(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5865241号
(P5865241)
(45)発行日　平成28年2月17日(2016.2.17)　(24)登録日　平成28年1月8日(2016.1.8)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N　15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q　1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12Q　1/06	(2006.01)	C12N	15/00	F
A61P　35/00	(2006.01)	C12Q	1/06	
A61P　1/04	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 18　(全 32 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-506544 (P2012-506544)
(86)(22)出願日　平成22年4月21日 (2010.4.21)
(65)公表番号　特表2012-524537 (P2012-524537A)
(43)公表日　平成24年10月18日 (2012.10.18)
(86)国際出願番号　PCT/FR2010/000323
(87)国際公開番号　WO2010/122243
(87)国際公開日　平成22年10月28日 (2010.10.28)
審査請求日　平成25年4月3日 (2013.4.3)
(31)優先権主張番号　09/01936
(32)優先日　平成21年4月22日 (2009.4.22)
(33)優先権主張国　フランス(FR)
(31)優先権主張番号　61/171,495
(32)優先日　平成21年4月22日 (2009.4.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　514058706
ユニヴェルシテ・ドゥ・ボルドー
フランス・Ｆ－３３０００・ボルドー・プラース・ペイ・ベルラン・３５
(73)特許権者　511256082
アンスティテュ　ベルゴニー
ＩＮＳＴＩＴＵＴ　ＢＥＲＧＯＮＩＥ
フランス国　Ｆ－３３０７６　ボルドー　セデックス　クール　ドゥ　ラルゴンヌ　２２９
(73)特許権者　508034266
アンスティテュ・キュリー
フランス国，７５２４８　パリ　セデックス　５，リュダルム　２６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】肉腫の予後分子署名およびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１０のポリヌクレオチド、配列番号３のポリヌクレオチド、配列番号４７のポリヌクレオチド、配列番号５８のポリヌクレオチド、および配列番号２４のポリヌクレオチドからなる、ポリヌクレオチド混合物。
【請求項２】
配列番号１から配列番号６７までのポリヌクレオチドからなる、ポリヌクレオチド混合物。
【請求項３】
固体支持体または液体支持体に固定化されている、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物。
【請求項４】
軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）の治療を目的とする化合物を得るための、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物の使用。
【請求項５】
生物試料における、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物の発現レベルを決定することを含む、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）を分析するインビトロの方法。
【請求項６】
前記発現レベルの決定が転移出現の予測を可能にする、請求項５に記載の方法。

【請求項７】
前記発現レベルの決定が、同じ組織学的悪性度分類の軟部組織肉腫（ＳＴＳ）のグループまたは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）のグループのうち、予後が良好または不良であるサブグループの区別を可能にし、これにより前記軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）の診断を補助する、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記発現レベルの決定が核酸チップ上で行われる、請求項５乃至７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）の検出、予後診断の補助、および診断の補助のうちの少なくとも一つのための、または軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の治療の監視のための、請求項５に記載の方法であって、
　前記決定された発現レベルが、前記検出、前記予後診断の補助、前記診断の補助、前記治療の監視を可能にする、方法。
【請求項１０】
軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者において転移出現を予測するインビトロの方法であって、
　ａ）試験されるべき該患者から予め回収された腫瘍生物試料を提供する工程；
　ｂ）該腫瘍生物試料において、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物の発現レベルを決定する工程；および
　ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、対照の生物試料において測定された同じポリヌクレオチド混合物の発現レベルを比較する工程；
を含み、対照の生物試料において測定された対応する発現レベルと比較した、ポリヌクレオチド混合物の発現レベルの脱制御が、転移出現の可能性の度合いを示す、方法。
【請求項１１】
軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の予後を評価するインビトロの方法であって、
　ａ）試験されるべきＳＴＳ患者から予め回収された腫瘍生物試料を提供する工程；
　ｂ）該腫瘍生物試料において、請求項１または２に記載のポリヌクレオチドの混合物の発現レベルを決定する工程；および
　ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、対照の生物試料において測定された同じポリヌクレオチド混合物の発現レベルを比較する工程；
を含み、対照の生物試料において測定された対応する発現レベルと比較した、ポリヌクレオチド混合物の発現レベルの脱制御が、予後が良好であるサブグループまたは予後が不良であるサブグループの特定を可能にする、方法。
【請求項１２】
軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）を治療するための候補化合物についてスクリーニングするインビトロの方法であって、
　ａ）腫瘍生物試料を試験化合物と接触させる工程；
　ｂ）該腫瘍生物試料において、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物の発現レベルを決定する工程；および
　ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、該試験化合物と接触していない同じ腫瘍生物試料の発現レベルを比較する工程；
を含み、該試験化合物の非存在下での該腫瘍生物試料の発現レベルと比較した、該試験化合物の存在下での該腫瘍生物試料における発現レベルの減少が、ＳＴＳまたはＧＩＳＴの治療に使用され得る化合物を示す指標である、方法。
【請求項１３】
軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の処置の抗転移有効性を監視するためのインビトロの方法であって、

ａ）試験されるべき処置された該患者から予め回収された腫瘍生物試料を提供する工程；

ｂ）該腫瘍生物試料において、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物の発現レベルを決定する工程；および

ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、対照の生物試料または処置前の該患者からの腫瘍生物試料の発現レベルを比較する工程；

を含み、該対照の生物試料または該処置前の腫瘍生物試料の発現レベルと比較した、該処置後の腫瘍生物試料の発現レベルの減少が、治療的処置の抗転移有効性を示す指標である、方法。

【請求項１４】

請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物を選択するインビトロの方法であって、

ａ）軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者から得られた腫瘍生物試料を提供する工程；

ｂ）該腫瘍生物試料の各々において個別に、該ポリヌクレオチドの各々の検出および定量の少なくとも一方を行う工程；

ｃ）該腫瘍生物試料の各々について、生物学的表現型に関して、工程ｂ）において得られた該ポリヌクレオチドの発現プロファイルを比較する工程；

ｄ）試験された該表現型について、統計学的に有意な経路（$\mathrm{p} < 10^{-5}$）を選択する工程；および

ｅ）この生物学的経路に有意に関与するポリヌクレオチドを選択する工程；

を含み、前記ポリヌクレオチドの発現が転移出現の可能性を示す、方法。

【請求項１５】

前記生物学的表現型が、染色体の不安定性、ゲノムの複雑性または組織学的悪性度分類である、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】

請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物を含むキット。

【請求項１７】

請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物の発現を検出するかまたは定量するかの少なくとも一方を行う手段を含む、転移出現のインビトロでの予測、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の予後の評価、および軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の治療的処置の抗転移有効性の監視のうちの少なくとも一つのためのキット。

【請求項１８】

固体支持体または液体支持体に固定化されている、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド混合物を含む核酸チップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、肉腫、特に遺伝的に複雑な肉腫の予後分子署名（予後分子サイン）、ならびに肉腫患者の無転移生存および全生存を予測するためのその使用に関する。

肉腫予後もしくは診断の領域において、または肉腫患者の治療の監視のために、多くの応用が見出される。

【背景技術】

【０００２】

成人における軟部組織肉腫（ｓｏｆｔ ｔｉｓｓｕｅ ｓａｒｃｏｍａｓ：ＳＴＳ）は、局在性、組織学、分子異常性および予後の観点から稀であり、しかも異質である。低分化ＳＴＳは、成人において最も一般的な悪性腫瘍であり、病理学的診断の約５０％を示し、主に、複雑な核型の肉腫、すなわち、平滑筋肉腫（ｌｅｉｏｍｙｏｓａｒｃｏｍａｓ：ＬＭＳ）、未分化肉腫（ｕｎｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ ｓａｒｃｏｍａｓ：ＵＳ）

または悪性線維性組織球腫（ｍａｌｉｇｎａｎｔ　ｆｉｂｒｏｈｉｓｔｉｏｃｙｔｏｍａｓ：ＭＦＨ）、および脱分化した脂肪肉腫（ｄｅｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ　ｌｉｐｏｓａｒｃｏｍａｓ：ＤＤ－ＬＰＳ）（非特許文献１）を含む。遺伝子レベルで、低分化ＳＴＳは、２つの主要なグループに分けることができる。複雑なゲノムプロファイルのグループ（８０％）には、本質的に、非常に複雑であるが、ゲノム不均衡の再発プロファイルと関連したＵＳ、ＬＭＳ、多形性横紋筋肉腫および多形性脂肪肉腫が含まれ（非特許文献２；非特許文献３；非特許文献４）、高レベルの限定された増幅に基づく単純な遺伝子プロファイルを有し、専らＤＤ－ＬＰＳから構成される第２のグループ（２０％）がある（非特許文献５；非特許文献６）。ＳＴＳは、局所性および転移性再発の可能性がある浸潤性腫瘍である。このような腫瘍を有する患者は、通常、予後が不良であり、４０～５０％が、最終的には、特に肺に、概して診断の５年以内に遠隔転移を発症する（非特許文献７；非特許文献８）。

【０００３】

ＳＴＳの臨床的治療は、主に外科的切除からなり、期間および性質が切除縁、腫瘍組織型および組織学的悪性度分類に依存するアジュバント治療を伴う。しかしながら、化学療法などのアジュバント療法の恩恵が現在議論になっているが、最近の研究は、局所的および遠隔的な再発に対する効果を示す傾向にある（非特許文献９；非特許文献１０；非特許文献１１）。それにもかかわらず、化学療法の有効性は不十分である（評価基準によると３～１０％、非特許文献１１、前掲）；これは、腫瘍悪性度が組織学的悪性度分類によって評価される患者の選択に起因している可能性があった。さらに、患者の管理は、本質的には病期に依存する。ある種のタイプの肉腫の臨床的評価に関する有効な情報が提供されているが、組織学的分類は、他種の肉腫、特に、未分類であり、低分化および非転座と関連した肉腫について限定された予測値を有する。予後に関して組織学の予測値を増大させるために、いくつかの評価システムが詳述されている（非特許文献１２；非特許文献１３；非特許文献１４；非特許文献１５；非特許文献１６）。後者のうち、国立癌研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ：ＮＣＩ）（非特許文献１６、前掲）のシステム、および全国癌対策センター連合（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃｅｎｔｅｒｓ　Ｃｏｍｂａｔｉｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ）（Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌｅ　ｄｅｓ　Ｃｅｎｔｒｅｓ　ｄｅ　Ｌｕｔｔｅ　Ｃｏｎｔｒｅ　ｌｅ　Ｃａｎｃｅｒ，ＦＮＣＬＣＣ）（非特許文献１５、前掲）のシステムは幅広く使用されているが、２番目のシステムは、遠隔転移を予測するための能力が僅かに増大し、このために「ゴールド・スタンダード」と見なされてきた（非特許文献１７）。

【０００４】

これまで、組織学的悪性度分類は、無転移生存および全生存を予測するための最良の基準である。ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類が最も有効であり、２０年以前に確立し、今でも最も一般に使用されているシステムである。それは、腫瘍分化、壊死、および分裂指数の半定量的評価に基づいている。しかしながら、このシステムにはいくつかの制限がある：病理学者ごとの再現性が完全ではなく、全ての種類の肉腫（非特許文献１８）に適用されず、悪性度２（約４０％の症例を示す）として分類された症例について有益ではなかった。しかしながら、これらの制限にもかかわらず、２０年を超えて、この組織学的悪性度分類システムを置き換えることができる予後基準を提供する研究は行われていない。

【０００５】

最近１０年では、病理数の増大において、予後分子署名の出現が見られるようになってきた。これまで、分子署名の最良の例は、確かに乳癌のものであり、そこでは、転移性再発を予測するための発現サインは２００２年に確立され、次に、同年、同じチームによって、独立したグループの２９５個の腫瘍について有効性が示されたことである（非特許文献１９；非特許文献２０）。

【０００６】

現在まで、肉腫の分野において、発現プロファイルは、特に、新規な診断マーカーの同定、または腫瘍分化に関して、これらの腫瘍の癌遺伝子のさらなる理解を目的として確立

されてきた（非特許文献２１；非特許文献２２；非特許文献２３；非特許文献２４；非特許文献２５；非特許文献２６；非特許文献２７；非特許文献２８）。３０個の平滑筋肉腫（非特許文献２９）および８９個の多形性肉腫（非特許文献３０）に関するたった２つの研究が、予後分子署名を提案している。しかしながら、これらの２つのサインは、それらの間の明確な生物学的な結び付きを伴わない多数の遺伝子（それぞれ３３５個および２４４個）から構成される。さらに、これらの２つのサインは、相対的に低い有意性を与える特定の肉腫の相対的に限定された数の亜型に基づいて確立された。最後に、これまで、これらの２つのサインは、ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムと比較されたことがなく、未だに独立したグループにより有効でないとされ、したがって、それらの臨床的な有用性を制限している。

【０００７】

肉腫の領域では、分子変化を予後に相関させようとする研究の数は、十分に確認された腫瘍の同種研究グループを得ることの困難性により、必然的に限定されている。また、これまで、遺伝子プロファイルと無転移生存との間で、明確かつ証明された相関が確立されていない。

【０００８】

したがって、腫瘍予後は、肉腫のグループ内で予期することがなおも困難であり、治療が期待できるほど適合されていない。結論として、肉腫の予後と診断を改善し、結果として患者の良好な臨床的アフターケアを確実にする明確な必要性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】フレッチャー（ＦＬＥＴＣＨＥＲ）ら，Ｗｏｒｌｄ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ（WHO）ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｕｍｏｕｒｓ．Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ｏｆ　ｔｕｍｏｕｒｓ　ｏｆ　ｓｏｆｔ　ｔｉｓｓｕｅ　ａｎｄ　ｂｏｎｅ．Ｌｙｏｎｓ，ＩＡＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，２００2

【非特許文献２】イドバイチ（ＩＤＢＡＩＨ）ら，Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．，８５（２）：１７６－１８１，２００５

【非特許文献３】チボン（ＣＨＩＢＯＮ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．，１４１（１）：７５－７８，２００３

【非特許文献４】デレ（ＤＥＲＲＥ）ら，Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．，８１（２）：２１１－２１５，２００１

【非特許文献５】チボン（ＣＨＩＢＯＮ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．，１３９（１）：２４－２９，２００２

【非特許文献６】コインドレ（ＣＯＩＮＤＲＥ）ら，Ｍｏｄ．Ｐａｔｈｏｌ．，１６（３）：２５６－２６２，２００３

【非特許文献７】ウェイツ（WEＩＴＺ）ら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃ．，２１（１４）：２７１９－２７２５，２００３

【非特許文献８】ザガース（ＺＡＧＡＲＳ）ら，Ｃａｎｃｅｒ，９７（１０）：２５３０－２５４３，２００３

【非特許文献９】サマック（ＳＭＡＣ），Ｌａｎｃｅｔ，３５０（９０９２）：１６４７－１６５４，１９９７

【非特許文献１０】フルスタチ（ＦＲＵＳＴＡＣＩ）ら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，１９（５）：１２３８－１２４７，２００１

【非特許文献１１】パーバイツ（ＰＥＲＶＡＩＺ）ら，Ｃａｎｃｅｒ，１１３（３）：５７３－５８１，２００８

【非特許文献１２】ブローダー（ＢＲＯＤＥＲＳ）ら，Ｓｕｒｇ．Ｇｙｎｅｃｏｌ，Ｏｂｓｔｅｔ．，６９：２６７－２８０，１９３９

【非特許文献１３】ラッセル（ＲＵＳＳＥＬＬら，Ｃａｎｃｅｒ，４０（４）：１５６２

－１５７０，１９７７
【非特許文献１４】マークヒデ（ＭＡＲＫＨＥＤＥ）ら，Ｃａｎｃｅｒ，４９（８）：１７２１－１７３３，１９８２
【非特許文献１５】トロジャニ（ＴＲＯＪＡＮＩ）ら，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，３３（１）：３７－４２，１９８４
【非特許文献１６】コスタ（ＣＯＳＴＡ）ら，Ｃａｎｃｅｒ，５３（３）：５３０－５４１，１９８４
【非特許文献１７】グイロウ（ＧＵＩＬＬＯＵ）ら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃ．，１５（１）：３５０－３６２，１９９７
【非特許文献１８】コインドレ（ＣＯＩＮＤＲＥ）ら，Ｃａｎｃｅｒ，９１（１０）：１９１４－１９２６，２００１
【非特許文献１９】ヴァント・ベアー（ＶＡＮ’Ｔ　ＶＥＥＲ）ら，Ｎａｔｕｒｅ，４１５（６８７１）：５３０－５３６，２００２
【非特許文献２０】ヴァント・デ・ヴィジュバー（ＶＡＮ　ｄｅ　ＶＩＪＶＥＲ）ら，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，３４７（２５）：１９９９－２００９，２００２
【非特許文献２１】ニールセン（ＮＩＥＬＳＥＮ）ら，Ｌａｎｃｅｔ，３５９（９３１４）：１３０１－１３０７，２００２
【非特許文献２２】バイデ（ＢＡＩＲＤ），Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６５（２０）：９２２６－９２３５，２００５
【非特許文献２３】フリッツ（ＦＲＩＴＺ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６２（１１）：２９９３－２９９８，２００２
【非特許文献２４】マタスハンスキー（ＭＡＴＵＳＨＡＮＳＫＹ）ら，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．，１７２（４）：１０６９－１０８０，２００８
【非特許文献２５】シーガル（ＳＥＧＡＬ）ら，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．，１６３（２）：６９１－７００，２００３
【非特許文献２６】リー（ＬＥＥ）ら，Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，８８（４）：５１０－５１５，２００３
【非特許文献２７】ナカヤマ（ＮＡＫＡＹＡＭＡ）ら，Ｍｏｄ．Ｐａｔｈｏｌ．，２０（７）：７４９－７５９，２００７
【非特許文献２８】シンガー（ＳＩＮＧＥＲ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６７（１４）：６６２６－６６３６，２００７
【非特許文献２９】リー（ＬＥＥ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６４（２０）：７２０１－７２０４，２００４
【非特許文献３０】フランシス（ＦＲＡＮＣＩＳ）ら，ＢＭＣ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，８：７３，２００７
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
　したがって、本発明の目的の１つは、従来技術の欠点を克服するために、より有効であり、信頼でき、かつ再現可能な評価システムを提供することである。本発明の別の目的は、上記評価システムを実施するための手段およびキットを提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
　ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムがゲノム変化の表現型概要を示し得るという仮定に基づいて、本発明者らは、ＤＮＡチップなどの新興技術による分子プロファイルの確立が、同定されるべき腫瘍の攻撃性の起源での変化／遺伝子を可能にし、したがって、分子変化に基づくより効果的な悪性度評価システムを画定する能力を与えることを全く予期せずに発見した；これは、肉腫分析の領域において大きな進歩をもたらす。
【００１２】
　分子変化を予後に相関させようとする研究数は、十分に確認された腫瘍の同種研究グル

ープを得ることの困難性により限定される一方で、本発明者らは、欧州コンチカベース（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｎｔｉｃａｂａｓｅ）（ｗｗｗ．ｃｏｎｔｉｃａｂａｓｅ．ｏｒｇ）の一体部分であるＧＳＦ（Ｇｒｏｕｐｅ Ｓａｒｃｏｍｅ Ｆｒａｎｃａｉｓ／フランス肉腫グループ）のデータベースにおいて参照される、未処理および完全に確立された、１８３個の遺伝的に複雑な原発腫瘍からゲノムおよび発現プロファイルを決定する目的で最初のプロジェクトを開始した。グループ分析は、患者の臨床転帰と関連した分子変化を同定するために用いられた。

【００１３】

このアプローチは、以下の実験セクションで説明され、特に転移出現を予測するが、なお同じ組織学的悪性度分類の肉腫患者のグループ内で、有意に異なる予後を有するサブグループを区別するために、ゲノムの複雑性、腫瘍の攻撃性、およびその発現プロファイルが肉腫患者の信頼できる予後の確立を可能にしたか、と関連付ける「プール」または「分子署名」と呼ばれる、特定の遺伝子セットを同定することを可能にした。

【００１４】

したがって、本発明は、第１に、配列番号１から配列番号６７までのポリヌクレオチド配列から選択された少なくとも２つのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのプールに関する。言い換えれば、本発明に係るポリヌクレオチドのプールは、配列番号１から配列番号６７までのポリヌクレオチド配列から選択される２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、または６７のポリヌクレオチドを含むことができる。

【００１５】

さらに、遺伝子オントロジー（Ｇｅｎｅ Ｏｎｔｏｌｏｇｙ：ＧＯ）データベースによって同定された６７個の遺伝子（配列番号１から配列番号６７まで）の分析は、それらの全てが、同じ生物学的工程、すなわち、染色体の完全性の調節に関与することを示した。

【００１６】

さらに、本発明者らは、これらの遺伝子が、有糸分裂におけるそれらの役割に従って５つの主なグループに区分され得ることを示した：有糸分裂および細胞周期の調節の点（１２個の遺伝子、配列番号１～１２）；染色体、凝集、アラインメントおよび分離の生物発生（２６個の遺伝子、配列番号１３～３８）；有糸分裂紡錘体および中心体（１２個の遺伝子、配列番号３９～５０）；微小管モーター、キネシン複合体（８個の遺伝子、配列番号５１～５８）、および細胞質分裂（４個の遺伝子、配列番号５９～６２）；最後の５個の遺伝子のうち、実験結果に基づいて一緒にされ（配列番号６３～６７）、３個は染色体不安定性に関与することが知られ（配列番号６３～６５）、および２個は本研究に従って、組織学的悪性度分類と関連付けられる（配列番号６６および６７）。

【００１７】

以下の表１は、各遺伝子の名称、５つの主なグループへのそれらの分類、およびそれらの各配列（ＧｅｎＢａｎｋ参照および配列番号）を示す。

【００１８】

【表１】

表1

セット	遺伝子の名称	プローブセットＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（商標）参照番号	ＧｅｎＢａｎｋ参照番号	配列番号
セット１：有糸分裂および細胞周期	ASPM	219918_a_at	NM_018136	1
	FOXM1	202580_x_at	NM_021953	2
	PAK3 / UBE2C	202954_at	NM_002578	3
	CDC7	204510_at	NM_003503	4
	CDC20	202870_s_at	NM_001255	5
	CDC45L	204126_s_at	NM_003504	6
	CCNA2	203418_at	NM_001237	7
	CCNB1	214710_s_at	NM_031966	8
	CCNB2	202705_at	NM_004701	9
	CKS2	204170_s_at	NM_001827	10
	MELK	204825_at	NM_014791	11
	CDCA3	223307_at	NM_031299	12
セット２：染色体、アラインメント、分離の生物発生	NCAPH	212949_at	NM_015341	13
	HP1BP3	1554251_at	NM_016287	14
	CENPA	204962_s_at	NM_001042426	15
	KIAA1794	213007_at	NM_018193	16
	SMC2	204240_s_at	NM_001042550	17
	CHEK1	205394_at	NM_001274	18
	H2AFX	205436_s_at	NM_002105	19
	OIP5	213599_at	NM_007280	20
	MCM2	202107_s_at	NM_004526	21
	MCM7	210983_s_at	NM_005916	22
	BIRC5	202095_s_at	NM_001012270	23
	AURKA	204092_s_at	NM_003600	24
	MAD2L1	1554768_a_at	NM_002358	25
	BUB1	215509_s_at	NM_004336	26

	AURKB	239219_at	NM_004217	27
	BUB1B	203755_at	NM_001211	28
	SGOL2	230165_at	NM 152524	29
	PTTG1	203554_x_at	NM_004219	30
	CENPE	205046_at	NM_001813	31
	NUF2	223381_at	NM_031423	32
	CDCA8	221520_s_at	NM_018101	33
	CENPL	1554271_a_at	NM_033319	34
	ZWINT	204026_s_at	NM_001005413	35
	SPBC25	209891_at	NM_020675	36
	TOP2A	201291_s_at	NM_001067	37
	ESPL1	38158_at	NM_012291	38
セット３：有糸分裂紡錘体および中心体	CDC2	203213_at	NM_001786	39
	TTK	204822_at	NM_003318	40
	RRM2	201890_at	NM_001034	41
	SPAG5	203145_at	NM_006461	42
	FBX05	234863_x_at	NM_012177	43
	NDE1	222625_s_at	NM_017668	44
	CDC6	203967_at	NM_001254	45
	PLK4	204886_at	NM_014264	46
	NEK2	204641_at	NM_002497	47
	TPX2	210052_s_at	NM_012112	48
	CEP55	218542_at	NM_018131	49
	CKAP5	1555278_a_at	NM_001008938	50
セット４：微小管				
	KIF11	204444_at	NM_004523	51
	KIF15	219306_at	NM_020242	52
	KIF23	244427_at	NM_004856	53
	KIF4A	218355_at	NM_012310	54
	KIF14	236641_at	NM_014875	55
	KIF18A	221258_s_at	NM_031217	56
	KIF20A	218755_at	NM_005733	57
	KIF2C	209408_at	NM_006845	58
細胞質分裂	ECT2	219787_s_at	NM_018098	59

	ANLN	1552619_a_at	NM_018685	60
	PBK	219148_at	NM_018492	61
	PRC1	218009_s_at	NM_003981	62
セット５：カーター（Ｃａｒｔｅｒ）不安定性	RAD51AP1	204146_at	NM_006479	63
	RNASEH2A	203022_at	NM_006397	64
	TRIP13	204033_at	NM_004237	65
研究における悪性度	CDCA2	236957_at	NM_152562	66
	C13orf34	219544_at	NM_024808	67

好都合には、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドを含むことができる。

【００１９】

好都合には、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチド、および配列が、本発明との関連で同定された他の６２個の遺伝子配列から選択された少なくとも１つの遺伝子を含むことができる。言い換えれば、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドと、配列番号１、配列番号２、配列番号４から配列番号９、配列番号１１から配列番号２３、配列番号２５から配列番号４６、配列番号４８から配列番号５７、および配列番号５９から配列番号６７の配列から選択される配列を有する少なくとも１つのポリヌクレオチドとを含むことができる。

【００２０】

あるいは、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドから構成され得る。言い換えれば、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドだけを含むことができる。

【００２１】

あるいは、本発明のポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチド、および配列が、本発明との関連で同定された他の６２個の遺伝子配列から選択された少なくとも１つの遺伝子から構成され得る。言い換えれば、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドと、配列番号１、配列番号２、配列番号４から配列番号９、配列番号１１から配列番号２３、配列番号２５から配列番号４６、配列番号４８から配列番号５７、および配列番号５９から配列番号６７の配列から選択される配列を有する少なくとも１つのポリヌクレオチドとだけから構成され得る。

【００２２】

本発明の別の実施形態によれば、本発明に係るポリヌクレオチドのプールは、ポリヌクレオチドの以下のセット：

セット１：配列番号１から配列番号１２まで；

セット２：配列番号１３から配列番号３８まで；

セット３：配列番号３９から配列番号５０まで；

セット４：配列番号５１から配列番号５８まで、および配列番号５９から配列番号６２

まで；
　セット５：配列番号６３から配列番号６５まで、および配列番号６６から配列番号６７まで
の各々から選択された少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むことができる。
【００２３】
　本発明の別の実施形態によれば、本発明のポリヌクレオチドのプールは、セット１～５から選択され得る。言い換えれば、少なくとも２つのポリヌクレオチドのプールは、セット１、セット２、セット３、セット４またはセット５の全部またはその一部から構成され得る。言い換えれば、本発明のプールは、セット１の全部もしくは一部、またはセット２の全部もしくは一部、またはセット３の全部もしくは一部、またはセット４の全部もしくは一部、またはセット５の全部もしくは一部から構成され得る。
【００２４】
　本発明の別の実施形態によれば、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチド、ならびにセット５から選択された少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むことができる。このポリヌクレオチドのプールは、本発明との関連で同定された他の遺伝子の少なくとも１つをさらに含むことができる。
【００２５】
　本発明の別の実施形態によれば、ポリヌクレオチドのプールは、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチド、ならびにセット５から選択された少なくとも１つのポリヌクレオチドから構成され得る。
【００２６】
　本発明の別の実施形態によれば、本発明のポリヌクレオチドのプールは、配列番号１から配列番号６７までの配列のポリヌクレオチドを含む。それは、例えば、配列番号１から配列番号６７までの配列からなるプールであってもよい。
【００２７】
　本発明の実施形態にかかわらず、好都合には、ポリヌクレオチドのプールは、最大１０個のポリヌクレオチドを好都合に含むことができる。それは、例えば、配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドからなる配列のポリヌクレオチド、ならびに配列番号１、配列番号２、配列番号４から配列番号９、配列番号１１から配列番号２３、配列番号２５から配列番号４６、配列番号４８から配列番号５７、配列番号５９から配列番号６７から選択される配列の少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む、最大１０個のポリヌクレオチドを含むプールであってもよい。
【００２８】
　本発明の実施形態にかかわらず、好都合には、本発明のポリヌクレオチドのプールは、支持体、例えば、固体支持体または液体支持体に固定化されている。支持体が液体支持体である場合には、それは、核酸が固定されるビーズを含むことができる。液体媒体は、細胞培養上清、血清、血漿であってもよく、このリストは包括的ではない。それは、例えば、Ｌｕｍｉｎｅｘ（登録商標）技術に使用される支持体であってもよい。支持体が固体支持体である場合には、それは、好ましくは、ナイロンメンブレン、ニトロセルロースメンブレン、ガラスプレート、ガラスビーズ、ガラス支持体またはシリコンチップ上のメンブレン、プラスチック支持体からなる群から選択される。特に好ましくは、固体支持体は、核酸チップ、例えば、ＤＮＡチップ（または遺伝子チップ、バイオチップ、発現チップとも呼ばれる）であり得る。腫瘍が互いと比較して分類され得る関数として、発現の平均値を決定するために、上記チップは、（ｉ）２つの実験条件：一般的には参照条件と病理学的条件、または（ｉｉ）いくつかの腫瘍、との間で、本発明のオリゴヌクレオチドのプールの２またはそれを超えるポリヌクレオチドの発現（差異発現）変化の定量的な測定を可能にする。非制限的な例として、それは、Ａｆｆｉｍｅｔｒｉｘ（登録商標）ＤＮＡチッ

プ、またはアジレント・テクノロジーズ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）社のＤＮＡチップであってもよい。

【００２９】

本発明者らによって同定された遺伝子は、その全てが同じ生物学的工程に関与し、さらに、転移能獲得の初期段階を標的とする新規な治療的アプローチの潜在的な標的となり得る。さらに、これらの遺伝子の発現プロファイルに基づく患者の生命予後は、非常に初期であるか、またはさらには初期診断中に行うことができる。

【００３０】

このようにして、本発明の特定の実施形態によれば、本発明のポリヌクレオチドのプールは、軟部組織肉腫（ｓｏｆｔ　ｔｉｓｓｕｅ　ｓａｒｃｏｍａ：ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ　ｓｔｒｏｍａｌ　ｔｕｍｏｒ：ＧＩＳＴ）の検出、予後、診断のため、または軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の治療の監視のために用いることができる。

【００３１】

本発明の別の特定の実施形態によれば、本発明のポリヌクレオチドのプールは、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）の治療を目的とする化合物を得るために用いることができる。

【００３２】

一般的にＤＮＡ発現チップのデータから、予後グループと関連した発現プロファイルを同定するために、２つの主なアプローチ、不良な予後と直接的に相関される遺伝子の選択を目的とする監視下の下行または「トップダウン」アプローチ（ヴァント・ベアー（ＶＡＮ’Ｔ　ＶＥＥＲ）ら，２００２，前掲；ソチリョウ（ＳＯＴＩＲＩＯＵ）ら，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ，９８（４）：２６２－２７２，２００６）、および特定の生物学的表現型と関連した発現プロファイルが最初に同定され、次に、続いて臨床転帰に関連付けられる監視下の「ボトムアップ」アプローチが使用され得る（ソチリョウ（ＳＯＴＩＲＩＯＵ）ら，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，３６０（８）：７９０－８００，２００９）。本発明との関連で、第２の「ボトムアップ」アプローチは、腫瘍発現プロファイルが生物学的表現型（染色体の不安定性、ゲノムの複雑性および組織学的悪性度分類）の関数として比較されるが、遺伝子の直接的な選択の代わりに、試験される表現型に特に関連した生物学的経路が最初に同定され、次に、これらの経路に有意に関与される遺伝子が同定されるという意味において提供された。生物学的経路のこの選択（遺伝子の選択でない）は、転座と関連しない肉腫の選択などの異種のグループにおいて、さらに、ＧＩＳＴ（消化管間質腫瘍）および乳癌などの異なるタイプの腫瘍において、本発明の幸運な結果をもたらす重要な工程である。

【００３３】

したがって、本発明はまた、ポリヌクレオチドのプール、例えば、本発明に係るポリヌクレオチドのプールを選択するインビトロの方法であって、

ａ）軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者から得られた腫瘍生物試料を提供する工程；

ｂ）該腫瘍生物試料の各々において個別に、該ポリヌクレオチドの各々を検出および／または定量する工程；

ｃ）該腫瘍生物試料の各々について、好ましくは染色体の不安定性、ゲノムの複雑性または組織学的悪性度分類の生物学的表現型に関して、工程ｃ）において得られた該ポリヌクレオチドのプールの発現プロファイルを比較する工程；

ｄ）試験された該表現型について、統計学的に有意な（ｐ＜１０$^{-5}$）生物学的経路を選択する工程；および

ｅ）この生物学的経路に有意に関与するオリゴヌクレオチドを選択する工程；

を含み、そのポリヌクレオチドの発現が転移出現の可能性を示す、方法に関する。

【００３４】

「発現プロファイル」とは、１セットのポリヌクレオチドの発現が決定される場合に得

られる結果の全体性を意味する。上記プロファイルは、定量的な統計分析技術の使用を促進し、結果の迅速な視覚的比較を可能にする。好ましくは、上記プロファイルは、ＤＮＡチップなどの固体支持体から得られる。

【００３５】

「生物学的表現型」は、本発明の意味において、遺伝的状態の現れ、または染色体によって担持された情報（遺伝子型）の発現を反映する、ＳＴＳもしくはＧＩＳＴ患者から得られる試料を特徴付ける観察可能な特徴のセットを意味する。

【００３６】

「染色体の不安定性」とは、本発明の意味において、クローン性または非クローン性再配列を意味する。この不安定性は、染色体アームの喪失および獲得、ならびに不安定な染色体再配列をもたらす。個々の細胞の核内の染色体の不安定性は、新生組織形成（癌の出現）に関して、後者をより攻撃されやすくなる。この不安定性が見出されるのは腫瘍細胞においてである。

【００３７】

「ゲノムの複雑性」とは、本発明の意味において、不均衡数、および関連する染色体断片の性質の決定を意味する。

「組織学的悪性度分類」とは、本発明の意味において、腫瘍増殖の共感性指標、転移の危険性およびアジュバント治療（化学療法）に対する応答を意味する。組織学的または腫瘍の悪性度は、腫瘍を治療するための決定因子である。それは、腫瘍の組織学的試験によって決定され、使用される悪性度評価システムは、例えば、ＦＮＣＬＣＣのシステムである。Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　ｄｅｓ　Ｃｅｎｔｒｅｓ　ｄｅｌｕｔｔｅ　ｃｏｎｔｒｅ　ｌｅ　Ｃａｎｃｅｒ（ＦＮＣＬＣＣ）によって適合されるこのシステムは、次の３つの特徴に基づいている。

【００３８】

【表２】

腫瘍分化	有糸分裂指数	腫瘍壊死
スコア1 肉腫様の正常成人組織 例：十分に分化した脂肪肉腫 スコア2 組織学的タイプの診断が確かである肉腫 例：粘液性脂肪肉腫 スコア3 胎児肉腫、類上皮肉腫、滑膜肉腫、明細胞肉腫、歯茎軟部肉腫、未分化肉腫、および組織学的タイプが未確定である肉腫	スコア1 １０領域について０～９の有糸分裂 スコア2 １０領域について１０～１９の有糸分裂 スコア3 １０領域について＞１９の有糸分裂 １領域の測定値0.1734 mm^2	スコア0 壊死なし スコア1 ＜５０%の腫瘍壊死 スコア2 ＞５０%の腫瘍壊死

ＦＮＣＬＣＣの軟部組織腫瘍の組織学的悪性度分類は、３つのスコアである「分化」、

「有糸分裂指数」および「腫瘍壊死」の合計である：グレード１（全スコア２または３）、グレード２（全スコア４または５）、およびグレード３（全スコア６～８）。

【００３９】

また、本発明は、腫瘍生物試料における、本発明に係るポリヌクレオチドのプールの発現レベルを決定することを含む、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）を分析するためのインビトロの方法に関する。

【００４０】

「腫瘍生物試料」とは、本発明の意味において、任意選択で、ＳＴＳ患者の（ｉ）原発腫瘍、（ｉｉ）腫瘍の中央、（ｉｉｉ）中央以外の腫瘍の部位、および（ｉｖ）腫瘍組織自体の外側に局在した任意の腫瘍、から得られる組織試料を意味する。上記腫瘍生物試料は、例えば、原発腫瘍から腫瘍細胞または原発腫瘍由来の腫瘍細胞によって生成される腫瘍タンパク質を含む、患者のＳＴＳについて行われる外科手術または腫瘍切除、その後の分析のために、腫瘍組織の一部が患者のＳＴＳから回収される生検；血液試料、例えば、全血、血漿または血清が起源であってもよい。

【００４１】

本発明のポリヌクレオチドのプールの発現レベルは、従来技術として知られている任意の方法によって決定することができる。例えば、ＳＴＳ患者から得られる試料における、本発明の分子署名に関わる少なくとも２つのポリヌクレオチドの発現レベルは、ポリヌクレオチドに対応するｍＲＮＡおよび／またはポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質のレベルを測定することによって決定することができる。ＲＮＡは、当業者によって周知である方法、例えば、ＡＵＳＵＢＥＲら（Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１：４．１．１－４．２．９および４．５．１－４．５．３，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，１９９６）に報告されている方法によって試料から単離することができる。本発明を実施するために使用することができる、ｍＲＮＡの発現レベルを検出する方法は従来技術において周知であり、限定されないが、発現チップ、ノーザンブロッティング、リアルタイム定量的ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、タックマン（Ｔａｑｍａｎ）プローブまたは微小流体カードを用いたＲＴ－ＰＣＲ、および、一般的には、ハイブリダイゼーション技術（すなわち、非共有結合によって互いにハイブリダイズして、二本鎖構造を形成するために完全に相補的であるかまたは十分に相補的である２つの一本鎖ポリヌクレオチドの会合）を含む。

【００４２】

好都合には、ポリヌクレオチドのプールが最大１０個のポリヌクレオチドを含む場合、本発明のポリヌクレオチドのプールの発現レベルは、規定通りに定量的ＰＣＲによって決定することができる。さらに、組織もしくは臓器の試料、または生物試料を含むパラフィンブロックから得られるＲＮＡを用いることが可能である場合がある。

【００４３】

本発明によれば、記載される複数のポリヌクレオチドから発現されるｍＲＮＡ転写物のレベルを決定するための特に有効な方法は、オリゴヌクレオチドチップ（ＤＮＡチップ、遺伝子チップ、発現チップとも呼ばれる）への標識されたｍＲＮＡのハイブリダイゼーションを伴う。上記方法は、ポリヌクレオチドの発現プロファイルを生じさせるために、複数のポリヌクレオチドの転写レベルの同時決定を提供する。

【００４４】

このハイブリダイゼーションの方法に使用されるオリゴヌクレオチドは、一般的には、支持体、例えば、固体支持体または液体支持体に固定される。支持体が液体支持体である場合には、それは、核酸が固定されるビーズを含むことができる。液体媒体は、細胞培養上清、血清、血漿であってもよく、このリストは包括的ではない。それは、例えば、Ｌｕｍｉｎｅｘ（登録商標）技術に使用される支持体であってもよい。固体支持体の例としては、限定されないが、メンブラン、フィルター、スライド、ペーパー、ナイロン、ファイバー、磁性であるかどうかにかかわらずにビーズ、ゲル、ポリマーおよび当業者に知られている任意の固体支持体が含まれる。オリゴヌクレオチドが、直接的または間接的に共有

結合または非共有結合によって固定化され得る任意の固体支持体を用いることができる。特に有利な固体支持体は、核酸チップ、特にＤＮＡチップからなる。これらのチップは、チップの所定の定位（ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）にある特定のオリゴヌクレオチドプローブを含む。各々の所定の定位は、特定のプローブの１を超える分子を含むことができる。オリゴヌクレオチドが支持体の特定の位置に局在するため、ハイブリダイゼーションプロファイルおよび強度（一緒になって特有の発現プロファイルを形成する）は、特定のポリヌクレオチドの発現レベルに関して解釈することができる。

【００４５】

オリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドの相補的転写物のみに特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有するものである。「オリゴヌクレオチド」とは、本発明の意味において、一本鎖核酸を意味する。一般には、オリゴヌクレオチドプローブは、１６～２０個のヌクレオチド、ある種の場合には最大２５個のヌクレオチド、またはさらには最大５００個もしくはそれを超えるヌクレオチドからなる。

【００４６】

プローブがｍＲＮＡまたはｃＤＮＡのコピーと接触すると、ｍＲＮＡまたはハイブリダイズしたｃＤＮＡの存在が、従来技術として知られている方法によって検出される。例えば、オリゴヌクレオチドプローブは、１またはそれを超えるマーカーで標識され、ハイブリダイズしたプローブ／標的ポリヌクレオチドの複合体の検出を可能にする。マーカーは、分光的、生化学的、光化学的、生体電子的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出することができる組成を含むことができる。マーカーの例としては、限定されないが、放射性同位体、化学発光化合物、標識された結合タンパク質、重金属原子、分光学的マーカー、例えば、蛍光マーカーおよび色素、結合酵素、質量分析標識および磁気マーカーが挙げられる。例えば、それは、バイオチップ用にはCy^3／Cy^5またはアレクサ（Ａｌｅｘａ）標識、タックマン（Ｔａｑｍａｎ）プローブ用にはＦＡＭ（６－カルボキシフルオロセイン）もしくはＴＡＭＲＡ（テトラーメチルー６－カルボキシローダミン）であってもよい。

【００４７】

発現を監視するためのオリゴヌクレオチドプローブチップは、例えば、ロックハート（ＬＯＣＫＨＡＲＴ）ら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１４：１６７５－１６８０，１９９６；マックギャル（ＭｃＧＡＬＬ）ら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，９３：１３５５５－１３４６０，１９９６；米国特許第６，０４０，１３８号に報告されているように、従来技術において周知である方法に従って調製および使用されてもよい。上記バイオチップは、例えば、アフィメトリックス（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）（カリフォルニア州サンタクララ（Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ）から市販されている。

【００４８】

また、本発明の分子署名において関わる２またはそれを超えるポリヌクレオチドによってコードされたタンパク質の発現を検出することができる。これは、例えば、検出可能に標識されているか、または後に標識され得るプローブの使用などの従来技術として周知である方法によって行うことができる。一般に、プローブは、発現されるタンパク質を認識する抗体である。次に、試料中のタンパク質の発現レベルは、抗体を用いた免疫アッセイ技術、例えば、ドットブロッティング、ウェスタンブロッティング、ＥＬＩＳＡ、免疫組織化学、ＦＡＣＳなどによって決定される。

【００４９】

特定の実施形態によれば、本発明の方法は、ＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者の予後の確立を可能にし、特に、転移出現の危険性の決定／予測を可能にする。

「転移出現を予測する」とは、本発明の意味において、ＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者において、１もしくはそれを超える組織または臓器の転移出現の可能性を定量することができるようになる相対値を決定することを意味する。好ましくは、転移出現の予測は、試験されるオリゴヌクレオチドの各々について得られる発現の値から計算される、ｐ値を含む統

計値によって表される。

【００５０】

別の特定の実施形態によれば、本発明の方法は、ＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者の予後を確立し、特に、初期には同じ組織学的悪性度分類に属するものと見なされる軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）のグループにおける良好または不良の予後のサブグループを区別することができるようになる。

【００５１】

「良好な予後」とは、本発明の意味において、患者が、再発、すなわち、治療中または治療後の５～６年以内の転移出現を示す可能性が低いことを示す、すなわち、有意に異なる長期間の無転移生存を意味する。このようにして、本発明との関連において、ＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者が、本発明の分子署名の遺伝子を低発現し、いずれかのタイプの肉腫の場合の２０％未満で転移を発症する可能性が高く、特にＧＩＳＴの場合には発症しない場合に「良好な予後」のサブグループに属すると考えることができる。反対に、「不良な予後」とは、患者が、治療中または治療後の５～６年以内に再発（転移出現）を起こす可能性が高いことを示すことを意味する。このようにして、本発明との関連で、ＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者が、分子署名の遺伝子を過剰発現し、少なくとも５０％の症例において転移が発症する可能性が高い場合に不良な予後のサブグループに属すると考えられる。

【００５２】

好都合には、本発明の方法におけるポリヌクレオチドのプールの発現レベルの決定は、バイオチップ、ＤＮＡチップ、遺伝子チップ、発現チップとも呼ばれる核酸チップ上で行われる。上記チップは、（ｉ）患者由来の生物試料から、２つの実験条件、例えば、参照または病理学的実験条件、または（ｉｉ）腫瘍が互いに比較して分類し得る関数として、発現の平均値を決定するためにいくつかの腫瘍、の間で、２またはそれを超えるポリヌクレオチドの発現レベルの変化または差次的発現の定量的測定および迅速視覚化を可能にする。非制限的な例として、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（商標）ＤＮＡチップ、またはアジレント・テクノロジーズ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）社のＤＮＡチップを用いることができる。

【００５３】

特定の実施形態によれば、本発明の方法は、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）の検出、予後、診断のため、または軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の治療の監視のために使用することができ、この患者由来の生物試料の核酸に対する本発明の方法の適用を含む。

【００５４】

また、本発明は、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者において転移出現を予測するインビトロの方法であって、

ａ）試験されるべき該患者から予め回収された腫瘍生物試料を提供する工程；

ｂ）該腫瘍生物試料において、本発明のポリヌクレオチドのプールの発現レベルを決定する工程；および

ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、対照の生物試料において測定された同じポリヌクレオチドのプールの発現レベルを比較する工程；

を含み、対照の生物試料において測定された対応する発現レベルと比較した、該オリゴヌクレオチドのプールの発現レベルの脱制御が転移出現を予測する、方法に関する。

【００５５】

「発現レベルの脱制御」とは、下記で定義される対照の生物試料において測定される対応の発現と比較して、試験されるべきＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者の腫瘍生物試料において測定される本発明によるポリヌクレオチドのプールの２またはそれを超えるポリヌクレオチドの過剰発現または低発現を意味する。具体的には、対照の生物試料のレベルと比較した、試験されるべきＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者の腫瘍生物試料における高い発現レベルは、患者が転移を発症する可能性が高いことを示すものであり、すなわち、予後が不良であることを示すのに匹敵する。反対に、対照の生物試料のレベルと比較した、試験されるべ

きＳＴＳまたはＧＩＳＴ患者の腫瘍生物試料における低い発現レベルは、患者が転移を発症する可能性が低いことを示すものであり、すなわち、予後が良好であることを示すのに匹敵する。

【００５６】

「対照の生物試料」とは、本発明の意味において、（ｉ）試験されるべき患者以外のＳＴＳもしくはＧＩＳＴ患者の腫瘍から得られる組織試料、または（ｉｉ）健常な対象、すなわち、医師によって診断されたいずれの病理学および病理学的症状を示さない個体からの組織試料を意味する。このようにして、各々の場合における本発明の分子署名の遺伝子の発現レベルの関数として、腫瘍は、互いに比較して分類され得る。

【００５７】

また、本発明は、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の予後を評価するインビトロの方法であって、

ａ）試験されるべきＳＴＳまたは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者から予め回収された腫瘍生物試料を提供する工程；

ｂ）該腫瘍生物試料において、本発明のポリヌクレオチドのプールの発現レベルを決定する工程；および

ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、対照の生物試料において測定された同じポリヌクレオチドのプールの発現レベルとを比較する工程；

を含み、対照の生物試料において測定された対応する発現レベルと比較した、該オリゴヌクレオチドのプールの発現レベルの脱制御が、予後が良好であるサブグループまたは予後が不良であるサブグループの特定を可能にする、方法に関する。

【００５８】

また、本発明は、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）を治療するための候補化合物についてスクリーニングするインビトロの方法であって、

ａ）予め回収された腫瘍生物試料を試験化合物と接触させる工程；

ｂ）該腫瘍生物試料において、本発明のポリヌクレオチドのプールの発現レベルを決定する工程；および

ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、該試験化合物と接触していない同じ腫瘍生物試料の発現レベルとを比較する工程；

を含み、該試験化合物の非存在下での該腫瘍生物試料の発現レベルと比較した、該試験化合物の存在下での該腫瘍生物試料における発現レベルの減少が、ＳＴＳまたはＧＩＳＴの治療に使用され得る候補化合物を示すものとなる、方法に関する。

【００５９】

本発明は、軟部組織肉腫（ＳＴＳ）または消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の処置の抗転移有効性を監視するインビトロの方法であって、

ａ）試験されるべき処置された該患者から予め回収された腫瘍生物試料を提供する工程；

ｂ）該腫瘍生物試料において、本発明のポリヌクレオチドのプールの発現レベルを決定する工程；および

ｃ）工程ｂ）において得られた発現レベルと、対照の生物試料または処置前の該患者からの腫瘍生物試料の発現レベルを比較する工程；

を含み、該対照の生物試料または該処置前の腫瘍生物試料の発現レベルと比較した、該処置後の腫瘍生物試料の発現レベルの減少が、治療的処置の抗転移有効性を示すものとなる、方法に関する。

【００６０】

第４に、本発明は、本発明のポリヌクレオチドのプールを含むキットに関する。

本発明によれば、このキットは、例えば、転移出現をインビトロで予測、および／または軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の予後の評価、および／または軟部組織肉腫（ＳＴＳ）もしくは消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）患者の治療的処置の抗転移有効性の監視のために用いることができる。

【００６１】
本発明によれば、このキットは、本発明のヌクレオチドのプールの発現を検出および／または定量するための手段をさらに含むことができる。これらの手段は、例えば、上記で定義される手段、または以下の実施例において与えられる手段の１つであってもよい。

【００６２】
第５に、本発明は、本発明のポリヌクレオチドのプールを含むまたはそれからなる核酸チップ、具体的にはＤＮＡチップに関する。このＤＮＡチップは、例えば、上記で定義される通りであり、特に支持体に関係しているものであってもよい。

【００６３】
好都合には、本発明の核酸チップは、固体支持体に固定された「プローブ」、例えば、ｃＤＮＡまたはオリゴヌクレオチド（例えば、６０～８０塩基、またはそれを超える塩基を有する）を含むことができる。これらの「プローブ」は、ハイブリダイゼーションによって、試験されるべき生物試料に存在する、「標的」、例えば、相補的遺伝子を特異的に固定する。このハイブリダイゼーションは、非共有結合によって互いにハイブリダイズし、二本鎖結合を形成するのに完全に相補的であるかまたは十分に相補的である一本鎖核酸配列の会合を必要とする。

【図面の簡単な説明】

【００６４】
【図１】３タイプのゲノムプロファイル、（ａ）増幅（１６％）、（ａ）アーム（２３％）および（ｄ）再配列（６１％）を示す図。
【図２】ＣＩＮＳＡＲＣサインに従った異なるグループの肉腫の無転移生存のカプラン－マイヤー（Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ）曲線を示す図。
【図３】ＣＩＮＳＡＲＣサインに従った３グループの腫瘍の進行／転移を伴わない生存のカプラン－マイヤー曲線を示す図。
【図４】配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドからなるヌクレオチドのプールによるサインに従った、肉腫グループ（サインが定義された腫瘍グループ）の進行／転移を伴わない生存（治療後の年数を関数として転移なしの症例の％）のカプラン－マイヤー曲線を示す図。曲線Ａは、良好な予後である患者の生存の曲線を示し、約８０％の症例が５年で転移を伴わないことを示す。曲線Ｂは、不良な予後である患者の生存の曲線を示し、約５０％の症例が５年で転移を伴わないことを示す。
【図５】配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列のポリヌクレオチドからなるヌクレオチドのプールによるサインに従った、肉腫グループ（サインの同定と無関係である腫瘍グループ）の進行／転移を伴わない生存（治療後の年数を関数として転移なしの症例の％）のカプラン－マイヤー曲線を示す図。曲線Ａは、良好な予後である患者の生存の曲線を示し、約９０％の症例が５年で転移を伴わないことを示す。曲線Ｂは、不良な予後である患者の生存の曲線を示し、約５０％の症例が５年で転移を伴わないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【００６５】
実施例
実施例１：本発明のプール
患者および試料
コンチカベース（ｗｗｗ．ｃｏｎｔｉｃａｂａｓｅ．ｏｒｇ）の統一体としてのフランス肉腫グループ（ｇｒｏｕｐｅ　ｓａｒｃｏｍｅ　Ｆｒａｎｃａｉｓ，ＧＳＦ）のデータベースは、患者、原発腫瘍、治療、追跡調査および腫瘍試料の詳細を含む１１のセンターで処置された成人における軟部組織肉腫のデータを含む。このデータベースは、研究時に約３８００症例を含んでいた。全ての症例は、病理学者のサブグループによって精査され、これが必要とされるときに、組織学、免疫組織化学および細胞遺伝学ならびに分子遺伝学を用いて、ＷＨＯ２００２の分類に従って分類された。この研究のために、転移性染色

体転座のない軟部組織肉腫が選択され、このための未処置の原発腫瘍の凍結組織試料が利用可能であった。最後に、以下の表２記載された１８３人の患者から得られた生物試料を調査した。

【００６６】

【表３】

表２

特徴	腫瘍グループ（ｎ＝１８３）	p値
平均追跡調査（月）	64	
平均年齢（齢） 標準偏差	63 15	0.07
男性（%）	98 (53)	0.75
ＦＮＣＬＣＣ悪性度（%）		0.43
1	7 (4)	
2	62 (34)	
3	102 (56)	
n.d.	12 (6)	
組織タイプ（%）		0.01
未分化の肉腫	71 (39)	
平滑筋肉腫	52 (28)	
脱分化した脂肪肉腫	44 (24)	
その他	16 (9)	
局在率（%）		0.23
胴体壁	28 (16)	
胴体壁	113 (62)	
頭頸部	2 (1)	
胴体内部	39 (21)	
平均サイズ（ｃｍ）	10	0.33
深部腫瘍（%）		n.d.
はい	173 (95)	
いいえ	10 (5)	
血管、神経または骨の浸潤（%）		<0.001
はい	27 (15)	
いいえ	156 (85)	
再発イベント（%）		
転移	78 (43)	
局所的再発	72 (39)	
治療のタイプ（%）		

外科手術	50 (27)	
外科手術＋放射線治療	80 (44)	
外科手術＋化学療法	10 (5)	
外科手術＋放射線治療＋化学療法	40 (22)	
データ欠如	3 (2)	

ＤＮＡチップ上のＣＧＨ（比較ゲノムハイブリダイゼーション（Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ））によるＤＮＡ抽出および分析

凍結腫瘍組織のゲノムＤＮＡは、フェノールークロロホルムを用いた抽出用の標準的プロトコールにより単離し、分光光度計（ナノドロップ（Ｎａｎｏｄｒｏｐ））上で分析された。このようにして、ＤｐｎＩＩ（Ｏｚｙｍｅ，Ｓａｉｎｔ－Ｑｕｅｎｔｉｎ　ｅｎ　Ｙｖｅｌｉｎｅｓ，フランス）で消化し、カラム精製（キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＰＣＲ精製キット、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）社）後、１．５μｇの腫瘍ＤＮＡおよび１．５μｇの正常なＤＮＡは、バイオプライム（ＢｉｏＰｒｉｍｅ）ＤＮＡ標識システムキット（インビトロゲン社（Ｉｎｖｅｔｒｏｇｅｎ）、Ｃｅｒｇｙ　Ｐｏｎｔｏｉｓｅ，フランス）を用いて、それぞれＣｙ５－ｄＣＴＰまたはＣｙ３－ｄＣＴＰ（パーキン・エルマー社（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ））により標識された。標識された正常ＤＮＡおよび腫瘍ＤＮＡを混合し、１００μｇのヒトＣｏｔ－１　ＤＮＡ（インビトロゲン社（Ｉｎｖｅｔｒｏｇｅｎ））と共に沈殿させ、７２μｌのハイブリダイゼーション緩衝液（５０％ホルムアミド、４０ｍＭ　NaH_2PO_4、０．１％ＳＤＳ、１０％硫酸デキストラン、２×ＳＳＣ）に再懸濁した。プレハイブリダイズしたプローブをスライドに配置し、高湿度チャンバー（コーニング社（Ｃｏｒｎｉｎｇ））に置き、３７℃にて４８時間ハイブリダイゼーションを行った。

【００６７】

ゲノムプロファイルを確立するために、３８０３ＢＡクローンから構成されるＢＡＣ（細菌人工染色体）チップを作製し、クローン間で平均１Ｍｂであった。ＢＡＣクローンを３点測定で配置した。

【００６８】

ハイブリダイゼーション後の洗浄は、以下のように行った：０．５×ＳＳＣ、０．０３％ＳＤＳ中で６５℃にて洗浄し、次に、同じ溶液中で４５℃にて洗浄した。

スライドをスキャン（スキャナリー（Ｓｃａｎａｒｒｙ）４０００ＸＬ，パッカード・バイオサイエンス社（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ））し、画像分析ソフトウェアであるジーンピックス・プロ（ＧｅｎｅＰｉｘ　Ｐｒｏ）５．１を用いて分析した。標準化、細分類濾過、グループ分析およびグラフ表示は、ＤＮＡチップ分析プラットフォーム（ＣＡＰＷｅｂ）上でＣＧＨを用いて行われた。５０％を超える値の欠損があるクローンを廃棄した。２を超えるＣｙ５－Ｃｙ３比は、増幅と見なされ、１．２を超え、０．８を下回る比は、それぞれ獲得および喪失と見なされた。

【００６９】

ＤＮＡチップ上のＣＧＨによる分析（ゲノム変化の計算）は、ＶＡＭＰインターフェイス（ラ・ロサ（ＬＡ　ＲＯＳＡ）ら，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，２２（１７）：２０６６－２０７３，２００６）によって行われた。

ＲＮＡ抽出および発現分析

総ＲＮＡは、トリゾール（ＴＲＩｚｏｌ）試薬（ライフ・テクノロジーズ社（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．））を用いて、凍結腫瘍試料から抽出された。次に、ＲＮＡは、製造業者の使用説明書に従って、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）Ｍｉｎ　Ｅｌｕｔｅ（商標）クリーンアップキット（キアゲン社（Ｑｉａｇｅｎ））を用いて精製された。ＲＮＡの質は、アジレント（Ａｇｉｌｅｎｔ）２１００バイオアナライザー（アジレント・テクノロジーズ社（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））で検証された

。
【００７０】
次に、試料は、製造業者の使用説明書に従って、ヒトゲノムＵ１２２プラス２．０チップ（Ａｆｆｉｍｅｔｒｉｘ（登録商標））で分析された。ＤＮＡチップからの全てのデータは、ＧＣＲＭＡアルゴリズム（ウー（ＷＵ）ら，Ｊ．Ａｍ．Ｓｔａｔ．Ａｓｓｏｃ．，９９：９０９−９１７，２００４）を用いて同時に標準化された。階層的グループ分析は、ｄＣｈｉｐソフトウェア（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｓｕｎ１．ｈａｒｖａｒｄ．ｅｄｕ／ｃｏｍｐｌａｂ／ｄｃｈｉｐ／）を用いて行われた。ウェルチ（Ｗｅｌｃｈ）、ウィルコキソン（Ｗｉｌｌｃｏｘｏｎ）およびサム（ＳＡＭ）試験について、ｐ値は、ベンジャミンーホッホベルク（Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ−Ｈｏｃｈｂｅｒｇ）手法（Ｒ−マルチテストパッケージ）を用いて調節された。
【００７１】
遺伝子オントロジーデータベース（ＧＯ；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｅｏｎｔｏｌｏｇｙ．ｏｒｇ／）の分析は、ＧＯ制限まで統計的増大について行われた。
統計的分析
カイ二乗（χ^2）検定は、種々の腫瘍の特徴、ゲノム変化、発現プロファイルおよび臨床転帰間の結び付きを評価するために行われた。種々の予測因子の相互作用は、上行ロジスティック回帰の検定を用いた多変量分析によって決定された。全ての因子は、ロジスティック回帰の分析に含まれ、単変量分析によって得られるそれらのＰ値を考慮しなかったが、Ｐ値≦５％である因子だけを最終モデルにおいて使用した。無転移生存はカプランーマイヤー法によって得られ、対数順位検定を用いて比較された。全ての統計的検定は二面的であり、有意閾値はｐ＝０．０５であった。全ての統計的分析（ロジスティック回帰モデル）は、ＳＡＳソフトウェアのバージョン８を用いて行われた。
結果
１８３個の分化の乏しい肉腫のゲノムプロファイル
１８３個の分化に乏しい肉腫のゲノムプロファイルは、３８０３クローンを含むＢＡＣチップ上のＣＧＨ分析によって確立された。３つの主な再発プロファイルは、同定された変化の数およびタイプの両方に従って、最後に解釈され得る１７４個のゲノムプロファイルのうちから同定された（図１）。「増幅された」プロファイルと表され、同時増幅に基づき、ほぼ例外なく分化した脂肪肉腫に対応している、単純な遺伝学を有する２８個の腫瘍（１６％）の第１グループ；「アーム」プロファイルと表され、主に全染色体または染色体の完全なアームの変化を伴う、ある種の変化を有する（３０未満）、４０個の腫瘍（２３％）の第２グループ；「再配列された」プロファイルと表され、３０〜８５を超える変化を有する高レベルの染色体の複雑性によって特徴付けられる、１０６個の腫瘍（６１％）の第３のグループ。
【００７２】
さらに、ゲノムプロファイルが臨床転帰と関連付けられるかどうかを実証されなければならない。
ゲノムプロファイル（「アーム」プロファイル対「再配列された」プロファイル）に従って監視されるグループ分析は、転移出現の有意な予測を可能にしなかった（ｐ＝０．１７）。興味深いことに、正の相関は、研究の１８３個の肉腫（ｐ＝０．００１）において、ならびに「アーム」および「再配列された」プロファイルを有する複雑な遺伝学を伴う手足の１１７個の肉腫のサブグループ（ｐ＝２．２×10^{-4}）において、「再配列された」プロファイルと組織学的悪性度分類３との間に見出された。組織学的悪性度分類が腫瘍攻撃性の間接的な評価であるため、乏しい臨床転帰との相関が観察されなかったとしても、ゲノムの複雑性は腫瘍攻撃性と関連付けられることが示された。
【００７３】
さらに、ゲノムの複雑性および／または腫瘍悪性度と関連した遺伝子発現が転移出現を予測し得るかどうかを実証しなければならない。
予後分子署名の発現プロファイルおよび確立

研究の１８３個の肉腫の遺伝子発現プロファイルは、複雑なゲノムを有する腫瘍における遺伝子の特定の発現と転移出現との間の相関の仮説を試験するために、再考された。

【００７４】

これを行うために、１８３個の試料は、最初に、染色体の不安定性に結び付けられるように選択された７０個の遺伝子から構成される従来確立されたサインの関数として分類された（カーター（ＣＡＲＴＥＲ）ら、Ｎａｔ．　Ｇｅｎｅｔ．、３８（９）：１０４３－１０４８、２００６）。しかし、これは、傾向の予測をもたらしたが、無転移生存を表していなかった。

【００７５】

また、第２に、目的は、不均衡レベルと関連し、患者の将来の転帰を予測することができる、肉腫に特異的な一連の遺伝子を確立することであった。３つの監視分析では、発現プロファイルは、ｉ）ＣＧＨ不均衡の数、２０未満の不均衡対３５を超える不均衡、ｉｉ）組織学的悪性度分類ＦＮＣＬＣＣ３対腫瘍悪性度２、およびｉｉｉ）カーター（Ｃａｒｔｅｒ）サインに従って、２つのグループに分類された腫瘍について分析された。最初の２つの比較から、８６遺伝子に対応する１１８個のクローンおよび７３遺伝子に対応する９２クローンは、それぞれ、ＣＧＨ不均衡（差次的発現因子（＝遺伝子がより多く発現される回数）＞３；または無し、ｐ＜０．０１）によって、または悪性度（差次的発現因子＞２；ｐ＜０．０１）によって階層化された腫瘍間で異なる様式で有意に発現された。次に、これらの遺伝子は、ＣＧＨ不均衡および組織学的悪性度分類と関連した経路を決定することを目的として、遺伝子オントロジーデータベースによって分析された。興味深いことに、これらの経路は、ＣＧＨ不均衡に従って決定されたグループ、および組織学的悪性度分類の比較によって決定されたグループにおいて非常に類似し、主に染色体の完全性および有糸分裂の制御に関与している（表３）。カーターサインの遺伝子のうち、２２遺伝子は、最初の２つの比較においてまだ同定されてなく、肉腫の２つのグループ間で異なる様式で有意に発現された（ｐ＜１０^{-5}）。

【００７６】

これらの結果に基づいて、最初の２つの比較から有意に過剰表現された経路に属する全ての重要な遺伝子（ｐ＜１０^{-5}、表３）、および上記で画定されたカーターサインの２２遺伝子が選択された。

【００７７】

【表４】

表３

ａ）ウェルチ（Ｗｅｌｃｈ）検定による

入力したプローブ／クローンの数：９２
見出された識別数：７３

ＧＯ識別	選択における観察	チップ上の観察	フィッシャー（Ｆｉｓｈｅｒ）の実際のｐ値	ＧＯ制限
GO:0007067	19	122	1.46E-24	有糸分裂
GO:0051301	19	174	7.10E-22	細胞分裂
GO:0007049	21	422	1.36E-17	細胞周期
GO:0000775	6	37	1.78E-08	染色体、動原部 (pericentric region)
GO:0000074	8	181	1.02E-06	細胞周期を介した進行の制御
GO:0005694	6	118	1.02E-05	染色体
GO:0004674	8	338	7.96E-05	セリン／スレオニンキナーゼ活性
GO:0008283	7	248	8.41E-05	細胞増殖
GO:0006270	3	19	1.00E-04	ＤＮＡ複製の開始
GO:0000776	3	21	1.20E-04	動原体
GO:0003777	4	62	1.54E-04	微小管の運動活性
GO:0007018	4	75	3.22E-04	微小管に基づく運動
GO:0000079	3	35	5.23E-04	キナーゼサイクリン依存

				的活性の制御
GO:0005813	3	48	1.14E-03	中心体
GO:0005875	3	54	1.58E-03	微小管と関連した複合体
GO:0006468	7	475	3.67E-03	タンパク質アミノ酸のリン酸化
GO:0046982	3	80	4.83E-03	タンパク質ヘテロ二量化の活性
GO:0005874	4	178	6.25E-03	微小管
GO:0006260	3	96	8.13E-03	ＤＮＡ複製
GO:0016301	3	184	4.18E-02	キナーゼ活性

ｂ）ウェルチ検定による

入力したプローブ／クローンの数：１１８
見出された識別数：８６

ＧＯ識別	選択における観察	チップ上の観察	フィッシャー（Ｆｉｓｈｅｒ）の実際のｐ値	ＧＯ制限
GO:0007067	23	122	4.50E-28	有糸分裂
GO:0051301	23	174	7.15E-25	細胞分裂
GO:0007049	27	422	1.48E-21	細胞周期
GO:0000775	8	37	9.04E-11	染色体、動原部 (pericentric region)
GO:0005819	6	14	7.45E-10	紡錘体
GO:0007018	9	75	8.12E-10	微小管に基づく運動
GO:0003777	8	62	1.51E-09	微小管の運動活性
GO:0005876	5	12	2.39E-08	紡錘体の微小管
GO:0000074	10	181	9.46E-08	細胞周期を介した進行の制御
GO:0008283	11	248	1.72E-07	細胞増殖
GO:0005874	8	178	7.01E-06	微小管
GO:0007089	3	5	9.18E-06	制御点の通過、有糸分裂細胞周期の開始
GO:0005875	5	54	1.62E-05	微小管と関連した複合体
GO:0005694	6	118	5.52E-05	染色体
GO:0005871	3	16	1.39E-04	キネシン複合体
GO:0000079	3	35	1.23E-03	キナーゼサイクリン依存

				性活性の制御
GO:0004674	7	338	1.40E-03	セリン／スレオニンキナーゼ活性
GO:0006468	8	475	5.32E-03	タンパク質アミノ酸のリン酸化
GO:0006260	3	96	1.79E-02	ＤＮＡ複製
GO:0008284	3	145	4.99E-02	細胞増殖の正の制御

本発明者らによってＣＩＮＳＡＲＣ（複雑性インデックス肉腫（Ｃｏｍｐｌｅｘｉｔｙ　ＩＮｄｅｘ　ＳＡＲＣｏｍａｓ））と指定されたこの最終セットの遺伝子は、６７遺伝子からなり、全てがゲノムの調節に関与する。

実施例２：ＣＩＮＳＡＲＣによる肉腫における転移出現の予測

ＣＩＮＳＡＲＣ発現サインと転移出現との相関は、研究の全グループ（１８３個の肉腫）において評価された。グループ分析は、転移出現における有意差を用いて、３つのサブグループ（サブグループ１、２、３）に腫瘍を分類することを可能にした（図２）。多価分析は、サブグループ３の腫瘍が、サブグループ１の腫瘍と比較して、転移の危険性が３倍あることを示した（カプランーマイヤー分析；ＨＲ＝３．０１；９５％　ＣＩ［１．８－５．２］；ｐ＜１０$^{-3}$）。また、組織学的タイプ、ＦＮＣＬＣＣ腫瘍悪性度、腫瘍サイズ、局在、血管、神経または骨への浸潤、性別および年齢などの他の標準的な予後因子を考慮する多価分析は、サブグループ１と比較して、サブグループ３についての転移の危険性が３倍を超えることを示した（Ｃｏｘモデル；ＨＲ＝３．１；９５％　ＣＩ［１．８－５．４］，ｐ＜１０$^{-3}$）。これらの結果は、ＣＩＮＳＡＲＣサインが転移の発症と強く関連付けられた独立した予後因子であることを示した。

【００７８】

独立した予後因子としてのＣＩＮＳＡＲＣサインのこの検証後、肉腫の６個の特定のサブグループはまた、非監視グループ分析によって試験された（図２）。手足の１１７個の遺伝子的に複雑な肉腫のうち、単変量分析は、２つのサブグループにおいて腫瘍を分け、サブグループ２対サブグループ１についての転移の危険性が３倍を超えることを示した（カプランーマイヤー分析；ＨＲ＝３．１；９５％ＣＩ［１．６－６．０］；ｐ＜１０$^{-3}$）。同様に、５２個の平滑筋肉腫のうち、異なる有意な臨床転帰の３つのグループ分析によって試験された（ｐ＝０．００１）が見出された（サブグループ２は、ほぼ例外なく、他の２つのサブグループについて胴体外部の代わりに、胴体内部に発症したＬＭＳからなる）。また、胴体外部のＬＭＳだけが非監視グループ分析において考慮される場合、３６人の患者は、転移危険性の６倍の差を有する２つのサブグループに分けられる（カプランーマイヤー分析；ＨＲ＝６；９５％　ＣＩ［２．１－１６．９］；ｐ＜１０$^{-3}$）。

【００７９】

また、ＣＩＮＳＡＲＣサインの実効性は、同じ組織学的悪性度分類の患者について分析された（図２）。悪性度３の腫瘍（１００症例）のうち、３倍を超えて高い転移の危険性は、サブグループ２の腫瘍対サブグループ１の腫瘍において観察され（カプランーマイヤー分析；ＨＲ＝３；９５％ＣＩ［１．６－５．６］；ｐ＜１０$^{-3}$）、アームまたは再配列されたプロファイルを有する悪性度２の腫瘍（４０症例）（すなわち、ＤＤ－ＬＰＳを除く全て）のうち、患者はまた、異なる臨床転帰の２つのグループに分けられた（カプランーマイヤー分析；ＨＲ＝２．６；９５％ＣＩ［１－７．５］；ｐ＝０．０５）。無転移生存は、ＣＩＮＳＡＲＣサインに従って分けられた脱分化した脂肪肉腫の２つのグループにおいて有意に異なっていない。

【００８０】

このようにして、本発明のＣＩＮＳＡＲＣサインは、ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システム

に従って同じ転移潜在力を有すると考えられた腫瘍（図２）を転移出現の異なる可能性を有する２つグループに分けることができるようになった。ＣＩＮＳＡＲＣサインが、治療戦略を決定するために現在使用されているものよりも有効なシステムであり得ることは明確に実証されるため、恐らくは最も重要である。

【００８１】

さらに、肉腫の領域で初めて、遺伝子発現プロファイルが、ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムを用いて得られたものよりも良好な臨床予後に帰すると考えられる。したがって、様々な組織タイプを組み合わせる全グループにおいて、ＣＩＮＳＡＲＣサインは、不良な予後を有する腫瘍のサブグループを同定することができるようになり、一方、ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムは、別の予後を有するこれらの腫瘍を区別することができなかった（データ示さず）。

実施例３：ＣＩＮＳＡＲＣによる他の癌における転移出現の予測

他の肉腫におけるＣＩＮＳＡＲＣの予測値を試験し、一連の３２個のＧＩＳＴを分析した（ヤマグチ（ＹＡＭＡＧＵＣＨＩ）ら，Ｊ；Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２６（２５）：４１００－４１０８，２００８）。図３に示されるように、ＣＩＮＳＡＲＣサインは、異なる予後を有するＧＩＳＴの２つのグループへと導く非監視階層的グループ分析を可能にした（$\mathrm{p} < 10^{-3}$）。興味深いことに、この分類は、小腸のＧＩＳＴおよび胃のＧＩＳＴが各々の異なる予後グループにおける２つの別々のグループを形成するとしても、局在とは独立している。

【００８２】

ＣＩＮＳＡＲＣサインは、専ら染色体の完全性に関与した遺伝子から構成され、発現は染色体の不均衡と関連しているため、ＣＩＮＳＡＲＣサインはまた、大きく再配列された腫瘍、例えば、乳腺癌について予後値を有することができる。結果として、オランダ癌センター（Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）の２つの一連の乳癌（７８および２９５症例）（ヴァント・ベアー（ＶＡＮ’Ｔ　ＶＥＥＲ）ら，２００２，前掲；ヴェン・デ・ヴィジュバー（ＶＡＮ　ｄｅ　ＶＩＪＶＥＲ）ら，２００２，前掲）はＣＩＮＳＡＲＣサインに従って集められ、再度、非常に有意に異なる臨床転帰（$\mathrm{p} < 10^{-3}$）を有する患者の２つのグループが得られた（図３）。

【００８３】

本研究において実証されたように、ＣＩＮＳＡＲＣサインは、転移出現の良好な評価、ならびにＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムと比較した患者に良好な臨床予後の帰属を与える、力強い独立した予測ツールである。したがって、この新しい分子悪性度評価システムは、患者の臨床的アフターケアを改善する可能性がなければならない。さらに、ＣＩＮＳＡＲＣサインの遺伝子の生物学的有意性は、転移能の獲得の初期段階を標的とする新規な治療的アプローチの潜在的な標的として、それらを画定する。

【００８４】

ＣＩＮＳＡＲＣサインが、このような腫瘍の異種グループ（肉腫から癌腫まで）の全域で転移出現と関連しているという事実は、既存の組織学的悪性度分類評価システムに代わって、転移の危険性が高い患者を特定し、さらなる化学療法戦略を標的とするためのこの発現プロファイルの使用を想定することを十分に促している。

【００８５】

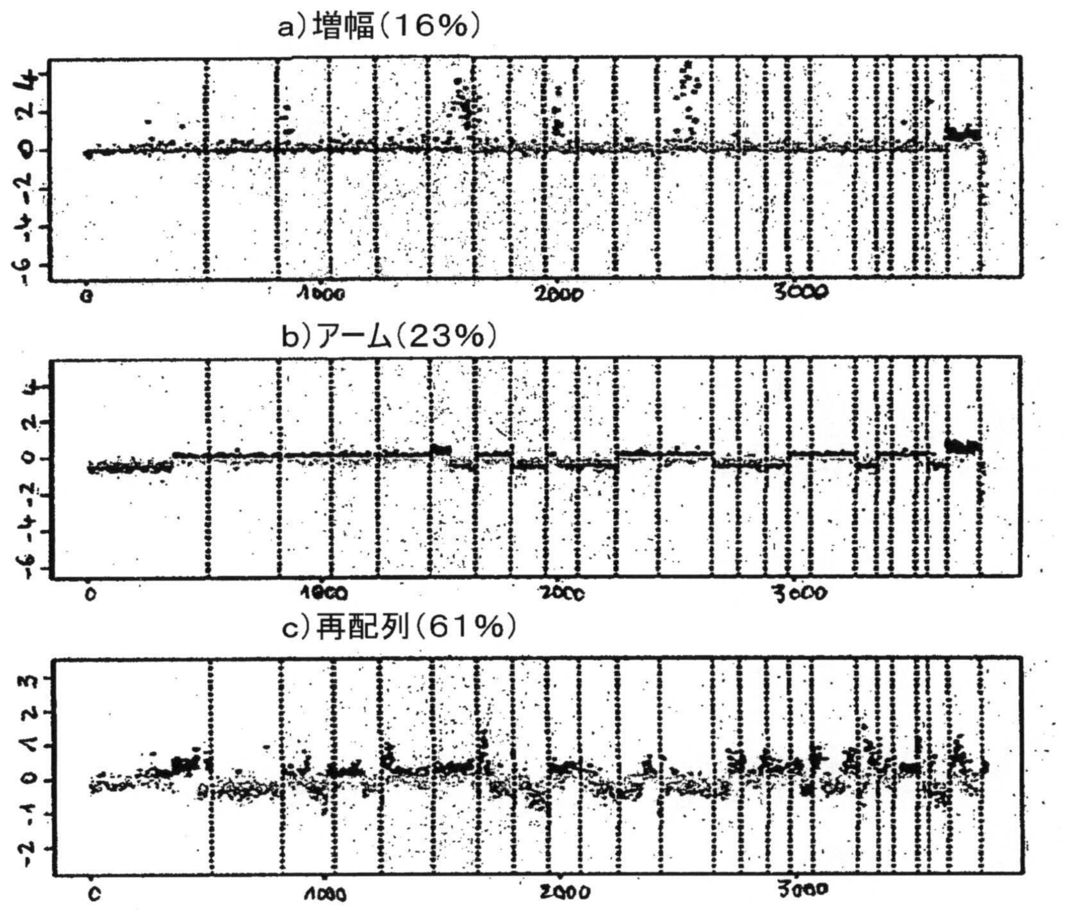
現在の治療戦略は、外科的切除およびアジュバントまたは非アジュバント状態における化学療法／放射線両方を組み合わせている。しかしながら、高い転移能を有する肉腫だけがこのような治療が有益である可能性がある。これは、現在、イマチニブを用いたアジュバント治療が再発の危険性が高い腫瘍について検証を受けているＧＩＳＴの場合である。しかしながら、現在使用されているシステムは不完全である。ＣＩＮＳＡＲＣサインの使用は、これらの患者の選択を改善し、したがって、アジュバント療法の恩恵を増大させることができた。

【００８６】

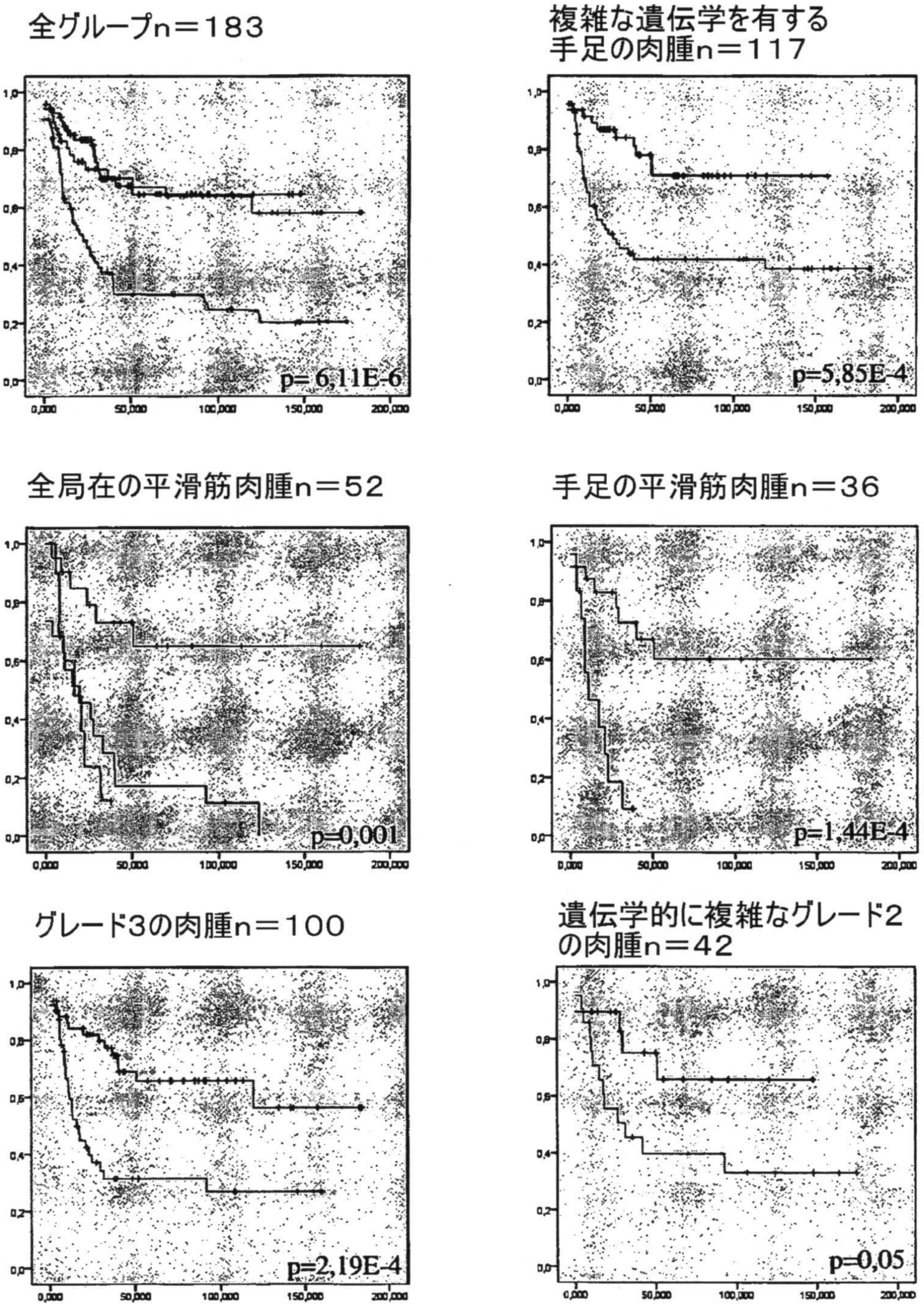
したがって、特に、標的とされた治療が既に存在するＧＩＳＴ（消化管間質腫瘍）に関

して、アジュバント治療の許容性についての主要な決定基準として、ＣＩＮＳＡＲＣサインを用いることに非常な関心がある（Ｇｌｉｖｅｃ（登録商標））。
実施例４：ＣＩＮＳＡＲＣサイの５個のポリヌクレオチドのプールの助けによる肉腫における転移出現の予測
　ＣＩＮＳＡＲＣの配列番号１０、配列番号３、配列番号４７、配列番号５８、および配列番号２４からなる配列の５個のポリヌクレオチドの発現サインと転移出現との相関が２つの一連の肉腫において評価された（図４および５）。グループ分析は、腫瘍を２つのサブグループ（サブグループＡおよびＢ）に分類することを可能とし、転移出現において有意差があった。中心に最も近づく方法（ｍｅｔｈｏｄ　ｏｆ　ｎｅａｒｅｓｔ　ｃｅｎｔｅｒｓ）による分析は、サブグループＢにおける腫瘍がサブグループＡにおける腫瘍と比較して転移の危険性がより大きいことを示した。これらの結果は、５つの遺伝子を用いてＣＩＮＳＡＲＣサインが、転移の発症と強く関連した、独立した予後因子であることを示した。
【００８７】
　これは、５つの遺伝子のＣＩＮＳＡＲＣサインが、治療戦略を決定するために現在使用されているものよりも効果的なシステムであり得ることを明確に実証している限りにおいて、重要な結果である。
【００８８】
　さらに、肉腫の領域において初めて、遺伝子発現プロファイルがＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムを用いて得られたものよりも良好な臨床予後に帰すると考えられる。このようにして、異なる組織タイプを組み合わせている全グループにおいて、ＣＩＮＳＡＲＣサインは、不良な予後を有する腫瘍のサブグループを同定することができるようになり、一方、ＦＮＣＬＣＣ悪性度分類システムは、異なる予後を有するこれらの腫瘍を分離することができなかった（データは示さず）。

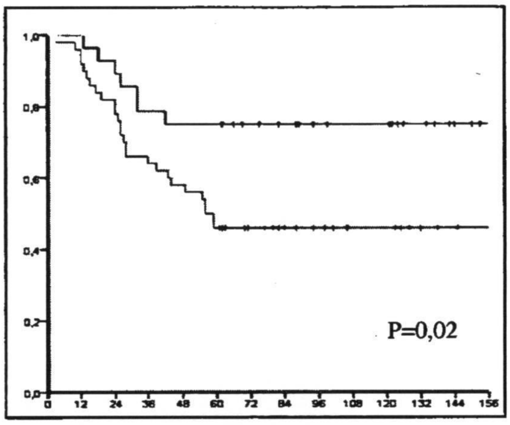
【図１】


a) 増幅 (16%)
-6 -4 -2 0 2 4
0
1000
2000
3000
b) アーム (23%)
-6 -4 -2 0 2 4
0
1000
2000
3000
c) 再配列 (61%)
-2 -1 0 1 2 3
0
1000
2000
3000

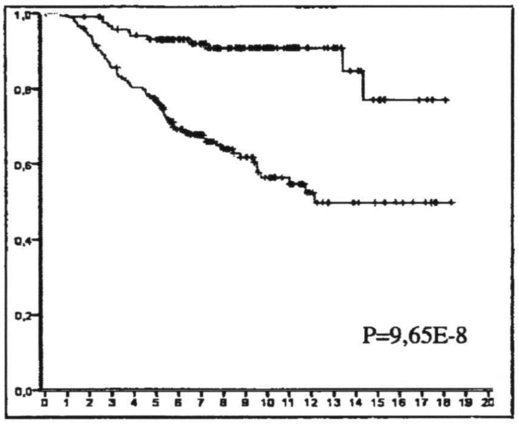
【図２】


全グループn＝183
複雑な遺伝学を有する
手足の肉腫n＝117
p= 6,11E-6
p=5,85E-4
全局在の平滑筋肉腫n＝52
手足の平滑筋肉腫n＝36
p=0,001
p=1,44E-4
グレード3の肉腫n＝100
遺伝学的に複雑なグレード2
の肉腫n＝42
p=2,19E-4
p=0,05

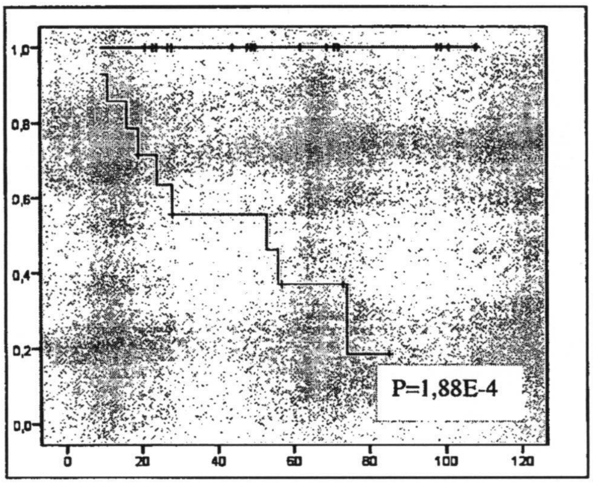
【図３】



78 乳癌 無進行性生存
（ヴァント・ベアーら
（VAN'T VEER et al）、2002）

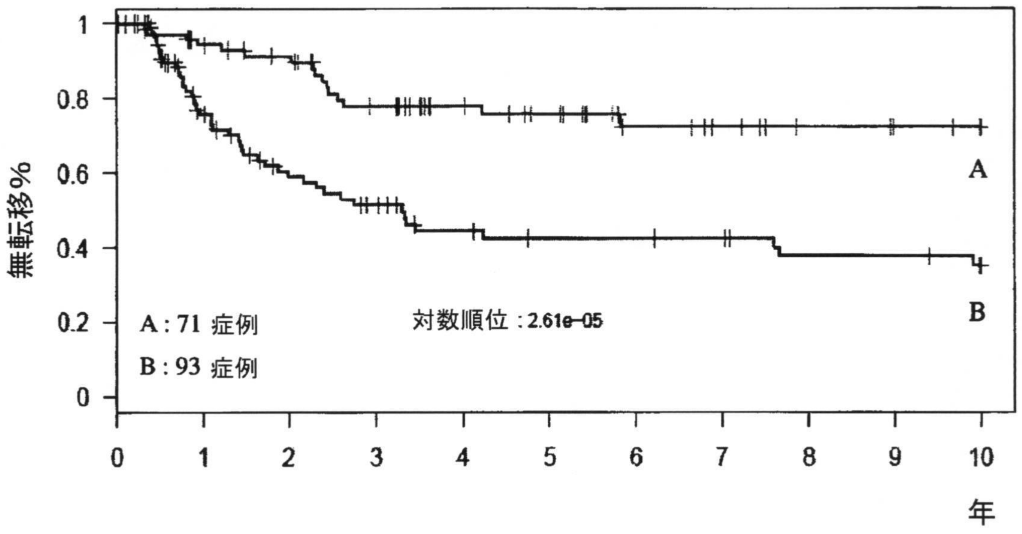


295 乳癌 無進行性生存
（ヴァン・デ・ヴィジュバーら
（VAN de VIJVER et al）、2002）

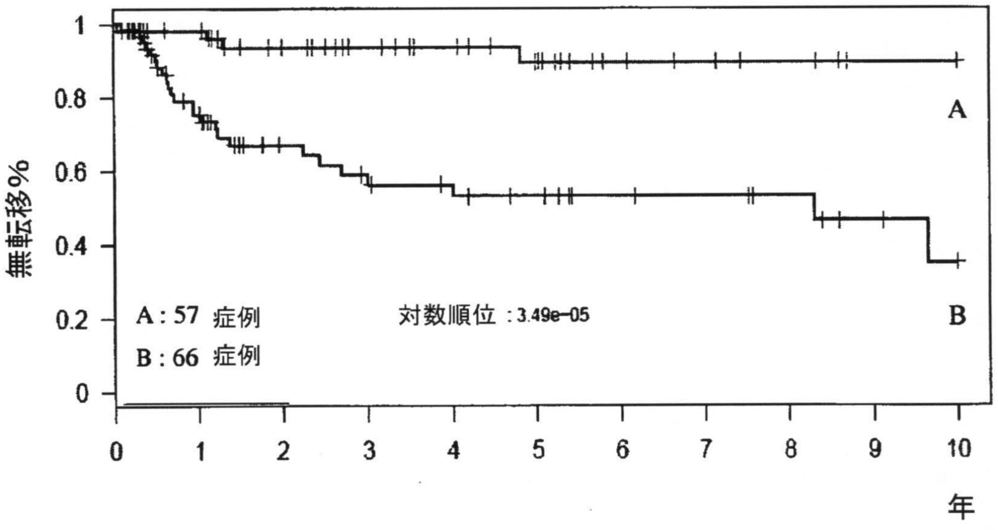


29 GIST 無転移生存
（ヤマグチら
（YAMAGUCHI et al）、2008

【図４】



【図５】



【配列表】
0005865241000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.　　　　　　　　　　　　ＦＩ
Ａ６１Ｋ　31/7088　 (2006.01)　　　Ａ６１Ｐ　 1/04
　　　　　　　　　　　　　　　　　　Ａ６１Ｋ　31/7088

(74)代理人　100105957
　　　　　弁理士　恩田　誠
(74)代理人　100068755
　　　　　弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100142907
　　　　　弁理士　本田　淳
(72)発明者　シボン、フレデリク
　　　　　フランス国　Ｆ－３３６４０　イスルーサンージョルジュ　ルート　ドゥ　ラベ　９
(72)発明者　コワンドル、ジャンーミシェル
　　　　　フランス国　Ｆ－３３２００　ボルドー　リュ　ドゥ　スラック　１９
(72)発明者　オーリアス、アラン
　　　　　フランス国　Ｆ－９１４４０　ビュールーシュリヴェット　アヴェニュー　ボーセジュール　２０

　審査官　田中　耕一郎

(56)参考文献　欧州特許出願公開第０１８０６４１３（ＥＰ，Ａ１）
　　　　　　特表２００６－５１６０８９（ＪＰ，Ａ）
　　　　　　国際公開第２００８／０４８９３８（WO，Ａ１）
　　　　　　国際公開第２００５／１１７９４３（WO，Ａ１）
　　　　　　H.E.Richardson, et al., Genes & Development, 1990, 4(8), pp1332-1344

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
　　　　　　Ｃ１２Ｎ　　１／００－Ｃ１２Ｎ　１５／９０
　　　　　　ＰｕｂＭｅｄ