

(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2018-524972

(P2018-524972A)

(43) 公表日 平成30年9月6日(2018.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-560179 (P2017-560179)	(71) 出願人	500205596
(86) (22) 出願日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		ザ・ウイスター・インスティテュート・オブ・アナトミー・アンド・バイオロジー
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月14日 (2017.12.14)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州19104
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/033232		フィラデルフィア・スプリングストリート3601
(87) 国際公開番号	W02016/187404	(74) 代理人	110000741
(87) 国際公開日	平成28年11月24日 (2016.11.24)		特許業務法人小田島特許事務所
(31) 優先権主張番号	62/163,766	(72) 発明者	ショウ, ルイーズ・シー
(32) 優先日	平成27年5月19日 (2015.5.19)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州19063
(33) 優先権主張国	米国 (US)		メディア・インディアンズプリングロード95
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肺癌の診断または検出のための方法及び組成物

(57) 【要約】

肺癌または肺疾患の診断用多分析物組成物は、哺乳類血液試料由来のmRNA遺伝子転写物と特異的に、複合体化する、ハイブリダイズする、またはこれを同定することができる、核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される、リガンド；及び哺乳類血液試料由来の遺伝子のmiRNAと特異的に、複合体化する、ハイブリダイズする、またはこれを同定することができる、核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される、追加リガンドを含む。各リガンド及び追加リガンドは、異なる遺伝子転写物またはmiRNAと結合し、かつ同定された遺伝子転写物及びmiRNAは、肺癌または肺疾患の段階の特徴的なプロファイルを形成する。診断及び評価のためのこの組成物の使用方法、ならびにそのような組成物の開発方法も記載される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

肺癌の診断用の多分析物組成物であって、以下

(a) 哺乳類生体試料由来の mRNA 遺伝子転写物と特異的に、複合体化する、ハイブリダイズする、またはこれを同定することができる、核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される、リガンド；及び

(b) 哺乳類生体試料由来の miRNA と特異的に、複合体化する、ハイブリダイズする、またはこれを同定することができる、核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される、追加リガンド；

を含み、

各リガンド及び追加リガンドは、異なる遺伝子転写物または miRNA と結合し、かつ同定された該遺伝子転写物及び miRNA の発現レベルの組み合わせは、肺癌の、または肺癌の段階の特徴的なプロファイルを形成する、前記組成物。

【請求項 2】

前記遺伝子転写物及び miRNA は、表 1 または 2 または 3 から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記遺伝子転写物及び miRNA は、表 1 の順位 1 ~ 119 位から選択される、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記リガンドはそれぞれ、前記遺伝子転写物または miRNA の核酸配列を増幅及び検出する増幅核酸プライマーまたはプライマー対、前記遺伝子の mRNA または miRNA 核酸配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブ、あるいは抗体または抗体断片であり、各リガンドは、表 1 または 2 または 3 の少なくとも 1 つの mRNA または 1 つの miRNA に特異的である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記リガンドが固定されている基材、マイクロアレイ、マイクロ流体カード、チップ、チャンバまたは複数のプローブからなる複合体あるいは複数のプローブ配列を含むキット、少なくとも 1 つの該プローブ配列は表 1、表 2、または表 3 の前記 mRNA 及び miRNA 標的のうち 1 つの mRNA とハイブリダイズすることができ、かつ少なくとも 1 つのプローブは表 1、表 2、または表 3 の前記 mRNA 及び miRNA 標的のうち 1 つの miRNA とハイブリダイズすることができる；あるいは前記同一 mRNA または miRNA とハイブリダイズすることができる追加リガンドをさらに含むキット；あるいは前記リガンドを複数含むキット、それぞれは、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマープローブセットを含み、かつ該キットはプライマー及びプローブ両方を含み、各プライマープローブセットは異なる遺伝子転写物または miRNA を増幅する、をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

1 つまたは複数のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたはリガンドは、検出可能な標識を伴う、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記組成物は、同一の選択された遺伝子及び miRNA の発現、発現レベル、または活性について、対象の全血中のものの、参照または対照のものからの変化を検出することができ、該変化は、肺癌の初期診断、肺癌の段階、肺癌の型または分類、肺癌の再発、肺癌の退縮、肺癌の予後、または外科的もしくは非外科的治療に対する肺癌の反応と関連する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物は、同一の選択された遺伝子の発現について、対象の血液中のものの、参照または対照のものからの変化を検出することができ、該変化は、肺癌の診断または評価と関連する、請求項 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

前記リガンドは、RNAプライマーである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

少なくとも 2 つのリガンドを含むキットまたはマイクロアレイであり、少なくとも 1 つのリガンドは、前記対象が肺癌を有する場合に発現に修飾を生じる選択された遺伝子の mRNA 転写物を同定し、かつ少なくとも 2 つ目のリガンドは前記対象が肺癌を有する場合に発現レベルに変化を生じる miRNA を同定する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

哺乳類対象でのアッセイの感度及び特異性の向上方法であって、哺乳類対象の生体液中、少なくとも 1 つの mRNA 標的と少なくとも 1 つの miRNA 標的の組み合わせの発現の、参照または対照由来の同一生体試料における mRNA 標的及び miRNA 標的の同一組み合わせでの発現レベルからの変化を同定することを含む、前記方法。

10

【請求項 12】

請求項 1 に記載の多分析物組成物を使用することを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記診断または評価は、肺癌の診断、良性肺小結節、肺癌の段階の診断、肺癌の型または分類の診断、肺癌の再発の診断または検出、肺癌の退縮の診断または検出、肺癌の予後、または外科的もしくは非外科的治療に対する肺癌の反応の評価、または初期肺癌の診断、またはステージ I もしくは II の非小細胞肺癌である肺癌の診断のうち 1 つまたは複数を含み；あるいは、前記選択された miRNA 及び mRNA は、肺疾患なしで喫煙歴なし、肺疾患なしで喫煙歴あり、肺癌、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、良性肺小結節、腫瘍切除前の肺癌、及び腫瘍切除後の肺癌から選択される 2 つ以上の条件下で異なって発現する、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 14】

前記変化は、前記参照または対照との比較での 1 つまたは複数の選択された遺伝子転写物の上向き調節または下向き調節と、及び前記参照または対照との比較での 1 つまたは複数の選択された miRNA の上向き調節または下向き調節との組み合わせを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記遺伝子転写物及び miRNA は、表 1 または表 2 または表 3 に列挙されるものの中から選択される、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記対象は、固形腫瘍切除の手術または化学療法を受けた後であり；かつ前記参照または対照は、手術前または治療前の同一対象由来の同一の選択された遺伝子転写物及び mRNA を含み；かつ前記選択された遺伝子転写物及び miRNA の発現の変化は、癌の再発または退縮と関連する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

前記参照または対照は、少なくとも 1 つの参照対象を含み、該参照対象は、以下からなる群より選択され：(a) 悪性疾患のある喫煙者、(b) 非悪性疾患のある喫煙者、(c) 非悪性疾患のある元喫煙者、(d) 疾患のない健康な非喫煙者、(e) 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を有する非喫煙者、(f) COPD のある元喫煙者、(g) 固形肺腫瘍があり、その除去のための手術前である対象；(h) 固形肺腫瘍があり、該腫瘍の外科的除去後の対象；(i) 固形肺腫瘍があり、その治療前である対象；及び (j) 固形肺腫瘍があり、その治療中または治療後の対象；前記参照または対照の対象 (a) ~ (j) は、時間的により早い時点での同一試験対象である；または、前記参照 mRNA または miRNA 標準は、参照対象または参照集団に由来する、算術平均、広義の平均、数値平均、または数値平均の範囲、数値パターン、図式パターン、または組み合わせた、mRNA 及び miRNA 発現プロファイルである、請求項 11 に記載の方法

40

【請求項 18】

さらに、前記対象由来の前記生体試料を、前記試料中の前記選択された mRNA と複合

50

体化し、その発現レベルを測定する診断試薬と接触させること、及び前記対象由来の前記生体試料を、前記試料中の前記選択されたm i R N Aと複合体化し、その発現レベルを測定する診断試薬と接触させること、を含み、前記発現レベルの前記変化の組み合わせは、癌またはその段階の診断となる、請求項11に記載の方法。

【請求項19】

診断試薬を作製する方法であって、哺乳類対象の生体液の試料中の、疾患の選択されたm R N A及びm i R N A配列特性の発現における変化の組み合わせを検出することを含む、該疾患の分類プロファイルの形成を含む、前記方法。

【請求項20】

肺癌のある対象と良性小結節のある対象とを識別するためのアッセイの感度及び特異性の向上方法であって、以下：

対象から生体液または組織試料を得ること；

哺乳類生体試料由来の表1、2、または3の1つまたは複数のm R N A遺伝子転写物標的と特異的に、複合体化する、ハイブリダイズする、またはこれを同定することができる核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のリガンドと、該試料を接触させることにより、表1、2、または3の1つまたは複数のm R N A標的が該試料に存在するかどうかを検出すること；及び

哺乳類生体試料由来の表1、2、または3の1つまたは複数のm i R N A標的と特異的に、複合体化する、ハイブリダイズする、またはこれを同定することができる核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のリガンドと、該試料を接触させることにより、表1、2、または3の1つまたは複数のm i R N A標的が該試料に存在するかどうかを検出すること、

を含み、各リガンドは、異なるm R N A標的またはm i R N A標的と結合する、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子形式で提出されたデータの参照による援用

本出願人は、本明細書とともに電子形式で出願された配列表データを、本明細書により参照することにより援用する。このファイルは名前が「W S T 1 5 5 P C T _ _ S T 2 5 . t x t」であり、2016年5月19日に作製されたもので、43KBである。

【0002】

政府の権利についての声明

本発明は、国立衛生研究所により支給される助成金番号第P30 C A 0 1 0 8 1 5号の下、政府支援でなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【発明の背景】

【0003】

肺癌は、全世界で最大の癌死亡原因であり、毎年新たに約220,000の症例が診断されるが、これは全ての癌診断の約13%を占める。全ての癌死のうち27%超は、肺癌によるものであり、毎年約150,000人が亡くなっている。現在の診断率は、後期のものである、すなわち、診断の>70%超は、ステージIII以上であり、診断された肺癌のうち、15%のみが、初期の治療可能な段階、すなわちステージIまたはIIAで診断される。肺癌全体の生存率は、約18%の5年生存率であるが、これは、この疾患の初期に診断された場合の5年生存率が>50%であるのとは対照的である。

【0004】

非小細胞肺癌(N S C L C)は、致死性の高い疾患であり、早期検出に続く手術によってのみ治療可能である。残念ながら、診断時に限局性疾患であるのは、肺癌患者の15%のみである。肺上皮がタバコ煙曝露後に変異してしまう領域癌化により、喫煙者と初期肺癌の喫煙者とを区別する遺伝子変化を同定することは困難である。肺癌生存率を改善する上で最も重要な長期目的の1つは、患者、主に、全肺癌症例の大部分を占める喫煙者及び

元喫煙者の悪性腫瘍を、初期段階で、それらが依然として外科切除可能なうちに、検出することの達成である。現在、良性小結節と悪性小結節を区別する唯一の方法は、侵襲的バイオプシー、手術、または繰り返しスキャニングでの長期観察である。初期診断へのアプローチには、CTスキャン、経気管支擦過、ならびに疾患の生体マーカーとして痰、血漿、及び血液の分析などのプロセスが関与する。

【0005】

遺伝子診断の目的を達成する1つの確立された有効な方法は、腫瘍組織からのマイクロアレイシグネチャーの使用であった。末梢血単核球(PBMC)プロファイルは、癌を含む全身性疾患の診断及び分類に、ならびに治療反応のモニタリングに使用することができる。癌患者でPBMC遺伝子発現プロファイルを使用することの有効性は、マイクロアレイの使用による後期腎細胞癌の患者と正常対照でのPBMCの比較で、既に報告されている。末梢血試料から初期乳癌を検出するための37の遺伝子による分類指標が、82%精度で開発されている。別の研究では、結腸直腸癌患者のPBMCの遺伝子発現プロファイルが同定されたが、これは、治療に対する反応と相関する可能性がある。本発明者らは、患者PBMCの疾患に関する29の遺伝子による分類指標も明らかにした(例えば、米国特許第8,476,420号を参照、本明細書中参照として援用される)。

【0006】

マイクロRNA(miRNA)は、非翻訳リボ核酸配列の大きな1グループであり、昆虫、微生物、ヒト、動物、及び植物から単離及び同定されており、Wellcome Trust Sanger Instituteのデータベース(<http://mirna.sanger.ac.uk/sequences/>)を始め複数のデータベースに報告されている。こうしたmiRNAは、長さが約22ヌクレオチドであり、それより長い前駆体から生じ、非タンパク質コード遺伝子から転写される。前駆体は、自己相補的領域で自分自身に対して折り返して構造を形成する。miRNAの機能的役割についてはあまり知られておらず、それらの標的についてはさらに不明である。miRNA分子は、それらの標的と正確または不正確に塩基対形成することを通じて、遺伝子翻訳を中断または抑制すると思われる(米国特許出願公開第2004/0175732号)。生物情報学解析から、どのようなmiRNAであっても、最大で数百の異なる遺伝子と結合しその発現を改変する可能性があること；及び1つの遺伝子が複数のmiRNAにより制御される可能性があることが示唆される。miRNAと標的遺伝子間の複雑な相互作用調節ネットワークは、実際のところ、どの遺伝子が、与えられたmiRNAに反応して不適切に調節されることになるかを正確に予測することを困難にしていると、指摘されている。ある特定のmiRNAの発現レベルは、様々な癌に関連しているとされてきた(Esquelea-Kerschler and Slack, 2006 Nat. Rev. Cancer, 6(4):259-269; McManus 2003 Seminars in Cancer Biology, 13:253-258; Karube Yet al 2005 Cancer Sci, 96(2):111-5; Yanaihara N. et al 2006 Cancer Cell, 9(3):189-98)。

【0007】

本発明者らは、2009年11月6日出願の国際特許出願公開第WO2010/054233号において、複数のmiRNAと、及び特に1つのmiRNAと特異的に複合体形成、これとハイブリダイズ、またはこれらのプロファイルを同定することができるリガンドを含む診断試薬またはキットをすでに開示しており、これらのプロファイルには、hsa-miR-148a、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-221、hsa-miR-let-7d、hsa-miR-let-7a、hsa-miR-328、hsa-miR-let-7c、hsa-miR-34a、hsa-miR-202、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-642の様々な組み合わせが含まれる。これらの試薬及びキットは、対象の全血または末梢血単核球中のこれらmiRNAのmiRNA発現レベルまたはプロファイルを同定することにより、哺乳類対象の肺癌を診断ま

10

20

30

40

50

たは検出する方法で有用である。当該分野では、様々な肺癌及び他の肺疾患の初期診断を促進する新規かつ有効な道具が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

1つの態様において、肺癌または肺疾患があることが疑われる哺乳類対象の診断または評価のための多分析物組成物が提供される。この組成物は、試薬またはキットであり、哺乳類生体試料中のある特定のmRNA（遺伝子転写物）及び非翻訳miRNAの発現における変化の同定を可能にするリガンドを含む。これらの選択された翻訳及び非翻訳配列における変化の組み合わせは、肺癌または肺疾患の存在、段階、または進行に反応して変化する配列のプロファイルまたは分類を同定することを可能にする。

10

【0009】

1つの実施形態において、リガンドは、以下の表1に提示するある特定のmRNA及びmiRNAと結合するプローブである。

【0010】

別の態様において、多分析物組成物を用いて肺癌または肺疾患の存在、段階、または進行を診断する方法が提供される。

【0011】

なおさらなる態様において、肺癌、肺疾患の診断、またはそれらの段階もしくはサブタイプの診断を可能にする特徴的な肺癌分類またはmRNA及びmiRNAプロファイルの組み合わせを開発する方法が提供される。

20

【0012】

別の態様において、肺癌のある対象と良性小結節のある対象とを識別するためのアッセイの感度及び特異性を上昇させる方法が提供される。

【0013】

別の態様において、肺癌または肺疾患があることが疑われる哺乳類対象の診断または評価のための多分析物組成物が提供され、本組成物は、試薬またはキットであり、哺乳類生体試料中のある特定のmRNA標的（遺伝子転写物）の発現における変化の同定を可能にするリガンドを含む。mRNA標的は、本明細書中の表1、表2、及び表3から選択される複数標的である。

【0014】

これらの組成物及び方法の他の態様及び利点を、それらの好適な実施形態についての以下の詳細な説明でさらに記載する。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】訓練集合の大きさを拡大していった場合の誤り率の推定を示すグラフである。全データから訓練集合を様々な大きさで選択することにより、検出力関数曲線の当てはめを行った。MAD: 50の再サンプリングにまたがる中央絶対偏差。本方法で記載される試料の本発明者らの予備試験で、検出力関数曲線を作成した。全データから訓練集合を様々な大きさで選択し、大きさを、そのデータの分類について該当する誤り率に対してプロットすることにより、検出力関数の当てはめを行った。訓練に使用した試料数と誤り率の間の関連性は、訓練集合の大きさを拡大することにより、NSCLC対小結節あり及びなしの対照の分類により高い精度を得ることが可能であることを示す。約550の試料を含む訓練集合を使用することにより、90%分類精度を達成することができる。実施例で訓練に使用した242の試料での結果は、曲線上に緑色で示す；この分析の誤り率は、0.17であり、本発明者らの以前の予測とまさに一致する。MAD: 50の再サンプリングにまたがる中央絶対偏差。

40

【図2】実施例3の分類指標の組み合わせについてROCのAUCを示すグラフである。このデータは、242の訓練試料及び103の試験試料、例えば、癌対対照を使用して得られたものである。精度の比較は、mRNAのみでは79%、miRNAのみでは71%であるが、mRNAとmiRNAの組み合わせでは83%であることを示した。アッセイ

50

感度は76%であった。アッセイの特異性は、88%であり、ROCのAUCは0.88であった。癌対象(n=54);対照(n=49)。

【図3】独立した訓練集合からの各試料に対して分類指標により割り当てられた個別のスコアを示す、サポートベクターマシン(SVM)プロットである。各試料には、SVM分類指標により割り当てられたスコアが与えられた。正のスコアは、癌という分類であり、負のスコアは対照という分類を示す。各カラムは、患者を表し、カラムの高さは、分類の強度すなわち信頼度の尺度と解釈することができる。示される分類は、分類について古典的0点切捨を使用する。感度は、92.6%で最大であり、この時の特異性は73.5%である。SVM分析は、各試料にスコアを割り当て、これは、それぞれどれくらい良好に分類されているかの尺度である。

10

【図4】肺疾患を診断するためのmRNA及びmiRNA標的からなる分類指標を開発するのに使用された生体試料の数及び評価を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明者らは、分類のためのアルゴリズムを開発したが、それは前向き特徴選択を用いたSVMであった。mRNA及びmiRNAを別々に分析して、独立した分類指標を開発し、診断を下すのにmRNAのみまたはmiRNAのみを使用する場合の精度を超える相乗的レベルの精度を実証した。翻訳及び非翻訳特徴を組み合わせることにより、組み合わせ分類指標を開発したが、これは、改善された精度での診断を可能にする。

20

【0017】

mRNA及び/またはmiRNA発現の組み合わせ(組み合わせ分類指標)は、miRNA結果のみを使用する予備PBMCと比較して、より正確である。多分析物分類指標は、よりロバストである。分類のためにより多くの特徴が必要とされ;これらの特徴の個数は、訓練集合が大きくなるほど減少させることができるが、しかし個数は、Nanosttring(Nanosttring Technologies, Inc., Seattle, WA)及びPCRアレイなど可能性のある開発プラットフォームと適合するものである。

【0018】

本明細書に記載される方法及び組成物は、選択された遺伝子転写物(mRNA)の検出及び選択されたmiRNA(非翻訳)の検出を組み合わせた技法を、肺疾患などの症状の検出、診断、及びその治療に対する反応のモニタリングのために、生体液のスクリーニングに応用する。ある特定の実施形態において、肺疾患は、NSCLCまたはCOPDである。他の実施形態において、疾患は、良性結節の存在である。本明細書に記載される組成物を用いて、さらに他の肺疾患が診断される。本明細書に記載される組成物及び方法は、生体試料に由来する特徴的遺伝子転写物(mRNA)及び特徴的miRNAまたはmiRNA発現プロファイル(非翻訳)の組み合わせにおける変化を求めることにより、概して症状または疾患またはその段階を、特に肺癌及びCOPDを、診断または検出することを可能にする。試料として、様々な実施形態において、哺乳類、好ましくはヒト対象の全血、血清、または血漿が挙げられる。mRNA標的及びmiRNA標的両方の発現における変化の組み合わせは、同一クラス(例えば、ある特定の型及び段階の肺癌またはCOPDである、あるいは混合した型及び段階である、患者)の多数の対象のプロファイルを、あるクラスの複数の対象のプロファイルと比較することにより、確立されるが、比較されるクラスに由来する個々の対象は、有用な診断を提供する目的で、必ず識別できなければならない。

30

40

【0019】

肺疾患スクリーニングのこれらの方法は、前立腺特異的抗原を使用して診断を補助し前立腺癌の進行を追跡するのとほぼ同じやり方で、mRNA及びmiRNA発現プロファイリングを組み合わせ用いて、簡潔で費用効果が高く非侵襲的な血液検査を行うのに適した組成物を使用し、スクリーニングの結果、患者及び医師に胸部X線写真またはCTスキャンなどさらなる検査を行うように注意喚起することができる。本明細書に記載されるm

50

R N A 及び m i R N A 発現のレベル及びプロファイルは、この診断問題と関連した様々な分類の基礎を提供する。これらの比較レベル及びプロファイルの応用は、疾患が悪性か非悪性の初期検査から始まる、肺疾患の型の重複及び確認診断を提供する。

【 0 0 2 0 】

組成物及び方法の構成要素

「患者」または「対象」は、本明細書中使用される場合、哺乳動物を意味し、そのような動物として、ヒト、獣医学的または農業家畜、家庭家畜またはペット、及び臨床研究に通常用いられる動物が挙げられる。より詳細には、これらの方法及び組成物の対象は、ヒトである。

【 0 0 2 1 】

「リガンド」は、本明細書中使用される場合、標的 m R N A または m i R N A の検出及び定量を可能にするように、標的 m R N A または m i R N A とハイブリダイズ、結合、またはなんにせよ会合することができる、標識化または未標識の、任意のヌクレオチド配列、アミノ酸配列、抗体、プローブ、プライマー、それらの断片、あるいは任意の実体（小分子または化学もしくは遺伝子組換え分子）を示す。

【 0 0 2 2 】

「参照」レベル、標準、またはプロファイルは、本明細書中使用される場合、参照 m R N A 及び m i R N A の提供源を示す。1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、非小細胞肺癌（N S C L C）を有する参照ヒト対象または集団から選択された生体試料から得られる。例えば、1つの実施形態において、利用される参照標準は、扁平上皮癌の参照ヒト対象またはヒト対象の集団あるいは扁平上皮癌の複数対象の平均の生体試料に由来する標準またはプロファイルである。ある特定の実施形態において、利用される参照標準は、初期扁平上皮癌の参照ヒト対象、または複数対象の平均に由来する標準またはプロファイルである。別の実施形態において、参照標準は、腺癌の参照ヒト対象、または複数対象の平均の生体試料に由来する標準またはプロファイルである。別の実施形態において、参照標準は、初期腺癌の参照ヒト対象、または複数対象の平均の生体試料に由来する標準またはプロファイルである。

【 0 0 2 3 】

別の実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、C O P D または他のある肺疾患を有する参照ヒト対象または集団から選択された生体試料から得られる。例えば、参照標準は、C O P D の参照ヒト対象、または複数対象の平均の生体試料に由来する標準またはプロファイルである。1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、健康で喫煙したことがない参照ヒト対象または集団から選択された生体試料から得られる。例えば、参照標準は、健康で喫煙したことがない参照ヒト対象、または複数対象の平均の生体試料に由来する標準またはプロファイルである。1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、元喫煙者または現在喫煙者であるが疾患はない参照ヒト対象または集団から選択された生体試料から得られる。例えば、参照標準は、元喫煙者または現在喫煙者であるが疾患はない参照ヒト対象、または複数対象の平均に由来する標準またはプロファイルである。

【 0 0 2 4 】

1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、良性肺小結節を有する参照ヒト対象または集団から選択された生体試料から得られる。例えば、参照標準は、良性肺小結節を有する参照ヒト対象、または複数対象の平均の生体試料に由来する標準またはプロファイルである。1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、N S C L C 腫瘍の外科的除去後の参照ヒト対象、または集団から選択された生体試料から得られる。1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、N S C L C 腫瘍の外科的除去前の参照ヒト対象または集団から選択された生体試料から得られる。1つの実施形態において、参照 m R N A 及び m i R N A 標準は、時間的により早く生体試料を提供した同一対象から選択された生体試料から得られる。別の実施形態において、参照標準は、2つ以上の上記参照標準の組み合わせである。

10

20

30

40

50

【0025】

参照標準は、様々な実施形態において、参照対象または参照集団に由来する、算術平均、広義の平均、数値平均、または数値平均の範囲、数値パターン、図式パターン、またはmiRNAもしくはmRNAもしくは遺伝子発現プロファイルである。特定クラスの参照標準、参照集団、mRNAレベルもしくはプロファイル、またはmiRNAレベルもしくはプロファイルの選択は、医師が設定する診断/モニタリング方法及び組成物の使い方に依存する。

【0026】

「試料」または「生体試料」は、本明細書中使用される場合、免疫細胞及び/または癌細胞を含有する任意の生体液または組織を意味する。1つの実施形態において、適切な試料は、全血である。別の実施形態において、試料は、静脈血の場合がある。別の実施形態において、試料は、動脈血の場合がある。別の実施形態において、本明細書に記載される方法で使用するのに適した試料として、末梢血が挙げられ、より具体的には末梢血単核球が挙げられる。他の有用な生体試料として、制限なく、全血、血漿、または血清が挙げられる。なお他の実施形態において、試料は、肺疾患を有することが疑われる対象から得られる、唾液、尿、滑液、骨髄、脳脊髄液、腔粘液、子宮頸管粘液、鼻分泌物、痰、精液、羊水、気管支肺胞洗浄液、及び他の細胞滲出液である。そのような試料は、生理食塩水、緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤で、さらに希釈される場合がある。あるいは、そのような試料は、従来手段で濃縮される。当然のことながら、本明細書全体を通じて、いずれか1つの生体試料を使用するまたはそれについて記述するのは、例示にすぎない。例えば、本明細書中、試料が全血であると示される場合、当然のことながら、他の試料、例えば、血清、血漿なども、同様にして採用することができる。

【0027】

1つの実施形態において、生体試料は、全血であり、本方法は、PaxGene Blood RNA Workflowシステム(Qiagen)を採用する。このシステムには、血液収集(例えば、1回血液吸引)及びRNA安定化、続いて輸送及び貯蔵、続いて全RNAの精製及び分子RNA検査が関与する。このシステムは、即時RNA安定化及び一定した血液吸引体積を提供する。血液は、医師の診療室または診療所で吸引することができ、同一試験管で検体を輸送及び貯蔵することができる。短期RNA安定性は、18~25で3日間、または2~8で5日間である。長期RNA安定性は、-20~-70で4年間である。この試料収集システムは、利用者が、全血での遺伝子発現及びmiRNA発現のデータを信頼して得ることを可能にする。1つの実施形態において、生体試料は、全血である。PAXgeneシステムは生体試料源としてPBMCを使用するよりも高い雑音を有するものの、PAXgene試料収集の有益性は、この問題を上回る。雑音は、生物情報工学により差し引くことが可能である。

【0028】

「免疫細胞」は、本明細書中使用される場合、Bリンパ球、Tリンパ球、NK細胞、マクロファージ、肥満細胞、単球、及び樹状細胞を意味する。

【0029】

本明細書中使用される場合、「症状」という用語は、疾患の不在(健康な状態)または存在を示し、そのような疾患として、肺疾患、肺癌、肺での良性小結節もしくは良性腫瘍増殖の存在、慢性肺疾患(関連癌を伴うまたは伴わない)、手術前の癌性肺腫瘍の存在、癌性肺腫瘍除去後の術後症状が挙げられる。指定される場合、そのような症状のどれであっても、喫煙または非喫煙と関連する可能性がある。

【0030】

本明細書中使用される場合、「肺疾患」という用語は、肺癌または慢性閉塞性肺疾患、あるいは喫煙もしくは他の肺組織での有害事象による肺小結節または肺病変の存在を示す。

【0031】

本明細書中使用される場合、「癌」という用語は、制御不能な細胞増殖を典型的な特徴

10

20

30

40

50

とする、哺乳類の生理学的状態を示す、または説明する。より詳細には、本明細書中使用される場合、「癌」という用語は、任意の肺癌を示す。1つの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。より具体的な実施形態において、肺癌の型は、肺腺癌（AC）である。別の実施形態において、肺癌の型は、肺扁平上皮癌（SCC）である。別の実施形態において、肺癌は、「初期」（IまたはII）NSCLCである。なお別の実施形態において、肺癌は、「後期」（IIIまたはIV）NSCLCである。なお別の実施形態において、肺癌は、初期及び後期、ならびに複数の型のNSCLCの混合物である。

【0032】

「腫瘍」という用語は、本明細書中使用される場合、悪性か良性かに関わらず、全ての腫瘍性細胞成長及び増殖、ならびに全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を示す。

10

【0033】

「診断」または「評価」により、肺癌の診断、肺癌の段階の診断、肺癌の型または分類の診断、肺癌の再発の診断または検出、肺癌の退縮の診断または検出、肺癌の予後、外科的または非外科的治療に対する肺癌の反応の評価、あるいは良性肺小結節の診断を示す。

【0034】

「発現の変化」により、参照または対象との比較での、1つまたは複数の選択された遺伝子転写物（RNA）またはmiRNAの上向き調節；参照または対象との比較での、1つまたは複数の選択された遺伝子またはmiRNAの下向き調節；あるいはある特定の上向き調節された遺伝子もしくはmiRNAと下向き調節遺伝子もしくはmiRNAとの組み合わせを意味する。

20

【0035】

「治療用試薬」または「レジメン」により、固形腫瘍の有無にかかわらず癌の治療に採用される任意の種類の治療を意味し、そのような治療として、制限なく、化学療法薬、生体反応修飾剤、放射線、食事、ビタミン療法、ホルモン療法、遺伝子治療、外科切除などが挙げられる。

【0036】

本明細書中使用される場合、「選択されたまたは指定された」mRNAまたは「選択されたまたは指定された」miRNAにより、それらmRNA及びmiRNA配列について、それらの発現の組み合わせが、肺疾患または肺癌などの症状の存在下、特徴的に変化する（上向き調節または下向き調節いずれかの様式で）ことを意味する。1つの実施形態において、選択されたmRNA及びmiRNAは、表1～3に記載されるものである。統計上有意な個数のそのような情報価値のあるmRNA及びmiRNAは、本方法及び組成物で使用するのに適したmRNA及びmiRNA発現プロファイルの組み合わせを形成する。統計上有意な個数は、そのような個数での組み合わせが持つ、試験された2つ以上の参照集団を識別することができる能力に基づいて決定される。

30

【0037】

「統計上有意な個数のmRNA及びmiRNA」という用語は、本発明の文脈において、観察されるmRNA及びmiRNA発現の組み合わせでの変化の度合いに応じて異なる。mRNA及びmiRNA発現での変化の度合いは、条件、例えば、肺疾患または癌の型、及び癌または固形腫瘍の大きさまたは拡散などで変わる。変化の度合いは、個体の免疫応答でも変化し、個々の個体による多様性に左右される。指定されたmRNA及びmiRNAの発現での変化の度合いは、診断される疾患の型、例えば、COPDまたはNSCLC、及び癌または固形腫瘍の大きさまたは拡散などで変わる。変化の度合いは、個体の免疫応答でも変化し、個々の個体による多様性に左右される。例えば、本発明の1つの実施形態において、mRNAとmiRNAまたは2つより多いそのようなmRNAとmiRNAの組み合わせ、さらには3～約119もしくは145もしくは200以上の特徴的なmRNAとmiRNAの組み合わせの発現における1.2倍以上の増加または減少による変化は、統計上有意である。別の実施形態において、より大きな変化、例えば、mRNAとmiRNAまたは2つより多いそのようなmRNAとmiRNAの組み合わせ、さらには

40

50

3 ~ 約 1 1 9 以上の特徴的な m R N A と m i R N A の組み合わせの発現における 1 . 5 倍以上、1 . 7 倍以上、または 2 . 0 倍以上の増加または減少による変化は、統計上有意である。これは、固形腫瘍のない癌に特に当てはまる。さらにまた別で、1 つの m R N A と 1 つの m i R N A の単独の組み合わせが、その m R N A または m i R N A を通常は発現しない細胞で上向き調節されるまたは顕著に発現されるとプロファイリングされる場合、単独の m R N A 及び / または m i R N A のそのような上向き調節が、単独で、統計上有意となり得る。反対に、m R N A と m i R N A の単独の組み合わせが、その m R N A 及び m i R N A の組み合わせを通常は発現する細胞で、下向き調節されるまたは顕著に発現されないとプロファイリングされる場合、単独の組み合わせのそのような下向き調節が、単独で、統計上有意となり得る。

10

【 0 0 3 8 】

すなわち、本明細書に記載される方法及び組成物は、単独のプロファイルにおいて、組み合わせた m R N A 及び m i R N A のうち 1 ~ 約 2 0 0 個の発現レベルまたはプロファイルを試験することを企図する（表 1 及び表 2 を参照）。別の実施形態において、本明細書に記載される方法及び組成物は、単独のプロファイルにおいて、組み合わせた m R N A 及び m i R N A のうち 1 ~ 約 1 1 9 個（表 1 の順位による）の発現レベルまたはプロファイルを試験することを企図する。別の実施形態において、本明細書に記載される方法及び組成物は、単独のプロファイルにおいて、組み合わせた m R N A 及び m i R N A のうち 1 ~ 約 1 4 5 個（表 1 の順位による）の発現レベルまたはプロファイルを試験することを企図する。別の実施形態において、本明細書に記載される方法及び組成物は、単独のプロファイルにおいて、組み合わせた m R N A 及び m i R N A のうち 1 ~ 約 1 4 7 個（表 2 の順位による）の発現レベルまたはプロファイルを試験することを企図する。別の実施形態において、本明細書に記載される方法及び組成物は、表 3 に同定される m R N A 及び m i R N A を有する単独のプロファイルにおいて、組み合わせた m R N A 及び m i R N A のうち 1 ~ 約 2 0 0 個の発現レベルまたはプロファイルを試験することを企図する。なお別の実施形態において、表 1 ~ 3 の複数の m R N A のみまたは表 1 ~ 3 の複数の m i R N A のみの組み合わせが、肺癌または肺の患者を診断するのに使用されるプロファイルとして有用である。

20

【 0 0 3 9 】

1 つの実施形態において、m R N A 及び / または m i R N A の同定された組み合わせのうち 1 つの発現レベルにおける顕著な変化は、症状、例えば、肺疾患の診断となり得る。別の実施形態において、同定された複数の m R N A 及び / または m i R N A のうち 2 つの発現レベルにおける顕著な変化は、症状、例えば、肺疾患を示すものとなり得る。別の実施形態において、同定された複数の m R N A 及び / または m i R N A のうち 3 つの組み合わせの発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断または別の症状を示すものとなり得る。m R N A 及び / または m i R N A の組み合わせは、発現プロファイルにおいて数が等しい必要はない。例えば、表 1 の上位 1 1 9 位までの構成要素の組においてそうであるとおり、m R N A は、組み合わせ中で m i R N A の数を上回る可能性がある。別の実施形態において、同定された複数の m R N A 及び / または m i R N A のうち 4 つ以上の発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断または別の症状を示すものとなり得る。別の実施形態において、表 1 の同定された組み合わせの m R N A 及び / または m i R N A のうち少なくとも 1 0、少なくとも 5 0、少なくとも 1 0 0、少なくとも約 1 1 9、または少なくとも約 1 4 5（またはこれらの端点のいずれかの間にある任意の整数）の発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断となる、または別の症状を示す。

30

40

【 0 0 4 0 】

別の実施形態において、同定された m R N A 及び / または m i R N A のうち 4 つ以上の発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断または別の症状を示すものとなり得る。別の実施形態において、表 2 の同定された組み合わせの m R N A 及び m i R N A のうち少なくとも 1 0、少なくとも 5 0、少なくとも 1 0 0、少なくとも約 1 2 0、または少なくとも約 1 4 7（またはこれらの端点のいずれかの間にある任意の整数）の発現レベルにお

50

ける顕著な変化は、肺疾患の診断となる、または別の症状を示す。

【0041】

別の実施形態において、表3の同定された組み合わせのmRNA及びmiRNAのうち少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20（またはこれらの端点のいずれかの間にある任意の整数）の発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断となる、または別の症状を示す。

【0042】

別の実施形態において、選択された組み合わせのmRNA及びmiRNAのうち約15の発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断または別の症状を示すものとなり得る。別の実施形態において、選択された組み合わせのmRNA及びmiRNAのうち約20～40の発現レベルにおける顕著な変化は、肺疾患の診断または別の症状を示すものとなり得る。さらに他の個数のmRNAとmiRNAを組み合わせた変化が、本明細書中教示されるとおり、肺疾患の診断に使用され得るまたは別の肺症状を示す。なおさらなる実施形態において、肺疾患または別の症状の診断となるmRNAのプロファイルは、以下の表1に2、5、7、10、12、15、17、24、26、27、31、36、40、41、46、51、57、58、63、69、78、80、85、94、101、105、107、117、118、125、127、128、134、及び139位として順位付けされたmRNAのうち5つ以上を含む。mRNA及び/またはmiRNAのさらに他の群も、表1、表2、または表3の中から選ぶことができる。

【0043】

「マイクロアレイ」という用語は、ハイブリダイズ可能なアレイ要素の順序だった配列を示す。1つの実施形態において、マイクロアレイは、基材上に、指定された組み合わせのmRNA及びmiRNAとハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを含む。別の実施形態において、マイクロアレイは、複数のプライマーまたは抗体を含み、それらは任意選択で基材に固定されている。

【0044】

本明細書中記載される方法による診断または検出に必要な、mRNA及び/またはmiRNAの組み合わせの発現における変化は、参照対象または参照標準でのmRNAまたはmiRNAの発現と比べて、症状があるまたは疾患を罹患している、具体的には肺癌またはNSCLCである対象で、その発現が活性化されて、より高いまたはより低いレベルになることを示す。mRNA及びmiRNAは、同一疾患または症状の異なる段階で、より高いまたはより低いレベルで発現される場合もある。mRNA及びmiRNAの特定の組み合わせの発現は、喫煙したことがないまたは現在もしくは元喫煙者である正常な対象と、疾患、具体的にはCOPD、良性肺小結節、または癌を罹患している対象との間で、あるいは同一疾患の異なる段階間で、異なる。特定mRNAまたはmiRNAの発現は、肺癌の患者で手術前後で異なる。miRNA発現におけるそのような差異には、例えば、正常細胞と疾患細胞の間での、または異なる疾患事象または疾患段階にある細胞間での、発現パターンの時間的または細胞的な、定量的、ならびに定性的差異の両方が含まれる。本発明の目的に関して、mRNA及びmiRNA発現の組み合わせにおける顕著な変化は、参照標準と比較した場合に、対象と参照標準またはプロファイルとの間に、mRNA及びmiRNA発現の組み合わせに統計上有意味な（ $p < 0.05$ ）差が存在する場合に、存在するとみなされる。

【0045】

すなわち、1つの実施形態において、肺癌のある対象と良性小結節のある対象とを識別するためのアッセイの感度及び特異性を上昇させる方法が提供される。本方法は、対象から生体液または組織試料を得ること；哺乳類生体試料由来の表1、2、または3の1つまたは複数のmRNA遺伝子転写物標的と特異的に複合体化、これとハイブリダイズ、またはこれを同定することができる核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種のリガンドと試料を接触させることにより、試料中に1つまたは複数のmRNA標的（例えば、以下の表1、2、または3のmRNA標的）が存在

するかどうか検出すること、を含む。この方法の別の工程は、同一哺乳類生体試料由来の表 1、2、または 3 の 1 つまたは複数の m i R N A 標的と特異的に複合体化、これとハイブリダイズ、またはこれを同定することができる核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも 1 種のリガンドと試料を接触させることにより、試料中に 1 つまたは複数の m i R N A 標的（例えば、以下の表 1、2、または 3 の m i R N A ）が試料中に存在するかどうか検出することが関与する。本方法で使用される各リガンドは、異なる m R N A 標的または m i R N A 標的と結合する。ある特定の実施形態において、m R N A 標的と m i R N A 標的の両方の検出の組み合わせは、診断の感度または特異性あるいはその両方を向上させることを可能にする。1 つの実施形態において、本方法は、対象が肺癌を有するのか良性小結節を有するのか同定する精度の上昇を可能にする。別の実施形態において、本方法は、肺癌のある対象と喫煙者であるが小結節のない対象と識別する精度を上昇させる。喫煙者は、非癌疾患の他の症状特徴を有する可能性がある。以下の実施例を参照。

10

【 0 0 4 6 】

表 1 は、肺癌または肺疾患の患者を、参照標準から、特に、肺疾患のある対象を含む健康なまたは健康ではない対象から診断するのに使用する m R N A 及び / または m i R N A プロファイルの組み合わせを形成するのに有用な 1 4 5 の m R N A 及び m i R N A の一覧を特定する。1 4 5 の混合された配列からなるこの集合は、以下の実施例において表 5 で参照される、肺癌と、小結節（N O D ）の患者及び小結節のない（S C ）喫煙者との比較で参照される。表 1 は、癌と対象を比較する S V M 分類指標訓練で、F F S 手順により選択された、順位付けされた特徴（m R N A 及び m i R N A ）の一覧である。m i R N A は、アスタリスクを付けて示す。m R N A は、N C B I 受入番号で特定される；m i R N A は、A B I O p e n A r r a y 識別番号（O A # ）で特定される。これらの配列は、公的に入手可能である。標的配列の配列番号は、順位数に該当し、それぞれ配列番号 1 ~ 1 4 5 である。表 1 の欄 1（順位及び配列番号）に示すとおり、順位及び配列番号は、同一数字である。当然ながら、m R N A の他の標的配列も同様に使用される。

20

【表 1 - 1】

表 1					
順位 及び 配 列 番 号	I D	種 類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1 *	O A _ 0 0 2 2 8 5	m i R N A	h s a - m i R - 1 8 6	m i R - 1 8 6	C A A A G A A U U C U C C U U U U G G G C U
2	I L M N _ 1 7 0 5 4 3 3	m R N A	N M _ 0 2 4 8 1 4 . 1	C B L L 1	G A T T G C A G G G T C C G C C T T C T C A A A C C C C A C T T C C T G G A C C A C A T C A T C C A
3 *	O A _ 0 0 0 4 4 2	m i R N A	h s a - m i R - 1 0 6 b	m i R - 1 0 6 b	U A A A G U G C U G A C A G U G C A G A U
4 *	O A _ 0 0 0 4 5 4	m i R N A	h s a - m i R - 1 3 0 a	m i R - 1 3 0 a	C A G U G C A A U G U U A A A A G G G C A U
5	I L M N _ 1 8 0 6 9 4 6	m R N A	N M _ 0 0 1 0 7 6 6 8 3 . 1	U B T F	G T C C C A A A G A G T T T G A T G A G G C C C T C C A C A C C T G C G G C C C A A T C C A A G G T
6 *	O A _ 0 0 2 2 3 4	m i R N A	h s a - m i R - 1 4 0 - 3 p	m i R - 1 4 0 - 3 p	U A C C A C A G G G U A G A A C C A C G G
7	I L M N _ 2 3 8 2 7 5 8	m R N A	N M _ 1 3 4 4 4 2 . 2	C R E B 1	T C A A C G C C A G G A A T C A T G A A G A G A C T T C T G C T T T T C A A C C C C C A C C C T C C
8	I L M N _ 1 7 8 8 4 1 0	m R N A	N M _ 0 1 5 4 3 0 . 2	P A M R 1	T C T G G A G G C T G G G A A G T C C A A G A T C A A G G C G T C A G A A G A T T C A T T G T C T G
9 *	O A _ 0 0 0 3 9 7	m i R N A	h s a - m i R - 2 1	m i R - 2 1	U A G C U U A U C A G A C U G A U G U U G A
1 0	I L M N _ 1 6 5 9 8 7 4	m R N A	N M _ 0 2 0 7 0 6 . 1	S F R S 1 5	G C C T G A G G T G A C A G A C A G G G C A G G T G G T A A C A A A A C C G T T G A A C C T C C C A

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1 1	I L M N _ 1 7 0 5 0 4 9	m R N A	N M _ 1 5 3 7 0 4 . 3	T M E M 6 7	A A G C T G T T G A A G G T G A G G G T G G T G T A C G A A G T G C C A C T G T T C C T G T A A G C
1 2	I L M N _ 1 7 7 0 0 3 5	m R N A	N M _ 0 2 0 9 6 7 . 2	N C O A 5	A G A A G G A G G G T T T C T G G C T G T G G T T C T A A A T G G A G C C C C A G G A A G C T G C C
1 3	I L M N _ 1 6 8 7 9 4 1	m R N A	N M _ 0 0 2 9 3 8 . 2	R N F 4	C A C T G T C G T C C T T C C T C A G A G G G C C T C A C G C C A A A C A A A C G G C C T T T T C G
1 4	I L M N _ 1 7 6 6 4 3 5	m R N A	N M _ 0 1 6 3 1 2 . 2	W B P 1 1	G C T A A C A T C C A T T C C C T T T C A T A C C A C C A T T T T C A C C C T G T T T C T T C C C C
1 5	I L M N _ 1 7 3 3 5 1 1	m R N A	N M _ 0 0 5 8 9 5 . 3	G O L G A 3	G G T C C A G G T G A A T C T C G T C A T A A G T G A T C T C A G G C T C T C A C A G G A T C C G G
1 6	I L M N _ 3 2 9 9 3 3 0	m R N A	X M _ 9 4 4 3 7 7 . 3	Z N F 8 0 7	A A A C T C A A G G A C T G C G T G A C C G A C A C A A T G A C C C C C G A G G A G A C A G A G G C
1 7	I L M N _ 1 8 0 5 9 9 6	m R N A	N M _ 0 1 5 4 7 7 . 1	S I N 3 A	C C T T G C T G C C T A C C C T T T T C T C T C C T C T G G T T C T C A A C C T C A A C G A G T T C
1 8	I L M N _ 1 7 7 0 0 8 5	m R N A	N M _ 0 0 6 7 6 3 . 2	B T G 2	C C A A A C A C T C T C C C T A C C C A T T C C T G C C A G C T C T G C C T C C T T T T C A A C T C
1 9	I L M N _ 1 7 7 1 6 8 9	m R N A	N M _ 0 1 8 1 9 9 . 2	E X D 2	C A G G T T G C A A T A T G A G G A C T T C T C T G T C T C C T C T G A A G C C T G G G A C A C T G
2 0	I L M N _ 1 6 9 2 1 3 3	m R N A	N M _ 0 0 1 0 3 2 3 7 2 . 1	Z N F 2 2 6	G A A A G A A A T G A G C A G C T T T G G A T A A T G A C G A C A G C A A C C C G A A G A C A G G G
2	I L M	m R N	N M _	A D A	G C T C G T G T G C T A C

10

20

30

40

【表 1 - 3】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1	N _ 3 2 4 5 6 9 3	A	1 8 2 5 0 3. 2	T 2	A A T G G C A G A G T T G A G C A G T G G T G A C A A A C C A T G C G A C
2 2	I L M N _ 1 7 4 9 8 6 8	m R N A	N M _ 0 0 1 0 1 0 9 2 4. 1	F A M 1 7 1 A 1	G C C A A G T G C C A T T T G G G G T C A G C A T C C T C G T T T C A A C A C A G T G T G C T C T C
2 3	I L M N _ 1 7 5 8 0 3 8	m R N A	N M _ 0 0 6 0 2 0. 2	A L K B H 1	G T C A G T C C A A G G A G G T A T G T T C T T C C A C A A C A G C C T T C T C A G C C T C T G C T
2 4	I L M N _ 3 1 7 9 3 7 1	m R N A	N M _ 0 3 1 2 6 3. 2	H N R N P K	C A G A A G A G G G A G A C C T G G A G A C C G T T A C G A C G G C A T G G T T G G T T T C A G T G
2 5	I L M N _ 1 8 1 5 3 0 3	m R N A	X M _ 9 3 6 3 5 4. 2	L O C 6 4 2 1 9 7	G C T T G C T G C T T T C T G G C T A A T G A A A G C C A A G G A C T A T C C A G C A C A C A C A G
2 6	I L M N _ 1 8 0 2 2 0 5	m R N A	N M _ 0 0 4 0 4 0. 2	R H O B	G C A G G T C A T G C A C A C A G T T T T G A T A A A G G G C A G T A A C A A G T A T T G G G G C C
2 7	I L M N _ 2 2 2 7 5 7 3	m R N A	N M _ 0 0 4 8 3 2. 1	G S T O 1	G A C T G G C A A G G T T T C C T A G A G C T C T A C T T A C A G A A C A G C C C T G A G G C C T G
2 8	I L M N _ 1 7 4 5 3 8 5	m R N A	N M _ 0 0 5 9 6 8. 2	H N R P M	G C C T G C C G G A T G A T G A A T G G C A T G A A G C T G A G T G G C C G A G A G A T T G A C G T
2 9 *	O A _ 0 0 0 5 2 4	m i R N A	h s a - m i R - 2 2 1	m i R - 2 2 1	A G C U A C A U U G U C U G C U G G G U U U C
3 0	I L M N _ 1 6 7 1 8 5 4	m R N A	X M _ 9 4 4 5 9 3. 1	M A R C H 1 4	T G T C T G T C A T T G T G G C C C G T T T C A C A C T G T C T C T A T A T C T G T T T C C C C T G
3 1	I L M N _ 1	m R N A	N M _ 0 0 4	X P C	A G T C T T C A T C T G T C C G A C A A G T T C A C

10

20

30

40

【表 1 - 4】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	7 9 0 8 0 7		6 2 8 . 3		T C G C C T C G G T T G C G G A C C T A G G A C
3 2	I L M N _ 1 8 9 0 8 7 7	m R N A	A A 7 8 9 2 7 0	A A 7 8 9 2 7 0	G C C G C C T C G C A A G C T C T T G T T T T C T A A C C C C A C C T T C T G G G A G C C G T G T T
3 3	I L M N _ 2 3 4 7 5 9 2	m R N A	N M _ 0 2 1 0 7 7 . 3	N M B	G T C A T G A T C T G C T C G G A A T C C T C C T G C T A A A G A A G G C T C T G G G C G T G A G C
3 4 *	O A _ 0 0 2 3 5 2	m i R N A	h s a - m i R - 6 5 2	m i R - 6 5 2	A A U G G C G C C A C U A G G G U U G U G
3 5	I L M N _ 1 6 5 3 5 7 5	m R N A	N M _ 1 7 3 0 4 4 . 1	I L 1 8 B P	G G A G T A T G G G A G A G A G G G A C T G C C A C A C A G A A G C T G A A G A C A A C A C C T G C
3 6	I L M N _ 1 7 0 0 0 4 4	m R N A	N M _ 0 2 4 5 4 5 . 2	S A P 1 3 0	C C A C C C C A T T C G G T T C T T C T G C C T G A C C T T C A A A T G C C C A T G T T G G C C T T
3 7 *	O A _ 0 0 2 3 2 2	m i R N A	h s a - m i R - 6 7 1 - 3 p	m i R - 6 7 1 - 3 p	U C C G G U U C U C A G G G C U C C A C C
3 8 *	O A _ 0 0 2 1 6 9	m i R N A	h s a - m i R - 1 0 6 a	m i R - 1 0 6 a	A A A A G U G C U U A C A G U G C A G G U A G
3 9	I L M N _ 1 7 4 5 1 1 2	m R N A	N M _ 0 0 1 0 3 5 2 5 4 . 1	F A M 1 0 2 A	A G A C T C C T C C A G A C C A G G A A C C C C A G A A G G A G A C A G A G C C T G C C A C A T C C
4 0	I L M N _ 1 7 3 4 7 4 0	m R N A	N M _ 0 0 3 6 0 8 . 2	G P R 6 5	C C G G A A A G T C T A C C A A G C T G T G C G G C A C A A T A A A G C C A C G G A A A A C A A G G
4 1	I L M N _ 3	m R N A	X R _ 0 3 8	L O C 6 4 8	C A C C T G T G G G C A G T G G G C A G T G T C T T

10

20

30

40

【表 1 - 5】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	2 7 4 9 1 4		9 0 6 . 1	9 2 7	G G T G A A A G G G A G C G G A T A C T A C T T
4 2	I L M N _ 1 7 9 4 0 6 3	m R N A	N M _ 0 3 2 1 3 9 . 2	A N K R D 2 7	G A G G C C A G G C T G A A A T G T C A T A T C T G A A G G A A G A A A G C A G C A G C T G G A C A
4 3	I L M N _ 1 7 6 1 4 1 1	m R N A	N M _ 0 2 4 8 3 4 . 2	C 1 0 o r f 1 1 9	C A G C G T T A A T C C T G T A T G G C C A G G A A A C T G A G T A G A C T C C T G T G T A A C C C
4 4	I L M N _ 1 7 9 9 3 2 7	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 4 4 7 7 . 1	O R 1 0 X 1	C T G A T C T C A G T G T C T G G T T T G C T G G G T A C C C T T C T G C T C A T C A T C C T G A C
4 5 *	O A _ 0 0 2 8 9 5	m i R N A	h s a - M I R - 7 2 0	M I R - 7 2 0	U C U C G C U G G G G C C U C C A
4 6	I L M N _ 1 7 3 8 6 7 7	m R N A	N M _ 0 0 6 4 4 5 . 3	P R P F 8	A T C G G G A G G A C C T G T A T G C C T G A C C G T T T C C C T G C C T C C T G C T T C A G C C T
4 7	I L M N _ 1 7 5 1 3 6 8	m R N A	N M _ 0 0 2 1 3 8 . 3	H N R N P D	G G T G A C C A G C A G A G T G G T T A T G G G A A G G T A T C C A G G C G A G G T G G T C A T C A
4 8	I L M N _ 1 7 3 7 0 7 6	m R N A	N M _ 0 0 7 0 7 2 . 2	H H L A 2	T A A G A T T G C T A G G G A A A A G G G C C C T A T G T G T C A G G C C T C T G A G C C C A A G C
4 9	I L M N _ 2 0 9 5 1 3 3	m R N A	N M _ 0 0 3 1 2 7 . 1	S P T A N 1	A G C T G C C C T C A T T C C G A C T T C A G A A A A T C G A A G C A G C T G G C G C C T C C C C T
5 0 *	O A _ 0 0 2 1 4 8	m i R N A	h s a - m i R - 1 4 4 _ A	m i R - 1 4 4 _ A	G G A U A U C A U C A U A U A C U G U A A G
5 1	I L M N _ 1	m R N A	N M _ 0 1 2	T R I M 3 2	C C T C T C G C C T G G A G G A T C T G T G C C A T

10

20

30

40

【表 1 - 6】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種 類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	6 5 4 7 3 7		2 1 0 . 3		C T T G G A T T G A G A A T T G C A G A T G T G
5 2	I L M N _ 1 7 5 9 9 4 8	m R N A	X R _ 0 0 0 5 2 8 . 1	R N F 5 P 1	T T C A C C A T C G T C T T C A A T G C C C A T G A G C C T T T C C G C C G G G G T A C A G G T G T
5 3	I L M N _ 1 8 5 7 5 2 3	m R N A	B M 7 2 8 8 6 9	B M 7 2 8 8 6 9	G A A T C C G A T G G T C C T C G A A A C A T G G A A A G T C T G C T G T C A C G C T G C A C G C C
5 4	I L M N _ 1 6 8 3 9 2 0	m R N A	X M _ 9 4 0 2 2 9 . 1	L O C 6 5 1 1 0 0	T G C C G G A A G T C A C T A C C A A G G A T C G A T A C A C A T T T A G G A A A G C C A G C A C T
5 5 *	O A _ 0 0 1 0 1 4	m i R N A	h s a - m i R - 2 0 b	m i R - 2 0 b	C A A A G U G C U C A U A G U G C A G G U A G
5 6	I L M N _ 2 1 9 6 7 3 4	m R N A	N M _ 0 0 4 5 0 4 . 3	H R B	G G A G A G G G T G A C C T G G C T G C T G G T T T A C C A C T G T A C C A A C A T C T C T G G A G
5 7	I L M N _ 1 7 9 4 9 6 7	m R N A	N M _ 0 1 9 8 4 3 . 2	E I F 4 E N I F 1	G G G C T T T T A C T T T G G A G C A C T C T G T G T G A A G C T G T T T G G T G G A A C C C A T G
5 8	I L M N _ 1 6 9 0 9 0 7	m R N A	N M _ 0 3 1 4 0 9 . 3	C C R 6	G A G G A G C T G C A G A T T A G C T A G G G G A C A G C T G G A A T T A T G C T G G C T T C T G A
5 9	I L M N _ 2 0 8 6 1 4 3	m R N A	N M _ 0 0 5 5 0 8 . 4	C C R 4	C C T G A A C T G A T G G G T T T C T C C A G A G G G A A T T G C A G A G T A C T G G C T G A T G G
6 0 *	O A _ 0 0 2 1 8 6	m i R N A	h s a - m i R - 3 4 5	m i R - 3 4 5	G C U G A C U C C U A G U C C A G G G C U C
6 1	I L M N _ 1 7 7 0 2 0 6	m R N A	N M _ 0 1 5 7 2 1 . 2	G E M I N 4	G C T T C T T A C C T G T G C G G G A G C G A A A A A G C T G G G C T T C A A C A T G G C A G G T C

10

20

30

40

【表 1 - 7】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
6 2 *	O A _ 0 0 2 4 0 6	m i R N A	h s a - l e t - 7 e	l e t - 7 e	U G A G G U A G G A G G U U G U A U A G U U
6 3	I L M N _ 1 6 7 4 7 5 9	m R N A	N M _ 1 5 3 6 1 3 . 2	L P C A T 4	C A C T C T A T G G G A A A C T C T T C A G C A C C T A C C T G C G C C C C C C A C A C A C C T C T
6 4	I L M N _ 3 2 5 0 7 9 8	m R N A	N M _ 0 0 1 1 4 2 7 0 5 . 1	C 1 1 o r f 5 8	C C C A G C C C T A G A T G T A T C C A A G C C C T C C T A C C C T C A C C A G T T A T T T C T G G
6 5	I L M N _ 3 2 4 3 5 6 2	m R N A	X M _ 0 0 1 7 1 5 6 2 0 . 1	L O C 1 0 0 1 3 2 7 8 2	C T C C A A A T G T C A A A G G C A A G C T G G G C A T C A T G A T C T G G C A T A A A G A A C C C
6 6	I L M N _ 2 0 6 0 7 7 0	m R N A	N M _ 0 3 0 6 6 5 . 3	R A I 1	G C C C A G G G C C G C C C T A G C A A C T T C C T G T A C A T A T G A C T G T A A A A T G G T A A
6 7 *	O A _ 0 0 0 5 8 0	m i R N A	h s a - m i R - 2 0 a	m i R - 2 0 a	U A A A G U G C U U A U A G U G C A G G U A G
6 8	I L M N _ 2 2 6 2 4 6 2	m R N A	N M _ 0 0 1 0 8 0 5 4 3 . 1	C 1 9 o r f 2 9	C C C C G A G T T T T G C C C A T A T C A G G A C A G T G G C T C C T T C T C A C T C C C C T T T C
6 9	I L M N _ 1 7 0 0 6 0 4	m R N A	N M _ 0 0 6 3 2 8 . 2	R B M 1 4	G C G G C A C A G T C C C A C T T C C C C A T C T C C C C A A G T A G G T G G T G T T A G A A A A C
7 0	I L M N _ 3 2 9 0 3 4 0	m R N A	X M _ 0 0 1 7 2 6 2 7 3 . 1	L O C 1 0 0 1 3 2 0 3 2	G A A A G C G G C C T C A T G A A G G G G A A G C C A A G G G T G C C G A G A C C A C A A A G C G C
7 1	I L M N _ 1	m R N A	X M _ 9 4 3	L O C 6 4 7	A G T C G T C C T T C C C T G G T G C G C A G C C C

10

20

30

40

【表 1 - 8】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	8 1 2 4 8 2		0 3 3 . 1	8 0 6	A G G C C T G T G G G T C C A G C C T C A C C C
7 2	I L M N _ 1 7 7 5 9 3 9	m R N A	N M _ 0 0 6 8 4 2 . 2	S F 3 B 2	A T G G C C A T G A C C C A G A A G T A T G A G G A G C A T G T G C G G G A G C A G C A G G C T C A
7 3	I L M N _ 3 2 8 8 7 3 1	m R N A	X R _ 0 3 8 1 5 6 . 1	L O C 1 0 0 1 3 1 5 0 7	G C C T G A G G G A C C G C A G A C T C G T C G G G C T G C T T T C T G A T G A G A G G A T T A A C
7 4	I L M N _ 1 7 8 3 4 6 9	m R N A	X M _ 9 3 6 3 5 4 . 2	L O C 6 4 2 1 9 7	G G A A A G T G A A G A T G C A G A G T T A C T G T G G C G T T T G G C A C G G G C A T C A C G T G
7 5	I L M N _ 1 6 8 2 1 2 6	m R N A	X M _ 3 7 2 1 0 9 . 3	L O C 2 8 6 2 9 7	A C C G A T C T T T C T C T G T C T C A C C A A C C T G A C A A A A A A G G T G T G C C A A G G G A
7 6	I L M N _ 1 9 0 2 1 4 6	m R N A	D Q 2 8 6 4 3 1	D Q 2 8 6 4 3 1	A C G A T G C C A G A C T C A T G T T T G G A G A T G G A A C T C A G C T G G T G G T G A A G C C C
7 7	I L M N _ 3 2 3 0 7 2 3	m R N A	X M _ 0 0 1 7 1 4 6 6 4 . 1	L O C 1 0 0 1 3 0 5 2 2	C C T C A A G G A G A T G C C T C T G G T C C A G G C T T T G T A A A C T T G G G C C T T C C A G C
7 8	I L M N _ 1 7 0 6 0 1 5	m R N A	N M _ 1 5 3 6 9 0 . 4	F A M 4 3 A	G T A G C A C T G T T C T G G T T C T G T T T G C A C G C C A G T G G G G A G A G A A T A A A G A G
7 9	I L M N _ 3 2 9 5 8 9 4	m R N A	X R _ 0 3 7 7 8 8 . 1	L O C 1 0 0 1 3 3 2 1 3	G G G C A G T A C A G G G C C A G A T C C A C G G C A G G C A C A G G G C A A A G C C A G G C C C A
8 0	I L M N _ 1 7 4 3 3 2 4	m R N A	N M _ 0 1 5 1 8 8 . 1	T B C 1 D 1 2	C C A A G G A A T G C A C T A A G C C T T C A G T C T T T T T A G A C T G A C A G T A C T G G C A G
8 1	I L M N _ 1 7 2 1	m R N A	N M _ 0 0 4 6 9 3 .	K R T 7 5	C T A T A C C C A T T C C C A G G C C T A A G C C A G C C T C T C C C T C C T

10

20

30

40

【表 1 - 9】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	2 4 7		2		G A C A G T G C C C A
8 2	I L M N _ 1 7 7 9 0 1 4	m R N A	N M _ 0 0 3 3 0 9 . 2	T S P Y L 1	G A G G C A T G G G C C A G G T A A A A A T T G G G C C T A G A G T G A A G A C T G T G C T G T C G
8 3	I L M N _ 1 8 0 5 7 2 5	m R N A	N M _ 0 0 1 4 7 8 . 3	B 4 G A L N T 1	G G C T G G G G T G A G G G C T G G T G G T T G G T G A A A G C C A T T C T T A G T T G T G T C T C
8 4 *	O A _ 0 0 1 2 7 1	m i R N A	h s a - m i R - 3 6 3	m i R - 3 6 3	A A U U G C A C G G U A U C C A U C U G U A
8 5	I L M N _ 1 7 3 0 9 9 9	m R N A	N M _ 0 0 3 2 9 2 . 2	T P R	G T C A G A T C T C C C C T C C A C C A G C C A G G A T C C T C C T T C T A G C T C A T C T G T A G
8 6	I L M N _ 2 1 4 9 9 5 2	m R N A	N M _ 2 0 7 4 4 8 . 1	F L J 4 5 2 5 6	G T G A G C C A A A A T G G C G C T A C T G C A C T C C A G A C C G G G G A C A G A G T G A G A C T
8 7 *	O A _ 0 0 2 8 8 3	m i R N A	h s a - M I R - 1 2 7 4 A	M I R - 1 2 7 4 A	G U C C C U G U U C A G G C G C C A
8 8	I L M N _ 1 6 8 5 4 7 2	m R N A	N M _ 0 2 4 9 9 3 . 3	L R R T M 4	A G G A G A G A G G T T T G A G T T C T G G G T A T C C T C C C T T T C T G T A A C A G C C T C A A
8 9 *	O A _ 0 0 0 4 5 1	m i R N A	h s a - m i R - 1 2 6 _ A	m i R - 1 2 6 _ A	C A U U A U U A C U U U U G G U A C G C G
9 0	I L M N _ 1 7 9 3 3 8 6	m R N A	N M _ 0 0 5 1 2 0 . 1	M E D 1 2	C T T T G G T C C G G C A A C T T C A A C A A C A G C T C T C T A A T A C C C A G C C A C A G C C C
9 1	I L M N _ 3 2 4 8	m R N A	X M _ 9 3 0 6 7 8 .	L O C 6 4 2 4 4 1	C C A G C C A T C C C A T T A C T G G G T A G G T A C C C A A A T C A T G C T

10

20

30

40

【表 1 - 10】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	5 9 5		3		G C T A T A A A G A C
9 2	I L M N _ 1 6 6 9 5 0 8	m R N A	N M _ 0 1 9 0 8 8 . 2	P A F 1	C C C A G G G C A T T C A G G G C T G G T T C A G A C A C C A T T A T T G T G A G C A G C A A A G C
9 3	I L M N _ 2 0 5 4 1 2 1	m R N A	N M _ 2 0 7 4 0 9 . 1	C 6 o r f 1 2 6	C C G C C G G T G C C A T A T G A T T T A G A G G A A G A T G C A G G C T G G T C A C T G C T C C C
9 4	I L M N _ 2 1 4 7 4 2 4	m R N A	N M _ 0 0 5 0 2 4 . 1	S E R P I N B 1 0	T C A A G T C A A C C C T G A G C A G T A T G G G G A T G A G T G A T G C C T T C A G C C A A A G C
9 5	I L M N _ 1 7 9 1 0 8 4	m R N A	X M _ 9 3 6 2 7 9 . 2	L O C 6 4 2 1 3 2	C A T A C C A C C C T T T G G T G G G A G G A A A C T A A A A A T A T A G C A A A T G C A G A A C C
9 6 *	O A _ 0 0 2 4 4 4	m i R N A	h s a - m i R - 2 6 b _ A	m i R - 2 6 b _ A	C C U G U U C U C C A U U A C U U G G C U C
9 7	I L M N _ 1 8 1 3 5 9 4	m R N A	N M _ 0 1 5 3 8 7 . 2	P R E I 3	C T A G A C G C T G G C A C T A T G G T C A T G G C G G A G G G G A C G G C A G T G C T G A G G C G
9 8	I L M N _ 1 6 9 0 6 8 9	m R N A	X M _ 9 3 1 7 0 4 . 1	L O C 6 4 2 7 8 2	C T T T T C G C A G A T G C T G G G A A C G C A G C T C T G C T G C C G G C G G G G T G G A C A G A
9 9	I L M N _ 1 8 0 9 0 1 3	m R N A	N M _ 0 2 1 0 1 9 . 3	M Y L 6	T C G T C C G C A T G G T G C T G A A T G G C T G A G G A C C T T C C C A G T C T C C C C A G A G T
1 0 0	I L M N _ 1 8 0 3 8 1 8	m R N A	N M _ 0 1 5 0 3 9 . 2	N M N A T 2	G G A T C C A C A T G G T C T T G A G G G T T G G C A T G A G G A G G G G G A A G C T T T T T T T G A
1 0 1	I L M N _ 1 6 7 3 7 1 1	m R N A	N M _ 0 0 7 3 5 5 . 2	H S P 9 0 A B 1	A A T G C T G C A G T T C C T G A T G A G A T C C C C C C T C T C G A G G G C G A T G A G G A T G C

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1 0 2	I L M N _ 2 0 5 1 6 8 4	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 1 7 0 1 . 1	L O C 4 0 1 1 5 2	G T G G T A G A T C A C T T G A G G T C A A G A G T T G T G A C A C C A G C C T G G C C A A C C T G
1 0 3	I L M N _ 1 6 7 5 8 5 2	m R N A	X M _ 9 3 7 2 8 5 . 1	L O C 6 5 0 5 1 8	C A A A T A T C A T G G A G G T C C C T G G A T T G A A A A A A G A G C C T C T C C C A C T C C T C
1 0 4	I L M N _ 1 6 8 1 3 2 4	m R N A	N M _ 0 0 4 9 2 7 . 2	M R P L 4 9	C C C T G C C C C C A A A C T G G C T A A G A C A G C T T T C A G T T C C T G A C T C C C C A A C T
1 0 5	I L M N _ 2 4 0 1 1 5 5	m R N A	N M _ 0 0 1 0 2 0 6 5 8 . 1	P U M 1	C T G A G A C G G G C A A G T G G T T G C T C C A G G A T T A C T C C C T C C T C C A A A A A A G G
1 0 6	I L M N _ 1 6 5 4 0 1 3	m R N A	N M _ 0 3 0 6 3 0 . 1	C 1 7 o r f 2 8	C T C T G G C C T C T G G G T C C C A C C A C C C A G C C C C C C G T G T C A G A A C A A T C T T T
1 0 7	I L M N _ 1 7 4 8 4 2 7	m R N A	N M _ 0 0 1 0 9 9 2 8 3 . 1	Z N F 2 3 9	T C C T C G C T A A C T G A C A T T A G C C C A T T C A G G T C T T C A C A G C G C T C A T A C T G
1 0 8	I L M N _ 1 7 3 2 2 9 6	m R N A	N M _ 0 0 2 1 6 7 . 2	I D 3	C C C C A A C T T C G C C C T G C C C A C T T G A C T T C A C C A A A T C C C T T C C T G G A G A C
1 0 9	I L M N _ 1 7 0 3 4 7 7	m R N A	N M _ 0 0 4 7 2 3 . 2	A R H G E F 2	T G G G G G A T T T T T C A G T G G A A C C C T T G C C C C C A A A T G T C G A C C A G C C C C C A
1 1 0	I L M N _ 1 6 8 8 7 2 2	m R N A	N M _ 0 0 0 6 4 0 . 2	I L 1 3 R A 2	G T A A C C G G T C T G C T T T T G C G T A A G C C A A A C A C C T A C C C A A A A A T G A T T C C
1 1 1	I L M N _ 3 3 0 7	m R N A	N M _ 1 9 9 3 4 4 .	S F T 2 D 2	G G C C A G T T T T A T G A A G C T T T G G A A G G C A C T A T G G A C A G A

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

表 1					
順位 及び 配 列 番 号	I D	種 類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	6 5 9		2		A G C T G G T G G A C
1 1 2	I L M N _ 1 7 6 8 2 8 4	m R N A	N M _ 1 7 8 1 2 9 . 3	P 2 R Y 8	C T A T G G A G A G C A G C C G A C A C C C C C T C T T A C A G C C G T G G A T G T T T C C T G G A
1 1 3	I L M N _ 2 3 3 8 6 8 7	m R N A	N M _ 0 3 1 8 6 4 . 1	P C D H A 1 2	G G C C A C G G T G C T G G T G T C G C T G G T G G A G A A C G G C C A G G C C C C A A A G A C G T
1 1 4	I L M N _ 1 7 3 0 4 9 1	m R N A	N M _ 0 5 2 9 0 5 . 3	F M N L 2	A G T G T A C C T A T T T A C A G A A A G A T T A A A C T G C C A C C T G C G G G C A C A T T C C C
1 1 5	I L M N _ 1 8 0 7 2 4 9	m R N A	N M _ 0 0 2 2 7 8 . 3	K R T 3 2	T A C T G A A G T C C C T T T G T G C C A G T G G A T C C T G G A G G G C C T G G G G C T G G G C A
1 1 6	I L M N _ 1 8 0 0 5 7 3	m R N A	N M _ 0 0 1 0 2 4 . 3	R P S 2 1	C G C C G A T A T C T C T G C C G G G T G A C T A G C T G C T T C C T T T C T C T C T C G C G C G C
1 1 7	I L M N _ 1 7 8 6 0 3 9	m R N A	N M _ 0 2 5 1 2 6 . 2	R N F 3 4	C G A C T G C C A G G G C C T T A G A C T C C A C A T G T C C A T T T T T G T T C A G G T A T A G C
1 1 8	I L M N _ 1 7 7 5 5 4 2	m R N A	N M _ 0 0 5 4 4 9 . 3	F A I M 3	C T C G G G C A T C C T T C C C A G G G T T G G G T C T T A C A C A A T A G A A G G C T C T T G C
1 1 9 *	O A _ 0 0 2 2 5 8	m i R N A	h s a - m i R - 3 4 0	m i R - 3 4 0	U U A U A A A G C A A U G A G A C U G A U U
1 2 0	I L M N _ 1 7 1 8 6 5 7	m R N A	X M _ 0 0 1 1 2 7 0 8 7 . 1	F L J 4 3 9 5 0	C C A C A G C C T G T T T C T C C C T T G G A T T C C A A G T T C C C C A T A G A C C A T T C C C T
1 2 1	I L M N _ 1 8 5 2 7 5 6	m R N A	B G 2 0 1 0 8 9	B G 2 0 1 0 8 9	C C C T C A A C T G C C T T T C C A C C A C C T A T G A T G T T G G G G T T T C A G A A A A G G T G

10

20

30

40

【表 1 - 13】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1 2 2	I L M N _ 1 7 4 6 4 5 7	m R N A	N M _ 0 0 1 5 2 1. 2	G T F 3 C 2	C C A C A G A C A C C C T A C C G A T A G A A C A G T G G C T C A G A T C T T A C T T G C T C C T G
1 2 3	I L M N _ 1 6 8 3 3 2 8	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 5 9 1 0. 1	I P 6 K 2	T A C G A G A C C C T C C C T G C T G A G A T G C G C A A A T T C A C T C C C C A G T A C A A A G G
1 2 4	I L M N _ 1 7 0 5 5 9 4	m R N A	N M _ 0 2 4 6 6 2. 1	N A T 1 0	G T G C T G T T C C A C T C T T G G C T C C A G C A G A C C C A C T G T C C C A G A A A A G C C T G
1 2 5	I L M N _ 1 7 4 0 3 1 9	m R N A	N M _ 0 3 2 0 3 6. 2	I F I 2 7 L 2	C C C A G C T G A A C C C G A G G C T A A A G A A G A T G A G G C A A G A G A A A A T G T A C C C C
1 2 6	I L M N _ 1 6 6 7 0 4 3	m R N A	N M _ 0 1 4 7 4 0. 2	E I F 4 A 3	C A G C A G A T C A G T G G G A T G A G G G A G A C T G T T C A C C T G C T G T G T A C T C C T G T
1 2 7	I L M N _ 1 6 6 4 0 1 6	m R N A	N M _ 0 1 5 3 1 8. 2	A R H G E F 1 8	C G T G G G A T C T G C A C A C G T C T T T G T C A G T T G T G G T C A T G A T C T T A G T C A C C
1 2 8	I L M N _ 2 3 9 1 7 5 0	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 5 1 5 8. 1	S F M B T 1	G G A G T G T G G C A G A C G T T G T G C G G T T C A T C A G A T C C A C T G A C T G T G C T C C A
1 2 9	I L M N _ 1 8 0 3 0 1 5	m R N A	N M _ 1 7 3 5 8 0. 1	C 1 1 o r f 4 4	T C T G C T G G A C T G A T G T C T T C T G C A G G T T G C A G A T C C T G A C C A T G G G C T G C
1 3 0	I L M N _ 1 6 7 8 7 6 6	m R N A	N M _ 0 0 6 5 1 9. 1	D Y N L T 1	C G T C A G T G C C T T C G G A C T G T C T A T T T G A C C T G C A G T C C A G C C T A T G G C C T
1 3 1	I L M N _ 1 9 0 8 1 3 3	m R N A	A W 0 2 6 0 6 4	A W 0 2 6 0 6 4	A C T T G T C C A C G G T C C T C T C G G T G A C C C T G T T G G G C A G G G C C A A G G G A C A A

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1 3 2	I L M N _ 1 7 3 9 5 1 3	m R N A	N M _ 0 1 2 1 1 4 . 1	C A S P 1 4	C G C C T A C C G A C A T G A T C A G A A A G G C T C A T G C T T T A T C C A G A C C C T G G T G G
1 3 3	I L M N _ 1 7 1 2 3 8 9	m R N A	N M _ 0 0 1 0 4 0 1 3 8 . 1	C K L F	A C A T C G C C C C T T C T G C T T C A G T G T G A A A G G C C A C G T G A A G A T G C T G C G G C
1 3 4	I L M N _ 1 7 1 4 4 3 3	m R N A	N M _ 0 2 3 0 0 9 . 4	M A R C K S L 1	C C T G A G C C A G A A G T G G G G T G C T T A T A C T C C C A A A C C T T G A G T G T C C A G C C
1 3 5	I L M N _ 1 7 0 7 9 5 4	m R N A	X M _ 9 4 2 9 6 8 . 1	L O C 6 4 7 4 4 7	A A A T T G A A C A C A A A T G T G G T G G A G A C G G G A C A G G G C A G G T G G A A A T T C A C
1 3 6	I L M N _ 2 3 6 7 1 4 1	m R N A	N M _ 2 0 1 6 3 2 . 1	T C F 7	G G C A G A G A A G G A G G C C A A G A A G C C A A C C A T C A A G A A G C C C C T C A A T G C C T
1 3 7	I L M N _ 3 2 3 6 4 6 8	m R N A	N M _ 0 0 1 1 2 3 2 2 8 . 1	T M E M 1 4 E	C C C A G G C T G G T C T T A C A G C C T C A G G C A A T C C T C T G G T C T T G A C G T C C C A A
1 3 8	I L M N _ 3 2 0 9 8 3 2	m R N A	X M _ 0 0 1 7 2 6 5 0 4 . 1	L O C 1 0 0 1 3 1 8 0 1	A G G C C G A G T G G T T T G A G G A C G A T G T C A T A C A G C G C A A G A G G G A G C T G T G G
1 3 9	I L M N _ 1 7 2 9 8 0 1	m R N A	N M _ 0 0 2 9 6 4 . 3	S 1 0 0 A 8	T A A C T T C C A G G A G T T C C T C A T T C T G G T G A T A A A G A T G G G C G T G G C A G C C C
1 4 0	I L M N _ 1 7 7 7 2 6 3	m R N A	N M _ 0 0 5 9 2 4 . 4	M E O X 2	C T T C C T G A T T G A C A A C A G T G T T A G A C A A G G T G C A A A G C G A A A C T G G T T G C
1 4 1	I L M N _ 1 6 9 7	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 5	S F 3 A 1	A G T G C T C C T G T T G C A G G A C T G C T G G G A A A A C A G G T G G T G

10

20

30

40

【表 1 - 15】

表 1					
順位 及び 配列 番号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	2 8 6		4 0 9 . 1		T G G G A C T T A A G
1 4 2	I L M N _ 1 7 7 5 5 2 2	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 5 3 3 2 . 1	M A G E D 1	C A G C C A G T G C C A A C T T C G C T G C C A A C T T T G G T G C C A T T G G T T T C T T C T G G
1 4 3	I L M N _ 1 7 3 6 5 7 5	m R N A	N M _ 0 0 5 7 6 2 . 2	T R I M 2 8	G A A G T T G T C A C C T C C C T A C A G C T C C C C A C A G G A G T T T G C C C A G G A T G T G G
1 4 4	I L M N _ 1 7 4 7 1 6 2	m R N A	N M _ 0 1 6 3 5 5 . 3	D D X 4 7	A C A G C T T T G C T A C T G C G A A A T C T T G G C T T C A C T G C C A T C C C C C T C C A T G G
1 4 5	I L M N _ 1 8 1 1 3 4 6	m R N A	X M _ 9 3 7 6 8 4 . 1	L O C 6 4 8 6 1 5	C C C C A C C C C C G C G T T C C G A C C G C T G A A G C T C C A A A T T C A G G C C T T A A A T A

10

20

【0047】

表 2 は、肺癌または肺疾患の患者を、参照標準から、特に、肺疾患のある対象を含む健康なまたは健康ではない対象から診断するのに使用する mRNA 及び / または miRNA プロファイルの組み合わせを形成するのに有用な約 147 の mRNA 及び miRNA の一覧を特定する。147 の混合された配列からなるこの集合は、以下の実施例において表 5 で参照される、肺癌と、小結節 (NOD) のある患者との比較で参照される。表 2 は、癌と対象を比較する SVM 分類指標訓練で、FFS 手順により選択された、順位付けされた特徴 (mRNA 及び miRNA) の一覧である。mRNA は、NCBI 受入番号で特定される ; miRNA は、ABI Open Array 識別番号 (OA#) で特定される。以下の実施例で使用される標的配列を、以下の表に提示する。しかしながら、受入番号で同定される配列の他の部分も同様に使用可能である。これらの配列は、公的に入手可能である。表 2 の標的配列 1 ~ 147 の配列番号は、それぞれ配列番号 146 ~ 292 であり、順位 / 配列番号の欄で特定される。これらの配列は、公的に入手可能である。

30

40

【表 2 - 1】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
1 / 1 4 6	O A _ 0 0 2 2 8 3	m i R N A	h s a - l e t - 7 d	l e t - 7 d	A G A G G U A G U A G G U U G C A U A G U U
2 / 1 4 7	O A _ 0 0 2 2 8 5	m i R N A	h s a - m i R - 1 8 6	m i R - 1 8 6	C A A A G A A U U C U C C U U U U G G G C U
3 / 1 4 8	I L M N _ 1 7 7 5 3 0 4	m R N A	N M _ 0 0 6 1 4 5 . 1	D N A J B 1	C A T T T C T G T A A G G C A A T C T T G G C A C A C G T G G G G C T T A C C A G T G G C C C A G G
4 / 1 4 9	I L M N _ 1 6 6 4 4 4 0	m R N A	N M _ 0 0 5 6 5 7 . 1	T P 5 3 B P 1	C C T G T G C C T T G C C A G T G G G A T T C C T T G T G T G T C T C A T G T C T G G G T C C A T G
5 / 1 5 0	I L M N _ 1 8 0 8 1 9 6	m R N A	N M _ 0 0 4 8 3 2 . 1	G S T O 1	G A A G C A T A C C C A G G G A A G A A G C T G T T G C C G G A T G A C C C C T A T G A G A A A G C
6 / 1 5 1	O A _ 0 0 0 4 4 2	m i R N A	h s a - m i R - 1 0 6 b	m i R - 1 0 6 b	U A A A G U G C U G A C A G U G C A G A U
7 / 1 5 2	I L M N _ 1 7 8 6 2 1 1	m R N A	N M _ 0 0 3 9 2 2 . 3	H E R C 1	C G A C A C T G A C T A C T G A C C G T G C G G G T G C T C T C A C C C T C C C T T C T C T C C C T
8 / 1 5 3	I L M N _ 1 7 7 3 7 9 7	m R N A	X M _ 9 4 2 1 5 0 . 1	L O C 6 5 2 6 1 5	T C T G T G C C C T T T A T C C G C A C T T C C C A G C T C A C A G C A C T G A C A A C C G G T G A
9 / 1 5 4	I L M N _ 2 3 0 4 6 2 4	m R N A	N M _ 0 2 2 1 7 0 . 1	E I F 4 H	G C A C C C A G C G G A A T G T G C T T A G T A T T T G G T C A C C A G C C G T C A T C C T G G G C
1 0 ／ 1 5 5	I L M N _ 3 1 7 9 3 7 1	m R N A	N M _ 0 3 1 2 6 3 . 2	H N R N P K	C A G A A G A G G G A G A C C T G G A G A C C G T T A C G A C G G C A T G G T T G G T T T C A G T G
1 1 ／ 1 5 6	I L M N _ 1 7 8 3 6 0 6	m R N A	N M _ 0 1 8 6 8 2 . 3	M L L 5	G C A T C T C C A G T G C C T G G A C A G A T T C C A A T T C A C A G A G C A C A G G T G C C A C C
1 2 ／ 1	I L M N _ 2	m R N A	N M _ 0 0 4	G S T O 1	G A C T G G C A A G G T T T C C T A G A G C T C T A C T T A

10

20

30

40

【表 2 - 2】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
5 7	2 2 7 5 7 3		8 3 2 . 1		C A G A A C A G C C C T G A G G C C T G
1 3 ／ 1 5 8	O A _ 0 0 2 4 2 2	m i R N A	h s a - m i R - 1 8 a	m i R - 1 8 a	U A A G G U G C A U C U A G U G C A G A U A G
1 4 ／ 1 5 9	I L M N _ 2 3 8 2 7 5 8	m R N A	N M _ 1 3 4 4 4 2 . 2	C R E B 1	T C A A C G C C A G G A A T C A T G A A G A G A C T T C T G C T T T T C A A C C C C C A C C C T C C
1 5 ／ 1 6 0	I L M N _ 2 0 8 6 4 1 7	m R N A	N M _ 0 2 1 0 7 4 . 1	N D U F V 2	G C T C A A G G C T G G C A A A A T C C C A A A A C C A G G G C C A A G G A G T G G A C G C T T C T
1 6 ／ 1 6 1	I L M N _ 1 7 3 1 0 6 4	m R N A	N M _ 0 2 0 2 4 7 . 4	C A B C 1	G G C T G G A G C T G G G A G A G G T G C T G A G C T A A C A G T G C C A A C A A G T G C T C C T T
1 7 ／ 1 6 2	I L M N _ 1 8 0 5 9 9 6	m R N A	N M _ 0 1 5 4 7 7 . 1	S I N 3 A	C C T T G C T G C C T A C C C T T T T C T C T C C T C T G G T T C T C A A C C T C A A C G A G T T C
1 8 ／ 1 6 3	I L M N _ 3 2 2 2 4 2 5	m R N A	X R _ 0 4 0 8 7 0 . 1	L O C 7 2 9 8 5 2	G G C A G T A C A G G G C A C C A T C A C T G A C C T T C C C G A C C A C T T A C T C T C C T A T G
1 9 ／ 1 6 4	I L M N _ 2 3 5 2 5 8 0	m R N A	N M _ 0 1 5 8 4 4 . 1	M B D 1	G G A T G G C C T G G A A C C C A T G T C A G T C T C T C A C C A C C T C C A G C T T C G A T G A T
2 0 ／ 1 6 5	I L M N _ 1 6 7 9 9 2 9	m R N A	N M _ 0 1 5 9 9 5 . 2	K L F 1 3	T T G C T T G T G T G C A T G T G T T G G G T G C A T G C T T C C G G G T C T C A G C T G C C C C A
2 1 ／ 1 6 6	O A _ 0 0 2 1 8 4	m i R N A	h s a - m i R - 3 3 9 - 3 p	m i R - 3 3 9 - 3 p	U G A G C G C C U C G A C G A C A G A G C C G
2 2 ／ 1 6 7	I L M N _ 1 8 1 1 1 0 3	m R N A	N M _ 0 1 8 9 2 5 . 2	P C D H G B 5	G G G C C T T A T T T C C A C T T T G T A A T T C C A G C G A G T C G A C T T C C C A T C C T G A G
2 3 ／ 1 6 8	I L M N _ 1 7 7 2	m R N A	X M _ 9 4 2 0 5 3 .	L O C 6 5 2 5 5 4	A C T T A A A A A T A C T T C G T T T A T C A C A T C T C A G G A A C T A A A C T G G G

10

20

30

40

【表 2 - 3】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
	1 4 7		2		T T A A G
2 4 ／ 1 6 9	I L M N _ 1 7 4 9 0 0 6	m R N A	N M _ 0 5 2 8 6 2 . 2	R C S D 1	T G C A A G G G A C A G G G G G C C T G A C T A C C C A G T C T T T G A C T T G T A T C C T C T C C
2 5 ／ 1 7 0	I L M N _ 1 7 6 6 6 5 7	m R N A	N M _ 0 0 4 0 9 9 . 4	S T O M	T C A C T T G G G A G G G A C G C A T A G A A G G A G C T C T A G G A A C A C A G T G C C A G T G C
2 6 ／ 1 7 1	I L M N _ 1 6 8 1 6 7 5	m R N A	N M _ 0 1 4 8 9 2 . 3	R B M 1 6	G T G C C T C A G G T T A A T G G T G A A A A T A C A G A G A G A C A T G C T C A G C C A C C A C C
2 7 ／ 1 7 2	I L M N _ 1 7 6 9 4 7 3	m R N A	N M _ 0 1 4 1 5 9 . 4	S E T D 2	G A C C T G A C T C C A C T C T T A A A C C T G G G T C T T C T C C T T G G C G G T G C T G T C A G
2 8 ／ 1 7 3	I L M N _ 3 2 6 1 1 9 7	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 1 9 7 7 . 1	A T P 5 E	T C T G A T C T T C C T G C G G C T G A A C C G C C C G G C T G A G C C G A C A T T G C C G G C G T
2 9 ／ 1 7 4	I L M N _ 1 6 8 1 0 6 7	m R N A	N M _ 0 1 4 3 0 8 . 2	P I K 3 R 5	T G A G G C T C T G G T G C T C A G G G G G A T G G C T T G G G C C T T T T C T C T C A A C C T T G
3 0 ／ 1 7 5	I L M N _ 1 7 9 8 0 8 3	m R N A	N M _ 0 0 6 3 8 7 . 5	C H E R P	A T C C A G A G C A T G G A G C C C G A C C C C A G C C A G C G C C T T C C A C T C C A T C A T T T
3 1 ／ 1 7 6	I L M N _ 2 3 6 8 0 6 8	m R N A	N M _ 1 8 1 4 9 2 . 1	T C F 2 0	G A G G G A C T G T C G C T G T G A T C A G A G T G G G T T A A G C T G A C C A G G A A C A C C C A
3 2 ／ 1 7 7	I L M N _ 2 4 0 2 4 1 6	m R N A	N M _ 0 0 5 4 9 4 . 2	D N A J B 6	C C G A G G G A C G G G G T C G T T T T T C T C T G C G T T C A G T G G A T T T C C G T C T T T T G
3 3 ／ 1 7 8	I L M N _ 1 6 8 3 5 9 5	m R N A	N M _ 0 1 5 8 4 5 . 2	M B D 1	A G G A T G G C C T G G A A C C C A T G T C A G T C T C T C A C C A C C T C C A G C T T C G A T G A
3 4 ／ 1 7 9	O A _ 0 0 0 3 7 7	m i R N A	h s a - l e t - 7 a	l e t - 7 a	U G A G G U A G U A G G U U G U A U A G U U

10

20

30

40

【表 2 - 4】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
3 5 ／ 1 8 0	I L M N _ 1 7 0 3 4 2 7	m R N A	N M _ 1 3 8 9 2 7 . 1	S O N	G C T A A G G C T G G T G T C C C T T T A C C A C C A A A C C T A A A G C C T G C A C C T C C A C C
3 6 ／ 1 8 1	I L M N _ 1 6 7 6 6 0 0	m R N A	N M _ 1 9 8 5 9 7 . 1	S E C 2 4 C	C T C T C C T G C T G G G A C A C C G C T T G G G C T T T G G T A T T G A C T G A G T G G C T G A C
3 7 ／ 1 8 2	I L M N _ 1 7 9 8 1 6 4	m R N A	N M _ 0 1 5 1 5 3 . 1	P H F 3	G T G C T C T G T A C C A G T G C T C A T C A T C C C T T C T T C A T A C C A A C G G T C C C T A G
3 8 ／ 1 8 3	I L M N _ 2 3 0 7 8 8 3	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 3 7 1 4 . 1	A T P 5 J 2	C T T G G C C C G A G C C C C T C C G T G A G G A A C A C A A T C T C A A T C G T T G C T G A A T C
3 9 ／ 1 8 4	I L M N _ 1 8 0 0 4 2 0	m R N A	N M _ 2 0 7 3 4 3 . 2	R N F 2 1 4	C C T G C T C C A C T G G C C C A A A T C A G T A C C C C A A T G T T C T T G C C T T C T G C C C A
4 0 ／ 1 8 5	I L M N _ 1 6 5 3 0 2 6	m R N A	N M _ 0 1 6 6 1 9 . 1	P L A C 8	T A A G G C C C T G C A C T G A A A A T G C A A G C T C A G G C G C C G G T G G T C G T T G T G A C
4 1 ／ 1 8 6	I L M N _ 3 2 4 5 3 5 1	m R N A	N M _ 0 0 1 0 8 0 5 3 3 . 1	U N C 1 1 9 B	C C A G T G T C A C T A T G A T G T C A G T G A G G T C T G G G G A T G A G G A C A G T G T G T C C
4 2 ／ 1 8 7	I L M N _ 1 7 0 5 9 0 7	m R N A	N M _ 0 0 5 1 2 4 . 2	N U P 1 5 3	C A C T G A T T T G A C A T A G T C T G G C T G T A C C C A G G A A T G G A G C C T G C A C G G T G
4 3 ／ 1 8 8	I L M N _ 1 7 3 0 9 9 9	m R N A	N M _ 0 0 3 2 9 2 . 2	T P R	G T C A G A T C T C C C C T C C A C C A G C C A G G A T C C T C C T T C T A G C T C A T C T G T A G
4 4 ／ 1 8 9	I L M N _ 3 3 0 4 8 9 8	m R N A	X R _ 0 1 6 1 4 0 . 2	L O C 9 2 7 5 5	A T C G A G T C C T A C A A T G C T A C C C T C T C C G T C C A T C A G T T G G T A G A G A A C A C
4 5 ／ 1 9 0	I L M N _ 1 8 1 1 4 1 0	m R N A	N M _ 0 0 0 3 2 4 . 1	R H A G	G C T G G A A C C T G A A G T C T A A A C A C C A T T C C T G C T C T C C A G C T T C C T T T C C C

10

20

30

40

【表 2 - 5】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
4 6 ／ 1 9 1	I L M N _ 2 1 5 2 5 8 1	m R N A	N M _ 0 0 7 2 7 1 . 2	S T K 3 8	C T G C A G C T G G G A G C C T G C T T T C T G C C A G T C T T G A G G T T C T G A A G A T C A G C
4 7 ／ 1 9 2	I L M N _ 1 6 6 8 4 8 4	m R N A	N M _ 0 2 0 7 1 0 . 1	L R R C 4 7	C T G T A C A G T C A T G T G C C A C G T A A C A G C G T C T G G G T C A G T G A C G G A C A C T T
4 8 ／ 1 9 3	I L M N _ 2 3 7 0 3 3 6	m R N A	N M _ 1 4 8 9 7 5 . 1	M S 4 A 4 A	T C C C T G G A A C T C A A T A A C T C A T T T C A C T G G C T C T T T A T C G A G A G T A C T A G
4 9 ／ 1 9 4	I L M N _ 1 7 9 2 0 7 8	m R N A	N M _ 0 1 8 6 8 3 . 3	R N F 1 1 4	G T C T G G A G G G A A A T C T G G C G A A A C C T T C G T T T G A G G G A C T G A T G T G A G T G
5 0 ／ 1 9 5	I L M N _ 3 2 7 4 9 1 4	m R N A	X R _ 0 3 8 9 0 6 . 1	L O C 6 4 8 9 2 7	C A C C T G T G G G C A G T G G G C A G T G T C T T G G T G A A A G G G A G C G G A T A C T A C T T
5 1 ／ 1 9 6	I L M N _ 3 2 2 9 3 2 4	m R N A	N M _ 0 0 5 6 2 7 . 3	S G K 1	C G G A C G C T G T T C T A A A A A A G G T C T C C T G C A G A T C T G T C T G G G C T G T G A T G
5 2 ／ 1 9 7	I L M N _ 1 7 9 3 3 8 4	m R N A	N M _ 0 0 2 2 2 7 . 2	J A K 1	A T T G C C T C T G A C G T C T G G T C T T T T G G A G T C A C T C T G C A T G A G C T G C T G A C
5 3 ／ 1 9 8	I L M N _ 2 3 6 1 6 0 3	m R N A	N M _ 2 0 1 5 3 9 . 1	N D R G 2	G C T G A G G G G T A A G A G G T T G T T G T A G T T G T C C T G G T G C C T C C A T C A G A C T C
5 4 ／ 1 9 9	I L M N _ 1 7 3 0 6 2 8	m R N A	N M _ 0 0 2 9 3 4 . 2	R N A S E 2	G G A A G C C A G G T G C C T T T A A T C C A C T G T A A C C T C A C A A C T C C A A G T C C A C A
5 5 ／ 2 0 0	I L M N _ 1 7 2 2 8 7 2	m R N A	N M _ 0 0 2 4 7 3 . 3	M Y H 9	C T A G G A C T G G G C C C G A G G G T G G T T T A C C T G C A C C G T T G A C T C A G T A T A G T
5 6 ／ 2 0 1	I L M N _ 1 7 6 0 3 2 0	m R N A	N M _ 0 0 2 0 7 4 . 2	G N B 1	T T C C G T C C A A C A A C T C T G T A G A G C T C T C T G C A C C C T T A C C C C T T T C C A C C
5 7 ／ 2	I L M N _ 1	m R N A	N M _ 0 1 7	W D R 1	C A T A C C G G C T G G C C A C G G G A A G C G A T G A T A

10

20

30

40

【表 2 - 6】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
0 2	6 7 5 8 4 4		4 9 1 . 3		A C T G C G C G G C A T T C T T T G A G
5 8 ／ 2 0 3	I L M N _ 2 3 6 2 9 0 2	m R N A	N M _ 1 8 2 6 6 4 . 2	R A S S F 5	G C T C C T G C T G C A A C C G C T G T G A A T G C T G C T G A G A A C C T C C C T C T A T G G G G
5 9 ／ 2 0 4	I L M N _ 1 6 9 4 6 0 3	m R N A	N M _ 0 0 3 0 7 4 . 2	S M A R C C 1	C C C C T G G A G T C C G A G A A G G A A A A T G G A A T T C T G G T T C A T A C T G T G G T C C C
6 0 ／ 2 0 5	I L M N _ 2 0 5 4 1 2 1	m R N A	N M _ 2 0 7 4 0 9 . 1	C 6 o r f 1 2 6	C C G C C G G T G C C A T A T G A T T T A G A G G A A G A T G C A G G C T G G T C A C T G C T C C C
6 1 ／ 2 0 6	I L M N _ 1 7 0 0 0 4 4	m R N A	N M _ 0 2 4 5 4 5 . 2	S A P 1 3 0	C C A C C C C A T T C G G T T C T T C T G C C T G A C C T T C A A A T G C C C A T G T T G G C C T T
6 2 ／ 2 0 7	I L M N _ 1 7 3 7 0 0 5	m R N A	N M _ 0 1 9 1 0 8 . 2	C 1 9 o r f 6 1	C C G G G G C T T C C A C C T G A C T T C C T G G A C T C T G A G G T C A A C T T A T T C C T G G T
6 3 ／ 2 0 8	I L M N _ 1 7 0 2 4 8 7	m R N A	N M _ 0 0 5 6 2 7 . 2	S G K	A G A A A G G G T T T T T A T G G A C C A A T G C C C C A G T T G T C A G T C A G A G C C G T T G G
6 4 ／ 2 0 9	I L M N _ 1 7 3 0 6 2 5	m R N A	N M _ 0 0 1 6 2 2 . 1	A H S G	T C C T C A C A G G A C A G A A G C A G A G T G G G T G G T G G T T A T G T T T G A C A G A A G G C
6 5 ／ 2 1 0	O A _ 0 0 0 3 9 7	m i R N A	h s a - m i R - 2 1	m i R - 2 1	U A G C U U A U C A G A C U G A U G U U G A
6 6 ／ 2 1 1	I L M N _ 1 7 9 3 3 8 6	m R N A	N M _ 0 0 5 1 2 0 . 1	M E D 1 2	C T T T G G T C C G G C A A C T T C A A C A A C A G C T C T C T A A T A C C C A G C C A C A G C C C
6 7 ／ 2 1 2	I L M N _ 1 6 5 9 2 2 7	m R N A	N M _ 0 0 1 7 8 3 . 3	C D 7 9 A	C A T A T A C G T G T G C C G G G T C C A G G A G G G C A A C G A G T C A T A C C A G C A G T C C T
6 8 ／ 2 1 3	I L M N _ 1 7 6 7 4 7 5	m R N A	N M _ 0 2 2 7 6 6 . 4	C E R K	G C T C T G A T T T C C G G G G C A G C C T T T C A G A T G C G G C A G A C A T A C A A C A C C T G

10

20

30

40

【表 2 - 7】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
6 9 ／ 2 1 4	I L M N _ 1 6 8 1 3 2 4	m R N A	N M _ 0 0 4 9 2 7 . 2	M R P L 4 9	C C C T G C C C C C A A A C T G G C T A A G A C A G C T T T C A G T T C C T G A C T C C C C A A C T
7 0 ／ 2 1 5	I L M N _ 1 6 6 7 4 0 2	m R N A	X M _ 9 2 7 8 6 0 . 1	L O C 6 4 4 7 6 3	C A C T G C C G T C C C C C A A G G T C C A G A A T G T C A G C T C G C C T C A C A A G T C A G A A
7 1 ／ 2 1 6	O A _ 0 0 2 4 4 6	m i R N A	h s a - m i R - 2 8 - 3 p	m i R - 2 8 - 3 p	C A C U A G A U U G U G A G C U C C U G G A
7 2 ／ 2 1 7	I L M N _ 2 3 9 6 6 7 2	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 3 4 0 7 . 1	A B L I M 1	G C A T C C T C C T G T G T A T G G A A G A G A C A G G T G A C C G C T C C A G G T T G G G T G C T
7 3 ／ 2 1 8	I L M N _ 1 7 9 6 4 6 4	m R N A	N M _ 0 1 4 0 2 3 . 3	W D R 3 7	G A G C C G G G G C A C C T T G C T G T T C G C T G C T G T G T C G T C T T C T A A T G T G A G C T
7 4 ／ 2 1 9	I L M N _ 1 6 9 0 7 0 8	m R N A	N M _ 0 0 3 1 2 8 . 2	S P T B N 1	A G A T A G G C C A G A G C G T G G A C G A G G T G G A G A A G C T C A T C A A G C G C C A C G A G
7 5 ／ 2 2 0	I L M N _ 2 3 5 2 5 7 4	m R N A	N M _ 0 1 6 3 2 4 . 2	Z N F 2 7 4	T C A C A C T G G C G C T A A G C C C T A C A A G T G T C A G G A C T G T G G A A A A G C C T T C C
7 6 ／ 2 2 1	I L M N _ 1 7 6 1 0 6 9	m R N A	N M _ 0 0 3 3 6 9 . 3	U V R A G	C C C C T G T G G G G G C C A A A G T T T T T A T G T G G G C A G A T G C T G T G G T C A G G A A C
7 7 ／ 2 2 2	I L M N _ 2 3 5 7 7 7 7	m R N A	N M _ 2 0 7 3 4 3 . 2	R N F 2 1 4	C A A T G G C G T G T A C C C A T G T A T T G C A C A A G G A G T G T A T C A A A T T C T G G G C C
7 8 ／ 2 2 3	I L M N _ 1 6 7 6 8 9 9	m R N A	N M _ 0 1 8 0 2 3 . 3	Y E A T S 2	G C A A G T A C A G A A G G A A T C T A T T C T C A G C A G G G C A T A G G G C A C G C A C T G G C
7 9 ／ 2 2 4	I L M N _ 3 2 4 5 4 7 6	m R N A	N M _ 0 2 0 9 0 1 . 1	P H R F 1	T C G G G T T C C T G C G C T G A C A C C T G G T C T G T G C A C C T G T G T T G C T C A C A G T T

10

20

30

40

【表 2 - 8】

表 2					
順位 ／配 列番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
8 0 ／ 2 2 5	I L M N _ 2 0 9 3 3 4 3	m R N A	N M _ 0 1 6 6 1 9 . 1	P L A C 8	A T G C T G T C T G T G T G G A A C A A G C G T C G C A A T G A G G A C T C T C T A C A G G A C C C
8 1 ／ 2 2 6	I L M N _ 1 7 8 0 1 4 1	m R N A	N M _ 0 1 6 1 2 7 . 4	T M E M 6 6	G A G C T C T G A A G C T T T G A A T C A T T C A G T G G T G G A G A T G G C C T T C T G G T A A C
8 2 ／ 2 2 7	I L M N _ 2 0 9 8 0 1 3	m R N A	N M _ 0 0 0 0 7 8 . 1	C E T P	T G G C T C C C A A C T C C T C C C T A T C C T A A A G G C C C A C T G G C A T T A A A G T G C T G
8 3 ／ 2 2 8	I L M N _ 2 0 6 9 5 9 3	m R N A	N M _ 0 0 4 7 1 9 . 2	S F R S 2 I P	C T G C T C C G A C A G C A G C C C C A G G A A A T A C G G G A A T G G T T C A G G G A C C A A G T
8 4 ／ 2 2 9	I L M N _ 2 1 3 6 4 4 6	m R N A	N M _ 0 0 3 7 9 8 . 1	C T N N A L 1	C T C C T G G A A A T A A A C A A G C T A A T T C C T C T A T G C C A C C A G C T C C A G A C A G T
8 5 ／ 2 3 0	I L M N _ 1 7 5 1 3 6 8	m R N A	N M _ 0 0 2 1 3 8 . 3	H N R N P D	G G T G A C C A G C A G A G T G G T T A T G G G A A G G T A T C C A G G C G A G G T G G T C A T C A
8 6 ／ 2 3 1	I L M N _ 1 6 5 1 5 0 4	m R N A	N M _ 0 0 3 7 0 4 . 3	F A M 1 9 3 A	T G G G C G G G G C A G G C C T C C T T T G T T C T C C A C A A T C T A C T G T C T C C G A G T G T
8 7 ／ 2 3 2	I L M N _ 1 6 9 1 1 9 4	m R N A	X M _ 9 3 9 5 3 5 . 1	F L J 3 6 0 3 2	G A G C T C T A A C C T C T C C C C G A C C C C T G C A G T A T C T C C C T T T G T T C A G T C T T
8 8 ／ 2 3 3	I L M N _ 1 7 0 9 6 2 3	m R N A	N M _ 1 3 9 0 3 2 . 1	M A P K 7	A G G C T T T A G C C C T G G A C C C A G C A G G T G A G G C T C G G C T T G G A T T A T T C T G C
8 9 ／ 2 3 4	I L M N _ 1 7 3 3 9 2 7	m R N A	N M _ 0 0 7 1 0 8 . 2	T C E B 2	G A T G A C A C C T T T G A G G C C C T G T G C A T C G A G C C G T T T T C C A G C C C G C C A G A
9 0 ／ 0 2 3 5	I L M N _ 3 2 0 2 0 0 2	m R N A	X R _ 0 1 6 2 8 7 . 1	L O C 6 4 3 3 3 2	T G T A C T G T A A C C T C A C A A C T C C A A G T C C A C A G A A T A T T T C A A A C T G C A G G
9 1 ／ 2	I L M N _ 1	m R N A	N M _ 0 0 0	P A F A H 1	G G G A G G G C A A G C T G G A T T T A C A G G T C A C G G

10

20

30

40

【表 2 - 9】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
3 6	7 2 2 2 7 6		4 3 0 . 2	B 1	C T G G A C T G A A T G G G C C T T T T
9 2 ／ 2 3 7	I L M N _ 1 7 1 1 3 8 3	m R N A	N M _ 0 0 6 2 8 2 . 2	S T K 4	T G A G G T C A G C A G T T T G T A T G A G A C A T A G C T T C C T C C A T T G C C C C C A C T C C
9 3 ／ 2 3 8	I L M N _ 3 2 3 8 5 6 0	m R N A	N M _ 0 3 2 0 3 6 . 2	I F I 2 7 L 2	A A C A T C C T C C T G G C C T C T G T T G G G T C A G T G T T G G G G G C C T G C T T G G G G A A
9 4 ／ 2 3 9	I L M N _ 1 8 0 1 9 2 8	m R N A	N M _ 0 0 3 4 0 6 . 2	Y W H A Z	G G C A C C C T G C T T C C T T T G C T T G C A T C C C A C A G A C T A T T T C C C T C A T C C T A
9 5 ／ 2 4 0	I L M N _ 1 8 0 6 9 4 6	m R N A	N M _ 0 0 1 0 7 6 6 8 3 . 1	U B T F	G T C C C A A A G A G T T T G A T G A G G C C C T C C A C A C C T G C G G C C C A A T C C A A G G T
9 6 ／ 2 4 1	I L M N _ 2 1 6 4 2 4 2	m R N A	N M _ 0 8 0 6 7 8 . 1	U B E 2 F	C C C C T G G A T T G C C C C A G T C C T G T G A C C A T G T T G C C C T G A A G A A G A C C A T C
9 7 ／ 2 4 2	I L M N _ 1 7 2 6 0 2 5	m R N A	N M _ 0 1 5 3 3 8 . 4	A S X L 1	G C T C C T G C C T C T C T C C C A A C A T G T T T C C A G C A A G T A G A T G C C C C T G T G T G
9 8 ／ 2 4 3	I L M N _ 1 7 0 0 8 1 1	m R N A	N M _ 0 1 9 1 1 6 . 2	U B F D 1	T G G C C C A G G A G A C T G A C C C A A A G T G A A G G A C A T T G C C G G G A G A G G C C T G C
9 9 ／ 2 4 4	I L M N _ 1 8 0 8 5 0 1	m R N A	N M _ 0 3 1 8 9 2 . 1	S H 3 K B P 1	C T T T T G C T T C A G G C T A A G A G C T G C C T C G C T C T T T G T C C C C C C A T T A G G A T
1 0 ／ 2 4 5	I L M N _ 1 7 8 6 3 9 6	m R N A	N M _ 0 1 5 1 1 3 . 3	Z Z E F 1	A G G A G G C G A A G C C C G C A G A G C A A A G G T G G A A A C A C G T G C C T A C G C T G T A A
1 0 1 ／ 2 4 6	O A _ 0 0 0 4 3 9	m i R N A	h s a - m i R - 1 0 3	m i R - 1 0 3	A G C A G C A U U G U A C A G G G C U A U G A
1 0 2 ／ 2 4	I L M N _ 1 7 7 0	m R N A	N M _ 0 2 0 9 6 7 .	N C O A 5	A G A A G G A G G G T T T C T G G C T G T G G T T C T A A A T G G A G C C C C A G G A A G

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種 類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
7	0 3 5		2		C T G C C
1 0 3 / 2 4 8	I L M N _ 1 7 8 2 9 2 2	m R N A	N M _ 0 0 2 6 0 0 . 3	P D E 4 B	G C A G T G G T G T C G T T C A C C G T G A G A G T C T G C A T A G A A C T C A G C A G T G T G C C
1 0 4 / 2 4 9	I L M N _ 1 7 5 6 9 9 9	m R N A	N M _ 0 0 5 6 1 1 . 2	R B L 2	C C C C A T T C G G T G T G G T G C A G T G T G A A A A G T C C T T G A T T G T T C G G G T G T G C
1 0 5 / 2 5 0	I L M N _ 1 7 4 6 9 6 8	m R N A	N M _ 0 2 4 1 6 5 . 1	P H F 1	T G C C T C T G C C C A G C T C C C C A T T C A C A C A C A C C G G C A C T T T C A T A C C C T G A
1 0 6 / 2 5 1	I L M N _ 1 7 7 7 2 9 6	m R N A	N M _ 0 0 1 1 0 1 . 2	A C T B	C G G C T A C A G C T T T C A C C A C C A C G G C C G A G C G G G A A A T C G T G C G T G A C A T T A
1 0 7 / 2 5 2	I L M N _ 3 2 3 7 4 6 2	m R N A	N M _ 1 9 4 2 9 4 . 2	I D O 2	G C C A A G C C T T T C C C T C C C T A C C T G A T C A C T G C T T A A C G G C A T G T A T A A T G
1 0 8 / 2 5 3	O A _ 0 0 1 2 7 1	m i R N A	h s a - m i R - 3 6 3	m i R - 3 6 3	A A U U G C A C G G U A U C C A U C U G U A
1 0 9 / 2 5 4	O A _ 0 0 2 2 3 4	m i R N A	h s a - m i R - 1 4 0 - 3 p	m i R - 1 4 0 - 3 p	U A C C A C A G G G U A G A A C C A C G G
1 1 0 / 2 5 5	I L M N _ 1 7 2 7 1 4 2	m R N A	N M _ 0 0 1 5 5 6 . 1	I K B K B	G T G C T G G G C C G G G G A G T C C C T G T C T C T C A C A G C A T C T A G C A G T A T T A T T A
1 1 1 / 2 5 6	O A _ 0 0 2 0 8 7	m i R N A	h s a - m i R - 5 0 5 - A	m i R - 5 0 5 _ A	G G G A G C C A G G A A G U A U U G A U G U
1 1 2 / 2 5 7	I L M N _ 3 2 4 0 8 7 1	m R N A	X M _ 0 0 1 7 2 0 5 0 1 . 1	L O C 7 2 9 2 7 3	C A T G A T G G G A T A T C C C T G C C T A G A T C T T T C A G T G A G T C T C T A C C T C A G C T
1 1 3 /	I L M N _ 2	m R N A	N M _ 1 3 3	P O F U T 2	G A G A G A G G A C A G T T A G G A G G G A C A G A C A G C

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種 類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
2 5 8	3 7 6 6 6 7		6 3 5 . 4		T C T T C C T T T C G G A G C C T G G C
1 1 4 / 2 5 9	I L M N _ 1 6 5 5 4 2 9	m R N A	N M _ 0 2 1 1 3 7 . 3	T N F A I P 1	C A G T G T C T C A G T C T T T T T T G C C G A G A A A G C A C A G T A G T C T G G G A C T G G G C
1 1 5 / 2 6 0	I L M N _ 2 0 8 9 4 8 4	m R N A	N M _ 0 0 0 8 9 6 . 2	C Y P 4 F 3	C A G C T C G G A G G A A G G T C T C C T A T A C A C A C A A A G C C T G G C A T G C A C C T T C G
1 1 6 / 2 6 1	I L M N _ 1 6 8 8 7 2 2	m R N A	N M _ 0 0 0 6 4 0 . 2	I L 1 3 R A 2	G T A A C C G G T C T G C T T T T G C G T A A G C C A A A C A C C T A C C C A A A A A T G A T T C C
1 1 7 / 2 6 2	I L M N _ 1 6 6 0 6 6 3	m R N A	N M _ 1 3 0 4 3 7 . 2	D Y R K 1 A	T G A C T G G T C T C C T A A C C A A G G T G C A C T G A G A A G C A A T C A A C G G G T C G G T C
1 1 8 / 2 6 3	I L M N _ 1 6 9 9 7 0 3	m R N A	N M _ 0 0 1 6 5 5 . 3	A R C N 1	G C T G G T T G A A A A G T A C C A C T C C C A C T C T G A A C A T C T G G C C G T C C C T G C A A
1 1 9 / 2 6 4	I L M N _ 1 8 0 2 3 8 0	m R N A	N M _ 0 0 1 0 4 2 6 8 2 . 1	R E R E	G C C C T G A C C T T C A T G G T G T C T T T G A A G C C C A A C C A C T C G G T T T C C T T C G G
1 2 0 / 2 6 5	I L M N _ 1 6 8 5 4 7 2	m R N A	N M _ 0 2 4 9 9 3 . 3	L R R T M 4	A G G A G A G A G G T T T G A G T T C T G G G T A T C C T C C C T T T C T G T A A C A G C C T C A A
1 2 1 / 2 6 6	I L M N _ 1 7 4 0 3 1 9	m R N A	N M _ 0 3 2 0 3 6 . 2	I F I 2 7 L 2	C C C A G C T G A A C C C G A G G C T A A A G A A G A T G A G G C A A G A G A A A A T G T A C C C C
1 2 2 / 2 6 7	I L M N _ 1 7 4 2 7 5 3	m R N A	N M _ 0 0 1 0 0 2 9 1 7 . 1	O R 8 D 1	C A C C T T G G T G C C C A C C C T A G C T G T T G C T G T C T C C T A T G C C T T C A T C C T C T
1 2 3 / 2 6 8	I L M N _ 3 2 2 6 0 4 5	m R N A	X R _ 0 1 5 6 1 0 . 2	L O C 7 2 8 5 3 3	C T A T A C T C C T T T G G C C C A T A G C T A A G G T C A T C C T T C C C C A C A G G G G T G G C
1 2 4 /	I L M N _ 1	m R N A	N M _ 0 0 1	C C D C 9 0	G A G A A C A G A A A T A G T G G C A T T G C A T G C C C A

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種 類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
2 6 9	7 6 1 9 6 1		0 3 1 7 1 3 . 2	A	G C A A G A T C G G G C C C T T A C C C
1 2 5 / 2 7 0	I L M N _ 1 7 6 6 4 3 5	m R N A	N M _ 0 1 6 3 1 2 . 2	W B P 1 1	G C T A A C A T C C A T T C C C T T T C A T A C C A C C A T T T T C A C C C T G T T T C T T C C C C
1 2 6 / 2 7 1	I L M N _ 1 7 9 2 4 3 2	m R N A	N M _ 0 5 2 9 1 9 . 1	K I A A 1 9 2 0	C A T C T G G A C C C C T C C C C C T C T A T C C C T A A C C C T G T C T A A A C T A A T G G C G C
1 2 7 / 2 7 2	I L M N _ 2 3 2 7 0 9 0	m R N A	N M _ 0 0 5 8 8 2 . 3	M A E A	T C C G C C C A T G A T G C T G C C C A A C G G C T A C G T C T A C G G C T A C A A T T C T C T G C
1 2 8 / 2 7 3	I L M N _ 2 2 7 9 6 3 5	m R N A	N M _ 0 0 1 4 1 8 . 3	E I F 4 G 2	C T C T T A T C C C A G C T G C A A G G A C A G T C G A A G G A T A T G C C A C C T C G G T T T T C
1 2 9 / 2 7 4	I L M N _ 2 2 7 8 8 1 9	m R N A	N M _ 0 0 2 6 0 3 . 1	P D E 7 A	T G G A A G G G A C T G C A G A G A G A A C A G T C G A G C A G T G A G G A C A C T G A T G C T G C
1 3 0 / 2 7 5	I L M N _ 1 6 8 7 0 9 2	m R N A	N M _ 0 1 8 0 9 5 . 3	K B T B D 4	G C C T G T T C T C T G C C A T T C C C T A G T C A T C C T G T G C C T C A C C A C A G C T T G C T
1 3 1 / 2 7 6	I L M N _ 2 2 2 2 2 3 4	m R N A	N M _ 0 0 6 4 0 6 . 1	P R D X 4	C T G C C C T G C T G G C T G G A A A C C T G G T A G T G A A A C A A T A A T C C C A G A T C C A G
1 3 2 / 2 7 7	I L M N _ 1 7 7 7 9 9 8	m R N A	N M _ 0 1 4 8 8 2 . 2	A R H G A P 2 5	G A C C A C G T C C A G T G A A G A C A T T T G A G G C A G C A C A T C T C A G G A C C C A G G C A
1 3 3 / 2 7 8	I L M N _ 1 7 8 2 1 2 9	m R N A	N M _ 0 1 4 8 3 8 . 2	Z B E D 4	G C A T C T C C A C G C T C T G A A G C T G T C T T T C A A A A T G T G T G C A C T G A C C C C C T
1 3 4 / 2 7 9	I L M N _ 1 7 9 0 8 0 7	m R N A	N M _ 0 0 4 6 2 8 . 3	X P C	A G T C T T C A T C T G T C C G A C A A G T T C A C T C G C C T C G G T T G C G G A C C T A G G A C
1 3 5 / 2 8	I L M N _ 1 6 9 3	m R N A	N M _ 0 1 5 9 3 2 .	P O M P	G A T C C A T C A C A A A G C G A A G T C A T G G G A G A G C C A C A C T T G A T G G T G

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

表 2					
順位 ／ 配 列 番 号	I D	種類	受 入 番 号	記号	標的配列
0	2 8 7		3		G A A T A
1 3 6 / 2 8 1	I L M N _ 1 7 7 1 5 9 9	m R N A	N M _ 0 0 0 9 3 5 . 2	P L O D 2	A C A A A G T T G T T G A G C C T T G C T T C T T C C G T T T T G C C C T T T G T C T C G C T C C T
1 3 7 / 2 8 2	I L M N _ 1 6 7 3 0 2 4	m R N A	N M _ 0 1 3 2 8 6 . 3	R B M 1 5 B	C T G C C C C A G C T A C A G A G A C G G C C G A A A T G C T T T C A C T C C T T A G C T T T G C C
1 3 8 / 2 8 3	I L M N _ 1 6 8 0 2 4 6	m R N A	N M _ 0 1 3 2 8 3 . 3	M A T 2 B	G G A G A A A G A G C T C T C T A T A C A C T T T G T T C C C G G G A G C T G T C G G C T G G T G G
1 3 9 / 2 8 4	I L M N _ 1 7 6 6 2 7 5	m R N A	N M _ 0 0 5 0 2 6 . 2	P I K 3 C D	A G C T C T G T T C T G A T T C A C C A G G G G T C C G T C A G T A G T C A T T G C C A C C C G C G
1 4 0 / 2 8 5	I L M N _ 1 7 5 2 8 9 5	m R N A	N M _ 0 0 4 8 5 3 . 1	S T X 8	G C C A G A G G A G A C C A G A G G C T T G G G T T T T G A T G A A A T C C G G C A A C A G C A G C
1 4 1 / 2 8 6	I L M N _ 2 1 7 5 0 7 5	m R N A	N M _ 0 0 5 6 2 6 . 3	S F R S 4	T G G C C T T T C C T A C A G G G A G C T C A G T A A C C T G G A C G G C T C T A A G G C T G G A A
1 4 2 / 2 8 7	I L M N _ 1 7 1 3 7 4 9	m R N A	N M _ 0 0 7 0 7 4 . 2	C O R O 1 A	G A T G C T G G G C C C C T C C T C A T C T C C C T C A A G G A T G G C T A C G T A C C C C C A A A
1 4 3 / 2 8 8	I L M N _ 1 8 1 4 9 9 8	m R N A	N M _ 0 0 1 0 1 7 4 2 1 . 1	F K S G 3 0	C C T G G G C A T G G A A T C C T G T G G C A T C C A C A A A A C T A C C T T C A A C T C C A T A G
1 4 4 / 2 8 9	I L M N _ 1 7 0 0 6 2 8	m R N A	N M _ 0 2 0 4 1 4 . 3	D D X 2 4	A A G A A G C C G A A G G A G C C A C A G C C G G A A C A G C C A C A G C C A A G T A C A A G T G C
1 4 5 / 2 9 0	I L M N _ 1 7 0 3 6 1 7	m R N A	N M _ 0 1 2 1 1 1 . 1	A H S A 1	C C A C C A T C A C C T T G A C C T T C A T C G A C A A G A A C G G A G A G A C T G A G C T G T G C
1 4 6 / 2 9 1	I L M N _ 2 1 1 7 3 2 3	m R N A	N M _ 0 0 2 6 4 6 . 2	P I K 3 C 2 B	C C A T A A C T G G A G A A A G A A G C T C C A T T G A C C G A A G C C A C A G G G C A G C A T G G

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

表 2					
順位 ／配 列番 号	I D	種類	受 入 番 号	記 号	標 的 配 列
1 4 7 / 2 9 2	I L M N _ 1 7 6 8 8 0 9	m R N A	N M _ 0 0 3 4 3 5 . 2	Z N F 1 3 4	A C C T G A G G C C C T T A A C C T T T C T C T C A G T G C T C G C C T T C C C C A G A A T C C C

10

【 0 0 4 8】

表 3 は、表 1 及び表 2 の m R N A 及び m i R N A 集合の間で重複する 1 8 の遺伝子及び 5 つの m i R N A を同定する。

【表 3】

表 3			
I D	種類	受入番号	記号
O A _ 0 0 2 2 8 5	m i R N A	h s a - m i R - 1 8 6	m i R - 1 8 6
O A _ 0 0 0 4 4 2	m i R N A	h s a - m i R - 1 0 6 b	m i R - 1 0 6 b
I L M N _ 2 3 8 2 7 5 8	m R N A	N M _ 1 3 4 4 4 2 . 2	C R E B 1
I L M N _ 1 8 0 5 9 9 6	m R N A	N M _ 0 1 5 4 7 7 . 1	S I N 3 A
I L M N _ 3 1 7 9 3 7 1	m R N A	N M _ 0 3 1 2 6 3 . 2	H N R N P K
I L M N _ 2 2 2 7 5 7 3	m R N A	N M _ 0 0 4 8 3 2 . 1	G S T O 1
O A _ 0 0 0 3 9 7	m i R N A	h s a - m i R - 2 1	m i R - 2 1
I L M N _ 3 2 7 4 9 1 4	m R N A	X R _ 0 3 8 9 0 6 . 1	L O C 6 4 8 9 2 7
I L M N _ 1 7 0 0 0 4 4	m R N A	N M _ 0 2 4 5 4 5 . 2	S A P 1 3 0
I L M N _ 1 8 0 6 9 4 6	m R N A	N M _ 0 0 1 0 7 6 6 8 3 . 1	U B T F
I L M N _ 1 7 7 0 0 3 5	m R N A	N M _ 0 2 0 9 6 7 . 2	N C O A 5
O A _ 0 0 2 2 3 4	m i R N A	h s a - m i R - 1 4 0 - 3 p	m i R - 1 4 0 - 3 p
I L M N _ 1 7 3 0 9 9 9	m R N A	N M _ 0 0 3 2 9 2 . 2	T P R
I L M N _ 1 7 5 1 3 6 8	m R N A	N M _ 0 0 2 1 3 8 . 3	H N R N P D
I L M N _ 1 7 6 6 4 3 5	m R N A	N M _ 0 1 6 3 1 2 . 2	W B P 1 1
I L M N _ 2 0 5 4 1 2 1	m R N A	N M _ 2 0 7 4 0 9 . 1	C 6 o r f 1 2 6
I L M N _ 1 7 9 3 3 8 6	m R N A	N M _ 0 0 5 1 2 0 . 1	M E D 1 2
I L M N _ 1 7 9 0 8 0 7	m R N A	N M _ 0 0 4 6 2 8 . 3	X P C
I L M N _ 1 6 8 1 3 2 4	m R N A	N M _ 0 0 4 9 2 7 . 2	M R P L 4 9
O A _ 0 0 1 2 7 1	m i R N A	h s a - m i R - 3 6 3	m i R - 3 6 3
I L M N _ 1 6 8 5 4 7 2	m R N A	N M _ 0 2 4 9 9 3 . 3	L R R T M 4
I L M N _ 1 6 8 8 7 2 2	m R N A	N M _ 0 0 0 6 4 0 . 2	I L 1 3 R A 2
I L M N _ 1 7 4 0 3 1 9	m R N A	N M _ 0 3 2 0 3 6 . 2	I F I 2 7 L 2

【 0 0 4 9 】

表 1 ~ 3 で特定される遺伝子及び m i R N A は、公的に入手可能である。当業者なら、

10

20

30

40

50

それらとハイブリダイズするこれらの組成物またはプローブ及びプライマー配列を、mRNA及びmiRNAの配列を使用することにより、容易に再現することができるだろう。そのような配列は全て、Illumina、ABI Open Array、GenBank、またはNCBIデータベースなどの従来よりある提供源から公的に入手可能である。www.mirbase.orgとして特定されるウェブサイトも、そのような配列の別の公的提供源である。

【0050】

本明細書中記載される組成物及び方法の文脈において、どのような特定の組み合わせ集合であってもその中に列挙されるmRNA及びmiRNAの組み合わせについての「少なくとも2」、「少なくとも5」などの記述は、同定されるmRNA及びmiRNAのありとあらゆる組み合わせを意味する。疾患プロファイルに特異的なmRNA及びmiRNAは、表1及び表2にあるとおりの順位付け順である必要はなく、本明細書中、及び/または表3に特定されるmRNA及びmiRNAの任意の組み合わせが可能である。

10

【0051】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数形または複数形で使用される場合、概して、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを示し、これらは、未変RNAまたはDNAの場合も、変性RNAまたはDNAの場合もある。すなわち、例えば、本明細書中定義されるとおりのポリヌクレオチドとして、制限なく、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、ならびに一本鎖及び二本鎖領域を含むRNA、DNA及びRNAを含むハイブリッド分子、この分子中のDNA及びRNAは、一本鎖の場合もあるし、より典型的には、二本鎖の場合もあるし、一本鎖及び二本鎖領域を含む場合もある、を挙げることができる。また、「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書中使用される場合、RNAまたはDNAあるいはRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域も示す。そのような領域中の鎖は、同一分子に由来する場合も異なる分子に由来する場合もある。そのような領域は、1つまたは複数の分子の全てを含む場合があるが、より典型的には、分子のあるものの領域のみを含む。三重螺旋領域の分子の1つは、オリゴヌクレオチドであることが多い。「ポリヌクレオチド」という用語は、具体的には、cDNAを含む。この用語は、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNA(cDNAを含む)及びRNAを含む。すなわち、安定性または他の理由から修飾された骨格を持つDNAまたはRNAは、この用語が本明細書中意図するとおりの「ポリヌクレオチド」である。その上、イノシンなどの普通ではない塩基、またはトリチウム標識した塩基などの修飾された塩基を含むDNAまたはRNAも、本明細書中定義されるとおりの「ポリヌクレオチド」という用語に含まれる。一般に、「ポリヌクレオチド」という用語は、未修飾のポリヌクレオチドが化学的、酵素的、及び/または代謝的に修飾された全ての形、ならびに単細胞及び複雑細胞をはじめとするウイルス及び細胞のDNA及びRNA特徴の化学的形を包含する。

20

30

【0052】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、比較的短いポリヌクレオチドを示し、オリゴヌクレオチドとして、制限なく、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖または二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド、及び二本鎖DNAが挙げられる。オリゴヌクレオチド、例えば一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドなどは、化学的方法により、例えば、市販の自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して、合成されることが多い。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、様々な他の方法によっても作製することができ、そのような方法として、in vitro組換えDNA介在技法、ならびに細胞及び生命体でのDNA発現が挙げられる。

40

【0053】

本明細書中使用される場合、「抗体」という用語は、二本の軽鎖及び二本の重鎖を有するインタクト免疫グロブリン、またはそれらの任意の断片を示す。すなわち、単独の孤立した抗体または断片は、ポリクローナル抗体、高親和性ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体の場合があ

50

る。「抗体断片」という用語は、インタクト抗体構造未満のものを示し、抗体断片として、制限なく、孤立した単独抗体鎖、一本鎖Fv構築物、Fab構築物、軽鎖可変もしくは相補性決定領域(CDR)配列などを挙げることができる。

【0054】

「差次的に発現される遺伝子転写物またはmRNA」または「差次的に発現されるmiRNA」、「差次的発現」という用語及びそれらの同義語は、互換使用されるが、これらは、疾患、具体的には肺癌などの癌に罹患している対象では発現が活性化して、対照となる対象における発現よりも高いまたはより低いレベルになる遺伝子またはmiRNA配列を示す。これらの用語は、同一疾患の異なる段階で発現が活性化されてより高いまたはより低いレベルになる遺伝子またはmiRNAも含む。同じく当然のことながら、差次的に発現される遺伝子またはmiRNAは、核酸レベルまたはタンパク質レベルで活性化または阻害いずれかを受ける場合もあるし、代替スプライシングの対象となって異なるポリペプチド産物をもたらす場合もある。そのような差異は、例えば、mRNAレベル、表面発現、分泌、またはポリペプチドの他の分配での変化により明らかになる場合がある。差次的遺伝子発現は、2種以上の遺伝子またはそれらの遺伝子産物間の発現の比較、あるいは2種以上の遺伝子またはそれらの遺伝子産物間の発現の比の比較、あるいはさらに同一遺伝子の2種の異なるプロセッシング産物の比較を含む場合があり、これらは、正常な対象、健康ではない対照、及び疾患、具体的には癌に罹患している対象の間で、または同一疾患の様々な段階間で異なる。差次的発現は、例えば、正常細胞と患部細胞間、または異なる疾患事象もしくは疾患段階にある細胞間での遺伝子もしくはその発現産物の時間的または細胞的発現パターンでの、定量的ならびに定性的差異の両方を含む。本発明の目的に関して、「差次的遺伝子発現」は、対象試料と対照試料の間で遺伝子発現に統計上有意差($p < 0.05$)がある場合、存在するとみなされる。

【0055】

RNA転写物に関して「過剰発現」という用語は、参照mRNAのレベルに対して正規化することにより求められる転写物のレベルを示すのに使用され、過剰発現のレベルは、検体またはmRNAの特定参照集団中の全ての測定された転写物の場合がある。

【0056】

「増幅」という用語は、遺伝子または遺伝子断片またはmiRNAの複数のコピーが、特定細胞または細胞株中に形成されるプロセスを示す。複製された領域(一続きの増幅DNA)は、「アンプリコン」と称することが多い。通常、産生されたメッセンジャーRNA(mRNA)の量、すなわち、遺伝子発現レベルによって、発現する特定遺伝子から作製されるコピーの数の割合も増加する。

【0057】

「予後」という用語は、本明細書中、癌が寄与する死亡または進行の可能性の予測を示すために使用され、この用語には、腫瘍性疾患、例えば肺癌などの再発、転移性伝播、及び薬物耐性が含まれる。「予測」という用語は、本明細書中、薬物または薬物集合に対して有利または不利のいずれかで反応すること、同じくそれらの反応の度合い、あるいは患者が、原発性腫瘍の外科的除去及び/または化学療法後、ある特定の長さの時間、癌の再発なしに生存することの可能性を示すために使用される。本発明の予測方法は、どのような患者についても最も適切な治療様式を選択することで治療の決定を下すのに臨床上使用することができる。本明細書中記載される予測方法は、患者が、外科治療介入、所定の薬物または合剤を用いた化学療法、及び/または放射線療法などの治療レジメンに対して有利に反応しそうであるかどうか、あるいは手術及び/または化学療法もしくは他の治療様式の終了後、患者の長期生存が望めるかどうかを予測するのに役立つ道具である。

【0058】

「長期」生存という用語は、本明細書中、手術または他の治療後少なくとも1年間、より好ましくは少なくとも3年間、特に好ましくは少なくとも7年間の生存を示すために使用される。

【0059】

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者により容易に決定することができ、概して、プローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的見積もりである。一般に、プローブが長いほど、適切にアニーリングするためにより高い温度が必要となり、一方プローブが短いほど低温が必要となる。ハイブリダイゼーションは、一般に、相補鎖が、それらの溶融温度より低い環境中に存在する場合の変性DNAの再アニーリング能力に依存する。ハイブリダイズする配列とプローブとの間の所望の相同性の度合いが高いほど、使用される相対温度は高くなる。結果として、当然ながら、より高い相対温度が、よりストリンジェントな反応条件を作り、温度が低いほどそうではなくなる傾向にある。様々な文献が、ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーについて追加の詳細及び説明を提供している。

10

【0060】

本明細書中記載される組成物及び方法の文脈において、どのような遺伝子集団でもその中に列挙されるmRNA及びmiRNA（例えば、表1、2、または3）のうち「3つ以上」、「少なくとも5つ」などの記述は、列挙されるmRNA及びmiRNAの任意の1つまたはありとあらゆる組み合わせを意味する。例えば、mRNA及びmiRNA発現プロファイルの適切な組み合わせとして、少なくとも3から145までの間の任意の個数のmRNA及びmiRNAを表1、2及び/または3から選んで含有するプロファイルが挙げられる。1つの実施形態において、表から選択された、mRNA及びmiRNAにより形成される発現プロファイルは、好ましくは、順位付けされた順序で使用され、例えば、表の最上位にある遺伝子は、試験で、より顕著に識別される結果を実証したので、したがって、それより下位の遺伝子よりもプロファイルにおいてより意義深い可能性がある。しかしながら、他の実施形態において、有用な遺伝子プロファイルを形成する遺伝子は、必ずしも順位付けの順序にある必要はなく、それぞれの表から選ばれた任意の遺伝子の場合がある。

20

【0061】

当然のことながら、本明細書中の様々な実施形態は、様々な状況下で「comprising（含む）」という言葉を使用して表現されているものの、関連実施形態は、「consisting of（からなる）」または「consisting essentially of（本質的に～からなる）」という言葉を使用しても記載される。なお、「a」または「an」という用語は、1つまたは複数であることを示し、例えば、「an miRNA」は、当然ながら、1つまたは複数のmiRNAを表す。そのため、「a」（または「an」）、「1つまたは複数の」、及び「少なくとも1つの」という用語は、本明細書中、同義で使用される。

30

【0062】

本明細書中特に記載がない限り、本明細書中使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるもの、及び本出願で使用される用語の多くについて全般的な案内を当業者に提供する文献を参照することにより一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0063】

本明細書中で、ならびに表1、2、及び/または3の遺伝子コレクションの使用を通じて特定される、mRNA及びmiRNAの肺癌及び肺疾患シグネチャー、または遺伝子及びmiRNA発現プロファイルは、さらに最適化して遺伝子及びmiRNAの個数を減少または増加させることができ、それにより診断の精度を上昇させることができる。

40

【0064】

遺伝子（mRNA）発現プロファイリング方法

本明細書中記載される組成物及び方法に有用なプロファイルを作製するのに、または本明細書中記載される組成物を使用して診断工程を行うのに使用された遺伝子（mRNA）発現プロファイリングの方法は、既知であり、米国特許第7,081,340号に、及び国際特許出願公開第WO2010/054233号に十分にまとめられている。これらの特許文献は、本明細書中参照として援用される。遺伝子発現プロファイリングのそのよう

50

な方法として、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づく方法、ポリヌクレオチドの配列決定に基づく方法、及びプロテオミクスに基づく方法が挙げられる。試料中の mRNA 発現を定量するための当該分野で既知の最も一般的に使用される方法として、ノーザンブロット法及び *in situ* ハイブリダイゼーション法；RNA アーゼ保護アッセイ；及び RT-PCR などの PCR に基づく方法が挙げられる。あるいは、DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、及び DNA-RNA ハイブリッド二重鎖または DNA-タンパク質二重鎖をはじめとする特定二重鎖を認識することが可能な抗体が使用される場合がある。配列決定に基づく遺伝子発現分析の代表的な方法として、遺伝子発現連続解析法 (SAGE)、及び大規模並列シグネチャー配列決定 (MPSS) による遺伝子発現解析が挙げられる。

10

【0065】

簡単に述べると、最も高感度かつ最も柔軟な定量方法は、RT-PCR であり、この方法を用いて、異なる試料集団中、正常及び腫瘍組織中、薬物治療ありまたはなしでの、mRNA レベルを比較して、遺伝子発現のパターンを特性決定し、密接に関連した mRNA 同士を識別し、及び RNA 構造を分析することができる。第一工程は、標的試料からの mRNA の単離である (例えば、この場合、典型的には全 RNA をヒト PBMC から単離する)。mRNA は、例えば、凍結または保管されたパラフィン包埋した固定 (例えばホルマリン固定した) 組織試料から抽出することができる。RNA 単離は、企業から購入した精製キット、緩衝剤セット、及びプロテアーゼを用いて、取扱説明書に従って行うことができる。市販品の例として、TRI-REAGENT、Qiagen RNeasy ミニ

20

【0066】

RT-PCR による遺伝子発現プロファイリングの第一工程は、RNA テンプレートから cDNA への逆転写、続いて PCR 反応でのその指数関数的増幅である。逆転写工程は、典型的には、状況及び発現プロファイリングの目的に応じて、特定のプライマー、ランダムヘキサマー、またはオリゴ dT プライマーを用いて刺激する。例えば、GENE AMPLIFICATION RNA PCR キット (Perkin Elmer、Calif.、USA) 製品に

30

【0067】

PCR 工程は、一般に、5' - 3' ヌクレアーゼ活性を有するが、3' - 5' ブルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性は欠けている Taq DNA ポリメラーゼ、例えば、TAQMAN (登録商標) PCR などの熱安定性の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼを使用する。選択されたポリメラーゼは、その標的アンプリコンと結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解し、2つのオリゴヌクレオチドプライマーは、アンプリコンを生成させる。第三のオリゴヌクレオチド、またはプローブは、好ましくは標識されており、2つの PCR プライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。Ta q M a n (登録商標) RT-PCR は、市販されている装置を用いて行うことができる。

40

【0068】

リアルタイム PCR は、各標的配列に対する内部競争相手が正規化のために使用される定量的競合 PCR、及び試料中に含有される正規化遺伝子、または RT-PCR 用ハウスキーピング遺伝子を利用する定性的競合 PCR の両方に匹敵する。別の PCR 方法は、MassARRAY に基づく遺伝子発現プロファイリング方法 (Sequenom、Inc.、San Diego、CA) である。当該分野で既知であり遺伝子発現プロファイリングに使用可能な、PCR に基づく技法のさらに他の実施形態として、例えば、ディフアレシナルディスプレイ法、増幅断片長多型 (iAFLP)、及び遺伝子発現の迅速アッセ

50

イに市販されている Lumindex 100 LabMAP システム及び多色符号化微粒子 (Lumindex Corp., Austin, Tex.) を使用する Bead Array (商標) 技法 (Illumina, San Diego, CA); ならびに広範囲適用発現プロファイリング (HiCEP) 解析が挙げられる。

【0069】

RNA 発現プロファイルは、対象の血液から、CPT 管を用いた遠心、フィコール勾配、または等価な密度分離により、赤血球及び顆粒球を除去し、続いて TRIzol 試薬、RNALATER 試薬、または同様な試薬を用いて RNA を抽出して、完全性の高い RNA を得ることにより、得られる。個々のメッセンジャー RNA 種の量は、マイクロアレイ及び / または定量的ポリメラーゼ連鎖反応法を用いて求めた。

10

【0070】

プロファイルのため RNA 発現レベルを得るのに使用される他の手順の中に、機械学習アルゴリズム、例えば、再帰的特徴消去を伴う SVM (SVM - RFE)、または他の分類アルゴリズム、例えばペナルティ付き判別分析 (PDA) などを解析に使用して (国際特許出願公開第 WO 2004 / 105573 号、2004 年 12 月 9 日公開、を参照) 数学的関数を得る RT - PCR があり、この関数の係数は、入力される RNA 遺伝子発現値に従って作用して「スコア」を出力し、「スコア」の値は、個々のクラス及び予測の確実性を決定する。その後識別される予定のメンバーのクラスに属することが既知である対象を多数解析することによりこの関数を決定したら、それを用いて、対象をその疾患状態に関して分類する。

20

【0071】

差次的遺伝子発現も、マイクロアレイ技法を用いて同定または確認することが可能であり、これも国際特許出願公開第 WO 2010 / 054233 号に詳細に記載されている。すなわち、肺癌 / 肺疾患関連遺伝子の発現プロファイルは、マイクロアレイ技法を用いて、新鮮なまたはパラフィン包埋組織いずれかで測定することができる。この方法では、関心対象のポリヌクレオチド配列 (cDNA 及びオリゴヌクレオチドを含む) を、マイクロチップまたはガラス基板に撒くまたは整列させる。次いで、整列させた配列を、関心対象の細胞または組織由来の特定 DNA プローブとハイブリダイズさせる。マイクロチップに固定されたマイクロアレイ化遺伝子は、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションに適している。チップに適用される標識化 cDNA プローブは、アレイの DNA の各点と特異的にハイブリダイズする。ストリンジェントな洗浄により非特異的に結合したプローブを除去した後、チップを、共焦点レーザー顕微鏡法によりまたは CCD カメラなど別の検出法によりスキャンする。各整列させたエレメントのハイブリダイゼーションの定量は、対応する mRNA 存在量の査定を可能にする。マイクロアレイ分析は、市販されている装置で、製造者のプロトコルに従って行うことができる。

30

【0072】

米国特許第 7,081,340 号 (本明細書注参照として援用される) にまとめられている他の有用な方法として、遺伝子発現連続解析法 (SAGE)、及び大規模並列シグネチャー配列決定法 (MPSS) が挙げられる。

【0073】

40

免疫組織化学的方法及びプロテオミクス的方法も、本明細書中の方法及び組成物への使用について記載される遺伝子の遺伝子発現産物の発現レベルを検出するのに適しており、遺伝子発現プロファイリングの他の方法に対する有用な補助であり、単独でまたは他の方法と併用して、本明細書中記載される遺伝子及び miRNA プロファイルの組み合わせの遺伝子発現産物を検出するのに使用することができる。抗体または抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、特に好ましくはモノクローナル抗体、または各マーカーに対して特異的な他のタンパク質結合リガンドを使用して、発現を検出することができる。抗体は、抗体自身を、例えば、放射性標識、蛍光標識、ビオチンなどのハプテン標識、または西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素で、直接標識化することにより、検出することができる。あるいは、未標識一次抗体を、一次抗体に特異的な

50

抗血清、ポリクローナル抗血清、またはモノクローナル抗体を含む標識化二次抗体と併用する。免疫組織化学的分析用プロトコル及びキットは、当該分野で周知であり、市販されている。

【0074】

本発明のアッセイ及び方法を行う上で、これらの同一技法を用いて、mRNA及びmiRNAプロファイルの組み合わせについてmRNA発現レベル要素を得ることができ、患者のプロファイルを、適切な参照プロファイルと比較することができ、この情報に基づいて、推奨される診断または治療を選択することができる。

【0075】

miRNAの検出/定量方法

miRNA発現を得る、検出する、及び定量するのに使用可能な方法は、既知であり、本発明の診断目標を達成するために使用することができる。例えば、以下の実施例に記載される技法、ならびに、例えば、特に国際特許出願公開第WO2008/073923号；米国特許出願公開第2006/0134639号、米国特許第6,040,138号、及び同第8,476,420号に記載される技法を参照。

【0076】

例えば、生体試料は、専売のPaxGene Blood RNAシステム(PreAnalytiX、a Qiagen、BD company)を用いて収集することができる。PAXgene Blood RNAシステムは、2つの統合された構成要素を含む：PAXgene Blood RNA管及びPAXgene Blood RNAキットである。血液試料は、標準的な静脈切開技法を介して、直接PAXgene Blood RNA管に吸引採取される。これらの管は、細胞内RNAを直ちに安定させる専売試薬を含有しており、ex-vivo分解またはRNA転写物の上向き調節を最小限に抑える。パッチ試料凍結を排除すること及び収集後の試料処理の緊急性が最小限に抑えられることが可能になることで、大幅に検査効率が向上し費用が削減される。

【0077】

その後、様々なアッセイを用いて、miRNAを、検出及び/または測定する。最も高感度かつ最も柔軟な定量方法は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)であり、この方法を用いて、異なる試料集団中、正常及び腫瘍組織中、薬物治療ありまたはなしでの、miRNAレベルを比較して、miRNA発現のパターンを特性決定し、密接に関連したmiRNA同士を識別し、及びRNA構造を分析することができる。この方法は、TaqMan(登録商標)RT-PCR(Applied Biosystems)など、従来のRT-PCRアッセイキットを、取扱説明書に従って使用することにより、採用することができる。

【0078】

第一工程は、標的試料からのRNAの単離である(例えば、この場合、典型的には全RNAをヒト全血から単離する)。mRNA抽出の一般的方法は、当該分野で、例えば、分子生物学の標準的教科書において、周知である。RNA単離は、企業から購入した精製キット、緩衝剤セット、及びプロテアーゼを用いて、取扱説明書に従って行うことができる。市販品の例として、TRI-REAGENT、Siegen RNeasyミニカラム、MASTERPURE完全DNA及びRNA精製キット(EPICENTRE(登録商標)、Madison、Wis.)などが挙げられる。塩化セシウム密度勾配遠心分離などの従来技法も使用できる。

【0079】

逆転写工程では、cDNAは、検出しようとするmiRNAに特異的なプライマーを用いて、mRNA試料から逆転写される。逆転写の方法は、当該分野で、例えば、分子生物学の標準的教科書において、周知である。簡単に述べると、RNAを、最初に、プライマーとともに70℃でインキュベートしてRNA二次構造を変性させ、次いで、氷上で急速に冷却して、プライマーでRNAをアニールさせる。dNTP、RNAアーゼ阻害剤、逆転写酵素、及び逆転写緩衝剤を含む他の構成要素を反応物に加える。逆転写反応は、42

10

20

30

40

50

で1時間行う。次いで、反応物を70℃に加熱して、酵素を不活性化させる。

【0080】

RT-PCR工程では、cDNA試料からPCR産物を増幅させる。PCR産物の蓄積は、二重標識化蛍光発生プローブ（すなわち、TaqMan（登録商標）プローブ）により測定する。リアルタイムPCRは、各標的配列に対する内部競争相手が正規化のために使用される定量的競合PCR、及び試料中に含有される正規化miRNA、またはRT-PCR用ハウスキーピングmiRNAを使用する定性的競合PCRの両方に適合する。さらなる詳細については、例えばHeld et al., Genome Research 6:986-994 (1996)を参照。TaqMan（登録商標）RT-PCRは、市販されている装置を使用することができる。誤差及び試料間の多様性の影響を最小限に抑えるため、RT-PCRは、通常、内部標準を用いて行われる。理想的な内部標準とは、異なる組織間で一定レベルで発現し、実験処理により影響されないものである。miRNA発現のパターンを正規化するために最も頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピングmiRNAであるグリセルアルデヒド-3リン酸-デヒドロゲナーゼ（GAPDH）及びβ-アクチンのmRNAである。

10

【0081】

RNA源として固定されたパラフィン包埋組織を使用する、miRNA発現のプロファイリングの代表的プロトコルの工程には、mRNA単離、精製、プライマー延長、及び増幅が含まれるが、これらの工程は、当業者に既知である。簡単に述べると、代表的なプロセスは、パラフィン包埋腫瘍組織試料から、約10μm厚さの切片を切り出すことから始まる。次いで、RNAを抽出し、タンパク質及びDNAを除去する。RNA濃度を分析した後、RNA修復及び/または増幅工程が、必要であれば、これを含めることができ、そしてRNAを、miRNA特異的プロモーターを用いて逆転写し、続いてRT-PCRを行う。

20

【0082】

以下の実施例で同定される具体的な技法は、当該分野の状況を示す。しかしながら、miRNA単離、検出、及び定量的他の従来方法を、これらの方法で採用することもできる。miRNAを検出する及び/または測定するさらに他の方法を、抗体またはその断片を使用して、採用することができる。miRNAと結合する配列を有する組換え分子も、これらの方法で使用することができる。当然ながら、本明細書中定義されるとおりの指定されたmiRNAと結合する任意の抗体、抗体断片、またはそれらの混合物は、その抗体または抗体混合物がどのようにして生成したかに関わらず、mRNA及びmiRNAプロファイルの組み合わせのためmiRNA発現レベルを得る方法に採用することができる。

30

【0083】

同様に、miRNA配列を同定するためにゲノムまたは他のハイブリダイゼーションプローブを使用する方法は、本明細書中有用である。別の実施形態において、適切なアッセイ検出アッセイは、免疫組織化学的アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、カウンター免疫電気泳動、放射免疫アッセイ、放射性免疫沈降アッセイ、ドットプロットアッセイ、競合阻害アッセイ、またはサンドイッチアッセイである。

【0084】

上記または本明細書中のその他どこかで記載される方法は、どれでも、状態または2つの状態の間の差異を診断または検出するのに有用な数値データまたはグラフデータを作製するコンピュータープロセッサまたはコンピューターでプログラミングされた装置により行うことができる。

40

【0085】

組成物

遺伝子（mRNA）及びmiRNA発現プロファイルの定義された組み合わせを利用して肺癌及び肺疾患を診断する方法は、肺癌、例えば、NSCLCなどを診断する、あるいは肺癌の具体的な段階（初期、ステージI、ステージII、または後期）を診断する、肺癌の具体的な型（例えば、AC対LSCC）を診断する、肺疾患の種類、例えば、COP

50

Dまたは良性肺小結節などを診断する、または癌もしくは疾患のさらなる治療を決めるまたは再発の可能性を評価するための治療的または外科的介入の効果をモニタリングするための簡潔な診断道具の開発を可能にする。

【0086】

すなわち、本明細書中記載されるとおりの哺乳類対象でのそのような診断または評価のための組成物は、キットまたは試薬が可能である。例えば、組成物の1つの実施形態は、mRNA及びmiRNAを検出及び定量するのに使用されるリガンドが固定されている基材を含む。試薬は、1つの実施形態において、mRNAまたはmiRNAの核酸配列を増幅及び検出する増幅核酸プライマー（RNAプライマーなど）またはプライマー対である。別の実施形態において、試薬は、標的配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブである。別の実施形態において、試薬は、抗体または抗体断片である。試薬は、上記のプライマー、プローブ、または抗体を複数含むことが可能であり、それぞれが、表1、2、または3の少なくとも1つのmRNA及びmiRNAに特異的である。任意選択で、試薬は、従来の検出可能な標識と併用することができる。本明細書中使用される場合、「標識」または「レポーター分子」は、核酸（単独ヌクレオチドを含む）、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはタンパク質リガンド、例えば、アミノ酸もしくは抗体などを標識するのに有用な化学または生化学部分である。「標識」及び「レポーター分子」として、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、消光剤、放射性ヌクレオチド、酵素、基質、補因子、阻害剤、磁気粒子、及び他の当該分野で既知の部分が挙げられる。「標識」または「レポーター分子」は、測定可能な信号を生成することができ、オリゴヌクレオチドもしくはヌクレオチド（例えば、非天然ヌクレオチド）またはリガンドと共有結合または非共有結合で結合できる。

10

20

【0087】

別の実施形態において、組成物は、関連する複数のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプローブもしくはリガンド、それらに対する任意選択の検出可能な標識、固定用基材、酵素標識に対する任意選択の基質、ならびに他の検査用具を含有するキットである。さらに別の実施形態において、少なくとも1つのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたはリガンドは、検出可能な標識を伴う。ある特定の実施形態において、試薬は、基材に固定されている。基材の例として、マイクロアレイ、チップ、マイクロ流体カード、またはチャンバが挙げられる。

30

【0088】

そのような組成物は、1つの実施形態において、複数のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含有し、各ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、哺乳類生体試料、例えば、血液、血清、または血漿由来の異なる遺伝子または異なるmiRNAとハイブリダイズする。mRNA及びmiRNAは、1つの実施形態において、表1、2、及び/または3に列挙されるものから選択される。表1は、肺癌の存在を示すプロファイルまたはシグネチャーの代表として本発明者らが同定した上位約145の遺伝子及びmiRNAの1つの実施形態を含む。遺伝子及びmiRNAのこのコレクションは、参照対照の生体試料中の同一mRNA及びmiRNA発現と比較して、mRNA及びmiRNA発現が変更される（すなわち、増加または減少する）遺伝子及びmiRNAのものである。表2は、肺癌の存在を示す別のプロファイルまたはシグネチャーの代表として本発明者らが同定した上位約147の遺伝子及びmiRNAの1つの実施形態を含む。遺伝子及びmiRNAのこのコレクションは、参照対照の生体試料中の同一mRNA及びmiRNA発現と比較して、mRNA及びmiRNA発現が変更される（すなわち、増加または減少する）遺伝子及びmiRNAのものである。表3は、表1と表2の間で重複するmRNA及びmiRNAを含有する。

40

【0089】

1つの実施形態において、標的となるmRNA及びmiRNAは、表1で1位から119位に順位付けされたものから選択される。別の実施形態において、表1の順位に入ったこれらの標的の他に、mRNA及びmiRNAに対するリガンドを、本発明の組成物に含

50

める。1つの実施形態において、組成物は、表1の単独のmRNAを標的とするリガンド、及び表1の単独のmiRNAを標的とするリガンドを含有する。別の実施形態において、組成物は、同一mRNAまたは同一miRNAを標的とする複数のリガンドを含有する。

【0090】

1つの実施形態において、標的となるmRNA及びmiRNAは、表1で特定される標的全部から選択される。別の実施形態において、標的となるmRNA及びmiRNAは、表2で特定される標的の一部または全部から選択される。別の実施形態において、表1及び表2の順位に入ったこれらの標的の他に、mRNA及びmiRNAに対するリガンドを、本発明の組成物に含める。1つの実施形態において、組成物は、表1または2の単独のmRNAを標的とするリガンド、及び表1または2の単独のmiRNAを標的とするリガンドを含有する。別の実施形態において、組成物は、同一mRNAまたは同一miRNAを標的とする複数のリガンド、すなわち、これらの表のものの少なくとも5、10、20、50、75、100、130、140、またはそれ以上の組み合わせを標的とする複数のリガンドを含有する。

10

【0091】

別の実施形態において、哺乳類対象で肺癌を診断する組成物は、3セット以上のPCRプライマープローブセットを含む。各プライマープローブセットは、対象の生体試料で見つかる2つ以上のmRNAとは異なるポリヌクレオチド配列を増幅し、プライマーまたはプローブまたはセットは、対象の生体試料で見つかる1つまたは複数のmiRNAとは異なるポリヌクレオチド配列を増幅する。別の実施形態において、哺乳類対象で肺癌を診断する組成物は、3セット以上のPCRプライマープローブセットを含む。各プライマープローブセットは、対象の生体試料で見つかる2つ以上のmRNAの異なるポリヌクレオチド配列を増幅し、プライマーまたはプローブまたはセットは、対象の生体試料で見つかる1つまたは複数のmiRNAの異なるポリヌクレオチド配列を増幅する。

20

【0092】

さらに他の実施形態は、1～119位の順位にあるmRNA及びmiRNAの全て、すなわち表1の全てのmRNA及びmiRNA標的、表2の119のまたは全てのmRNA及びmiRNA標的、及び/または表3の全てのmRNA及びmiRNA標的を増幅するのに十分な、プライマー、プローブ、またはセットを含む。すなわち、別の実施形態において、リガンドは、組成物で使用するために表1、2、または3の少なくとも1つのmRNA及びmiRNAに対して作製される。さらに別の実施形態において、PCRプライマー及びプローブは、組成物で使用するために表1、2、及び/または3の少なくとも25のmRNA及びmiRNAに対して作製される。さらに別の実施形態において、PCRプライマー及びプローブは、組成物で使用するために表1、2、及び/または3の少なくとも50のmRNA及びmiRNAに対して作製される。さらに別の実施形態において、PCRプライマー及びプローブは、組成物で使用するために表1、2、及び/または3の少なくとも75のmRNA及びmiRNAに対して作製される。さらに別の実施形態において、PCRプライマー及びプローブは、組成物で使用するために表1または表2の少なくとも100のmRNA及びmiRNAに対して作製される。さらに別の実施形態において、PCRプライマー及びプローブは、組成物で使用するために表1または2の少なくとも125のmRNA及びmiRNAに対して作製される。当業者なら、上記に指定される数字の間に存在する全ての整数が、たとえ本明細書中具体的に記述されなかったとしても、この開示に含まれることがわかるだろう。表1、2、または3から選択された遺伝子及びmiRNAは、順位付けされた順序にある必要はなく；そうではなくて、参照対照対病気と診断された患者で発現の差を明らかに示す任意の組み合わせが、そのような組成物で有用である。

30

40

【0093】

さらに他の実施形態は、表1の順位付けされたmRNA及びmiRNA標的のより小さなサブセットを増幅するのに十分なPCRプライマー、プローブ、またはセットを含む。

50

さらに他の実施形態は、表 1 の順位付けされた mRNA 及び miRNA 標的のより小さなサブセットを増幅するのに十分な PCR プライマー、プローブ、またはセットを、肺疾患または癌で特徴的に変化することが見つかった他の mRNA 及び miRNA 標的を増幅するのに十分な PCR プライマー、プローブ、またはセットとともに含む。

【0094】

これらの選択された遺伝子及び miRNA は、遺伝子 / miRNA 発現の組み合わせプロファイルまたはシグネチャーを形成し、このプロファイルまたはシグネチャーは、肺癌または別の肺疾患を有する対象と選択された参照対照との間で識別可能である。1 つの実施形態において、患者の生体試料、例えば、血液中の mRNA 及び miRNA 発現の組み合わせにおける参照のものからの顕著な変化は、肺癌、例えば、非小細胞肺癌 (NSCLC) の診断と相関する。1 つの実施形態において、患者の生体試料、例えば、血液中の mRNA 及び miRNA 発現の組み合わせにおける参照のものからの顕著な変化は、そのような癌の段階の診断と相関する。1 つの実施形態において、患者の生体試料、例えば、血液中の mRNA 及び miRNA 発現の組み合わせにおける参照のものからの顕著な変化は、肺癌の型の診断と相関する。1 つの実施形態において、患者の生体試料、例えば、血液中の mRNA 及び miRNA 発現の組み合わせにおける参照のものからの顕著な変化は、非癌性症状、例えば、COPD、良性肺病変、または小結節などの診断と相関する。1 つの実施形態において、患者の生体試料、例えば、血液中の mRNA 及び miRNA 発現の組み合わせにおける参照のものからの顕著な変化は、別の疾患の診断と相関する。さらにこれらの組成物は、原因不明の肺小結節を有する対象で、追加診断または最初の診断を下すのに有用である。

10

20

【0095】

上記の組成物の 1 つの実施形態において、参照対照は、非健康対照 (NHC) である。他の実施形態において、参照対照は、上記に記載されるとおりの対照のどのクラスのものでもよい。選択された組み合わせの遺伝子及び miRNA 発現プロファイルのメンバーとハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含有する組成物は、診断用だけでなく、切除 / 化学療法の陽性効果が、最初の治療後長期に渡り維持されるかどうかを判断する外科的または非外科的治療処置の効果のモニタリング用にも望ましい。これらのプロファイルは、結果が手術前 / 化学療法前のプロファイルに戻ることを示すかどうかで、肺癌、例えば、NSCLC などの再発または再発の可能性を判断することも可能にする。これらの組成物が、肺癌の非外科的治療の有効性のモニタリング用に採用される可能性も非常に高い。

30

【0096】

表 1、2、及び / または 3 から選択された遺伝子及び miRNA に、任意選択で検出可能な標識を付随させたものに基づく組成物は、上記の PCR、RT-PCR、または QPCR 技法で使用するのに適合させたマイクロ流体カード、チップもしくはチャンバ、またはキットの形式で存在させることができる。1 つの態様において、そのような形式は、TAQMAN (登録商標) 定量的 PCR 低密度アレイを使用する診断アッセイである。予備結果は、必要とされる遺伝子及び miRNA の数が、これらのプラットフォームと適合性があることを示唆する。選択された対象由来の生体試料を組成物中のプライマー及びプローブと接触させた場合、対象由来の発現プロファイルにおける情報価値のある標的遺伝子及び miRNA の PCR 増幅は、遺伝子及び miRNA の発現における、参照遺伝子発現プロファイルからの変化を検出することを可能にする。患者の試料中の選択された mRNA 及び miRNA の発現組み合わせにおける、参照プロファイルのものからの顕著な変化は、肺癌の診断と相関するものとなり得る。同様に、手術後開在性対象由来の生体試料を組成物中のプライマー及びプローブと接触させた場合、プロファイル中の、表 1、2、及び / または 3 のものから選択された情報価値のある標的遺伝子及び miRNA の PCR 増幅は、手術前の患者 (または同様な患者) のものと比較することができる。患者の試料中の選択された mRNA 及び miRNA の発現における、参照発現プロファイルのものからの顕著な変化は、手術の陽性効果、及び / または陽性効果の維持と相関する。

40

50

【0097】

プライマー及びプローブ配列の設計は、いったん、特定のmRNA及びmiRNA標的が選択されれば、当業者の技能内にある。プライマー及びプローブ設計のために選択される特定の方法ならびに特定のプライマー及びプローブ配列は、これらの組成物の制限特徴ではない。当業者が利用可能なプライマー及びプローブ設計技法の良い説明が、公的に入手可能な道具、例えば、DNA BLASTソフトウェア、Repeat Maskerプログラム(Baylor College of Medicine)、Primer Express(Applied Biosystems); MGB assay-by-design(Applied Biosystems); Primer3(Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) WW

W上の一般利用者用及び生物学プログラマー用のPrimer3に関して、米国特許第7,081,340号に、及び他の出版物にまとめられている。一般に、本明細書中記載される組成物に使用される最適なPCRプライマー及びプローブは、概して、長さが12~30、例えば、17~22塩基であり、約20~80%、例えば、約50~60%のG+C塩基を含有する。50~80、例えば約50~70の融点、典型的には好ましい。

10

【0098】

マイクロ流体カード、マイクロアレイ、チップもしくはチャンバの形式で存在させることが可能な組成物は、本明細書中記載されるポリヌクレオチドハイブリダイゼーション技法を採用する。選択された関在性対象由来の生体試料を組成物中のハイブリダイゼーションプローブと接触させた場合、患者由来の発現プロファイルにおける情報価値のある標的遺伝子及びmiRNAのPCR増幅は、発現プロファイル中の遺伝子及びmiRNAの発現における、参照組み合わせ発現プロファイル、例えば、健康な対照、または肺疾患があるが癌はない対照などのものからの変化の検出及び定量を可能にする。

20

【0099】

これらの組成物は、肺癌、例えば、ステージIまたはステージIIのNSCLCなどを診断するのに使用することができる。さらに、これらの組成物は、原因不明の肺小结節を有する対象で、追加診断または最初の診断を下すのに有用である。表1、2、及び/または3から選択された標的またはそのサブセットにより形成されたmRNA及びmiRNA発現プロファイルの組み合わせは、炎症性遺伝子発現プロファイルと識別可能である。

30

【0100】

参照対象のクラスとして、悪性疾患のある喫煙者、非悪性疾患のある喫煙者、非悪性疾患のある元喫煙者、疾患のない健康な非喫煙者、慢性閉塞性肺疾患(COPD)を有する非喫煙者、COPDのある元喫煙者、固形肺腫瘍がありその除去のための手術前である対象; 固形肺腫瘍があり、その腫瘍の外科的除去後の対象; 固形肺腫瘍があり、その治療前である対象; 及び固形肺腫瘍があり、その治療中または治療後の対象を挙げることができる。適切なクラスの選択は、組成物の用途、すなわち、初期診断用か、治療もしくは手術後の予後用か、または疾患の型、例えば、AC対LSCCの詳細診断用かに依存する。

【0101】

診断方法

上記の組成物は全て、対象の疾患状態の、血液に基づく非侵襲性評価を可能にする様々な診断道具を提供する。診断検査におけるこれらの組成物の使用は、他のスクリーニング検査、例えば胸部X線またはCTスキャンなどとカップリングさせることが可能であるが、これらの使用は診断精度を高め、及び/または直接の追加試験を増加させる。他の態様において、本明細書中記載される診断用組成物及び道具は、疾患の予後、特定治療に対する反応のモニタリング、及び再発のリスクの定期評価を可能にする。本明細書中記載される方法及び組成物使用は、治療前、手術前、及び/または治療中の様々な時点、ならびに治療後の試料で、mRNA及びmiRNAレベルまたはプロファイルの診断用組み合わせにおける変化の評価も可能にし、再発の可能性を査定するのに使用可能な発現プロファイルまたはシグネチャーの組み合わせを同定する。

40

50

【 0 1 0 2 】

1つの実施形態において、哺乳類対象の症状を、診断または検出または査定する方法は、対象の生体試料中、または試料から作製されたmRNA及びmiRNA発現プロファイルの組み合わせから、表1、2、及び/または3で特定される標的mRNA及びmiRNA核酸配列の発現レベルを検出すること；ならびに対象試料中のmRNA及びmiRNA発現レベルまたはプロファイルの組み合わせを、参照標準と比較することを含む。対象試料のプロファイルの発現における、参照標準のものからの変化は、上述の症状の診断または予後を示すが、これは参照標準の選択に依存する。ある特定の実施形態において、症状は、肺癌、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、または良性肺小結節である。これらの方法は、上記の生体試料を用いて採用することができる。ある特定の実施形態において、生体試料は、全血、末梢血単核球、血漿、及び血清である。

10

【 0 1 0 3 】

上記で説明したとおり、本方法は、ある特定の実施形態において、対象の試料中の1つまたは複数の指定されたmRNA及び1つまたは複数の指定されたmiRNAの組み合わせの発現レベルを測定することが関与する。他の実施形態において、本方法の、検出、測定、または比較工程は、複数回繰り返される。例えば、ある特定の実施形態において、mRNA及びmiRNAレベルは、対象から異なる時点で採取された一連の試料で検出または測定される。これにより、このmRNA及びmiRNAの組み合わせの発現の、選択した参照標準からの変化のパターンを同定することができる。

20

【 0 1 0 4 】

さらに他の実施形態において、検出または測定工程は、対象由来の生体試料を、診断試薬、例えば試料中の標的mRNA及びmiRNA発現レベルを同定または測定する上記のもの、と接触させることが関与する。ある特定の実施形態において、接触工程は、上記生体試料中に、上記mRNAまたはmiRNA用診断試薬と試料中のmRNAまたはmiRNAとの間の直接または間接複合体を形成させることが関与するまたはそれを含む。その後、本方法により、本明細書で記載するような適切なアッセイで複合体のレベルを測定する。

【 0 1 0 5 】

これらの方法のある特定の実施形態において、組み合わせプロファイルを形成するmRNA及びmiRNA標的は、肺疾患なしで喫煙歴なし、肺疾患なしで喫煙歴あり、肺癌、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、良性肺小結節、腫瘍切除前の肺癌、腫瘍切除後の及び肺癌から選択される2つ以上の条件下で異なって発現する。本方法により査定される症状に応じて、参照標準が、参照対象または参照集団、例えば、（a）非小細胞肺癌（NSCLC）を有する参照ヒト対象または集団；（b）COPDを有する参照ヒト対象または集団、（c）健康でありかつ喫煙したことがない参照ヒト対象または集団、（d）元喫煙者または現在喫煙者であるが、疾患のない参照ヒト対象または集団；（e）良性肺小結節を有する参照ヒト対象または集団；（f）NSCLC腫瘍の外科的除去後の参照ヒト対象または集団；（g）NSCLC腫瘍の外科的除去前の参照ヒト対象または集団；及び（h）時間的により早い生体試料を提供した同一対象、などから得られる。

30

【 0 1 0 6 】

本明細書中記載される診断組成物及び方法は、現行の診断方法に勝る様々な利点を提供する。そのような利点の中でも以下がある。本明細書中例示されるとおり、肺癌の最も一般的な2種類である肺の腺癌または扁平上皮癌のある対象は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）または肉芽腫または他の良性腫瘍をはじめとする非悪性肺疾患のある対象と識別される。これらの方法及び組成物は、肺診療科に来院した小結節のある患者が悪性疾患を有するかどうかという実務的な診断問題に対する解決策を提供する。中度リスクの小結節のある患者は、その患者を、疾患リスクの可能性が非常に低いカテゴリーまたは非常に高いカテゴリーいずれかに分けられると思われる非侵襲性試験の恩恵を明らかに受けるだろう。遺伝子プロファイルに基づいた悪性度の正確な見積もり（すなわち、所定の患者が癌を有する確率が90%であるという見積もり对患者が癌を有する可能性は5%しかないという見積もり

40

50

）は、良性疾患に対する手術を減らし、根治できる段階で除去される初期腫瘍を増やし、経過観察のＣＴスキャンを減らし、小結節について心配する大きな心理的苦痛の削減をもたらすと思われる。肺癌についてＣＴスクリーニングと関連した追加医療の現在の推定費用の削減など、経済的影響も大きいと思われる、すなわち、質調整生存年あたり\$ 116,000が得られる。十分な感度及び特異性を有する非侵襲性試験は、手術後の悪性腫瘍の可能性を、すなわちその後の臨床診療を大きく変えると思われる。

【0107】

既存の方法に勝るこれらの方法の望ましい利点は、それらが、最小限に侵襲的な手順から、すなわち、血液試料の採取により、疾患状態を特性決定することができることである。対照的に、遺伝子発現プロファイルから癌腫瘍を分類する現行の実務は、組織試料、通常は腫瘍由来の試料に依存する。非常に小さな腫瘍の場合、生検は問題があり、腫瘍がわからないまたは見えない場合、その腫瘍から試料を得ることは明らかに不可能である。腫瘍の精製は必要なく、腫瘍の試料を分析する場合も同様である。最近発表された方法は、気管支鏡検査中に肺から上皮細胞をブラシで収集することに依存するが、これも血液試料を採取するよりも明らかに侵襲性である方法であり、しかも肺癌にしか適用できないが、本明細書に記載される方法は、あらゆる癌に一般化できる。血液試料は、さらなる利点を有する。その利点とは、材料の準備及びその後の分析のための安定化が容易であることであり、このことは、mRNAまたはmiRNAを分析しようとする場合に重要である。

【0108】

実施形態

1つの実施形態において、肺癌の診断用多分析物組成物は、(a)哺乳類生体試料由来のmRNA遺伝子転写物と特異的に、複合体化、ハイブリダイズ、またはこれを同定することができる、核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択されたリガンド；及び(b)哺乳類生体試料由来のmiRNAと特異的に、複合体化、ハイブリダイズ、またはこれを同定することができる、核酸配列、ポリヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドから選択された追加リガンドを含む。リガンド及び追加リガンドはそれぞれ、異なる遺伝子転写物またはmiRNAと結合し、同定された遺伝子転写物及びmiRNAの発現レベルの組み合わせは、肺癌または肺癌の段階の特徴的なプロファイルを形成する。

【0109】

別の実施形態において、上記組成物の遺伝子転写物及びmiRNAは、表1から選択される。別の実施形態において、組成物の遺伝子転写物及びmiRNAは、表1の第1～119位から選択される。別の実施形態において、上記組成物の遺伝子転写物及びmiRNAは、表1の全ての標的から選択される。別の実施形態において、上記組成物の遺伝子転写物及びmiRNAは、表2の標的の一部または全部から選択される。別の実施形態において、組成物の遺伝子転写物及びmiRNAは、表3の標的の一部または全部から選択される。

【0110】

さらに別の実施形態において、組成物の上記リガンドのそれぞれは、上記遺伝子転写物またはmiRNAの核酸配列を増幅及び検出する増幅核酸プライマーまたはプライマー対である。別の実施形態において、リガンドは、遺伝子のmRNAまたはmiRNA核酸配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブである。別の実施形態において、組成物は、抗体または抗体断片を含有し、各リガンドは、表1、2、または3の少なくとも1つのmRNAまたは1つのmiRNAに特異的である。

【0111】

別の実施形態において、組成物は、さらに、上記リガンドが固定される基材を含む。別の実施形態において、組成物は、マイクロアレイ、マイクロ流体カード、チップ、チャンバ、または複数プローブの複合体を含む。別の実施形態において、組成物は、複数プローブ配列を含むキットを含み、このプローブ配列はそれぞれ、表1の第1～119位、または表1の標的全部、または表2の標的の一部または全部、及び/または表3の標的の一部

または全部に入っている mRNA 及び miRNA のうち 1 つの mRNA 及び 1 つの miRNA とハイブリダイズすることができる。別の実施形態において、キットは、同一の mRNA または miRNA とハイブリダイズすることができる追加リガンドを含む。さらに別の実施形態において、キットは、複数の上記リガンドを含み、リガンドはそれぞれ、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマープローブセットを含む。別の実施形態において、キットは、プライマー及びプローブの両方を含み、上記プライマープローブセットはそれぞれ、異なる遺伝子転写物または miRNA を増幅する。

【0112】

別の実施形態において、組成物は、1 つまたは複数のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたはリガンドを、検出可能な標識を伴って含有する。

10

【0113】

別の実施形態において、組成物は、同一の選択された遺伝子及び miRNA の発現、発現レベル、または活性について、対象の全血中のものの、参照または対照のものからの変化を検出することができ、この変化は、肺癌の初期診断、肺癌の段階、肺癌の型または分類、肺癌の再発、肺癌の退縮、肺癌の予後、または外科的もしくは非外科的治療に対する肺癌の反応と相関する。別の実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌である。

【0114】

別の実施形態において、組成物は、同一の選択された遺伝子の発現について、対象の血液中のものの、参照または対照のものからの変化を検出することができ、この変化は、肺癌の診断または評価と相関する。

20

【0115】

別の実施形態において、診断または評価は、肺癌の診断、肺癌の段階の診断、肺癌の型または分類の診断、肺癌の再発の診断または検出、肺癌の退縮の診断または検出、肺癌の予後、または外科的もしくは非外科的治療に対する肺癌の反応の評価のうち 1 つまたは複数を含む。組成物の 1 つの実施形態において、リガンドは、RNA プライマーである。

【0116】

別の実施形態において、組成物は、少なくとも 2 つのリガンドを含む、キットまたはマイクロアレイであり、リガンドの少なくとも 1 つは対象が肺癌を有する場合に発現に修飾を生じる選択された遺伝子の mRNA 転写物を同定し、かつ少なくとも 2 つ目のリガンドは対象が肺癌を有する場合に発現レベルに変化を生じる miRNA を同定する。

30

【0117】

本発明のさらに別の実施形態は、哺乳類対象での肺癌の存在の診断方法または肺癌の評価方法であり、本方法は、哺乳類対象の生体液中の、表 1 の第 1 ~ 119 位、表 1 の標的の全部、表 2 の標的の一部または全部、及び / または表 3 の標的の一部または全部から選択される遺伝子転写物及び miRNA の発現の変化を同定すること、ならびにこの対象の mRNA 及び miRNA 発現レベルと、参照または対照由来の同一生体試料中の同じ mRNA 及び miRNA のレベルを比較することを含み、対象の mRNA 及び miRNA 遺伝子の発現の、参照のものからの変化は、肺疾患または癌の診断または評価と相関する。

【0118】

1 つの実施形態において、本方法は、本明細書に記載される、多分析物組成物を使用する。別の実施形態において、本方法は、診断または評価が、肺癌の診断、良性肺小结節、肺癌の段階の診断、肺癌の型または分類の診断、肺癌の再発の診断または検出、肺癌の退縮の診断または検出、肺癌の予後、または外科的もしくは非外科的治療に対する肺癌の反応の評価のうち 1 つまたは複数を含むことを可能にする。

40

【0119】

別の実施形態において、本方法の診断または評価は、肺癌の初期段階の診断を含む。

【0120】

別の実施形態において、本方法は、上記参照または対照との比較での 1 つまたは複数の選択された遺伝子転写物の上向き調節または下向き調節と、及び上記参照または対照との比較での 1 つまたは複数の選択された miRNA の上向き調節または下向き調節との組み

50

合わせを含む変化の検出を可能にする。別の実施形態において、本方法で使用される遺伝子転写物及びm i R N Aは、表1、2、及び/または3に列挙されるものの中から選択される。別の実施形態において、肺癌は、ステージIまたはIIの非小細胞肺癌である。

【0121】

なおさらなる実施形態において、対象は、固形腫瘍切除の手術または化学療法を受けた後であり；上記参照または対照は、手術前または治療前の同一対象由来の同一の選択された遺伝子転写物及びm i R N Aを含み；この選択された遺伝子転写物及びm i R N Aの発現の変化は、癌の再発または退縮と相関する。さらに他の実施形態において、参照または対照は、少なくとも1つの参照対象を含み、この参照対象は、以下からなる群より選択され：(a)悪性疾患のある喫煙者、(b)非悪性疾患のある喫煙者、(c)非悪性疾患のある元喫煙者、(d)疾患のない健康な非喫煙者、(e)慢性閉塞性肺疾患(COPD)を有する非喫煙者、(f)COPDのある元喫煙者、(g)固形肺腫瘍があり、その除去のための手術前である対象；(h)固形肺腫瘍があり、その外科的除去後の対象；(i)固形肺腫瘍があり、その治療前である対象；及び(j)及び固形肺腫瘍があり、その治療中または治療後の対象；上記参照または対照の対象(a)-(j)は、時間的により早い時点での同一試験対象である。他の実施形態において、参照mRNAまたはmiRNA標準は、参照対象または参照集団に由来する、算術平均、広義の平均、数値平均、または数値平均の範囲、数値パターン、図式パターン、または組み合わせたmRNA及びmiRNA発現プロファイルである。

10

【0122】

他の実施形態において、本方法で使用される生体試料は、全血、血清、または血漿である。

20

【0123】

なおさらなる実施形態において、本方法は、対象由来の生体試料を、試料中の選択されたmRNAと複合体化し、その発現レベルを測定する診断試薬と接触させること、及び対象由来の生体試料を、試料中の選択されたmiRNAと複合体化し、その発現レベルを測定する診断試薬と接触させること、を含み、発現レベルの変化の組み合わせは、癌またはその段階の診断となる。

【0124】

なお別の実施形態において、選択されたmiRNA及びmRNAは、肺疾患なしで喫煙歴なし、肺疾患なしで喫煙歴あり、肺癌、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、良性肺小結節、腫瘍切除前の肺癌、及び腫瘍切除後の肺癌から選択される2つ以上の条件下で異なって発現する。

30

【0125】

別の実施形態において、診断試薬を作製する方法は、哺乳類対象の生体液の試料中の、疾患の選択されたmRNA及びmiRNA配列特性の発現における変化の組み合わせを検出することを含む、疾患分類プロファイルの形成を含む。

【0126】

以下の実施例は、例示のみを目的として提供されるものであり、本発明は、いかなる方法でも、これらの実施例に制限されるとして解釈すべきではなく、そうではなくて、本明細書中提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる改変形態を包含すると解釈されるべきである。

40

【実施例】

【0127】

実施例1：試料規模の計算

この計算は、図1に記載されるPAXgeneデータに基づく。本発明者らは、癌患者23人及び対照25人の現在のPAXgeneデータセットから得られるデータを使用して、試験集団で所望の90%精度に到達するのに必要と思われる試料規模を推定した。本発明者らは、全試料の50~90%に相当する試料数24から44まで様々な規模の訓練集合を無作為に選択した。段階ごとに癌試料1つ及び対照試料1つを加えていけるように

50

、試料規模を、増加幅 2 で漸増させていった。所定の試料規模ごとに、50 の再サンプリングを行った。

【0128】

次いで、各訓練集合で t 検定を行い、p 値で順位付けして上位 100 位までの遺伝子を同定した。遺伝子リストを、あらゆる低発現物（癌群及び非癌群の全試料について平均バックグラウンドの 2 倍を超えない発現）を除去することにより、さらに縮小した。

【0129】

次いで、残った 58 の遺伝子を使用して、試験目的に最初持ちこたえたものを含む全試料をクラスター化した。本発明者らは、階層的クラスター化の計量基準として、標準化されたユークリッド距離及び完全連結を使用した。クラスターツリーを水平に横断する 1 本の切断を入れることにより、クラスターツリーを 2 つに分割して、2 つのクラスター（36）を同定した。一方は大部分が癌であり、他方は大部分が非癌であった。持ちこたえた試料は、2 つのクラスターのうち一方に割り振られ、癌試料の大部分を含有するクラスターを癌クラスターと定義した。

10

【0130】

誤分類された持ちこたえた試験試料の数を用いて、誤り率（ $e = \text{誤分類数} / \text{合計数}$ ）を計算した。次いで、本発明者らは、各特定訓練集合規模で、誤り率の中央値及び中央絶対偏差を 50 回の反復で計算した。既に記載したプロセスと同様に、検出力関数曲線を誤り率中央値から得られるデータに当てはめ、本発明者らは、図 1 に示すとおり、持ちこたえた試験試料で所望の 90 % 精度を達成するために訓練に必要な症例数を見積もる目的で、直線の方程式を得た。本発明者らの計算では、患者と対照に分かれる約 500 の試料を含む訓練集合を使用することにより、新規試験集団での 90 % 分類精度が達成可能であると示される。

20

【0131】

実施例 2 - RNA 精製及び品質の査定

遺伝子の RNA 精製及び miRNA アレイプロセッシングを、Genomics Core による通常サービスとして標準化された手順を用いて行う。Qiagen（商標）から市販されている標準キットを使用して、PAXgene RNA を調製する。このキットは、mRNA 及び miRNA の同時精製を可能にする。得られる RNA を、mRNA または miRNA のプロファイリングに使用する。

30

【0132】

RNA 品質を、バイオアナライザーを用いて求める。RNA 完全性数が > 7.5 である試料のみを使用した。Illumina 承認 RNA 増幅キット（Epicenter）を用いて、一定量（100 ng）の全 RNA を増幅した（aRNA）。この手順は、遺伝子及び miRNA 発現の複数繰り返しに十分な増幅材料を提供する。後日、代替収集系でより少ない試料を入手したとしても、ほんの 10 ng の少ない RNA 量で使用することができる。

【0133】

実施例 3 - データの前処理、アレイ品質管理、プローブフィルタリング

Illumina の Bead Studio によりアレイデータを処理し、シグナルプローブ及び対照プローブの発現レベルを、分析用にエクスポートする。実験ノイズを減らすため、情報価値のないプローブ（すべての試料の $> 95\%$ で検出されたのではなかったプローブ）及び任意の 2 つの試料間で少なくとも 1.2 倍変化することがなかったプローブを除去することにより、データをフィルタリングした。次いで、発現レベルを分位数正規化した。これらの手順により、情報価値のないプローブデータの除去された分位数正規化されたデータを得る。

40

【0134】

各ハイブリダイゼーションバッチ後、本発明者らは、全シグナルプローブ（ $> 40,000$ ）の発現レベルを用いて全てのマイクロアレイにまたがりスピアマン相関中央値として遺伝子観点で包括的相関をコンピューター計算した。そして包括的相関の中央絶対偏差

50

を計算する。各マイクロアレイについて、スピアマン相関中央値を、全ての他のアレイに対してコンピューター計算し、相関中央値が包括的相関から絶対偏差で8超異なるアレイを、外れ値としてマークし、それ以上の解析に使用しない。外れ値は、典型的にはPAX gene 試料の<1%である。外れ値のさらなる同定を、全般またはロバスト主成分(PCA)プロット及び多次元スケーリングなどの多変量解析を通じて行う。

【0135】

miRNA発現について、本発明者らは、本研究のためにABI(Life Sciences)製のOpenArrayプラットフォームを選択した。OpenArrayナノ流体PCRプラットフォームは、科学者が、最大3,072の独立したPCR分析を同時に行うことを可能にし、すでに臨床応用されており、変動を排除するロボットステーションを利用する。このプロセス用に検討した追加プラットフォームは、Nanosttring Technologies, Inc. (Seattle, WA)製のnCounterシステムである。簡単に述べると、このシステムは、デジタルカラーコード化されたバーコード技術を利用する。カラーコード化された分子「バーコード」を、標的遺伝子に対する1つの標的特異的プローブに取り付ける。バーコードは、標的分子と直接ハイブリダイズするので、増幅を必要とせずに個別に計数することができる。そのようなバーコードプローブ及び対照のセットを用いた単独分子の画像化は、1回の反応で多くの独特な転写物の検出及び計数を可能にする。例えば、NanoString Technologyが、ウェブサイト、www.nanostringtechnology.comに掲載する説明を参照。miRNAデータ前処理及びOpenArray品質管理については、全RNAを、ABIのプロトコルに従って、ABIから購入したOpenArray試薬を使用して、処理する。OpenArrayから得られたデータを、MATLABを使用して、以下のとおり、前処理する：小核RNA、RNU44及びRNU48のサイクル閾値(Ct)の平均(RNU_{avg})を、内在対照(ハウスキーピング遺伝子)として使用して、試料の発現レベルを正規化し、各miRNAの相対量(ΔCt)をコンピューター計算する。Ct値を、製造元(及び本発明者らの施設)が提示する24に限定することで、最大 ΔCt 値が、 ΔCt_{24} に等しくなる(この場合、 $\Delta Ct_{24} = 24 - RNU_{avg}$)。 ΔCt_{24} を超える ΔCt 値は、信頼できないと見なして、比較解析のため、 ΔCt_{24} 値にする。次いで、 ΔCt 値を、 $2^{\Delta Ct_{24} - \Delta Ct}$ を計算することにより、完全発現レベルに変換することになる。全ての反応は、3つ組で行う。全てのアッセイは、高度に標準化された条件を用いて行う。統計的考察のため、試料を、肺小結節のあるまたはない非癌患者及び肺癌のある患者から収集する。本発明者らの以前のPBM研究の結果に基づき、本発明者は、600のPAX gene 試料(肺小結節のある患者とない患者を組み合わせる)から、癌を全ての非癌から区別するのにより良好な遺伝子パネルを同定できると想定している。試料規模及び検出力の推定は、この想定に基づいていた。

【0136】

臨床業務では、間違いなく非悪性の小結節のある患者から癌を識別することが、より迅速に重要となる。本発明者らの以前の実験に基づき、癌と非悪性小結節を分類できる可能性がある遺伝子パネルは、癌と全ての非癌を分類するために同定されたものと、ある程度異なると思われる。分類用遺伝子パネルを決定する方法は、複数存在する。1つの従来式のやり方は、本発明者らが予備PAX gene 試験で使用した手順であり、予備PAX gene 試験について記載したとおりt検定によるもので、Benjamini and Hochberg, J. Royal Statist Soc., Series B, Vol. 57(1): 289-300 (1995)を用いて、p値を $p < .05$ に調整し、かつ最小のp値である50~100の遺伝子を階層的クラスタリングのために選択するものであるが、これは、巨大データセットについては有効ではないので、その場合には、本発明者らはSVM-RFEを代わりに使用して上手くいった。

【0137】

実施例4 - 遺伝子選出のための教師付き分類

本発明者らは、多くの交絡類似性(喫煙歴、肺疾患、年齢、人種など)を共有する臨床

上定義されたクラス（例えば癌／非癌／良性小結節）を識別する遺伝子発現分類指標を開発するのに、再帰的特徴消去を伴うサポートベクターマシン（SVM-RFE）（WO 2010/054233を参照）を適用するのが最も成功することを見出した。多くの他の教師付き方法とは異なり、SVMは、生体マーカーの選択に利点を有する。なぜなら、遺伝子は、クラス分離に対するそれぞれの寄与により順位付けされるので、分離に最も有用な遺伝子を同定することができるからである。寄与遺伝子は、RFEの反復プロセスにより削減されて、最も正確なクラス識別を提供する最小数の遺伝子が見つかる。また、各試料には、正または負のスコアが与えられ、このスコアは、図1に示すとおり、その試料をどちらかのクラスに振り分けるとともに、その試料がどのくらい良好に特定のクラスで同定されるのかの尺度でもある。本発明者らの研究では、正の場合は、癌と定義し、負の場合は、非癌とする。正のスコアが大きいほど、または負のスコアが小さいほど、各試料が特定のクラスに良好に振り分けられていると定義する。プロセスを、以下により詳細に示す。

【0138】

試料の分類を、SVM-RFEを使用して行い、このとき、無作為10倍再サンプリング及び相互検証を10回繰り返す（100位までの遺伝子の順位付けを得る）。各相互検証反復は、t検定で最も有意性の高い1,000の遺伝子で開始し、遺伝子数を、特徴消去工程1回ごとに10%削減する。遺伝子の最終順位付けは、Bordaカウント手順を用いて行う。試験した試料それぞれの分類スコアを、1つの遺伝子になるまで、相互検証及び遺伝子削減工程1回ごとに、記録する。最良の精度をもたらす遺伝子数を求め、最大精度の時点で関連する全ての遺伝子で、最初の識別指標を構成する。次いで、この識別指標を、精度を落とさずに可能な限り縮小していくことで、最終識別指標に到達する。SVM-RFEを用いると、相互検証工程は、過剰適合を回避するために不可欠である。

【0139】

検証手順に関して、分類指標の普遍性をさらに確保するため、本発明者らは、全ての患者のうち25～30%を分析に含めず、こうして独立した検定集団を形成する。独立した検定試料を、訓練集合の試料のうち70～75%の分析に由来する候補遺伝子を用いて分類する。各工程で、識別指標検出力計算の感度及び特異性を再評価して、要求されるエンドポイントを定義する。

【0140】

本発明者らの分類戦略の大きな強み及び進歩性は、識別力を最適化する目的でmRNA及びmiRNAを含む複数のデータタイプを組み込み、これらの別箇の遺伝子調節レベル間に相乗効果をもたらすことである。そのような多モードの分析は、癌診断に大きな可能性を提供する。したがって、mRNA及びmiRNAは、いずれか1種類のデータのみを使用するか、または利用可能な情報全てを合併することで利益を得る最良の識別指標を同定するのに、独立して及び合併したデータセットとしての両方で使用される。各プラットフォームから得られたデータを、本発明者らが以前にmRNAに適用した教師無し分類技法により、別々に定量し、正規化し、分析する。

【0141】

これらの技法のそれぞれから得られるデータは、定量的であり、t検定により分析される差次的発現特徴であり、各タイプのデータに顕著な特徴を、別々及び組み合わせたデータセットとしての両方で、SVM-RFEによりさらに分析する。本発明者らは、最も集約された特徴集団は、両タイプのデータのあるものを含有すると予測している。詳細には、1つの情報価値のあるmiRNAは、そのmiRNAが制御する複数のmRNA種と同じくらいに情報価値があり、したがって、それらと交換できる場合がある。SVM-RFEにより決定された、識別指標に含まれることになる遺伝子またはmiRNAの集合は、比較される試料の任意の所定の2群を区別する共通の機能または経路を同定する目的で、さらに分析することができ、かつ新たな治療標的を同定することができる可能性を有している。

【0142】

診断アルゴリズムの開発及び実行：

本発明者らが以前に発表した遺伝子シグネチャーに基づき、本発明者らは、>30の遺伝子プローブ、及び/または20未満のmiRNAプローブからなるシグネチャーを同定する。mRNA及びmiRNAの分類精度を、各データタイプを別々に正規化して処理し、別々に査定する。OPENARRAYシステムにより、本発明者らは、高処理プラットフォームで候補遺伝子を試験することができる専用アレイを開発することができる。さらに、NANOSTRINGプラットフォームは、市販の試験をさらに試験し実行する簡単かつロバストなシステムを提供する。mRNAプラットフォーム及びmiRNAプラットフォームは、両方とも、最終的に、その実体が試料中にどれだけ多く存在するかの尺度となる数字をもたらす。これは、分類の最終データを、1つの行列にまとめることができ、単独の分類指標として使用できることを意味する。試料のクラス、分類戦略、ならびに試料及びそれらのサブタイプの個数を、表4にまとめる。

10

【表4】

表4：様々な分析に使用される試料数のまとめ。

分析される試料数					
		セットA*			セットB**
比較	クラス	合計	訓練	試験	合計
L C 対 N O D	L C	1 8 1	1 2 7	5 4	
	N O D	9 9	6 9	3 0	
	合計	2 8 0	1 9 6	8 4	7 0 + 6 5
L C 対 N O D + S C	L C	1 8 1	1 2 7	5 4	
	N O D + S C	1 6 4	1 1 5	4 9	
	合計	3 4 5	2 4 2	1 0 3	7 0

20

【0143】

* (セットA) 345の試料が、一義的に癌(LC)または対照(NODまたはSC)に割り振られ、訓練及び試験に使用された。

30

【0144】

** (セットB) 不明確な表現型の70の試料。これら70の試料には、肺切除後の試料及び後にLCを発症した小結節患者由来の試料が含まれており、そのため癌シグネチャーの状態は、本質的に不明であった。LC対NODの比較には、65のSC試料も含まれていたが、これらの試料は、訓練-試験では使用されなかったものの、分類に利用可能であった。

【0145】

分析の合計415の試料のうち、345の試料は、一義的に、癌(LC)または対照(NODまたはSC)ラベルが割り振られ(セットA)、訓練及び試験目的で使用された。残りの70の試料は、不明確な表現型の試料(セットB)であり、肺切除後の試料及び後にLCを発症した小結節患者由来の試料が含まれ、345の一義的に割り振られた試料(症例または対照として臨床上確認されたが、切除後の試料を含まない)で開発された分類指標によりさらに分類するために使用された。両方のセットから取り出した試料を、無作為に分けて、70%を訓練集合(セットAについて242の試料)に及び残り30%を試験集合(セットAについて103の試料)にした。

40

【0146】

訓練集合を使用して、SVMにRadial Basis Function(RBF)カーネル及び前向き特徴選択(FFS)を使用する10倍相互検証ルーチンを併用することにより、最良の分類指標を見つけた。FFSは、各段階で1つの最良の特徴(遺伝子

50

またはm i R N A)を選出して、この特徴が全体の訓練精度を改善した。あるいは、本発明者らは、過去の8の試料で使用が上手くいった線形カーネル及び再帰的特徴消去 (R F E) の使用を試みたが、前向き特徴選択とR B Fカーネルの併用の方が、予備訓練集合でより良い精度が得られた。次いで、最良の訓練精度をもたらした特徴の個数に合った分類指標を、最終分類指標として選択し、独立集合外の試験集合に適用して、その分類指標の偏りのない精度を見積もった。

【 0 1 4 7 】

記載した分類指標開発プロセスを使用して、本発明者らは、比較用に、3つのデータセットを用いて、3つの異なる分類指標を作製した：(1)mRNAデータのみを使用；(2)m i R N A発現データのみを使用、及び(3)mRNA及びm i R N Aデータの組み合わせを分析。各データセット/分類分析から、試験集合性能に基づく報告を得たが、それには精度、感度、特異性、及びR O C曲線の曲線下面積 (A U C) が含まれていた。結果を表5に示す。

【表5】

表5：肺癌のある患者 (L C) を、良性小結節のある患者 (N O D) 及び小結節のない喫煙対照 (S C) から識別する上での、予備精度、感度、及び特異性。

*

比較	データの 種類	合計標的 数	精度	感度	特異性	A U C
L C 対 N O D	m R N A	1 6 1	8 1 %	9 2 %	6 0 %	0 . 8 6
	m i R N A	5	7 5 %	8 3 %	6 0 %	0 . 7 5
	両方	1 4 7 **	7 9 %	8 7 %	6 7 %	0 . 8 7
L C 対 N O D + S C	m R N A	1 5 1	7 9 %	7 8 %	8 0 %	0 . 8 8
	m i R N A	2 6	7 1 %	6 9 %	7 3 %	0 . 7 7
	両方	1 4 5 ** *	8 3 %	8 1 %	8 4 %	0 . 8 8

* 遺伝子発現 (m R N A) のみ、m i R N A発現のみ、及びm R N A + m i R N A発現 (両方) を用いた分析についてのデータが提示される。N O D = 小結節、S C = 小結節のない喫煙対照。 ** 表2からの標的 (全て) 。 *** 表1からの標的 (全て) 。

【 0 1 4 8 】

表によれば、最良の精度は、癌全般対全ての対照の分類指標により達成された (8 3 % 精度) が、これは、mRNA及びm i R N Aデータ両方を同時に使用し (合計145の特徴) 、このことは、同一分類において両方のプラットフォームを使用することの利点を実証する。組み合わせ分類指標のR O CのA U Cを図2に示す。

【 0 1 4 9 】

独立した試験集合の各試料に対して分類指標により割り振られた個別スコアを、図3のS V Mプロットに示すが、各試料には、S V M分類指標により割り振られたスコアが与えられていた。正のスコアは、癌に分類されたことを、負のスコアは対照に分類されたことを示す。各カラムは、1人の患者を示し、カラムの高さは、分類の信頼度の強さの尺度と見なすことができる。示される分類は、分類のため古典的な0点切り捨てを使用する。グラフは、カットオフにより感度が92.6%に最大化され、特異性が73.5%になるこ

とを示す。

【 0 1 5 0 】

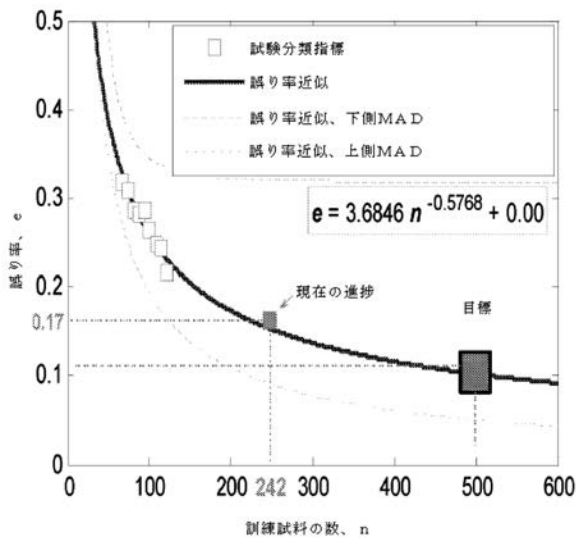
図 4 は、この方法論の予備結果を示す：345 の試料を、ABI Open Array PCR プラットホームで Illumina HT12v4 mRNA アレイ及び miRNA を用いて、処理及び分析した。完全に独立した試験集合であることを確実にするため、242 (70%) を訓練セットとし、103 (30%) を試験試料とした。

【 0 1 5 1 】

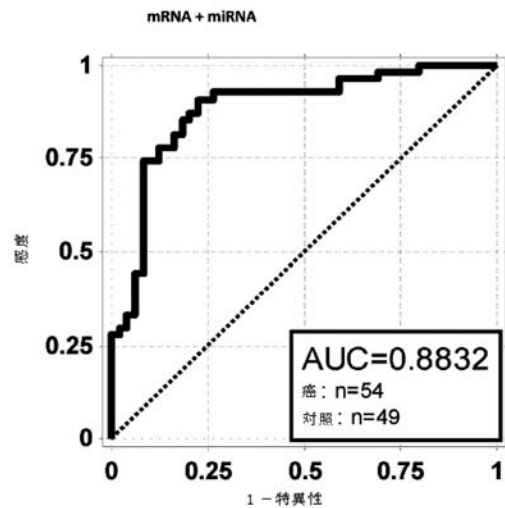
本開示全体を通じて記載される、ありとあらゆる、特許、2015 年 5 月 19 日出願の米国仮特許出願番号第 62 / 163,766 号をはじめとする特許出願、及びウェブサイトを含む文献は、そのまま全体が、本明細書中参照として明白に援用される。本発明は、具体的な実施形態を参照して開示されてきたものの、本発明の他の実施形態及び変形形態が、本発明の真の精神及び範囲から逸脱することなく当業者により考案されることは、明白である。添付の請求項は、そのような実施形態及び等価な変形形態を含む。

10

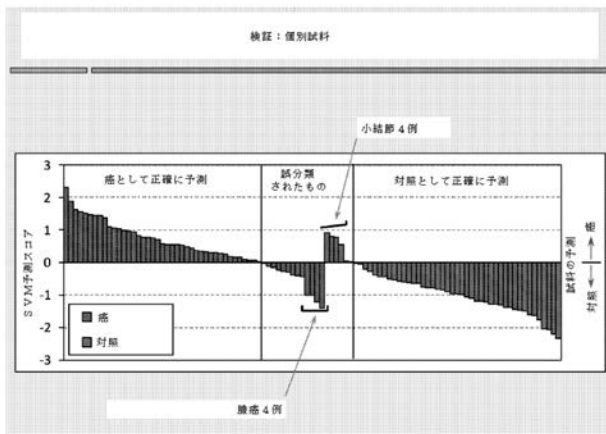
【 図 1 】



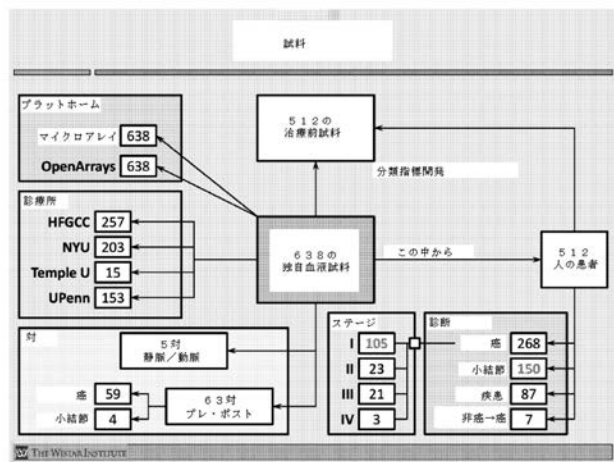
【 図 2 】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2018524972000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33232

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33232

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.:
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-10, directed to a multi-analyte composition.

Group II, claims 11-20, directed to a method for detecting the expression of combination of at least one mRNA target and at least one miRNA target, and a method of generating a diagnostic reagent.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

—continued on extra sheet attached hereto—

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.:
1-10

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C40B 30/04 (2016.01) CPC - G01N 33/5091, G01N 33/5094 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) - C40B 30/04 (2016.01) CPC - G01N 33/5091, G01N 33/5094 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 536/24.33, 536/24.31 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) pubWEST; PatBase; Google Scholar search terms - Cancer, tumor, metast\$, lung, mma, messenger ma, mima, microrna, micro-ma, composi\$, marker, biomark\$, assay, assay\$miR-186, miR, 186, microma, 186, miR186, CBL1, UBTF, CREB1, pamr, pamr1, SFRS15, TMEM67, NCOA5, mif4, WBPII		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2014/0141986 A1 (SPETZLER et al.) 22 May 2014 (22.05.2014) para [0009]; [0011]; [0025]; [0027]; [0032]; [0201]; [0376]; [0377]; [0447]; [0466]-[0469]; [0819]; [0820]; [0856]; [0857]; [0864]-[0898].	1, 6-10 2-5
Y	US 2014/0005065 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al.) 02 January 2014 (02.01.2014) para [0021]; [0080]; Table V.	2-5
A	US 2013/0287772 A1 (HALBERT) 31 October 2013 (31.10.2013) para [0168]; claims 1, 16, 17, 18.	1
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 06 October 2016 (06.10.2016)		Date of mailing of the international search report 26 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33232

—continuation of Box No III—

Special technical features

Group I has the special technical feature of a multi-analyte composition comprising a ligand and an additional ligand, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a method for detecting the expression of combination of at least one mRNA target and at least one miRNA target, and a method of generating a diagnostic reagent, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical feature of a mRNA ligand and an additional miRNA ligand selected from a nucleic acid sequence, polynucleotide or oligonucleotide capable of specifically complexing with, hybridizing to, or identifying a mRNA and a miRNA from a mammalian biological sample, wherein the expression levels of the gene transcripts or miRNA is indicative of lung cancer or stage of lung cancer. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is anticipated by US 2013/0287772 A1 to Halbert et al., (hereinafter Halbert).

Halbert teaches a mRNA ligand and an additional miRNA ligand selected from a nucleic acid sequence, polynucleotide or oligonucleotide capable of specifically complexing with, hybridizing to, or identifying a mRNA and a miRNA from a mammalian biological sample, wherein the expression levels of the gene transcripts or miRNA is indicative of lung cancer or stage of lung cancer (claim 1 'method of theranosing a disease or disorder in a subject in need thereof, comprising: a. identifying a biosignature of a vesicle population in a sample from the subject,...and b. comparing the biosignature to a reference, wherein the comparison is indicative of the likelihood of whether the subject is a responder or non-responder to a therapeutic agent, thereby theranosing the disease or disorder'; claims 17, 18 'wherein identifying the biosignature comprises assessment of one or more nucleic acid...wherein the one or more nucleic acid comprises mRNA and/or microRNA'; claim 30 'wherein the disease or disorder comprises prostate cancer, colorectal cancer, lung cancer'; [0168] 'overexpression in a sample of cancer-related surface antigens or vesicle payload, e.g., a tumor associated mRNA or microRNA, as compared to a reference, can indicate the presence of cancer in the sample'; [0239] 'Different vesicle populations can be isolated or detected using different binding agents. Each population in a biological sample can be labeled with a different signaling label').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I-II lack unity of invention under PCT Rule 13.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/09	2 0 0	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)		C 1 2 N 15/11	Z	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . M A T L A B

(72) 発明者 ショウ , マイケル・ケイ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 6 3 メディア・インディアンズブリングロード 9 5

(72) 発明者 コセンコー , アンドレイ・ブイ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 0 6 ハンティンドンバリー・オークウィンロード 1 8 0 6

F ターム(参考) 4B063 QA07 QA08 QA19 QQ42 QQ52 QQ58 QR32 QR35 QR56 QR62
QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	用于诊断或检测肺癌的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2018524972A	公开(公告)日	2018-09-06
申请号	JP2017560179	申请日	2016-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	解剖学和生物学的Wistar客棧住下特乌特		
申请(专利权)人(译)	将Wistar - 在居家特乌特解剖学和生物学		
[标]发明人	ショウ、ルイズ・シー ショウ、マイケル・ケイ コセンコー、アンドレイ・ブイ		
发明人	ショウ、ルイズ・シー ショウ、マイケル・ケイ コセンコー、アンドレイ・ブイ		
IPC分类号	C12Q1/6886 G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/6851 C12Q1/6837 C12N15/09 C12N15/11		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G16B25/00 G16B40/00 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 G16H50/70		
FI分类号	C12Q1/6886.ZNA.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12Q1/6851.Z C12Q1/6837.Z C12N15/09.200 C12N15/11.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA07 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	62/163766 2015-05-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

可以络合，肺癌或肺疾病中，mRNA基因转录物特异性的哺乳动物来源的血液样品的诊断组合物多分析物杂交，或以识别它，核酸序列，聚核苷酸或选自寡核苷酸，配位体;并且从所述基因的哺乳动物的血液样品中的miRNA特异性，络合，可以杂交，或以识别它，所述核酸序列，多核苷酸，或寡核苷酸，以及另外的配体。每个配位体和另外的配体是不同的基因的转录物，或结合到所述miRNA，和基因转录和miRNA识别形式肺癌或肺疾病的阶段的鲜明轮廓。还描述了使用该组合物进行诊断和评估的方法，以及开发这种组合物的方法。 【选择图】无

(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2018-524972
(P2018-524972A)

(43) 公表日
平成30年9月6日 (2018. 9. 6)

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

GO1N 33/53 (2006.01)

GO1N 37/00 (2006.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12Q 1/6837 (2018.01)

F I

C12Q 1/6886 ZNAZ

GO1N 33/53 M

GO1N 37/00 I02

C12Q 1/6851 Z

C12Q 1/6837 Z

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

(全 70 頁)

最終頁に続く

(21) 出願番号
(86) (22) 出願日
(85) 翻訳文提出日
(86) 国際出願番号
(87) 国際公開番号
(81) 国際公開日
(31) 優先権主張番号
(32) 優先日
(33) 優先権主張国

特願2017-560179 (P2017-560179)
平成28年5月19日 (2016. 5. 19)
平成29年12月14日 (2017. 12. 14)
PCT/US2016/033232
W02016/187404
平成28年11月24日 (2016. 11. 24)
62/163, 766
平成27年5月19日 (2015. 5. 19)
米国 (US)

(71) 出願人
(74) 代理人
(72) 発明者

500205596
ザ・ウイスター・インスティテュート・オブ・アナトミー・アンド・バイオロジー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19104
フイラデルフィア・スブルースストリート3601
110000741
特許業務法人小田島特許事務所
ショウ、ルイズ・シー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19063
メディア・インディアンズプリングロード95

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌の診断または検出のための方法及び組成物

(54) 【発明の名称】 肺癌の診断または検出のための方法及び組成物