
| ICAM5 | 0.13 | -0.145 | -0.12 |
| INSM1 | 0.0705 | 7.5695 | -0.0245 |
| ITGA6 | -0.709 | 0.029 | 1.074 |
| LGALS3 | 0.1805 | -1.1435 | -0.2305 |
| LIPE | 0.0065 | 0.5225 | -0.0015 |
| LRP10 | 0.2565 | -0.087 | -0.16 |
| MAPRE3 | -0.0245 | 0.6445 | -0.0025 |
| ME3 | 0.3085 | 0.3415 | -0.2915 |
| MGRN1 | 0.429 | 0.8075 | -0.3775 |
| MYBPH | 0.04 | -0.193 | -0.054 |
| MYO7A | 0.083 | -0.287 | -0.109 |

10

20

30

【表 1 4 - 2】

| 表14. | | | | |
|---------|---------|---------|---------|----|
| 遺伝子 | 腺癌 | 神経内分泌 | 扁平上皮癌 | |
| NFIL3 | -0.332 | -1.0425 | 0.3095 | |
| PAICS | -0.2145 | 0.3915 | 0.2815 | |
| PAK1 | -0.112 | 0.6095 | 0.0965 | |
| PCAM1 | 0.232 | -0.256 | -0.144 | 10 |
| PIK3C2A | 0.1505 | 0.597 | -0.021 | |
| PLEKHA6 | 0.4465 | 2.0785 | -0.2615 | |
| PSMD14 | -0.251 | 0.5935 | 0.1635 | |
| SCD5 | -0.1615 | 0.06 | 0.13 | |
| SFN | -0.789 | -3.026 | 0.91 | |
| SIAH2 | -0.5795 | 0.1895 | 0.7175 | |
| SNAP91 | -0.0255 | 3.818 | 0.003 | |
| STMN1 | -0.0995 | 1.2095 | 0.1405 | 20 |
| TCF2 | 0.2835 | -0.5175 | -0.4665 | |
| TCP1 | -0.1685 | 0.9815 | 0.1985 | |
| TFAP2A | -0.374 | -0.5075 | 0.3645 | |
| TITF1 | 1.482 | 0.1525 | -1.2755 | |
| TRIM29 | -1.0485 | -1.318 | 1.379 | |
| TUBA1 | 0.155 | 1.71 | -0.07 | 30 |

【表 15 - 1】

| 表15. | | | |
|---------|------------|------------|------------|
| 遺伝子 | 腺癌 | 神経内分泌 | 扁平上皮癌 |
| ABCC5 | -1.105993 | 0.53584995 | 0.28498017 |
| ACVR1 | -0.1780792 | 0.27746814 | -0.1331305 |
| ALDH3B1 | 2.21915126 | -1.0930042 | 0.82709803 |
| ANTXR1 | 0.14704523 | -0.0027417 | -0.1000265 |
| CACNB1 | -0.2032444 | 0.36015235 | -0.7588385 |
| CAPG | 0.52784999 | -0.6495988 | -0.0218352 |
| CBX1 | -0.5905845 | -0.0461076 | -0.2776489 |
| CDH5 | -0.1546498 | 0.53564677 | -0.9166437 |
| CDKN2C | -1.8382992 | -0.1614815 | -0.7501799 |
| CHGA | -6.2702431 | 8.18090411 | -7.4497926 |
| CIB1 | 0.29948877 | -0.1804507 | 0.06141265 |
| CLEC3B | 0.1454466 | 0.86221597 | -0.6686516 |
| CYB5B | -0.1957799 | 0.13060667 | -0.2393801 |
| DOK1 | 0.03629227 | 0.03029676 | -0.2861762 |
| DSC3 | 0.76811006 | -2.2230482 | 4.45353398 |
| FEN1 | -0.4100344 | -0.774919 | 0.19244803 |
| FOXH1 | 1.36365962 | -1.1539159 | 1.86758359 |
| GJB5 | 2.19942372 | -3.2908475 | 4.00132739 |
| HOXD1 | -0.069692 | -0.3296808 | 0.50430984 |
| HPN | 0.62232864 | -0.0416111 | -0.5391064 |
| HYAL2 | 0.47459315 | -0.2332929 | -0.0080073 |
| ICA1 | -0.8108302 | 1.25305275 | -2.1742476 |
| ICAM5 | 2.12506546 | -2.2078991 | 2.89691121 |
| INSM1 | -2.4346556 | 1.92393374 | -1.9749654 |
| ITGA6 | -0.7881662 | 0.36443897 | 0.54978058 |
| LGALS3 | -0.8270046 | 0.79512054 | -0.9453521 |
| LIPE | -0.2519692 | 0.29291064 | -0.2216243 |
| LRP10 | 0.09504093 | 0.14082188 | -0.4042101 |
| MAPRE3 | -0.6806204 | 1.2417945 | -0.5496704 |
| ME3 | 0.17668171 | 0.67674964 | -1.581183 |
| MGRN1 | -0.0839601 | 0.35069923 | -0.6885404 |
| MYBPH | 0.73519429 | -0.9569161 | 1.14344753 |
| MYO7A | 0.58098661 | -0.2096425 | 0.0488886 |
| NFIL3 | 0.22274434 | -0.337858 | 0.66234639 |

10

20

30

【表 15 - 2】

| 表15. | | | |
|---------|------------|------------|------------|
| 遺伝子 | 腺癌 | 神経内分泌 | 扁平上皮癌 |
| PAICS | -0.2423309 | -0.1863934 | 0.39037381 |
| PAK1 | -0.3803406 | 0.15627507 | 0.0677904 |
| PCAM1 | 0.03655586 | 0.32457357 | -0.6957339 |
| PIK3C2A | -0.3868824 | 0.56861416 | -0.6629455 |
| PLEKHA6 | -0.4007847 | 1.31002812 | -1.9802266 |
| PSMD14 | -0.5115938 | 0.27513479 | -0.2847234 |
| SCD5 | -0.4770619 | -0.4338812 | 0.56043153 |
| SFN | 0.35719248 | -1.4361124 | 2.34498532 |
| SIAH2 | -0.4222382 | -0.3853078 | 0.43237756 |
| SNAP91 | -5.5499562 | 4.65742276 | -2.5441741 |
| STMN1 | -1.4075058 | 0.49776156 | -1.017481 |
| TCF2 | 1.96819785 | -0.4121173 | -0.6555613 |
| TCP1 | -2.9255287 | 2.322428 | -2.3059797 |
| TFAP2A | 2.02528144 | -2.9053184 | 3.62844763 |
| TITF1 | 0.46476685 | -9.82E-05 | -1.7079242 |
| TRIM29 | -1.6554559 | -0.6463626 | 2.94818107 |
| TUBA1 | 1.77126501 | -2.0395783 | 1.58902579 |

10

20

【0111】

30

A f f y m e t r i x データの評価を、一個抜き (L O O) 交差検証を使用して実施した。スピアマン相関を、A f f y m e t r i x 遺伝子発現訓練重心に対する腫瘍検査試料について計算した。腫瘍に、最大に関連した重心に対応するゲノム定義の組織学的型 (A D、S Q C、または N E) を割り当てた。正しい予測を、腫瘍の元の組織学的診断にマッチする L S P コールとして定義した。パーセント合致を、全予測の数によって除した正しい予測の数として定義し、合致カッパ統計量を計算した。

【0112】

F F P E 試料分析からの q R T - P C R : F F P E 肺腫瘍試料の q R T - P C R データから計算された、以前に公開された訓練重心 (本明細書に参照により組み込まれている、Wilkersonら、J Molec Diagn、2013年; 15巻: 485 ~ 497頁) を、F F P E 肺腫瘍組織からの q R T - P C R 遺伝子発現のこの新しい試料セットにおいて交差検証した。W i l k e r s o n らの A D および S Q C 重心を、公開された通り使用した (本明細書に参照により組み込まれている、Wilkersonら、J Molec Diagn、2013年; 15巻: 485 ~ 497頁) 。神経内分泌遺伝子重心を、公開された遺伝子発現データ (n = 130) (本明細書に参照により組み込まれている、Wilkersonら、J Molec Diagn、2013年; 15巻: 485 ~ 497頁) を使用して同様に計算した。F F P E 組織評価についての W i l k e r s o n らの遺伝子重心 (本明細書に参照により組み込まれている、Wilkersonら、J Molec Diagn、2013年; 15巻: 485 ~ 497頁) は、表 15 に含まれている。F F P E 試料遺伝子発現データをスケール変更して、遺伝子分散を W i l k e r s o n らのデータとアラインした。データセット間の標識頻度の差異を考慮に入れた

40

50

遺伝子特異的な換算係数を計算した。次いで遺伝子発現データを、中央値を中心とし、符号反転し (sign flipped) (高い Ct = 低い存在量)、遺伝子特異的な換算係数を使用してスケール変更した。サブタイプは、各試料を3つのサブタイプ重心と相関させ、最高の相関重心 (スピアマン相関) を有するサブタイプを割り当てることによって予測した。

【0113】

9つのFF + 1つの新しいFFPE qRT-PCR遺伝子発現データセットを含む10の肺腫瘍遺伝子発現データセットを組み合わせ、4つのプラットフォーム特異的データセットにした (Affymetrix、Agilent、Illumina RNAseq、およびqRT-PCR)。臨床情報が利用可能であったデータセットについては、患者集団は、多様であり、病期Ⅰ～病期Ⅳの範囲の腫瘍を有する喫煙者および非喫煙者を含んでいた。本試験で利用したデータセットの試料特性および肺がん診断は、表16に含まれている。AD、SQC、SCC、またはカルチノイドの確定診断を伴わない試料を除外し、qRT-PCR分析に失敗した1つのFFPE試料を除外した後、以下の試料がさらなるデータ分析に利用可能であった: Affymetrix (n = 538)、Agilent (n = 322)、Illumina RNAseq (n = 951)、およびqRT-PCR (n = 77)。

【表 16】

| 表 16. | | | | |
|---------------|-----------------|------------|------------|----------|
| 特性 | TCGA RNA seq | Agilent | Affymetrix | UNC FFPE |
| 試料の総数 | 1062 | 344 | 693 | 78 |
| 組織保存 | 新鮮凍結 | 新鮮凍結 | 新鮮凍結 | FFPE |
| 腫瘍標本組織診断 | | | | |
| 腺癌 | 468 | 174 | 264 | 21 |
| カルチノイド | 0 | 0 | 23 | 15 |
| 小細胞癌 | 0 | 0 | 24 | 16 |
| 扁平上皮癌 | 483 | 148 | 227 | 25 |
| その他(分析から除外した) | 111 | 22 | 155 | 01 |
| 性別 | | | | |
| 女性/男性/NA | 285/366/300 | 87/85/150 | 151/386/1 | NA |
| 診断時の年齢 | | | | |
| 中央値/(範囲) | 67/(38-88) | 66/(37-90) | 65/(13-85) | NA |
| 年齢不明 | 323 | 0 | 2 | NA |
| 病期 | | | | |
| I | 355 | NA | NA | NA |
| II | 146 | NA | NA | NA |
| III | 119 | NA | NA | NA |
| IV | 26 | NA | NA | NA |
| 病期不明 | 305 | 322 | 538 | 77 |
| 喫煙 | | | | |
| 喫煙者 | 386 | NA | NA | NA |
| 非喫煙者 | 39 | NA | NA | NA |
| 喫煙状態不明 | 526 | 322 | 538 | 77 |

10

20

30

【0114】

新しいFFPEデータセットの新規の評価の手段として、本発明者らは、FFPEアーカイブ試料（ $n = 77$ ）からのLSP遺伝子発現の階層的クラスタリングを実施した。予期されたように、この分析は、AD、SQC、およびNEに対応する3つのクラスター/サブタイプを実証した（図2）。次いで、所定のLSP 3-サブタイプ重心予測因子を4つすべてのデータセットに適用し、結果を腫瘍形態学的分類と比較した。パーセント合致およびFleissカッパを各データセットについて計算した（表17）。パーセント合致は、78%～91%の範囲であり、カッパは、0.57～0.85の範囲であった。

40

【0115】

独立した病理合致を評価する別の手段として、77のFFPE肺腫瘍の盲検化された病理学的レビューの元の形態学的診断との合致は、82%（63/77）であることが判明した。12/77の場合では、盲検化された2つ組のスライドは、矛盾する結果をもたら

50

し、10/77の場合では、2つ組の少なくとも一方は、「腺扁平上皮」、「大細胞」、または「高悪性度低分化癌」という確定的でない病理学的サブタイプ分類を有していた。77の試料のそれぞれについての元の形態学的な診断、盲検化された病理学的レビュー、および遺伝子発現LSPサブタイプコールの比較を図3に示す。一致しない試料のオーバーラップ（すなわち、腫瘍サブタイプが病理学的レビューおよび遺伝子発現LSPコールの両方によって元の形態診断と合致しなかった6つの試料）の詳細を表18に提供する。全体的に、元の病理学的コールに対するLSPのこれらの一致値は、任意の2人の病理学者との間の一致と少なくとも同じくらい大きく（Grilleyら、Arch Pathol Lab Med、2013年；137巻：32～40頁；Thunnissenら、Virchows Arch、2012年；461巻（6号）：629～38頁、Doi:10.1007/s00428-012-1234-x、2012年10月12日電子出版；Thunnissenら、Mod Pathol、2012年；25巻（12号）：1574～83頁、Doi:10.1038/modpathol.2012.106；そのそれぞれは、すべての目的に関して本明細書に参照により組み込まれている）、したがって、本明細書に記載のアッセイでは、訓練された病理学者と少なくとも同じくらいよく機能することが示唆される。

10

20

30

40

50

【0116】

本試験では、LSPは、信頼できるサブタイプ分類をもたらし、複数の遺伝子発現プラットフォームにわたって、かつFFPE標本を使用するときでもその性能をバリデートした。新しくアッセイしたFFPE試料の階層的クラスタリングは、52のクラシファイヤーバイオマーカーのレベルに基づいて3つのサブタイプ（AC、SQC、およびNE）の良好な分離を実証した。LSP重心を使用するときの形態診断との一致は、他のデータセットと比較してTCGA試料と関連した非常に広範な病理学的レビューおよび組織学的診断の精度におそらく起因して、TCGA RNAseqデータセットにおいて最大であった（合致＝91％）。合致は、Agilentデータセットにおいて最低であった（78％）。このデータセットは、その分析について利用可能であった遺伝子の数が少なかったことによって影響された可能性がある。全体的に、LSPアッセイは、52ではなく47のみの遺伝子が分析のために存在したAgilentデータセットを除いてすべてのデータセットにおいて病理学的レビューより元の形態診断とのより高い一致を示した。

【0117】

盲検化された病理学的再レビューが可能であったFFPE試料では、結果は、病理学的コールが、元の診断と常に一致しているとは限らず、これらは、各試料から提供される2つ組スライドにおいて必ずしも一貫していないことを示唆した。試料のサブセット（n＝6）について、病理学的再レビューおよびLSP遺伝子発現分析の両方は、同じ代替の診断を示唆し、これから、本発明者らの「ゴールドスタンダード」であった元の形態学的診断の精度が疑問視された。

【0118】

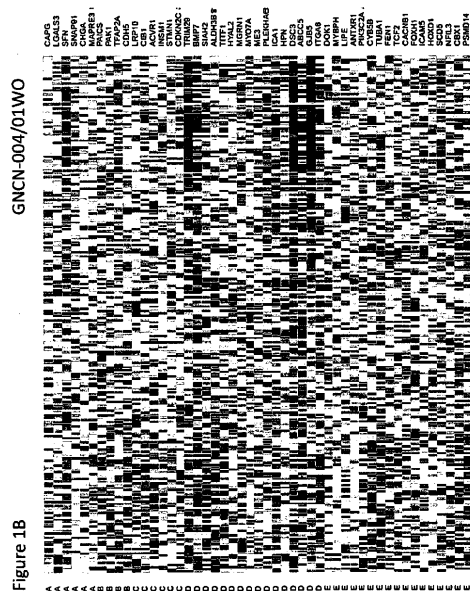
本試験では、Affymetrixデータセットにおける少数のNE腫瘍試料があり、AgilentデータセットおよびTCGAデータセットの両方においてNE試料が存在しなかった。これは、FFPE試料セット中の相対的に高い数のNE試料（31/77）によって部分的に克服されたため、NE試料を同定するLSPシグネチャーの能力の良好な検査がもたらされた。本試験の別の限定事項は、盲検化された病理学的再レビューに関する。盲検化された病理学的レビューは、2つの画像化された切片に基づき、複数の切片/ブロック、および潜在的にIHC染色剤が診断を行うのに利用可能である通常の組織診断の標準プラクティスを反映しなかった。

【0119】

上述した様々な実施形態は、さらなる実施形態をもたらすように組み合わせることができる。本明細書に参照され、かつ/または出願データシートに列挙された米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物のすべては、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。実施形態の態様は、必要であれば、様々な特許、出願、および刊行物の概念を採用してなおさらなる実施形態をもたらすように改変することができる。

これらの変更および他の変更を、上記詳細な説明を踏まえると実施形態に行うことができる。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用した用語は、本明細書および特許請求の範囲に開示した具体的な実施形態に特許請求の範囲を限定するように解釈されるべきでないが、このような特許請求の範囲が権利を与えられる均等物の全範囲とともにすべての可能な実施形態を含むように解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

【 図 1 B 】



【手続補正書】

【提出日】平成29年2月2日(2017.2.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017516501000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 15/33611 | | | | | | |
|--|--|--|-----------|--|-----------------------|---|--|-----|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2015.01) CPC - C12Q 1/6886, C12Q 2600/112 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) IPC(8) - C12Q 1/68 (2015.01) CPC - C12Q 1/6886, C12Q 2600/112 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12Q 1/6886, C12Q 2600/156 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: lung cancer, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, neuroendocrine, marker, biomarker, hybridize, classification, classify, subtype, type, probe, probing | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2010/0233695 A1 (HAYES et al.) 18 September 2010 (16.09.2010) para [003], [0014], [0020], [0036], [0039], [0043], [0045], [0120], [0147], [0148], [0149]; Table 1; claim 11</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | US 2010/0233695 A1 (HAYES et al.) 18 September 2010 (16.09.2010) para [003], [0014], [0020], [0036], [0039], [0043], [0045], [0120], [0147], [0148], [0149]; Table 1; claim 11 | 1-4 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | |
| X | US 2010/0233695 A1 (HAYES et al.) 18 September 2010 (16.09.2010) para [003], [0014], [0020], [0036], [0039], [0043], [0045], [0120], [0147], [0148], [0149]; Table 1; claim 11 | 1-4 | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | | | | | | | |
| * 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 22 August 2015 (22.08.2015) | | Date of mailing of the international search report 14 SEP 2015 | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | | Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QRP: 571-272-7774 | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/33611

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ファルキ, ハワジン
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27701, ダーハム, エス. マンガム ストリート 280, スイート 350, ジーンセントリック ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ライ-ゴールドマン, マイラ
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27701, ダーハム, エス. マンガム ストリート 280, スイート 350, ジーンセントリック ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ペロウ, チャールズ
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27510, キャルボロ, オーク スプリング コート 103

(72)発明者 ヘイズ, デイビッド ニール
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27514, チャペル ヒル, グレンデール ドライブ 127

(72)発明者 メイヒュー, グレグ
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27701, ダーハム, エス. マンガム ストリート 280, スイート 350, ジーンセントリック ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ファン, チェン
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27599, チャペル ヒル, メイソン ファーム ロード 120, ユーエヌシー-チャペル ヒル, デパートメント オブ ジェネティクス 気付

(72)発明者 ミグラリス, マーク アール.
アメリカ合衆国 ノース カロライナ 27701, ダーハム, エス. マンガム ストリート 280, スイート 350, ジーンセントリック ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25
QS34 QX01