

(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2006-509185

(P2006-509185A)

(43) 公表日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		Y	4 B O 6 3
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N 33/569		B	
GO 1 N 33/571	(2006.01)	GO 1 N 33/569		G	
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/571			
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	GO 1 N 33/574		D	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 151 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号	特願2004-536444 (P2004-536444)	(71) 出願人	502321021
(86) (22) 出願日	平成15年9月11日 (2003.9.11)		モノジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月13日 (2005.5.13)		アメリカ合衆国 イリノイ州 パーノンヒルズ バターフィールドロード 1033
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/028379	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02004/025251		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成16年3月25日 (2004.3.25)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	10/241,753		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成14年9月12日 (2002.9.12)	(72) 発明者	プレスマン ノーマン ジェイ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 イリノイ州 グレンコエグリーンウッド アベニュー 390
		(72) 発明者	ハーシュ ケニス エス.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ポートマン ドライブ 807
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患状態の細胞ベースの検出および弁別

(57) 【要約】

本発明は、高い感度および特異性をもって疾患状態を検出し、弁別する方法を提供する。本方法により、細胞ベースの試料が異常な細胞を含むかどうかの判断が可能となり、また、ある一定の疾患について、存在する疾患の組織学的タイプを決定することができる。本方法は、細胞ベースの試料における分子マーカーの発現のレベルおよびパターンの変化を検出する。パネルの選択および有効化手法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞ベースの診断を用いて一般的な疾患の状態を検出するためのまたは特定の疾患状態の間を区別するためのパネルであって、該パネルは複数のプローブを含み、その複数のプローブは各々一般的または特定の疾患状態に関連するマーカーに特異的に結合し、該パネルの構成プローブの細胞学的検体中の細胞への結合パターンが、該疾患状態の存在または特定の性質の診断となる、パネル。

【請求項 2】

一般的疾患状態が癌および感染症からなる群より選択される、請求項1記載のパネル。

【請求項 3】

癌が、上皮細胞ベースの癌、固形腫瘍ベースの癌、分泌性腫瘍ベースの癌、および血液ベースの癌からなる群より選択される、請求項2記載のパネル。

【請求項 4】

感染症が、ウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、または真菌が感染性生物である細胞ベースの疾患からなる群より選択される、請求項2記載のパネル。

【請求項 5】

パネルが、コスト、地理的位置における一般的な疾患状態の有病率、地理的位置における特定の疾患状態の有病率、プローブの利用可能性、および商業的考慮からなる群より選択される重み付け因子を用いることによって最適化される、請求項1記載のパネル。

【請求項 6】

プローブの各々が検出可能な標識を含む、請求項1記載のパネル。

【請求項 7】

プローブが抗体を含む、請求項6記載のパネル。

【請求項 8】

標識が、発色団、フルオロフォア、色素、放射性同位体、および酵素からなる群より選択される、請求項6記載のパネル。

【請求項 9】

標識が、 β 線、 γ 線、X線、紫外線放射、可視光、赤外線放射、およびマイクロ波からなる群より選択される電磁放射線を用いて検出される発色団である、請求項8記載のパネル。

【請求項 10】

結合パターンが光工学的顕微鏡を用いて検出される、請求項1記載のパネル。

【請求項 11】

光工学的顕微鏡が、 γ 線、X線、 β 線、紫外線放射、可視光、赤外線放射、およびマイクロ波からなる群より選択される少なくとも1つの電磁放射線を利用する、請求項10記載のパネル。

【請求項 12】

性感染症を検出し、クラミジア、トリコモナス、淋病、ヘルペス、および梅毒の間を区別する、請求項1記載のパネル。

【請求項 13】

以下の工程を含む、細胞ベースの診断を用いて患者における疾患状態を検出するための、または疾患状態の間を区別するためのパネルを形成する方法：

(a) その各々が疾患状態に関連するマーカーのライブラリーのメンバーに特異的に結合するプローブの、結合の感度および特異性を測定する工程；次いで、

(b) その結合パターンが該疾患状態の存在または具体的性質についての診断である、限定された複数の該プローブを選択する工程。

【請求項 14】

測定する工程が以下の工程を含む、請求項13記載の方法：

(a) 疾患に罹患していることがわかっている患者からの組織学的または細胞学的試料、および該疾患に罹患していないことがわかっている患者からの組織学的または細胞学的

10

20

30

40

50

試料を、プローブの各々と別々に接触させる工程；

(b) 各プローブのその相補的疾患マーカーとの特異的結合の量を、該マーカーが該試料の細胞に存在することが知られている座位において測定する工程；次いで、

(c) 各該量を該疾患の存在または特定の性質と関連付ける工程。

【請求項 15】

選択する工程が、統計学的分析方法、パターン認識方法、および神経ネットワーク分析の一つまたは複数を含む、請求項13記載の方法。

【請求項 16】

選択する工程が重み付け因子の使用を含む、請求項13記載の方法。

【請求項 17】

以下の工程を含む、疾患を検出する、または疾患状態の間を区別する方法：

(a) 疾患状態に特徴的な異常細胞を含有することが疑われる細胞学的試料を請求項1記載のパネルと接触させる工程；次いで、

(b) 該疾患状態の存在または具体的性質についての診断であるプローブの結合パターンを検出する工程。

【請求項 18】

細胞学的試料が、体液、上皮細胞ベースの器官系、微小針吸引物、またはバイオプシーから収集された細胞試料である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

細胞学的試料が痰である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

細胞ベースの診断を用いて一般的疾患状態を検出するためのまたは特定の疾患状態の間を区別するためのパネルであって、請求項13記載の方法により形成される、パネル。

【請求項 21】

疾患マーカーが、形態学的バイオマーカー、遺伝学的バイオマーカー、細胞周期バイオマーカー、分子バイオマーカー、および生化学バイオマーカーからなる群より選択される、請求項1記載のパネル。

【請求項 22】

上皮細胞ベースの癌が、肺、泌尿器、胃腸、または生殖器の管に由来する、請求項3記載のパネル。

【請求項 23】

固形腫瘍ベースの癌が、肉腫、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、甲状腺癌、および前立腺癌からなる群より選択される、請求項3記載のパネル。

【請求項 24】

分泌性腫瘍ベースの癌が、肉腫、乳癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、甲状腺癌、および前立腺癌からなる群より選択される、請求項3記載のパネル。

【請求項 25】

血液ベースの癌が白血病およびリンパ腫からなる群より選択される、請求項3記載のパネル。

【請求項 26】

体液が、血液、尿、脊髄液、およびリンパからなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 27】

上皮細胞ベースの器官系が、肺管、尿路、生殖管、および胃腸管からなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 28】

微小針吸引物が器官および系中の固体組織タイプに由来する、請求項18記載の方法。

【請求項 29】

バイオプシーが器官および系中の固体組織タイプに由来する、請求項18記載の方法。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

器官および系が、乳房、膵臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺からなる群より選択される、請求項28記載の方法。

【請求項31】

形態学的バイオマーカーが、DNA倍数性、MAC、および前悪性病巣からなる群より選択される、請求項21記載のパネル。

【請求項32】

遺伝学的バイオマーカーが、DNA付加体、DNA突然変異、およびアポトーシス指標からなる群より選択される、請求項21記載のパネル。

【請求項33】

細胞周期バイオマーカーが、細胞増殖マーカー、分化マーカー、調節分子、およびアポトーシスマーカーからなる群より選択される、請求項21記載のパネル。

10

【請求項34】

分子バイオマーカーまたは生化学バイオマーカーが、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、腫瘍抗原、成長因子および受容体、酵素、タンパク質、プロスタグランジン、ならびに接着分子からなる群より選択される、請求項21記載のパネル。

【請求項35】

器官および系が、乳房、膵臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺からなる群より選択される、請求項29記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全内容が参照として本明細書に組み入れられる、2001年3月12日に出願された米国仮出願第60/274,638号の利益を主張する、2002年3月12日に出願された米国出願第10/095,298号の一部継続出願である。

【0002】

発明の背景

本発明は、患者における一般的疾患状態の早期検出に関する。また、本発明は、その初期および後期段階における特定の疾患状態の間の区別（弁別）に関する。

【背景技術】

30

【0003】

具体的疾患状態の初期検出は、疾患がまだ限局的であり、その病理学的効果を解剖学的に、生理学的に、かつ臨床的に制限しつつ、初期診断および初期治療を可能とすることによって、患者の生存に対する機会を大いに改善することができる。いずれのテストまたは疾患検出方法の2つの鍵となる評価尺度は、その感度（感度 = 真の陽性 / (真の陽性 + 偽陰性)）および特異性（特異性 = 真の陰性 / (偽陽性 + 真の陰性)）であり、これは例外なしに標的疾患を有さない個体を誤って含めることなく、全ての罹患個体を正確に検出するためにどのようにしてテストを十分に行うかの尺度となる。歴史的には、貧弱な感度および特異性のため、多くの診断テストが批評されてきた。

【0004】

40

感度は、テストすべき個体における標的疾患を正しく検出するテストの能力の尺度である。感度が貧弱なテストでは、偽陰性、すなわち病気を有するがその特定の疾患がないと誤って同定される個体が高率で生じる。偽陰性の潜在的危険は、病気の個体が、ある期間診断されず、治療されず、その間に疾患が後期段階まで進行し、治療（もしあれば）が、効果的でなくなりうることである。この結果、患者の結果はさらに不良であろう。感度の低いテストの一例は、HIVに対するタンパク質ベースの血液テストである。このタイプのテストは、前記疾患が十分に確立されてウイルスがかなりの数で血流に侵入するまでウイルスの存在を検出できないため、感度が貧弱である。対照的に、高い感度を有するテストの例は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いるウイルス負荷検出である。このタイプのテストは非常に少量のウイルスを検出するために、高い感度が達成される（Lewis, D.R. et

50

al.,「Molecular Diagnostics: The Genomic Bridge Between Old and New Medicine: A White Paper on the Diagnostic Technology and Services Industry」, Thomas Weisel Partners, June 13, 2001参照)。

【0005】

他方、特異性は、疾患状態がない患者を正確に同定するテストの能力の尺度である。特異性が貧弱なテストでは、偽陽性、すなわち病気を有すると誤って同定される個体を高率で生じる。偽陽性の決定により、不必要な医療手続治療とそれに伴う危険、情緒的および財政的ストレスを患者に強いることであり、これは患者の健康に有害な効果を有し得る。高い特異性を持つ診断テストを開発するのを困難としている疾患の特徴は、疾患のメカニズムがしばしば複数の遺伝子およびタンパク質に関連していることである。加えて、ある種のタンパク質は、疾患状態と無関係の理由で評価される可能性がある。高い特異性を有するテストの例は、p53突然変異を検出することができる遺伝子ベースのテストである。p53突然変異は、存在する癌細胞がなければ決して検出されない(Lewis, D.R. et al.,「Molecular Diagnostics: The Genomic Bridge Between Old and New Medicine: A White Paper on the Diagnostic Technology and Services Industry」, Thomas Weisel Partners, June 13, 2001参照)。

10

【0006】

細胞マーカーは、健康および病気の細胞を特徴付けるかまたは弁別するために発見され、使用することができる、細胞内の天然に生じる分子構造である。その存在は、マーカーに結合し、可視化を通じてのマーカーの検出および/またはイメージングシステムを用いての定量を可能にする、ヒトによって発明され開発されたプローブによって検出することができる。4つのクラスの細胞ベースのマーカー検出技術は、細胞病理学、サイトメトリー、細胞遺伝学、およびプロテオミクスであり、これは後に区別して記載する。

20

【0007】

細胞病理学は、染色された全細胞集団内の細胞形態学的変化の専門家の目による評価に頼っている。その例は、各々細胞技術者および細胞病理学者による、パパニコラウ(Papanicolaou)染色(すなわちPapスミア)子宮頸部-膣検体の細胞学的スクリーニングおよび細胞診断である。細胞遺伝学、プロテオミクス、およびサイトメトリーとは異なり、細胞病理学は定量的なツールではない。それは臨床診断細胞学における技術水準ではあるが、主観的であって、診断の結果は、特に癌の初期段階においては、高感受性または再現可能ではないことが多い(例えば、ASCUS、LSIL)。

30

【0008】

形態学的分析に頼るテストは、光学顕微鏡下で患者の細胞の試料を観察して、細胞における異常および核の形状、サイズ、光学的テクスチャー、または染色挙動を同定することを含む。顕微鏡を介して見ると、正常な成熟上皮細胞は大きくかつ十分に分化しているようであり、凝縮した核が伴う。しかしながら、形成異常によって特徴付けられる細胞は多様な分化段階にあり、いくつかの細胞は非常に未成熟である。最後に、侵入性癌腫によって特徴付けられる細胞は、しばしば未分化のように見え、細胞質および比較的大きな核はほとんど伴わない。

【0009】

形態学的分析に頼る診断テストの欠陥は、細胞の形態は実際よりも遅れたインジケータであることである。形態は機能に従うので、疾患状態は、疾患が形態学的分析によって明らかになる時点までに、既に臨界的またはさらに進んだ段階まで進行してしまっていることが多い。疾患の初期段階は、分子レベルの化学的变化を伴う。顕微鏡下で細胞の特徴を見ることによって検出できる変化は、典型的には、疾患の後期段階までには出現しない。従って、「分子診断」テストという、分子レベルで化学的变化を測定するテストは、形態学的分析単独に頼るテストよりも早い検出を提供する可能性が高い。

40

【0010】

サイトメトリーは、溶液中の単一ファイルで移動する蛍光染色細胞の流動-ミクロ蛍光測定機器分析(フローサイトメトリー)または顕微鏡スライドグラス上に沈積された染色

50

細胞のコンピューター支援顕微鏡機器分析（イメージサイトメトリー）に基づく。フローサイトメトリーの応用は白血病およびリンパ腫免疫表現型決定を含む。イメージサイトメトリーの応用は、DNA倍数性、悪性関連変化（MAC）、細胞周期キネティックス、およびS期分析を含む。フローおよびイメージサイトメトリーアプローチは、懸濁液中、または顕微鏡スライドガラス上の細胞を特徴付ける定量的データを生じる。フローおよびイメージサイトメトリーは、用いる細胞染色およびフロー/イメージ測定特徴の感度および特異性に依存して良好なマーカーの検出および弁別の結果を生じうる。

【 0 0 1 1 】

1900年代初期～中期以来、悪性関連変化（MAC）が定性的に観察され、報告されている（OC Gruner：「Study of the changes met with leukocytes in certain cases of malignant disease」 in Brit J Surg 3：506-522,1916）（HE Neiburgs,FG Zak,DC Allen,H Reisman,T Clardy：「Systemic cellular changes in material from human and animal tissues」 in Transactions,7th Ann Mtg Inter Soc Cytol Council,pp 137-144,1959）。1900年代中期から1975年まで、MACは頬粘膜および頬スミア（Nieburgs,Finch,Klawe）、十二指腸（Nieburgs）、肝臓（Elias,Nieburgs）、巨核細胞（Ramsdahl）、頸部（Nieburgs,Howdon）、皮膚（Kwitiken）、血液および骨髄（Nieburgs）、単球および白血球（van Haas,Matison,Clausen）、ならびに肺および痰（Martuzzi and Oppen Toth）における独立した定量的組織学および細胞学研究において記述されている。1975年より前は、これらの定性的研究により、特異的疾患検出についてのMACベースの感度は76%から97%、特異性は50%から90%であることが報告されている。1975年に、Oppen Tothは、定性的痰分析実験において76%の感度および81%の特異性を報告した。

【 0 0 1 2 】

MACベースのプロープ分析に関する定量的観察は20～30年前に始まった（H Klawe,J Rowinski：「Malignancy associated changes (MAC) in cells of buccal smears detected by means of objective image analysis」 in Acta Cytol 18：30-33,1974）（GL Wied,PH Bartels,M Bibbo,JJ Sychra：「Cytomorphometric markers for uterine cancer in intermediate cells」 in Analyt Quant Cytol 2：257-263,1980）（G Burger,U Jutting,K Rodenacker：「Changes in benign population in cases of cervical cancer and its precursors」 in Analyt Quant Cytol 3：261-271,1981）。MACは、頬粘膜およびスミア（Klawe,Burger）、頸部（Wied,Burger,Bartels,Vooijs,Reinhardt,Rosenthal,Boon,Katzke,Haroske,Zahniser）、胸（King,Bibbo,Susnik）、膀胱および前立腺（Sherman,Montironi）、結腸（Bibbo）、肺および痰（Swank,MacAulay,Payne）、ならびに鼻粘膜（Reith）研究における独立した定量的組織学および細胞学研究において記載されており、70%から89%のMACベースの感度および52%から100%の特異性を伴っていた。MarekおよびNakhosteen（1999,American Thoracic Society年次集会）は、（a）89%の感度および92%の特異性、（b）91%の感度および100%の特異性を示す2つの定量的肺（気管支洗浄）研究の結果を示した。

【 0 0 1 3 】

明らかに、悪性関連変化（MAC）は、イメージ-サイトメトリーマーカー検出技術に由来する潜在的に有用なプロープである。DNA染色核からのMACベースの特徴は、他の分子診断プロープと組合せて用いて、肺癌および他の疾患状態の検出、および弁別のための最適化された分子診断パネルを作り出すことができる。

【 0 0 1 4 】

細胞遺伝学、例えばインサイチューハイブリダイゼーション（ISH）技術を用いて特異的染色体ベースの細胞内変化が検出される。ISH技術は、蛍光（FISH）、多色蛍光（M-FISH）、または光吸収ベースのクロモゲニックスイメージング（CHRISH）技術に基づくことができる。ISH技術のファミリーは、DNAまたはRNAプロープを用いて、クローン化された細菌または培養真核生物細胞における相補的DNA配列の存在を検出する。FISH技術は、例えばある種の癌に関連する遺伝的異常の検出に用いることができる。その例は、トリソミー8およびHER-2 neuについてのプロープを含む。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような

他の高感受性で特異的な技術を用いて、B細胞およびT細胞遺伝子再編成を検出することができる。細胞遺伝学は、原因、または病理的疾患を生じる「トリガー」分子事象を検出するため、高度に特異的なマーカー検出技術である。それは一般に、検出する事象がほとんどないと考えられるため、他のマーカー検出技術よりも感度が低い可能性がある。インサイチューハイブリダイゼーション（ISH）は、遺伝子ベースの分析を用いて、突然変異、染色体エラー、または特異的病原体によって挿入された遺伝物質のような遺伝子レベルの異常を検出する分子診断方法である。例えば、インサイチューハイブリダイゼーションは、患者の細胞の試料を、特異的mRNAにハイブリダイズするように設計された標識プライマーで処理し、未結合プライマーを洗浄して除き、次いで標識のシグナルを測定することによって特異的mRNAのレベルを測定することを含みうる。遺伝子配列の独自性のため、遺伝子配列の検出を含むテストは高い特異性を有する可能性が高く、非常に少ない偽陽性しか生じない。しかしながら、細胞の試料中の遺伝物質の量は非常に低いので、非常に弱いシグナルしか得ることができない。従って、プレ増殖技術を使用しないインサイチューハイブリダイゼーションテストは特異性が貧弱である可能性が高く、多くの偽陰性を生じうる。

10

20

30

40

50

【0015】

プロテオミクスは、正常または異常細胞型の集団中の独自のまたは特異的なタンパク質の過剰発現、過小発現、または存在/非存在に由来する細胞特徴付けおよび弁別に依存する。プロテオミクスは、タンパク質の同定および定量のみならず、その局在、修飾、相互作用、化学的活性、および細胞/細胞外機能の測定も含む。免疫化学（IC）（細胞における免疫細胞化学および組織における免疫組織化学（IHC））は、抗体を用いて抗原（すなわち、プロテオーム）を染色するのに定性的または定量的のいずれかに（QIHC）用いられる技術である。免疫染色方法は検出指標として色素を使用する。IHC適用の例はER（エストロゲン受容体）、PR（プロゲステロン受容体）、p53腫瘍抑制遺伝子、EGFR予後マーカーについての分析を含む。プロテオミクスは典型的には、細胞遺伝学よりも感受性が良好なマーカー検出技術である。なぜならば、細胞遺伝学を用いて検出する細胞遺伝学的突然変異または遺伝子配列改変があるよりも、プロテオミクスを用いて検出する、しばしば何オーダーも大きなタンパク質分子があることが多いためである。しかしながら、プロテオミクスは、多数の病理により同様なタンパク質の過剰発現または過小発現の変化がもたらされる可能性があり、細胞遺伝学的マーカー検出技術よりも特異性が貧弱である可能性がある。免疫化学は多くの場合、プローブ試薬として標識された抗体を利用する、組織切片または細胞調製物各々における免疫反応性物質の組織学的または細胞学的局所化を含む。疾患マーカー上のエピトープに特異的な標識抗体（プローブ）のような物質で細胞を処理し、次いで未結合抗体を洗浄して除き、標識のシグナルを測定することによって、免疫化学を用いて細胞の試料中の疾患マーカー（特異的タンパク質）の濃度を測定することができる。免疫化学は、癌細胞が健康な細胞とは異なるレベルである種の疾患マーカーを保有する特性に基づいている。癌細胞における疾患マーカーの濃度は一般には、大きなシグナルを生じるのに十分である。従って、免疫化学に頼るテストは高感度で、偽陰性をほとんど生じないと考えられる。しかしながら、疾患状態に加えて他の因子が疾患マーカーの濃度を上昇または下降させ得るので、特異的疾患マーカーの免疫化学分析に頼るテストは、特異性が貧弱で、偽陽性を高率で生じる可能性が高い。

【0016】

本発明は、高感度および高特異性の双方を伴う非侵襲的な疾患状態の検出および識別方法を提供する。この方法は患者のスクリーニングに有用である。また本発明は、高感度および高特異性の双方を伴う疾患状態の検出および識別方法を提供する。この方法は、患者の診断および治療モニタリングに有用である。本方法は、病気の細胞を含有することが疑われる細胞学的試料または複数の試料を、その各々が特異的疾患マーカーに定量的に結合する複数の物質を含むプローブのパネルと接触させ、次いでプローブ物質の結合パターンを検出し、分析することを含む。また本発明は、特異的疾患（または疾患群）を検出し、その種々の疾患状態間を識別するためのプローブのパネルを構築し、それを確実なものと

する方法も提供する。肺癌を検出し、異なるタイプの肺癌の間を識別するための例示的パネルも提供される。例示的パネルまたは他の癌および非癌疾患状態も提供される。

【0017】

ヒトの疾患は、身体の細胞、組織、器官、または系内の異常な構造または機能をもたらす外的（すなわち、局所または全体的環境）または内的傷害を中和するヒト生物の適合メカニズムの失敗に由来する。疾患は、表1に後記する原因の共有メカニズムによってグループ分けすることができる。

【0018】

（表1）

疾患のクラス	疾患状態の例
アレルギー	食物および植物に対する有害反応
心血管	心不全、アテローム性動脈硬化症
変性(神経学的および筋肉)	アルツハイマーおよびパーキンソン
ダイエット	非栄養物質および栄養過剰/不均衡
遺伝	鎌状細胞貧血、嚢胞性線維症
免疫	HIV および自己免疫
感染	ウイルス、細胞、真菌、寄生虫
代謝	糖尿病
分子および細胞生物学	癌(新形成)
毒性傷害	アルコール、薬物、環境変異原および発癌物質
外傷	自動車衝突による身体の負傷

10

20

30

【0019】

疾患状態は、細胞下、細胞、組織、器官、またはヒトの解剖学的または生理学的系のレベルにおける異常な変化（すなわち病理学的状態）によって引き起こされるか、またはその結果となる。多くの疾患状態（例えば肺癌）は、細胞下または細胞レベルにおける異常な変化によって特徴付けられる。検体（例えば、頸部Papスミア、排泄された尿、血液、痰、結腸洗浄液）は、疾患状態の存在およびタイプにつき患者を診断するために、疑われる疾患状態を持つ患者から収集することができる。分子病理学は、これらの細胞ベースの疾患に関連する分子の変化を同定し、診断的に活用しようとする訓練的試みである。

40

【0020】

肺癌は、疾患状態の存在を検出するための診断テスト（例えば分子診断パネルアッセイ）を用いて、危険性の高い集団および危険性のある個体のスクリーニングを行うことができる疾患状態の説明的例である。また、肺癌または他の疾患状態がこれらの手段によって検出されている患者では、関連診断テストを使用して、関連する、または共に起こる疾患状態から具体的疾患を弁別することができる。例えばこの肺癌の例においては、さらなる分子診断パネルアッセイにより、患者の疾患状態が以下のタイプの肺癌：（a）肺の扁平細胞癌腫、（b）肺の腺癌、（c）肺の大細胞癌腫、（d）肺の小細胞癌腫、または（e）中

50

皮腫のうちの1つに一致する確率を示し得る。細胞ベースの疾患状態の初期検出および弁別は、患者の結果を改善するための仮定的手段である。

【0021】

癌は新生物形成性疾患であり、その自然の進行は致命的である。癌細胞は、良性腫瘍細胞とは異なり、侵入および転移の特性を呈し、高度に脱分化している。癌は、癌腫（すなわち上皮細胞ベースの癌）、肉腫（例えば骨ベースの癌）、および血液ベースの癌（例えば、白血病およびリンパ腫）の3つの広いカテゴリーを含むが、一般的用法では、前記各3タイプは、癌腫と同義とされることが多い。世界保健機関（WHO）によれば、癌は毎年1千万を超える人々に影響し、620万人を超える死亡の原因である。

【0022】

癌は現実的には、身体の実質的にいずれの部分においても起こり得る疾患の不均一集団である。その結果、異なる治療は全ての癌において、あるいは特定のタイプの癌の段階内においてさえ、等しく効果的ではない。診断（例えば、マンモグラフィー、頸部細胞学、および血清PSAテスト）の進歩は、一部のケースにおいては、非常に多数の治療オプションがある場合に初期段階の癌の検出を可能とし、療法はより効果的な傾向がある。固形腫瘍が小さくて局所化されている場合には、外科処置単独で治療に十分であろう。しかしながら、腫瘍が拡大した場合には、外科的処置は、限られた利点を提供するに過ぎないであろう。そのような場合には、化学療法および/または放射線療法を追加して転移性疾患を治療する。寿命を延ばすのに幾分効果的ではあるが、非血液ベースの転移性疾患を持つ患者の治療は稀にしか治癒しない。初期応答はあるかもしれないが、時間が経つにしたがって疾患は進行し、患者はその効果および/または治療の毒性効果から結局は死亡する。

【0023】

証明されていないが、初期の検出および治療は、癌の罹患率、死亡率、およびコストを低下させるということが一般的に受け入れられている。初期の検出により多くの場合、転移に先立って治療が開始される。さらに、非常に多数の治療オプションがあるので、治癒または長期生存が有意に改善される確率がより高い。

【0024】

「危険な」集団をスクリーニングするために用いようとするテストの開発は、長い間、健康衛生従事者の目標であった。乳癌についてのマンモグラフィー、前立腺癌についてのPSAテスト、および頸癌についてのPapスミアのようないくつかの成功があるが、ほとんどの場合には、癌は比較的后期の段階で検出され、患者には徴候が出ており、この疾患はほぼ常に致死性である。ほとんどの癌では、初期段階の疾患を持つ患者のコスト的に効果的な同定を可能とする、必要な感度および特異性を有するテストまたはテストの組合せはない。

【0025】

患者、医師、および第三者の支払人に利益がある良好な癌スクリーニングプログラムのためには、テストは、広く利用でき、一般的健康管理の枠組み内で容易に実施できるという利点を有しなければならない（結果を変化させる）。テストは比較的非侵襲的であり、適切なコンプライアンスに導き、高い感度、および合理的な特異性および予測値を有するべきである。加えて、テストは比較的低コストで利用できなければならない。

【0026】

癌を有すると疑われる患者では、診断は確認されなければならない、腫瘍は適切に細胞学的かつ臨床的に段階が決定されて、医師が適切な治療介入を実行できなければならない。しかしながら、癌の診断および段階決定で現在用いられているいくつかのテストは十分な感度または特異性を欠き、余りにも侵襲的であり、あるいは集団ベースのスクリーニングテストとしてのその使用を正当化するには余りにもコストがかかる。肺癌診断の感度および特異性の見積もり、および肺癌を検出するのに用いられる診断テストに対する概算コスト（米ドル）を例えば以下の表2および3に示す。

【0027】

（表2）肺癌診断の感度および特異性見積もり [1]

10

20

30

40

診断テスト	感度(%)	特異性(%)
通常の痰細胞学	51.0	100.0
胸部X線	16-85*	90-95
白色光気管支鏡検査	48.0-80.0	91.1-96.8
LIFE 気管支鏡検査	72.0	86.7
コンピューター断層法	63.0-99.9	80.0-61
PET スキャン	88.0-92.5	83.0-93.0

* 診断時における疾患の段階に依存

10

【 0 0 2 8 】

(表 3) 肺癌で用いられる診断テストについてのコストの見積もり [1]

診断テスト	コスト(\$)
痰細胞学	90
胸部X線	44
気管支鏡検査	725
コンピューター断層法	378
PET スキャン	800-3000
直視下生検	12,847-14,121

20

【 0 0 2 9 】

胸部ラジオグラフィー (X線) が、その合理的な感度、高い特異性、および低コストの理由から、癌病巣を検出し突き止めるのに用いられることが多い。しかしながら、小さな病巣の検出が困難であることが多く、より大きな腫瘍は胸部フィルムで見るのが比較的容易ではあるが、検出の時点でほとんどは既に転移してしまっている。このように胸部X線は、初期検出方法として用いるのに必要な感度を欠いている。

【 0 0 3 0 】

コンピューター断層法 (CT) は、肺結節の確認および特徴付けに有用で、標準胸部X線では見逃される微妙な異常の検出を可能とする [2]。CT、特にスパイラルCT方法は、先に悪性痰細胞学の結果または声帯麻痺を現在持つ患者についての選択されるテストであり続けている。慣用的胸部フィルムよりも優れたその改良された感度を持つCTは、中央気道をイメージするための主なツールとなった [3]。CTは、大きな領域を調べることができ、ヨウ素化造影物質の使用を通じて解像度が改良されているが、心臓および呼吸器系の動きからの人為現象を受ける。

30

【 0 0 3 1 】

スパイラルCTは、慣用的なCTまたはX線のいずれかよりも信頼性よく初期癌病巣を検出する能力を有する、CTのより迅速かつ感度のよい形態である。スパイラルCTは、初期疾患の診断において大いに改良された感度を有するようである。しかしながら、前記テストは比較的特異性が低く、偽陽性率は20%である [4]。操作技術の進歩によって、スパイラルCT機器の解像度が改良されるにつれ、偽陽性率は増加するようである。またスパイラルCTは、全ての肺癌の1/3を表す中心病巣を検出する際に感度がより低い。さらに、初期テストのコストは比較的安い (\$ 300)、フォローアップのコストは少なくとも1桁高くなり得る。分子診断パネルアッセイを用いる細胞学は、スパイラルCT-疑惑肺結節からの微小針吸引 (FNA) またはバイオプシー (FNB) の評価を通じて偽陽性の結果を最小に抑えることによって、スパイラルCTテストの特異性を改良するための、スパイラルCTに伴う付属的なテストとしてかなりの有望性を示す。

40

【 0 0 3 2 】

蛍光気管支鏡検査は、慣用的な白色光気管支鏡検査よりも感度がよく、中央気道内の小さな病巣の検出がかなり改良されている [5]。しかしながら、蛍光気管支鏡検査は末梢

50

病巣を検出することができず、気管支鏡検査者が患者の気道を調べるのに長時間を要し、かつそれは費用がかかる手法である。加えて、前記手法は中程度に侵入的であり、集団ベースのスクリーニングテストとしてのその使用に対して克服できないバリアとなっている。

【 0 0 3 3 】

陽電子射出断層撮影法（PET）は、肺内の癌細胞の存在を同定するために放射性グルコースを利用する、非常に感度の良好なテストである〔6～8〕。テストの容易性を確立するコストは高く、部位またはその近くにサイクロトロンを必要とする。また、集中化テストの実行は論理学的問題である。これは、前記テストの高いコストとあいまって、疾患の初期検出ではなく、肺癌患者の段階を決定するPETスキャンの使用を制限している。

10

【 0 0 3 4 】

痰細胞学は、肺癌についてスクリーニングする手段としてある時期用いられていたが、感度が低く疾患特異的な死亡率を低下できなかったため、その成功は限られたものであった。従来の痰細胞学においては、病理学者は細胞形態の特徴的变化を用いて悪性細胞を同定し、癌の診断を行う。現在、「危険な」すなわち肺癌を有すると疑われる患者の15%のみが痰細胞学テストを受け、5%未満が複数の評価を受ける〔9〕。腫瘍のサイズ、位置、分化の程度、細胞クランピング、細胞および痰を外部環境に放出するクリアリングメカニズムの非効率、ならびに痰内の細胞の安定性の減少を含む多数の因子が、このテストの全体的に貧弱な性能に影響している。

【 0 0 3 5 】

癌診断は伝統的に、単一の分子マーカーの検出に頼ってきた。残念なことに、癌という疾患状態においては、単一のマーカーでは典型的には疾患の多くの形態を検出または弁別することはできなかった。従って、単一マーカーのみを認識するプローブは非常に非効率であることが示されてきた。「魔法の弾丸」診断テストについての網羅的な検討が何十年もの間続けられているが、普遍的な首尾よい魔法の弾丸プローブは今日まで見出されていない。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の主な前提は、細胞ベースの癌診断、ならびに他の疾患状態のスクリーニング、診断、および治療的モニタリングが、複数の同時に標識されたプローブのキットではなく単一のマーカー/プローブの分析を用いる技術水準よりもかなり改良されるということである。癌は単一の疾患ではないため、この多重分析アプローチが癌診断に特に適している。さらにこの多因子「パネル」アプローチは、細胞学的かつ臨床的に、癌の不均一な性質と合致する。

30

【 0 0 3 7 】

細胞ベースの診断テストに対してパネルアプローチを成功させる鍵は、種々の疾患状態を特徴付け、識別するマーカーのパターンを化学的に認識できるプローブの最適化されたパネルの設計と開発である。本特許出願は、そのような新規かつ最適化されたパネルを設計し開発する、効果的かつ独自の方法を記載する。

【 0 0 3 8 】

検体収集（例えば、痰細胞学ではpoint-of-careミキサー）および調製（例えば、新しい細胞学の維持および輸送流体、ならびに液体ベースの細胞学的調製機器）に関する改良法は開発下にあり、商業的に利用可能となりつつある。現存のおよびこれらの出現しつつある方法と組み合わせて、この分子診断細胞ベースのパネルアッセイの首尾よい実施により、（a）悪性腫瘍および他の疾患状態の分子プロファイルの特徴付け、（b）初期癌および他の疾患状態の検出および弁別のための改良法、および（c）改良された臨床診断、予後、慣用化された患者処置、および治療的モニタリングのための機会、がもたらされるであろう。

40

【 発明の開示 】

【 0 0 3 9 】

発明の概要

50

本発明は、細胞ベースの診断を用いて一般的疾患状態を検出し、または特定の疾患状態の間を弁別するためのパネルに関する。前記パネルは、その各々が、一般的または特定の疾患状態に関連するマーカーに特異的に結合する複数のプローブを含み、パネルの構成プローブの細胞学的検体中の細胞への結合のパターンが前記疾患状態の存在または特定の性質の診断となる。また本発明は、細胞ベースの診断を用いて、患者において疾患状態を検出し、または疾患状態の間を弁別するためのパネルの形成方法に関する。本方法は、その各々が疾患状態に関連するマーカーのライブラリーのメンバーに特異的に結合するプローブの結合の感度および特異性を測定し、次いでその結合パターンが前記疾患状態の存在または特定の性質についての診断となる限定された複数の前記プローブを選択することを含む。また本発明の方法は、疾患を検出し、または疾患状態の間を弁別する方法に関する。本方法は、疾患状態に特徴的な異常細胞を含有することが疑われる細胞学的試料を、請求項1によるパネルと接触させ、次いで前記疾患状態の存在または特定の性質に対して診断となる前記プローブの結合パターンを検出することを含む。

10

【0040】

発明の詳細な説明

1. 緒言

本発明は、高い感度および特異性を伴う非侵襲的な疾患状態の検出および弁別方法を提供する。本方法は、細胞学的もしくは組織学的試料、または病気の細胞を含有することが疑われる試料を、その各々が疾患マーカーに定量的に結合する複数の物質を含むパネルと接触させ、次いで物質の結合パターンを検出することを含む。このパターンは、パネルの構成プローブの結合の局在および密度/濃度を含む。また本発明は、疾患状態を検出するための、および疾患状態の間を弁別するためのパネルの製法、ならびに初期段階において肺癌を検出し、異なるタイプの肺癌間を弁別するためのパネルを提供する。パネルテストは医薬分野で用いられてきた。例えば、パネルは血清分析で用いられる。しかしながら、細胞学分析は個体の細胞および組織内でのイメージングおよび特異的マーカーの局所化を含むので、本発明に先立っては、パネルアプローチは細胞学または組織学試料で有効であることは明らかでなかった。加えて、どの統計学的分析を適用して、プローブの最適化された細胞ベースの診断パネルを設計し開発できるのかが、明らかでなかった。

20

【0041】

細胞学ベースのスクリーニングプログラムの少数の例のうちの1つは、頸癌についてスクリーニングするPapスミアである。この方法は50年以上にわたって実施されており、定期的にPapスミアを受ける女性には頸癌で死亡する人はほとんどいないという現在の事実大いに寄与してきた。しかしながら、Papスミアスクリーニングプログラムには欠点がある。例えば、Papスミアは、人間の働きに関連する変動の影響を受け、手間がかかり、かつ普遍的にアクセス可能ではない。プローブパネルを利用する本発明の分子診断細胞ベースのスクリーニング方法はこれらの欠点を被らない。本方法は十分に自動化することができ、それにより安価かつ再現可能となり、このタイプのテストに対するアクセスを増加させる。

30

【0042】

本発明は、疾患状態を検出するための、および疾患状態の間を識別するための、高い特異性および高い感度の双方を有する方法を提供する。本発明は癌および感染症のようないずれの細胞ベースの疾患状態にも適用することができる。

40

【0043】

前記パネルは、疾患状態の存在または具体的性質の診断である。本発明は、コストを低く維持しつつ、細胞学的試料中の病気の細胞の、迅速かつ正確な、比較的非侵入性で容易な検出および識別を可能とすることによって、公知の疾患状態検出方法の制限および欠点を克服する。

【0044】

本発明のパネルを製造するための発明的方法の特徴は、パネルを開発することができる迅速性である。

50

【 0 0 4 5 】

疾患状態を検出し、および疾患状態のタイプの間を識別するための方法に、物質パネルを用いることにはいくつかの利点がある。1つの利点は、物質パネルは疾患状態の検出および特徴付けを可能とするのに十分な余剰分があり、それによりテストの感度および特異性を増加させることである。多くの疾患状態の不均一な性質を仮定すれば、単一の物質では非常に多くのケースを同定できない。

【 0 0 4 6 】

パネルを用いるさらなる利点は、パネルの使用により、発現の特異的パターン（プローブの局在および密度/濃度）に基づいて疾患状態の種々のタイプの間を識別することが可能となることである。種々のタイプの疾患は、その進行速度、療法に対する応答、および致死率の劇的な差を呈しうるので、特異的タイプの知識は、医師が最適な治療アプローチを選択することを補助しうる。

【 0 0 4 7 】

2. パネル

本発明のパネルは、その各々が疾患マーカーに定量的に結合する複数の物質を含み、パネルの構成物質の結合パターン（局在および密度/濃度）は疾患状態の存在または具体的性質の診断となる。従って、パネルは検出パネルまたは識別パネルでありうる。検出パネルは、一般的疾患状態が細胞の試料に存在するか否かを検出し、他方識別パネルは、異なるタイプの疾患を含む疾患状態によって影響されることが知られる細胞の試料における異なる特定の疾患状態の間を識別する。検出パネルと識別パネルの差は、パネルが含む特異的物質にある。検出パネルは疾患状態の存在の診断となる結合パターンを有する物質を含み、他方識別パネルは疾患状態の特異的性質（すなわち各タイプ）の測定を可能とする結合パターンを有する物質を含む。

【 0 0 4 8 】

定義上、パネルは1より多くのメンバーを含む。一般的疾患状態を検出するために、あるいは特定の疾患状態の間を識別するために、たった1つのマーカー単独ではなく複数のマーカーのパネルを用いることが有利であることには、いくつか理由がある。1つの理由は、その挙動を高い特異性および感度でもって測定して正確なテスト結果を得ることができる、全ての病気の細胞に存在するが健康な細胞には存在しない1つの単独のマーカーについてのプローブの存在可能性の低さである。もしそのような単一のプローブが高い感度および特異性でもって特定の疾患の検出で存在すれば、それは臨床試験で既に利用されていたであろう。むしろそれは、各々が臨床的に適切なテストを保障する範囲の検出能力を共に提供できる複数のプローブからなるパネルテストの指向選択である。

【 0 0 4 9 】

それにもかかわらず、1または非常に少数のプローブを含むパネルテストを構築することを選択すると、なんらかの理由によって（例えば、生物学的変動による検体細胞の反応性の低下；多数のプローブ試薬の間の固有の変動；弱い、期限切れ、または欠陥のある処理試薬；そのプローブについての不適切な処理時間または条件）いずれかの単一マーカー/プローブ組合せがその標識機能を実行できないことにより、標的疾患を検出または識別するテストの決定的な失敗をもたらすであろう。複数の、過剰ともいえるプローブを各パネルテストに含ませることにより、いずれか1つのプローブの失敗によってテストの決定的な失敗が引き起こされない確率を大いに高める。

【 0 0 5 0 】

プローブは、疾患マーカーに結合するいずれかの分子構造またはサブ構造である。本明細書に用いる用語「物質」は、疾患マーカーに結合する分子構造またはサブ構造を指しうる。分子プローブは、特定の疾患状態の指標となるマーカーを検出し突き止めるために生物学者および臨床家によって用いられる方向付け（homing）デバイスである。例えば、小細胞肺癌に対するマーカーとして以前に同定されたタンパク質に特異的に結合する抗体を生産することができる。次いで、この抗体プローブを用いて、適当な免疫化学プロトコルおよびインキュベーションを用いることによって病気を有することが疑われる患者の細胞

および組織において標的タンパク質マーカ―を局在化することができる。もし抗体プローブが化学量論様式で（すなわち定量的に）その標的マーカ―に結合し、色原性または着色「タグ」で標識される場合、プローブ、間接的にはその標的マーカ―の、局在化および定量が、光学顕微鏡およびイメージサイトメトリー技術を用いて達成できるであろう。

【0051】

本発明では、当業者が利用できる多数の方法のいずれかを用いて、DNA、RNAまたはタンパク質レベルの分子マーカ―発現の変化を検出することが考えられる。例示的なプローブは、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体またはその断片、あるいはパネルにおける分子マーカ―をコードする核酸配列に相補的な核酸配列であり得る。また、プローブはDNA染色のような染色でもあり得る。本発明で用いる抗体の多くは、マーカ―物質として
10
の種々の細胞表面または細胞内抗原に対して特異的である。抗体は、当業者に一般的に知られた技術を用いて合成することができる。例えば、最初にマーカ―に対する抗体を作成し、抗体を配列決定して、続いて組換え技術によって調製することができる。または、抗体は購入したものであってもよい。

【0052】

本発明の態様において、プローブは標識を含む。標識を含むプローブは、本明細書では「標識されたプローブ」とも呼ぶ。標識は、プローブがマーカ―に結合する場合シグナルが発せられるか、あるいは標識されたプローブがヒト観察者または分析機器によって検出されるように、プローブに結合させることができるいずれの物質でもあり得る。この標識は「タグ」ということもある。標識は解読機器を用いて可視化することができる。用語「
20
解読機器」とは、プローブを検出するのに用いる分析器具をいう。本発明によって想定される標識は、シグナルを発し、試料中の構成要素の同定を可能とするいずれの標識であってよい。好ましい標識は、放射性、蛍光原性、色原性、または酵素的部位を含む。従って、可能な検出方法は、限定されるものではないが、免疫細胞化学、免疫組織化学、インサイチューハイブリダイゼーション、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション、フローサイトメトリー、およびイメージサイトメトリーを含む。標識されたプローブによって発生したシグナルは、医療実施者による検出を可能とするのに十分な強度である。

【0053】

「マーカ―」、「疾患マーカ―」、または「分子マーカ―」は、疾患状態または病原体に関連する任意の分子構造またはサブ構造である。用語「抗原」は「マーカ―」と交換可能に用いることができる。広く定義すれば、マーカ―は、特定の状態、事象、または物質の存在もしくは頻度および/または量を明らかにする、検出する、または測定するのに観察者または機器によって慎重に用いられ得る生物学的インジケーターである。例えば、ヌクレオチド塩基の特異的かつユニークな配列を遺伝マーカ―として用いて、個体の間の、および家族を通じての遺伝的継承のパターンを追跡することができる。同様に分子マーカ―は、その細胞または組織内の存在が特定の疾患状態を示すタンパク質またはタンパク質断片のような特異的分子である。例えば、増殖中の癌細胞は、同一タイプの正常な細胞には見られない新規な細胞表面タンパク質を発現したり、またはその量の増大もしくは減少（例えばそれぞれ過剰発現または過小発現）が特定の疾患状態に対するマーカ―として働きうる特異的分泌タンパク質を過剰発現することがある。
40

【0054】

細胞学パネルについての適当なマーカ―は、核、細胞質、または細胞膜中もしくは上に局在する物質である。また、マーカ―は細胞中のこれらの位置のいずれかに位置するオルガネラに局在するものであってもよい。核に局在する例示的マーカ―は、限定されるものではないが、網膜芽腫遺伝子産物（Rb）、サイクリンA、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ/nm23、テロメラゼ、Ki-67、サイクリンD1、増殖細胞核抗原（PCNA）、p120（増殖関連核小体抗原）、および甲状腺転写因子1（TTF-1）を含む。細胞質に局在する例示的マーカ―は、限定されるものではないが、VEGF、界面活性剤アポプロテインA（SP-A）、ヌクレオシドnm23、メラノーマ抗原-1（MAGE-1）、ムチン1、界面活性剤アポプロテインB（SP-B）、ER関連タンパク質p29、およびメラノーマ抗原-3（MAGE-3）を含む。細胞膜に局在す
50

る例示的マーカーは、限定されるものではないが、VEGF、トロンプモジュリン、CD44v6、E-カドヘリン、ムチン1、ヒト上皮関連抗原（HERA）、線維芽細胞成長因子（FGF）、肝細胞成長因子受容体（C-MET）、BCL-2、N-カドヘリン、表皮成長因子受容体（EGFR）、およびグルコーストランスポーター-3（GLUT-3）を含む。細胞質のオルガネラに局在するマーカーの例は、ミトコンドリア膜に（部分的に）位置するBCL-2である。核のオルガネラに位置するマーカーの例は、核小体に位置するp120（増殖関連核小体抗原）である。

【0055】

発現変化が疾患進行初期に起こり、大部分の罹患細胞によって呈され、所与の疾患タイプの75%過剰、最も好ましくは所与の疾患タイプの90%過剰の検出を可能とし、および/または疾患状態の異なるタイプの性質の間の識別を可能とするマーカーが好ましい。

10

【0056】

プローブがマーカーに結合することができるため、本発明のパネルは、プローブのパネルまたはマーカーのパネルということができることに注目されたい。従って、パネルは多数のマーカーを含み、あるいは特異的マーカーに結合する多数のプローブを含みうる。統一的には、本発明のパネルはプローブのパネルと呼ぶが、マーカーのパネルということもできる。

【0057】

またマーカーは、細胞核における悪性関連変化（MAC）のような特徴、または患者の家族の癌の履歴に関連する特徴を含むこともできる。悪性関連変化すなわちMACは典型的には、癌細胞の隣に位置する正常に見える細胞に起こる不可視変化である。細胞核におけるこれらの非常に微細な変化は生物学的に、核マトリックス中の変化およびクロマチン分布パターンから生じうる。それらは個々の細胞の視覚的観察を通じて訓練された観察者によってさえ認識できないが、高度に自動化されコンピューター化された高速イメージサイトメトリーを用いて細胞集団の統計学的分析から測定することができる。MACの検出のための技術は当業者に周知であり、Gruner, O.C. Brit. J. Surg. 3 506-522 (1916); Neiburgs, H. E. et al., Transaction, 7th Annual Mtg. Inter. Soc. Cytol. Council 137-144 (1959); Klawe, H. Acta. Cytol. 18 30-33 (1974); Wied, G. L. et al., Analyt. Quant. Cytol. 2 257-263 (1980); および Burger, G. et al., Analyt. Quant. Cytol. 3 261-271 (1981) に詳細に記載されている。

20

【0058】

本発明は、疾患状態に関連する任意のマーカーを含む。個々のマーカーそれ自体は本発明の単なるツールである。従って、本発明は特定のマーカーに限定されない。マーカーを分類する1つの方法は、他の分子に対するその機能的関係によるものである。本明細書中で用いるような、「機能的に関連する」マーカーは、問題のマーカーと同一の生物学的プロセスまたは経路の構成要素であり、当業者により問題のマーカーと共に異常に発現されることが知られているであろう。例えば多くのマーカーは、線維芽細胞成長因子（FGF）、（血管内皮成長因子）VEGF、サイクリンA、およびサイクリンD1のような細胞増殖経路に関連する。他のマーカーは、Glut-1およびGlut-3のようなグルコーストランスポーターである。

30

【0059】

当業者であれば、機能的に関連したマーカーを十分に測定して種々のマーカーを調べることができ、あるいはマーカーの機能的挙動を測定する実験を行うことができる。非限定的な例として、マーカーは、脈管形成、膜貫通糖タンパク質、細胞表面糖タンパク質、肺界面活性剤タンパク質、核DNA結合リンタンパク質、膜貫通Ca²⁺依存性細胞接着分子、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）の調節サブユニット、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、リボヌクレオプロテイン酵素、増殖する正常および新形成細胞で発現される核タンパク質、DNAポリメラーゼデルタについての補因子、正常な組織ではサイレントであるが悪性新生物で発現される場合には自己腫瘍特異的および特異的細胞傷害性T細胞（CTL）によって認識される遺伝子、グリコシル化分泌タンパク質、胃腸管または生殖泌尿管、肺界面活性剤の疎水性タンパク質、膜貫通糖タンパク質に関与する分子、増殖、分化、および脈管形

40

50

成、プロトオンコジーン、ホメオドメイン転写因子、ミトコンドリア膜タンパク質、迅速に増殖する細胞の核小体に見出される分子、グルコーストランスポーター、またはエストロゲン関連熱ショックタンパク質に関与する分子として分類することができる。

【0060】

バイオマーカーおよびプローブのクラスは、限定されるものではないが、(a) DNA倍数性、MAC、および前悪性病巣を含む形態学的バイオマーカー；(b) DNA付加体 (DNA adduct)、DNA突然変異、およびアポトーシス指標を含む遺伝的バイオマーカー；(c) 細胞増殖、分化、調節分子、およびアポトーシスマーカーを含む細胞周期バイオマーカー、ならびに；(d) 癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、腫瘍抗原、成長因子および受容体、酵素、タンパク質、プロスタグランジンのレベル、ならびに接着分子を含む分子および生化学バイオマーカーを含む。

10

【0061】

「疾患状態」はいずれの細胞ベースの疾患でもあり得る。いくつかの態様において、疾患状態は癌である。他の態様においては、疾患状態は感染症である。癌は、限定されるものではないが、肺、泌尿器、胃腸、および生殖管からの上皮細胞ベースの癌；肉腫、乳癌、膵臓の癌、肝臓の癌、腎臓の癌、甲状腺の癌、および前立腺の癌のような固形および/または分泌性腫瘍ベースの癌；ならびに白血病およびリンパ腫のような血液ベースの癌を含むいずれの癌でもあり得る。本発明によって検出することができる例示的癌は、肺癌、膀胱癌、胃腸癌、頸癌、乳癌、または前立腺癌である。検出できる例示的感染症は、感染性生物がウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、または真菌である細胞ベースの疾患である。感染症は例えば、HIV、肝炎、インフルエンザ、髄膜炎、単核細胞症、結核、ならびにクラミジア、トリコモナス、淋病、ヘルペス、および梅毒のような性感染症 (STD) であり得る。

20

【0062】

本明細書中で用いられるような、用語「一般的疾患状態」とは、肺癌、性感染症、および免疫ベースの疾患のようないくつかのタイプの特定の疾患を含む疾患をいう。特定の疾患状態は組織学的タイプの疾患をもいう。例えば、用語「肺癌」は、いくつかの特定の疾患を含み、その中には扁平細胞癌腫、腺癌、大細胞癌腫、小細胞肺癌、および中皮腫がある。用語「性病」は、いくつかの特定の疾患を含み、その中には淋病、ヒトパピローマウイルス (HPV)、ヘルペス、および梅毒がある。用語「免疫ベースの疾患」は、全身性紅斑エリテマトーデス (ルプス)、慢性関節リウマチ、および悪性貧血のようないくつかの特定の疾患を含む。

30

【0063】

本明細書中で用いられるような、用語「危険性の高い集団」とは、家庭または仕事場いづれかにおいて、疾患原因因子、例えばカルシノゲンに曝露される個体群をいう (すなわち、肺癌に対する「危険性の高い集団」は、喫煙、受動的喫煙、および職業的に曝露されるであろう)。「危険性の高い集団」における個体はまた、遺伝的素因を有し得る。

【0064】

用語「危険な」とは、無症状であるが、家族の履歴または有意な曝露のため、疾患を発症する有意な危険性がある個体をいう (すなわち、30パック-年を超えるの喫煙歴を持つ肺癌の危険性がある個体；「パック-年」は、1日当たり吸うパックの数にこの曝露の年数を掛け合わせるによって計算される測定単位である)。

40

【0065】

癌は、細胞が例えば遺伝子発現の変化により制御なしに分裂する疾患である。本発明の方法およびパネルにおいては、癌はいずれの器官におけるいずれの悪性成長でもあり得る。例えば癌は、肺癌、膀胱癌、胃腸癌、頸癌、乳癌、または前立腺癌であり得る。各癌は、癌疾患または組織学的タイプのコレクションを含むことができる。用語「組織学的タイプ」とは、異なる組織学の癌をいう。癌に応じて、1つまたはいくつかの組織学的タイプがあり得る。例えば肺癌は、限定されるものではないが、扁平細胞癌腫、腺癌、大細胞癌腫、小細胞癌腫、および中皮腫を含む。患者に影響する組織学的タイプの癌の知識は非常

50

に有用である。なぜならば、それは医療実行者が疾患を突き止め、特徴付け、および最適な治療戦略を決定するのを助けるからである。

【0066】

感染症は、感染性生物がウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、または真菌である、細胞ベースの疾患を含む。

【0067】

例示的検出および識別パネルは、肺癌、一般的疾患状態を検出するパネル、ならびに単一肺癌タイプ、全ての他のタイプの肺癌に対する特定の疾患状態、および偽陽性を識別するパネルである。偽陽性は、転移化肝臓癌、腎臓癌、または膵臓癌のような異なるタイプの転移性癌を含むことができる。

10

【0068】

3. パネルの作成方法

患者において一般的疾患状態を検出し、または特定の疾患状態の間を識別するためのパネルの作成方法は、一般的または特定の疾患状態に関連するマーカーのライブラリーへのプローブの結合の感度および特異性を測定し、次いで、その結合のパターン（局在および密度/濃度）が疾患状態の存在または具体的性質の診断となる複数の前記プローブを選択することを含む。いくつかの態様において、任意の予備的除去および調製工程を行う。本発明のパネルの作成方法は、公知の組織学的病理学試料、すなわち黄金標準におけるマーカーへのプローブの結合パターンを分析することを含む。次いで、黄金標準データにつき設計されたクラシファイアーを用いて、サイトメトリー、特に自動化サイトメトリー用のクラシファイアーを設計することができる。従って、病理学分析から選択されるマーカープローブの組を用いて、痰、微小針吸引、尿等のような細胞学的試料から採取した新しいトレーニングデータセットを調製する。特定の病巣から放出された細胞は黄金標準と同様に染色される。本明細書中に記載の方法は最良な特徴の組を選択する際に実験誤差を排除する。なぜならば、黄金標準組織学的病理学試料に基づく診断の一体性は高いからである。原理的には、細胞学的試料を用いてパネルを製造することが可能であるが、これは余り望ましくない。なぜならば、細胞学的試料は残渣を含有し、細胞学的試料中には細胞の劣化があり得、かつ病理学診断を臨床的に確認することが困難なためである。

20

【0069】

マーカーのライブラリーはマーカーの群である。ライブラリーは任意の数のマーカーを含むことができる。しかしながらいくつかの態様においては、ライブラリー中のマーカーの数は検体サイズのような技術的および/または商業的現実性によって制限される。例えばいくつかの態様においては、各検体はパネル中のマーカーの全てに対してテストされる。従ってマーカーの数は、その中に検体を分割するであろう試料の数よりも大きくあってはならない。もう1つの技術的実効性は時間である。典型的には、ライブラリーは60未満のマーカーを含む。好ましくは、ライブラリーは50未満のマーカーを含む。より好ましくは、ライブラリーは40未満のマーカーを含む。最も好ましくは、ライブラリーは10~30のマーカーを含む。潜在的パネルメンバーのライブラリーは、パネルの性能を最適化する機会があるように、10よりも多いマーカーを含むのが好ましい。本明細書中で用いるような、用語「約」は±3マーカーを意味する。

30

40

【0070】

いくつかの態様において、ライブラリーは、種々のマーカー、ならびにマーカーおよび一般的/特定疾患状態の間の相関についての情報を含む情報源を調べることによって得られる。例示的な情報源は、実験結果、理論的または予測される分析、ならびに雑誌、書籍、カタログ、およびウェブサイトのような文献的情報源である。これらの種々の情報源は、組織学または細胞学を用いることができ、インサイチューハイブリダイゼーションのような細胞遺伝学；免疫組織化学のようなプロテオミクス；MACまたはDNA倍数性のようなサイトメトリー；および/または形態学のような細胞病理学に頼ることができる。マーカーは細胞中または上のどこかに局在することができる。例えば、マーカーは、核、細胞質、または細胞膜中もしくは上に局在している可能性がある。またマーカーは、前記した局在

50

のいずれかの中のオルガネラに局在していてもよい。

【0071】

いくつかの態様において、ライブラリーは不適切なサイズであってもよい。従って、パネルを作成する基本的方法を開始するに先立って、一つまたは複数の除去工程が必要となることがある。除去工程は1つまたはいくつかの連続的除去工程を含みうる。1つの除去工程は例えば、感度および/または特異性についての任意の閾値を設定することを含みうる。従って、その実験的もしくは予測的感度および/または特異性が閾値未満の任意のマーカーをライブラリーから除去することができる。単独でまたは他の除去工程と順次に行うことができる他の例示的除去工程は、報告済みの結果の技術的要件、アクセス拘束、および非再現性に頼ることができる。検出技術の要件に関しては、特定のマーカーを検出するのに必要な機械が利用できない可能性がある。アクセス拘束に関しては、ライセンスの制限が特定のマーカーに結合するプローブを得ることを困難または不可能とする可能性がある。いくつかの態様においては、義務的実験が各マーカーについて行われる。

10

【0072】

いくつかの態様において、パネルを作成するための基本的方法を開始するに先立って、調製工程を行う必要がある。例示的調製工程は、ライブラリー中のマーカーの目的定量的検出用のプロトコルを最適化し、次いで組織学検体を収集することを含む。マーカーの目的定量的検出用のプロトコルの最適化は当業者の技量内のものである。例えば、緩衝液、試薬、ソフトウェア、および機器のような必要な試薬および必要物を得なければならない。試薬の濃度は調整する必要があるかもしれない。例えば、もし非特異的結合が観察される場合、当業者はプローブ溶液の濃度を希釈することができる。

20

【0073】

いくつかの態様において、組織学検体は黄金標準である。用語「黄金標準」は、検体の組織学および臨床診断が知られていることを意味することが、当業者に公知である。黄金標準は、「トレーニング」データセットといわれることも多い。黄金標準は、識別プロセスに寄与し得る特徴の全ての、測定の組、または信頼性のある見積もりを含む。そのような特徴は、既知の疾患状態を持つ代表的な数の患者から収集された試料から収集される。標準試料は細胞学的試料であり得るが、これはパネル選択では余り望ましくない。

【0074】

組織学試料は、当業者に公知のいずれかの技術、例えばバイオプシーによって得ることができる。いくつかの態様においては、患者当たりの検体のサイズは、ライブラリー中の各マーカーをテストするのに十分な組織切片を得ることができるような十分な大きさとする必要がある。

30

【0075】

いくつかの態様において、検体は、各特定の疾患状態と診断された複数の患者から得られる。患者当たり1つの検体を得ることができるか、あるいは患者当たり複数の検体を得ることができる。複数の検体が個々の患者から得られる態様においては、外科医の技量により、単一患者から得られた各検体はその患者から得られた他の検体と同様であることを確かにする。患者の対照群は、健康な患者、またはテストすべき一般的または特定の疾患状態に罹患していない患者であり得る。

40

【0076】

基本的方法の第一の工程は、所望の疾患状態に関連するマーカーのライブラリーへのプローブの結合の感度および特異性を測定することである。この工程においては、ライブラリー中の各マーカーに特異的なプローブを患者の検体の試料に適用する。従っていくつかの態様においては、もしライブラリー中に例えば30のマーカーがあれば、各患者の検体は30の試料に分割され、各試料は30のマーカーのうちの1つにつき特異的なプローブで処理される。プローブは可視化できる標識を含む。従って、マーカーへのプローブの結合のパターンおよびレベルを検出することができる。結合のパターンおよびレベルは、定量的に、すなわち分析機器によって、あるいは定性的に、病理学者のようなヒトによって検出することができる。

50

【0077】

いくつかの態様においては、目的のおよび/または定量的スコアリング方法を開発して、マーカーへのプローブの結合のパターンおよびレベルを検出する。スコアリング方法は発見的手法によって設計することができる。スコアリング方法を用いて、例えば病理学者によって主観的解釈を客観化する。適当なスコアリング方法を決定することは当業者技量内のものである。いくつかの態様においては、スコアリング方法は、無し、弱い、中程度、または強いとして、マーカープローブ染色の密度のような特徴をカテゴリー化することを含みうる。もう1つの態様において、これらの特徴は顕微鏡スライドイメージに対するアルゴリズムの操作で測定することができる。例示的なスコアリング方法は、割合および密度を、密度を：無し = 0、弱い = 1、中程度 = 2、強い = 3として、パーセンテージ細胞を：0 ~ 5% = 0、6 ~ 25% = 1、26 ~ 50% = 2、51 ~ 75% = 3、> 75% = 4としてグレードを付け、次いで2つのグレードを一緒に掛け合わせることによって得られた単一の「Hスコア」に統合するものである。例えば、50%弱く染色された+50%中程度に染色されるものは、スコア6 = (1 × 2) + (2 × 2)である。「Hスコア」は本発明者らの1人、故Kenneth Hirschによるものである。

10

【0078】

当業者であれば、病理学者および試料に関する潜在的偏りを最小化することに関連する論点に立ち向かうことができる。例えば、ランダム化を用いて、系統的誤差を有する確率を最小化することができる。盲検を用いて、実験を行う人々による実験的偏りを排除することができる。例えば、いくつかの態様において、病理学者の間の変動は、二重盲検を行うことによって最小化することができる。本明細書中で用いるように、用語「二重盲検」は、偏りを回避するための十分に確立された方法であり、データの収集およびデータの解析が独立してなされる。他の態様において、試料間の変動は試料をランダム化することによって最小化される。例えば、病理学者が試料を分析する前に試料をランダム化する。また、実験プロトコルに関連するランダム化もある。いくつかの態様において、各試料は、少なくとも二人の病理学者において分析される。各患者につき、マーカーへのプローブの結合の信頼性のある評価が得られる。1つの態様において、この診断は、患者当たり二人の病理学者を用いて資格のある病理学者によって行い、信頼性についてチェックする。

20

【0079】

信頼性のある設計および信頼性のある統計学的性能見積もりを得るためには、十分な数の試料を収集すべきである。信頼性のある設計および信頼性のある統計学的性能見積もりを得るためのにどれくらい多くの試料が十分であるかを判断することは当業者の技量内である。ほとんどの標準クラシファイアー設計パッケージは、性能見積もりの信頼性を測定するための方法を有しており、試料のサイズは、信頼できる見積もりが達成されるまで漸次増加させるべきである。例えば、信頼できる設計を得るために十分な見積もりは、収集された200の試料で達成することができ、27の異なる特徴が各試料から見積もられる。

30

【0080】

第2の工程は限定された複数のプローブを選択することである。前記選択工程には統計学的分析および/またはパターン認識技術を使用することができる。選択工程を実行するためには、データをデータベースに統合しうる。いくつかの態様においては、有効性分析の間に作用様式が見えないように、また偏りを最小化するために、プローブに番号をつけてもよい。この方法によると大量のデータがもたらされるため、厳格な統計学的技術が用いられる。任意の統計的方法を用いることができ、当業者であれば、いずれの方法が、またどれくらい多くの方法が適切であるかを特定することができる。

40

【0081】

任意の数の統計学的分析および/またはパターン認識方法を使用することができる。データ構造は最初は未知で、かつ異なるクラシファイアー設計方法が異なる構造につき良好に実行するので、データにつき少なくとも2つの設計方法を用いるのが好ましい。いくつかの態様において、3つの異なる方法を用いることができる。データセットの統計学的分析および/またはパターン認識の分野における当業者であれば、データセット構造の特徴

50

から、ある種の統計的方法が他の方法よりも効果的な結果を生じるであろうことを認識するであろう。ここで効果的とは、所望の数のプロープにより一定のレベルの感度および特異性を達成することを意味する。当業者であれば、統計学的分析および/または方法の効率がデータに依存することを知っているであろう。例示的な統計学的分析および/またはパターン認識方法を以下に記載する。

【0082】

a) 決定樹法 (C4.5として知られる)

C4.5は<http://www.cse.unsw.edu.au/~quinlan/>からftpを介して入手可能な公的ドメインソフトウェアである。これは、決定閾値を特定の特徴に順次適用することによって最良に分類することができるデータに適している。これは相関性のないデータに最良に働き、また偏差が異なるという前提で、同様な平均を有するデータをうまく処理する。前記C4.5パッケージを用いて、本明細書に示す例が得られた。

10

【0083】

b) 直線識別分析

これは、最良のクラスの分離を与える特徴の重み付け組合せを見つけ出すことを含む。これらの方法は関連するデータでよく働くが、同様な平均および異なる偏差を持つデータではよく働かない。性能の見積もりおよび必要なグラフ出力に応じて、いくつかの統計学的パッケージを用いた (SPSS、SASおよびR)。Fisherの直線識別関数を用いて、誤差率を最小化するクラシファイアーを得た。カノニカル識別関数を用いて、決定閾値が変化することにつれて感度および選択性の間のトレードオフを示すレシーバー操作特徴 (ROC) 曲線を計算した。

20

【0084】

c) 論理的的回帰

これは直線回帰モデルの非直線変換である。独立変数をlogオッズ率 (logit) で置き換える。識別分析のように、直線回帰は、直線モデルで樹立された統計学的方法のクラスに属する。そのようなモデルは、例示的変数の間の直線的関係に基づく。

【0085】

十分な数の試料により、前記技術およびソフトウェアパッケージを用いて、クラスの間での良好な識別を与える特徴の組合せをサーチすることが可能である。他の例示的統計学的分析および/またはパターン認識方法は、SPSSにおける直線識別関数方法ならびにRおよびSASにおける論理的的回帰方法である。SPSSは正式製品名称であり、SPSS, Inc., 本社, 233S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606 (www.spss.com) にあるSPSS, Inc. から入手可能である。SASは正式製品名称であり、SAS Institute, Inc., 100 SAS Campus Drive, Cary, NC 27513-2414, USA (www.sas.com) から入手可能である。Rは正式製品名称であり、Free Software Foundation's GNU (General Public License) からFree Softwareとして入手可能である。<http://www.r-project.org/>。

30

【0086】

いくつかの態様において、相関マトリックスが得られる。相関は、変数の対の間の直線会合の量を測定する。相関マトリックスは、1つのマーカーで得られたデータをもう1つのマーカーで得られたデータと関連付けることによって得られる。閾値相関数を設定することができる (例えば50%相関)。この場合には、50%またはそれより高い相関数を持つ全てのマーカーを相関マーカーと考える。

40

【0087】

本発明のいくつかの態様において、ユーザーが供給した重み付け因子を用いて、最適化されたパネルを得ることができる。重み付けはいずれかの因子と関連付けることができる。例えばあるマーカーは、コスト、商業的考慮、誤分類または誤差率、地理的位置における一般的疾患状態の有病率、地理的位置における特定の疾患状態の有病率、余剰分、およびプロープの入手可能性のため他のマーカーよりも高く重み付けすることができる。ユーザーが他のマーカーよりもあるマーカーをより高く重み付けすることができるコストに関連したいくつかの因子は、プロープのコスト、およびライセンスの期間および条件のよう

50

な商業的アクセス論点である。ユーザーが他のマーカーよりもあるマーカーをより高く重み付けをすることができる商業的考慮に関連するいくつかの因子は、研究および開発（R&D）時間、R&Dコスト、R&Dリスク、すなわちプローブが働く確率、最終分析機器のコスト、最終性能、および市場への時間である。検出パネルにおいては、例えばユーザーが他のマーカーよりもいくつかのマーカーをより高く重み付けの可能性がある誤分類および誤差率に関連するいくつかの因子は、それが偽陰性を最小化するために望ましいであろうことである。他方、識別パネルにおいては、擬陽性を最小化するのが望ましいであろう。ユーザーが他のプローブよりもあるプローブをより高く重み付けするであろう地理的領域における一般的または特定の疾患状態の有病率に関連するいくつかの因子は、いくつかの地理的位置においては、ある種の一般的または特定の疾患の発生率が多かれ少なかれ 10 支配的であるということである。余剰分に関しては、いくつかの例では、パネルにおいて余剰分を有することが望ましい。例えば、もし何らかの理由で1つのプローブがパネル中のマーカーの生物学的変動により検出されなくても、疾患状態は他のマーカーにより検出されるであろう。いくつかの態様においては、好ましい余剰マーカーをより重く重み付けすることができる。

【0088】

本発明は、コストまたは供給の問題によって非常に良好な組合せが得られない可能性がある特徴の利用可能性に適合できるという点で柔軟である。1つの態様において、本発明は、利用可能な特徴に単純に適用して、代替的組合せを見出すことができる。もう1つの態様において、アルゴリズムを用いて、コスト重み付けが選択されたプロセスに含まれ、 20 最小のコスト解決に到達することができる特徴を選択する。例においては、収集された全てのマーカーから、あるいは商業的に好ましいプローブの群のみについて選択された組合せでのマーカー性能見積もりが示される。前記C4.5パッケージを用いてその高いコストに基づいてある種のプローブの重み付けをどのように下げることができるかも例によって示す。これらのプローブの組合せは、最適な組合せ同様に実行できないかもしれないが、その性能は、コストが重要な因子である状況において許容できる可能性がある。

【0089】

用いるいくつかの方法により、重み付けをクラスに適用することが可能となる。これは、ツリー（樹）設計がコストを最適化できるC4.5で利用できる。また、識別関数方法は、 30 所望の偽陽性または偽陰性の確率を与えるのに用いることができる単一のパラメーター出力を与える。異なる閾値設定のためのこれらのパラメーターのプロットは、レシーバー操作特徴（ROC）曲線として知られている。ROC曲線は、クラシファイアの異なる閾値レベルについての真の陽性スコアに対する偽陽性の見積もられたパーセンテージを示す。

【0090】

多くの一般的疾患状態の不均一な性質を考慮して、パネルをある程度の余剰分をもって構築し、テストが十分な感度、特異性、陽性の予測値（陽性予測値 = 真の陽性 / （真の陽性 + 偽陽性））、および陰性予測値（陰性予測値 = 真の陰性 / （偽陰性 + 真の陰性））を有するようにし、集団ベースのスクリーニングとしてのその使用を妥当なものとする 40 ことができる。しかしながら、局所のおよび地域的な差は、世界的な市場の異なるセグメントにおけるテストの具体的使用を制限し得、従って所与の市場についての最終パネルテストを構築するのに用いられる基準に有意に影響するであろう。臨床的利用の最適化は最も重要であるが、供給性（コスト）、技術的能力、実験室、およびヘルスケアプロバイダー、ワークフロー論点、マンパワー要件、ならびにプローブおよび標識の入手可能性を含む局所的因子は、パネルで用いられるマーカーの最終的な局所的選択に寄与するであろう。周知の直線識別関数分析を用いて、それにより各局所的因子が方程式中の項によって表され、各々がその局所的に決定された重要性に従って重み付けされる、全ての潜在的選択因子を含めて評価する。このようにして、1つの世界的領域で用いるために最適化されたパネルテストは、異なる領域で用いるために最適化されたパネルテストとは異なるであろう。

【0091】

検出または識別パネルが前記方法を用いて設計された後、次の工程は既知の細胞学的試 50

料を用いてパネルを有効化することである。有効化に先立ち、任意の最適化工程を用いることができる。いくつかの態様において、細胞学的試料を収集する方法を改良することができる。これは、患者から試料を得る方法ならびに細胞学的試料を混合する方法を含む。他の態様において、細胞学提示方法を改良することができる。例えば、最適固定剤（保存流体）または輸送流体の同定。

【0092】

黄金標準組織学試料を用いて得たパネルを有効化するために用いられる細胞学的試料は、既知の診断による細胞学的試料である。これらの試料は、当業者に知られるいずれの方法を用いて収集することもできる。例えば、自然発生生産、誘導生産によって、および痰生産を増強する物質の使用を介して、痰試料を収集することができる。前記試料をパネル中の各プローブと接触させ、プローブの結合レベルおよびパターンを分析して、パネルの性能を測定する。いくつかの態様において、パネルをさらに最適化することが必要であろう。例えば、パネルからプローブを除去する必要があるかもしれない。あるいは、さらなるプローブをパネルに加える必要がある可能性がある。加えて、パネル上の1つのプローブをもう1つのプローブで置き換える必要がある可能性もある。新しいプローブを加える場合、このプローブは相関マトリックスから決定された相関マーカーであり得る。またはプローブは機能的に同様なマーカーであり得る。一旦パネルを最適化すれば、パネルは臨床実験において更なるテストに進められる。

10

【0093】

他の態様において、パネルを最適化する必要は無い。もし細胞学的試料での結果が組織学試料からの結果に相関すれば、パネルを最適化する必要は無く、パネルは臨床試験でさらなるテストに進めることができる。

20

【0094】

4.使用方法

一旦前記した方法を用いてパネルが得られれば、それを細胞学的試料に適用することができる。本方法を説明するために、癌、特に肺癌を例示する。同様な工程および手法を他の疾患状態に適用する。特定の病巣から放出された細胞は同様に染色され、パネルを得るために用いた組織病理学試料と同様に、微小針吸引、痰、尿のような細胞学的試料において示すと考えられる。

【0095】

本発明の基本的な方法は、典型的には2つの工程を含む。まず、病気の細胞を含むことが疑われる細胞学的試料を、その各々が疾患マーカーに定量的に結合する複数の物質を含むパネルと接触させる。次いで、各物質の疾患マーカーへの結合のレベルまたはパターンを検出する。検出結果を用いて、一般的疾患の存在を診断し、または特定の疾患状態の間を識別することができる。任意の予備的工程は、細胞学的試料での疾患の検出、または疾患状態の間の識別を助ける物質の最適化パネルを同定することである。

30

【0096】

細胞学的検体は、限定されるものではないが、血液、尿、脊髄液、およびリンパ系のような体液からの細胞試料；肺管、例えば肺痰、泌尿器管、例えば膀胱洗浄液、生殖管、例えば頸部Papスミア、および胃腸管、例えば結腸洗浄液のような上皮細胞ベースの器官系；ならびに乳房、脾臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺のような器官および系での個体組織部位からの微小針吸引；乳房、脾臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺のような器官および系における個体組織部位からのバイオプシー；ならびに外科的バイオプシーからの組織のような組織学的検体を含むことができる。

40

【0097】

本発明による物質の例示的パネルは、細胞学的試料中の悪性細胞の正確な検出を可能とする任意の数の物質を含む。本発明によって考えられる分子マーカーは悪性細胞の検出を助けるいずれの分子であってもよい。マーカーはマーカーの発現レベルまたはパターンの変化に関連するいくつかの異なる基準に基づいてパネルを含めるにつき選択することができる。好ましいのは、発現の変化が腫瘍進行の初期に起こり、腫瘍細胞の大部分によって

50

呈され、所与の腫瘍タイプの75%を超えて、最も好ましくは所与の腫瘍タイプの90%を超えて検出を可能とし、および/または癌の組織学的タイプの間の識別を可能とする分子マーカーである。

【0098】

基本的方法の第1の工程は、組織学的試料中物質のパネルの発現のレベルまたはパターンの変化の検出である。この工程は典型的には、細胞学的試料を、標識されたポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはその断片、または核酸プローブのような物質と接触させ、個々の細胞におけるシグナルを観察することを含む。シグナルの変化がある細胞の検出により、標識プローブがそれに向けられる分子マーカーの発現のレベルの変化が示される。前記変化は、調べるべき組織または部位から得られた非悪性細胞に対する発現のレベルの増加または減少に基づく。

10

【0099】

物質パネルの発現レベルまたはパターン変化の分析は、当業者が、高い感度および高い特異性をもって悪性細胞が細胞学的試料に存在するか否かを判断することを可能とする。用語「感度」とは、病気を有する個人が臨床試験によって正しく同定される条件付確率をいう（真の陽性結果の数を真の陽性および偽陰性結果の数で割ったもの）。従って、もし癌検出方法が高い感度を有するならば、癌が検出されるパーセンテージが高く、例えば80%、好ましくは90%よりも高い。用語「特異性」とは、病気を有さない個人が臨床試験によって正しく同定される条件付確率をいう（すなわち、真の陰性結果の数を真の陰性および偽陽性の結果で割ったもの）。従って、もし癌検出方法が高い特異性、すなわち80%、好ましくは90%、より好ましくは95%を有すれば、本方法により生じる偽陽性のパーセンテージは低い。「細胞学的試料」は、その患者の細胞を含む患者から収集されたいずれの試料も含む。本発明で考えられる細胞学的試料の例は、体液、上皮細胞ベースの器官系洗浄液、搔取物、ブラッシング物、スミアまたは滲出物、ならびに微小針吸引およびバイオプシーを含む。

20

【0100】

本発明に記載されるマーカーの使用は、適切な細胞学的試料をルーチンの得ることが可能なこと、および試料を続いた評価のために適切に保存できることを仮定している。細胞学的試料を加工し、適切な保存剤中で貯蔵することができる。好ましくは、細胞学的試料を、保存剤を含有するバイアル中に収集する。保存剤は、細胞の形態を維持し、細胞タンパク質および核酸の分解を阻害し、またはブロックすることが知られるいずれかの分子または分子の組合せである。適当な固定を確実にするために、試料をバラバラにしおよび/または粘液のような被覆物質を分解するために高スピードで収集部位にて試料を混合し、それによって細胞を保存剤に曝露することができる。

30

【0101】

一旦検体が得られれば、適当な混合デバイスを用いてそれをホモジナイズすることが望ましい。これにより、1より多いテスト部位にアリコットを送り、複数のスライドおよび/または複数の沈積物をスライド上に調製する可能性を含む、複数の目的でのアリコットの使用を可能とする。使用前の検体および各アリコットの最初のホモジナイズは、スライド間の結果の比較が意味をもつように、各個々のスライドが実質的に同一の細胞分布を有することを確実にするであろう。

40

【0102】

分析用の検体の調製は、限定されるものではないが、細胞の単層のスミア、遠心、または沈積を含む方法を用いて試料を顕微鏡スライドに適用することを含む。そのような方法は手動、半自動または全自動とすることができる。細胞懸濁液を吸引して、細胞をフィルター上に沈積させ、細胞の単層を準備したスライドに移し、これをさらなる評価のために処理することができる。このプロセスを繰り返すことによって、さらなるスライドを必要に応じて調製することができる。本発明は、スライド当たり1つの分子マーカーの検出を含む。スライド当たりいくつかの分子マーカーの検出も考えられる。好ましくはスライド当たり1~6のマーカーを検出する。いくつかの態様において、スライド当たり2つのマ-

50

カーを検出する。他の態様においては、3つのマーカーをスライド当たり検出する。

【0103】

本発明では、当業者が利用できる多数の方法のうちいずれかを用いて、DNA、RNAまたはタンパク質レベルで分子マーカー発現の変化を検出することが考えられる。細胞学的試料での分子マーカーの発現のレベルまたはパターンの変化の検出は、一般に、細胞学的試料を、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体またはその断片、あるいはパネル中の分子マーカーをコードする核酸配列に相補的な核酸配列、集合的に「プローブ」および標識と接触させることを含む。典型的には、プローブが分子マーカーと反応する場合、シグナルが発生されるように（「標識プローブ」）、プローブおよび標識構成要素を操作可能に連結する。本発明によって考えられる標識は、シグナルが発生し、またはそれを可能とし、および試料中の構成要素の同定を可能とするいずれかの標識である。好ましい標識は放射性、蛍光原性、色原性、または酵素的部位を含む。従って、可能な検出方法は、限定されるものではないが、免疫細胞化学；免疫化学のようなプロテオミクス；インサイチューハイブリダイゼーションおよび蛍光インサイチューハイブリダイゼーションのような細胞遺伝学；MACおよびDNA倍数性のような放射性検出、サイトメトリーおよび電界効果（自動コンピューター化サイトメトリーを用いる化学量論的に染色された核DNAの定量）および；形態学に基づく定量的細胞病理学のような細胞病理学を含む。標識されたプローブによって生じたシグナルは、好ましくは、医療実践者または技術者による検出を可能とするのに十分な強度のものである。

10

【0104】

一旦スライドが準備されれば、医療実践者はスライドの顕微鏡観察を行って、癌診断のマーカー発現特徴の変化を呈する細胞を同定する。医療実践者はイメージ分析系および自動顕微鏡を用いて、対象となる細胞を同定することができる。データの解析は、明確な診断を医師がなすのを助け、最適な治療アプローチを選択する情報管理系およびアルゴリズムを利用することができる。医療実践者は、標識された物質の存在を検出することができる機器プラットフォームを用いて試料を調べることができる。

20

【0105】

分子診断パネルアッセイの結果、標識された細胞および/または組織切片を持つ一つまたは複数の顕微鏡スライドグラスが得られる。これらの（細胞）病理学複数標識細胞調製物を目的的に、かつ臨床的に意味のある結果をもって評価するヒト専門家の挑戦の結果、いずれかのヒトについての実質的に克服できない検出および知覚問題がもたらされる。

30

【0106】

コンピューター支援イメージング系（すなわち、Photonic Microscopes（商標））を開発し、それを用いて、プローブ標識細胞および組織の量および位置を定量的かつ再現性よく評価することができる。そのようなPhotonic Microscopes（商標）はロボットスライド取扱能力、データ管理システム（例えば、医療情報科学）、および定量的デジタル（光学およびエレクトロニック）イメージ解析ハードウェアおよびソフトウェアモジュールを組み合わせて、匹敵する感度および精度をもってヒト可視化によって得ることができない細胞ベースのプローブ内容および位置データを検出し、報告する。これらのプローブデータを用いて、種々の疾患状態についてのそれらの各細胞ベースのマーカーにおけるその関連特徴および差に基づいて細胞試料を特徴付け、弁別することができる。

40

【0107】

本方法は、分子診断パネルを細胞ベースの検体および試料に適用し、続いてコンピューター支援イメージングシステムを用いて分子診断パネルテストの結果を定量し、報告する方法である。そのようなイメージングシステムを用いて、複数プローブを同時に所与のスライドベースの試料で用い、プローブは顕微鏡細胞学または組織学スライド上の色によって弁別されるためにプローブを別々に分析し、定量し、報告することができる細胞ベースの試料を評価することができる。

【0108】

試料中の標識物質によって生じるシグナルは、もしそれが適当なタイプであって十分な

50

強度のものであれば、標準顕微鏡またはコンピューター支援顕微鏡を用いてヒトレビューアー（例えば病理学者）によって検出され得る[167]。前記コンピューター支援顕微鏡は、顕微鏡操作のマウス駆動制御（例えば、ステージの移動、焦点合わせ）を鍵となる機能（例えば、スライドスキッピングパターン）のコンピューター化自動化と一体化させる人間工学コンピューター接続顕微鏡ワークステーションである。中枢化データ管理システムは関連する患者の情報ならびに全ての検体のスクリーニングおよび病理学者のレビューからの結果を貯蔵し、組織化し、表示する。バーコードにインプリントされ、各試料スライドに付着された識別番号は、データベース中の各試料をユニークに同定し、それを元の検体および患者に関連付ける。

【0109】

10

好ましい態様において、試料中の標識された物質によって生じたシグナルは、自動イメージ分析システム、または中枢化データ管理システムに連結された光工学的顕微鏡を用いて検出され、定量される。前記光工学的顕微鏡は顕微鏡の操作の十分に自動化されたソフトウェア制御を提供し、非常に弱いシグナルまたは放射性標識部位からのシグナルのような、ヒトレビューアーによっては検出できないシグナルさえも定量に適したディテクターおよび他の構成要素を一体化させる。検出されたシグナルの位置は、自動化機器による迅速な再位置決定のために、およびコンピューター援助顕微鏡を用いるヒトレビューのために電子的に貯蔵される[168]。

【0110】

中枢化データ管理システムは、バーコード化識別番号を用いて全ての患者および試料のデータを保管する。データは多重部位から非同調的に獲得することができ、ヒト細胞学者および/または自動アナライザーによって複数のレビューおよび分析から由来することができる。これらのデータは、以前にホモジナイズされた単一患者検体からのアリコットを表す複数試料スライドからの結果を含むことができる。データの一部または全てを病院の実験室情報システムに送り、またはそこから送って、報告、保管、請求または調節要件に適合させることができる。パネルテストおよびヒトレビューからの一体化された結果を含む単一の包括的な報告を生じさせ、ハードコピーにてまたはネットワークコンピューターまたはインターネットを通じて電子的に医師に送達することができる。

20

【0111】

いくつかの態様において、本発明の方法は、異なる組織学的タイプの癌のような異なる疾患の弁別識別を可能とする。用語「組織学的タイプ」とは特定の疾患状態をいう。一般的な疾患状態に依存し、一つまたは数個の組織学的タイプがあり得る。例えば、肺癌は、限定されるものではないが、扁平細胞癌腫、腺癌、大細胞癌腫、小細胞癌腫および中皮腫を含む。患者に影響する癌の組織学的タイプの知識は非常に有用である。なぜならば、それは医療実践者が疾患を突き止め、特徴付け、および光学処理戦略を決定するのを助けるからである。

30

【0112】

特定の疾患状態を測定するためには、特定の疾患状態の間の識別を可能とするマーカーのパネルを選択する。例えば、分子マーカーのパネル内では、癌の特定の組織学的タイプを示す発現のパターンを同定することができる。分子マーカーのパネルの発現のレベルの検出は、前記した方法によって保管される。好ましくは、1~20の分子マーカーのパネルを用いて、肺癌の種々の組織学的タイプの間を識別する。しかしながら、最も好ましくは、4~7のマーカーを用いる。決定樹を開発して、マーカー発現のパターンに基づいて異なる組織学的タイプの間を識別するのを助けることができる。

40

【0113】

細胞学的試料中の悪性細胞の検出を可能とすることに加え、本発明は、疾患状態の分子特徴付けにおいて用途を有する。そのような情報は、しばしば、予後が重要なものであり、特定の患者に対する最適な治療アプローチの選択において医師を助けることができる。加えて、本発明で記載されたマーカーのパネルは、再発につき、または疾患を治療するのに用いられる療法の有効性の測定いずれかにつき患者をモニターする用途を有することが

50

できる。

【0114】

非限定的例として、肺癌の存在は肺癌の検出パネルによって検出することができ、肺癌の特異的タイプは識別パネルによって検出される。もし悪性細胞が細胞学的試料に存在すると医療実践者が判断すれば、肺癌の組織学的タイプの更なる分析を行うことができる。本発明に含まれる肺癌の組織学的タイプは、限定されるものではないが、扁平細胞癌腫、腺癌、大細胞癌腫、小細胞癌腫および中皮腫を含む。図1は、肺癌の異なる組織学的タイプを同定するためのパネルに含ませるべき好ましいマーカーである分子マーカーを示す。「%」で記した欄は、特定のマーカーを発現する腫瘍検体のパーセンテージを示す。

【0115】

肺癌の種々の組織学的タイプを決定するにおいて、マーカーの発現の相対的レベルを分析する。図2は、どのように異なるマーカーを用いて、癌の異なる組織学的タイプ内を識別できるかを示す。この表において、SQは扁平細胞癌腫を示し、ADは腺癌を示し、LCは大細胞癌腫を示し、SCは小細胞癌腫を示し、MEは中皮腫を示す。各細胞に出現する数は、一つの細胞型対もう1つの細胞型におけるマーカーの変化の頻度を表す。表に含めるには、前記比率は2.0より大きい、または0.5未満でなければならない。100よりも大きな数は一般に、第2のマーカーが発現されないことを示す。そのような場合、デノミメーターを分析の目的で0.1に設定した。最後に、空の細胞は発現の差が無い、または発現データの非存在のいずれかを表す。

【0116】

収集されたデータを分析するための1つの方法は、決定樹を構築することである。スキーム1~4は、発現パターンを用いて肺癌の組織学的タイプの異なる決定を可能とするために構築することができる決定樹の例である。本発明は、スキーム1~4に示された決定樹には限定されない。マーカーの発現の相対的レベルは、異なる組織学的タイプの悪性細胞における分子マーカーの発現のレベルよりも高い、低い、または同一（ND）であり得る。各スキームは、分子マーカーの示されたパネルの使用を通じて肺癌の5つの組織学的タイプの間の区別を可能とする。

【0117】

例えば、スキーム1においては、パネルは、HERA、MAGE-3、トロンプモジュリンおよびサイクリンD1からなる。まず試料を、HERAに向けられた標識プローブと接触させる。もしHERAの発現が対照よりも低いと、前記テストは、肺癌の組織学的タイプは中皮腫（ME）であることを示す。しかしながら、もし発現が対照よりも高いか、またはそれと同一であれば、試料を、MAGE-3に向けられたプローブと接触させる。もしMAGE-3の発現が対照よりも低ければ、試料を、サイクリンD1に向けられた標識プローブと接触させ、小細胞癌腫（SC）または腺癌（AD）の測定が可能である。もしMAGE-3の発現が対照よりも高いか、またはそれと同一であれば、試料を、トロンプモジュリンに向けられた標識プローブと接触させ、扁平細胞癌腫（SC）または大細胞癌腫（LC）の測定が可能である。

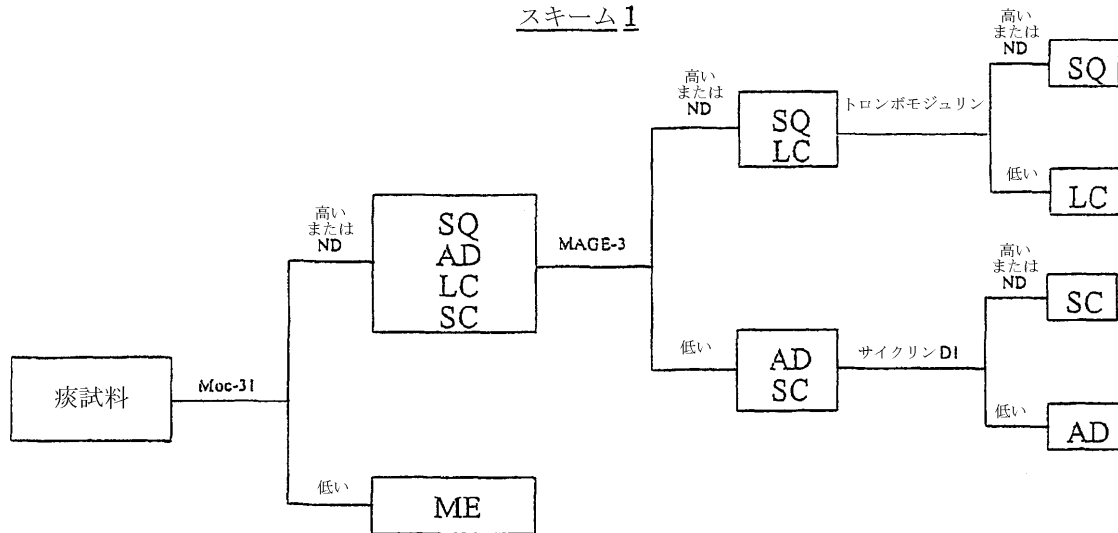
【0118】

10

20

30

スキーム 1



10

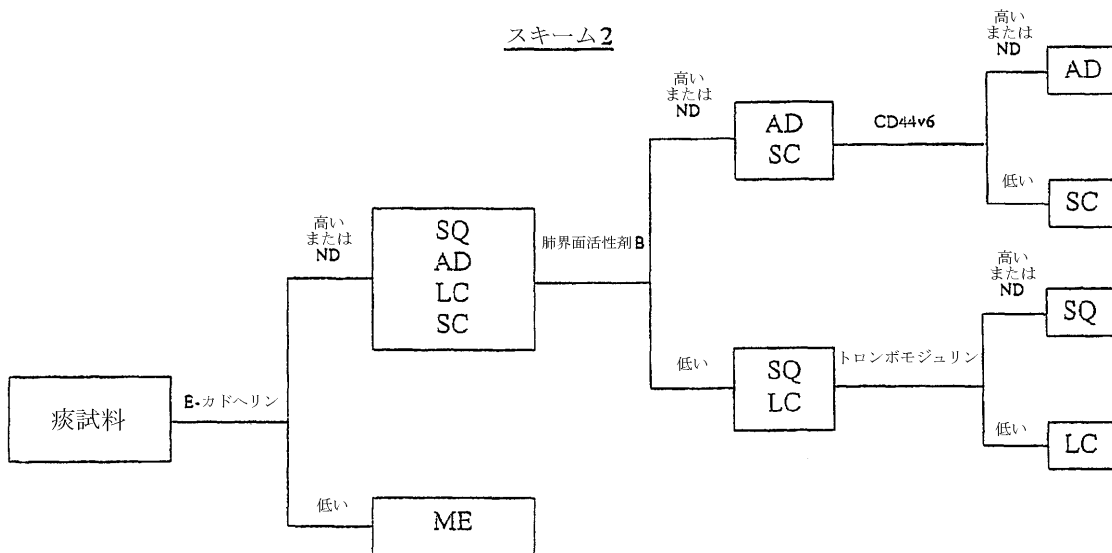
【 0 1 1 9 】

スキーム2において、パネルはE-カドヘリン、肺界面活性剤Bおよびトロンボモジュリンからなる。まず、試料を、E-カドヘリンに向けられた標識プローブと接触させる。もしE-カドヘリンの発現が対照よりも低ければ、前記テストは肺癌の組織学的タイプが中皮腫（ME）であることを示す。しかしながら、もし発現が対照よりも高いか、または同一であれば、試料を、肺界面活性剤Bに向けられたプローブと接触させる。もし肺界面活性剤Bの発現が対照よりも低ければ、試料を、トロンボモジュリンに向けられた標識プローブと接触させ、扁平細胞癌腫（SQ）または大細胞癌腫（LC）の測定が可能である。もし肺界面活性剤Bの発現が対照よりも高いか、またはそれと同一であれば、試料、CD44v6に向けられた標識プローブと接触させ、腺癌（AD）および小細胞癌腫（SC）の測定が可能である。（決定樹のさらなる例についてはスキーム3および4参照）。

20

【 0 1 2 0 】

スキーム 2

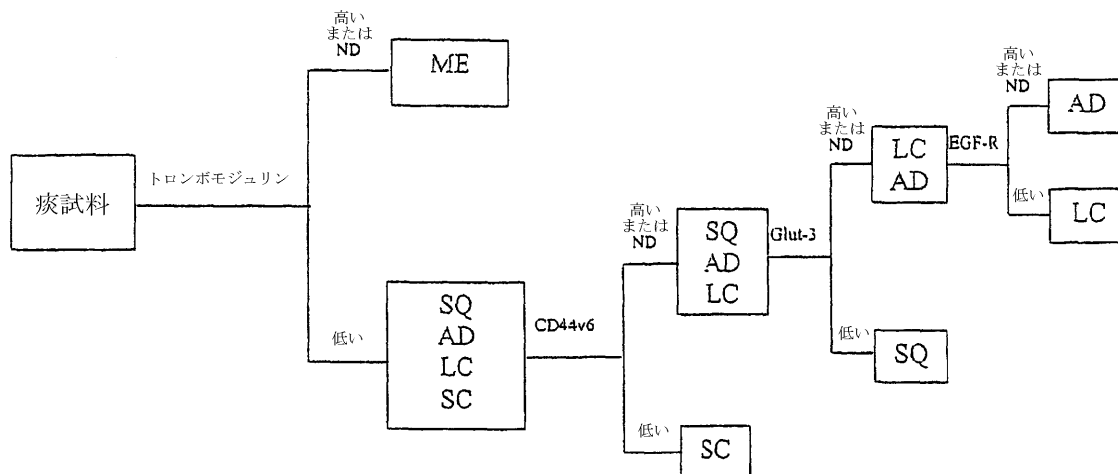


30

40

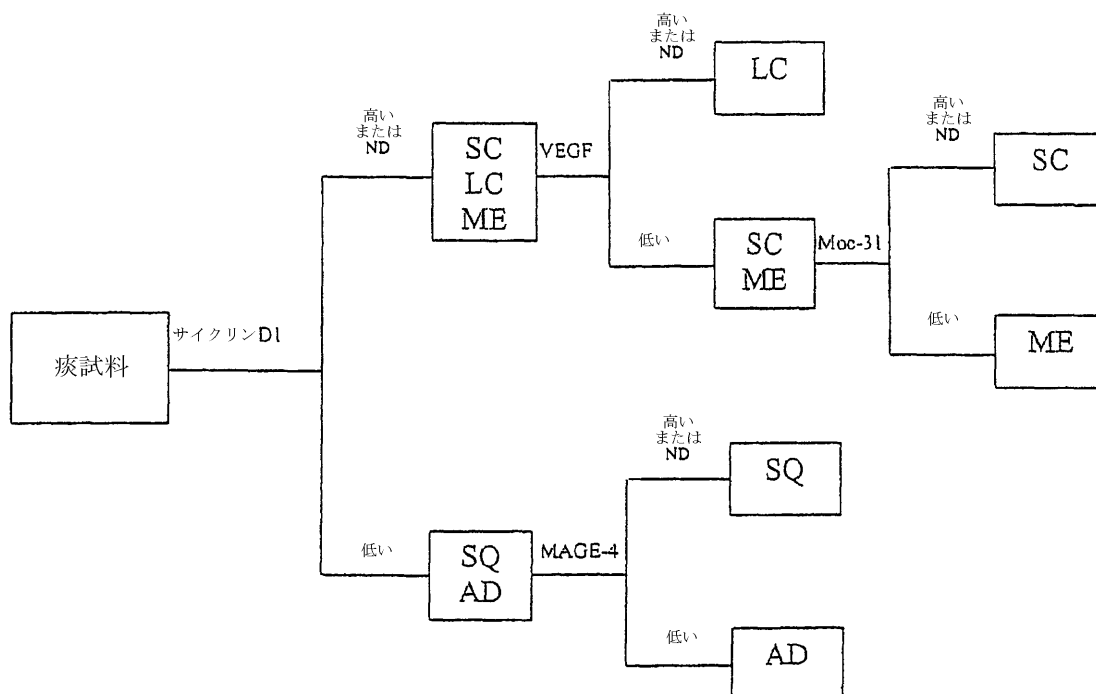
【 0 1 2 1 】

スキーム3



10

スキーム4



20

30

【0122】

好ましい方法は、発現のパターンの差が肺癌の種々の組織学的タイプの間の識別を可能とする分子マーカーのパネルを用いることを含む。

【0123】

多くの異なる決定樹を構築して、マーカー発現のパターンを分析することができる。この情報は医師または他のヘルスケアプロバイダーが用いて、患者管理決定を行い、最適な治療戦略を選択することができる。

40

【0124】

5. パネル分析の結果の報告

パネル分析からの結果はいくつかの方法で報告することができる。例えば、結果は単純な「是または非」結果として報告することができる。または、結果は、テスト結果が正しい確率として報告することができる。例えば、検出パネル実験からの結果は、患者が一般的疾患状態を有するか否かを示すことができる。また、パネルは特異性および感度を報告するので、前記結果は、患者が一般的疾患状態を有する確率として報告することもできる。識別パネル分析からの結果は、特定の疾患状態の間を識別するであろう。結果は、特定

50

の疾患状態が存在するか否かに関して「是または非」として報告することができる。または、結果は、特定の疾患状態が存在する確率として報告することができる。また、1人の患者からの検体についてのいくつかの識別パネル分析を行い、存在する疾患状態が他の確率に関連する特定の疾患状態である確率のプロフィールを報告することも可能である。他の確率は偽陽性を含むこともできる。

【0125】

存在する各特定疾患状態の確率のプロフィールが作成される態様において、いくつかの可能な出力がある。例えば、確率の全てが非常に小さな確率であるということも可能である。この場合、医師は、患者の検体診断が偽陽性であると結論する可能性がある。約80~90%である1つを除く全ての確率が低いという可能性もある。この場合医師は、患者がその高い確率を示す特定の疾患状態を有することをテストが証明している、と結論する可能性がある。また、確率のほとんどが低い、同様に高い確率が2つの特定の疾患状態において報告される可能性もある。この場合、医師は、正しい疾患状態を確実に同定するために、より広範なパネルテストを推薦することができる。もう1つの確率は、報告される確率の全てが低く、1つは残りよりもわずかに高いが、80~90%の範囲ほどには十分に高いことである。この場合、医師は、正しい疾患状態を同定し、および/または異なる癌タイプの遠隔一次腫瘍から転移性癌を除外することを確実にするために、より広範なパネルテストを推薦することができる。

10

【0126】

以下の実施例は、疾患検出パネル、疾患識別パネル、パネルの有効化、および疾患につきスクリーニングするための、および疾患の異なるサブタイプの間を識別するための診療所のパネルの使用を選択するための本発明の方法を説明する。肺癌は、部分的には、世界中の健康に対するその重要性のためこの説明的例で選択したが、同様の手法が他のタイプの癌、ならびに感染症、変性病、および自己免疫疾患に対して、これまでの全体的な開示に従って適用されることが認識されよう。

20

【0127】

説明的実施例

1. 肺癌

本発明を用いて、肺癌検出パネルならびに単一肺癌タイプ特異的識別パネルを開発した。肺癌は、2つの主なクラスに分けることができる疾患の例示的で複雑なコレクションである。全ての肺癌のほぼ70~80%を占める非小細胞肺癌腫(NSCLC)はさらに、扁平細胞癌腫、腺癌、および大細胞癌腫を含む3つの主な組織学的タイプに分けることができる。肺癌患者の残りの20~30%は小細胞肺癌腫(SCLC)を持つとされる。加えて、胸膜空間の悪性中皮腫はアスベストに曝露された個体で発症しかねず、しばしば、広く拡大して、他の胸部構造に侵入する。異なる形態の肺癌は肺の異なる領域に局在する傾向があり、異なる予後を有し、種々の形態の療法に異なって応答する。

30

【0128】

世界保健機構の最近の統計によると(Globocan 2000)、肺癌は男性および女性双方において最も普通の致死性悪性疾患となり、毎年124万の新しい症例および110万の死亡が見積もられている。米国単独では、National Cancer Instituteは、肺癌のほぼ186,000の新しい症例があり、毎年162,000の人々が前記疾患で死亡しており、全ての癌関連死亡の25%を占めると報告している。米国においては、肺癌を持つ患者に対する総じて1年の生存率は40%であるが、5年生きるのは14%に過ぎない。世界の他の地域においては、5年生存率は有意に低い(英国では5%)。肺癌の高い死亡率は、治療のオプションが制限されており、前記疾患が転移してしまったようである時には、ほとんどの患者(85%)が進行した病気を持つと診断される事実に戻ることができる。これらの患者においては、5年生存率は診断の時点における段階に応じて2~30%の間である。これは、患者が初期に診断され、5年生存率が75%よりも大きな症例とはかなり対照的である。多数の新しい化学療法剤が進行した肺癌の治療用の臨床プラクティスに導入されたのは事実であるが、今日まで、長期生存の有意な改善を生じさせるものは無かった。初期段階の病気を持つ患者は恐らく

40

50

は外科的処置によって治療できるにもかかわらず、患者はかなり危険なままである。というのは、患者は第2の悪性疾患を発生させる高い確率があるからである。従って、肺癌患者にとって、初期発見および治療、それ続く積極的なモニタリングにより、罹患率およびコストの低下とともに、長期生存の有意な改善を達成する最良の機会が提供される。

【0129】

現時点においては、患者は、X線による疑わしい病巣により、あるいは患者が兆候を示すようになることによって、肺癌を有することが疑われる。その結果、ほとんどの患者は比較的后期の段階の病気を持つと診断される。加えて、ほとんどの方法は初期段階疾患の検出に関して十分な感度を欠くので、米国National Cancer Institute (NCI)、National Institutes of Healthの現在のポリシーは、有意に危険な患者の集団においてさえ肺癌 10
に対するスクリーニングに抗して推薦している。しかしながら、本発明のこの態様においては、痰細胞学を使用して、肺癌の初期検出のための比較的非侵入性で、より効果的かつコスト的に有効な手段を提供する。

【0130】

痰細胞学の特異性は比較的高い。最近の研究により、経験のある細胞技術者は、高度な精度および信頼性を持って悪性またはひどい異型細胞を認識できることが示されている [10]。検出率は、試料が比較的進行した病気を持つ患者から集められた場合に80~90%と高いことがあるが [11、12]、総じて、痰細胞学は30~40%の感度を有するに過ぎない [13、14]。痰細胞学の低い感度は、検体入手し、それを調製するのに比較的费用がかかり得ることを仮定すれば特に重要である。さらに、悪性疾患を検出できないことは、治療 20
をかなり遅らせ、それにより、治療を達成する機会を低下させかねない。

【0131】

「危険な」集団の選択は、スクリーニングツールとしての痰細胞学の価値に影響しかねない。有意に危険な個体は、肺癌と前に診断された者、長期喫煙者または以前の喫煙者 (>30パック年)、およびアスベストまたは肺カルシノゲンに長期曝露した個体を含む。遺伝的素因または家系的履歴を持つ人々もまた「危険な」集団に含まれる。そのような個体はテストから利益を受ける可能性が高い。より低い危険性を持つ個体を含めると、検出される症例の絶対数は増加し得るが、ヘルスケアコストの実質的増加を妥当なものとする 30
ことは困難であろう。

【0132】

慣用的痰細胞学の比較的貧弱な性能に寄与する他の因子は、病巣の位置、腫瘍サイズ、組織学的タイプ、および試料の質を含む。扁平細胞癌腫は全ての一次肺新生物の31%を占める。これらの腫瘍のほとんどは気管支セグメントから起こり、近位葉および遠位サブセグメント枝まで伸びる [15]。この理由から、痰細胞学はこれらの病巣を検出するにおいて合理的には効果的である (79%)。剥離細胞は評価用にかなり入手できる可能性が高いため、現在、扁平細胞癌腫は、インサイチューおよび放射線では不顕性の段階における、細胞学的検出が可能な唯一の肺癌タイプと見なされている [15]。患者を胸部X線および痰細胞学双方で追跡した1つの大きな研究において、細胞学単独によって全ての肺癌の23%が検出され、前記腫瘍が初期段階で放射線学的には不顕性であったことを示唆している [16]。もう1つの研究において [17]、痰細胞学は放射線によっては不顕性の腫瘍を持 40
つ患者の76%を検出した。

【0133】

腺癌の場合には、腫瘍の70%が肺の周辺で起こり、悪性細胞が慣用的痰検体で見出されない。この理由から、腺癌は痰細胞学によっては稀にしか検出されず (45%) [12、18、19]、これは重要な懸念事項である。というのは、腺癌の発生率は特に女性に増加しているようだからである [20~22]。

【0134】

また、腫瘍のサイズも正しい診断を達成する確率に影響しかねず、これは、無症候個体における疾患の検出用のスクリーニングテストを考える場合に特に重要な因子である。24 mm未満の腫瘍が真の陽性であると読むのは50%のチャンスに過ぎないが、より大きな病巣 50

を検出する確率は84%を超える [12] 。

【 0 1 3 5 】

また、最近の報告により、検体の細胞性が痰細胞学の感度に影響するであろうことが示されている [14、23]。一般に、扁平細胞癌腫を持つ患者はかなりの数の腫瘍細胞を持つ検体を生じ、それにより、正しい診断の確率を増加させる [14、23]。腺癌を持つ患者では、痰検体における腫瘍細胞の存在は検体の95%のうち10%未満であって、検体の75%のうち2%未満であると報告されており、これは、前記診断を非常に困難なものとしている。

【 0 1 3 6 】

また、分化の程度も特に腺癌の場合に悪性細胞を検出する病理学者の能力に影響しかねない。十分に分化した腫瘍細胞は、非神経性呼吸器系上皮細胞に似ていることが多い。小細胞肺癌腫の場合には、痰試料はしばしば、区別される外観を有する緩く分離された細胞の巣を含む。しかしながら、痰試料を処理するのに現在用いられている技術は、細胞をばらばらにする傾向があり、診断をより困難なものとしている。

【 0 1 3 7 】

試料の質は、痰細胞学の低い感度に寄与し得るもう1つの因子である。最近の報告は、対象の70~85%からの適切な試料を得るのが可能なことを示唆している。しかしながら、この成功的測定を達成することは、しばしば、患者が複数の検体を提供することを必要とする [13]。この手法は不便で、時間がかかり、かつコストが高い。患者はしばしば数日間にわたって収集することを要求されるので、患者のコンプライアンスも一般に低い [13]。等しく重要なのは、以前の喫煙家が、肺癌を発症するかなりの危険性があるにもかかわらず、しばしば、適切な検体を生じさせないという観察である。試料の保存および処理は、診断テストとしての痰細胞学の価値に影響し得るもう1つの決定的な因子である。

【 0 1 3 8 】

最後に、たとえ適切な試料を得て、最適に調製できたとしても、細胞技術者は、一般に、依然として検体あたり2~4のスライドを観察しなければならず、各々は典型的には4分かかる [24]。慣用的痰細胞学の低い感度、高い技術的複雑性および労働の強さを仮定すれば、このテストが肺癌の初期検出のための集団ベースのスクリーニングとしてほとんど普遍的に拒絶されてきたのは驚くべきことではない [25]。

【 0 1 3 9 】

たとえこれらの技術的論点が解決されたとしても、痰細胞学の低い感度は重要な問題のままである。高率の偽陰性結果は、患者が治療可能な療法を受けることをかなり遅らせかねない。より大きな感度を持つテストを開発するのは可能であるが、そのような改良は特異性を犠牲としてはならない。偽陽性の結果の数の増加は、患者を不必要で、しばしば侵入的で、かつコスト高のフォローアップに供し、患者の生活の質に対して否定的なインパクトを有するであろう。本発明は、肺癌の初期発見のための痰細胞学の使用に関連するものを含む、初期癌検出の以前の方法に伴う制限の多くを克服する。

【 0 1 4 0 】

肺癌は疾患の不均一なコレクションである。テストが、集団ベースのスクリーニングとしてのその使用を正当化するのに必要なレベルの感度および特異性を有するのを確実にするためには、本発明では、例えば、パネルを開発するのに10~30細胞マーカーのライブラリーを用いることが考えられる。本発明のライブラリーの選択は、ほとんどの場合、発現を予後にリンクさせる試みにおいて肺癌を持つ患者から採取したバイオプシー検体でマーカーの発現が測定された関連科学文献のレビューおよび再分析に基づくものであった。

【 0 1 4 1 】

例えば、患者の痰における肺癌の初期検出、特徴付けおよび/またはモニタリング用の好ましいパネルは、発現の変化が腫瘍検体の少なくとも75%で起こった分子マーカーを含むことができる。例示的パネルはVEGF、トロンプモジュリン、CD44v6、SP-A、Rb、E-カドヘリン、サイクリンA、nm23、テロメラゼ、Ki-67、サイクリンD1、PCNA、MAGE-1、ムチン、SP-B、HERA、FGF-2、C-MET、甲状腺転写因子、Bcl-2、N-カドヘリン、EGFR、Glut-1、E

10

20

30

40

50

R関連 (p29)、MAGE-3およびGlut-3から選択されるマーカーを含む。最も好ましいパネルは、発現の変化が腫瘍検体の85%より多く起こる分子マーカーを含む。例示的パネルはGlut1、HERA、Muc-1、テロメラゼ、VEGF、HGF、FGF、E-カドヘリン、サイクリンA、EGF受容体、Bcl-2、サイクリンD1およびN-カドヘリンから選択される分子マーカーを含む。RbおよびE-カドヘリンを例外として、肺癌の診断はマーカー発現の増加と関連付けられる。本実施例で利用したプローブ/マーカーのライブラリーの簡単な記載は以下の表4に掲げる。以下の表中の抗体のナンバリングは、本実施例を通じて抗体/プローブ/マーカーの番号と一致することに注意されたい。

【0142】

(表4)

肺パネル用のプローブおよびマーカー			
番号	マーカー略語	抗体/プローブの完全な名称	標的マーカーの名称/説明
1	VEGF	抗 VEGF	血管内皮成長因子タンパク質
2	トロニンボモジュリン	抗トロニンボモジュリン	膜貫通糖タンパク質
3	CD44v6	抗 CD44v6	細胞表面糖タンパク質 (CD44 変異体6 遺伝子): 細胞接着分子
4	SP-A	抗界面活性剤アポプロテイン A	肺界面活性剤アポプロテイン
5	網膜芽腫	抗網膜芽腫遺伝子産物	リンタンパク質
6	E-カドヘリン	抗 E-カドヘリン	膜貫通 Ca^{2+} 依存性細胞接着分子
7	サイクリン A	抗サイクリン A	サイクリン依存性キナーゼ酵素のタンパク質サブユニット: 細胞周期調節用
8	nm23	抗 nm23	nm23-H1および-H2遺伝子によって生産された2つの産物に関連するタンパク質
9	テロメラゼ	抗テロメラゼ	染色体修復のためのリボヌクレオタンパク質酵素
10	Mib-1 (Ki-67)	抗 Ki-67	核タンパク質: 増殖細胞に発現
11	サイクリン D1	抗サイクリン D1	サイクリン依存性キナーゼ酵素のタンパク質サブユニット: 細胞周期調節用
12	PCNA	抗増殖細胞核抗原	DNA ポリメラーゼのタンパク質補因子
13	MAGE-1	抗メラノーマ関連抗原 1	遺伝子の MAGE ファミリーによってコードされた細胞認識タンパク質
14	ムチン 1 (MUC-1)	抗ムチン 1	細胞表面および分泌ムチン (高度にグリコシル化されたタンパク質)
15	SP-B	抗成熟界面活性剤アポプロテイン B	肺界面活性剤アポプロテイン
16	HERA	抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)	細胞表面抗原 (膜貫通タンパク質)
17	FGF-2 (塩基性 FGF)	抗繊維芽細胞成長因子	細胞表面に結合するタンパク質
18	c-MET	抗 c-MET	肝細胞成長因子 (HGF) のための膜受容体タンパク質
19	甲状腺転写因子 1	抗 TTF-1	甲状腺特異的遺伝子のレギュレーター: 肺にも発現
20	BCL-2	抗 BCL2	BCL2 遺伝子によってコードされた細胞内膜結合タンパク質
21	PT20	抗 p20	増殖関連核小体抗原タンパク質
22	N-カドヘリン	抗 N-カドヘリン	膜貫通 Ca^{2+} 依存性細胞接着分子
23	EGFR	抗 EGFR	表皮成長因子受容体: 膜貫通糖タンパク質
24	Glut 1	抗 Glut 1	グルコース輸送: タンパク質の膜貫通 Glut ファミリー
25	ER 関連 (p29)	抗 ER 関連 P29: 抗 HSP 27	エストロゲン受容体関連 p29 タンパク質: 熱ショックタンパク質 27
26	Mage 3	抗メラノーマ関連抗原 3	遺伝子の MAGE ファミリーによってコードされた細胞認識タンパク質
27	Glut 3	抗 Glut 3	グルコース輸送: タンパク質の膜貫通 Glut ファミリー
28	PCNA (より高い希釈)	抗増殖細胞核抗原	DNA ポリメラーゼのタンパク質補因子

【0143】

好ましいパネルにおける各分子マーカーを以下に記載する。各タイプの肺癌についての組織中のマーカーの発現のパーセンテージを引用する表5をこのセクションの最後に掲げる。

【0144】

グルコーストランスポータータンパク質 (Glut1およびGlut3) [26~28]

グルコーストランスポーター-1 (Glut1) およびグルコーストランスポーター-3 (Glut-3) は普遍的に発現される高親和性グルコーストランスポーターである。腫瘍細胞は、しばしば、正常細胞よりもより高い率の呼吸、グルコース摂取、およびグルコース代謝を呈し、腫瘍細胞におけるグルコースの上昇した摂取はグルコーストランスポーターによって媒介されると考えられている。GLUTイソ形態のある種のタイプの過剰発現が肺癌で報告されている。Glut1の細胞局在は細胞膜である。GLUT-1およびGLUT-3は疾患状態の検出に有用な疾患マーカーである。

【0145】

悪性細胞は、グルコーストランスポータータンパク質 (Gluts) のファミリーによって媒介されると考えられるグルコース摂取の増加を呈する。癌遺伝子および成長因子は、これらのタンパク質の発現ならびにその活性を調節するように見える。タンパク質のGlutファミリーのメンバーは、種々のヒト組織における分布の異なるパターンを呈し、迅速な増殖は、しばしば、その過剰発現と関連付けられる。最近の証拠は、Glut1がNSCLCの大きなパーセンテージによって、およびSCLCの大部分によって発現されることを示唆している。

【0146】

Glut3の発現はNSCLCおよびSCLC双方において比較的低い、大細胞癌腫のかなりのパーセンテージ (39.5%) が前記タンパク質を発現する。段階I腫瘍においては、83%が、症

10

20

30

40

50

例の25%における細胞染色の75~100%でもってあるレベルのGlut1を発現する。これらのデータは、Glut1過剰発現は腫瘍進行における比較的初期の事象であることを示唆する。Glut1免疫反応性もまた段階IIおよびIIIA癌の90%を超えて検出されている。また、Glut1およびGlut3免疫反応性と腫瘍分化との間には逆の相関があるように見える。高いレベルのGlut1を発現する腫瘍は、特に攻撃的なようであり、これは貧弱な予後に関連する。腫瘍がタンパク質につき陰性である場合には、良好な生存が観察された。

【0147】

ヒト上皮関連抗原 (HERA) [29、30]

HERAは、未知の機能を持つ膜貫通糖タンパク質である。HERAは、ほとんどの通常および悪性上皮に存在する。最近の報告は、HERAの発現がNSCLCの全ての組織学的タイプで高いが、それを検出マーカーとして有用なものとしていることを示唆する。対照的には、HERA発現は中皮腫で存在せず、従って、識別マーカーとしての利用性を有することが示唆される。HERAの細胞局在は細胞表面である。

10

【0148】

塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF) [31~34]

塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF) は、ヘパリンおよび他のグリコサミノグリカンに対する高い親和性を持つポリペプチド成長因子である。癌においては、FGFは優れたマイトジェンとして機能し、脈管形成、分化、および増殖において役割を演じ、腫瘍の進行および転移に参与する。FGF過剰発現は、しばしば、SCLCおよび扁平細胞癌腫双方で起こる。多くの場合(62%)、細胞はFGF受容体も発現し、これはオートクリンループの存在を示唆する。段階I腫瘍の48パーセントがFGFを過剰発現する。段階II肺癌におけるFGFの頻度は84%である。成長因子またはその受容体いずれかの発現は貧弱な予後と関連付けられた。段階I疾患を持つ患者での5年生存率は、FGFを発現する患者では73%であったのに対し、FGF陰性である患者では80%であった。細胞局在は細胞膜である。

20

【0149】

テロメラーゼ [35~42]

テロメラーゼは、真核生物染色体のテロメアを延長し、維持するリボヌクレオタンパク質酵素である。それは逆転写酵素活性を持つ触媒タンパク質サブユニットおよび逆転写酵素活性を持つRNAサブユニット、およびテロメア延長用の鋳型として働くRNAサブユニットからなる。テロメラーゼを発現しない細胞は、各細胞分裂で順次に短くなったテロメアを有し、最後には、染色体の無能、老化および細胞の死滅に至る。テロメラーゼの細胞局在は核である。

30

【0150】

テロメラーゼの発現は不死化細胞で起こるようであり、酵素活性は悪性表現型の共通の特徴である。肺癌のほぼ80~94%が高レベルのテロメラーゼ活性を呈する。加えて、過形成の71%、化生の80%および形成異常の82%が酵素活性を発現する。全ての癌腫インサイチュー (CIS) 検体は酵素活性を呈する。前悪性組織における低レベルの発現は、恐らくは、試料中の小さなパーセンテージの細胞(5および20%)が酵素活性を発現するに過ぎないという事実に関連する。これは、細胞の20~60%が酵素活性を発現できる腫瘍とは対照的である。限定された数の試料に基づき、テロメラーゼ活性の発現はSCLCにおいても共通するようである。

40

【0151】

増殖細胞核抗原 (PCNA) [43~51]

PCNAは、DNAポリメラーゼデルタに対する補因子として機能する。PCNAは細胞周期のS期間およびDNA修復に関連するDNA合成の期間双方で発現される。PCNAは、広い範囲の正常および悪性組織において増殖する細胞で発現される。PCNAの細胞局在は核である。

【0152】

PCNAの発現は、迅速に分裂する細胞の共通の特徴であって、腫瘍の98%で検出される。免疫組織化学染色は、NSCLCの83%で検出された中程度~強い染色を持つ核である。強いPCNA染色はp53陰性腫瘍の51%で観察された。しかしながら、PCNA(細胞染色の>50%)お

50

よびp53双方が過剰発現された場合（染色された細胞の>10%）、予後はより貧弱な傾向があり、進行までの時間が短い。しばしば全ての段階の肺癌で検出されるが、PCNAに対する強い染色は転移性疾患においてより普通である。また、CISの31%がPCNAを過剰発現する。

【0153】

CD44 [51~58]

CD44v6は、細胞接着分子として作用する細胞表面糖タンパク質である。それは、上皮、中皮および造血組織において広い範囲の正常および悪性細胞で発現される。特異的CD44スプライス変種の発現は、ある種のヒト悪性疾患における転移および貧弱な予後に関連することが示されている。それは、扁平細胞癌腫および腺癌の間の検出および識別で用いられると予測される。CD44は、腫瘍の侵入および転移で役割を演じるように見える細胞接着分子である。代替スプライシングの結果、いくつかの変種イソ形態が発現される。CD44の発現は、一般には、SCLCでは欠けており、NSCLCでは可変的に発現される。高レベルの発現が扁平細胞癌腫で起こり、従って、それを腫瘍タイプの間を識別するにおいて価値あるものとする。非新生物組織においては、CD44染色は気管支上皮細胞、マクロファージ、リンパ球、および肺胞細胞で観察される。特に、過剰発現が初期段階の疾患で起こる場合、CD44発現および腫瘍段階、再発または生存の間に有意な相関は無かった。転移性病巣においては、扁平細胞癌腫の100%および腺癌の75%が強いCD44v6陽性を示した。これらのデータは、CD44発現の変化が腫瘍進行において比較的后期に起こることを示す傾向があり、これは、初期検出マーカーとしてのその価値を制限するであろう。最近の知見は、CD44v8-10変種がNSCLCの大部分によって発現されることを示唆しており、それを可能な候補マーカーとする。

【0154】

サイクリンA [59~62]

サイクリンAは、細胞周期の特定のフェーズにおいて転位点を制御するサイクリン依存性キナーゼ（CDK）の調節サブユニットである。それはS期において、およびG2期への進行の間に検出可能である。サイクリンAの細胞局在は核である。

【0155】

サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼからなるタンパク質複合体は、細胞周期の進行を調節するように機能する。サイクリン発現の変化は、CCDN1遺伝子に影響する遺伝的改変に関連付けられている。サイクリンは調節分子として作用するが、サイクリン依存性キナーゼは、Rbを活性化し、および不活化する触媒サブユニットとして機能する。

【0156】

免疫組織化学分析は、サイクリンの過剰発現が、高いKi-67標識指標によって示される細胞増殖の増加と関連することを明らかにした。サイクリン過剰発現はNSCLCの75%で起こり、腫瘍進行の比較的前期に起こるようである。最近の報告は、段階I/IIの66.7%および段階III腫瘍の70.9%がサイクリンAを過剰発現することを示す。核染色は貧弱に分化した腫瘍で共通する。サイクリンAの発現は、しばしば、平均生存時間の減少、および薬物耐性の発生に対する傾向と関連付けられる。しかしながら、増加した発現もまたドキソルビシンに対するより大きな応答と関連付けられてきた。

【0157】

サイクリンD1 [63~73]

サイクリンAに関するように、サイクリンD1は、細胞周期の特定のフェーズにおいて転位点を制御するサイクリン依存性キナーゼ（CDK）の調節サブユニットである。サイクリンD1は、細胞が細胞周期のS期に入るのを調節する。この遺伝子は頻繁に増幅され、および/またはその発現は広い範囲のヒト悪性疾患で脱調節される。サイクリンD1の細胞局在は核である。

【0158】

サイクリンAのように、サイクリンD1は細胞周期の進行を調節するように機能する。サイクリンD1の染色は圧倒的に細胞質であり、組織学的タイプからは独立している。サイク

リンD1の過剰発現はNSCLCの40～70%およびSCLCの80%で起こることを示唆する報告がある。サイクリンD1の染色は段階Ⅰ腫瘍の37.9%、段階Ⅱ腫瘍60%、および段階Ⅲ腫瘍の57.9%で観察された。サイクリンD1発現は形成異常および過形成組織で観察されており、これは、これらの変化が腫瘍進行の比較的初期で起こるという証拠を提供する。サイクリンD1を過剰発現する患者はより短い平均生存時間およびより低い5年生存率を呈する。

【0159】

肝細胞成長因子受容体 (C-MET) [74～77]

C-METは、HGFについての膜受容体チロシンキナーゼをコードするプロトオンコジーンである。HGFは肝細胞および内皮細胞についてのマイトジェンであり、いくつかの細胞型の上皮起源に対して多面発現性活性を発揮する。C-METの細胞局在化は細胞表面である。

10

【0160】

肝細胞成長因子/散乱因子 (HGF/SF) は広い範囲の上皮細胞を刺激し、上皮細胞を増殖させ、移動させ、脈管形成を含む複雑な分化プログラムを実行させる。HGF/SFはc-MET癌遺伝子によってコードされる受容体に結合する。正常および悪性組織はHGF受容体を発現するが、HGF/SFの発現は悪性組織に制限されているようである。

【0161】

ヒト肺は、一般に低レベルのHGF/SFを発現するが、発現はNSCLCにおいて顕著に増加する。ウエスタンブロット分析を用い、肺癌の88.5%がタンパク質発現の増加を呈した。腫瘍の全ての組織学的タイプは増大した濃度にて前記タンパク質を発現した。増大したレベルのタンパク質が前記疾患の全ての段階で生じるが、最近の証拠は、癌細胞に加えて、間葉細胞および/または炎症細胞が成長因子の生産を担っているらしいことを示唆する。

20

【0162】

ムチン-MUC-1 [78-82]

ムチン-1は、気管支樹、胃腸管および尿生殖器管をコートし、保護する粘性ゲルの主なタンパク質構成要素を含む高度にグリコシル化された分泌タンパク質のファミリーに由来する。ムチン-1は、上皮腫瘍で非典型的に発現される。ムチン-1の細胞局在は細胞質および細胞表面である。

【0163】

ムチンは、膜結合または分泌いずれかである種々の分泌上皮細胞によって合成される高分子量糖タンパク質のファミリーである。呼吸管内では、これらのタンパク質は、その気管支樹を被覆し、保護する粘性ゲルに寄与する。ムチン発現の変化は通常、肺癌を含む悪性形質転換と組み合わせられて起こる。これらの変化は細胞成長調節、免疫系による認識、および腫瘍の転移能力の改変に寄与し得ることを示唆する証拠が存在する。

30

【0164】

正常肺組織はMUC-1を発現するが、かなり高いレベルの発現が、腺癌で最高レベルで起こる肺癌で見い出される。染色は段階とは独立して起こるようであり、以前の喫煙者または非喫煙者におけるよりも喫煙者においてより通常である。いくつかの前悪性病巣は増大したMUC-1発現を呈する。

【0165】

甲状腺転写因子-1 (TTF-1) [83、84]

40

TTF-1は、甲状腺特異的および肺特異的分化遺伝子を活性化させるホメオドメイン転写因子のファミリーに属する。TTF-1の細胞局在は核である。

【0166】

TTF-1は、元来チログロブリンの転写を媒介することが見出されたタンパク質である。最近、TTF-1発現が間脳および気管支肺胞上皮で見出された。肺内では、TTF1は、界面活性剤タンパク質およびクララ分泌タンパク質の合成を調節する転写因子として機能する。TTF-1の過剰発現は大きな割合の肺腺癌で起こり、一次肺癌および肺に転移する癌の間を識別するのに援助することができる。TTF-1を発現し、サイトケラチン7陽性であって、サイトケラチン20陰性である腺癌は95%の感度をもって検出することができる。

【0167】

50

血管内皮成長因子 (VEGF) [33、61、85-89]

VEGFは脈管形成で重要な役割を演じ、これは、腫瘍の進行および転移を促進する。VEGFの複数形態がある；2つのより小さなイソ形態は分泌タンパク質であって、拡散性剤として作用し、他方、より大きな2つは細胞と会合したままである。VEGFの細胞局在は細胞質、細胞表面、および細胞外マトリックスである。

【 0 1 6 8 】

血管内皮成長因子 (VEGF) は、重要な脈管形成因子および内皮細胞特異的マイトジェンである。脈管形成は、癌形成、腫瘍進行の後期段階における重要なプロセスであり、遠隔転移の発生において特に重要である。VEGFは、しばしば、前記成長因子を発現する腫瘍に存在する特異的受容体Flt1に結合し、これは、オートクリンループの存在を示唆する。

10

【 0 1 6 9 】

免疫組織化学分析により、VEGFを発現する細胞は、散漫な細胞質性の染色パターンを呈することが明らかにされている。非新形成細胞によって発現されないが、VEGFはNSCLCの大部分およびSCLCのより小さなパーセンテージで存在する。いくつかの報告は、初期段階の肺癌における高レベルのVEGFを示している。

【 0 1 7 0 】

VEGFの発現は転移の増大した頻度と関連付けられてきた。研究は、VEGF発現が貧弱な予後、および扁平細胞癌腫ではなく腺癌においてより短い病気でない間隔の指標であることを示している。高レベルのVEGFを発現する群における3年および5年生存率は、低いVEGF群の90.9および77.9%と比較して、各々50%および16.7%であった。

20

【 0 1 7 1 】

表皮成長因子受容体 (EGFR) [90-104]

表皮成長因子受容体 (EGFR) は、種々のリガンドに結合し、活性化状態となることができ、膜貫通糖タンパク質である。結合は、DNA合成、細胞増殖、および細胞分化をもたらす一連の事象を開始させる。EGFRは広域スペクトルの正常組織で示されており、EGFR過剰発現は種々の新生物で見出される。増大した発現が肺の腺癌および大細胞癌腫で観察されているが、小細胞肺癌腫では観察されていない。EGFRの細胞局在は細胞表面である。

【 0 1 7 2 】

EGFRは、細胞の成長および分化で重要な役割を演じる。EGFRは基底細胞層に均一に存在するが、組織学的に正常な気管支上皮の表層には多くは存在しない。これを例外として、正常組織の一致する染色は無い。最近の証拠は、EGF受容体の過剰発現は、侵入性肺癌の発生についての絶対的要件ではないであろうことを示唆する。しかしながら、EGFR過剰発現が起こる場合には、それはより進んだ疾患におけるより大きな染色強度を伴う比較的初期の事象であるようである。

30

【 0 1 7 3 】

侵入性癌腫を持つ患者では、腫瘍の50～77%はEGFについて染色される。EGFRの過剰発現は腺癌におけるよりも扁平細胞癌腫でより普通であり、SCLCでは普通である。高レベルのEGFRが、段階I/II腫瘍で観察されたもののほぼ2倍のEGFR濃度を有する後期段階および転移性疾患と一緒に起こる。見積もりは、段階I腫瘍で観察されたEGFRのレベルが正常組織で観察されたもののほぼ2倍であることを示唆する。加えて、気管支病巣の48%が、化生、異型性、形成異常およびCISを含むEGFR染色を示す。これらの同一癌患者の「正常」気管支粘膜においては、EGFRの過剰発現は症例の39%で観察されたが、非癌の気管支上皮では存在しなかった。加えて、EGFRの過剰発現は、特に、扁平細胞癌腫の場合に、非喫煙者におけるよりも喫煙者の腫瘍でよりしばしば起こる。

40

【 0 1 7 4 】

いくつかの研究が、EGFRの過剰発現は貧弱な予後と関係することを示唆しているが、他の研究はこの相関をなさなかった。

【 0 1 7 5 】

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ /nm23 [105～111]

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (NDPキナーゼ) /nm23はヌクレオシド二リン酸キナーゼ

50

である。高い転移能力を持つ腫瘍細胞は、しばしば、nm23タンパク質を欠如するか、または少量のnm23タンパク質を発現するに過ぎない。よって、nm23タンパク質は転移サプレッサータンパク質として記載されてきた。nm23の細胞局在は核および細胞質である。

【0176】

nm23/ヌクレオシド二リン酸/キナーゼA (nm23) の発現は腫瘍進行のマーカーであり、発現および転移能力の間には逆の関係がある。段階I腫瘍がnm23を過剰発現する場合、35ヶ月の平均フォローアップ期間の間に転移の証拠は見られなかった。免疫組織化学分析により、散漫な細胞質性の、一般に悪性細胞に制限される染色が明らかにされている。肺胞マクロファージもまた前記タンパク質を発現する。高レベルの発現が低い転移能力に関連すると仮定すれば、なぜ正常上皮細胞がnm23を発現しないかに関する説明は現在ない。

10

【0177】

NSCLC、特に大細胞肺癌の高いパーセンテージおよびSCLCの74%で強い染色が観察されており、これはこのタンパク質が腫瘍進行において重要な役割を演じることを示唆している。扁平細胞癌腫を例外とし、染色強度は段階に伴って増加する傾向がある。利用可能な証拠に基づき、nm23はSCLCおよびNSCLC双方において予後因子であるらしい。

【0178】

Bcl-2 [101、112~125]

Bcl-2は、アポトーシスの阻害において中心的役割を演じるミトコンドリア膜タンパク質である。bcl-2の過剰発現は、プログラム細胞死が阻止された細胞の共通の特徴である。Bcl-2の細胞局在は細胞表面である。

20

【0179】

Bcl-2は、細胞の最後の分化を促進し、非周期細胞の生存を延長し、周期細胞においてアポトーシスをブロックする役割を演じると考えられるプロトオンコジーンである。Bcl-2はホモダイマーとして存在することができるか、あるいはBaxとヘテロダイマーを形成することができる。ホモダイマーとしては、Baxはアポトーシスを誘導するように機能する。しかしながら、Bax-bcl-2複合体の形成はアポトーシスをブロックする。アポトーシスをブロックすることによって、bcl-2発現は、冒された細胞に生存の利点を付与するようである。Bcl-2発現は薬物体制の発生において役割を演じることもある。bcl-2の発現はp53によって負に調節される。

【0180】

30

bcl-2の免疫組織化学分析は、細胞質染色の不均一パターンを明らかにしている。腺癌においては、bcl-2の発現はより小さな腫瘍 (< 2cm) およびより低い増殖活性と有意に関連付けられた。bcl-2の発現は、神経内分泌分化とより密接に関連しているようであり、SCLCの大きなパーセンテージで起こる。

【0181】

bcl-2の過剰発現はプレ新形成病巣には存在せず、これは、bcl-2の変化が腫瘍進行において比較的后期で起こることを示唆する。腫瘍細胞に加え、bcl-2免疫染色は基底細胞中、および正常細気管支の管腔表面でも起こるが、一般には、より分化した細胞型では検出されない。

【0182】

40

bcl-2免疫反応性とNSCLCにおける改良された予後との関係には論争がある。いくつかの報告は、bcl-2を発現する腫瘍を持つ患者は優れた予後および再発するまでにより長い時間を有することを示唆した。いくつかの報告は、bcl-2発現が、転移性疾患を発症した患者においてより低い傾向があることを示す。扁平細胞癌腫を持つ患者では、bcl-2の発現が5年生存率の改善にリンクされている。しかしながら、3つの比較的大きな研究では、特に、初期段階の疾患を持つ患者では、bcl-2発現にリンクされた生存利点はなかった。

【0183】

エストロゲン受容体関連タンパク質 (p29) [126]

ER関連タンパク質p29は、エストロゲン-受容体の発現と相関することが判明しているエストロゲン関連熱ショックタンパク質である。p29の細胞局在は細胞質である。

50

【0184】

エストロゲン依存性細胞内プロセスは正常組織の成長調節で重要であり、悪性疾患の調節で役割を演じる。1つの研究において、p29の発現は111の肺癌の内109(98%)で検出された。p29発現および生存時間の関係は男性および女性で異なった。p29の発現は、特に、段階IおよびII疾患を持つ女性でより貧弱な生存と関連付けられた。男性では、p29発現と長期生存との間には相関はなかった。

【0185】

網膜芽腫遺伝子産物(Rb) [68、73、123、127~141]

網膜芽腫遺伝子産物(Rb)は核DNA結合リントタンパク質である。リン酸化Rb下では、DNA腫瘍ウイルスの癌タンパク質および遺伝子調節タンパク質に結合し、従って、DNA複製を抑制する。Rbタンパク質は転写を調節することによって作用することができ；Rb機能の喪失は未制御細胞増殖に至る。Rbの細胞局在は核である。

10

【0186】

網膜芽腫タンパク質(pRb)は、網膜芽腫遺伝子によってコードされ、細胞周期依存的にリン酸化および脱リン酸化されるタンパク質である。pRbは、G0/G1において細胞周期を調節するように機能する重要な腫瘍抑制遺伝子と考えられる。その低リン酸化状態では、pRbはG1からSへの転移を阻害する。G1の間には、pRbの成長抑制的特性の不活化が、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)が前記タンパク質をリン酸化する場合に起こる。pRbの過剰リン酸化は、それが、DNA合成に必要な転写因子タンパク質として機能するE2Fと複合体を形成するのを妨げる。

20

【0187】

網膜芽腫(Rb)遺伝子の不活化は、肺癌を含む種々のタイプの癌で記載されてきた。小細胞癌腫はpRbにつき染色されず、これはRbの機能の喪失を示す。総じて、腫瘍の17.6%がpRbを発現せず、段階または結節性状態に関して相関は見られない。染色の低下は31%の形成異常気管支パイオプシーで観察された。しかしながら、pRb発現と形成異常の酷さとの間には相関はないようである。対照的に正常気管支上皮および腫瘍に隣接する領域から採取した細胞は腫瘍にpRb陽性核を発現した。これらのデータは、Rbタンパク質の過剰発現の改変が、いくつかの肺癌の発生において初期に起こり得ることを示唆する。

【0188】

Rb-陽性癌腫を持つ患者は幾分良好な予後を有する傾向があるが、ほとんどの研究においては、差は有意ではない。しかしながら、その腫瘍がpRb陰性であって、p53またはRAS陽性いずれかである腺癌を持つ患者は5年生存率の減少を呈する。同様の関係は扁平細胞癌腫では起こらない。pRb陰性腫瘍は、Rb-陽性癌腫よりもドキソルビシンに対する耐性を呈するようであると報告されている。

30

【0189】

トロンボモジュリン [142~147]

トロンボモジュリンは膜貫通糖タンパク質である。(プロテインSおよびトロンピンを結合することによって抗凝固剤として働く)プロテインCの加速された活性化を通じて、TMの合成は、内皮細胞の表面での血餅で形成を低下させるにおいて重要ないくつかのメカニズムの1つである。トロンボモジュリンの細胞局在は細胞表面である。

40

【0190】

循環腫瘍細胞による宿主血小板の凝集は、転移プロセスにおいて重要な役割を演じるようである。トロンボモジュリンは、トロンピンによる抗凝固剤プロテインCの活性化において重要な役割を演じ、血管内凝固の重要なモジュレーターである。正常扁平上皮におけるこの発現に加え、トロンボモジュリンの発現は扁平化生、インサイチューでの癌腫、および侵入性扁平細胞癌腫で起こる。一次扁平細胞癌腫の74%で存在するが、転移性病巣の44%がトロンボモジュリンで染色されるに過ぎない。これらのデータは、進行に伴い、トロンボモジュリン発現の低下があることを示唆する。高レベルの発現は、貧弱に分化した腫瘍と比較して、十分に分化した、および中程度に分化した腫瘍で起こる傾向がある。

【0191】

50

トロンボモジュリン陰性扁平細胞癌腫を持つ患者はより悪い予後を有する傾向がある。トロンボモジュリン陰性を持つ患者の5年生存率は、腫瘍がタンパク質につき陽性に染色された場合の60%と比較して18%である。転移性疾患への進行はトロンボモジュリン陰性腫瘍よりも普通であり(69%対37%)、これらの腫瘍が胸外部位で発生するより大きな傾向があった。従って、トロンボモジュリン発現の喪失は扁平細胞癌腫の場合の予後であるようである。トロンボモジュリン発現の変化はNSCLCの後期段階で起こり、前記タンパク質は正常気管支上皮細胞によって発現されるという観察は、初期検出用のマーカーとしてその利用性を制限する傾向があるであろう。しかしながら、中皮腫の大部分および小さなパーセンテージの腺癌のみはトロンボモジュリンを発現するので、前記マーカーはこれらの2つの腫瘍タイプの間を識別する潜在的利用性を有する。

10

【0192】

E-カドヘリンおよびN-カドヘリン [148-151]

E-カドヘリンは膜貫通Ca²⁺依存性細胞接着分子である。それは、組織構造の制御および組織一体性の維持のメカニズムを介して細胞の成長および発生において重要な役割を演じる。E-カドヘリンは上皮細胞の細胞間接着、上皮分極の確立、腺分化、および層化に寄与する。E-カドヘリン発現の下方調節は多数の癌腫で観察されており、通常、進んだ段階および進行に関連付けられる。E-カドヘリンの細胞局在は細胞表面である。

【0193】

E-カドヘリンはカルシウム依存性上皮細胞接着分子である。E-カドヘリン発現の減少は、腫瘍脱分化および転移、および生存率低下と関連付けられてきた。低下した発現は中程度に、および貧弱に分化した扁平細胞癌腫、およびSCLCで観察されてきた。腺癌においてE-カドヘリン発現の変化はなかった。さらに、腺癌はE-カドヘリンを発現するが、これらの腫瘍は、E-カドヘリンではなくN-カドヘリンを発現する中皮腫とは対照的なN-カドヘリンを発現しない。従って、これらのマーカーを用いて腺癌および中皮腫の間を識別することができる。

20

【0194】

E-カドヘリンの発現を用いて、扁平細胞癌腫を持つ患者の予後を評価することもできる。E-カドヘリンを発現する腫瘍を持つ患者の60%は3年生存したが、発現の低下を呈する患者の30%のみが3年生存した。

【0195】

MAGE-1およびMAGE-3 [152~156]

メラノーマ抗原-1(MAGE-1)およびメラノーマ抗原-3(MAGE-3)は、正常組織では通常はサイレントであるが、悪性新生物で発現した場合は、自己腫瘍に向けられかつ特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)によって認識される遺伝子のファミリーのメンバーである。MAGE-1およびMAGE-3の細胞局在は細胞質である。

30

【0196】

MAGE-1、MAGE-3およびMAGE4遺伝子産物は、細胞傷害性Tリンパ球によって認識される腫瘍関連抗原である。それ自体、それらはNSCLCにおいて免疫療法についての標的としての利用性を有する。また、MAGEタンパク質はいくつかのSCLCによって発現されるが、正常な細胞によっては発現されない。MAGE発現の頻度は検出マーカーとして用いるのに必要なレベル未満である場合、組織学的タイプの間の発現のパターンの差は、MAGE発現が分化マーカーとしての利用性を有することができることを示唆する。また、この利用性は、扁平細胞癌腫の50%において、90%を超える腫瘍細胞が、細胞の少なくとも50%において過剰発現を呈する腫瘍に対して30%のMAGE-3過剰発現の証拠を示したという観察によっても支持される。

40

【0197】

核小体タンパク質(p120) [157]

p120(増殖関連核小体抗原)は、初期G1期の間に迅速に増殖する核小体の細胞で見出される。p120の細胞局在は核である。

【0198】

50

核小体タンパク質p120は、その機能が未だ解明されていない増殖関連タンパク質である。強い染色が腫瘍組織で検出されたが、マクロファージまたは正常組織では検出されていない。p120の過剰発現は、このマーカーが腫瘍タイプの間を識別するにおいて利用性を有し得るという確率を上昇させる腺癌または大細胞癌腫よりも扁平細胞癌腫でより普通であった。

【 0 1 9 9 】

肺界面活性剤 [83、158 ~ 166]

肺界面活性剤は、肺胞-液体界面の表面張力を低下させるように機能するリン脂質が豊富な混合物であり、排気に必要な肺胞安定性を提供する。界面活性剤タンパク質は気道で専ら発現されるようであり、肺胞タイプII細胞によって生産される。非新形成肺においては、プロ界面活性剤-B免疫反応性は、正常および過形成肺胞IIタイプおよびいくつかの非線毛を持つ細気管支上皮細胞で検出される。腺癌の60%は、症例の大部分の染色を呈する腫瘍細胞の10 ~ 50%との強い細胞質免疫反応性を含んだ。扁平細胞癌腫および大細胞癌腫は、プロ界面活性剤-Bにつき染色しなかった。

10

【 0 2 0 0 】

界面活性剤アポプロテインB (SP-B) は、タイプII肺胞細胞によって分泌されるリン脂質およびタンパク質複合体である肺界面活性剤を形成する4つの疎水性タンパク質のうちの1つである。肺の扁平細胞および大細胞癌腫、および非肺腺癌はSP-Bを発現しない。SP-Bの細胞局在は細胞質である。

【 0 2 0 1 】

SP-Aは、呼吸の最後において崩壊することから肺胞を守る本質的役割を演じる肺界面活性剤タンパク質である。SP-Aは肺の肺胞上皮細胞 (タイプIIの肺細胞) のユニークな分化マーカーであり ; 抗原は新形成状態においてさえ維持される。SP-Aの細胞局在は細胞質である。

20

【 0 2 0 2 】

肺界面活性剤Aは、ムチンのタイプと比較して、100%染色を持つ非ムチン細気管支-肺胞癌腫につき特異的なように見える。肺界面活性剤は、潜在的に、肺に転移した他の癌から肺癌を識別するにおいて利用性を有する。腫瘍細胞に加え、非新形成肺細胞は肺界面活性剤Aについても染色する。肺界面活性剤Bに関しては、肺界面活性剤Aについての染色は、腺癌では比較的普通であるが、NSCLCまたはSCLCの他の形態においてはそうではない。また、中皮腫は肺界面活性剤Aを発現せず、肺界面活性剤Aは腺癌および中皮腫の間の識別において利用性を有することができるという示唆に導く。

30

【 0 2 0 3 】

Ki-67

Ki-67は、正常および新形成細胞の増殖において発現される核タンパク質であって、静止細胞では下方調節される。それは、細胞周期のG1、S、G2およびM期に存在するが、G0期には存在しない。通常、増殖のマーカーとして用いられる。Ki-67の細胞局在は核である。

【 0 2 0 4 】

(表 5)

40

マーカー	扁平細胞癌腫	腺癌	大細胞癌腫	小細胞癌腫	中皮腫
Glut1	100.0*	64.5	80.5	64.0	NDA*
Glut3	17.5	16.0	39.5	9.0	NDA*
HERA	100.0	100.0	100.0	NDA	4.5
塩基性FGF	83.0	48.7	50.0	100.0	NDA
テロメラーゼ	82.3	86.3	93.0	66.7	NDA
PCNA	80.0	69.8	87.7	51.0	NDA
CD44v6	79.3	34.8	44.2	0.0	NDA
サイクリンA	79.0	68.0	83.5	97.0	NDA
サイクリンD1	42.7	36.0	62.0	90.0	NDA
肝細胞増殖因子/ 散乱因子	75.5	78.3	100.0	NDA	100.0
MUC-1	55.5	90.0	100.0	100	NDA
TTF-1	38.0	76.0	NDA	83.0	NDA
VEGF	61.8	68.3	100.0	43.5	NDA
EGF 受容体	63.1	45.3	96.0	頻繁	NDA
nm23	68.0	52.6	83.5	73.5	NDA
Bcl-2	45.5	43.3	42.5	92.0	NDA
pRb 発現の喪失	20.1	25.8	35.4	85.3	NDA
トロンプモジュリン	66.8	12.2	4.0	0.0	81.0
E-カドヘリン	69.0	85.0	NDA	100.0	0.0
N-カドヘリン	NDA	4.0	NDA	NDA	94.0
MAGE 1	45.0	35.0	NDA	16.5	NDA
MAGE 3	72.0	33.3	NDA	33.5	NDA
MAGE 4	45.5	11.0	NDA	50.0	NDA
核小体タンパク質 (p120)	68.0	35.0	30.0	NDA	NDA
肺界面活性剤 B	0.0	61.5	0.0	NDA	NDA
肺界面活性剤 A	12.0	52.9	17.5	20	0.0

10

20

30

40

50

* マーカー発現の変化を呈する腫瘍のパーセント

* 利用可能なデータ無し

【 0 2 0 5 】

a. 適当なサイズのマーカーのライブラリーを取得

肺癌に相関するマーカーの適当なサイズのライブラリーを得るには、予備的除去工程が必要であった。肺癌に相関する100より多くのマーカーが文献で知られている。文献で確認され、パネルテストにおいて潜在的包含につき評価された候補プローブの部分的リストはbax、Bcl-2、c-MET (HGFr)、CD44S、CD44v4、CD44v5、CD44v6、cdk2キナーゼ、CEA (カルシノ-胚抗原)、サイクリンA、サイクリンD1、E-カドヘリン、EGFR、ER関連 (p29)、erbB-1、erbB-2、FGF-2 (bFGF)、FOS、Glut-1、Glut-2、Glut-3、Glut-4、Glut-5、HERA (MOC-31)、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-51、インテグリンVLA2、インテグリンVLA3、インテグリンVLA6、JUN、ケラチン、ケラチン7、ケラチン8、ケラチン10、ケラチン13、ケラチン14、ケラチン16、ケラチン17、ケラチン18、ケラチン19、A-タイブラミン (A; C)、B-タイブラミン (B1; B2)、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-4、メラノーマ関連抗原クロンNK1/C3、mdm2、mib-1 (Ki-67)、ムチン1 (MUC-1)、ムチン2 (MUC-2)、ムチン3 (MUC-3)、ムチン4 (MUC-4)、MYC、N-カドヘリン、NCAM (神経細胞接着分子)、nm23、p16、p21、p27、p53、p120、P-カドヘリン、PCNA、網膜目腫、SP-A、SP-B、テロメラーゼ、トロンプモジュリン、甲状腺転写因子1、VEGF、ビメンチン、およびwaf1に対する抗体を含む。マーカーの初期リストは、最初に、文献から初期癌細胞の検出におけるプローブの見かけの有効性を評価し、異なる癌状態の細胞間を区別し、標識を標的癌細胞に局所化することによって余分な部分を除いた。マーカーのこのリストは、さらに、生産するのがまたは得るのが困難なためにその利用を実践するのが困難で、不適切な検出技術要件または報告された結果の貧弱な再現性を有するマーカーを除去することによって余分なものを除いた。余分なものを除く工程の全てが完了した後、27のマーカーのライブラリーを

得た。

【0206】

b. プロトコルの最適化および黄金標準肺癌試料の入手

また、パネルを得るに先立って、予備的調製工程が必要であった。適当な標識を含むプローブは商業的販売業者から入手可能であった。プローブのプロトコルは、最適な目的定量検出につき分析した。例えば、PCNAの濃度が余りにも低かったと判断された。始めにPCNAはS809緩衝液中に1:4000希釈した。第二の希釈をなし、これはS809中に1:3200であった。各マーカーについての最適なプロトコルは以下に示す。第二の欄は「抗体の名称」と記したことに注意されたい。販売業者の多くはマーカーの名称によって抗体を呼ぶため、このリスト中のプローブは、MOC-31を除き、マーカーの名称によって列挙されている。別の方法では、これらの試薬を列挙する別の方法は、例えば、抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗CD44v6などである。

10

【0207】

黄金標準組織検体はUCLAから得た。組織検体は2つの供給源から受領した。症例は、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色スライドおよび臨床履歴のレビューを含む標準的手法を用いて診断した。検体スライドを冷却し、任意の数で標識して、実験病理学者を履歴診断および抗体マーカーにつき盲検とし、患者の秘密を保護した。

【0208】

癌性および非癌性（対照）組織からの組織切片を含む検体スライドを用いた。合計175の別々の症例を分析した。この組内で、表6に掲げた以下の診断が以下の頻度で存在していた。

20

【0209】

（表6）

	診断	発生の数
癌	腺癌	25
	大細胞癌腫	18
	中皮腫	26
	小細胞肺癌	20
	扁平細胞癌腫	24
対照	気腫	34
	肉芽腫性疾患	3
	間質性肺疾患	25

30

【0210】

c. 分子マーカーのパネルの発現のレベルの測定

十分な検体スライドを、スライド当たり1つのプローブのみがテストされるように各症例につき調製した。全体として、特定の分子マーカーにおいて方向づけられる一つまたは複数の標識プローブと接触させた細胞学的試料を含む顕微鏡スライドを調製する。独立して、各実験病理学者はH&E染色スライドを調べて、各症例につき診断をなし、次いで、各プローブ反応および免疫化学染色スライドを調べて、プローブ結合のレベルを評価し、標準化されたデータフォームについての結果を記録した。

40

【0211】

より詳細には、免疫組織化学染色をホルマリン固定したパラフィン包埋（FFPE）組織で行った。組織切片をポリ-L-リシン被覆スライド上で4ミクロンの厚みに切断し、室温にて一晩乾燥した。組織切片の脱パラフィン化および再水和を以下のように行った。検体から包埋媒体の全てを完全に除去するために、スライドを、各々、5分間、2つの連続したキシレン-置換（Histoclear）浴中でインキュベートした。100%試薬グレードのアルコールの2つの連続浴中での各々3分間のインキュベーションの前に、全ての液体をスライドからタッピングして除いた。95%試薬グレードのアルコールの2つの最終浴中での各々3分間のイ

50

ンキュベーションの前に、一旦、全ての過剰な液体をスライドからタッピングして除いた。95%の最後の浴の後、スライドを水道水中で濯ぎ、洗浄緩衝液（DAKO自動染色器洗浄緩衝液、コードS3306の1:10希釈に対応する、0.05% Tween 20を含有するトリス-緩衝化生理食塩水洗浄緩衝液）中に保持した。以下の表7は、対応する製品コード番号と共にこの実験で用いた試薬の完全なリストを示す。実験で用いた検出システムはDAKO EnVision+ HRPマウス（コードK4007）またはウサギ（コードK4003）およびLSAB+ HRP（コードK0690）であった。免疫アッセイはパッケージに挿入されていたプロトコルに従った。前記キットは液体の2つの成分DAB+ 基質色原体（コードK3468）を含んだ。

【0212】

（表7）

実験で用いた試薬	
試薬	コード番号
National Diagnostics HistoClear	HS-200
Mallinckrodt 試薬無水アルコール	7019-10
DAKO 抗体希釈剤	S809
DAKO バックグラウンド減少抗体希釈剤	S3022
DAKO 自動染色器緩衝液 10X	S3306
DAKO 標的検索溶液	S1700
DAKO Hi pH 標的検索溶液	S3307
DAKO プロテイナーゼK	S3020
Rite Aid 過酸化水素 3%	なし
DAKO タンパク質ブロック無血清	X0909
DAKO ヤギ血清	X0501
DAKO ブタ血清	X0901
DAKO EnVision+ マウス	K4007
DAKO EnVision+ ウサギ	K4003
DAKO LSAB+	K0690
DAKO DAB+	K3468
DAKO ヘマトキシリン	S3302
Dakomount 封入剤	S3025
機器	シリアル番号
DAKO 自動染色器	3400-6613-03
	3400-6142R-03
自動染色器IHCソフトウェアバージョン V3.0.2	

【0213】

予備処理は肺組織でのこれらの抗体を最適化するにおいて重要であった。酵素消化を必要とする抗体では、DAKOプロテイナーゼK（コードS3020）を室温にて5分間用いた。熱誘導標的検索を必要とする抗体には、DAKO標的検索溶液（コードS1700）またはDAKO高pH標的検索溶液（コードS3307）いずれかをを用いる予備処理を受けさせた。組織を予熱した標的検索溶液に入れ、特異的プロトコルに応じて、95℃の水浴中で20分または40分インキュベートした。次いで、組織切片を室温にてさらに20分間冷却した。

【0214】

脱パラフィン化、再水和および組織予備処理の後、全ての検体を3%過酸化水素の溶液中でインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性をクエンチした。ブロッキング試薬を2つの抗体FGFおよびテロメラゼにつき特異的に用いて、非特異的バックグラウンドを最小化した。

【0215】

以下の表8に示すように、組織検体を、200マイクロリットルの最適に希釈した一次抗体と共に特定の時間インキュベートした。表8におけるマーカー/抗体のナンバリングは、本

10

20

30

40

50

明細書を通じて抗体プローブおよびマーカーのナンバリングと合致していることに留意されたい。次いで、スライドをDAKO1×自動染色器緩衝液（コードS3306）中で洗浄した。抗体に依り、正しい検出システムを適用した。DAKO EnVision+ HRPおよびLSAB+ HRP検出システムについての工程および合計インキュベーション時間を以下の表9に示す。3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）を用いて発色反応を起こし、その結果、反応部位において褐色沈殿を得た。

【0216】

（表8）

肺パネル用の抗体									
以下のものに対する抗体									
#	マーカー	予備処理	ブロック	希釈	一次インキュベーション	検出システム	クローン	販売業者	コード番号
1	VEGF	Hi pH TRS 20分 S3307	無し	S809 中 1:15	30分	EnV+マウス	JH121	NeoMarkers	MS-350-P
2	トロンボモジュリン	無し	無し	S809 中 1:100	30分	EnV+マウス	1009	DAKO	M0617
3	CD44v6	TRS 20分 S1700	無し	RTU	30分	EnV+マウス	VFF-7	NeoMarkers	MS-1093-R7
4	SP-A	無し	無し	S809 中 1:200	30分	EnV+マウス	PE10	DAKO	M4501
5	網膜芽腫	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:25	30分	EnV+マウス	Rb1	DAKO	M7131
6	E-カドヘリン	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:100	30分	EnV+マウス	NCH-38	DAKO	M3612
7	サイクリンA	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:25	30分	EnV+マウス	6E6	Novocastra	NCL 117205
8	nm23	Hi pH TRS 20分 S3307	無し	S809 中 1:50	30分	EnV+ウサギ	ポリクローナル	DAKO	A0096
9	グロメララーゼ	TRS 20分 S1700	Prot Block X0909, 30分	S809 中 1:400	一晩	EnV+ウサギ	ポリクローナル	Alpina Diagnostic	EST21-A
			w/5% ヤギ血清 X0501						
10	KI-67	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:200	30分	EnV+マウス	IVAK-2	DAKO	M7240
11	サイクリンD1	Hi pH TRS 20分 S3307	無し	S3022 中 1:200	30分	EnV+マウス	DCS-6	DAKO	M7155
12	PCNA 希釈1	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:4000	30分	EnV+マウス	PC10	DAKO	M0879
13	MAGE-1	Hi pH TRS 20分 S3307	無し	S809 中 1:250	30分	EnV+マウス	MA454	NeoMarkers	MS 1067
14	ムチン1	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:40	30分	EnV+マウス	VU4H5	Santa Cruz Biotech	Sc-7313
15	SP-B	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:100	30分	EnV+マウス	SPB02	NeoMarkers	MS-1300-P1
16	HERA	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:50	30分	EnV+マウス	MOC-31	DAKO	M3525
17	FGF-2	無し	Prot Block X0909, 30分	S809 中 1:50	一晩	EnV+マウス	bFM-2	Upstate Biotech	#05-118
			w/5% ブタ血清 X0901						
18	C-Met	不完全	無し	不完全	不完全	EnV+マウス	8F11	Novocastra	118406
19	TTF-1	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:25	30分	EnV+マウス	8G7G3/1	DAKO	M3575
20	Bcl-2	Hi pH TRS 20分 S3307	無し	S809 中 1:75	30分	EnV+マウス	124	DAKO	M0687
21	p120	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:10	30分	EnV+マウス	FB-2	Biogenex	MU196-UC
22	N-カドヘリン	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:75	30分	EnV+マウス	8G4 & 8G11	DAKO	N/A
23	EGFR	Prot K 1:25 5分間	無し	S809 中 1:1500	30分	EnV+マウス	3-18C9	DAKO	K1492
24	Glut 1	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:200	30分	LSAB+	ポリクローナル	Santa Cruz Biotech	SC 1805
25	ER 関連 (p29)	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:200	30分	EnV+マウス	G3.1	Biogenex	MU171-UC
26	Mage 3	TRS 40分 S1700	無し	S809 中 1:20	30分	EnV+マウス	57B	G. Spagnoli	N/A
27	Glut 3	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:80	30分	LSAB+	ポリクローナル	Santa Cruz Biotech	SC 7581
28	PCNA 希釈2	TRS 20分 S1700	無し	S809 中 1:3200	30分	EnV+マウス	PC10	DAKO	M0879

10

20

【0217】

（表9）

実験で用いた検出システム				
工程				
1	脱パラフィン化および再水和			
	各々 5 分間の Histoclear の 2 浴			
	100% アルコールの各々 3 分間の 2 浴			
	95% アルコールの各々 3 分間の 2 浴			
	水洗			
2	予備処理			
	TRS 40 分間または 20 分間			
	高 pH TRS 20 分			
	5 分間のプロテイナーゼ K			
	水洗			
3	ペルオキシダーゼブロック			
	5 分間のペルオキシンド浴			
	水洗			
	5 分間の緩衝液			
	H2O2 ブロック後の 30 分間のタンパク質ブロック			
4	一次 Ab			
	室温で 30 分間または一晩			
5	検出システム			
	EnV+ システム	標識ポリマー	または LSAB+ システム	二次試薬
		30 分		15 分二次 Ab リンク
				三次試薬
				15 分間の SA-HRP
6	色原体			
		色原体		色原体
		10 分間の DAB+		5 分間の DAB+

10

20

30

40

50

【 0 2 1 8 】

免疫染色に続き、全てのスライドを DAKO ヘマトキシリン（コード S3302）中で 3 分間インキュベートし、DAKO Mount 設置媒体（S3025）を用いてカバースライドを準備した。全てのプロトコルは、IHC ソフトウェアバージョン 3.0.2 を用いて DAKO 自動染色器（シリーズ番号 3400-6612-03 & 3400-6142R-03）で行った。

【 0 2 1 9 】

光学顕微鏡下で免疫染色を観察して、対照が正しく染色され、組織が無傷であることを判断した。スライドを標識し、箱にいれ、結果の解釈について指名された病理学者に送った。訓練された病理学者が試料中に見える癌または他の病巣のタイプを同定した。染色細胞の染色密度および割合を見積もることによって、訓練された病理学者がマーカープローブに対する感度を評価した。これらのスコアをその患者についてのデータシートに入力した。病理学者は元の診断および免疫染色で用いた抗体マーカーを知らなかった。各スライドは少なくとも 2 人の病理学者によって読まれ、結果はデータ収集フォームに記録した。プロセスに対するさらなる完全性を提供するために、本方法を第二または第三の病理学者で反復した。次いで、得られたスコアをマッチさせて、データエントリーエラーを同定することができる。さらなるデータは良好なクラシファイアー設計を促進する。

【 0 2 2 0 】

各症例では、27 までのスライドを分析し、マーカーにつき染色した各々は数字 1 ~ 17、19 ~ 28 で暗号化した。マーカー 18（C-MET）についての染色は最適化できず、従ってマーカー / プローブは用いなかった。病理学者 1 は全ての 175 の症例からのスライドをスコア取りした。病理学者 2 は症例の 99 からのスライドをスコア取りした。病理学者 3 は症例の 80 からのスライドをスコア取りした。

【 0 2 2 1 】

以下の表 10 は、各診断のどれくらい多くの症例を各病理学者が以下からのスライドをスコア取りしたかを示す。

【 0 2 2 2 】

(表 10)

	診断	病理学者 1	病理学者 2	病理学者 3
癌	腺癌	25	12	14
	大細胞癌腫	18	9	9
	中皮腫	26	14	8
	小細胞肺癌	20	12	6
	扁平細胞癌腫	24	13	11
対照	気腫	34	23	13
	肉芽腫性疾患	3	3	2
	間質性肺疾患	25	13	17

10

【0223】

いくつかの選択された統計学的分析技術ために、存在する全ての27のスライドについてのスコアを有する症例のみを考慮する必要があった。以下の表11は、各診断のどれくらい多くの症例が全ての27のスライドからのスコアを有する点で完全であったかを示す。

【0224】

(表 11)

	診断	病理学者 1	病理学者 2	病理学者 3
癌	腺癌	14	10	8
	大細胞癌腫	12	9	3
	中皮腫	17	13	3
	小細胞肺癌	7	9	1
	扁平細胞癌腫	12	13	4
対照	気腫	32	21	1
	肉芽腫性疾患	2	1	0
	間質性肺疾患	23	7	3

20

30

【0225】

この表から、各病理学者が以下の合計数の完全な症例をスコア取りしたのを計算することができる。病理学者1は症例119についての全ての27のスライドをスコア取りした。病理学者2は症例の83についての全ての27のスライドをスコア取りした。病理学者3は症例の23についての全ての27のスライドをスコア取りした。

【0226】

癌データポイントの合計数は172である。これは病理学者1からの113のデータポイントおよび病理学者2からの60のデータポイントを含む。対照データポイントの合計数は101である。これは病理学者1からの62のデータポイントおよび病理学者2からの39のデータポイントを含む。

40

【0227】

図3は、対照組織における、および癌性組織におけるプローブ7および15についてのHスコア間の比較を示す。x軸はHスコアを示し、y軸はその特定のHスコアを持つ症例のパーセントを示す。Hスコアの差は明らかである。

【0228】

各患者につき、診断、染色細胞の割合、および染色密度と共に患者アイデンティファイアーを示すデータベースにスコアを統合する病理学レビューフォームにスコアを電子的に入力した。割合および密度は、強度を：無し = 0、弱い = 1、中程度 = 2、強い = 3として、およびパーセンテージ細胞を0 ~ 5% = 0、6 ~ 25% = 1、26 ~ 50% = 2、51 ~ 75% = 3、>75% = 4としてグレード分けし、次いで、2つのグレードを一緒に掛け合わせるによって単

50

一の「Hスコア」に統合した。例えば、50%弱く染色 + 50%中程度に染色はスコア $10 = 2 \times 2 + 2 \times 3$ となろう。これは、交互スコアリングシステムを調査する「他の（非Hスコア）目的スコアリングパラメーターを用いる効果」と題された以下のセクション3(f)を除いて、分析を通じて標準的なスコアリングシステムである。

【0229】

標準分類手法を用いて、プローブの最良組合わせを見出した。典型的には、これらは「分岐および結合アルゴリズム」のようなサーチ手法を用いて、最良な特徴のヒエラルキーを見出し、識別パワーのテストに従ってランク付けし、有意性のテストに従って一部を省略した。このプロセスは、最良分類についての決定規則または複数規則を定義する。

【0230】

これらの特徴にて設計されたクラシファイアーの性能は、クラシファイアーを設計するのに用いたデータから見積もることができる。クラシファイアーへの設計データへの全ての直接的適用により、性能の非常に根拠の薄弱な見積もりを与える。

【0231】

本実施例で収集されたデータの解析は、最良のクラスの分離を提供したプローブの最適な選択を提供する。従って、解析を実行するのにほんの少数のプローブを必要とするパネルが得られた。従って、データは、最適に近い性能がプローブの他の組合せで得られるであろうことを示した。よって、本発明は、コストまたは供給の問題が最良の組合せを可能にしないであろう場合にプローブの利用性に適合できる点で柔軟である。いくつかの症例において、本発明は利用可能な特徴に単に適用して、代替的組合せを見出すことができる。他の症例においては、アルゴリズムを用いて、選択プロセスに含ませるべきコスト重み付けを可能とする特徴を選択して、低いコスト解決に到達することができる。

【0232】

データ収集および分析実験の設計を選択して、データ収集およびデータ解析が独立して行われない場合に、十分に確立された二重盲検手法を介して偏りを回避した。

【0233】

第一の症例において、病理学者は、診断をなすのを可能とする慣用的染色でスライドをレビューした。この診断を病理学レビューフォームに入力した。次いで、染色された細胞のパーセンテージおよび染色の相対的強度のスコア取りをするために、病理学者に、マーカープローブによって染色されたスライドをランダムに提示した。スライドは、病理学者からのプローブについての情報を含むように番号付けした。データの一体性をチェックするために、2人の病理学者が全ての患者をレビューした。

【0234】

データをデータベースに統合し、次いで、統計学者のチームによってこれをレビューさせた。プローブは、その有効性の解析の間に、その作用の方法を見られないように番号付けした。

【0235】

解析の第一の段階は、各患者についてのエントリーを比較することによって、データの一体性をチェックするものであった。大きな差が見出された場合、データエントリーをチェックし、いずれの明白なエラーも修正された。説明されない差がデータに残された。

【0236】

次いで、異なる統計学的方法が異なるタイプのデータ中の情報を識別することに適しているという事実を認識し、異なる技術を用いて4人の統計学者によってデータを別々に解析させた。

【0237】

最良のプローブ組合せを選択するプロセスにおける最初の工程は、データを2つの組、1つはクラシファイアーを設計するもの、1つは前記クラシファイアーの性能をテストするもの、に分けることである。設計（訓練）組によるが、テスト組で見積もった最良の性能を示す設計を選択することによって、クラシファイアーがデータの構造に一般化され、訓練組で見られた特定の症例に適合されないということが、自信を持って結論づけられる。

10

20

30

40

50

【0238】

信頼性につきテストするために、解析を典型的には、データの訓練およびテストデータの多くのランダムに選択された組で反復した。このアプローチは、一般には、クラシファイアー性能の良好な見積もりを与えるものとして認められている。これらのテストがプロープの一致しない選択を示した場合、そのようなプロープ選択は信頼できないものとして無視した。

【0239】

d. 統計学的分析および/またはパターン認識

1. データ解析への導入

a. 入力データ

10

i. 生データ

各患者につき、スコアを病理学レビューフォームに電子的に入力し、前記フォームは、診断と一緒にした患者アイデンティファイアー、染色された細胞の割合、および染色密度を示すデータにスコアを統合した。

【0240】

ii. 計算されたデータ

分析で用いた各プロープについてのスコアの効率は、強度/パーセンテージ表から計算する。割合および密度は、単純な規則 $H = \text{染色された割合} \times (3 (\text{もし強ければ}) + 2 (\text{もし中程度であれば}) + 1 (\text{もし弱く染色されれば}))$ を持つ単一の「Hスコア」に統合する。これは、プロープに関連する特徴の値である。

20

【0241】

iii. 代替化合物のデータパラメーター

上記Hスコアは発見的に導かれた、Hスコアについて有意な改善を示さないパーセンテージおよび強度を組み合わせる良好な方法を見出すための単純な解析である（セクション3（f）、表題「他の（非Hスコア）目的スコアリングパラメーターを用いる効果」）。より大きなデータベースは、将来の良好な規則の抽出を可能とするであろう。

【0242】

iv. マーカー当たりのユーザー供給重み付け基準

本発明は、コストまたは供給の問題が最良の組合せを可能としないであろう場合に、特徴の利用性に適合可能である点で柔軟である。例えば、本発明は単純に入手可能な特徴に適用して、代替的組合せを見出すことができる。または、特徴を選択するのに用いたアルゴリズムは、コスト重み付けを選択プロセスに含めて、最小のコスト解決に到達する。マーカー性能の見積もりは、収集された全てのマーカーから選択される組合せまたは1つのサプライヤーからのもののみにつき示される。また、例えば、その高いコストに基づき、どのようにしてC4.5パッケージを用いてあるプロープの重みを下げることができるかを示す。これらプロープの組合せは最適な組合せ同様には働かないが、その性能は、コストが重要な因子である状況では許容できる可能性がある。

30

【0243】

v. クラス当たりのユーザー供給の重み付け基準

用いた方法のいくつかは重み付けをクラスに適用することを可能とする。これは、ツリー設計がコストを最適化できるC4.5で利用可能である。また、識別機能方法は単純なパラメーター出力を与え、これを用いて、所望の偽陽性または偽陰性確率を与えることができる。異なる閾値設定のためのこれらのパラメーターのプロットはレシーバー操作曲線として知られている。

40

【0244】

vi. 検出パネル-仮定

偽陰性の低い確率は、（再スクリーニングを必要とする多数の偽陽性のコストにおいて陽性患者が見逃されるのを避けるために）癌検出プロセスに望ましいと仮定した。また、癌識別プロセスは（誤った処置を受ける患者を最小とするために）より低い偽陽性スコアを必要とするであろうと仮定した。

50

【0245】

許容できる性能を達成するのに6以上のプローブを必要とする検出パネルはコスト的に有効ではないであろうと仮定した。また、5%より多くの偽陰性エラー率を持つ検出パネルは許容できないであろうと仮定した。このボックスの外部にあるパネルは許容されない。この仮定は、サイトメトリーパネルは本明細書に分析した組織学ベースのパネルよりも悪い性能を有するらしいことを認める。最終的な目的は20%よりも良好なエラー率を実行するサイトメトリーパネルであり、これはほぼ、頸部Papスミアスクリーナーの性能である。

【0246】

vii. 識別パネル-仮定

6以上のプローブを必要とするパネルはコスト的に効果的ではないと仮定し、20%よりも良好なエラー率が必要であると仮定した。このボックスの外部となるパネルは許容しなかった。

【0247】

b. 出力データ

本発明によって提供される出力は以下のものを含む：

・テスト組からのデータがどのようにして真の陽性、偽陽性、真の陰性または偽陰性いずれかとして分類されるかを示す混乱マトリックス。これらは、実数またはパーセンテージとして示すことができる。混乱マトリックスは「性能マトリックス」と題されたセクション2(d)で議論する。混乱マトリックスは、テスト組からのデータがどのようにして真の陽性、偽陽性、真の陰性または偽陰性いずれかとして分類されたかを示す。決定樹によって分析されたデータから得られた例示的混乱マトリックスを、腺癌、扁平細胞癌腫、大細胞癌腫、中皮腫および小細胞癌腫の同時識別につき以下の表12に示す。

【0248】

(表12)

	腺癌	扁平細胞	大細胞	中皮腫	小細胞
腺癌	67.74%	6.45%	19.40%	0.00%	6.45%
扁平細胞	2.94%	76.47%	11.67%	0.00%	8.82%
大細胞	28.00%	8.00%	44.00%	8.00%	12.00%
中皮腫	0.00%	25.64%	51.28%	89.74%	2.56%
小細胞	0.00%	3.85%	23.08%	3.85%	69.23%

【0249】

・パーセンテージとして表して行った分類の合計数で割った全ての偽分類の合計として混乱マトリックス中のデータをまとめるエラー率。

・レシーバー操作特徴(ROC)曲線は、クラシファイアーにおける異なる閾値レベルについての偽陽性および偽陰性スコアの見積もったパーセンテージ(またはユニット確率当たり)を示す。ランダム選択よりも良好に識別できない平凡なクラシファイアーは、同等の真のおよび偽の読みでもってROC曲線を表す。この曲線下面積は50%となろう(0.5確率)。

・曲線下面積(AUC)は、しばしば、クラシファイアー性能の総じての見積もりとして用いられ、ほとんどの標準的識別機能パッケージはこのAUC図を提供する。完璧なクラシファイアーは100%曲線下面積を有し、無益なクラシファイアーは50%に近いAUCを有する(0.5確率)。

・感度および特異性(は、混乱マトリックスから由来することができる)。「感度および特異性」と題されたセクション2(d)(iii)参照。

・マーカー相関マトリックス。図4参照。

【0250】

i. 検出パネル：組成物

これらのパネルを、2つのクラス、5つの癌のいずれかを持つ患者および癌を持たない患

10

20

30

40

50

者に分けたデータで訓練した。全てのプローブが全ての患者で存在するというわけではなかった。一つまたは複数のプローブが特定の分析で見られなかった場合、これらのケースはデータから外した。よって、分析が少数のプローブで行われた場合、データセットは多いケースを含む。

【0251】

分析に含まれたプローブの数は27であった。多くの症例において、そのプローブにつき入力されたデータがランダム数のジェネレーター組である場合に偽プローブを添加して、0~12の間に均一に数を生じさせた。この偽プローブは、プローブ選択プロセスにおいて一体性を確保とするために初期分析の多くに含ませた。また、この偽プローブも1つのアプローチに含めて、分析から徐々にプローブを排除した。偽プローブよりも少ない情報に寄与したプローブは容易に同定され、選択プロセスから排除できる。そのようなプローブの初期排除は分析のスピードを上げ、これらのプローブによって引き起こされる結果（ノイズ）における変動に対して分析を保護する。

10

【0252】

ii. 検出パネルの性能

この実験からの出力として、異なる方法によって選択されたプローブの組合せおよび混乱マトリックス、%エラー率、およびAUCの点における性能見積もりを報告する。

【0253】

iii. 検出パネル-代替組成物

検出パネルもまたプローブの減少した組から選択した。パネルの1つの組において、商業的に好ましいマーカーにつき重み付けしたパネルの性能尺度を得た。最良のプローブを分析から除去して、識別プローブの新しい組合せを見出す場合に得られた性能も分析した。それ自身に作用する単一プローブの性能は非常に高いことが判明した（プローブ7）。しかしながら、直線識別分析を用いて評価した性能ダイアグラム（表13）において以下に示すように、性能はより多くのマーカーを添加するにつれて改良された。プローブの最良のサブセットは、最良なサブセット論理回帰を用いて決定した。改良は統計学的に有意である。

20

【0254】

（表13）

プローブ7

	癌	対照
癌	87.93%	12.07%
対照	0.00%	100.00%

プローブ7および16

	癌	対照
癌	93.10%	6.90%
対照	1.16%	98.84%

プローブ7,15および16

	癌	対照
癌	90.52%	9.48%
対照	1.16%	98.84%

プローブ1、7,15および16

	癌	対照
癌	90.52%	9.48%
対照	0.00%	100.00%

プローブ1、4、7,15および16

	癌	対照
癌	92.24%	7.76%
対照	1.16%	98.84%

10

20

40

50

【0255】

(最良のサブセット論理回帰を用いて決定した)かつ論理回帰を用いて評価したプローブの最良なおよび次に最良なサブセットを以下に示す。AUC = ROC曲線下面積。平均AUCはランダム訓練およびテスト分割につき100のトライアルからの平均であることに留意されたい(70% : 30%)。結果を以下の表14に示す。

【0256】

(表14)

プローブ	平均 AUC
7	94.28
28	80.14
7, 16	95
7, 15	94.59
7, 15, 16	95.94
1, 7, 16	95.33
1, 7, 15, 16	95.61
4, 7, 15, 16	95.34
1, 4, 7, 15, 16	95.3
1, 7, 11, 15, 16	95.57

【0257】

iv. 識別プローブ-組成物

研究のこの部分では、癌を持つ全ての患者からの癌の1つの存在を検出するように各々が設計された5つのクラシファイアーを設計し、テストした。この5経路対様式システムの適用は、疑われる症例が分析において1回より多く出現するのを可能とするか、全く出現

しないようにする。そのような症例を同定し、より綿密な精査、再テストまたは代替テスト方法に供することができる。

【0258】

やはり、実験におけるプローブの数は27であり、分析における数を低下させるために初期段階で用いた偽プローブを伴った。

【0259】

v. 識別パネル-性能

前記した性能エスティメーターを用いて、異なる技術によって発見された最良のプローブ組合せの性能を示した。

【0260】

vi. 識別パネル-代替組成物

分析は、商業的に好ましいプローブを含むプローブ組合せにつき反復した。性能は悪化した、いくつかの低下した組クラシファイアーについて不安定ではなかった。以下、(最良のサブセット論理回帰を用いて決定した) プローブ7なしのプローブの最良のサブセットを表15に示す。直線識別分析を用いてデータを評価した。

【0261】

(表15)

プローブ28

	癌	対照
癌	0.706897	0.293103
対照	0.093023	0.906977

プローブ10および28

	癌	対照
癌	0.793103	0.206897
対照	0.034884	0.965116

プローブ10、15および28

	癌	対照
癌	0.810345	0.189655
対照	0.011628	0.988372

プローブ1、10、15および28

	癌	対照
癌	0.827586	0.172414
対照	0.011628	0.988372

プローブ1、10、15、16および28

	癌	対照
癌	0.827586	0.172414
対照	0.011628	0.988372

【0262】

(最良のサブセット論理回帰を用いて決定し) 論理回帰を用いて評価したプローブ7を含むプローブの最良および次に最良なサブセットを以下に示す。AUC = ROC曲線下面積。平均AUCはランダム訓練およびテスト分割についての100のトライアルからの平均である(70% : 30%) ことに留意されたい。結果を以下の表16に示す。

【0263】

(表16)

プローブ	平均 AUC
28	79.36%
10	82.28%
10, 28	94.21%
15, 28	88.68%
10, 15, 28	92.90%
1, 10, 28	93.59%
1, 10, 15, 28	92.99%
8, 10, 15, 28	93.20%
1, 10, 15, 16, 28	93.13%
1, 8, 10, 15, 28	93.57%

10

【0264】

2. データ解析方法

このセクションでは、用いた異なる方法からの結果を解釈するガイドとしてデータの構造の初期理解を獲得するプロセスを記載する。

【0265】

a. 偏差の分析

i. 病理学者間の変動および病理学者スコアのプール

(1) t検定

2人の病理学者にこの臨床試験において各患者のスライドをレビューさせた。病理学者1は全ての患者をレビューし、病理学者2はこの組のほぼ半分をレビューし、病理学者3は残りをレビューした。Hスコアの2つの独立した見積もりに関し、病理学者性能のコンシステンシーをテストできた。

20

【0266】

容易に入手できる統計ツールを用いて、病理学者の間の変動をテストした。これは対とした試料のt検定である。これは見積もりの各対の間の差を取り、これらを平均し、これを総じての偏差の割合として表現する。次いで、t検定はこの比率を、2つの試料組が同一集団から来る尤度を見積もる確率に変換する(P値)。

【0267】

このテストを各マーカープローブについてのスコアに適用し、病理学者1および病理学者2は全ての症例をレビューし、やはり全ての症例が病理学者1および病理学者3によってレビューされた。(全てのプローブをカバーするために)適用した27のテストがあったので、 $P=0.01$ の低い値を「有意な閾値」として選択した。各プローブについてのPスコアを示し、病理学者の2つの対についての結果を以下の表17、18、19および20に示す。病理学者1および病理学者2は病理学者1および病理学者3よりも合致していたことが明らかである。

30

【0268】

(表17) 病理学者1、病理学者2のスコア

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
0.3875446	0.01051847	0.4659704	0.4659704	0.3772394	0.2307273	0.01001357
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
0.004131056	0.7703014	0.1640003	0.1374452	0.9580652	0.1587876	0.001200265
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
0.19742	0.3860899	0.3829022	NA	0.544601	0.08873848	0.1686243
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
0.5423451	0.1912477	0.4031977	0.2477236	0.5673386	0.9174037	0.00339071

40

【0269】

(表18) 0.01を閾値とした病理学者1、病理学者2のスコア ($\alpha = 1\%$ の有意性レベル)

50

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
真	真	真	真	真	真	真

X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
偽	真	真	真	真	真	偽

X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
真	真	真	NA	真	真	真

X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
真	真	真	真	真	真	偽

10

【0270】

(表19) 病理学者2、病理学者3のスコア

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
3.814506e-09	0.0399131	0.1954867	5.671062e-05	0.01856276	0.2757166	0.2292583
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
2.044038e-12	0.004166467	0.00983267	0.003710155	0.01461007	0.03312421	0.0003367823
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
0.0005162036	0.2276337	0.002987705		4.267708e-06	0.007287372	0.1654067
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
0.02400127	0.0009497766	2.478456e-07	0.1591684	0.08318303	3.122143e-05	1

20

【0271】

(表20) 0.01を閾値とした病理学者1、病理学者3のスコア ($\alpha = 1\%$ の有意性レベル)

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
偽	真	偽	偽	真	真	真
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
偽	偽	偽	偽	真	真	偽
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
偽	真	偽	偽	偽	偽	真
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
真	偽	偽	真	真	偽	真

30

【0272】

Hスコアは主観的であるため、境界症例においてスケールファクターの差およびノイズに従う。従って、病理学者1と病理学者2の間で統計学的に異なるスコアを示した3つの特徴にもかかわらず、このジョイントデータは測定機器の代表として受け入れられた。病理学者1および病理学者2を分析プロセスのために単一のデータセットに組み合わせた。病理学者3の結果は、独立したテスト目的で保留した。病理学者3データを用いるそのようなテストは、有意差のため過小性能を示す方向に偏るであろう。

【0273】

病理学者1および病理学者2からのデータは、いずれか1つの症例についての結果の間の独立度を与える変動と共に、それらを別々の症例と考えることによって組合せた。そのようなデータでテストする場合、性能の見積もりはより楽観的な値に偏るであろう。これは、同一患者から来る試料がテストサブセットの訓練において同時に起こり得るからである。しかしながら、これは特徴の最良な組合せを見出すために用いたプロセスを無効とせず、それは単に性能の見積もりを偏らせるに過ぎない。

40

【0274】

(2) Hスコアの分散分析

(a) 背景

各ブローブ内で、Hスコアは多くの理由で変動し得る。それが、これが有用な疾患タイ

50

ブのため一定に変動する程度で、いずれの病理学者がスライドを読むかによる変動は教示的であり、他方、ランダム変動は以前の2つの変動源の検出に対する制限を設定する。

【0275】

分散分析 (ANOVA) は、データにおける変動源を分割し、その統計的有意性をテストするための標準的技術である。ANOVAは、具体的変動源または原因に帰することができる項目の合計としてのデータの組の合計変動をまとめる。

【0276】

ANOVAは多くの統計学的パッケージで入手できる。公のドメインパッケージ「R」を選択した (「The R Project for Statistical Computing」, <http://www.R-project.org/>)。

【0277】

10

(b) 目的

病理学者1および2からのHスコアデータにつきANOVA分析を行うため、そしてこのデータがパネルの選択用のさらなる分析のための単一合致組に安全にまとめることができるか否かを考慮すること。

【0278】

(c) 方法

データベースから、病理学者1および2からデータを選択した。所与のプロープについて完全であるデータのみをそのプロープ用のANOVAで用いた。

【0279】

気腫、肉芽腫性疾患および介入性肺病の制御カテゴリーと一緒にグループ分けして「正常」と呼び、ファクター「疾患」内に6つのレベルを与えた。

20

【0280】

病理学者は2レベルにてファクターとして暗号化した (病理学者1、病理学者2)。

【0281】

ファクター：「疾患」、「病理学者」、および相互的項目「疾患：病理学者」を用いて、Rスクリプトを書き、次々に各プロープについての標準ANOVA分析を行った。結果を以下の表21に示す。「Df」は自由度と定義される。n回観察のデータセットにおいて、平均からのn-1偏差をとり、n番目が自動的に決定される。n-1は自由度の数である。合計Sqおよび平均Sqは変動の尺度である。Fは、F分布に基づく2つの偏差の質に関するテスト統計である。Pr(>F)は、変動が統計学的に有意か否かを判断するのに用いた確率である。

30

【0282】

(表21) Hスコアの分散分析

グループ1						
	Df	合計	Sq	平均	Sq	F 値 Pr(>F)
疾患	5	443.56	88.71	15.8202	3.690e-13	***
病理学者	1	0.66	0.66	0.1174	0.7323	
疾患：病理学者	5	15.34	3.07	0.5470	0.7405	
残存	204	1143.93	5.61			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**
					0.05	.
					0.1	.
						1

グループ2						
	Df	合計	Sq	平均	Sq	F 値 Pr(>F)
疾患	5	1067.39	213.48	24.1234	<2e-16	***
病理学者	1	13.02	13.02	1.4709	0.2263	
疾患：病理学者	5	27.98	5.60	0.6324	0.6752	
残存	249	2203.50	8.85			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**
					0.05	.
					0.1	.
						1

10

グループ3						
	Df	合計	Sq	平均	Sq	F 値 Pr(>F)
疾患	5	1098.49	219.70	21.0751	<2e-16	***
病理学者	1	6.73	6.73	0.6458	0.4224	
疾患：病理学者	5	29.72	5.94	0.5703	0.7227	
残存	243	2533.16	10.42			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**
					0.05	.
					0.1	.
						1

20

グループ4						
	Df	合計	Sq	平均	Sq	F 値 Pr(>F)
疾患	5	631.8	126.4	9.3707	3.454e-08	***
病理学者	1	6.6	6.6	0.4869	0.4860	
疾患：病理学者	5	13.1	2.6	0.1939	0.9647	
残存	246	3317.1	13.5			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**
					0.05	.
					0.1	.
						1

30

グループ5						
	Df	合計	Sq	平均	Sq	F 値 Pr(>F)
疾患	5	754.30	150.86	25.2826	<2e-16	***
病理学者	1	14.25	14.25	2.3875	0.1236	
疾患：病理学者	5	7.54	1.51	0.2528	0.9381	
残存	248	1479.80	5.97			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**
					0.05	.
					0.1	.
						1

ブローブ6						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	721.91	144.38	11.8515	2.771e-10	***
病理学者	1	1.91	1.91	0.1568	0.6925	
疾患：病理学者	5	47.82	9.56	0.7850	0.5613	
残存	246	2996.93	12.18			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**
				0.05	.	0.1
					.	1

ブローブ7						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	1171.47	234.29	77.6802	< 2e-16 ***	
病理学者	1	8.84	8.84	2.9294	0.08847 .	
疾患：病理学者	5	46.36	9.27	3.0742	0.01063 *	
残存	209	630.37	3.02			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**

10

ブローブ 8						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	209.82	41.96	6.4352	1.201e-05 ***	
病理学者	1	12.66	12.66	1.9407	0.16483	
疾患：病理学者	5	71.20	14.24	2.1838	0.05654 .	
残存	251	1636.76	6.52			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**

20

ブローブ 9						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	197.21	39.44	8.4348	2.015e-07	***
病理学者	1	7.33	7.33	1.5681	0.2116	
疾患：病理学者	5	24.56	4.91	1.0505	0.3884	
残存	265	1239.17	4.68			

有意性コード:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05 \ '.' 0.1 \ ' 1

30

ブローブ10						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	1113.46	222.69	39.0730	< 2e-16 ***	
病理学者	1	1.01	1.01	0.1778	0.67371	
疾患：病理学者	5	62.45	12.49	2.1916	0.05635 .	
残存	213	1213.96	5.70			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**

グループ11											
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)						
疾患	5	320.15	64.03	9.5553	2.416e-08	***					
病理学者	1	1.28	1.28	0.1918	0.6618						
疾患：病理学者	5	10.04	2.01	0.2996	0.9128						
残存	245	1641.76	6.70								

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	1

グループ12											
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)						
疾患	5	832.26	166.45	27.8793	<2e-16 ***						
病理学者	1	0.18	0.18	0.0307	0.8610						
疾患：病理学者	5	15.16	3.03	0.5079	0.7701						
残存	248	1480.68	5.97								

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	1

10

グループ13											
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)						
疾患	5	46.594	9.319	7.8408	8.674e-07 ***						
病理学者	1	0.044	0.044	0.0368	0.8481						
疾患：病理学者	5	10.143	2.029	1.7069	0.1343						
残存	210	249.584	1.188								

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	1

20

グループ14											
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)						
疾患	5	1305.69	261.14	23.9460	< 2e-16 ***						
病理学者	1	28.66	28.66	2.6279	0.10630						
疾患：病理学者	5	142.90	28.58	2.6208	0.02492 *						
残存	243	2649.98	10.91								

有意性コード:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'	0.05	'.'	0.1	' '	1

30

グループ15											
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)						
疾患	5	401.02	80.20	21.268	<2e-16 ***						
病理学者	1	13.17	13.17	3.493	0.0630 .						
疾患：病理学者	5	6.17	1.23	0.327	0.8963						
残存	214	807.02	3.77								

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	1

ブローブ16						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	2520.26	504.05	65.5572	<2e-16 ***	
病理学者	1	0.15	0.15	0.0194	0.8892	
疾患：病理学者	5	24.29	4.86	0.6318	0.6757	
残存	247	1899.12	7.69			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	* 0.05 . 0.1 ' 1

ブローブ17						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	530.64	106.13	13.0178	2.426e-11	***
病理学者	1	8.42	8.42	1.0325	0.31050	
疾患：病理学者	5	109.96	21.99	2.6975	0.02131	*
残存	266	2168.55	8.15			

有意性コード:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05
					'.'	0.1
						' ' 1

10

ブローブ19						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	1670.86	334.17	29.1960	<2e-16 ***	
病理学者	1	2.17	2.17	0.1895	0.6637	
疾患：病理学者	5	32.61	6.52	0.5698	0.7231	
残存	248	2838.56	11.45			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	* 0.05 . 0.1 ' 1

20

ブローブ20						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	964.71	192.94	34.2760	<2e-16 ***	
病理学者	1	8.83	8.83	1.5687	0.2116	
疾患：病理学者	5	19.60	3.92	0.6963	0.6267	
残存	245	1379.12	5.63			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	* 0.05 . 0.1 ' 1

30

ブローブ21						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	6.927	1.385	2.0604	0.07076	
病理学者	1	0.464	0.464	0.6906	0.40670	
疾患：病理学者	5	1.576	0.315	0.4687	0.79945	
残存	263	176.830	0.672			

有意性コード:	0	****	0.001	***	0.01	* 0.05 . 0.1 ' 1

ブロープ22						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	640.16	128.03	31.7250	<2e-16 ***	
病理学者	1	1.64	1.64	0.4058	0.5247	
疾患：病理学者	5	18.78	3.76	0.9305	0.4617	
残存	247	996.81	4.04			

有意性コード:	0	****	0.001 ***	0.01 **	0.05 .	0.1 ' 1

ブロープ23						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	1915.62	383.12	46.5565	<2e-16 ***	
病理学者	1	10.77	10.77	1.3092	0.2537	
疾患：病理学者	5	20.92	4.18	0.5084	0.7698	
残存	246	2024.39	8.23			

有意性コード:	0	****	0.001 ***	0.01 **	0.05 .	0.1 ' 1

10

ブロープ24						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	516.06	103.21	24.0786	<2e-16 ***	
病理学者	1	9.52	9.52	2.2210	0.1376	
疾患：病理学者	5	12.48	2.50	0.5823	0.7135	
残存	216	925.87	4.29			

有意性コード:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05
					'.'	0.1
						' ' 1

20

ブロープ25						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	1761.26	352.25	34.5245	<2e-16 ***	
病理学者	1	11.51	11.51	1.1285	0.2891	
疾患：病理学者	5	41.49	8.30	0.8134	0.5411	
残存	248	2530.33	10.20			

有意性コード:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05
					'.'	0.1
						' ' 1

30

ブロープ26						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	399.85	79.97	13.6548	1.428e-11 ***	
病理学者	1	0.30	0.30	0.0517	0.8204	
疾患：病理学者	5	14.81	2.96	0.5056	0.7719	
残存	214	1253.31	5.86			

有意性コード：	0	****	0.001	***	0.01	* 0.05 . ' 0.1 ' ' 1

プロープ27						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	117.92	23.58	6.2551	1.956e-05	***
病理学者	1	0.64	0.64	0.1695	0.6810	
疾患：病理学者	5	25.52	5.10	1.3539	0.2431	
残存	212	799.31	3.77			

有意性コード:	0	***	0.001	***	0.01	*' 0.05 \.' 0.1 \ ' 1

プロープ28						
	Df	合計 Sq	平均 Sq	F 値	Pr(>F)	
疾患	5	1634.60	326.92	38.171	<2e-16	***
病理学者	1	8.40	8.40	0.981	0.3229	
疾患：病理学者	5	16.15	3.23	0.377	0.8643	
残存	267	2286.76	8.56			

有意性コード:	0	***	0.001	***	0.01	*' 0.05 \.' 0.1 \ ' 1

10

【0283】

(d) 結果の分析

(プロープ21を除き)全ての症例において、プロープの応答は疾患に関連していた。プロープはこの目的で予測的に選択されたので、これは驚くべきことではない。(p=0.05
レベルにおいて)病理学者に関連したプロープの応答はいずれの症例でもなかった。これにより、このデータを合わせ、データについて2つの尺度として2人の病理学者を用いることが安全であることが示される。

20

【0284】

少数の症例、プロープ7、14、17において、有意性を獲得する相互的項目のいくつかの証拠がある。これは、いくつかの疾患のそのスコアリングにおける病理学者の間のいくつかの差があり得ることを示す。これらの症例のいくつかは、データ中の偶然の孤立値によるものであると考えられる。

【0285】

(e) 結論

結果は、さらなる分析のためにこのデータを合わせることが安全であることを示す。データは、病理学者および疾患の間のいくつかの症例におけるわずかな相互作用がランダム源に帰せられるようであることを示す。

30

【0286】

ii. 患者間の変動

患者間の変動はセクション2(a)(i)(2)の疾患：疾患変動によって測定した(前記[Hスコアの分散分析]参照)。

【0287】

iii. マーカー間変動

対照対癌に対する各プロープについてのマーカースコアの分布を示すヒストグラムをプロットした(PathologistData.xls, ワークシート: ヒストグラム)。

40

【0288】

b. マーカー相関マトリックス分析

集団相関係数(「Applied Multivariate Statistical Analysis」R.A.Jhonson and D.W. Wichern, 2nd Ed, 1998, Prentice-Hall, N.J.)は、ランダム変数の対の間の直線会合の量を測定する。典型的には、ランダム変数の分布および関連パラメーターは知られておらず、集団相関係数は直接的には計算することができない。この症例においては、試料相関係数は試料データから計算することができる。図4参照。しかしながら、試料相関係数は集団相関係数の概略に過ぎない。さらに、それは試料データに基づいて計算されるので、純粋に偶然により、それは、現実には、対応するランダム変数の間に現実の関係は無いであ

50

る場合、強い陽性または陰性相関を示す可能性がある（「Modern Elementary Statistics」, J.E.Freund, 6th Ed, 1984, Prentice-Hall, N.J.）。

【0289】

相関係数は他の変数を予測するための1つの変数の能力を測定する。しかしながら、強い直線会合が偶然の関係を意味する。相関係数の二乗は決定係数と呼ばれる。二変数データセットにつき計算された決定係数は、他に対するその直線関係によって占めることができる1つの変数における変動の割合を測定する。いくつかの変数を取り扱う場合、相関係数は、今度は、各対につき計算することができ、係数の組は相関マトリックスと呼ばれるマトリックスとして書くことができる。図4参照。

【0290】

個々のマーカーについてのHスコアはランダム変数としてモデル化することができる。この多変数データセットについての試料相関マトリックスは、前記「入力データ」と題したセクションに記載された入力データから計算することができる。

【0291】

c. パターン認識

統計学的パターン認識は、定量的測定に基づいてシグナルまたは幾何学的物体の分類に対するアプローチである（特徴と呼ばれる）。統計学的パターン認識は、本質的には、対象となるカテゴリーまたはクラスに対応する領域へ n 次元特徴空間を分割する問題に帰結される。

【0292】

この研究で使用される3つの異なるクラシファイアー方法は、データ内の異なる構造形態に対して感受性である。

【0293】

決定樹方法について、異なるデータ組合せの予備的解析により、検出パネルでC4.5によって決して用いられなかったマーカーが同定された。これらを分析から取り除き、この結果、より合致する結果が得られ、これは選択プロセスに対するノイズに寄与するに過ぎない残りのプローブに兆候的である。

【0294】

同様に、検出パネルで用いたプローブの予備的解析は、詳細な解析に先立って除去するノイズプローブを同定した。

【0295】

SPSSにおける直線識別機能方法は、分析においてマーカーの数を低下させるための内蔵された段階的プロセスを有する。典型的に、これは、2~7の間に分析に用いられるプローブを減少させた。

【0296】

RおよびSASにおける論理回帰方法は、可変選択のための段階的手法を実行する。SASにおいては、最良なサブセット変数選択オプションも提供される。Rにおいては、段階的方法を複数ランダムトライアル組合せと用いて、回数に基づいて変数を選択するための発見的方法を開発し、所与の特徴をトレーニングおよびテストデータの100のランダム選択で用いた（各々、分裂70%：30%）。人工的ランダム特徴についてのカウントに匹敵するカウントを持つ特徴は、特徴の最小一定組が100ランを超えて得られるまで徐々に排除された。

【0297】

i. 統計学的方法

多変数統計学的観点から、問題は、高次元空間における密度関数の見積もり（および対象となる領域へのこの空間の分割）の1つである。ランダム（特徴）ベクターの分布は知られていると仮定し、理論的に最善なクラシファイアーはBayesクラシファイアーである。なぜならば、それは分類エラーの確率を最小化するからである（K.Fukunaga, 「Statistical Pattern Recognition」, 2nd Ed., Academic Press 1990, P.3）。あいにく、Bayesクラシファイアーの実行は、特に、特徴空間の次元性が高い場合、その複雑性のため困難で

10

20

30

40

50

ある。現実には、より単純なパラメータクラシファイアを用いる。パラメータクラシファイアは、密度または識別機能の基礎についての仮定に基づいている。最も普通のそのようなクラシファイアは直線および二次クラシファイアである。多変数統計解析では、そのようなクラシファイアは識別分析の見出しに入る。識別分析技術は多変数直線回帰モデルおよび汎用直線モデル（論理的および多項回帰を含む）汎用直線モデルに密接に関連している。

【0298】

（1）二項応答での論理回帰

（a）背景

検出パネルで用いるべきマーカーの組を選択する問題は、二項応答での論理回帰問題として公式化することができる。応答変数は2つのレベル：正常（癌なし）および異常（癌）を持つ因子である。例示的に変数はマーカーHスコアである。

【0299】

癌識別パネルで用いるべきマーカーの組を選択する問題もまた二項応答で論理回帰問題として公式化することができる。応答変数は2つのレベル：正常（対象となる癌なし）および異常（対象となる癌）を持つ因子である。例示的な変数はマーカーHスコアである。

【0300】

段階的変数選択を用いて、2つのクラス間の識別で用いる元の変数（マーカー）のサブセットを選択することができる。これは計算的に高くつく仕事であり、コンピューターに最もよく適している。いくつかの商業的および公のドメインソフトウェアパッケージ、例えば、R、S-plus、およびSASにより、段階的論理回帰が実行される。

【0301】

特徴選択に対する2つの異なるアプローチを、各々、RおよびSASで見出された段階的変数選択手法に基づいて調べた。

【0302】

（b）実験データ

本分析で用いるデータは、病理学者1および病理学者2によって調べられ、本報告の他の箇所に記載された症例につきマーカー1-17および19-28についてのHスコアからなる。加えて、ダミーマーカー18をデータセットに加えた。ダミーマーカーは、均一分布からランダムに選択された0～12の整数値からなる。

【0303】

（c）方法1：Rパッケージの使用（バージョン1.4.1）

コンピューター化モデル適合手法は一般に、欠けているデータに対処することができない。これは、Rで用いられるglm（glmは汎用直線モデルを表す）手法に当てはまる。結果的には、glmを用いてモデルを適合させる場合、一つまたは複数の失われた値がある全ての症例を排除する必要があった。27リアルマーカーおよびシグナルダミーマーカーを含む初期の十分なモデルを適合させる場合、これはデータセットを202の症例まで低下させる。そのような少数の観察で、変数選択を行って、選択された変数を用いるクラシファイアを訓練し、その性能にアクセスする最良の方法は、データの訓練およびテスト組のランダム分割で100の試験を実行することであると判断された。

【0304】

（i）データの訓練およびテスト組への分割

各試験の開始時に、データをテスト組および訓練組に分割する。これは、異常の30%および正常の30%をランダムに選択してテスト組を形成し、残りの観察を用いて訓練組を形成することによってなされる。

【0305】

（ii）変数（マーカー）選択

各試験の開始時、変数（マーカー）全てを含んだ十分なモデルを訓練データに適合させる。Rにおいては、glmを用いて論理回帰モデルを適合させる。用いたコードフラグメントは以下の通りである。

10

20

30

40

50

```
my.モデル <- クラス ~ X1 + X2 + X2 + X3 + X4 + X5 + X6 + X7 + X8 +
X9 + X10 + X11 + X12 + X13 + X14 + X15 + X16 + X17 + X18 + X19 +
X20 + X21 + X22 + X23 + X24 + X25 + X26 + X27 + X28
```

```
my.glm <- glm(my.モデル、ファミリー = 二項(リンク = logit)、データ = 訓練.データ)
```

【0306】

次いで、手法工程AICを用いて、Akaike Information Criterion(AIC)に基づいて段階的変数選択を行う。この手法は、公的に入手可能なMASSライブラリーの一部である。前記ライブラリーおよび前記手法は「Modern Applied Statistics with S-PLUS」(W.N.Venables and B.D.Ripley, Springer-Verlag, Pathologist 3 New York, 1999)に記載されている。これをなすためのRコードフラグメントは以下の通りである。

```
my.工程 <- 工程AIC(my.glm、方向 = 双方)
```

【0307】

次いで、得られたモデルをテストデータに基づいて評価する。用いたコードフラグメントは以下の通りである。

確率は異常である <-

```
予測(my.工程、テスト、データ、タイプ = 「応答」)
```

【0308】

クラシファイアーの性能は誤分類(AER)およびROC曲線下面積(AUC)の実際の誤差率の項目で記録する。100のトライアルの後、100モデルおよびその関連AERおよびAUCはそのままである。頻度表を構築し、変数毎の回数が100モデル中に外観を作ったのを記録する。その例を表22に示す。

【0309】

(表22)

変数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	14
頻度	2	6	4	1	4	16	100	40	3	10	43	1
変数	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	28	
頻度	4	28	2	1	3	2	2	18	10	84	4	

【0310】

この表を用いて、どのマーカーを捨てるべきかを決定する。まず、10以下の頻度を有するマーカーの全てを捨てる。次に、ダミーマーカーの頻度に基づいてカットオフ頻度を選択する(典型的には、これはダミーマーカーの1または1.5倍である)。このカットオフ値の未満の頻度を持つ全てのマーカーを捨てる。次いで、ダミーマーカーと共に残りのマーカーをもう1つの100トライアル用の完全なモデルとして用い、除去プロセスを反復する。必要であれば、除去の程度を増大させて、一つまたは複数のマーカーをモデルから外す。必要であれば、残りのマーカーをさらにもう1つの100のトライアル用の完全なモデルとして用いることができる。パネルメンバーの所望の数に到達するか、または現行モデルについての平均AUCが先行モデルのそれ未満である場合に、除去を停止させる。

【0311】

除去プロセスを説明するために、前記表を考える。前記表は、検出パネルデータを用いて得られた。陰影を付したエントリーは、除去後に保持させるマーカーを示す。もう1つの100のトライアルは以下の完全モデルを用いて実行される。

```
my.モデル <- クラス ~ X6+X7+X8+X12+X16+X18+X23+X25
```

【0312】

再度、頻度表、表23を構築する。

(表23)

変数	6	7	8	12	16	18	23	25
頻度	63	100	51	48	30	47	66	98

【0313】

陰影を付したエントリーは（47のカットオフを用いる）除去の後に保持されたマーカを示す。もう1つの100のトライアルは以下の完全モデルを用いて行う。

my.モデル<クラス~X6+X7+X8+X12+X18+X23+X25

【0314】

再度、頻度表、表24を構築する。

（表24）

変数	6	7	8	12	18	23	25
頻度	96	100	23	73	3	88	98

10

【0315】

この時点で、50のカットオフを選択する。陰影をつけたエントリーは、5つのメンバーのパネルで用いられる残りのマーカを示す。各工程において、平均AUCは増加する。94.37% → 95.45% → 95.78%。

【0316】

（iii）パネルの性能の評価

パネルの性能を評価するために、段階的選択手法を行わない以外は前記したように100のトライアルを実行した。各トライアルでは、前記AUC、感度および特異性を記録する。例えば、検出パネルでは、結果は以下の通りである。

20

> my.モデル <- クラス ~ X7 + X25 + X6 + X23 + X12

> 要約(AUC)

最小 第1のQu. メジアン 平均 第3のQu. 最大
0.9289 0.9590 0.9615 0.9601 0.9630 0.9630

> 要約(感度)

最小 第1のQu. メジアン 平均 第3のQu. 最大
0.8519 0.9630 0.9630 0.9737 1.0000 1.0000

> 要約(特異性)

最小 第1のQu. メジアン 平均 第3のQu. 最大
0.8378 0.9730 0.9730 0.9749 1.0000 1.0000

30

【0317】

まとめると、前記パネルは97.37%の感度および97.49%の特異性を有する。ROC下の面積は96.01%である。

【0318】

（d）方法2：SASの使用（バージョン8.2）

論理的回帰は、手法LOGISTICを用いてSASで行うことができる。応答変数が2-レベルの因子である場合、前記手法はバイナリー-logitモデル（Rにおけるglmと同等、ファミリー=二項およびリンク=logit）を適合させる。SASは、特定したモデルについての失われた多変数観察の全てを自動的に排除する。Rとは異なり、SASは最良のサブセット変数選択手法を実行することができる。これを行うのに必要なSASにおけるコードフラグメントは以下の通りである。

40

PROC LOGISTIC DATA=WORK.パネル;

CLASS クラス;

MODEL クラス = X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16 X17 X18 X19 X20 X21 X22
X23 X24 X25 X26 X27 X28 /選択 = SCORE BEST=28;

RUN;

【0319】

50

この手法は完全なデータセットに適用される。パラメーターBEST = 28はSASが最良の28の単一変数モデル、最良の28の2変数モデル、最良の28の3変数モデル、最良28までの28変数モデルを見出すように命令する。

【0320】

(i) パネルの性能の評価

方法1に記載した手法を用いて、パネルの各々の性能を評価する。以下の表25は検出パネルデータから作成した。それは、2つの最良の1-、2-、3-、4-および5-マーカーパーネルについてのみの結果を列挙する。

【0321】

(表25)

パネル	パネルのメンバー	感度	特異性	ROC下の面積
1	7			94.28%
2	28			80.14%
3	7, 16			95.00%
4	7, 15			94.59%
5	7, 15, 16			95.94%
6	1, 7, 16			95.33%
7	1, 7, 15, 16			95.61%
8	4, 7, 15, 16			95.34%
9	1, 4, 7, 15, 16			95.30%
10	1, 7, 11, 15, 16			95.57%

【0322】

(2) 直線識別分析

(a) 背景

商業的統計学パッケージSPSSは、単純な直線識別関数が設計され、テストされるのを可能とする手法を有する。

【0323】

通常使用される方法は、Fisherの直線識別関数である。これは、良好なクラスの分類を与える特徴空間において超平面を見出す。クラス分布が異なる平均を有するが、同様の多変数ガウス分布を有する場合の2クラス問題について、このクラシファイアーは最適な性能を与える。本方法は発見的に多クラス問題まで拡大することができるが、これは前記研究では適用できなかった。

【0324】

本方法はそのアプローチにおいては単純であるが、非常に多数の特徴を含むデータセットに関連する問題に対して確実なものである(200ほどの標本(症例)のみを含むデータセットに対して問題を生じる我々の症例番号27におけるプローブ)。

【0325】

このパッケージは、識別プロセスに十分に寄与する特徴を同定するための手法を有する。この「段階的方法」は、まず、ほとんどの識別特徴を見出す。次いで、他の特徴を順次に加え、クラシファイアーに対して評価する。もし良好な組合せが見出せれば最初に選択された特徴を最終解決が排除できるように組合せを開発する。特徴の数は、統計学的テストが、残りの特徴が分類プロセスに信頼性よく寄与しないことを示すまで、徐々に増加さ

10

20

30

40

50

せる。

【0326】

性能の見積もりは、リーブワンアウト (leave one out) 方法を用いることによって獲得される。これは、データセットから1つの試料を除去して、訓練組を形成する。残された試料はテスト組として保持し、クラシファイアーに適用し、得られた分類を混乱マトリックスに蓄積する。前記手法はデータ中の症例につき反復する。この手法は性能の偏っていない見積もりを与えるが、前記見積もりは高い偏差を有するであろう。

【0327】

SPSSにおいて、分析用の適当なデータセットを選択し、「Analyze (分析)」を選択し、「Classify (分類)」を選択し、「Discriminant (識別) ...」を選択し、表において、「Fishers方法」、「リーブワンアウトテスト」および「段階的方法を用いる」を選択する。診断をグループ分け変数として入力し、全ての特徴を独立変数として入力する。「OK」を入力して分析を完了する。他のパラメーターについてのプレ値を組として残した。

10

【0328】

分析出力は、分析で、カノニカル識別関数および混乱マトリックス、ならびに正しい分類率 (1-誤差率) で用いた特徴のリストを含む。

【0329】

ROC曲線を計算するためには、カノニカル識別関数を選択された特徴に適用して、新しい特徴を作成する。SPSSでは、Graphs (グラフ)、ROCを用いて、この曲線をプロットする。

20

【0330】

ii. ヒエラルキー方法：決定樹

(1) 背景

決定樹研究は、誘導推理のための最も広く用いられ、かつ現実的な方法の1つである。それは、ノイズデータに対して強固であり、かつ学習選立的表現が可能な分類のための方法である (Tom M. Mitchell, 「Machine Learning」, McGraw-Hill, New York, NY, 1997)。

【0331】

最もよく用いられているアクセス可能なマシン学習パッケージは「C4.5」であり、このソースコードは (J. Ross Quinlan, 「C4.5: Programs for Machine Learning」, Morgan Kaufmann, San Mateo CA, 1993) に公開されている。

30

【0332】

決定樹が (訓練データで) 訓練されつつある場合、前記アルゴリズムは、ツリーの各ノードにおいて、データのいずれの単一の属性をこのノードで用いて決定を最良になすかを決定する。従って、ツリーが完全に構築された場合、それは、用いるべき属性のいくつかの組を選択し、他を無視してしまっているであろう。我々の適用においては、分子プローブから獲得された測定を処理するための決定樹を用い、前記決定はプローブのパネル、およびプローブスコアを組み合わせる方法を効果的に選択し、これは、データの分類を最良に説明する。パネル性能の偏っていない見積もりを得るためには、得られたツリーを、訓練で用いなかったデータについて評価しなければならない。これを行うための1つの標準的な技術は交差有効化 (cross-validation) である。10倍交差有効化を使用した。

40

【0333】

交差有効化は、限定されたデータの最良の使用をなすための技術である。10倍交差有効化においては、データを10のほぼ等しいサイズの分割にランダムに分割し、各分割にわたるクラスにおいてはほとんど同一数の症例を有するように注意する。次いで、決定樹を、組み合わせた分割2~9につき訓練し、分割1につきテストし、次いで、組み合わせた分割1、3~9につき訓練し、分割2につきテストし、一旦データ全体にわたり保持されたテスト組を回転させ、10トライアルにつき同様に行う。このようにして、テストを保持されたデータで単に実行し、従って偏りはなく、全てのデータが一旦そのように正確にテストされれば、全データセットにわたる集合誤差率を計算することができる。

【0334】

50

ツリーは、それらが訓練データに対して非常に良好な適合となるまで通常は構築され、次いで、それらを、「ノイジー」な枝や葉を排除することによって逆に「除去」する。これは、見られていないデータについての決定樹の一般化能力を改良し、良好な性能を得るために必須である。C4.5パッケージは、ツリーを除去するための2つの方法を含み、最初のは標準ツリー除去アルゴリズムであり、第二のものは規則抽出アルゴリズムである。一般に、ツリーベースの方法は、このデータについての優れた結果を与えることが判明した。従って、規則ベースの方法は報告しない。

【0335】

(2) データの調製

正常な組織および5つの異なる癌に対する種々のプローブの応答についてのデータ（腺癌、大細胞癌腫、中皮腫、小細胞肺癌、および扁平細胞癌腫）は他の箇所に記載されたように得た。プローブ1~28、ならびに病理学者の病理学者1および病理学者2についてのHスコアをデータベースから抽出し、フラットなデータファイルに入れた。決定樹分析では、（同一の物理的スライドでの2人の病理学者によってさえ）各データ点は、染色に対する疾患の効果の独立した観察が取られた。これは、わずかに、分類の性能を正にバイアスし得るが、パネル選択に対しては効果を有さないはずである。

- ・気腫、肉芽腫性疾患、および介在性肺病の制御カテゴリーを一緒に分類し、「正常」と呼んだ。

- ・検出パネルでは、全ての癌を一緒にグループ分けし、「異常」と呼び、これを2クラスの問題とする。

10

20

- ・単一識別パネルでは、正常な症例はデータから除去して、5クラスの問題を形成した。
- ・保持された識別パネルでは、各癌は、今度は保持し、残りの癌を「他のもの」に分類して、5つの2クラス問題の組を得た。

【0336】

C4.5は、分析に含めるべきデータおよび属性を記載する「名称」ファイルを必要とする。識別パネルについての例示的名称ファイルは表26である。

【0337】

(表26)

```

|
| C4.5 MonoGen 2F21 diag データについての名称ファイル
|
腺癌、大細胞癌腫、中皮腫、小細胞肺癌、扁平細胞癌腫
| クラス

```

```

P1 : 続き
P2 : 続き
P3 : 続き
P4 : 続き
P5 : 続き
P7 : 続き
P8 : 続き
P9 : 続き
P10 : 続き
P11 : 続き
P12 : 続き
P13 : 続き
P14 : 続き
P15 : 続き
P16 : 続き
P17 : 続き
P18 : 無視
P19 : 続き
P20 : 続き
P21 : 続き
P22 : 続き
P23 : 続き
P24 : 続き
P25 : 続き
P26 : 続き
P27 : 続き
P28 : 続き

```

10

20

【0338】

プローブ18はデータから失われており、これを全ての設計において「無視する」ように設定した。名称ファイル中で「無視する」属性の設定は、パネルからプローブをトリミングする容易かつ効果的な方法であり、データ解析で用いられる。

30

【0339】

(3) データ解析

C4.5と共に「xval.sh」スクリプトを用い、10倍交差有効化を各データで実行した。パッケージについての標準（デフォルト）パラメーターを用いた。交差有効化は、クラシファイアー訓練および小さなデータセットについてのテストのために開発された技術である。それは、データをNの同等なサイズの分割にランダムに分割することを含む。次いで、クラシファイアーと一緒にN-1の分割につき訓練し、残りの分割につきテストする。これをN回反復する。

【0340】

1つの交差有効化（CV）トライアルで訓練された決定樹は（選択されたプローブおよびツリー係数双方が異なる）もう1つのもので得られたツリーから異なり得るので、各プローブが10トライアルでツリーから選択される回数を計算した。

40

【0341】

プローブの最初のカルは、10CVトライアルからの除去されたツリーで5回以上起こらなかったいずれのプローブも無視するように設定することによってなされた。

【0342】

次いで、交差有効化は、候補プローブのこの最小組で反復した。プローブの第二のカルは、10CVトライアルから除去されたツリーで5回以上起こらなかったいずれのプローブも無視するように設定することによってなされた。もしいずれのさらなるプローブもドロッ

50

ブアウトされなければ、第三のCVランを行った。

【 0 3 4 3 】

パネルは種々のランによって選択し、それらの見積もられた誤差性能を結果の表に示す。決定樹分析についてのパネル性能は以下の表27に示す。

【 0 3 4 4 】

(表 2 7)

パネル性能 - 決定ツリー

検出パネル

プローブ: 3、7、19、25 および 28

	癌	対照
癌	99.42%	0.58%
対照	17.82%	82.18%

10

対様式識別

4、6、14、19 および 23

	腺癌	その他
腺癌	67.74%	32.26%
その他	11.20%	88.80%

対様式識別

3、6、17、19 および 25

	扁平	その他
扁平	70.59%	29.41%
その他	4.07%	95.93%

対様式識別

1、5、10、13、21、27 および 28

	大細胞	その他
大細胞	36.36%	63.64%
その他	7.37%	92.63%

20

対様式識別

3、12 および 16

	中皮腫	その他
中皮腫	82.05%	17.95%
その他	5.00%	95.00%

対様式識別

12、17、20、23 および 25

	小細胞	その他
小細胞	69.23%	30.77%
その他	1.49%	98.51%

検出(プローブ7なし)

6、10、16 および 19

	癌	対照
癌	89.60%	10.40%
対照	3.30%	96.70%

30

検出(商業的に好ましいプローブのみ)

5、6、10、16、19 および 23

	癌	対照
癌	92.80%	7.20%
対照	5.49%	94.51%

【 0 3 4 5 】

例示的決定樹の構造を、小細胞肺癌および残りの4つのタイプの癌の間を識別するにつき、以下の表28および29に示す。

【 0 3 4 6 】

(表 2 8) C4.5出力フォーマット

40

```

P23 <= 3 :
| P25 <= 2 : 小細胞肺癌 (18.0)
| P25 > 2 :
| | P17 <= 5 : 小細胞肺癌 (2.0)
| | P17 > 5 :
| | | P20 <= 11 : その他 (9.0)
| | | P20 > 11 : 小細胞肺癌 (2.0)
P23 > 3 :
| P12 > 7 : その他 (120.0)
| P12 <= 7 :
| | P20 <= 2 : その他 (5.0)
| | P20 > 2 : 小細胞肺癌 (4.0)

```

ツリーをセーブする

訓練データについての評価 (160 項目):

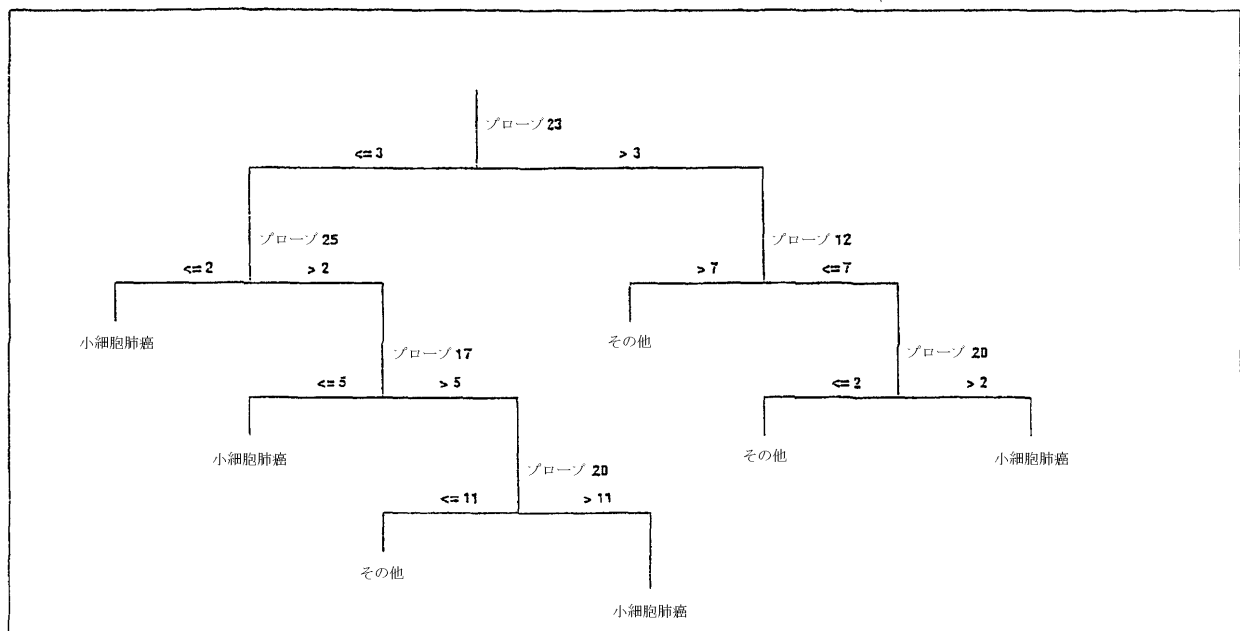
除去前		除去後		推定
サイズ	誤差	サイズ	誤差	
13	0(0.0%)	13	0(0.0%)	(5.2%)

10

20

【 0 3 4 7 】

(表 2 9) 絵で表したフォーマット



30

40

【 0 3 4 8 】

段階的直線識別のためのパネル性能を以下の表30に示す。

【 0 3 4 9 】

(表 3 0)

パネル性能 - 段階的 LD

検出パネル

1、4、7、15 および 16

	癌	対照
癌	92.24%	7.76%
対照	1.16%	98.84%

対様式識別

4、5、14、19、20、25 および 27

	腺癌	その他
腺癌	91.67%	8.33%
その他	5.43%	94.57%

対様式識別

1、2、3、24、25 および 26

	扁平	その他
扁平	88.00%	12.00%
その他	6.59%	93.41%

対様式識別

1 および 7

	大細胞	その他
大細胞	80.95%	19.05%
その他	26.32%	73.68%

対様式識別

3、12 および 16

	中皮腫	その他
中皮腫	96.67%	3.33%
その他	4.65%	95.35%

対様式識別

12、19、22 および 23

	小細胞	その他
小細胞	93.75%	6.25%
その他	5.00%	95.00%

検出(プローブ 7 なし)

1、2、3、4、10、11、15、16、23、24、27 および 28

	癌	対照
癌	85.34%	14.66%
対照	2.33%	97.67%

検出(商業的に好ましいプローブのみ)

8、10、11、19、23 および 28

	癌	対照
癌	81.20%	18.80%
対照	1.16%	98.84%

【 0 3 5 0 】

段階的論理回帰分析についてのパネル性能を以下の表 31 に示す。

【 0 3 5 1 】

(表 3 1)

10

20

30

パネル性能・段階的 LR

検出パネル

6、7、12、23 および 25

	癌	対照
癌	97.49%	2.63%
対照	2.51%	97.49%

対様式識別

14、19、20、25 および 27

	腺癌	その他
腺癌	96.39%	3.61%
その他	12.29%	87.71%

対様式識別

3 および 10

	扁平	その他
扁平	94.93%	5.07%
その他	35.86%	64.14%

対様式識別

1、4、6、16 および 21

	大細胞	その他
大細胞	95.11%	4.89%
その他	61.00%	39.00%

対様式識別

3、7、12 および 16

	中皮腫	その他
中皮腫	95.07%	4.93%
その他	10.89%	89.11%

対様式識別

12、13 および 23

	小細胞	その他
小細胞	98.90%	1.10%
その他	4.00%	96.00%

検出(プローブ7なし)

1、10、19、23 および 28

	癌	対照
癌	94.00%	6.00%
対照	5.80%	94.20%

検出(商業的に好ましいプローブのみ)

10、19、20、23 および 28

	癌	対照
癌	93.88%	6.12%
対照	6.39%	93.61%

10

20

30

40

50

【0352】

iii. 神経ネットワークおよび代替方法

人工神経ネットワークANNは、本発明と組み合わせることで容易に適用して、特徴を選択し、クラシファイアーを設計することができる候補パターン認識技術である。しかしながら、そのような技術は、LDFが与えるような、データの構造および特定のプローブの影響については洞察をほとんど与えない。この理由で、このクラスのアルゴリズムは、本研究では用いられなかった。LDFは直線識別関数、すなわち、その結果が分類を決定するのに閾値となる特徴の直線組合せを表す。

【0353】

このクラスの技術は、多層認知MLP、Back-Prop、Kohonenの自己組織化マップ、学習ベクター定量、K-最近接および遺伝子アルゴリズムを含む。

【0354】

iv. 特別なトピックス

(1) 仮定

・直線識別分析

・2クラスについての共偏差マトリックスは同等であると仮定する。

・2クラスが多変数ノルマルである場合のみ誤分類のコストを最小化する。

・例示的変数はカテゴリー的ではなく連続的であると仮定する(本研究では、Hスコアはカテゴリー的であり、他方、現実的には(すなわち、自動システムでは)、強度は連続的スケールで測定することができる)。

・論理回帰(二項一般化直線モデル)

【 0 3 5 5 】

Venerables and Ripley, Chapter 7 (「Modern Applied Statistics with S-PLUS」(W. N. Venables and B. D. Ripley, Springer-Verlag, New York, 1999)) を参照されたい。

【 0 3 5 6 】

(2) マーカー棄却 (脱選択)

識別分析および回帰手法のコンピューター化された実行は段階的変数選択手法；例えば、Rにおける工程AICを含む。これらの手法は、例示的変数として用いられる変数の最良のサブセットを選択するように設計される。現実には、これらの手法のステップごとの性質のため、最良の変数が予測のために選択される保証はない (Johnson and Wichern, p.299)。それにもかかわらず、そのような手法はマーカー選択および脱選択についての基礎を提供する。 10

【 0 3 5 7 】

(3) 対様式テスト

マルチクラスクラシファイアーを設計するにおける固有の問題は「Applied Multivariate Statistical Analysis」, R. A. Johnson and D. W. Wichern, 2nd Ed, 1988, Prentice-Hall, N. J. で議論されている。これは、いくつかの別々の2クラスクラシファイアー (識別パネル) を開発するためのモチベーションである。

【 0 3 5 8 】

(4) パネル組成における余剰分の考慮

「Linear models from the core of classical statistics and are still the basis of much of statistical practice」, 「Modern Applied Statistics with S-PLUS」(W. N. Venables and B. D. Ripley, Springer-Verlag, New York, 1999)。直線モデルは、t検定、分散分析 (ANOVA)、回帰分析、ならびに識別分析を含む種々の多変数方法のための基礎である。例示的変数は一次項としてモデルに入力してもしなくてもよい。これは (非直線) 論理回帰についても当てはまる。論理回帰モデルは、単純に、直線回帰モデルの非直線変換であり、従属変数はlogオッズ比 (logit) によって置き換えられる。要約すると、これらの統計学的方法は例示的変数間の直線的関係に基づいている。その結果、パネルにおいて余剰分を求める1つの手段は、非常に関連する変数 (マーカー) を同定することである。パネルにおいて1つのマーカーを他のマーカーで置き換えて、同様の性能を達成するのは可能であろう。 20 30

【 0 3 5 9 】

パネルにおいて余剰分を求めるもう1つの手段は、「最良サブセット」回帰分析を行うことである。対象となる例示的変数の全てを備えた出発モデルを仮定すると、目的は、最良の単一変数回帰モデル、最良の2変数回帰などを見出すことである。この方法はSAS統計パッケージで実行される。

【 0 3 6 0 】

(5) スコア重み付けの使用

(a) 商業的および臨床的考慮

戦略的および商業的因子：コスト；入手可能性；使用の容易性を含む多くの理由で、パネル中でのある種のプローブの選択を促し、他の選択にペナルティーを与え、同時にパネルサイズまたは性能に対して交換するのが好ましいことがある。 40

【 0 3 6 1 】

(b) 属性コスト評価

(決定樹における) そのような属性重み付けのための方法は、バックグラウンド知識 (M. Nunez, 「The Use of Background Knowledge」, Machine Learning 6: 231-250, 1991)、およびロボットセンサーから情報を得る差別コスト (M. Tan, 「Cost-sensitive Learning of Classification Knowledge and its Applications in Robotics」, Machine Learning. 13: 7-33, 1993) の取り込みのような他の文脈でのマシーン学習文献に提案されている。

【 0 3 6 2 】

これらのコスト感受性アルゴリズムの双方は、C4.5として知られた標準マシーン学習ソ 50

ソフトウェアパッケージに対するマイナーな変化によって文献で実行されている (J. Ross Quinlan, 「C4.5: programs for machine learning」, Morgan Kaufmann, CA. 1993)。便宜のために、このアプローチを追跡して、Nunezの「EG2」アルゴリズムを実行した。

【0363】

C4.5決定樹構築フェーズにおいては、アルゴリズムは、情報利得 G_i を最大化する単一のものを分割し、選択するための各利用可能な属性を比較する。EG2アルゴリズムにおいては、 $(2^{G_i} - 1) / (C_i + 1)$ を最大化し、これを属性 i についての情報のコスト C_i に一体化させる。重みのベクトルはユーザーによって先験的に設定される必要はない。

【0364】

(i) コード修飾

C4.5ソースコードを修飾して、M. Nunezによって提案された経済的ジェネライザー「EG2」アルゴリズムを実行した (The Use of Background Knowledge, Machine Learning 6: 231-250, 1991)。

【0365】

C4.5パッケージに対する正確な修飾は以下の通りである。
ファイル「R8/Src/contin.c」(J. Ross Quinlan, 「C4.5: programs for machine learning」, Morgan Kaufmann, CA. 1993) 中の以下の行の後に、

```
ForEach(i, Xp, Lp - 1)
{
    if ( (Val = SplitGain[i] - ThreshCost) > BestVal )
    {
        BestI    = i;
        BestVal = Val;
    }
}
```

新しい行は、

```
BestVal = (powf(2.0, BestVal) - 1.0) / (AttributeCosts[Att] + 1.0);
```

を挿入する。属性コストのベクトルがユーザーによって維持されたテキストファイルから以前に読まれている場合。

【0366】

(ii) 実験的方法

商業的に好ましいプロープは、2、4、5、6、8、10、11、12、16、19、20、22、23、28である。

【0367】

例のため、仮に前記プロープがコストのため商業的に好ましく、このコストを考慮して検出パネルを再度選択するのが望まれると仮定する。

【0368】

修飾されたC4.5決定樹ソフトウェアを用いて、商業的に好ましいプロープにゼロのペナルティーを与え、商業的に好ましくないプロープに2のペナルティーを与える。修飾されたC4.5アルゴリズムを用い、10倍交差有効化パネル選択方法 (他の箇所に記載) を実行した。

【0369】

(iii) 結果

標準決定樹検出パネルはプロープ3、7、19、25、28からなる。得られたパネルメンバーは2、6、7、10、19、25、28であり、これは2つの商業的に好ましいプロープのみ、P7およびP25を用いた。これらのプロープは、このデータについてのその優れた性能のためその増大したコストにもかかわらず本方法によって選択されたことに注意されたい。パネルはより大きくなった：元々5であったのに対し7プロープ。性能はプロープのコスト低下の代

10

20

30

40

50

償として最適以下となるが、このデータについてのパネル性能の証明可能な降下はない。

【0370】

(iv) 結論

プローブ使用のコストをパネル選択方法に取り込むための直接的な方法が確立された。

【0371】

(c) 誤分類コスト評価

(i) 背景

多くの理由から、異なる種類の分類誤差のコストが変動し得るということを考えて最適なパネルを選択することが望ましいであろう。例えば、1つの疾患（例えば、大細胞癌腫）に対して増大した感度を有するパネルを選択するのが望ましいことがあると考えられ、混乱マトリックスにおける他の箇所での特異性および感度の低下を代償としてもそれが望まれる場合もあるであろう。

【0372】

理論的には、コストの可能な全ての組合せを一体化させるための（混乱マトリックスと同次元の）誤分類コストのマトリックスを必要とするであろう。現実には、非単位であるコストのみ（デフォルト）を入力する。

【0373】

商業的決定樹ソフトウェアSee5 (RuleQuest Research Pty Ltd., 30 Athena Avenue, St Ives Pathologist 3SW 2075, Australia. (<http://www.rulequest.com>)) は、この能力を組み込んだものであり、以下の証明で用いた。

【0374】

(ii) 目的

標準ジョイント識別パネル（他の箇所で記載）はメンバー：P2、3、4、5、12、14、16、19、22、23、28からなる。そして、以下の見積もられた混乱マトリックスを与える。

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	←以下のように分類される	
24	4	2	5	2	(a) :	クラス 腺癌
8	7	3	5	4	(b) :	クラス 大細胞癌腫
1	1	33	1	4	(c) :	クラス 中皮腫
6	2	1	23		(d) :	クラス 小細胞肺癌
4	4	3	2	24	(e) :	クラス 扁平細胞癌腫

【0375】

大細胞癌腫の感度は26パーセントで低い。もしこの感度を新しく設計されたパネルで増加させたいならば、以下の方法を使用することができる。

【0376】

(iii) 方法

以下のコストファイルを作成した。

```

| ZF21Discrim についてのコストファイル
|
| 「大細胞癌腫」についての感度の増大
|
中皮腫、大細胞癌腫： 10
腺癌、大細胞癌腫： 10
中皮腫、大細胞癌腫： 10
小細胞肺癌、大細胞癌腫： 10
扁平細胞癌腫、大細胞癌腫： 10

```

【0377】

このファイルは、他の癌のいずれかとしての大細胞癌腫の10のファクターによる誤分類を上方重み付けする。これは、（他の箇所で低下した性能を伴う）このクラスにおける検出の感度を増加させる傾向があるが、重み付けは完全な分類を保証することができない。

【0378】

10

20

30

40

50

(C4.5の代わりにSee5を用いて)標準決定樹パネル選択方法を適用した。

【0379】

(iv) 結果

新しいパネルメンバーは、P2、3、4、5、6、9、12、14、16、17、25、28である。以下の性能が見込まれる。

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	<-以下のように分類される	
20	13	1	1	2	(a) :	クラス 腺癌
3	13	3	2	6	(b) :	クラス 大細胞癌腫
1	9	27	2	1	(c) :	クラス 中皮腫
2	9		21		(d) :	クラス 小細胞肺癌
1	15	2	1	18	(e) :	クラス 扁平細胞癌腫

10

【0380】

前記は、大細胞癌腫の見込み感度が今や48%まで増加したことを示す。

【0381】

(v) 結論

誤分類の異なるコストをパネル選択方法に取り込むための直接的方法が証明された。

【0382】

d. 性能メトリックス

各方法の見込み性能を示す分析によって提供された出力は以下のものを含む。

20

【0383】

i. ROC分析

レシーバー操作特徴 (ROC) 曲線は、クラシファイアーにおける異なる閾値レベルについての偽陽性および偽陰性スコアの見込みパーセンテージ (または単位確率当たり) を示す。ランダム選択よりは良好に識別することができない平凡なクラシファイアーは、等しく真のおよび偽の読みを伴うROC曲線を呈するであろう。この曲線下面積は50%となろう (0.5確率)。

【0384】

曲線下面積 (AUC) は、しばしば、クラシファイアー性能の総じての見積もりとして用いられ、ほとんど商業的識別関数パッケージはこの数字を計算する。完全なクラシファイアーは100%の曲線下面積を有し、有用でないクラシファイアーは50%に近いAUC (0.5確率) を有するであろう。

30

【0385】

ii. 混乱マトリックス: カウントおよびパーセンテージ

混乱マトリックスは、どのようにしてテスト組からのデータが分類されたかを示す。対様式テストでは、これらは真の陽性、偽陽性、真の陰性または偽陰性のスコアのカウントである。これらは現実のカウントとして、またはパーセンテージとして示すことができる。1つのパネルについてのみユニークな診断を与えるよう試みるマルチ方法パネルでは、混乱マトリックスは、それぞれの正しい分類についてのカウントを示すであろう。例えば、毎回、小細胞癌腫は、それがマトリックスの1つの対角線に入力されるように検出される。正しくないスコア、例えば、どれくらいの頻度で小細胞癌腫が扁平細胞癌として正しくなく同定されるかは、マトリックスの適当な対角線外要素に入力されるであろう。誤差率を用いて、パーセンテージとして表した、なされた分類の合計数で割った全ての偽分類の合計として混乱マトリックスにデータをまとめる。

40

【0386】

iii. 感度および特異性

特異性とは、いずれかの定義が無益な症例を排除する程度をいう。もし定義が貧弱な特異性を有すれば、それは偽陽性が高い。これは、それが、現実には存在する障害がない場合に障害を有するものとして個体を標識することを意味する。感度とは、いずれかの定義が全ての有効な症例を含む程度をいう。もし定義が貧弱な感度を有すれば、それは偽陰性

50

が高い（存在する障害を有する個体は、それを有しないと誤って診断される）。

【0387】

3.データの解析および結果

a.試料のサイズおよび変動性

- ・組み合わせた病理学者1および病理学者2のデータセットにおける354の症例のうち、202の症例のみが各マーカー（変数または特徴）につきHスコアを保有した。
- ・少数の完全な観察および多数の変数は、見積もりの問題（次元性の災い）に導く。よって、クラシファイアーを形成するのに用いる変数の数は厳格に逆除去する必要がある。
- ・少数の観察のため、データを（クラシファイアー性能の強固な見積もりに必要な）別々の訓練およびテスト組に分割するのは賢明ではない。この理由で、（交差有効化および複数のランダムトライアルのような）再サンプリング方法を用いる必要があった。
- ・癌識別のためのマルチクラスクラシファイアーの設計は困難である。なぜならば、癌の各タイプについて小数の観察しかないからである。

10

【0388】

b.脱選択されたマーカー

前記した方法を用いてマーカーを脱選択した。脱選択されたマーカーはパネル中で非選択によって表される。

【0389】

c.検出パネル組成

i.選択されたマーカープロープ

20

全ての3つの方法についての選択されたマーカープロープを図5にまとめる。

【0390】

ii.最小の選択されたマーカー組

選択パネルでは、プロープ7が単一マーカーにつき最良の検出性能を送達したことが明らかである。プロープの組合せを分析して、信頼できるパネルがより多くのプロープにより得ることができるかを見た。

【0391】

(1)方法

論理回帰方法は、最良のサブセットが、性能尺度の点でランク付けするのを可能とする（Fisherのスコア）。この分析を用いて、1~5のプロープからの組合せを選択した。Fishers直線識別関数およびlogitモデル（論理回帰）を用いて、これらの組合せの性能を示した。データは上記されている。

30

【0392】

(2)結論

プロープ7はクラシファイアーとしてそれ自身よく実行される；しかしながら、プロープ7単独を用いる欠点は、プロープ7が高い偽陰性スコアを有することである。Fisher直線識別関数をクラシファイアーとして用いる最良の性能はプロープ7および16でのものであった。他の組合せを用いるパネルの中での結果の変動は、より多くの特徴によって加えられたノイズが、分類スコアを改善するいずれの能力よりも勝ることを示唆する。少数の正しくなくスコア取りされた試料は、これらのより稀な事象の統計の貧弱な提示を与える。より多数の症例で設計されたクラシファイアーは、良好なクラシファイアーが設計されるのを可能とすることができる。異なるクラシファイアーを用いるプロープの最良な組合せを選択する技術は、データの構造に依存して、異なる良好なパネルを作り出すことができる。

40

【0393】

iii.補足的マーカー

パネルは、異なるプロープの入手可能性に適するように設計することができる。決定木、論理回帰、および直線識別関数。データは前記に示す。

【0394】

50

SPSSを用い、Fisherの直線識別関数を、拘束がアクセス拘束により適用されたパネルから得られたスコアに適用した。例えば、プローブの全てが1つの販売業者からのものである。再度、段階的オプションを選択して、特徴の最良の組合せを見出した。性能は、Leave-One-Out交差有効化テストを用いて見積もった。

【0395】

iv. 代替マーカー：生物学的作用メカニズム（機能的に同等なマーカー）

当業者であれば、機能的に同等なマーカーを決定することができる。パネルで用いたマーカーの機能的挙動は本明細書を通じて記載される。

【0396】

v. マーカーの局所化

10

この研究で用いた種々のマーカーの局所化は本明細書中の他の箇所で記載される。

【0397】

vi. パネルの性能

3つの方法の性能は前記されている。

【0398】

vii. パネルの性能の解釈についての制限

・ 小さなデータセット、および再サンプリング方法を使用する必要性のため、クラシファイアーが過剰訓練される（データに余りにも接近して適合される）危険性がある。

・ 細胞学的検体を用いるパネル性能は正確に予想するのが困難である。というのは、痰細胞学的試料が、組織学的有効化実験で分析した細胞の代表である細胞の適切な数を含むか否かは明瞭でないからである。それにもかかわらず、適切な細胞試料のサイズを仮定すれば、細胞学的検体と同様に挙動する最適化パネルを期待できよう。

20

【0399】

d. 識別パネル組成

i. 全ての癌についての単一5方向パネル

3つの分析技術のうち、決定樹のみが単一5方向パネルに使用できる。従って、単一決定樹を構築して、全てのタイプの肺癌を同時に分類した。パネルのメンバーを図5に示す。パネルの性能はパネル性能の表にて前記されている。

【0400】

ii. その他全てに対する肺癌の単一タイプを識別するためのパネル

30

直線識別関数は、同時マルチクラス識別を行うのにあまり適合していない。各々が全ての癌のプールされた組から癌の1つを識別するために別々に設計された5つの別々のクラシファイアーの性能を分析した。そのような組合せは、候補癌の1つを有するものとして症例のいずれも分類せず、あるいは候補癌の2以上を有するものとして単一症例を分類する能力を有する。これは、さらなるレビューのための一致しない症例を同定するにおいて潜在的利点を有する。

【0401】

全ての癌タイプについての単一識別パネルの総じての誤差率はかなり高い誤差率を有することが観察されている（5方向クラシファイアー）。前記で示されたパネル性能データにおいては、各々が他の可能な4つの癌から1つの癌を同定するように設計された5つの対様式クラシファイアーの性能が示される。このアプローチは決定樹、および直線識別関数を用いる分析に使用できる。前記技術は、適用された場合に曖昧な知見を送達する能力を有し、単一の患者についての2以上の診断を与え、さらなる臨床的調査を示唆する。前記技術は知見を送達しない能力を有し、再度、さらなる調査（恐らくは、検出パネルでの再テスト）を示唆する。

40

【0402】

iii. 検出パネルからの偽陽性症例の確率を説明するパネル

さらなるパネルを訓練して、（決定パネルからの）偽陽性症例および5つの癌タイプの間を識別することができる。これは、異常として正しくなく分類された決定パネルからの個体症例を選択することを含む。これは、これらの「特殊な」症例を検出する「より困難

50

な」問題についての専用クラシファイアーを訓練する。しかしながら、これは理論的には確実な仕事であるが、データセットはこれらの症例のうち4つを生じ、集団は分析では過小表示されているようであった。

【0403】

iv. 選択されたマーカー

全ての3つの方法についての選択されたマーカーを図5にまとめる。

【0404】

v. 最小の選択されたマーカー組

このトピックは以下の「異なる方法を用いる同様の結果によって証明されたアプローチの強固性」で取り扱う。

【0405】

vi. 補足マーカー

このトピックは、以下の「異なる方法を用いる同様の結果によって証明されたアプローチの強固性」で取り扱う。

【0406】

vii. 代替マーカー：生物学的作用メカニズム

当業者であれば、機能的に同等のマーカーを決定することができる。パネルで用いたマーカーの機能的挙動は本明細書を通じて記載される。

【0407】

viii. マーカーの局所化

本研究で用いた種々のマーカーの局所化は本明細書を通じて記載される。

【0408】

ix. パネル性能

3つの方法の性能を図5にまとめる。

【0409】

e. 重み付けパラメータの効果

先に議論したマーカーについての、また疾患状態（クラス）についてのユーザーが供給した重み付け基準に加えて、バイナリー重み付けスキームを用いることもできる。例えば、全ての非DAKO供給プローブが「0」に重み付けられ、全てのDAKO-供給プローブが「1」と重み付けられれば、最適化されたパネルはDAKO-供給プローブのみを含むであろう。これは、その供給のみを用いて分子診断パネルキットを開発し、市販することを意図するいずれの供給業者にとっても重要な製品設計能力である。

【0410】

f. 他の（非Hスコア）目的スコアリングパラメーターを用いる効果

i. 背景

病理学者レビューシートは表32通りのボックスの組を含む。

【0411】

（表32）

強度	無し	弱い	中程度	強い
0-5%	☐ 0	☐ 0	☐ 0	☐ 0
6-25%	☐ 1	☐ 1	☐ 1	☐ 1
26-50%	☐ 2	☐ 2	☐ 2	☐ 2
51-75%	☐ 3	☐ 3	☐ 3	☐ 3
>75%	☐ 4	☐ 4	☐ 4	☐ 4

【0412】

標準スコアリングシステムは、強度を：無し = 0、弱い = 1、中程度 = 2、強い = 3として、およびパーセンテージ細胞を：0～5% = 0、6～25% = 1、26～50% = 2、51～75% = 3、>75% = 4とグレード付けし、次いで、2つのグレードを一緒に掛け合わせることによって得られた「Hスコア」を用いる。例えば、50%の弱く染色された + 50%の中程度に染色さ

10

20

30

40

50

れたは、スコアは $10 = 2 \times 2 + 2 \times 3$ となろう。

【0413】

ii. 方法

代替スコアリング方法を分析し、そこでは、応答を以下の通り低い、中程度および高いと分けた。

(a) もし細胞の50%より多く中程度またはそれを超える染色を有すれば→高い

(b) もし細胞の50%より多く染色無しであれば→低い

(c) その他→中程度。

【0414】

決定樹検出パネル選択方法はHスコアの代わりにこの3-レベル因子を用いて反復した。

10

これは、必要であれば、前記ツリーが各ノードにおいて3つの分岐に分裂させた。

【0415】

iii. 結果

選択されたパネルは、プローブ3、7、10、11、16、19、20、28であった。以下の見積もられた性能を伴った。

以下のように分類される ->

	(a)	(b)	
対照 (a)	79	22	特異性 = 78%
癌 (b)	24	149	感度 = 86%

20

【0416】

これは、以下のHスコアを持つ参照性能と比較すべきである。

以下のように分類される ->

	(a)	(b)	
対照 (a)	85	6	特異性 = 93%
癌 (b)	5	120	感度 = 96%

【0417】

iv. 結論

30

・提案された代替スコアリングシステムを用いる場合、性能の実質的喪失がある（より大きなパネル、より小さな感度およびより小さな特異性）。

・（0～12の範囲の）連続変数としてHスコアを処理することは、調べたデータについてのパネル選択で最適に近いように見える。

・多くの他の可能なスコアリングシステムは調べられていないが、可能であって、実験的にテストされたパネル設計および開発方法に適用することができる。

【0418】

4. 肺癌検出および識別パネル

以下に列挙するのは、前記説明的実施例によって決定された例示的肺癌検出および識別パネルである。以下に列挙するパネルは特異的プローブを引用するが、各特異的プローブは相関プローブまたは機能的に関連するプローブによって置き換えることができることに注意されたい。

40

【0419】

検出（拘束無し）

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA。

抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）。

抗サイクリンA、抗ER関連P29。

抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB。

抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF。

抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗成熟界面活性剤アポプロテインB。

50

抗サイクリンA、抗原-成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF。

抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗界面活性剤アポプロテインA。

抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA。

抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF、抗サイクリンD1。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）。

10

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗ER関連P29。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗成熟界面活性剤アポプロテインB。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗界面活性剤アポプロテインA。

20

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗成熟界面活性剤アポプロテインB、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF、抗サイクリンD1。

【0420】

検出（W/O抗サイクリンA）

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群から選択されるいずれか1つのプローブと組み合わせた抗Ki-67。

30

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群から選択されるいずれかの2つのプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群から選択されるいずれかの3つのプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群から選択されるいずれかの4つのプローブと組み合わせた抗Ki-67。

40

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群から選択されるいずれかの5つのプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗Ki-67、抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインB。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群より選択されるいずれか1つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および

50

抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群より選択されるいずれか2つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群より選択されるいずれか3つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群より選択されるいずれか4つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。

抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原および抗成熟界面活性剤アポプロテインBからなる群より選択されるいずれか5つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。 10

抗Ki-67、抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟界面活性剤アポプロテインBおよび一つまたは複数のさらなるプローブ。

【0421】

商業的に好ましいプローブでの検出

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗Ki-67。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗TTF-1。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗EGFR。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原。

抗Ki-67、抗TTF-1、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原からなる群から選択される2つのプローブ。 20

抗Ki-67、抗TTF-1、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原からなる群から選択される3つのプローブ。

抗Ki-67、抗TTF-1、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原。

抗Ki-67、抗TTF-1、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原からなる群から選択される2つのプローブ、および一つまたは複数のさらなるプローブ。

抗Ki-67、抗TTF-1、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原からなる群から選択される3つのプローブ、および一つまたは複数のさらなるプローブ。

抗Ki-67、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原、および一つまたは複数のさらなるプローブ。 30

【0422】

腺癌および他の肺癌の間の識別

抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか1つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか2つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか3つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか4つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。 40

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗ムチン1、抗TTF-1、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3。

抗ムチン1、抗TTF-1および一つまたは複数のさらなるプローブ。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか1つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか2つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。 50

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか3つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗BCL2、抗ER関連P29および抗Glut3からなる群から選択されるいずれか4つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1。

抗VEGF、抗界面活性剤アポプロテインA、抗ムチン1、抗TTF-1、抗BCL2、抗ER関連P29、抗Glut3および一つまたは複数のさらなるプローブ。

【0423】

扁平細胞癌腫および他の肺癌の間の識別

10

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか1つのプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか2つのプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか3つのプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか4つのプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗CD44v6、抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3。 20

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか1つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか2つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか3つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗CD44v6。 30

抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29および抗メラノーマ関連抗原3からなる群より選択されるいずれか4つのプローブと、および一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗CD44v6。

抗CD44v6、抗VEGF、抗トロンプモジュリン、抗Glut1、抗ER関連P29、抗メラノーマ関連抗原3および一つまたは複数のさらなるプローブ。

【0424】

大細胞癌腫および他の肺癌の間の識別

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗VEGF。

抗VEGFおよび抗p120。

抗VEGFおよび抗Glut3。 40

抗VEGF、抗p120および抗サイクリンA。

抗VEGF、抗p120および一つまたは複数のさらなるプローブ。

抗VEGF、抗Glut3および一つまたは複数のさらなるプローブ。

抗VEGF、抗p120、抗サイクリンAおよび一つまたは複数のさらなるプローブ。

【0425】

中皮腫および他の肺癌の間の識別

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗CD44v6。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた、抗CD44v6、抗増殖細胞核抗原およ 50

び抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31) からなる群より選択される2つのプローブ。

抗CD44v6、抗増殖細胞核抗原、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31) および一つまたは複数のさらなるプローブ。

【0426】

小細胞および他の肺癌の間の識別

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗BCL2。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗EGFR。

抗増殖細胞核抗原、抗BCL2および抗EGFRからなる群から選択される2つのプローブ。

抗増殖細胞核抗原、抗BCL2、抗EGFR。

10

一つまたは複数のさらなるプローブと組合わせた、抗増殖細胞核抗原、抗BCL2および抗EGFRからなる群から選択される2つのプローブ。

抗増殖細胞核抗原、抗BCL2、抗EGFRおよび一つまたは複数のさらなるプローブ。

【0427】

腺癌、扁平細胞癌腫、大細胞癌腫、中皮腫および小細胞癌腫の同時識別

抗VEGF、抗トロポモジュリン、抗CD44v6、抗界面活性剤アポプロテインA、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン1、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗TTF-1、抗N-カドヘリン、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原から選択される2以上のプローブ。

抗VEGF、抗トロポモジュリン、抗CD44v6、抗界面活性剤アポプロテインA、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン1、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗TTF-1、抗N-カドヘリン、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原。

20

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた、抗VEGF、抗トロポモジュリン、抗CD44v6、抗界面活性剤アポプロテインA、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン1、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗TTF-1、抗N-カドヘリン、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原から選択される2以上のプローブ。

一つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた、抗VEGF、抗トロポモジュリン、抗CD44v6、抗界面活性剤アポプロテインA、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン1、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗TTF-1、抗N-カドヘリン、抗EGFRおよび抗増殖細胞核抗原。

【0428】

5. 結論

30

a. 分子診断剤に対するパネルアプローチの有効性

i. 非直感的解決

対照対癌に対する各プローブについてのマーカースコアの分布を示すヒストグラムをプロットした (PathologistData.xls、ワークシート: ヒストグラム)。これらのヒストグラムから、特異的パネルのためのプローブの直感的選択は確かに自明ではなく、記載した発明が明白な方法なしに効果的な組合わせを見出すことを可能とすることが明らかである。

【0429】

ii. 変化させた製品適用についての最適化

iii. 異なる方法を用いる同様な結果によって証明されたアプローチの強固性

40

この報告の本体における種々の分析によって得られ、表および図面にまとめた結果の詳細な精査は以下の知見を示す。

【0430】

1. 個々のプローブの性能の注意深い精査は、いずれか1つのプローブ単独よりも良好に実行するプローブ組合せを明らかとしない。

【0431】

2. 全ての3つの分類方法は特徴の同様な組においてホーン (hone) を評価した。小さな差は、1つのクラシファイアーよりも別のクラシファイアーで役に立ち得るデータ構造に帰することができる。

【0432】

50

3.設計プロセスの間には見られなかった、独立した病理学者からのデータでテストした場合、これらの方法の1つで設計された全てのクラシファイアーは良好な性能を与えることが示された。これは本発明における高い信頼性を与える。

【0433】

4.プローブ7単独に基づく検出パネルは高い性能を与える。

【0434】

5.プローブ7をプローブ16または25と組み合わせると、良好な性能が得られる。

【0435】

6.他のプローブとプローブ7との組合せはさらに性能を改良するように見えるが、捕獲された過剰症例の数は余りにも低くて、それは代表的ではなく、そのように設計されたクラシファイアーは一般化できない。 10

【0436】

7.プローブ7を排除するプローブから選択されるパネルの性能は、ヒトスクリーニングを用いる現行のプラクティスと比較して十分に良好であるが、将来の臨床診断細胞学の世界における自動サイトメトリーについては恐らくはあまり良好ではないある程度の識別を提供した(図6参照)。

【0437】

8.プローブの他の組合せは有用であるがより低い性能を提供しうる。

【0438】

9.もしいくつかのプローブが利用できないことになれば、本発明はプローブの他の組合せの選択を可能とする。これは、商業的に好ましいプローブのみの組をベースとするクラシファイアー設計によって示された。図7参照。 20

【0439】

10.本発明は、コスト高のプローブに対して重み付けが適用されるようにする。分析からそれらを全体的に排除するよりはむしろ、これは、もしそれらの寄与が重要であればパネルにそれらを含ませることができる。

【0440】

11.本発明は、全ての他の癌の中から肺癌の1つのタイプを識別できる単一肺癌タイプ特異的識別パネルの設計を可能とする。

【0441】

12.5つの癌を分類する単一パネルの性能の分析は、識別が可能であったが、総じての誤差率は、癌の1つを他の癌から識別するように各々設計された5つのパネルの組よりも悪かった。 30

【0442】

13.非常に有用な識別が5つの2方向クラシファイアーの組合せで得られた。

【0443】

14.プローブの通常の組は、5つの識別パネルについての3つの分類方法によって選択され、この結果における信頼性を再度与える。

【0444】

15.腺癌の症例を単離するためのプローブは4、14、19、20、25および27である。 40

【0445】

16.扁平細胞癌の症例を単離するためのプローブは1、2、3、24、25および26である。

【0446】

17.大細胞癌の症例を単離するためのプローブは1および7、または1および21である。

【0447】

18.中皮腫の症例を単離するためのプローブは3、12および16である。

【0448】

19.小細胞癌の症例を単離するためのプローブは12、20および23である。

【0449】

20.全ての癌を同時に認識するためのプローブは1、2、3、4、12、14、19、22、23およ 50

び28である。

【0450】

21.本発明によって規定される複数対様式パネルを用いる利点は、疑われる症例が5つのパネルのいずれかでスコア取りできず、また、混乱する症例は2以上のパネルで示され得ることである。そのような例外的な報告により、細胞学者はさらなる分析が示唆されることを知るであろう。

【0451】

iv. リスク管理研究

本研究で適用された全てのテストはその性質が統計学的であった。性能の小さな改良に基づいて選択されたプローブは、新しいデータでテストした場合、統計学的変動を有するという危険性がある。この結果に信頼性を与えるために、病理学者1および病理学者2のデータでの直線識別分析から出現する最良のクラシファイアーをテストした。病理学者3のデータは病理学者1および病理学者2のデータとは統計的に異なったので、病理学者3のデータを用いてテストした場合にもし良好な性能が得られれば、これは非常に期待の持てるものであることを記憶に留めておいていただきたい。

【0452】

(1) 未観察データでのテストについての報告-検出パネル

(a) 方法

前記した「検出パネル組成」と題されたセクションにおいて、我々は、特徴7および16で良好な分類が得られることを示した。SPSSを用い、7および16双方につきHスコアを報告した全ての病理学者3のデータを選択した。次いで、変換および計算を用い、カノニカル識別関数を新しい特徴として作り出した。この特徴単独の性能を次いでテストした。

【0453】

(b) 結果

これらは、病理学者1および病理学者2のデータについて設計されたクラシファイアーをテストし、病理学者3のデータにつきテストした結果である。クラシファイアーは、プローブ7および16についての直線識別関数を用いて設計した。カノニカル病理学者2関数は $0.965^* \text{ Probe7} - 0.298^* \text{ Probe16}$ であった。

【0454】

プローブ7および16を用いる病理学者3のデータについての分類結果

		予測される 群のメンバー		合計
		0	1	
元のカウン	診断 (UCLA)			
	0	20	1	21
	1	6	41	47
%	0	95.2	4.8	100.0
	1	12.8	87.2	100.0
交差有効化カウン	0	20	1	21
	1	6	41	47
%	0	95.2	4.8	100.0
	1	12.8	87.2	100.0

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の89.7%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の89.7%は正しく分類される。

【0455】

これは、プローブ7のみについての病理学者3のデータが以下を示す分類よりも良好である。

【0456】

プローブ7のみを用いる病理学者3のデータについての分類結果

		予測される 群のメンバー		合計
		診断 (UCLA)	0	1
元のカウン	0	0	20	1
	1	1	8	39
%	0	0	95.2	4.8
	1	1	17.0	83.0
交差有効化カウン	0	0	20	1
	1	1	8	39
%	0	0	95.2	4.8
	1	1	17.0	83.0

10

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の86.8%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の86.8%は正しく分類される。

【0457】

(c) 結論

これは、7および16に基づく2プロークラシファイアーがプローク7単独よりも良好であるという信頼性を与える。

【0458】

(2) 未観察データでのテストについての報告-識別パネル

20

(a) 背景

以下に報告するのは、LDFを用いて病理学者1および病理学者2のデータで設計され、未観察病理学者3データでテストされたクラシファイアーの性能である。設計段階における症例の数は比較的小さく、テストデータにおける数も小さく、従って、良好な程度の変動性が第一および第二の組についての性能の間で予測することができる。

【0459】

(b) 方法

SPSSにおいて、「パターン認識」と題されたセクションにおいて誘導されたカノニカル識別関数を形成し、癌の全ての5つのクラスに対する病理学者3のデータにつきテストした。

30

【0460】

(c) 結果

中皮腫LDF = プローク3sc* .385プローク12s* .317 + プローク16s* 1.006

分類の結果

		予測される 群のメンバー		合計
		中皮腫 = 1, その他 = 0	0	1
元のカウン	0	0	38	2
	1	1	1	7
%	0	0	95.0	5.0
	1	1	12.5	87.5
交差有効化カウン	0	0	38	2
	1	1	1	7
%	0	0	95.0	5.0
	1	1	12.5	87.5

40

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の93.8%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の93.8%は正しく分類される。

【0461】

50

小細胞癌LDF = プロープ12s* .575プロープ20s* .408プロープ22s* .423 + プロープ23s* .344

分類の結果

		予測される 群のメンバー		合計	10
		小 = 1, その他 = 0	0	1	
元のカウン	0	0	39	3	
	1	1	1	5	
%	0	0	92.9	7.1	
	1	1	16.7	83.3	
交差有効化カウン	0	0	39	3	
	1	1	1	5	
%	0	0	92.9	7.1	
	1	1	16.7	83.3	

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の91.7%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の91.7%は正しく分類される。

【 0 4 6 2 】

扁平細胞癌LDF = プロープ1sc* .328プロープ2sc* .295 + プロープ3sc* .741 + プロープ24s* .490 + プロープ25s* .393 + プロープ26s* .426

分類の結果

		予測される 群のメンバー		合計	30
		扁平 = 1, その他 = 0	0	1	
元のカウン	0	0	31	4	
	1	1	2	9	
%	0	0	88.6	11.4	
	1	1	18.2	81.8	
交差有効化カウン	0	0	31	4	
	1	1	2	9	
%	0	0	88.6	11.4	
	1	1	18.2	81.8	

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の87.0%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の87.0%は正しく分類される。

【 0 4 6 3 】

大細胞癌LDF = プロープ1sc* .847 + プロープ7sc* .452

分類の結果

40

		予測される 群のメンバー		合計
		大 = 1, その他 = 0	0	1
元のカウンント		0	23	15
		1	4	5
	%	0	60.5	39.5
交差有効化カウンント		1	44.4	55.6
		0	23	15
	%	1	60.5	39.5
		0	23	15
		1	4	5
	%	0	60.5	39.5
		1	44.4	55.6
		0	23	15
	%	1	60.5	39.5

10

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の59.6%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の59.6%は正しく分類される。

【0 4 6 4】

より低いが有用な性能は、非常に少数の大細胞癌の症例で設計され、テストされたクラシファイアーについてであり、従って、この結果は依然として非常に刺激的である。

【0 4 6 5】

腺癌、LDF = -プロープ4sc * .515 + プロープ5sc * .299 - プロープ14s * .485 - プロープ19s * .347 + プロープ20s * .723 + プロープ25s * .327 + プロープ27s * .327 20

分類の結果

		予測される 群のメンバー		合計
		腺癌 = 1, その他 = 0	0	1
元のカウンント		0	29	5
		1	0	14
	%	0	85.3	14.7
交差有効化カウンント		1	.0	100.0
		0	29	5
	%	1	85.3	14.7
		0	29	5
		1	0	14
	%	0	85.3	14.7
		1	.0	100.0
		0	29	5
	%	1	.0	100.0

30

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の89.6%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の89.6%は正しく分類される。

【0 4 6 6】

(d) 結論

これらのクラシファイアーの性能が未観察データに適用されるテストに耐えることは非常に期待が持てる。これは、個々の癌を検出する能力における非常に高い信頼性を与えるものである。

40

【0 4 6 7】

(3) 異なる患者および病理学者からのデータについての訓練およびテスト

強固性の「最終」テストとして、LDFを、病理学者1および病理学者2双方によってレビューされたデータにつき訓練した。これは病理学者3によってレビューされたデータを除去する。よって、病理学者3+病理学者1のデータ双方によってレビューされたデータについてのテストは偏りが無い。以前、テストプロセスは、テストおよび訓練につき同一患者からのデータの使用を通じて偏りがあった。

【0 4 6 8】

50

LDFは、含めなかったプローブ4を除く特徴の同一の組を生じさせた。LDFは = プローブ1
 $sc^* .288 + \text{プローブ}7sc^* .846 - \text{プローブ}15s^* .249 - \text{プローブ}16s^* .534$

分類結果

曲線下面積 = .977

		予測される 群のメンバー		合計	
		0	1		
元のカウンント	診断 (UCLA)				
	0	20	0	20	
	1	9	37	46	
%	0	100.0	.0	100.0	10
	1	19.6	80.4	100.0	
交差有効化カウンント	0	20	0	20	
	1	9	37	46	
%	0	100.0	.0	100.0	
	1	19.6	80.4	100.0	

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の86.4%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の86.4%は正しく分類される。

【0469】

20

依然として、合理的な結果であるが同様な結果（しかし、より小さな曲線下面積を伴う）が、病理学者3のみのデータでのプローブ7単独で得られた。

分類結果

曲線下面積 = .908

		予測される 群のメンバー		合計	
		0	1		
元のカウンント	診断 (UCLA)				
	0	19	1	20	
	1	7	39	46	
%	0	95.0	5.0	100.0	30
	1	15.2	84.8	100.0	
交差有効化カウンント	0	19	1	20	
	1	7	39	46	
%	0	95.0	5.0	100.0	
	1	15.2	84.8	100.0	

a交差有効化は分析においてそれらの症例についてのみ行う。交差有効化においては、各症例は、その症例以外の全ての症例に由来する関数によって分類される。

b元のグループ分けの症例の87.9%は正しく分類される。

c交差有効化グループ分け症例の87.9%は正しく分類される。

40

【0470】

11. 結腸直腸癌

腸の上皮腫瘍は世界中の罹患率および死亡率の主な原因である。結腸（直腸を含む）は、身体におけるいずれの他の器官よりも一次的新生物に対して宿主となる。結腸直腸癌は、癌キラーの中で気管支原性癌腫に次いで二番目にランクされる。腺癌は結腸直腸癌の大部分を占め、胃腸（GI）管に生起する全ての悪性疾患の70%を表す。小腸は、その長さおよび分裂性粘膜細胞の多量のプールにもかかわらず、良性または悪性腫瘍が通常は起こらない部位である（Crawford, J.M., The Gastrointestinal Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S.e.a. Cotran, Editor. 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia.p. 775-843）。

50

【0471】

結腸直腸癌腫に対するピーク発生率は60～79歳の年齢範囲の患者にある。50歳の年齢前では、20%よりも少数の症例が起こる。結腸直腸癌腫が若い人で発見されれば、予め存在する潰瘍性結腸またはポリポース症候群の1つが疑われなければならない。結腸直腸癌腫は世界的な分布を有する。最大の死亡率は米国および東ヨーロッパの国々で見出され、メキシコ、南米およびアフリカにおける率よりも10倍まで大きい。環境因子、特に食事の習慣が、これらの驚くべき地理的コントラストで重要である。加えて、多くの研究は肥満および身体の不活動が結腸癌に対する危険因子であると関連付けている (Crawford, J.M., The Gastrointestinal Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S.E.A. Cotran, Editor, 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p.775-843)。

10

【0472】

大腸で発見されるほとんど全ての癌(98%)は腺癌である。実質的に全ての結腸直腸癌腫は、腺腫結腸ポリポース (APC) におけるE-カドヘリンおよび β -カテニン; 遺伝性非結腸ポリポース癌腫 (HNPCC) におけるヒトミスマッチ修復遺伝子、hMSH2、hMLH1およびhPMS2; およびK-rasおよびP53遺伝子の突然変異を含む遺伝的改変を呈する (Crawford, J.M., The Gastrointestinal Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S.E.A. Cotran, Editor, 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p.775-843)。初期段階における結腸直腸癌腫の診断は、医療専門家に対する第一の挑戦の1つである。なぜならば、これらの癌腫は、疲労、貧血、腹部疼痛および血便のような非特異的臨床徴候と共に存在するからである。現在、主な診断方法は、腫瘍の塊があるか否かを目で調べる結腸鏡検査である。しかしながら、これは、患者による結腸プレッピング (prepping) および無意識を達成するための手法を通じての麻酔を含む侵入手法である。患者コンプライアンスが主な論点であることは驚くべきことではない。あいにく、利用可能な糞閉塞血液テストまたはGuaicテストは十分特異的ではない。従って、結腸鏡検査またはS状結腸鏡検査のような結腸直腸癌についての現行検査方法は、前記手法の侵入性、正確性の相対的欠如、および貧弱な患者コンプライアンスのため不適切なスクリーニングツールであることが判明している。さらに、非侵入性糞閉塞血液テスト (FOBT) は効果的ではなく、感度または特異性の欠如を被っている。

20

【0473】

結腸直腸癌腫の分子診断は、多くの注意を受ける。なぜならば、これらの癌のほとんどは遺伝的異常を有するからである。技術の中では、免疫組織化学 (IHC) および免疫細胞化学 (ICC) が、結腸直腸癌形成を評価するのに広く用いられている。種々の結腸直腸癌腫マーカーが、医師がタイムリーに正確な診断をなすのを助け、良好な患者管理を有意に提供することが見出されている。あいにく、これらの腫瘍マーカーのいずれも、高い感度および特異性双方を持つ「魔法の弾丸」ではない。従って、診断の精度を高めるための代替方法が必要である。

30

【0474】

診断精度を高めるための代替法は、その各々が結腸直腸癌に関連するマーカーに特異的に結合する複数のプローブを含むパネルを開発することである。全ての候補プローブは、ICC技術でテストされるべきである。いくつかの態様においては、検体は結腸洗浄から得ることができる。結腸洗浄から得られた細胞学的検体は、しばしば、組織セクションよりも細胞数が少ないが、高い品質のポリクロナルまたはモノクロナル抗体の使用を用いて、良好なアッセイ性能を確実にすることができる。いくつかの態様において、現実の患者検体をテストする前に、腫瘍細胞を細胞懸濁液にスパイクすること (spiking) によってテストスライドを作成することができる。他の態様においては、しばしば組織セクションよりも少数の細胞を有する結腸洗浄による制限は、年齢、性別、診断、腫瘍グレード、腫瘍サイズ、臨床的段階などのような、できる限り変数に近くマッチする患者を調べることによって克服することができる。

40

【0475】

一旦検体を収集すれば、検体を処理し、分析する。肺癌について前記したように、統計

50

学的分析を用いてパネルを設計する。処理の間、粗い洗浄の間にスライドに粘着しない細胞スミアまたはペレットのような技術的問題がいくつかの態様で起こり得る。しかしながら、そのような問題はソフトウェアの操作、またはそのような問題を解決する染色プロトコルの修飾によって容易に取り組むことができる。いくつかの態様においては、自動的に検体をサンプリングし、診断用のスライドを調製するデバイスを用いて検体を処理し、分析する。広いメニューのプロープが最初に用いられると予測される。プロープの数を適切なサイズのパネルとなるまで削除して、高レベルの感度および特異性を保持する。最終プロープの選択は、陽性染色腫瘍細胞のパーセンテージの予め規定された閾値に基づくであろう。巧妙な統計学的分析を使用して、これらの決定を行う。悪性疾患検出に対するパネル-アッセイアプローチは固形腫瘍に適用できるので、同一腫瘍マーカーのいくつかは異なるパネルにあり、この方法を平行して、ならびに系統的に行うことができる。このようにして、アッセイ開発プロセスを実行することができる。

10

【0476】

5つのサブタイプ（腺癌、扁平細胞癌腫、小細胞癌腫、大細胞癌腫、および中皮腫）を有する肺癌と比較して、結腸直腸上皮性腫瘍は圧倒的に腺癌である。これは、結腸直腸腫瘍パネルが癌のただ一つのタイプに特異的に標的化されるようにする。パネルはバイオプシーによるまたは結腸切除による組織のいずれかでテストできるので、非常に多数の細胞学的検体は必要でない。

【0477】

プロープ/マーカーのライブラリー

20

癌マーカーについての情報を含む種々の情報源をレビューした。結腸直腸癌腫の20%以上の陽性の任意基準を用いて、結腸直腸癌の検出および/または診断用の好ましいパネルのためのプロープを選択した。用語「20%以上の陽性」は、もし100の腫瘍症例を調べれば、これらの症例の20以上が個々のマーカーの存在を示し、他方、残りの80の症例が個々のマーカーの存在を示さないことを意味する。好ましいパネルはAKT、 β -カテニン、脳型グリコーゲンホスホリラーゼ（BPG）、カベオリン-1、CD44v6、cFLIP、クリプト-1、アンフィレグリン、サイクリンD1、シクロオキシゲナーゼ（COX-2）、サイトケラチン20（CK20）、癌胎児性抗原（CEA）、E-カドヘリン、Bcl-2、Bax、hMLH1、hMSH2、表皮成長因子受容体（EGFR）、エフリン-B2（Eph-B2）、エフリン-B4（Eph-B4）、FasL、HMGI（Y）、Ki-67、リゾチーム、マトリリシン（MMP-7）、p16、p68、網膜芽腫（Rb）、cdk2/cdc2、S100A4、YB-1およびp53から選択される分子マーカーを含むことができる。本例で利用したプロープ/マーカーのライブラリーの簡単な記載を以下に掲げる。

30

【0478】

AKT

これは、強い抗アポトーシス活性を持つプロトオンコジーンである。このセリン-スレオニンキナーゼは多数の悪性疾患で過剰に発現される。Roy et alは、正常な結腸粘膜および過形成ポリープが、結腸直腸癌で観察された劇的なAKT免疫反応性（57%陽性）とは顕著に対照的に、有意なAKT発現を呈しないことを示した。加えて、AKTは、結腸癌形成の間に初期事象としてこのプロトオンコジーンの過剰発現を示す腺腫の57%で検出された（Roy, H.K., et al., AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. Carcinogenesis 2002.23(1): p.201-5）。

40

【0479】

β -カテニン

腫瘍抑制遺伝子、腺腫様結腸ポリポーシス（APC）は、散在性結腸直腸癌腫の80%で検出されている。それらは小さなサイズの腺腫および新形成の危険性を伴う最も小さな病巣、形成異常腺窩巢においてさえ起こる。APC遺伝子の産物は細胞内 β -カテニンを調節する。研究は、突然変異したAPCが減少した代謝回転速度を引き起こし、 β -カテニンの蓄積に導くことを示した。Herter et alは、症例の大部分において、 β -カテニン直線状増加の発現レベルのみならず、腺腫と癌腫との β -カテニンの異なる位置も発見した。温和なおよび中程度の形成異常を伴う腺腫では、 β -カテニンは核にのみ存在する。ひどい形成異

50

常腺腫および癌腫においては、それは細胞質および核双方に存在する。正常な直腸粘膜においては、弱い染色のみが細胞間の境界膜および細胞質にある。これらの結果は診断および臨床目的では重要であり得る。なぜならば、 β -カテニンの核存在は結腸直腸悪性疾患の最も早い分子証拠であり得るからである。(Herter,P.,et al.,Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas,carcinomas and Peutz-Jeghers polyps .J Cancer Res Clin Oncol,1999.125(5):p.297-304)。

【0480】

脳型グリコーゲンホスホリラーゼ (BPG)

脳型グリコーゲンホスホリラーゼ (BPG) はユニークな腸悪性疾患マーカーである。それは3つの主なイソ形態：筋肉、肝臓および脳を有する。以前、胃癌腫は、免疫化学 (IHC) 技術を通じてBPGの異常な発現と関連することが示されている。Tashima et alによる新しい研究は、BPGがIHCにより結腸直腸癌腫の83%に存在することを初めて証明した。そして、より興味深いことには、遠隔部位からの正常な結腸粘膜はBPGに対して陰性であり、他方、腫瘍に隣接する明らかに正常に見える粘膜は陽性である (Tashima,S.,et al.,Expression of brain-type glycogen phosphorylase is a potentially novel early biomarker in the carcinogenesis of human colorectal carcinomas Am J Gastroenterol,2000.95(1):p.255-63)。

【0481】

カベオリン-1

これは、小胞、原形質膜の小胞陥入の主要構造タンパク質である。研究は、カベオリンファミリーのメンバーが、G-プロテインHa-ras、Srcファミリーチロシンキナーゼおよび表皮成長因子受容体 (EGFR) を含むシグナリング分子を組織化するように機能する、カベオリン足場と呼ばれる共通のドメインを含むことを証明した。インビトロおよびインビボ動物実験は細胞形質転換および乳癌形成におけるカベオリン-1の抑制効果を示しているが、ヒト乳癌および前立腺癌の研究を含めた他の研究は主要形成および進行とのカベオリン-1発現の正の関係を明らかにし、これは腫瘍促進機能を示唆する。Fine et alの研究は、結腸腺癌の88%がIHCによりカベオリン-1につき陽性であることを記した (Fine,S.W.,et al.,Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon.Am J Clin Pathol,2001.115(5):p.719-24.)

【0482】

CD44v6

これは、細胞間および細胞およびマトリックス間相互作用に関与し得る広く発現される細胞表面糖タンパク質である。豊富なCD44は正常な上皮および造血系起源の細胞に存在する。対照的に、交互にスプライスされたCD44変種 (CD44v) は細胞および上皮起源の腫瘍で圧倒的に発現される。いくつかの報告は、進行した段階の結腸直腸癌腫を伴うCD44v6の発現を示している。IshidaはIHC技術を通じて63結腸直腸癌腫患者を調べ、症例の59%がCD44v6につき陽性であることを見出した。正常な結腸粘膜はCD44v6につき陰性である (Ishida,T.,Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma.Surg Today,2000.30(1):p.28-32)。

【0483】

細胞FLICE様阻害タンパク質 (cFLIP)

細胞FLICE様阻害タンパク質 (cFLIP) はFas媒介アポトーシスの内因性阻害性レギュレーターである。cFLIPの生理学的機能は未だ解明されていないが、腫瘍を含む疾患における病原性関係が疑われている。さらに、最近、cFLIPの過剰発現がT細胞免疫性からの腫瘍細胞の逃避をもたらし、これは、恐らくは、腫瘍の樹立および増殖に関連すると報告されている。Ryu et alは、結腸腺癌の100% (52/52) がcFLIPにつき陽性であることを証明した。通常の結腸上皮腺様ポリープがかなり低い染色強度を有する (Ryu,B.K.et al.,Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma.J.Pathol,2001.194(1):p.15-9)。

【0484】

クリプト-1およびアンフィレグリン

クリプト-1 (CR-1) およびアンフィレグリン (AR) は表皮成長因子 (EGF) 関連ペプチドである。いくつかの報告は、インビトロでARおよびCR-1がヒト結腸上皮細胞でオートクリン成長因子として機能することを証明している。さらに、ARおよびCR-1はヒト一次結腸癌腫の大部分で発現されることが証明されている。特に、ARまたはCR-1タンパク質いずれかの過剰発現が、ヒト結腸腺腫および癌腫のほぼ70%でIHCにより見出されている (De Angelis E. et al., Expression of cripto and amphiregulin in colon mucosa from high risk colon cancer families, *Int J Oncol*, 1999 14 (4) : p.437-40)。

【0485】

サイクリンD1

このタンパク質は、細胞増殖において重要な役割を演じる。サイクリンD1の突然変異および/または改変された発現は新形成に関与する。サイクリンD1の増大した発現は食道癌、頭部癌、頸癌、肝臓癌、乳癌および結腸直腸癌で観察される。Arber et alによる研究は、結腸直腸腺癌の30%および腺腫様ポリープの34%において増大したサイクリンD1染色を明らかにしたが、過形成ポリープまたは正常な粘膜では明らかにしなかった (Arber, N. et al., Increased expression of cyclin D-1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*, 1996. 110 (3) : p.669-74)。

【0486】

シクロオキシゲナーゼ (COX-2)

これは、アラキドン酸代謝に関与するプロスタグランジンシンターゼ酵素である。証拠は、非ステロイド抗炎症薬物 (NSAID) の結腸直腸癌に対する腫瘍抑制効果を示している。なぜならば、NSAIDの腫瘍抑制効果はCOX-2活性によるらしいからである。Sakuma et alは、結腸直腸癌の38%がCOX-2陽性であることを証明した。COX-2染色は非癌性組織におけるよりは癌組織の領域においてより強かった。いくつかの検体において、癌に近い組織は癌とはさらに離れた組織よりも強く染色された (Sakuma, K. et al., Cyclooxygenase (COX) -2 immunoreactivity and relationship to p53 and Ki-67 expression in colorectal cancer. *J Gastroenterol*, 1999. 34 (2) : p.189-94)。

【0487】

サイトケラチン20 (CK20) および癌胎児性抗原 (CEA)

これは周知の結腸直腸癌腫マーカーである。それらは多くの科学論文で報告されている。それらは結腸直腸腫瘍に特異的ではないが、Lagendijk et alによる一つの研究は、免疫組織化学的には、CK20およびCEAは、乳癌腫および一次卵巣癌腫から卵巣癌へ転移性結腸腺癌を分化させる二つの鍵となる区別マーカーである (Lagendijk, J.H et al., Immunohistochemical differentiation between primary adenocarcinomas of the ovary and ovarian metastases of colonic and breast origin. Comparison between a statistical and an intuitive approach. *J Clin Pathol*, 1999. 52 (4) ; p283-90)。

【0488】

E-カドヘリン、p53、Bcl-2、Bax、hMLH1、hMSH2

Kapiteijn et alおよびBukholm et alは別々の研究において結腸直腸癌の癌形成に関与する多数の癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子を発見した。E-カドヘリン、p53、Bcl-2、Baxは、全て、腫瘍細胞において20%よりも大きな免疫染色を示した。ミスマッチ修復遺伝子、hMLH1およびhMSH2もかなり増大する。これらの修復遺伝子はDNA複製の間に遺伝的「ブルーフリーディング」に関与し、よって、ケアテイカー遺伝子と言われる。これらの遺伝子の突然変異は、胃腸悪性疾患の初期発生に関与することが示されている。(Kapiteijn, E. et al., Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J. Pathol*, 2001. 195 (2) : p.171-8; Bukholm, I. K. and J. M. Nesland, Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch*, 2000. 436 (3) ; p.224-8)。Yantiss et alは、p53およびE-カドヘリンが誤って置かれた上皮を持つ腺腫を侵入性腺癌を持つ腺腫から弁別する二つのマーカーであることを示してお

10

20

30

40

50

り、これは、結腸直腸細胞についてのこれらの二つのマーカーの特異性を示す (Yantiss, R.K. et al., Utility of MMP-1, p53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. Am J Surg Pathol, 2002. 26 (2) : p. 206-15)。これらのマーカーはほとんど全ての固形腫瘍に共通している。

【0489】

表皮成長因子受容体 (EGFR)

表皮成長因子受容体 (EGFR) は170キログルトンの膜貫通細胞表面受容体である。それは、c-erb B-2、c-erb B3、およびc-erb B4と共に、チロシンキナーゼ活性を有し、c-erb B-2プロトオンコジーンによってコードされている。キメラ抗EGFRモノクローナル抗体は、進行した段階の結腸腺癌に対する調査中の療法である。増大したレベルのEGFRが、肺、頭部、首、頸部、胸、前立腺および膀胱の結腸直腸癌腫、扁平細胞癌腫を含む多くの固形腫瘍で発見されている。Goldstein et al.による一つの研究は、結腸直腸腺癌の75%がEGFR免疫組織化学陽性を有することを示した (Goldstein, N.S. and M. Armin, Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. Cancer, 2001. 92 (5) : p. 1331-46)。

10

【0490】

エフリン-B2 (Eph-B2) およびエフリン-B4 (Eph-B4)

エリスロポエチンを生産する増幅された配列 (Eph) ファミリーは、受容体チロシンキナーゼ (RTK) の最大のサブファミリーである。Eph-B2およびB4はEphに結合するリガンドである。エフリン-Eph系は神経および血管系の発生学的な発生および分化で重要である。いくつかの研究は、エフリンの高い発現は腫瘍増殖、腫瘍形成および転移についての増大した潜在能力と関連させることができることを示している。免疫組織化学分析を用い、Liu et al.は、Eph-B2およびEph-B4が、隣接する正常粘膜と比較して、調べた症例の100% (5/5) においてより高い染色強度を有することを示した (Liu, W., et al., Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. Cancer, 2002. 94 (4) : p. 934-9)。

20

【0491】

FasL

これは、腫瘍壊死因子スーパーファミリーの膜貫通タンパク質メンバーであって、その受容体Fasを発現するアポトーシス感受性細胞において細胞死滅を誘導する (CD95/APO-1)。FasLがいくつかのタイプの癌において上方調節されるのは広く証明されている。さらに、インビトロおよびインビボ研究は、FasLが、抗腫瘍免疫エフェクター細胞においてアポトーシスを誘導することによって、癌細胞がFas逆襲を開始させ、免疫応答を損なわせることができることを示した。これらの発見は、癌細胞によるFasL発現が、抗腫瘍免疫応答の阻害における重要な因子であり得ることを示唆する。Belluco et al.は、FasL発現が癌腫および結腸直腸腫瘍形成の比較的初期の事象である。FasL発現は過形成ポリープの28%、低グレードポリープの76%および高グレードのポリープの93%で見出された (Belluco, C. et al., Fas ligand is up-regulated during the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Eur J Surg Oncol, 2002. 28 (2) : p. 120-5)。結果は、FasL発現が癌腫の81%および腺腫の41%で検出されたという他の発見と一致している。さらに、FasLは、低グレードの腺腫におけるよりも高グレードの形成異常腺腫において有意により頻繁に発現された。

30

40

【0492】

HMG1 (Y)

タンパク質HMG-1、HMG-YおよびHMG1-Cは、高移動性グルーPIプロテインファミリーを構成する。最初の2つのタンパク質は代替スプライシングを通じて同一の遺伝子HMG1 (Y) によってコードされ、他方、HMG1-Cは異なる遺伝子の産物である。HMG1遺伝子は良性および悪性腫瘍の発生に関与している。従前の報告は、HMG1 (Y) タンパク質が結腸癌腫細胞

50

系および組織で豊富に発現されるが、正常な結腸粘膜ではそうではないことを示した。Chiappetta et alは、36の結腸直腸癌腫が全てIHCによるとHMGI(Y)につき陽性であり、他方、正常な結腸粘膜では発現は検出されなかったことを見出している。腺腫におけるHMGI(Y)発現は細胞異型性の程度に密接に関連していた。テストした18の非新形成ポリープのうちの2つのみがHMGI(Y)陽性であった(Chiappetta,G.et al.,High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases.Int J Cancer,2001.91(2):p.147-51)。これらの結果は、HMGI(Y)タンパク質誘導が結腸細胞の新形成形質転換の初期段階に関連しており、結腸細胞過剰増殖には稀にしか関連していない。

【0493】

10

Ki-67

Ki-67は細胞増殖核マーカーである。それは結腸直腸癌を含む種々の腫瘍で発現される。Sakuma et alによる1つの研究は、結腸直腸癌の48%がKi-67につき陽性であることを証明した(Sakuma,K.et al.,Cyclooxygenase(COX)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and Ki-67 expression in colorectal cancer.J Gastroenterol,1999.34(2):p.189-94)。

【0494】

リゾチーム

リゾチームは、広域スペクトルの抗菌活性を持つ酵素である。それは、唾液、涙、ミルク(mil)、血清、胃腸液および小腸液を含む多数のヒト組織液および分泌物に存在する。リゾチームは通常の結腸上皮には存在しない。興味深いことには、多数の免疫組織化学研究が、胃腺腫および腺癌の腫瘍細胞におけるリゾチームの発現を示した。多くの研究は、28%~80%の範囲の結腸癌におけるリゾチーム陽性を示しており、他方、腺癌に隣接する正常な結腸腺はいずれのリゾチームタンパク質発現も示さなかったことを示している(Yuen,S.T.et al.,Up-regulation of lysozyme production in colonic adenomas and adenocarcinomas.Histopathology,1998.32(2):p.126-32)。

20

【0495】

マトリリシン(MMP-7)

マトリリシンはMMP遺伝子ファミリーのメンバーであって、コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、ラミニン、フィブロネクチンおよびカゼインのような基質範囲に対してタンパク質分解活性を有する。それは、食道、結腸直腸、胃、頭部、頸、肺、前立腺および肝細胞癌腫のような悪性腫瘍細胞によって生産される。免疫組織化学研究は、マトリリシンの発現が胃および結腸直腸癌腫において結節性または遠隔転移に有意に関連することを示している。Masaki et alによる研究は、結腸直腸癌腫の34%がマトリリシンにつき陽性であることを示した。(Masaki,T.et al.,Matrilysin(MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas.Br J Cancer,2001.84(10):p.1317-21)。

30

【0496】

p16

これは、細胞周期阻害剤および主要腫瘍抑制タンパク質である。腸新形成におけるp16についての役割は、プロモーター領域がヒト結腸腫瘍のサブセットでメチル化されるという観察によって示唆される。Dai et alは、p16発現は正常な粘膜、および28の一次結腸癌腫のうちの18、および5つの転移性結腸癌腫のうちの5で非常に低かったことを示した。加えて、p16染色はKi-67、サイクリンAおよび網膜芽腫タンパク質のそれと逆相関し、これは、細胞周期の進行が阻害されたことを示唆する(Dai,C.Y.et al.,p16(INK4a) expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation.Gastroenterology,2000.119(4):p.929-42)。

40

【0497】

p68

これは、ウイルスおよび細胞タンパク質合成双方の調節において鍵となる因子であるイ

50

ンターフェロン誘導性プロテインキナーゼである。その発現は、正常および新形成細胞型双方における細胞分化に相関する。Singh et alは、p68は結腸直腸癌腫患者の76%において陽性であることを見出した。正常な結腸粘膜は弱いp68染色を示した。高いp68発現は改良された生存に向かう傾向を示した。高レベル(3~4+)のp68を発現する腫瘍を持つ患者は、より低いp68発現を持つ患者と比較してより長く5年生存率を有した(Singh, C. et al., Expression of p68 in human colon cancer. *Tumour Biol*, 1995. 16(5): p. 281-9)。

【0498】

Rbおよびcdk2/cdc2

網膜芽腫(Rb)遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であって、その産物pRBは細胞周期の陰性でレギュレーターとして作用することが知られている。遺伝子改変に由来するpRB発現の欠如は、肺、胸および膀胱の骨肉腫および癌腫を含むいくつかの悪性疾患の形成を担うと考えられる。対照的に、結腸直腸癌は、報告されているところによると、この遺伝子のまれな不活化を示し、サザンブロット分析は結腸直腸癌のほぼ30%におけるRb遺伝子増幅を示した。Yamamoto et alは、ウェスタンブロットによってRbおよびその関連キナーゼ、cdk2およびcdc2を研究し、結腸直腸癌腫における増大したレベルのcdk2/cdc2ならびに過剰リン酸化形態を見出した。さらに、免疫組織化学研究は、cdc2/cdc2がpRBについて陽性の癌細胞で専ら発現されたことを示した。これらの結果は、結腸直腸癌におけるcdk2/cdc2の発現の増加は、リン酸化を通じてpRBが細胞周期にブレーキをかけるのを防ぐことができることを示唆する(Yamamoto, H. et al., Coexpression of cdk2/cdc2 and retinoblastoma gene products in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1995. 71(6): p. 1231-6)。

【0499】

S100A4

これはカルシウム結合タンパク質であって、細胞不死化、細胞増殖、乳房上皮幹細胞の筋上皮様細胞への分化、および線維形成に関与することが示唆された。加えて、S100A4は、転移性腫瘍細胞で特異的に発現されると報告されている。Takenaga et alは、病巣癌腫の44%および腺癌の94%が免疫陽性であって、他方、腺腫のいずれも陽性ではないことを観察した。興味深いことには、免疫陽性細胞の発生は侵入の深さに応じて増大し、肝臓の14の転移においてほとんど全ての癌腫細胞が陽性であった。これらの結果は、S100A4が腺癌から腺腫を弁別する良好なマーカーであり、結腸直腸新形成細胞の進行および転移プロセスに関与し得ることを示唆する(Takenaga, K. et al., Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(12Pt1): p. 2309-16)。

【0500】

Yボックス結合タンパク質(YB-1)

前記Yボックス結合タンパク質(YB-1)は、高度に保存された寒冷ショックドメインを含み、逆転CCAATボックス(Yボックス)と相互作用するDNA結合タンパク質のファミリーのメンバーである。YB-1は広い範囲の細胞型で発現され、細胞増殖に関与する種々の遺伝子の調節に関連付けられている。それは、また、シスプラチン耐性肝臓癌系で過剰発現され、これは、YB-1が転写因子としてのその役割に加えて、DNA修復またはDNA損傷応答いずれかに関与し得ることを示唆する。Shibao et alは、YB-1が、正常な粘膜と比較してほとんど全てのクラスの結腸直腸癌腫で過剰発現されたことを示した(Shibao, K. et al., Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer*, 1999. 83(6): p. 732-7)。

【0501】

結腸直腸癌腫パネルの利用性

結腸直腸癌腫パネルは、結腸直腸癌腫の初期発見のためのマーカーのみならず、転移性能力および予後を評価するためのマーカーも含む。例えば、陽性CEA(癌胎児性抗原)反応は、結腸直腸癌腫の分化のグレードと有意な関係を有し、他方、この抗原の散漫な細胞発現は、しばしば、腸壁を越えて伸び、リンパ管に侵入する新生物を示す。発現された組織抗原の数は、腸壁を通じて拡大した腫瘍の程度に有意に関係する(Lorenzi, M. et al., H

istopathological and prognostic evaluation of immunohistochemical findings in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*, 1997. 12 (2) : p.68-74)。また、血清CEAレベルおよびp53タンパク質の発現は、結腸直腸癌に対する相補的予後情報を提供する。p53の陽性免疫染色および上昇したCEAレベルは低い累積疾患でない生存に関連し、独立した予後重要性を有することが示された (Diez, M. et al., Time-dependency of the prognostic effect of carcinoembryonic antigen and p53 protein in colorectal adenocarcinoma. *Cancer*, 2000. 88 (1) : p.35-41)。Nasierowska-Guttmejerおよび同僚 (Nasierowska-Guttmejer, A., The comparison of immunohistochemical proliferation and apoptosis markers in rectal carcinoma treated surgically or by preoperative radio-chemotherapy. *Pol J Pathol*, 2001. 52 (1-2) : p.53-61) は、Ki-67の低発現および高レベルのBax発現が、治療に対する結腸直腸癌の全体的、またはほとんど全体的応答、および腫瘍塊の退行に10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2

、DNA複製の間に「ブルーフリーディング」を担う。もう1つのマーカー、p53は染色体17に位置し、70%より多くの結腸直腸癌は染色体17pにおいて喪失を有する。サイトケラチン20(CK20)は結腸直腸癌腫で終始一貫して発現され、陰性サイトケラチン7(CK7)染色とカップリングさせた場合、前記組合せ(CK20+/CK7-)は結腸直腸癌腫に対して高度に特異的である(Chu,P.,E.Wu and L.M.Weiss,Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases.Mod Pathol,2000.13(9):p.962-72)。結腸直腸癌腫に関するこれらの腫瘍マーカーの重要性は以下に詳細に記載する。

【0503】

β-カテニン

家族性腺腫様ポリポーシス(FAP)およびガードナー症候群の基礎となる遺伝した欠陥は5q21、APC腫瘍抑制遺伝子の部位にマッピングされている。APCタンパク質は、細胞内接着分子E-カドヘリンを含む細胞接着分子複合体中の細胞骨格タンパク質β-カテニンに結合する。β-カテニンは癌遺伝子としても作用することができる。それがE-カドヘリンに結合していない(従って、細胞間接着に参画する)場合、β-カテニンは、他の遺伝子を活性化するT細胞因子リンパ様エンハンサー因子(Tcf-Lef)タンパク質として知られたタンパク質パートナーのtファミリーに結合する。このβ-カテニン:Tcf複合体によって活性化された遺伝子は、細胞増殖を刺激し、アポトーシスを阻害するものを含むと考えられる。β-カテニンに結合するAPCは分解を指令し、それにより、β-カテニン:Tcfシグナリング経路を阻害する。前記APC遺伝子における突然変異はβ-カテニンに対するAPCタンパク質の親和性を低下させ、一方では、細胞内接触の喪失、他方、β-カテニンの増大した細胞質プールに導く。Tcf媒介細胞増殖の得られた増強は、癌腫の発生に対して素因となる事象の系列を開始させる(Peifer,M.,Beta-catenin as oncogene: the smoking gun.Science,1997.275(5307):p.1752-3)。よって、APCは「ゲートキーパー」遺伝子と見なされる。APCにおける突然変異はFAPの基礎となり、散在性結腸癌の発生における初期事象であり、突然変異は結腸直腸癌腫の85%に見出される(Crawford,J.M.,The Gastrointestinal Tract,in Robbins Pathologic Basis of Disease,R.S.e.a.Cotran,Editor.1999,W.B.Saunders Company: Philadelphia,p.775-843)。注目すべきは、APCにおける突然変異無しの腫瘍のほとんどはβ-カテニンにおいて突然変異を示す。

【0504】

hMSH2およびhMLH1

DNA修復に關与する遺伝子のいずれかにおける遺伝した突然変異は、推定によると、HNPCCの家族性症候群を担う。これらのミスマッチ修復遺伝子、hMSH2、hMLH1は、DNA複製の間に遺伝的「ブルーフリーディング」に關与し、よって、「ケアテイカー」遺伝子と言われる。ヒトゲノムには50,000~100,000ジヌクレオチド反復配列があり、ミスマッチ修復遺伝子における突然変異は、これらの反復における広く普及した改変の存在によって検出することができる。これをマイクロサテライト不安定性という。突然変異体DNA修復遺伝子を遺伝した患者は、残存する正常対立遺伝子のため正常な修復活性を有する。しかしながら、いくつかの器官(結腸、胃、子宮内膜)中の細胞は、野生型対立遺伝子を不活化する第二の体細胞突然変異に罹りやすい。突然変異は正常の1000倍までの突然変異率が起こり、従って、HNPCC腫瘍のほとんどはマイクロサテライト不安定性を示す。これらの遺伝子の突然変異は胃腸癌の初期発生に關与することが示されている(Kapiteijn,E.et al.,Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer.J.Pathol,2001.195(2):p.171-8; Bukholm,I.K.and J.M.Nesland,Protein expression of p53,p21(WAF1/CIP1),bcl-2,Bax,cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas.Virchows Arch,2000.436(3):p.224-8)。

【0505】

p53

染色体17pにおける喪失は結腸癌の70~80%で見出されている。これらの染色体欠失はp53遺伝子に影響し、これは、p53における突然変異が結腸癌形成の後期に起こることを示唆する。また周知のように、p53は細胞周期調節において臨界的役割を演じる。結腸癌の

癌形成に対してマルチヒット概念が仮定されている。APC突然変異は、通常、最も早く、恐らくは、散在性結腸癌の約80%における開始事象であり、ミスマッチ修復遺伝子における突然変異からの寄与は頻度が低い。腺腫から癌腫への後に起こる進行の間に、染色体17p上のp53および染色体18q上のDCC領域におけるヘテロ接合性（LOH）の後期突然変異または喪失のようなさらなる突然変異が続く。従って、ゲノムにおける累積的変化は、異常形成のサイズ、レベル、および新形成病巣の侵入能力に導く（Crawford, J.M., The Gastrointestinal Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S.e.a. Cotran, Editor. 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 775-843）。

【0506】

サイトケラチン20（CK20）

CK20は低い分子量の中間径フィラメントである。それは、その制限された範囲の発現のため特に関心対象である。CK20は正常および悪性上皮で終始一貫して発現される。発現は胃および腸の上皮およびメルケル細胞に制限される。免疫組織化学技術によって種々の器官系からの上皮新生物を数百調べる研究は、結腸直腸癌腫の実質的に全ての症例がCK20陽性であることを示した（Chu, P., E. Wu and L.M. Weiss, Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. Mod Pathol, 2000. 13 (9) : p. 962-72）。CK20/CK7免疫プロファイルの組合せは、細胞学的検体における転移性腫瘍の主要な部位を同定するにおいて特に有用である。CK20+ /CK7-は、結腸直腸が主要な部位である細胞ブロックで観察されるに過ぎない（Blumenfeld, W. et al., Utility of cytokeratin 7 and 20 subset analysis as an aid in the identification of primary site of origin of malignancy in cytologic specimens. Diagn Cytopathol, 1999. 20 (2) : p. 63-6）。Ascoliおよび同僚（Ascoli, V. et al., Utility of cytokeratin 20 in identifying the origin of metastatic carcinomas in effusions. Diagn Cytopathol, 1995. 12 (4) : p. 303-8）は、免疫組織化学によるCK20発現は結腸起源からの悪性滲出において終始一貫して観察されたと判断した。

【0507】

本実施例を通じて以下の略語を用いた。APC = 腺腫様結腸ポリポーシス、AR = アンフィレグリン、BGP = 脳型グリコーゲンホスホリラーゼ、CD44v6 = CD44スプライス変種6、CEA = 癌胎児性抗原、CFLIP = 細胞FLICE様阻害性タンパク質、CK = サイトケラチン、COX = シクロオキシゲナーゼ、CR-I = クリプト、EGFR = 表皮成長因子受容体、EphB = エリスロポエチンを生産する増幅された配列、FasL = Fasリガンド、FOBT = 糞閉塞血液テスト、HNPCC = 遺伝性非ポリポーシス結腸癌、ICC = 免疫細胞化学、IHC = 免疫組織化学、MLH = ヒトミスマッチ修復遺伝子、MMP = マトリリシン（MMP-7）、MSH = ヒトミスマッチ修復遺伝子、PLAP = 胎盤アルカリ性ホスファターゼ、Rb = 網膜芽腫およびYB = Yボックス結合タンパク質。

【0508】

III. 膀胱癌

膀胱の新生物は生物学および臨床的挑戦を提示する。米国におけるこれらの上皮腫瘍の発生は過去数年間に確実に増加し、今や、毎年50,000より多くの新しい症例に達する。これらの新生物の検出および管理の改良にもかかわらず、死亡者数は毎年依然として約10,000のままである（Crawford, J.M. and R.S. Cotran, The Lower Urinary Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, T. Collins, Editor. 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 1003-1008）。現在、膀胱癌をスクリーニングし、検出するための信頼できる方法は存在しない。従って、初期段階で膀胱腫瘍を検出するための良好な方法が罹患率および死亡率を減少させるために必要である。

【0509】

膀胱腫瘍の95%を超えるものが上皮起源であり、残りは間葉腫瘍である。上皮腫瘍のほぼ90%は移行細胞から構成され、移行細胞癌腫（TCC）と呼ばれ、他方、残りの10%は扁平および腺癌腫である。TCCは米国において5番目に最も普通に見られる悪性疾患であり、2番目に最も普通に見られる悪性疾患は尿生殖器癌腫である。TCCは2つの主なカテゴリー：低グレードおよび高グレードに分けられる。低グレードTCCは、常に、正常な移行上皮

10

20

30

40

50

を繰り返す乳頭状非侵入性病巣である。これらの症例は優れた予後を有する。高グレードTCCは乳頭状、結節性または双方であり得、かなりの細胞多形現象および退生を呈する。それらは膀胱腫瘍の50%を占め、転移能力を有し、診断から10年以内に症例の60%は致死性である (Crawford, J.M. and R.S. Cotran, The Lower Urinary Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, T. Collins, Editor, 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p. 1003-1008)。

【0510】

尿細胞学は慣用的なスクリーニング方法であって、高グレード膀胱腫瘍についての有用な診断情報を提供する (Koss, L.G. et al., Diagnostic value of cytology of voided urine. *Acta Cytol*, 1985. 29 (5) : p. 810-6)。しかしながら、低グレード腫瘍における形態学的変化の欠如のため、低グレード乳頭状移行細胞癌腫 (TCC) の検出におけるその効率は信頼性が低い (Busch, C. et al., Malignancy grading of epithelial bladder tumours. Reproducibility of grading and comparison between forceps biopsy, aspiration biopsy and exfoliative cytology. *Scand J Urol Nephrol*, 1977. 11 (2) : p. 143-8; Murphy, W.M. et al., Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. *Cancer*, 1984. 53 (7) : p. 1555-65; Shenoy, U.A., T.V. Colby and G.B. Schumann, Reliability of urinary cytodiagnosis in urothelial neoplasms. *Cancer*, 1985. 56 (8) : p. 2041-5)。膀胱鏡検査は患者にとって侵襲的であって、面倒である。外方増殖性腫瘍は膀胱鏡検査によって信頼性よく診断されるが、平坦なTCC、特にインサイチュールにおける癌腫は内視鏡のジレンマのままである (Lin, S. et al., Cytokeratin 20 as an immunocytochemical marker for detection of urothelial carcinoma in atypical cytology: preliminary retrospective study on archived urine slides. *Cancer Detect Prev*, 2001. 25 (2) : p. 202-9; Heicappell, R. et al., Evaluation of urinary bladder cancer antigen as a marker for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Scand J Clin Lab Invest*, 2000. 60 (4) : p. 275-82)。典型的には、尿細胞学および膀胱鏡検査双方は、必要な場合には、バイオプシーと一緒に用いて、診断の感度を最適化する。これらのテストは単独で、または組み合わせて、再発または疾患進行の初期検出または評価には不十分である。

【0511】

免疫細胞化学 (ICC) は人気を獲得しつつある。なぜならば、それは非侵入性であって、尿細胞学と比較して増大した感度を有するからである。核マトリックスタンパク質 (NMP22) およびヒト補体因子H関連タンパク質 (BTA stat) についての尿テストが数年間販売されていたが、それらは膀胱鏡検査の使用について限定されたインパクトを有した。NMP22はBTA statよりも感度が高いが、それらは共に不十分な特異性および偽陽性率に悩んでおり、それが問題である (Ramakumar, S. et al., Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol*, 1999. 161 (2) : p. 388-94; Ross, J.S. and M.B. Cohen, Detecting recurrent bladder cancer: new methods and biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*, 2001. 1 (1) : p. 39-52)。しかしながら、FDAは、最近、Matritechからの改良されたNMP22アッセイ、ImmunoCytを認可した。この新しいアッセイは2つの抗体を含み、家庭用妊娠テストのように働く。そのクレームはより低い偽陽性率を含む。なぜならば、前記アッセイは、尿中の血液の存在、および膀胱鏡検査と組み合わせた増大した診断精度によって影響されないからである。ImmunoCytは蛍光マーカーで標識した3つの腫瘍マーカーのカクテルである。それはムチン糖タンパク質および膀胱において腫瘍細胞によって発現された癌胎児性抗原 (CEA) の形態を認識する。しかしながら、それは再発膀胱癌のスクリーニングではなくモニタリングで用いられ、レビューするのに蛍光顕微鏡を必要とする (Mian, C. et al., Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol*, 1999. 161 (5) : p. 1486-9)。

【0512】

免疫組織化学 (IHC) は、臨床泌尿器科医に対して膀胱癌の最も広く用いられる評価方法である。調べられ、膀胱癌についての臨床決定実行プロセスで役割に値するほとんどの

腫瘍マーカーはIHCの適用から展開された (Williams, S.G., M. Buscarini and J.P. Stein, Molecular markers for diagnosis, staging, and prognosis of bladder cancer. *Oncology (Huntingt)*, 2001. 15 (11) : p. 1461-70, 1473-4, 1476; discussion 1476-84)。あいにく、膀胱癌を検出するための腫瘍マーカーのいずれも、高い感度および特異性を共に持つ「魔法の弾丸」ではない。診断の精度を高めるための代替方法が必要である。

【0513】

診断の精度を高める代替方法は、その各々が膀胱癌に関連するマーカーに特異的に結合する複数のプローブを含むパネルを開発することである。各候補プローブはIHCまたはICCによってテストされるべきである。ICCについては、検体は、尿試料であることが多い。IHCよりはむしろICCを行う兼ね合いは、尿細胞学的検体が通常は組織セクションよりも少数の細胞を有することである。いくつかの態様において、高品質のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、アッセイの良好な性能を確実にする。他の態様において、年齢、性別、診断、腫瘍グレード、腫瘍サイズ、臨床段階などにおいてできる限り近い患者を調べることができる。さらなる態様において、同一患者は、可能な限りしばしば医療的に示された尿収集を有することができる。加えて、腫瘍細胞を細胞懸濁液にスパイクし、現実の患者検体がテストされる前にテストすることによってスライドを作ることができる。

10

【0514】

検体、IHCのためのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織またはICCのための尿細胞学いずれかは医療機関から得られるであろう。一旦検体が収集されれば、検体を処理し、分析する。統計学的分析を用いて、肺癌について前記にて記載したように、パネルを設計する。処理の間、荒い洗浄の間にスライドに粘着しない細胞スミアまたはペレットのような技術的論点がいくつかの態様で起こり得る。しかしながら、そのような論点は、ソフトウェアの操作、またはそのような問題を解決するための染色プロトコルを修飾することによって容易に取り組むことができる。いくつかの態様において、検体を自動的にサンプリングし、細胞解釈または診断のために単層スライドを調製するデバイスを用いて検体を処理し、分析する。

20

【0515】

広いメニューのプローブを最初に用いることが予測される。プローブの数は適当なサイズのパネルまで減らして、高レベルの感度および特異性を保持する。最終プローブの選択は、陽性染色腫瘍細胞のパーセンテージの予め規定された閾値に基づく。巧妙な統計学的分析を用いて、これらの決定をなす。悪性疾患の検出に対するパネル-アッセイアプローチは固形腫瘍に適用でき、同一腫瘍マーカーのいくつかは異なるパネルにあるので、この方法は平行して、ならびに系列的に行うことができる。このようにして、前記アッセイの開発プロセスを行うことができる。

30

【0516】

初期プローブは高い感度および特異性を持つ適当なサイズのパネルまで減らす。最終プローブの選択は、陽性染色腫瘍細胞のパーセンテージの予め規定された閾値に基づく。一旦IHCを用いるテストの最終パネルを決定すれば、検体はICCによってテストされる。確立されたICCプローブはパネルとして尿検体でテストされる。いくつかの態様において、自動染色を使用し、従って、標準化を達成することができ、結果の解釈はより一致するであろう。

40

【0517】

5つのサブタイプ (腺癌、扁平細胞癌腫、小細胞癌腫、大細胞癌腫、中皮腫) を有する肺癌と比較して、膀胱癌の90%を超えるものは移行細胞癌腫 (TCC) としてカテゴリー化される。これは、膀胱腫瘍パネルが癌の1つのタイプを標的化するにおいてより特異的とする。加えて、膀胱腫瘍の検出および診断はFFPEベースおよび/または細胞ベースとすることができる (尿細胞学)。

【0518】

プローブ/マーカーのライブラリー

50

癌マーカーについての情報を含む種々の公表された科学的情報源をレビューした。膀胱癌の20%以上の陽性の任意の基準を用いて、膀胱癌の検出および/または診断のための好ましいパネル用のプローブを選択した。用語「20%以上の陽性」は、もし100の腫瘍症例を調べれば、これらの症例の20以上が個々のマーカーの存在を示し、他方、残りの80以下の症例は個々のマーカーの存在を示さないことを意味する。好ましいパネルはBL2-10D1、C-erbB-2、CD44s標準、スプライス変種CD44v6、スプライス変種CD44v3、カベオリン-1、コラゲナーゼ、サイクリンD1、シクロオキシゲナーゼ-1(COX-1)、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、サイトケラチン20(CK20)、E-カドヘリン、表皮成長因子受容体(EGFR)、熱ショックタンパク質-90(HSP-90)、IL-6、IL-10、HLA-DR、ヒトミスマッチ修復遺伝子(hMSH2)、Lewis X、MDM2、核マトリックスタンパク質22(NMP-22)、p53、PCNA、MIB1(Ki-67)、網膜芽腫(Rb)、サバイピン、トランスフォーミング成長因子-β-1、トランスフォーミング成長因子-β-1受容体I、トランスフォーミング成長因子-β-1受容体IIおよびUBC(CK8およびCK18)から選択されるマーカーを含むことができる。本例で利用されるプローブ/マーカーのライブラリーの短い記載を以下に掲げる。

【0519】

BL2-10D1

これはIgM抗体である。IgMモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系は、マウスをRT4細胞およびヒト膀胱癌腫細胞の懸濁液で免疫化した後に生産された(Longin, A. et al., A monoclonal antibody (BL2-10D1) reacting with a bladder cancer-associated antigen. *Int J Cancer*, 1989. 43(2): p. 183-9)。それは、アンブレラ細胞の5%~10%を除き、膀胱腫瘍との強い反応性を示し、正常な尿路上皮とでは示さない。この抗体は乳頭状グレード1およびグレード2TCCのほとんどと、およびインサイチューの癌腫と反応し、他方、乳頭状グレード3および侵入性非乳頭状TCCは貧弱な反応性を示す。Longin (Longin, A. et al., A useful monoclonal antibody (BL2-10D1) to identify tumour cells in urine cytology. *Cancer*, 1990. 65(6): p. 1412-7) および同僚は、低グレード(G1)腫瘍を持つ患者からの全ての尿がBL2-10D1で染色されたことを示した。グレード2または3は常に染色された。そのような結果は、BL2-10D1が膀胱癌の初期検出の価値あるマーカーと考えることができることを示唆する。

【0520】

c-erbB-2

前記c-erbB-2遺伝子は、ペプチドホルモンのファミリーに対する受容体である膜貫通チロシンキナーゼをコードする。c-erbB-2増殖は、移行細胞癌腫で見出されている。以前の研究はc-erbB-2と転移との点ならびに腫瘍のグレードまたは段階との関連を観察した(Ioachim, E. et al., Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histol Histopathol*, 2000. 15(3): p. 721-7)。

【0521】

CD44標準(CD44s)およびスプライス変種CD44v6およびCD44v3

CD44は膜貫通細胞表面受容体である。それは細胞間接着、細胞マトリックス相互作用、および腫瘍転移を含む広い機能と関連付けられている。腫瘍の発生およびその進行におけるCD44イソ形態の重要性は種々の腫瘍で報告されている。Masuda et al (Masuda, M. et al., Expression and prognostic value of CD44 isoforms in transitional cell carcinoma of renal pelvis and ureter. *J. Urol*, 1999. 161(3): p. 805-8; discussion 808-9) による研究において、CD44s、CD44v6およびCD44v3の発現は組織学グレードの膀胱癌に対して有意に減少した。しかしながら、これらのイソ形態の全ては正常尿路上皮粘膜の基底細胞の細胞質膜で強く発現された。しかしながら、正常な尿路上皮粘膜の表層はそれを発現しなかった。

【0522】

カベオリン-1

小胞は脂肪細胞および内皮細胞からI型肺細胞および骨格筋細胞の範囲の多数の細胞型

で豊富である。3つの構成要素カベオリンタンパク質ファミリーメンバーが同定されている；カベオリン-1、カベオリン-2およびカベオリン-3。CAV-1遺伝子は染色体7q31にマッピングされており、腫瘍サプレッサー活性の潜在的部位としてかなりの科学的興味を有する。それは、恐らくは、広い範囲のシグナル伝達分子および受容体と相互作用することによるシグナル伝達を含む（Src,G Protein and EGFR）。Rajjayabun (Ioachim,E.et al.,Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb),p53 protein,M DM2,c-erbB-2,HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma .Histol Histopathol,2000.15 (3) : p.721-7) は、最初に、高グレード膀胱癌においてCAV-1免疫反応性を示した。

【0523】

10

コラゲナーゼ

コラゲナーゼはコラーゲンを溶解し、組織を修復し維持することが知られている。それは上皮細胞、好中球、組織球、および線維芽細胞から分泌される。コラゲナーゼの増大した発現は乳癌および甲状腺癌と関連付けられている。RT-PCR研究は、尿路上皮癌腫における増大したmRNAを示し、1つの研究は、TCCを持つ患者の34%および45%が、細胞学および組織学検体各々でのコラゲナーゼの陽性発現を示した。良性病巣では発現は見出されなかった（Hattori,M.,E.Ohno,and H.Kuramoto,Immunocytochemistry of collagenase expression in transitional cell carcinoma of the bladder.Acta Cytol,2000.44 (5) : p.771-7）。

【0524】

20

サイクリンD1

サイクリンD1遺伝子産物は細胞周期のG1/S期転位の調節に寄与し、候補癌遺伝子である。それは、一次膀胱癌腫における低グレード、低段階および乳頭状腫瘍増殖と関連することが示されており、それは膀胱癌の進行において重要な役割を演じることが示唆されている（Byrne,R.R.et al.,E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma,carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup.J Urol ,2001.165 (5) : p.1473-9）。

【0525】

シクロオキシゲナーゼ-1 (Cox-1) およびシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2)

シクロオキシゲナーゼは炎症、免疫応答、有糸分裂誘発およびアポトーシスに参与するプロスタグランジンの形成における初期工程を触媒する反応律速酵素である。オキシゲナーゼ-1 (Cox-1) はむしろ安定なレベルでほとんどの組織において構成的に発現される。誘導性形態のシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2) の低い基礎活性は、サイトカイン、増殖因子、癌遺伝子および腫瘍プロモーターによって炎症プロセスの間に増加する。増加したシクロオキシゲナーゼ活性および、結果としての、上昇したプロスタグランジンレベルが胃腸学的悪性疾患ならびに膀胱癌で観察されている。Bostrom et al (Bostrom,P.J.et al.,Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in urinary bladder carcinomas in vivo and in vitro and prostaglandin E2 synthesis in cultured bladder cancer cells.Pathology,2001.33 (4) : p.469-74) は、膀胱の全ての29のTCCで検出されたCox-2についての散漫な中程度～強い細胞質免疫シグナルを示した。検体における正常な尿路上皮もCox-2 40 について染色されたが、強度が弱かった。Cox-1染色は29のTCC検体のうち18 (62%) からの組織で検出されたが、シグナルは18の検体のうち16で弱かった。Cox-1からの免疫シグナルは少数の正常な検体でのみ検出され、弱い～中程度であった。

【0526】

サイトケラチン20 (CK20)

サイトケラチン20 (CK20)、20の公知のサイトケラチンのうちの1つは、上皮細胞の間径フィラメントの構成要素である。IHC研究は、CK20が、尿路上皮癌腫または尿路上皮形成異常を持つ患者の尿路上皮細胞で発現されたことを示した。正常な尿路上皮においては、CK20発現は表層アンブレラ細胞に制限された。ICCを用いることによって、Lin (Lin, S.et al.,Cytokeratin 20 as an immunocytochemical marker for detection of urothel 50

ial carcinoma in atypical cytology: preliminary retrospective study on archived urine slides. *Cancer Detect Prev*, 2001. 25 (2) : p. 202-9) および同僚は、CK20が膀胱癌患者の95%で陽性であり、正常対照の10%で陽性であったに過ぎないことを示した。

【 0 5 2 7 】

E-カドヘリン

E-カドヘリンは全ての上皮組織で発現され、扁平細胞および移行細胞の原形質膜に見出される。E-カドヘリン媒介細胞接着は腫瘍の進行および転移に関与する。膀胱の移行細胞癌腫におけるE-カドヘリンのIHC研究は、進行した腫瘍段階および分化の喪失と異常E-カドヘリン発現との有意な関係を示している。Byrne et al (Byrne, R.R. et al., E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *J Urol*, 2001. 165 (5) : p. 1473-9) は、59の (77%) 膀胱腫瘍が正常な膜E-カドヘリンの喪失を有し、他方、保存されたE-カドヘリン発現が正常な尿路上皮で観察されたことを示した。

【 0 5 2 8 】

表皮成長因子受容体 (EGFR)

表皮成長因子は優れたミトジェンであって、その作用は表皮成長因子受容体 (EGFR) の外部ドメインに結合することによって媒介される。EGFRはチロシンキナーゼ活性を持つ膜貫通タンパク質受容体である。EGFRの細胞質および内部ドメインは鳥類赤芽球症ウイルス (v-erb-B-2) の癌遺伝子産物との密接な同源性を有する。増大したレベルのEGFRは、肺、頭部、首、頸、乳房、前立腺および膀胱の扁平細胞癌腫を含む固形腫瘍で見出される (Neal, D.E. et al., The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 1990. 65 (7) : p. 1619-25) 。膀胱癌の陽性の範囲は31 ~ 48%である (American Cancer Society. 2000) 。

【 0 5 2 9 】

熱ショックタンパク質 -90 (HSP-90) 、 IL-6およびIL-10

膀胱癌の初期段階の間に、免疫学的反応のカスケードが起こり、熱ショックタンパク質 (HSP-90) およびサイトカインを含む種々のタンパク質が大量に分泌される。HSP-90はHSPファミリーの最も重要なメンバーのうちの1つである。IHCによって調べられた56の膀胱癌腫のうち、52 (93%) がHSP-90を発現し、48 (86%) がIL-6を発現し、45 (80%) がIL-10を発現した。高グレードおよび筋肉侵入性腫瘍は低グレードの腫瘍よりもかなり高いレベルのHSP-90およびIL-6を含んだ。腫瘍領域に隣接する正常な尿路上皮はHSP-90染色は示さない。IL-6およびIL-10はほとんど免疫反応性を示さなかった (Cardillo, M.R., P. Sale and F. Di Silverio, Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer. *Anticancer Res*, 2000. 20 (6B) : p. 4579-83) 。これは、IL-6およびIL-10が腫瘍発生の間に比較的低い段階で転じることができるのを示唆する。

【 0 5 3 0 】

HLA-DR

HLA-DRの機能的役割は免疫担当細胞間の通信を媒介することであるが、HLA-DR抗原発現は膀胱癌におけるリンパ球垂集団から独立していることも示されている (Ioachim, E. et al., Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb) , p53 protein MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histol Histopathol*, 2000. 15 (3) : p. 721-7) 。

【 0 5 3 1 】

ヒトミスマッチ修復遺伝子 (hMSH2)

これはプロトタイプのミスマッチ修復遺伝子 (MMR) である。hMSH2はヌクレオチドのミスマッチを認識し、それに結合し、他のMMRタンパク質と組み合わせて、DNA複製エラーの共働した修正を指令する。MMR遺伝子の突然変異は遺伝性非ポリポーシス結腸癌 (HNPCC) の40%で報告されており、最近のIHC研究は、hMSH2の発現が低下した膀胱腫瘍がより高いグレードおよび再発と関連することを示唆している。1つの研究は、全ての膀胱腫瘍がhMSH2につき陽性であり、他方、正常な膀胱粘膜はIHCによると陰性であることを示した (Lea 50

ch,F.S.et al.,Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy.Cancer,2000.88(10):p.2333-41)。

【0532】

Lewis X

ABHおよびLewis血液型関連抗原は正常な尿路上皮の表面に存在する。前記Lewis X抗原は、通常は、場合によるアンブレラ細胞を除いて、成人における尿路上皮細胞から非存在である。Sheinfeld (Sheinfeld,J.et al.,Enhanced bladder cancer detection with the Lewis X antigen as a marker of neoplastic transformation.J Urol,1990.143(2):p.285-8) および同僚は、膀胱腫瘍の検出用の膀胱洗浄液検体からの上皮細胞上のLewis X抗原の免疫染色を用い、86%の感度および87%の特異性を報告した。Golijanin (Golijanin,D.et al.,Detection of bladder tumors by immunostaining of the Lewis X antigen in cells from voided urine.Urology,1995.46(2):p.173-7) および同僚もまた、尿試料のLewis X免疫染色の高い感度および特異性を示した。高グレードおよび低グレードの移行細胞腫瘍は同等の効率でもって検出された。

【0533】

MDM2

これは細胞プロトオンコジーン産物である。MDM2はp53に結合することが示されており、陰性レギュレーターとして作用し、その転写トランス活性化を阻害する。異常なMDM2およびp53表現型は膀胱癌患者において重要な診断マーカーであり得ることが示された (Iochim,E.et al.,Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb),p53 protein,MDM2,c-erbB-2,HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma.Histol Histopathol,2000.15(3):p.721-7)。

【0534】

核マトリックスタンパク質22 (NMP-22)

この核マトリックスタンパク質は、DNA複製および遺伝子発現において、核の構造枠組みで重要な役割を演じる。NMPの有意に増加した濃度が新形成形質転換で、および乳房、結腸および膀胱の癌腫で見出されている。可溶性NMPはNMPの選択エпитープ (NMP-22) に対する抗体を用いて膀胱癌からの尿で検出することができる。Landman et al (Landman,J.et al.,Sensitivity and specificity of NMP-22,telomerase,and BTA in the detection of human bladder cancer.Urology,1998.52(3):p.398-402) は総じての感度が81%であることを見出した。

【0535】

p53

このヒト腫瘍抑制遺伝子は、ゲノム損傷の後にDNA修復を容易とする核リントタンパク質をコードする。野生型p53は分解する。従って、突然変異体p53は細胞に蓄積しない。突然変異体p53はIHCによって検出することができる。いくつかの研究は、p53突然変異を高グレードの膀胱癌および不都合な予後と関連付けている (Vollmer,R.T.et al.,Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histologic grade and expression of p53,MB-1,c-erb B-2,epidermal growth factor receptor,and bcl-2.Cancer,1998.82(4):p.715-23; Nakopoulou,L.et al.,The prevalence of bcl-2,p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates.Hum Pathol,1998.29(2):p.146-54; Vorreuther,R.et al.,Expression of immunohistochemical markers (PCNA,Ki-67,486p and p53) on paraffin sections and their relation to the recurrence rate of superficial bladder tumors.Urol Int,1997.59(2):p.88-94; Li,B.et al.,Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder.Urol Res,1998.26(4):p.235-41)。膀胱癌において報告されたp53突然変異は30%から58%まで変化する。Wu et al (Wu,T.T.et al.,The role of bcl-2,p53,and ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma.J Urol,2000.163(3):p.758-60) は、60の症例のうち42(70%)がp53突

然変異を有したことを示した。

【0536】

PCNAおよびMIB1 (Ki-67)

双方は細胞増殖核マーカーである。それらは膀胱癌を含む種々の腫瘍で発現される。研究は、PCNAおよびMIB1の間の強い相関を示し、これは、マーカーのいずれかを用いることができるのを示唆する (Ioachim, E. et al., Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histol Histopathol*, 2000.15 (3) : p.721-7; Lavezzi, A.M., L.Terni and L.Matturri, PCNA immunostaining as a valid alternative to tritiated thymidine-autoradiography to detect proliferative cell fraction in transitional cell bladder carcinomas. *In Vivo*, 2000.14 (3) : p.447-51)。

【0537】

網膜芽腫 (Rb)

Rbは腫瘍抑制遺伝子であって、ヒト腫瘍の開始および進行で役割を演じ得る。Rbは正常細胞に存在する核リンタンパク質をコードし、細胞周期の制御および細胞増殖の負の調節に関与すると考えられている。Rb遺伝子の改変はいくつかの上皮腫瘍で観察されており、遺伝子の突然変異および/または欠失を含む構造的異常を示唆し、その結果、腫瘍サプレッサタンパク質が不活化され、腫瘍形成に関与し得る。

【0538】

サバイビン

サバイビンは142アミノ酸のタンパク質である。それは細胞周期のG2/M期で発現され、有糸分裂紡錘体の微小管と会合する。それは、通常のヒト癌で選択的に過剰発現されるが、正常な組織ではそうではないアポトーシスの阻害剤であり、攻撃的疾患および不都合な結果と相関する (Lehner, R. et al., Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002.10 (2) : p.134-8)。

【0539】

トランスフォーミング成長因子-β1、および受容体IおよびII

TGF-β1は細胞の増殖、分化、移動、免疫応答、脈管形成およびアポトーシスを調節する多面的成長因子である。それは、細胞がS期に入る能力を低下させることによって正常上皮細胞増殖を阻害することが示されている。逆に、多くの癌腫細胞はTGF-β1による増殖阻害に対して耐性を示す。TGF-β1の効果は、現在、TGF-β1受容体I (TGF-β1I) およびTGF-β1受容体II (TGF-β1II) と呼ばれる膜結合セリン-スレオニンキナーゼ受容体によって媒介される。受容体IおよびIIの発現の喪失は前立腺、結腸、卵巣および膀胱を含むいくつかの癌で見出されている。1つの研究において、TGF-β1、TGF-β1IおよびTGF-β1IIの発現は膀胱癌症例51 (64%)、34 (43%)、および38 (48%) で変化した。TGF-β1の過剰発現は高グレードの腫瘍で見られ、正常な膀胱粘膜では陰性である。TGF-β1Iおよびβ1IIの喪失は侵入性腫瘍段階と関連付けられた (Kim, J.H. et al., Predictive value of expression of transforming growth factor-beta(1) and its receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*, 2001.92 (6) : p.1475-83)。

【0540】

UBC (CK8およびCK18)

これは、尿中のサイトケラチン断片8および18の濃度を測定する酵素免疫アッセイである。これらのサイトケラチンは単純な上皮および癌腫、とりわけ、正常な尿路上皮およびTCCで共発現される。Heicappell et alは、UBCの感度が22%および75%の範囲であり、総じての特異性は77%であることを示した (Heicappell, R. et al., Evaluation of urinary bladder cancer antigen as a marker for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Scand J Clin Lab Invest*, 2000.60 (4) : p.275-82)。

【0541】

組織ベースのマーカー

膀胱癌を検出し、および/または診断するための組織ベースのパネルは診断および予後マーカー、ならびに転移能力、腫瘍グレードおよび段階の決定に関連するマーカーを含む。それは、患者スクリーニングおよび診断のみならず、臨床療法をガイドする患者成層化において潜在的価値を有する。組織ベースのパネルは尿検体をテストして、結果が現存の細胞ベースのパネルよりも優れているか否かを見ることがもできる。膀胱癌を検出しおよび/または診断するための好ましい組織ベースのパネルはp53、Rb、MDM2、EGFRおよびサバイピンから選択されるマーカーを含む。膀胱癌に関するこれらの腫瘍マーカーの重要性は以下に詳細に記載する。

【0542】

高グレードの膀胱癌の検出は、通常は、問題ではない。なぜならば、酷い細胞学異型性が存在するからである。他方、低グレードの腫瘍の検出は細胞病理学者に対する継続した挑戦である。膀胱腫瘍の病因の理解は、腫瘍形成の間の最も初期の事象に狙いを定めるのに非常に重要である。喫煙、アリアルアミンへの曝露、鎮痛剤の長期使用、およびシクロホスファミドへの曝露は膀胱癌の危険性を増加させる。どのようにしてこれらの影響が癌を誘導するのかは明らかでないが、多数の遺伝的変化が移行細胞癌腫で観察されている。前記証拠は腫瘍抑制遺伝子が関与する染色体欠失を示唆し、細胞周期の制御の引き続いての喪失は膀胱腫瘍の初期発生で重要である (Crawford, J.M. and R.S. Cotran, *The Lower Urinary Tract*, in Robbins Pathologic Basis of Disease, T. Collins, Editor, 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.1003-1008; Williams, S.G., M. Buscarini and J.P. Stein, *Molecular markers for diagnosis, staging, and prognosis of bladder cancer*. *Oncology (Huntingt)*, 2001. 15 (11): p.1461-70, 1473-4, 1476; discussion 1476-84)。

【0543】

膀胱腫瘍の30%~60%の間が染色体9モノソミーまたは9pおよび9qの欠失、ならびに17p、13q、11pおよび14qの欠失を有する (Gibas, Z. and L. Gibas, *Cytogenetics of bladder cancer*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. 95 (1): p.108-15)。染色体9欠失は、表層乳頭状腫瘍および、場合によっては、非侵入性平坦腫瘍に頻繁に存在する唯一の遺伝的変化である。前記9p欠失、9p21は腫瘍抑制遺伝子p16を含む。しかしながら、研究は、p16タンパク質発現が9p欠失で減少しないことを示す。他方、多くの侵入性移行細胞癌腫は17pの欠失およびp53遺伝子における突然変異を示し、これは、p53における変化が移行細胞癌腫の進行に寄与することを示唆する。

【0544】

また、p53における突然変異は平坦インサイチュー膀胱癌にも見出される。MDM2、プロトオンコジンはp53との結合によって細胞周期の調節で中枢的な役割を演じる。MDM2は、E2FおよびRbのような、細胞周期およびアポトーシス調節制御の他の臨界的エレメントと相互作用することができる (Martin, K. et al., *Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein*. *Nature*, 1995. 375 (6533): p.691-4; Xiao, Z.X. et al., *Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2*. *Nature*, 1995. 375 (6533): p.694-8)。13q欠失は網膜芽腫遺伝子 (Rb) のそれであり、Rb遺伝子の突然変異は多くのヒト悪性新生物の病因で中枢的重要性のものであると考えられる。最近、pRbのゲノム喪失が制御されていない細胞増殖およびアポトーシス (すなわち、細胞の死滅) に導くことが明らかとなった。膀胱癌における以前の研究は、Rbの不活化が腫瘍進行に関連することを報告している (Ioachim, E. et al., *Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DA and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma*. *Histol Histopathol*, 2000. 15 (3): p.721-7)。

【0545】

再発率は低グレード膀胱癌では高い。筋肉侵入がない患者では、長期見通しは良好であるが、半分より多くが、通常は一次癌と段階およびグレードが同様な膀胱内の再発腫瘍発生を有する。EGFRは、増大した再発率および侵入性膀胱癌への表層の進行に関連することが示されている (Neal, D.E. et al., *The epidermal growth factor receptor and the pro*

10

20

30

40

50

gnosis of bladder cancer. *Cancer*, 1990. 65 (7) : p.1619-25 ; Izawa, J. I. et al., Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep*, 2001. 8 (1) : p.9-15)。

【 0 5 4 6 】

サバイピンは細胞周期のG2/M期で発現される新しい膀胱腫瘍マーカーであり、有糸分裂紡錘体の微小管と関連する (Li, B. et al., Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res*, 1998. 26 (4) : p.235-41) 。 サバイピン-微小管相互反応の破壊の結果、サバイピンの抗アポトーシス機能が喪失し、カスパーゼ-3が活性化される。カスパーゼ-3はFas媒介細胞死滅に対する必須死滅因子であって、その細胞における不活化はp21との相互作用によって開始される (Tamm, I. et al., IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 1998. 58 (23) : p.5315-20) 。 サバイピンは細胞周期制御にも関与する。より重要なことには、研究は、サバイピンの核染色が移行細胞癌腫の大部分に存在するが、健康な膀胱粘膜には存在しないことを示す (Lehner, R. et al., Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002. 10 (2) : p.134-8) 。

10

【 0 5 4 7 】

細胞ベースの免疫細胞化学マーカー

20

細胞ベースのパネルは初期段階、低グレードTCC、ならびに後期の高グレードTCCに対して特異的なマーカーを有する。それを用いて、初期段階低グレードTCCをスクリーニングし、検出することができる。困難な症例では、膀胱鏡検査バイオプシーを後で行って、組織ベースのパネルでの診断を確認することができる。また、それを用いて、もし患者が後期段階に存在するならば、高グレードTCCも診断することができる。結果は泌尿器科医による治療決定をガイドすることができる。免疫細胞化学技術を用いて膀胱癌を検出および/または診断するための好ましい細胞ベースのパネルはBL2-10D1、サイトケラチン20、Lewis XおよびNMP22から選択されるマーカーを含む。膀胱癌に対するこれらの腫瘍マーカーの重要性を後に詳細に記載する。

【 0 5 4 8 】

30

新規な分子マーカーの臨床泌尿器科学の導入は、慣用的泌尿器科学と比較して膀胱癌の診断精度を増加させた。多数の慣用的製品ならびに個々のマーカーが入手可能である。しかしながら、各マーカーは異なる感度および特異性を呈する。さらに、単一免疫細胞化学アッセイは未だ侵入性膀胱鏡検査を置き換えていない。

【 0 5 4 9 】

ユニーク性はいくつかのマーカーで明らかである。例えば、BL2-10D1は低グレードTCCとの首尾一貫した反応性対高グレードTCCとのその終始一貫しない反応性を有する (Longin, A. et al., A useful monoclonal antibody (BL2-10D1) to identify tumor cells in urine cytology. *Cancer*, 1990. 65 (6) : p.1412-7) 。 CK20はTCCの検出につき94%の総じての感度および80%の特異性を有し (Lin, C. W. et al., Detection of tumor cells in bladder washings by a monoclonal antibody to human bladder tumor-associated antigen. *J Urol*, 1988. 140 (3) : p.672-7) 、 良性上皮では、染色がアンブレラ細胞の表面に制限され、他方、形成異常上皮では、染色は十分な厚みを含む (Harnden, P. et al., Cytokeratin 20 as an objective marker of urothelial dysplasia. *Br J Urol*, 1996. 78 (6) : p.870-5) 。 膀胱洗浄液検体からの上皮細胞上のLewis X抗原の免疫染色は、86%の感度および87%の特異性を見出した (Sheinfeld, J. et al., Enhanced bladder cancer detection with the Lewis X antigen as a marker of neoplastic transformation. *J Urol*, 1990. 143 (2) : p.285-8) 。 そして、NMP-22、テロメラーゼ、およびBTAアッセイを比較するためになされた研究は、NM-22が最高の感度および特異性を有することを示した (Landman, J. et al., Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of h

40

50

uman bladder cancer. Urology, 1998. 52 (3) : p. 398-402 ; Friedrich, M. G. et al., Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma: a comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against Lewis X and 486p3/12 with the BTA STAT and NMP22 tests. J Urol, 2002. 168 (2) : p. 470-4) 。

【 0 5 5 0 】

一つまたは複数のパネル-アッセイについてのバイオマーカーを組み合わせることによって、感度および特異性は有意に増大する (Eissa, S. et al., Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibronectin, urinary bladder cancer antigen and voided urine cytology in the detection of bladder tumors. J Urol, 2002. 168 (2) : p. 465-9) 。

理想的な膀胱癌アッセイは非侵入的であり、感度がよく、特異的かつコスト的に有利であるべきである。組織ベースのパネルおよび細胞ベースのパネルは単独で用いることができるが、組織ベースのパネルからの、および細胞ベースのパネルからのマーカーを最終最適化パネルを有するように再度組み合わせることができる。

10

【 0 5 5 1 】

以下の略語を本実施例を通じて用いた。CD44s = CD44標準、CD44v6 = CD44スプライス変種6、CD44v3 = CD44スプライス変種3、CK = サイトケラチン、Cox-1 = シクロオキシゲナーゼ-1、Cox-2 = シクロオキシゲナーゼ-2、EGFR = 表皮成長因子受容体、ELISA = 酵素結合免疫吸着検定法、FFPE = ホルマリン固定パラフィン包埋、FNA = 微小針吸引、FNB = 微小針バイオプシー、HLA-DR = ヒト白血球抗原-DR、hMSH2 = ヒトミスマッチ修復遺伝子、HNPCC = 遺伝性非ポリポーシス結腸癌、HSP-90 = 熱ショックタンパク質-90、IL-6 = インターロイキン-6、IL-10 = インターロイキン-10、ICC = 免疫細胞化学、IHC = 免疫組織化学、ISH = インサイチューハイブリダイゼーション、NMP22 = 核マトリックスタンパク質、PCNA = 増殖細胞核抗原、PCR = ポリメラーゼ連鎖反応、TCC = 移行上皮癌、TGF = トランスフォーミング成長因子、STD = 性感染症、およびRb = 網膜芽腫

20

【 0 5 5 2 】

IV. 前立腺癌

適時に正確な診断をなすにおいて医師を助け、および有意に良好な患者管理を提供するために、種々の前立腺腫瘍マーカーが発見されている。あいにく、これらの前立腺腫瘍マーカーのいずれも、高い感度および特異性双方を持つ「魔法の弾丸」ではない。従って、診断精度を高める代替方法が必要である。

30

【 0 5 5 3 】

診断精度を高める代替方法は、その各々が前立腺癌に関連するマーカーに特異的に結合する複数のプローブを含むパネルを開発することである。全ての候補プローブはICCおよび/またはIHC技術でテストされるべきである。いくつかの態様において、検体は微小針バイオプシーから得ることができる。微小針吸引 (FNA) は、通常、表層および外部器官で用いられ、それにより、乳房、甲状腺または同様な柔軟組織塊のような細胞懸濁液細胞学的検体を得ることができる。前立腺、腎臓または肝臓のような深い内部器官の症例では、微小針バイオプシー (FNB) 技術がしばしば用いられ、これは、超音波またはCTによってガイドすることができ、組織検体が得られる。前立腺では、超音波がしばしば用いられ、FNBは経直腸的に行われる。他の態様において、FNBのタッチ製剤 (タッチプレップ) を行って、組織からのスライドガラス上に細胞のインプラントを作り出すことができる。FNB手法からの流体または血液検体の場合には、細胞懸濁液を作成することができる。

40

【 0 5 5 4 】

一旦検体が収集されれば、検体を処理し、分析する。統計学的分析を用いて、肺癌につき前記したように、パネルを設計することができる。処理の間、粗い洗浄の間にスライドに粘着しない細胞スミアまたはペレットのような技術的問題がいくつかの態様で起こり得る。しかしながら、そのような問題は、ソフトウェアの操作によって容易に取り込むことができ、あるいは染色プロトコルの修飾はそのような問題を克服することができる。いくつかの態様において、自動的に検体をサンプリングし、診断用のスライドを調製するデバイスを用いて、検体を処理し、分析する。広いメニューのプローブを最初に用いることが

50

予測される。プローブの数は適当なサイズのパネルまで減らして、高レベルの感度および特異性を保持する。最終プローブの選択は、陽性染色腫瘍細胞のパーセンテージの予め規定された閾値に基づくであろう。巧妙な統計学的分析を使用して、これらの決定をなす。悪性疾患の検出に対するパネル-アッセイアプローチは固形腫瘍に適用することができ、かつ同一腫瘍マーカーのいくつか異なるパネルにあるので、この方法は平行して、ならびに系列的に行うことができる。このようにして、アッセイ開発プロセスを行うことができる。

【0555】

プローブ/マーカーのライブラリー

癌マーカーについての情報を含む種々の源をレビューした。前立腺癌の20%以上の陽性の任意の基準を用いて、前立腺癌の検出および/または診断用の好ましいパネルのためのプローブを選択することができる。用語「20%以上の陽性」は、もし100の腫瘍症例を調べれば、これらの症例の20以上が個々のマーカーの存在を示し、他方、残りの80症例が個々のマーカーの存在を示さないことを意味する。好ましいパネルは34βE12、B72.3、C-erbB2、E-カドヘリン、表皮増殖因子受容体(EGFR)、脂肪酸センサーゼ(FAS)、ID-1、カリクレイン2、Ki-67、Leu7、MDM2、N-カドヘリン、P504S、p53、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、前立腺インヒビリンペプチド(PI)および前立腺特異的抗原(PSA)から選択される分子マーカーを含むことができる。本実施例で利用したプローブ/マーカーのライブラリーの短い記載を以下に掲げる。

【0556】

34βE12

これは、前立腺の基底細胞に存在する高分子量サイトケラチン(HMWCK)である。前立腺の腺癌は、この抗体との免疫反応性を欠く。Yangおよび同僚(Yang, X.J. et al., Rare expression of high-molecular-weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate gland: a study of 100 cases of metastatic and locally advanced prostate cancer. Am J Surg Pathol, 1999. 23(2): p. 147-52)は、免疫組織化学によって、34βE12で転移性の局所的に進行した前立腺癌の100の症例を調べた。4つの症例のみが34βE12につき陽性であった。彼らは、34βE12が、正常な前立腺から前立腺腺癌を弁別するのに非常に有用なマーカーであると結論した。もう1つのグループは、228の疑わしい症例を調べ、外科的病理学の毎日のプラクティスで見られる問題がある病巣における診断を確認し、確立し、または変化させるにおける大きな価値の34βE12を見出した(Wojno, K.J. and J.I. Epstein, The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 beta E12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. Am J Surg Pathol, 1995. 19(3): p. 251-60)。

【0557】

B72.3

これは、糖タンパク質72に関連する腫瘍を認識するモノクローナル抗体である。それは、前立腺腺癌を含む種々のタイプの腺癌と反応することが示されている。Mazurおよび同僚(Mazur, M.T. and J.J. Shultz, Prostatic adenocarcinoma. Evaluation of immunoreactivity to monoclonal antibody B72.3. Am J Clin Pathol, 1990. 93(4): p. 466-70)は、良性前立腺病の95%を超えるものがB72.3につき陰性であり、他方、前立腺腺癌の77%が少なくとも病巣的に陽性であって、100%の十分に分化した前立腺腺癌はB72.3陽性であることを示した。もう1つの研究は、良性上皮および間葉組織がB72.3で免疫染色されないことを示した。免疫染色は、局所化前立腺腺癌の30%における悪性細胞内で検出された(Myers, R.B., et al., Expression of tumor-associated glycoprotein 72 in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. Mod Pathol, 1995. 8(3): p. 260-5)。

【0558】

C-erbB-2

これはHer2/neuとしても知られた癌遺伝子であって、その産物は癌タンパク質と呼ばれ

る。C-erb-B2は、c-erb-B1、c-erb-B2およびc-erb-B3を含む表皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーに属する。c-erb-B2の過剰発現は乳房癌腫で周知である。c-erb-B2の役割は、ヒト前立腺癌の病因および進行において不確かなままである。従前の研究は、恐らくは、研究における重要な方法の差のため、一次前立腺腫瘍におけるc-erb-B2発現の広く多様性のある速度を報告している。Reeseおよび同僚（Reese,D.M.et al.,HER2 protein expression and gene amplification in androgen-independent prostate cancer.Am J Clin Pathol,2001.116（2）：p.234-9）は、免疫組織化学および蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）によってアンドロゲン独立性前立腺癌でのHer2タンパク質発現を調べた。彼らは、検体の36%がHer2につき陽性であるが、6%のみが遺伝子増幅を有することを発見し、これは、Her2増幅およびタンパク質発現のメカニズムが乳癌におけるのと異なることを示す。もう1つの研究は、c-erb-B2が進行した前立腺癌腫に非常に有用なバイオマーカーであることを示した（Arai,Y.,T.Yoshiki and O.Yoshida,C-erbB-2 oncoprotein : a potential biomarker of advanced prostate cancer.Prostate,1997.30（3）：p.195-201）。

10

【0559】

E-カドヘリン

これは、膜貫通Ca⁺⁺依存性細胞接着分子である。E-カドヘリンの減少した発現が多数の癌腫で示されており、転移するより高い傾向および減少した生存率双方に関連付けられている。Kuniyasuおよび同僚（Kuniyasu,H.et al.,Relative expression of type IV collagenase,E-cadherin,and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers.Clin Cancer Res,2000.6（6）：p.2295-308）は、E-カドヘリンの減少した発現が増大するGleasonスコアと関連することを示した。他の研究も、また、E-カドヘリンが前立腺骨転移において下方調節され、低下したE-カドヘリンは前立腺癌を持つ患者における貧弱な予後に関連することを明らかにした（Bryden,A.A.et al.,E-cadherin and beta-catenin are down-regulated in prostatic bone metastases.BJ U Int,2002.89（4）：p.400-3；Umbas,R.et al.,Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer.Cancer Res,1994.54（14）：p.3929-33）。

20

【0560】

EGFR

表皮成長因子受容体（EGFR）は膜貫通糖タンパク質である。それは細胞の増殖および分化で重要な役割を演じる。表皮成長因子（EGF）、リガンドの1つは、細胞表面表皮成長因子受容体（EGFR）と相互作用して、受容体チロシンリン酸化および細胞内シグナル変換経路の活性化を誘導する。EGFは正常な前立腺および良性前立腺過形成（BPH）において圧倒的にEGF関連成長因子であるように見える。EGFRは良性前立腺の基底/神経内分泌（NE）区画に位置し、相対的にアンドロゲン独立性発現を呈する。また、EGF関連ペプチドおよびEGFRは新形成前立腺組織に存在する。アンドロゲン独立性癌細胞は、アンドロゲン-応答性前立腺癌細胞よりもよりEGFR発現およびリン酸化を呈する（Sherwood,E.R.and C.Lee,Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate.World J Urol,1995,13（5）：p.290-6）。1つの研究は、46の前立腺癌発現EGFRのうちの22を見出した（Cohen,D.W.et al.,Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues.J Urol,1994.152（6 Pt 1）：p.2120-4）。

40

【0561】

脂肪酸シンターゼ（FAS）

脂肪酸シンターゼ（FAS）、または癌抗原519（OA-519）は鍵となる脂肪生成酵素である。それは、最近、乳癌において貧弱な予後に関連付けられた。Shurbajiおよび同僚（Shurbaji,M.S.,J.H.Kalbfleisch and T.S.Thurmond,Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase（OA-519）as a predictor of progression of prostate cancer.Hum

50

Pathol,1996.27(9):p.917-21)は、FASの発現が前立腺癌の57%にあり、FAS陽性癌はFAS陰性癌よりもより進行するようであることを示した。Swinnenの研究(Swinnen,J.V.et al.,Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer.Int.J Cancer,2002.98(1):p.19-22)において、良性過形成腺構造は全てFAS染色につき陰性であり、免疫組織化学シグナルは25の低グレード前立腺上皮新形成(PIN)病巣のうち24において、26の高グレードPIN病巣のうち26において、および87の侵入性癌腫のうち82において明らかであった。染色強度は、低グレードから高グレードPINに増加して、癌腫に侵入する傾向がある。高いFAS発現を持つ癌は総じての高い増殖指標を有した。もう1つの研究は、FASが前立腺癌に対して重要な予後マーカーであって、Gleasonスコアのそれを超えてさらなる予測情報を提供する少数のマーカーのうちの1つであることを見出した(Epstein,J.I.,M.Carmichael and A.W.Partin,0A-519(fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate.Urology,1995.45(1):p.81-6)。

10

【0562】

ID-1

ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質ID-1は、塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子がDNAに結合するのを妨げるように働き、従って、分化関連遺伝子の転写を阻害する。ID-1の過剰発現が、乳癌、食道癌、膵臓癌および甲状腺髄質癌のようなある種の腫瘍で報告されている。Ouyangおよび同僚(Ouyang,X.S.et al.,Overexpression of ID-1 in prostate cancer.J Urol,2002.167(6):p.2598-602)は、正常な前立腺またはBPH組織におけるID-1の陰性～弱い発現が免疫組織化学実験およびインサイチュハイブリダイゼーションで観察されたと記載している。対照的に、全ての前立腺癌バイオプシーは、メッセンジャーRNAおよびタンパク質レベルでの腫瘍細胞における有意な陽性ID-1発現を示した。さらに、ID-1の発現は十分に分化した癌腫におけるよりも貧弱に分化した癌腫においてより強く、これは、ID-1発現のレベルが腫瘍のグレードに関連し得ることを示唆する。

20

【0563】

カリクレイン2

ヒト腺カリクレイン2(hK2)はセリンプロテアーゼの多重遺伝子族のメンバーである。それは前立腺上皮で発現され、アンドロゲンの調節下にある。カリクレイン2は血清および精液に存在する。それは内因性プロテアーゼ阻害剤(例えば、 α 2-マクログロブリンおよび α 1-抗キモトリプシン)とで複合体を形成することができる。研究は、カリクレイン2が前立腺特異的抗原(PSA)と組み合わせた場合に、増加した前立腺癌検出の特異性を示す(Partin,A.W.et al.,Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis.Urology,1999.54(5):p.839-45)。もう1つの研究は、ヒト腺カリクレインおよび遊離前立腺特異的抗原(PSA)の組合せが、中程度に増大した合計PSAを持つ患者において前立腺癌および良性前立腺過形成の間の識別を高めることを示した(Magklara,A.et al.,The combination of human glandular kallikrein and free prostate-specific antigen(PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA.Clin Chem,1999.45(11)p.1960-6)。Namおよび同僚(Nam,R.K.et al.,Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen.J Clin Oncol,2000.18(5):p.1036-42)は、血清ヒト腺カリクレイン2レベルが上昇したPSAを持つヒトの間で前立腺癌の存在を予測すると記載した。

30

40

【0564】

Ki-67

これは、増殖する正常および新形成細胞で発現される核タンパク質である。Ki-67発現は後期G1、S、MおよびG2期と命名される細胞周期の間に起こるが、G0期では起こらない(Cattoretto,G.et al.,Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67

50

antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 1992. 168 (4) : p. 357-63)。Ki-67は細胞増殖マーカーとして通常は用いられ、それは核に位置する。研究は、前立腺癌におけるKi-67染色が、過激な前立腺切除後に独立した予後情報を提供し、Ki-67免疫反応性が前立腺癌生存についてのプリディクターであることを示す (Halvorsen, O. J. et al., Maximum Ki-67 staining in prostate cancer provides independent prognostic information after radical prostatectomy. *Anticancer Res*, 2001. 21 (6A) : p. 4071-6 ; Stattin, P. et al., Cell proliferation assessed by Ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer. *J Urol*, 1997. 157 (1) : p. 219-22)。

10

【 0 5 6 5 】

Leu7

この抗原は非癌性および癌性前立腺上皮、ならびにナチュラルキラー細胞および有髄神経で存在する。Liuおよび同僚 (Liu, X. et al., Immunohistochemical study of HNK-1 (Leu-7) antigen in prostate cancer and its clinical significance. *Chin Med J (Engl)*, 1995. 108 (7) : p. 516-21) は、前立腺癌の94%がLeu7につき陽性であることを示した。十分に分化した癌は最高パーセンテージの陽性癌細胞および最も強い染色を示し、他方、貧弱に分化した癌は最低パーセンテージの陽性癌細胞および最も弱い染色を有したことを示した。もう1つの研究は、前立腺癌でのLeu7の発現が前立腺癌を持つ患者についての有用な予後因子であり得ることを示唆した (Liu, X. H. et al., The prognostic value of the HNK-1 (Leu-7) antigen in prostatic cancer--an immunohistochemical study. *Hinyokika Kiyo*, 1993. 39 (5) : p. 439-44)。

20

【 0 5 6 6 】

MDM2

これは、細胞プロトオンコジーン産物である。MDM2はp53に結合し、ユビキチンを介する分解を促進し、そのトランス活性化ドメインをマスクし、および細胞周期阻止およびアポトーシスに関連する遺伝子のその転写活性化を抑制する (Momand, J. and G. P. Zambetti, Mdm-2: 「big brother」 of p53. *J Cell Biochem*, 1997. 64 (3) : p. 343-52)。MDM2遺伝子の増幅またはMDM2タンパク質の過剰発現が腫瘍の発生に関係付けられており、MDM2過剰発現がより攻撃的な疾患およびより貧弱な生存に関連付けられている (Freedman, D. A., L. Wu and A. J. Levine, Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 1999. 55 (1) : p. 96-107)。Leiteおよび同僚 (Leite, K. R. et al., Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 2001. 14 (5) : p. 428-36) は、MDM2が前立腺腺癌症例の41%で過剰発現されたことを示した。p53およびMDM2双方につき陽性である腫瘍はより大きく、より進行した段階のものであった。結果は、MDM2-陽性/p53-陽性表現型が攻撃的な挙動にて前立腺癌を同定することを示唆する。

30

【 0 5 6 7 】

N-カドヘリン

E-カドヘリンと同様に、これは細胞接着分子である。細胞間相互作用の変化は癌進行のプロセスで非常に重要である。同様に、細胞接着分子E-カドヘリンの発現の喪失は前立腺癌を含む多くの癌腫においてグレード、段階および予後に関連することが示されている。損なわれたE-カドヘリン媒介相互作用の結果、侵入的表現型がもたらされる。しかしながら、細胞間接触および通信の単純な喪失は、E-カドヘリン媒介接着および貧弱な臨床的結果の間の観察された相関についての唯一の説明ではない (Kuniyasu, H. et al., Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor or vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res*, 2000. 6 (6) : p. 2295-308 ; (Bryden, A. A. et al., E-cadherin and beta-catenin are down-regulated in prostatic bone metastases. *BJU Int*, 2002. 89 (4) : p. 400-3 ; Umbas, R. et al., Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with

40

50

prostate cancer. *Cancer Res*, 1994. 54 (14) : p. 3929-33)。Bussemakers および 同僚 (Bussemakers, M. J. et al., Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer*, 2000. 85 (3) : p. 446-50) は、N-カドヘリンがヒト前立腺癌細胞系で上昇調節されることを示した。もう1つの研究は、N-カドヘリンが正常な前立腺組織で発現されず、しかしながら、前立腺癌においては、N-カドヘリンは、主に異常なまたは陰性E-カドヘリン染色を示した貧弱に分化した領域において発現されることが判明したことを示した (Tomita, K. et al., Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2000. 60 (13) p. 3650-4)。

【 0 5 6 8 】

P504S

α -メチルアシル-CoAラセマーゼ (P504S) は細胞質タンパク質である。それは、最近、前立腺癌腫から、高スループットマイクロアレイスクリーニングと組み合わせてcDNAライブラリー減算によって同定された。Jiang および 同僚 (Jiang, Z. et al., P504S : a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2001. 25 (11) : p. 1397-404) は、良性および癌性前立腺組織についての免疫細胞化学によってP504Sを調べた。P504Sは、Gleasonスコアおよび拡散にもかかわらず前立腺癌腫の100%において強い細胞質粒状染色を示した。対照的に、67の良性前立腺癌のうち56 (84%) および癌に隣接する良性腺の127の症例のうち115 (91%) を含む194の良性前立腺のうち171 (88%) がP504Sにつき陰性であった。もう1つの研究は、P504Sが、前立腺腺癌からの前立腺の非定型腺腫様過形成を識別するための非常に有用なマーカーであることを示している (Yang, X. J. et al., Expression of alpha-Methylacyl-CoA racemase (P504S) in atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. *Am J Surg Pathol*, 2002. 26 (7) : p. 921-5)。

【 0 5 6 9 】

p53

これは腫瘍抑制遺伝子である。p53の不活化は、全てのヒト癌の半分にわたっての腫瘍形成に関連付けられる。それは、DNA損傷に応答しての細胞のG₁期増殖阻止に関与し、ならびに紡錘体チェックポイント、動原体ホメオスタシス、およびG₂-M期転位の調節において役割を有する転写レギュレーターとして機能する。また、それは、多くの細胞型において転写依存性および非依存性メカニズムによってアポトーシスを誘導し、腫瘍脈管形成を調節する (Kirsch, D. G. M. and M. B. Kastan, Tumor-suppressor p53 : implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*, 1998. 16 (9) : p. 3158-68 ; Agarwal, M. L. et al., The p53 network. *J Biol Chem*, 1998. 273 (1) : p. 1-4 ; Liebermann, D. A., B. Hoffman, and R. A. Steinman, Molecular controls of growth arrest and apoptosis : p53-dependent and independent pathways. *Oncogene*, 1995. 11 (1) : p. 199-210)。Thompson および 同僚 (Thompson, S. J. et al., P53 and Ki-67 immunoreactivity in human prostate cancer and benign hyperplasia. *Br J Urol*, 1992. 69 (6) : p. 609-13) は、p53を持つ前立腺癌検体が染色され、他方、良性前立腺過形成 (BPH) で染色は観察されなかったことを示した。もう1つの研究は、p53の核蓄積は前立腺癌についての有意な予後インジケータであったことを示した (Quinn, D. I. et al., Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res*, 2000. 60 (6) : p. 1585-94)。

【 0 5 7 0 】

前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)

前立腺酸性ホスファターゼ (PAP) は、前立腺特異的抗原 (PSA) として、一次または転移性前立腺癌腫の信頼できる診断の可能性を大いに増大させた。研究は、PAPの診断感度が90~100%であって、その特異性が87~100%であることを示し、PAPは進行した前立腺癌腫の有用な予後インジケータである (Svanholm, H. M. and M. Horder, Clinical application of prostatic markers. I. Classification of prostatic tumours using immunohistochemical techniques. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 1988. 107 : p. 65-70 ; (Sakai, H. et al., Prostate specific antigen and prostatic acid phosphatase immunoreactivity as

10

20

30

40

50

prognostic indicators of advanced prostatic carcinoma. J Urol, 1993. 149 (5) : p. 1020-3)。

【 0 5 7 1 】

前立腺インヒビンペプチド (PIP)

前立腺インヒビンペプチド (PIP) は前立腺によって合成されるポリペプチドである。それは前立腺の増殖および分化に關与する。PIP遺伝子は、多数の脆い部位を含む7q34領域に局在している。PIP遺伝子の再編成が前立腺癌腫で見出された (Autiero, M. et al., Abnormal restriction pattern of PIP gene associated with human primary prostate cancers. DNA Cell Biol, 1999. 18 (6) : p. 481-7)。Gardeおよび同僚 (Garde, S. V. et al., Prostate inhibin peptide (PIP) in prostate cancer : a comparative immunohistochemical study with prostate-specific antigen (PSA) and prostatic acid phosphatase (PAP) . Cancer Lett, 1994. 78 (1-3) : p. 11-7) は、PIPが、前立腺癌腫の診断においてPSAおよびPAPと同程度の免疫組織化学マーカーの感受性および特異性であることを示した。さらに、PIPのアンドロゲン非独立性性質は、それに、アンドロゲン除去剤に曝露された腫瘍においてPSA/PAPよりも優れた利点を与えることができる。

【 0 5 7 2 】

前立腺特異的抗原 (PSA)

前立腺特異的抗原 (PSA) は前立腺上皮の産物であって、通常、精液に分泌される。それは、その機能が、射精後に形成される精液凝塊を切断し、液化することであるセリンプロテアーゼである。PSAは器官特異的であり、癌特異的ではない。従って、PSAレベルの上昇は癌におけるのみならず、前立腺の節過形成および前立腺炎のような非新形成疾患においても起こる。PSAそれ自体は初期癌の検出で用いることができない。しかしながら、直腸検査および経直腸超音波検査と組み合わせた場合、PSAレベルの測定は初期段階癌の検出で有用であると考えられる (Crawford, J. M. and R. S. Cotran, The Male Genital Tract, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R. S. Cotran, V. Kuman and T. Collins, Editor. 1999, W. B. Saunders Company : Philadelphia. p. 1011-1034)。より多くの証拠は、無血清PSAは前立腺癌腫の診断において全PSAよりも正確であることを示唆している (Catalona, W. J. et al., Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. Jama, 1998. 279 (19) : p. 1542-7)。前立腺癌腫診断のためのPSAの免疫組織学的研究もやはり非常に感度がよく、特異的である。Svanholmおよび同僚 (Svanholm, H. M. and M. Horder, Clinical application of prostatic markers. I. Classification of prostatic tumours using immunohistochemical techniques. Scand J Urol Nephrol Suppl, 1998. 107 : p. 65-70) は、前立腺癌腫診断のためのPSAの感度は94 ~ 100%であって、その特異性は100%であることを示した。

【 0 5 7 3 】

V. 乳癌

乳癌についてのスクリーニングツールとしての非侵入性マンモグラフィーは効果的ではない (Gotzsche, P. C. and O. Olsen, Is screening for breast cancer with mammography justifiable? Lancet, 2000. 355 (9198) : p. 129-34)。従って、乳癌につきスクリーニングする他の技術が研究された。種々の乳癌マーカーが発見されて、適時に正確な診断をなすにおいて医師を助け、かなり良好な患者管理を提供している。あいにく、これらの腫瘍マーカーのいずれも、高い感度および特異性双方を持つ「魔法の弾丸」ではない。従って、診断精度を高めるための代替方法が必要である。

【 0 5 7 4 】

診断精度を高めるための代替方法は、その各々が乳癌に関連するマーカーに特異的に結合する複数のプローブを含むパネルを開発することである。全ての候補プローブはICCおよび/またはIHC技術でテストされるべきである。いくつかの態様において、検体は微小針吸引 (FNA) から得ることができる。他の態様において、検体は微小針バイオプシー (FNB) から得ることができる。FNAおよびFNB手法による腫瘍の適切な位置決定およびサンプリ

ングは、超音波および他のイメージ-ガイディング技術によって助けることができる。いくつかの態様において、テスト細胞は乳管洗浄から得られる。この目的のためのデバイスは容易に入手可能であり、手動胸ポンプと同様なアスピレーターを介して細胞を収集することによって作動することができる。小さな吸引カップを用いて、乳首を通じて乳首吸引液（NAF）を吸い取る。NAFの存在は乳首の表面の管の天然の開口を位置付けるのを助ける。次いで、非常に小さなフレキシブルなマイクロカテーテルを管にほぼ半インチ挿入して洗浄し、乳管を裏打ちする細胞を収集する。

【0575】

一旦検体が収集されれば、検体を処理し、分析する。統計学的分析を用いて、肺癌につき前記したように、パネルを設計する。処理の間、粗い洗浄の間にスライドに粘着しない細胞スミアまたはペレットのような技術的問題がいくつかの態様で起こるかもしれない。しかしながら、そのような問題は、ソフトウェアの操作、またはそのような問題を解決するための染色プロトコルの修飾によって容易に取り組むことができる。いくつかの態様において、検体を自動的にサンプリングし、診断用のスライドを調製するデバイスを用いて、検体を処理し、分析する。広いメニューのプロープが最初に用いられると予測される。プロープの数は、適当なサイズのパネルまで減らして、高いレベルの感度および特異性を保持する。最終プロープの選択は、陽性染色腫瘍細胞のパーセンテージの予め規定された閾値に基づくであろう。巧妙な統計学的分析を用いて、これらの決定を行う。悪性疾患の検出に対するパネル-アッセイアプローチは固形腫瘍に適用でき、同一腫瘍マーカーのいくつかは異なるパネルにあるので、この方法は平行して、ならびに系列的に行うことができる。このように、アッセイ開発プロセスを行うことができる。

【0576】

プロープ/マーカーのライブラリー

癌マーカーについての情報を含む種々の源をレビューした。乳癌の20%以上の陽性の任意の基準を用いて、乳癌の検出および/または診断用の好ましいパネルのためのプロープを選択した。用語「20%以上の陽性」は、もし100の腫瘍症例を調べれば、これらの症例の20以上は個々のマーカーの存在を示し、他方、残りの80症例は個々のマーカーの存在を示さないことを意味する。好ましいパネルはAE1/AE3、BCA-225、Bcl-2、BRCA-1、癌抗原15.3（CA 15.3）、カセスピンド、癌胎児性抗原（CEA）、C-erb-B2、E-カドヘリン、表皮増殖因子受容体（EGFR）、エストロゲン受容体（ER）、交差線維病流体タンパク質15（GCDFP-15）、HOX-B3、Ki-67、MUC-1、p53、p65、プロゲステロン受容体（PR）、網膜芽腫（Rb）およびトランスグルタミナーゼK（TGK）から選択される分子マーカーを含むことができる。本実施例で利用したプロープ/マーカーのライブラリーの短い記載を以下に掲げる。

【0577】

AE1/AE3

これは、抗ケラチン抗体のカクテルである。ケラチンは、乳管上皮のような上皮起源の細胞中の中間径フィラメントを形成する水不溶性タンパク質のグループである。抗ケラチンAE1は酸性サブファミリーの56および40kDケラチンを認識する。抗ケラチンAE3は塩基性サブファミリーを認識する。AE1およびAE3は、乳管癌腫からのリンパ節転移の同定において他の抗サイトケラチンよりも効果的であることが示されている（Elson, C.E., D.Kufe and W.W.Johnston, Immunohistochemical detection and significance of axillary lymph node micrometastases in breast carcinoma. A study of 97 cases. Anal Quant Cytol Histol, 1993. 15 (3) : p. 171-8）。Kowolikおよび同僚（Kowolik, J.H. et al., Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes of the breast applying monoclonal antibodies AE1/AE3 to pancytokeratins. Oncol Rep, 2000. 7 (4) : p. 745-9）は、AE1/AE3免疫組織化学染色によって正しく予測された乳癌転移を持つ腋窩リンパ節の33症例のうち32を示した。また、AE1/AE3は、小葉乳癌腫を浸潤する節において不顕性転移を検出するための最も感度の良好なマーカーであることが示された（Kainz, C. et al., Infiltrating lobular breast carcinoma: detection of occult regional lymph node metastasis by immunohistochemistry. Anticancer Res, 1993. 13 (1) : p. 73-4）。

【 0 5 7 8 】

BCA-225

この抗体は、他の乳癌腫抗原とはサイズおよび分布が異なるヒト乳癌腫関連糖タンパク質BCA-225 (220-225kD) を認識する。しかしながら、乳癌腫抗原に対する他の癌腫抗体とは異なり、BCA-225は良性または悪性胃腸組織と反応しない。1つの研究は、乳癌腫の94%がBCA-225につき陽性であることを示し (Mesa-Tejada, R. et al., Immunocytochemical distribution of a breast carcinoma associated glycoprotein identified by monoclonal antibodies. Am J Pathol, 1988. 130 (2) : p. 305-14)、他方、もう1つの研究は、乳癌腫を含有する滲出液の78%が陽性であって、全ての良性滲出液は免疫組織化学によるとBCA-225につき陰性であることを示した。BCA-225は高度に特異的な弁別体であって、腺癌および反応性中皮腫細胞の異なる診断で非常に有用である (Loy, T. S., A. A. Diaz-Arias, and J. T. Bickel, Value of BCA-225 in the cytologic diagnosis of malignant effusions: an immunocytochemical study of 197 cases. Mod Pathol, 1990. 3 (3) : p. 294-7)。

10

【 0 5 7 9 】

Bcl-2

細胞に対する生存閾値は、細胞死滅サプレッサーと、外部因子または刺激体によって、ならびに細胞内分子によって提供された細胞死滅プロモーターシグナルとの間のバランスによって決定される。Bcl-2はこの決定において中枢的な役割を有し、その産物は抗アポトシス分子として作用する (Daidone, M. G. et al., Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. Endocr Relat Cancer, 1999. 6 (1) : p. 61-8)。Bcl-2タンパク質は癌形成に寄与することが示されている。なぜならば、それはc-myc, rasまたはウイルス遺伝子と共働して細胞を形質転換し、不死化することができるからである (Del Bufalo, D. et al., Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. Faseb J, 1997. 11 (12) : p. 947-53)。Bcl-2発現は、ほとんどの小胞リンパ腫におけるt (14; 18) トランスロケーションと最も通常には関連する。より最近、Bcl-2は非血液学的悪性疾患で同定されている。Alsabehおよび同僚は、Bcl-2が一次肺および胃癌腫から転移性乳癌腫を識別するにおいて有用なマーカーであり、それが同様に有用な予後インジケータであると判断した (Alsabeh, R. et al., Expression of bcl-2 by breast cancer: a possible diagnostic application. Mod Pathol, 1996, 9 (4) : p. 439-44)。

20

30

【 0 5 8 0 】

BRCA-1

これは、染色体17の長いアームに位置した腫瘍抑制遺伝子である。腫瘍抑制遺伝子は、細胞増殖を調節するにおいて臨界的な役割を演じる。BRCA-1は、細胞周期の負のレギュレーターとして通常は機能し、新形成進行の能動的阻害剤であり得る核リントタンパク質である。BRCA1遺伝子の突然変異は家族性乳癌の80%で示されている。BRCA1の減少したmRNAレベルまたは異常細胞下位置が、乳癌系において、および乳癌組織の散在性症例において同定された。BRCA1突然変異は同様に卵巣癌にリンクしている (Lee, W. Y. et al., Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. Histopathology, 1999. 34 (2) : p. 106-12)。Jarvisおよび同僚 (Jarvis, E. M., J. A. Kirk and C. L. Clarke, Loss of nuclear BRCA1 expression in breast cancers is associated with a highly proliferative tumor phenotype. Cancer Genet Cytogenet, 1998. 101 (2) : p. 109-15) は、BRCA-1についての核染色がほとんどの散在性腫瘍で観察されたが、核BRCA-1は家族性および初期開始乳癌腫の大部分で減少するか、または存在しないことを見出した。有意な逆相関が核BRCA-1および増殖マーカーKi-67の間で見出された。もう1つの研究は、BRCA-1発現が、p53、c-erb-B2、Bcl-2、ER、組織学的グレード、腫瘍サイズ、腋窩リンパ節の状態および年齢を含む他の予後マーカーと相関することを明らかにした (Lee, W. Y. et al., Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. Histopathology, 1999. 34

40

50

(2) : p.106-12)。

【0581】

癌抗原15.3 (CA-15.3)

癌抗原15.3は血清炭水化物抗原である。CA-15.3の増大した血清濃度は乳癌腫ならびに正常および良性乳房疾患と関連付けられている。しかしながら、CA-15.3のレベルは正常または良性乳房疾患いずれかにおけるよりも乳癌腫において有意に高い (Barak, M. et al., CA-15.3, TPA and MCA as markers for breast cancer. Eur J Cancer, 1990. 26 (5) : p. 577-80)。Martoniおよび同僚 (Martoni, A. et al., CEA, MCA, CA 15.3 and CA 549 and their combinations in expressing and monitoring metastatic breast cancer: a prospective comparative study. Eur J Cancer, 1995. 31A (10) : p. 1615-21) は、CA 15.3が、転移性乳癌を検出するにおいて、他の腫瘍マーカーよりも高い感度を有することを示した。

10

【0582】

カテプシンD

これは、可溶性リソソームアルパラギン酸プロテイナーゼである。それは、プレプロカテプシンDとして小胞体で合成される。マンノース-6-リン酸タグ、プロカテプシンDを有することは、マンノース-6-リン酸受容体によって認識される。酸性リソソームに入ると、一本鎖プロカテプシンD (52kD) はカテプシンDに活性化される。カテプシンDの基本的な役割は、細胞内および内部化タンパク質の分解である。(mRNAおよびタンパク質双方のレベルにおける) カテプシンDの増大したレベルは、最初、1980年半ばにいくつかのヒト新形成組織で報告された。これらの知見は、新形成プロセスにおけるカテプシンDについての可能な役割の精力的な研究を生じさせた。強い予測値が、乳癌、ならびに多くの他の腫瘍タイプにおけるカテプシンD濃度で見出された (Vetvicka, V. et al., Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells. Int J Cancer, 1997. 73 (3) : p. 403-9; Vetvicka, V., J. Vetvickova and M. Fusek, Effect of procathepsin D and its activation peptide on prostate cancer cells. Cancer Lett, 1998. 129 (1) : p. 55-9)。Niuおよび同僚 (Niu, Y. et al., Potential markers predicting distant metastasis in axillary node-negative breast carcinoma. Int J Cancer, 2002. 98 (5) : p. 754-60) は、カテプシンDが、腋窩節陰性乳癌患者において遠隔転移を予測する優れたマーカーであることを見出した。

20

30

【0583】

癌胎児性抗原 (CEA)

癌胎児性抗原 (CEA) は、結腸直腸癌についての診断およびフォローアップでのその役割について周知である。乳癌腫のCEA陽性も報告されている。Alexiev (Alexiev, B. A. et al., Immunocytochemical detection of carcinoembryonic antigen in fine-needle aspirates from patients with diverse breast diseases. Diagn Cytopathol, 1993. 9 (4) : p. 377-82) および同僚は、一次乳癌腫の90%がCEAにつき陽性細胞質染色を示し、他方、良性乳房疾患のいずれも微小-針吸引およびパラフィン包埋組織セクションで陽性ではないと報告した。他の者は、CEAが線維腺腫および嚢胞性変化病につき陽性であり、25% ~ 64%の範囲であることを報告した (Wittekind, C., S. Von Kleist and W. Sandritter, CEA positivity in tissue and sera of patients with benign breast lesions. Oncodev Biol Med, 1981. 2 (6) : p. 381-90)。

40

【0584】

c-erb-B2

これは癌遺伝子であって、その産物は癌タンパク質として知られている。Her2/neuとしても知られたc-erb-B2は、c-erb-B1、c-erb-B2およびc-erb-B3を含む表皮成長因子受容体 (EGFR) ファミリーに属する。c-erb-B2の過剰発現は、胸、卵巣、肺、前立腺、胃および唾液腺内で生起するヒト癌腫の高いパーセンテージと関連する。c-erb-B2のような、成長因子を過剰発現する腫瘍は、少量の成長因子の成長-促進効果に対して強烈に感受性であり、よって、より攻撃的なようである。この仮説は、乳癌細胞でのc-erb-B2タンパク質の

50

高レベルが貧弱な予後の前兆であるという観察によって裏付けられる (Mitchell, R.N. and R.S.Cotran, Neoplasia, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S.Cotran, V.K.Kumar, and T.Collins, Editor. 1999, W.B.Sauders Company: Philadelphia. p.260-327)。Inaji および同僚 (Inaji, H. et al., ErbB-2 protein levels in nipple discharge: role in diagnosis of early breast cancer. Tumour Biol, 1993. 14 (5) : p.271-8) は、乳頭分泌物における c-erbB-2 癌タンパク質のレベルが乳癌腫患者で上昇していることを見出した。1つの研究は、乳癌腫の、および1つの対応する組織セクションを除いて全ての微小針吸引の34%が c-erbB-2 癌タンパク質につき陽性であることを明らかにした (Jorda, M., P.Ganjei, and M.Nadji, Retrospective c-erbB-2 immunostaining in aspiration cytology of breast cancer. Diagn Cytopathol, 1994. 11 (3) : p.262-5)。

10

【0585】

E-カドヘリン

このタンパク質は、乳腺における主要細胞接着分子であることが示唆されている。細胞質においては、E-カドヘリンは、細胞骨格の結合を媒介するアルファ-およびベータ-カテニンに連結している。加えて、c-erbB-2タンパク質は、ベータカテニンリン酸化を通じて細胞接着系の破壊を引き起こす (Nagae, Y. et al., Expression of E-cadherin catenin and C-erbB-2 gene products in invasive ductal-type breast carcinomas. J Nippon Med Sch, 2002. 69 (2) : p.165-71)。E-カドヘリンの減少した発現が乳癌腫で見出されている (Mitchell, R.N. and R.S.Cotrin, Neoplasia, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S.Cotran, V.K.Kumar, and T.Collins, Editor. 1999, W.B.Sauders Company: Philadelphia. p.260-327)。

20

【0586】

表皮成長因子受容体 (EGFR)

表皮成長因子受容体 (EGFR) は膜貫通糖タンパク質である。それは、細胞の増殖および分化で重要な役割を演じる。EGFR発現は広域スペクトルの正常組織で示されており、他方、過剰発現は種々の新生物と関連付けられている。Sue および同僚 (Suo, Z. et al., Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. Histopathology, 1998. 33 (6) : p.514-21) は、乳腫瘍組織における4つのEGFRファミリーメンバーの発現パターンを調べ、良性腫瘍も、全てより低い、中程度のレベルではあるが、EGFRタンパク質を発現したが、乳腫瘍組織の53%はEGFRにつき強く陽性であることを見出した。EGFR発現および増大する悪性腫瘍のグレードの間の関連は、浸潤管癌腫の群で見出された。

30

【0587】

エストロゲン受容体 (ER)

エストロゲンは種々の生理学および疾患-連結プロセス、最も顕著には、生殖、骨再形成および乳癌を制御し、その効果はエストロゲン受容体 (ER) といわれる古典的受容体を介して変換される。このモノクローナル抗体はエストロゲン受容体の67kDポリペプチド鎖のN-末端ドメイン (A/B領域) と反応し、核染色パターンを呈するが、細胞質反応性はほとんどまたは全くない。腫瘍組織において、ERは、乳癌、および他のエストロゲン依存性組織に由来するヒト新生物の上皮細胞と強く反応する。一般に、その核においてERを発現する細胞を有する癌は良好な予後を有するであろう。なぜならば、そのような陽性新形成細胞は良好に分化し、ホルモン操作に応答できるからである。タモキシフェン、薬物は、この目的でしばしば利用される (Barnes, D.M. et al., Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. Br J Cancer, 1996. 74 (9) : p.1445-51; Pichon, M.F. et al., Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. Br J Cancer, 1996. 73 (12) : p.1545-51)。

40

【0588】

グロス嚢胞性病流体タンパク質15 (GCDFP-15)

グロス嚢胞性病流体タンパク質15 (GCDFP-15) は、アポクリン汗腺、外分泌腺、小唾液

50

腺、気管支腺および胸の化生上皮によって発現される糖タンパク質（15kD）である。アポクリン特徴を持つ乳癌腫（一次および転移性病巣）はGCDFP-15抗原を発現する。GCDFP-15は乳首外パジェット病で陽性であり、他方、テストした他の腫瘍は陰性である。多数の組織病理学研究は、GCDFP-15が外科検体において乳癌についての特異的マーカーであることを示している。また、Fielおよび同僚（Fiel, M. I. et al., Value of GCDFP-15 (BRST-2) as a specific immunocytochemical marker for breast carcinoma in cytologic specimens. *Acta Cytol*, 1996. 40 (4) : p. 637-41）は、GCDFP-15が、細胞学的検体における乳癌腫についての特異的免疫組織化学マーカーであることを示した。

【0589】

HOX-B3

ホメオボックス（HOX）遺伝子は、61アミノ酸DNA結合ホメオドメインを含み、正常癌形成および組織形成の間に他の遺伝子の転写調節に関与するタンパク質をコードする。クラスIのHOX遺伝子はヒトにおいて異なる染色体上で4つのクラスターに組織され、これらのクラスターの各々内の遺伝子の順序は高度に保存されている。HOX遺伝子産物の再発現は、広く種々の新形成的に形質転換された細胞で報告されており、HOX遺伝子は、正常発生および癌形成、ならびに腫瘍進行に関するなおもう1つのクラスの腫瘍胎児性抗原をかなり表すようである。HOX-3はHOX遺伝子産物（HOX-B3、-B4、および-C6）の1つである。1つの研究は、乳癌腫の90%を超えるものがHOX-B3につき陽性であることを示した（Bodey, B. et al., Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4 and C6 gene products in breast carcinomas. *Anticancer Res*, 2000. 20 (5A) : p. 3281-6）。

【0590】

Ki-67

これは、正常および新形成細胞の増殖で発現される核タンパク質である。Ki-67の発現は、後期G1、S、MおよびG2と命名される細胞周期の期の間に起こる。しかしながら、G0期の間には、抗原は検出できない。研究は、Ki-67の発現がエストロゲンおよびプロゲステロン受容体と逆に関係していることを示し、これは、高いKi-67のレベルはより攻撃的な表現型および貧弱な予後を特徴付けるようである（Ceccarelli, C. et al., Quantitative p21 (waf-1) / p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer*, 2001. 95 (2) : p. 128-34; Ceccarelli, C. et al., Retinoblastoma (RB1) gene Product expression in breast carcinoma. Correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. *J Clin Pathol*, 1998. 51 (11) : p. 818-24）。

【0591】

MUC-1

上皮ムチンは、上皮細胞およびその癌腫によって分泌される糖タンパク質である。少なくとも9つのムチン遺伝子が同定されており、その産物であるMUC1～MUC9は種々の上皮で発現される。MUC1は胸上皮細胞で発現されるムチンであり、他方、MUC2およびMUC3は第一には腸ムチンである。MUC1抗原は細胞表面糖タンパク質である。この抗原は、正常な組織には存在しない形態で、ヒト乳癌の90%で豊富である（Diaz, L. K., E. L. Wiley and M. Morrow, Expression of epithelial mucins Muc1, Muc2 and Muc3 in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast J*, 2001. 7 (1) : p. 40-5）。1つの研究（Croce, M. V. et al., Expression of tumour associated antigens in normal, benign and malignant human mammary epithelial tissue: a comparative immunohistochemical study. *Anticancer Res*, 1997. 17 (6D) : p. 4287-92）は、良性胸組織が、先端細胞表面膜およびルーメンデブリスに制限される、低強度のMUC-1を発現したことを示した。

【0592】

p53

これは腫瘍抑制遺伝子である。p53タンパク質の高濃度は多数の腫瘍および腫瘍細胞系で起こり、他方、それは正常な細胞および組織ではごく微量に存在する。腫瘍細胞における増大した発現は、p53タンパク質の突然変異によって、または他のタンパク質との複合

10

20

30

40

50

体化によって引き起こされ得る。p53についての遺伝子は染色体17pに位置しており、対立遺伝子喪失の頻繁な部位は胸、肺、結腸、卵巣、精巣、膀胱、脳の腫瘍、メラノーマ、ある種のタイプの白血病および神経芽肉腫におけるものである。p53タンパク質の腫瘍細胞発現は、核染色パターンを呈する免疫組織化学によって検出することができる。p53癌タンパク質の発現は乳癌における貧弱な予後と相関することが示されている (Lee, W.Y. et al., Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology*, 1999. 34 (2) : p.106-12 ; Midulla, C. et al., Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res*, 1999. 19 (5B) : p.4033-7)。

【0593】

p65

この65kD癌胎児性タンパク質は、未だ知られていないリガンドを持つ、遺伝子のステロイド/甲状腺スーパーファミリーの新しいメンバーとして同定された。この受容体は腫瘍の発生で重要な役割を演じるらしいと示唆されている。p65の改変された形態は、乳癌を引き起こし得るある種のホルモンの過剰生産にリンクしている (Hanausek, M. et al., The oncofetal protein p65: a new member of the steroid/thyroid receptor superfamily. *Cancer Detect Prev*, 1996. 20 (2) : p.94-102) 。 Mirowski および 同僚 (Mirowski, M. et al., Serological and immunohistochemical detection of a 65-kDa oncofetal protein in breast cancer. *Eur J Cancer*, 1994. 30A (8) : p.1108-13) は、免疫組織化学によって評価して、p65が乳癌患者からの血清の90%で陽性であり、対応するバイオプシー処理組織の80%で陽性であったことを明らかにした。結果は、p65が、乳癌についての潜在的な血清および/または免疫組織化学マーカーであり得ることを示す。

【0594】

プロゲステロン受容体 (PR)

プロゲステロン受容体 (PR) に対するモノクローナル抗体は核染色パターンを呈する。腫瘍組織においては、PR発現は乳癌、および他のプロゲステロン依存性組織に由来するヒト新生物の上皮細胞で強く、他方、正常組織では、それは乳腺および子宮では陽性である。乳癌腫におけるPR陽性の重要性は余りよくは理解されない。一般に、ER陽性である癌もまたPR陽性である。しかしながら、PR陽性であるがER陽性ではない癌腫は悪い予後を有し得る (Blanco, G. et al., Estrogen and progesterone receptors in breast cancer: relationships to tumour histopathology and survival of patients. *Anticancer Res*, 1984. 4 (6) : p.383-9) 。 1つの研究は、PRが全ての皮下転移性乳腫瘍で陽性であり、他方、1つの腫瘍のみがERで陽性であることを示した (Wallace, M.L. and B.R. Smoller, Differential sensitivity of estrogen/progesterone receptors and BRST-2 markers in metastatic ductal and lobular breast carcinoma to the skin. *Am J Dermatopathol*, 1996. 18 (3) : p.241-7) 。

【0595】

網膜芽腫 (Rb)

これは腫瘍抑制遺伝子の1つである。網膜芽腫タンパク質 (pRb) は網膜芽腫遺伝子によってコードされるタンパク質であって、G0/G1において細胞周期を調節するように機能する。Rb機能の喪失は制御されていない細胞増殖に導く。網膜芽腫遺伝子の不活化は、乳癌を含めた種々のタイプの癌で記載されている。網膜芽腫遺伝子過少発現は胸-腫瘍攻撃性および迅速な腫瘍-細胞増殖を促進する (Bieche, I. and R. Lidereau, Loss of heterozygosity at 13q14 correlates with RB1 gene underexpression in human breast cancer. *Mol Carcinog*, 2000. 29 (3) : p.151-8) 。 Ceccarelli および 同僚 (Ceccarelli, C. et al., Retinoblastoma (RB1) gene product expression in breast carcinoma. Correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. *J Clin Pathol*, 1998. 51 (11) : p.818-24) は、侵入性乳癌腫におけるpRb発現および腫瘍マーカーKi-67、ER/PR、p53および

EGFRを研究し、pRb発現は知られた乳癌腫の大部分において増殖性活性と平行していることを見出し、これは、これらの症例において、前記タンパク質は細胞周期の調節において正常に挙動することを示唆する。逆に、pRb免疫染色の喪失を伴う症例において、EGFRおよびp53発現、エストロゲン受容体/プロゲステロン受容体陰性状態および高K67のような特異的な高度に攻撃的因子の組合された発現は、より攻撃的な表現型を特徴付けるらしい。

【0596】

トランスグルタミナーゼK (TGK)

トランスグルタミナーゼKは乳癌診断ではよく研究されていない。しかしながら、Friedrichおよび同僚 (Friedrich, M. et al., Correlation between immunoactivity for transglutaminase K and for markers of proliferation and differentiation in normal breast tissue and breast carcinomas. Eur J Gynaecol Oncol, 1998. 19 (5) : p. 444-8) は、弱い～強い膜染色が30の乳癌腫のうちの17で検出され、他方、正常な胸組織の90%がTGKに対する免疫反応性を明らかにしないことを示した。結果は、乳癌腫におけるTGKの上昇調節が、細胞-マトリックス相互作用を変調することによって、あるいはマトリックスの組立て、および組織再形成を容易とすることによって、腫瘍細胞侵入的特性の調節で重要な役割を演じ得ることを示唆する。

【0597】

VI. 頸癌

種々の頸癌マーカーが発見されて、適時に正確な診断をするにおいて医師を助け、かなり良好な患者管理を提供してきた。あいにく、これらの腫瘍マーカーのいずれも高い感度および特異性双方を持つ「魔法の弾丸」ではない。従って、診断の精度を高めるための代替方法が必要である。

【0598】

診断の精度を高めるための代替方法は、その各々が頸癌に関連するマーカーに特異的に結合する複数のプローブを含むパネルを開発することである。全ての候補プローブはICCおよび/またはIHC技術でテストされるべきである。いくつかの態様において、検体はPapスミアを用いて得ることができる。慣用的なPapスミアはスパチュラおよびブラシを利用して頸細胞を収集する。液体ベースの調製 (LBP) Papテストでは、ブルーム、ブラシまたはバルーンを用いて細胞を収集する。例えば、CytocのThinPrepR製品およびTriPathのSurePrepTM製品を用いることができる。加えて、Molecular Diagnosticsの「e2 Collector TM」は頸細胞を得るのに用いることができる。それはシリコンバルーンであり、頸部の鏡像のような形状をしている。頸部に対して膨張させた場合、細胞はバルーンの表面に接着し、単一工程で頸管内および子宮腔部細胞を収集する。

【0599】

一旦検体が収集されれば、検体を処理し、分析する。統計学的分析を用いて、肺癌について前記したように、パネルを設計する。処理の間に、粗い洗浄の間にスライドに粘着しない細胞スミアまたはペレットのような技術的問題がいくつかの態様で起こるであろう。しかしながら、そのような問題は、ソフトウェアの操作によって、またはそのような問題を解決するための染色プロトコルの修飾によって容易に取り組むことができる。いくつかの態様において、検体を自動的にサンプリングし、診断用のスライドを調製するデバイスを用いて検体を処理し、分析する。広いメニューのプローブをまず用いることが予測される。プローブの数は適切なサイズのパネルまで減らして、高レベルの感度および特異性を保持する。最終プローブの選択は、陽性染色腫瘍細胞のパーセンテージの予め規定された閾値に基づく。巧妙な統計的分析を使用して、これらの決定を行う。悪性疾患の検出に対するパネル-アッセイアプローチは固形腫瘍に適用することができ、同一腫瘍マーカーのいくつか異なるパネルにあるので、この方法は平行して、ならびに系列的に行うことができる。このように、アッセイの開発プロセスを実行することができる。

【0600】

頸部癌腫は、性的に伝播する因子によって引き起こされることが疫学的研究により示唆

されており、ヒトパピローマウイルス (HPV) が第一の被疑体である。ほぼ70の遺伝学的に区別されるタイプのHPVが同定されている。タイプ16および18、より普通ではないが、タイプ31、33、35および51が侵入性扁平細胞癌およびその前駆体 (インサイチューの酷い形成異常および癌腫) のほぼ85%で見出される。頸癌とは対照的に、低い悪性能力を持つ生殖器イボはHPV-6およびHPV-11の「低い危険性」のタイプに関連付けられている (Mitchell, R.N. and R.S. Cotran, Neoplasia, in Robbins Pathologic Basis of Disease, R.S. Cotran, V. Kumar and T. Collins, Editors, 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p.260-327)。

【0601】

HPV感染の分子診断は慣用的Papスミアよりも感度が良好で、特異的であり、疑わしいPapスミア結果を伴う女性の評価で付加価値を有する。DigeneのHybrid Capture II HPV DNAテストは高グレードの形成異常を持つ患者を検出するにおいて高度に効果的である (Solomon, D., M. Schiffman and R. Tarone, Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. J Natl Cancer Inst, 2001. 93 (4): p.293-9)。もう1つのHPV方法はMolecular Diagnosticsによって開発されたHPV16およびHPV18のE6およびE7タンパク質の検出である。HPV-16およびHPV-18の癌形成能力はこれらの2つの初期ウイルス遺伝子産物に関連付けられた (Huibregtse, J.M. and S.L. Beaudenon, Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. Semin Cancer Biol, 1996. 7 (6): p.317-26) および (zur Hausen, H., Papillomavirus and p53. Nature, 1998. 393 (6682): p.217)。Roche Diagnosticsは最近Institut PasteurからHPVテスト特許を獲得した。

【0602】

プローブ/マーカーのライブラリー

癌マーカーについての情報を含む種々の源をレビューした。乳癌の20%以上の陽性の任意の基準を用いて、乳癌の検出および/または診断用の好ましいパネルのためのプローブを選択した。用語「20%以上の陽性」は、もし100の腫瘍症例を調べれば、これらの症例の20以上が個々のマーカーの存在を示し、他方、残りの80以下の症例は個々のマーカーの存在を示さないことを意味する。好ましいパネルは癌胎児性抗原 (CEA)、C-erb-B2、サイクリンE、E6/E7、表皮成長因子受容体 (EGFR)、Ki-67、p16、p53、増殖細胞核抗原 (PCNA)、サバイビン、テロメラゼおよび血管内皮成長因子から選択される分子マーカーを含むことができる。本実施例で利用したプローブ/マーカーのライブラリーの短い記載を以下に掲げる。

【0603】

癌胎児性抗原 (CEA)

この癌胎児性抗原は、種々のヒト腫瘍で過剰発現される高度にグリコシル化された細胞表面タンパク質であって、結腸直腸癌患者における疾患進行についての腫瘍マーカーとして用いられてきた。従前の報告は頸癌を持つ患者において上昇した血清CEAレベルを見出したが、これは疾患進行と関連しなかった (Borras, G. et al., Tumor antigens CA 19.9, CA 125, and CEA in carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol, 1995. 57 (2): p.205-11)。Sarandakouおよび同僚 (Sarandakou, A. et al., Tumour-associated antigens CEA, CA125, SCC and TPS in gynaecological cancer. Eur J Gynaecol Oncol, 1998. 19 (1): p.73-7) は、頸癌患者における血清CEAレベルが、良性婦人科学病を持つ患者と比較して有意に増加したことを示した。もう1つの研究は、免疫組織化学染色によると、頸部上皮内新形成 (CIN III) および癌腫インサイチュー (CIS) で増加するが、これらの患者の結成CEAレベルは上昇しなかったことを報告している。結果は、CEA免疫染色は、初期段階において頸部形成異常または癌を診断するのに血清CEAよりも感度が良好であり得ることを示唆する (Tendler, A., H.L. Kaufman and A.S. Kadish, Increased carcinoembryonic antigen expression in cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and in cervical squamous cell carcinoma. Hum Pathol, 2000. 31 (11): p.1357-62)。

【0604】

C-erb-B2

この癌タンパク質は185kDの膜結合糖タンパク質である。それは、表皮細胞成長因子受容体 (c-erb-B1) に対して相同な細胞質膜上の受容体である。前記c-erb-B2癌遺伝子はいくつかのグループによって独立して発見され、その結果、HER2およびneuを含めた種々の名称によって言及される (Coussens, L. et al., Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 1985. 230 (4730) : p. 1132-9; Bargmann, C. I., M. C. Hung, and R. A. Weinberg, The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 1986. 319 (6050) : p. 226-30)。c-erb-B2の過剰発現は頸癌を持つ患者の14% ~ 38%で示されており、貧弱な予後に関連することが判明している (Hale, R. J. et al., Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma. *J. Clin Pathol*, 1992. 45(7):p. 594-6)。他の研究 (Sharma, A. et al., Frequent amplification of C-erbB2 (HER-2/Neu) oncogene in cervical carcinoma as detected by non-fluorescence in situ hybridization technique on paraffin sections. *Oncology*, 1999. 56 (1) : p. 83-7; Mitra, A. B. et al., ERBB2 (HER2/NEU) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*, 1994. 54 (3) : p. 637-9) は、頸癌におけるc-erb-B2の頻繁な増幅を見出した。c-erb-B2の発現は、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) および免疫組織化学 (IHC) によって測定して頸癌腫で上昇している (Kim, J. W., Y. T. Kim and D. K. Kim, Correlation between EGFR and c-erbB-2 oncoprotein status and response to neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*, 1999. 40(3):p. 207-14; Nagan, H. Y. et al., Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. *Tumour Biol*, 2001. 22 (3) : p. 176-83)。

【0605】

サイクリンE

サイクリンとして知られたタンパク質およびサイクリン依存性キナーゼ (CDK) と呼ばれる調節タンパク質の関連群は鍵となるチェックポイントを調節する。サイクリンEは、細胞周期の後期G1期においてCDK2と複合体化する50kDタンパク質である。癌形成は、細胞周期の脱調節によって特徴付けられる。p53は、依然として、ヒト悪性疾患において最も重要な細胞周期レギュレーターであるが、サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害剤の異常な発現は種々のヒト癌の悪性形質転換における最も重要な事象の1つと考えられることを示す証拠が益々増大している。Choおよび同僚 (Cho, N. H., Y. T. Kim and J. W. Kim, Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*, 1997. 16 (4) : p. 339-47) は、サイクリンEの発現が正常な頸部上皮では非存在であるが、HPV-陽性症例では有意に高いことを見出した。もう1つの研究は、侵入性頸癌または頸部形成異常いずれかを持つ患者は対照患者よりも有意に高いサイクリンE指標 (CEI) を有することを明らかにした (Tae Kim, Y. et al., Expression of cyclin E and p27 (KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett*, 2000. 153 (1-2) : p. 41-50)。

【0606】

E6/E7

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は頸癌と関連する。E1およびE2パピローマウイルスタンパク質は感染の初期段階に発現され、DNA複製を調節する。E2タンパク質は異なるHPVプロモーターからの転写を活性化し、抑制する。ウイルスDNAが細胞ゲノムに組み込まれるある段階において、E2遺伝子は破壊されるか、あるいは不活化される。この事象は、E6およびE7ウイルス癌遺伝子の抑制に繋がる。E6およびE7は細胞増殖、遺伝子発現、および悪性疾患への進行に影響する (Rosales, R., M. Lopez-Contreras, and R. R. Cortes, Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA. *J Med Virol*, 2001. 65 (4) : p. 736-44)。研究は、HPV16または18において、E6/E7 mRNAが良性頸部疾患で検出されなかったことを示している。しかしながら、頸部腺癌インサイチュー (ACIS) の60%および頸部

腺癌の24%がHPV16癌遺伝子を発現した。HPV18癌遺伝子の発現はACISの27%および侵入性頸癌の51%で検出された (Riethdorf, S. et al., Analysis of HPV 16 and 18 E6/E7 oncogene expression in cervical and endometrial glandular neoplasias. Cancer Detection and Prevention, 2000. 24 (Supplement 1))。Rosalesおよび同僚 (Rosales R., M. Lopez-Contreras and R. R. Cortes, Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA. J Med Virol, 2001. 65 (4) : p. 736-44) は、HPV感染を持つ172人の女性を調べ、HPV16のE6およびE7タンパク質に対する抗体が、各々、患者の52%および37%で見出されることを発見した。HPV18のE6およびE7タンパク質に対する抗体は、各々、患者の35%および45%で見出された。もう1つの研究は、HPV16およびHPV18において、E6/E7タンパク質は、酵素-連結免疫吸着検定法 (ELISA) を用いて、頸癌を持つ患者からの頸部腔洗浄液の48%および血清の29%で検出されたことを示した。

10

【 0 6 0 7 】

表皮成長因子受容体 (EGFR)

表皮成長因子受容体 (EGFR) は、膜貫通糖タンパク質である。そのリガンドとの結合は事象の鎖を開始させ、その結果、DNA合成、細胞増殖、および細胞分化がもたらされる。EGFRの活性化は、多くの異なるタイプの固形腫瘍の増殖および拡大に寄与することが示されている。EGFRの上方調節および過剰発現は、制御されていない細胞増殖およびアポトーシスの防止を含めた癌に関連した多くのプロセスに関連付けられている (Wu, X. et al., Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. J Clin Invest, 1995. 95 (4) : p. 1897-905)。多くの上皮腫瘍は高いEGFRを発現し、これは、頸癌および胃癌、ならびに結腸直腸、頭部および頸部の癌を含めた進行した疾患および貧弱な臨床予後と関連付けられる (Salomon, D. S. et al., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. 19 (3) : p. 183-232)。Kimおよび同僚 (Kim, J. W. et al., Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol, 1996. 60 (2) : p. 283-7) は、EGFRの過剰発現が40の侵入性頸癌の29 (72%) および20の頸部上皮内新形成 (CIN) 患者の5 (25%) で見出されたことを示した。EGFRの過剰発現は、HPV16/18の存在にもかかわらず、不都合な予後因子のように見える (Kedzia, W. et al., [Immunohistochemical examination oncogenic c-erb-b2, egf-r proteins and antioncogenic p53 protein in vulvar cancers HPV-16 positive and negative]. Ginekol Pol, 2000. 71 (2) : p. 63-9)。

20

30

【 0 6 0 8 】

Ki-67

これは、増殖する正常および新形成細胞で発現される核タンパク質である。Ki-67の発現は後期G1、S、MおよびG2と命名された細胞周期の期の間に起こる。しかしながら、G0期の間には、抗原は検出できない (Cattorette, G. et al., Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol, 1992. 168 (4) : p. 357-63)。Barおよび同僚 (Bar, J. K. et al., Relations between the expression of p53, c-erbB-2, Ki-67 and HPV infection in cervical carcinomas and cervical dysplasias. Anticancer Res, 2001. 21 (2A) : p. 1001-6) は、異常形成における増殖性活性の増大が特に伴うHPV感染は、悪性プロセス発生の素因である細胞亜集団を規定することができることを示した。これは、Ki-67活性が、癌腫および形成異常を持ち、HPV陰性よりもHPV陽性である患者の高いパーセンテージで見出されることを示す結果によって裏付けられる。

40

【 0 6 0 9 】

p16

この遺伝子はサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 (CDKI) であって、それは腫瘍サプレッサーとして作用することによって細胞周期を負に調節することができる。頸部形成異常は

50

、ヒトパピローマウイルス（HPV）の危険性の高いタイプを介する執拗な感染によって誘導される。形成異常病巣の自然成長は、共に種々の細胞周期調節タンパク質と相互作用する2つのウイルス癌遺伝子E6およびE7の発現を増加させることによってトリガーされる。これらの中には、E7によって不活化させる網膜芽腫遺伝産物pRBがある。pRB産物はサイクリン依存性キナーゼ阻害剤遺伝子p16（INK4a）の転写を阻害する。形成異常頸部細胞におけるウイルス癌遺伝子の発現の増加は、p16（INK4a）の増大した発現によって反映されるであろう。Sanoおよび同僚（Sano,T.et al.,Immunohistochemical overexpression of p16 protein, associates with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia.Pathol Int,1998.48（8）：p.580-5）は、p16タンパク質についての強い免疫反応性が、いくつかの転移グレードCIN病巣を除き、全てのCINおよび侵入性癌症例の核および細胞質双方で観察されることを示した。また、研究は、p16（INK4a）の過剰発現は、頸部の形成異常および新形成上皮細胞についての特異的マーカーであり、Ki-67およびサイクリンEと共にp16はHPV関連頸部新形成についての相補的代替物であることを示した（Klaes,R.et al.,Overexpression of p16（INK4A） as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri.Int J Cancer,2001.92（2）：p.276-84；Keating,J.T.,T.Ince, and C.P.Crum,Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis .Adv Anat Pathol,2001.8（2）：p.83-92）。

10

【0610】

p53

20

これは、周知の腫瘍抑制遺伝子の1つである。p53タンパク質は正常な細胞および組織でごく微量に存在するが、高い濃度は非常に多数の腫瘍および腫瘍細胞系で起こる。よって、それは免疫組織化学（核染色）によって検出することができる。腫瘍細胞における増大した濃度は、他のタンパク質との複合体化によって、あるいはp53タンパク質の突然変異によって引き起こされ得る。p53についての遺伝子は、多くの腫瘍において対立遺伝子喪失の頻繁な部位である染色体17pに位置する。Vassalloおよび同僚（Vassallo,J.et al.,High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia.Int J Gynaecol Obstet,2000.71（1）：p.45-8）は、CINにおけるp53タンパク質の過剰発現は危険性の高いHPV感染に関連付けられると記載した。ウエスタンブロット分析および免疫組織化学を用いることによって、過剰発現されたp53タンパク質でのp53遺伝子の再編成が一次頸癌で見出された（Sahu,G.R.et al.,Rearrangement of p53 gene with overexpressed p53 protein in primary cervical cancer.Oncol Rep,2002.9（2）：p.433-7）。

30

【0611】

増殖する細胞核抗原（PCNA）

この増殖する細胞核抗原（PCNA）はDNAポリメラーゼデルタについての補因子である。PCNAは細胞周期のS期間、およびDNA修復に関連するDNA合成の期間の間の双方で発現される。PCNAは、広い範囲の正常および悪性組織において増殖する細胞で発現される。PCNAの位置は核である。Kobayashiその他は、ひどい形成異常および癌腫インサイチュー（CIS）におけるPCNAおよび有糸分裂指標の間の親密な相関があることを示した（Kobayashi,I.et al.,The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining.Hum Pathol,1994.25(2):p.198-202;Smela,M.,M.Chosia,and W.Domagala,Proliferation cell nuclear antigen（PCNA）expression in cervical intraepithelial neoplasia(CIN).An immunohistochemical study.Pol J Pathol,1996.47（4）：p.171-4）。もう1つの研究は、PCNAがKi-67よりもCINについての免疫反応性の良好なマーカーに見えることを示した（Maeda,M.Y.et al.,Relevance of the rates of PCNA,Ki-67 and p53 expresion according to the epithelial compartment in cervical legions. Pathologica,2001.93（3）：p.189-95）。

40

【0612】

サバイビン

50

これは、142アミノ酸のタンパク質であって、細胞周期のG2/M期で発現される。それが通常のヒト癌において選択的に過剰発現されるが、正常な細胞では、攻撃的疾患および不都合な結果と相関するアポトーシスの阻害剤である (Lehner, R. et al., Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002. 10 (2) : p.134-8)。サバイビン mRNA は頸癌組織で検出される (Saitoh, Y., Y. Yaginuma and M. Ishikawa, Analysis of Bcl-2, Bax and Survivin genes in uterine cancer. Int J Oncol, 1999. 15 (1) : p.137-41)。良性頸部粘膜、頸部形成異常、および侵入性扁平細胞癌腫におけるサバイビンの免疫組織学的位置決定は、核染色が正常な粘膜、低グレード形成異常、および高グレード形成異常で検出されたことを示した。染色強度は HPV 感染の形態学的証拠を持つ症例において最大であった (Frost, M. et al., Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. Am J Clin Pathol, 2002. 117 (5) : p.738-44)。

10

【0613】

テロメラーゼ

これは、真核生物染色体のテロメアを延長し、維持するリボ核タンパク質酵素である。テロメラーゼを発現しない細胞は核細胞分裂で順次に短くなったテロメアを有し、これは、最終的には染色体の不能、老化および細胞の死滅に導く。他の細胞事象と組み合わせた、危険性の高いヒトパピローマウイルス (HPV) での感染は、頸癌の発生において臨界的な役割を演じると仮定されている。テロメア反復を合成するテロメラーゼ酵素複合体の活性化は、インビトロでの不滅表現型の獲得と関連付けられており、通常はヒト癌で観察される (Anderson, S. et al., Telomerase activation in cervical cancer. Am J Pathol, 1999. 7. 151 (1) : p.25-31)。研究は、テロメラーゼが癌腫、および頸部上皮内新形成グレード III 病巣に専ら存在するが、正常な頸部組織には存在しないことを意味した。テロメラーゼの活性化は、頸部病巣における、危険性の高い HPV 感染、不活性な p53 タンパク質の蓄積および増大した細胞増殖に関連するようである (Snijders, P. J. et al., Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. Cancer Res, 1999. 59 (17) : p.3812-8; Nair, P. et al., Telomerase, p53 and human papillomavirus infection in the uterine cervix. Acta Oncol, 2000. 39 (1) : p.65-70)。もう1つの研究は、テロメラーゼ活性が頸部腫瘍試料の96%および前悪性頸部切屑の69%で検出されるが、対照子宮摘出試料および正常な健康患者の頸部切屑においては検出されなかったことを示す。これは、テロメラーゼが頸癌スクリーニングのための非常に感度良好で特異的な分子マーカーであることを示す (Reddy, V. G. et al., Telomerase-A molecular marker for cervical cancer screening. Int J Gynecol Cancer, 2001. 11 (2) : p.100-6)。

20

30

【0614】

血管内皮成長因子 (VEGF)

血管内皮成長因子 (VEGF) は重要な脈管形成因子かつ内皮細胞特異的マイトジェンである。脈管形成は、癌形成および腫瘍進行の後期段階における臨界的なプロセスを演じ、遠隔転移の発生において特に重要である。VEGF は脈管形成の最も重要なインデュースターの1つであることが知られており、頸部の癌腫において上方調節させる。Lopez-Ocejo および同僚 (Lopez-Ocejo, O. et al., Oncogenes and tumor angiogenesis: The HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. Oncogene, 2000. 19 (40) : p.4611-20) は、HPV-16 E6-陽性細胞が一般に高レベルの VEGF メッセージを発現することを示し、これは、HPV 癌タンパク質 E6 が VEGF 遺伝子の直接的刺激によって腫瘍脈管形成に寄与できる確率を示唆する。もう1つの研究は、VEGF の発現が頸癌における脈管形成の促進に関与し、初期癌侵入において重要な役割を演じることを示した (Kodama, J. et al., Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. Eur J Cancer, 1999. 35 (3) : p.4

40

50

85-9)。

【0615】

VII. 実施例I~VIのまとめ

前記した実施例I~VIは、肺癌、結腸直腸癌、膀胱癌、前立腺癌、乳癌および頸癌を検出しおよび/または診断するためのパネルに含むべき好ましいプローブ/マーカーを提供する。図8a~cは各癌のタイプに対する好ましいプローブ/マーカーのまとめを提供する。図8a~cは、また、いずれのマーカーが一般的癌検出利用性で有用であるか、ならびに特定の癌タイプについてのその特異性により、より価値があるマーカーを同定する。例えば、EGFRおよびKi-67は一般的癌検出で有用である。他方、BL2-10D1、CD44v3、コラゲナーゼ、COX-1、HLA-DR、HSP-90、IL-6、IL-10、Lewis X、NMP-22、TGF- β 1、TGF1I、TGF1IIおよびUBCは膀胱癌の検出および/または診断で有用であり；AE1/AE3、BCA-225、BRCA-1、CA-15.3、カテスピンド、GCDFP-15、HOX-B3、p65、PRおよびTGKは乳癌の検出および/または診断で有用であり、サイクリンE、E6およびE7は頸癌の検出および/または診断で有用であり、AKT、アンフィレグリン、 β -カテニン、Bax、BPG、Cdk/2/cdc2、cFLIP、クリプト-I、エフリン-B2、エフリン-B4、Fas-L、HMGI(Y)、hMLH1、リゾチーム、マトリリシン、p68、S100A4およびYB-1は結腸直腸癌の検出および/または診断で有効であり；C-MET、サイクリンA、FGF-2、Glut-1、Glut-3、HERA、MAGE-1、MAGE-3、ムチン1、Nm23、p120、SP-1、SP-B、トロンプモジュリンおよびTTF-1は肺癌の検出および/または診断で有用であり；および34 β E12、B72.3、FAS、ID-1、カリデレイン2、Leu7、P504S、PAP、PIPおよびPSAは前立腺癌の検出および/または診断で有用である。

10

20

【0616】

参考文献

- [1] Goldberg-Kahn, B., Healy, J.C. and Bishop, J.W. (1997) The cost of diagnosis: a comparison of four different strategies in the workup of solitary radiographic lung lesions. *Chest* 111, 870-6.
- [2] O'Donovan, P.B. (1997) The radiologic appearance of lung cancer. *Oncology (Huntingt)* 11, 1387-402; discussion 1402-4.
- [3] Worrell, J.A. (1995) Radiology of the central airways. *Otolaryngol Clin North Am* 28, 701-20.
- [4] Henschke, C.I., Miettinen, O.S., Yankelevitz, D.F., Libby, D.M. and Smith, J.P. (1994) Radiographic screening for cancer. Proposed paradigm for requisite research. *Clin Imaging* 18, 16-20. 10
- [5] Lam, S., Kennedy, T., Unger, M., Miller, Y.E., Gelmont, D., Rusch, V., Gipe, B., Howard, D., LeRiche, J.C., Coldman, A. and Gazdar, A.F. (1998) Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 113, 696-702.
- [6] Sazon, D.A., Santiago, S.M., Soo Hoo, G.W., Khonsary, A., Brown, C., Mandelkern, M., Bland, W. and Williams, A.J. (1996) Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in the detection and staging of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 417-21. 20
- [7] Lowe, V.J., DeLong, D.M., Hoffman, J.M. and Coleman, R.E. (1995) Optimum scanning protocol for FDG-PET evaluation of pulmonary malignancy. *J Nucl Med* 36, 883-7.
- [8] Lowe, V.J., Fletcher, J.W., Gobar, L., Lawson, M., Kirchner, P., Valk, P., Karis, J., Hubner, K., Delbeke, D., Heiberg, E.V., Patz, E.F. and Coleman, R.E. (1998) Prospective investigation of positron emission tomography in lung nodules. *J Clin Oncol* 16, 1075-84.
- [9] Raab, S.S., Hornberger, J. and Raffin, T. (1997) The importance of sputum cytology in the diagnosis of lung cancer: a cost-effectiveness analysis. *Chest* 112, 937-45.
- [10] Franklin, W.A. (1998) New molecular and cellular approaches to lung cancer detection. In: *Biology of Lung Cancer*, pp. 529-570. 30
- [11] Kern, W.H. (1988) The diagnostic accuracy of sputum and urine cytology. *Acta Cytol* 32, 651-4.
- [12] Mehta, A.C., Marty, J.J. and Lee, F.Y. (1993) Sputum cytology. *Clin Chest Med* 14, 69-85.
- [13] Gledhill, A., Bates, C., Henderson, D., DaCosta, P. and Thomas, G. (1997) Sputum cytology: a limited role. *J Clin Pathol* 50, 566-8.
- [14] Steffee, C.H., Segletes, L.A. and Geisinger, K.R. (1997) Changing cytologic and histologic utilization patterns in the diagnosis of 515 primary lung malignancies. *Cancer* 81, 105- 40

15.

- [15] Zaman, M.B. (1991) Pulmonary cytology. Clin Lab Med 11, 293-315.
- [16] Flehinger, B.J. and Melamed, M.R. (1994) Current status of screening for lung cancer. Chest Surg Clin N Am 4, 1-15.
- [17] Koss, L.G., Melamed, M.R. and Goodner, J.T. (1964) Pulmonary cytology: A brief survey of diagnostic results from July 1st, 1952 until December 31st, 1960. Acta Cytol 8, 104.
- [18] Saccomanno, G., Saunders, R.P., Ellis, H., Archer, V.E., Wood, B.G. and Beckler, P.A. (1963) Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. Acta Cytol 5, 305-310. 10
- [19] Miura, H., Konaka, C., Kawate, N., Tsuchida, T. and Kato, H. (1992) Sputum cytology-positive, bronchoscopically negative adenocarcinoma of the lung [see comments]. Chest 102, 1328-32.
- [20] Valatis, J., Warrens, D. and Gamble, D. (1981) Increased incidence of adenocarcinoma of the lung. Cancer 47, 1042-1046.
- [21] Baldini, E.H. and Strauss, G.M. (1997) Women and lung cancer: waiting to exhale. Chest 112, 229S-234S. 20
- [22] Caldwell, C.J. and Berry, C.L. (1996) Is the incidence of primary adenocarcinoma of the lung increasing? Virchows Arch 429, 359-63.
- [23] Risse, E.K., Vooijs, G.P. and van't Hof, M.A. (1987) Relationship between the cellular composition of sputum and the cytologic diagnosis of lung cancer. Acta Cytol 31, 170-6.
- [24] Holiday, D.B., McLarty, J.W., Farley, M.L., Mabry, L.C., Cozens, D., Roby, T., Waldron, E., Underwood, R.D., Anderson, E., Culbreth, W. and *et al.* (1995) Sputum cytology within and across laboratories. A reliability study. Acta Cytol 39, 195-206.
- [25] Eddy, D.M. (1989) Screening for lung cancer [see comments]. Ann Intern Med 111, 232-7. 30
- [26] Younes, M., Brown, R.W., Stephenson, M., Gondo, M. and Cagle, P.T. (1997) Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. Cancer 80, 1046-51.
- [27] Ogawa, J., Inoue, H. and Koide, S. (1997) Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. Int J Cancer 74, 189-92.
- [28] Ito, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Hayashi, H., Inayama, Y. and Kitamura, H. (1998) Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage [see comments]. Mod Pathol 11, 437-43. 40
- [29] Sosolik, R.C., McGaughy, V.R. and De Young, B.R. (1997) Anti-MOC-31: a potential

addition to the pulmonary adenocarcinoma versus mesothelioma immunohistochemistry panel. *Mod Pathol* 10, 716-9.

[30] Ordóñez, N.G. (1998) Value of the MOC-31 monoclonal antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 29, 166-9.

[31] Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas: an investigation of their expression as prognostic markers. *Eur J Cancer* 32A, 1504-9.

10

[32] Takanami, I., Imamura, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) Immunohistochemical detection of basic fibroblast growth factor as a prognostic indicator in pulmonary adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 26, 293-7.

[33] Ohta, Y., Endo, Y., Tanaka, M., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, Y. and Sasaki, T. (1996) Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2, 1411-6 1996.

[34] Volm, M., Koomagi, R., Mattern, J. and Stämmler, G. (1997) Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer* 33, 691-3.

20

[35] Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A.F., Piatyszek, M.A. and Shay, J.W. (1995) Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 87, 895-902.

[36] Yashima, K., Litzky, L.A., Kaiser, L., Rogers, T., Lam, S., Wistuba, II, Milchgrub, S., Srivastava, S., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. and Gazdar, A.F. (1997) Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 57, 2373-7.

[37] Ahrendt, S.A., Yang, S.C., Wu, L., Westra, W.H., Jen, J., Califano, J.A. and Sidransky, D. (1997) Comparison of oncogene mutation detection and telomerase activity for the molecular staging of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1207-14.

30

[38] Albanell, J., Lonardo, F., Rusch, V., Engelhardt, M., Langenfeld, J., Han, W., Klimstra, D., Venkatraman, E., Moore, M.A. and Dmitrovsky, E. (1997) High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 89, 1609-15.

[39] Hiyama, K., Ishioka, S., Shay, J.W., Taooka, Y., Maeda, A., Isobe, T., Hiyama, E., Maeda, H. and Yamakido, M. (1998) Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune-associated lung diseases. *Int J Mol Med* 1, 545-9.

40

[40] Yahata, N., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J.H., Iwama, H., Hayashi, S., Ando, K., Hirano, T., Tsuchida, T., Kato, H., Shay, J.W. and Toyama, K. (1998) Telomerase activity in lung cancer

cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst* 90, 684-90.

[41] Lee, J.C., Jong, H.S., Yoo, C.G., Han, S.K., Shim, Y.S. and Kim, Y.W. (1998) Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer* 21, 99-103.

[42] Arai, T., Yasuda, Y., Takaya, T., Ito, Y., Hayakawa, K., Toshima, S., Shibuya, C., Yoshimi, N. and Kashiki, Y. (1998) Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep* 5, 405-8.

[43] Fujii, M., Motoi, M., Saeki, H., Aoe, K. and Moriwaki, S. (1993) Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-small cell lung cancer. *Acta Med Okayama* 47, 103-8. 10

[44] Kawai, T., Suzuki, M., Kono, S., Shinomiya, N., Rokutanda, M., Takagi, K., Ogata, T. and Tamai, S. (1994) Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma. Correlation with DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 74, 2468-75.

[45] Ogawa, J., Tsurumi, T., Yamada, S., Koide, S. and Shohtsu, A. (1994) Blood vessel invasion and expression of sialyl Lewisx and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. Relation to postoperative recurrence. *Cancer* 73, 1177-83.

[46] Ebina, M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L. and Linnoila, R.I. (1994) Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54, 2496-503. 20

[47] Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Merlo, G.R., Ribecchini, A., Angeletti, C.A., Basolo, F., Pingitore, R. and Bevilacqua, G. (1994) Human non-small cell lung cancer: p53 protein accumulation is an early event and persists during metastatic progression [see comments]. *J Pathol* 174, 23-31.

[48] Wiethage, T., Voss, B. and Muller, K.M. (1995) P53 accumulation and proliferating-cell nuclear antigen expression in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 371-7.

[49] Esposito, V., Baldi, A., De Luca, A., Micheli, P., Mazzarella, G., Baldi, F., Caputi, M. and Giordano, A. (1997) Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking. *Hum Pathol* 28, 233-7. 30

[50] Caputi, M., Esposito, V., Groger, A.M., Pacilio, C., Murabito, M., Dekan, G., Baldi, F., Wolner, E. and Giordano, A. (1998) Prognostic role of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *In Vivo* 12, 85-8.

[51] Hirata, T., Fukuse, T., Naiki, H., Hitomi, S. and Wada, H. (1998) Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res* 58, 1108-10. 40

[52] Ariza, A., Mate, J.L., Isamat, M., Lopez, D., Von Uexkull-Guldeband, C., Rosell, R., Fernandez-Vasalo, A. and Navas-Palacios, J.J. (1995) Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. *J*

Pathol 177, 363-8.

- [53] Fasano, M., Sabatini, M.T., Wieczorek, R., Sidhu, G., Goswami, S. and Jagirdar, J. (1997) CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? *Cancer* 80, 34-41.
- [54] Miyoshi, T., Kondo, K., Hino, N., Uyama, T. and Monden, Y. (1997) The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1289-97.
- [55] Tran, T.A., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E. and Ross, J.S. (1997) Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 28, 809-14. 10
- [56] Takigawa, N., Segawa, Y., Mandai, K., Takata, I. and Fujimoto, N. (1997) Serum CD44 levels in patients with non-small cell lung cancer and their relationship with clinicopathological features. *Lung Cancer* 18, 147-57.
- [57] Kondo, K., Miyoshi, T., Hino, N., Shimizu, E., Masuda, N., Takada, M., Uyama, T. and Monden, Y. (1998) High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in non-small cell lung cancers, but not in small cell lung cancers. *J Surg Oncol* 69, 128-36.
- [58] Sasaki, J.I., Tanabe, K.K., Takahashi, K., Okamoto, I., Fujimoto, H., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M. and Saya, H. (1998) Expression of CD44 splicing isoforms in lung cancers: dominant expression of CD44v8-10 in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 12, 525-33. 20
- [59] Volm, M., Koomagi, R., Mattern, J. and Stammers, G. (1997) Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 75, 1774-8.
- [60] Dobashi, Y., Shoji, M., Jiang, S.X., Kobayashi, M., Kawakubo, Y. and Kameya, T. (1998) Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 153, 963-72.
- [61] Volm, M., Rittgen, W. and Drings, P. (1998) Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas [published erratum appears in *Br J Cancer* 1998 Apr;77(7):1198]. *Br J Cancer* 77, 663-9. 30
- [62] Shoji, M., Dobashi, Y., Morinaga, S., Jiang, S.X. and Kameya, T. (1999) Tumor extension and cell proliferation in adenocarcinomas of the lung. *Am J Pathol* 154, 909-18.
- [63] Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J. and Rollins, B.J. (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55, 505-9.
- [64] Betticher, D.C., Heighway, J., Hasleton, P.S., Altermatt, H.J., Ryder, W.D., Cerny, T. and Thatcher, N. (1996) Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 73, 294-300. 40
- [65] Mate, J.L., Ariza, A., Aracil, C., Lopez, D., Isamat, M., Perez-Piteira, J. and Navas-Palacios, J.J. (1996) Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma:

correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 180, 395-9.

[66] Yang, W.I., Chung, K.Y., Shin, D.H. and Kim, Y.B. (1996) Cyclin D1 protein expression in lung cancer. *Yonsei Med J* 37, 142-50.

[67] Betticher, D.C., Heighway, J., Thatcher, N. and Hasleton, P.S. (1997) Abnormal expression of CCND1 and RB1 in resection margin epithelia of lung cancer patients. *Br J Cancer* 75, 1761-8.

[68] Nishio, M., Koshikawa, T., Yatabe, Y., Kuroishi, T., Suyama, M., Nagatake, M., Sugiura, T., Ariyoshi, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. (1997) Prognostic significance of cyclin D1 and retinoblastoma expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 3, 1051-8.

10

[69] Caputi, M., De Luca, L., Papaccio, G., A, D.A., Cavallotti, I., Scala, P., Scarano, F., Manna, M., Gualdiero, L. and De Luca, B. (1997) Prognostic role of cyclin D1 in non small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Eur J Histochem* 41, 133-8.

[70] Betticher, D.C., White, G.R., Vonlanthen, S., Liu, X., Kappeler, A., Altermatt, H.J., Thatcher, N. and Heighway, J. (1997) G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 74, 556-62.

20

[71] Volm, M., Koomagi, R. and Rittgen, W. (1998) Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 79, 294-9.

[72] Kurasono, Y., Ito, T., Kameda, Y., Nakamura, N. and Kitamura, H. (1998) Expression of cyclin D1, retinoblastoma gene protein, and p16 MTS1 protein in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. An immunohistochemical analysis. *Virchows Arch* 432, 207-15.

[73] Tanaka, H., Fujii, Y., Hirabayashi, H., Miyoshi, S., Sakaguchi, M., Yoon, H.E. and Matsuda, H. (1998) Disruption of the RB pathway and cell-proliferative activity in non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 79, 111-5.

30

[74] Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., Comoglio, P.M. and Di Renzo, M.F. (1996) Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74, 1862-8.

[75] Harvey, P., Warn, A., Newman, P., Perry, L.J., Ball, R.Y. and Warn, R.M. (1996) Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 180, 389-94.

[76] Takanami, I., Tanana, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. *Oncology* 53, 392-7.

40

- [77] Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Luketich, J.D., Weyant, R.J., Gubish, C.T. and Landreneau, R.J. (1998) The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 66, 1915-8.
- [78] Nguyen, P.L., Niehans, G.A., Cherwitz, D.L., Kim, Y.S. and Ho, S.B. (1996) Membrane-bound (MUC1) and secretory (MUC2, MUC3, and MUC4) mucin gene expression in human lung cancer. *Tumour Biol* 17, 176-92.
- [79] Yu, C.J., Yang, P.C., Shun, C.T., Lee, Y.C., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1996) Overexpression of MUC5 genes is associated with early post-operative metastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 69, 457-65. 10
- [80] Yu, C.J., Shun, C.T., Yang, P.C., Lee, Y.C., Shew, J.Y., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1997) Sialomucin expression is associated with erbB-2 oncoprotein overexpression, early recurrence, and cancer death in non-small-cell lung cancer [published erratum appears in *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Aug;156(2 Pt 1):677-8]. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1419-27.
- [81] Jarrard, J.A., Linnoila, R.I., Lee, H., Steinberg, S.M., Witschi, H. and Szabo, E. (1998) MUC1 is a novel marker for the type II pneumocyte lineage during lung carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 5582-9.
- [82] Ohgami, A., Tsuda, T., Osaki, T., Mitsudomi, T., Morimoto, Y., Higashi, T. and Yasumoto, K. (1999) MUC1 mucin mRNA expression in stage I lung adenocarcinoma and its association with early recurrence. *Ann Thorac Surg* 67, 810-4. 20
- [83] Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Biddinger, P.W., Miller, M.A., Fenoglio-Preiser, C., al-Kafaji, B., Di Lauro, R. and Whitsett, J.A. (1996) Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol* 9, 445-52.
- [84] Harlamert, H.A., Mira, J., Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Miller, M.A., Whitsett, J.A. and Yassin, R. (1998) Thyroid transcription factor-1 and cytokeratins 7 and 20 in pulmonary and breast carcinoma. *Acta Cytol* 42, 1382-8.
- [85] Fontanini, G., Vignati, S., Lucchi, M., Mussi, A., Calcinai, A., Boldrini, L.; Chine, S., Silvestri, V., Angeletti, C.A., Basolo, F. and Bevilacqua, G. (1997) Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression [see comments]. *Br J Cancer* 75, 1295-301. 30
- [86] Shibusu, T., Shijubo, N. and Abe, S. (1998) Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 4, 1483-7.
- [87] Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Kakolyris, S., Turley, H., O'Byrne, K., Scott, P.A., Pezzella, F., Georgoulas, V., Harris, A.L. and Gatter, K.C. (1998) Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 4, 3017-24. 40
- [88] Fontanini, G., Boldrini, L., Vignati, S., Chine, S., Basolo, F., Silvestri, V., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C.A. and Bevilacqua, G. (1998) Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial

growth factor (VEGF)- mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 34, 718-23.

[89] Takahama, M., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Kido, A., Okajima, E., Nezu, K., Tojo, T., Kushibe, K., Kitamura, S. and Konishi, Y. (1998) Frequent expression of the vascular endothelial growth factor in human non-small-cell lung cancers. *Jpn.J Clin Oncol* 28, 176-81.

[90] Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Calderone, C., Lombardi, L., Pilotti, S., Pastorino, U., Pierotti, M.A. and Della Porta, G. (1991) Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. *Cancer Res* 51, 400-4. 10

[91] Volm, M., Efferth, T., Mattern, J. and Wodrich, W. (1992) Overexpression of c-fos and c-erbB1 encoded proteins in squamous cell carcinomas of the lung of smokers. *Int J Oncol* 1, 69-71 1992.

[92] Wodrich, W. and Volm, M. (1993) Overexpression of oncoproteins in non-small cell lung carcinomas of smokers. *Carcinogenesis* 14, 1121-4.

[93] Pastorino, U., Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Pilotti, S. and Pierotti, M.A. (1993) Genetic changes in lung cancer. *J Cell Biochem Suppl* 17F, 237-48. 20

[94] Gorgoulis, V., Sfikakis, P.P., Karameris, A., Papastamatiou, H., Trigidou, R., Veslemes, M., Spandidos, D.A., Sfikakis, P. and Jordanoglou, J. (1995) Molecular and immunohistochemical study of class I growth factor receptors in squamous cell lung carcinomas. *Pathol Res Pract* 191, 973-81.

[95] Rusch, V., Klimstra, D., Linkov, I. and Dmitrovsky, E. (1995) Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 55, 1365-72.

[96] Rusch, V.W. and Dmitrovsky, E. (1995) Molecular biologic features of non-small cell lung cancer. Clinical implications. *Chest Surg Clin N Am* 5, 39-55. 30

[97] Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Mussi, A., Lucchi, H., Angeletti, C.A., Pingitore, R., Pepe, S., Basolo, F. and Bevilacqua, G. (1995) Epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in non-small cell lung carcinomas correlates with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes in the squamous subtype. *Eur J Cancer* 31A, 178-83.

[98] Pflug, B. and Djakiew, D. (1996) Expression of the low affinity nerve growth factor receptor in prostate epithelial cells negatively regulates nerve growth factor- mediated growth via induction of apoptosis (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A262 1996.

[99] Rusch, V., Klimstra, D., Venkatraman, E., Langenfeld, J., Pisters, P. and Dmitrovsky, E. (1996) Overexpression of EGFR and TGF-alpha is frequent in early stage non- small cell lung cancer, but does not predict tumor progression (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc* 40

Cancer Res 37, A1314 1996.

[100] Fujino, S., Enokibori, T., Tezuka, N., Asada, Y., Inoue, S., Kato, H. and Mori, A. (1996) A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 32A, 2070-4.

[101] Pastorino, U., Andreola, S., Tagliabue, E., Pezzella, F., Incarbone, M., Sozzi, G., Buyse, M., Menard, S., Pierotti, M. and Rilke, F. (1997) Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 15, 2858-65.

[102] Sekine, I., Takami, S., Guang, S.G., Yokose, T., Kodama, T., Nishiwaki, Y., Kinoshita, M., Matsumoto, H., Ogura, T. and Nagai, K. (1998) Role of epidermal growth factor receptor overexpression, K-ras point mutation and c-myc amplification in the carcinogenesis of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 5, 351-4.

10

[103] Pfeiffer, P., Nexø, E., Bentzen, S.M., Clausen, P.P., Andersen, K., Rose, C. and Nex, E. (1998) Enzyme-linked immunosorbent assay of epidermal growth factor receptor in lung cancer: comparisons with immunohistochemistry, clinicopathological features and prognosis. *Br J Cancer* 78, 96-9.

[104] D'Amico, T.A., Massey, M., Herndon, J.E., 2nd, Moore, M.B. and Harpole, D.H., Jr. (1999) A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117, 736-43.

20

[105] Engel, M., Theisinger, B., Seib, T., Seitz, G., Huwer, H., Zang, K.D., Welter, C. and Dooley, S. (1993) High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 55, 375-9.

[106] Ozeki, Y., Takishima, K. and Mamiya, G. (1994) Immunohistochemical analysis of nm23/NDP kinase expression in human lung adenocarcinoma: association with tumor progression in Clara cell type. *Jpn J Cancer Res* 85, 840-6.

[107] Lai, W.W., Wu, M.H., Yan, J.J. and Chen, F.F. (1996) Immunohistochemical analysis of nm23-H1 in stage I non-small cell lung cancer: a useful marker in prediction of metastases. *Ann Thorac Surg* 62, 1500-4.

30

[108] Gazzeri, S., Brambilla, E., Negoescu, A., Thoraval, D., Veron, M., Moro, D. and Brambilla, C. (1996) Overexpression of nucleoside diphosphate/kinase A/nm23-H1 protein in human lung tumors: association with tumor progression in squamous carcinoma. *Lab Invest* 74, 158-67.

[109] MacKinnon, M., Kerr, K.M., King, G., Kennedy, M.M., Cockburn, J.S. and Jeffrey, R.R. (1997) p53, c-erbB-2 and nm23 expression have no prognostic significance in primary pulmonary adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 11, 838-42.

40

[110] Bosnar, M.H., Pavelic, K., Krizanac, S., Slobodnjak, Z. and Pavelic, J. (1997) Squamous

cell lung carcinomas: the role of nm23-H1 gene. *J Mol Med* 75, 609-13.

[111] Kawakubo, Y., Sato, Y., Koh, T., Kono, H. and Kameya, T. (1997) Expression of nm23 protein in pulmonary adenocarcinomas: inverse correlation to tumor progression. *Lung Cancer* 17, 103-13.

[112] Ritter, J.H., Dresler, C.M. and Wick, M.R. (1995) Expression of bcl-2 protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 26, 1227-32.

[113] Kitagawa, Y., Wong, F., Lo, P., Elliott, M., Verburgt, L.M., Hogg, J.C. and Daya, M. (1996) Overexpression of Bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 45-54. 10

[114] Rao, S.K., Krishna, M., Woda, B.A., Savas, L. and Fraire, A.E. (1996) Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in adenocarcinoma and non-neoplastic cellular compartments of the lung. *Mod Pathol* 9, 555-9.

[115] Boers, J.E., ten Velde, G.P. and Thunnissen, F.B. (1996) P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 411-6.

[116] Coppola, D., Clarke, M., Landreneau, R., Weyant, R.J., Cooper, D. and Yousem, S.A. (1996) Bcl-2, p53, CD44, and CD44v6 isoform expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Mod Pathol* 9, 484-90. 20

[117] Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H. and Tateishi, R. (1996) Bcl-2 oncoprotein expression is increased especially in the portion of small cell carcinoma within the combined type of small cell lung cancer. *Tumour Biol* 17, 341-4.

[118] Strauss, G.M. (1997) Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 11, 409-34.

[119] Anton, R.C., Brown, R.W., Younes, M., Gondo, M.M., Stephenson, M.A. and Cagle, P.T. (1997) Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Hum Pathol* 28, 1079-82. 30

[120] Ishida, H., Irie, K., Itoh, T., Furukawa, T. and Tokunaga, O. (1997) The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 80, 1034-45.

[121] Stefanaki, K., Rontogiannis, D., Vamvouka, C., Bolioti, S., Chaniotis, V., Sotsiou, F., Vlychou, M., Delidis, G., Kakolyris, S., Georgoulas, V. and Kanavaros, P. (1998) Immunohistochemical detection of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 18, 1167-73.

[122] Brambilla, E., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Coll, J.L., Moro, D., Negoescu, A. and Brambilla, C. (1998) p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 4, 1609-18. 40

- [123] Salgia, R. and Skarin, A.T. (1998) Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 16, 1207-17.
- [124] Kim, Y.C., Park, K.O., Kim, J.A., Park, C.S., Lim, S.C., Jang, A.S. and Yang, J.B. (1998) The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 22, 181-90.
- [125] Groeger, A.M., Caputi, M., Esposito, V., De Luca, A., Salat, A., Murabito, M., Giordano, G.G., Baldi, F., Giordano, A. and Wolner, E. (1999) Bcl-2 protein expression correlates with nodal status in non small cell lung cancer. *Anticancer Res* 19, 821-4.
- [126] Vargas, S.O., Leslie, K.O., Vacek, P.M., Socinski, M.A. and Weaver, D.L. (1998) Estrogen-receptor-related protein p29 in primary nonsmall cell lung carcinoma: pathologic and prognostic correlations. *Cancer* 82, 1495-500.
- [127] Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H. and Tateishi, R. (1994) Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Oncology* 51, 544-51.
- [128] Xu, H.J., Quinlan, D.C., Davidson, A.G. and et.al. (1994) Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early stage non-small cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 695-699.
- [129] Lee, J.S., Kalapurakal, S., Ro, J.Y. and Hong, W.K. (1995) Prognostic significance of retinoblastoma protein expression in non- small cell lung cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 36, A3787 1995.
- [130] Dixon, G., Salisbury, J. and Walker, C. (1995) Expression of the retinoblastoma protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and lung cancer (Meeting abstract). *J Pathol* 176, 32A 1995.
- [131] Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J. and Rollins, B.J. (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16 expression in lung cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 36, A164 1995.
- [132] Volm, M. and Stammers, G. (1996) Retinoblastoma (Rb) protein expression and resistance in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 16, 891-4.
- [133] Dosaka-Akita, H., Hu, S.X., Kinoshita, I., Fujino, M., Harada, M., Kawakami, Y. and Benedict, W.F. (1996) Prognostic significance of Rb protein expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A1401 1996.
- [134] Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Akie, K., Mishina, T., Hiroumi, H. and Kawakami, Y. (1996) Significance of abnormal p16INK4 and RB protein expression in non- small cell lung cancer (NSCLC) (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A3979 1996.
- [135] Kratzke, R.A., Greatens, T.M., Rubins, J.B., Maddaus, M.A., Niewoehner, D.E., Niehans, G.A. and Geradts, J. (1996) Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors.

10

20

30

40

Cancer Res 56, 3415-20.

[136] Sakaguchi, M., Fujii, Y., Hirabayashi, H., Yoon, H.E., Komoto, Y., Oue, T., Kusafuka, T., Okada, A. and Matsuda, H. (1996) Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 65, 442-5.

[137] Xu, H.J., Cagle, P.T., Hu, S.X., Li, J. and Benedict, W.F. (1996) Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res* 2, 1169-76 1996.

[138] Dosaka-Akita, H., Hu, S.X., Fujino, M., Harada, M., Kinoshita, I., Xu, H.J., Kuzumaki, N., Kawakami, Y. and Benedict, W.F. (1997) Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer* 79, 1329-37. 10

[139] Cagle, P.T., el-Naggar, A.K., Xu, H.J., Hu, S.X. and Benedict, W.F. (1997) Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 150, 393-400.

[140] Kashiwabara, K., Oyama, T., Sano, T., Fukuda, T. and Nakajima, T. (1998) Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int J Cancer* 79, 215-20. 20

[141] Caputi, M., Esposito, V., Groger, A.M., De Luca, A., Pacilio, C., Dekan, G., Giordano, G.G., Baldi, F., Wolner, E. and Giordano, A. (1998) RB growth control evasion in lung cancer. *Anticancer Res* 18, 2371-4.

[142] Tamura, A., Matsubara, O., Hirokawa, K. and Aoki, N. (1993) Detection of thrombomodulin in human lung cancer cells. *Am J Pathol* 142, 79-85.

[143] Tamura, A., Komatsu, H., Hebisawa, A., Kurashima, A., Mori, M. and Katayama, T. (1996) Is thrombomodulin useful as a tumor marker of a lung cancer? *Lung Cancer* 15, 189-95.

[144] Collins, C.L., Ordonez, N.G., Schaefer, R., Cook, C.D., Xie, S.S., Granger, J., Hsu, P.L., Fink, L. and Hsu, S.M. (1992) Thrombomodulin expression in malignant pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Am J Pathol* 141, 827-33. 30

[145] Hamatake, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Akazawa, K. and Sugimachi, K. (1996) Prognostic value and clinicopathological correlation of thrombomodulin in squamous cell carcinoma of the human lung. *Clin Cancer Res* 2, 763-6 1996.

[146] Ordonez, N.G. (1997) Value of thrombomodulin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Histopathology* 31, 25-30.

[147] Tolnay, E., Wiethage, T. and Muller, K.M. (1997) Expression and localization of thrombomodulin in preneoplastic bronchial lesions and in lung cancer. *Virchows Arch* 430, 209-12. 40

- [148] Bohm, M., Totzeck, B. and Wieland, I. (1994) Differences of E-cadherin expression levels and patterns in human lung cancer. *Ann Hematol* 68, 81-3.
- [149] Bohm, M., Totzeck, B., Birchmeier, W. and Wieland, I. (1994) Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 12, 55-62.
- [150] Peralta Soler, A., Knudsen, K.A., Jaurand, M.C., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., Klein-Szanto, A.J. and Salazar, H. (1995) The differential expression of N-cadherin and E-cadherin distinguishes pleural mesotheliomas from lung adenocarcinomas [see comments]. *Hum Pathol* 26, 1363-9. 10
- [151] Han, A.C., Peralta-Soler, A., Knudsen, K.A., Wheelock, M.J., Johnson, K.R. and Salazar, H. (1997) Differential expression of N-cadherin in pleural mesotheliomas and E-cadherin in lung adenocarcinomas in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [see comments]. *Hum Pathol* 28, 641-5.
- [152] Weynants, P., Lethe, B., Brasseur, F., Marchand, M. and Boon, T. (1994) Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56, 826-9.
- [153] Shichijo, S., Hayashi, A., Takamori, S., Tsunosue, R., Hoshino, T., Sakata, M., Kuramoto, T., Oizumi, K. and Itoh, K. (1995) Detection of MAGE-4 protein in lung cancers. *Int J Cancer* 64, 158-65. 20
- [154] Sakata, M. (1996) Expression of MAGE gene family in lung cancers. *Kurume Med J* 43, 55-61.
- [155] Fischer, C., Gudat, F., Stulz, P., Noppen, C., Schaefer, C., Zajac, P., Trutmann, M., Kocher, T., Zuber, M., Harder, F., Heberer, M. and Spagnoli, G.C. (1997) High expression of MAGE-3 protein in squamous-cell lung carcinoma [letter]. *Int J Cancer* 71, 1119-21.
- [156] Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, T. and Mitsudomi, T. (1998) Frequency of MAGE-3 gene expression in HLA-A2 positive patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 20, 117-25. 30
- [157] Uchiyama, B., Saijo, Y., Kumano, N., Abe, T., Fujimura, S., Ohkuda, K., Handa, M., Satoh, K. and Nukiwa, T. (1997) Expression of nucleolar protein p120 in human lung cancer: difference in histological types as a marker for proliferation. *Clin Cancer Res* 3, 1873-7.
- [158] Singh, G., Scheithauer, B.W. and Katyal, S.L. (1986) The pathobiologic features of carcinomas of type II pneumocytes. An immunocytologic study. *Cancer* 57, 994-9.
- [159] Mizutani, Y., Nakajima, T., Morinaga, S., Gotoh, M., Shimosato, Y., Akino, T. and Suzuki, A. (1988) Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumors. Special reference to nonmucus producing lung adenocarcinomas. *Cancer* 61, 532-7. 40
- [160] Noguchi, M., Nakajima, T., Hirohashi, S., Akiba, T. and Shimosato, Y. (1989)

Immunohistochemical distinction of malignant mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma with anti-surfactant apoprotein, anti-Lewis, and anti-Tn antibodies. Hum Pathol 20, 53-7.

[161] Linnoila, R.I., Jensen, S.M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L., Eggleston, J.C. and Gazdar, A.F. (1992) Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features [see comments]. Am J Clin Pathol 97, 233-43.

[162] Shijubo, N., Tsutahara, S., Hirasawa, M., Takahashi, H., Honda, Y., Suzuki, A., Kuroki, Y. and Akino, T. (1992) Pulmonary surfactant protein A in pleural effusions. Cancer 69, 2905-9.

[163] Shijubo, N., Honda, Y., Fujishima, T., Takahashi, H., Kodama, T., Kuroki, Y., Akino, T. and Abe, S. (1995) Lung surfactant protein-A and carcinoembryonic antigen in pleural effusions due to lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma. Eur Respir J 8, 403-6.

[164] Nicholson, A.G., McCormick, C.J., Shimosato, Y., Butcher, D.N. and Sheppard, M.N. (1995) The value of PE-10, a monoclonal antibody against pulmonary surfactant, in distinguishing primary and metastatic lung tumours. Histopathology 27, 57-60.

[165] Khor, A., Whitsett, J.A., Stahlman, M.T. and Halter, S.A. (1997) Expression of surfactant protein B precursor and surfactant protein B mRNA in adenocarcinoma of the lung. Mod Pathol 10, 62-7.

[166] Saitoh, H., Shimura, S., Fushimi, T., Okayama, H. and Shirato, K. (1997) Detection of surfactant protein-A gene transcript in the cells from pleural effusion for the diagnosis of lung adenocarcinoma. Am J Med 103, 400-4.

[167] Grohs *et al.*, Acta Cytologica, 1996, 40(1):26-30.

[168] Grohs *et al.*, Acta Cytologica, 1997, 41(1):144-152.

【図面の簡単な説明】

【0617】

【図1】異なる組織学的タイプの肺癌を同定するためのパネルに含めるべき好ましいマーカーである分子マーカー「%」で表した欄は、特定のマーカーを発現する腫瘍検体のパーセンテージを示す。

【図2】異なるマーカーを用いて、特定のタイプの肺癌の間を区別することができる優れた方法。SQは扁平細胞癌腫、ADは腺癌を示す、LCは大細胞癌腫を示し、SCは小細胞癌腫を示し、およびMEは中皮腫を示す。各細胞に現れる数は、1つの細胞型対もう1つの細胞型のマーカー変化の頻度を表す。表を含めるには、前記比率は2.0より大、または0.5未満でなければならない。100を超える数は、一般的には、第2のマーカーが発現されないことを示す。そのような場合においては、分析の目的では分母は0.1に設定した。最後に、空の欄は発現において差がないこと、または発現データが存在しないことのいずれかを表す。

【図3】対照組織および癌性組織におけるプローブ7および15についてのHスコアの間の比較。X軸はHスコアを示し、他方、Y軸は症例のパーセントを示す。

【図4】相関が変数の対の間の直線群集の量を測定する相関マトリックス。50%またはそれより高い相関数を持つこのマトリックス中の全てのマーカーは相関マーカーと考えられる。この相関マトリックスの全ての対角線要素は1.0の値（すなわち、真実）を有することに注意されたい。なぜならば、対角線要素は自己相関値（すなわち、プローブNに対するプローブN相関）を示すからである。また、このマトリックスは対角線に対して対象である（すなわち、プローブN対Mの相関値はプローブM対Nの相関値に同一であることに注意されたい）。

【図5】検出パネル組成、対様式識別パネル組成およびジョイント識別パネル組成。決定

【図6】プローブ7がプローブとして含まれない検出パネル組成。検出ツリー分析、段階様式LRおよび段階様式LDを用いるパネル組成を示す。陰影を付したボックスは、これらの独立した分析方法の2以上によって効果的であることが示されたプローブを同定することに注意されたい。

【図7】商業的に好ましいプローブのみを用いる検出パネル組成。決定樹分析、段階様式LRおよび段階様式LDを用いるパネル組成を示す。陰影を付したボックスは、これらの独立した分析方法の2以上によって効果的であることが示されたプローブを同定することに注意されたい。

【図 8】肺癌、結腸直腸癌、膀胱癌、前立腺癌、乳癌および頸癌を検出しおよび/または診断するためのパネル用の好ましいマーカー（プローブ）のまとめ。

10

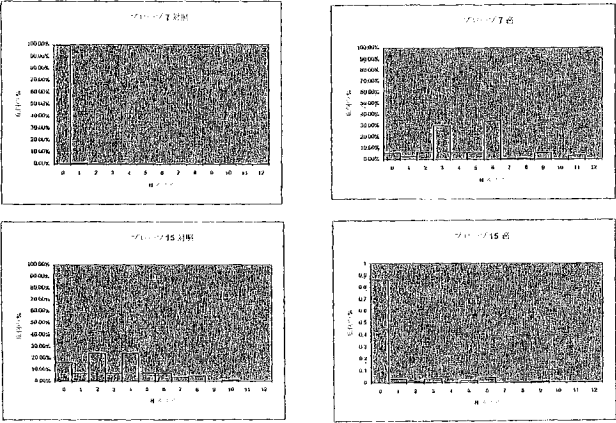
【图 1】

HepG2 (HepG2)		HepG2 (HepG2)		HepG2 (HepG2)		HepG2 (HepG2)		HepG2 (HepG2)	
シグナル	(%)	シグナル	(%)	シグナル	(%)	シグナル	(%)	シグナル	(%)
Glut1	100.0	MOC-31	100.0	VEGF	100.0	MOC-31	100.0	HGF	100.0
MOC-31	100.0	MUC-1	90.0	MUC-1	100.0	HGF	100.0	NF- κ B	100.0
シグナル	83.0	シグナル	83.0	HGF	96.0	Bcl-2	97.0	シグナル	81.0
PCNA	80.0	HGF	78.3	シグナル	76.0	シグナル	97.0	シグナル	81.0
CD44v6	79.3	シグナル	76.0	シグナル	76.0	シグナル	97.0	シグナル	81.0
シグナル	75.5	シグナル	75.5	シグナル	75.5	シグナル	97.0	シグナル	81.0
HGF	75.5	シグナル	75.5	シグナル	75.5	シグナル	97.0	シグナル	81.0

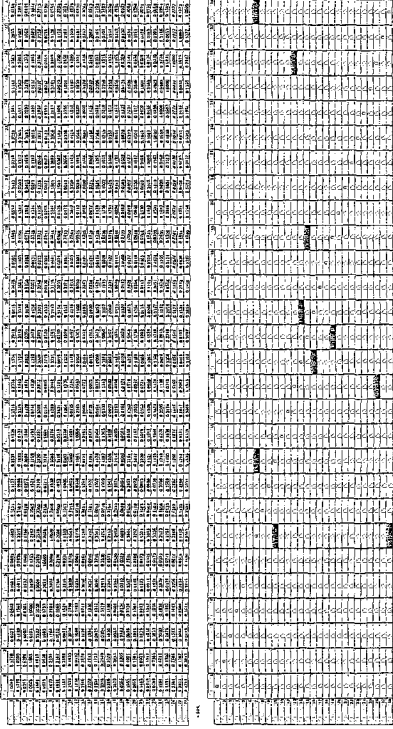
【圖 2】

N-カドミウム		04					
Mac-31		22.22				22.22	22.22
MOB-3	2.16	2.15		0.49		0.50	
MOB-3	5.64	683.00					
VRGF		17.70			0.15		
MAGE-4	4.14			0.22		2.30	0.05
サイレン・D1		0.47		0.40			
昭和興業/NT	0.50	0.46					
Gln3	0.44		0.41			4.39	
CD44v6	2.28	793.00		318.00		43.90	
E-カドミウム		690.00			850.00	0.00	
長谷川化学/タナク		2.27					
PI20							
EGF 変性体			0.47				
Bcl-2	5			47		46	
MAGE-1	2.73			2.12			
RG (細胞的)	0.24			0.31		0.42	
Pharmacia/DiB	0.001			615.00			
33	33			19		2.65	<50

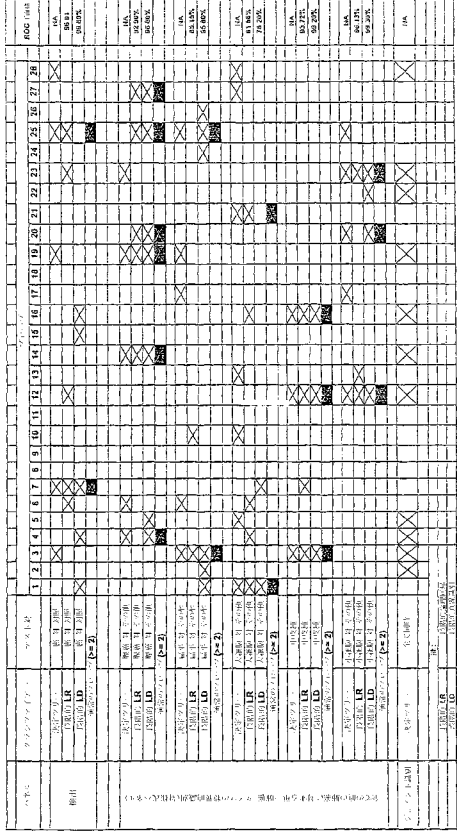
【図 3】



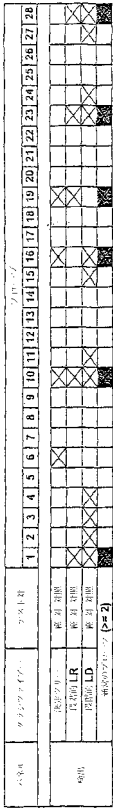
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

ハタチ	マウス																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
マウス	マウス																											
	マウス																											

【図 8 a】

マーカー	膀胱癌	乳癌	肺癌	結腸直腸癌	肺癌	前立腺癌
EGFR	X	X	X	X	X	X
Ki-67	X	X	X	X	X	X
E-カドヘリン	X	X	X	X	X	X
p53	X	X	X	X	X	X
C-erbB-2	X	X	X	X	X	X
HER-2/neu	X	X	X	X	X	X
bc1-2	X	X	X	X	X	X
CEA	X	X	X	X	X	X
CD44v6	X	X	X	X	X	X
サイクリン D1	X	X	X	X	X	X
PCNA	X	X	X	X	X	X
カヘオリン-1	X	X	X	X	X	X
CK 20	X	X	X	X	X	X
Cox-2	X	X	X	X	X	X
ER	X	X	X	X	X	X
hMSH2	X	X	X	X	X	X
MCM2	X	X	X	X	X	X
MUC-1	X	X	X	X	X	X
N-カドヘリン	X	X	X	X	X	X
p16	X	X	X	X	X	X
サイクリン D1	X	X	X	X	X	X
VEGF	X	X	X	X	X	X
BL2-1001	X	X	X	X	X	X
CD44v3	X	X	X	X	X	X
コラジン-1	X	X	X	X	X	X
Cox-1	X	X	X	X	X	X
HLA-DR	X	X	X	X	X	X
HSP-90	X	X	X	X	X	X
IL-6	X	X	X	X	X	X
IL-10	X	X	X	X	X	X
Lewis X	X	X	X	X	X	X

【図 8 b】

マーカー	膀胱癌	乳癌	肺癌	結腸直腸癌	肺癌	前立腺癌
NMP-22	X	X	X	X	X	X
TGF-β1	X	X	X	X	X	X
TGF-β1I	X	X	X	X	X	X
TGF-β1II	X	X	X	X	X	X
UBC	X	X	X	X	X	X
AE1/AE3	X	X	X	X	X	X
BCA-225	X	X	X	X	X	X
BRCA-1	X	X	X	X	X	X
CA-15.3	X	X	X	X	X	X
カラフィリン D	X	X	X	X	X	X
GCDPF-15	X	X	X	X	X	X
HOX-B3	X	X	X	X	X	X
p65	X	X	X	X	X	X
PR	X	X	X	X	X	X
TGK	X	X	X	X	X	X
サイクリン E	X	X	X	X	X	X
E6	X	X	X	X	X	X
E7	X	X	X	X	X	X
AKT	X	X	X	X	X	X
アンフィレグリン	X	X	X	X	X	X
β-カザニン	X	X	X	X	X	X
Bax	X	X	X	X	X	X
BPG	X	X	X	X	X	X
Cdk2/cdc2	X	X	X	X	X	X
cFLIP	X	X	X	X	X	X
グリコ-4	X	X	X	X	X	X
エプリン-B2	X	X	X	X	X	X
エプリン-B4	X	X	X	X	X	X
Fas-L	X	X	X	X	X	X
HMGI(Y)	X	X	X	X	X	X
hMLH1	X	X	X	X	X	X
リゾチーム	X	X	X	X	X	X
マトリリン	X	X	X	X	X	X
p68	X	X	X	X	X	X
S100A4	X	X	X	X	X	X
YB-1	X	X	X	X	X	X
C-MET	X	X	X	X	X	X
サイクリン A	X	X	X	X	X	X
PGF-2	X	X	X	X	X	X
Gut-1	X	X	X	X	X	X

【図 8 c】

マーカー	膀胱癌	乳癌	肺癌	結腸直腸癌	肺癌	前立腺癌
Glut-3	X	X	X	X	X	X
HERA	X	X	X	X	X	X
MAGE-1	X	X	X	X	X	X
MAGE-3	X	X	X	X	X	X
Nm23	X	X	X	X	X	X
P120	X	X	X	X	X	X
SP-A	X	X	X	X	X	X
SP-B	X	X	X	X	X	X
トロンボモニン	X	X	X	X	X	X
TTF-1	X	X	X	X	X	X
34βE12	X	X	X	X	X	X
B72.3	X	X	X	X	X	X
FAS	X	X	X	X	X	X
ID-1	X	X	X	X	X	X
カリクレイン 2	X	X	X	X	X	X
Leu 7	X	X	X	X	X	X
P504S	X	X	X	X	X	X
PAP	X	X	X	X	X	X
Plp	X	X	X	X	X	X
PSA	X	X	X	X	X	X

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/28379		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : G01N 33/48, 33/53; C12Q 1/04, 1/68; C07H 21/04 US CL : 435/ 4, 6, 7.1; 436/ 63, 64, 503, 504; 530/ 387.1, 536/ 24.31, 24.32 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) U.S. : 435/ 4, 6, 7.1; 436/ 63, 64, 503, 504; 530/ 387.1, 536/ 24.31, 24.32				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, Biosis, Scisearch, Cancerlit, Lifesci, Biotechids, Caplus				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	Database Cancerlit on STN (Columbus, OH, USA), No. 90306100, FLAM et al,	20		
---	'Immunohistochemical markers defined by monoclonal antibodies and response to bacillus	-----		
Y	Calmette-Guerin endovesical immunotherapy for superficial bladder tumors', abstract,	1-3, 5-11, 13-18, 21,		
	European Urology, Vol. 17, No. 4, pp. 338-342.	22, 26-29, 31-34		
X	Database Cancerlit on STN (Columbus, OH, USA), No. 90363587, DURAY et al,	20		
---	'Immunohistochemical phenotyping of malignant melanoma. A procedure whose time has	-----		
Y	come in pathology practice', abstract, Pathology Annual, 1990, Vol. 25 Pt 2, pages 351-	1-3, 5-11, 13-18, 21,		
	377.	29, 31-34		
X	Database Cancerlit on STN (Columbus, OH, USA), No. 92678426, GAZDAR et al,	20		
---	'Biological, Molecular, and Clinical Markers for the Diagnosis and Typing of Lung	-----		
Y	Cancer', abstract, Immunol. Ser, 1990, Vol. 53, pages 453-468.	1-3, 5-11, 13-19, 21,		
		22, 27-35		
X	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 91:581781,	20		
---	TERADA et al, 'N-Ras Gene-Mutations in Childhood Acute Non-Lymphoblastic	-----		
Y	Leukemia', abstract, Leukemia Research, 1991, Vol. 15, No. 10, pages 935-941.	1-3, 5, 6, 8-11, 13-18,		
		21, 25, 26, 31-34		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 13 February 2004 (13.02.2004)		Date of mailing of the international search report 15 SEP 2004		
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. (703) 872-9306		Authorized officer <i>Dorise Bell-Harris</i> Anthony Caputo Telephone No. (571) 272-1600		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/28379

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 93:289812, IMAMURA et al, 'Detection of High-Incidence of N-Ras Oncogene Point Mutations in Acute Myelogenous Leukemia', abstract, American Journal of Hematology, June 1993, Vol. 43, No. 2, pages 151-153.	20 ----- 1-3, 5, 6, 8-11, 13-18, 21, 25, 26, 31-34
X ---	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 94:217098, WOOD et al, 'Immunocytochemical and Differentiation of Reactive Hyperplasia from Follicular Lymphoma Using Monoclonal Antibodies to Cell-Surface and Proliferation-Related Markers', abstract, Applied Immunohistochemistry, Spring 1994, Vol. 2, Nol. 1, pages 48-53.	1, 2, 3, 7, 11, 2-3, 6, 7, 20, 20 ----- 1-3, 5-11, 13-18, 21, 25, 26, 31-34
X ---	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 94:289212, JACQUEMIER et al, 'P53 Immunohistochemical Analysis in Breast-Cancer with 4 Monoclonal-Antibodies- Comparison of Staining and PCR-SSCP Results', abstract, British Journal of Cancer, May 1994, Vol. 69, No. 5, pages 846-852.	20 ----- 1-3, 5-11, 13-18, 21, 23, 24, 28-35
X ---	Database Cancerlit on STN (Columbus, OH, USA), No. 1998637774, GRANBERG et al, 'Prognostic markers in bronchial carcinoid tumors', abstract, Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res, 1997, Vol. 38, A774.	20 ----- 1-3, 5-11, 13-19, 21, 22, 27-35
X ---	Database Cancerlit on STN (Columbus, OH, USA), No. 97398204, PASTORINO et al, 'Immunohistochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis', abstract, Journal of Clinical Oncology, August 1997, Vol. 15, No. 8, pages 2858-2865.	20 ----- 1-3, 5-11, 13-19, 21, 22, 27-35
X ---	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 1999:273567, HARPOLE et al, 'A biological risk model for stage I lung cancer: Immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers', abstract, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, April 1999, Vol. 117, No. 4, pages 736-742.	1-3, 6, 7, 13, 14, 17, 13, 14, 16, 20, 2120 ----- 1-3, 5-11, 13-19, 21, 22, 27-35
X ---	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 2002:108961, PIAO et al, 'Frequent loss xq25 on the inactive X chromosome in primary breast carcinomas is associated with tumor grade and axillary lymph node status', abstract, Genes, Chromosomes & Cancer, March 2002, Vol. 33, No. 3, pages 262-269.	20 ----- 1-3, 5, 6, 8-11, 13-18, 21, 23, 24, 28-35
Y	Database Biosis on STN, Biological Abstracts, Inc., (Columbus, OH, USA), No. 2002:557719, FRITSCHKE et al, 'Tumor markers and pattern recognition analysis: A new diagnostic tool for cancer', abstract, Journal of Clinical Ligand Assay, Spring 2002, Vol. 25, Nol. 1, pages 11-15.	17-19, 26-30, 35
Y	Database Caplus on STN, American Chemical Society, (Columbus, OH, USA), No. 2000:466326, WU et al, 'Value of Combined determination of tumor marker for histological type of lung cancer by pattern recognition', abstract, Henan Yike Daxue Xuebao, 2000, Vol. 35, No. 3, pages 214-217.	17-19, 27-30, 35
Y	Database Cancerlit on STN (Columbus, OH, USA), No. 95614997, POHL et al, 'Neural network evaluation of multiple tumor markers for diagnosis of ovarian cancer using three different sets of patients', abstract, 3rd International Conference of the Mediterranean Society of Tumor Marker Oncology, 26-29 October 1994.	15
Y	Database Medline on STN, National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA), No. 2001471494, LANSFORD et al, 'Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy', abstract, Journal of Biomedical Optics, July 2001, Vol. 6, No. 3, pages 311-318.	10, 11

PCT/US03/28379

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 1998:841244, SO et al, 'Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures', abstract, Optics Express, 26 October 1998, Vol. 3, No. 9, pages 339-350.	10, 11
Y	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 2001:72015, PHILLIPS et al, 'Three-dimensional imaging of embryonic mouse kidney by two-photon microscopy', abstract, American Journal of Pathology, January 2001, Vol. 158, No. 1, pages 49-55.	10, 11
Y	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No. 1998:346080, OSAKA et al, 'Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas', abstract, Cancer Research, 01 May 1998, Vol. 58, No. 9, pages 1808-1812.	32
Y	Database Lifesci on STN, CSA (Columbus, OH, USA), No. 85:34818, SANTELLA et al, 'Quantitation of exposure to benzo(a)pyrene with monoclonal antibodies', abstract, Environ. Health Perspect., 1985, Vol. 62, pages 95-99.	32
Y	Database Cancerlit on STN, (Columbus, OH, USA), No. 93229131, LAWRY et al, 'The identification of informative parameters in the flow cytometric analysis of breast carcinoma', abstract, European Journal of Cancer, 1993, Vol. 29A, No. 5, pages 719-723.	31
Y	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No.95:705476, BROTHERRICK et al, 'P53 expression measured by flow-cytometry- a comparison of 3 monoclonal-antibodies and the relationship with grade and DNA-ploidy in breast cancer', abstract, Cancer Immunology Immunotherapy, September 1995, Vol. 41, No. 3, pages 146-150.	31
Y	Database Scisearch on STN, Thomson ISI (Columbus, OH, USA), No.97:237668, HARRISON et al, 'Comparison of chromosome 1 aneusomy detected by interphase cytogenetics and DNA ploidy in carcinoma of the breast', abstract, Histopathology, March 1997, Vol. 30, No. 3, pages 221-226.	31
X	Database Caplus on STN, American Chemical Society, (Columbis, OH, USA), No. 1995:291485, OSSEWAARDE et al, 'Comparison of two panels of monoclonal antibodies for determination of Chlamydia trachomatis serovars', abstract, Journal of Clinical Microbiology, 1994, Vol. 32, Nol. 12, pages 2968-2974.	20 ----- 1, 2, 4-9, 12-18
X	Database Biotechds on STN, Thomson Derwent/ISI (Columbus, OH, USA), No. 1983-04070, GOLDSTEIN et al, 'Specific diagnosis of herpesvirus with monoclonal antibodies; hybridoma construction and monoclonal antibody preparation', abstract, Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 1983, Vol. 83, page 292.	20 ----- 1, 2, 4-9, 12-18

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 Q 1/68 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,M N,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM ,ZW

F ターム(参考) 4B063 QA17 QA19 QQ08 QQ41 QR56 QS32

专利名称(译)	基于细胞的检测和疾病状态的区分		
公开(公告)号	JP2006509185A	公开(公告)日	2006-03-16
申请号	JP2004536444	申请日	2003-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	蒙诺根有限公司		
申请(专利权)人(译)	Monojen公司		
[标]发明人	プレスマンノーマンジェイ ハーシュケニスエス		
发明人	プレスマン ノーマン ジェイ. ハーシュ ケニス エス.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/574 C12Q1/68 C07H21/04 C12Q1/04 G01N G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/569 C12Q1/6809 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/56966 G01N33/574 G01N33/57484 G01N33/57492		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/569.B G01N33/569.G G01N33/571 G01N33/574.D C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ41 4B063/QR56 4B063/QS32		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/241753 2002-09-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种以高灵敏度和特异性检测和区分疾病状态的方法。该方法使得可以确定基于细胞的样品是否包含异常细胞，并且对于某些疾病，可以确定存在的组织学类型的疾病。该方法检测基于细胞的样品中分子标记物的表达水平和模式的变化。还提供了面板选择和激活方法。

疾患のクラス	疾患状態の例
アレルギー	食物および植物に対する有害反応
心血管	心不全、アテローム性動脈硬化症
変性(神経学および筋肉)	アルツハイマーおよびパーキンソン
ダイエット	非栄養物質および栄養過剰/不均衡
遺伝	鎌状細胞貧血、囊胞性線維症
免疫	HIV および自己免疫
感染	ウイルス、細胞、真菌、寄生虫
代謝	糖尿病
分子および細胞生物学	癌(新形成)
毒性傷害	アルコール、薬物、環境変異原および発癌物質
外傷	自動車衝突による身体の負傷