

(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2014-533100

(P2014-533100A)

(43) 公表日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(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 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 C 0 8 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-539425 (P2014-539425)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月1日 (2014.7.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/002844
 (87) 国際公開番号 W02013/064908
 (87) 国際公開日 平成25年5月10日 (2013.5.10)
 (31) 優先権主張番号 61/555,762
 (32) 優先日 平成23年11月4日 (2011.11.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513227446
 オスロ ユニヴェルシテーツスィーケフ
 ース ハーエフ
 OSLO UNIVERSITETSSY
 KEHUS HF
 ノルウェイ, エヌーO424 オスロ, ニ
 ーダレン, ポストボックス 450
 Postboks 450, Nydale
 n N-O424 Oslo, Norwa
 y
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WOR
 LD PATENT & TRADEMA
 RK

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸癌の分析のための方法およびバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、生物学的サンプル（例えば組織サンプル、生検サンプル、大便サンプル、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプル）における結腸直腸癌の検出のための方法およびバイオマーカー（例えば遺伝子発現バイオマーカー）に関する。ある実施形態では、本発明の方法およびバイオマーカーは、直腸癌の検出、および、結腸直腸癌の患者への予後の提供に有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の結腸直腸癌の予後を決定する、対象の結腸直腸癌を診断する、対象の結腸直腸癌への素因を予測する、対象の結腸直腸癌の再発の可能性を予測する、または、特定の治療法を有する治療に対する疾病を有する対象を選択する、方法であって、

(a) 対象からの生物学的サンプルを、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3, BNIP3, PLA2G2A, GZMK, MMP1, AKD1, XRCC4, RAET1L, TTC30A, HAS2, CPE, CXCL9, GBP4, RPS6KA6, ENPP5, RAP1B, DYNLL1およびRPS27Lからなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の発現レベルを検出するための結腸直腸癌情報提供的試薬に接触させるステップと、

10

(b) *in vitro*分析で、上記結腸直腸癌情報提供的試薬を用いて、1個以上の上記遺伝子の発現レベルを検出するステップとを含み、

1個以上の上記遺伝子の発現の変化したレベルが、対象の悪い予後、対象の結腸直腸癌の診断、対象の結腸直腸癌の素因への予測、対象の結腸直腸癌の再発の可能性の予測、または、対象が特定の治療法を有する治療に対する候補者であることを示すことを特徴とする方法。

【請求項 2】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる2個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる3個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

30

【請求項 4】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる5個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

40

【請求項 5】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、か

50

らなるグループから選ばれる 10 個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

1 個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの 1 つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの 1 つ、(MMP3またはMMP1)のうちの 1 つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの 1 つ、(SESN1またはAKD1)のうちの 1 つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの 1 つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの 1 つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの 1 つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの 1 つ、(DSC3またはCPE)のうちの 1 つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの 1 つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの 1 つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの 1 つ、からなるグループから選ばれる 12 個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

1 個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの 1 つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの 1 つ、(MMP3またはMMP1)のうちの 1 つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの 1 つ、(SESN1またはAKD1)のうちの 1 つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの 1 つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの 1 つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの 1 つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの 1 つ、(DSC3またはCPE)のうちの 1 つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの 1 つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの 1 つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの 1 つ、からなるグループから選ばれる 13 個の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

1 個以上の上記遺伝子が、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3、およびBNIP3の組を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

上記生物学的サンプルが、組織サンプル、生検サンプル、血液サンプル、および大便サンプルからなるグループから選ばれることを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

対象が、あらかじめ結腸直腸癌と診断されていることを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 11】

上記遺伝子の発現の基準レベルと比べて、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの 1 つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの 1 つ、(MMP3またはMMP1)のうちの 1 つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)、および(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの 1 つ、およびその組み合わせからなるグループから選ばれる 1 個以上の遺伝子の発現の減少したレベルが、対象の悪い予後に関連することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

上記遺伝子の発現の基準レベルと比べて、(SESN1またはAKD1)のうちの 1 つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの 1 つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの 1 つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの 1 つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの 1 つ、(DSC3またはCPE)のうちの 1 つ、(ENPP3またはRPS6KA6)、および(BNIP3またはENPP5)のうちの 1 つ、からなるグループから選ばれる 1 個以上の遺伝子の発現の増加したレベルが、対象の悪い予後に関連することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

悪い予後が、減少した生存を含むことを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

悪い予後が、結腸直腸癌の再発または転移を含むことを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の方法。

50

【請求項 15】

上記基準レベルが、ステージIまたはIVの結腸直腸癌と診断された対象からのレベルであることを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 16】

上記基準レベルが、結腸直腸癌と診断されていない対象からのレベルであることを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 17】

上記予後が、5年間再発無しの生存を含むことを特徴とする請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

治療計画を決定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 1 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

上記治療計画が、悪い予後を有すると確認された対象への化学療法を行うことと、良い予後を有すると確認された対象への化学療法を行わないこととを含むことを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

上記化学療法が、アジュバント化学療法であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

結腸直腸癌がステージI、IIまたはIIIであることを特徴とする請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対してハイブリダイズする1個以上の核酸プローブ、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物の増幅と検出のための核酸プライマー、および、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対して特異的な抗原結合タンパク質からなるグループから選ばれることを特徴とする請求項 1 ないし 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

上記遺伝子産物が、上記遺伝子由来のRNA転写物であり、上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各上記遺伝子産物に対してハイブリダイズする1個以上の核酸プローブ、または、1個以上の上記遺伝子の各上記遺伝子産物の増幅と検出のための核酸プライマーであることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

対象の結腸直腸癌に関する予後を行う方法であって、(a)対象からの生物学的サンプルを、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の発現レベルを検出するための結腸直腸癌情報提供的試薬に接触させるステップと、(b)in vitro分析で、上記結腸直腸癌情報提供的試薬を用いて、1個以上の上記遺伝子の発現レベルを検出するステップとを含み、

1個以上の上記遺伝子の発現の変化したレベルが、対象の結腸直腸癌に関する悪い予後を示すことを特徴とする方法。

【請求項 25】

(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1

10

20

30

40

50

つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の結腸直腸癌を有するまたは有する疑いがある対象からのサンプルにおいて変化した遺伝子発現を検出する1個以上の結腸直腸癌情報提供的試薬を含むことを特徴とするキット。

【請求項26】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KL K6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる2個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項25に記載のキット。

10

【請求項27】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KL K6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる3個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項25に記載のキット。

20

【請求項28】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KL K6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる5個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項25に記載のキット。

30

【請求項29】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KL K6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる10個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項25に記載のキット。

40

【請求項30】

1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KL K6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる12個以上の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項25

50

に記載のキット。

【請求項 3 1】

1 個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの 1 つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの 1 つ、(MMP3またはMMP1)のうちの 1 つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの 1 つ、(SESN1またはAKD1)のうちの 1 つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの 1 つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの 1 つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの 1 つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの 1 つ、(DSC3またはCPE)のうちの 1 つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの 1 つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの 1 つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの 1 つ、からなるグループから選ばれる 1 3 個の遺伝子の組を含むことを特徴とする請求項 2 5 に記載のキット。

10

【請求項 3 2】

1 個以上の上記遺伝子が、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3、およびBNIP3の組を含むことを特徴とする請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 3 3】

1 個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1 個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対して特異的にハイブリダイズするプローブであることを特徴とする請求項 2 5 ないし 3 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 4】

1 個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1 個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物を増幅するプライマーの組であることを特徴とする請求項 2 5 ないし 3 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

【請求項 3 5】

1 個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1 個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に結合する抗原結合タンパク質であることを特徴とする請求項 2 5 ないし 3 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 6】

1 個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1 個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対してハイブリダイズし、各遺伝子産物のシーケンシングを可能にする、シーケンシングプライマーであることを特徴とする請求項 2 5 ないし 3 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

30

【請求項 3 7】

結腸直腸癌と診断された対象の予後を決定するための、請求項 2 5 ないし 3 6 のいずれか 1 項に記載のキットの、使用。

【請求項 3 8】

対象の結腸直腸癌を診断するための、請求項 2 5 ないし 3 6 のいずれか 1 項に記載のキットの、使用。

【請求項 3 9】

治療の成功の可能性を決定するための、および/または、治療に対する患者を選択するための、請求項 2 5 ないし 3 6 のいずれか 1 項に記載のキットの、使用。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、本発明は、生物学的サンプル（例えば組織サンプル、生検サンプル、大便サンプル、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプル）における結腸直腸癌の検出のための方法およびバイオマーカー（例えば遺伝子発現バイオマーカー）に関する。ある実施形態では、本発明の方法およびバイオマーカーは、直腸癌の検出、結腸直腸癌の患者への予後の提供、および、それに伴う診断に有用である。

【0002】

〔背景技術〕

50

結腸直腸癌（CRC）は、世界中の男女両方に非常に一般的なタイプの癌の一つであり、毎年約120万人の新たなケースが記録されている（文献1）。予後は、診断時の腫瘍のステージに非常に依存する。癌に関する米国の共同委員会によれば、ステージI、II、IIIおよびIVの5年間の生存率はそれぞれ93%、83%、60%および8%である（文献2）。しかしながら、ステージIIbの患者（pT3-4、リンパ節ネガティブ）に対する予後は、ステージIIIb（pT1-2、リンパ節ポジティブ、83%）に対する予後よりも非常に低い（72%）（文献2）。

【0003】

アジュバント化学療法は、ステージIIIのCRCで著しく生存を改善し、これらの患者の標準的な治療として受け入れられている（文献3）。ステージIIのCRCの患者の大部分は外科手術のみで治療するが、腫瘍といくつかの検査されたリンパ節の孔は、生存の減少に関連し、通常は、アジュバント化学療法が考慮される。現在の臨床ファクターに基づいた再発の危険の増大していないステージIIの患者の割合は、依然として再発を発生している。アジュバント化学療法で全てのステージIIのCRCの患者を治療することも考えられるが、この効果は決定的でない（文献4-6）。

10

【0004】

これは、高リスクのステージIIの患者のより正確な予測のための新しいバイオマーカー、したがって、改善された個々の癌のケアの必要性をも浮き彫りにしている。

【0005】

〔発明の概要〕

20

本発明は、生物学的サンプル（例えば組織サンプル、生検サンプル、大便サンプル、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプル）における結腸直腸癌の検出のための方法およびバイオマーカー（例えば遺伝子発現バイオマーカー）に関する。ある実施形態では、本発明の方法およびバイオマーカーは、直腸癌の検出、および、結腸直腸癌の患者への予後の提供に有用である。

【0006】

例えば、本発明の実施形態は、対象における、直腸癌の診断または予後の予測の方法を提供し（例えば、ステージI、IIまたはIIIの結腸直腸癌）、（a）（例えば、ステージI、IIまたはIIIの結腸直腸癌と診断された）対象からの生物学的サンプルを、例えば、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3またはBNIP3から選ばれる1個以上（例えば、2個以上、3個以上、5個以上、10個以上または13個すべて）の遺伝子の発現レベルを検出するための試薬に接触させるステップと、（b）in vitro分析を用いて、1個以上の上記遺伝子の発現レベルを検出するステップとを含み、1個以上の上記遺伝子の発現の変化したレベルが、対象の結腸直腸癌の診断、または、対象の悪い予後を示す。ある実施形態では、生物学的サンプルは、組織サンプル、生検サンプル、血液サンプル、または大便サンプルである。ある実施形態では、遺伝子の、対照サンプルの発現レベルと比べて、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1BおよびCXCL10のうちの1個以上の遺伝子の発現の減少したレベル、および/または、遺伝子の、対照サンプルの発現レベルと比べて、SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, ENPP3およびBNIP3のうちの1個以上の遺伝子の発現の増加したレベルが、対象の悪い予後に関連する。ある実施形態では、発現は、核酸レベル（例えばmRNA）で検出され、他の実施形態では、タンパク質レベルで検出される。ある実施形態では、予後は、結腸直腸癌の、5年間の再発無しの生存、減少した生存、または、再発または転移である。ある実施形態では、対照サンプルは、ステージIまたはIVの結腸直腸癌と診断された対象からのサンプルまたは結腸直腸癌と診断されていない対象からのサンプルである。ある実施形態では、予後に基づいて、治療計画（例えば悪い予後を有すると確認された対象への化学療法）が決定される。

30

40

【0007】

さらなる実施形態は、例えばPIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3またはBNIP3から選ばれる1個以上（例えば2個以上、

50

【 0 0 0 8 】

【 0 0 0 9 】

ある実施形態では、１個以上の遺伝子は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの１つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの１つ、(MMP3またはMMP1)のうちの１つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1, またはRPS27L)のうちの１つ、(SESN1またはAKD1)のうちの１つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの１つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの１つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの１つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの１つ、(DSC3またはCPE)のうちの１つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの１つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの１つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの１つ、からなるグループから選ばれる２個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、１個以上の遺伝子は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの１つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの１つ、(MMP3またはMMP1)のうちの１つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1, またはRPS27L)のうちの１つ、(SESN1またはAKD1)のうちの１つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの１つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの１つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの１つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの１つ、(DSC3またはCPE)のうちの１つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの１つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの１つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの１つ、からなるグループから選ばれる３個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、１個以上の遺伝子は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの１つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの１つ、(MMP3またはMMP1)のうちの１つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1, またはRPS27L)のうちの１つ、(SESN1またはAKD1)のうちの１つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの１つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの１つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの１つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの１つ、(DSC3またはCPE)のうちの１つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの１つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの１つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの１つ、からなるグループから選ばれる５個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、１個以上の遺伝子は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの１つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの１つ、(MMP3またはMMP1)のうちの１つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1, またはRPS27L)のうちの１つ、(SESN1またはAKD1)のうちの１つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの１つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの１つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの１つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの１つ、(DSC3またはCPE)のうちの１つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの１つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの１つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの１つ、からなるグループから選ばれる１０個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、１個以上の遺伝子は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの１つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの１つ、(MMP3またはMMP1)のうちの１つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1, またはRPS27L)のうちの１つ、(SESN1またはAKD1)のうちの１つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの１つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの１つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの１つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの１つ、(DSC3またはCPE)のうちの１つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの１つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの１つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの１つ、からなるグループから選ばれる１０個以上の遺伝子の組を含む。

0A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる12個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の遺伝子は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる13個の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3、およびBNIP3の組を含む。

10

【0010】

ある実施形態では、上記生物学的サンプルが、組織サンプル、生検サンプル、血液サンプル、および大便サンプルからなるグループから選ばれる。ある実施形態では、対象が、あらかじめ結腸直腸癌と診断されている。

【0011】

ある実施形態では、上記遺伝子の発現の基準レベルと比べて、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)、および(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、およびその組み合わせからなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の発現の減少したレベルが、対象の悪い予後に関連する。ある実施形態では、上記遺伝子の発現の基準レベルと比べて、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)、および(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の発現の増加したレベルが、対象の悪い予後に関連する。ある実施形態では、悪い予後が、減少した生存を含む。ある実施形態では、悪い予後が、結腸直腸癌の再発または転移を含む。ある実施形態では、上記基準レベルが、ステージIまたはIVの結腸直腸癌と診断された対象からのレベルである。ある実施形態では、上記基準レベルが、結腸直腸癌と診断されていない対象からのレベルである。ある実施形態では、上記予後が、5年間再発無しの生存を含む。

20

30

【0012】

ある実施形態では、治療計画を決定するステップをさらに含む。ある実施形態では、上記治療計画が、悪い予後を有すると確認された対象への化学療法を行うことと、良い予後を有すると確認された対象への化学療法を行わないこととを含む。ある実施形態では、上記化学療法が、アジュバント化学療法である。

【0013】

ある実施形態では、上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対してハイブリダイズする1個以上の核酸プローブ、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物の増幅と検出のための核酸プライマー、および、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対して特異的な抗原結合タンパク質からなるグループから選ばれる。ある実施形態では、上記遺伝子産物が、上記遺伝子由来のRNA転写物であり、上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各上記遺伝子産物に対してハイブリダイズする1個以上の核酸プローブ、または、1個以上の上記遺伝子の各上記遺伝子産物の増幅と検出のための核酸プライマーである。

40

【0014】

ある実施形態では、本発明は、対象の結腸直腸癌に関する予後を行う方法であって、(a)対象からの生物学的サンプルを、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1

50

つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の発現レベルを検出するための結腸直腸癌情報提供的試薬に接触させるステップと、(b) *in vitro*分析で、上記結腸直腸癌情報提供的試薬を用いて、1個以上の上記遺伝子の発現レベルを検出するステップとを含み、1個以上の上記遺伝子の発現の変化したレベルが、対象の結腸直腸癌に関する悪い予後を示すことを特徴とする方法を提供する。

【0015】

ある実施形態では、本発明は、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる1個以上の遺伝子の結腸直腸癌を有するまたは有する疑いがある対象からのサンプルにおいて変化した遺伝子発現を検出する1個以上の結腸直腸癌情報提供的試薬を含むことを特徴とするキットを提供する。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる2個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる3個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる5個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる10個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10

、CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる12個以上の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる13個の遺伝子の組を含む。ある実施形態では、1個以上の上記遺伝子が、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3、およびBNIP3の組を含む。

10

【0016】

ある実施形態では、1個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対して特異的にハイブリダイズするプローブである。ある実施形態では、1個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物を増幅するプライマーの組である。ある実施形態では、1個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に結合する抗原結合タンパク質である。ある実施形態では、1個以上の上記結腸直腸癌情報提供的試薬が、1個以上の上記遺伝子の各遺伝子産物に対してハイブリダイズし、各遺伝子産物のシーケンシングを可能にする、シーケンシングプライマーである。

20

【0017】

ある実施形態では、キットは、結腸直腸癌と診断された対象の予後を決定するために用いられる。ある実施形態では、キットは、対象の結腸直腸癌を診断するために用いられる。ある実施形態では、キットは、治療の成功の可能性を決定するため、および/または、治療に対する患者を選択するために用いられる。

【0018】

さらなる実施形態は、関係技術の当業者には、ここに含まれる開示に基づけば明らかであろう。

【0019】

〔図面の簡単な説明〕

30

図1は、テストシリーズにおける予後の遺伝子発現の分類器の確認に導く遺伝子選択基準を示す。17617個の遺伝子の初期リストのうち、6760個の遺伝子が、ステージIとIVの腫瘍の間で、発現が異なっており、ステージ調整p値 < 0.50 であり、3339個の遺伝子(49%)が、ステージIとIVの腫瘍の間で異なる発現を持つ遺伝子リストに対し共通であり、ステージIIのCRCの患者の間で再発の高い危険性に関連する高発現および低発現遺伝子であった。危険性の高いステージIIのCRCの患者を示すために、これらの遺伝子のうち、13個の遺伝子発現分類器が確認された。この遺伝子分類器の予後影響力は、2個の独立サンプルシリーズにおいて良好に検証された。単変量Cox回帰分析から、危険比(HR)が得られた。

【0020】

40

図2は、ステージIIのCRCの患者の間で再発無しの生存(RFS)を表すKaplan Meier生存曲線を示す。(A)テストシリーズにおいて、再発グループの2個の危険性が十分に分離されている($p<0.001$)。(B)および(C)両方の検証シリーズIおよびII(それぞれbおよびc)において、予後の遺伝子発現分類器は、統計的に有意(それぞれ $p=0.02$ および $p=0.001$)に、再発グループの低いおよび高い危険性を確認する。

【0021】

図3は、図に示すように、13個の遺伝子の予後の分類器が、投げ縄ペナルティー法によりテストシリーズの44のステージIIのCRCから確認された、生存(A)、高い変動(B)および互いに対する低い相関(C)、に対する明らかな相関を有する遺伝子の確認に有利であることを示す。(A)単変量Cox回帰分析(「材料および方法」を見よ)か

50

ら生成された P 値は、分析に入れた 3 3 3 9 個の遺伝子からの P 値と比べて、平均的に有意に低かった(それぞれ $p=0.07$ 対 $p=0.55$)。(B) 遺伝子発現の変動の計算もまた、1 3 個の遺伝子の平均変動が、遺伝子セットに対するものより高いことを示している(それぞれ、変動2.39対0.23)。(C) ヒートマップは、CXCL10およびCXCL13を例外として、1 3 個の遺伝子の間で低い相関を示し(範囲 $-0.37 < r < 0.44$)、両方とも、染色体バンド4q21に位置し、 $r=0.70$ の相関係数を有する。

【0022】

図4は、ステージIIおよびIIIのCRCのサンプルと、1 3 個の遺伝子発現分類器の使用により計算された生存の可能性を示す。テストシリーズ(A)および検証シリーズ(B)の両方において、予後の遺伝子発現分類器は、ステージIIの患者に対してのみの予後出力に応じて有意な分離を可能にした。

10

【0023】

図5は、1 3 個の遺伝子のパネルに対するTaqMan(商標)アッセイ結果を用いたマイクロアレイデータの相関を示すプロットである。

【0024】

図6は、定量的RT-PCR(TaqMan(商標))アッセイ結果を用いたマイクロアレイデータの相関を示す個々の遺伝子に対するプロットである。

【0025】

〔定義〕

本発明の理解を容易にするために、多くの用語とフレーズを以下に定義する。

20

【0026】

ここで用いられる場合、用語「感度」は、分析(例えば方法、試験)の性能の統計的尺度として定義され、真の陽性および偽の陰性の和で、真の陽性の数を割って計算される。

【0027】

ここで用いられる場合、用語「特異性」は、分析(例えば方法、試験)の性能の統計的尺度として定義され、真の陰性および偽の陽性の和で、真の陰性の数を割って計算される。

【0028】

ここで用いられる場合、用語「情報提供的」または「情報提供性」は、マーカーまたはマーカーパネルの品質を指し、特に陽性試料からマーカー(またはマーカーパネル)を発見できる可能性を指す。

30

【0029】

ここで用いられる場合、用語「結腸直腸癌情報提供的試薬」は、ここで述べる癌遺伝子マーカーの発現の確認に対して情報提供的な試薬を指す。ある実施形態では、試薬は、以下の遺伝子の遺伝子発現産物(例えばRNA転写物またはタンパク質)の検出のための、プライマー、プローブまたは抗体である:PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3, BNIP3, PLA2G2A, GZMK, MMP1, AKD1, XRCC4, RAET1L, TTC30A, HAS2, CPE, CXCL9, GBP4, RPS6KA6, ENPP5, RAP1B, DYNLL1およびRPS27L。

【0030】

ここで用いられる場合、用語「転移」は、体内の一組織または部分で発生した癌細胞が他の部分に移転して複製し続ける過程を指すように意図される。その後、転移細胞は腫瘍を形成し、この腫瘍がさらに転移することがある。したがって、この用語は、癌が最初に発生した体内部位から他の体内部位へ広がることを指す。ここで用いられる場合、用語「転移結腸直腸癌細胞」は、転移した結腸直腸癌細胞、すなわち、結腸直腸以外の体内部分に局在する結腸直腸癌細胞を指すように意図されている。

40

【0031】

ここで用いられる場合、「転移性結腸直腸癌細胞の影響を受けやすいことが疑われる個体」は、転移結腸直腸癌細胞の発生について平均より高いリスクを有する個体を指すように意図されている。転移結腸直腸癌細胞の発生について特定のリスクを有する個体の例は

50

、個体の血縁者の医療記録から血縁者間の結腸直腸癌の発生率が平均よりも高いことが示される個体、および／または、既に結腸直腸癌に罹って効果的な治療を受けており、したがって再発のリスクに直面する個体である。平均より高い転移性結腸直腸癌の発生リスクに寄与し、したがって個体が転移性結腸直腸癌細胞の影響を受けやすいことが疑われる個体であると分類されることに繋がる他の要因は、個体の特定の遺伝的、医学的、および／または行動的背景および特性に基づいている。

【0032】

本願で使用する用語「新生物」は、組織の新生で異常な成長を指す。したがって、新生物は、前癌状態の新生物または悪性の新生物とすることができる。用語「新生物特異的マーカー」は、新生物の存在を示すのに使用することのできる任意の生体マーカーを指す。上記生体マーカーの例は、核酸、ポリペプチド、炭水化物、脂肪酸、細胞成分（例えば、細胞膜およびミトコンドリア）、および細胞全体を含むが、これらに限定されない。用語「結腸直腸の新生物に特異的なマーカー」は、結腸直腸の新生物（例えば、結腸直腸の前癌状態の新生物、結腸直腸の悪性の新生物、結腸直腸の転移性の新生物）の存在を示すのに使用することのできる任意の生体マーカーを指す。結腸直腸の新生物に特異的なマーカーの例は、ここで述べる13個の遺伝子サインを含むが、これらに限定されない。

10

【0033】

ここで用いられる場合、用語「アンプリコン」は、プライマー対を用いて生成される核酸を指す。アンプリコンは一般的には、一本鎖DNA（例えば、不斉増幅の生成物）であるが、RNAまたはdsDNAであってもよい。

20

【0034】

核酸との関連で使用する用語「増幅性」または「増幅」は、ポリヌクレオチドまたはその一部（一般的には、少量（例えば、単一のポリヌクレオチド分子）から開始）の複数のコピーを作製することを指し、この場合の増幅産物またはアンプリコンは通常は検出可能な増幅産物またはアンプリコンである。ポリヌクレオチドの増幅は様々な化学的および酵素的処理を含む。増幅手法の種類としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはリガーゼ連鎖反応（LCR；例えば、米国特許第5,494,810号参照；当該米国特許を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）中に標的DNA分子または鋳型DNA分子の1つまたは少数のコピーから複数のDNAコピーを発生させることがある。さらなる増幅手法の種類は、対立遺伝子特異的PCR法（例えば、米国特許第5,639,611号参照；当該米国特許を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、アセンブリPCR法（例えば、米国特許第5,965,408号参照；当該米国特許を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、ヘリカーゼ依存増幅法（例えば、米国特許第7,662,594号参照；当該米国特許を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、ホットスタートPCR法（例えば、米国特許第5,773,258号および米国特許第5,338,671号参照；当該米国特許を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、配列間特異的PCR法、インバースPCR法（例えば、Triglia, et al. (1988) Nucleic Acids Res., 16:8186参照；当該文献を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、ライゲーション介在PCR法（例えば、Guilfoyle, R. et al., Nucleic Acids Research, 25:1854-1858 (1997)および米国特許第5,508,169号を参照；当該文献および当該米国特許を参照することにより、それらの全開示内容を本願に援用するものとする）、メチル化特異的PCR（例えば、Herman, et al., (1996) PNAS 93(13) 9821-9826を参照；当該文献を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、ミニプライマーPCR法、マルチプレックスライゲーション依存プローブ増幅法（例えば、Schouten, et al., (2002) Nucleic Acids Research 30(12): e57を参照；当該文献を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする）、マルチプレックスPCR法（例えば、Chamberlain, et al., (1988) Nucleic Acids Research 16(23) 11141-11156およびBallabio, et al., (1990) Human Genetics 84(6) 571-573; Hayden, et al., (2008) BMC Genetics 9:80を参照；当該各文献を参

30

40

50

照することにより、それぞれの全開示内容を本願に援用するものとする)、ネステッドPCR、重複伸長PCR法(例えば、Higuchi, et al., (1988) Nucleic Acids Research 16(15) 7351-7367を参照; 当該文献を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする)、リアルタイムPCR(例えば、Higuchi, et al., (1992) Biotechnology 10:413-417およびHiguchi, et al., (1993) Biotechnology 11:1026-1030を参照; 当該各文献を参照することにより、それぞれの全開示内容を本願に援用するものとする)、逆転写PCR法(例えば、Bustin, S.A. (2000) J. Molecular Endocrinology 25:169-193を参照; 当該文献を参照することにより、その全開示内容を本願に援用するものとする)、固相PCR、熱非対称インターレースPCR法、およびタッチダウンPCR法(例えば、Don, et al., Nucleic Acids Research (1991) 19(14) 4008、Roux, K. (1994) Biotechniques 16(5) 812-814、およびHecker, et al., (1996) Biotechniques 20(3) 478-485を参照; 当該各文献を参照することにより、それぞれの全開示内容を本願に援用するものとする)を含むが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドの増幅処理はまた、デジタルPCR(例えば、Kalinina, et al., Nucleic Acids Research. 25; 1999-2004, (1997)、Vogelstein and Kinzler, Proc Natl Acad Sci USA. 96; 9236-41, (1999)、国際公開第WO 05023091A2号、および米国公開特許出願第2007 0202525号を参照; 当該各文献を参照することにより、それぞれの全開示内容を本願に援用するものとする)を用いることにより達成することが可能である。

【0035】

ここで用いられる場合、用語「相補的」または「相補性」は、塩基対合則に関するポリヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチドの配列)に関連して使用される。例えば、配列「5'-A-G-T-3'」は、配列「3'-T-C-A-5'」に相補的な配列である。相補性は、幾つかの核酸塩基のみが塩基対合則にしたがって一致しているような部分的な相補性であってもよい。または、核酸ストランド間には“完全”または“全体”相補性が存在してもよい。核酸の螺旋構造間の相補性の度合いは、核酸の螺旋構造間の交配の効率性および強度に多大な効果をおよぼす。このことは、増幅反応ならびに核酸ストランド間の結合に依存する検出方法において特に重要である。

【0036】

ここで用いられる場合、用語「プライマー」は、精製した制限消化産物において自然発生するような天然のオリゴヌクレオチドまたは合成的に作製されるような非天然のオリゴヌクレオチドの区別なく、核酸ストランドに対して相補的なプライマー伸長生成物の合成が誘発される状態(例えば、ヌクレオチドおよび生体触媒(例えば、DNAポリメラーゼなど)などの誘発剤の存在下であって、適切な温度およびpH条件下)におかれた場合に合成反応の開始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、増幅処理における最大の効率性を得るために、一般的には一本鎖のプライマーを使用するが、代わりに二本鎖のプライマーを使用してもよい。二本鎖のプライマーを使用する場合では、プライマーを用いて伸長生成物を調製する前に、先ず処理を行ってプライマーの二本鎖を分離させる。一部の実施形態では、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。上記プライマーは、誘発剤の存在下において伸長生成物の合成の事前準備を行うのに十分な長さを有している。上記プライマーの具体的な長さは、温度、プライマーのソース、および上記方法の使用を含む多数の要因に応じて決定される。特定の実施形態では、上記プライマーは捕捉プライマーである。

【0037】

ここで用いられる場合、用語「核酸分子」は、DNAまたはRNAを含む任意の核酸含有分子を指すが、これらに限定されない。上記用語が表す対象は、DNAおよびRNAの公知の塩基類似体を有する配列を含み、このような塩基類似体は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシル-)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチル-アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニ

ン、1 - メチルアデニン、1 - メチルシュード - ウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチル - グアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチル - シトシン、5 - メチルシトシン、N 6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシ - アミノ - メチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルケウオシン、5 ' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシブトキソシン、シュードウラシル、ケウオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、シュードウラシル、ケウオシン、2 - チオシトシン、および 2 , 6 - ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない。

10

【 0 0 3 8 】

ここで用いられる場合、用語「核酸塩基」は、「ヌクレオチド」、「デオキシヌクレオチド」、「ヌクレオチド残基」、「デオキシヌクレオチド残基」、「ヌクレオチド三リン酸 (N T P) 」、または「デオキシヌクレオチド三リン酸 (d N T P) 」を含む、当該分野で用いられる他の用語の同義語である。

【 0 0 3 9 】

ここで用いられる場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、少なくとも 2 個の核酸単量体単位 (例えば、ヌクレオチド) を含む核酸を指し、前記少なくとも 2 個の核酸単量体単位は、一般的には 3 個を超える単量体単位であり、より一般的には 1 0 個を超える単量体単位である。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは一般的には、最終機能またはオリゴヌクレオチドの使用を含む多様な要因に応じて決定される。さらに説明すると、オリゴヌクレオチドは一般的には 2 0 0 残基未満 (例えば、1 5 残基 ~ 1 0 0 残基) の長さである。しかし、本願に使用するように、用語「オリゴヌクレオチド」は、より長いポリヌクレオチド鎖を含むよう意図されている。オリゴヌクレオチドはその長さによって称されることが頻繁にある。例えば、2 4 残基のオリゴヌクレオチドは「2 4 - m e r」と称される。一般的には、ヌクレオシド単量体は、ホスホロチオデート、ホスホロジチオデート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、およびホスホラミデートなどを含み、付随する対イオン (例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、および Na^+ など) が存在する場合にはこれを含むリン酸ジエステル結合またはその類似物により結合される。さらに、オリゴヌクレオチドは一般的には一本鎖である。オリゴヌクレオチドは、任意の好適な方法により適宜調製され、前記任意の好適な方法は、既存または天然の配列の単離法、D N A の複製法または増幅法、逆転写法、適当な配列のクローニング法および制限消化法、または、Narang et al. (1979) Meth Enzymol. 68: 90-99 に記載のホスホトリエステル方法、Brown et al. (1979) Meth Enzymol. 68: 109-151 に記載のホスホジエステル方法、Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 に記載の diethylphosphoramidite 方法、Matteucci et al. (1981) J Am Chem Soc. 103:3 185-3191 に記載のトリエステル方法、自動合成方法、米国特許第 4 , 4 5 8 , 0 6 6 号 ("PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES"、発効日: 1 9 8 4 年 7 月 3 日、Caruthers et al.) に記載の固相支持方法、または当業者に公知の他の方法により実現される直接化学合成法を含むが、これらに限定されない。上述の全ての文献については、参照することにより各々の開示内容を本願に援用するものとする。

20

30

40

【 0 0 4 0 】

生重合体の「配列」は、生重合体中の単量体単位 (例えば、ヌクレオチドなど) の順番および識別性を指す。核酸の配列 (例えば、塩基配列) は一般的には 5 ' 末端側から 3 ' 末端側に読まれる。

【 0 0 4 1 】

ここで用いられる場合、用語「対象」は、特定の処理を受ける任意の動物 (例えば、哺乳類) を指し、前記任意の動物は、ヒト、ヒト以外の霊長類、および齧歯類などを含むが、これらに限定されない。通常、本願において用語「対象」および「患者」は互いに互換

50

可能にヒト対象と関連して使用される。

【0042】

本願に使用するように、用語「ヒト以外の動物」はヒト以外の全ての動物を指し、前記ヒト以外の全ての動物は、齧歯類、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、ウシ、反芻類、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類などの脊椎動物を含むが、これらに限定されない。

【0043】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド、RNA（例えば、mRNA、tRNA、およびrRNAを含むが、これらに限定されない）、または前駆体の生成に必要なコード配列を含む核酸（例えば、DNA）配列を指す。ポリペプチド、RNA、または前駆体は、全長コード配列によってコードされることが可能であり、全長コード配列または断片の所望の活性特性または機能特性（例えば、酵素活性、リガンド配位子結合、シグナル伝達など）が保持されている場合に限ってはコード配列の任意の部分によってコードされることが可能である。用語「遺伝子」は、構造遺伝子のコード領域も含み、コード領域に隣接して5'末端側および3'末端側に約1 kb離れて位置する配列を含んでいるので、遺伝子は全長mRNAの長さに対応する。上記コード領域の5'側に位置し、mRNA中に存在する配列は、5'非翻訳配列と称される。コード領域の3'側または下流側に位置してmRNA中に現れる配列は、3'非翻訳配列と称される。用語「遺伝子」は、遺伝子のcDNA形式およびゲノム形式の両方を含む。遺伝子のゲノム形式またはクローンは、「イントロン」、「介在領域」、または「介在配列」と称される非コード領域によって分断化されるコード領域を含む。イントロンは、転写されて核RNA（hnRNA）となる遺伝子断片である。イントロンは、エンハンサーなどの制御要素を含んでよい。イントロンは、核転写産物または一次転写産物から除去されるか、またはスプライシングにより取り出される。したがって、イントロンは、メッセンジャーRNA（mRNA）処理された転写産物中には不在となる。mRNAは翻訳中に作用して、新生ポリペプチドのアミノ酸の配列または順序を指定する。

【0044】

本願に使用する用語「遺伝子座」は、染色体上または連鎖地図上の核酸配列を指し、コード配列並びに遺伝子制御に関与する5'配列および3'配列を含む。

【0045】

〔発明の詳細な実施形態〕

本発明は、生物学的サンプル（例えば組織サンプル、生検サンプル、大便サンプル、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプル）における結腸直腸癌の検出のための方法およびバイオマーカー（例えば遺伝子発現バイオマーカー）に関する。ある実施形態では、本発明の方法およびバイオマーカーは、直腸癌の検出、および、結腸直腸癌の患者への予後の提供に有用である。

【0046】

KRASおよびBRAFの変異のような分子マーカーは、染色体およびマイクロサテライトの不安定性（MSI）同様、CRCの予後の可能性に対して系統的に分析される。これまでのところ、KRASの変異の分析だけが、転移性の疾病においてEGFR抗体の効果に対する予測マーカーとして実際の臨床で行われている（文献7 - 10）。他の公知の重要なCRC遺伝子の分析は、スクリーニングにも薦められていないし、予後および/または予測のマーカーとしても用いられていない（文献11、12）。

【0047】

いくつかの研究は、ステージIIおよびIIIのCRCの患者の予後の影響力を有する遺伝子発現のサインを確認した（文献13 - 19）。早期の研究では、小さいサンプルシリーズおよび独立したサンプルの検証の欠如が、引き出される結論の力を限定した。しかしながら、最近の公開物は、これらの限定に対処し、これらのうちの一つも特異的にステージIIのCRCをターゲットにしていなくても、遺伝子のサインが示唆されることを約束した（文献13、14、17、18）。

【0048】

この研究では、我々は、ステージIIのCRCの患者のリスクの階層化を改善した。遺伝子発現レベルを正確に決定するために高解像度のエクソンレベルマイクロアレイを用いることによって、再発の予測のための遺伝子分類器を開発した。この発現サインの予測値は、2個の患者シリーズにわたって検証された。

【0049】

マイクロアレイ技術は、発癌への洞察を得るのに高い適用性があることがわかった（文献28）。この研究で、我々は、ゲノムの各遺伝子の各エクソンに対するプローブを持つ高解像度のマイクロアレイを用い、厳しい統計的アプローチと組み合わせて、高リスクのステージIIの患者グループを確認した。2個の独立したサンプルシリーズが分析され、その全長に沿って遺伝子をターゲットにする強い遺伝子発現値を生成した。これは、ここに示したサインの強さに貢献したと考えられ、これは、臨床的に独立した社内のサンプルシリーズに加えて、第3の独立した公的に利用可能なデータセットにおいても検証された。後者のシリーズ（検証シリーズII）のサンプルは、社内のデータシリーズと比べて異なったタイプの発現マイクロアレイによって分析され、主に遺伝子の3'末端がターゲットにされた（文献13、14、18）。

10

【0050】

独立したデータセットに適用するときには、予測者の重要性が低いことによって特徴付けられる高次元のデータの生存モデリングに過剰に適合する危険がある。この挑戦に対処するために、遺伝子の最適な選択のためにL1（投げ縄）ペナルティを用いたCox比例危険モデルが、強い予後値と高い発現変動と相互間の低い相関を持つ遺伝子の選択に有利であり、過剰な適合を防止するために用いられる（文献25、29、30）。投げ縄法は、乳癌の研究で述べられている（文献25）。この方法は、「ColoGuide」と名付けられたステージIIのCRCの13個の遺伝子の予後の分類器を確認した。

20

【0051】

今日では、ステージIIの患者は、もし彼らが、臨床的および病学的な評価に基づいて再発の危険が高ければ、アジュバント化学療法的治療が考慮される。ASCOの推奨に沿えば、これに反対する要因は、進んだTステージ、いくつかの検査されたリンパ節、腫瘍孔および低い腫瘍分化である（文献5）。高リスクの患者グループは、pT4ステージまたは低グレード腫瘍を持った患者を含まなかった。これは、最近のSalazar達の研究に追従しており、そのレベルと臨床リスクファクターとの間の危険階層化における不一致を示し（文献17）、最も好ましくない結果を有する患者をより正確に指摘するためにさらなる分子情報の必要性を強調している。患者の生存との相関を有するMSI状態も示されている（文献10）。この研究では、MSI腫瘍（テストシリーズおよび検証シリーズI）のうちで、MSIに関連する好ましい予後と一致して遺伝子発現サインに沿って高リスクサンプルとして分類されたものはなかった。

30

【0052】

初めに、数千の遺伝子を、ステージIIの患者の結果にとって情報提供的なセットへと減少させる処理において、遺伝子が、転移能力に関連する発現レベルで確認されたが、これは例えば、ステージIとステージIVとの間で区別されるものである。遺伝子の機能的分析は、その生物学的関連性を支持した（表7）。Jorissenらは、ステージIIとIIIのCRCの予後サブグループを見いだすために、種々のデータセットにおける重複する遺伝子を比較する、同様のアプローチを用いた（文献13）。彼らは、その予後サインの確認のためにさらなる統計モデルは用いず、それゆえ、得られた大量の遺伝子(n=128)は、ルーチンの臨床試験への転送を複雑化する可能性がある（文献13）。我々の研究では、我々は、このような転送を簡素化するために、余分でない遺伝子のセットを確認することを狙った。2個の分析、ColoPrintおよびOncotype DXが開始され、それぞれ、18個および12個の遺伝子の予後分類器を有する早いステージのCRC（文献31、32）の危険予知を改善させた（文献17、33）。ColoPrintは、1個の内部データセットだけの検証に限定され、サインの強さは、予想される試行における評価を待っている（文献34）。Oncotype DX 19は、ゲノムの広範囲な遺伝子発現アプローチによって確認されなかったが、要求

40

50

された予後値のために文献から選択された数百の遺伝子の分析後（文献 33、35）、さらなる検証をも要求した（文献 36）。

【0053】

この研究でのテストシリーズは、CRCの患者の連続的な収集物からのサンプルからなる。ステージIIの患者の生存率と十分比較して、ステージIIの患者の16%が高リスクの患者と確認された（文献2）。検証シリーズIおよびIIの療法において、同様のサイズのサブグループが確認された（それぞれ13%、16%）。一般に、ステージIIの患者の予後の階層化を求める他の研究では、高い割合の患者が、37～51%の範囲の悪い予後のグループに分類された（文献13、14、17、18）。これはおそらく、患者を分類するのに用いられる異なった統計を反映している。再発疾病（37%の5年RFS）を有するステージIIの患者に対して濃縮するために、検証シリーズIがあらかじめ選択された。ここで、サンプルの13%のみにおける高リスクプロファイルの確認は、この患者のトータルの再発率を正確に表しておらず、全ての3個のサンプルシリーズ（発現値の20番目と80番目の百分位数）で患者の階層化のための同じ厳しい基準を用いた結果である。ここで表される遺伝子サインは、3個の患者シリーズにわたって予後情報を、説得力を持って保持している。「ColoGuide」-ステージIIは、分類器を構成する遺伝子の中で共変が無いが非常に低いことを統計的手段によって確認され、短い遺伝子リストを臨床試験に転送するときの利益を保証する。

10

【0054】

免疫監視およびそれに続く破壊を回避することは、HanahanおよびWeinbergによって癌の新規な特徴として最近示唆された（文献37）。我々は最近、CRCの免疫指標が、疾病開始時の年齢と著しく関連することを示した（文献38）。示された「ColoGuide」分類器における遺伝子のいくつかは、ケモカイン、BNIP3、AZGP1およびENPP3のような免疫システムにも関連している。サインにおける別の興味深い遺伝子は、KLK6で、これはKLK3に対する同族体であり、前立腺癌へのバイオマーカーを検出して監視するのに広く用いられる前立腺癌に特異的な抗体（PSA）をエンコードする（文献39）。

20

【0055】

< I . 診断方法およびスクリーニング方法 >

上述したように、本発明の実施形態は、癌マーカー遺伝子（例えば、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3, BNIP3, PLA2G2A, GZMK, MMP1, AKD1, XRCC4, RAET1L, TTC30A, HAS2, CPE, CXCL9, GBP4, RPS6KA6, ENPP5, RAP1B, DYNLL1またはRPS27L）およびその組み合わせの発現の変化したレベルの検出を利用する、診断、予後およびスクリーニングの方法およびキットを提供する。ある実施形態では、上記方法およびキットは、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SESN1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、から選ばれる、2個以上、3個以上、5個以上、10個以上、11個以上、12個以上、または13個の癌マーカー遺伝子の、対象における発現の変化したレベルの検出を利用するあるいは検出を可能にする。ある実施形態では、上記方法およびキットは、遺伝子産物（例えば、RNA転写物またはタンパク質または、表1のカラムAに載っている、1個以上、2個以上、3個以上、5個以上、10個以上、11個以上、12個以上、または13個の癌マーカー遺伝子）の検出のための結腸直腸癌情報提供的試薬を利用する。ある実施形態では、表1のカラムBに載っている1個以上の癌マーカー遺伝子が、カラムAの対応する癌マーカー遺伝子の代わりに用いられ、適切な結腸直腸癌情報提供的試薬をこの方法およびキットに利用される。典型的な、限定しない実施形態を以下に述べる。

30

40

【0056】

表 1

50

【 0 0 5 7 】

【 表 1 】

カラムA	カラムB
PIGR	PLA2G2A
CXCL13	GZMK
MMP3	MMP1
SESN1	AKD1
AZGP1	XRCC4
KLK6	RAET1L
EPHA7	TTC30A
SEMA3A	HAS2
DSC3	CPE
CXCL10	CXCL9
	GBP4
ENPP3	RPS6KA6
BNIP3	ENPP5
TUBA1B	RAP1B
	DYNLL1
	RPS27L

10

20

【 0 0 5 8 】

遺伝子を含んでいる疑いがある患者のサンプルはどれも、本発明の実施形態の方法に従って試験することができる。限定しない実施例によって、サンプルは、組織（例えば結腸直腸の生検サンプルまたは他の組織サンプル）、血液、大便またはそれらの分画（例えば血漿、血清など）であってよい。

30

【 0 0 5 9 】

ある実施形態では、患者のサンプルは、偽遺伝子または偽遺伝子を含む細胞のためのサンプルを単離または濃縮するように設計された予備処理に付される。この目的のために、当業者に公知の種々の技術を使用可能であり、限定されないが、遠心分離、免疫捕捉、細胞溶解、および、核酸ターゲット捕捉（例えば、参照によりここにその全体を盛り込む、EP特許No. 1 409 727を参照）を含む。

【 0 0 6 0 】

本発明は結腸直腸癌の予後を検出および提供するのに特異的ないくつかのマーカーを例示しているが、結腸直腸癌の存在または非存在に関連するいずれのマーカーも、単独、または、ここに述べるマーカーと組み合わせで用いることができる。ここで用いられるマーカーは例えば、その産生または変異または非産生が、結腸直腸の新生物またはその予後に特有であるような核酸を含む。所定の分析に用いられるマーカーの特定の組に依存して、統計分析は変わる。例えば、マーカーの特定の組み合わせが結腸直腸癌に高い特異性を有する場合は、陽性の結果の統計の重要性は高い。しかしながら、このような特異性は、感度を犠牲にして達成されることがありうる（例えば、結腸直腸癌が存在するときでも陰性の結果が生じる）。さらに、種々の組み合わせは非常に感度が高い（例えば偽の陰性が少ない）が、特異性が低い。

40

【 0 0 6 1 】

50

種々の民族グループまたは性別、種々の地理的分布、種々の疾病ステージ、種々の特異性レベル、または種々の感度レベルに最適な機能を示すマーカーの特定の組み合わせが用いられる。疾病の進行に対し療法的な養生法の効果に対し特に感度のある特定の組み合わせもまた行える。特異的な療法および/または治療計画の効果を決定するために、療法および/または治療計画の後に、対象を監視することができる。複合フォーマットまたはパネルフォーマットに含めるために、他の癌、疾病、感染、および代謝状態のマーカーも考慮される。

【0062】

この方法は、ほ乳類の特定のタイプに限定されない。ある実施形態では、ほ乳類はヒトである。ある実施形態では、結腸直腸新生物は前癌状態である。ある実施形態では、結腸直腸新生物は悪性である。ある実施形態では、結腸直腸新生物は癌のステージ（例えばステージI、II、IIIまたはIV）と無関係の結腸直腸癌である。ある実施形態では、結腸直腸癌はステージIIである。

10

【0063】

< A . DNAおよびRNA検出 - 結腸直腸癌情報提供的試薬 >

本発明の癌マーカー遺伝子の発現は、当業者に公知な種々の核酸技術を用いて検出され、これは、限定されないが、核酸シーケンシング、核酸ハイブリダイゼーション、核酸増幅を含む。これらの技術は、癌マーカー遺伝子の遺伝子産物を増幅するためにハイブリダイズする、または増幅するのに用いられる、核酸のプロブおよびプライマーのような結腸直腸癌情報提供的試薬を利用し、その結果、各癌マーカー遺伝子の発現レベルを決定することができる。

20

【0064】

< 1 . シーケンシング >

核酸シーケンシング技術の説明的で非限定的な例は、限定されないが、チェーンターミネーター(Sanger)シーケンシングおよびダイターミネーターシーケンシングを含む。当業者は、細胞内ではRNAは安定性が低く、実験的にヌクレアーゼ攻撃の傾向がより高いので、RNAは通常、シーケンシング前にDNAに逆転写されることを認識している。

【0065】

チェーンターミネーターシーケンシングは、修飾されたヌクレオチド基質を用いるDNA合成反応の配列特異的停止を用いる。伸長は、テンプレートのDNAの特異的な位置で、当該位置でテンプレートのDNAに対し相補的な、放射性または他のラベルされた、短いオリゴヌクレオチドプライマーを用いて開始される。オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAポリメラーゼ、標準的な4つのデオキシヌクレオチド塩基および低濃度の1種類の連鎖停止ヌクレオチド、最も一般的にはジ-デオキシヌクレオチドを用いて伸長する。この反応は、各塩基が交代してジ-デオキシヌクレオチドとされている4個の個別のチューブにて繰り返される。DNAポリメラーゼによる連鎖停止ヌクレオチドの導入が限定されている結果、特定のジ-デオキシヌクレオチドが用いられる位置でのみ停止する関連する一連のDNAフラグメントが生じる。各反応チューブに対し、フラグメントは、厚板のポリアクリルアミドゲルまたは粘性ポリマーで満たされたキャピラリーチューブでの電気泳動によって大きさごとに分離される。ゲルの最上部から底までスキャンして、ラベル化プライマー由来の視覚的マークがどのレーンで生成されているかを読むことによって、配列は決定される。

30

40

【0066】

ダイターミネーターシーケンシングは、停止剤を代替的にラベルする。完全なシーケンシングは、ジ-デオキシヌクレオチドの連鎖停止剤のそれぞれを、異なる波長で蛍光を発する個々の蛍光色素でラベルすることによって、単一の反応で実行できる。

【0067】

本開示の方法での使用には、種々の核酸シーケンシング法が考慮され、例えば、チェーンターミネーター(Sanger)シーケンシング、ダイターミネーターシーケンシングおよび高スループットのシーケンシング法を含む。これらのシーケンシング法は公知であり、例え

50

ば、以下を参照されたい：Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1997); Maxam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560-564 (1977); Drmanac, et al., Nat. Biotechnol. 16:54-58 (1998); Kato, Int. J. Clin. Exp. Med. 2:193-202 (2009); Ronaghi et al., Anal. Biochem. 242:84-89 (1996); Margulies et al., Nature 437:376-380 (2005); Ruparel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5932-5937 (2005), and Harris et al., Science 320:106-109 (2008); Levene et al., Science 299:682-686 (2003); Korlach et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:1176-1181 (2008); Branton et al., Nat. Biotechnol. 26(10):1146-53 (2008); Eid et al., Science 323:133-138 (2009); これらのそれぞれは、その全体が参照によってここに盛り込まれる。

【 0 0 6 8 】

ある実施形態では、サンプル中のRNA分子の配列と頻度の分析を提供するために、ディープシーケンシングが利用される。適切なディープシーケンシングは、限定されないが、単一分子リアルタイムシーケンシング(Pacific Biosciences)、合成によるシーケンシング(Illumina, Inc.)、454パイロシーケンシング(Roche Diagnostics, Inc.)、SOLiDシーケンシング(Life Technologies, Inc.)およびイオン半導体シーケンシング(Life Technologies, Inc.)のような、次世代シーケンシング技術を含む。

【 0 0 6 9 】

< 2 . ハイブリダイゼーション >

核酸のハイブリダイゼーション技術の説明のための非限定的な例は、限定されないが、in situハイブリダイゼーション(ISH)、マイクロアレイ、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、およびサザンプロット法またはノーザンプロット法を含む。

【 0 0 7 0 】

in situハイブリダイゼーション(ISH)は、ラベルされた相補的なDNAまたはRNAのストランドをプローブとして用い、組織の一部または部位で(in situ)、または、組織が十分小さければ、組織全体(ホールマウントISH)で、特異的なDNAまたはRNAの配列を局在化させるタイプのハイブリダイゼーションである。DNAのISHは、染色体の構造を決定するのに用いることができる。RNAのISHは、組織の部位またはホールマウント内にmRNAとその他の転写物(例えば偽遺伝子)を測定して局在化させるのに用いられる。サンプルの細胞および組織は通常、定位置にてターゲットの転写物を固定してプローブのアクセスを増加させるために処理される。プローブは、温度を上昇させるとターゲット配列へとハイブリダイズし、その後、過剰のプローブは洗い流される。放射線、蛍光または抗体でラベルされた塩基でラベルされたプローブは、それぞれ、オートラジオグラフィ、蛍光顕微鏡法または免疫組織化学を用いて、組織内で局在化し、定量される。ISHは、放射性でラベルされたまたは他の非放射ラベルされた2個以上のプローブを用いて、2個以上の転写物を同時に検出することもできる。

【 0 0 7 1 】

ある実施形態では、遺伝子発現は、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を用いて検出される。ある実施形態では、FISH分析は、細菌の人工染色体(BACS)を用いる。これらは、ヒトゲノムシーケンシングプロジェクトで広く用いられ(Nature 409: 953-958 (2001)参照)、特異的なBACSを含んだクローンは、多くの供給元(例えばNCBI)を介して探し出され得る分配者を介して利用可能である。ヒトゲノムからの各BACクローンは、明確にそれを確認する基準名を与えられている。これらの名前は、対応するGenBank配列を見いだして分配者からクローンのコピーを注文するのに用いることができる。

【 0 0 7 2 】

本発明は、さらに、ヒト結腸直腸細胞、ヒト結腸直腸組織またはヒト結腸直腸の細胞または組織の周りの液体に対し、FISH分析を行う方法を提供する。特定のプロトコルはこの分野で公知であり、本発明に容易に適用できる。方法論に関するガイダンスは、以下のものを含む多くの参考文献から得ることができる：in situハイブリダイゼーション：Medical Applications (eds. G. R. Coulton and J. de Belleruche), Kluwer Academic P

10

20

30

40

50

ublishers, Boston (1992); in situハイブリダイゼーション: In Neurobiology; Advances in Methodology (eds. J. H. Eberwine, K. L. Valentino, and J. D. Barchas), Oxford University Press Inc., England (1994); in situハイブリダイゼーション: A Practical Approach (ed. D. G. Wilkinson), Oxford University Press Inc., England (1992)); Kuo, et al., Am. J. Hum. Genet. 49:112-119 (1991); Klinger, et al., Am. J. Hum. Genet. 51:55-65 (1992); and Ward, et al., Am. J. Hum. Genet. 52:854-865 (1993)). 商業的に利用可能で、FISH分析を行うプロトコルを提供するキットもある(例えばOncor, Inc., Gaithersburg, MDから利用可能である)。方法論のガイダンスを提供する特許は、米国5,225,326; 5,545,524; 6,121,489および6,573,043を含む。これらの参考文献の全ては、その全体が参照によってここに盛り込まれ、この分野の類似の参考文献とともにおよびここでの実施例セクションで提供される情報とともに用いることができ、特定の研究室のために便利な手続上のステップを確立する。

10

【0073】

ある実施形態では、本発明は、ヌクレアーゼプロテクションアッセイを用いる。ヌクレアーゼプロテクションアッセイは、低いトータル濃度でも、公知の配列の1個以上のRNA分子を確認するのに有用である。抽出されたRNAは、まず、所定の配列に相補的なアンチセンスRNAまたはDNAと混合され、相補的なストランドは、ハイブリダイズされて、二本鎖RNA(またはDNA-RNAハイブリッド)を形成する。それから、混合物は、一本鎖RNAのみを特異的に切断し、二本鎖RNAには反応性を持たないリボヌクレアーゼに曝露される。反応が完了すると、感受性の強いRNA領域は、非常に短いオリゴマーまたは個々のヌクレオチドに分解し、また、生存したRNAフラグメントは、追加されたアンチセンスストランドに対し相補的で、それゆえ所定の配列を含んだものである。適切なヌクレアーゼプロテクションアッセイは、限定されないが、米国5,770,370; EP 2290101A3; 米国20080076121; 米国20110104693に記載のものを含み、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる。ある実施形態では、本発明は、HTG Molecular Diagnostics, Inc. (Tuscon, AZ)によって提供される定量的ヌクレアーゼプロテクションアッセイを用いる。

20

【0074】

<3. マイクロアレイ>

異なった種類の生物学的分析は、限定されないが、DNAマイクロアレイ(例えば、cDNAマイクロアレイおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ)、タンパク質マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、トランスフェクションまたは細胞マイクロアレイ、化学化合物マイクロアレイ、および、抗体マイクロアレイを含むマイクロアレイと呼ばれる。DNAマイクロアレイは、遺伝子チップ、DNAチップまたはバイオチップとして普通に知られ、固体表面に結合されて、数千の遺伝子に対して同時に発現プロファイルまたは発現レベルの監視の目的のためのアレイを形成する微視的なDNAスポットの収集物である。接着されたDNAフラグメントは、プローブとして知られ、これら数千のものが、一本鎖DNAマイクロアレイに用いることができる。マイクロアレイは、疾病の細胞と正常な細胞との遺伝子発現を比較することによって、疾病の遺伝子または転写物(例えばここに記載の遺伝子)を確認するのに用いることができる。マイクロアレイは、種々の技術を用いて製造でき、これらの技術は、限定されないが、微細な尖ったピンを用いたガラススライド上へのプリンティング、あらかじめ作られたマスクを用いたフォトリソグラフィ、ダイナミックマイクロミラーを用いたフォトリソグラフィ、インクジェットプリンティング、または、マイクロ電極アレイ上の電気化学を含む。

30

40

【0075】

サザンブロット法およびノーザンブロット法は、それぞれ、特異的なDNAまたはRNAのシーケンスを検出するのに用いられる。サンプルから抽出されたDNAまたはRNAは、フラグメント化され、マトリックスゲル上で電気泳動によって分離され、メンブランフィルターに転写される。フィルターに結合したDNAまたはRNAは、所定の配列に相補的なラベルされたプローブとともにハイブリダイゼーションに付される。フィルターに

50

結合したハイブリダイズされたプローブが検出される。処理の変形例は、逆ノーザンブロット法であり、そこでは、膜に接着された基質の核酸が、単離されたDNAフラグメントの集積物であり、プローブが、組織から抽出されてラベルされたRNAである。

【0076】

< 3 . 増幅 >

核酸（例えば癌マーカー遺伝子）は、検出の前または同時に増幅してもよい。核酸増幅技術の説明のための実施例は、限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、転写媒介増幅（TMA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ストランド置換増幅（SDA）、および核酸配列ベースの増幅（NASBA）を含む。当業者は、ある増幅技術（例えばPCR）では、増幅前にRNAがDNAに逆転写される（例えばRT-PCR）必要がある一方、他の増幅技術ではRNAを直接増幅する（例えばTMAおよびNASBA）ことを認識している。

10

【0077】

ポリメラーゼ連鎖反応（米国特許4,683,195, 4,683,202, 4,800,159および4,965,188、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる）は、通常、PCRと呼ばれ、変性、逆ストランドに対するプライマーペアのアニーリング、およびプライマーの伸長という多重サイクルを用い、ターゲットの核酸配列のコピー数を指数関数的に増加させる。RT-PCRと呼ばれる変形例では、mRNAから相補的DNA（cDNA）を作るために逆転写が用いられ、次いで、cDNAは、PCRによって増幅され、DNAの多数のコピーを生成する。PCRの他の種々の置換としては、例えば、米国特許4,683,195, 4,683,202および4,800,159や、Mullis et al., Meth. Enzymol. 155: 335 (1987)およびMurakawa et al., DNA 7: 287 (1988)を参照されたく、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる。

20

【0078】

転写媒介増幅（米国特許5,480,784および5,399,491、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる）は、通常、TMAと呼ばれ、実質的に一定の温度、イオン強度およびpHの条件で自己触媒的にターゲットの核酸配列の多数のコピーを合成し、ターゲット配列のRNAの多数のコピーが、自己触媒的にさらなるコピーを生成する。例えば、米国特許5,399,491および5,824,518を参照されたく、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる。米国公開20060046265（その全体が参照によってここに盛り込まれる）に記載の変形例においては、TMAは、随意的に、遮断部分、終結部分、および他の修飾部分の使用を盛り込み、TMA処理の感度と正確さを改善する。

30

【0079】

リガーゼ連鎖反応（Weiss, R., Science 254: 1292 (1991)、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる）は、通常、LCRと呼ばれ、ターゲットの核酸配列の隣接領域に対してハイブリダイズする相補的なDNAオリゴヌクレオチドの2組を用いる。DNAヌクレオチドは、熱変性、ハイブリダイゼーションおよび連結反応の反復サイクルにおいてDNAリガーゼによって共有結合でリンクされ、検出可能な二本鎖の連結されたオリゴヌクレオチド産物を生成する。

【0080】

ストランド置換増幅（Walker, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396 (1992); 米国特許5,270,184および5,455,166、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる）は、通常、SDAと呼ばれ、ターゲットの配列の逆ストランドに対するプライマー配列のペアのアニーリング、dNTPαSの存在下でプライマーの伸長による二重のヘミホスホロチオエートのプライマーの伸長産物の生成、半修飾された制限エンドヌクレアーゼの認識部位のエンドヌクレアーゼ媒介のニック付け、および、ポリメラーゼ媒介のニックの3'末端からのプライマーの伸長による存在ストランドの置換および次のラウンドのプライマーアニーリング、ニック付けおよびストランド置換に対するストランドの生成、およびそれによる産物の幾何学的増幅、のサイクルを用いる。熱SDA（tSDA）は、本質的に同じ方法において、より高温で、好熱性のエンドヌクレアーゼ

40

50

およびポリメラーゼを用いる（欧州特許0 684 315）。

【0081】

他の増幅方法は、例えば、核酸配列ベースの増幅（米国特許5,130,238、これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる）であって、通常、N A S B Aと呼ばれるもの、R N A レプリカーゼを用いてプローブ分子自体を増幅するもの（Lizardi et al., BioTechnol. 6: 1197 (1988)、これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる）であって、通常、Q β レプリカーゼと呼ばれるもの、転写ベースの増幅法（Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989)）、および、自立配列複製（Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874 (1990)、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる）を含む。公知の増幅方法のさらなる議論については、Diagnostic Medical Microbiologyの、Persing, David H., "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques": Principles and Applications (Persing et al., Eds.), pp. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC (1993))を参照されたい。

10

【0082】

< 4 . 検出方法 >

増幅されないまたは増幅された核酸は、任意の公知の手段で検出することができる。例えば、ここに記載の癌マーカー遺伝子は、検出可能にラベルされたプローブでハイブリダイズし、得られたハイブリッドの測定によって検出することができる。検出方法の説明のための非限定的な実施例を以下に述べる。

【0083】

一つの説明のための検出方法は、リアルタイムで、増幅処理の定量的評価を提供する。「リアルタイム」での増幅処理の評価は、増幅反応中に連続的または周期的に反応混合物中でアンプリコンの量を決定することと、決定された値を用いて、サンプル中に初めに存在するターゲット配列の量を計算することを含む。リアルタイムの増幅に基づいて、サンプル中に存在する初めのターゲット配列の量を決定する、種々の方法がこの分野でよく知られている。これらは、米国特許6,303,305および6,541,205に記載の方法を含み、これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる。サンプル中に初めに存在するターゲット配列の量を決定するが、リアルタイムの増幅によらない他の方法は、米国特許5,710,029に記載され、これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる。

20

【0084】

増幅産物は、種々の自己ハイブリダイゼーションプローブを用いてリアルタイムで検出され、そのほとんどは、ステムループ構造を有する。このような自己ハイブリダイゼーションプローブは、プローブが自己ハイブリダイゼーション状態にあるか、ターゲット配列に対するハイブリダイゼーションによって変化した状態にあるかに依存して、異なって検出可能なシグナルを放出する。非限定的な例によって、「分子トーチ」は、結合領域（例えば非ヌクレオチドリinker）によって接続されて、所定のハイブリダイゼーション分析条件の下で互いに対してハイブリダイズする、自己相補性の明確な領域（「ターゲット結合ドメイン」および「ターゲット閉鎖ドメイン」と称する）を含む。好ましい実施形態では、分子トーチは、1ないし20塩基の長さのターゲット結合ドメインにおける一本鎖塩基領域を含み、ストランド置換条件下で増幅反応において存在するターゲット配列に対するハイブリダイゼーションに対して利用しやすい。ターゲット結合ドメインに存在する一本鎖領域に結合し、ターゲット閉鎖ドメインの全部または一部を置換するターゲット配列の存在下を除いて、ストランド置換条件下では、分子トーチの完全または部分的に相補的な2つの相補的な領域のハイブリダイゼーションが好ましい。分子トーチのターゲット結合ドメインおよびターゲット閉鎖ドメインは、分子トーチが自己ハイブリダイズされたときには、分子トーチがターゲット配列にハイブリダイズされたときとは異なったシグナルが生成されて、それによって、非ハイブリダイゼーション分子トーチの存在下でテストサンプルにて二重のプローブターゲットの検出ができるように位置する、検出可能な、相互作用するラベルまたはラベルのペア（例えば発光性 / 消光剤）を含んでいる。分子トーチおよび種々のタイプの相互作用ラベルペアは、米国特許6,534,274に記載され、これは、

30

40

50

その全体が参照によってここに盛り込まれる。

【0085】

ある実施形態では、癌マーカー遺伝子の検出および発現の定量的ために、TaqMan（商標）検出システムが用いられる。TaqManプローブシステムは、Taqポリメラーゼの5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を利用して、相補的なターゲット配列へのハイブリダイゼーション中、および蛍光物質ベースの検出中に、二重にラベルされたプローブを切断する。他のリアルタイムPCR法のように、得られる蛍光シグナルは、PCRの指数関数的段階中、生成物の蓄積の定量的な測定が可能である、しかしながら、TaqManプローブは、検出の特異性を著しく増加させる。TaqManプローブは、オリゴヌクレオチドプローブの5'末端に共有結合で結合された蛍光物質と、3'末端の消光剤とからなる。いくつかの異なる蛍光物質（例えば、6 - カルボキシフルオレセイン、頭字語FAM、またはテトラクロロフルオレセイン、頭字語TET）および消光剤（例えばテトラメチルローダミン、頭字語TAMRA、または、ジヒドロシクロピロロインドールトリペプチドのマイナーグループバインダー、頭字語MGB）が利用可能である。消光剤分子は、FRETを介して循環体の光源によって刺激されると、蛍光物質によって放出された蛍光を消光する。蛍光物質と消光剤とが近接している限り、消光によっていずれの蛍光シグナルも抑制される。TaqManプローブは、それが、特定のプライマーの組によって増幅されるDNA領域内でアニーリングするように設計されている。Taqポリメラーゼは、プライマーを伸長させ、初期ストランドを生成（再び、一本鎖テンプレート上ではあるが、ダイアグラムに示したのとは反対の向きに、すなわち、相補的なストランドの3'から5'へと）すると、ポリメラーゼの5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性が、テンプレートにアニーリングしたプローブを分解させる。プローブの分解によって、そこから蛍光物質が解放され、消光剤への近接が停止し、これによって、消光効果を軽減し、蛍光物質の蛍光を可能にする。したがって、リアルタイムPCR熱循環体で検出された蛍光は、開放された蛍光物質およびPCRにおけるDNAテンプレートの量に直接比例する。

10

20

【0086】

自己相補性を有する検出プローブの別の例は、「分子ビーコン」である。分子ビーコンは、ターゲットの相補的配列を有する核酸分子、増幅反応に存在するターゲット配列が無いときに閉鎖構造にてプローブを保持する親和性ペア（または核酸アーム）、および、ペアが閉鎖構造にあるときに相互作用するラベルペア、を含む。ターゲット配列とターゲット相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、親和性ペアのメンバーが分離され、それゆえ、プローブが開放構造にシフトする。開放構造へのシフトは、ラベルペアの相互作用の減少により検出でき、これは例えば、蛍光物質および消光剤（例えばDABCYL およびEDANS）とすることができる。分子ビーコンは、米国特許5,925,517および6,150,097に記載され、これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる。

30

【0087】

他の自己ハイブリダイゼーションプローブは、当業者に公知である。非限定的な例によって、米国特許5,928,862（これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる）に記載のような、相互作用ラベルを有するプローブ結合ペアが、本発明の使用に適合する。一塩基多型(SNPs)を検出するのに用いられるプローブシステムも、本発明に用いることができる。さらなる検出システムは、米国公開20050042638に記載のような「分子スイッチ」を含み、これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる。挿入色素および/または蛍光色素を含むもののような、他のプローブも、本発明の増幅産物の検出に有用である。例えば米国特許5,814,447（これは、その全体が参照によってここに盛り込まれる）を参照されたい。

40

【0088】

他の説明のための検出方法、ハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ(HPA)は、化学発光オリゴヌクレオチドプローブ（例えばアクリジニウムエステルラベル(AE)プローブ）をターゲット配列にハイブリダイズすること、非ハイブリダイゼーションプローブに存在する化学発光ラベルを選択的にハイブリダイズすること、および、残っているプロ

50

ープから生成される化学発光を照度計で測定することを要する。例えば米国特許5,283,174およびNorman C. Nelson et al., Nonisotopic Probing, Blotting, and Sequencing, ch. 17 (Larry J. Kricka ed., 2d ed. 1995, これらはそれぞれ、その全体が参照によってここに盛り込まれる)を参照されたい。

【0089】

< B . タンパク質の検出 - 結腸直腸癌情報提供的試薬 >

ここに記載の癌マーカー遺伝子は、当業者に公知の種々のタンパク質技術を用いてタンパク質として検出することができ、限定されないが、タンパク質シーケンシングおよびイムノアッセイを含む。

【0090】

< 1 . シーケンシング >

タンパク質シーケンシング技術の説明のための非限定的な例は、限定されないが、質量分析およびEdman分解を含む。

【0091】

質量分析は、原理的には任意のサイズのタンパク質をシーケンシングすることができるが、サイズが増加するにつれて、コンピュータ処理が困難になる。タンパク質はエンドプロテアーゼによって消化され、得られた溶液は高速液体クロマトグラフィーカラムを通される。このカラムの端部では、溶液は、高い正電位に荷電された狭いノズルから外の質量分析計に噴射される。小滴の電荷によって小滴がフラグメント化し、単一のイオンのみが残る。その後、ペプチドはフラグメント化し、フラグメントの質量と電荷の比が測定される。質量分析は、コンピュータで分析され、しばしば、あらかじめシーケンシングされたタンパク質のデータベースと比較され、フラグメントのシーケンスが決定される。異なる消化酵素を用いてこの処理が繰り返され、シーケンス間の重なりが、タンパク質のシーケンスを組み立てるのに用いられる。

【0092】

Edman分解反応では、シーケンシングすべきペプチドが固体表面（例えばポリブレンでコーティングされたガラスファイバー）上に吸着される。Edman試薬である、フェニルイソチオシアネート(PTC)が、12%トリメチルアミンの穏やかな塩基バッファ溶液とともに、吸着されたペプチドに加えられ、N末端のアミノ酸のアミノ基と反応する。末端のアミノ酸誘導体は、その後、無水酸の添加により選択的に切り離されることができる。誘導体は、異性化して、置換フェニルチオヒダントインを生成し、これは、洗浄されて、クロマトグラフィーによって確認することができ、このサイクルを繰り返すことができる。各ステップの効率は、約98%であり、これにより、約50個のアミノ酸を高信頼度で決定することができる。

【0093】

< 2 . イムノアッセイ >

イムノアッセイの説明のための非限定的な例は、限定されないが、免疫沈降、ウエスタンブロット、ELISA、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリーおよび免疫PCRを含む。当業者に公知の種々の技術を用いて検出可能にラベルされたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体（例えば比色分析、蛍光、化学発光または放射性）が、イムノアッセイでの使用に好適である。

【0094】

免疫沈降は、抗原に特異的な抗体を用いて溶液から抗体を沈降させる技術である。この処理は、複合体中にあると思われるタンパク質をターゲットにすることによって、細胞抽出物中に存在するタンパク質複合体を確認するのに用いることができる。複合体は、初めに細菌から単離された、タンパク質Aやタンパク質Gなどのような、不溶性の抗体結合タンパク質によって溶液から取り出される。抗体も、溶液から容易に単離できるセファロースビーズと結合することができる。洗浄後、沈殿物は、質量分析、ウエスタンブロットまたは複合体中の成分を確認するための任意の数の他の方法を用いて分析することができる。

【0095】

ウエスタンブロットすなわち免疫ブロットは、組織ホモジェネートまたは抽出物の所定のサンプルにおいてタンパク質を検出する方法である。これは、ゲル電気泳動を用いて、変性したタンパク質を質量によって分離する。その後、タンパク質は、ゲルから膜、典型的にはポリビニルジフルロリドまたはニトロセルロース、の上へ転写され、タンパク質は、所定のタンパク質に特異的な抗体を用いて検査される。結果として、研究者は、所定のサンプル中のタンパク質の量を検査して、いくつかのグループ間でレベルを比較することができる。

【0096】

ELISA、酵素結合免疫吸着法は、サンプル中の抗体または抗原の存在を検出する生物学的技術である。これは、最小2個の抗体を用い、そのうちの1個は抗原に特異的であり、他方は酵素に結合している。2番目の抗体によって、色を生成するまたは蛍光を生成する基質が、シグナルを生成する。ELISAの変形例は、サンドイッチELISA、競合ELISAおよびELISPOTを含む。ELISAは、サンプル中の抗体または抗原の存在を評価するのに用いられるので、血清抗体濃度の決定にも、抗原の存在の検出にも、有用なツールである。

10

【0097】

免疫組織化学および免疫細胞化学は、各抗体に結合する組織または細胞中の抗原の原理から、それぞれ、組織部位または細胞中にタンパク質を局在化させる処理を指す。視覚化は、色を生成する抗体をタグとすることによって、または蛍光タグによって実現される。色タグの典型的な例は、限定されないが、西洋わさびのペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む。蛍光タグの典型的な例は、限定されないが、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリトリンを含む。

20

【0098】

フローサイトメトリーは、液体の流れの中に懸濁された微細粒子をカウント、検査、および分類する技術である。これは、光学的/電子的検出器を通る単一細胞という物理的および/または化学的特徴の同時のマルチパラメトリック分析を可能にする。単一波長または単一色の光ビーム(例えばレーザー)は、流体力学的に集中した液体流上のほうを向く。多くの検出器が、流れが光ビームを流れる点に向けられ、一つは、光ビームの線に沿っており(前方散乱すなわちFSC)、またいくつかは、それと垂直である(側方散乱(SSC)および1個以上の蛍光検出器)。ビームを通る各懸濁粒子は、なんらかの方法で光を散乱させ、粒子の蛍光成分は、光源よりも低い周波数で光を出射するよう刺激されてもよい。散乱光と蛍光との組み合わせが検出器によって採集され、また、各検出器で、一つには、各蛍光出射ピークに対して、輝度の変動を分析することによって、各個々の粒子の物理的および化学的な構造についての種々の事実を推測することができる。FSCは、細胞の体積と関連し、SSCは、粒子の密度または内部の複雑さ(例えば、核の形状、細胞質の小粒の量およびタイプ、または膜の荒さ)と関連する。

30

【0099】

免疫ポリメラーゼ連鎖反応(IPCR)は、抗体ベースのイムノアッセイでのシグナル生成を増加させる核酸増幅技術を用いる。タンパク質のPCR等価物はないので、すなわち、タンパク質は、核酸がPCRで複製されるとの同じ方法では複製できないので、検出感度を増加させる唯一の方法は、シグナル増幅によるものである。ターゲットタンパク質は、オリゴヌクレオチドに直接または間接に接合している抗体と結合する。結合していない抗体は、洗い流され、残った、結合した抗体は、そのオリゴヌクレオチドが増幅される。タンパク質の検出は、リアルタイム法を含めて、標準的な核酸検出方法を用いて、増幅されたオリゴヌクレオチドの検出によって行われる。

40

【0100】

<II. データ分析>

ある実施形態では、検出分析によって生成した生データ(例えば所定のマーカーの発現レベル)を、臨床医のための予測値のデータに変えるのに、コンピュータベースの分析プログラムが用いられる。臨床医は、任意の好適な手段を用いて予測データにアクセスでき

50

る。それゆえ、ある好適な実施形態では、本発明は、遺伝学や分子生物学の訓練を受けていないと思われる臨床医が、生データを理解する必要がないというさらなる利益を提供する。データは、最も有用な形で、臨床医に直接提示される。そして、臨床医は、対象の治療を最適化するために、情報をすぐに利用することができる。

【0101】

本発明は、分析を行う研究所、情報提供者、医療関係者および対象から、およびそれらへ、情報を受けて処理して送信できる任意の方法を考慮する。例えば、本発明のある実施形態では、サンプル（生検、血清および大便サンプル）は、対象から得られ、世界の任意の場所に（例えば対象の居住する国とは異なる国で、または、最終的にその情報が使われる所に）位置するプロフィールサービス（例えば医療施設、ゲノムプロフィールビジネスなどの臨床研究所）に送られ、生データを生成する。サンプルが、組織または他の生物学的サンプルを含む場合、対象は、医療センターを訪れ、病院側でサンプルを採取してもらい、病院側にプロフィールセンターへ送ってもらうか、または、対象は、自分でサンプルを集め（例えば尿サンプル）、それをプロフィールセンターへ直接送る。サンプルが、あらかじめ決定された生物学的情報を含む場合、その情報は、対象によって、プロフィールセンターへ直接送られる（例えば、その情報を含む情報カードは、コンピュータによってスキャンされ、データは、電子伝達システムを用いて、プロフィールセンターのコンピュータへ送信される）。サンプルは、一旦プロフィールセンターで受け取られると、処理されて、対象にとって望まれる診断または予後の情報についての具体的なプロフィールが生成される（例えば発現データ）。

10

20

【0102】

その後、プロフィールデータは、治療を行う臨床医による解釈に適したフォーマットに調整される。例えば、発現の生データを提供するよりもむしろ、調整されたフォーマットは、特定の治療オプションのアドバイスとともに、対象の診断または危険評価（例えば疾病のない生存や、転移の予後）を表すことができる。データは、任意の適切な方法によって、臨床医に提示される。例えば、ある実施形態では、プロフィールサービスは、臨床医のために印刷可能なレポート（例えば治療のポイント）または、コンピュータのモニターにて臨床医に提示可能なレポートを生成する。

【0103】

ある実施形態では、情報はまず、治療を行う所で、または、地域の施設で、分析される。そして、生データは、さらなる分析のための、および/または、生データを臨床医または患者に有用な情報に変換するための、中央処理施設へ送られる。中央処理施設は、プライバシー（全てのデータは、均一な安全プロトコルで中央施設に格納される）、速さおよびデータ分析の均一性の点で有利である。そして、中央処理施設は、対象の治療に付随するデータの成り行きを制御することができる。例えば、中央処理施設は、電子伝達システムを用いて、データを、臨床医、対象または研究者に提供することができる。

30

【0104】

ある実施形態では、対象は、電子伝達システムを用いて、データに直接アクセスできる。対象は、結果に基づいて、さらなる介入またはカウンセリングを選ぶことができる。ある実施形態では、データは、研究に用いられる。例えば、データは、疾病の特定の状態やステージを示す有用なものとしての、または、治療計画を決定するための予後の手引きとしての、マーカーの盛り込みまたは消去をさらに最適化するのに用いることができる。

40

【0105】

< I I I . 構成およびキット >

ここに記載の診断方法に用いられる構成は、限定されないが、上述の1個以上の結腸直腸癌情報提供的試薬を含むキットを含む。ある実施形態では、キットは、(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)のうちの1つ、(SES1またはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1

50

つ、(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)のうちの1つ、および、(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、からなるグループから選ばれる1個以上、2個以上、5個以上、10個以上、11個以上、12個以上、または13個の結腸直腸癌であるまたはその疑いがある患者からのサンプルにおいて変化した遺伝子発現を検出するための1個以上の結腸直腸癌情報提供的試薬を含む。ある実施形態では、キットは、検出試薬およびバッファに加え、癌遺伝子マーカーに特異的な結腸直腸癌情報提供的試薬を含む。

【0106】

好ましい実施形態では、結腸直腸癌情報提供的試薬は、1個以上の遺伝子の各遺伝子産物に対して特異的にハイブリダイズするプローブ、1個以上の遺伝子の各遺伝子産物を増幅するプライマーの組、1個以上の遺伝子の各遺伝子産物に結合する抗原結合タンパク質、または、1個以上の遺伝子の各遺伝子産物に対してハイブリダイズし、各遺伝子産物のシーケンシングを可能にする、シーケンシングプライマーである。本発明のプローブおよび抗体の構成は、アレイの形で提供することもできる。好ましい実施形態では、キットは、全ての対照、分析を行うための使用説明書、および、分析と結果の表示のための必要なソフトウェアを含めた、検出分析を行うのに必要な構成成分の全てを含む。

【0107】

ある実施形態では、キットは、対象からのサンプルにおいて癌の検出と特徴付けのためにキットに含まれる試薬の使用の指示書を含む。ある実施形態では、指示書は、さらに、*in vitro*の診断製品のラベルをするときに、米国食品医薬品局(FDA)に要求される使用目的の記述を含む。FDAは、*in vitro*の診断製品を医療機器として分類し、それが510(k)の手順で承認されることを要求している。510(k)に必要な情報は、(1)商標または商品名、一般または通常の名前を含む、*in vitro*の診断製品の名前、および、機器の分類名、(2)製品の使用目的、(3)もし当てはまる場合は所有者または510(k)開陳者の官庁登録番号、*in vitro*の診断製品がFDAの法令のセクション513下で位置する分類、もしわかれれば適切なパネル、または、もし所有者または操作者が、機器がこのセクション下で分類されないことを決定する場合は、*in vitro*の診断製品がそのように分類されないことの決定および決定の根拠の陳述、(4)*in vitro*の診断製品を記載するのに十分な、提案されたラベル、および広告、使用目的、および使用方法、なお、もし当てはまる場合は写真や製品図面も供給すべきである、(5)機器が、米国での商業的流通で同等のタイプの他の*in vitro*の診断製品と類似しているか異なっているかを示す陳述、および、その陳述を支持するデータ、(6)実質的な同等物の決定の根拠となる、安全性と効果のデータの510(k)の要約、または、実質的な同等物を見いだすFDAを支持する510(k)の安全性と効果の情報が、書面での申請の30日以内に任意の人間に利用可能であることの陳述、(7)提出者が、自分の可能な限りの知識の範囲内で、上市前届出に提出されたデータと情報とが、正確であり、重要な事実を省いていないと信じることの陳述、(8)FDAが実質的な同等性の決定を行うのに必要な、*in vitro*の診断製品に関する追加情報を含む。追加情報は、米国のFDAのインターネットウェブページで利用可能である。

【0108】

<III. 使用方法>

ここに記載のように、本発明は、対象の結腸直腸癌の予後を決定し、対象の結腸直腸癌を診断し、対象の結腸直腸癌への素因を予測し、対象の結腸直腸癌の再発の可能性を予測し、または、特定の治療法を有する治療に対する疾病を有する対象を選択する、結腸直腸癌情報提供的試薬および方法を提供する。結腸直腸癌は、ステージI, II, IIIまたはIVの結腸直腸癌とすることができる。ある好ましい実施形態では、本発明の実施形態は、結腸直腸癌(例えばステージIIの結腸直腸癌)と診断された患者に予後を提供する構成および方法を提供する。例えば、ある実施形態では、PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1B, SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, CXCL10, ENPP3およびBNIP3のうちの1個以上の、対照サンプル(例えば、癌でない結腸直腸組織またはステージIまたはIVの結腸直腸癌)と比べて変化した発現が、悪い予後に関連する。特に、ある実施形態では、遺伝子の、対照サ

10

20

30

40

50

ンプルの発現の基準レベルと比べて(PIGRまたはPLA2G2A)のうちの1つ、(CXCL13またはGZMK)のうちの1つ、(MMP3またはMMP1)のうちの1つ、(TUBA1B, RAP1B, DYNLL1,またはRPS27L)、および(CXCL10, CXCL9またはGBP4)のうちの1つ、のうちの1個以上の発現の減少したレベル、および/または、対照サンプルの発現の基準レベルと比べて(SESNIまたはAKD1)のうちの1つ、(AZGP1またはXRCC4)のうちの1つ、(KLK6またはRAET1L)のうちの1つ、(EPHA7またはTTC30A)のうちの1つ、(SEMA3AまたはHAS2)のうちの1つ、(DSC3またはCPE)のうちの1つ、(ENPP3またはRPS6KA6)、および(BNIP3またはENPP5)のうちの1つ、のうちの1個以上の発現の増加したレベル、が、悪い予後に関連する(例えば、減少した生存または増加した転移の危険)。ある実施形態では、基準レベルは、ステージIまたはIVの結腸直腸癌と診断された対象からのものである。ある実施形態では、基準レベルは、結腸直腸癌と診断されていない対象からのものである。ある実施形態では、基準レベルと比べて、発現レベルが、悪い予後を示す。ある実施形態では、悪い予後は、生存の減少した機会である。ある実施形態では、悪い予後は、結腸直腸癌の、再発または転移の増加した機会である。ある実施形態では、予後は、5年間再発無しの生存の可能性である。

10

20

30

40

50

【0109】

ある実施形態では、予後情報は、対象の治療計画を決定するのに用いられる。例えば、ある実施形態では、悪い予後を有することがわかった対象には、アジュバント化学療法を行うことができ、良い予後を有することがわかった対象は、外科手術のみで治療することができる。さらなる実施形態では、本発明の分析は、結腸直腸癌の治療薬の臨床試験中に用いられる。上述の遺伝子産物の分析は、治療薬での治療が全体の患者人口よりも多かれ少なかれ効果的であるような特別な患者人口を規定するということが考慮される。したがって、本発明のある実施形態では、対象が、本発明の分析を用いてスクリーニングされ、上述のような遺伝子発現の特定のプロファイルを有する患者が、特定の治療薬または治療計画での治療に選ばれるような方法が提供される。

【0110】

〔実施例〕

以下の実施例は、本発明のある好ましい実施形態と様子とをさらに示して説明するために提供され、本発明の範囲を制限するものとは解釈されない。

【0111】

〔実施例1〕

〔材料および方法〕

〔患者および腫瘍サンプル〕

3個の独立した患者シリーズからの全部で315個のCRCが、テストシリーズおよび2個の検証シリーズ(IおよびII)を含むグローバル遺伝子発現で分析された。

【0112】

テストシリーズは、オスロ大学病院、Aker, ノルウェーで2005年と2008年との間に連続的に集められた同じ数の患者からの、112個の新鮮な冷凍の第1のCRCサンプル(ステージI-IV)から成っていた。生存者に対する中央値のフォローアップタイムは47ヶ月(32~61ヶ月)であった。ノルウェーのガイドラインに沿ってアジュバント化学療法が行われ、術前の放射線治療を受けていた患者はいなかった。シリーズは、44個のステージIIおよび33個のステージIIIの患者を含んでいた。全員が治療的切除を受け、腸の穿孔の報告はなかった。検証シリーズIは、1987年~1989年の期間にオスロ地域の病院から集められた52個のステージIIおよび43個のステージIIIのCRCサンプルから成っていた。アジュバント化学療法は、1997年にノルウェーで75年間ステージIIIの患者の標準的治療として導入されたものであるが、このアジュバント化学療法を受けていた患者はいなかった。中央値のフォローアップタイムは71ヶ月(4~120ヶ月)であった。両方のシリーズに対し、International Union Against Cancer (UICC)/American Joint Committee on Cancer (AJCC)からのガイダンスに沿って腫瘍ステージが決定された。両方のシリーズについてMSI状態があらかじめ報告されている(文献20、21)。2個の社内のサンプルシリーズの詳細な記述を表4にまとめた。

【 0 1 1 3 】

生データは、マイクロアレイデータのためのGene Expression Omnibus (GEO) public repositoryに預けられた (アクセス番号GSE24550, GSE29638およびGSE30378)。本研究に含まれる全てのサンプルのアクセス番号を表5に挙げている。

【 0 1 1 4 】

〔 外部検証シリーズ 〕

検証シリーズIIは、GEO (GSE14333およびGSE17538) からアクセスされる、108個のステージIIのCRCサンプルからの遺伝子発現データから成っていた。臨床サンプルは、米国およびオーストラリアからのもので、GEOエントリーに従ったものであり、化学治療や放射線治療を受けていた患者はいなかった。利用可能な臨床病理学的データを表4にまとめた。プローブ細胞強度 (CEL) ファイルの相関分析によって、我々は、2個のデータセットにおいて、Moffit Cancer Centreからの、重複するサンプルを見出した。重複しないサンプル (n=108) を結合させて、多くのステージIIの腫瘍を有する検証シリーズを得た (文献13、14、18)。本研究に含まれるサンプルを表5に挙げた。

【 0 1 1 5 】

〔 サンプル調製および遺伝子発現分析 〕

各腫瘍から組織を取り出し、液体窒素で迅速に凍らせ、処理まで - 80 で貯蔵した。RNA単離の前に、各サンプルから組織部分を取り出し、ヘマトキシリンおよびエオシンによって染色し、腫瘍細胞の中身を病理学者が評価した。製造者による推奨通りにDNA/RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてRNAを単離した。UV分光法 (NanoDrop ND-100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) およびAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて量と質を測定した。

【 0 1 1 6 】

遺伝子発現測定には、5百万個を越える形態と約1.4百万個のプローブの組とを有するGeneChip(R) Human Exon 1.0 ST Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いた。リボソームRNA削減反応への入力として、全部で1 μ g のRNAが用いられ (Ribominus(TM) Human/Mouse Transcriptome Isolation kit, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、その後、GeneChip(R) Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual (Affymetrix) に従ってcDNA合成、増幅、およびDNAセンスストランドラベリングを行った。マニュアルの推奨通りに、各11個のサンプルを、16ないし18時間ハイブリダイズし、洗浄し、染色し、スキャンした。各サンプルに対し、Affymetrix GeneChip(R) Command Console software (version 1.0) によって、強度の度合いを格納するCELファイルを作成させた。Affymetrix(R) Expression Console software (HuEx-1_0-st-v2.r2 gene-core library file) を用いて、Robust Multichip Analysis (RMA) によって、これらのファイルを、遺伝子レベルで、バックグラウンド補正、変位値標準化および要約によってさらに処理した。HuEx-1_0-st-v2.na31.hg19.transcript.csvの注釈ファイルが、注釈された17,617個の遺伝子を確認した。

【 0 1 1 7 】

GSE14333およびGSE17538のデータセットからのサンプルをAffymetrix HGU133 Plus2.0アレイ上で分析した。ステージIIの患者からのCELファイルをダウンロードし、Affymetrix(R) Expression Console softwareを用いて、RMAによって分析した。ライブラリおよび注釈ファイルとして、それぞれThe HG-U133_Plus_2.cdfおよびHGU133_Plus_2.na31.annot.csvのファイルを用いた。

【 0 1 1 8 】

〔 遺伝子発現サインの発生 〕

多変量生存モデリングの前に、テストシリーズからの遺伝子発現データセットをフィルター処理して、可能性のある予後予測値を有する遺伝子を濃縮した。まず、44個のステージIIのCRCから単変量危険比 (HR) を計算した (Cox回帰分析、同じ癌からの再発や死亡がイベントとして規定される5年再発無しの生存 (RFS))。この分析は、Rコンピュータ環境に対し、加重相関ネットワーク分析 (WGCNA) ソフトウェアパッケージ (

文献 22、23) を用いて行われた。テストシリーズ (R で走る Limma ソフトウェアパッケージにおいて実行される経験的な Bayes の抑制された t - 統計) として同じバイオバンクからの 23 個のステージ I と 12 個のステージ IV の CRC サンプルの分析によって、転移に関連する発現のある遺伝子を確認した (文献 24)。各遺伝子について偽の発見率 (FDR) を計算し、0.50 より小さい、調整された P 値を持つ遺伝子のみがダウンロード分析に含まれた ($n=6,760$ 遺伝子)。ステージ I から IV までの腫瘍の発現調整の方向 (ステージ IV にて上昇調整または下降調整) と、(HR によって示されるように) ステージ II の腫瘍において高いまたは低い発現レベルでの患者の生存との関連との間で、一致を示す遺伝子のみが保持された ($n=3,339$ 遺伝子、図 1)。分析に用いられる R コマンドを表 6 に挙げている。

10

【0119】

Cox 比例危険モデル (文献 25、26) における L_1 ペナルティー (投げ縄) 推定を用いて、フィルター処理されたこの 3,339 個の遺伝子の組に対する発現レベルが、テストシリーズのステージ II の腫瘍 (再発の危険) の多変量生存モデリングのための入力として用いられた。パラメーター λ (λ_1) を調整する関数としての非ゼロ回帰係数を有する遺伝子の数を計算するために、可能性クロス検証法を用いた。クロス検証からの最適な λ_1 値は 0 個の遺伝子に対応した。我々は、ペナルティー (λ_1) の厳しさを減らして、非ゼロ回帰係数を有する遺伝子を組織的に少しずつ増やすことを選んだ。このアプローチによって、初めの 15 個の最適な遺伝子の組が確認された。全てのサンプルは、遺伝子ごとに基づいて、(それぞれ、高いまたは低い発現が再発の高リスクと関連しているかによって、) その発現が 80% を超えるか 20% を下回るときはいつでも、再発の高リスクを示す正の予後スコアを与えられた。1 個ないし 15 個の遺伝子の各可能なサインを用いて、再発の高リスクと関連する遺伝子の数が、全てのサンプルについてまとめられた。我々は、具体的には、サンプルの少なくとも 10% が再発の高リスクなグループにあるサインを選択した。RFS と最も強い関連を持つものを確認するために、各サインに対して P 値 (Wald 統計) が計算された。

20

【0120】

〔遺伝子発現サインの検証〕

テストシリーズにおいて確認された最適な予後サインが、さらに、両方の検証シリーズにおいて検証に付された。サインにおいて各遺伝子の 80% および 20% のレベルを超える遺伝子の数に基づいて、各シリーズ内のステージ II の CRC サンプルが、再発の低リスクグループまたは高リスクグループに分類された。検証シリーズ II の発現データは、Affymetrix HG-U133 Plus2.0 マイクロアレイから得られ、多重プローブの組によりターゲットにされた遺伝子に対し、十分に注釈されたプローブの組からの中央値発現がさらに用いられた (“_x_at” で注釈された低い特異性を持つプローブの組を除く)。

30

【0121】

イベントとして CRC からの再発や死亡が規定されている 5 年 RFS を推定するために、ロジックテストの Kaplan Meier 生存分析が用いられ、患者は、最後に、フォローアップ、他の癌からの死、癌以外の死、または、5 年以内での治療に関連する死であったかが調べられた。検証シリーズ II からの生存データが、疾病の無い生存として示され、その公開物 (文献 13、18) によれば、イベントとして疾病の再発が規定されているので、我々の規定通りである。比例危険回帰モデルにおいて、単変量および多変量の両方の Cox 回帰分析の P 値を計算するために、Wald 統計が用いられた。多変量分析では、全てのパラメーターが、全ての臨床および分子パラメーターに対し、階段状前進モデルに入れられた。0.05 より小さい P 値が統計的に有意と考えられた。Kaplan Meier と Cox 回帰分析において、PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) が用いられた。サンプルと遺伝子発現データとの間の相関係数 (Pearson) を計算するために、Partek Genomics Suite (version 6.5, Partek Incorporated, MI) が用いられた。機能濃縮分析は、注釈、視覚化および統合された発見のためのデータベースによって行われ (DAVID) (文献 27)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) により規定された公知のパスウェイが分析に含まれた

40

50

。0.05より小さい修正Fisher's Exact P値を有する濃縮されたKEGGパスウェイが統計的に有意と考えられた。

【0122】

〔結果〕

〔ステージIIのCRCに対する予後の遺伝子発現のサインの段階的確認〕

テストシリーズからの発現データに基づいて17,617個の遺伝子の初期リストがフィルター処理され、転移関連の発現変化(ステージIV対ステージI)を有する3,339個の遺伝子を、したがって、予後(ステージIIの悪い生存におけるステージIV様の発現)と関連しておりそれゆえ強い予後分類器(〔材料および方法〕を参照されたい)を、濃縮した。したがって、投げ縄ペナルティー多変量Cox比例危険分析によって、1個ないし15個の遺伝子のサイズの予後遺伝子発現サインが(ペナルティーの厳しさを減少させて)確認された。サンプルは、遺伝子発現尺度の80%および20%での閾値に基づいて、各サインに対して低リスクおよび高リスクの再発グループに分けられた。

10

【0123】

悪い生存と関連する実際の遺伝子の数に対するテストシリーズ(P値)での予測処理に基づいて、予後遺伝子発現サインがランク付けされ、13個の遺伝子発現サインが最適であると確認された。遺伝子発現サインの組み合わせのランキングによって、再発の高リスクの患者から再発の低リスクの患者を分離するには、正の予後スコアを有する5個以上の遺伝子が必要であることが明らかになった。悪い予後は、遺伝子PIGR, CXCL13, MMP3, TUBA1BおよびCXCL10の低発現と、SESN1, AZGP1, KLK6, EPHA7, SEMA3A, DSC3, ENPP3およびBNIP3の高発現とに関連した(表1)。可変の選択に対する適合した投げ縄ペナルティアルゴリズムによれば、確認された遺伝子は、生存に高く関連するとともに、分析に用いられた遺伝子と比べて、遺伝子発現に高い変動と低レベルの相関を示した(図3)。

20

【0124】

テストシリーズにおいて、患者の16%が、再発の高リスクを持つものとして確認され、5年のRFS率は、再発の低リスクとして確認された患者における89%と比べて、14%であった(図2A、表2、 $p<0.001$; $HR=18.2$)。

【0125】

〔ステージII CRCサンプルの2個の独立サンプルにおける遺伝子発現のサインの検証〕

30

検証シリーズIにおいて、患者の13%が再発の高リスクを持つものとされた。低リスクグループおよび高リスクグループの間には統計的に有意な差があった(5年のRFSはそれぞれ69%と29%、図2B、表2、 $p=0.02$; $HR=3.6$)。この患者に対し、10年のフォローアップタイムが利用可能であった。リスクグループ間の生存率の差は、10年後にも統計的に有意なままであった($p=0.02$; $HR=3.1$)。

【0126】

13個の遺伝子の予後発現サインに対する外部の独立した検証シリーズとして、検証シリーズIIのステージIIのCRCサンプルが用いられた。これらの患者は、社内のデータセットとは異なる人々から集められ、Affymetrixのマイクロアレイの別バージョンに基づいて分析された。このシリーズの高リスクの患者は、5年のRFSが、低リスクの患者における91%と比べて、55%であった(図2C、表2、 $p=0.001$; $HR=6.5$)。

40

【0127】

〔13個の遺伝子の予後の分類器と臨床パラメーターとの間の相関〕

予後サインが、種々の臨床病理学的特徴から独立して強い予後分類器であるかどうかを評価するために、臨床データを、単変量および多変量の両方のCox回帰分析に含めた(表2)。単変量分析においては、予後サインは、テストシリーズおよび検証シリーズIの両方において予後と関連して最も強く変化した。検証シリーズIIにおいてアジュバント化学療法および/または放射線療法を受けた患者は、治療を受けなかった患者と比べて、より悪い結果を示した($p=0.02$; $HR=3.7$)。多変量分析においては、予後サインは、3個全てのサンプルシリーズにおいて、独立した予後分類器であった(表2、 $p<0.004$; 多変量H

50

R > 5.1)。13個の遺伝子分類器によるリスク階層化と、3個のシリーズにおける種々の臨床および分子パラメーターとの間には関連は無かった（表3）。

【0128】

〔ステージIIの腫瘍に対する特異性〕

ステージIIのCRCに対する13個の遺伝子予後分類器が、悪い予後のステージIIIの患者も確認できるかを調査するために、ステージIIとIIIの両方のサンプルを含めて予後スコアを再計算した。予想通り、テストシリーズにおけるステージIIのサンプルは、再発の低リスクグループおよび高リスクグループに分離され、一方、サインは、ステージIIIのサンプルを分離できなかった（図4A）。検証シリーズIのサンプルは、ノルウェーにおいてアジュバント化学療法がステージIIIの標準的な治療になる前に集められたので、このサンプルシリーズの患者は、治療の恩恵の影響を受けなかった。にもかかわらず、ステージIIのサンプルだけが、低リスクグループおよび高リスクグループに有意に分離された（図4B）。

10

【0129】

表1. 予後の発現のサインおよびその予後に対する単変量相関における13個の遺伝子の確認

【0130】

【表2】

転写物 クラスターID*	遺伝子 シンボル†	遺伝子名†	染色体の 位置†	遺伝子発現レベルおよび 悪い予後に対する相関
2453006	<i>PIGR</i>	高分子免疫グロブリンレセプター	1q31-q41	低い
2732508	<i>CXCL13</i>	ケモカイン(C-X-C motif)リガンド13	4q21	低い
3388830	<i>MMP3</i>	マトリックス金属ペプチダーゼ3 (ストロメリン1、プロゲラチナーゼ)	11q22.3	低い
3453732	<i>TUBA1B</i>	チューブリンα1b	12q13.12	低い
2968652	<i>SESN1</i>	セストリン1	6q21	高い
3063589	<i>AZGP1</i>	α-2-グロブリン1、亜鉛結合	7q22.1	高い
3868768	<i>KLK6</i>	カリクレイン関連ペプチダーゼ6	19q13.3	高い
2965206	<i>EPHA7</i>	EPHレセプターA7	6q16.3	高い
3059464	<i>SEMA3A</i>	semaトメイン、免疫グロブリントメイン (Ig)、ショートヘーシットメイン、分泌、 (セマホリン3A)	7p12.1	高い
3802924	<i>DSC3</i>	デスモコリン3	18q12.1	高い
2773958	<i>CXCL10</i>	ケモカイン(C-X-C motif)リガンド10	4q21	低い
2925871	<i>ENPP3</i>	エクストレオチド ピロホスファターゼ/ホスホエステラーゼ3	6q22	高い
3314040	<i>BNIP3</i>	BCL2/アポトウイルスE1B 19kDa 相互作用タンパク	10q26.3	高い

20

30

*Affymetrix GeneChip® ヒトエクソン1.0 STアレイ転写物クラスターID. †HUGO遺伝子命名委員会による承認(2011年3月8日)

【0131】

表2. テストシリーズからのステージIIのCRCサンプルおよび検証シリーズIおよびIIにおける13個の遺伝子の予後のサインおよび臨床ファクターの単変量および多変量のCox回帰分析(5年のRFS)

40

【0132】

【表 3】

パラメーター		患者数		単変量		多変量
			P値*	HR (95% CI)	P値†	HR (95% CI)
トレーニングシリーズ(n=44)						
予後サイン						
年齢	低リスク(ref)/高リスク	37/7	<0.001	18.2 (4.5-74.1)	<0.001	61.8 (8.7-440.0)
	連続	44	0.16	0.1 (0.9-1.0)		
性別	女性(ref)/男性	30/14	0.74	1.3 (0.3-5.1)		
腫瘍局在性	結腸(ref)/直腸	40/4	-	-		
検査されたリンパ節数	n<12 (ref)/n≥12	5/39	0.99	1.0 (0.1-8.2)		
MSI状態	不安定(ref)/安定	9/35	0.44	2.3 (0.3-18.3)		
アジュバント化学療法/放射線療法	なし(ref)/あり	40/4	-	-		
検証シリーズI(n=52)						
予後サイン						
年齢	低リスク(ref)/高リスク	45/7	0.02	3.6 (1.3-10.1)	0.001	6.4 (2.1-19.6)
	連続	52	0.07	1.0 (1.0-1.1)	0.01	1.1 (1.0-1.1)
性別	女性(ref)/男性	30/22	0.68	1.2 (0.5-3.0)		
腫瘍局在性	結腸(ref)/直腸	32/20	0.75	0.9 (0.3-2.2)		
MSI状態	不安定(ref)/安定/NA	2/49/1	-	-		
検証シリーズII(n=108)						
予後サイン						
年齢	低リスク(ref)/高リスク	91/17	0.001	6.5 (2.2-19.7)	0.004	5.1 (1.7-15.5)
	連続	108	0.20	1.0 (0.9-1.0)		
性別	女性(ref)/男性	48/60	0.65	0.8 (0.3-2.3)		
腫瘍局在性	結腸(ref)/直腸	96/12	0.15	2.6 (0.7-9.4)		
アジュバント化学療法/放射線療法	なし(ref)/あり/NA	72/22/14	0.02	3.7 (1.3-11.1)	0.04	3.3 (1.1-9.9)

*P値は、Waldの統計値から計算した。統計的に有意なP値(<0.05)は太字で示す。P値およびHRは、グループのいずれかにおいて5個より少ないサンプルしかない場合は計算しなかった。†多変量分析では、Pのみ

【0133】

表3. ステージIIのCRCサンプルにおける13個の遺伝子の予後のサインおよび臨床ファクターに対する相関

【0134】

【表 4】

パラメーター	トレーニングシリーズ(n=44)			検証シリーズ I(n=52)			検証シリーズ II(n=108)		
	低リスク グループ	高リスク グループ	P値*	低リスク グループ	高リスク グループ	P値*	低リスク グループ	高リスク グループ	P値*
患者数	37	7		45	7		91	17	
年齢									
平均値	75	73	0.76	67	62	0.31	68	65	0.55
性別									
女性	26	4	0.66	26	4	1.00	41	7	0.80
男性	11	3		19	3		50	10	
腫瘍 局在性									
結腸	34	6	0.51	26	6	0.23	82	14	0.40
直腸	3	1		19	1		9	3	
グレート									
高	3	0	1.00	-	-		-	-	
中	32	7		-	-		-	-	
低	2	0		-	-		-	-	
Tステージ									
T3	35	7	1.00	-	-		-	-	
T4	2	0		-	-		-	-	
検査された リンパ節数									
<12	4	1	1.00						
≥12	33	6							
MSI状態									
MSI	9	0	0.31	2	0	1.00	-	-	
MSS	28	7		42	7		-	-	
NA				1					
アジュバント化学療法 /放射線療法									
なし	33	7	1.00	45	7		60	12	0.54
あり	4	0					17	5	

*年齢に対するP値は、t-testによって計算し、他のすべてのパラメーターについてはFisher's Exact testによって計算した。CI:信頼区間 HR:危険比 MSI:マイクロサテライト不安定 MSS:マイクロサテライト安定 NA:情報利用不可

【0135】

表4. テストシリーズおよび検証シリーズの臨床病理学的情報の要約

【0136】

10

20

30

【表 5】

パラメーター	テストシリーズ*	検証シリーズ†*	検証シリーズ††	
サンプル数	112	95	108	
ステージ				
ステージI	23	-	-	
ステージII	44	52	108	
ステージIII	33	43	-	
ステージIV	12	-	-	
年齢中央値、年齢(範囲)	72 (30-93)	66 (24-87)	70 (30-94)	10
平均フォローアップタイム、月(範囲)				
全ステージ	47 (33-61)‡	71 (4-120)**	42 (0.4-119)**	
5年RFSを有するサンプル				
ステージII	9	19	13	
ステージIII	10	27		
性別				
女性	62	49	48	
男性	50	46	60	
腫瘍局在性				
結腸	92	58	96	
直腸	20	37	12	
グレード				20
高グレード	6	-	-	
中グレード	95	-	-	
低グレード	9	-	-	
NA	2	-	-	
Tステージ				
T1	5	-	-	
T2	19	-	-	
T3	82	-	-	
T4	6	-	-	
Nステージ				
N0	68	-	-	
N1	28	-	-	
N2	16	-	-	30
検査されたリンパ節数††				
<12	5	-	-	
≥12	39	-	-	
アジュバント化学療法/放射線療法				
なし	82	95	99	
あり	30	-	9	
NA	-	-	14	

【0137】

* : 社内のバイオバンクからのサンプル。

† : GEOのデータセットGSE14333およびGSE17538から回収されたサンプル。

‡ : フォローアップタイムは、疾病からの生存者のみを含む。

** : フォローアップタイムは、再発までの時間または死 / 最後のフォローアップまでの時間を含む。

†† : ステージIIのみ。NA、情報利用不可 ; RFS、再発無しの生存。

【0138】

表5. 研究に含まれるすべてのサンプルのGSEデータセットアクセスナンバーおよびGEOサンプル確認

【0139】

[illegible]

40

40

[illegible]

GEOデータセット	GEOサンプルID	サンプルシリーズ
GSE17538	GSM437306	検証シリーズII
GSE17538	GSM437307	検証シリーズII
GSE17538	GSM437313	検証シリーズII
GSE17538	GSM437323	検証シリーズII
GSE17538	GSM437324	検証シリーズII

【 0 1 4 0 】

補足表 3 . 分析におけるソフトウェアパッケージと基本的な R コマンドの概観

【 0 1 4 1 】

【表 7】

10

分析	ソフトウェア パッケージ	インプットデータ	コメント
種々に発現した 遺伝子の確認	Biobase* affy limma	トレーニングシリーズ ステージIおよび IVのCRCから の遺伝子発現 データ	<pre>#ExpressionSet, group=factor (targets\$stage, levels=c("stage I", "stageIV")) #design=model.matrix(~0+group) >fm1<-lmFit(ExpressionSet, design) >contrast.matrix<-makeContrasts(stageIV-stageI, levels=design) >fm2<-contrasts.fit(fm1, contrast.matrix) >fm3<-eBayes(fm2) >ttestLimma<-topTable(fm3, genelist=fm3\$genes, coef="stageIV-stageI", number=X, adjust.method="fdr", p.value=1,lfc=0)</pre>
単変量Cox 回帰法	WGCNA	トレーニングシリーズ ステージIIのCRC からの遺伝子 発現データ	<pre>#time:各サンプルに対して再発または打ち切るまでの時間 event:各サンプルに対して1=再発, 0=打ち切り datExpr:サンプルの 見出しを有し, 第1カラムにプロフセットIDを有する, タブ区切りの 遺伝子発現データ(datExpr.txt)からのマトリックスファイルを生成する >datExpr<- t(as.matrix(read.table("datExpr.txt",header=TRUE,sep="t",ro w.names=1,as.is=TRUE))) >c<-standardScreeningCensoredTime(time, event, datExpr, fastCalculation=F)</pre>
最適なラムダを見 いだすためのL1 ペナルティ(投げ 縄)および交差 検証	ペナルティ を科され た	トレーニングシリーズ ステージIIのCRC からの遺伝子 発現データ	<pre>#time:各サンプルに対して再発または打ち切るまでの時間 event:各サンプルに対して1=再発, 0=打ち切り datExpr:サンプルの 見出しを有し, 第1カラムにプロフセットIDを有する, タブ区切りの 遺伝子発現データ(datExpr.txt)からのマトリックスファイルを生成する >datExpr<- t(as.matrix(read.table("datExpr.txt",header=TRUE,sep="t",ro w.names=1,as.is=TRUE))) >opt<-optL1(time,event,penalized=datExpr,fold=10) >opt >coefficients(opt\$fullfit) #交差検証された可能性値のプロフィールをプロットし, 最適な λ1 が見いだされたことをチェックするためのコメント >prof<- profL1(time,event,penalized=datExpr,fold=opt\$fold,steps=20) >plot(prof\$lambda,prof\$cvl,type="l") #A single lasso fit predicting survival; X, chosen λ1 >pen<-penalized(s,penalized=d,lambda1=X) >show(pen) >coefficients(pen)</pre>

20

30

40

*発現データセットを生成するために, Bioconductor projectからのBiobaseソフトウェアパッケージを用いた。

【 0 1 4 2 】

表 6 . 機能分析および重要な K E G G パスウェイ

【 0 1 4 3 】

【表 8】

KEGGパスウェイのターム	カウント*	何倍に濃縮されたか	P値†	遺伝子リスト‡
hsa04360 Axon ガイダンス	39	1.8	<0.001	PLXNB1, MAPK3, SEMA3F, NGEF, NTN4, PAK4, EPHA7, SRGAP1, RASA1, RAC1, EPHA3, ITGB1, PAK3, PLXNA2, EFNA3, NFAT5, CDK3, SEMA6D, NTNG1, FYN, SEMA6C, SEMA3A, SEMA5A, CHP2, EFNA1, EPHA5, GNAI1, LIMK2, EFNA4, NTN3, CXCL12, PAK2, PTK2, DPYSL3, EFNBI, EPHA8, SEMA4C, SEMA5B, PLXNA3
hsa04310 Wntシグナル 経路	41	1.6	0.003	WNT8B, RBX1, LRP5, MAPK9, WNT8A, RAC1, FZD1, PPP2CB, MAPK10, WNT9B, PPP2R5A, PLCB1, PSEN1, AXIN1, LEF1, CAMK2B, NFAT5, DVL3, PRKACA, WNT2B, DKK1, FOSL1, PRICKLE2, WNT3A, SOX17, MAPK8, CAMK2A, WLS, MAP3K7, DVL1, NKD1, PRICKLE1, CHP2, CER1, WNT16, LRP6, APC, WNT9A, WNT6, PPP2R1A, CTNNB1
hsa05217 基底細胞 癌	19	2.0	0.004	HHIP, WNT8B, DVL1, WNT8A, BMP4, FZD1, PTCH2, SMO, WNT9B, AXIN1, LEF1, DVL3, WNT16, APC, WNT9A, WNT2B, WNT6, WNT3A, CTNNB1
hsa05200 癌の経路	75	1.3	0.006	E2F2, MAPK3, EPAS1, HHIP, RUNX1, RB1, FZD1, WNT9B, FGF9, ITGB1, AXIN1, LEF1, ARNT, CDK6, XIAP, PIK3CA, STAT1, TGFB2, MAPK8, FASLG, LAMA4, WLS, FGF13, ACVR1B, WNT16, COL4A4, APC, ITGA3, PTK2, WNT9A, WNT6, BRAF, RARA, PDGFRA, CDK4, FGF4, STAT5B, RAF1, WNT8B, RBX1, PPARG, TGFB2, BID, LAMC2, MAPK9, WNT8A, VEGFA, BMP4, RAC1, PTCH2, MLH1, MAPK10, LAMB1, DVL3, NKX3-1, WNT2B, DAPK2, PIAS3, WNT3A, LAMC1, LAMB3, DVL1, CDKN2B, FOS, SMO, AKT2, RARB, CASP9, TPM3, PLD1, FGF8, CDH1, PIK3CB, CTNNB1, BIRC5
hsa05210 結腸直腸癌	25	1.7	0.006	PDGFRA, MAPK3, RAF1, TGFB2, MAPK9, RAC1, FZD1, MLH1, MAPK10, AXIN1, LEF1, DVL3, TGFB2, PIK3CA, MAPK8, DVL1, FOS, ACVR1B, AKT2, CASP9, APC, BRAF, PIK3CB, CTNNB1, BIRC5
hsa04510 局所接着	49	1.4	0.009	RBMS1, MAPK3, COMP, DOCK1, PAK4, ITGB1, PDPK1, XIAP, CAV1, PIK3CA, MAPK8, LAMA4, GRLF1, ACTN2, CAV2, COL11A2, ITGA3, COL4A4, PTK2, PAK2, TNR, ITGB6, BRAF, PDGFRA, MYLPP, RAF1, MYLK, VEGFA, MAPK9, LAMC2, RAC1, MYL9, LAMB1, MAPK10, MYL10, PAK3, CAPN2, ACTN1, FYN, ACTG1, ARHGAP5, ITGB5, LAMC1, LAMB3, AKT2, PDGFD, PDGFC, VAV3, PIK3CB, CTNNB1

10

20

30

40

hsa04340	ヘッジホッグ シグナル経路	18	1.9	0.011	BMP8A, IHH, HHIP, WNT3B, WNT3A, BMP4, PTCH2, SMO, WNT9B, WNT16, ZIC2, WNT9A, PRKACA, LRP2, WNT2B, WNT6, WNT3A, DHH	
hsa04660	T細胞レセプ ターシグナル 経路	29	1.6	0.014	CDK4, MAPK3, RAF1, PAK4, MAPK9, LCK, CD247, IFNG, MAP2K7, PAK3, NFAT3, CD8A, CD3D, FYN, PIK3CA, IL4, DLG1, CARD11, MAP3K7, FOS, ZAP70, AKT2, GRAP2, ICOS, CHP2, CTLA4, PAK2, VAV3, PIK3CB	
hsa05212	膵臓癌	21	1.7	0.017	E2F2, MAPK8, CDK4, MAPK3, RAF1, TGFB2, VEGFA, MAPK9, RB1, RAC1, ACVR1B, AKT2, CASP9, MAPK10, PLD1, CDK6, BRAF, PIK3CB, TGFB2, STAT1, PIK3CA	10
hsa04350	TGF- β シグナル経路	24	1.6	0.020	BMP8A, COMP, SMAD7, MAPK3, RBX1, SMURF1, TGFB2, INHBE, BMP2, CDKN2B, GDF7, ACVR2A, BMP4, ACVR1B, IFNG, PPP2CB, FST, CHR1, ACVR2B, AMH, TGFB2, ACVR1, ACVRL1, PPP2R1A	
hsa03320	PPAR シグナル経路	20	1.7	0.021	CD36, PCK2, PCK1, PPARG, EHHADH, APOC3, GK3P, ADIPOQ, FABP2, CYP27A1, SORBS1, PDPK1, ACAA1, UCPI, PLTP, PPARA, ACSL3, LPL, ACADI, HMGCS2	
hsa04142	リソソーム	29	1.4	0.039	GLB1, TBC1D24, AP4S1, CTSD, ATP6V1H, GBAP1, HEXB, SCARB2, GALC, CTS4, MAN2B1, ATP6V0A2, SMPD1, MANBA, GBA, CTSF, SGSH, GUSB, HGSNAT, FUCI1, LAMP2, CLN5, ATP6V0D1, LAPTM4A, ATP6V0A1, ATP6AP1, SORT1, PTPN14, LAMP1, CTSZ	20
hsa00511	他のグリカン 分解	7	2.5	0.044	MAN2B2, GLB1, GBA, MAN2B1, MANBA, GBAP1, HEXB, FUCI1	
hsa00590	アラキドン酸 代謝	16	1.7	0.048	HPGDS, GPX6, PLA2G2E, ALOX15, ALOX12, AKRIC3, PLA2G12A, PLA2G2D, CYP4F3, GGT7, PLA2G3, LTC4S, GPX2, PTGS1, CYP2B6, CYP2C9	

*KEGGパスウェイのタームに含まれる遺伝子の数 †調整されたFisher's ExactP値 *期間に関与する遺伝子

30

【 0 1 4 4 】

〔 実施例 2 〕

この実施例では、TaqMan（商標）分析を用いて遺伝子発現のリアルタイム定量を用いたマイクロアレイの結果の確認、ならびに、オリジナルの13個の遺伝子パネルにおける遺伝子の代わりをすることができる遺伝子発現の確認について述べる。Affymetrixマイクロアレイ (GeneChipR Human Exon 1.0 ST) からの発現データによってColoGuideExが展開され、また、両方のマイクロアレイおよびリアルタイムRT-PCRによって19個のステージIIの結腸直腸癌サンプルにおける同じ遺伝子进行分析することによって、他の遺伝子発現プラットフォームへの転送能力が示された。13個の遺伝子に対して予後スコアが展開され、ここで、19個のサンプルのうちの15個が、オリジナルのマイクロアレイベースのColoGuideExとして、二分された同じグループにグループ分けされた。これは、最終的なRT-PCRベースの分類器となることを意図したものではなく、RT-PCRベースのアプローチそのものの柔軟性や、他の発現プラットフォームへの転送能力の点でColoGuideExの一般的な強さを示す、初めの19個の選択されたサンプルについてセットアップされた未加工モデルを意図したものである。

40

【 0 1 4 5 】

手短かに言えば、13個の遺伝子パネルに対してTaqMan（商標）プライマーおよびプローブが選択され、テストされて、表7において分析確認器が提供される。

【 0 1 4 6 】

表 7

50

【 0 1 4 7 】

【 表 9 】

遺伝子シンボル	TaqMan分析ID
PIGR	Hs00922561_m1
CXCL13	Hs00757930_m1
MMP3	Hs00968308_m1
SESN1	Hs00902787_m1
AZGP1	Hs00426651_m1
KLK6	Hs00160519_m1
EPHA7	Hs00177891_m1
SEMA3A	Hs00173810_m1
DSC3	Hs00170032_m1
CXCL10	Hs01124251_g1
ENPP3	Hs01038393_m1
BNIP3	Hs00969291_m1

10

20

【 0 1 4 8 】

患者サンプルの遺伝子発現レベルを分析するために試薬を用いた。結果を図 5 に示す。このプロットは、悪い予後と関連するレベルで発現される、サンプルに関するColoGuideExの遺伝子の数における、TaqMan定量的 R T - P C R と、マイクロアレイデータのとの間の良い対応を示す。個々の遺伝子に対するプロットを図 6 に示す。現時点では、サンプルのサブセットだけが q P C R で分析された (n = 19 ステージIIサンプル) ので、悪い予後と関連するような遺伝子発現レベルを示すための閾値は最終的なものではない。ここで示した分類においては、マイクロアレイデータに対して、遺伝子ごとに悪い予後を有するサンプルの同じ量を分類するために、q P C R データに対する発現レベル閾値が設定された。例えば、マイクロアレイによるPIGR発現は、悪い予後を有するような、発現の最も低い (19 個中で) 5 個のサンプルを分類した。したがって、q P C R による発現が最も低いこの 5 個のサンプルも、この遺伝子に対して悪い予後に分類された。悪い予後に関連するレベル (ColoGuideExの公開物で用いられた閾値) でColoGuideExにおいて 13 個の遺伝子のうちの 5 個以上を発現するときに悪い予後を有する患者の分類によって、19 人の患者のうちの 15 人 (79%) が、q P C R およびマイクロアレイデータによって同じカテゴリーに分類された。

30

【 0 1 4 9 】

TaqMan分析によって 13 個の遺伝子のそれぞれについて発現レベルを評価し、関連する P 値と共にマイクロアレイと R T - P C R データとの間のPearson相関係数を表 8 に示す。13 個の遺伝子のうちの 12 個に対し、Pearson相関は $r > 0.8$ であり、P 値 < 0.0001 であった。

40

【 0 1 5 0 】

表 8

【 0 1 5 1 】

【表 10】

	遺伝子	Pearson 相関係数(r)	P値
	PIGR	-0.98	1.22E-13
	CXCL13	-0.91	9.38E-08
	MMP3	-0.96	9.49E-11
	SESN1	-0.84	8.15E-06
ColoGuideEx(1	AZGP1	-0.86	2.85E-06
個の患者シリーズ	KLK6	-0.91	5.04E-08
からの19個のス	EPHA7	-0.88	5.81E-07
テージIIサンプル)	SEMA3A	-0.80	4.13E-05
	DSC3	-0.90	3.87E-07
	CXCL10	-0.88	8.86E-07
	ENPP3	-0.91	4.19E-08
	BNIP3	-0.90	1.18E-07

10

20

【0152】

さらなる実験において、パネルに置き換えることができる遺伝子を確認するために、マイクロアレイデータを分析した。表9は、2個の別個の独立した臨床サンプルの組について、結果を示し、対となって相関している遺伝子と、対応するPearson相関係数および関連する有意なレベル(P値)とを挙げている。

【0153】

表9

【0154】

【表 1 1】

ColoGuideEx	バックアップ遺伝子	44個のステージIIのAUS2		52個のステージIIのGIM	
		相関係数(r)	P値	相関係数(r)	P値
PIGR	PLA2G2A	0,522	2,78E-04	0,543	3,26E-05
CXCL13	GZMK	0,750	4,69E-09	0,773	1,97E-11
MMP3	MMP1	0,855	1,46E-13	0,857	5,51E-16
SESN1	AKD1	0,607	1,24E-05	0,557	1,80E-05
AZGP1	XRCC4	0,540	1,55E-04	0,501	1,57E-04
KLK6	RAET1L	0,618	7,91E-06	0,471	4,31E-04
EPHA7	TTC30A	0,420	4,50E-03	0,455	7,06E-04
SEMA3A	HAS2	0,560	7,69E-05	0,700	7,68E-09
DSC3	CPE	0,344	2,21E-02	0,336	1,49E-02
CXCL10	CXCL9	0,913	6,14E-18	0,893	5,57E-19
	GBP4	0,838	1,25E-12	0,830	2,65E-14
ENPP3	RPS6KA6	0,787	2,46E-10	0,610	1,60E-06
BNIP3	ENPP5	0,470	1,29E-03	0,495	1,90E-04
TUBA1B	RAP1B	0,716	4,74E-08	0,620	9,44E-07
	DYNLL1	0,644	2,43E-06	0,593	3,56E-06
	RPS27L	0,646	2,20E-06	0,568	1,12E-05

【 0 1 5 5 】

〔参考文献〕

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010;127:2893-917.
- 2 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst 2004; 96:1420-5.
- 3 NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 1990;264:1444-50.
- 4 Figueredo A, Coombes ME, Mukherjee S. Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. Cochrane Database Syst Rev 2008;CD005390.
- 5 Benson AB, III, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. J Clin Oncol 2004;22:3408-19.
- 6 Gray R, Barnwell J, McConkey C, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. Lancet 2007;370:2020-9.
- 7 Farina-Sarasqueta A, van LG, Moerland E, et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. Ann Oncol 2010;21:2396-402.
- 8 Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the

10

20

30

40

50

PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010;28:466-74.

9 Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 2008;57:941-50.

10 Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-18.

11 Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5313-27.

12 Van SS, Allen WL, Turkington RC, et al. Implementing prognostic and predictive biomarkers in CRC clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:222-32.

13 Jorissen RN, Gibbs P, Christie M, et al. Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:7642-51.

14 Van Laar RK. An online gene expression assay for determining adjuvant therapy eligibility in patients with stage 2 or 3 colon cancer. *Br J Cancer* 2010;103:1852-7.

15 Jiang Y, Casey G, Lavery IC, et al. Development of a clinically feasible molecular assay to predict recurrence of stage II colon cancer. *J Mol Diagn* 2008;10:346-54.

16 Bertucci F, Salas S, Eysteries S, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004;19;23:1377-91.

17 Salazar R, Roepman P, Capella G, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:17-24.

18 Smith JJ, Deane NG, Wu F, et al. Experimentally derived metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in patients with colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138:958-68.

19 Wang Y, Jatkoa T, Zhang Y, et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1564-71.

20 Berg M, Danielsen SA, Ahlquist T, et al. DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset. *PLoS One* 2010;5:e13978.

21 Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, et al. Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2003;21:820-9.

22 Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;9:559.

23 Langfelder P, Horvath S. Package 'WGCNA'.

24 Smyth GK, Ritchie M, Thorne N, et al. limma: Linear Models for Microarray Data User's Guide.

25 Goeman JJ. L1 penalized estimation in the Cox proportional hazards model. *Biometrika* 2010;52:70-84.

26 Goeam J. Package 'penalized'.

27 Huang daW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57.

28 Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006;354:2463-72.

29 Tibshirani R. The lasso method for variable selection in the Cox model. *Stat*

10

20

30

40

50

t Med 1997;16:385-95.

30 Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the LASSO. Journal of the Royal Statistical Society Series B 1996;58:267-88.

31 Agendia Inc. ColoPrint.

32 Genomic Health Inc. Oncotype DX colon cancer assay.

33 O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. J Clin Oncol 2010;28:3937-44.

34 PARSC study (NCT00903565): A Prospective Study for the Assessment of Recurrence Risk in Stage II Colon Cancer Patients Using ColoPrint (PARSC). 10

35 Clark-Langone KM, Wu JY, Sangli C, et al. Biomarker discovery for colon cancer using a 761 gene RT-PCR assay. BMC Genomics 2007;8:279.

36 Webber EM, Lin JS, Evelyn PW. Oncotype DX tumor gene expression profiling in stage II colon cancer. Application: prognostic, risk prediction. PLoS Curr 2010;2.

37 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646-74.

38 Agesen TH, Berg M, Clancy T, et al. CLC and IFNAR1 are differentially expressed and a global immunity score is distinct between early- and late-onset colorectal cancer. Genes Immun 2011. 20

39 Kim JT, Song EY, Chung KS, et al. Up-regulation and clinical significance of serine protease kallikrein 6 in colon cancer. Cancer 2011;117:2608-19.

【 0 1 5 6 】

本願明細書の上述の部分において言及した全ての刊行物および特許を参照することにより、それらの開示内容を本願に援用する。上で説明した本願の方法およびシステムについては、本発明の範囲および要旨を逸脱しない範囲で多様な変更および変形が加えられることは、当事者にとって明らかであろう。本願発明を特定の好適な実施形態に関連させて説明してきたが、特許請求の範囲に記載する発明がこれら特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことは理解されるであろう。実際、発明を実現するために本願に記載の様態を多様に変更して得られる、当業者にとって明らかな様態についても、添付の特許請求の範囲に含めるよう意図する。 30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 5 7 】

【 図 1 】テストシリーズにおける予後の遺伝子発現の分類器の確認に導く遺伝子選択基準を示す図である。

【 図 2 】ステージIIのCRCの患者の間で再発の無い生存（RFS）を表すKaplan Meier生存曲線を示す図である。

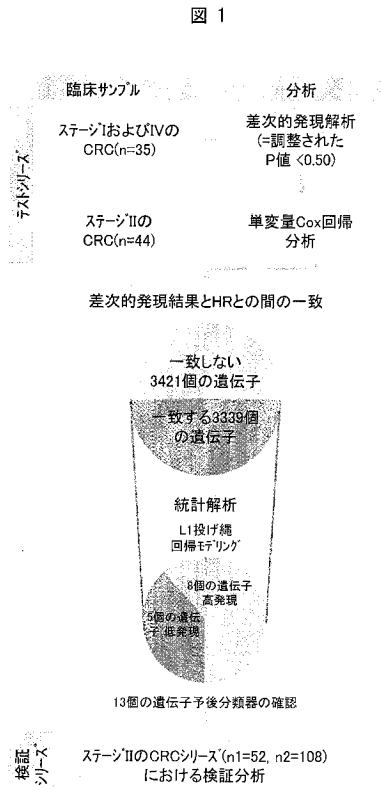
【 図 3 】13個の遺伝子の予後の分類器が、投げ縄ペナルティー法によりテストシリーズの44のステージIIのCRCから確認された、生存（A）、高い変動（B）および互いに対する低い相関（C）、に対する明らかな相関を有する遺伝子の確認に有利であることを示す図である。 40

【 図 4 】ステージIIおよびIIIのCRCのサンプルと、13個の遺伝子発現分類器の使用により計算された生存の可能性を示す図である。

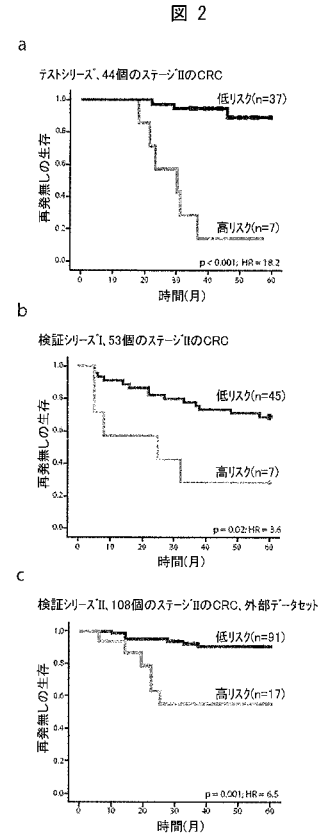
【 図 5 】13個の遺伝子のパネルに対するTaqMan（商標）アッセイ結果を用いたマイクロアレイデータの相関を示すプロットを示す図である。

【 図 6 】定量的RT-PCR（TaqMan（商標））アッセイ結果を用いたマイクロアレイデータの相関を示す個々の遺伝子に対するプロットを示す図である。

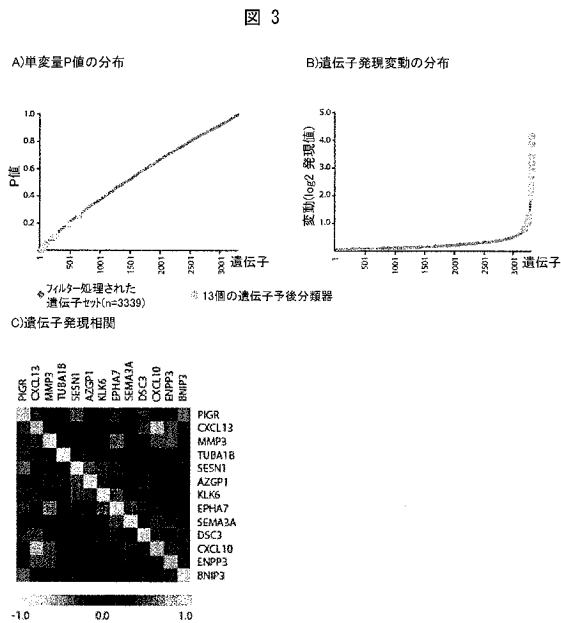
【 図 1 】



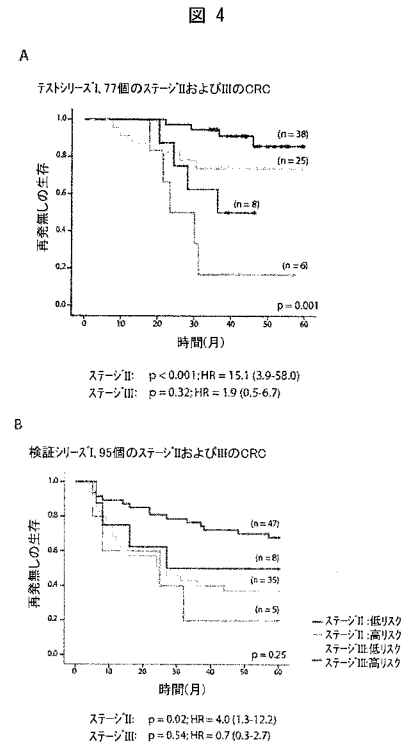
【 図 2 】



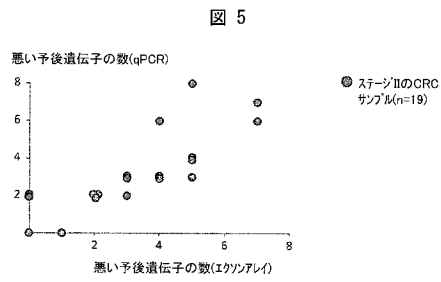
【 図 3 】



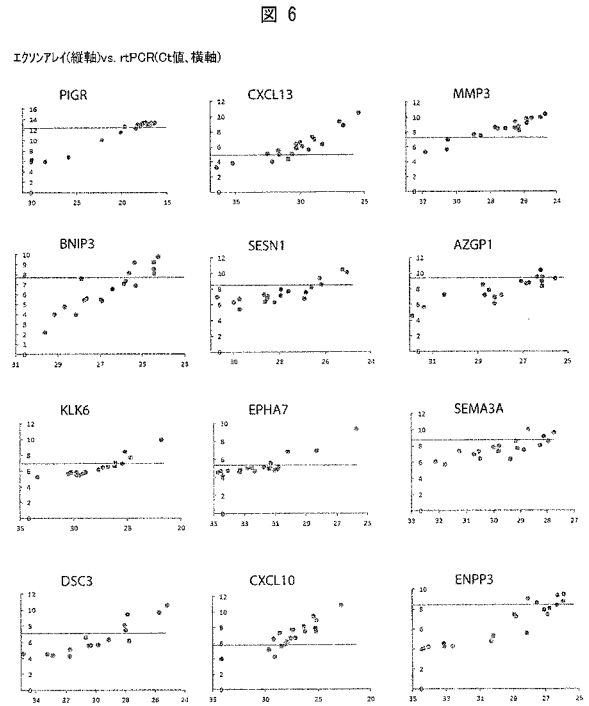
【 図 4 】



【図5】



【図6】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2012/002844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KASAMATSU A ET AL: "Identification of candidate genes associated with salivary adenoid cystic carcinomas using combined comparative genomic hybridization and oligonucleotide microarray analyses", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 37, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 1869-1880, XP027742022, ISSN: 1357-2725 [retrieved on 2005-09-01] page 1871, right col.	25-33
Y	----- -/--	34-36, 38,39
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 April 2013		19/04/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Leber, Thomas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/002844

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUROKAWA K ET AL: "Brief naturalistic stress induces an alternative splice variant of SMG-1 lacking exon 63 in peripheral leukocytes", 29 October 2010 (2010-10-29), NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, PAGE(S) 128 - 132, XP027299415, ISSN: 0304-3940 [retrieved on 2010-08-17]	25-33
Y	abstract	34-36, 38,39
A	----- GREENBAUM D ET AL: "COMPARING PROTEIN ABUNDANCE AND MRNA EXPRESSION LEVELS ON A GENOMIC SCALE", GENOME BIOLOGY (ONLINE), BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 40, no. 9, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 117.01-117.08, XP008036618, ISSN: 1465-6914 page 117.4, left and right col.	1-39
A	----- GREENBAUM DOV ET AL: "Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'Oming in on function", GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol. 11, no. 9, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 1463-1468, XP009088703, ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/GR.207401 page 1467, right col.	1-39
A	----- OERNTOT T F ET AL: "GENOME-WIDE STUDY OF GENE COPY NUMBERS, TRANSCRIPTS, AND PROTEIN LEVELS IN PAIRS OF NON-INVASIVE AND INVASIVE HUMAN TRANSITIONAL CELL CARCINOMAS", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 1, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 37-45, XP008015037, ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/MCP.M100019-MCP200 page 44, right col.	1-39
X	----- US 2011/097423 A1 (BEAUCHAMP R DANIEL [US] ET AL) 28 April 2011 (2011-04-28)	37
Y	Fig. 2A, 4A, 4B; par. 200; claims 1, 2, 6, 7	38,39
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/002844

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2007/082099 A2 (GENOMIC HEALTH INC [US]; NASBP FOUNDATION INC [US]; COWENS WAYNE [US];) 19 July 2007 (2007-07-19)	1-24
Y	claims 35, 36; Table 1A	34-36, 38,39
X,P	----- AGESEN TRUDE H ET AL: "ColoGuideEx: a robust gene classifier specific for stage II colorectal cancer prognosis", GUT, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, UK, vol. 61, no. 11, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 1560-1567, XP009168202, ISSN: 0017-5749 the whole document -----	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/002844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011097423 A1	28-04-2011	NONE	
WO 2007082099 A2	19-07-2007	AU 2007204826 A1	19-07-2007
		BR P10706511 A2	29-03-2011
		CA 2636984 A1	19-07-2007
		EP 1974058 A2	01-10-2008
		EP 2377950 A1	19-10-2011
		EP 2400036 A1	28-12-2011
		EP 2407553 A1	18-01-2012
		EP 2412820 A1	01-02-2012
		EP 2412821 A1	01-02-2012
		EP 2412822 A1	01-02-2012
		EP 2412823 A1	01-02-2012
		EP 2412824 A1	01-02-2012
		JP 2009523028 A	18-06-2009
		KR 20090003178 A	09-01-2009
		NZ 569788 A	26-08-2011
		NZ 593224 A	26-10-2012
		NZ 593225 A	26-10-2012
		NZ 593226 A	26-10-2012
		NZ 593227 A	26-10-2012
		NZ 593228 A	26-10-2012
		NZ 593229 A	26-10-2012
		US 2009291434 A1	26-11-2009
		US 2010190173 A1	29-07-2010
		US 2011039269 A1	17-02-2011
		US 2011039270 A1	17-02-2011
		US 2011039271 A1	17-02-2011
		US 2011039272 A1	17-02-2011
		US 2011097759 A1	28-04-2011
		US 2011111421 A1	12-05-2011
		US 2012171688 A1	05-07-2012
		WO 2007082099 A2	19-07-2007

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ローテ, ラグンヒルド, アー.

ノルウェイ, エン - 0 2 6 7 オスロ, エルリング シャルグソンズ ガテ 2 3 エー

(72) 発明者 アグセン, トゥルーデ, ホルメイデ

ノルウェイ, エン - 0 4 9 1 オスロ, シェルサスヴァイセン 9 5 デー

(72) 発明者 スヴェーン, アニータ

ノルウェイ, エン - 0 5 7 1 オスロ, ハスルヴァイエン 2 6

(72) 発明者 リンド, ゲーロ, エリサベット

ノルウェイ, エン - 0 7 7 0 オスロ, ピロトヴァイエン 1 0

(72) 発明者 ネスバッケン, アリルド

ノルウェイ, エン - 3 4 4 0 リュケン, プレストガルドショルデット 2 8

(72) 発明者 スコティム, ロルフ, インゲ

ノルウェイ, エン - 0 3 7 2 オスロ, ガウスタッドヴァイエン 8 デー

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA09 HA12

4B063 QA19 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

4C084 AA17 NA05 ZA661 ZB261

专利名称(译)	用于分析结肠直肠癌的方法和生物标志物		
公开(公告)号	JP2014533100A	公开(公告)日	2014-12-11
申请号	JP2014539425	申请日	2012-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	奥斯陆海胆威赛扫描速率哲锡斯坦柯希丁克她 F 奥斯陆大学医院HF		
申请(专利权)人(译)	奥斯陆海胆威赛扫描速率哲锡斯坦柯希丁克Haefu		
[标]发明人	ローテラグンヒルドアー アグセントウルデーホルメイデ スヴェーンアニータ リンドグーロエリサベット ネスバッケンアリルド スコティムロルフインゲ		
发明人	ローテ,ラグンヒルド,アー. アグセン,トゥルーデ,ホルメイデ スヴェーン,アニータ リンド,グーロ,エリサベット ネスバッケン,アリルド スコティム,ロルフ,インゲ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574 A61K45/00 A61P1/00 A61P35/00		
CPC分类号	A61P1/00 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/158 C12Q1/6813 C12Q2563/159		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/574.A A61K45/00 A61P1/00 A61P35/00		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZA661 4C084/ZB261		
优先权	61/555762 2011-11-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测生物样品（例如组织样品，活检样品，粪便样品，血液样品，血浆样品，血清样品）中的结肠直肠癌的方法和生物标志物（例如，基因表达生物标志物）。在一些实施方案中，本发明的方法和生物标志物可用于检测结肠癌并为结肠直肠癌患者提供预后。

カラムA	カラムB
PIGR	PLA2G2A
CXCL13	GZMK
MMP3	MMP1
SESNI	AKD1
AZGP1	XRCC4
KLK6	RAET1L
EPHA7	TTC30A
SEMA3A	HAS2
DSC3	CPE
CXCL10	CXCL9
	GBP4
ENPP3	RPS6KA6
BNIP3	ENPP5
TUBA1B	RAP1B
	DYNLL1
	RPS27L