

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-503488

(P2017-503488A)

(43) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574 D	4C084
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	4C085
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4C086
A61K 45/00 (2006.01)	GO1N 37/00 101	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 188 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-541175 (P2016-541175)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月18日 (2014.12.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月10日 (2016.8.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/071169
 (87) 国際公開番号 W02015/095527
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)
 (31) 優先権主張番号 61/918, 816
 (32) 優先日 平成25年12月20日 (2013.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/937, 883
 (32) 優先日 平成26年2月10日 (2014.2.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592017633
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
 ストン フルーツ ストリート 55
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中循環腫瘍細胞に関する方法およびアッセイ

(57) 【要約】

本明細書に記載される技術は、例えば、ある特定のCTCマーカー遺伝子の発現の変化を検出することによって、血中循環腫瘍細胞 (CTC) を検出する方法に関する。また、CTCマーカー遺伝子の異常発現、例えば、CTCを指し示す発現の変化を、癌を治療する目的で標的とすることもできる。

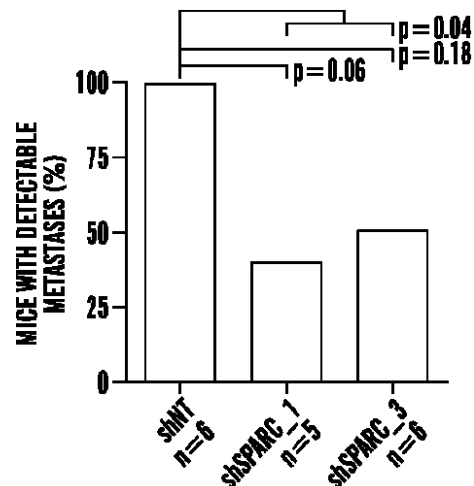
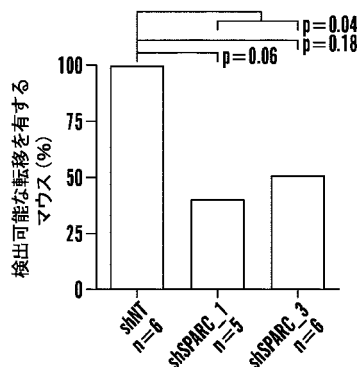


FIG. 14D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の血中循環腫瘍細胞（CTC）を検出する方法であって、
試料中のPC-CTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；および
該マーカー遺伝子発現産物の検出レベルが参照基準レベルを上回る場合にPC-CTCが存在
すると判定する段階
を含む、方法。

【請求項 2】

CTCが膀胱癌CTCである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法
。

【請求項 4】

発現産物が核酸である、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、請求項
4記載の方法：

RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンプロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世
代シーケンシング；およびRNAインサイチュウハイブリダイゼーション。

【請求項 6】

発現産物がポリペプチドである、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、請求項
6記載の方法：

ウエスタンプロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射線免
疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュウハイブリダイゼーショ
ン（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；
FACS；および免疫電気泳動アッセイ。

【請求項 8】

CTCマーカー遺伝子が表7；表8；または表14から選択される、請求項1～7のいずれか一
項記載の方法。

【請求項 9】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項1～8のいずれか一項記載
の方法：

ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L
1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN
；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP
1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSPO1；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPA
RC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；T
PT1；TWSG1およびWNT4。

【請求項 10】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項1～8のいずれか一項記載
の方法：

ALDH1A1；ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；SPARC；WNT；TGFB2；VEGF；COL1A2；COL3A1；
およびTIMP2。

【請求項 11】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項1～9のいずれか一項記載
の方法：

ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；およびSPARC。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；およびDCN。

【請求項13】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法：

TPT1；HMGB1；SPON 2；SPARC；およびARSA。

【請求項14】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法：

IL6ST；ARSA；TIMP2；CD55；SULF2；ITGA6；SDC4；CDON；およびSV2A。

【請求項15】

対象における癌を治療する方法であって、CTCマーカー遺伝子標的療法の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項16】

癌が膀胱癌である、請求項15記載の方法。

【請求項17】

CTCマーカー遺伝子標的療法がCTCマーカー遺伝子の阻害薬を含む、請求項15～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

阻害薬が抗体反応物である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

阻害薬が阻害性核酸反応物である、請求項17記載の方法。

【請求項20】

CTCマーカー遺伝子標的療法がCTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物および化学療法薬を含む、請求項15～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

前記対象が、血液中および/または癌の間質中に存在するCTCのレベルが高い、かつ/またはCTCマーカー遺伝子のレベルが高いと判定された対象である、請求項15～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

CTCマーカー遺伝子標的療法が、以下からなる群より選択されるマーカー遺伝子と結合するCTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物を含む、請求項15～21のいずれか一項記載の方法：

IL6ST、SULF2およびSV2A。

【請求項23】

対象がCTCマーカー遺伝子標的療法による治療に反応する可能性が高いか否かを判定する方法であって、

血液中および/または癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびに

該発現産物のレベルが参照基準レベルに比して高い場合に、対象が治療に反応する可能性が高いと判定する段階

を含む、方法。

【請求項24】

試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む、請求項23記載の方法。

【請求項25】

癌が膀胱癌である、請求項23～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

発現産物が核酸である、請求項23～25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

10

20

30

40

50

発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、請求項26記載の方法：

RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンブロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーション。

【請求項28】

発現産物がポリペプチドである、請求項23～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、請求項28記載の方法：

ウエスタンブロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射線免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。

【請求項30】

PC-CTCマーカー遺伝子が表7；表8；または表14から選択される、請求項23～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項23～30のいずれか一項記載の方法：

ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSP01；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPARC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；TPT1；TWSG1およびWNT4。

【請求項32】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項23～31のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A1；ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；SPARC；WNT；TGFB2；VEGF；COL1A2；COL3A1；およびTIMP2。

【請求項33】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項23～31のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；およびSPARC。

【請求項34】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項23～31のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；およびDCN。

【請求項35】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項23～31のいずれか一項記載の方法：

TPT1；HMGB1；SPON2；SPARC；およびARSA。

【請求項36】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項23～31のいずれか一項記載の方法：

IL6ST；ARSA；TIMP2；CD55；SULF2；ITGA6；SDC4；CDON；およびSV2A。

【請求項37】

対象の治療をモニターするための方法であって、

癌治療法をそれを必要とする対象に投与する段階；

血液中および／または癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測

10

20

30

40

50

定する段階；ならびに

CTCマーカー遺伝子発現産物のレベルが参照基準レベルに比して低い場合に対象が反応していると判定し、CTCマーカー遺伝子発現産物が参照基準レベルに比して低くない場合に対象が治療に反応していないと判定する段階を含む、方法。

【請求項38】

癌が膀胱癌である、請求項37記載の方法。

【請求項39】

参照基準レベルが、投与する段階の前の患者における遺伝子発現産物のレベルである、請求項37～38のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項40】

試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

発現産物が核酸である、請求項37～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、請求項41記載の方法：

RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンプロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーション。

20

【請求項43】

発現産物がポリペプチドである、請求項37～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、請求項43記載の方法：

ウエスタンプロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射線免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。

30

【請求項45】

PC-CTCマーカー遺伝子が表7；表8；または表14から選択される、請求項37～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項37～45のいずれか一項記載の方法：

ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSPO1；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPARC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；TPT1；TWSG1およびWNT4。

40

【請求項47】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項37～46のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A1；ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；SPARC；WNT；TGFB2；VEGF；COL1A2；COL3A1；およびTIMP2。

【請求項48】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項37～46のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；およびSPARC。

50

【請求項 49】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項37～46のいずれか一項記載の方法：

ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；およびDCN。

【請求項 50】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項37～46のいずれか一項記載の方法：

TPT1；HMGB1；SPON 2；SPARC；およびARSA。

【請求項 51】

CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、請求項37～46のいずれか一項記載の方法：

IL6ST；ARSA；TIMP2；CD55；SULF2；ITGA6；SDC4；CDON；およびSV2A。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)(35 U.S.C. § 119(e))の下で、2013年12月20日に提出された米国仮出願第61/918,816号、および2014年2月10日に提出された第61/937,883号の優先権を主張し、それらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府の援助

本発明は、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)によって授与された助成金番号2R01CA129933の下で、米国政府の援助を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本明細書に記載される技術は、癌の診断および治療に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

血中循環腫瘍細胞(CTC)は、原発性腫瘍から剥離して血流中に入り、遠隔臓器への癌の伝播(転移)を媒介する。このため、血流中に血中循環腫瘍細胞(CTC)が存在すると、最終的には遠隔臓器への癌の伝播につながる。しかし、CTCは稀であり、血液1ミリリットル中の正常血液細胞100億個当たり、腫瘍細胞は1～10個と推定される。そのため、それらの単離および分子的分析は大きな技術的課題となっている(Pantel et al., Nat Rev Cancer 2008 8:329-340(非特許文献1)；Yu et al., J Cell Biol 2011 192:373-382(非特許文献2))。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Pantel et al., Nat Rev Cancer 2008 8:329-340

【非特許文献2】Yu et al., J Cell Biol 2011 192:373-382

【発明の概要】

【0006】

概要

本明細書に述べるように、本発明者らは、その発現がCTCに特徴的であるいくつかの遺伝子を同定した。特に、これらの遺伝子の発現は、原発性腫瘍細胞からCTCを分化させる。したがって、本明細書において提供されるのは、診断的および予後予測的な方法およびアッセイを含む、CTCの検出に関する方法およびアッセイである。さらに、本明細書にお

10

20

30

40

50

いて提供されるのは、例えば、転移を阻害することを目的とする、CTCのこれらのマーカーを標的とする癌の治療である。

【0007】

1つの局面において、本明細書に記載されるのは、試料中の血中循環腫瘍細胞（CTC）を検出する方法であって、試料中のPC-CTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；および、マーカー遺伝子発現産物の検出レベルが参照基準レベルを上回る場合にPC-CTCが存在すると判定する段階、を含む方法である。いくつかの態様において、CTCは膵癌CTCである。いくつかの態様において、本方法は、試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む。いくつかの態様において、発現産物は核酸である。いくつかの態様において、発現産物のレベルは、RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンブロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーションからなる群より選択される方法を用いて決定される。いくつかの態様において、発現産物はポリペプチドである。いくつかの態様において、発現産物のレベルは、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される：ウエスタンブロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射性免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は表7または表8から選択される。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSP01；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPARC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；TPT1；TWSG1およびWNT4。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ALDH1A1；ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；SPARC；WNT；TGFB2；VEGF；COL1A2；COL3A1；およびTIMP2。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；およびSPARC。

10

20

【0008】

1つの局面において、本明細書に記載されるのは、対象における癌を治療する方法であって、CTCマーカー遺伝子標的療法の治療的有効量を対象に投与する段階を含む方法である。いくつかの態様において、癌は膵癌である。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法は、CTCマーカー遺伝子の阻害薬を含む。いくつかの態様において、阻害薬は抗体反応物である。いくつかの態様において、阻害薬は阻害性核酸反応物である。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法は、CTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物および化学療法薬を含む。いくつかの態様において、対象は、血液中および/または癌の間質中に存在するCTCのレベルが高い、かつ/またはCTCマーカー遺伝子のレベルが高いと判定された対象である。

30

【0009】

1つの局面において、本明細書に記載されるのは、対象がCTCマーカー遺伝子標的療法による治療に反応する可能性が高いか否かを判定する方法であって、血液中および/または癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびに発現産物のレベルが参照基準レベルに比して高い場合に対象が治療に反応する可能性が高いと判定する段階、を含む方法である。いくつかの態様において、本方法は、試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む。いくつかの態様において、癌は膵癌である。いくつかの態様において、発現産物は核酸である。いくつかの態様において、発現産物のレベルは、RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンブロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーションからなる群より選択される方法を用いて決定される。いくつかの態様において、発現産物はポリペプチドである。いくつかの態様において、発現産物のレベルは、以下からなる群より選択され

40

50

る方法を用いて決定される：ウエスタンブロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射性免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。いくつかの態様において、PC-CTCマーカー遺伝子は表7または表8から選択される。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSPO1；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPARC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；TPT1；TWSG1およびWNT4。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ALDH1A1；ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；SPARC；WNT；TGFB2；VEGF；COL1A2；COL3A1；およびTIMP2。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；およびSPARC。

10

20

30

40

50

【0010】

1つの局面において、本明細書に記載されるのは、対象の治療をモニターするための方法であって、癌治療法をそれを必要とする対象に投与する段階；血液中および／または癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびにCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルが参照基準レベルに比して低い場合に対象が反応していると判定し、CTCマーカー遺伝子発現産物が参照基準レベルに比して低くない場合に対象が治療に反応していないと判定する段階、を含む方法である。いくつかの態様において、癌は膀胱癌である。いくつかの態様において、参照基準レベルは、投与の段階の前の患者における遺伝子発現産物のレベルである。いくつかの態様において、本方法は、試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む。いくつかの態様において、発現産物は核酸である。いくつかの態様において、発現産物のレベルは、RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンブロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーションからなる群より選択される方法を用いて決定される。いくつかの態様において、発現産物はポリペプチドである。いくつかの態様において、発現産物のレベルは、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される：ウエスタンブロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射性免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。いくつかの態様において、PC-CTCマーカー遺伝子は表7または表8から選択される。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSPO1；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPARC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；TPT1；TWSG1およびWNT4。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ALDH1A1；ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；SPARC；WNT；TGFB2；VEGF；COL1A2；COL3A1；およびTIMP2。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子は、以下からなる群より選択される：ALDH1A2；IGFBP5；KLF4；DCN；およびSPARC。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1A～1Cは、CTCの単離および特性決定を明示している。図1Aは、CTC-iChip陰性IFDシステムの概略図を描写している。図1Bは、正常マウスモデルと癌マウスモデルとの間でのマウスWBC枯渇の均一性に関するグラフを描写している。WBC枯渇はlog10で示されている。図1Cは、正常マウスおよびKPCマウスでの免疫蛍光染色（CK+ / CD45- / DAPI+）に

よるCTC計数のグラフを描写している。

【図2】図2は、単一細胞試料の主成分分析の概略図を描写している。

【図3】図3A~3Bは、上皮細胞、間葉細胞および幹細胞の遺伝子が、CTC-c細胞と腫瘍との間で変動して発現されることを明示している。描写されているのは、CTC-c細胞と腫瘍との比較で、A) ダウンレギュレートされる遺伝子(図3A)およびアップレギュレートされる遺伝子(図3B)のボックスプロットである。バー=中央値、ボックスプロット=四分位数、尺度はlog10(rpm)。

【図4】図4A~4Cは、CTC-iChip特性決定を明示している。図4Aは、WBC当たりの抗CD45ビーズの数(x軸)の関数としての、偏向したWBCのパーセント(y軸)のグラフを描写している。図4Bは、正常マウス血液中にスパイク投与したマウスPDAC細胞株NB508の回収のグラフを描写している(4回の独立した実験を示している)。図4Cは、NB508細胞株を用いた同系同所性PDAC腫瘍からの捕捉CTC/血液mLのグラフを描写している。

【図5】図5Aは、KPCマウスの遺伝子型および特徴の表を描写している。図5Bは、単細胞シーケンシングの品質計量値のグラフを、細胞株(NB508、MEF)、CTC、WBC、および条件を合わせた原発性腫瘍からのバルクRNA希釈物に関する、アラインメントを行ったリードのパーセンテージおよびユニークアラインメントの総数とともに描写している。図5Cは、各クラスターに関する(右)、ならびに単細胞原発性腫瘍(TuGMP3)、癌細胞株(NB508)、および全CTC(クラスター1、3、4、5、9)の間でのクラスター内相関係数の平均値を用いた、単細胞不均一性のグラフを描写している。丸印=平均値、範囲=95% CI。

【図6】図6は、CTC-cにおいてエンリッチされているECMタンパク質遺伝子のボックスプロットグラフを、バルク原発性腫瘍および単細胞原発性腫瘍と比較して描写している。バー=中央値、ボックスプロット-四分位数、尺度はlog10(rpm)。

【図7】図7は、3人の患者由来のヒト膵臓CTCのヒートマップ発現プロファイルを描写している。CTCを定義するために用いた上皮遺伝子、およびエンリッチされている細胞外タンパク質を示している。発現はlog10尺度で示されている。

【図8】図8は、ヒト膵癌細胞株におけるSPARC発現の定量的RT-PCRのグラフを描写している。

【図9】図9は、浸潤アッセイを描写している。SPARCに対するshRNA(ShF1およびShF3)による、PDAC2およびPDAC3細胞株のMatrigelを経由しての浸潤の減少が観察された。shNT=非標的shRNA

【図10】図10は、非標的shRNA(NT)およびSPARC shRNA(SHF1)におけるインビボルシフェラーゼ画像化による、検出可能な転移を有するマウスの数のグラフを描写している。

【図11】図11は、CTCの不均一性を判定する過程の概略図を描写している。

【図12】図12A~12Cは、CTCでエンリッチされている遺伝子が、原発性腫瘍の上皮性構成要素および間質性構成要素に見いだされることを明示している。描写されているのは、(図12A) Aldh1a2幹細胞ならびにCTCで高度にエンリッチされている遺伝子である(図12B) Klf4遺伝子および(図12C) Igfbp5遺伝子の発現ボックスプロットである。バー=中央値、ボックスプロット=四分位数、尺度はlog10(rpm)。

【図13】図13は、種々の上皮癌にわたるヒトおよびマウスCTCが、ECMタンパク質遺伝子を高レベルで発現することを明示している。描写されているのは、ヒトpdac、乳癌(br)および前立腺癌(pr)ctcにおける高発現ecm遺伝子の発現ボックスプロットである。バー、中央値; ボックスプロット、四分位数; 尺度はlog10(rpm)。holm調整p値<0.05(*), 0.01(**), 0.001(***)。

【図14】図14A~14Eは、ヒトPDACにおけるSPARC発現が、浸潤および転移を強化することを明示している。図14Aは、MTTによって判定したPDAC3細胞株の増殖のグラフを描写している。図14Bは、43の視野当たりで算定した、PDAC3 shNTにおける腫瘍スフェアをshSPARCと比較したグラフを描写している(エラーバーはSDを表す)。図14Cは、203の視野当たりの核の数によって定量した、shSPARC細胞株およびshNT細胞株の浸潤のグラフを描写している。p値<0.01(**), 0.001(***)、0.0001(****)。エラーバーはSDを表す。図14Dは、PDAC3細胞株の尾静脈接種から3週後のインビボルシフェラーゼ画像化による、検出

10

20

30

40

50

可能な肺転移のパーセンテージのグラフを描写している。Fisherの直接確率検定によるp値を示している。図14Eは、PDAC3細胞株由来の同所性膵臓腫瘍を有するマウスにおける、正規化した転移負荷量のグラフを描写している。エラーバーはSDを表す (*p<0.05)。

【図15】図15は、転移カスケードにおける膵臓CTCの役割に関する概要モデルを描写している。示されているのは膵臓CTCの異質なサブセットであり、上皮性遺伝子(ケラチン)および間質性遺伝子(Sparc)の共発現を高度に有する最も顕著な古典的CTC群に注目している。

【図16】図16Aは、qRT-PCRによるPDAC2 shRNA細胞株のグラフを描写している。平均値がRQの最大値および最小値(エラーバー)とともに示されている。図16Bは、同様にPDAC2細胞株におけるMTTアッセイによる増殖速度のグラフを、shNT安定株とshSPARC安定株との間で描写している。図16Cは、2週時点での腫瘍スフェア浸潤アッセイ(エラーバー=STD)形成のグラフを、同様にshNT細胞株とshSPARC細胞株との間で描写している。定量は4倍拡大視野当たりに行った(エラーバー=SD)。48時間時点で浸潤アッセイによって判定した(図16D)、shSPARC_1 & 3によって減少した遊走挙動。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

本明細書に述べるように、本発明者らは、血中循環腫瘍細胞(CTC)が、ある特定の遺伝子、すなわちCTCマーカー遺伝子の発現によって特徴づけられることを発見した。これらのCTCマーカー遺伝子の発見により、CTCレベル、例えば、対象由来の試料におけるCTCレベルの検出および/または測定のための方法およびアッセイが可能になる。これらの方法およびアッセイは、CTCレベルの測定における速さおよび精度の向上をもたらすことができる。その上、これらのマーカー遺伝子の発現によってCTCが他の細胞、例えば、他の血中循環細胞および/または正常腫瘍細胞と識別されることから、CTCのレベルおよび/または転移能を低下させるためにこれらのマーカー遺伝子発現産物と結合させること、および/またはそれらの産物を阻害することによって、治療法をCTCに対して標的化することができる。

【0013】

本明細書で用いる場合、「血中循環腫瘍細胞」または「CTC」とは、腫瘍から剥離して血液中に存在する、すなわち循環している腫瘍細胞のことである。CTCを血液の他の構成要素から同定する、および/または単離するために用いる細胞マーカー(例えば、マーカー遺伝子)は、本明細書において以下に記載されている。いくつかの態様において、CTCは膵癌CTCであってよい。

【0014】

1つの局面において、本明細書に記載されるのは、試料中の血中循環腫瘍細胞(CTC)を検出する方法であって、試料中のCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階; および、マーカー遺伝子発現産物の検出レベルが参照基準レベルを上回る場合にCTCが存在すると判定する段階、を含む方法である。

【0015】

本明細書に述べるように、本発明者らは、いくつかの遺伝子が、例えば血中非循環性腫瘍細胞と比較して、CTCにおいて変動して調節されていることを発見した。したがって、本明細書において提供されるのは、CTCレベルの測定に関する方法およびアッセイが提供される。高CTCレベルは、予後不良、例えば、転移のリスクが高いことを指し示しうる。したがって、本明細書において提供されるのは、癌を有する対象の予後予測、リスク評価および治療に関する方法およびアッセイが提供される。ある態様において、アッセイおよび方法は、対象の生物試料における遺伝子産物(例えば、タンパク質および/またはmRNAなどの遺伝子転写物)の発現レベルの決定および/または測定を対象とする。ある態様において、アッセイおよび方法は、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、すなわち、本明細書に述べるような表7、表8および/もしくは表14から選択される、少なくとも2種の遺伝子、少なくとも3種の遺伝子、少なくとも4種の遺伝子、少なくとも5種の遺伝

10

20

30

40

50

子、少なくとも6種の遺伝子、少なくとも7種の遺伝子、少なくとも8種の遺伝子、少なくとも9種の遺伝子、少なくとも10種の遺伝子...少なくとも15種の遺伝子...少なくとも25種の遺伝子...少なくとも30種の遺伝子、またはそれを上回る遺伝子、または任意の数の遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする。

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、ABI3BP ; ADAMTS5 ; ADAMTSL1 ; ANG ; ARSA ; C1RL ; C3 ; C4A ; C4B ; CCDC80 ; CD109 ; CHI3L1 ; CLEC3B ; CMTM3 ; CMTM7 ; COL14A1 ; COL1A2 ; COL3A1 ; COL4A6 ; CSF1 ; DAG1 ; DCN ; DMKN ; FBLN1 ; FGF1 ; FMOD ; GPC3 ; GPC4 ; HMGB1 ; IFNAR2 ; IGFBP5 ; IL16 ; LAMA4 ; LTBP4 ; MFAP1A ; NID2 ; OGN ; PDAP1 ; PF4 ; PLAT ; PODN ; PRELP ; RSPO1 ; SERPING1 ; SLURP1 ; SOD3 ; SPARC ; SPOCK2 ; SPON2 ; SULF1 ; SULF2 ; TGFB2 ; TGM2 ; THBD ; THBS1 ; THSD4 ; TIMP2 ; TNXB ; TPT1 ; TWSG1およびWNT4からなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載のアッセイ、方法およびシステムは、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、例えば、以下のうち少なくとも2種の遺伝子、または少なくとも3種の遺伝子、または少なくとも4種の遺伝子、または例えばすべての遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする：ABI3BP ; ADAMTS5 ; ADAMTSL1 ; ANG ; ARSA ; C1RL ; C3 ; C4A ; C4B ; CCDC80 ; CD109 ; CHI3L1 ; CLEC3B ; CMTM3 ; CMTM7 ; COL14A1 ; COL1A2 ; COL3A1 ; COL4A6 ; CSF1 ; DAG1 ; DCN ; DMKN ; FBLN1 ; FGF1 ; FMOD ; GPC3 ; GPC4 ; HMGB1 ; IFNAR2 ; IGFBP5 ; IL16 ; LAMA4 ; LTBP4 ; MFAP1A ; NID2 ; OGN ; PDAP1 ; PF4 ; PLAT ; PODN ; PRELP ; RSPO1 ; SERPING1 ; SLURP1 ; SOD3 ; SPARC ; SPOCK2 ; SPON2 ; SULF1 ; SULF2 ; TGFB2 ; TGM2 ; THBD ; THBS1 ; THSD4 ; TIMP2 ; TNXB ; TPT1 ; TWSG1およびWNT4。

【 0 0 1 7 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、ALDH1A1 ; ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; SPARC ; WNT ; TGFB2 ; VEGF ; COL1A2 ; COL3A1 ; およびTIMP2からなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載のアッセイ、方法およびシステムは、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、例えば、以下のうち少なくとも2種の遺伝子、または少なくとも3種の遺伝子、または少なくとも4種の遺伝子、または例えばすべての遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする：ALDH1A1 ; ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; SPARC ; WNT ; TGFB2 ; VEGF ; COL1A2 ; COL3A1 ; およびTIMP2。

【 0 0 1 8 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; およびSPARCからなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載のアッセイ、方法およびシステムは、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、例えば、以下のうち少なくとも2種の遺伝子、または少なくとも3種の遺伝子、または少なくとも4種の遺伝子、または例えばすべての遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする：ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; およびSPARC。

【 0 0 1 9 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; およびDCNからなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載のアッセイ、方法およびシステムは、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、例えば、以下のうち少なくとも2種の遺伝子、または少なくとも3種の遺伝子、または例えばすべての遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする：ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; およびDCN。

【 0 0 2 0 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、TPT1 ; HMGB1 ; SPON 2 ; SPARC ; およびARSAからなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載のアッセイ、方法およびシステムは、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、例えば、以下のうち少なくとも2種の遺伝子、または少なくとも3種の遺伝子、または少なくとも4種の遺伝子、または例えばすべての遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする：TPT1 ; HMGB1 ; SPON 2 ; SPARC ; およびARSA。

【 0 0 2 1 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、IL6ST ; ARSA ; TIMP2 ; CD55 ; SULF2 ; ITG

A6 ; SDC4 ; CDON ; およびSV2Aからなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載のアッセイ、方法およびシステムは、対象の生物試料における少なくとも2種の遺伝子、例えば、以下のうち少なくとも2種の遺伝子、または少なくとも3種の遺伝子、または少なくとも4種の遺伝子、または少なくとも5種の遺伝子、または少なくとも6種の遺伝子、または少なくとも7種の遺伝子、または少なくとも8種の遺伝子、または例えばすべての遺伝子の遺伝子産物の発現レベルの決定を対象とする：IL6ST ; ARSA ; TIMP2 ; CD55 ; SULF2 ; ITGA6 ; SDC4 ; CDON ; およびSV2A。いくつかの態様においては、ポリペプチド発現産物のレベルが、IL6ST ; ARSA ; TIMP2 ; CD55 ; SULF2 ; ITGA6 ; SDC4 ; CDON ; およびSV2Aからなる群より選択されるマーカー遺伝子に関して決定されるが、これは例えば、本明細書に述べるように、細胞表面タンパク質のRNAレベルがポリペプチドレベルよりも低いためである。

10

【 0 0 2 2 】

(表7) 例示的なマウスマーカー遺伝子

マウス遺伝子記号	遺伝子名
Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
Abi3bp	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein
Ablim3	actin binding LIM protein family, member 3
Acad9	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9
Acbd3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3
Acin1	apoptotic chromatin condensation inducer 1
Actb	actin, beta
Actg1	predicted gene 8543; actin-like 8; predicted gene 7505; predicted gene 12715; predicted gene 12003; predicted gene 8399; predicted gene 6375; actin, gamma, cytoplasmic 1; similar to gamma-actin; predicted gene 4667; similar to cytoplasmic beta-actin; predicted gene 16385
Adamts5	similar to a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2); a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)
Adamtsl1	ADAMTS-like 1
Add3	adducin 3 (gamma)
Aebp1	AE binding protein 1
Agap1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1
Akap13	A kinase (PRKA) anchor protein 13
Akap2	A kinase (PRKA) anchor protein 2; paralemmin 2
Akr1b3	aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)
Akt2	similar to RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-PK-beta) (Protein kinase Akt-2) (Protein kinase B, beta) (PKB beta); thymoma viral proto-oncogene 2; similar to serine/threonine kinase
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2
Alox12	arachidonate 12-lipoxygenase
Amfr	autocrine motility factor receptor
Amhr2	anti-Mullerian hormone type 2 receptor
Ang	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
Ankrd11	ankyrin repeat domain 11

10

20

30

Ankrd12	ankyrin repeat domain 12; similar to Ankrd12 protein
Ankrd17	ankyrin repeat domain 17
Ano6	anoctamin 6
Anp32a	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
Anxa7	annexin A7
Ap1s3	predicted gene 8532; similar to adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3; adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3
Ap3s1	predicted gene 7603; adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit; predicted gene 5610
Ap4e1	adaptor-related protein complex AP-4, epsilon 1
Ap1p1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1
Apol9a	apolipoprotein L 9b; apolipoprotein L 9a
App	amyloid beta (A4) precursor protein
Aqp1	aquaporin 1
Arap2	predicted gene 336; ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2
Arf2	ADP-ribosylation factor 2
Arf3	ADP-ribosylation factor 3
Arf5	similar to ADP-ribosylation factor; ADP-ribosylation factor 5
Arhgap28	Rho GTPase activating protein 28
Arhgap29	Rho GTPase activating protein 29
Arhgap5	Rho GTPase activating protein 5
Arhgef12	predicted gene 7281; predicted gene 5831; similar to SP140 nuclear body protein (predicted); Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12
Arid1a	similar to AT rich interactive domain 1A isoform a; AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
Arid4a	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)
Arid4b	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)
Arid5b	similar to modulator recognition factor 2; AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
Arl3	ADP-ribosylation factor-like 3
Arl4d	ADP-ribosylation factor-like 4D; hypothetical protein LOC100044157
Arl6ip5	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 5
Armcx3	armadillo repeat containing, X-linked 3; hypothetical protein LOC100044266; predicted gene 9299
Arpc2	predicted gene 5492; actin related protein 2/3 complex, subunit 2
Arsa	arylsulfatase A
Arsb	arylsulfatase B
Ascc3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
Atf3	activating transcription factor 3
Atg3	autophagy-related 3 (yeast)

10

20

30

40

Atp1a1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	
Atp1b1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	
Atp2b1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	
Atp6v1a	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	
Atxn2	ataxin 2	
B230120H23Rik	RIKEN cDNA B230120H23 gene	
B2m	beta-2 microglobulin	
BC003331	similar to odorant response abnormal 4; cDNA sequence BC003331	10
BC005537	cDNA sequence BC005537	
BC005561	THO complex 2; cDNA sequence BC005561	
BC013529	cDNA sequence BC013529	
Baz2a	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	
Bbs4	Bardet-Biedl syndrome 4 (human)	
Bbx	bobby sox homolog (Drosophila)	
Bcam	basal cell adhesion molecule	
Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10; predicted gene 6141	
Bdp1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	20
Bicc1	bicaudal C homolog 1 (Drosophila)	
Bicd1	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	
Birc6	baculoviral IAP repeat-containing 6	
Blvrb	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	
Bnc1	basonuclin 1	
Bnc2	basonuclin 2	
Bod1l	biorientation of chromosomes in cell division 1-like	
Bptf	bromodomain PHD finger transcription factor	
Braf	Braf transforming gene	30
Brd2	similar to mKIAA4005 protein; bromodomain containing 2	
Brd4	bromodomain containing 4	
Brp44l	similar to brain protein 44-like protein; brain protein 44-like; predicted gene 3452; predicted gene 8219	
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	
Btbd2	BTB (POZ) domain containing 2	
Btbd7	BTB (POZ) domain containing 7	
Btf3	predicted gene 9308; basic transcription factor 3; predicted gene 3531; predicted gene 7973	40
Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	
Bzw1	predicted gene 11652; predicted gene 5191; basic leucine zipper and W2 domains 1	
C1d	C1D nuclear receptor co-repressor	
C1ra	complement component 1, r subcomponent; predicted gene 8551	
C1rl	complement component 1, r subcomponent-like	

C1s	similar to Complement component 1, s subcomponent; complement component 1, s subcomponent	
C2	complement component 2 (within H-2S)	
C3	complement component 3; similar to complement component C3 prepropeptide, last	
C4a	similar to Complement C4 precursor; complement component 4A (Rodgers blood group); similar to complement C4; complement component 4B (Childo blood group)	
C4b	similar to Complement C4 precursor; complement component 4A (Rodgers blood group); similar to complement C4; complement component 4B (Childo blood group)	10
Calm1	predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308	
Calm2	predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308	
Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	
Cast	calpastatin	
Cav1	caveolin 1, caveolae protein	20
Ccdc109b	coiled-coil domain containing 109B	
Ccdc34	coiled-coil domain containing 34	
Ccdc80	coiled-coil domain containing 80	
Ccdc88a	coiled coil domain containing 88A	
Ccdc90a	coiled-coil domain containing 90A	
Ccnl1	cyclin L1	
Cd109	CD109 antigen	
Cd200	CD200 antigen; similar to MRC OX-2 antigen homolog	
Cd248	CD248 antigen, endosialin	30
Cd34	CD34 antigen	
Cd55	CD55 antigen	
Cd81	CD81 antigen	
Cd82	CD82 antigen	
Cd9	CD9 antigen	
Cdc42ep3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	
Cdh11	cadherin 11	
Cdh3	cadherin 3	
Cdk13	cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)	40
Cdon	cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	
Celf2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	
Cep164	centrosomal protein 164	
Cep57	centrosomal protein 57	

Cfh	complement component factor h; similar to complement component factor H	
Cfl1	cofilin 1, non-muscle; similar to Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform); predicted gene 6180	
Cfl2	cofilin 2, muscle	
Chd1	chromodomain helicase DNA binding protein 1	
Chd2	chromodomain helicase DNA binding protein 2	
Chi3l1	chitinase 3-like 1	
Chst4	carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 4	10
Cish	cytokine inducible SH2-containing protein	
Clcn3	chloride channel 3	
Cldn15	claudin 15	
Cldn25	predicted gene 16492	
Clec1b	C-type lectin domain family 1, member b	
Clec3b	C-type lectin domain family 3, member b	
Clic4	chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	
Clip1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	
Clip3	CAP-GLY domain containing linker protein 3	20
Cln8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	
Cmah	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	
Cmtm3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3	
Cmtm7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	
Cnot6l	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	
Cobl	cordon-bleu	
Cobl1	Cobl-like 1	
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1	
Col1a2	collagen, type I, alpha 2	30
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	
Col4a6	collagen, type IV, alpha 6	
Colec12	collectin sub-family member 12	
Coq10b	hypothetical protein LOC675736; coenzyme Q10 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>); predicted gene 4899	
Creb3l1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1	
Creb5	RIKEN cDNA 9430076C15 gene; cAMP responsive element binding protein 5	
Crebbp	CREB binding protein	40
Creg1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	
Crim1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin like)	
Crls1	cardiolipin synthase 1	
Cryab	crystallin, alpha B	
Cryl1	crystallin, lambda 1	
Crym	crystallin, mu	

Csda	cold shock domain protein A	
Csf1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	
Csnk1a1	casein kinase 1, alpha 1	
Csrnp1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	
Csrp1	cysteine and glycine-rich protein 1	
Cuedc1	CUE domain containing 1	
Cyb5	cytochrome b-5	
Cybrd1	cytochrome b reductase 1	
Cyp2d22	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	10
Cyp2s1	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	
Cyr61	cysteine rich protein 61	
Dab2	disabled homolog 2 (Drosophila)	
Dag1	dystroglycan 1	
Daglb	diacylglycerol lipase, beta	
Dapk1	death associated protein kinase 1	
Dcn	decorin	
Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1	
Ddr2	discoidin domain receptor family, member 2	20
Ddx3x	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked	
Ddx5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5; predicted gene 12183	
Dennd5a	DENN/MADD domain containing 5A; similar to Rab6 interacting protein 1	
Dhx15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	
Diap1	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	
Dlgap4	discs, large homolog-associated protein 4 (Drosophila)	
Dmkn	dermokine	
Dnaja2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	30
Dnajb9	predicted gene 6568; DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	
Dnajc1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	
Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	
Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	
Dpysl2	dihydropyrimidinase-like 2	
Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3	
Dst	dystonin; hypothetical protein LOC100047109	
Dtx2	deltex 2 homolog (Drosophila)	40
Dusp1	dual specificity phosphatase 1	
Dusp14	dual specificity phosphatase 14	
Dusp3	dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related)	
Dync1i2	dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2	
Ecd	ecdysoneless homolog (Drosophila)	

Eea1	early endosome antigen 1	
Eef1a1	predicted gene 5869; predicted gene 7161; predicted gene 7105; predicted gene 5822; similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; predicted gene 6192; predicted gene 6392; predicted gene 6767; predicted gene 6170; predicted gene 6548; predicted gene 6789; eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	
Efemp1	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	10
Efhd2	similar to EF hand domain containing 2; EF hand domain containing 2	
Efna5	ephrin A5	
Egr1	early growth response 1	
Ehd2	EH-domain containing 2	
Eif2s3x	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked; similar to translation initiation factor eIF-2 gamma subunit; predicted gene 2223	
Eif3a	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A	20
Elf1	E74-like factor 1	
Elovl6	predicted gene 11295; ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	
Emp2	epithelial membrane protein 2	
Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	
Enpp4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4	
Esam	endothelial cell-specific adhesion molecule	
Esf1	ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	30
Espn	espin	
Esyt3	family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member C	
Etfa	predicted gene 2893; electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	
Evpl	envoplakin	
Exoc4	exocyst complex component 4	
F11r	F11 receptor	
Faim2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	40
Fam117a	family with sequence similarity 117, member A	
Fam134b	family with sequence similarity 134, member B	
Fam53b	family with sequence similarity 53, member B	
Fam63b	RIKEN cDNA B230380D07 gene	
Fam76a	predicted gene 7527; family with sequence similarity 76, member A	
Fam84b	RIKEN cDNA D330050I23 gene	

Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)
Fbln1	fibulin 1
Fermt2	fermitin family homolog 2 (Drosophila)
Fgf1	fibroblast growth factor 1
Fhl1	four and a half LIM domains 1
Filip1l	filamin A interacting protein 1-like
Fkbp5	FK506 binding protein 5
Flii	flightless I homolog (Drosophila); similar to cytoskeletal actin-modulating protein
Flnc	filamin C, gamma
Flrt2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
Fmo2	flavin containing monooxygenase 2
Fmod	fibromodulin
Fndc1	fibronectin type III domain containing 1; similar to fibronectin type III domain containing 1
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
Foxn3	forkhead box N3
Frmd4b	FERM domain containing 4B
Fth1	ferritin heavy chain 1
Fxyd1	FXYD domain-containing ion transport regulator 1
G3bp1	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 1
Gabarapl1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor-associated protein-like 1
Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta
Ganab	alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit
Gas1	growth arrest specific 1
Gas6	growth arrest specific 6
Gata6	GATA binding protein 6
Gbp2	guanylate binding protein 2
Gbp3	guanylate binding protein 3
Gcap14	granule cell antiserum positive 14
Gcsh	predicted gene 3672; similar to Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor; glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)
Gda	guanine deaminase
Gem	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)
Gfm2	G elongation factor, mitochondrial 2
Gfpt2	glutamine fructose-6-phosphate transaminase 2
Gja1	gap junction protein, alpha 1
Gjb5	gap junction protein, beta 5
Gm10052	predicted gene 10052

10

20

30

40

Gm13251	predicted gene 13251; predicted gene, OTTMUSG00000010657; RIKEN cDNA 1700029I01 gene	
Gm3893	similar to 4933409K07Rik protein; predicted gene, 665845; predicted gene 2490; predicted gene 10601; predicted gene 2163; predicted gene 3892; RIKEN cDNA 4933409K07 gene; predicted gene 3893	
Gm6548	predicted gene 5869; predicted gene 7161; predicted gene 7105; predicted gene 5822; similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; predicted gene 6192; predicted gene 6392; predicted gene 6767; predicted gene 6170; predicted gene 6548; predicted gene 6789; eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	10
Gm6578	predicted gene 6578	
Gm6644	predicted gene 6644	
Gm9199	predicted gene 9199	
Gnb2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 2	
Golga4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	
Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1	20
Gpc3	glypican 3	
Gpc4	glypican 4; similar to Glypican 4	
Gpcpd1	preimplantation protein 4	
Gpm6a	glycoprotein m6a	
Gpr116	G protein-coupled receptor 116	
Gpr133	G protein-coupled receptor 133	
Gpr64	G protein-coupled receptor 64	
Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	
Gpx8	glutathione peroxidase 8 (putative)	30
Gsr	similar to Glutathione reductase, mitochondrial precursor (GR) (GRase); glutathione reductase	
Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3	
Gstm1	similar to Glutathione S-transferase Mu 1 (GST class-mu 1) (Glutathione S-transferase GT8.7) (pmGT10) (GST 1-1); predicted gene 5562; glutathione S-transferase, mu 1	
Gstm4	glutathione S-transferase, mu 4	
Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	
H2-D1	histocompatibility 2, D region; histocompatibility 2, D region locus 1	40
H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region; similar to H-2K(d) antigen	

H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 1; histocompatibility 2, Q region locus 9; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain precursor; histocompatibility 2, Q region locus 8; histocompatibility 2, Q region locus 2; similar to MHC class Ib antigen; histocompatibility 2, Q region locus 7; histocompatibility 2, Q region locus 6; hypothetical protein LOC100044307; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor (QA-2 antigen); RIKEN cDNA 0610037M15 gene	
H3f3a	predicted gene 14383; predicted gene 3835; predicted gene 14384; predicted gene 12950; predicted gene, 670915; H3 histone, family 3A; predicted gene 12657; predicted gene 6132; predicted gene 10257; predicted gene 7227; H3 histone, family 3B; predicted gene 6128; similar to histone; predicted gene 1986; predicted gene 6186; hypothetical protein LOC676337; predicted gene 6421; predicted gene 2198; predicted gene 6817; predicted gene 8095; predicted gene 12271; predicted gene 13529; predicted gene 8029; predicted gene 4938; predicted gene 7100; predicted gene 9014; similar to Histone H3.4 (Embryonic); predicted gene 7179; similar to H3 histone, family 3B; predicted gene 7900; predicted gene 2099; similar to H3 histone, family 3A; predicted gene 6749; predicted gene 6485; predicted gene 4028; predicted gene 7194	10 20
Hdac3	histone deacetylase 3	
Hdac5	histone deacetylase 5	
Heg1	HEG homolog 1 (zebrafish)	
Herpud2	HERPUD family member 2	
Hes1	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	
Hexb	hexosaminidase B	30
Hist1h1c	histone cluster 1, H1c	

Hmgb1	<p>predicted gene 13121; predicted gene 3160; high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1-like 1; predicted gene 6090; predicted gene 3851; predicted gene 8967; predicted gene 7782; predicted gene 4587; predicted gene 4689; predicted gene 3307; predicted gene 13932; predicted gene 15059; predicted gene 3565; predicted gene 15447; predicted gene 12587; predicted gene 9012; predicted gene 6115; predicted gene 9480; high mobility group box 1; predicted gene 8423; predicted gene 5853; predicted gene 8288; predicted gene 7888; predicted gene 8594; predicted gene 15387; predicted gene 5473; predicted gene 8807; similar to high mobility group box 1; similar to 2810416G20Rik protein; predicted gene 8390; predicted gene, OTTMUSG00000005439; predicted gene 5842; predicted gene 5527; predicted gene 8563; predicted gene 2710; predicted gene 12331; predicted gene 5937; predicted gene 5504; similar to high-mobility group box 1; predicted gene 10361; predicted gene 2607; predicted gene 7422; predicted gene 10075; predicted gene 12568; predicted gene 6589; predicted gene 4383; predicted gene 8031; similar to High mobility group protein 1 (HMG-1) (High mobility group protein B1) (Amphoterin) (Heparin-binding protein p30); predicted gene 7468; predicted gene 8554</p>	10 20
Hnrnph1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	
Hnrnph2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	
Hnrnpl	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	
Hnrnpm	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	
Hnrnpr	predicted gene 6159; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	
Hook3	hook homolog 3 (Drosophila)	
Hoxa5	homeo box A5	30
Hp1bp3	heterochromatin protein 1, binding protein 3	
Hsp90aa1	predicted gene 5511; heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	
Hsp90ab1	heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	
Hsp90b1	heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1	
Hspa12a	heat shock protein 12A	
Hspa2	heat shock protein 2	
Hspb1	heat shock protein 1	
Hspb8	heat shock protein 8	40
Id1	inhibitor of DNA binding 1	
Id2	inhibitor of DNA binding 2	
Ier2	immediate early response 2	
Ifi204	interferon activated gene 204	
Ifi205	interferon activated gene 205	
Ifi2712a	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	

Ifi35	interferon-induced protein 35	
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	
Ifnar2	interferon (alpha and beta) receptor 2	
Ifngr1	interferon gamma receptor 1	
Ifrd1	interferon-related developmental regulator 1	
Ift74	intraflagellar transport 74 homolog (Chlamydomonas)	
Igf1r	insulin-like growth factor I receptor	
Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5	10
Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6	
Il16	interleukin 16	
Il17re	interleukin 17 receptor E	
Il6ra	interleukin 6 receptor, alpha	
Il6st	interleukin 6 signal transducer	
Ildr2	immunoglobulin-like domain containing receptor 2	
Ilf3	interleukin enhancer binding factor 3	
Impad1	inositol monophosphatase domain containing 1	
Ints10	integrator complex subunit 10; similar to integrator complex subunit 10	20
Iqsec1	IQ motif and Sec7 domain 1	
Irak4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	
Irf2bp2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	
Irf7	interferon regulatory factor 7	
Irs2	insulin receptor substrate 2	
Itch	itchy, E3 ubiquitin protein ligase	
Itga6	integrin alpha 6	
Itpr2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2	30
Jmjd1c	jumonji domain containing 1C	
Jun	Jun oncogene	
Junb	Jun-B oncogene	
Jund	Jun proto-oncogene related gene d	
Jup	junction plakoglobin	
Kank1	KN motif and ankyrin repeat domains 1	
Kcnab1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	
Kdelr1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	40
Kdm5a	lysine (K)-specific demethylase 5A	
Kdm6b	KDM1 lysine (K)-specific demethylase 6B	
Kdr	kinase insert domain protein receptor	
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1	
Kif1b	kinesin family member 1B	

Kif5b	kinesin family member 5B	
Klf10	Kruppel-like factor 10	
Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)	
Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)	
Klf6	Kruppel-like factor 6	
Klf7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	
Klf9	Kruppel-like factor 9	
Kpna1	karyopherin (importin) alpha 1	
Kpna3	karyopherin (importin) alpha 3	10
Krcc1	lysine-rich coiled-coil 1	
Krt14	keratin 14	
Ktn1	kinectin 1	
Lama4	laminin, alpha 4	
Lamp2	lysosomal-associated membrane protein 2	
Lars2	leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial	
Lass2	LAG1 homolog, ceramide synthase 2	
Lass4	LAG1 homolog, ceramide synthase 4	
Lgals7	lectin, galactose binding, soluble 7	20
Limch1	LIM and calponin homology domains 1	
Lims2	LIM and senescent cell antigen like domains 2	
Lman1	lectin, mannose-binding, 1	
Lpar2	lysophosphatidic acid receptor 2	
Lrrc20	leucine rich repeat containing 20	
Lrrc58	leucine rich repeat containing 58; predicted gene, OTTMUSG00000025724	
Lrrc61	leucine rich repeat containing 61	
Lrrn4	leucine rich repeat neuronal 4	30
Lrrn4cl	LRRN4 C-terminal like	
Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	
Luc7l3	RIKEN cDNA 3300001P08 gene	
Maf	similar to c-Maf long form; avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog	
Maged1	melanoma antigen, family D, 1	
Magt1	magnesium transporter 1	
Malat1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	40
Man1a	mannosidase 1, alpha	
Manf	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	
Maoa	monoamine oxidase A	
Map3k3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	
Mapk1	mitogen-activated protein kinase 1	
Mapkapk3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	

Mapre2	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	
Marcks1	MARCKS-like 1; predicted gene 9106	
Mat2a	methionine adenosyltransferase II, alpha	
Mat2b	methionine adenosyltransferase II, beta	
Matr3	matrin 3; similar to Matrin 3	
Med13l	mediator complex subunit 13-like	
Med21	mediator complex subunit 21	
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	
Meis2	Meis homeobox 2	10
Mesdc1	mesoderm development candidate 1	
Metap2	methionine aminopeptidase 2	
Mettl2	methyltransferase like 2	
Mettl7a1	methyltransferase like 7A1	
Mfap1a	similar to microfibrillar-associated protein 1A; microfibrillar-associated protein 1A; microfibrillar-associated protein 1B	
Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	
Mgll	monoglyceride lipase	
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1	20
Mll1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1	
Mll3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	
Morf4l2	predicted gene 5521; similar to mortality factor 4 like 2; mortality factor 4 like 2	
Mpdz	multiple PDZ domain protein	
Mphosph8	M-phase phosphoprotein 8	
Mras	muscle and microspikes RAS	
Mrgprf	MAS-related GPR, member F	
Msn	moesin	30
Mtap1a	microtubule-associated protein 1 A	
Mtdh	metadherin	
Mtmr6	myotubularin related protein 6	
Mut	methylmalonyl-Coenzyme A mutase	
Mxd4	Max dimerization protein 4	
Myh10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	
Myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory	
Mylip	myosin regulatory light chain interacting protein	
Myst4	MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4	40
Naa25	RIKEN cDNA C330023M02 gene	
Naga	N-acetyl galactosaminidase, alpha	
Nckap1	NCK-associated protein 1	
Ncoa1	similar to Nuclear receptor coactivator 1 (NCoA-1) (Steroid receptor coactivator 1) (SRC-1) (Nuclear receptor coactivator protein 1) (mNRC-1); nuclear receptor coactivator 1	

Ncoa4	predicted gene 6768; nuclear receptor coactivator 4
Ncor1	nuclear receptor co-repressor 1
Ndn	necdin
Ndst1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1
Ndufa4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4
Nedd4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
Nf1	neurofibromatosis 1
Nfe2l1	nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1
Nfia	nuclear factor I/A
Nfic	nuclear factor I/C
Nfix	nuclear factor I/X
Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
Nfyc	nuclear transcription factor-Y gamma
Nid2	nidogen 2
Ninl	ninein-like
Nipal3	NIPA-like domain containing 3; similar to NIPA-like domain containing 3
Nipbl	Nipped-B homolog (Drosophila)
Nkain4	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 4
Nkd1	naked cuticle 1 homolog (Drosophila); similar to naked cuticle 1 homolog
Nnmt	nicotinamide N-methyltransferase
Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
Npr1	natriuretic peptide receptor 1
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
Nrgn	neurogranin
Nucks1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
Oat	ornithine aminotransferase
Ogdh	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)
Ogn	osteoglycin
Olf1033	olfactory receptor 1033
Olf613	olfactory receptor 614; hypothetical protein LOC100044261; olfactory receptor 613
Opa3	optic atrophy 3 (human)

10

20

30

40

Orai3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	
Osr1	odd-skipped related 1 (Drosophila)	
Oxct1	3-oxoacid CoA transferase 1	
Oxnad1	oxidoreductase NAD-binding domain containing 1	
Pard3b	par-3 partitioning defective 3 homolog B (C. elegans)	
Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	
Parp4	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4	
Parvb	parvin, beta; similar to parvin, beta	
Pbx1	pre B-cell leukemia transcription factor 1; region containing RIKEN cDNA 2310056B04 gene; pre B-cell leukemia transcription factor 1	10
Pcdh15	protocadherin 15	
Pcdhgb5	protocadherin gamma subfamily B, 5	
Pcm1	pericentriolar material 1	
Pdap1	PDGFA associated protein 1	
Pdcd6ip	programmed cell death 6 interacting protein	
Pde4dip	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	
Pdia3	protein disulfide isomerase associated 3	20
Pdia4	protein disulfide isomerase associated 4	
Pdpn	podoplanin	
Pef1	penta-EF hand domain containing 1	
Peli1	pellino 1	
Per1	period homolog 1 (Drosophila)	
Pf4	platelet factor 4	
Pfn1	profilin 1	
Pgcp	plasma glutamate carboxypeptidase	
Pgrmc1	progesterone receptor membrane component 1	30
Phf21a	PHD finger protein 21A	
Phf3	PHD finger protein 3	
Phip	pleckstrin homology domain interacting protein	
Pigt	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T; similar to GPI transamidase component PIG-T precursor (Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class T protein) (Neuronal development-associated protein 7)	
Pik3c2a	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, alpha polypeptide	40
Pim1	proviral integration site 1	
Pitpnm2	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2	
Pkhd1l1	polycystic kidney and hepatic disease 1-like 1	
Pknx1	Pbx/knotted 1 homeobox	
Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	
Plat	plasminogen activator, tissue	
Plce1	phospholipase C, epsilon 1	

Plk1s1	non-protein coding RNA 153	
Plk2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	
Plod2	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	
Plxdc1	plexin domain containing 1	
Plxdc2	plexin domain containing 2	
Plxna4	plexin A4	
Pmp22	peripheral myelin protein 22	
Pnrc1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	
Podn	podocan	10
Ppap2a	phosphatidic acid phosphatase type 2A	
Ppbp	pro-platelet basic protein	
Ppfibp2	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, F interacting protein, binding protein 2	
Ppig	peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	
Ppl	periplakin	
Ppp1cb	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	
Ppp1r12a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	
Ppp1r15a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A; myeloid differentiation primary response gene 116	20
Ppp3ca	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	
Pppde1	PPPDE peptidase domain containing 1	
Pqlc3	PQ loop repeat containing	
Prelp	proline arginine-rich end leucine-rich repeat	
Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)	
Prkar2a	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha	
Prpf40a	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (yeast)	30
Prr13	proline rich 13	
Prss23	protease, serine, 23	
Psd	pleckstrin and Sec7 domain containing	
Psip1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	
Psmb2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2	
Psmd11	predicted gene 14048; proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	
Psmd7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	
Ptges3	predicted gene 9769; prostaglandin E synthase 3 (cytosolic); similar to Sid3177p; predicted gene 11893	40
Ptgis	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	
Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	
Ptma	predicted gene 12504; predicted gene 9800; predicted gene 4617; predicted gene 6625; predicted gene 7614; similar to prothymosin alpha; prothymosin alpha; predicted gene 9009	

Ptp4a2	predicted gene 13422; protein tyrosine phosphatase 4a2
Ptplad2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
Ptprf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
Ptrf	polymerase I and transcript release factor
Qrich1	glutamine-rich 1
Qser1	glutamine and serine rich 1
R74862	expressed sequence R74862
Rab11fip1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)
Rab1b	RAB1B, member RAS oncogene family
Rab5c	RAB5C, member RAS oncogene family
Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family
Rab7	RAB7, member RAS oncogene family
Rabgap1l	RAB GTPase activating protein 1-like
Ralbp1	ralA binding protein 1
Raly	RIKEN cDNA C130057N11 gene; hnRNP-associated with lethal yellow
Rarres2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2
Rb1cc1	RB1-inducible coiled-coil 1
Rbbp6	retinoblastoma binding protein 6
Rbbp8	retinoblastoma binding protein 8
Rbm25	RNA binding motif protein 25
Rbm27	RNA binding motif protein 27
Rbm3	predicted gene 15453; RNA binding motif protein 3
Rbpms	RNA binding protein gene with multiple splicing
Rdx	radixin
Rest	RE1-silencing transcription factor
Rgma	RGM domain family, member A
Rgs10	regulator of G-protein signalling 10
Rhob	ras homolog gene family, member B
Rhoj	ras homolog gene family, member J
Rhou	ras homolog gene family, member U
Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4
Rnd3	Rho family GTPase 3
Rnf167	ring finger protein 167
Rnf20	ring finger protein 20
Rock1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1
Rock2	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2
Rpp25	ribonuclease P 25 subunit (human)
Rras2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
Rspo1	R-spondin homolog (Xenopus laevis)

10

20

30

40

Rtf1	Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
Rtn1	reticulon 1
Ryk	receptor-like tyrosine kinase
Sarnp	predicted gene 6563; SAP domain containing ribonucleoprotein
Sat1	similar to spermidine/spermine N1-acetyltransferase; predicted gene 5552; spermidine/spermine N1-acetyl transferase 1
Sbsn	suprabasin
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
Sdc4	syndecan 4
Sdpr	serum deprivation response
Sec62	SEC62 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
Secisbp2	SECIS binding protein 2
Sema5a	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A
Senp6	similar to Sentrin-specific protease 6 (Sentrin/SUMO-specific protease SENP6) (SUMO-1-specific protease 1); SUMO/sentrin specific peptidase 6
Sep15	selenoprotein
Sept9	septin 9
Serinc5	serine incorporator 5
Serpinb6b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b
Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1
Serpinh1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1
Sesn1	sestrin 1
Setd2	SET domain containing 2
Sf3b1	splicing factor 3b, subunit 1
Sf3b4	predicted gene 7935; splicing factor 3b, subunit 4
Sfrs18	splicing factor, arginine/serine-rich 18
Shc1	predicted gene 5500; src homology 2 domain-containing transforming protein C1
Shfm1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
Siae	sialic acid acetyltransferase
Siah1a	seven in absentia 1A
Sirt2	sirtuin 2 (silent mating type information regulation 2, homolog) 2 (<i>S. cerevisiae</i>)
Slc10a3	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 3
Slc16a1	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1
Slc1a5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5

10

20

30

40

Slc26a3	solute carrier family 26, member 3	
Slc27a3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	
Slc38a1	solute carrier family 38, member 1	
Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	
Slc43a3	solute carrier family 43, member 3	
Slc4a4	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	
Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	
Slc6a6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	10
Slc8a1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	
Slc9a3r1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	
Sltm	SAFB-like, transcription modulator	
Slu7	SLU7 splicing factor homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	
Slurp1	secreted Ly6/Plaur domain containing 1	
Smad4	similar to MAD homolog 4 (<i>Drosophila</i>); MAD homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	20
Smarca2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	
Smarca5	predicted gene 13034; SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	
Smc2	structural maintenance of chromosomes 2	
Smc3	predicted gene 8892; structural maintenance of chromosomes 3	
Smc4	structural maintenance of chromosomes 4	
Smc6	structural maintenance of chromosomes 6	30
Smchd1	SMC hinge domain containing 1	
Smpd3	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	
Snrnp70	small nuclear ribonucleoprotein 70 (U1)	
Sntb2	similar to beta-2-syntrophin; syntrophin, basic 2	
Soat1	sterol O-acyltransferase 1	
Socs3	suppressor of cytokine signaling 3	
Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	
Sorbs1	sorbin and SH3 domain containing 1	
Sorbs3	sorbin and SH3 domain containing 3	40
Sox6	SRY-box containing gene 6	
Sp100	nuclear antigen Sp100	
Spag9	sperm associated antigen 9	
Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein; similar to Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	
Spn	SPEN homolog, transcriptional regulator (<i>Drosophila</i>)	

Spint2	serine protease inhibitor, Kunitz type 2	
Spnb2	spectrin beta 2	
Spock2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	
Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein	
Spop	speckle-type POZ protein	
Src	Rous sarcoma oncogene	
Srrm1	serine/arginine repetitive matrix 1	
Ssh2	slingshot homolog 2 (Drosophila)	
Ssr3	signal sequence receptor, gamma	10
St3gal1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	
Stag1	stromal antigen 1	
Star	steroidogenic acute regulatory protein	
Stard5	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5	
Stat3	similar to Stat3B; signal transducer and activator of transcription 3	
Stim1	similar to Stromal interaction molecule 1; stromal interaction molecule 1	
Stk10	serine/threonine kinase 10	
Stk40	serine/threonine kinase 40	20
Stmn2	stathmin-like 2	
Stra6	stimulated by retinoic acid gene 6	
Strn3	striatin, calmodulin binding protein 3	
Sulf1	sulfatase 1	
Sulf2	sulfatase 2	
Supt16h	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	
Sv2a	synaptic vesicle glycoprotein 2 a	
Syne1	synaptic nuclear envelope 1	
Syne2	synaptic nuclear envelope 2	30
Syt11	synaptotagmin XI; similar to synaptotagmin XI	
Sytl1	synaptotagmin-like 1; similar to synaptotagmin-like 1	
Taf3	TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	
Taf7	TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	
Tapbp	TAP binding protein	
Tbc1d15	TBC1 domain family, member 15	
Tbcel	tubulin folding cofactor E-like	40
Tbl1x	transducin (beta)-like 1 X-linked	
Tbx18	T-box18	
Tceal8	transcription elongation factor A (SII)-like 8; similar to transcription elongation factor A (SII)-like 8	
Tcf7l1	transcription factor 3	
Tfdp2	transcription factor Dp 2	

Tgfb1i1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2	
Tgfbr2	transforming growth factor, beta receptor II	
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	
Thbd	thrombomodulin	
Thbs1	thrombospondin 1; similar to thrombospondin 1	
Thoc2	THO complex 2; cDNA sequence BC005561	
Thrap3	thyroid hormone receptor associated protein 3; predicted gene 5898	
Thsd4	thrombospondin, type I, domain containing 4	10
Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	
Tirap	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein	
Tlr2	toll-like receptor 2	
Tm4sf1	transmembrane 4 superfamily member 1	
Tm4sf5	transmembrane 4 superfamily member 5	
Tmcc3	transmembrane and coiled coil domains 3	
Tmco1	transmembrane and coiled-coil domains 1	
Tmco7	transmembrane and coiled-coil domains 7	
Tmed2	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2; predicted gene 10698; predicted gene 7318	20
Tmem119	transmembrane protein 119	
Tmem140	transmembrane protein 140	
Tmem151a	transmembrane protein 151A	
Tmem221	transmembrane protein 221	
Tmem50a	transmembrane protein 50A	
Tmem98	transmembrane protein 98	
Tmod3	tropomodulin 3	
Tmpo	thymopoietin	30
Tmsb4x	thymosin, beta 4, X chromosome; similar to thymosin beta-4	
Tnxb	tenascin XB	
Tob2	transducer of ERBB2, 2	
Topors	topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	
Tpm3	predicted gene 7848; predicted gene 7839; predicted gene 4157; similar to tropomyosin 3, gamma; tropomyosin 3, gamma; predicted gene 4903	
Tppp3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3	
Tpt1	predicted gene 1974; tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene; tumor protein, translationally-controlled 1; predicted gene 14456	40
Trafd1	TRAF type zinc finger domain containing 1	
Trib1	tribbles homolog 1 (Drosophila)	
Trim8	tripartite motif protein 8	
Trpm7	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	

Tsc22d3	TSC22 domain family, member 3	
Tshz1	teashirt zinc finger family member 1	
Tsix	X (inactive)-specific transcript, antisense	
Tspan31	tetraspanin 31	
Tspan5	tetraspanin 5	
Ttc28	tetratricopeptide repeat domain 28	
Ttc38	tetratricopeptide repeat domain 38	
Tuba1a	predicted gene 7172; similar to tubulin, alpha 1; tubulin, alpha 1A	
Tubb2a	tubulin, beta 2A	10
Twsg1	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	
Txndc5	thioredoxin domain containing 5	
Txnrd1	thioredoxin reductase 1	
Uap1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	
Uba7	ubiquitin-activating enzyme E1-like; RIKEN cDNA D330022A01 gene	
Ube2d1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1, UBC4/5 homolog (yeast)	
Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	
Ube2n	ubiquitin-conjugating enzyme E2N; similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2 UbcH-ben; similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2N; predicted gene 5943	20
Ube2v1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1; predicted gene 7181; predicted gene 12502; similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	
Ubqln2	ubiquilin 2	
Ubxn2a	UBX domain protein 2A; predicted gene 6245	
Ubxn4	UBX domain protein 4	
Ugdh	UDP-glucose dehydrogenase	
Upk1b	uroplakin 1B	30
Upk3b	uroplakin 3B	
Usp16	ubiquitin specific peptidase 16	
Usp2	ubiquitin specific peptidase 2	
Usp25	ubiquitin specific peptidase 25	
Usp54	ubiquitin specific peptidase 54	
Usp8	ubiquitin specific peptidase 8	
Utp20	UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	
Vat1	vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	40
Vim	vimentin	
Vps13a	vacuolar protein sorting 13A (yeast)	
Vwa5a	von Willebrand factor A domain containing 5A	
Wac	similar to WW domain-containing adapter protein with coiled-coil; WW domain containing adaptor with coiled-coil	
Wasf2	WAS protein family, member 2	

Wdr26	WD repeat domain 26; similar to myocardial ischemic preconditioning upregulated protein 2	
Wdr92	WD repeat domain 92	
Wfdc1	WAP four-disulfide core domain 1	
Wls	G protein-coupled receptor 177	
Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4	
Wrnip1	Werner helicase interacting protein 1	
Wt1	similar to Wilms tumor homolog; Wilms tumor 1 homolog	
Wwc2	WW, C2 and coiled-coil domain containing 2	10
Xdh	xanthine dehydrogenase	
Xist	inactive X specific transcripts	
Yipf5	Yip1 domain family, member 5; predicted gene 5738	
Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide; predicted gene 4202	
Zbed6	similar to Zinc finger BED domain containing protein 4	
Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16	
Zbtb20	zinc finger and BTB domain containing 20	
Zbtb4	zinc finger and BTB domain containing 4	20
Zbtb7c	zinc finger and BTB domain containing 7C	
Zc3h13	zinc finger CCCH type containing 13	
Zc3h18	predicted gene 5939; zinc finger CCCH-type containing 18	
Zcchc11	zinc finger, CCHC domain containing 11	
Zcchc3	zinc finger, CCHC domain containing 3	
Zfand6	zinc finger, AN1-type domain 6	
Zfhx4	zinc finger homeodomain 4	
Zfp148	zinc finger protein 148	
Zfp277	zinc finger protein 277	30
Zfp281	zinc finger protein 281	
Zfp318	zinc finger protein 318	
Zfp353	zinc finger protein 353	
Zfp36	zinc finger protein 36	
Zfp385a	zinc finger protein 385A	
Zfp488	zinc finger protein 488	
Zfp672	zinc finger protein 672	
Zfp704	zinc finger protein 704	
Zmat1	zinc finger, matrin type 1	40
Zrsr1	zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 1	
Zzef1	zinc finger, ZZ-type with EF hand domain 1	
1110002B05Rik	RIKEN cDNA 1110002B05 gene	
1110003E01Rik	RIKEN cDNA 1110003E01 gene	

1110004F10Rik	predicted gene 9169; RIKEN cDNA 1110004F10 gene; similar to small acidic protein
1500003O03Rik	RIKEN cDNA 1500003O03 gene; similar to EF-hand Ca ²⁺ binding protein p22
1600029D21Rik	RIKEN cDNA 1600029D21 gene
1810014B01Rik	RIKEN cDNA 1810014B01 gene
1810041L15Rik	RIKEN cDNA 1810041L15 gene
1810074P20Rik	RIKEN cDNA 1810074P20 gene
2010107G12Rik	RIKEN cDNA 2010107G12 gene
2210403K04Rik	hypothetical protein LOC100042498
2310030G06Rik	RIKEN cDNA 2310030G06 gene
2510002D24Rik	RIKEN cDNA 2510002D24 gene
2610034B18Rik	RIKEN cDNA 2610034B18 gene
2610101N10Rik	RIKEN cDNA 2610101N10 gene
2810474O19Rik	RIKEN cDNA 2810474O19 gene
2900002K06Rik	RIKEN cDNA 2900002K06 gene
3110062M04Rik	RIKEN cDNA 3110062M04 gene
4930402H24Rik	RIKEN cDNA 4930402H24 gene
4930523C07Rik	RIKEN cDNA 4930523C07 gene
5430435G22Rik	RIKEN cDNA 5430435G22 gene
6330406I15Rik	RIKEN cDNA 6330406I15 gene
A130040M12Rik	RIKEN cDNA A130040M12 gene
A1848100	expressed sequence A1848100
Gm16897	
kg:uc009lxf.1	
Prrc2c	
kg:uc007won.1	
kg:uc009ogv.1	
kg:uc009iln.1	
kg:uc007qca.1	
Atxn7l3b	
kg:uc008ewj.2	
kg:uc008wkn.1	
kg:uc007bgn.1	
Ces2g	
kg:uc009cvm.1	
kg:uc008ehr.1	
Tmem234	
kg:uc012hdk.1	
kg:uc008ajk.1	
eg:245190:chr7:m	
kg:uc007qse.1	

10

20

30

40

kg:uc007bvx.1	
Mob3c	
kg:uc008dzh.1	
kg:uc009okn.1	
kg:uc007zts.1	
kg:uc008jup.1	
kg:uc008tkz.1	
kg:uc007zwh.1	
kg:uc008znh.1	
Mau2	
kg:uc009mng.1	
kg:uc007ded.1	
kg:uc007ctp.1	
kg:uc007zak.1	
eg:497210:chr14:m	
kg:uc007vsr.1	
Mir3064	
kg:uc009ize.1	
Kansl1	
eg:320169:chr9:p	
kg:uc009vev.1	
kg:uc009acs.1	
kg:uc009tuw.1	
kg:uc007pff.1	
kg:uc007vnc.1	
kg:uc009igb.1	
kg:uc008oki.1	
kg:uc008tky.1	

10

20

30

【 0 0 2 3 】

(表8) 例示的なヒトマーカ－遺伝子

ヒト遺伝子記号	遺伝子名
ABI3BP	ABI family, member 3 (NESH) binding protein
ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3
ACAD9	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9
ACBD3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3
ACIN1	apoptotic chromatin condensation inducer 1
ACTB	actin, beta
ACTG1	actin, gamma 1
ADAMTS5	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5

40

ADAMTSL1	ADAMTS-like 1
ADD3	adducin 3 (gamma)
AEBP1	AE binding protein 1
AGAP1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1
AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13
AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2; paralemmin 2; PALM2-AKAP2 readthrough transcript
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
ALOX12	arachidonate 12-lipoxygenase
AMFR	autocrine motility factor receptor
AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II
ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
ANKRD11	ankyrin repeat domain 11; hypothetical protein LOC100128265
ANKRD12	ankyrin repeat domain 12
ANKRD17	ankyrin repeat domain 17
ANO6	anoctamin 6
ANP32A	hepatopoietin PCn127; acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
ANXA7	annexin A7
AP1S3	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit
AP3S1	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit
AP4E1	adaptor-related protein complex 4, epsilon 1 subunit
APLP1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1
APP	amyloid beta (A4) precursor protein
AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)
ARAP2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2
ARF3	ADP-ribosylation factor 3
ARF5	ADP-ribosylation factor 5
ARHGAP28	Rho GTPase activating protein 28
ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29
ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5
ARHGEF12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
ARID4A	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)
ARID4B	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
ARL3	ADP-ribosylation factor-like 3
ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D
ARL6IP5	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5
ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3

10

20

30

40

ARPC2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	
ARSA	arylsulfatase A	
ARSB	arylsulfatase B	
ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	
ATF3	activating transcription factor 3	
ATG3	ATG3 autophagy related 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	
ATP1A1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	
ATP2B1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	10
ATP6V1A	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	
ATXN2	ataxin 2	
B2M	beta-2-microglobulin	
BAZ2A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	
BBS4	Bardet-Biedl syndrome 4	
BBX	bobby sox homolog (<i>Drosophila</i>)	
BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10; hypothetical LOC646626	
BDP1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	20
BICC1	bicaudal C homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	
BICD1	bicaudal D homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	
BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6	
BLVRB	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	
BNC1	basonuclin 1	
BNC2	basonuclin 2	
BOD1L	biorientation of chromosomes in cell division 1-like	
BPTF	bromodomain PHD finger transcription factor	30
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	
BRD2	bromodomain containing 2	
BRD4	bromodomain containing 4	
BRP44L	brain protein 44-like	
BST2	NPC-A-7; bone marrow stromal cell antigen 2	
BTBD2	BTB (POZ) domain containing 2	
BTBD7	BTB (POZ) domain containing 7	
BTF3	basic transcription factor 3; basic transcription factor 3, like 1 pseudogene	40
BTG2	BTG family, member 2	
BZW1	basic leucine zipper and W2 domains 1 pseudogene 1; basic leucine zipper and W2 domains 1 like 1; basic leucine zipper and W2 domains 1	
C1D	C1D nuclear receptor co-repressor; similar to nuclear DNA-binding protein; similar to hCG1791993	

C1RL	complement component 1, r subcomponent-like	
C1S	complement component 1, s subcomponent	
C2	complement component 2	
C3	similar to Complement C3 precursor; complement component 3; hypothetical protein LOC100133511	
C4A	complement component 4A (Rodgers blood group)	
C4B	complement component 4B (Chido blood group)	
CALM1	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	10
CALM2	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	
CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	
CAST	calpastatin	
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	
CCDC109B	coiled-coil domain containing 109B	
CCDC34	coiled-coil domain containing 34	20
CCDC80	coiled-coil domain containing 80	
CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	
CCDC90A	coiled-coil domain containing 90A	
CCNL1	cyclin L1	
CD109	CD109 molecule	
CD200	CD200 molecule	
CD248	CD248 molecule, endosialin	
CD34	CD34 molecule	
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	30
CD81	CD81 molecule	
CD82	CD82 molecule	
CD9	CD9 molecule	
CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	
CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	
CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	
CDK13	cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)	40
CDON	Cdon homolog (mouse)	
CELF2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	
CEP164	centrosomal protein 164kDa	
CEP57	centrosomal protein 57kDa	
CFH	complement factor H	
CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	

CFL2	cofilin 2 (muscle)	
CHD1	chromodomain helicase DNA binding protein 1	
CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein 2	
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	
CHST4	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4	
CISH	cytokine inducible SH2-containing protein	
CLCN3	chloride channel 3	
CLDN10	claudin 10	
CLDN15	claudin 15	10
CLDN25	claudin-like	
CLEC1B	C-type lectin domain family 1, member B	
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	
CLIC4	chloride intracellular channel 4	
CLIP1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	
CLIP3	CAP-GLY domain containing linker protein 3	
CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)	
CMAH	cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) pseudogene	20
CMTM3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3	
CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	
CNOT6L	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	
COBL	cordon-bleu homolog (mouse)	
COBLL1	COBL-like 1	
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	30
COL4A6	collagen, type IV, alpha 6	
COLEC12	collectin sub-family member 12	
COQ10B	coenzyme Q10 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	
CREB3L1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1	
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	
CREBBP	CREB binding protein	
CREG1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	
CRLS1	cardiolipin synthase 1	40
CRYAB	crystallin, alpha B	
CRYL1	crystallin, lambda 1	
CRYM	crystallin, mu	
CSDA	cold shock domain protein A; cold shock domain protein A pseudogene 1	
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	

CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	
CSRP1	cysteine and glycine-rich protein 1	
CUEDC1	CUE domain containing 1	
CYBRD1	cytochrome b reductase 1	
CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	
DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	10
DAG1	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	
DAGLB	diacylglycerol lipase, beta	
DAPK1	death-associated protein kinase 1	
DCN	decorin	
DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	
DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	
DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	
DENND5A	DENN/MADD domain containing 5A	20
DHX15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	
DLGAP4	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4	
DMKN	dermokine	
DNAJA2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	
DNAJC1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	
DPP4	dipeptidyl-peptidase 4	
DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	30
DPYSL3	dihydropyrimidinase-like 3	
DST	dystonin	
DTX2	deltex homolog 2 (Drosophila)	
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	
DUSP14	dual specificity phosphatase 14	
DUSP3	dual specificity phosphatase 3	
DYNC1I2	similar to dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2; dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2	
ECD	ecdysoneless homolog (Drosophila)	40
EEA1	early endosome antigen 1	
EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7; eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 3; similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	

EFHD2	EF-hand domain family, member D2	
EFNA5	ephrin-A5	
EGR1	early growth response 1	
EHD2	EH-domain containing 2	
EIF3A	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A	
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	
ELOVL6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)	
EMP2	epithelial membrane protein 2	10
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	
ENPP4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative function)	
ESAM	endothelial cell adhesion molecule	
ESF1	similar to ABT1-associated protein; ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	
ESPN	espin	
ESYT3	family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member C	20
ETFA	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	
EVPL	envoplakin	
EXOC4	exocyst complex component 4	
F11R	F11 receptor	
FAIM2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	
FAM117A	family with sequence similarity 117, member A	
FAM134B	family with sequence similarity 134, member B	
FAM53B	family with sequence similarity 53, member B	
FAM63B	family with sequence similarity 63, member B	30
FAM76A	family with sequence similarity 76, member A	
FAM84B	family with sequence similarity 84, member B	
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	
FBLN1	fibulin 1	
FERMT2	fermitin family homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	
FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	
FHL1	four and a half LIM domains 1	
FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like	
FKBP5	FK506 binding protein 5	40
FLII	flightless I homolog (<i>Drosophila</i>)	
FLNC	filamin C, gamma (actin binding protein 280)	
FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	
FMO2	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	
FMOD	fibromodulin	
FNDC1	fibronectin type III domain containing 1	

FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	
FOXN3	forkhead box N3	
FRMD4B	FERM domain containing 4B	
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1; ferritin, heavy polypeptide-like 16; similar to ferritin, heavy polypeptide 1; ferritin, heavy polypeptide-like 3 pseudogene	
FXYP1	FXYP domain containing ion transport regulator 1	
G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1	
GABARAPL1	GABA(A) receptors associated protein like 3 (pseudogene); GABA(A) receptor-associated protein like 1	10
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	
GAS1	growth arrest-specific 1	
GAS6	similar to growth arrest-specific 6; growth arrest-specific 6	
GATA6	GATA binding protein 6	
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	
GBP3	guanylate binding protein 3	
GBP7	guanylate binding protein 7	20
GCSH	similar to Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor; glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier); similar to Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	
GDA	guanine deaminase	
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	
GFM2	G elongation factor, mitochondrial 2	
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	30
GJB5	gap junction protein, beta 5, 31.1kDa	
GNB2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	
GOLGA4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	
GOLGB1	golgin B1, golgi integral membrane protein	
GPC3	glypican 3	
GPC4	glypican 4	
GPCPD1	hypothetical protein KIAA1434	
GPM6A	glycoprotein M6A	40
GPR116	G protein-coupled receptor 116	
GPR133	G protein-coupled receptor 133	
GPR64	G protein-coupled receptor 64	
GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	
GPX8	glutathione peroxidase 8 (putative)	
GSR	glutathione reductase	

GSTA3	glutathione S-transferase alpha 3	
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	
GSTM4	glutathione S-transferase mu 4	
GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	
H3F3A	H3 histone, family 3B (H3.3B); H3 histone, family 3A pseudogene; H3 histone, family 3A; similar to H3 histone, family 3B; similar to histone H3.3B	
HDAC3	histone deacetylase 3	
HDAC5	histone deacetylase 5	10
HEG1	HEG homolog 1 (zebrafish)	
HERPUD2	HERPUD family member 2	
HES1	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	
HEXB	hexosaminidase B (beta polypeptide)	
HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	
HMGB1	high-mobility group box 1; high-mobility group box 1-like 10	
HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	
HNRNPH2	ribosomal protein L36a pseudogene 51; ribosomal protein L36a pseudogene 37; ribosomal protein L36a pseudogene 49; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H'); ribosomal protein L36a	20
HNRNPL	similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	
HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	
HNRNPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	
HOOK3	hook homolog 3 (Drosophila)	
HOXA5	homeobox A5	
HP1BP3	heterochromatin protein 1, binding protein 3	30
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2; heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	
HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	
HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	
HSPA12A	heat shock 70kDa protein 12A	
HSPA2	heat shock 70kDa protein 2	
HSPB1	heat shock 27kDa protein-like 2 pseudogene; heat shock 27kDa protein 1	
HSPB8	heat shock 22kDa protein 8	40
ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	
IER2	immediate early response 2	
IFI35	interferon-induced protein 35	

IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
IFNGR1	interferon gamma receptor 1
IFRD1	interferon-related developmental regulator 1
IFT74	intraflagellar transport 74 homolog (Chlamydomonas)
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6
IL16	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
IL17RE	interleukin 17 receptor E
IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
ILDR2	immunoglobulin-like domain containing receptor 2
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
IMPAD1	inositol monophosphatase domain containing 1
INTS10	integrator complex subunit 10
IQSEC1	IQ motif and Sec7 domain 1
IRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2
IRF7	interferon regulatory factor 7
IRS2	insulin receptor substrate 2
ITCH	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)
ITGA6	integrin, alpha 6
ITPR2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2
JMJD1C	jumonji domain containing 1C
JUN	jun oncogene
JUNB	jun B proto-oncogene
JUND	jun D proto-oncogene
JUP	junction plakoglobin
KANK1	KN motif and ankyrin repeat domains 1; similar to ankyrin repeat domain protein 15 isoform b
KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
KDEL1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1
KDM5A	lysine (K)-specific demethylase 5A
KDM6B	lysine (K)-specific demethylase 6B
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1
KIF1B	kinesin family member 1B
KIF5B	kinesin family member 5B
KLF10	Kruppel-like factor 10

10

20

30

40

KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)
KLF6	Kruppel-like factor 6
KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)
KLF9	Kruppel-like factor 9
KPNA1	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)
KPNA3	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)
KRCC1	lysine-rich coiled-coil 1
KRT14	keratin 14
KTN1	kinectin 1 (kinesin receptor)
LAMA4	laminin, alpha 4
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2
LARS2	leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
LASS2	LAG1 homolog, ceramide synthase 2
LASS4	LAG1 homolog, ceramide synthase 4
LGALS7	lectin, galactoside-binding, soluble, 7; lectin, galactoside-binding, soluble, 7B
LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1
LIMS2	LIM and senescent cell antigen-like domains 2
LMAN1	lectin, mannose-binding, 1
LPAR2	lysophosphatidic acid receptor 2
LRRC20	leucine rich repeat containing 20
LRRC58	leucine rich repeat containing 58
LRRC61	leucine rich repeat containing 61
LRRN4	leucine rich repeat neuronal 4
LRRN4CL	LRRN4 C-terminal like
LTBP4	latent transforming growth factor beta binding protein 4
LUC7L3	cisplatin resistance-associated overexpressed protein
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
MAGED1	melanoma antigen family D, 1
MAGT1	magnesium transporter 1
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)
MANF	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
MAOA	monoamine oxidase A
MAP3K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3
MAPRE2	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
MARCKSL1	MARCKS-like 1
MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha

10

20

30

40

MAT2B	methionine adenosyltransferase II, beta	
MATR3	matrin 3	
MED13L	mediator complex subunit 13-like	
MED21	mediator complex subunit 21	
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	
MEIS2	Meis homeobox 2	
MESDC1	mesoderm development candidate 1	
METAP2	methionyl aminopeptidase 2	
MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	10
MGLL	monoglyceride lipase	
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	
MORF4L2	mortality factor 4 like 2	
MPDZ	multiple PDZ domain protein	
MPHOSPH8	M-phase phosphoprotein 8	
MRAS	muscle RAS oncogene homolog	
MRGPRF	MAS-related GPR, member F	
MSN	moesin	20
MTDH	metadherin	
MTMR6	myotubularin related protein 6	
MUT	methylmalonyl Coenzyme A mutase	
MXD4	MAX dimerization protein 4	
MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle	
MYL12A	myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric	
MYL7	myosin, light chain 7, regulatory	
MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein	
MYST4	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	30
NAA25	chromosome 12 open reading frame 30	
NAGA	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	
NCKAP1	NCK-associated protein 1	
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1	
NCOA4	nuclear receptor coactivator 4	
NCOR1	nuclear receptor co-repressor 1	
NDN	necdin homolog (mouse)	
NDST1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	
NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	40
NEDD4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	
NF1	neurofibromin 1	
NFE2L1	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	
NFIA	nuclear factor I/A	
NFIC	nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	

NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
NFYC	nuclear transcription factor Y, gamma
NID2	nidogen 2 (osteonidogen)
NINL	ninein-like
NIPAL3	NIPA-like domain containing 3
NIPBL	Nipped-B homolog (Drosophila)
NKAIN4	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 4
NKD1	naked cuticle homolog 1 (Drosophila)
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NPR1	natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atriuretic peptide receptor A)
NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)
NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
OAT	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)
OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
OGN	osteoglycin
OPA3	optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia)
ORAI3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3
OSR1	odd-skipped related 1 (Drosophila)
OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1
OXNAD1	oxidoreductase NAD-binding domain containing 1
PARD3B	par-3 partitioning defective 3 homolog B (C. elegans)
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
PARP4	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4
PARVB	parvin, beta
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1
PCDH15	protocadherin 15
PCDHGB5	protocadherin gamma subfamily B, 5
PCM1	pericentriolar material 1

10

20

30

40

PDAP1	PDGFA associated protein 1; similar to PDGFA associated protein 1
PDCD6IP	programmed cell death 6 interacting protein
PDE4DIP	hypothetical protein LOC100134230; similar to KIAA0454 protein; similar to phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 2; phosphodiesterase 4D interacting protein
PDIA3	protein disulfide isomerase family A, member 3
PDIA4	protein disulfide isomerase family A, member 4
PDPN	podoplanin
PEF1	penta-EF-hand domain containing 1
PELI1	pellino homolog 1 (Drosophila)
PER1	period homolog 1 (Drosophila)
PF4	platelet factor 4
PFN1	profilin 1
PGCP	plasma glutamate carboxypeptidase
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1
PHF21A	PHD finger protein 21A
PHF3	PHD finger protein 3
PHIP	pleckstrin homology domain interacting protein
PIGT	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T
PIK3C2A	phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide
PIM1	pim-1 oncogene
PITPNM2	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2
PKHD1L1	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1
PKNOX1	PBX/knotted 1 homeobox 1
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
PLAT	plasminogen activator, tissue
PLCE1	phospholipase C, epsilon 1
PLK1S1	non-protein coding RNA 153
PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
PLXDC1	plexin domain containing 1
PLXDC2	plexin domain containing 2
PLXNA4	plexin A4
PMP22	peripheral myelin protein 22
PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1
PODN	podocan
PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A
PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
PPFIBP2	PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2)
PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)

10

20

30

40

PPL	periplakin	
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform; speedy homolog A (<i>Xenopus laevis</i>)	
PPP1R12A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	
PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	
PPP3CA	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	
PPPDE1	PPPDE peptidase domain containing 1	
PQLC3	PQ loop repeat containing 3	10
PRELP	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	
PRG4	proteoglycan 4	
PRKAR2A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	
PRPF40A	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	
PRR13	proline rich 13	
PRSS23	protease, serine, 23	
PSD	pleckstrin and Sec7 domain containing	
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	
PSMB2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	20
PSMD11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	
PSMD7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	
PTGES3	prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	
PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	
PTMA	hypothetical LOC728026; prothymosin, alpha; hypothetical gene supported by BC013859; prothymosin, alpha pseudogene 4 (gene sequence 112)	30
PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	
PTPLAD2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2	
PTPRD	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	
PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	
PTRF	polymerase I and transcript release factor	
QRICH1	glutamine-rich 1	
QSER1	glutamine and serine rich 1	
RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	
RAB1B	RAB1B, member RAS oncogene family	40
RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family	
RAB6B	RAB6B, member RAS oncogene family	
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	
RALBP1	hypothetical LOC100129773; raIA binding protein 1	
RALY	RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse))	

RARRES2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	
RB1CC1	RB1-inducible coiled-coil 1	
RBBP6	retinoblastoma binding protein 6	
RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	
RBM25	RNA binding motif protein 25	
RBM27	RNA binding motif protein 27	
RBM3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	
RBPMS	RNA binding protein with multiple splicing	
RDX	radixin	10
REST	RE1-silencing transcription factor	
RGMA	RGM domain family, member A	
RGS10	regulator of G-protein signaling 10	
RHOB	ras homolog gene family, member B	
RHOJ	ras homolog gene family, member J	
RHOU	ras homolog gene family, member U	
RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4	
RND3	Rho family GTPase 3	
RNF167	ring finger protein 167	20
RNF20	ring finger protein 20	
ROCK1	similar to Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	
RPP25	ribonuclease P/MRP 25kDa subunit	
RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2; similar to related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	
RSPO1	R-spondin homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	
RTF1	Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	30
RTN1	reticulon 1	
RYK	RYK receptor-like tyrosine kinase	
SARNP	SAP domain containing ribonucleoprotein	
SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	
SBSN	suprabasin	
SDC4	syndecan 4	
SDPR	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	
SEC62	SEC62 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	40
SECISBP2	SECIS binding protein 2	
SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	
SENP6	SUMO1/sentrin specific peptidase 6	
SEP15	15 kDa selenoprotein	

SEPT9	septin 9	
SERINC5	serine incorporator 5	
SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	
SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	
SESN1	sestrin 1	
SETD2	SET domain containing 2	
SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	
SF3B4	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa	10
SFRS18	splicing factor, arginine/serine-rich 18	
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	
SHFM1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1	
SIAE	sialic acid acetyltransferase	
SIRT2	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	
SLC10A3	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 3	
SLC16A1	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	20
SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	
SLC26A3	solute carrier family 26, member 3	
SLC27A3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	
SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	
SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	
SLC43A3	solute carrier family 43, member 3	
SLC4A4	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	30
SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	
SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	
SLC9A3R1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	40
SLTM	SAFB-like, transcription modulator	
SLU7	SLU7 splicing factor homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	
SLURP1	secreted LY6/PLAUR domain containing 1	
SMAD4	SMAD family member 4	
SMARCA2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	

SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	
SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	
SMC6	structural maintenance of chromosomes 6	
SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	
SMPD3	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)	10
SNRNP70	small nuclear ribonucleoprotein 70kDa (U1)	
SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)	
SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	
SOD3	superoxide dismutase 3, extracellular	
SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	
SORBS3	sorbin and SH3 domain containing 3	20
SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6	
SP100	SP100 nuclear antigen	
SPAG9	sperm associated antigen 9	
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	
SPEN	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	
SPINT2	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	
SPOCK2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2	30
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	
SPOP	speckle-type POZ protein	
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	
SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1	
SSH2	slingshot homolog 2 (Drosophila)	
SSR3	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	
ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	
STAG1	stromal antigen 1	40
STAR	steroidogenic acute regulatory protein	
STARD5	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5	
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	
STIM1	stromal interaction molecule 1	
STK10	serine/threonine kinase 10	

STK40	serine/threonine kinase 40	
STMN2	stathmin-like 2	
STRA6	stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse)	
STRN3	striatin, calmodulin binding protein 3	
SULF1	sulfatase 1	
SULF2	sulfatase 2	
SUPT16H	suppressor of Ty 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>); suppressor of Ty 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) pseudogene	
SV2A	synaptic vesicle glycoprotein 2A	10
SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	
SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	
SYT11	synaptotagmin XI	
SYTL1	synaptotagmin-like 1	
TAF3	TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 140kDa	
TAF7	TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 55kDa	
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	20
TBC1D15	TBC1 domain family, member 15	
TBCEL	tubulin folding cofactor E-like	
TBL1X	transducin (beta)-like 1X-linked	
TBX18	T-box 18	
TCEAL8	transcription elongation factor A (SII)-like 8	
TCF7L1	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	
TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	
TGFB111	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	30
TGFB2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	
TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	
THBD	thrombomodulin	
THBS1	thrombospondin 1	
THOC2	THO complex 2	
THRAP3	thyroid hormone receptor associated protein 3	
THSD4	thrombospondin, type I, domain containing 4	
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	40
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	
TLR2	toll-like receptor 2	
TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	
TM4SF5	transmembrane 4 L six family member 5	
TMCC3	transmembrane and coiled-coil domain family 3	

TMCO1	transmembrane and coiled-coil domains 1	
TMCO7	transmembrane and coiled-coil domains 7	
TMED2	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2	
TMEM119	transmembrane protein 119	
TMEM140	transmembrane protein 140	
TMEM151A	transmembrane protein 151A	
TMEM221	transmembrane protein 221	
TMEM50A	transmembrane protein 50A	
TMEM98	similar to transmembrane protein 98; transmembrane protein 98	10
TMOD3	tropomodulin 3 (ubiquitous)	
TMPO	thymopoietin	
TMSB4X	thymosin-like 2 (pseudogene); thymosin-like 1 (pseudogene); thymosin beta 4, X-linked	
TNXB	tenascin XB; tenascin XA pseudogene	
TOB2	transducer of ERBB2, 2	
TOPORS	topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	
TPM3	tropomyosin 3	
TPPP3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3	20
TPT1	similar to tumor protein, translationally-controlled 1; tumor protein, translationally-controlled 1	
TRAFD1	TRAF-type zinc finger domain containing 1	
TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)	
TRIM8	tripartite motif-containing 8	
TRPM7	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3; GRAM domain containing 4	
TSHZ1	teashirt zinc finger homeobox 1	30
TSIX	XIST antisense RNA (non-protein coding)	
TSPAN31	tetraspanin 31	
TSPAN5	tetraspanin 5	
TTC28	chromosome 6 open reading frame 35; hCG1820764; tetratricopeptide repeat domain 28	
TTC38	tetratricopeptide repeat domain 38	
TUBA1A	tubulin, alpha 1a	
TUBB2A	tubulin, beta 2A	
TWSG1	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	40
TXNDC5	thioredoxin domain containing 5 (endoplasmic reticulum); muted homolog (mouse)	
TXNRD1	thioredoxin reductase 1; hypothetical LOC100130902	
UAP1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	
UBA7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	
UBE2D1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast)	

UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	
UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	
UBE2V1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1; ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 pseudogene 2; transmembrane protein 189; TMEM189-UBE2V1 readthrough transcript	
UBQLN2	ubiquilin 2	
UBXN2A	UBX domain protein 2A	
UBXN4	UBX domain protein 4	
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	10
UPK1B	uroplakin 1B	
UPK3B	uroplakin 3B	
USP16	ubiquitin specific peptidase 16	
USP2	ubiquitin specific peptidase 2	
USP25	ubiquitin specific peptidase 25	
USP54	ubiquitin specific peptidase 54	
USP8	ubiquitin specific peptidase 8	
UTP20	similar to Down-regulated in metastasis protein (Key-1A6 protein) (Novel nucleolar protein 73) (NNP73); UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	20
VAT1	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)	
VIM	vimentin	
VPS13A	vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)	
VWA5A	von Willebrand factor A domain containing 5A	
WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	
WASF2	WAS protein family, member 2	
WDR26	WD repeat domain 26	
WDR92	WD repeat domain 92	30
WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	
WLS	G protein-coupled receptor 177	
WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 4	
WRNIP1	Werner helicase interacting protein 1	
WT1	Wilms tumor 1	
WWC2	WW and C2 domain containing 2	
XDH	xanthine dehydrogenase	
XIST	X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	
YIPF5	Yip1 domain family, member 5	40
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16	
ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	
ZBTB4	zinc finger and BTB domain containing 4	
ZBTB7C	zinc finger and BTB domain containing 7C	

ZC3H13	zinc finger CCCH-type containing 13
ZC3H18	zinc finger CCCH-type containing 18
ZCCHC11	zinc finger, CCHC domain containing 11
ZCCHC3	zinc finger, CCHC domain containing 3
ZFAND6	zinc finger, AN1-type domain 6
ZFHX4	zinc finger homeobox 4
ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
ZMAT1	zinc finger, matrin type 1
ZRSR1	zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 1
ZZEF1	zinc finger, ZZ-type with EF-hand domain 1

10

【 0 0 2 4 】

表7および表8に列記された遺伝子名は一般名である。表7または表8に列記された遺伝子のそれぞれに関するNCBI Gene ID番号は、NCBIの"Gene" Database (World Wide Webの<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>で利用可能)を、一般名をクエリーとして用いて検索し、返された最初のヒト (Homo sapiens) 遺伝子 (表8中の遺伝子の場合) またはマウス (Mus musculus) 遺伝子 (表7中の遺伝子の場合) を選択することによって得ることができる。他の遺伝子を、UCSCゲノムブラウザ (World Wide Webの<http://genome.ucsc.edu/>で利用可能) をGene Sorter機能を用いて得ることもできる。マウス遺伝子のヒト相同体は、例えば、NCBIデータベース中の相同体を同定すること、またはBLASTなどのデータベースのクエリーを行うことによって、容易に同定することができる。ある態様において、マーカー遺伝子は、表7、表8または表14に列記された遺伝子から選択される。

20

【 0 0 2 5 】

CTCにおいて、表7、表8または表14に列記されたマーカー遺伝子がアップレギュレートされてもよく、例えば、表7、表8または表14に列記されたマーカー遺伝子に関して、細胞または試料における測定されたマーカー遺伝子の発現がそのマーカー遺伝子の発現の参照基準レベルと比較して高度であるならば、その細胞はCTCと同定される、かつ/またはその試料はCTCを含むと同定される。統計学的に有意な変化が認められることが好ましい。しかし、たとえ一群の中の少数の遺伝子が正常と異なっていなくても、その一群の全体的変化が有意な変化、好ましくは統計学的に有意な変化を示すならば、その試料はCTCを含むと同定することができる。表記されたマーカーの考えられる2種またはそれを上回る組み合わせが、本明細書において想定される。

30

【 0 0 2 6 】

そのマーカー遺伝子の参照基準レベルよりも高く、参照基準量よりも少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約80%、少なくとも約100%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、または少なくとも約1000%高い、またはそれを上回る、表7、表8または表14中のマーカー遺伝子の遺伝子発現産物のレベルは、CTCの存在の指標となる。

40

【 0 0 2 7 】

いくつかの態様において、参照基準は、CTCではない細胞または細胞の集団におけるマーカー遺伝子産物の発現のレベル、例えば、血中非循環性腫瘍細胞および/または癌細胞でない血中循環細胞における平均レベルであってよい。いくつかの態様において、参照基準が、対照試料、対照個体のプール試料におけるマーカー遺伝子産物の発現のレベル、またはそれらに基づく数値もしくはある範囲の値であってよい。

【 0 0 2 8 】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法およびアッセイは、(a) 遺伝子発現産物を検出可能な遺伝子標的に変換すること; (b) 検出可能な遺伝子標的の量を測定すること; ならびに(c) 検出可能な遺伝子標的の量を参照基準の量と比較して、検出可能

50

な遺伝子標的の量が参照基準レベルの量と統計学的に有意に異なる場合に、CTCの存在および/またはレベルが決定されること、を含む。いくつかの態様において、検出可能な遺伝子標的の量が参照基準レベルの量と統計学的に有意に異なってはいない場合に、試料はCTCを含まないと同定される。

【0029】

本明細書で用いる場合、「変換すること」または「変換」という用語は、対象物または物質、例えば、生物試料、核酸またはタンパク質を、別の物質に変化させることを指す。変換は物理的、生物的または化学的であってよい。例示的な物理的変換には、生物試料の前処理、例えば、分画遠心法による全血の血清への前処理が非限定的に含まれる。生物的/化学的変換は、少なくとも1つの酵素および/または化学的反応物を反応に必要とする。例えば、DNA試料を1つもしくは複数の制限酵素によって消化して断片化すること、または断片化されたDNA試料にリガーゼによって外因性分子を結びつけることができる。いくつかの態様において、DNA試料は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による酵素的複製を受けることができる。

【0030】

本明細書に記載のマーカ-遺伝子に関連のある遺伝子発現産物を測定するための方法は当業者に周知である。遺伝子発現産物、例えばタンパク質のレベルを測定するためのそのような方法には、抗体またはタンパク質結合剤などの検出反応物を用いる、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、ウエスタンブロット法、FACS、放射線免疫アッセイ;(RIA); サンドイッチアッセイ; 蛍光インサイチュ-ハイブリダイゼーション(FISH); 免疫組織染色; 免疫電気泳動; 免疫沈降法および免疫蛍光が含まれる。または、標識抗ペプチド抗体および他の種類の検出剤を対象に導入することによって、ペプチドを対象において検出することもできる。例えば、抗体を、対象における存在および場所が標準的な画像化手法によって検出される放射性マーカ-によって標識することができる。

【0031】

例えば、本明細書に記載のマーカ-遺伝子のポリペプチド発現産物に対する抗体は市販されており、タンパク質発現レベル、例えば、抗IGFBP5(カタログ番号4255; Abcam; Cambridge, MA)を測定するために本発明の目的で用いることができる。または、本明細書に記載のマーカ-遺伝子のアミノ酸配列は公知であって、NCBIウェブサイトに掲載されているため、当業者は、関心対象のこれらのタンパク質に対する自分たち独自の抗体を本発明の目的のために産生させることができる。本明細書に記載のマーカ-遺伝子のアミノ酸配列には、ヒト、マウスおよびラットなどの種々の種についてのNCBIアクセッション番号が割り当てられている。

【0032】

いくつかの態様においては、免疫組織化学(「IHC」)および免疫細胞化学(「ICC」)の手法を用いることができる。IHCは組織切片に対する免疫化学の適用であり、一方、ICCは、細胞または組織インプリントに対する、それらが特定の細胞学的調製、例えば液体ベースの調製などを受けた後の免疫化学の適用である。免疫化学は、特異的抗体の使用に基づく一群の手法であり、ここで抗体は細胞の内部または表面にある分子を特異的に標的化するために用いられる。抗体は典型的には、標的化された分子に遭遇すると即座に生化学的反応を受け、それによって色調変化を呈するマーカ-を含有する。場合によっては、マーカ-色素またはマーカ-シグナルを含む二次抗体を一次特異抗体に適用することを伴うシグナル増幅を、特定のプロトコールに組み込んでもよい。

【0033】

いくつかの態様において、アッセイはウエスタンブロット分析であってよい。または、タンパク質を二次元ゲル電気泳動システムによって分離することもできる。二次元ゲル電気泳動は当技術分野において周知であり、典型的には、第1の次元に沿った等電点フォーカシングと、それに続く第2の次元に沿ったSDS-PAGE電気泳動を必要とする。これらの方法はまた、かなりの量の細胞材料も必要とする。2D SDS-PAGEゲルの分析は、ゲル上のタンパク質スポットの強度を決定することによって行うことができ、または免疫検出を用い

10

20

30

40

50

て行うこともできる。他の態様において、タンパク質試料は質量分析法によって分析される。

【0034】

免疫学的試験は本明細書に記載の方法およびアッセイとともに用いることができ、これには例えば、ウエスタンブロット法、放射性免疫アッセイ(RIA)、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、例えばラテックス凝集、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、例えば、FIA(蛍光結合免疫アッセイ)、化学発光免疫アッセイ(CLIA)、電子化学発光免疫アッセイ(ECLIA)、計数免疫アッセイ(CIA)、ラテラルフロー試験または免疫アッセイ(LFIA)、磁気免疫アッセイ(MIA)およびプロテインA免疫アッセイなどの手法を用いる競合アッセイおよび非競合的アッセイシステムが含まれる。そのようなアッセイを行うための方法は、適切な抗体反応物が利用可能であれば、当技術分野において公知である。いくつかの態様において、免疫アッセイは定量的または半定量的な免疫アッセイであってよい。

10

【0035】

免疫アッセイは、生物試料、典型的には血清などの流体試料における物質の濃度を、1つまたは複数の抗体のその抗原との相互作用を用いて測定する生化学的試験である。本アッセイは、抗体のその抗原との高度に特異的な結合を利用する。本明細書に記載の方法およびアッセイの場合には、標的ポリペプチドの、本明細書に記載の各々のタンパク質もしくはタンパク質断片、または単離されたペプチド、または融合タンパク質との特異的結合が免疫アッセイにおいて起こって、標的タンパク質/ペプチド複合体が形成される。続いて複合体が、当技術分野において公知の種々の方法によって検出される。免疫アッセイは多くの場合、検出用抗体の使用も必要とする。

20

【0036】

酵素結合免疫吸着アッセイは、ELISA、酵素免疫アッセイまたはEIAとも呼ばれ、試料における抗体または抗原の存在を検出するために免疫学において主に用いられる生化学的手法である。ELISAは医学および植物病理学において診断用ツールとして用いられているほか、さまざまな産業において品質管理チェックとしても用いられている。

【0037】

1つの態様において、特定の所望の抗原(すなわち、本明細書に述べるようなマーカー遺伝子ポリペプチド)に対する特異性を有する少なくとも1つの抗体を必要とするELISAを行うこともできる。既知量の試料および/または抗原を、固体支持体(通常はポリスチレン製マイクロタイタープレート)上に固定化する。固定化は、非特異的(例えば、表面への吸着による)でも、または特異的(例えば、表面上に固定化させた別の抗体を、抗原または一次抗体を捕捉するために用いる場合)でもよい。抗原を固定化した後に、検出用抗体を添加して、抗原との複合体を形成させる。検出用抗体を酵素と共有結合性に連結させることもでき、またはそれ自体を、バイオコンジュゲーション(bio-conjugation)によって酵素と連結させた二次抗体によって検出することもできる。各段階の間に、典型的にはプレートを、特異的に結合していないあらゆるタンパク質または抗体を除去するために、穏和な洗浄液によって洗浄する。最後の洗浄段階の後に、試料中の抗原の数量を指し示す可視シグナルを生じさせるために、酵素基質を添加することによってプレートを現像する。以前のELISAでは発色性基質を利用していたが、最近のアッセイでは感度ははるかに高い蛍光発生基質を使用している。

30

40

【0038】

もう1つの態様においては、競合的ELISAを用いる。標的ポリペプチドまたはその断片を対象とする精製抗体を、マルチウェルプレートの固相上にコーティングする、すなわち、固体表面に対してコンジュゲートさせる。固体支持体上にコンジュゲートされていない精製抗体の第2のバッチも必要となる。これらの非コンジュゲート精製抗体は、検出目的で標識され、例えば、検出可能なシグナルを生じさせるために西洋ワサビペルオキシダーゼによって標識される。対象由来の試料(例えば、腫瘍、血液、血清または尿)を、西洋ワ

50

サビペルオキシダーゼ標識抗体とともに、既知量の所望の抗原（例えば、標的ポリペプチドを含む既知の容積または濃度の試料）と混合し、続いて混合物を、競合的な組み合わせを形成させるために、コーティングされたウェルに添加する。試料中のポリペプチドレベルが高ければ、インキュベーション後に、標識抗体反応物-抗原という複合体が形成されると考えられる。この複合体は溶液中で遊離状態にあり、洗い流すことができる。ウェルの洗浄により、複合体は除去されると考えられる。続いてウェルを、ウェル中の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体の位置決定のために、TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）発色基質とともにインキュベートする。試料中の標的ポリペプチドレベルが高ければ、色調変化は全くないか、またはわずかであると考えられる。試料中に存在する標的ポリペプチドがわずかであるかまたは全くないならば、異なる複合体、すなわち固体支持体と結合した抗体反応物-標的ポリペプチドという複合体が形成される。この複合体はプレート上に固定化されており、洗浄段階では洗い流されない。その後のTMBとのインキュベーションにより、はるかに大きな色調変化が生じると考えられる。そのような競合的ELSA試験は、特異的で、感度が高く、再現性があり、かつ操作が容易である。

10

20

30

40

50

【0039】

他の異なる形態のELISAもあり、それらも当業者に周知である。ELISAのための、当技術分野において公知の標準的な手法は、"Methods in Immunodiagnosis", 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; および Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22:895-904に記載されている。これらの参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0040】

1つの態様において、試料におけるポリペプチドのレベルは、免疫クロマトグラフィーマットリックスまたはストリップ試験としても知られるラテラルフロー免疫アッセイ試験（LFIA）によって検出される。LFIAは、流体試料における抗原、例えばポリペプチドの存在（または欠如）を検出することを意図した単純なデバイスである。現在、多くのLFIA試験が、家庭での検査、医療現場での検査、または検査室での使用のいずれかを目的として、医療診断のために用いられている。LFIA試験は、試験試料が毛管作用を通して固体基質に沿って流れる免疫アッセイの一形態である。試料を試験ストリップに適用した後に、それを、試料と混ぜ、基質を移行させて、別の抗体または抗原によって前処理された線または帯域に遭遇させる、微粒子と結合した有色反応物（試験標的抗原に対して特異的な抗体を一般に含む）に遭遇させる。試料中に存在する標的ポリペプチドのレベルによっては、有色反応物を捕捉して試験線または帯域の箇所では結合させることができる。LFIAは本質的には、試験ストリップ方式またはディップスティック方式に適応するように単一の軸に沿って操作させるのに適合化された免疫アッセイである。ストリップ試験は極めて用途が広く、尿、血液、水、および/または均質化された腫瘍試料などといった流体試料から広大な範囲の抗原を検出するために当業者による容易な改変が可能である。ストリップ試験はディップスティック試験としても知られ、その名前は、試験ストリップを、試験しようとする流体試料に「浸す」という文字通りの行為からとられている。LFIAストリップ試験は用いるのが容易で、わずかな訓練しか必要とせず、現地の現場で用いるために臨床現場検査（POCT）診断法の構成要素として容易に組み入れることができる。LFIA試験は、競合アッセイまたはサンドイッチアッセイとして操作することができる。サンドイッチLFIAはサンドイッチELISAと類似している。試料をまず、標的抗原に対して産生された抗体によって標識された有色粒子に遭遇させる。試験線は同じ標的に対する抗体も含有するが、それは抗原上の異なるエピトープと結合してもよい。試験線は陽性試料では有色バンドを示すと考えられる。いくつかの態様において、ラテラルフロー免疫アッセイは、二重抗体サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、定量的アッセイ、またはそれらの変形物であってよい。競合的LFIAは競合的ELISAに類似している。試料をまず、標的抗原または類似体によって標識された有色粒子に遭遇させる。試験線は標的/その類似体に対する抗体を含有する。試料中の非標識抗原は抗体上の結合部位を遮断して、有色粒子の取り込みを妨げる。試験線は陰性試料では有色バンドとして示されると考えられる。ラテラルフロー技術にはいくつ

かの変形物がある。多重試験を作り出すために複数の捕捉帯域を適用することも可能である。

【0041】

「ディップスティック」またはLFIA試験ストリップおよび他の固体支持体の使用は、当技術分野において、いくつかの抗原バイオマーカーに関して免疫アッセイの文脈で記載されている。米国特許第4,943,522号；第6,485,982号；第6,187,598号；第5,770,460号；第5,622,871号；第6,565,808号、米国特許出願第10/278,676号；米国特許出願第09/579,673号および米国特許出願第10/717,082号は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられ、そのようなラテラルフロー試験デバイスの非限定的な例である。免疫化学アッセイを介して可溶性抗原を検出するための「ディップスティック」技術の使用を記載している特許の例には、米国特許第4,444,880号；第4,305,924号；および第4,135,884号が非限定的に含まれ、それらはそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。これらの3つの特許の装置および方法は、「ディップスティック」上に固定された構成要素と結合する可溶性抗原を含有する溶液に曝露され、その後スティック上の構成要素-抗原複合体の検出が行われる、「ディップスティック」上の固体表面上に固定された第1の構成要素を広範囲に記載している。この「ディップスティック」技術の教示を、本明細書に述べるような抗体反応物を用いるポリペプチドの検出用に改変することは、当業者の技能の範囲内にある。

10

【0042】

試料におけるポリペプチドのレベルを検出するために他の手法を用いることができる。そのような手法の1つは、ウエスタンブロット法 (Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979)) の変法の1つであるドットブロット法である。ウエスタンブロット法では、ポリペプチドまたはその断片を界面活性剤によって解離させ、SDS-PAGEゲル上で加熱および分離させた後に、ニトロセルロース膜またはPVDF膜などの固体支持体に移行させる。膜を、標的ポリペプチドまたはその断片に対して特異的な抗体反応物とともにインキュベートする。続いて膜を、非結合タンパク質および非特異的結合を有するタンパク質を除去するために洗浄する。検出可能に標識された酵素が結合した二次抗体または検出用抗体を、続いて、検査する試料中のポリペプチドの量を検出および評価するために用いることができる。検出可能な標識からのシグナルの強度は存在する酵素の量に対応し、それ故にポリペプチドの量に対応する。レベルは、例えば濃度測定によって定量することができる。

20

30

【0043】

フローサイトメトリーは、流体の流れの中に懸濁化された細胞（または他の小粒子）の分析および選別のための周知の手法の1つである。この手法により、光学的、電子的または磁気的な検出装置を通して流れる単細胞の物理的および/または化学的特性の同時分析が可能になる。FACSに適用される場合、フローサイトメーターは、単一の縦列の形にある流体の流れの中の細胞を、蛍光標識した検出用マーカー（例えば、抗体反応物）を励起させて細胞の蛍光特性を測定する光源を通過させて移送するフローセルからなる。続いて、流体の流れを加圧下でノズルおよび荷電リング (charging ring) を通して吐出させ、流体を壊して小滴にする。フローセル装置および流体の流れは、個々の細胞間または結合した細胞群間の距離が比較的大きくなり、その結果、あらゆる小滴が単細胞または結合した細胞群よりも多くを含む確率が小さくなるように較正される。荷電リングは、小滴を、その中に含有されている細胞の蛍光特性に基づいて荷電させる。荷電した小滴を続いて、小滴の進路をその電荷（細胞の蛍光強度と関係がある）に基づいて変えてさまざまな容器内に入れる、静電荷電偏向システムによって偏向させる。FACSシステム（例えば、FACSAria（商標）フローサイトメーター（BD Biosciences）およびFLOWJO（商標）バージョン7.6.4 (TreeStar)）は、総細胞数、ならびに1つまたは複数の蛍光特性を呈する細胞の数、例えば、CTCマーカー遺伝子に対して特異的な1つまたは複数の抗体反応物が結合した細胞の総数を検出して記録することができる。

40

【0044】

50

ある態様において、本明細書に述べるような遺伝子発現産物を、代わりに、本明細書に記載のマーカ-遺伝子と関連のある遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA) 発現のレベルを決定することによって決定することもできる。そのような分子は、腫瘍生検試料などの生物試料から単離すること、導き出すこと、または増幅することができる。mRNA発現の検出は当業者には公知であり、これには例えば、PCR手順、RT-PCR、定量的PCRまたはRT-PCR、ノーザンブロット分析、遺伝子発現変動、RNA保護アッセイ、マイクロアレイ分析、ハイブリダイゼーション法、次世代シーケンシングなどが非限定的に含まれる。次世代シーケンシング技術の非限定的な例には、Ion Torrent、Illumina、SOLiD、454 ; Massively Parallel Signature Sequencing固相、可逆的ダイターミネーターシーケンシング；およびDNAナノボールシーケンシングが含まれる。

10

【 0 0 4 5 】

一般に、PCR手順は、(i) 核酸試料またはライブラリー内の特定の遺伝子または配列に対するプライマーの配列特異的ハイブリダイゼーション、(ii) 耐熱性DNAポリメラーゼを用いる複数回のアニーリング、伸長および変性を伴うその後の増幅、ならびに(iii) 正しいサイズのバンドに関するPCR産物のスクリーニング、で構成される遺伝子増幅の方法を記述する。用いられるプライマーは、重合の開始をもたらすのに十分な長さおよび適切な配列を持つオリゴヌクレオチドであり、すなわち、各プライマーは、増幅しようとするゲノム遺伝子座の鎖に対して相補的となるように特別に設計される。1つの代替的な態様において、本明細書に記載の遺伝子発現産物のmRNAレベルは、逆転写 (RT) PCR法によって、および定量的RT-PCR (QRT-PCR) 法またはリアルタイムPCR法によって決定することができる。RT-PCRおよびQRT-PCRの方法は当技術分野において周知である。本明細書に記載のマーカ-遺伝子の核酸配列には、ヒト、マウスおよびラットといった種々の種についてNCBIアクセッション番号が割り当てられている。したがって、当業者は、各々の遺伝子のmRNAレベルを決定するために、公知の配列に基づいて適切なプライマーを設計することができる。

20

【 0 0 4 6 】

核酸分子およびリボ核酸 (RNA) 分子は、当技術分野において周知であるいくつかの手順のいずれかを用いて特定の生物試料から単離することができ、選択される特定の単離手順は、特定の生物試料にとって適切である。例えば、凍結融解およびアルカリ溶解手順は、固体材料から核酸分子を得るために有用でありうる；熱およびアルカリ溶解手順は、尿から核酸分子を得るために有用でありうる；かつ、プロテイナーゼK抽出は、血液から核酸を得るために用いることができる (Roiff, A et al. PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer (1994)) 。

30

【 0 0 4 7 】

一般に、PCR手順は、(i) 核酸試料またはライブラリー内の特定の遺伝子に対するプライマーの配列特異的ハイブリダイゼーション、(ii) DNAポリメラーゼを用いる複数回のアニーリング、伸長および変性を伴うその後の増幅、ならびに(iii) 正しいサイズのバンドに関するPCR産物のスクリーニング、で構成される遺伝子増幅の方法を記述する。用いられるプライマーは、重合の開始をもたらすのに十分な長さおよび適切な配列を持つオリゴヌクレオチドであり、すなわち、各プライマーは、増幅しようとする核酸分子の各鎖に対して相補的となるように特別に設計される。

40

【 0 0 4 8 】

1つの代替的な態様において、本明細書に記載の遺伝子発現産物のmRNAレベルは、逆転写 (RT) PCR法によって、および定量的RT-PCR (QRT-PCR) 法またはリアルタイムPCR法によって決定することができる。RT-PCRおよびQRT-PCRの方法は当技術分野において周知である。

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様において、本明細書に記載の反応物 (例えば、抗体反応物および / または核酸プローブ) の1つまたは複数は、検出可能な標識を含むこと、および / または検出可能なシグナル (例えば、化合物を検出可能な産物に変換する反応を触媒することによる

50

)を生じる能力を含むことができる。検出可能な標識は、例えば、光吸収性色素、蛍光色素、または放射性標識を含みうる。検出可能な標識、それらを検出する方法、およびそれらを反応物(例えば、抗体および核酸プローブ)に組み入れる方法は、当技術分野において周知である。

【0050】

いくつかの態様において、検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電磁的、放射化学的または化学的手段によって検出する標識、例えば蛍光、化学蛍光または化学発光など、または他の任意の適切な手段が含まれうる。本明細書に記載の方法に用いられる検出可能な標識は、一次標識(標識が、直接的に検出可能であるかまたは直接的に検出可能なモイエティーを生成するモイエティーを含む場合)であってもよく、または二次標識(検出可能な標識が、例えば二次抗体および三次抗体を用いる免疫学的標識において一般的であるように、検出可能なシグナルを生じるように別のモイエティーと結合する場合)であってもよい。検出可能な標識は、共有結合的または非共有結合的手段によって反応物と連結させることができる。または、リガンド-受容体結合対配置を介して反応物との結合を実現する分子、または他のそのような特異的認識分子を直接的に標識することなどによって、検出可能な標識を連結させることもできる。検出可能な標識には、放射性同位体、生物発光化合物、発色団、抗体、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート、および酵素が非限定的に含まれうる。

【0051】

他の態様において、検出反応物は、蛍光化合物を有する標識である。蛍光標識された抗体が適正な波長の光に曝露されると、その存在を蛍光によって検出することができる。いくつかの態様において、検出可能な標識は、蛍光色素分子または蛍光団であってよく、これには、フルオレセイン、フィコエリトリン、フィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、フルオレサミン、Cy3(商標)、Cy5(商標)、アロフィコシアニン、テキサスレッド、ペリデニクロロフィル、シアニン、タンデムコンジュゲート、例えばフィコエリトリン-Cy5(商標)など、緑色蛍光タンパク質、ローダミン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)およびオレゴングリーン(商標)、ローダミンおよび誘導体(例えば、テキサスレッドおよびテトラローダミンイソチオシアネート(TRITC))、ピオチン、フィコエリトリン、AMCA、CyDyes(商標)、6-カルボキシフルオレセイン(6-carboxyfluorescein)(略号FAMおよびFによって一般的に知られる)、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(6-carboxy-2',4',7',4,7-hexachlorofluorescein)(HEX)、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein)(JOEまたはJ)、N,N,N',N'-テトラメチル-6カルボキシローダミン(TAMRAまたはT)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROXまたはR)、5-カルボキシローダミン-6G(R6G5またはG5)、6-カルボキシローダミン-6G(R6G6またはG6)、およびローダミン110;シアニン色素、例えば、Cy3、Cy5およびCy7色素;クマリン、例えばウンベリフェロン;ベンジミド色素、例えば、Hoechst 33258;フェナントリジン色素、例えば、テキサスレッド;エチジウム色素;アクリジン色素;カルバゾール色素;フェノキサジン色素;ポルフィリン色素;ポリメチン色素、例えば、シアニン色素、例えばCy3、Cy5など;BODIPY色素ならびにキノリン色素が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、検出可能な標識は、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²Pおよび³³Pを非限定的に含む放射性標識であってよい。いくつかの態様において、検出可能な標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを非限定的に含む酵素であってよい。酵素標識は、例えば、化学発光シグナル、色シグナル、または蛍光シグナルを生じうる。抗体反応物を検出可能に標識するために用いることを想定している酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 α -V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが非限定

10

20

30

40

50

的に含まれる。いくつかの態様において、検出可能な標識は、ルシゲニン、ルミノール、ルシフェリン、イソルミノール、テロマトック (theromatic) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルを非限定的に含む化学発光標識である。いくつかの態様において、検出可能な標識は、コロイド金または着色ガラスまたはプラスチック (例えば、ポリスチレン、ポリプロピレンおよびラテックス) ビーズを非限定的に含むスペクトル比色標識であってよい。

【0052】

いくつかの態様において、検出反応物が、検出可能なタグ、例えばc-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5、HISまたはビオチンなどによって標識されていてもよい。他の検出系、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン系を用いることもできる。この系では、関心対象のバイオマーカーに対して免疫反応性がある (すなわち、特異的な) 抗体をビオチン化する。バイオマーカーと結合したビオチン化抗体の数量を、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲートおよび発色 (chromagenic) 基質を用いて決定する。そのようなストレプトアビジンペルオキシダーゼ検出キットは、例えば、DAKO ; Carpinteria, CAから市販されている。また、反応物を、 ^{152}Eu またはランタン系列の他のものなどの蛍光発光金属を用いて検出可能に標識することもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの金属キレート基を用いて反応物に結びつけることができる。

【0053】

本明細書に記載の諸局面のいずれかのいくつかの態様において、複数の遺伝子の発現産物のレベルは同時に決定することもでき (例えば、多重アッセイ)、または並行して決定することもできる。いくつかの態様においては、200種を上回らない他の遺伝子の発現産物のレベルを決定する。いくつかの態様においては、100種を上回らない他の遺伝子の発現産物のレベルを決定する。いくつかの態様においては、20種を上回らない他の遺伝子の発現産物のレベルを決定する。いくつかの態様においては、10種を上回らない他の遺伝子の発現産物のレベルを決定する。

【0054】

「試料」または「試験試料」という用語は、本明細書で用いる場合、生物体から採取または単離された試料、例えば、対象由来の腫瘍試料のことを表す。例示的な生物試料には、生物流体試料; 血清; 血漿; 尿; 唾液; 腫瘍試料; 腫瘍生検試料および/または組織試料などが非限定的に含まれる。この用語はまた、上述した試料の混合物も含む。「試験試料」という用語はまた、処理されていない、または前処理された (または前加工処理された) 生物試料も含む。いくつかの態様において、試験試料は対象由来の細胞を含みうる。いくつかの態様において、試験試料は腫瘍細胞試験試料であってよく、例えば、試料は癌性細胞、腫瘍由来の細胞、および/または腫瘍生検試料を含みうる。いくつかの態様において、試験試料は血液試料であってよい。

【0055】

試験試料は、細胞の試料を対象から取り出すことによって得ることができるが、以前に単離された細胞 (例えば、事前の時点で単離され、かつ同じであるかまたは別の人によって単離された) を用いて実現することもできる。加えて、試験試料は新たに収集された試料であってよく、または以前に収集された試料であってよい。

【0056】

いくつかの態様において、試験試料は処理されていない試験試料である。本明細書で用いる場合、「処理されていない試験試料」という語句は、溶液中での希釈および/または懸濁化を除いて、事前の試料前処理を受けていない試験試料のことを指す。試験試料を処理するための例示的な方法には、遠心分離、濾過、超音波処理、均質化、加熱、凍結および融解、ならびにそれらの組み合わせが非限定的に含まれる。いくつかの態様において、試験試料は凍結された試験試料、例えば、凍結組織であってよい。凍結試料は、本明細書に記載の方法、アッセイおよびシステムを使用する前に融解させることができる。融解後に、凍結試料を遠心分離して、その後本明細書に記載の方法、アッセイおよびシステム

10

20

30

40

50

に供することができる。いくつかの態様において、試験試料は、清澄化された試験試料、例えば、遠心分離、および清澄化された試験試料を含む上清の収集によるものである。いくつかの態様において、試験試料は、前加工処理された試験試料、例えば、遠心分離、濾過、融解、精製およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される処理に起因する上清または濾液であってよい。いくつかの態様において、試験試料は、化学的および/または生物学的反応物によって処理されていてよい。化学的および/または生物学的反応物は、加工処理中の、試料中の生体分子（例えば、核酸およびタンパク質）を含む、試料の安定性を保護および/または維持するために使用することができる。1つの例示的な反応物はプロテアーゼ阻害薬であり、これは一般に、加工処理中のタンパク質の安定性を保護および/または維持するために用いられる。当業者は、本明細書に述べるような発現産物のレベルの決定のために必要とされる生物試料の前加工処理のために適切な方法および過程を十分に把握している。

10

【0057】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法、アッセイおよびシステムは、対象から試験試料を得る段階をさらに含む。いくつかの態様において、対象はヒト対象であってよい。

【0058】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法およびアッセイは、本明細書に記載のマーカ-遺伝子のうち1つまたは複数の発現産物のレベルを測定するために、CTCまたはCTCの可能性のあるものを試料から単離する段階をさらに含む。非限定的な例として、CTCは、例えば、流体力学的サイズに基づく分離、および/または血液試料中に存在する他の細胞型の免疫枯渇（immunodepletion）によって、血液試料から単離することができる。本明細書において実施例に記載されているCTC-iChipは、CTCを単離するためのこれらの2つのアプローチを組み合わせている。

20

【0059】

CTCのレベルが高いか、または少なくとも検出可能である対象は、CTCを特異的に標的とする治療法による治療によって恩恵を受ける可能性が非常に高い。したがって、本明細書において提供されるのは、対象がCTCマーカ-遺伝子標的療法による治療に反応する可能性が高いか否かを判定する方法であって、血液中および/または癌の間質中に存在するCTCマーカ-遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびに発現産物のレベルが参照基準レベルに比して高い場合に、対象が治療に反応する可能性が高いと判定する段階、を含む方法である。CTCマーカ-遺伝子標的療法について、本明細書において以下に考察する。

30

【0060】

治療法の投与後のCTCレベルの低下は、対象の病状の改善、例えば、癌のサイズ、増殖、および/または転移能が低下したことの指標となりうる。したがって、本明細書において提供されるのは、対象の治療をモニターするための方法であって、癌治療法をそれを必要とする対象に投与する段階；血液中および/または癌の間質中に存在するCTCマーカ-遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびにCTCマーカ-遺伝子発現産物のレベルが参照基準レベルに比して低い場合に対象が反応していると判定し、CTCマーカ-遺伝子発現産物が参照基準レベルに比して低くない場合に対象が治療に反応していないと判定する段階、を含む方法である。いくつかの態様において、治療法は化学療法、外科療法、および/または放射線療法である。いくつかの態様において、治療法はCTCマーカ-遺伝子標的療法である。いくつかの態様において、参照基準レベルは、投与の段階の前の患者における遺伝子発現産物のレベルである。

40

【0061】

本明細書に記載のCTCマーカ-遺伝子を直接的に標的化すること、ならびに/またはCTCのレベルおよび/もしくは病原性活性（例えば、転移活性）を低下させるために化学療法薬を物理的に標的化するために用いることができる。したがって、本明細書に記載されるのは、対象における癌を治療する方法であって、CTCマーカ-遺伝子標的療法の治療的有

50

効量を対象に投与する段階を含む方法である。いくつかの態様において、対象は、CTCのレベルが高値である、ならびに/または血液中および/もしくは癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子のレベルが高値であると判定された対象である。

【0062】

いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法はCTCマーカー遺伝子の阻害薬を含むことができ、例えば、CTCマーカー遺伝子標的療法は、CTCマーカー遺伝子のレベルおよび/または活性を阻害することができる。本明細書で用いる場合、「阻害薬」という用語は、標的化された発現産物（例えば、標的をコードするmRNA、または標的ポリペプチド）の発現および/または活性を、例えば、少なくとも10%またはそれを上回って、例えば、10%もしくはそれを上回って、50%もしくはそれを上回って、70%もしくはそれを上回って、80%もしくはそれを上回って、90%もしくはそれを上回って、95%もしくはそれを上回って、または98%もしくはそれを上回って低下させることのできる作用物質のことを指す。CTCマーカー遺伝子の阻害薬の有効性、例えば、それがCTCマーカー遺伝子のレベルおよび/または活性を低下させる能力は、例えば、CTCマーカー遺伝子の発現産物のレベルおよび/または活性を測定することによって決定することができる。ある所与のmRNAおよび/またはポリペプチドのレベルを測定するための方法は当業者に公知であり、例えば、RNAのレベルを決定するためにプライマーを用いるRTPCRを用いること、およびポリペプチドのレベルを決定するために抗体を用いるウエスタンブロット法を用いることができる。例えばCTCマーカー遺伝子の活性は、例えば、当技術分野において公知であって本明細書中の他所に記載されている方法を用いて、CTCのレベルおよび/または生存を測定することによって測定することができる。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子の阻害薬は、阻害性核酸；アプタマー；抗体反応物；抗体；または小分子であってよい。

10

20

【0063】

いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子の阻害薬は抗体反応物であってよい。本明細書で用いる場合、「抗体」とは、抗体を天然に産生するいずれかの種に由来するか、または組換えDNA技術によって作り出されるかに関係なく；血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクターマ、酵母または細菌のいずれから単離されるかにも関係なく、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE分子、またはそれらの抗原特異的抗体断片（Fab、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、単一ドメイン抗体、閉構造多重特異性抗体、ジスルフィド結合型scfv、ダイアボディを非限定的に含む）のことを指す。

30

【0064】

本明細書に述べるように、「抗原」は、抗体物質上の結合部位による結合を受ける分子のことである。典型的には、抗原は抗体リガンドによる結合を受け、インビボで抗体を産生させることができる。抗原はポリペプチド、タンパク質、核酸もしくは他の分子、またはそれらの部分であってよい。「抗原決定基」という用語は、抗原結合性分子、より詳細には前記分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープのことを指す。

【0065】

本明細書で用いる場合、「抗体反応物」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、かつある所与の抗原と特異的に結合するポリペプチドのことを指す。抗体反応物は、抗体、または抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを含みうる。いくつかの態様において、抗体反応物は、モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを含みうる。例えば、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書ではVHと略記）および軽（L）鎖可変領域（本明細書ではVLと略記）を含みうる。もう1つの例では、抗体は2つの重（H）鎖可変領域および2つの軽（L）鎖可変領域を含みうる。「抗体反応物」という用語は、抗体の抗原結合性断片（例えば、単鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、scFv、およびドメイン抗体（dAb）断片（例えば、de Wildt et al., Eur J. Immunol. 1996; 26(3):629-39を参照；これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる））ならびに完全な抗体を範囲に含む。抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM（ならびにそれらのサブタイプおよびそれらの組み合わせ）の構造的特徴を有しうる。抗体は、マウス、ウ

40

50

サギ、ブタ、ラットおよび霊長動物（ヒトおよび非ヒト霊長動物）抗体ならびに霊長類化抗体を含む、任意の供給源に由来してよい。抗体にはまた、ミニボディ、ヒト化抗体、キメラ抗体なども含まれる。

【0066】

VH領域およびVL領域は、「相補性決定領域」（「CDR」）と名づけられた超可変性領域と、その間に散在する、「フレームワーク領域」（「FR」）と名づけられたより保存性の高い領域にさらに細分することができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は以前に明確にされている（Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照；それらはそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる）。各VHおよびVLは典型的には、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置された3つのCDRおよび4つのFRで構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

10

【0067】

「抗原結合性断片」または「抗原結合ドメイン」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、関心対象の標的と特異的に結合する能力を保持している完全長抗体の1つまたは複数の断片を指して用いられる。完全長抗体の「抗原結合性断片」という用語の範囲に含まれる結合性断片の例には、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(iii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインまたはVLドメインからなるdAb断片（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546；これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる）；および(vi) 特異的な抗原結合機能を保持している、単離された相補性決定領域（CDR）。本明細書で用いる場合、「特異的結合」という用語は、第1の実体が、第2の標的実体と、それが標的でない第3の実体と結合するよりも高い特異性および親和性で結合する、2つの分子、化合物、細胞および/または粒子の間の化学的相互作用のことを指す。いくつかの態様において、特異的結合は、第2の標的実体に対する第1の実体の親和性が、第3の非標的実体に対する親和性よりも少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、またはそれを上回ることを指すことができる。

20

30

【0068】

さらに、かつ本明細書に述べるように、組換えヒト化抗体を、ヒトにおける治療法のために、機能的活性を維持しながら潜在的な免疫原性を低下させるために、さらに最適化することができる。この点に関して、機能的活性とは、本明細書に述べるような組換え抗体またはその抗体反応物に付随する1つまたは複数の既知の機能的活性を示すことができるポリペプチドを意味する。そのような機能的活性には、例えば、ある所与のCTCマーカー遺伝子と結合する能力が含まれる。

【0069】

いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子の阻害薬は、阻害性核酸反応物であってよい。いくつかの態様において、阻害性核酸は阻害性RNA（iRNA）である。二本鎖RNA分子（dsRNA）は、RNA干渉（RNAi）として知られる高度に保存された調節機構で遺伝子発現を阻止することが示されている。本明細書に記載の阻害性核酸は、長さが30ヌクレオチドまたはそれ未満、すなわち15~30ヌクレオチドの長さ、一般に19~24ヌクレオチドの長さを有するRNA鎖（アンチセンス鎖）の領域を有し、その領域は標的化されたmRNA転写物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である。これらのiRNAの使用により、mRNA転写物の標的化分解が可能になり、その結果として標的の発現および/または活性の低下がもたらされる。

40

【0070】

本明細書で用いる場合、「iRNA」という用語は、この用語が本明細書において定義されるようにRNAを含み、かつRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）経路を介してRNA転写物

50

の標的化切断を媒介する作用物質のことを指す。1つの態様において、本明細書に述べるようなiRNAは、標的mRNAの発現および/または活性の障害を生じさせる。ある態様においては、細胞を阻害薬（例えば、iRNA）と接触させることにより、その結果として、細胞における標的mRNAレベルは、iRNAが存在しない細胞内で見いだされる標的mRNAレベルの少なくとも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、最大で100%までの減少をもたらす。

【0071】

いくつかの態様において、iRNAはdsRNAであってよい。dsRNAは、dsRNAが用いられる条件下でハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分に相補的である2本のRNA鎖を含む。dsRNAの一方の鎖（アンチセンス鎖）は、標的配列に対して実質的に相補的であり、一般に完全に相補的である相補性領域を含む。標的配列は、標的の発現の間に形成されるmRNAの配列に由来しうる。もう一方の鎖（センス鎖）は、アンチセンス鎖に対して相補的である領域を含み、その結果、2本の鎖は、好適な条件下で組み合わされるとハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。一般に、二重鎖構造は15塩基対以上30塩基対以下であり、より一般的には18塩基対以上25塩基対以下であり、さらにより一般的には19塩基対以上24塩基対以下であり、最も一般的には19塩基対以上21塩基対以下である。同様に、標的配列に対する相補性領域は15ヌクレオチド長以上30ヌクレオチド長以下であり、より一般的には18ヌクレオチド長以上25ヌクレオチド長以下であり、さらにより一般的には19ヌクレオチド長以上24ヌクレオチド長以下であり、最も一般的には19ヌクレオチド長以上21ヌクレオチド長以下である。いくつかの態様において、dsRNAは15ヌクレオチド長以上20ヌクレオチド長以下であり、他の態様において、dsRNAは25ヌクレオチド長以上30ヌクレオチド長以下である。当業者は認識しているであろうが、切断のための標的となるRNAの標的領域は、ほとんどの場合、より大きいRNA分子の一部、しばしばmRNA分子である。該当する場合、mRNA標的の「一部」は、RNAi指向性切断（すなわち、RISC経路を経由する切断）のための基質であるのに十分な長さであるmRNA標的の連続した配列である。9塩基対ほどの長さである二重鎖を有するdsRNAは、ある状況下では、RNAi指向性RNA切断を媒介する。ほとんどの場合、標的は少なくとも15ヌクレオチド長、好ましくは15~30ヌクレオチド長である。

【0072】

さらにもう1つの態様において、iRNAのRNA、例えば、dsRNAは、安定性または他の有益な特性を強化するために化学修飾される。本発明において特徴となる核酸は、"Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されているもののような、当技術分野において十分確立された方法によって合成および/または修飾することができ、これらは参照により本明細書に組み込まれる。修飾には、例えば、(a)末端修飾、例えば、5'端修飾（リン酸化、コンジュゲーション、逆結合など）、3'端修飾（コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、逆結合など）など、(b)塩基修飾、例えば、安定化塩基、不安定化塩基、もしくはパートナーの広範なレパートリーと塩基対合する塩基による置き換え、塩基の除去（脱塩基ヌクレオチド）、またはコンジュゲートされた塩基など、(c)糖修飾（例えば、2'位または4'位で）、または糖の置き換え、ならびに(d)ホスホジエステル結合の修飾または置き換えを含む骨格修飾が含まれる。本明細書に記載の態様において有用なRNA化合物の具体例には、修飾された骨格を含むか、または天然のヌクレオシド間結合を含まないRNAが非限定的に含まれる。修飾された骨格を有するRNAには、とりわけ、骨格にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書においては、かつ当技術分野において時に言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾されたRNAもオリゴヌクレオシドであると見なすことができる。特定の態様において、修飾されたRNAは、そのヌクレオシド間骨格内にリン原子を有する。

【0073】

修飾されたRNA骨格は、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-ア

10

20

30

40

50

ルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに通常の3'-5'結合を有するポラノホスフェート、2'-5'結合したこれらの類似体、ならびにヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'へ、または2'-5'から5'-2'へ結合する、逆向きの極性を有するものを含むことができる。また、さまざまな塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。上記のリン含有結合の調製を教示している代表的な米国特許には、米国特許第3,687,808号；第4,469,863号；第4,476,301号；第5,023,243号；第5,177,195号；第5,188,897号；第5,264,423号；第5,276,019号；第5,278,302号；第5,286,717号；第5,321,131号；第5,399,676号；第5,405,939号；第5,453,496号；第5,455,233号；第5,466,677号；第5,476,925号；第5,519,126号；第5,536,821号；第5,541,316号；第5,550,111号；第5,563,253号；第5,571,799号；第5,587,361号；第5,625,050号；第6,028,188号；第6,124,445号；第6,160,109号；第6,169,170号；第6,172,209号；第6,239,265号；第6,277,603号；第6,326,199号；第6,346,614号；第6,444,423号；第6,531,590号；第6,534,639号；第6,608,035号；第6,683,167号；第6,835,826号；第6,858,715号；第6,867,289号；第6,867,294号；第6,878,805号；第7,015,315号；第7,041,816号；第7,273,933号；第7,321,029号；第7,834,171号；第7,919,612号；第7,960,360号；第7,989,603号；第8,309,707号；第6,524,681号；および米国特許RE39464号が非限定的に含まれ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

【0074】

内部にリン原子を含まない修飾されたRNA骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混在性のヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（一部はヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサ骨格；硫化物、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファミン酸骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混在性のN、O、SおよびCH₂構成要素部分を有する他のもの、を有するものが含まれる。上記のオリゴヌクレオシドの調製を教示している代表的な米国特許には、米国特許第5,034,506号；第5,166,315号；第5,185,444号；第5,214,134号；第5,216,141号；第5,235,033号；第5,64,562号；第5,264,564号；第5,405,938号；第5,434,257号；第5,466,677号；第5,470,967号；第5,489,677号；第5,541,307号；第5,561,225号；第5,596,086号；第5,602,240号；第5,608,046号；第5,610,289号；第5,618,704号；第5,623,070号；第5,663,312号；第5,633,360号；第5,677,437号、および第5,677,439号が非限定的に含まれ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0075】

iRNAにおける使用が好適であるかまたは想定される他のRNA模倣体では、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち骨格が、新規の基によって置き換えられる。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているそのようなオリゴマー化合物の1つであるRNA模倣体は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物では、RNAの糖骨格が、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置き換えられる。核酸塩基は保たれ、骨格のアミド部分のアザ窒素原子と直接的または間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示している代表的な米国特許には、米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；および第5,719,262号が非限定的に含まれ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。PNA化合物のさらなる教示は、例えば、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見いだすことができる。

40

【0076】

50

本発明において特徴となるいくつかの態様は、ホスホロチオエート骨格を有するRNA、ならびにヘテロ原子骨格、特に上述の米国特許第5,489,677号の $--CH_2--NH--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として知られる]、 $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$ 、 $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ 、および $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [式中、ネイティブ性のホスホジエステル骨格は $--O--P--O--CH_2--$ として表される]、ならびに上述の米国特許第5,602,240号のアミド骨格を有するオリゴヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、本明細書において特徴となるRNAは、上述の米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有する。

【0077】

また、修飾されたRNAは、1つまたは複数の置換糖モイエティーも含有しうる。本明細書において特徴となるiRNA、例えばdsRNAは、2'位に以下のうち1つ：OH；F；O-、S-もしくはN-アルキル；O-、S-もしくはN-アルケニル；O-、S-もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、を含むことができ、ここでアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換型または非置換型の $C_1 \sim C_{10}$ アルキルまたは $C_2 \sim C_{10}$ アルケニルおよびアルキニルであってよい。例示的な適した修飾には、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ が含まれ、式中、 n および m は、1~約10である。他の態様において、dsRNAは、2'位に以下のうち1つを含む： $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラキル、O-アルカリル、もしくはO-アラキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、介入物、iRNAの薬物動態特性を改善するための基、またはiRNAの薬力学的特性を改善するための基、ならびに類似した特性を有する他の置換基。いくつかの態様において、修飾には、2'-メトキシエトキシ(2'-O--CH₂CH₂OCH₃、これは2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる)(Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504)、すなわちアルコキシ-アルコキシ基が含まれる。もう1つの例示的な修飾は、本明細書において以下の実施例に述べるような、2'-DMAOEとしても知られる2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、および同じく本明細書において以下の実施例に記載される、2'-ジメチルアミノオキシエトキシエトキシ(当技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても知られる)、すなわち $2'-O--CH_2--O--CH_2--N(CH_2)_2$ である。

【0078】

他の修飾には、2'-メトキシ(2'-OCH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。同様の修飾を、iRNAのRNA上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上または2'-5'結合dsRNA内の糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位に行うこともできる。また、iRNAが、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチルモイエティーなどの糖模倣体を有してもよい。そのような修飾糖構造の調製を教示している代表的な米国特許には、米国特許第4,981,957号；第5,118,800号；第5,319,080号；第5,359,044号；第5,393,878号；第5,446,137号；第5,466,786号；第5,514,785号；第5,519,134号；第5,567,811号；第5,576,427号；第5,591,722号；第5,597,909号；第5,610,300号；第5,627,053号；第5,639,873号；第5,646,265号；第5,658,873号；第5,670,633号、および第5,700,920号；第8,084,600号；第8,124,745号；第8,377,644号が非限定的に含まれ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

【0079】

iRNAはまた、核酸塩基(当技術分野ではしばしば単に「塩基」と称される)修飾または置換も含みうる。本明細書で用いる場合、「非修飾」もしくは「天然」の核酸塩基には、プリン塩基であるアデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)が含まれる。修飾された核酸塩基には、他の合成性および天然性の核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよ

10

20

30

40

50

び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル（シュードウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどが含まれる。さらなる核酸塩基には、米国特許第3,687,808号に開示されたもの、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008に開示されたもの；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されたもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613によって開示されたもの、およびSanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993によって開示されたものが含まれる。これらの核酸塩基のうちある種のもは、本発明において特徴となるオリゴマー化合物の結合親和性を高めるために特に有用である。これらには、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6およびO-6置換プリンが含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2 高めることが示されており（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、例示的な塩基置換であり、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられると、さらに特に有用である。

【0080】

上述した修飾された核酸塩基のある種のもの、ならびに他の修飾された核酸塩基の調製を教示している代表的な米国特許には、上述した米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号；第5,130,30号；第5,134,066号；第5,175,273号；第5,367,066号；第5,432,272号；第5,457,187号；第5,459,255号；第5,484,908号；第5,502,177号；第5,525,711号；第5,552,540号；第5,587,469号；第5,594,121号；第5,596,091号；第5,614,617号；第5,681,941号；第6,015,886号；第6,147,200号；第6,166,197号；第6,222,025号；第6,235,887号；第6,380,368号；第6,528,640号；第6,639,062号；第6,617,438号；第7,045,610号；第7,427,672号；および第7,495,088号が非限定的に含まれ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられ、米国特許第5,750,692号も参照により本明細書に組み込まれる。

【0081】

また、iRNAのRNAを、1つまたは複数のロックド核酸（LNA）を含むように修飾することもできる。ロックド核酸は、修飾リボースモイエティーを有するヌクレオチドであり、このリボース部分は、2'および4'炭素を接続する追加の架橋を含む。この構造は、リボースを3'-endo構造配座に効果的に「ロックする」。siRNAに対するロックド核酸の付加は、血清中のsiRNAの安定性を高め、オフターゲット効果を低下させることが示されている（Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447；Mook, OR. et al., (2007) Mol Cane Ther 6(3):833-843；Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193）。ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示している代表的な米国特許には、米国特許第6,268,490号；第6,670,461号；第6,794,499号；第6,998,484号；第7,053,207号；第7,084,125号；および第7,399,845号が非限定的に含まれ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

【0082】

本発明において特徴となるiRNAのRNAのもう1つの修飾は、iRNAの活性、細胞分布、薬物動態学的特徴、またはiRNAの細胞内取り込みを強化する1つまたは複数のリガンド、モイエティーまたはコンジュゲートと、RNAとを化学的に連結させることを伴う。そのような

モイエティールには、コレステロールモイエティール (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556)、コール酸 (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ペリル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10: 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-ホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654)、パルミチルモイエティール (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキサシルアミノ-カルボニルオキシコレステロールモイエティール (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937)などの脂質部分が非限定的に含まれる。

10

【0083】

いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法は、CTCマーカー遺伝子発現産物と結合する作用物質を含むことができ、作用物質は化学療法剤である。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法は、CTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物および化学療法薬を含む。CTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物は、例えば、CTCマーカー遺伝子ポリペプチドと結合する抗体反応物であってよい。結合抗体反応物は阻害薬であってよく、またはそれ自体では阻害効果を示さなくてもよい。CTCマーカー遺伝子と、それ故にCTCと結合することにより、それは化学療法薬を循環血液中および/または腫瘍の間質中のCTC細胞内に濃縮および局在させ、有効性を高めるとともに副作用を低下させる。

20

【0084】

いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法は、表14から選択されるマーカー遺伝子と結合するCTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物を含む。いくつかの態様において、CTCマーカー遺伝子標的療法は、以下からなる群より選択されるマーカー遺伝子と結合するCTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物を含む：IL6ST、SULF2、およびSV2A。

30

【0085】

本明細書で用いる場合、「化学療法薬」という用語は、異常な細胞増殖を特徴とする疾患の治療において治療的有用性を有する、あらゆる化学的または生物学的な作用物質のことを指す。そのような疾患には、腫瘍、新生物および癌、ならびに過形成性増殖を特徴とする疾患が含まれる。これらの作用物質は、癌細胞が持続的増殖のために依存している細胞活性を阻害するように機能することができる。すべての態様のいくつかの局面において、化学療法薬は細胞周期阻害薬または細胞分裂阻害薬である。本発明の方法において有用な化学療法薬のカテゴリーには、アルキル化/アルカノイド剤、代謝拮抗剤、ホルモンまたはホルモン類似体、および多種多様な抗悪性腫瘍薬が含まれる。これらの作用物質のほとんどは、癌細胞に対して直接的にまたは間接的に毒性がある。1つの態様において、化学療法薬は放射性分子である。当業者は、有用な化学療法薬を容易に特定することができる (例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed. 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D S, Knobf M F, Durivage H J (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993を参照)。いくつかの態様において、化学療法薬は細胞傷害性化学療法薬である。本明細書で用いる「細胞傷害性薬物」という用語は、細胞の機能を阻害するかもしくは妨げる、かつ/または細胞の

40

50

破壊を引き起こす物質のことを指す。この用語は、放射性同位体（例えば、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬および毒素、例えば、細菌、真菌、植物または動物由来の小分子毒素または酵素活性のある毒素を、その断片および/または変異体を含めて含むものとする。

【 0 0 8 6 】

化学療法薬の非限定的な例には、ゲムシタピン、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、AMG479、ポリノスタット、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、ABT-737、PI-103；アルキル化剤、例えばチオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロフォスファミドなど；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなど；アジリジン、例えばベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパおよびウレドーパなど；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミン（trimethylolomelamine）を含むエチレンイミンおよびメチラメラミン（methyramelamine）；アセトゲニン（特にプラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン（ranimustine）など；抗生物質、例えばエンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン 1Iおよびカリケアマイシン 1I（例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照）；ダイネミシンAを含むダイネミシン；ピスホスホネート、例えばクロドロネートなど；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連した色素タンパク質エンジイン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン（ADRIAMYCIN）（登録商標）ドキシソルピシン（モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンCなど、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗剤、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）など；葉酸類似体、例えばデノブテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなど；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えばアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなど；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗副腎薬、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補給剤、例えばフロリン酸など；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エフロルニチン（elifornitine）；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロ

10

20

30

40

50

キシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサマイトシンなど；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール（mopidanmol）；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖類複合体（JHS Natural Products, Eugene, Oreg.）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン（sizofuran）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンAおよびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、タキソール（TAXOL）（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、パクリタキセルのクレモフォール無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.）であるアブラキサン（ABRAXANE）（登録商標）、およびタキソテール（TAXOTERE）（登録商標）ドキセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシル；ジェムザール（GEMZAR）（登録商標）ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えばシスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンなど；ビンブラスチン；白金；エトボシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ナベルピン（NAVELBINE）（登録商標）ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（Camptosar, CPT-11）（イリノテカンと5-FUおよびロイコボリンとの治療レジメンを含む）；トポイソメラーゼ阻害薬RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド、例えばレチノイン酸など；カペシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン（LV）；オキサリプラチン治療レジメン（FOLFOX）を含む、オキサリプラチン；ラパチニブ（Tykerb（登録商標））；細胞増殖を低下させるPKC-、Raf、H-Ras、EGFR（例えば、エルロチニブ（タルセバ（Tarceva）（登録商標）））およびVEGF-Aの阻害薬、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が含まれる。

10

20

30

40

50

【0087】

いくつかの態様においては、結合抗体反応物と化学療法薬を直接的にコンジュゲートさせること、および/または互いに結合させることができ、例えば、それが抗体-薬物コンジュゲートであってもよい。いくつかの態様において、結合は、例えば水素、静電またはファンデルワールス相互作用による非共有結合性であってもよいが、しかし、結合が共有結合性であってもよい。「コンジュゲートされた」とは、少なくとも2つの分子の共有結合を意味する。いくつかの態様において、組成物は抗体-薬物コンジュゲートであってもよい。

【0088】

いくつかの態様において、結合抗体反応物を、複数の化学療法用分子と結合させること、および/またはコンジュゲートさせることができる。いくつかの態様において、ある所与の化学療法用分子と結合抗体反応物分子との比は約1：1～約1,000：1であってよく、例えば、単一の抗体結合反応物分子を、約1～約1,000個の個々の化学療法用分子と連結させること、コンジュゲートさせること、などができる。

【0089】

いくつかの態様において、結合抗体反応物および化学療法薬がスカフォールド材料の中に存在してもよい。治療用組成物に用いるのに適したスカフォールド材料は当技術分野において公知であり、これには、ナノ粒子；マトリックス；ヒドロゲル；ならびに生体材料性、生体適合性、および/または生分解性のスカフォールド材料が非限定的に含まれる。本明細書で用いる場合、「ナノ粒子」という用語は、約 10^{-9} すなわち10億分の1メートルのオーダーである粒子のことを指す。「ナノ粒子」という用語は、ナノスフェア；ナノロッド；ナノシェル；およびナノプリズムを含み、これらのナノ粒子はナノネットワークの一部であってもよい。

【0090】

「ナノ粒子」という用語はまた、ナノ粒子のサイズを有するリポソームおよび脂質粒子も範囲に含む。本明細書で用いる場合、「マトリックス」という用語は、本明細書に記載の組成物 (composition) の構成成分 (例えば、結合反応物、キナーゼ阻害薬、および/またはEGFR阻害薬) を含む3次元構造のことを指す。マトリックス構造の非限定的な例には、発泡体; ヒドロゲル; エレクトロスピンニング法による繊維 (electrospun fiber); ゲル; 繊維マット; スポンジ; 3次元スカフォールド; 不織マット; 織物; 編み物; ファイバーバンドル; ならびに繊維および他の材料形式 (例えば、Rockwood et al. Nature Protocols 2011 6: 1612-1631、および米国特許出願公開第2011/0167602号; 第2011/0009960号; 第2012/0296352号; および米国特許第8,172,901号を参照されたい; これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。マトリックスの構造は、組成物の意図する用途に応じて当業者によって選択可能であり、例えば、エレクトロスピンニング法によるマトリックスは、発泡体よりも大きな表面積を有しうる。

10

【0091】

いくつかの態様において、スカフォールドはヒドロゲルである。本明細書で用いる場合、「ヒドロゲル」という用語は、水に不溶性であるが、大量の水を吸収および保持して、安定した、多くの場合は柔軟で曲げやすい構造を形成する、三次元ポリマー構造のことを指す。いくつかの態様においては、水がポリマーネットワークのポリマー鎖の間に浸透して、その後ヒドロゲルの膨潤および形成を引き起こすことができる。一般に、ヒドロゲルは高吸収性である。ヒドロゲルは、生物医学用途にとって多くの望ましい特性を有する。例えば、それらは無毒性で組織との適合性があるように作ることができ、かつそれらは水、イオンおよび小分子の透過性が高い。ヒドロゲルは超吸収性 (それらは99%を上回る水分を含有しうる) であり、天然性 (例えば、絹) または合成性のポリマー、例えばPEGで構成されうる。

20

【0092】

本明細書で用いる場合、「生体材料」という用語は、生体適合性および生分解性である材料のことを指す。本明細書で用いる場合、「生体適合性」という用語は、細胞に対する毒性のない物質のことを指す。いくつかの態様において、物質は、インビトロでの細胞に対するその添加が、およそ20%未満またはそれに等しい細胞死をもたらす場合に「生体適合性」であると見なされる。いくつかの態様において、物質は、インビボでの細胞に対するその添加が、インビボで炎症および/または他の有害作用を誘導しない場合に「生体適合性」であると見なされる。本明細書で用いる場合、「生分解性」という用語は、生理的条件下で分解される物質のことを指す。いくつかの態様において、生分解性物質は、細胞機構によって分解される物質である。いくつかの態様において、生分解性物質は、化学的過程によって分解される物質である。

30

【0093】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法は、癌を有するかまたは癌を有すると診断された対象を、CTCマーカー遺伝子標的療法によって治療することに関する。いくつかの態様において、癌は膵癌であってよい。癌を有する対象は、癌を診断する現行の方法を用いて、医師によって同定されうる。これらの病状を特徴づけるとともに診断にも役立つ、癌、例えば膵癌の症状および/または合併症は、当技術分野において周知であり、上腹部の疼痛、胸やけ、悪心、嘔吐、下痢、悪液質、黄疸、肺塞栓症、トルソー症候群、および真性糖尿病が非限定的に含まれる。膵癌の診断に役立つ検査には、例えば、肝機能検査、CA19-9検査、CTおよび超音波内視鏡検査が非限定的に含まれる。膵癌の家族歴、または膵癌の危険因子 (例えば、喫煙または飲酒) への曝露も、対象が癌を有する可能性が高いか否かを判定するのに、または癌の診断を下すのに役立つ。

40

【0094】

本明細書に記載の組成物および方法は、癌、例えば膵癌を有する対象、または有すると診断された対象に投与することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載の方法は、癌の症状を緩和する目的で、本明細書に記載の組成物、例えば、CTCマーカー遺伝

50

子標的療法の有効量を対象に投与する段階を含む。本明細書で用いる場合、「癌の症状を緩和する」とは、癌に伴う任意の病状または症状を緩和することである。同等の無治療対照と比較して、そのような軽減は、いずれかの標準的な手法による測定で、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%またはそれを上回る。本明細書に記載の組成物を対象に投与するための種々の手段が当業者に公知である。そのような方法には、経口的、非経口的、静脈内、筋肉内、皮下、経皮的、気道（エアロゾル）、肺、皮膚、局部への注射、または腫瘍内投与が非限定的に含まれる。投与は局所性でも全身性でもよい。

【0095】

本明細書で用いる「有効量」という用語は、疾患または障害の少なくとも1つまたは複数の症状を緩和するために必要とされるCTCマーカー遺伝子標的療法の量のことを指し、所望の効果を与えるのに十分な薬理的組成物の量に関する。「治療的有效量」という用語は、それ故に、典型的な対象に投与された場合に特定の抗癌効果をもたらすのに十分な、CTCマーカー遺伝子標的療法の量のことを指す。本明細書において用いられる有効量はまた、さまざまな状況で、疾患の症状の発生を遅延させる、疾患の症状の経過を変化させる（例えば、限定されることはないが、疾患の症状の進行を遅らせる）、または疾患の症状を好転させるのに十分な量を含むと考えられる。したがって、正確な「有効量」を特定することは一般に実用的ではない。しかし、任意の所与の場合に、当業者は慣行的な実験のみを用いて、適切な「有効量」を判定することができる。

【0096】

有効量、毒性、および治療効果は、例えば、LD50（集団の50%に対して致死的な用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を判定するための、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって判定することができる。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて異なりうる。毒性作用と治療効果との用量比が治療指数であり、これはLD50/ED50という比として表すことができる。大きい治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイによってまず推定することができる。また、細胞培養において、または適切な動物モデルにおいて判定されたIC50（すなわち、症状の半値阻害を達成するCTCマーカー遺伝子標的療法の濃度）を含む循環血漿中濃度が達成されるように、ある用量を動物モデルに処方することもできる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。任意の特定の投与量の効果は、適したバイオアッセイ、例えば、いくつかある中から例を挙げると、CTCレベルに関するアッセイによってモニターすることができる。投与量は、医師によって決定されて、観察される治療効果に適合するように、必要に応じて調整することができる。

【0097】

いくつかの態様において、本明細書に記載の技術は、本明細書に述べるようなCTCマーカー遺伝子標的療法と、任意で薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物に関する。薬学的に許容される担体および希釈剤には、食塩水、水性緩衝溶液、溶媒および/または分散媒が含まれる。そのような担体および希釈剤の使用は、当技術分野において周知である。薬学的に許容される担体として役立つことができる材料のいくつかの非限定的な例には、(1)糖、例えばラクトース、グルコースおよびスクロースなど；(2)デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなど；(3)セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロースなど；(4)粉末トラガカント；(5)麦芽；(6)ゼラチン；(7)滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなど；(8)賦形剤、例えばカカオ脂および坐薬ワックスなど；(9)油、例えば落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油など；(10)グリコール、例えばプロピレングリコールなど；(11)ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（PEG）など；(12)エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなど；(13)寒

10

20

30

40

50

天；(14)緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなど；(15)アルギン酸；(16)発熱物質を含まない水；(17)等張食塩水；(18)リンゲル液；(19)エチルアルコール；(20)pH緩衝溶液；(21)ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ酸無水物；(22)増量剤、例えばポリペプチドおよびアミノ酸など；(23)血清成分、例えば血清アルブミン、HDLおよびLDLなど；(22)C₂~C₁₂アルコール、例えばエタノールなど；ならびに(23)薬学的製剤中に使用される他の無毒性適合物質が含まれる。湿潤剤、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、保存料および抗酸化剤も、製剤中に存在しうる。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」などの用語は、本明細書において互換的に用いられる。いくつかの態様において、担体は、活性作用物質、例えば本明細書に述べるようなCTCマーカー遺伝子標的療法の分解を阻害する。

10

【0098】

いくつかの態様において、本明細書に述べるようなCTCマーカー遺伝子標的療法を含む薬学的組成物は、非経口剤形であってよい。非経口剤形の投与では、典型的には、汚染物質に対する患者の自然防御が回避されることから、非経口剤形は無菌であるか、または患者への投与の前に滅菌可能であることが好ましい。非経口剤形の例には、即座に注射できる溶液、注射用の薬学的に許容される媒体に即座に溶解または懸濁させることができる乾燥製品、即座に注射できる懸濁液、および乳濁液が非限定的に含まれる。加えて、患者の投与のために、DUROS(登録商標)型剤形および用量ダンピング(dose-dumping)を非限定的に含む、制御放出性の非経口剤形を調製することもできる。

20

【0099】

ここに開示されたようなCTCマーカー遺伝子標的療法の非経口剤形を提供するために用いる適した媒体は、当業者には周知である。例としては、滅菌水；注射用水USP；生理食塩液；グルコース溶液；限定されることはないが、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、ならびに乳酸加リンゲル注射液などの水性媒体；限定されることはないが、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコールなどの水混和性媒体；ならびに限定されることはないが、トウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピルおよび安息香酸ベンジルなどの非水性媒体が非限定的に含まれる。また、本明細書に開示されたようなCTCマーカー遺伝子標的療法の薬学的に許容される塩の溶解性を改変または変更する化合物を、従来の制御放出性の非経口剤形を含む、本開示の非経口剤形に組み入れることもできる。

30

【0100】

また、CTCマーカー遺伝子標的療法を含む薬学的組成物を、経口投与に適するように、例えば、限定されることはないが、錠剤(分割錠もしくはコーティング錠を非限定的に含む)、丸剤、カプレット、カプセル、チュアブル錠、粉末パケット、カシェ剤、トローチ、オブラート剤、エアロゾルスプレイなどの分離した剤形として、または、限定されることはないが、シロップ、エリキシル剤、水性液体、非水性液体中の溶液もしくは懸濁液、水中油型乳剤、または油中水型乳剤などの液体として製剤化することもできる。そのような組成物は、あらかじめ決められた量の、開示される化合物の薬学的に許容される塩を含有し、当業者に周知の薬学の方法によって調製することができる。概論については、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia PA. (2005)を参照されたい。

40

【0101】

従来の剤形は一般に、製剤からの急速または即時的な薬物放出をもたらす。薬物の薬理および薬物動態によっては、従来の剤形の使用は、患者の血液中および他の組織中での薬物濃度の大幅な変動につながる恐れがある。これらの変動は、投薬頻度、作用の発現、有効性の持続期間、治療域血中レベルの維持、毒性、副作用などのような、いくつかのパラメータに影響を及ぼしうる。制御放出製剤を用いて、薬物の作用の発現、作用の持続期間、治療ウィンドウ内の血漿中レベル、およびピーク血中レベルを制御しうることを有利で

50

ある。特に、制御放出性または延長放出性の剤形または製剤を用いることで、薬物の最大の有効性を達成する一方で、薬物の過少投与（すなわち、最低治療レベルを下回る）および薬物の毒性レベルを超過することの両方から起こりうる、可能性のある有害作用および安全性の問題を最小限にすることを確実にできる。いくつかの態様において、CTCマーカ―遺伝子標的療法は徐放製剤で投与されうる。

【0102】

制御放出性の医薬製品は、その非制御放出性対応物によって達成されるものと比べて薬物療法を改善するという共通の目標を有する。理想的には、医学的治療における最適にデザインされた制御放出調製物の使用は、最少量の薬物を使用し、最小限の時間で病状を治癒させること、またはコントロールすることを特徴とする。制御放出製剤の利点には、1) 薬物の活性延長；2) 投薬頻度の低下；3) 患者コンプライアンスの増大；4) 薬物全体の使用量の減少；5) 局所または全身副作用の軽減；6) 薬物蓄積の最小化；7) 血中レベルの変動低減；8) 治療の有効性の改善；9) 薬物活性の増強または消失の低下；および10) 疾患または病状のコントロールの速度の改善が含まれる。Kim, Chong-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)。

10

【0103】

ほとんどの制御放出製剤は、所望の治療効果を迅速に生じさせる量の薬物（有効成分）を最初に放出し、この治療的または予防的な効果のレベルを長期間にわたって維持するように残りの量の薬物を徐々にかつ持続的に放出するように設計される。体内でこの薬物の一定のレベルを維持するために、薬物は、代謝されて身体から排泄される薬物の量と置き換わる速度で剤形から放出されなければならない。有効成分の制御放出は、pH、イオン強度、浸透圧、温度、酵素、水、および他の生理的条件または化合物を非限定的に含む、さまざまな条件によって誘発することができる。

20

【0104】

種々の公知の制御放出性または持続放出性の剤形、製剤およびデバイスを、本開示の塩および組成物とともに用いるために適合させることができる。例としては、米国特許第3,845,770号；第3,916,899号；第3,536,809号；第3,598,123号；第4,008,719号；第5674,533号；第5,059,595号；第5,591,767号；第5,120,548号；第5,073,543号；第5,639,476号；第5,354,556号；第5,733,566号；および第6,365,185B1号に記載されたものが非限定的に含まれる；これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。これらの剤形は、所望の放出プロフィールをさまざまな比率で提供するために、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム（例えば、OROS（登録商標）（Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA）など）、またはそれらの組み合わせを用いて、1つまたは複数の有効成分の緩徐放出または制御放出を提供するように用いることができる。

30

【0105】

本明細書に記載の方法は、例えば、併用療法の一部として、第2の作用物質および/または治療を対象に投与する段階をさらに含む。第2の作用物質および/または治療の非限定的な例には、本明細書において上述したように、放射線療法、手術および化学療法薬が含まれうる。

40

【0106】

ある態様においては、本明細書に述べるようなCTCマーカ―遺伝子標的療法を含む組成物の有効用量を、患者に1回投与することができる。ある態様においては、CTCマーカ―遺伝子標的療法を含む組成物の有効用量を、患者に繰り返して投与することができる。全身投与の場合には、対象に、CTCマーカ―遺伝子標的療法を含む組成物の治療量、例えば、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、またはより多くを投与することができる。

【0107】

いくつかの態様においては、初期の治療レジメン後に、治療をより少ない頻度で投与す

50

ることができる。例えば、3カ月間にわたって隔週で治療した後に、治療を月1回ずつ、6カ月間または1年間またはより長く繰り返すことができる。本明細書に記載の方法による治療は、病状のマーカ-または症状のレベル、例えばCTCレベルを、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%、またはより多く低下させることができる。

【0108】

本明細書に述べるような組成物の投与量は、医師によって決定されて、観察される治療効果に適合するように、必要に応じて調整することができる。治療の期間および頻度に関して、治療が治療的有益性をもたらす時期を判定するために、ならびに投与量を増加させるかまたは減少させるか、投与頻度を増加させるかまたは減少させるか、治療を中断するか否か、治療を再開するか否か、または治療レジメンに他の変更を加えるか否かを決定するために対象をモニターすることは、熟練した臨床医にとって一般的なことである。投薬スケジュールは、いくつかの臨床的因子、例えばCTCマーカ-遺伝子標的療法に対する対象の感受性などに応じて、週1回から毎日までの間でさまざまでありうる。活性化の所望の用量または量を、一度に投与することもでき、または分割用量(subdose)、例えば2つ~4つの分割用量に分けて、ある期間にわたって、例えば1日を通じて適切な間隔で、または他の適切なスケジュールで投与することもできる。いくつかの態様において、投与は長期的に、例えば1つもしくは複数の用量および/または治療を数週間または数カ月にわたって毎日行うことができる。投薬および/または治療スケジュールの例は、1週間、2週間、3週間、4週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月または6カ月、またはそれより長い期間にわたって、毎日、1日2回、1日3回または1日4回、またはより多く投与することである。CTCマーカ-遺伝子標的療法を含む組成物は、ある期間、例えば5分間、10分間、15分間、20分間または25分間にわたって投与することができる。

【0109】

本明細書に記載の方法による、CTCマーカ-遺伝子標的療法の投与のための投与量の範囲は、例えば、CTCマーカ-遺伝子標的療法の形態、その効力、および本明細書に記載の病状の症状、マーカ-または指標に関して望まれる低下の程度、例えば、CTCレベルに関して望まれる低下率に依存する。投与量は、有害な副作用を引き起こすほど多くあるべきではない。一般に、投与量は、患者の年齢、状態および性別に応じて異なると考えられ、当業者によって決定されうる。投与量はまた、何らかの合併症が生じた場合に、個々の医師によっても調整可能である。

【0110】

CTCマーカ-遺伝子標的療法の、例えば本明細書に記載の病状の治療における有効性、または本明細書に述べるような反応(例えば、CTCレベルの低下)を誘導する有効性は、熟練した臨床医によって決定されうる。しかし、治療は、本明細書に記載の方法による治療後に、本明細書に記載の病状の徴候または症状のうち1つまたは複数が有益な様式で変化するか、他の臨床的に許容される症状が改善する、もしくはさらには寛解するか、または所望の反応が、例えば少なくとも10%誘導される場合に、「有効な治療」と見なされ、この用語は本明細書においてそのように用いられる。有効性は、例えば、本明細書に記載の方法によって治療される病状のマーカ-、指標、症状および/もしくは発生率、または適切な任意の他の測定可能なパラメーター、例えば、腫瘍のサイズおよび/または増殖を測定することによって評価することができる。また、有効性を、入院による評価で個体が悪化しなかったこと、または医学的介入の必要性がない(すなわち、疾患の進行が停止することによって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知であり、かつ/または本明細書に記載される。治療は、個体または動物(いくつかの非限定的な例には、ヒトまたは動物が含まれる)における疾患の任意の治療を含み、これには(1)疾患を阻害すること、例えば、症状(例えば、疼痛もしくは炎症)の悪化を防止すること;または(2)疾患の重症度を緩和すること、例えば、症状の退縮を引き起こすことが含まれる。疾患の治療のための有効量は、それを必要とする対象に投与された時に、

その疾患に対して有効な治療が、本明細書においてこの用語が定義された通りにもたらされるのに十分な量を意味する。作用物質の有効性は、病状の身体的指標または所望の反応（例えば、CTCレベル）を評価することによって判定することができる。そのようなパラメーターのいずれか1つまたはパラメーターの任意の組み合わせを測定することによって、投与および/または治療の有効性をモニターすることは、十分に当業者の技能の範囲内にある。有効性は、本明細書に記載の病状の動物モデルにおいて、例えば癌の治療に関して評価することができる。実験動物モデルを用いる場合、治療の有効性は、マーカーの統計的に有意な変化、例えばCTCレベルの変化が観測される場合に証明される。

【0111】

便宜のために、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において用いられるいくつかの用語および語句の意味を以下に提示する。別様に指定しない限り、または文脈から暗に示されない限り、以下の用語および語句は、以下に提示する意味を含む。本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるため、定義は、特定の態様を記載する上で助けとなるように与えられるものであり、特許請求された発明を限定することを意図するものではない。特に定義しない限り、本明細書において用いられるすべて技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。当技術分野における用語の使用と本明細書に提示されたその定義との間に明らかな矛盾がある場合、本明細書内に与えられる定義が優先されるものとする。

10

【0112】

便宜のために、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において用いられるいくつかの用語をここにまとめる。

20

【0113】

「減少する」、「低下した」、「低下」、または「阻害する」という用語はすべて、本明細書において、統計的に有意な量の減少を意味して用いられる。いくつかの態様において、「低下させる」、「低下」または「減少する」または「阻害する」は、典型的には、参照基準レベル（例えば、所与の治療がない場合）と比較して、少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはより多くの減少を含むことができる。本明細書で用いる場合、「低下」または「阻害」は、参照基準レベルと比較した場合の完全な阻害または低下を包含しない。「完全な阻害」は、参照基準レベルと比較した場合の100%阻害である。減少は、好ましくは、所与の障害を有しない個体にとって正常な範囲内として許容されるレベルまで低下することによってよい。

30

【0114】

「増加した」、「増加する」、「強化する」または「活性化する」という用語はすべて、本明細書において、統計的に有意な量の増加を意味して用いられる。いくつかの態様において、「増加した」、「増加する」、「強化する」または「活性化する」という用語は、参照基準レベルと比較して、少なくとも10%の増加、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%の増加、もしくは最大で100%までの増加、もしくは参照基準レベルと比較して10~100%の間の任意の増加、または参照基準レベルと比較して、少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、もしくは2倍~10倍の間の任意の増加、もしくはより多い増加を意味することができる。マーカーまたは症状に関して、「増加する」は、そのようなレベルの統計的に有意な増加である。

40

【0115】

本明細書で用いる場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長

50

動物、齧歯動物、家畜または狩猟動物といった脊椎動物である。霊長動物は、チンパンジー、カニクイザル、クモザルおよびマカクザル、例えばアカゲザルを含む。齧歯動物は、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターを含む。家畜および狩猟動物は、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、パッファロー、ネコ科動物、例えばイエネコ、イヌ科動物、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えばニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚類、例えばマス、ナマズおよびサケを含む。いくつかの態様において、対象は、哺乳動物、例えば霊長動物、例えばヒトである。「個体」、「患者」および「対象」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【0116】

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであってよいが、これらの例には限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、癌の動物モデルを表す対象として好都合に用いることができる。対象は雄であっても雌であってもよい。

10

【0117】

対象は、治療を必要とする病状（例えば、癌）またはそのような病状に関連する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断されているか、またはそれらに罹患しているかもしくはそれらを有すると同定されていて、かつ任意で、癌または癌に関連する1つもしくは複数の合併症に対する治療をすでに受けている対象であってよい。または、対象が、癌または癌に関連する1つもしくは複数の合併症を有すると以前に診断された対象であってもよい。例えば、対象は、癌または癌に関連する1つもしくは複数の合併症の1つもしくは複数の危険因子を示す対象であってもよく、または危険因子を示さない対象であってもよい。

20

【0118】

特定の病状に対する治療を「必要とする対象」は、その病状を有する、その病状を有すると診断された、またはその病状を発症するリスクのある対象であってよい。

【0119】

本明細書で用いる場合、「癌」または「腫瘍」という用語は、身体の臓器および系の正常な機能を妨害する、制御下にない細胞増殖のことを指す。癌または腫瘍を有する対象とは、その身体に客観的に測定可能な癌細胞が存在する対象である。この定義には、良性のがんおよび悪性癌、ならびに休眠状態の腫瘍または微小転移が含まれる。その当初の場所から遊走して重要な臓器に播種する癌は、罹患した臓器の機能の悪化を通じて、最終的に対象を死に至らせうる。

30

【0120】

「作用物質」という用語は、一般に、通常は存在しないか、または細胞、組織もしくは対象に投与されるレベルでは存在しない任意の実体のことを指す。作用物質は、以下を非限定的に含む群から選択されうる：ポリヌクレオチド；ポリペプチド；小分子；および抗体またはその抗原結合性断片。ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAであってよく、一本鎖または二本鎖であってよく、かつ、例えば、ポリペプチドをコードする核酸および核酸類似体を含む群から選択されうる。ポリペプチドは、天然のポリペプチド、関心対象の機能を保っている突然変異ポリペプチドまたはその断片であってよいが、それらには限定されない。作用物質のさらなる例には、核酸アプタマー、ペプチド-核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、小型の有機分子または無機分子；サッカリド；オリゴ糖；多糖；生体高分子、ペプチド模倣体；核酸類似体および誘導體；細菌、植物、真菌または哺乳動物の細胞または組織などの生体物質から作製された抽出物、および天然性または合成性の組成物が非限定的に含まれる。作用物質を培地に適用して、そこで細胞と接触させてその作用を誘導することができる。または、作用物質が、作用物質をコードする核酸配列の細胞内への導入およびその転写の結果として細胞内にあって、細胞内での核酸および/またはタンパク質環境刺激の生成をもたらすこともできる。いくつかの態様において、作用物質は、合成性および天然性の非タンパク質性実体を非限定的に含む、任意の化学物質、実体またはモイエティーである。ある態様において、作用物質は、例えば、マクロライド、レプトマイ

40

50

シンおよび関連する天然産物またはそれらの類似体を含む、非置換もしくは置換アルキル、芳香族またはヘテロシクリルモイエティーから選択される化学モイエティーを有する小分子である。作用物質は、所望の活性および/もしくは特性を有することが知られていてもよく、または多様な化合物のライブラリーから選択することもできる。本明細書で用いる場合、「小分子」という用語は、「天然産物様」である化合物を指すことができるが、しかしながら、「小分子」という用語は、「天然産物様」化合物には限定されない。より正確に言えば、小分子は、典型的には、いくつかの炭素-炭素結合を含有し、かつ分子量が約50ダルトンを上回るが約5000ダルトン(5kD)未満であることを特徴とする。好ましくは、小分子は、3kD未満、さらにより好ましくは2kD未満、最も好ましくは1kD未満の分子量を有する。場合によっては、小分子が700ダルトンまたはそれ未満の分子量を有することが好ましい。

10

【0121】

アプタマーは、小分子、タンパク質、核酸などのさまざまな分子標的、ならびにさらには細胞および組織などとも特異的に結合する、短い合成一本鎖オリゴヌクレオチドである。これらの小型核酸分子は、タンパク質または他の細胞標的と特異的に結合しうる二次構造および三次構造を形成することができ、本質的には抗体の化学的同等物である。アプタマーは高度に特異的であり、サイズが相対的に小さく、かつ非免疫原性である。アプタマーは一般に、SELEX(指数的エンリッチメントによるリガンドの系統的進化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment))として知られるバイオニング法によって選択される(Ellington et al. Nature. 1990;346(6287):818-822; Tuerk et al., Science. 1990;249(4968):505-510; Ni et al., Curr Med Chem. 2011;18(27):4206-14; これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。任意の所与の標的に対してアプタマーを作製する方法は、当技術分野において周知である。例えば、アプタマー-siRNAキメラおよびアプタマー標的化ナノ粒子治療薬を用いた前臨床試験は、癌およびHIVのマウスモデルにおいて非常に好成績を収めている(Ni et al., Curr Med Chem. 2011; 18(27):4206-14)。

20

【0122】

本明細書で用いる場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において、隣接する残基の -アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって互いに連結された一連のアミノ酸残基を指して互換的に用いられる。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能にかかわらず、修飾アミノ酸(例えば、リン酸化された、糖化された、グリコシル化された、など)およびアミノ酸類似体を含む、アミノ酸の重合体のことを指す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、多くの場合、相対的に大きいポリペプチドについて用いられ、一方、「ペプチド」という用語は、多くの場合、小さいポリペプチドについて用いられるが、当技術分野におけるこれらの用語の使用法には重複がある。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において、遺伝子産物およびその断片に言及する場合に互換的に用いられる。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質には、遺伝子産物、天然のタンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片、ならびに前述のものの他の同等物、変異体、断片および類似体が含まれる。

30

40

【0123】

本明細書で用いる場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはそれらの類似体の単位を組み込んだ任意の分子、好ましくは重合性分子のことを指す。核酸は一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。一本鎖核酸は、変性した二本鎖DNAのうちの1本の核酸鎖であってもよい。または、一本鎖核酸は、いかなる二本鎖DNAにも由来しない一本鎖核酸であってもよい。1つの局面において、核酸はDNAであってもよい。もう1つの局面において、核酸はRNAであってもよい。適した核酸分子は、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNAである。他の適した核酸分子は、mRNAを含むRNAである。

【0124】

本明細書で用いる場合、「治療する」、「治療」、「治療すること」、または「改善」

50

という用語は、その目的が、疾患または障害、例えば癌に関連する病状の進行または重症度を好転させる、緩和する、改善する、阻害する、緩徐にする、または停止させることにある治療的処置のことを指す。「治療すること」という用語は、癌に関連する病状、疾患または障害の少なくとも1つの有害作用または症状を軽減または緩和することを含む。治療は一般に、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低下する場合に「有効」である。または、治療は、疾患の進行が低下または停止する場合に「有効」である。すなわち、「治療」は、治療を行わなかった場合に予想されるものと比較して、症状またはマーカーの改善だけでなく、症状の進行または悪化を休止させること、または少なくとも遅らせることも含む。有益な、または所望の臨床的結果には、検出可能であるか検出不可能であるかにかかわらず、1つまたは複数の症状の緩和、疾患範囲の縮小、疾患状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の進行の遅延もしくは緩徐化、疾患状態の緩和もしくは一時的緩和、寛解（部分的であるか完全であるかにかかわらず）、および/または死亡率の減少が非限定的に含まれる。疾患の「治療」という用語はまた、疾患の症状または副作用からの解放（姑息療法を含む）をもたらすことも含む。

10

20

30

40

50

【0125】

本明細書で用いる場合、「薬学的組成物」という用語は、薬学的に許容される担体、例えば製薬業界において一般的に用いられる担体と組み合わせられた活性作用物質のことを指す。「薬学的に許容される」という語句は、本明細書において、正しい医学的判断の範囲内で、妥当な利益/リスク比に見合いながらも、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、ヒトおよび動物の組織と接触させて用いるのに適する化合物、物質、組成物および/または剤形を指して用いられる。

【0126】

本明細書で用いる場合、「投与すること」という用語は、作用物質の所望の部位での少なくとも部分的な送達をもたらす方法または経路によって、本明細書に開示されたような化合物を対象の内部に配置することを指す。本明細書に開示された化合物を含む薬学的組成物は、対象に有効な治療をもたらす任意の適切な経路によって投与することができる。

【0127】

「統計的に有意な」または「有意に」という用語は、統計的有意性のことを指し、一般に2標準偏差（2SD）またはそれを上回る差異を意味する。

【0128】

実施例以外において、または特に指示のない限り、本明細書で用いられる成分の数量または反応条件を表すすべての数値は、すべての事例において、「約」という用語によって一部変更されているものと解釈されるべきである。「約」という用語は、パーセンテージと併せて用いられる場合、 $\pm 1\%$ を意味する。

【0129】

本明細書で用いる場合、「含む（comprising）」または「含む（comprises）」は、組成物、方法、およびそれらの方法または組成物に必須であるその各々の成分に言及して用いられるが、必須であるか否かにかかわらず明記されていない要素を含めることも受け入れられる。

【0130】

「からなる」という用語は、態様の説明に列挙されていないいかなる要素も含まない、本明細書に述べるような組成物、方法およびその各々の成分のことを指す。

【0131】

本明細書で用いる場合、「から本質的になる」という用語は、所与の態様にとって必要な要素のことを指す。この用語は、その態様の基本的で新規な、または機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない要素の存在を許容する。

【0132】

単数形用語である「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」は、文脈が明確に他のことを示していない限り、複数形の指示対象を含む。同様に、「または（or）」という単語は、文脈が明確に他のことを示していない限り、「および」を含むものと

する。本明細書に記載の方法および材料と類似または同等な方法および材料を、本開示の実施または試験において用いることができるが、適した方法および材料については以下に述べる。「例えば (e.g.)」という略語は、例えば (ラテン語の *exempli gratia*) に由来するものであり、本明細書において非限定的な例を指すために用いられる。したがって、「例えば (e.g.)」という略語は、「例えば (for example)」という用語と同義である。

【 0 1 3 3 】

細胞生物学および分子生物学における一般的な用語の定義は、"The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 19th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321); Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) および Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., edsに見いだすことができる。

10

【 0 1 3 4 】

特に指示のない限り、本発明は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995); または Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)、および Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998) に記載されているような標準的な手順を用いて実施しており、これらはすべてその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

【 0 1 3 5 】

他の用語は、本明細書において、本発明のさまざまな局面の説明において定義されている。

【 0 1 3 6 】

本出願の全体を通して引用される、参考文献、発行済み特許、公開済み特許出願、および同時係属特許出願を含む、すべての特許および他の刊行物は、例えば、本明細書に記載された技術と併せて用いられる可能性のある、そのような刊行物中に記載された方法を記載および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の提出日以前にさかのぼったそれらの開示のためのみに提供される。この点に関して、本発明者らが、先行発明の権限に基づいて、または任意の他の理由によって、そのような開示に先行する権利を持たないことを認めたものと見なされるべきではない。これらの文書の日付に関するすべての記述、またはそれらの内容に関する描写は、出願人が入手可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確さに関していかなる承認も行うものではない。

40

【 0 1 3 7 】

本開示の態様の説明は、包括的であることも、本開示を開示された厳密な形態に限定することも意図していない。本開示の具体的な態様およびその例は、例示の目的で本明細書に記載されているが、関連する技術分野の当業者には理解されるであろうが、さまざまな同等な変更が本開示の範囲内で可能である。例えば、方法の段階または機能が、ある所与の順序で提示されているが、代替的な態様が異なる順序で機能を遂行することも考えられ

50

、または複数の機能が実質的に同時に遂行されることも考えられる。本明細書において提供された本開示の教示を、必要に応じて他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載されたさまざまな態様を組み合わせ、さらなる態様を提供することができる。本開示の局面を、必要であれば、上記の参考文献および出願の組成物、機能および概念を使用するように変更することで、本開示の別のさらなる態様を提供することができる。さらに、例えば、コドン縮重性のために、様々な変化を、タンパク質配列に影響を及ぼすことなく、基礎となるDNA配列において行うことができる。さらに、生物学的な機能的同等性を考慮することにより、いくつかの変化を、種類または量の点で生物学的または化学的な作用に影響を及ぼすことなく、タンパク質構造に施すことができる。これらのおよび他の変更は、詳細な説明に照らして本開示に対して施すことができる。そのような変更物はすべて、添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図している。

10

【0138】

前述の態様のいずれかの具体的な要素を、他の態様における要素と組み合わせること、またはそれと置き換えることができる。さらに、本開示の特定の態様に関連する利点をこれらの態様に照らして説明しているが、他の態様がそのような利点を示すこともあり、本開示の範囲内に入るようにすべての態様がそのような利点を示すことは必ずしも必要でない。

【0139】

本明細書に記載された技術を、以下の実施例によってさらに例示するが、これらの実施例は決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。

20

【0140】

本明細書に記載された技術のいくつかの態様は、以下の番号付きの項目のいずれかに従って定義することができる。

1. 試料中の血中循環腫瘍細胞 (CTC) を検出する方法であって、

試料中のPC-CTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；および

該マーカー遺伝子発現産物の検出レベルが参照基準レベルを上回る場合にPC-CTCが存在すると判定する段階

を含む、方法。

2. CTCが膀胱癌CTCである、項目1の方法。

3. 試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む、項目1~2のいずれかの方法。

30

4. 発現産物が核酸である、項目1~3のいずれかの方法。

5. 発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、項目4の方法：

RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンプロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュウハイブリダイゼーション。

6. 発現産物がポリペプチドである、項目1~3のいずれかの方法。

7. 発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、項目6の方法：

ウエスタンプロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)；放射線免疫アッセイ (RIA)；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュウハイブリダイゼーション (FISH)；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。

40

8. CTCマーカー遺伝子が表7；表8；または表14から選択される、項目1~7のいずれかの方法。

9. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目1~8のいずれかの方法：

ABI3BP；ADAMTS5；ADAMTSL1；ANG；ARSA；C1RL；C3；C4A；C4B；CCDC80；CD109；CHI3L1；CLEC3B；CMTM3；CMTM7；COL14A1；COL1A2；COL3A1；COL4A6；CSF1；DAG1；DCN；DMKN；FBLN1；FGF1；FMOD；GPC3；GPC4；HMGB1；IFNAR2；IGFBP5；IL16；LAMA4；LTBP4；MFAP1A；NID2；OGN；PDAP1；PF4；PLAT；PODN；PRELP；RSP01；SERPING1；SLURP1；SOD3；SPARC；SPOCK2；SPON2；SULF1；SULF2；TGFB2；TGM2；THBD；THBS1；THSD4；TIMP2；TNXB；T

50

PT1 ; TWSG1およびWNT4。

10. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目1～8のいずれかの方法：
ALDH1A1 ; ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; SPARC ; WNT ; TGFB2 ; VEGF ; COL1A2 ; COL3A1 ;
およびTIMP2。

11. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目1～9のいずれかの方法：
ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; およびSPARC。

12. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目1～9のいずれかの方法：
ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; およびDCN。

13. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目1～9のいずれかの方法：
TPT1 ; HMGB1 ; SPON 2 ; SPARC ; およびARSA。

10

14. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目1～9のいずれかの方法：
IL6ST ; ARSA ; TIMP2 ; CD55 ; SULF2 ; ITGA6 ; SDC4 ; CDON ; およびSV2A。

15. 対象における癌を治療する方法であって、CTCマーカー遺伝子標的療法の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、方法。

16. 癌が膵癌である、項目15の方法。

17. CTCマーカー遺伝子標的療法がCTCマーカー遺伝子の阻害薬を含む、項目15～16のいずれかの方法。

18. 阻害薬が抗体反応物である、項目17の方法。

19. 阻害薬が阻害性核酸反応物である、項目17の方法。

20. CTCマーカー遺伝子標的療法がCTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物および化学療法薬を含む、項目15～19のいずれかの方法。

20

21. 前記対象が、血液中および/または癌の間質中に存在するCTCのレベルが高い、かつ/またはCTCマーカー遺伝子のレベルが高いと判定された対象である、項目15～20のいずれかの方法。

22. CTCマーカー遺伝子標的療法が、以下からなる群より選択されるマーカー遺伝子と結合するCTCマーカー遺伝子結合性抗体反応物を含む、項目15～21のいずれかの方法：
IL6ST、SULF2およびSV2A。

23. 対象がCTCマーカー遺伝子標的療法による治療に反応する可能性が高いか否かを判定する方法であって、

血液中および/または癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびに

30

該発現産物のレベルが参照基準レベルに比して高い場合に、対象が治療に反応する可能性が高いと判定する段階を含む、方法。

24. 試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む、項目23の方法。

25. 癌が膵癌である、項目23～24のいずれかの方法。

26. 発現産物が核酸である、項目23～25のいずれかの方法。

27. 発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、項目26の方法：

RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンブロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーション。

40

28. 発現産物がポリペプチドである、項目23～26のいずれかの方法。

29. 発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、項目28の方法：

ウエスタンブロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射線免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。

30. PC-CTCマーカー遺伝子が表7；表8；または表14から選択される、項目23～29のいずれかの方法。

50

31. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目23～30のいずれかの方法
:

ABI3BP ; ADAMTS5 ; ADAMTSL1 ; ANG ; ARSA ; C1RL ; C3 ; C4A ; C4B ; CCDC80 ; CD109 ; CHI3L1 ; CLEC3B ; CMTM3 ; CMTM7 ; COL14A1 ; COL1A2 ; COL3A1 ; COL4A6 ; CSF1 ; DAG1 ; DCN ; DMKN ; FBLN1 ; FGF1 ; FMOD ; GPC3 ; GPC4 ; HMGB1 ; IFNAR2 ; IGFBP5 ; IL16 ; LAMA4 ; LTBP4 ; MFAP1A ; NID2 ; OGN ; PDAP1 ; PF4 ; PLAT ; PODN ; PRELP ; RSP01 ; SERPING1 ; SLURP1 ; SOD3 ; SPARC ; SPOCK2 ; SPON2 ; SULF1 ; SULF2 ; TGFB2 ; TGM2 ; THBD ; THBS1 ; THSD4 ; TIMP2 ; TNXB ; TPT1 ; TWSG1およびWNT4。

32. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目23～31のいずれかの方法
:

ALDH1A1 ; ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; SPARC ; WNT ; TGFB2 ; VEGF ; COL1A2 ; COL3A1 ; およびTIMP2。

33. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目23～31のいずれかの方法
:

ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; およびSPARC。

34. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目23～31のいずれかの方法
:

ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; およびDCN。

35. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目23～31のいずれかの方法
:

TPT1 ; HMGB1 ; SPON 2 ; SPARC ; およびARSA。

36. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目23～31のいずれかの方法
:

IL6ST ; ARSA ; TIMP2 ; CD55 ; SULF2 ; ITGA6 ; SDC4 ; CDON ; およびSV2A。

37. 対象の治療をモニターするための方法であって、

癌治療法をそれを必要とする対象に投与する段階；

血液中および/または癌の間質中に存在するCTCマーカー遺伝子発現産物のレベルを測定する段階；ならびに

CTCマーカー遺伝子発現産物のレベルが参照基準レベルに比して低い場合に対象が反応していると判定し、CTCマーカー遺伝子発現産物が参照基準レベルに比して低くない場合に対象が治療に反応していないと判定する段階を含む、方法。

38. 癌が膀胱癌である、項目37の方法。

39. 参照基準レベルが、投与する段階の前の患者における遺伝子発現産物のレベルである、項目37～38のいずれかの方法。

40. 試料からCTCを単離する第1の段階をさらに含む、項目37～39のいずれかの方法。

41. 発現産物が核酸である、項目37～40のいずれかの方法。

42. 発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、項目41の方法：

RT-PCR；定量的RT-PCR；ノーザンブロット法；マイクロアレイに基づく発現分析；次世代シーケンシング；およびRNAインサイチュールハイブリダイゼーション。

43. 発現産物がポリペプチドである、項目37～40のいずれかの方法。

44. 発現産物のレベルが、以下からなる群より選択される方法を用いて決定される、項目43の方法：

ウエスタンブロット法；免疫沈降法；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；放射線免疫アッセイ（RIA）；サンドイッチアッセイ；蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）；免疫組織染色；放射性免疫測定アッセイ；免疫蛍光アッセイ；質量分析法；FACS；および免疫電気泳動アッセイ。

45. PC-CTCマーカー遺伝子が表7；表8；または表14から選択される、項目37～44のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

46. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目37～45のいずれかの方法
:

ABI3BP ; ADAMTS5 ; ADAMTSL1 ; ANG ; ARSA ; C1RL ; C3 ; C4A ; C4B ; CCDC80 ; CD109 ; CHI3L1 ; CLEC3B ; CMTM3 ; CMTM7 ; COL14A1 ; COL1A2 ; COL3A1 ; COL4A6 ; CSF1 ; DAG1 ; DCN ; DMKN ; FBLN1 ; FGF1 ; FMOD ; GPC3 ; GPC4 ; HMGB1 ; IFNAR2 ; IGFBP5 ; IL16 ; LAMA4 ; LTBP4 ; MFAP1A ; NID2 ; OGN ; PDAP1 ; PF4 ; PLAT ; PODN ; PRELP ; RSP01 ; SERPING1 ; SLURP1 ; SOD3 ; SPARC ; SPOCK2 ; SPON2 ; SULF1 ; SULF2 ; TGFB2 ; TGM2 ; THBD ; THBS1 ; THSD4 ; TIMP2 ; TNXB ; TPT1 ; TWSG1およびWNT4。

47. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目37～46のいずれかの方法
:

ALDH1A1 ; ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; SPARC ; WNT ; TGFB2 ; VEGF ; COL1A2 ; COL3A1 ; およびTIMP2。

48. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目37～46のいずれかの方法
:

ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; DCN ; およびSPARC。

49. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目37～46のいずれかの方法
:

ALDH1A2 ; IGFBP5 ; KLF4 ; およびDCN。

50. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目37～46のいずれかの方法
:

TPT1 ; HMGB1 ; SPON 2 ; SPARC ; およびARSA。

51. CTCマーカー遺伝子が以下からなる群より選択される、項目37～46のいずれかの方法
:

IL6ST ; ARSA ; TIMP2 ; CD55 ; SULF2 ; ITGA6 ; SDC4 ; CDON ; およびSV2A。

【実施例】

【0141】

実施例1: マウス血中循環腫瘍細胞の単細胞RNAシーケンシングにより、それらのECMタンパク質の発現が明らかになる

血中循環腫瘍細胞 (CTC) は、原発性腫瘍から剥離して血流中に入り、遠隔臓器への癌の血行性伝播を媒介する。腫瘍マウスモデルを用いて、腫瘍エピソードに非依存的にCTCを単離するためにマイクロ流体デバイスを適用し、これらを単細胞RNAシーケンシングに供した。CTCは、原発性腫瘍および癌細胞株とは異なる複数のサブセットへとクラスタ化した。増殖シグネチャーは概ね少なかったが、CTCは、MAPK、ならびにWNT、TGF- β 、ニュートロフィン、Toll様受容体およびB細胞受容体シグナル伝達経路に関してエンリッチされていた。CTCは、幹細胞関連遺伝子Aldh1a2の発現に関して高度にエンリッチされていた。それらによるIgfbp5およびKlf4の事実上普遍的な発現は、上皮/間質境界に局在した原発性腫瘍細胞のサブセットと相関しており、これはCTCに上皮マーカーおよび間葉マーカーの両方が存在することに一致する。DenおよびSparcを含む間質由来細胞外マトリックスタンパク質のCTC発現が非常に高度であることにより、転移への微小環境の寄与が指し示され、かつ予想外の治療標的が同定される。

【0142】

序論

膵管腺癌 (PDAC) は、米国における癌による死因の第4位であり、5年時の全生存率は6%である (Society, 2013)。この癌の高い高い死亡率は、広範な転移を招く腫瘍細胞の急速な播種から来ている。局所組織およびリンパ管への浸潤は早期PDACでも明白であり、血流中の血中循環腫瘍細胞 (CTC) の存在は、遠隔臓器への癌の伝播を最終的に招く。CTCは稀であり、血液1ミリリットル中の正常血液細胞10億個当たり、腫瘍細胞は1～10個と推定される。そのため、それらの単離および分子的分析は大きな技術的課題となっている (Pantel et al., 2008 ; Yu et al., 2011)。血行性転移におけるそれらの役割を考慮すると、CTC集団は転移前駆細胞に関してエンリッチされている可能性が高く、それらの分析

10

20

30

40

50

により、有望な治療標的が同定され、ならびに膵癌の早期検出の機会がもたらされる可能性がある。

【0143】

遺伝子操作されたマウス膵癌モデルにより、この疾患の進行に関する重要な洞察がもたらされた。具体的には、遺伝子操作されたLSL-Kras^{G12D}、Trp53^{fl^{ox}/fl^{ox} or+}、Pdx1-Cre (KPC) マウスモデルは、前癌性膵臓上皮内新生物 (PanIN) 病変から浸潤癌への組織学的進行を再現した (Bardeesy et al., 2006)。最近の諸研究により、このモデルでは上皮-間葉転換 (EMT) が早期に起こり、そのために腫瘍浸潤性が強化される可能性が示唆されている (Rhim et al., 2012)。マウス膵臓CTCの初期の分子特性決定で、CTCでエンリッチされている集団のRNAシーケンシングが行われ、それにより、血中循環上皮細胞のアノキス耐性に寄与する可能性がある、非標準的WNTシグナル伝達の活性化が反復性イベントとして同定されている (Yu et al., 2012)。その研究では、CTCでエンリッチされている発現シグネチャーを導き出すために、精製されたCTC集団の分析を、条件を合わせた白血球RNAリードのデジタル減算と組み合わせた単分子RNAシーケンシングを用いて実現している。しかし、そのような部分的に精製された細胞集団のトランスクリプトーム分析は、最も高度な発現変動遺伝子をカバーする深さの点で限界があり、バルクCTC集団のその種の研究では、これらのほとんど解明されていない細胞集団間の不均一性の度合いを解き明かすことができない。

【0144】

CTCのディーブRNAシーケンシングプロファイルを単細胞レベルで達成するために、正常血液細胞の高効率陰性枯渇を可能にして非付着性CTCを溶液中に残し、それらを単細胞として選択して分析することができる新規な慣性集束強化デバイス、CTC-iChip (Ozkumur et al., 2013) を用いた。上皮マーカーEpCAMを標的化するという腫瘍エピトープ特異的捕捉を避けることにより、CTC-iChipは、上皮性および間葉性特徴の両方を有する癌細胞を単離する点で無バイアス性である。さらに、タグ標識がなく生存能のあるCTCから精製されるRNAの品質の高さは、詳細なトランスクリプトーム分析に特に適する。その上、膵癌のマウスモデルの使用により、原発性腫瘍とCTCの同時分析が可能になり、一方、異なる動物間で共有されるドライバー突然変異により、CTC特異的不均一性の同定が容易になる。本明細書に記載されるのは、CTC集団内の異なる細胞サブセット、CTCにおいてエンリッチされているシグナル伝達経路、ならびに特有のCTCマーカーおよび治療標的を同定することにに向けた、CTCの単細胞レベルでの包括的トランスクリプトーム分析である。

【0145】

結果

マウス膵臓CTCの単離 . CTCの単離のために全血標本に直接適用される一体型マイクロ流体細胞分離プラットフォームであるCTC-iChip (Ozkumur et al., 2013) を、本明細書に記載された実験に用いた。これは、血球、血小板および血漿からのすべての有核細胞 (白血球 (WBC) およびCTC) の流体力学的サイズに基づく分離を最初に行い、続いて単一の流線内の有核細胞の慣性集束と組み合わせることで、高効率のインライン式磁気選別を達成する。腫瘍エピトープはばらつきが大きい、WBC細胞表面マーカーは十分に確立されている；磁気結合抗WBC抗体をこの非常にハイスループットのマイクロ流体細胞分離デバイスに適用することにより、それ故、大多数のWBCが除外されて、タグ標識のない少数のCTCが明らかになる (図1A)。CTC-iChipをマウス造血細胞の枯渇用に適合化して、KPC膵癌マウスモデルに適用した。このPDACモデルでは、かなりの数のCTCが生じる (Rhim et al., 2012; Yu et al., 2012)。WBC当たり100個の抗CD45ビーズを用いた全血標識により、正常マウス、同所性腫瘍担持マウス、および遺伝子操作されたKPCマウスにおいて、 10^3 を上回る枯渇が達成された (図1Bおよび4A~4C)。

【0146】

マウス全血にスパイク投与したGFPタグ標識NB508マウス膵癌細胞を用い、CTC-iChipを通して処理したところ、CTC回収は平均95% (+/-3% 標準偏差) と測定された (図4A~4C)。NB508細胞は、同じKras / Trp53を動因とするKPCマウスモデルにおいて生じた膵臓腫

瘍から以前に作製された (Bardeesy et al., 2006)。これに比較して、マウスCTCの抗EpCAM捕捉に基づく代替的なマイクロ流体プラットフォームを用いた場合、同じ細胞の回収は35%しか達成されなかった (Yu et al., 2012)。GFPタグ標識NB508細胞の膵臓接種に由来する同所性腫瘍にCTC-iChipを適用したところ、試験した3種のマウスすべてで、1000個を上回るCTC/mLが得られた (図4A~4C)。さらに、遺伝子操作されたKPCモデルを用いてCTC-iChipを試験し、その後上皮マーカーであるパン-サイトケラチン (CK) および白血球マーカーCD45に関する単離された細胞の二重免疫蛍光染色を行ったところ、中央値118個のCTC/mL (平均429個のCTC/mL; 範囲0~1694) が明らかになった (図1C)。7匹の健常対象マウスからはCK陽性細胞は全く単離されなかった。マイクロ流体デバイス内で偏向することができなかった大多数のCD45陽性細胞は、その表面上に免疫磁気ビーズをいくつか保持していた。このように、CTC-iChip製品においてCTCをWBCと容易に識別することができ、EpCAMなどの上皮特異的細胞表面エピトープに対する染色を必要とせずに単細胞操作が可能になった。

10

【0147】

単一CTCのRNAシーケンシング。5匹の腫瘍担持KPCマウスから合計168個の単一CTCが得られ、それらを改変された初期のcDNA増幅およびライブラリープロトコルに供し (Tang et al., 2010)、RNAの品質 (Gapdh、Actb)、膵臓マーカーの存在 (Krt8、Krt18、Krt19、Pdx1)、およびWBCマーカーの欠如 (Cd45/Ptprc) に関してスクリーニングした (図5A~5C)。これらのうち、75個 (45%) は次世代シーケンシングのためにさらに増幅およびライブラリー構築を進めるのに十分な品質であった。注目に値することとして、候補CTCの大半 (55%) は形態的には無傷であるように見えたが、RNAは分解されていた。これらの細胞は血流中で生存能を失った腫瘍細胞である可能性が高い。マウスモデルからの血液試料の迅速な処理、マイクロ流体デバイスにおける剪断条件が最小限であること、および同じ処理を受けた対照細胞でRNAの品質が保たれたことを考慮すれば、細胞がそのような損傷をインピット精製の間を受けた可能性は低い。膵臓CTCとの比較のために、単細胞RNAシーケンシングを、対照マウス由来の12個のWBC、12個のマウス胚線維芽細胞 (MEF) およびマウスNB508膵癌細胞株由来の16個の単細胞に対しても行った。NB508およびMEF培養物由来の単細胞の90%超はシーケンシングの品質に関する基準を満たしており、損なわれたRNAテンプレートを同じ条件下で有するCTCの頻度が高いことが強く示された。CTCプロファイルを、CTC単離の時点で採取した条件を合わせた親腫瘍のものと比較するために、各原発性腫瘍からのバルクRNAを1または10細胞当量 (10または100pg RNA) に希釈して、同じ増幅およびRNAシーケンシングのプロトコルに供した (n=34; 条件を合わせた4つの腫瘍からの最低8つの反復試験物)。

20

30

【0148】

単細胞RNAシーケンシングの成績は分析したすべての試料について同等であり、リード数は平均440万~850万で、そのうち平均46~61%がゲノムに対してユニークにアラインメントされた (図5A~5C)。ゲノムにアラインメントされたリードにアノテーションを行い、UCSC Known Geneトランスクリプトーム参照基準を用いて算定した上で、100万当たりリード数 (RPM) として正規化した。続いて、正規化されたリードを、教師なし階層クラスタリングによって分析した (非提示データ)。MEF、NB508膵癌細胞株および正常WBCからの単細胞トランスクリプトームは高度にクラスター化し、このRNAシーケンシング戦略の分析上の信頼性が裏づけられた。候補CTCの5つの異なるクラスターが同定され、これらはすべて、条件を合わせた原発性腫瘍配列とも癌由来細胞株とも異なっていた。主成分分析により、これらの異なる群のクラスタリングおよび相互関係が実証されている (図2)。

40

【0149】

KPCマウスモデルにおけるPDACの遺伝的動因が均一であることから、個々のマウスに由来するCTCおよび異なるマウス間のCTCにおいて、細胞不均一性の尺度を定量することが可能になる。各CTCクラスター内での単細胞不均一性をクラスター内相関係数を計算することによって評価したが、ここで相関係数が低いことは不均一性が高いことを反映する (図

50

5A~5C)。予想された通り、CTCクラスターは、NB508癌細胞株に由来する単細胞（平均0.86、95% CI 0.80~0.91、p値 1.2×10^{-15} ）よりも、不均一性がかなり高かった（平均0.42、95% CI 0.36~0.47）。原発性PDACの中での細胞の不均一性を評価するために、条件的Tomato/EGFP (mT/mG) 発現マーカー（Muzumdar et al., 2007）をKPCマウスと交配させて、系列タグ標識マウス腫瘍（KPC-mT/mG）を作製したが、これは個々のEGFP陽性原発性腫瘍細胞を混入性の間質細胞から単離することができると考えられる。原発性腫瘍（TumGMP3）を脱凝集させて単細胞浮遊液にして、20個のEGFP陽性細胞をRNAシーケンシングに供した。個々の原発性腫瘍細胞は、以前分析したバルク腫瘍材料の内部に十分にクラスタリングし（非提示データ）、不均一性スコア（平均0.38、95% CI 0.28~0.47）はCTCのもの（p値 0.49）と同程度であった。

10

【0150】

要約すると、本明細書に記載されるのは、親腫瘍、遺伝子型の条件を合わせた樹立癌細胞株、MEFおよびWBCとともに、陽性選択バイアスを伴わずに単離されたマウス膵臓CTCの単細胞RNAシーケンシングである。CTCは、原発性腫瘍（バルク腫瘍および単離された単細胞の両方）とも腫瘍由来細胞株とも別個にクラスター化し、CTCと原発性腫瘍細胞との間で細胞間不均一性は同等の度合いであった。

【0151】

膵臓CTCのサブセットを規定する。候補CTCの同定および分類のために、既知の上皮マーカー、造血マーカーおよび内皮マーカーに関する遺伝子セットを、クラスター化したすべての試料に適用した。予想された通り、上皮マーカー（Krt7、Krt8、Krt18、Krt19、Epcam、Egfr、Cdh1）は原発性膵臓腫瘍および癌細胞株NB508において高発現され、非上皮MEFおよび正常WBCにはほぼ存在しなかった（非提示データ）。対照的に、造血マーカー（Ptprc/Cd45、Csf3r/Cd114、Cd14、Fcgr3/Cd16、Itga2b/Cd41、Itgb3/Cd61）は正常WBCに存在し、NB508およびMEFには存在しなかった。バルク原発性腫瘍試料では造血マーカーのある程度の発現が検出可能であり、これは白血球浸潤の度合いがさまざまであることに一致する。特徴的マーカー（Cdh5/Cd144、Vwf、Thbd/Cd141、Pecam1/Cd31、Mcam/Cd146、Sele/E-セレクトリン、Cd34）の発現、ならびに上皮マーカーおよび造血マーカーの欠如に基づくと、内皮細胞の特定のクラスターは同定されなかった。

20

【0152】

腫瘍担持マウスからCD45枯渇によって単離された単細胞の、上皮マーカー、造血マーカーおよび内皮マーカーを用いた照合により、大きく5つの候補CTCグループ分類が明らかになった（クラスター1、3、4、5および9；非提示データ）。クラスター3、4および5はすべて、より大きなグループ分類の一部であり、上皮マーカーの強い発現を示し、「古典的」CTCに一致する（CTC-cと表す）。これらの細胞の1つのサブセットは、MEF（非提示データ）および間質細胞（Krause et al., 1994）を含む間葉細胞にも見いだされる内皮前駆細胞マーカーであるCd34を発現したが、他の特徴的内皮系列マーカーは存在しなかった。クラスター1および9はより複雑であり、前者は血小板マーカーCD41（Itga2b）およびCD61（Itgb3）のエンリッチメントが注目され（それ故にCTC-pltと表す）、後者は顕著な細胞増殖シグネチャーを有する（CTC-pro）。

30

【0153】

各候補CTCクラスターの特徴をさらに規定するために、細胞間での絶対的転写物レベルの変動およびトランスクリプトーム描写の違いに適合させた、ランクプロダクト（rank product）（RP）法を含むノンパラメトリック遺伝子発現変動分析を用いた（Breitling et al., 2004）。非常に厳密なパラメーター（FDR 0.01）を設定したところ、原発性腫瘍とWBCとの対照比較により、上皮腫瘍マーカーであるケラチン7、8、18および19と白血球特異的CD45の比較で予想された発現変動を含めて、腫瘍において相対的に過剰発現される927種の遺伝子、およびWBCにおいて高度である293種の遺伝子が同定された（非提示データ）。「古典的」CTC-cクラスターとWBCを比較したところ、WBCにおけるCD45と比較してCTCにおけるサイトケラチン18および19のエンリッチメントも示され、このことはRP法によって単細胞集団間で妥当な発現変動遺伝子が同定されることを実証している。

40

50

【0154】

最も存在量の多いCTCクラスターであるCTC-cは、細胞75個のうち41個(55%)を構成し、上皮腫瘍細胞に関して確立された基準を満たす(これに対してCTC-plt:32%;CTC-pro:13%)。注目されることとして、複数の肉眼的転移を有した唯一のマウス(MP7)は、このクラスターの中でCTCの数が多かった。条件を合わせた原発性腫瘍と比較すると、CTC-c細胞では878種の転写物で発現が増加しており、発現が減少したのは774種の遺伝子であった(表2)。CTC-cでエンリッチされている遺伝子の遺伝子オントロジー(GO)分析(表3)により、環境シグナルとの細胞相互作用(GO:0045785 細胞接着の正の調節;GO:0048584 刺激に対する応答の正の調節)、細胞の形状および構造(GO:0030036 アクチン細胞骨格組織化;GO:0060429 上皮発生)、ならびに転写状態(GO:0045449 転写の調節;GO:0051276 染色体組織化)に関連するシグネチャーのエンリッチメントが指し示された。CTC-c細胞において外部刺激によって活性化されるシグナル伝達経路の寄与を評価するために、エンリッチされている遺伝子に対して、KEGGデータベースを用いてアノテーションを行った(表1)。Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)経路分析によっても、細胞接着斑(オッズ比[OR]2.7、q値6.7310.4)およびアクチン細胞骨格の調節(OR2.4、q値0.005)に関するエンリッチメントが同様に示された。注目に値することとして、アノテーションを行ったKEGGシグナル伝達経路のうち、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)経路は最も高度にエンリッチされていた。最も高度に示されたのはMAPK経路(OR2.2、q値0.006)であった;MAPKシグナル伝達は、Kras^{G12D}を動因とする原発性腫瘍において既に活性化されている。しかし、MSigDB Kras依存性シグネチャーはCTCと比較して原発性腫瘍においてエンリッチされていたものの、後者はBraf、MrasおよびRras2の発現が増加しており、これはCTCにおいてMAPKを活性化するための代替的な経路を示している。この知見は、マイクロアレイに基づく方法を用いて、臍臓CTCにおいてMAPK経路が最も高度にエンリッチされていることを同定した別の研究と一致する(Sergeant et al., 2012)。

10

20

【0155】

CTCでエンリッチされている遺伝子には、TGF- β (kushima and Miyazono, 2010; Siegel and Massague, 2003)、WNT (Anastas and Moon, 2013; Clevers and Nusse, 2012; Katoh and Katoh, 2007)、およびVEGF (Carmeliet and Jain, 2011; Folkman, 1995)を含む、転移に関与する十分に確立されたシグナル伝達経路の代表も見られた。臍臓CTCのこのコホートでは、Wnt4およびTgfb2が原発性腫瘍と対比してCTCにおいて最も高度にエンリッチされており、これはこれらの主要な経路に関与するオートクリンシグナル伝達を示す。転移へのこれらの十分に明確な寄与因子に加えて、CTC発現分析により、ニュートロフィン経路、toll様受容体経路およびB細胞受容体経路を含む、予想外のシグナル伝達経路の活性化も明らかになった。ニュートロフィン経路の活性化は臍臓において、特に神経周囲浸潤の増加と関連して報告されている(Miknyoczki et al., 1996; Miknyoczki et al., 1999; Ohta et al., 1997; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2005)。Toll様受容体経路およびB細胞受容体経路は、CTCリードにおける提示はよりわずかであったが、それらは免疫調節シグナル伝達の構成要素の異常活性化を示唆する。最終的には、これらの活性化されたシグナル伝達経路の機能的意義を検証するために、CTC由来培養物の樹立が必要であると考えられる。

30

40

【0156】

CTC-cクラスター内の単細胞は腫瘍細胞の特徴的基準を満たしたものの、非古典的CTCクラスター、CTC-pltおよびCTC-proの実体を規定するにはさらなる分析が必要となった。CTC-cと比較して、CTC-pltクラスター内の単細胞は、創傷治癒および止血のシグネチャーに関して高度のエンリッチメントを有し、さらにMSigDB血小板および巨核球発現プロファイルについても同様であった(表4)。このことは、これらの細胞が血中循環巨核球/巨大血小板のいずれかであるか、またはCTCが付着性血小板に覆われていることを指し示す。腫瘍細胞特異的な系列タグ標識により、CTC-plt細胞が腫瘍起源であるという実体が裏づけられる。2匹のKPC-mT/mGマウス由来の18個のEGFP系列タグ標識単一CTCを、単細胞RNA

50

シーケンシングに供した：2匹のマウス由来の合計9個のCTC（マウスGMP1由来のCTC 7個中7個、およびマウスGMP2由来の11個中2個）は、教師なし階層クラスタリングを用いて、CTC-plt内に含まれた（非提示データ）。このように、CTC-pltクラスターは強い血小板マーカーを示すCTCを含んでおり、これは付着性血小板によってコードされる転写物に由来する可能性が最も高い。興味深いことに、CTC-plt細胞は、アノテーションを行ったすべての血小板転写物のデジタル除去後にも、それらのCTC-cとの明確な分離を維持していた（非提示データ）。このため、インビトロモデル化実験によって最近示唆されているように（Labelle et al., 2011）、大量の血小板の付着のために本来のCTC発現プロファイルが変化している可能性がある。

【0157】

CTC-proクラスターはNB508膵癌細胞株およびMEFの両方と最も類似しており、これはCTC-cと比較すると細胞増殖マーカーMki67がエンリッチされていた。この複合的なグループ分類には複数の系列が寄与している可能性が高い：腫瘍に限定された系列タグ標識EGFP発現を有するKPCマウス由来のCTCはCTC-proとともにクラスター化し（非提示データ）、Mki67の大量発現およびMSigDBにおけるアノテーションを行った細胞周期シグネチャーの点で注目される（Whitfield et al., 2002）（非提示データ）。CTC-proクラスター内の1つの単細胞は膵癌細胞株NB508に由来しているが、もう1つのもの（MP3-2）は、古典的CTCに特徴的なケラチン高発現/E-カドヘリン高発現を有していた（非提示データ）。しかしながら、もう1つのサブクラスターは、抗原プロセッシング遺伝子および抗原提示遺伝子の発現によって同定された免疫細胞および樹状細胞を含んでいた（GO:0019886 抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介した外因性ペプチド抗原の提示；表5）。以上を総合すると、CTC-proクラスターは増殖性の高い細胞のグループ分類に相当し、そのサブセットは腫瘍由来であるように思われる。

【0158】

総合すると、個々の膵臓CTCのバイアスのない単離およびRNAシーケンシング評価により、これらの過半数はRNAのさまざまな段階での分解のために生存能がないことが指し示された。生存能のある残りのCTCにおいて、3つの主要なクラスが教師なしクラスタリングによって識別可能である：古典的サブセット（CTC-c）が55%を占め、第2は血小板付着グループ（CTC-plt；32%）、第3は増殖シグネチャーを特徴とする異種混交的クラスター（CTC-pro；13%）である。それらの最も明確に規定された腫瘍由来特徴を考慮して、本発明者らはCTC-cクラスターを、転移関連経路の詳細な分析のために選択した。

【0159】

膵臓CTCは上皮マーカー、間葉マーカーおよび幹細胞マーカーを共発現する。膵臓における初期転移とのEMTの関連性は、KPCマウスモデルにおける系列追跡研究によって裏づけられている（Rhim et al., 2012）。ヒト乳癌CTCにおいて、個々のCTC内の上皮マーカーおよび間葉マーカーの分布が本発明者らによって最近報告され、それは腫瘍組織学、および多様な治療法に対する反応または耐性の両方を反映している（Yu et al., 2013）。マウス膵臓CTCにおいてEMTを直接的に検討するために、樹立された上皮（E）マーカーおよび間葉（M）マーカー（Kalluri and Weinberg, 2009）を、CTC-cクラスター内の各細胞を評価するために用いた（非提示データ）。原発性腫瘍と比較して、CTC-c細胞は上皮マーカーであるE-カドヘリン（Cdh1）およびMuc1の明白な損失を明らかに示し、一方、間葉転写物は混在性であり、いくつかは発現増加（Cdh11、Vim）を示し、他のものはレベルが低下した（S100a4、Itga5、Sdc1）（図3Aおよび3B）。注目に値することとして、CTCにおいてアップレギュレートされていた間葉遺伝子でさえも、単細胞間で高度に異種混交的な発現を示した（非提示データ）。対照的に、E-カドヘリン（Cdh1）を含む上皮マーカーの損失は、すべての古典的CTCを通じてほぼ一様であった。

【0160】

CTCはまた、転移前駆細胞についてもエンリッチされていて、転移性腫瘍の蓄積を開始させることができると考えられている。そのような前駆細胞と想定されている癌幹細胞との関係ははっきりしておらず、これらの細胞を同定する上での確立された幹細胞マーカー

10

20

30

40

50

の関連性についても同様である。提唱されている膵癌幹細胞遺伝子 (Rasheed and Matsui, 2012; Rasheed et al., 2010) を、単細胞RNAシーケンシングのリードで評価した (図3B)。検討したすべての候補マーカー (Aldh1a1、Aldh1a2、Prom1 / Cd133、Cd44、Met、EpCAM) のうち、Aldh1a1およびAldh1a2のみがCTCにおいてエンリッチされていた。古典的CTCはほとんどAldh1a2アイソフォームを発現し、一方、CTC-plt細胞ではAldh1a1がエンリッチされていたが、いくつかの単一CTCではこれらのアイソフォームが共発現されていた。MEF、NB508膵癌細胞および正常WBCもAldh1a1を発現したが、Aldh1a2は発現しなかった (非提示データ)。単一CTCにおいて、Aldh1アイソフォームの発現と間葉遺伝子Cdh11またはVimのエンリッチメントとの間に相関は見られず、このことはこれらの2種のバイオマーカーに本来は結びつきがないことを示唆する。

10

【0161】

Aldh1a2がCTCによって発現される有望な幹細胞様マーカーとして同定されたことを受けて、条件を合わせた原発性腫瘍におけるその発現を、RNAインサイチュアハイブリダイゼーション (RNA-ISH) を用いて検討した。腫瘍内での発現パターンは異種混交的であった: Aldh1a2発現細胞は主として、腫瘍の「間質」区画または非上皮 (すなわち、ケラチン低値) 区画に局在していた (非提示データ)。膵癌において特に大量である、これらの非上皮細胞の起源は、混在性である可能性が高い。ヒト膵癌における組織学的評価、およびKRAS突然変異分析が陰性であったこと (Biankin et al., 2012; Ogino et al., 2005) により、これらの細胞のほとんどは、腫瘍起源ではなく、反応性線維芽細胞または間質であることが指し示された。しかし、KPCマウスにおける系列追跡により、間質細胞と推定されるこれらのごく一部は実際には腫瘍由来であり、おそらくEMTを受けて線維芽細胞のように見えるようになったと考えられることが最近示されている (Rhim et al., 2012)。興味深いことに、最も多くの転移を有し、Aldh1a2陽性CTCの数も最も多かったマウスであるMP7も、Aldh1a2が最も高いレベルである原発性腫瘍を有していた。そのケースでは、Aldh1a2陽性細胞は間質区画内に散在性に存在しており、さらに上皮性 (ケラチン高値) 構成要素の小さな部分集団も含んでいた (非提示データ)。このように、ケラチン高値である古典的CTCは幹細胞関連遺伝子Aldh1a2を発現し、原発性腫瘍におけるその発現は、間質 (ケラチン低値) 区画に、しかも上皮細胞の小さな部分集団のみに限定される。

20

【0162】

古典的CTCは、間質でエンリッチされている遺伝子の発現を共通に有する。CTCの明らかな多様性に加えて、原発性腫瘍内にあるそれらの起源の細胞、それらが血流に侵入してその中で生存する機序、および最終的にはCTC特異的治療標的の可能性のあるものの同定について、洞察がさらに得られる可能性のある共通の転写物を探索した。すべての古典的CTCのうち90%以上で、非常に高いレベル (100 RPMを上回る) で発現される、最も高度にエンリッチされているCTC転写物 (RPスコア < 300) を同定するために、厳格な基準を選択した。3種の遺伝子がこれらの基準を満たした: 種々の異なる癌で腫瘍間質中に発現される細胞外マトリックスプロテオグリカンであるデコリン (Decorin) (Dcn) (Adany et al., 1990; Bostrom et al., 2013; Henke et al., 2012; Hunzelmann et al., 1995; Iozzo and Cohen, 1994; Mu et al., 2013; Nash et al., 2002); 増殖誘発特性および抗増殖特性の両方を有すると報告されている、ヒトPDACで発現される細胞外増殖因子結合タンパク質であるインスリン様増殖因子結合タンパク質5 (Igfbp5) (Johnson et al., 2006; Johnson and Haun, 2009); および重要な幹細胞 (iPS) リプログラミング因子の1つであり (Takahashi and Yamanaka, 2006)、膵癌発生と関連づけられるKruppel様因子4 (Klf4) (Brembeck and Rustgi, 2000; Prasad et al., 2005; Wei et al., 2010)。RNA-ISHによれば、Dcnは腫瘍の間質要素中で散在性に発現されていた (図6)。注目すべきことに、Igfbp5およびKlf4は両方とも限局性に発現されており、その大部分は腫瘍の上皮区画に隣接する間質性に見える細胞内にあった (非提示データ)。EGFP系列限定原発性腫瘍のRNA-ISHにより、上皮/間質境界面にあるIgfbp5陽性細胞は腫瘍起源であることが確認された (非提示データ)。この移行領域に加えて、このEGFPタグ標識腫瘍におけるKlf4の分析により、上皮管のサブセットにおける発現も認められた (非提示データ)。注目されること

30

40

50

として、それらは原発性腫瘍細胞の小さなサブセットのみで発現されるものの、Igfbp5およびKlf4は両方とも、すべての古典的CTCのうち85%で高度に共発現される。CTCにおいて明らかな混在性上皮/間葉マーカーと合わせて考えると、これらの観察所見は、多くのCTCが、Igfbp5およびKlf4の発現によって規定される上皮/間質境界面にある病巣に由来するという可能性を提起するものである。

【0163】

最も高度に発現されるこの3種の転写物に加えて、CTCは、間質細胞マトリックスに関連づけられる遺伝子の高レベル発現の点でも注目された。CTCでエンリッチされている全遺伝子の遺伝子オントロジー分析(表3)により、60種の細胞外タンパク質(GO:0044421、OR 1.7、q値 6.4×10^{-3})が同定され、そのうち32種はタンパク質性細胞外マトリックス(ECM)中に見いだされた(GO:0005578、OR 2.4、q値 4.8×10^{-3})。最近の諸研究により、膵癌病態および転移に対する反応性間質の重要性が強く示されている(Feig et al., 2012; Neesse et al., 2013; Neesse et al., 2011; Olive et al., 2009; Provenzano et al., 2012)。しかし、循環血液中の腫瘍細胞内でのこれらの間質関連ECM遺伝子の発現は予想外であった。マウス膵臓腫瘍モデルにおいて、間質でエンリッチされている主要な遺伝子を同定するために、本発明者らは、腫瘍細胞と反応性間質細胞が混在するものに相当するバルク腫瘍試料と原発性腫瘍由来の精製EGFPタグ標識単細胞(TuGMP3)との間でRP発現変動分析を行った。原発性腫瘍単細胞との比較で、合計51種のタンパク質性ECM遺伝子が、バルク腫瘍においてエンリッチされていた(GO:0005578、OR 4.8、q値 3.4×10^{-18})。これらのうち、6種の遺伝子(Ccdc80、Col1a2、Col3a1、Dcn、Sparc、Timp2)は、以前同定されたCTCでエンリッチされている遺伝子セットと共通していた(非提示データ)。上述したように、デコリン(Dcn)は、CTCにおいて最も高度にエンリッチされており(中央値10,686rpm)、CTCの98%で高レベル発現(>100rpm)を有するものとして同定された。2番目に存在量の多い遺伝子はSparc(中央値3,913rpm)であり、CTCの88%で高発現された。これらの2種の遺伝子は、古典的CTCの88%で高レベルに共発現された。Dcn(図6)およびSparc(非提示データ)の両方に関する原発性腫瘍のRNA-ISHにより、これらの遺伝子は反応性間質全体で発現されるが、原発性腫瘍の上皮ケラチンリッチ領域には存在しないことが確かめられた。

【0164】

間質由来ECM遺伝子の発現はすべての古典的CTCに共通する特徴であるものの、それらが同一のKras/p53遺伝的動因を有するにもかかわらず、これらの遺伝子間でのマウス特異的な分布バイアスは明白であった。このマウス特異的クラスタリングは、教師なし分析で明白であった(p値 $< 2.2 \times 10^{-16}$)。例えば、サブクラスター3はマウスMP6由来の単一CTCにおいて大きな比率を占め、一方、サブクラスター4はマウスMP7で、サブクラスター5はマウスMP2でエンリッチされていた。RP分析によってマウスMP2およびMP7のCTC間で発現変動が見られた68種の転写物のうち、遺伝子オントロジーにより、11種の細胞外タンパク質について有意なエンリッチメントが指し示され(GO:0044421、OR 3.8、q値 0.06)、そのうち7種はタンパク質性ECM中に見いだされた(GO:0005578、OR 6.3、q値 0.05)(非提示データ)。総合すると、これらのデータは、マウス膵癌モデルに由来するほとんどのCTCが、原発性腫瘍の上皮区画ではなく間質中に正常認められるECM遺伝子のセットを高レベルで発現することを指し示している。このことは多くのCTCの起源が上皮/間質境界面にあることを反映すると考えられ、これはIgfbp5およびKlf4といった特有の限定的なマーカーの発現と一致する。遺伝的に条件を合わせた個々のマウス腫瘍から、ECM遺伝子発現の共通かつ特有の両方のパターンを有するCTCが生じたことは、CTCの基本的特徴に重ね合わされた腫瘍特異的浸潤経路を示唆する。CTCによって発現された細胞外タンパク質が高レベルであることは、これらの転移前駆細胞を標的化するための予想外の機会をもたらす。

【0165】

ヒト膵臓CTCはECMタンパク質SPARCを発現する。ECMタンパク質発現のヒト疾患との関連性を明らかにするために、転移性PDAC患者の血液からCTCを単離して単細胞RNAシーケン

シングに供した。3人の患者由来の7個の膵臓CTCの分析により、その大半がそれらが上皮起源であることを示すケラチンを発現すること、およびマウスCTCにおいてエンリッチされていた60種の細胞外タンパク質遺伝子のうち合計13種が、少なくとも1つのヒト膵臓CTCにおいて高レベル(>100rpm)で発現されることが明らかになった(図7)。ヒトSPARCは、すべてのヒト膵臓CTCにおいて高レベルで認められた唯一の遺伝子であった。ヒト前立腺CTCおよび乳癌CTCの分析からも、SPARCを含む細胞外タンパク質の有意な発現が示され、このことはこれらの標的が転移上皮癌細胞に一般的に共通することを強く示している(非提示データ)。マウスおよびヒトの両方のPDACにおけるSparc / SPARCのRNA-ISHにより、発現が主として腫瘍の間質区画に限局されることが見いだされた(非提示データ)。SPARC発現はヒト原発性PDAC腫瘍の198件中196件(99%)に認められ、陽性腫瘍の36%は、シグナル全体のうちわずかではあったが、上皮腫瘍細胞においてある程度検出可能なSPARCを有した。細胞外タンパク質としてのSPARCの存在により、SPARCを標的とする抗体主導療法が可能になる。総合すると、これらのデータは、マウス膵臓CTCにおける知見をヒト疾患でも見いだすことができ、新規バイオマーカーおよび治療標的の両方が与えられることを指し示している。

10

【0166】

考察

本明細書に記載されたのは、単細胞RNAシーケンシングを用いた、CTCの組成および多様性の詳細な分析である。合計すると、高品質トランスクリプトームが93個のマウス膵臓単一CTCで達成され、それらを、条件を合わせた原発性腫瘍由来の20個の単細胞、ならびにバルク腫瘍調製物、ならびに同じマウス膵臓腫瘍モデルから樹立された16個の細胞と比較した。ヒトPDACによく一致するマウスモデルの使用により、CTCと同時に単離された原発性腫瘍標本と比較することが可能であった。KPCマウスモデルにおける共通のKras / Trp53遺伝的動因を考慮することで、個々のマウスにおける、および異なる動物間のCTC不均一性を検討することも可能であった。さらに、CTC-iChip技術の使用により、タグ標識のないCTCをそれらの細胞表面エピトープにかかわらず選択することが可能になり、それ故に腫瘍マーカー特異的な細胞精製物に付随するバイアスを回避することができた。総合すると、これらの観察所見には以下が含まれる：1. CTCが、主要な「古典的CTC」グループ、および血小板由来マーカーまたは増殖シグネチャーを特徴とする他のグループを含む複数のサブセットにクラスター化すること；2. 個々のマウス腫瘍はこれらのクラスターのそれぞれに合致するCTCを生じうるが、それらに共通の遺伝的動因があるにもかかわらず、個々のマウスに由来するCTCに特有のパターンがあること；3. 事実上すべての古典的CTCが有する共通のマーカーには、上皮マーカーおよび間葉マーカーの両方、Aldh1a2幹細胞マーカー、ならびに原発性腫瘍の上皮/間質境界に局在する病巣を特定する2種の高発現転写物(Igfbp5およびKlf4)が含まれること；ならびに4. ほぼすべての古典的CTCが共通して有する最も高度にエンリッチされているCTC特異的転写物は、腫瘍間質区画に付随する細胞外マトリックスタンパク質をコードすること。

20

30

【0167】

部分的に精製されたバルクCTC集団の以前のRNAシーケンシングと比較して、本明細書において報告された単細胞分析は、かなり上回る深さを持つ腫瘍細胞特異的リードをもたらす。そのため、マウス膵癌モデル由来の古典的CTCの詳細な分析は前例のないものである。膵癌CTCが、上皮-間葉転換の重要な特徴である上皮マーカー、E-カドヘリン(Cdh1)の発現を一様に喪失していることが、本明細書において実証された。しかし、これらの細胞は、サイトケラチンなどの他の上皮マーカーの発現は喪失しておらず、ビメンチンなどの古典的EMT間葉マーカーの一貫した増加も見られない。そのため、ほとんどの古典的CTCは混合型状態に停止しているように思われる。それらによるサイトケラチン(原発性腫瘍の上皮構成要素に存在する)の発現にもかかわらず、CTCにおけるほとんどの他の高発現マーカーは、原発性腫瘍の非上皮性または「間質」性構成要素と共通している。古典的CTCにおいて発現されるこれらの間質遺伝子の中には、膵癌幹細胞マーカーと推定されるAldh1a2がある(Rasheed and Matsui, 2012; Rasheed et al., 2010)。Aldh1a2が、転移前

40

50

駆細胞における細胞可塑性の機能的に有意なマーカーであるか否かはまだ明らかでない。

【0168】

古典的CTCに共通する上皮性および間葉性状態に関する興味深い観察所見は、原発性腫瘍内の上皮/間質境界面にある細胞の小さな部分集団でのみ発現される2種の遺伝子であるIgfbp5およびKlf4の、事実上一様な(>85%)高レベルでの共発現である。このことは、腫瘍内のこの決定的な場所で、生存能のあるCTCのかなり多くの割合が生じるという興味深い可能性を提起する。実際に、EMTを活発に受ける腫瘍細胞はおそらく上皮-間質機能がエンリッチされており、腫瘍由来細胞型および非悪性の反応性細胞型の両方を有する腫瘍間質の混在系列に寄与すると考えられる。胚発生および膵臓悪性腫瘍におけるIGFシグナル伝達およびKlf4転写調節の両方について考えられる役割からみて、腫瘍およびCTCの両方におけるそれらの特有の発現パターンは特に注目に値する。

10

【0169】

最後に、この単一CTC RNAシーケンシング研究からの最も予想外の観察所見は、古典的CTCの大多数でECMタンパク質の存在量が極めて高レベルであったことである。注目に値することとして、条件を合わせた原発性乳房腫瘍および転移性乳房腫瘍の以前の評価から、最もよく認められる遺伝子発現の差異として、転移におけるECM分子のエンリッチメントが同定されており、それは発現変動遺伝子のおよそ18%を占めた(Weigelt et al., 2005)。このことは転移部位の局所環境における差異を反映すると解釈されたが、今回のデータは、ECMタンパク質がCTCそれ自体によって高発現されることを指し示している。古典的な「種子か土壌か(seed versus soil)」論争(Fidler, 2003)になぞらえて言えば、CTCは実のところ、それら自身の土壌をある程度保有している種子であるのかもしれない。

20

【0170】

CTCの詳細な分子分析の最終的な目標は、それらが生じる過程、およびそれらの治療上の脆弱性を解明することである。この点に関して、今回の単一CTC RNA配列解析によって導き出された重要な観察所見は、ECMに認められるタンパク質が圧倒的多数であるという細胞外タンパク質の予想外の発現であった。CTCにおいて最も存在量が多く、かつ共通していたECMタンパク質の2つはDcnおよびSparcであり、これらはいずれも確立されている腫瘍間質遺伝子である。注目に値することとして、Sparcを発現する間質はアルブミン結合化学療法含有ナノ粒子(nab-パクリタキセル)と結合するように思われ、ヒトPDACにおける細胞傷害性および有効性の増大が可能になっている(Neuzillet et al., 2013; Von Hoff et al., 2011; Yardley, 2013)。実際に、化学療法薬の送達を改良し、腫瘍細胞をそれらを支える微小環境から引き離す手段として、膵癌間質を標的とすることにはかなりの努力が向けられている(Neesse et al., 2011; Olive et al., 2009; Provenzano et al., 2012; Rasheed et al., 2012)。これらの遺伝子産物がCTCによっても発現されるという知見は、抗体主導療法を、原発性腫瘍間質に対してだけでなく、腫瘍細胞をそれらが血液中を移行している時に標的とするためにも用いることを指し示している。

30

【0171】

本明細書に述べるように、今回のCTC分析は、CTCを腫瘍を規定する既知のマーカーに合わせることから、CTCをほとんどの原発性腫瘍細胞と区別し、かつCTCが血流中で生存して遠隔転移を生じさせる能力の基盤をなす可能性のある、特有の特性を調べることに拡張している。ヒト癌転移の細胞過程についてのそのような洞察は、遠隔臓器への原発性腫瘍の伝播を最終的に予防するという目標にとって決定的に重要である。

40

【0172】

実験手順

マウスおよび細胞株。これらの実験に用いた膵癌を有するマウスは、以前に記載された通り(Bardeesy et al., 2006)、Pdx1、LSL-Kras^{G12D}、およびTrp53^{lox/+}またはTrp53^{lox/lox}によって作動されるCreを発現する。EGFP膵臓系列タグ標識KPCマウスは、mT/mGマウス(Jackson Laboratory Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J)を、KPCマウス作製のための交配ペアと交配させることによって作製した。正常FVBマウスはJackson

50

Laboratoryから購入した。マウスの飼育および手順はすべて、MGH SRACにより承認されたプロトコールの下で行った。

【 0 1 7 3 】

CTCエンリッチメント技術の適合化．バイアスのないエンリッチメントシステムへの要求を考慮した上で、以前に提示された陰性枯渇技術を本出願のために選択した（Ozkumur et al., 2013）。ラット抗マウスCD45抗体（BAM114、R&D Systems, USA）をMyOneビーズと結合させた点を除き、処理プロトコールはすべて、以前に特定されたものと同一とした。

【 0 1 7 4 】

単細胞顕微操作、増幅およびシーケンシング．全血抗CD45陰性枯渇の後に、エンリッチされた細胞を含有する産物を35mmペトリ皿に収集し、Nikon Eclipse Ti（商標）倒立蛍光顕微鏡を用いて観察した。関心対象の細胞は、細胞形態が無傷であり、抗CD45磁気ビーズによる標識がないことに基づいて同定した。これらの標的細胞を、Eppendorf Transfer Man（登録商標）NK 2マイクロマニピュレーターに装着した10 μ m移行チップで個別に顕微操作して、RNA保護用溶解緩衝液を含有するPCRチューブに注入し、液体窒素中で直ちに急速凍結させた。単細胞を改変プロトコール（Tang et al., 2010）を用いて増幅させて、ABI5500XL（商標）システムでシーケンシングを行った。

10

【 0 1 7 5 】

RNAインサイチュールハイブリダイゼーション（RNA-ISH）．RNA-ISHは、Affymetrix QuantiGene ViewRNA ISH Tissue-2 Plex Assay（商標）に従って行った。

20

【 0 1 7 6 】

参考文献

Adany, R., Heimer, R., Caterson, B., Sorrell, J.M., and Iozzo, R.V. (1990). Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. *The Journal of biological chemistry* 265, 11389-11396.

Anastas, J.N., and Moon, R.T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 11-26.

Bardeesy, N., Aguirre, A.J., Chu, G.C., Cheng, K.H., Lopez, L.V., Hezel, A.F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., *et al.* (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5947-5952.

Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Gingras, M.C., Muthuswamy, L.B., Johns, A.L., Miller, D.K., Wilson, P.J., Patch, A.M., Wu, J., *et al.* (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491, 399-405.

Bostrom, P., Sainio, A., Kakko, T., Savontaus, M., Soderstrom, M., and Jarvelainen, H. (2013). Localization of decorin gene expression in normal human breast tissue and in benign and malignant tumors of the human breast. *Histochemistry and cell biology* 139, 161-171.

Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P. (2004). Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS letters* 573, 83-92.

Brembeck, F.H., and Rustgi, A.K. (2000). The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. *The Journal of biological chemistry* 275, 28230-28239.

Cann, G.M., Gulzar, Z.G., Cooper, S., Li, R., Luo, S., Tat, M., Stuart, S., Schroth, G., Srinivas, S., Ronaghi, M., *et al.* (2012). mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One* 7, e49144.

10

20

30

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

Chen, C.L., Mahalingam, D., Osmulski, P., Jadhav, R.R., Wang, C.M., Leach, R.J., Chang, T.C., Weitman, S.D., Kumar, A.P., Sun, L., *et al.* (2013). Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *The Prostate* 73, 813-826.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205.

Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D.S., Cook, N., and Tuveson, D.A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18, 4266-4276.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine* 1, 27-31.

Henke, A., Grace, O.C., Ashley, G.R., Stewart, G.D., Riddick, A.C., Yeun, H., O'Donnell, M., Anderson, R.A., and Thomson, A.A. (2012). Stromal expression of decorin, Semaphorin6D, SPARC, Sprouty1 and Tsukushi in developing prostate and decreased levels of decorin in prostate cancer. *PLoS One* 7, e42516.

Hunzelmann, N., Schonherr, E., Bonnekoh, B., Hartmann, C., Kresse, H., and Krieg, T. (1995). Altered immunohistochemical expression of small proteoglycans in the tumor tissue and stroma of basal cell carcinoma. *The Journal of investigative dermatology* 104, 509-513.

Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 10, 415-424.

Iozzo, R.V., and Cohen, I. (1994). Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. *Exs* 70, 199-214.

Johnson, S.K., Dennis, R.A., Barone, G.W., Lamps, L.W., and Haun, R.S. (2006). Differential expression of insulin-like growth factor binding protein-5 in pancreatic adenocarcinomas: identification using DNA microarray. *Molecular carcinogenesis* 45, 814-827.

Johnson, S.K., and Haun, R.S. (2009). Insulin-like growth factor binding protein-5 influences pancreatic cancer cell growth. *World journal of gastroenterology : WJG* 15, 3355-3366.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.

Katoh, M., and Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 13, 4042-4045.

Krause, D.S., Ito, T., Fackler, M.J., Smith, O.M., Collector, M.I., Sharkis, S.J., and May, W.S. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84, 691-701.

10

20

30

40

- Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R.O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20, 576-590.
- Miknyoczki, S.J., Klein-Szanto, A.J., and Ruggeri, B.A. (1996). Neurotrophin-Trk receptor interactions in neoplasia: a possible role in interstitial and perineural invasion in ductal pancreatic cancer. *Critical reviews in oncogenesis* 7, 89-100.
- Miknyoczki, S.J., Lang, D., Huang, L., Klein-Szanto, A.J., Dionne, C.A., and Ruggeri, B.A. (1999). Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *International journal of cancer Journal international du cancer* 81, 417-427. 10
- Mu, Y., Chen, Y., Zhang, G., Zhan, X., Li, Y., Liu, T., Li, G., Li, M., Xiao, Z., Gong, X., *et al.* (2013). Identification of stromal differentially expressed proteins in the colon carcinoma by quantitative proteomics. *Electrophoresis* 34, 1679-1692.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593-605.
- Nash, M.A., Deavers, M.T., and Freedman, R.S. (2002). The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 8, 1754-1760. 20
- Neesse, A., Frese, K.K., Bapiro, T.E., Nakagawa, T., Sternlicht, M.D., Seeley, T.W., Pilarsky, C., Jodrell, D.I., Spong, S.M., and Tuveson, D.A. (2013). CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12325-12330.
- Neesse, A., Michl, P., Frese, K.K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M.A., Lolkema, M.P., Buchholz, M., Olive, K.P., Gress, T.M., *et al.* (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60, 861-868. 30
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cros, J., Faivre, S., Hammel, P., and Raymond, E. (2013). Stromal expression of SPARC in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer metastasis reviews*.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Yan, L., Cantor, M., Namgyal, C., Mino-Kenudson, M., Lauwers, G.Y., Loda, M., and Fuchs, C.S. (2005). Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 7, 413-421.
- Ohta, T., Numata, M., Tsukioka, Y., Futagami, F., Kayahara, M., Kitagawa, H., Nagakawa, T., Yamamoto, M., Wakayama, T., Kitamura, Y., *et al.* (1997). Neurotrophin-3 expression in human pancreatic cancers. *The Journal of pathology* 181, 405-412. 40
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., *et al.* (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461.

- Ozkumur, E., Shah, A.M., Ciciliano, J.C., Emmink, B.L., Miyamoto, D.T., Brachtel, E., Yu, M., Chen, P.I., Morgan, B., Trautwein, J., *et al.* (2013). Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med* 5, 179ra147.
- Pantel, K., Brakenhoff, R.H., and Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8, 329-340.
- Powell, A.A., Talasz, A.H., Zhang, H., Coram, M.A., Reddy, A., Deng, G., Telli, M.L., Advani, R.H., Carlson, R.W., Mollick, J.A., *et al.* (2012). Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* 7, e33788. 10
- Prasad, N.B., Biankin, A.V., Fukushima, N., Maitra, A., Dhara, S., Elkahloun, A.G., Hruban, R.H., Goggins, M., and Leach, S.D. (2005). Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res* 65, 1619-1626.
- Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., and Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 418-429. 20
- Ramskold, D., Luo, S., Wang, Y.C., Li, R., Deng, Q., Faridani, O.R., Daniels, G.A., Khrebtkova, I., Loring, J.F., Laurent, L.C., *et al.* (2012). Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30, 777-782.
- Rasheed, Z.A., and Matsui, W. (2012). Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology* 27 *Suppl* 2, 15-18.
- Rasheed, Z.A., Matsui, W., and Maitra, A. (2012). Pathology of pancreatic stroma in PDAC. In *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*, P.J. Grippo, and H.G. Munshi, eds. (Trivandrum (India)). 30
- Rasheed, Z.A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S.M., Koorstra, J.B., Rajeshkumar, N.V., He, X., *et al.* (2010). Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 102, 340-351.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., *et al.* (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349-361.
- Sergeant, G., van Eijnsden, R., Roskams, T., Van Duppen, V., and Topal, B. (2012). Pancreatic cancer circulating tumour cells express a cell motility gene signature that predicts survival after surgery. *BMC cancer* 12, 527. 40
- Siegel, P.M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-821.
- Society, A.C. (2013). *Cancer Facts & Figures 2013* (Atlanta: American Cancer Society).

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Tang, F., Barbacioru, C., Nordman, E., Li, B., Xu, N., Bashkirov, V.I., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc* 5, 516-535.

Von Hoff, D.D., Ramanathan, R.K., Borad, M.J., Laheru, D.A., Smith, L.S., Wood, T.E., Korn, R.L., Desai, N., Trieu, V., Iglesias, J.L., *et al.* (2011). Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 29, 4548-4554. 10

Wang, W., Zhao, H., Zhang, S., Kang, E., Chen, Y., Ni, C., Zhang, S., and Zhu, M. (2009). Patterns of expression and function of the p75(NGFR) protein in pancreatic cancer cells and tumours. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 35, 826-832.

Wei, D., Wang, L., Kanai, M., Jia, Z., Le, X., Li, Q., Wang, H., and Xie, K. (2010). KLF4alpha up-regulation promotes cell cycle progression and reduces survival time of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 139, 2135-2145. 20

Weigelt, B., Wessels, L.F., Bosma, A.J., Glas, A.M., Nuyten, D.S., He, Y.D., Dai, H., Peterse, J.L., and van't Veer, L.J. (2005). No common denominator for breast cancer lymph node metastasis. *Br J Cancer* 93, 924-932.

Welty, C.J., Coleman, I., Coleman, R., Lakely, B., Xia, J., Chen, S., Gulati, R., Larson, S.R., Lange, P.H., Montgomery, B., *et al.* (2013). Single cell transcriptomic analysis of prostate cancer cells. *BMC molecular biology* 14, 6.

Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O., *et al.* (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular biology of the cell* 13, 1977-2000. 30

Yardley, D.A. (2013). nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 170, 365-372.

Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., and Haber, D.A. (2011). Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 192, 373-382.

Yu, M., Ting, D.T., Stott, S.L., Wittner, B.S., Ozsolak, F., Paul, S., Ciciliano, J.C., Smas, M.E., Winokur, D., Gilman, A.J., *et al.* (2012). RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature* 487, 510-513. 40

Zhang, Y., Dang, C., Ma, Q., and Shimahara, Y. (2005). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human pancreatic cancer. *Oncology reports* 14, 161-171.

【 0 1 7 7 】

(表1) KEGGに定義されたシグナル伝達経路における、CTCでエンリッチされている遺伝子のアノテーション。*は複数の経路遺伝子セットに見いだされた遺伝子を指し示している。

MAPK 経路		WNT 経路	ニュートロフィン 経路	TGF- β 経路	Toll様 受容体 経路	VEGF 経路
1500003o03rik*	Jund	1500003o03rik*	Akt2*	Amhr2	Akt2*	1500003o03rik*
Akt2*	Map3k3*	Crebbp*	Braf*	Crebbp*	Fos*	Akt2*
B230120h23rik	Mapk1*	Csnk1a1	Calm1	Dcn	lfnar2	Hspb1*
Braf*	Mapkapk3*	Jun*	Calm2	Id1	lrak4*	Kdr
Dusp1	Mef2c	Nkd1	lrak4*	Id2	lrf7	Mapk1*
Dusp14	Mras	Ppp3ca*	Irs2	Mapk1*	Jun*	Mapkapk3*
Dusp3	Nf1	Rock1*	Jun*	Rock1*	Mapk1*	Pla2g4a*
Fas	Nfkb2	Rock2*	Maged1	Rock2*	Nfkbia*	Ppp3ca*
Fgf1	Nr4a1	Siah1a	Map3k3*	Smad4*	Tirap	Src
Finc	Pla2g4a*	Smad4*	Mapk1*	Tgfb2*	Tlr2	
Fos*	Ppp3ca*	Tbl1x	Nfkbia*	Tgfr2*		
Gadd45b	Rras2	Tcf7l1	Shc1	Thbs1		
Hspa2	Tgfb2*	Wnt4	Ywhaz			
Hspb1*	Tgfr2*					
Jun*						

10

【 0 1 7 8 】

(表2) ランクプロダクトによる、有意に発現された遺伝子 (FDR < 0.01)

カウント	CTC-c 対 原発性腫瘍で エンリッチされている遺伝子	原発性腫瘍 対 CTC-cで エンリッチされている遺伝子	CTC-plt 対 CTC-c	CTC-pro 対 CTC-c
1	Upk3b	Tff2	Clec1b	kg:uc007pge.1
2	Ier2	Wfdc2	AU023871	kg:uc007pgd.1
3	Egr1	Lamb3	Alox12	kg:uc007pgf.1
4	Nkain4	Lad1	Itga2b	kg:uc007pgg.1
5	Igfbp5	Dmbt1	Ppbp	Igj
6	Slc6a4	Npy	Gng11	kg:uc012enb.1
7	Klf4	Pmepa1	Vwf	2010001M09Rik
8	Tmem221	Kenn4	Pf4	kg:uc009cfw.1
9	Arl4d	Serinc2	Fcer1g	kg:uc007pgi.1
10	Lrrn4	5730559C18Rik	Tmem40	kg:uc007pgh.1
11	Cldn15	Muc1	Hba-a2	kg:uc007yos.1
12	Gpm6a	Chi3l3	Stom	Coro1a
13	Atf3	Pglyrp1	Beta-s	Pou2af1
14	Ptma	Arl4c	Plek	kg:uc011yvj.1
15	Slc9a3r1	Spp1	Srgn	Glpr1
16	Fos	Col15a1	Myl9	Cd52
17	Tmem119	C1qb	Cd84	Cd79b
18	Ptgis	Tnnt2	F5	Sec11c
19	Den	Gkn3	Trem1	Tnfrsf17
20	Gbp2	Onecut2	Hbb-b1	Krr1
21	Dmkn	Mmp7	Itgb3	Gmfg

20

30

40

22	Sdc4	Cd74	Gp9	Ccr9
23	Ildr2	Ctss	Mpl	Pycard
24	Akap2	Lamc2	Ctla2a	Derl3
25	Gfpt2	Olfml3	Tubb1	Rac2
26	Klf6	Lgals4	Mylk	Srgn
27	Btg2	Lcn2	F13a1	Cytip
28	Myl7	Ly6a	Slamf1	Edem2
29	Igfbp6	Pak1	Rgs10	Itgb7
30	Gpr133	Capn5	Mkrn1	Lsp1
31	Oasl2	Ptpn	Laptn5	Lcp1
32	Pfn1	Reg3b	1810058I24Rik	Cyfp2
33	Cap1	Fmn13	Itgb2	Nans
34	Nfkb1a	Sdc1	Slc2a3	Slamf7
35	Malat1	Prom1	Pcmt1	Ell2
36	Rarres2	Ankrd50	Gp5	H2-Eb1
37	Rspo1	Ccl6	Ube2o	Creld2
38	Espn	Slc4a11	5430417L22Rik	Cd74
39	Klf9	Oraov1	Ptpn18	Blnk
40	Zbtb7c	Aldh1l1	Lat	Fmn11
41	Brd2	Slc20a1	Fermt3	Snrnp70
42	Olf1033	Cldn7	Nrgn	Sec61b
43	Wt1	Acsbg1	Mrv1	Edem1
44	Esam	Las11	Lyz2	Tspan13
45	kg:uc009igb.1	C1qc	Epb4.1	Psm8
46	Tmem151a	Lama5	Rasgrp2	Pim1
47	Mgll	Mgat4a	Trem12	Sept1
48	Csrnp1	Cldn2	Hist1h4i	Cd48
49	Cd9	Mcpt2	March2	Sub1
50	Gjb5	Fxyd3	Ltbp1	Lims1
51	Lrrc61	Il4ra	Nptn	Ncoa2
52	Wasf2	Itga5	Abtb1	Ctnnb1
53	Pdpr	Poren	Ctla2b	Fdps
54	kg:uc009ogv.1	Mast3	Prkab2	Ube2j1
55	Sdpr	Scara3	Arhgdib	Mettl1
56	Gpr64	Atox1	Alas2	Lax1
57	Flnc	Arrdc1	Odc1	Rilpl2
58	Add3	Mmp2	Ptpn11	Ctse
59	Gata6	Saa3	Dhcr24	Glr3
60	Wfdc1	Serpinf1	Mfsd2b	Fut8
61	A130040M12Rik	Sox11	Gp1bb	AI662270
62	Ankrd12	Prpsap1	Rbpms2	Gramd3
63	Adamts11	Mcpt1	Fyb	Il2rg

10

20

30

40

64	C2	Mfge8	Smox	Rasgrp3
65	Prss23	Col18a1	P2rx1	Impdh1
66	Ube2v1	Lyz2	Otud7b	Plek
67	Cryab	C1qa	kg:uc007ttx.1	Ints5
68	Pkhd111	Acp5	Samd14	Blmh
69	Rtn1	Angptl4	Clea1	Dnmt1
70	Birc6	Ccnd1	kg:uc007tty.1	Galk1
71	Xdh	Asl	Gpr56	kg:uc007hvx.1
72	Cd34	Ctxn1	Sh3bgrl2	Ccdc88b
73	Rab6b	Pgs1	Pttg1ip	Selplg
74	Dusp1	Anapc2	Nomol	Sar1b
75	Clic4	Cp	Gnaz	Lat2
76	C3	Gpx3	Mmrn1	Slc16a6
77	Rhob	Lama3	Gp1ba	Mki67
78	Mir3064	Rbp1	Sh3bgrl3	Dnajc3
79	Thbd	Cotl1	Slc24a3	H2-Ab1
80	Dpysl2	Nek6	Sord	Ndufs6
81	Cobl	Cpxm1	Nfe2	Actr3
82	Npr1	Sfrp1	Tuba4a	Etnk1
83	Dnajb9	Ttr	Zyx	Herpud1
84	Arhgap29	Gsto1	Cnn2	Ptpn7
85	Cav1	Npepl1	Itgb5	Ctss
86	Gbp7	Usmg5	Gata1	Cs
87	Hes1	Polr2l	Hist1h1c	Fbxw7
88	Gm16897	Sphk1	Tbxas1	Ppp2r5c
89	Ppp1r12a	Asxl1	Ptplad2	Znrd1
90	Sv2a	Ctsh	Bpgm	Rfc2
91	Ang	Egfl7	Pdlim7	Preb
92	Aldh1a2	C1qtnf6	Mmd	Fcer1g
93	Cryl1	Rras	G6b	Dnajb11
94	Kank1	Lgi4	kg:uc009duo.1	Slc35b1
95	2210403K04Rik	Hmga2	Lyz1	Sin3b
96	kg:uc009okn.1	Cep250	Tacc1	Nktr
97	Osr1	B4galt3	Dap	
98	kg:uc008ewj.2	Tmem223	Mast2	
99	kg:uc009tuw.1	Ltbp2	Atp2a3	
100	Gadd45b	Tnfrsf23	Snea	
101	Ablim3	Col7a1	Stx11	
102	Clec3b	Ggct	C030046I01Rik	
103	Usp25	Rab25	Trpt1	
104	Sntb2	Nedd8	Tsc22d1	
105	Rock2	9430023L20Rik	Prkar2b	

10

20

30

40

106	Col14a1	Arl2	Cd9	
107	Cd200	Wbp1	Pgm2l1	
108	kg:uc008ehr.1	H2-Ab1	Gp6	
109	Atp2b1	Preb	Pde5a	
110	Exoc4	Sgsm3	Itga6	
111	Abcb1b	Sfn	Itgal	
112	Nrgn	Prrx2	Edem1	
113	kg:uc009cvm.1	Ptprk	Isg20	
114	Ncoa4	Reg1	Cdc42ep5	
115	Ndufa4	Sdcbp2	Nipal3	
116	Upk1b	Pcbd1	Ccdc92	
117	Jun	Slc25a1	Sort1	
118	Syne2	Vamp5	Ly6g6c	
119	kg:uc007bv.1	Crlf1	Ubash3b	
120	Ap4e1	Avil	Inf2	
121	Spock2	2700094K13Rik	Asap1	
122	Efemp1	Ctse	Sec11c	
123	Prpf40a	Penk	Gas2l1	
124	Tspan5	Tmc4	Parvb	
125	Lgals7	Dhrs3	Tmsb4x	
126	Kif5b	Ap1s1	kg:uc007xrw.1	
127	Psip1	Arl6ip4	Nudt3	
128	kg:uc008oki.1	9430008C03Rik	Bel2l1	
129	1810014B01Rik	Fcer1g	B230312A22Rik	
130	Ptges3	Uqcr11	Cnp	
131	Limch1	Nhp2	Plp1	
132	Bicd1	Plbd2	Cnst	
133	Rdx	Capg	Rgs18	
134	Pcdh15	Pnpla6	Lsm12	
135	Foxn3	Ppdpf	Alox5ap	
136	Morf4l2	Hgfac	Ppif	
137	Ppp1r15a	Apoe	Spnb1	
138	Cdc42ep3	Fam40a	Ormdl3	
139	Pard3b	Lyz1	Hpse	
140	Bicc1	2200002D01Rik	Srxn1	
141	Amhr2	Laptm5	2010002N04Rik	
142	Gucy1a3	Qars	Hist1h2bc	
143	Psmb2	Tmx2	Cyba	
144	Mapkapk3	Fkbp4	Chst12	
145	Ube2l6	Plin2	kg:uc009sps.1	
146	kg:uc007pff.1	Fcgr3	Max	
147	kg:uc007ctp.1	Gkn1	Was	

10

20

30

40

148	Nedd4	Snhg1	Isca1	
149	Plxna4	Lsp1	Pdzk1ip1	
150	2010107G12Rik	Gm20605	Lyn	
151	Ifngr1	Ly6c1	Mob3a	
152	Beam	Aim1	H2-T24	
153	Ccn11	2310007B03Rik	Slc44a1	
154	Hoxa5	Tgfb1	Der11	
155	Fhl1	Tsta3	Gclm	
156	1810041L15Rik	Pafah1b3	Fech	10
157	2900002K06Rik	Chid1	Ywhah	
158	Hspb1	Smox	Igtp	
159	Podn	1500012F01Rik	Myl6	
160	Fam63b	Tspan4	Thbs1	
161	Hsp90b1	Agrn	Tln1	
162	Dpp4	Cfp	kg:uc009apq.1	
163	Gas1	Cdh1	Bcap31	
164	kg:uc007zak.1	Rasgrf1	Ilk	20
165	Zc3h13	Nxf1	Epha1	
166	Sox6	Pdrg1	2810453I06Rik	
167	Arid4a	Polr2j	Rnf19b	
168	Tnxb	Suds3	Gsn	
169	Tsix	D0H4S114	Flna	
170	Scd1	Ccl9	Arrb1	
171	Jund	Neat1	kg:uc007pum.1	
172	Crls1	Ccdc12	Mbn11	
173	1110003E01Rik	Prr24	Ccnd3	30
174	Rnase4	Impdh1	Pdlim1	
175	Arhgef12	Card10	Ctse	
176	Irf7	Cpsf1	Tspan17	
177	Bbx	Sema4g	Gpx4	
178	Sema5a	Hes6	Bnip31	
179	Mau2	C130074G19Rik	P2ry12	
180	Abi3bp	Ctrb1	kg:uc009vev.1	
181	Dag1	Rnaseh2a	Prkab1	
182	Cyp2s1	Golm1	F2r12	
183	Sfrs18	Ctsz	Stk4	40
184	Hspb8	Cyb561	Fhl1	
185	Cnot6l	Ndufs8	Rnf10	
186	Twsg1	Atp6ap1	Rasa3	
187	Gpc3	Srd5a1	Taldo1	
188	Lrm4cl	Carkd	Bysl	
189	Cdh3	Cd24a	Esd	

190	Cyr61	Eng	Aldh2	
191	Cyp2d22	Tcirg1	Rhog	
192	Hist1h1c	Slc9a3r2	kg:uc009ecr.1	
193	Aplp1	0910001L09Rik	Cald1	
194	Tb11x	Cox5b	Wbp2	
195	Pcm1	Adipor2	Ptprj	
196	Ifi204	Scarf2	Tpm4	
197	Nfix	Myo7a	Mxi1	
198	Flrt2	Ppap2c	Ly6g6f	10
199	Heg1	Pea15a	Sla	
200	Il6ra	Sh3pxd2b	Slpi	
201	Ralbp1	H19	Bied2	
202	Rhoj	Tpd52	Clu	
203	Ktn1	2610203C20Rik	Mtmr14	
204	Arl6ip5	Naa10	Abca7	
205	Crebbp	Fermt1	Ppp1r18	
206	Ppig	Sap30l	Kif2a	
207	Akap13	Bgn	Prdx6	20
208	Rab7	Timm13	kg:uc009ize.1	
209	Plxdc2	Krt20	Calm3	
210	Aldh1a1	Itga3	Dhrs1	
211	Bnc2	Pfkl	Cfl1	
212	Slc4a4	Agpat6	Glpr2	
213	Tbx18	Mrpl11	Slc25a37	
214	Zbtb16	Ramp1	Atox1	
215	Arid4b	Hmga1	BC057079	
216	Enpp2	Gpx2	Pla2g16	30
217	Ptplad2	0610012G03Rik	Rnf144b	
218	Akr1b3	9130017N09Rik	Stk16	
219	Gm6644	Cygb	Rsad2	
220	Arf5	Tmprss4	Paip2	
221	Chi3l1	Paox	Capzb	
222	Gpr116	Endod1	Ppp1r12c	
223	Cd82	Cndp2	4930412F15Rik	
224	Srrm1	Suv39h1	Ninj1	
225	Fmo2	Cog4	2510009E07Rik	40
226	Tgfb1i1	Trim27	kg:uc007vsr.1	
227	Qrich1	Cyhr1	Pygb	
228	Nfia	Trmt1	Tlk1	
229	Pmp22	Zfyve19	Myet1	
230	Cdh11	Esrp1	Rnasek	
231	Arid5b	kg:uc008oow.1	Ctsd	

232	Rbm3	Dync1h1	0610010K14Rik	
233	Prelp	Tab1	Bcas3	
234	kg:uc007qse.1	Pla2g6	Atpif1	
235	Ddx3x	Timp1	Serf2	
236	Sulf1	Eif3f	Becn1	
237	Spnb2	Abhd11	Tspan9	
238	Tspan31	Pmm2	Acer2	
239	Prr13	Tyrobp	Vdac3	
240	Ppp1cb	Farsb	kg:uc008kbg.1	10
241	Fbln1	Plod3	Oaz2	
242	Gm6548	Abtb1	Serpine2	
243	Uap1	Brf1	Ccdc90a	
244	Mpdz	Tnk2	Ndufa1	
245	Sat1	Rfc2	Tssc1	
246	Stim1	Stxbp2	Mboat7	
247	Mll3	Pdlim7	Cd44	
248	Slurp1	A430105I19Rik	Cxx1c	20
249	Cd81	Vill	Ecm1	
250	Emp2	Bmp1	Mff	
251	Trpm7	Mpz11	Ptpn12	
252	Crym	Thy1	Mgmt	
253	Enpp4	Stab1	Cox4i1	
254	Raly	Aldh16a1	Tollip	
255	Celf2	Eif4ebp3	Cds2	
256	Ap3s1	Itpr12	Ybx1	
257	C1s	Mrpl52	Gypc	30
258	Frmd4b	2310002L13Rik	Dgkd	
259	Nr4a1	Mcm6	Pecam1	
260	Acin1	Kenk1	Ftl2	
261	Plod2	Pmf1	Nt5c3	
262	Id1	Cuta	1700037H04Rik	
263	Creg1	Nt5dc2	Cd151	
264	Zfp318	Rmnd5b	Lpin2	
265	Tmem140	Araf	6430548M08Rik	
266	Mras	Wwp2	Pon2	40
267	Vwa5a	Lamb1	Ndufa3	
268	Esyt3	Kene3	6330578E17Rik	
269	Hexb	Uqcrq	Mfap3l	
270	Nckap1	Gps1	Mink1	
271	Nipal3	Rexo4	Ston2	
272	Ubxn4	Coro1c	Rac2	
273	Zfp36	Hras1	Fyn	

274	Hnrnpl	Spint1	Serinc3	
275	C1ra	Cble	Maged2	
276	Nnmt	Fhod1	Ap2m1	
277	Mut	Atp13a1	Pacsin2	
278	kg:uc008jup.1	Man2c1	Ftl1	
279	Pnrc1	Vsig2	Adipor1	
280	Usp8	Bpgm	kg:uc009qdo.1	
281	Pgcp	Bap1	Snap23	
282	Junb	Smpd2	Tagln2	10
283	C1rl	Ubqln4	Cox6c	
284	Slc6a6	Sirt7	Creg1	
285	kg:uc008znh.1	Krt23	Bsg	
286	Aqp1	D8Erttd738e	Cmtm6	
287	Myh10	Mapk13	Cntd1	
288	Slc43a3	kg:uc008bcq.1	Plekho2	
289	Spint2	Polr2g	Arrb2	
290	Hnrnph1	Ndufs2	Pard3b	
291	Arhgap28	Dad1	Mlec	20
292	Cfh	Wnt7b	Taf10	
293	Brd4	Fam20c	Gabarapl2	
294	Fndc1	Cxxc5	Bag1	
295	Star	Polr2f	Galnt2	
296	Nfkbiz	Ltf	Hk1	
297	Arsb	2210407C18Rik	Fbxo9	
298	Rnd3	Cdipt	kg:uc009izd.1	
299	Stard5	Glrx5	Pnpo	
300	Thbs1	Gemin7	Fam46c	30
301	kg:uc008wkn.1	Man1b1	Pkm	
302	Slc26a3	Heatr7a	Ap1b1	
303	Phip	Arid5a	Rap1b	
304	Usp2	Sumo3	Itgb1	
305	Golgb1	Srm	Stf7	
306	Rock1	Plscr3	Smap1	
307	Rgma	2210010C17Rik	Rabgap11	
308	Actg1	Fam102a	Tmbim4	
309	BC013529	Dlst	H3f3a	40
310	kg:uc007zwh.1	Vps37c	Frmtd8	
311	3110062M04Rik	Ngfrap1	Nlrx1	
312	Cast	Pold4	Oaz1	
313	Mob3c	Grec10	Fam125b	
314	Slc16a1	Wnt7a	Hexa	
315	Fam117a	2010111I01Rik	Tspo	

316	Pdia3	Pxdn	Dcaf12	
317	Trim8	Coasy	Nav1	
318	kg:uc009mng.1	Dctn1	Cd24a	
319	eg:245190:chr7:m	Ncor2	Uqcr11	
320	Sbsn	Postn	Wipf1	
321	Serpinb6b	Col4a2	F10	
322	Daglb	Cib1	Erlec1	
323	Smarca2	Tbc1d13	Map2k3	
324	Mef2c	Ccnl2	Stk24	
325	Prrc2c	Dcakd	Ldlrap1	
326	BC005537	Cdc34	Ehd4	
327	Hsp90ab1	Atp6v0b	Atp6v1f	
328	Snmp70	Abhd12	Gnas	
329	Ppl	Flot2	Arhgap18	
330	Serpinh1	Sla2	Arhgap10	
331	Sorbs3	Rhbdf1	Pitpnm1	
332	Golga4	Cdh17	S100a1	
333	Acbd3	Psbm5	Bin1	
334	Hook3	Serf1	Ttyh3	
335	Map3k3	Slc15a3	Selp	
336	Rhou	Sftpd	Trappc9	
337	Smc2	Pop5	Aes	
338	C1d	Nude	Taok3	
339	kg:uc008dzh.1	Sh2d5	Zfand3	
340	Psm7	kg:uc007fw.1	Stim1	
341	Dab2	Mrpl37	Rnf114	
342	Cep164	Rin1	Sep15	
343	Crim1	Podxl	kg:uc012hdk.1	
344	Rtf1	Paqr5	Lgals9	
345	Fxyd1	Sepx1	Cox6b1	
346	H2-D1	Agr2	Riok3	
347	Zfp704	Bax	Slc38a10	
348	Mtap1a	Rxrb	Rtn3	
349	Ascc3	Tes	B3gat2	
350	Med13l	Hdac6	Ccndbp1	
351	Jup	I110008F13Rik	Rsu1	
352	Nid2	Mpnd	kg:uc007upr.1	
353	Kdr	Gmppa	Itm2b	
354	Ifnar2	Gramd1a	St3gal1	
355	5430435G22Rik	Wars	Sec61g	
356	Col4a6	Mtap	Ptpn1	
357	Il17re	C1qtnf5	kg:uc012bhf.1	

10

20

30

40

358	Gbp3	Mrpl28	B2m	
359	Slc39a8	Mfrp	Rasgrp3	
360	Cfl2	Kars	Memol	
361	Slc38a1	Lbp	Slc39a4	
362	Cuedc1	Plxnb1	Sdcbp	
363	Egfl	2700081O15Rik	Tspan14	
364	Gas6	Mrps24	Ubl7	
365	Cldn25	Klc4	Nras	
366	Sorbs1	Detn3	Ssx2ip	10
367	Hspa12a	Kcnq1	kg:uc007zbz.1	
368	kg:uc007zts.1	Smurf1	Wbp1	
369	Slc1a5	Fam162a	1110003E01Rik	
370	Nr3c1	Hip1r	Clip2	
371	Adamts5	kg:uc007hydr.2	Gapdh	
372	Gpcpd1	Gys1	Gm6578	
373	Dpysl3	Sac3d1	Actn1	
374	Colec12	Ndufs6	St3gal2	
375	Pded6ip	Rgl2	3110001D03Rik	20
376	Dst	Atp5g1	Ctsz	
377	Ifit3	Itgb4	kg:uc007vdl.1	
378	Chst4	Sars	Fam73a	
379	Xist	2310003F16Rik	Vcl	
380	Ifi2712a	Nhp211	Lims1	
381	Fkbp5	D19Wsu162e	Lars2	
382	Agap1	Cd320	Birc2	
383	Ankrd11	Pigq	Lamp2	
384	kg:uc007qca.1	Chd3	Ras110a	30
385	Syt11	Zdhhc4	Mif	
386	Ptrf	Eif31	Rab10	
387	Krec1	St8sia3	Pabpc1	
388	Zfp488	Rcan3	Wwp2	
389	Lama4	Meg3	Nqo2	
390	Aebp1	Nudt4	kg:uc007fte.1	
391	Fam134b	Gss	Plxna4	
392	Tppp3	Pih1d1	Gm1821	
393	Maf	Limd2	Gadd45a	40
394	Pel1	Ap1s2	Slc25a39	
395	Zfp353	BC056474	kg:uc009pet.1	
396	Cdon	Mms19	Ubb	
397	Sarnp	Clip2	Ppp1r2	
398	Atxn7l3b	2310016M24Rik	Rab27b	
399	Pef1	Itpa	Cap1	

400	App	Slc25a10	Jarid2	
401	Mtdh	Fibp	Rnf11	
402	Lrrc20	Higd2a	Tmem50b	
403	Btbd2	Snrpd2	Myh9	
404	Gnb2	Eri3	Tmem128	
405	Pigt	Nbeal2	Stradb	
406	Efna5	Trim28	Cela1	
407	Tm4sf1	S100a4	Ndrp2	
408	Coq10b	Ivns1abp	Dhrs3	
409	Eif2s3x	Ppp1r18	Hipk1	
410	Cmah	Efemp2	Atg9a	
411	Sf3b1	Med22		
412	Eea1	Nelf		
413	Slpi	2810428I15Rik		
414	Tmod3	D2Wsu81e		
415	Ppp3ca	Trappc6a		
416	Tceal8	Trappc2l		
417	Anp32a	Antxr2		
418	Actb	Rab11fip5		
419	Ddx5	Ldhd		
420	Cobll1	Npnt		
421	Cish	Acrbp		
422	Nod1	Pafah1b2		
423	Psd	Angptl2		
424	Gm10052	Fzr1		
425	Lims2	Aaas		
426	Stra6	Eif2b2		
427	kg:uc007bgn.1	1190003J15Rik		
428	Plxdc1	5730403B10Rik		
429	Nfe2l1	Adamts13		
430	Smpd3	Eif3b		
431	Bcl10	Znrf1		
432	Ilf3	Pkp3		
433	Fam76a	Lemd2		
434	Cybrd1	Rab34		
435	Gm3893	Mpv17l2		
436	Siae	Cdkn2b		
437	Ssh2	Snrpe		
438	Nfic	Gm14005		
439	Btf3	Prdx4		
440	Sp100	Xab2		
441	Ndn	Dpp3		

10

20

30

40

442	Matr3	Tyms		
443	Gm13251	Leprotl1		
444	Arhgap5	Uqcr10		
445	Zbtb4	Cdk5rap3		
446	Pgrmc1	Gorasp2		
447	4930402H24Rik	Wbp7		
448	Bptf	Sort1		
449	Dusp3	Ddx41		
450	Pla2g4a	Cct3		10
451	Brp44l	Mrps33		
452	Oxct1	Frmd8		
453	Stk40	1110049F12Rik		
454	Ddr1	Fscn1		
455	Ifi205	Ndufa2		
456	Col3a1	Dpcd		
457	Nipbl	Unc13a		
458	Plk1s1	Eif1ad		
459	Bdp1	Sgta		20
460	Smc3	Chaf1a		
461	Ifitm3	Plxna1		
462	Ndst1	Hspa9		
463	Zbed6	1110014N23Rik		
464	Rest	Cd99l2		
465	kg:uc007vnc.1	Snrpa		
466	Ccdc88a	Mcm7		
467	Stat3	Tars2		
468	Arf2	Gon4l		30
469	Trib1	Stk38		
470	Gcap14	C1qtnf1		
471	Tbc1d15	Tbrg4		
472	Igf1r	Tmem132a		
473	Ppbp	Cox6c		
474	kg:uc008tky.1	Alcam		
475	Rab1b	Phka2		
476	Krt14	Trim3		
477	Med21	Ppp1r14b		40
478	Gja1	Gpaa1		
479	Klf10	Ctps2		
480	Id2	Ptpn23		
481	Mfap1a	Endog		
482	Ogn	Mrto4		
483	Gpc4	Mrps6		

484	Bst2	Pvr		
485	Dtx2	Phgdh		
486	Wac	Itpr3		
487	Kpna3	Polr2e		
488	Kenab1	Sec16a		
489	Orai3	Mdp1		
490	Gesh	Fbfl		
491	Wdr92	Mept8		
492	Olfir613	Rps6ka4		10
493	Tcf711	Mical1		
494	Tgfb2	Mrpl34		
495	Ii16	Agpat3		
496	Manf	2310044H10Rik		
497	Mgst1	Myo9b		
498	kg:uc008tkz.1	Ndufb10		
499	Creb311	Apex1		
500	Txndc5	Elk3		
501	Klf2	Cpsf31		20
502	Slu7	Tnk1		
503	Ttc28	Pmvk		
504	1110002B05Rik	Ppp1r16a		
505	Zcchc11	Arhgef5		
506	Ptp4a2	Lonp1		
507	Pbx1	Pla2g7		
508	Cln3	Pip5k1c		
509	Tmco7	Inf2		
510	Lrrc58	Pgk1		30
511	Eif3a	Parp6		
512	Cldn10	Urm1		
513	H2-Q6	Mad2l2		
514	Ccdc80	Ing4		
515	kg:uc009iln.1	Rbck1		
516	Rab5c	Cant1		
517	Tsc22d3	Sgpl1		
518	Tm4sf5	Ehbp111		
519	Hmgb1	Runx1		40
520	Sec62	Slc27a4		
521	Maoa	Ndufa7		
522	Clec1b	Mcm3ap		
523	Mphosph8	1110008P14Rik		
524	Oat	Rassf7		
525	Ncor1	Ptpmt1		

526	Cyb5	Arfgap1		
527	Trafd1	Sec61a1		
528	Rpp25	Rps6ka1		
529	kg:uc007ded.1	Ints1		
530	2610101N10Rik	Tpcn1		
531	Il6st	Iffo2		
532	Evpl	Trim44		
533	Psm11	kg:uc012ctw.1		
534	Dync1i2	Golga2		
535	Lars2	Msto1		
536	Pdia4	Ppp6r3		
537	Cd55	Trmt2a		
538	Amfr	Appl2		
539	Zcchc3	Spare11		
540	Herpud2	Ragef1		
541	Txnrd1	Zfp11		
542	Vat1	Psmc4		
543	Diap1	Mosc2		
544	Tmed2	Fam101b		
545	Arf3	1500010J02Rik		
546	Arap2	Ccdc124		
547	St3gal1	Ptges		
548	Man1a	Fam189b		
549	Rgs10	Th11		
550	Tmsb4x	Kctd2		
551	Uba7	Olfr1372-ps1		
552	C4b	Hexa		
553	Tmem98	Anapc5		
554	Lpar2	Serpina3n		
555	Gabarap11	1810046J19Rik		
556	Cmtm7	Tmem167		
557	Spon2	Gm11428		
558	Smarca5	Gen111		
559	Mxd4	Kans13		
560	Smc4	Fasn		
561	Thsd4	Slc50a1		
562	Gsr	Smad3		
563	Ptprd	Trip6		
564	Clip1	Atp6v1e1		
565	Cln8	Chchd5		
566	Rbm27	Adssl1		
567	Zmat1	Nes		

10

20

30

40

568	Smc6	Ap1b1		
569	B2m	Fcgrt		
570	Irf2bp2	Ltbp3		
571	Ppap2a	Csf2rb		
572	Zfhx4	Ssna1		
573	Tob2	Mrps16		
574	Rabgap11	Cyba		
575	Nfkb2	Cyth2		
576	Nfyc	Igf2		
577	Ube2d1	Pisd-ps1		
578	Creb5	Atp13a2		
579	Opa3	Mlph		
580	Csnk1a1	Cyp4f16		
581	Fam84b	2010107E04Rik		
582	Ddr2	Gas5		
583	Usp54	Eif3k		
584	Akt2	Fam149a		
585	Strn3	Mif		
586	Hnrnpm	B230312A22Rik		
587	eg:497210:chr14:m	Ppp1r12c		
588	Tpt1	Tfip11		
589	Naa25	Tex10		
590	Eef1a1	Slc16a3		
591	Parp4	Stk16		
592	Msn	Epn1		
593	Zbtb20	Noc4l		
594	Fermt2	Rcc2		
595	Bod11	Rgs12		
596	Sltm	Shkbp1		
597	Dapk1	Got2		
598	Hnrnpr	Plek2		
599	Baz2a	Lilrb3		
600	Rnf167	Ndufb5		
601	Mapk1	Tesk1		
602	eg:320169:chr9:p	Rab24		
603	4930523C07Rik	Atp5j2		
604	Nfl	Commd9		
605	Fam53b	Rtkn		
606	Faim2	Prpf19		
607	Tgm2	6720401G13Rik		
608	Calm2	Ppa1		
609	AI848100	Pgp		

10

20

30

40

610	Slc10a3	Hps1		
611	Ogdh	Puf60		
612	Arl3	Mdm2		
613	Timp2	kg:uc012cgd.1		
614	Atxn2	kg:uc009uim.1		
615	Mll1	Pyy		
616	Ces2g	Zfp358		
617	Mat2a	Timm8b		
618	Esf1	Ddx39		10
619	Hsp90aa1	Pgm2		
620	Zfp385a	kg:uc008gbp.1		
621	Zfp672	Sipa1		
622	Csda	Mgat1		
623	Pf4	Tmem208		
624	Arsa	Ruvbl2		
625	F11r	8430410A17Rik		
626	C4a	Bad		
627	Kpna1	Pfdn5		20
628	Rbbp8	Eme1		
629	Oxnad1	kg:uc009mzj.1		
630	Rblcc1	Igf1		
631	Setd2	Prkag1		
632	Kif1b	kg:uc009sua.1		
633	2510002D24Rik	Uap111		
634	Cep57	Trappc4		
635	Chd2	Bola2		
636	Serinc5	Usp5		30
637	Marcks11	Ear2		
638	Shfm1	Cars		
639	Bbs4	1810027O10Rik		
640	Impad1	Amdhd2		
641	Tbcel	Phb		
642	Kdelr1	Kcmf1		
643	Ninl	Lsmd1		
644	Sytl1	Sec11c		
645	Tpm3	Pcbp4		40
646	Rbbp6	Mepce		
647	Lman1	Tpd52l2		
648	Ankrd17	Trf		
649	Naga	Hsd17b11		
650	Rbpms	Pilra		
651	Magt1	Atn1		

652	Tfdp2	Pgf		
653	Gem	Nxn		
654	Pde4dip	Inpp5k		
655	Mrgprf	Actr1a		
656	kg:uc008ajk.1	Cd68		
657	Itch	Eef1g		
658	Elf1	Fbn1		
659	Meis2	Hint1		
660	Arid1a	March5		10
661	Serping1	Usp48		
662	Slc27a3	Hnf1b		
663	Thoc2	Gga3		
664	Gsta3	Drosha		
665	Hnrnp2	Ubp1		
666	Socs3	Pkn3		
667	Armex3	Tmem192		
668	Siah1a	Prpf31		
669	kg:uc009ize.1	Hspd1		20
670	Irs2	Otub1		
671	Mettl7a1	Mrpl20		
672	Ppfibp2	Tead2		
673	Blvrb	Phpt1		
674	Yipf5	Neu1		
675	Plat	Pygo2		
676	Gm6578	Myeov2		
677	Mat2b	Cdk5		
678	Tmpo	Ndor1		30
679	Metap2	Rbp4		
680	Zfp277	Psat1		
681	Wls	Mrpl41		
682	Mesdc1	Snrpg		
683	kg:uc009acs.1	Acot7		
684	Colla2	Vars		
685	Csfl	Nono		
686	Sulf2	Gtf2i		
687	Ifrd1	Traf3		40
688	Wrnip1	Ppp2r4		
689	Flii	Actg2		
690	2810474O19Rik	Pi4k2a		
691	Sep15	Slc35b2		
692	2310030G06Rik	Ubqln1		
693	Cmtm3	Ppox		

694	Myliip	Bud31		
695	Slc8a1	Man2b1		
696	Btbd7	Nat15		
697	Hdac5	Spon1		
698	Zfand6	Cyc1		
699	Tapbp	Mpeg1		
700	Keap1	Nsun2		
701	Ube2n	Rab4a		
702	Ssr3	Mtmr11		
703	H3f3a	BC004004		
704	Myst4	B4galnt1		
705	G3bp1	Atp5k		
706	Ugdh	Lin37		
707	Lamp2	D330041H03Rik		
708	Zrsr1	Tbc1d17		
709	Pim1	March6		
710	Gm9199	2410015M20Rik		
711	Supt16h	1810013D10Rik		
712	Ano6	Eif2s1		
713	Soat1	Traf7		
714	Eci1	Rpl36al		
715	Plce1	Psenen		
716	Atg3	Aip		
717	Bnc1	Cmas		
718	Pik3c2a	Rpia		
719	Pqle3	Nebp1		
720	Thrap3	Mea1		
721	Irak4	Timm50		
722	Kdm6b	Ear12		
723	Apol9a	Fkbp1a		
724	Wnt4	Commd4		
725	1500003O03Rik	Col5a3		
726	Phf3	Fblim1		
727	1110004F10Rik	Cwh43		
728	Kansl1	Arl2bp		
729	Fth1	Mrpl46		
730	Tmem50a	Ten2		
731	Utp20	Add2		
732	Smad4	Specc11		
733	Stmn2	Ppes		
734	Gstm1	Vrk3		
735	Senp6	Trim25		

10

20

30

40

736	Gda	Nfatc1		
737	Nucks1	Rap1gap		
738	Ints10	Hsd17b12		
739	Syne1	Epas1		
740	Itga6	Ddx1		
741	Acad9	Prdx6		
742	Maged1	Mmp24		
743	Spen	Ndufb9		
744	Chd1	Phf23		
745	Taf3	Rpa2		
746	Ptgs1	5031439G07Rik		
747	Sparc	Rrp7a		
748	R74862	Arfip2		
749	B230120H23Rik	Efnal		
750	Tmem234	Agps		
751	Ryk	Sephs1		
752	Dlgap4	Apoc2		
753	Atp1b1	Mrps27		
754	Parp14	Snn		
755	Tgfbr2	Serinc3		
756	Ccdc90a	Pdcd5		
757	Ncoa1	AA986860		
758	Pppde1	Pitpna		
759	Luc7l3	Vac14		
760	Prg4	2810025M15Rik		
761	Rab11fip1	Def8		
762	Plk2	Hilpda		
763	Ifi35	Eif6		
764	Pdap1	Brd7		
765	Cd248	Fes		
766	Sesn1	Sbfl		
767	Ecd	Ak2		
768	Apls3	1810035L17Rik		
769	H2-K1	Lime1		
770	Spag9	Hspe1		
771	Tshz1	Csrp2bp		
772	Dennd5a	Uba5		
773	Stag1	Gsta4		
774	Gpx8	2900092E17Rik		
775	Sod3			
776	BC005561			
777	kg:uc009vev.1			

10

20

30

40

778	Ywhaz			
779	Ganab			
780	Rras2			
781	Dusp14			
782	kg:uc012hdk.1			
783	Nr1d1			
784	Wwc2			
785	Ubxn2a			
786	Iqsec1			
787	kg:uc007vsr.1			
788	Cfl1			
789	Csrp1			
790	Smchd1			
791	Myl12a			
792	Ubqln2			
793	Tmcc3			
794	Kdm5a			
795	Rbm25			
796	Wdr26			
797	Vim			
798	Arpc2			
799	Calm1			
800	Dnaja2			
801	Shc1			
802	Vps13a			
803	Klf7			
804	1810074P20Rik			
805	BC003331			
806	Itpr2			
807	Jmjd1c			
808	Pcdhgb5			
809	Tubb2a			
810	Ehd2			
811	Ift74			
812	Per1			
813	Pitpnm2			
814	Gstm4			
815	Dnmt1			
816	Tmco1			
817	Lass4			
818	Ptprf			
819	Sirt2			

10

20

30

40

820	Gfm2			
821	Taf7			
822	Spop			
823	Zzef1			
824	Ccdc34			
825	Zfp281			
826	Tuba1a			
827	Ccdc109b			
828	Cdk13			
829	Dhx15			
830	Src			
831	Braf			
832	Mapre2			
833	Anxa7			
834	Sept9			
835	Alox12			
836	Pknox1			
837	2610034B18Rik			
838	Topors			
839	Phf21a			
840	Qser1			
841	Tirap			
842	Fas			
843	Lass2			
844	6330406I15Rik			
845	Parvb			
846	Atp1a1			
847	Mtmr6			
848	Cd109			
849	Dnajc1			
850	Hp1bp3			
851	1600029D21Rik			
852	Ttc38			
853	Mfhas1			
854	Filip11			
855	Zfp148			
856	Nkd1			
857	Usp16			
858	Tlr2			
859	Zc3h18			
860	Stk10			
861	Ltbp4			

10

20

30

40

862	Hdac3			
863	Efh2			
864	Prkar2a			
865	Atp6v1a			
866	Sf3b4			
867	Gpre5b			
868	Clip3			
869	Mettl2			
870	Secisbp2			
871	Fmod			
872	kg:uc009lxf.1			
873	Elovl6			
874	Bzw1			
875	Etf2			
876	Hspa2			
877	kg:uc007won.1			
878	Rnf20			

10

20

【 0 1 7 9 】

(表3) BP_FATおよびCC_FATデータセットを用いた、CTC-cでエンリッチされている遺伝子における最も有意な遺伝子オントロジー用語

q-値 < 0.01				
出所	用語	カウント	オッズ比	ベンジャミニ (Benjamini) (q値)
GOTERM_BP_FAT	GO:0060429~上皮発生	35	2.92	8.72E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0030029~アクチンフィラメントに基づく過程	27	3.47	6.85E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0030036~アクチン細胞骨格組織化	26	3.57	4.95E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0007010~細胞骨格組織化	36	2.50	6.27E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0051173~窒素化合物代謝過程の正の調節	49	2.11	6.62E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0035295~管発生	31	2.66	7.80E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0010604~高分子代謝過程の正の調節	54	1.93	0.001727
GOTERM_BP_FAT	GO:0031328~細胞生合成過程の正の調節	49	2.01	0.0015751
GOTERM_BP_FAT	GO:0051789~タンパク質刺激に対する応答	16	4.16	0.0014484
GOTERM_BP_FAT	GO:0035239~管形態形成	23	3.05	0.0015064
GOTERM_BP_FAT	GO:0045449~転写の調節	140	1.42	0.0014097
GOTERM_BP_FAT	GO:0048729~組織形態形成	28	2.66	0.0013058
GOTERM_BP_FAT	GO:0009891~生合成過程の正の調節	49	1.99	0.0012408
GOTERM_BP_FAT	GO:0045935~核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドおよび核酸代謝過程の正の調節	46	2.04	0.0012061

30

40

GOTERM_BP_FAT	GO:0002009~上皮の形態形成	23	3.01	0.0012149	
GOTERM_BP_FAT	GO:0048584~刺激に対する応答の正の調節	24	2.92	0.0011396	
GOTERM_BP_FAT	GO:0051276~染色体組織化	39	2.19	0.0012619	
GOTERM_BP_FAT	GO:0045637~骨髄性細胞分化の調節	12	5.33	0.0014358	
GOTERM_BP_FAT	GO:0045785~細胞接着の正の調節	11	5.79	0.0016889	
GOTERM_BP_FAT	GO:0045941~転写の正の調節	43	2.05	0.0016795	10
GOTERM_BP_FAT	GO:0045893~転写の正の調節、DNA依存性	39	2.12	0.0019852	
GOTERM_BP_FAT	GO:0051254~RNA代謝過程の正の調節	39	2.11	0.0022107	
GOTERM_BP_FAT	GO:0006357~RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の調節	51	1.87	0.0022801	
GOTERM_BP_FAT	GO:0006325~クロマチン組織化	32	2.30	0.0025187	
GOTERM_BP_FAT	GO:0010628~遺伝子発現の正の調節	43	2.00	0.0025252	
GOTERM_BP_FAT	GO:0060562~上皮管形態形成	17	3.47	0.0025847	20
GOTERM_BP_FAT	GO:0042127~細胞増殖の調節	45	1.89	0.0051485	
GOTERM_BP_FAT	GO:0010557~高分子生合成過程の正の調節	44	1.88	0.0071937	
GOTERM_BP_FAT	GO:0002253~免疫応答の活性化	14	3.69	0.0078441	
GOTERM_BP_FAT	GO:0050778~免疫応答の正の調節	18	3.00	0.0080458	
GOTERM_BP_FAT	GO:0002684~免疫系過程の正の調節	23	2.53	0.0088166	
GOTERM_BP_FAT	GO:0045944~RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の正の調節	33	2.09	0.0090124	30
GOTERM_CC_FAT	GO:0005578~タンパク質性細胞外マトリックス	32	2.38	0.0047511	
GOTERM_CC_FAT	GO:0031012~細胞外マトリックス	32	2.28	0.0051923	
GOTERM_CC_FAT	GO:0044421~細胞外領域部分	60	1.71	0.0064365	
GOTERM_CC_FAT	GO:0031981~核内腔	65	1.62	0.0102413	
GOTERM_CC_FAT	GO:0043233~オルガネラ内腔	79	1.53	0.0085938	
GOTERM_CC_FAT	GO:0005829~サイトゾル	45	1.81	0.0100772	40
GOTERM_CC_FAT	GO:0070013~細胞内オルガネラ内腔	78	1.52	0.0093866	
GOTERM_CC_FAT	GO:0031982~小胞	43	1.83	0.0087123	
GOTERM_CC_FAT	GO:0031974~膜で囲われた内腔	80	1.50	0.0082696	

【 0 1 8 0 】

(表4) CTC-cとの比較でCTC-pltにおいてエンリッチされていた最も有意な遺伝子セット

q-値 < 0.01				
出所	用語	カウント	オッズ比	ベンジャミニ (Benjamini) (q値)
GOTERM_BP_FAT	GO:0042060~創傷治癒	18	7.8	1.86E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0007596~血液凝固	15	10.4	9.31E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0050817~凝固	15	10.4	9.31E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0007599~止血	15	10.3	7.59E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0050878~体液レベルの調節	15	8.2	1.30E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0030029~アクチンフィラメントに基づく過程	20	5.5	1.14E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0007010~細胞骨格組織化	26	3.9	3.95E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0030036~アクチン細胞骨格組織化	18	5.3	1.11E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0009611~創傷に対する応答	26	3.6	1.02E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0007155~細胞接着	33	2.9	2.86E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0022610~生物学的接着	33	2.8	2.70E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0001775~細胞活性化	19	3.7	4.70E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0030168~血小板活性化	6	18.2	1.68E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0007229~インテグリン媒介性シグナル伝達経路	10	6.4	2.95E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0016192~小胞媒介性輸送	25	2.6	3.81E-03
MSigDBv3.1 CGP	GNATENKO 血小板シグネチャー	20	55.1	3.91E-24
MSigDBv3.1 CGP	TENEDINI 巨核球マーカー	14	15.3	1.35E-11
MSigDBv3.1 CP:REACTOME	巨核球発生および血小板産生に関するリアクトーム因子	6	2.9	2.25E-02

10

20

30

40

50

【 0 1 8 1 】

(表5) CTC-cとの比較でCTC-proにおいてエンリッチされていた最も有意な遺伝子セット
q値 < 0.01

出所	用語	カウント	オッズ比	ベンジャミニ (Benjamini) (q値)
GOTERM_BP_FAT	GO:0002495~抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介したペプチド抗原の提示	5	59.81	6.97E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0019886~抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介した外因性ペプチド抗原の提示	5	59.81	6.97E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0002504~抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介したペプチド抗原または多糖抗原の提示	5	50.36	7.34E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0002478~抗原プロセッシングおよび外因性ペプチド抗原の提示	5	41.60	1.10E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0019884~抗原プロセッシングおよび外因性抗原の提示	5	34.18	1.87E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0048002~抗原プロセッシングおよびペプチド抗原の提示	5	27.34	3.72E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0001775~細胞活性化	9	7.00	3.82E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0019882~抗原プロセッシングおよび提示	6	13.20	7.40E-03

【 0 1 8 2 】

実施例2：補足的な方法

マウスおよび細胞株．これらの実験に用いた膵癌を有するマウスは、以前に記載された通り (Bardeesy et al., 2006)、Pdx1、LSL-Kras^{G12D}、およびTrp53^{lox/+}またはTrp53^{lox/lox}によって作動されるCreを発現する (その他の場合はKPCと称する)。EGFP膵臓系列タグ標識KPCマウスは、mT/mGマウス (Jackson Laboratory Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J) を、KPCマウス作製のための交配ペアと交配させることによって作製した。正常FVBマウスはJackson Laboratoryから購入した。マウスの飼育および手順はすべて、MGH SRACにより承認されたプロトコールの下で行った。

【 0 1 8 3 】

心臓穿刺のためには、動物をイソフルラン (isoflurane) で鎮静させた上で、胸腔を露出させて正常皮膚上皮細胞混入をなくすために、胸壁をエタノールで消毒し、胸郭の上方に皮膚切開を加えた。23ゲージ針を用いて、およそ1mLの血液を、100 μ LのPBS-10mM EDTA pH 7.4 (Gibco) をあらかじめ加えた1mLシリンジ中に採取した。500mM EDTAの濃縮ボラスまたは10mM EDTAの1:1希釈物のいずれかの添加によって、血中EDTA濃度を5mMに高めた。続いて動物を、動物プロトコールガイドラインに従って安楽死させた。

【 0 1 8 4 】

この内因性モデルにおいて発生させた原発性腫瘍から以前に作製したマウス膵臓細胞株NB508 (Pdx1-Cre / Kras^{G12D} / Trp53^{lox/+}) に、レンチウイルスによってGFPトランスフェクションを行った (NB508-GFP)。この細胞株を、スパイク細胞実験および同所性腫瘍形成のために用いた。

【 0 1 8 5 】

NB508-GFP細胞株は、RPMI-1640培地 + 10% FBS + 1% Pen / Strep (Gibco / Invitrogen) を用いて、標準的な培養条件下で維持した。

【 0 1 8 6 】

同所性実験のためには、NB508-GFP細胞を、健常同系 (FVBバックグラウンド) マウスの膵臓に同所性に注入した。手短に述べると、マウスにイソフルラン (isoflurane) で麻酔を施して、左腹壁をNair (登録商標) 脱毛製品で処理し、70%エタノールで消毒した。小切開を左側腹壁上方に加え、膵臓を移動させた。PBS中にあるおよそ100万個のNB508-GFP細胞、総容積0.1mLを膵臓に注入した。腹壁および腹壁を滅菌手術用ステープラーによって閉じた。腫瘍を2週間増殖させ、その時点でCTC-iChip処理のために心臓穿刺によって血液を採取した。

【 0 1 8 7 】

CTCエンリッチメント技術の適合化．バイアスのないエンリッチメントシステムへの要求を考慮した上で、陰性枯渇技術を本出願のために選択した。ラット抗マウスCD45抗体 (BAM114、R&D Systems, USA) をMyOneビーズと結合させた点を除き、処理プロトコールはすべて、以前に特定されたものと同じとした。

【 0 1 8 8 】

ほぼ1000個のGFP発現NB508細胞を1mLの健常マウス血液にスパイク投与した上で回収効率を判定するために処理を行うことによって、システムを検証するために、スパイク細胞実験を実施した。回収効率を検証するため、ならびに腫瘍担持マウスからの予想枯渇効率を最初に判定するために、同所性モデルを用いた。これらの実験では、エンリッチされた試料を、産物中に観察されるGFP+細胞の数について評価した。

【 0 1 8 9 】

内因性モデルから単離されたCTCの免疫染色．単離したCTCを遠心によりスライドグラス上に沈下させ、一次-二次アプローチを用いて免疫染色を行った。一次抗体は、ウサギ抗広域サイトケラチン (1:50、Abeam ab9377) およびヤギ抗マウスCD45 (1:500、R&D Systems AF114) とした。二次免疫蛍光性タグ標識抗体をシグナル増幅のために用いた。これらはロバ抗ウサギAlexa Fluor 594 (1:500、Invitrogen A-21207) およびロバ抗ヤギAlexa Fluor 488 (1:500、Invitrogen A-11055) であった。続いて核をDAPIで対比染色して

10

20

30

40

50

、スライドをPBSですすぎ洗いし、カバーガラスをかけて4℃で保存した。BioView(商標) Ltd. 自動画像化システム(Billerica, MA)ならびに自動正立蛍光顕微鏡(Eclipse 90i(商標)、Nikon, Melville, NY)を用いて、それらを倍率10倍で画像化した。CTCの可能性のあるもののスコア化のためには、CD45染色を伴わないCKに関する陽性染色が必要であり、続いてそれらを手作業で詳しく調べた。閾値およびベースラインシグナルは、非腫瘍担持マウスからの標本を用いて確立した。

【0190】

単細胞顕微操作 . 全血抗CD45陰性枯渇の後に、エンリッチされた細胞を含有する産物を35mmペトリ皿に収集し、Nikon Eclipse Ti(商標)倒立蛍光顕微鏡を用いて観察した。関心対象の細胞は、細胞形態が無傷であり、抗CD45磁気ビーズによる標識がないことに基づいて同定した。これらの標的細胞を、Eppendorf TransferMan(登録商標)NK 2マイクロマニピュレーターに装着した10µm移行チップで個別に顕微操作して、RNA保護用溶解緩衝液(10×PCR緩衝液II、25mM MgCl₂、10% NP40、0.1M DTT、SUPERase-In、Rnase Inhibitor、0.5uM UP1 Primer、10mM dNTPおよびヌクレアーゼ非含有水)を含有するPCRチューブに注入し、液体窒素中で直ちに急速凍結させた。

10

【0191】

単細胞増幅およびシーケンシング . 単細胞の増幅およびシーケンシングは、以下に示す若干の変更を加えた上で、以前に記載された通り(Tang et al., 2010)に行った。抽出された単一血中循環腫瘍細胞からのRNA試料を氷上で融解させて、70℃で90秒間インキュベートした。cDNAを作製するために、試料を逆転写マスターミックス(0.05uL RNase阻害薬、0.07uL T4遺伝子32タンパク質および0.33uL Superscript(商標)III逆転写酵素、1×容積当たり)で処理し、サーモサイクラーにて50℃で30分間、および70℃で15分間インキュベートした。遊離プライマーを除去するために、1.0uLのEXOSAPミックスを各試料に添加し、それを37℃で30分間インキュベートした上で、80℃で25分間かけて失活させた。次に、3'-ポリ-A尾部を各試料中のcDNAに添加し、マスターミックス(0.6uL 10×PCR緩衝液II、0.36uL 25mM MgCl₂、0.18uL 100mM dATP、0.3uL Terminal Transferase、0.3uL RNase H、および4.26uL H₂O、1×容積当たり)中で37℃で15分間インキュベートした上で、70℃で10分間かけて失活させた。第2鎖cDNAは、各試料を4つに分けて、マスターミックス(2.2uL 10×High Fidelity PCR緩衝液、1.76uL 2.5mMの各dNTP、0.066uL 100uMのUP2プライマー、0.88uL 50mM MgSO₄、0.44uL Platinum Taq DNAポリメラーゼ、および13.654uL H₂O、1×容積当たり)中で95℃で3分間、50℃で2分間および72℃で10分間インキュベートすることによって合成した。

20

30

【0192】

PCR増幅(95℃で3分間の後、95℃で30秒間、67℃で1分間および72℃で6分6秒間を20サイクル)は、マスターミックス(4.1uL 10×High Fidelity PCR緩衝液、1.64uL 50mM MgSO₄、4.1uL 2.5mMの各dNTP、0.82uL 100uMのAUP1プライマー、0.82uL 100uMのAUP2プライマー、0.82uL Platinum Taq DNAポリメラーゼ、および6.7uL H₂O、1×容積当たり)を用いて行った。各試料の4つの反応物をプールして、QIAGEN PCR Purification Kit(カタログ番号28106)を用いて精製し、50uL EB緩衝液中に溶出させた。qPCRを用いて、試料を遺伝子Gapdh、ActB、Ptprc(CD45)、Krt8、Krt18、Krt19およびPdx1に関して選択した。各試料を再び4つに分け、2回目のPCR増幅(98℃で3分間、67℃で1分間および72℃で6分6秒間を9サイクル)を、マスターミックス(9uL 10×High Fidelity PCR緩衝液、3.6uL 50mM MgSO₄、13.5uL 2.5mMの各dNTP、0.9uL 100uMのAUP1プライマー、0.9uL 100uMのAUP2プライマー、1.8uL Platinum Taq DNAポリメラーゼおよび59.1uL H₂O、1×容積当たり)を用いて行った。試料をプールし、Agencourt AMPure XPビーズを用いて精製して、40uLの1×low TE緩衝液中に溶出させた。

40

【0193】

シーケンシングライブラリーの構築 . Covaris S2(商標) Systemを用いてDNAを剪断するために、1×low TE緩衝液および1.2uLの剪断緩衝液を各試料に添加した。剪断プログラムの条件は以下を含む: 6サイクル、浴温5℃、浴温限界15℃、10%デューティーサイク

50

ル、強度5、100サイクル/バースト、および60秒間。続いて、試料を、マスターミックス（40uL 5X反応緩衝液、8uL 10mM dNTP、8uL End Polish Enzyme1、10uL End Polish Enzyme2および14uL H₂O、1×容積当たり）を用いて、室温で30分間かけてエンドポリッシュした。500bpよりも長いDNA断片は、0.5倍容積のAgencourt AMPure XP（商標）ビーズを用いて除去した。上清を別のチューブに移した。200～500bpのDNA産物をサイズ選択するために、0.3倍容積のビーズを添加し、試料を70% EtOHで2回洗浄した。産物を36uLのlow TE緩衝液中に溶出させた。マスターミックス（10uL 5×反応緩衝液、1uL 10mM dATPおよび5uL A-Tailing Enzyme 1、1×容積当たり）で処理することによってサイズ選択した各DNAにdA尾部を添加し、68℃で30分間インキュベートして、室温まで冷却させた。各DNA試料をシーケンシングのために標識して識別するために、バーコードアダプター（5500 SOLiD 4464405）を、5500 SOLiD Fragment Library Enzyme Module（商標）（4464413）を用いて、DNAに連結させた。バーコード化の後に、Agencourt AMPure XP（商標）ビーズを用いて試料を2回精製し、22uL low TE緩衝液中に溶出させた。1回のPCR増幅（95℃で5分間の後に、95℃で15秒間、62℃で15秒間および70℃で1分間を12サイクル、さらに70℃で5分間）の後に、ライブラリーをAMPure XPビーズを用いて精製した。最後に、連結されたDNAの量を定量するために、qPCRを行うためにSOLiD Library TaqMan Quantitation Kit（商標）を用いた。続いて、完成したバーコード付きライブラリーを、テンプレートビーズ調製物を用いるエマルジョンPCRに供し、ABI5500XL（商標）でシーケンシングを行った。

10

【0194】

RNAインサイチューハイブリダイゼーション（RNA-ISH）. パラフィン包埋した組織ブロックを新たに切り出して、-80℃で凍結させた。冷凍器から取り出した後に、スライドのベーキングを60℃で1時間行い、室温（RT）で1時間かけて10%ホルムアルデヒド中に固定した。パラフィンをHisto-Clear（商標）を用いて除去して、RNA-ISH（商標）を、Affymetrix QuantiGene ViewRNA ISH Tissue-2 Plex Assay（商標）に従って行った。組織切片の透過処理は、緩衝液中にて95℃で10分間前処理し、プロテアーゼで10分間消化させることによって行い、その後に5%ホルムアルデヒド中にて室温で固定した。標的プローブセットを適用し、40℃で2時間インキュベートすることによって組織とハイブリダイズさせた。1型プローブは1:50希釈で用い、これにはAldh1a2（VB1-14197）、Dcn（VB1-14962）、Klf4（VB1-14988）、Igfbp5（VB1-14987）およびSparc（VB1-14196）が含まれた。6型プローブには1:50のEGFP（VF6-13336）、ならびにそれぞれ1:100のプールしたKrt8（VB6-11060）およびKrt18（VB6-11059）が含まれた。シグナルを、PreAmplifierおよびAmplifier QTミックスの標的プローブセットとの逐次的ハイブリダイゼーションを通じて増幅させた。標的mRNA分子は、Type 6型標識プローブをFast Blue基質とともに適用し、1型標識プローブをFast Red基質とともに適用することによって検出した。組織をGill's Hemotoxylinによって室温で10秒間かけて対比染色した。DAPI（Invitrogen、D3571；3.0 μg/ml）染色は1分間行った。標的mRNAを描出するために、Nikon 90iを用いる蛍光顕微鏡検査を用いた。1型プローブはCy3チャンネルで検出し、6型プローブはCy5チャンネルで検出した。合成像はNIS-Elements（商標）ソフトウェアを用いて作成した。

20

30

【0195】

100万当たりリード数（rpm）の決定. 色空間のリードのアラインメントは、tophat（商標）バージョン2.0.4（Trapnell et al., 2009）およびbowtie1（商標）バージョン0.12.7を、no-novel-juncs論証セットとともに、マウスゲノムバージョンmm9およびgenome.ucsc.eduによるmm9 knownGene表によって規定されたトランスクリプトームとともに用いて行った。ゲノムに対してアラインメントされないか、ゲノム中の複数の場所に対してアラインメントされたリードは廃棄した。可能な場合には、genome.ucsc.eduによるmm9表knownTranscriptLocusLinkを用いて、アラインメントされた各リードを、そのリードがアラインメントされたエクソンを有する遺伝子に対してマッピングした。各遺伝子に関するリードのカウントは、その遺伝子に対してそのようにマッピングされたリードの数とした。このカウントを、任意の遺伝子に対してマッピングされたリードの総数で除算して、100万を乗算することで、100万当たりリード（rpm）カウントを得た。rpkmでなくrpmを用いた理由は、3'

40

50

バイアスがアラインメントに認められたためである。

【0196】

教師なし階層クラスタリングおよび主成分分析．ゼロをなくすために、最小値1およびrpmマトリックスの最小陽性値を、rpmマトリックスに加えた。その結果を続いてlog10変換して、log10 (rpm) マトリックスと呼ばれるものを得た。標準偏差が上位2000となるlog10 (rpm) マトリックスの列（遺伝子に対応する）を残して、残りの列は廃棄した。続いてその結果に対して中央値分散分析を行った。その結果を、1からPearson相関係数を差し引いたものに等しい距離基準を用いる平均連結法を用いる凝集階層クラスタリングによってクラスター化させた。log10 (rpm) マトリックスの主成分を計算し、最初の3つの主成分に関する試料の座標をプロットした。

10

【0197】

細胞不均一性の尺度．試料のクラスターの収集のために、統計量Mを、対に対応するrpmマトリックスの2つの行の間の相関係数のatanhのクラスターにおけるすべての試料対に関する平均値のクラスターに関する平均値と定義した。「クラスター内相関係数の平均値」は、 $\tanh(M)$ と定義した。統計量の標準偏差sを推定するために、ジャックナイフ推定量を試料に対して用いた。95% CIは、 \tanh

$(M + s\phi^{-1}(0.975))$

と定義され、式中、

ϕ

は標準正規分布の累積分布関数である。クラスターに関するM統計量の分布の平均値がクラスターの収集のためのM統計量の分布の平均値と等しいという帰無仮説に関してp値を計算するために、本発明者らは

20

$$p=2(1-\phi(|M1-M2|/\sqrt{(s_1^2+s_2^2)}))$$

とした。注目されることとして、ジャックナイフの代わりとして同じデータに対してブートストラップを行ったところ、同様の結果が得られた（非提示データ）。

【0198】

ランクプロダクトを用いる教師あり遺伝子発現変動．2セットの試料間での発現変動遺伝子を見つけるために、上記に定義したlog10 (rpm) マトリックスを用いる分析を開始した。いずれのセットの試料にもない試料に対応する行は除去した。続いて、値の90パーセントイルがlog10 (10) 未満である列を除外した。Bioconductor (Gentleman et al., 2004) RankProd (商標) パッケージ (バージョン2.28.0) のRP関数を用いて、発現増加変動および発現減少変動の両方に関するFDR推定量を得た。遺伝子はそれらのFDR推定量が0.01未満であれば発現変動性であると見なしたが、それらに発現増加変動および発現減少変動の両方が、少しでもある場合には、それらを除外した。

30

【0199】

遺伝子セットのエンリッチメント．エンリッチメントを、4種の遺伝子セット収集物において考察した：(1) DAVID (商標) 6.7に見られるような (Huang da et al., 2009)、KEGG (商標) のすべて、(2) DAVID 6.7に見られるような、GO_BPを用いる遺伝子オントロジー (GO)、および(3) DAVID 6.7に見られるようなGO_CC。発現変動性であることが見いだされた遺伝子のセットを、収集物中の各遺伝子セットに関する超幾何学検定を用いて、遺伝子セット収集物におけるエンリッチメントに関して検討した。各収集物に関してその結果得られたp値を、ベンジャミニ-ホフバーグ (Benjamini-Hochberg) の方法 (Benjamini and Hochberg, 1995) を用いてFDR推定量に変換した。

40

【0200】

アノテーションを行ったすべての血小板転写物のデジタル除去．log10 (rpm) マトリックスにおける発現の、MSigDB v3.1におけるGNATENKO_PLATELET_SIGNATUREおよびTENEDINI_MEGAKARYOCYTE MARKERSと名づけられた遺伝子セット中の遺伝子のいずれかの発現との相関係数の絶対値が0.6を上回っていた446種の遺伝子は、log10 (rpm) マトリックス (上記に定義) から除去した。続いて、クラスタリングを上記の通りに行った。

50

【 0 2 0 1 】

補足的な方法の参考文献

Bardeesy, N., Aguirre, A.J., Chu, G.C., Cheng, K.H., Lopez, L.V., Hezel, A.F., Feng, B., Brennan, C, Weissleder, R., Mahmood, U., et al. (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5947-5952.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 57, 289-300.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5, R80.

Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.

Tang, F., Barbacioru, C, Nordman, E., Li, B., Xu, N., Bashkirov, V.I., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc* 5, 516-535.

Trapnell, C, Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111.

【 0 2 0 2 】

実施例3

マウス膵臓CTCの比較分析により、60種の細胞外タンパク質のエンリッチメントが指示された(表6)。ヒト血中循環膵臓腫瘍細胞におけるこれらの特定のバイオマーカーおよび治療標的の評価に着手し、ヒト膵臓CTCにおける最も存在量の多い標的を示している(図7)。これらは可能性のあるバイオマーカーを表しているだけでなく、腫瘍細胞の外表面にあるタンパク質というそれらの性質を考慮すれば、それらは治療標的でもある。表6の細胞外タンパク質は、例えば、癌を治療するために、抗体ベースの治療薬(例えば、HER2に対するトラスツズマブ、EGFRに対するセツキシマブ、およびVEGFに対するベバシズマブ)によって標的化することができる。

【 0 2 0 3 】

(表6) 膵臓CTCでエンリッチされている細胞外タンパク質のリスト

公的な遺伝子記号	遺伝子名称
Abi3bp	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein
Adamts5	similar to a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2); a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)
Adamts1	ADAMTS-like 1
Ang	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
Arsa	arylsulfatase A
C1rl	complement component 1, r subcomponent-like
C3	complement component 3; similar to complement component C3 prepropeptide, last
C4a	similar to Complement C4 precursor; complement component 4A (Rodgers blood group); similar to complement C4; complement component 4B (Childo blood group)

C4b	similar to Complement C4 precursor; complement component 4A (Rodgers blood group); similar to complement C4; complement component 4B (Childo blood group)	
Ccdc80	coiled-coil domain containing 80	
Cd109	CD109 antigen	
Chi3l1	chitinase 3-like 1	
Clec3b	C-type lectin domain family 3, member b	
Cmtm3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3	
Cmtm7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	10
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1	
Col1a2	collagen, type I, alpha 2	
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	
Col4a6	collagen, type IV, alpha 6	
Csf1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	
Dag1	dystroglycan 1	
Dcn	decorin	
Dmkn	dermokine	
Fbln1	fibulin 1	
Fgf1	fibroblast growth factor 1	20
Fmod	fibromodulin	
Gpc3	glypican 3	
Gpc4	glypican 4; similar to Glypican 4	
Hmgb1	high mobility group box 1	
Ifnar2	interferon (alpha and beta) receptor 2	
Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5	
Il16	interleukin 16	
Lama4	laminin, alpha 4	
Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	
Mfap1a	similar to microfibrillar-associated protein 1A; microfibrillar-associated protein 1A; microfibrillar-associated protein 1B	30
Nid2	nidogen 2	
Ogn	osteolectin	
Pdap1	PDGFA associated protein 1	
Pf4	platelet factor 4	
Plat	plasminogen activator, tissue	
Podn	podocan	
Prelp	proline arginine-rich end leucine-rich repeat	
Rspo1	R-spondin homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	
Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	40
Slurp1	secreted Ly6/Plaur domain containing 1	
Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	
Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein; similar to Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	
Spock2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	
Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein	

Sulf1	sulfatase 1
Sulf2	sulfatase 2
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide
Thbd	thrombomodulin
Thbs1	thrombospondin 1; similar to thrombospondin 1
Thsd4	thrombospondin, type I, domain containing 4
Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Tnxb	tenascin XB
Tpt1	predicted gene 1974; tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene; tumor protein, translationally-controlled 1; predicted gene 14456
Twsg1	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)
Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4

10

【 0 2 0 4 】

CTCでエンリッチされているこれらの遺伝子を、ヒトの膵癌、乳癌、前立腺癌単一細胞CTCデータに拡張したところ、表9に示した5種の候補遺伝子が同定された。

【 0 2 0 5 】

(表9) RNA-seqによって高発現であったヒト単一CTCのパーセント

20

癌の種類	発現が50RPMを上回る単一CTCのパーセンテージ			
	膵癌 (N=7)	乳癌 (N=29)	前立腺癌 (N=77)	すべて (N=113)
TPT1	86%	90%	90%	89%
HMGB1	43%	62%	44%	49%
SPON2	43%	7%	45%	35%
SPARC	100%	41%	9%	23%
ARSA	71%	17%	5%	12%

30

【 0 2 0 6 】

膵癌に注目して、評価する最初の遺伝子としてSPARCを選択した。マウスおよびヒトの原発性腫瘍におけるSPARC RNA-ISH (非提示データ) により、腫瘍に対して必須の微小環境シグナルを与える、腫瘍の間質細胞における有意な発現が明示された。治療効果を目的としてPDACの間質を標的とすることに注目してきた、この分野における多くの努力により [1-4]、SPARCはCTC治療標的であるとともに間質指向性標的ともされている。ヒト膵臓腫瘍198件中合計196件(99%)はSPARCに関して陽性であり、明らかな上皮腫瘍細胞発現については36%陽性であった。

40

【 0 2 0 7 】

ヒト膵癌細胞株の評価により、5種の細胞株のうち3種がSPARC発現が高値であるとして同定され、それらは、転移挙動と相関する代用インビトロアッセイである遊走挙動の増加と相関していた(図8)。

【 0 2 0 8 】

ヒト膵癌におけるSPARC機能の評価を、SPARC発現が最も高度であった2種の細胞株(PDA C2およびPDAC3)に対して、低分子ヘアピン型RNA干渉(shRNA)を用いて行った。増殖、

50

遊走、浸潤、スクラッチ法および軟寒天法を含む、複数のインビトロアッセイを行った。SPARC発現を抑制することによる最も著明な効果は遊走挙動に対してであり（図9および非提示データ）、このことはSPARCが多くのCTCに存在するだけでなく、細胞株モデルにおいて阻害された場合にも機能的影響があることを指し示している。

【0209】

これらのデータを考慮した上で、SPARCノックダウンが転移に影響するか否かを明らかにするために、PDAC-3を用いてインビボ尾静脈接種を行った。尾静脈注射から2週後の初期データでは、SPARCがshRNAによって阻害された場合に転移能の低下が指し示されており、対照マウスでは83%が転移を有したが、これに対してSPARCに対するshRNAを有する細胞株では40%であった（図10）。

【0210】

表面タンパク質標的

表9に特定されている標的のほとんどは分泌性因子であり、細胞表面タンパク質としてアノテーションが行われた遺伝子の分析については表14にまとめた。

【0211】

（表14）表面タンパク質遺伝子が高発現であるヒト単一CTCのパーセント

癌の種類	発現が50RPMを上回る単一CTCのパーセンテージ			
	膵癌 (N=7)	乳癌 (N=29)	前立腺癌 (N=77)	すべて(N=113)
IL6ST	0%	38%	8%	15%
ARSA	71%	17%	5%	12%
TIMP2	0%	21%	4%	8%
CD55	0%	17%	4%	7%
SULF2	0%	24%	0%	6%
ITGA6	0%	14%	3%	5%
SDC4	0%	14%	3%	5%
CDON	0%	7%	5%	5%
SV2A	14%	3%	1%	3%

【0212】

これらの遺伝子は、それらがCTCの原形質膜中に組み込まれることを考慮すれば、標的であることが本明細書において想定される。一般に、細胞表面マーカーのRNA発現は、細胞上での実際のタンパク質レベルよりも少ない傾向がある。

【0213】

本明細書において治療的有用性に関して想定しているのは、IL6ST、SULF2およびSV2Aに対する抗体である。

1. IL6ST IL6、LIF、CNTFおよびオンコスタチンMに対するシグナル伝達物質。

a. 下流でのSTAT3活性化のために重要

b. IL6受容体およびIL6に対する抗体は、癌を含むヒト疾患に対して開発されている

2. SULF2-スルファターゼは6-O-硫酸基を除去することによってヘパリン硫酸を修飾する

a. 癌の進行および転移において発現がエンリッチされる

b. スルファターゼ活性に対する薬物が開発され、肝癌モデルにおいて活性が試験されている

3. SV2Aシナプス小胞糖タンパク質は神経内分泌細胞において高値である。

a. 神経内分泌細胞のマーカーであり、ヒト膵癌の上皮間質境界に認められる

b. 癌における神経内分泌分化の共通の特徴であり、より悪性度の高い疾患の前兆となる

【0214】

参考文献

10

20

30

40

50

1. Olive, K.P., M.A. Jacobetz, C.J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M.A. Goldgraben, M.E. Caldwell, D. Allard, K.K. Frese, G. Denicola, C. Feig, C. Combs, S.P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W.J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Ruckert, R. Grutzmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S.R. Hingorani, P. Huang, S.E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R.H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, and D.A. Tuveson, *Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer*. *Science*, 2009. 324(5933): p. 1457-61. 10
2. Neesse, A., P. Michl, K.K. Frese, C. Feig, N. Cook, M.A. Jacobetz, M.P. Lolkema, M. Buchholz, K.P. Olive, T.M. Gress, and D.A. Tuveson, *Stromal biology and therapy in pancreatic cancer*. *Gut*, 2011. 60(6): p. 861-8.
3. Rasheed, Z.A., W. Matsui, and A. Maitra, *Pathology of pancreatic stroma in PDAC*, in *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*, P.J. Grippo and H.G. Munshi, Editors. 2012: Trivandrum (India).
4. Provenzano, P.P., C. Cuevas, A.E. Chang, V.K. Goel, D.D. Von Hoff, and S.R. Hingorani, *Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Cancer Cell*, 2012. 21(3): p. 418-29. 20
5. Nagasaki, T., M. Hara, H. Nakanishi, H. Takahashi, M. Sato, and H. Takeyama, *Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction*. *Br J Cancer*, 2014. 110(2): p. 469-78.
6. Zarogoulidis, P., L. Yarmus, and K. Zarogoulidis, *New insights for IL-6 targeted therapy as an adjuvant treatment for non-small-cell lung cancer*. *Ther Deliv*, 2013. 4(10): p. 1221-3. 30
7. Voorhees, P.M., R.F. Manges, P. Sonneveld, S. Jagannath, G. Somlo, A. Krishnan, S. Lentzsch, R.C. Frank, S. Zweegman, P.W. Wijermans, R.Z. Orłowski, B. Kranenburg, B. Hall, T. Casneuf, X. Qin, H. van de Velde, H. Xie, and S.K. Thomas, *A phase 2 multicentre study of*

- siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma.* Br J Haematol, 2013. 161(3): p. 357-66.
8. Betts, B.C., E.T. St Angelo, M. Kennedy, and J.W. Young, *Anti-IL6-receptor-alpha (tocilizumab) does not inhibit human monocyte-derived dendritic cell maturation or alloreactive T-cell responses.* Blood, 2011. 118(19): p. 5340-3.
9. Bayliss, T.J., J.T. Smith, M. Schuster, K.H. Dragnev, and J.R. Rigas, *A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer.* Expert Opin Biol Ther, 2011. 11(12): p. 1663-8. 10
10. Khurana, A., D. Jung-Beom, X. He, S.H. Kim, R.C. Busby, L. Lorenzon, M. Villa, A. Baldi, J. Molina, M.P. Goetz, and V. Shridhar, *Matrix detachment and proteasomal inhibitors diminish SulF-2 expression in breast cancer cell lines and mouse xenografts.* Clin Exp Metastasis, 2013. 30(4): p. 407-15.
11. Lui, N.S., A. van Zante, S.D. Rosen, D.M. Jablons, and H. Lemjabbar-Alaoui, *SULF2 expression by immunohistochemistry and overall survival in oesophageal cancer: a cohort study.* BMJ Open, 2012. 2(6). 20
12. Hur, K., T.S. Han, E.J. Jung, J. Yu, H.J. Lee, W.H. Kim, A. Goel, and H.K. Yang, *Up-regulated expression of sulfatases (SULF1 and SULF2) as prognostic and metastasis predictive markers in human gastric cancer.* J Pathol, 2012. 228(1): p. 88-98.
13. Phillips, J.J., E. Huillard, A.E. Robinson, A. Ward, D.H. Lum, M.Y. Polley, S.D. Rosen, D.H. Rowitch, and Z. Werb, *Heparan sulfate sulfatase SULF2 regulates PDGFRalpha signaling and growth in human and mouse malignant glioma.* J Clin Invest, 2012. 122(3): p. 911-22.
14. Zheng, X., X. Gai, S. Han, C.D. Moser, C. Hu, A.M. Shire, R.A. Floyd, and L.R. Roberts, *The human sulfatase 2 inhibitor 2,4-disulfonylphenyl-tert-butyl nitron (OKN-007) has an antitumor effect in hepatocellular carcinoma mediated via suppression of TGFBI/SMAD2 and Hedgehog/GLI1 signaling.* Genes Chromosomes Cancer, 2013. 52(3): p. 225-36. 30
15. Bandala, C., A. Miliar-Garcia, C.M. Mejia-Barradas, M. Anaya-Ruiz, J.P. Luna-Arias, C.I. Bazan-Mendez, M. Gomez-Lopez, S. Juarez-Mendez, and E. Lara-Padilla, *Synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms.* Asian Pac J Cancer Prev, 2012. 13(10): p. 5063-7.
16. Ting, D.T., D. Lipson, S. Paul, B.W. Brannigan, S. Akhavanfard, E.J. Coffman, G. Contino, V. Deshpande, A.J. Iafrate, S. Letovsky, M.N. Rivera, N. Bardeesy, S. Maheswaran, and D.A. Haber, *Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers.* Science, 2011. 331(6017): p. 593-6. 40
17. Zeng, Y.J., W. Lai, L. Liu, H. Wu, X.X. Luo, J. Wang, and Z.H. Chu, *Prognostic Significance of Neuroendocrine Differentiation in Colorectal Adenocarcinoma After Radical Operation: a Meta-analysis.* J Gastrointest Surg, 2014.

18. Wang, J., B. Wei, C.T. Albarracin, J. Hu, S.C. Abraham, and Y. Wu, *Invasive neuroendocrine carcinoma of the breast: a population-based Study from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) database*. BMC Cancer, 2014. 14(1): p. 147.
19. Lipianskaya, J., A. Cohen, C.J. Chen, E. Hsia, J. Squires, Z. Li, Y. Zhang, W. Li, X. Chen, H. Xu, and J. Huang, *Androgen-deprivation therapy-induced aggressive prostate cancer with neuroendocrine differentiation*. Asian J Androl, 2014.
20. Chen, Y., I. Nowak, J. Huang, P.C. Keng, H. Sun, H. Xu, G. Wei, and S.O. Lee, *Erk/MAP kinase signaling pathway and neuroendocrine differentiation of non-small-cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2014. 9(1): p. 50-8. 10
21. Chang, P.C., T.Y. Wang, Y.T. Chang, C.Y. Chu, C.L. Lee, H.W. Hsu, T.A. Zhou, Z. Wu, R.H. Kim, S.J. Desai, S. Liu, and H.J. Kung, *Autophagy Pathway Is Required for IL-6 Induced Neuroendocrine Differentiation and Chemoresistance of Prostate Cancer LNCaP Cells*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e88556.
22. Debes, J.D. and D.J. Tindall, *Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. 351(15): p. 1488-90. 20

【 0 2 1 5 】

実施例5

血中循環腫瘍細胞 (CTC) は、原発性腫瘍から剥離して血流中に入り、遠隔臓器への癌の血行性伝播を媒介する。それらの組成を明確にするために、CTCのゲノムワイド発現プロファイルを、膀胱癌のマウスモデルにおける条件を合わせた原発性腫瘍と比較し、エピトープ非依存的なマイクロ流体捕捉を用いて個々のCTCを単離し、その後単細胞RNAシーケンシングを行った。CTCは原発性腫瘍由来のものと腫瘍由来細胞株に由来するもので別々にクラスター化し、増殖シグネチャーが少ないこと、Aldh1a2のエンリッチメント、上皮マーカーおよび間葉マーカーの混合型発現、ならびに上皮-間質境界面でエンリッチされる遺伝子転写物であるIgfbp5の発現を示した。マウスならびにヒトの膀胱CTCは、SPARCを含む間質由来細胞外マトリックス (ECM) タンパク質の極めて高度の発現を示し、癌細胞におけるそのノックダウンにより、細胞遊走および浸潤性が抑制された。間質ECM遺伝子のCTCによる異常発現は、癌の遠隔臓器への伝播のための微小環境シグナルへのそれらの寄与を提示するものである。 30

【 0 2 1 6 】

古典的CTCはほとんどAldh1a2アイソフォームを発現し、一方、種々の細胞型ではAldha1が発現された (非提示データ)。単一CTCにおいて、Aldh1アイソフォームの発現と間葉遺伝子 (Cdh11、Vim) のエンリッチメント、または上皮遺伝子 (Cdh1、Muc1) の損失との間に相関は見られず、このことは幹細胞マーカーおよびEMTマーカーがCTCと本来結びつきがないことを指し示している。RNAインサイチュアライゼーション (RNA-ISH) を用いた、Aldh1a2に関する原発性膀胱腫瘍の分析により、この幹細胞マーカーを発現する稀な上皮腫瘍細胞が同定されたが、発現の大半は癌に付随する間質細胞内に存在しており (図12A)、これはヒトPDACにおけるALDHタンパク質に関する免疫組織化学と一致する (Rasheed et al., 2010)。 40

【 0 2 1 7 】

CTCの明らかな多様性に加えて、原発性腫瘍内にあるそれらの起源の細胞、それらが血流に侵入してその中で生存する機序、および最終的にはCTC特異的治療標的の可能性のあるものの同定について、洞察がさらに得られる可能性のある共通の転写物を検索した。すべての古典的CTCのうちR90%で、非常に高いレベル (100 RPMを上回る) で発現される、最も高度にエンリッチされているCTC-c転写物 (RPスコア < 300) を同定するために、厳格 50

な基準を選択した。3種の遺伝子がこれらの基準を満たした：重要な幹細胞（iPS）リプログラミング因子の1つであるKruppel様因子4（Klf4）（Takahashi and Yamanaka, 2006）、細胞外増殖因子結合タンパク質の1つであるインスリン様増殖因子結合タンパク質5（Igfbp5）、およびデコリン（Dcn）。これらの3種の高度にエンリッチされているCTC遺伝子の共存の可能性を同定するために、原発性腫瘍標本においてRNA-ISHを利用した。Aldh1a2とは対照的に、Klf4は原発性腫瘍の上皮性構成要素において発現される（図12B）。Igfbp5は、それが腫瘍上皮-間質境界面で限局性に発現されるという点で特に関心が持たれる（図12C）。この位置領域はEMTを受ける癌細胞がエンリッチされており、単一CTCのRNA-seqによって明らかとなった混在性上皮/間質転写プログラムに寄与することを、本明細書において想定している。

10

【0218】

CTCは、高発現されるDcnに加えて、複数のECM遺伝子転写物も一貫して高レベルで有していた。CTCでエンリッチされている全遺伝子のGO分析（表3）により、32種のタンパク質性ECM遺伝子（GO：0005578、OR 2.4、q値 4.8 3 10.3）が同定された。これらの遺伝子は、上皮癌細胞ではなく、反応性間質細胞において通常発現されており、最近の諸研究では膀胱癌病態および転移を支える上での間質の重要性が強く示されているが（Feig et al., 2012; Neesse et al., 2011, 2013; Olive et al., 2009; Provenzano et al., 2012）、循環血液中の腫瘍細胞におけるこれらの間質関連ECM遺伝子の発現は予想外であった。RP発現変動分析を用いて、CTCを、精製EGFPタグ標識原発性腫瘍単細胞（TuGMP3）およびバルク腫瘍試料（反応性間質細胞が混在する腫瘍細胞）と比較した。6種のタンパク質性ECM遺伝子がCTCおよび間質構成要素において高発現されていたが、原発性腫瘍内の上皮細胞によっては発現されなかった：Dcn、Sparc、Ccnc80、Col1a2、Col3a1およびTimp2（非提示データ）。DcnおよびSparcの両方のRNA-ISH分析により、マウス原発性腫瘍の間質性要素における散在性発現が確かめられ、上皮-間質境界でこれらの転写物がケラチン-発現細胞と共存している稀な領域も認められた（非提示データ）。

20

【0219】

SPARCは、ECMタンパク質遺伝子の1つである。198種の原発性ヒトPDACのRNA-ISH分析により、症例の99%でSPARC転写物の大量の間質細胞発現が実証され、腫瘍の最大3分の1ではこのECM遺伝子産物を発現する稀な上皮細胞が認められた（非提示データ）。これらの観察所見に一致して、単一のEGFPタグ標識原発性腫瘍細胞のRNA-seq（非提示データ）では、SparcおよびKrt19の高レベル（>100rpm）での共発現を有することが同定された細胞は20個中1個（5%）のみであった。

30

【0220】

以上をまとめると、ECM遺伝子の大量の発現は、すべてのケラチンリッチ古典的CTCの共通の特徴である。これは原発性腫瘍とは著しく対照的であり、これらの遺伝子産物は支持性間質細胞によっては分泌されるが、上皮癌細胞によっては分泌されない。しかし、原発性腫瘍の上皮-間質境界面にある稀な細胞はケラチンおよびECM遺伝子の両方を発現するように思われ、これはCTCそれ自体において観察されるパターンと一致する。

【0221】

血流中のヒト癌細胞血中循環によるタンパク質性ECM遺伝子の発現を確かめるために、単一CTCを膀胱癌（n=7）、乳癌（n=29）および前立腺癌（n=77）の患者から単離し、これらを単細胞RNA-seqに供した。6種のECMタンパク質遺伝子がヒトCTCにおいて高発現されていた（全CTC試料の15%超で>100rpm）（図13；表13）。注目に値することとして、この3種の遺伝子（SPARC、MGP、SPON2）はECM糖タンパク質であり、コアマトリソーム（core matrisome）の一部として明確になっている（Naba et al., 2012）。コアマトリソームタンパク質SPARCは、膀胱癌CTCにおいて特にエンリッチされており、膀胱癌CTCの100%で高レベル（>100rpm）で発現され、これに対して乳癌CTCでは31%、前立腺CTCでは9%であった。ヒト上皮CTC間でのECMタンパク質遺伝子発現の顕著な違いは、微小環境組織特異性を示唆するとともに、ECMタンパク質シグナル伝達の冗長性の可能性も示唆する。総合すると、ヒトCTCにおけるECM遺伝子ファミリーメンバーの一貫した発現は、それらのアップレ

40

50

ギュレーションが、原発性腫瘍からのCTCの生成、または血流中を循環している時の微小環境シグナルが失われた癌細胞の生存のいずれかに寄与することを指し示している。

【0222】

膵癌細胞におけるSPARC発現の機能的影響を明確にする目的で、患者由来で継代数の少ない一群のPDAC細胞株を発現に関してスクリーニングした。SPARC発現が比較的高度である2種のヒトPDAC細胞株(PDAC2 and PDAC3)が同定され、それにより、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)媒介性ノックダウンの結果を検証することが可能になった(図8、9、図16A~16D)。PDAC2およびPDAC3細胞株の両方において、2種の無関係なshRNA構築物を用いた内因性SPARC発現の抑制は、2D培養物における増殖にも、足場非依存的な腫瘍スフェア形成にも影響を及ぼさなかった(図14A~14B、図16A~16D)。しかし、この両方のshRNAによるSPARCノックダウンにより、創傷スクラッチアッセイにおける膵癌細胞遊走、およびインビトロBoydenアッセイによって測定したそれらの浸潤特性は有意に低下した(非提示データ)。

10

【0223】

両方のshRNA構築物を用いてSPARCが抑制されたPDAC3細胞の尾静脈注射は、非標的ヘアピン(shNT)対照を発現する細胞よりも、生じる肺転移を有意に減少させた(図14D)。同所性膵臓異種移植片から生じる転移も、ルシフェラーゼ画像化および原発性腫瘍サイズに関する正規化による測定で、SPARCが抑制されたPDAC3細胞に関しては有意に減少した(図14E)。したがって、膵癌細胞によるSPARC発現は、それらの浸潤特性および遊走特性を選択的に強化して、転移の病毒性を増強させるように思われる。このことからみて、事実上すべての膵臓CTCで明らかに認められる高レベルのSPARC発現は、それが膵癌の転移伝播に有意に寄与するという可能性を提起するものである。

20

【0224】

考察

本明細書に記載されたのは、単細胞RNA-seqを用いた、膵癌におけるCTCの組成および多様性の詳細な分析である。高品質トランスクリプトームが93個のマウス膵臓単一CTCで達成され、それらを、条件を合わせた原発性腫瘍由来のバルク調製物および単細胞調製物、ならびに同じマウス膵臓腫瘍モデルから樹立された不死化細胞株と比較した。KPCマウスモデルの使用により、同時に単離された原発性腫瘍標本とCTCを比較することが可能になり、かつ、同じKras/Trp53遺伝的原因を共通に有する複数のマウス間でCTC不均一性を検討することも可能になった。単離されたCTCが多数であること、およびこれらの細胞から単離されたRNAが高品質であることは、正常な血液成分を効果的に枯渇させ、タグ標識のないCTCを濃縮し、かつ単細胞操作を可能にするという、CTC-iChip技術の有用性を反映している。さらに、その細胞表面エピトープにかかわらずCTCが精製されることにより、EpCAMなどの一般的な上皮マーカーの発現に基づくそれらの精製につきまとうバイアスも回避される。

30

【0225】

総合すると、本明細書において得られた観察所見には以下が含まれる。(1) CTC発現プロファイルが、主要な「古典的CTC」グループ、および血小板由来マーカーまたは増殖シグネチャーによって定義される他のグループを含む、3つのクラスにクラスター化する。(2) 事実上すべての古典的CTCが有する共通のマーカーには、上皮マーカーおよび間葉マーカーの両方、幹細胞関連遺伝子Aldh1a2、ならびに高発現される3種の転写物、Klf4、Igf1bp5およびDcnの発現が含まれる。原発性腫瘍における上皮-間質境界でのIgf1bp5発現細胞の特異的な局在は、CTC生成に有意に寄与する領域を提示している。(3) ほぼすべての古典的CTCが共通して有する最も高度にエンリッチされているCTC特異的転写物は、細胞外マトリックスタンパク質、例えばSparcなどをコードする。(4) 腫瘍間質区画に通常大量に存在する、このECM遺伝子産物のCTCにおける異常発現が、マウスおよびヒトの両方の膵臓CTCで観察され、かつそのノックダウンにより、再構成された系における癌細胞の遊走および浸潤が減弱する(図15)。白血球由来リードのデジタル減算を必要とした、部分的に精製されたバルクCTC集団のRNA-seqと比較して(Yu et al., 2012, 2013)、本明細書に

40

50

において報告された単細胞分析は、かなり上回る深さを持つ腫瘍細胞特異的リードをもたらす、それはCTC不均一性の測定を可能にする。

【0226】

体細胞性に獲得された遺伝的およびエピジェネティックな変化は、突然変異を惹起することに加えて、種々の腫瘍に由来するCTCを識別させることが本明細書において想定される。複数のマウス腫瘍は、CTCの3つの異なるクラスターのそれぞれに寄与していた。それらの非典型的な発現パターンにもかかわらず、血小板関連CTCサブセットおよび増殖性CTCサブセットが腫瘍由来であると同定されることは、それらに系列タグ標識腫瘍細胞を含めることによって立証された。古典的CTCクラスターによって示されるより特徴的な発現パターンにより、原発性腫瘍細胞との詳細な比較が可能になっており、それによってCTCの起源および特性についての洞察がさらに得られる。

10

【0227】

マウス膵臓古典的CTCは、上皮-間葉転換の重要な特徴である上皮マーカー、E-カドヘリン(Cdh1)の発現を一様に喪失している。しかし、これらの細胞は、サイトケラチンなどの他の上皮マーカーの発現は喪失しておらず、ビメンチンなどの古典的間葉マーカーの一貫した増加も見られない。そのため、ほとんどの古典的CTCは混合型状態に停止しているように思われる。原発性腫瘍の上皮構成要素に存在する、それらによるサイトケラチンの発現にもかかわらず、CTCにおけるほとんどの他の高発現マーカーは、原発性腫瘍の間質性構成要素と共通している。これらの間質遺伝子の中には、Aldh1a2がある(Rasheed and Matsui, 2012; Rasheed et al., 2010)。古典的CTCに共通する上皮性および間葉性状態に関する興味深い観察所見は、原発性腫瘍内の上皮/間質境界面にある細胞の小さな部分集団で特異的に発現されるIgfbp5の、それらによる事実上普遍的な(93%)発現である。このことは、原発性腫瘍内のこの決定的な場所で、生存能のあるCTCのかなり多くの割合が生じるという可能性を提起する。

20

【0228】

この単一CTC RNAseq研究からの最も予想外の観察所見は、古典的CTCの大多数でECM転写物の存在量が非常に多かったことである。これらのECM遺伝子産物を発現する単細胞における、膵臓においてエンリッチされているサイトケラチン(Krt7およびKrt19)の共発現により、これらが血中循環腫瘍由来線維芽細胞であるという可能性は否定される。

30

【0229】

一部の膵臓細胞におけるSPARCの異常発現と一致して、患者由来腫瘍細胞株のサブセットも、それを上皮サイトケラチンと共発現する。SPARCノックダウン後のこれらの膵臓細胞株によって示された細胞遊走および転移能の低下は、それがCTC媒介性転移に寄与することを指し示している。Sparc発現は転移に寄与するものの、ECMタンパク質発現に本来備わった冗長性のために、いくつかの態様においてはこの効果が減じる可能性があることが本明細書において想定される。

【0230】

化学療法薬の送達を改良し、さらに腫瘍細胞をそれらを支える微小環境から引き離す手段として、膵臓間質を標的とすることにはかなりの努力が向けられている(Neesse et al., 2011; Olive et al., 2009; Provenzano et al., 2012; Rasheed et al., 2012)。本明細書に記載された知見、例えば、これらの遺伝子産物がCTC自体によっても発現されるという知見は、著しいレベルの細胞可塑性を示唆する。CTCの浸潤特性がそのようなECMタンパク質の発現によって部分的に媒介されるという限りにおいて、このことは血液中の癌細胞を標的化する可能性をも提起する。

40

【0231】

(表13) ヒトCTC ECM遺伝子の発現

		100PRMを上回る試料のパーセンテージ			
カウント	ECM遺伝子記号	すべてのCTC	PDAC CTC	乳癌CTC	前立腺癌CTC
1	ANXA2	36.3%	0.0%	51.7%	33.8%
2	SPON2	29.2%	0.0%	3.4%	41.6%
3	LGALS3	22.1%	42.9%	37.9%	14.3%
4	SPARC	21.2%	100.0%	31.0%	10.4%

5	LGALS3BP	16.8%	0.0%	34.5%	11.7%
6	MGP	15.9%	57.1%	44.8%	1.3%
7	LAMC1	15.0%	0.0%	6.9%	19.5%
8	SMC3	15.0%	42.9%	17.2%	11.7%
9	CALR	14.2%	0.0%	6.9%	18.2%
10	TIMP1	13.3%	14.3%	27.6%	7.8%
11	MMP24	11.5%	0.0%	10.3%	13.0%
12	DAG1	10.6%	0.0%	20.7%	7.8%
13	ERBB2IP	10.6%	14.3%	20.7%	6.5%
14	MMP19	10.6%	0.0%	10.3%	11.7%
15	AGRN	8.8%	0.0%	6.9%	10.4%
16	CRTAP	8.8%	0.0%	6.9%	10.4%
17	COL24A1	8.0%	57.1%	17.2%	0.0%
18	ANG	7.1%	0.0%	0.0%	10.4%
19	MFAP1	7.1%	0.0%	6.9%	7.8%
20	VWF	7.1%	14.3%	17.2%	2.6%
21	VWA1	7.1%	0.0%	3.4%	9.1%
22	TIMP2	6.2%	0.0%	13.8%	3.9%
23	ECM1	6.2%	0.0%	24.1%	0.0%
24	LTBP1	6.2%	28.6%	10.3%	2.6%
25	LGALS1	6.2%	0.0%	10.3%	5.2%
26	SERPINA1	6.2%	0.0%	20.7%	1.3%
27	SPOCK1	6.2%	14.3%	0.0%	7.8%
28	TFF3	6.2%	0.0%	17.2%	2.6%
29	NPNT	5.3%	0.0%	3.4%	6.5%
30	TFIP11	5.3%	14.3%	6.9%	3.9%
31	COL9A2	4.4%	0.0%	0.0%	6.5%
32	COL6A1	4.4%	0.0%	0.0%	6.5%
33	FN1	4.4%	14.3%	10.3%	1.3%
34	LAD1	4.4%	0.0%	10.3%	2.6%
35	LAMA1	4.4%	14.3%	3.4%	3.9%
36	LAMB2	4.4%	0.0%	10.3%	2.6%
37	MATN2	4.4%	14.3%	3.4%	3.9%
38	ZP3	4.4%	0.0%	0.0%	6.5%
39	ADAMTSL3	3.5%	28.6%	3.4%	1.3%
40	FRAS1	3.5%	14.3%	0.0%	3.9%
41	TIMP3	3.5%	0.0%	3.4%	3.9%
42	DST	3.5%	0.0%	6.9%	2.6%
43	GFOD2	3.5%	14.3%	0.0%	3.9%
44	LAMA3	3.5%	14.3%	0.0%	3.9%
45	LAMB1	3.5%	14.3%	0.0%	3.9%
46	MMP7	3.5%	0.0%	0.0%	5.2%
47	ANGPTL4	2.7%	0.0%	0.0%	3.9%
48	BMP4	2.7%	0.0%	0.0%	3.9%
49	LTBP2	2.7%	28.6%	3.4%	0.0%
50	LEPRE1	2.7%	0.0%	0.0%	3.9%
51	LUM	2.7%	0.0%	0.0%	3.9%
52	NID2	2.7%	14.3%	6.9%	0.0%
53	SLC1A3	2.7%	28.6%	0.0%	1.3%
54	TECTA	2.7%	14.3%	3.4%	1.3%
55	THSD4	2.7%	0.0%	6.9%	1.3%

10

20

30

40

56	ADAMTS15	1.8%	0.0%	6.9%	0.0%
57	USH2A	1.8%	14.3%	3.4%	0.0%
58	APLP1	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
59	COL4A3	1.8%	14.3%	3.4%	0.0%
60	COL7A1	1.8%	0.0%	3.4%	1.3%
61	COL11A1	1.8%	0.0%	6.9%	0.0%
62	COL11A2	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
63	COL15A1	1.8%	28.6%	0.0%	0.0%
64	CTGF	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
65	CRISP3	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
66	DCN	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
67	ENTPD2	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
68	FMOD	1.8%	0.0%	3.4%	1.3%
69	GPC1	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
70	HSPG2	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
71	LAMA5	1.8%	0.0%	3.4%	1.3%
72	LAMC2	1.8%	14.3%	0.0%	1.3%
73	MMP10	1.8%	0.0%	3.4%	1.3%
74	MMP12	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
75	NTN4	1.8%	0.0%	6.9%	0.0%
76	NAV2	1.8%	0.0%	6.9%	0.0%
77	PAPLN	1.8%	0.0%	3.4%	1.3%
78	SFTPA2	1.8%	0.0%	0.0%	2.6%
79	VCAN	1.8%	14.3%	0.0%	1.3%
80	ADAMTS13	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
81	ADAMTS3	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
82	ADAMTS5	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
83	ADAMTSL4	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
84	EFEMP1	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
85	EFEMP2	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
86	EGFLAM	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
87	KAL1	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
88	KAZALD1	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
89	MAMDC2	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
90	SMOC1	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
91	SMOC2	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
92	ACHE	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
93	AMTN	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
94	ANXA2P2	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
95	CPZ	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
96	CHADL	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
97	COCH	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
98	COL6A6	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
99	COL1A2	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
100	COL2A1	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
101	COL4A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
102	COL4A2	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
103	COL4A6	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
104	COL5A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
105	COL6A2	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
106	COL8A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%

10

20

30

40

107	COL12A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
108	COL14A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
109	COL19A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
110	COL17A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
111	COL22A1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
112	ENTPD1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
113	FBN2	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
114	FBN3	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
115	FBLN1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
116	FBLN7	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
117	GPC4	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
118	HMCN1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
119	IMPG1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
120	IMPG2	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
121	LAMA2	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
122	LAMB3	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
123	MEPE	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
124	MMP1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
125	MMP2	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
126	MMP25	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
127	MMP3	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
128	MMP9	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
129	OGN	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
130	PI3	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
131	PRELP	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
132	PTPRZ1	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
133	RELN	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
134	ADAMTSL2	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
135	TGFBI	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
136	UCMA	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
137	VIT	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
138	WNT10A	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
139	WNT10B	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
140	WNT11	0.9%	0.0%	3.4%	0.0%
141	WNT4	0.9%	0.0%	0.0%	1.3%
142	ZP2	0.9%	14.3%	0.0%	0.0%
143	ADAMTS1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
144	ADAMTS10	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
145	ADAMTS12	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
146	ADAMTS14	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
147	ADAMTS16	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
148	ADAMTS17	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
149	ADAMTS18	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
150	ADAMTS19	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
151	ADAMTS2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
152	ADAMTS20	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
153	ADAMTS4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
154	ADAMTS6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
155	ADAMTS8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
156	ADAMTS9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
157	ADAMTSL1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

10

20

30

40

158	ADAMTSL5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
159	CD248	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
160	DGCR6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
161	EGFL6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
162	EMID1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
163	FREM1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
164	FREM2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
165	RELL2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
166	SPARCL1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
167	ACAN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
168	AMBN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
169	AMELX	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
170	AMELY	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
171	ASPN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
172	BGN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
173	BCAN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
174	CRTAC1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
175	CILP2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
176	CILP	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
177	COMP	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
178	CHL1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
179	CHI3L1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
180	CHAD	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
181	C6orf15	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
182	CCDC80	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
183	CTHRC1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
184	COL1A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
185	COL3A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
186	COL4A4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
187	COL4A5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
188	COL9A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
189	COL9A3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
190	COL5A2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
191	COL5A3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
192	COL6A3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
193	COL8A2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
194	COL10A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
195	COL16A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
196	COL18A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
197	COL21A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
198	COL27A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
199	COL28A1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
200	COLQ	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
201	DMP1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
202	DSPP	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
203	DPT	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
204	ELN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
205	EMILIN1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
206	EMILIN2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
207	EMILIN3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
208	ENAM	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

10

20

30

40

209	EPYC	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
210	ECM2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
211	FBN1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
212	FGF1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
213	FGF9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
214	FLRT1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
215	FLRT2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
216	FLRT3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
217	FBLN2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
218	FBLN5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
219	GPLD1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
220	GPC2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
221	GPC3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
222	GPC5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
223	GPC6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
224	HAPLN1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
225	HAPLN2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
226	HAPLN3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
227	HAPLN4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
228	KERA	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
229	LAMA4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
230	LAMB4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
231	LAMC3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
232	LTBP4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
233	LOX	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
234	LOXL1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
235	MATN1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
236	MATN3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
237	MMP11	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
238	MMP13	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
239	MMP16	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
240	MMP17	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
241	MMP20	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
242	MMP23A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
243	MMP26	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
244	MMP27	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
245	MMP28	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
246	MMP8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
247	MFAP5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
248	MFAP2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
249	MFAP4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
250	MUC4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
251	MMRN2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
252	NTN1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
253	NTN3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
254	NID1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
255	NYX	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
256	ODAM	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
257	OPTC	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
258	OMD	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
259	OTOA	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

10

20

30

40

260	POSTN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
261	PODN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
262	PODNL1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
263	PRSS36	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
264	RPTN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
265	RBP3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
266	SPN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
267	ADAMTS7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
268	SPOCK2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
269	SPOCK3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
270	SPON1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
271	SFTPA1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
272	SFTPD	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
273	TECTB	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
274	TNC	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
275	TNN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
276	TNR	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
277	TNXB	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
278	THBS4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
279	TFPI2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
280	TGFB1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
281	TINAG	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
282	TNFRSF11B	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
283	VEGFA	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
284	VTN	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
285	VWC2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
286	WNT2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
287	WNT1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
288	WNT16	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
289	WNT2B	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
290	WNT3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
291	WNT3A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
292	WNT5A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
293	WNT5B	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
294	WNT6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
295	WNT7A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
296	WNT7B	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
297	WNT8A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
298	WNT8B	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
299	WNT9A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
300	WNT9B	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
301	ZP1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
302	ZP4	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

10

20

30

40

【 0 2 3 2 】

(表 10) CTC-cとの比較でCTC-proにおいてエンリッチされている最も有意な遺伝子セット
 q値 < 0.01

出所	用語	カウント	オッズ比	ベンジャミニ (Benjamini) (q値)
GOTERM_BP_FAT	GO:0002495~抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介したペプチド抗原の提示	5	59.81	6.97E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0019886~抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介した外因性ペプチド抗原の提示	5	59.81	6.97E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0002504~抗原プロセッシングおよびMHCクラスIIを介したペプチド抗原または多糖抗原の提示	5	50.36	7.34E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0002478~抗原プロセッシングおよび外因性ペプチド抗原の提示	5	41.60	1.10E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0019884~抗原プロセッシングおよび外因性抗原の提示	5	34.18	1.87E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0048002~抗原プロセッシングおよびペプチド抗原の提示	5	27.34	3.72E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0001775~細胞活性化	9	7.00	3.82E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0019882~抗原プロセッシングおよび提示	6	13.20	7.40E-03

10

【 0 2 3 3 】

(表 1 1) CTC-cとの比較でCTC-pltにおいてエンリッチされている最も有意な遺伝子セット

q値 < 0.01

出所	用語	カウント	オッズ比	ベンジャミニ (Benjamini) (q値)
GOTERM_BP_FAT	GO:0042060~創傷治癒	18	7.8	1.86E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0007596~血液凝固	15	10.4	9.31E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0050817~凝固	15	10.4	9.31E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0007599~止血	15	10.3	7.59E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0050878~体液レベルの調節	15	8.2	1.30E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0030029~アクチンフィラメントに基づく過程	20	5.5	1.14E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0007010~細胞骨格組織化	26	3.9	3.95E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0030036~アクチン細胞骨格組織化	18	5.3	1.11E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0009611~創傷に対する応答	26	3.6	1.02E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0007155~細胞接着	33	2.9	2.86E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0022610~生物学的接着	33	2.8	2.70E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0001775~細胞活性化	19	3.7	4.70E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0030168~血小板活性化	6	18.2	1.68E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0007229~インテグリン媒介性シグナル伝達経路	10	6.4	2.95E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0016192~小胞媒介性輸送	25	2.6	3.81E-03
MSigDBv3.1 CGP	GNATENKO 血小板シグネチャー	20	55.1	3.91E-24
MSigDBv3.1 CGP	TENEDINI 巨核球マーカー	14	15.3	1.35E-11
MSigDBv3.1 CP:REACTOME	巨核球発生および血小板産生に関与するリアクトーム因子	6	2.9	2.25E-02

20

30

40

【 0 2 3 4 】

50

(表12) ランクプロダクトによる、有意に発現された遺伝子 (FDR < 0.01)

カウント	CTC-c 対 原発性腫瘍で 発現が 増加している遺伝子	原発性腫瘍 対 CTC-cで 発現が 増加している遺伝子	CTC-plt 対 CTC-c	CTC-pro 対 CTC- c	原発性腫瘍 対 WBC	WBC 対 原発性腫瘍	CTC-c 対 WBC	WBC 対 CTC
1	Upk3b	Tff2	Clec1b	kg:uc007pge.1	Wfdc2	Pbbp	Olf1 033	Beta-s
2	Ier2	Wfdc2	AU023871	kg:uc007pgd.1	Spp1	Alas2	Crip1	Alas2
3	Egr1	Lamb3	Alox12	kg:uc007pgf.1	Cct3	Nrgn	Ppp1r 12a	Hbb-b1
4	Nkain4	Lad1	Itga2b	kg:uc007pgg.1	Itga3	Cd9	Vcp	Il1b
5	Igfbp5	Dmbt1	Pbbp	Igj	Gsto1	Csf3r	Klf9	Pbbp
6	Slc6a4	Npy	Gng11	kg:uc012enb.1	Mmp2	Il1b	Mprip	Hba-a2
7	Klf4	Pmepa1	Vwf	2010001M09Rik	Mfge8	Gdpd3	Sdc4	kg:uc00 7pgs.1
8	Tmem221	Kcnn4	Pf4	kg:uc009cfw.1	Capg	Ms4a1	Gprc5 a	kg:uc01 1yvj.1
9	Arl4d	Serinc2	Fcer1g	kg:uc007pgi.1	Cd63	Hbb-b1	Vat1	Coro1a
10	Lrrn4	5730559C18R ik	Tmem40	kg:uc007pgh.1	Stub1	Beta-s	Wdr9 2	Cd74
11	Cldn15	Muc1	Hba-a2	kg:uc007yos.1	Lad1	kg:uc007 pgs.1	S100a 11	Gdpd3
12	Gpm6a	Chi3l3	Stom	Coro1a	Myo1h	kg:uc011 yvj.1	Clic4	Ccndbp 1
13	Atf3	Pglyrp1	Beta-s	Pou2af1	Igfbp7	Rpr1	Dync 1i2	kg:uc00 9cfw.1
14	Ptma	Arl4c	Plek	kg:uc011yvj.1	Kcnn4	Pfn1	Nfkbi z	kg:uc01 2enb.1
15	Slc9a3r1	Spp1	Srgn	Glipr1	D8Ert7 38e	Clec1b	Cyp2s 1	Ptprc
16	Fos	Col15a1	Myl9	Cd52	Lamb3	Ptprc	Esam	Csf3r
17	Tmem119	C1qb	Cd84	Cd79b	Chi3l3	Stim1	Surf4	Rac2
18	Ptgis	Tnnt2	F5	Sec11c	Arl4c	Ccndbp1	Krt19	Rpr1
19	Dcn	Gkn3	Trem1	Tnfrsf17	Col18a1	Cap1	Bsg	H2-Ab1
20	Gbp2	Onecut2	Hbb-b1	Krr1	Atox1	Cd79b	Tm4sf 1	Epb4.1
21	Dmkn	Mmp7	Itgb3	Gmfg	Ly6a	Alox12	Lgals3	Lyz2
22	Sdc4	Cd74	Gp9	Ccr9	Dmbt1	Hba-a2	Clic1	Ctla2b
23	Illdr2	Ctss	Mpl	Pycard	Dync1h 1	Ube2l6	Capns 1	Pld4
24	Akap2	Lamc2	Ctla2a	Derl3	Adipor2	Cat	Igfbp 6	kg:uc00 7pgt.1

10

20

30

40

25	Gfpt2	Olfml3	Tubb1	Rac2	Rpl37	Faim3	Rrbp1	Gng11
26	Klf6	Lgals4	Mylk	Srgn	Kctd10	Dusp1	Calr	Mepce
27	Btg2	Lcn2	F13a1	Cytip	Col15a1	kg:uc007 pgt.1	Rtf1	Tyrobp
28	Myl7	Ly6a	Slamf1	Edem2	Surf4	E2f2	Ildr2	Isca1
29	Igfbp6	Pak1	Rgs10	Itgb7	Dad1	Phospho 1	Mark 2	281045 3106Rik
30	Gpr133	Capn5	Mkrn1	Lsp1	Col4a1	Abi3	Mt1	Slc30a9
31	Oasl2	Ptpn	Laptm5	Lcp1	Ap2s1	Sorl1	Akr1b 3	Trem12
32	Pfn1	Reg3b	1810058I2 4Rik	Cyfp2	Sdc1	Trem12	Gm66 44	Srgn
33	Cap1	Fmn13	Itgb2	Nans	Rpl35	Cytip	Nkain 4	Dcaf12
34	Nfkb1a	Sdc1	Slc2a3	Slamf7	Sec61a 1	B2m	Ppp2c a	Plek
35	Malat1	Prom1	Pcmt1	Ell2	Rras	Fyb	Akap 2	Cat
36	Rarres2	Ankrd50	Gp5	H2-Eb1	Oraov1	Peli1	Hspb 1	Alox12
37	Rspo1	Ccl6	Ube2o	Creld2	Ndufa2	Plek	Ptgis	Fech
38	Espn	Slc4a11	5430417L 22Rik	Cd74	Anapc2	N4bp3	Msln	Rbm5
39	Klf9	Oraov1	Ptpn18	Blnk	Pitpna	Fam117a	Emp2	Cd97
40	Zbtb7c	Aldh1l1	Lat	Fmn1	Psap	Srgn	Capn 2	March8
41	Brd2	Slc20a1	Fermt3	Snrnp70	Atp5j2	Sept9	Rhoc	Pnpo
42	Olfr1033	Cldn7	Nrgn	Sec61b	Onecut 2	kg:uc012 hdk.1	Ptpnf	Phosph o1
43	Wt1	Acsbg1	Mrv1	Edem1	Hmga1	kg:uc009 vev.1	Bcam	Isg20
44	Esam	Las1l	Lyz2	Tspan13	Pmepa1	Ptpnrcap	Ogdh	March2
45	kg:uc009igb.1	C1qc	Epb4.1	Psm8	S100a1 1	kg:uc007 pgq.1	Sparc	Lsp1
46	Tmem151a	Lama5	Rasgrp2	Pim1	Rbp1	kg:uc007 pgr.1	Ahna k	181005 8124Rik
47	Mgll	Mgat4a	Trem12	Sept1	Rpl36al	kg:uc007 vdl.1	Oasl2	Clec1b
48	Csrnp1	Cldn2	Hist1h4i	Cd48	S100a4	Ctla2b	Wt1	Btg1
49	Cd9	Mcpt2	March2	Sub1	Atp6ap 1	Myl9	Klf4	Laptm5
50	Gjb5	Fxyd3	Ltbp1	Lims1	Ndufs2	Itpr2	Cdkn 1a	Nrgn
51	Lrrc61	Il4ra	Nptn	Ncoa2	Anapc5	kg:uc012 enb.1	Myl7	H2-Aa
52	Wasf2	Itga5	Abtb1	Ctnnb1	Cox6b1	Isg20	Col1a 2	Fyb
53	Pdpn	Porcn	Ctla2b	Fdps	Krtcap2	Rasal3	Eif4a1	Cd24a
54	kg:uc009ogv.1	Mast3	Prkab2	Ube2j1	Atn1	Gng11	Rbpm s	Fnbp4
55	Sdpr	Scara3	Arhgdib	Mettl1	573055 9C18Rik	kg:uc009 cfw.1	Emp3	Ehbp1l1

10

20

30

40

56	Gpr64	Atox1	Alas2	Lax1	Pea15a	Tmsb4x	Scaf1 1	Ctla2a
57	Finc	Arrdc1	Odc1	Rilpl2	Grcc10	Trem1	Col14 a1	Sgk1
58	Add3	Mmp2	Ptpn11	Ctse	Lama5	Fech	Ptrf	Glyr1
59	Gata6	Saa3	Dhcr24	Glrx	Krt18	Epb4.1	Crip2	Myl9
60	Wfdc1	Serpinf1	Mfsd2b	Fut8	Ccnd1	Sgk1	Ubxn 4	Il2rg
61	A130040M12R ik	Sox11	Gp1bb	AI662270	Arhgef5	Dgkq	Eif2s2	Mrps17
62	Ankrd12	Prpsap1	Rbpms2	Gramd3	Golm1	Snap23	S100a 6	Cdr2
63	Adamts1	Mcpt1	Fyb	Il2rg	Tff2	Usp25	Hectd 1	Mkrn1
64	C2	Mfge8	Smox	Rasgrp3	Plin2	Kif21b	Zc3h1 5	Gart
65	Prss23	Col18a1	P2rx1	Impdh1	H13	Irs2	Ube2 d3	Lyz1
66	Ube2v1	Lyz2	Otud7b	Plek	Rpl29	Pxk	A130 040M 12Rik	Vwf
67	Cryab	C1qa	kg:uc007t tx.1	Ints5	111003 4A24Rik	Cyp4f18	Cd34	Gadd45 a
68	Pkhd1l1	Acp5	Samd14	Blmh	Trim28	Map4k1	Igfbp 5	Mpp1
69	Rtn1	Angptl4	Clca1	Dnmt1	Ltbp3	Isca1	C1s	Stim1
70	Birc6	Ccnd1	kg:uc007t ty.1	Galk1	Fkbp1a	Itga4	Upk3 b	Psme3
71	Xdh	Asl	Gpr56	kg:uc007hvx.1	Erp29	Dock2	Gpr13 3	Ets1
72	Cd34	Ctxn1	Sh3bgrl2	Ccdc88b	Muc1	Spib	Dab2	Snap23
73	Rab6b	Pgs1	Pttg1ip	Selplg	Lamc2	28104531 06Rik	Serpi nh1	Arhgdib
74	Dusp1	Anapc2	Nomo1	Sar1b	Plscr3	Cdr2	Upk1 b	Hmha1
75	Clic4	Cp	Gnaz	Lat2	Agrn	Naa16	Sdf4	Itpr2
76	C3	Gpx3	Mmrn1	Slc16a6	Park7	Arhgdib	Ctbp2	Ubl7
77	Rhob	Lama3	Gp1ba	Mki67	Ctnnb1	Cd79a	Psap	Ddx58
78	Mir3064	Rbp1	Sh3bgrl3	Dnajc3	Atp5g1	Rbm27	Arhge f12	Nfkbie
79	Thbd	Cotl1	Slc24a3	H2-Ab1	Eef1g	Lmnb1	Copb 2	Setd7
80	Dpysl2	Nek6	Sord	Ndufs6	Nhp2	Slc25a37	Ctsl	Stk24
81	Cobl	Cpxm1	Nfe2	Actr3	Rrbp1	Klf6	Aldh1 a2	Hvcn1
82	Npr1	Sfrp1	Tuba4a	Etnk1	Sumo3	Hist1h1c	Dcn	Plekha2
83	Dnajb9	Ttr	Zyx	Herpud1	Scyl1	Phip	Timp 3	Psme4
84	Arhgap29	Gsto1	Cnn2	Ptpn7	Cox6a1	Qrfp	Xdh	Ankrd4 4
85	Cav1	Npepl1	Itgb5	Ctss	Krt8	Fermt3	Irf7	B4galt5

10

20

30

40

86	Gbp7	Usmg5	Gata1	Cs	Gsta4	Ptma	Tme m151 a	Phf20
87	Hes1	Polr2l	Hist1h1c	Fbxw7	Ppp1r1 4b	Etv3	Aebp 1	Zc3hav1
88	Gm16897	Sphk1	Tbxas1	Ppp2r5c	Tnk1	Apobr	C2	Rnf11
89	Ppp1r12a	Asxl1	Ptplad2	Znrd1	D19Ws u162e	kg:uc008 ewj.2	Spen	Plk3
90	Sv2a	Ctsh	Bpgm	Rfc2	Ctsl	Malat1	kg:uc 007pf e.1	Fbxw5
91	Ang	Egfl7	Pdlim7	Preb	Timp1	March8	Krt18	Emb
92	Aldh1a2	C1qtnf6	Mmd	Fcer1g	S100a6	Coro1a	Arf4	kg:uc00 7vdl.1
93	Cryl1	Rras	G6b	Dnajb11	Rps15	Rac2	Rab1 4	Taok2
94	Kank1	Lgi4	kg:uc009d uo.1	Slc35b1	Polr2j	Glyr1	Tme m98	Dhrs11
95	2210403K04Ri k	Hmga2	Lyz1	Sin3b	Hspe1	Btg2	Prss2 3	Slc25a3 9
96	kg:uc009okn.1	Cep250	Tacc1	Nktr	Lgals4	Mtf2	Egr1	Csk
97	Osr1	B4galt3	Dap		Edf1	Nfkbie	Perp	Bcl2
98	kg:uc008ewj.2	Tmem223	Mast2		Mtch1	Cd84	Csrp1	kg:uc00 9vev.1
99	kg:uc009tuw.1	Ltbp2	Atp2a3		Rnf187	AW5498 77	Pdnp	Wipf1
100	Gadd45b	Tnfrsf23	Snca		Npy	March2	Pdcd6 ip	Sept9
101	Ablim3	Col7a1	Stx11		Cox5b	Add3	Rpl37	Rnf10
102	Clec3b	Ggct	C030046I 01Rik		Pak1	Ddx50	F11r	Pml
103	Usp25	Rab25	Trpt1		Mmp7	Prkcb	Gpm6 a	Cd9
104	Sntb2	Nedd8	Tsc22d1		Fxyd3	Klf2	Tuba 1a	D4Wsu 53e
105	Rock2	9430023L20R ik	Prkar2b		Cuta	Dcaf12	Ctnna 1	Traf7
106	Col14a1	Arl2	Cd9		Ndufb8	Il2rg	Anxa 8	Pitpnc1
107	Cd200	Wbp1	Pgm2l1		Gps1	Selplg	Tpm1	Mms19
108	kg:uc008ehr.1	H2-Ab1	Gp6		Bud31	Cd37	S100a 16	Naa16
109	Atp2b1	Preb	Pde5a		Ppap2c	Fastkd2	Chmp 4b	Sharpin
110	Exoc4	Sgsm3	Itga6		Dap	Rsad2	Tbrg1	Capza1
111	Abcb1b	Sfn	Itgal		Slc25a1	Msn	C3	Rsad2
112	Nrgn	Prrx2	Edem1		Chaf1a	2010321 M09Rik	Ptgs1	kg:uc01 2hdk.1
113	kg:uc009cvm.1	Ptprk	Isg20		Asxl1	Kif2a	Rhou	Ghitm
114	Ncoa4	Reg1	Cdc42ep5		Jmjd8	Cd97	Cdc42	Csnk1g1
115	Ndufa4	Sdcbp2	Nipal3		Tecr	Hvcn1	Gpx4	Dgkz

10

20

30

40

116	Upk1b	Pcbd1	Ccdc92		Mgp	Nipsnap3b	Ppib	B2m
117	Jun	Slc25a1	Sort1		Uqcrh	Uba7	Stub1	Irs2
118	Syne2	Vamp5	Ly6g6c		Wdr38	1810058124Rik	Dmkn	Emg1
119	kg:uc007bvx.1	Crif1	Ubash3b		Col4a2	Nfrkb	Rnh1	Impact
120	Ap4e1	Avil	Inf2		Tnnt2	Pabpc1	Pdgfa	Mylip
121	Spock2	2700094K13Rik	Asap1		Ndufs8	Usp16	Rpl37a	Psmb8
122	Efemp1	Ctse	Sec11c		Tspan4	Pde1b	Rabac1	Rfk
123	Prpf40a	Penk	Gas2l1		Agpat6	Ncoa4	Timp2	Map3k5
124	Tspan5	Tmc4	Parvb		Timp3	Irf8	Serping1	Odc1
125	Lgals7	Dhrs3	Tmsb4x		Ankrd50	Ppp1cb	Rbm39	Slc11a2
126	Kif5b	Ap1s1	kg:uc007xrw.1		Ube2d3	Rgs2	Tgoln1	Eif2b1
127	Psip1	Arl6ip4	Nudt3		Sf1	Smyd4	Nfix	kg:uc008wjd.1
128	kg:uc008oki.1	9430008C03Rik	Bcl2l1		Csnk1d	Arid3b	Brd4	Rexo1
129	1810014B01Rik	Fcer1g	B230312A22Rik		Reg3b	Sh3bgrl2	Tmem234	Ddx50
130	Ptges3	Uqcr11	Cnp		Flot2	Lyl1	Wbp5	Nipsnap3b
131	Limch1	Nhp2	Plp1		Lmna	Prr13	Ppig	Sp100
132	Bicd1	Plbd2	Cnst		2310044H10Rik	Plagl2	Cd63	Uggt1
133	Rdx	Capg	Rgs18		H19	Nfkbia	Col1a1	kg:uc007czl.1
134	Pcdh15	Pnpla6	Lsm12		Slc20a1	Eef1a1	Mt2	Arpc5
135	Foxn3	Pdpf	Alox5ap		6720456B07Rik	Brd2	Zbtb7c	Nfrkb
136	Morf4l2	Hgfac	Ppif		Mdh2	Egr1	Npr1	Nap1l4
137	Ppp1r15a	Apoe	Spnb1		Eif6	Mkrn1	Tmem119	Fam117a
138	Cdc42ep3	Fam40a	Ormdl3		Phf5a	Pld4	Atf3	Sipa1l1
139	Pard3b	Lyz1	Hpse		Vps28	Aldh1a1	Ankd1	Ttc1
140	Bicc1	2200002D01Rik	Srxn1		Bag1	Dnajb9	Tmed10	kg:uc009vew.1
141	Amhr2	Laptm5	2010002N04Rik		Cyc1	Gjb5	Slc6a4	
142	Gucy1a3	Qars	Hist1h2bc		Angptl4	Mtif2	Atxn7l3b	
143	Psmb2	Tmx2	Cyba		Lgals3	H2-DMb2	Rpl29	
144	Mapkapk3	Fkbp4	Chst12		Farsb	Sdpr	Ccar1	
145	Ube2l6	Plin2	kg:uc009s		Mbd3	4932438	Ltbp4	

10

20

30

40

			ps.1			A13Rik		
146	kg:uc007pff.1	Fcgr3	Max		Timm13	Trem1	Scyl1	
147	kg:uc007ctp.1	Gkn1	Was		Tpd52l2	Nup153	Ap3d1	
148	Nedd4	Snhg1	Isca1		Ptpn	Mpp1	Iqgap1	
149	Plxna4	Lsp1	Pdzk1ip1		Crip2	Dhrs11	Cldn15	
150	2010107G12Rik	Gm20605	Lyn		Raver1	Lrmp	Spnb2	
151	Ifngr1	Ly6c1	Mob3a		Eif2b2	Manf	Ano1	10
152	Bcam	Aim1	H2-T24		Psm7	Mll3	Lrrn4	
153	Ccnl1	2310007B03Rik	Slc44a1		Rps6ka4	Fam116b	Id3	
154	Hoxa5	Tgfbi	Der1		Mgat4a	B4galt5	Eif3a	
155	Fhl1	Tsta3	Gclm		Ifitm2	kg:uc009vew.1	Prkcdbp	
156	1810041L15Rik	Pafah1b3	Fech		Wars	Ly6d	Atp1a1	
157	2900002K06Rik	Chid1	Ywhah		Capn5	Dguok	Dnaja2	20
158	Hspb1	Smox	Igtp		Bsg	Pnpo	Tubb4b	20
159	Podn	1500012F01Rik	Myl6		Sec16a	Tmem175	Hnrrnpab	
160	Fam63b	Tspan4	Thbs1		Cldn7	Gm6548	Mmp14	
161	Hsp90b1	Agrn	Tln1		Cox7a2	Rsrc2	Atp1b1	
162	Dpp4	Cfp	kg:uc009aqq.1		Nek6	Ccdc88b	Psip1	
163	Gas1	Cdh1	Bcap31		Rpl39	Akna	Mgll	
164	kg:uc007zak.1	Rasgrf1	Ilk		Itpr3	Tsc22d3	Rnase4	30
165	Zc3h13	Nxf1	Epha1		Ctnna1	Txndc5	Ywhab	
166	Sox6	Pdrg1	2810453106Rik		Tpd52	Tubb4a	Clip1	
167	Arid4a	Polr2j	Rnf19b		Mlf2	Stx11	Syn3	
168	Tnxb	Suds3	Gsn		Crip1	D4Wsu53e	Myl12a	
169	Tsix	D0H4S114	Flna		Fkbp4	Amfr	Rbm25	
170	Scd1	Ccl9	Arrb1		Gprc5a	Tti1	Arf2	40
171	Jund	Neat1	kg:uc007pum.1		Slc4a11	Fam175b	Cav1	
172	Crsl1	Ccdc12	Mbnl1		Syn3	Zfp36	Hnrrnpc	
173	1110003E01Rik	Prr24	Ccnd3		Npc2	Ddx5	Syne2	
174	Rnase4	Impdh1	Pdlim1		Rpl32	Tlr7	Dst	
175	Arhgef12	Card10	Ctse		Inf2	Rfk		

176	Irf7	Cpsf1	Tspan17		Rps10	kg:uc007 ded.1		
177	Bbx	Sema4g	Gpx4		Rps26	Gnb2		
178	Sema5a	Hes6	Bnip3l		Rpl37a	Tmed5		
179	Mau2	C130074G19 Rik	P2ry12		Ctxn1	Thbs1		
180	Abi3bp	Ctrb1	kg:uc009v ev.1		Lrrc59	eg:32016 9:chr9:p		
181	Dag1	Rnaseh2a	Prkab1		Dctn1	Zfp335		
182	Cyp2s1	Golm1	F2rl2		Mtap4	Emg1		
183	Sfrs18	Ctsz	Stk4		Uqcr10	Trmt61a		
184	Hspb8	Cyb561	Fhl1		Suds3	Adipor1		
185	Cnot6l	Ndufs8	Rnf10		Ap1s1	Vwf		
186	Twsg1	Atp6ap1	Rasa3		S100a1	Aatf		
187	Gpc3	Srd5a1	Taldo1		Atp5j	Trib1		
188	Lrrn4cl	Carkd	Bysl		Aim1	Pcyt1a		
189	Cdh3	Cd24a	Esd		Plec	Stx18		
190	Cyr61	Eng	Aldh2		Prom1	Trp53bp 2		
191	Cyp2d22	Tcirg1	Rhog		Rhoc	Stk40		
192	Hist1h1c	Slc9a3r2	kg:uc009e cr.1		Mast3	Il18		
193	Aplp1	0910001L09R ik	Cald1		Olfml3	1810014 B01Rik		
194	Tbl1x	Cox5b	Wbp2		Uqcr11	Lcp2		
195	Pcm1	Adipor2	Ptprj		Plp2	Gimap4		
196	Ifi204	Scarf2	Tpm4		Spna2	Rabl2		
197	Nfix	Myo7a	Mxi1		170001 7B05Rik	Ncf2		
198	Flrt2	Ppap2c	Ly6g6f		Anxa4	eg:49721 0:chr14: m		
199	Heg1	Pea15a	Sla		Nudc	Tpt1		
200	Il6ra	Sh3pxd2b	Slpi		Asl	Mll5		
201	Ralbp1	H19	Bicd2		Prkcsh	H3f3a		
202	Rhoj	Tpd52	Clu		Plod3	Tspan13		
203	Ktn1	2610203C20R ik	Mttr14		Ndufa9	Il10ra		
204	Arl6ip5	Naa10	Abca7		Impdh2	Mdc1		
205	Crebbp	Fermt1	Ppp1r18		Ccnl2	Stk24		
206	Ppig	Sap30l	Kif2a		Nedd8	Myst4		
207	Akap13	Bgn	Prdx6		Atp6v1f	Zdhhc20		
208	Rab7	Timm13	kg:uc009iz e.1		Mt1	Eif2b1		
209	Pldc2	Krt20	Calm3		Il4ra	Exoc4		
210	Aldh1a1	Itga3	Dhrs1		Cndp2	Wipf1		
211	Bnc2	Pfkl	Cfl1		Aprt	Impa1		

10

20

30

40

212	Slc4a4	Agpat6	Glipr2		Preb	Tmem119		
213	Tbx18	Mrpl11	Slc25a37		Ap3d1	Pml		
214	Zbtb16	Ramp1	Atox1		Mcm6	Ubb		
215	Arid4b	Hmga1	BC057079		Ubr4	Zmat3		
216	Enpp2	Gpx2	Pla2g16		Pvrl2	Slc30a9		
217	Ptplad2	0610012G03 Rik	Rnf144b		Snrpg	Lat		
218	Akr1b3	9130017N09 Rik	Stk16		Cycs	Tgfb2		
219	Gm6644	Cygb	Rsad2		Efemp2	Ube2o		
220	Arf5	Tmprss4	Paip2		Cct4	Igfbp5		
221	Chi3l1	Paox	Capzb		Gm20605	Tspan5		
222	Gpr116	Endod1	Ppp1r12c		Smad3	Fmn1		
223	Cd82	Cndp2	4930412F 15Rik		Card10	Fnbp4		
224	Srrm1	Suv39h1	Ninj1		Krt7	Extl3		
225	Fmo2	Cog4	2510009E 07Rik		Cct2	Adcy7		
226	Tgfb1i1	Trim27	kg:uc007v sr.1		Coro1c	Enpp4		
227	Qrich1	Cyhr1	Pygb		Ltbr	Sep15		
228	Nfia	Trmt1	Tlk1		Ric8	H2-Ab1		
229	Pmp22	Zfyve19	Myct1		Ndufs6	Bnip3l		
230	Cdh11	Esrp1	Rnasek		Fibp	Slc11a2		
231	Arid5b	kg:uc008oow .1	Ctsd		Pold4	Stom		
232	Rbm3	Dync1h1	0610010K 14Rik		Rpl34	Mfhas1		
233	Prelp	Tab1	Bcas3		Rpl34- ps1	Mettl1		
234	kg:uc007qse.1	Pla2g6	Atpif1		Clic1	Rnf10		
235	Ddx3x	Timp1	Serf2		Eri3	kg:uc009 cfd.1		
236	Sulf1	Eif3f	Becn1		Ets2	Klf4		
237	Spnb2	Abhd11	Tspan9		Unc13a	Psme4		
238	Tspan31	Pmm2	Acer2		Usmg5	Sema4a		
239	Prr13	Tyrobp	Vdac3		Sh3pxd 2b	Ftl2		
240	Ppp1cb	Farsb	kg:uc008k bg.1		Wdr6	Atad1		
241	Fbln1	Plod3	Oaz2		Las1l	Tspan31		
242	Gm6548	Abtb1	Serpine2		Polr2f	Srrm2		
243	Uap1	Brf1	Ccdc90a		Vamp5	Rab5c		
244	Mpdz	Tnk2	Ndufa1		Endod1	Capza1		
245	Sat1	Rfc2	Tssc1		Snrpd2	H2-Aa		
246	Stim1	Stxbp2	Mboat7		Tpi1	Fhl1		

10

20

30

40

247	Mll3	Pdlim7	Cd44		Wwp2	Cryab		
248	Slurp1	A430105119Rik	Cxx1c		Dalrd3	Arid4b		
249	Cd81	Vill	Ecm1		Iqgap1	Gart		
250	Emp2	Bmp1	Mff		Ahsa1	1110004 F10Rik		
251	Trpm7	Mpzl1	Ptpn12		Trim27	Rnf11		
252	Crym	Thy1	Mgmt		Serpinf1	Zc3hav1		
253	Enpp4	Stab1	Cox4i1		D33004 1H03Rik	kg:uc008 btl.1		10
254	Raly	Aldh16a1	Tollip		Ppp2r5d	Rnf34		
255	Celf2	Eif4ebp3	Cds2		Minos1	Dmkn		
256	Ap3s1	Itpril2	Ybx1		Tsta3	Btg1		
257	C1s	Mrpl52	Gypc		Prpsap1	Syt11		
258	Frmd4b	2310002L13Rik	Dgkd		Sphk1	Mtdh		
259	Nr4a1	Mcm6	Pecam1		Ldha	Med21		20
260	Acin1	Kcnk1	Ftl2		Abca3	Rnf2		
261	Plod2	Pmf1	Nt5c3		B4galt3	Tcf12		
262	Id1	Cuta	1700037H 04Rik		Porcn	Tacstd2		
263	Creg1	Nt5dc2	Cd151		Tmc4	Madd		
264	Zfp318	Rmnd5b	Lpin2		Serinc2	D16Erd4 72e		
265	Tmem140	Araf	6430548 M08Rik		Akr1b8	Pias1		
266	Mras	Wwp2	Pon2		Nudt4	Taok2		
267	Vwa5a	Lamb1	Ndufa3		Atp5l	Pold1		30
268	Esyt3	Kcne3	6330578E 17Rik		Psmc3	Cep110		
269	Hexb	Uqcrq	Mfap3l		Hint1	A930013 F10Rik		
270	Nckap1	Gps1	Mink1		Rpl41	Tcof1		
271	Nipal3	Rexo4	Ston2		Xpnpep1	kg:uc009 bpd.1		
272	Ubxn4	Coro1c	Rac2		Nav1	kg:uc009 bpr.2		
273	Zfp36	Hras1	Fyn		Parva	Capza2		
274	Hnrnpl	Spint1	Serinc3		Immt	Ptp4a2		40
275	C1ra	Cblc	Maged2		Pafah1b3	Fth1		
276	Nnmt	Fhod1	Ap2m1		Chid1	Mepce		
277	Mut	Atp13a1	Pacsin2		Aldh1l1	Rexo1		
278	kg:uc008jup.1	Man2c1	Ftl1		Rpl31	Prg4		
279	Pnrc1	Vsig2	Adipor1		Wbp1	Ctla2a		
280	Usp8	Bpgm	kg:uc009q		Zfp622	Smarca5		

			do.1					
281	Pgcp	Bap1	Snap23		270006 OE02Rik	Icam2		
282	Junb	Smpd2	Tagln2		Hspa9	Pbx1		
283	C1rl	Ubqln4	Cox6c		Tceb2	Gnl3l		
284	Slc6a6	Sirt7	Creg1		Rpl36a	Slc2a3		
285	kg:uc008znh.1	Krt23	Bsg		Pgs1	Nnmt		
286	Aqp1	D8ErtD738e	Cmtm6		Mpnd	Rb1cc1		
287	Myh10	Mapk13	Cntd1		Cdc42	Bpgm		
288	Slc43a3	kg:uc008bcc. 1	Plekho2		Dhrs3	Lcp1		
289	Spint2	Polr2g	Arrb2		Hexa	Sipa1l1		
290	Hnrnp1	Ndufs2	Pard3b		Cpsf1	Lilrb4		
291	Arhgap28	Dad1	Mlec		Mea1	Ankrd44		
292	Cfh	Wnt7b	Taf10		Polr2e	Specc1		
293	Brd4	Fam20c	Gabarapl2		Ddb1	Rif1		
294	Fndc1	Cxxc5	Bag1		Ptcd1			
295	Star	Polr2f	Galnt2		Atp5f1			
296	Nfkbiz	Ltf	Hk1		Sec61b			
297	Arsb	2210407C18R ik	Fbxo9		Psmc5			
298	Rnd3	Cdipt	kg:uc009iz d.1		Fam89b			
299	Stard5	Glrx5	Pnpo		Lama3			
300	Thbs1	Gemin7	Fam46c		Tomm6			
301	kg:uc008wkn.1	Man1b1	Pkm		Mrpl28			
302	Slc26a3	Heatr7a	Ap1b1		Syng1			
303	Phip	Arid5a	Rap1b		Ngfrap1			
304	Usp2	Sumo3	Itgb1		Kcmf1			
305	Golgb1	Srm	St7		Tubb4b			
306	Rock1	Plscr3	Smad1		Anapc1 1			
307	Rgma	2210010C17R ik	Rabgap1l		Vcp			
308	Actg1	Fam102a	Tmbim4		Arpp19			
309	BC013529	Dlst	H3f3a		Pglyrp1			
310	kg:uc007zwh.1	Vps37c	Frmd8		Rrp1			
311	3110062M04Ri k	Ngfrap1	Nlr1		Gkn3			
312	Cast	Pold4	Oaz1		Atpif1			
313	Mob3c	Grc10	Fam125b		Prickle3			
314	Slc16a1	Wnt7a	Hexa		Map4k4			
315	Fam117a	2010111I01Ri k	Tspo		Arrdc1			
316	Pdia3	Pxdn	Dcaf12		C1qtnf6			
317	Trim8	Coasy	Nav1		Hras1			

10

20

30

40

318	kg:uc009mng.1	Dctn1	Cd24a		Lamb1			
319	eg:245190:chr 7:m	Ncor2	Uqcr11		Eif3d			
320	Sbsn	Postn	Wipf1		Snrpa			
321	Serpinb6b	Col4a2	F10		Tbrg1			
322	Daglb	Cib1	Erlec1		Nxf1			
323	Smarca2	Tbc1d13	Map2k3		Pdim7			
324	Mef2c	Ccnl2	Stk24		Add1			
325	Prrc2c	Dcakd	Ldlrap1		Pfdn5			
326	BC005537	Cdc34	Ehd4		Stk16			
327	Hsp90ab1	Atp6v0b	Atp6v1f		Gm178 21			
328	Snrnp70	Abhd12	Gnas		Csnk1e			
329	Ppl	Flot2	Arhgap18		Rrp7a			
330	Serpinh1	Sla2	Arhgap10		Psm6			
331	Sorbs3	Rhbdf1	Pitpm1		Snhg1			
332	Golga4	Cdh17	S100a1		Ssr4			
333	Acdb3	Psm5	Bin1		Ergic3			
334	Hook3	Serf1	Ttyh3		Rnaseh 2a			
335	Map3k3	Slc15a3	Selp		kg:uc00 9cut.1			
336	Rhou	Sftpd	Trappc9		Bgn			
337	Smc2	Pop5	Aes		Gm550 6			
338	C1d	Nudc	Taok3		Uqcrq			
339	kg:uc008dzh.1	Sh2d5	Zfand3		Tmem1 67			
340	Psm7	kg:uc007fw. 1	Stim1		Nasp			
341	Dab2	Mrpl37	Rnf114		Mif			
342	Cep164	Rin1	Sep15		Acaa2			
343	Crim1	Podxl	kg:uc012h dk.1		Fam162 a			
344	Rtf1	Paqr5	Lgals9		Eif4ebp 3			
345	Fxyd1	Sepx1	Cox6b1		Nhp2l1			
346	H2-D1	Agr2	Riok3		Preid1			
347	Zfp704	Bax	Slc38a10		Gss			
348	Mtap1a	Rxb	Rtn3		Lonp1			
349	Ascc3	Tes	B3gat2		Srsf2			
350	Med13l	Hdac6	Ccndbp1		Igsf8			
351	Jup	1110008F13R ik	Rsu1		Ndufa7			
352	Nid2	Mpnd	kg:uc007u pr.1		Neat1			
353	Kdr	Gmppa	Itm2b		S100a1			

10

20

30

40

					3			
354	Ifnar2	Gramd1a	St3gal1		Apoa1b p			
355	5430435G22Rik	Wars	Sec61g		Fam40a			
356	Col4a6	Mtap	Ptpn1		Rps25			
357	Ii17re	C1qtnf5	kg:uc012b hf.1		Eno1			
358	Gbp3	Mrpl28	B2m		Cldn2			
359	Slc39a8	Mfrp	Rasgrp3		Capn2			
360	Cfl2	Kars	Memo1		Glo1			
361	Slc38a1	Lbp	Slc39a4		Atp5c1			
362	Cuedc1	Plxnb1	Sdcbp		Rab2a			
363	Fgf1	2700081015 Rik	Tspan14		Rab25			
364	Gas6	Mrps24	Ubl7		Ncor2			
365	Cldn25	Klc4	Nras		Lgi4			
366	Sorbs1	Dctn3	Ssx2ip		Ier3			
367	Hspa12a	Kcnq1	kg:uc007z bz.1		Tmem2 23			
368	kg:uc007zts.1	Smurf1	Wbp1		Slc9a3r 2			
369	Slc1a5	Fam162a	1110003E 01Rik		Atp13a 1			
370	Nr3c1	Hip1r	Clip2		Rpn2			
371	Adamts5	kg:uc007hydr. 2	Gapdh		Acp5			
372	Gpcpd1	Gys1	Gm6578		Cct5			
373	Dpysl3	Sac3d1	Actn1		Sdf4			
374	Colec12	Ndufs6	St3gal2		Mprrip			
375	Pdcd6ip	Rgl2	3110001D 03Rik		Pmm2			
376	Dst	Atp5g1	Ctsz		Snx22			
377	Ifit3	Itgb4	kg:uc007v dl.1		Arl2			
378	Chst4	Sars	Fam73a		111000 8F13Rik			
379	Xist	2310003F16R ik	Vcl		Polr1d			
380	Ifi2712a	Nhp2l1	Lims1		Dpm2			
381	Fkbp5	D19Wsu162e	Lars2		Cela1			
382	Agap1	Cd320	Birc2		231001 6M24Rik			
383	Ankrd11	Pigq	Lamp2		Cep250			
384	kg:uc007qca.1	Chd3	Rasl10a		Mybbp 1a			
385	Syt11	Zdhhc4	Mif		Polr2g			
386	Ptrf	Eif3l	Rab10		Bag6			

10

20

30

40

387	Krcc1	St8sia3	Pabpc1		Cpxm1			
388	Zfp488	Rcan3	Wwp2		Eif3m			
389	Lama4	Meg3	Nqo2		Prr24			
390	Aebp1	Nudt4	kg:uc007fte.1		Sra1			
391	Fam134b	Gss	Plxna4		Scara3			
392	Tppp3	Pih1d1	Gm1821		Reg1			
393	Maf	Limd2	Gadd45a		Gas5			
394	Peli1	Ap1s2	Slc25a39		Hnrnpab			
395	Zfp353	BC056474	kg:uc009pet.1		Mcpt2			
396	Cdon	Mms19	Ubb		Tgfbi			
397	Sarnp	Clip2	Ppp1r2		Capns1			
398	Atxn7l3b	2310016M24Rik	Rab27b		Fdx1l			
399	Pef1	Itpa	Cap1		S100a16			
400	App	Slc25a10	Jarid2		Nap1l1			
401	Mtdh	Fibp	Rnf11		Swi5			
402	Lrrc20	Higd2a	Tmem50b		Rpl38			
403	Btbd2	Snrpd2	Myh9		Dctn2			
404	Gnb2	Eri3	Tmem128		Pdlim1			
405	Pigt	Nbeal2	Stradb		Gemin7			
406	Efna5	Trim28	Cela1		Pnpla6			
407	Tm4sf1	S100a4	Ndrp2		Nono			
408	Coq10b	Ivns1abp	Dhrs3		Sla2			
409	Eif2s3x	Ppp1r18	Hipk1		Idh3b			
410	Cmah	Efemp2	Atg9a		Ppp2r4			
411	Sf3b1	Med22			Map2k2			
412	Eea1	Nelf			Ndufb10			
413	Slpi	2810428l15Rik			Atp5d			
414	Tmod3	D2Wsu81e			Arfgap1			
415	Ppp3ca	Trappc6a			Tmbim1			
416	Tceal8	Trappc2l			Ergic1			
417	Anp32a	Antxr2			Pdgfra			
418	Actb	Rab11fip5			Ppp2ca			
419	Ddx5	Ldhd			Hk1			
420	Cobll1	Npnt			Ltbp2			
421	Cish	Acrbp			Trim35			
422	Nod1	Pafah1b2			Gtf2i			
423	Psd	Angptl2			C1qb			
424	Gm10052	Fzr1			Ankhd1			

10

20

30

40

425	Lims2	Aaas			Podxl			
426	Stra6	Eif2b2			Rps21			
427	kg:uc007bgn.1	1190003J15Ri k			Huwe1			
428	Plxdc1	5730403B10R ik			Pomp			
429	Nfe2l1	Adamts13			Dpp3			
430	Smpd3	Eif3b			Fkbp8			
431	Bcl10	Znrf1			Itga5			
432	Ilf3	Pkp3			Hes6			10
433	Fam76a	Lemd2			Mrpl11			
434	Cybrd1	Rab34			Poldip3			
435	Gm3893	Mpv17l2			Scd2			
436	Siae	Cdkn2b			Tmem5 5b			
437	Ssh2	Snrpe			Ndufa1 3			
438	Nfic	Gm14005			Dcakd			
439	Btf3	Prdx4			Ubqln1			20
440	Sp100	Xab2			Gpx4			
441	Ndn	Dpp3			Cyb561			
442	Matr3	Tyms			Gmppa			
443	Gm13251	Leprotl1			Ncaph2			
444	Arhgap5	Uqcr10			Pdha1			
445	Zbtb4	Cdk5rap3			Ndufs4			
446	Pgrmc1	Gorasp2			Fcer1g			
447	4930402H24Ri k	Wbp7			Myof			30
448	Bptf	Sort1			Ppib			
449	Dusp3	Ddx41			Mrpl52			
450	Pla2g4a	Cct3			Tes			
451	Brp44l	Mrps33			Emp3			
452	Oxct1	Frmf8			Ndufa1 1			
453	Stk40	1110049F12R ik			Tor1aip 2			
454	Ddr1	Fscn1			Anp32b			
455	Ifi205	Ndufa2			Tnk2			
456	Col3a1	Dpcd			Mcpt1			40
457	Nipbl	Unc13a			Ssr2			
458	Plk1s1	Eif1ad			Psmb3			
459	Bdp1	Sgta			270008 1015Ri k			
460	Smc3	Chaf1a			Pcbd1			
461	Ifitm3	Plxna1			Eif1ax			

462	Ndst1	Hspa9			Pmm1			
463	Zbed6	1110014N23 Rik			Ptprk			
464	Rest	Cd99I2			Hadha			
465	kg:uc007vnc.1	Snrpa			Calu			
466	Ccdc88a	Mcm7			Fam73a			
467	Stat3	Tars2			Atp5e			
468	Arf2	Gon4l			Hsd17b 10			
469	Trib1	Stk38			Rbm39			10
470	Gcap14	C1qtnf1			Egfl7			
471	Tbc1d15	Tbrg4			Psmc1			
472	Igf1r	Tmem132a			Perp			
473	Ppbbp	Cox6c			Lman2			
474	kg:uc008tky.1	Alcam			Galnt1			
475	Rab1b	Phka2			Rbx1			
476	Krt14	Trim3			Lemd2			
477	Med21	Ppp1r14b			Zglp1			
478	Gja1	Gpaa1			Ing4			20
479	Klf10	Ctps2			kg:uc00 8oow.1			
480	Id2	Ptpn23			150001 2F01Rik			
481	Mfap1a	Endog			Cox4i1			
482	Ogn	Mrto4			kg:uc00 8bcq.1			
483	Gpc4	Mrps6			Ubap2l			
484	Bst2	Pvr			Pafah1b 2			
485	Dtx2	Phgdh			Mrpl13			30
486	Wac	Itpr3			Nucb1			
487	Kpna3	Polr2e			Fbn1			
488	Kcnab1	Sec16a			Adrm1			
489	Orai3	Mdp1			Itgb4			
490	Gcsh	Fbf1			Ctss			
491	Wdr92	Mcpt8			Plbd2			
492	Olf1r613	Rps6ka4			Ptpmt1			
493	Tcf7l1	Mical1			Sap30l			
494	Tgfb2	Mrpl34			Ppp1r1 2c			40
495	Il16	Agpat3			Sgta			
496	Manf	2310044H10 Rik			Acrbp			
497	Mgst1	Myo9b			Higd2a			
498	kg:uc008tkz.1	Ndufb10			Higd1a			
499	Creb3l1	Apex1			Tmem2			

				08			
500	Txndc5	Elk3		Cdh1			
501	Klf2	Cpsf3l		Ube2d2 a			
502	Slu7	Tnk1		Suv39h 1			
503	Ttc28	Pmvk		Rabac1			
504	1110002B05Ri k	Ppp1r16a		Anxa5			
505	Zcchc11	Arhgef5		Ubxn6			
506	Ptp4a2	Lonp1		Tpm1			
507	Pbx1	Pla2g7		Hmga2			
508	Clcn3	Pip5k1c		Cnbp			
509	Tmco7	Inf2		Rpl21			
510	Lrrc58	Pgk1		Ndufb5			
511	Eif3a	Parp6		Sec31a			
512	Cldn10	Urm1		Znhit1			
513	H2-Q6	Mad2l2		Cyb5b			
514	Ccdc80	Ing4		Sfn			
515	kg:uc009iin.1	Rbck1		Ccdc12			
516	Rab5c	Cant1		Elov1			
517	Tsc22d3	Sgpl1		Psmb5			
518	Tm4sf5	Ehbp1l1		Slc25a1 1			
519	Hmgb1	Runx1		Psm2			
520	Sec62	Slc27a4		Nsun2			
521	Maoa	Ndufa7		Slc50a1			
522	Clec1b	Mcm3ap		Eme1			
523	Mphosph8	1110008P14R ik		Bnip2			
524	Oat	Rassf7		Pxdn			
525	Ncor1	Ptpmt1		Mad2l2			
526	Cyb5	Arfgap1		Pdcd6			
527	Trafd1	Sec61a1		201010 7E04Rik			
528	Rpp25	Rps6ka1		Abhd11			
529	kg:uc007ded.1	Ints1		Carkd			
530	2610101N10Ri k	Tpcn1		Polr2l			
531	Il6st	Iffo2		Ppdpf			
532	Evpl	Trim44		Cib1			
533	Psm2	kg:uc012ctw. 1		Dgcr2			
534	Dync1i2	Golga2		Timm50			
535	Lars2	Msto1		Mrps24			
536	Pdia4	Ppp6r3		Abhd12			

10

20

30

40

537	Cd55	Trmt2a			Brf1			
538	Amfr	Appl2			Man1b1			
539	Zcchc3	Sparcl1			kg:uc012cgd.1			
540	Herpud2	Rapgef1			Gpaa1			
541	Txnrd1	Zfp1			Fmn13			
542	Vat1	Psmc4			Mapk3			
543	Diap1	Mosc2			C1qc			
544	Tmed2	Fam101b			Pgls			
545	Arf3	1500010J02Rik			Cp			
546	Arap2	Ccdc124			Serhl			
547	St3gal1	Ptges			2610203C20Rik			
548	Man1a	Fam189b			Hsbp1			
549	Rgs10	Th1l			Tmem214			
550	Tmsb4x	Kctd2			Akt1			
551	Uba7	Olfr1372-ps1			kg:uc007pfe.1			
552	C4b	Hexa			Tmed10			
553	Tmem98	Anapc5			Ttll3			
554	Lpar2	Serpina3n			2200002D01Rik			
555	Gabarapl1	1810046J19Rik			Tnfrsf23			
556	Cmtm7	Tmem167			Sgsm3			
557	Spon2	Gm11428			Atp9a			
558	Smarca5	Gcn1l1			Lcn2			
559	Mxd4	Kansl3			Pdrg1			
560	Smc4	Fasn			Tspan9			
561	Thsd4	Slc50a1			Nrd1			
562	Gsr	Smad3			Rin1			
563	Ptprd	Trip6			Ndufv1			
564	Clip1	Atp6v1e1			Naa10			
565	Cln8	Chchd5			Wnk1			
566	Rbm27	Adssl1			Heatr7a			
567	Zmat1	Nes			Slc4a2			
568	Smc6	Ap1b1			Ggct			
569	B2m	Fcgrt			5730403B10Rik			
570	Irf2bp2	Ltbp3			Sh3glb2			
571	Ppap2a	Csf2rb			Pfkl			
572	Zfhx4	Ssna1			Tspan3			

10

20

30

40

573	Tob2	Mrps16			Gns			
574	Rabgap1l	Cyba			Sdcbp2			
575	Nfkb2	Cyth2			C13007 4G19Ri k			
576	Nfyc	Igf2			Cotl1			
577	Ube2d1	Pisd-ps1			Tubb5			
578	Creb5	Atp13a2			Sec11c			
579	Opa3	Mlph			Pigq			
580	Csnk1a1	Cyp4f16			Zc3h15			
581	Fam84b	2010107E04R ik			Lsmd1			
582	Ddr2	Gas5			Ppa1			
583	Usp54	Eif3k			Chmp4 b			
584	Akt2	Fam149a			Sepn1			
585	Strn3	Mif			Angptl2			
586	Hnrnrm	B230312A22 Rik			Itpril2			
587	eg:497210:chr 14:m	Ppp1r12c			Ddx1			
588	Tpt1	Tfip11			Hbxip			
589	Naa25	Tex10			Cdk2ap 1			
590	Eef1a1	Slc16a3			Ctla			
591	Parp4	Stk16			Cpsf3l			
592	Msn	Epn1			ApoE			
593	Zbtb20	Noc4l			Ift46			
594	Fermt2	Rcc2			Sae1			
595	Bod1l	Rgs12			Gpi1			
596	Sltm	Shkbp1			Gorasp 2			
597	Dapk1	Got2			150003 2L24Rik			
598	Hnrnpr	Plek2			Nsmce4 a			
599	Baz2a	Lilrb3			Dlst			
600	Rnf167	Ndufb5			Bap1			
601	Mapk1	Tesk1			Pitpnb			
602	eg:320169:chr 9:p	Rab24			Meg3			
603	4930523C07Ri k	Atp5j2			Cyth2			
604	Nf1	Commd9			Atp5o			
605	Fam53b	Rtkn			Gon4l			
606	Faim2	Prpf19			Sox11			
607	Tgm2	6720401G13 Rik			Cxxc5			

10

20

30

40

608	Calm2	Ppa1			Avil			
609	Al848100	Pgp			Alcam			
610	Slc10a3	Hps1			Eif3f			
611	Ogdh	Puf60			Cygb			
612	Arl3	Mdm2			Eif1ad			
613	Timp2	kg:uc012cgd. 1			Polr3h			
614	Atxn2	kg:uc009uim. 1			Araf			
615	Mll1	Pyy			Gkn1			
616	Ces2g	Zfp358			Rhog			
617	Mat2a	Timm8b			Mtap			
618	Esf1	Ddx39			Eif4ebp 1			
619	Hsp90aa1	Pgm2			Akr1a1			
620	Zfp385a	kg:uc008gbp. 1			Trip6			
621	Zfp672	Sipa1			Prdx6			
622	Csda	Mgat1			241001 5M20Ri k			
623	Pf4	Tmem208			Rps6			
624	Arsa	Ruvbl2			Rps23			
625	F11r	8430410A17 Rik			Stxbp2			
626	C4a	Bad			Rps19			
627	Kpna1	Pfdn5			Ykt6			
628	Rbbp8	Eme1			Atp5g2			
629	Oxnad1	kg:uc009mzj. 1			Serpinb 1a			
630	Rb1cc1	Igf1			Col7a1			
631	Setd2	Prkag1			Mrps6			
632	Kif1b	kg:uc009sua. 1			Lgals9			
633	2510002D24Ri k	Uap111			Rcn3			
634	Cep57	Trappc4			Trim44			
635	Chd2	Bola2			Surf2			
636	Serinc5	Usp5			Rps29			
637	Marcksl1	Ear2			Cdipt			
638	Shfm1	Cars			Lmf2			
639	Bbs4	1810027O10 Rik			Psenen			
640	Impad1	Amdhd2			Ltf			
641	Tbcel	Phb			Mpzl1			
642	Kdelr1	Kcmf1			Psm6			
643	Ninl	Lsmd1			Ctnn			

10

20

30

40

644	Sytl1	Sec11c			Tmc6			
645	Tpm3	Pcbp4			250000 3M10Ri k			
646	Rbbp6	Mepce			Atp6v0 a1			
647	Lman1	Tpd52l2			Med8			
648	Ankrd17	Trf			Prrx2			
649	Naga	Hsd17b11			Atp5b			
650	Rbpms	Pilra			Smurf1			
651	Magt1	Atn1			Carhsp1			
652	Tfdp2	Pgf			Tpcn1			
653	Gem	Nxn			Ndufb9			
654	Pde4dip	Inpp5k			Pih1d1			
655	Mrgprf	Actr1a			Hnrnpa 0			
656	kg:uc008ajk.1	Cd68			Fn1			
657	Itch	Eef1g			281042 8l15Rik			
658	Elf1	Fbn1			061001 2G03Ri k			
659	Meis2	Hint1			Ube2i			
660	Arid1a	March5			Anxa3			
661	Serping1	Usp48			Msto1			
662	Slc27a3	Hnf1b			Eng			
663	Thoc2	Gga3			091000 1L09Rik			
664	Gsta3	Drosha			Rpl10			
665	Hnrnp2	Ubp1			kg:uc00 7xxx.1			
666	Socs3	Pkn3			Mosc2			
667	Armcx3	Tmem192			Vps37c			
668	Siah1a	Prpf31			Sgpl1			
669	kg:uc009ize.1	Hspd1			Fam166 a			
670	Irs2	Otub1			Polr2b			
671	Mettl7a1	Mrpl20			Fam101 b			
672	Ppfibp2	Tead2			Nupr1			
673	Blvrb	Phpt1			Lsm4			
674	Yipf5	Neu1			Rpl36			
675	Plat	Pygo2			061000 7C21Rik			
676	Gm6578	Myeov2			Psmc2			
677	Mat2b	Cdk5			Supt6h			
678	Tmpo	Ndor1			Rps13			

10

20

30

40

679	Metap2	Rbp4			543043 7P03Rik			
680	Zfp277	Psat1			Dsp			
681	Wls	Mrpl41			Ddx56			
682	Mesdc1	Snrpg			Tsc2			
683	kg:uc009acs.1	Acot7			Trmt2a			
684	Col1a2	Vars			Vdac2			
685	Csf1	Nono			Cant1			
686	Sulf2	Gtf2i			Eif4h			
687	lfrd1	Traf3			Puf60			
688	Wrnip1	Ppp2r4			A43010 5I19Rik			
689	Flii	Actg2			Cacnb3			
690	2810474O19Ri k	Pi4k2a			Prdx4			
691	Sep15	Slc35b2			March5			
692	2310030G06Ri k	Ubqln1			Ccar1			
693	Cmtm3	Ppox			Npepl1			
694	Myliip	Bud31			Fermt1			
695	Slc8a1	Man2b1			Use1			
696	Btbd7	Nat15			Axl			
697	Hdac5	Spon1			Slc39a4			
698	Zfand6	Cyc1			111000 8P14Rik			
699	Tapbp	Mpeg1			Sema4g			
700	Keap1	Nsun2			Timm8 b			
701	Ube2n	Rab4a			Krt23			
702	Ssr3	Mtmr11			Rpl28			
703	H3f3a	BC004004			Lgals3b p			
704	Myst4	B4galnt1			Hdgf			
705	G3bp1	Atp5k			111000 5A03Rik			
706	Ugdh	Lin37			Impdh1			
707	Lamp2	D330041H03 Rik			Mtmr1 1			
708	Zrsr1	Tbc1d17			Msln			
709	Pim1	March6			Zdhhc3			
710	Gm9199	2410015M20 Rik			Znrf1			
711	Supt16h	1810013D10 Rik			Aldh16 a1			
712	Ano6	Eif2s1			Bloc1s1			
713	Soat1	Traf7			Prkag1			
714	Eci1	Rpl36al			Plxnb1			

10

20

30

40

715	Plice1	Psenen			Crat			
716	Atg3	Aip			Phpt1			
717	Bnc1	Cmas			593043 4B04Rik			
718	Pik3c2a	Rpia			Kpnb1			
719	Pqlc3	Ncbp1			Nme2			
720	Thrap3	Mea1			E43002 5E21Rik			
721	Irak4	Timm50			Smyd2			
722	Kdm6b	Ear12			Cyhr1			
723	Apol9a	Fkbp1a			Mvp			
724	Wnt4	Commd4			Rps27l			
725	1500003003Ri k	Col5a3			Rbp4			
726	Phf3	Fblim1			Cars			
727	1110004F10Ri k	Cwh43			kg:uc01 2ctw.1			
728	Kansl1	Arl2bp			Ssr1			
729	Fth1	Mrpl46			Ssu72			
730	Tmem50a	Tcn2			Usp48			
731	Utp20	Add2			Atp5k			
732	Smad4	Specc1l			Lrrk1			
733	Stmn2	Ppcs			BC0564 74			
734	Gstm1	Vrk3			Epn1			
735	Senp6	Trim25			Trappc1			
736	Gda	Nfatc1			Clk2			
737	Nucks1	Rap1gap			Sugt1			
738	Ints10	Hsd17b12			Nenf			
739	Syne1	Epas1			kg:uc00 9cuu.1			
740	Itga6	Ddx1			Ubap2			
741	Acad9	Prdx6			Rps20			
742	Maged1	Mmp24			Atp5h			
743	Spen	Ndufb9			943000 8C03Rik			
744	Chd1	Phf23			Kars			
745	Taf3	Rpa2			Mrpl37			
746	Ptgs1	5031439G07 Rik			Aimp1			
747	Sparc	Rrp7a			Trmt1			
748	R74862	Arfip2			Hspa4			
749	B230120H23Ri k	Efna1			Cd164			
750	Tmem234	Agps			943002 3L20Rik			
751	Ryk	Sephs1			Rnf4			

10

20

30

40

752	Dlgap4	Apoc2			H1f0			
753	Atp1b1	Mrps27			C1qtnf1			
754	Parp14	Snn			Srd5a1			
755	Tgfbr2	Serinc3			150001 OJ02Rik			
756	Ccdc90a	Pdcd5			Rpl35a			
757	Ncoa1	AA986860			Cand2			
758	Pppde1	Pitpna			C63000 4H02Ri k			
759	Luc7l3	Vac14			Acsbg1			
760	Prg4	2810025M15 Rik			Derl1			
761	Rab11fip1	Def8			Cbx5			
762	Plk2	Hilpda			Tmem6 3a			
763	Ifi35	Eif6			Hgfac			
764	Pdap1	Brd7			Stx5a			
765	Cd248	Fes			Bri3			
766	Sesn1	Sbf1			Tomm2 0			
767	Ecd	Ak2			Fam20c			
768	Ap1s3	1810035L17R ik			Cox6c			
769	H2-K1	Lime1			Tm2d2			
770	Spag9	Hspe1			Plekhb2			
771	Tshz1	Csrp2bp			Ramp1			
772	Dennd5a	Uba5			241000 1C21Rik			
773	Stag1	Gsta4			Tardbp			
774	Gpx8	2900092E17R ik			Pebp1			
775	Sod3				kg:uc00 8gbp.1			
776	BC005561				Eif3b			
777	kg:uc009vev.1				Ccna2			
778	Ywhaz				Ptges			
779	Ganab				kg:uc00 7hyr.2			
780	Rras2				Wbp5			
781	Dusp14				Chchd2			
782	kg:uc012hdk.1				Fdft1			
783	Nr1d1				Srm			
784	Wwc2				Gtf3a			
785	Ubxn2a				D0H4S1 14			
786	Iqsec1				181000 9A15Rik			

10

20

30

40

787	kg:uc007vsr.1				Rps27			
788	Cfl1				Tmem1 76b			
789	Csrp1				Ndufc1			
790	Smchd1				Lasp1			
791	Myl12a				Fam108 a			
792	Ubqln2				Mapk8i p3			
793	Tmcc3				Copa			
794	Kdm5a				Serpina 3n			
795	Rbm25				Rps17			
796	Wdr26				Dnpep			
797	Vim				Lbp			
798	Arpc2				Krt19			
799	Calm1				Ei24			
800	Dnaja2				Ap1b1			
801	Shc1				Mogs			
802	Vps13a				Uba1			
803	Klf7				Postn			
804	1810074P20Ri k				Phf23			
805	BC003331				Paox			
806	ltpr2				Nploc4			
807	Jmjd1c				Ndufv2			
808	Pcdhgb5				Actr1a			
809	Tubb2a				Mxd3			
810	Ehd2				Pfdn1			
811	lft74				Ide			
812	Per1				Foxp4			
813	Pitpnm2				181001 3D10Ri k			
814	Gstm4				231000 7B03Rik			
815	Dnmt1				Xab2			
816	Tmco1				Agr2			
817	Lass4				Dctn3			
818	Ptprf				Urm1			
819	Sirt2				H2-Ke2			
820	Gfm2				Spint1			
821	Taf7				Slc38a2			
822	Spop				Ube2z			
823	Zzef1				Ctrb1			

10

20

30

40

824	Ccdc34				Fam195 b			
825	Zfp281				Suclg1			
826	Tuba1a				Ube2l3			
827	Ccdc109b				Rpn1			
828	Cdk13				Mrps7			
829	Dhx15				Tsg101			
830	Src				Drosha			
831	Braf				Arfp2			
832	Mapre2				Mrto4			
833	Anxa7				Grlf1			
834	Sept9				Sort1			
835	Alox12				Oaf			
836	Pknox1				Ints1			
837	2610034B18Ri k				Slc44a2			
838	Topors				Dph3			
839	Phf21a				Gramd1 a			
840	Qser1				Fkbp9			
841	Tirap				Fam149 a			
842	Fas				181003 5L17Rik			
843	Lass2				kg:uc00 7fte.1			
844	6330406115Rik				Eif2s1			
845	Parvb				Smpd1			
846	Atp1a1				Eef1b2			
847	Mtmr6				Actr10			
848	Cd109				Rab11fi p5			
849	Dnajc1				Ypel3			
850	Hp1bp3				Flnb			
851	1600029D21Ri k				Tcn2			
852	Ttc38				Crlf1			
853	Mfhas1				Map3k1 5			
854	Filip1l				Cul7			
855	Zfp148				Atp6v1 g1			
856	Nkd1				Ncbp1			
857	Usp16				Atp1b3			
858	Tlr2				Mtif3			
859	Zc3h18				Aldoa			
860	Stk10				Htra1			

10

20

30

40

861	Ltbp4				Rab14			
862	Hdac3				Ppm1a			
863	Efhd2				Ndufb1 1			
864	Prkar2a				Kansl3			
865	Atp6v1a				Rab24			
866	Sf3b4				Bcl2l1			
867	Gprc5b				Lgals1			
868	Clip3				Samm5 0			
869	Mettl2				Mrps33			
870	Secisbp2				Anxa1			
871	Fmod				Chchd1			
872	kg:uc009lxf.1				Mapre1			
873	Elov6				Ctbp2			
874	Bzw1				Rnps1			
875	Etfa				Spg7			
876	Hspa2				Tnfrsf1 2a			
877	kg:uc007won.1				H6pd			
878	Rnf20				Myo7a			
879					Mcm7			
880					Psmc13			
881					Mrpl54			
882					Atp6v0 b			
883					Prdx1			
884					Elof1			
885					Rexo4			
886					Mrps18 a			
887					Dpcc1			
888					D2Wsu 81e			
889					Cd99l2			
890					Synpo			
891					Atp2a2			
892					Cdc5l			
893					Stard7			
894					Atp13a 2			
895					Sdha			
896					Hdac6			
897					Krt20			
898					Ppp6r3			

10

20

30

40

899					170003 7H04Ri k			
900					Napa			
901					Pgp			
902					Cnih			
903					Atg4b			
904					Cox8a			
905					Srp68			
906					St13			
907					Gng12			
908					Cfdp1			
909					Rcc2			
910					Pisd- ps1			
911					Ivns1ab p			
912					Mpv17l 2			
913					Ssna1			
914					Gnl1			
915					Tmem1 11			
916					Hbs1l			
917					Agpat3			
918					Col6a2			
919					March6			
920					Usp39			
921					Rps11			
922					Ahnak			
923					Lcmt1			
924					Ddx41			
925					H2afv			
926					Fau			
927					Tuba1c			

10

20

30

【 0 2 3 5 】

表13および表12に列記された遺伝子名は一般名である。表13または表12に列記された遺伝子のそれぞれに関するNCBI Gene ID番号は、NCBIの"Gene" Database (World Wide Webの<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>で利用可能)を、一般名をクエリーとして用いて検索し、返された最初のヒト (Homo sapiens) 遺伝子を選択することによって得ることができる。他の遺伝子を、UCSCゲノムブラウザ (World Wide Webの<http://genome.ucsc.edu/>で利用可能)をGene Sorter機能を用いて得ることもできる。ある態様において、マーカー遺伝子は、表13および/または表12に列記された遺伝子から選択される。

40

【 0 2 3 6 】

いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、表13で少なくとも1つの型のCTCにおいてアップレギュレートされることが示されているマーカー遺伝子、例えば、マーカー遺伝子1~142から選択される。いくつかの態様において、マーカー遺伝子は、表12で少なくとも1つの型のCTCにおいてアップレギュレートされることが示されているマーカー遺伝子、例

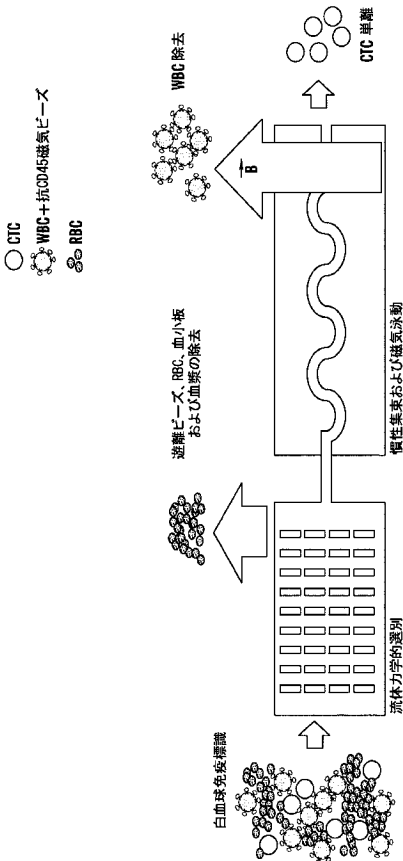
50

例えば、「CTC-c 対 原発性腫瘍でエンリッチされている遺伝子」または「CTC-c 対 WBC」と表示された列の中のマーカー遺伝子から選択される。

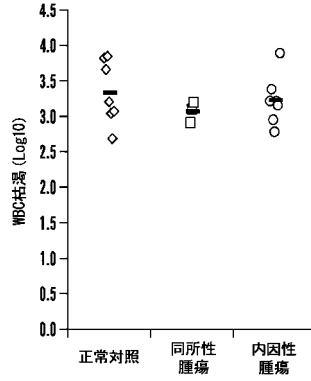
【 0 2 3 7 】

CTCにおいて、表13または表12に列記されたマーカー遺伝子がアップレギュレートされてもよく、例えば、表13または表12に列記されたマーカー遺伝子に関して、細胞または試料における測定されたマーカー遺伝子の発現がそのマーカー遺伝子の発現の参照基準レベルと比較して高度であるならば、その細胞はCTCと同定される、かつ/またはその試料はCTCを含むと同定される。統計学的に有意な変化が認められることが好ましい。しかし、たとえ一群の中の少数の遺伝子が正常と異なっていなくても、その一群の全体的変化が有意な変化、好ましくは統計学的に有意な変化を示すならば、その試料はCTCを含むと同定することができる。表記されたマーカーの考えられる2種またはそれを上回るすべての組み合わせを、本明細書において想定している。

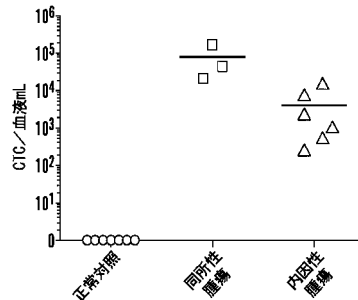
【 図 1 A 】



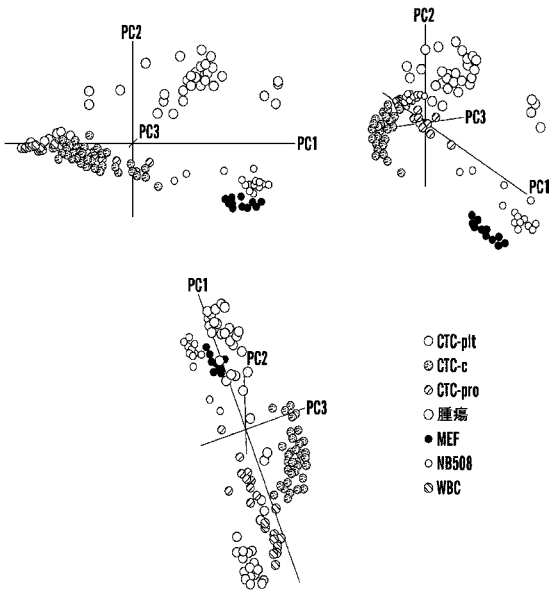
【 図 1 B 】



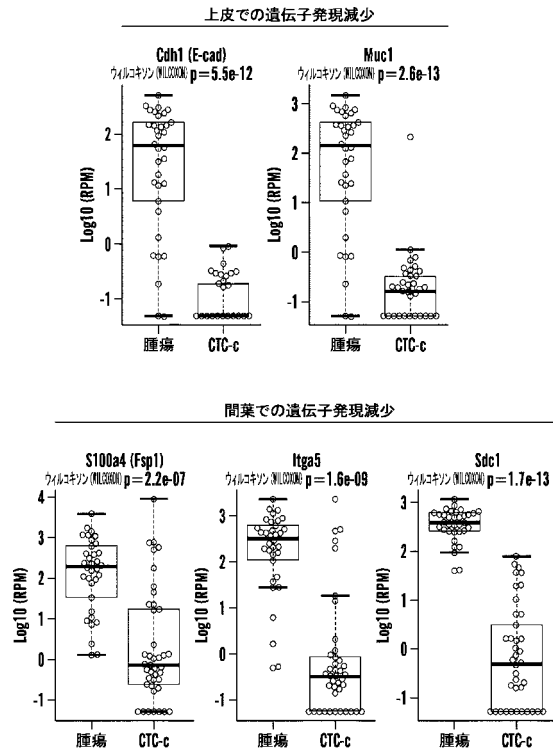
【 図 1 C 】



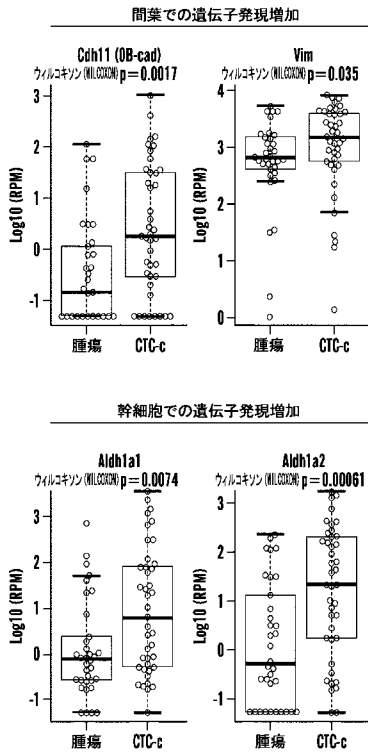
【 図 2 】



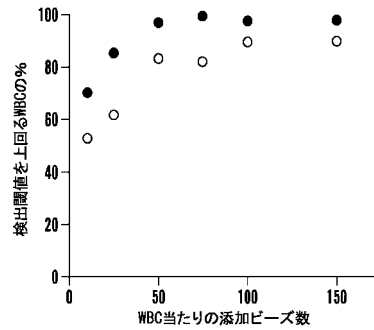
【 図 3 A 】



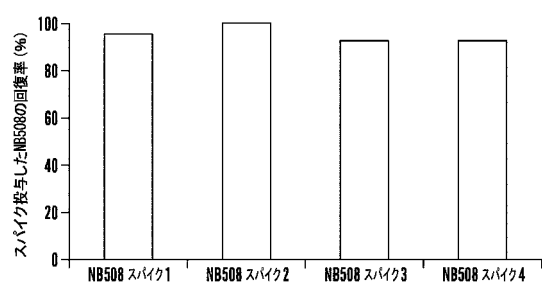
【 図 3 B 】

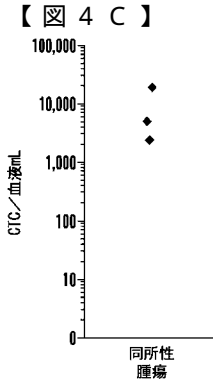


【 図 4 A 】



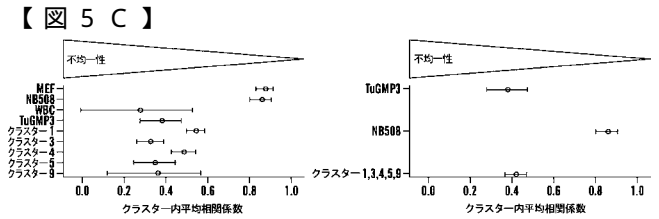
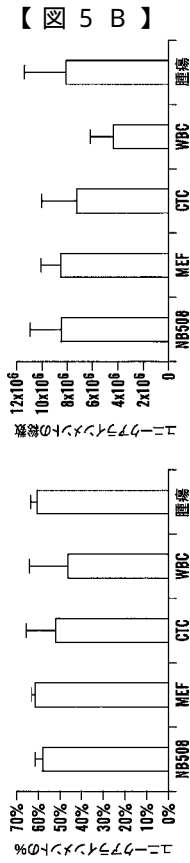
【 図 4 B 】



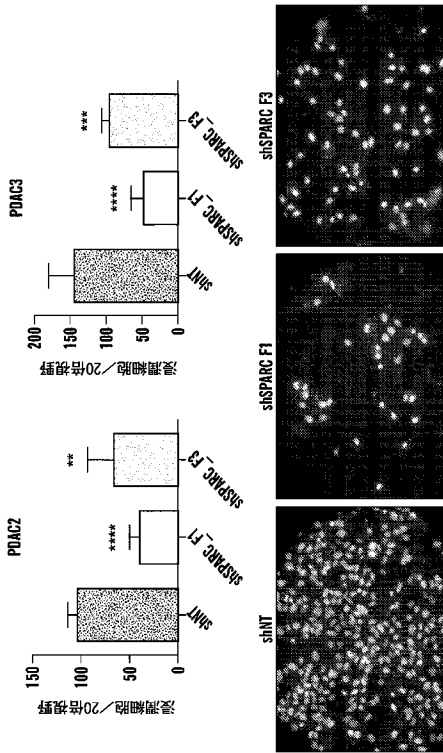


【 図 5 A 】

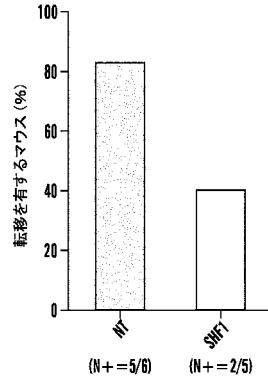
マウス ID	Kras	Cre	Trp53	性別	年齢 (週齢)	肉眼的転移	IF CK+ CTC/血液mL	抽出した細胞	シーケンシングを行った細胞
MP1	G12D	Ptk1	L/L	M	5.86	なし	118	3	N/A
MP2	G12D	Ptk1	L/L	M	5.00	なし	1684	36	16
MP3	G12D	Ptk1	L/L	M	6.14	なし	0	24	8
MP4	G12D	Ptk1	L/L	F	8.00	あり	28	42	15
MP5	G12D	Ptk1	L/L	M	6.00	なし	240	3	N/A
MP6	G12D	Ptk1	L/L	F	6.43	なし	861	24	16
MP7	G12D	Ptk1	L/+	F	16.71	あり	63	42	22



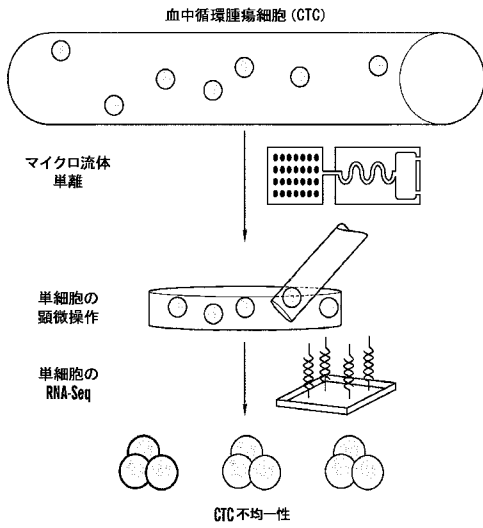
【 図 9 】



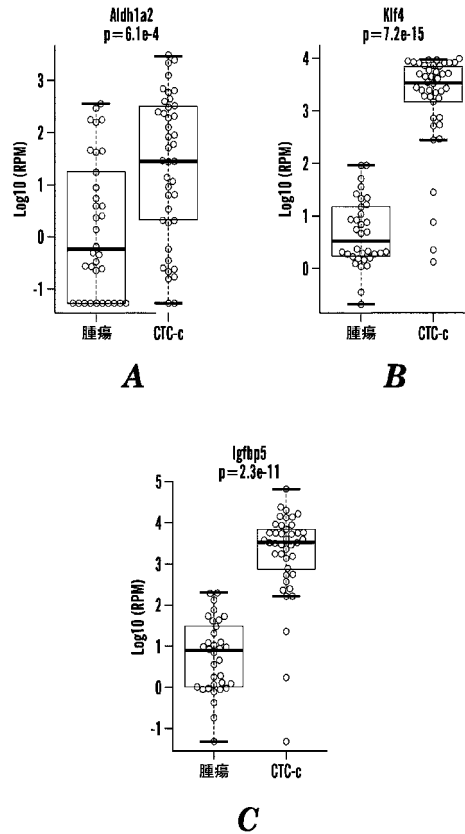
【 図 1 0 】



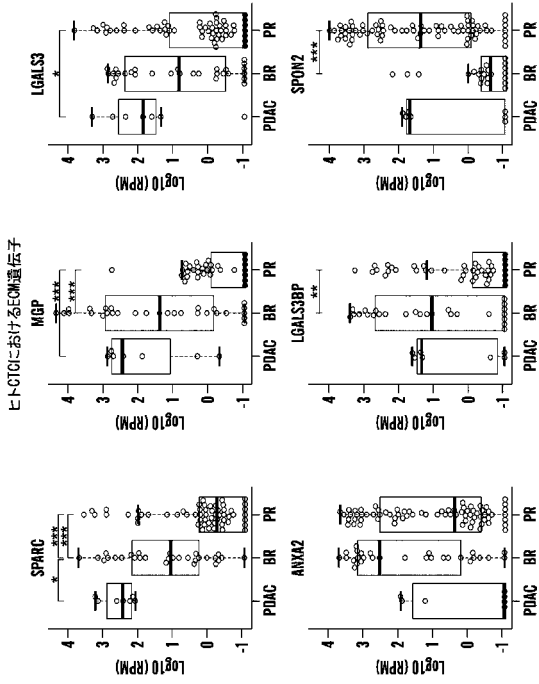
【 図 1 1 】



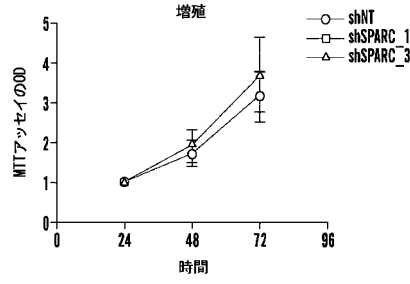
【 図 1 2 】



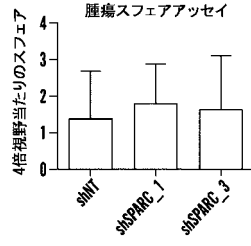
【図 1 3】



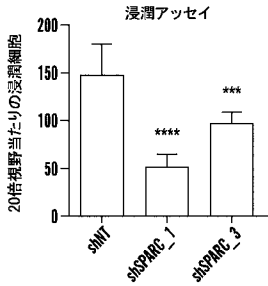
【図 1 4 A】



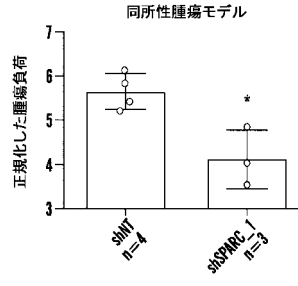
【図 1 4 B】



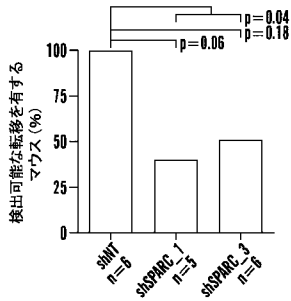
【図 1 4 C】



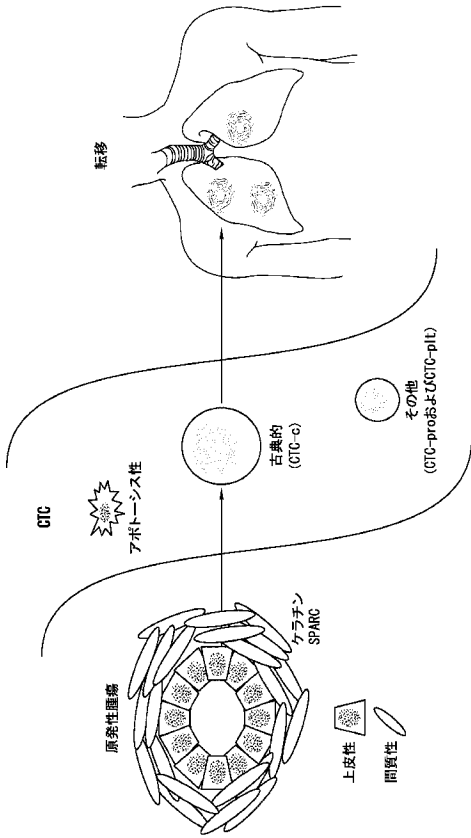
【図 1 4 E】



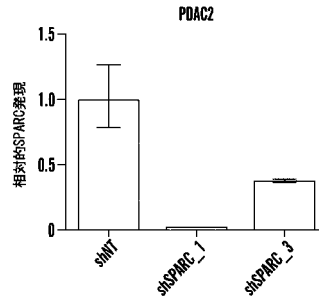
【図 1 4 D】



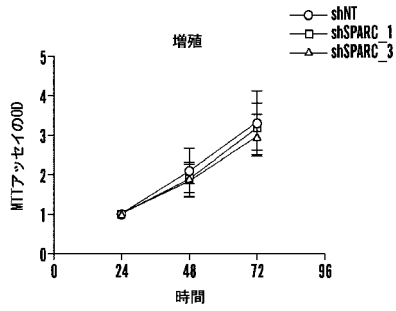
【 図 1 5 】



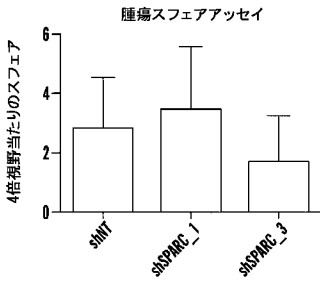
【 図 1 6 A 】



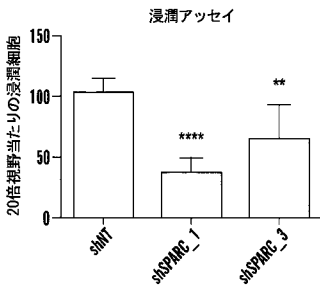
【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C 】



【 図 1 6 D 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

14/07/1169 13-03-2015
International application No.

PCT/US 14/71169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00, C12Q 1/68, G01N 33/00 (2015.01) CPC - A61K 38/00, C12Q 1/6886, G01N 33/57492 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 38/00, C12Q 1/68, G01N 33/00 (2015.01) CPC: A61K 38/00, C12Q 1/6886, G01N 33/57492 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6.13, 435/6.14, 424/174.1 (keyword search, terms limited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: circulating tumor cell, pancreatic cell, marker gene, prognosis diagnosis, treatment efficacy, expression level, reference level, monitoring treatment, cancer therapy, administer, marker gene-targeted therapy, biological sample, blood, response, ALDH1A2, IGFBP5, KLF4, DCN, SPARC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/109944 A1 RHIM et al. 25 July 2013 (25.07.2013) pg 3, ln 19-26, pg 4, ln 18-27, pg 13, ln 4-7, pg 14, ln 6-10, pg 17, ln 21-23, pg 18, ln 28-34 - pg 19, ln1-2	1-3, 37-39
X	US 2007/0026398 A1 (FARNSWORTH et al.) 01 February 2007 (01.02.2007) para [0014], [0018], [0019], [0045], [0046], [0082]	15-19, 23-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 February 2015 (18.02.2015)		Date of mailing of the international search report 13 MAR 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

14/71169 13.03.2019
International application No.

PCT/US 14/71169

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-14, 20-22, 26-36 and 40-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
	A 6 1 P 35/00	
	C 1 2 Q 1/04	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ティン デイビッド ティー .
アメリカ合衆国 0 2 0 3 0 マサチューセッツ州 ドーバー プライアント レーン 1

(72) 発明者 ハーバー ダニエル エイ .
アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州 ニュートン モナドノック ロード 3 4

(72) 発明者 マヘスワラン シャマラ
アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州 レキシントン イースタン アベニュー 2
4

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR62
QR66 QS25 QS34 QX02
4C084 AA13 AA17 MA17 MA22 MA23 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56
MA57 MA63 MA66 NA05 NA14 ZA66 ZB26
4C085 AA13 AA14 EE01 GG02 GG03 GG04 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 NA05 NA14 ZA66 ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017503488A5	公开(公告)日	2018-03-08
申请号	JP2016541175	申请日	2014-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	テインデイビッドティー ハーバーダニエルエイ マヘスワランシャマラ		
发明人	テイン デイビッド ティー. ハーバー ダニエル エイ. マヘスワラン シャマラ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/53 G01N37/00 A61K45/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/7088 A61P1/18 A61P35/00 C12Q1/04		
CPC分类号	A61P1/18 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57438 G01N33/57484 G01N2333/47 G01N2333/90 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/574.D G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.101 A61K45/00 A61K39/395.T A61K39/395.E A61K48/00 A61K31/7088 A61P1/18 A61P35/00 C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/ /QQ52 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA43 4C084/ /MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA66 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/ /GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZB26		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/918816 2013-12-20 US 61/937883 2014-02-10 US		
其他公开文献	JP6599334B2 JP2017503488A		

摘要(译)

本文描述的技术涉及例如通过检测某些CTC标记基因表达的变化来检测血液中循环肿瘤细胞 (CTC) 的方法。而且, 可以将CTC标记基因的异常表达, 例如指向CTC的表达改变, 用于治疗癌症。

