

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-516531

(P2014-516531A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-511892 (P2014-511892)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月24日 (2012.5.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月16日 (2014.1.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/059784
 (87) 国際公開番号 W02012/160177
 (87) 国際公開日 平成24年11月29日 (2012.11.29)
 (31) 優先権主張番号 61/490,021
 (32) 優先日 平成23年5月25日 (2011.5.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌に対するバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、個体における早期肺癌の予後を、1種または複数のバイオマーカーを使用して決定するための方法の一部に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非小細胞肺癌（NSCLC）の対象の予後を判定するための方法であって、
外科的切除後の、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、
表 1、表 2 または表 3 のそれぞれにおいて特定されている少なくとも 3 種以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するステップと、
発現レベルを分析してリスクスコアを生成するステップとを含み、リスクスコアを使用して、対象の予後判定をもたらすことができる、方法。

【請求項 2】

非小細胞肺癌（NSCLC）の対象の予後を判定するための方法であって、
外科的切除後の、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、
表 1、表 2 および表 3 の少なくとも 1 種のバイオマーカーの試験試料における発現レベルを決定するステップと、
発現レベルを分析してリスクスコアを生成するステップとを含み、リスクスコアを使用して、対象の予後判定をもたらすことができる、方法。

10

【請求項 3】

リスクスコアにより、対象を、高リスク群であり、アジュバント化学療法を受けることが有益になるか、または低リスク群であり、アジュバント化学療法を受けることが有益にならないかに分類する、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対象の予後が生存不良である、または予後が生存良好である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

表 1、表 2 および表 3 において特定されている少なくとも 1 種のバイオマーカーが、CBX7、STX1A、およびTPX2を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

表 1、表 2 および表 3 において特定されている少なくとも 1 種のバイオマーカーが、CBX7、TMPRSS2、STX1A、KLK6、TPX2およびUCK2を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

表 1、表 2 および表 3 において特定されている少なくとも 1 種のバイオマーカーが、CBX7、TMPRSS2、GPR116、STX1A、KLK6、SLC16A3、TPX2、UCK2、PHKA1を含む、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 8】

表 1、表 2 および表 3 において特定されている少なくとも 1 種のバイオマーカーが、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、STX1A、KLK6、SLC16A3、PYGL、TPX2、UCK2、PHKA1、またはEIF4A3を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

表 1、表 2 および表 3 において特定されている少なくとも 1 種のバイオマーカーが、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、STX1A、KLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3またはTK1を含む、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 10】

表 1、表 2 および表 3 において特定されている少なくとも 1 種のバイオマーカーが、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、CTSH、STX1A、KLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、ITGA5、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、TK1、またはCCNA2を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

50

外科的切除後の非小細胞肺癌（NSCLC）の対象において予後を予測する方法であって、表1、表2および/または表3に列挙されている1種または複数のバイオマーカーの発現を決定するステップを含み、対照と比較した、表2および/または表3に列挙されている1種または複数のバイオマーカーの発現の増加、ならびに表1に列挙されている1種または複数のバイオマーカーの発現の減少を用いて、対象が、生存不良を有する高リスク群に入るか、生存良好を有する低リスク群に入るかを予測する、方法。

【請求項12】

高リスク群の対象をアジュバント化学療法のために選択し、低リスク群の対象はアジュバント化学療法のために選択しない、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

NSCLCの対象に対する療法を選択する方法であって、
切除を受けた、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、
表2において特定されている少なくとも2種以上のバイオマーカーの、試験試料における発現レベルを決定して、各遺伝子についての発現値を生成するステップと、
発現値を分析してリスクスコアを生成するステップとを含み、リスクスコアを使用して、対象を、血管新生阻害剤を投与するように選択するかどうかを分類することができる、方法。

10

【請求項14】

血管新生阻害剤がアバスチンである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

NSCLC癌を有する対象を選択的に治療する方法であって、
外科的切除後の、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、
表1、表2または表3において特定されている少なくとも1種または複数のバイオマーカーの、または表1、表2または表3において特定されているバイオマーカーの任意の組み合わせの、試験試料における発現レベルを決定してリスクスコアを生成するステップと、
対象を、リスクスコアに基づいて高リスク群または低リスク群に分類するステップと、
高リスク群に属すると分類された対象にアジュバント療法を投与する、または低リスク群に属すると分類された対象にアジュバント療法を投与しないステップと
を含む方法。

20

30

【請求項16】

表1、表2および/または表3において特定されている少なくとも3種のバイオマーカーの発現を決定するステップを含む、請求項11、請求項13または請求項15に記載の方法。

【請求項17】

表1、表2および/または表3において特定されている少なくとも4種のバイオマーカーの発現を決定するステップを含む、請求項11、請求項13または請求項15に記載の方法。

【請求項18】

表1、表2および/または表3において特定されている少なくとも5種のバイオマーカーの発現を決定するステップを含む、請求項11、請求項13または請求項15に記載の方法。

40

【請求項19】

表1、表2および/または表3において特定されている少なくとも6種のバイオマーカーの発現を決定するステップを含む、請求項11、請求項13または請求項15に記載の方法。

【請求項20】

NSCLCがI期NSCLCまたはII期NSCLC、またはそれらの組み合わせである、請求項1から請求項19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】

50

NSCLCが、扁平上皮癌および腺癌からなる群に特定される、請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

試験試料が新鮮細胞、凍結細胞、パラフィン固定包埋細胞である、請求項1から請求項21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

発現レベルを、qNPA、nanoString、定量的PCRまたはアレイを用いて決定する、請求項1から請求項22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

発現を分析してリスクスコアを生成するステップを、統計的分析を用いて実施する、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項25】

統計的分析が、コックス回帰分析またはパラメトリック生存予測変数を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

対象がヒトである、請求項1から請求項25に記載の方法。

【請求項27】

表1、表2および/または表3において特定されている1種または複数のバイオマーカの発現を測定するための複数の作用剤と、使用説明書とを含むためのキット。

【請求項28】

肺癌の対象にアジュバント療法が有益であるかどうかを予測するためのキットであって、

表1、表2および/または表3において特定されている1種または複数のバイオマーカの発現を測定するための複数の作用剤と、

発現を分析し、リスクスコアを生成して、患者にアジュバント療法が有益であるかどうかを予測するための手段とを含むキット。

【請求項29】

発現を測定するための作用剤が、特定されている遺伝子のmRNAと相補的なポリヌクレオチドのアレイを含む、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

発現を測定するための作用剤が、qRT-PCRのための複数のPCRプローブおよび/またはプライマーを含む、請求項28に記載のキット。

【請求項31】

表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカが、CBX7、STX1A、およびTPX2を含む、請求項28に記載のキット。

【請求項32】

表1、表2および/または表3に示されている少なくとも2種のバイオマーカの発現産物に対して相補的およびハイブリダイズ可能である1種または複数のポリヌクレオチドプローブを含むアレイ。

【請求項33】

複数の単離された核酸配列を含む組成物であって、各単離された核酸配列が、バイオマーカCBX7、STX1A、およびTPX2のRNA産物とハイブリダイズする、前記3種の遺伝子のRNA発現のレベルを測定するために使用される、組成物。

【請求項34】

NSCLCの対象の予後を予測するためのコンピュータ製品であって、

NSCLCを有する対象由来の試料における表1、表2および/または表において特定されている1種または複数のバイオマーカの発現レベルに対応するデータを受け取るための手段と、

各遺伝子についての発現値を生成するための手段と、

10

20

30

40

50

予後に関連づけられる参照発現プロファイルを含むデータベースへの発現値の入力に基づいてリスクスコアを生成するための手段とを含み、リスクスコアにより、生存に関する予後を予測する、または対象を高リスク群または低リスク群に分類する、コンピュータ製品。

【請求項 3 5】

請求項 1 から請求項 2 5 のいずれか一項に記載の方法で使用するための、請求項 3 4 に記載のコンピュータ製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、予後判定およびオーダーメイド療法の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

肺癌は、2007年には世界中で1500万件の新規症例が診断された、最も一般的な癌である (Salomonら、Crit Rev Oncol Hematol.、19:183-232、1995、SEER-database 05.2010)。肺癌は、発生率および死亡率が高いことにより、癌に関連した死亡の主な原因となっており、その死亡数は1年当たり975,000件を超え、5年生存率は15%である (Salomonら、上記)。肺癌は、小細胞肺癌、または非小細胞肺癌 (NSCLC) に分類することができる。NSCLCが症例の約80%を占める。NSCLCは、さらにいくつかの組織型に細分することができ、最も一般的なものは腺癌 (40%) および扁平上皮癌 (25%) である。

【0003】

NSCLCの現行の治療は主に腫瘍の形態、および、腫瘍を、腫瘍の進行の程度に対応する等級別のカテゴリー (IA期、IB期、IIA期、IIB期、IIIA期、IIIB期およびIV期) に分類する腫瘍-節-転移 (TNM) に基づく病期分類システムに基づく。多くの病期分類システムが存在する (例えば、臨床的病期分類、それと対照して病理学的病期分類、ならびにInternational Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) により発行されたものなどの病期分類ガイドラインの種々の版 (Goldstrawら、J. Thorac. Oncol. 2、706-714、2007)。例えば、臨床的病期分類およびTNM病期分類推奨のIASLC第6版による病期の発生頻度はI期が23%、II期が19%、III期が37%、およびIV期が21%である (Goldstrawら、上記)。相対的な割合は、実質的に、ガイドラインおよび臨床的病期分類と病理学的病期分類のいずれを使用するかに応じて変化する可能性がある。

【0004】

早期NSCLC (IおよびII期) に対する標準の治療は外科手術であり、その後、アジュバント療法、例えば、放射線療法、化学療法 (II期以降に対して)、進行したNSCLCの病期に対してはペバシズマブおよび上皮増殖因子受容体 (EGFR) チロシキナーゼ阻害剤 (TKI) が続く (Kutikovaら、Lung Cancer ; 50(2):143-154、2005)。米国およびヨーロッパにおけるNSCLCを治療するための臨床的ガイドラインによりこれらの治療の選択肢が支持される (Mendelsohnら、2000 ; NCCN-Guidelines NSCLC V1、2010)。

【0005】

早期肺癌についての現行のTNMに基づく病期分類システムに基づいて、I期NSCLC患者では、外科手術後5年以内に再燃する確率が35%である (SEER-Database、2008)。現行の治療ガイドラインでは、これらの患者に対してアジュバント化学療法は推奨されていない。TNMに基づくII期の患者の30%では、アジュバント化学療法を伴わずに再燃が起こらない (SEER-Database)、つまり、これらの患者は現行の治療ガイドライン (すなわち、ESMO (D'Addarioら、Annals of Oncology. 2009 ; 20 (補遺4) : iv68-iv70、2009)、NCCN V1-2010) に基づくと過剰な治療を受ける。これは、早期NSCLCの患者の60%で外科手術後の再燃がないことを示す報告と対応する (Ar

10

20

30

40

50

riagadaら、NEJM、350:351-360、2004)。現在の臨床データに基づいて、早期NSCLCのアジュバント化学療法による治療により、アジュバント化学療法の利益の中央値は4% (NSCLC Meta-Analysis Collaborative Group) であり、これにより5年の時点で60%から64%に改善されるという証拠がもたらされる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

現在の欠点に基づいて、NSCLCの患者に対する予後のおよび/または予測的なゲノムのサインを必要とする医学的合理性が存在する。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、個体における早期肺癌の予後を、本明細書に記載の1種または複数のバイオマーカーを使用して決定するための方法の一部関する。これらの発見を用いて、早期肺癌の患者に対する適切な治療の決定を補助すること、例えばアジュバント療法を受けることが有益になる患者を特定することなどができる。

【0008】

一態様では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の対象の予後を判定するまたは該対象を分類するための方法であって、外科的切除後の、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、表1、表2および/または表3において特定されている少なくとも1種または複数のバイオマーカーの、または表1、表2および/または表3において特定されているバイオマーカーの任意の組み合わせの、試験試料における発現レベルを決定するステップと、発現レベルを分析してリスクスコアを生成するステップとを含み、リスクスコアを使用して、対象の予後判定をもたらすまたは対象を分類することができる、方法を包含する。

20

【0009】

別の態様では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の対象の予後を判定するまたは該対象を分類するための方法であって、外科的切除後の、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、表1、表2および表3の少なくとも1種のバイオマーカーの試験試料における発現レベルを決定するステップと、発現レベルを分析してリスクスコアを生成するステップとを含み、リスクスコアを使用して、対象の予後判定をもたらすまたは対象を分類することができる、方法を包含する。一実施形態では、表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカーは、CBX7、STX1A、およびTPX2を含む。別の実施形態では、表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカーは、CBX7、TMPRSS2、STX1A、KLLK6、TPX2およびUCK2を含む。さらに別の実施形態では、表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカーは、CBX7、TMPRSS2、GPR116、STX1A、KLLK6、SLC16A3、TPX2、UCK2、PHKA1を含む。さらに別の実施形態では、表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカーは、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、STX1A、KLLK6、SLC16A3、PYGL、TPX2、UCK2、PHKA1、またはEIF4A3を含む。さらに別の実施形態では、表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカーは、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、CTSH、STX1A、KLLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、ITGA5、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、TK1、またはCCNA2を含む。

30

40

50

【 0 0 1 0 】

一実施形態では、本発明のリスクスコアを、対象を、肺癌に起因する死亡、遠隔転移 (distance metastasis) または局所再燃の時間特異的確率にマッピングすることによって予後判定するために使用することができる。

【 0 0 1 1 】

別の実施形態では、リスクスコアにより、対象を、アジュバント化学療法を受けることが有益になる高リスク群またはアジュバント化学療法を受けることが有益にならない低リスク群に分類することができる。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本発明は、外科的切除後の非小細胞肺癌 (NSCLC) の対象において予後を予測する方法であって、新鮮凍結 (FF) 材料またはホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 材料のいずれかの腫瘍試料由来の mRNA の発現プロファイルを決定するステップを含む方法を包含する。プロファイルは、表 1、表 2 および / または表 3 に列挙されている 1 種または複数のバイオマーカーを含み、対照と比較した、表 2 および / または表 3 に列挙されている 1 種または複数のバイオマーカーの発現の増加、ならびに表 1 に列挙されている 1 種または複数のバイオマーカーの発現の減少を用いて、対象が、生存不良 (poor survival) を有する高リスク群に入るか、生存良好 (good survival) を有する低リスク群に入るかを予測する。本発明の方法では、高リスク群の対象をアジュバント化学療法のために選択し、低リスク群の対象はアジュバント化学療法のために選択せず、その後、状況に応じて治療する。

10

20

【 0 0 1 3 】

さらに別の実施形態では、本発明は、NSCLC の対象に対する療法を選択する方法であって、切除を受けた、NSCLC に罹患している対象から試験試料を得るステップと、表 2 において特定されている少なくとも 2 種以上のバイオマーカーの、試験試料における発現レベルを決定して、各遺伝子についての発現値を生成するステップと、発現値を分析してリスクスコアを生成するステップとを含み、リスクスコアを使用して、対象を、アパチンなどの血管新生阻害剤を投与するように選択するかどうかを分類することができる、方法を包含する。

【 0 0 1 4 】

本発明の方法では、本発明は、表 1、表 2 および / または表 3 において特定されている少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、少なくとも 5 種、少なくとも 6 種、少なくとも 7 種、少なくとも 8 種、少なくとも 9 種、少なくとも 10 種、少なくとも 11 種、少なくとも 12 種、少なくとも 13 種、少なくとも 14 種または少なくとも 15 種バイオマーカーの、またはそれらの任意の組み合わせの発現を決定するステップを包含する。例えば、表 1、表 2 および表 3 のそれぞれから少なくとも任意の 5 種のバイオマーカーの発現を選択する (この実施形態におけるサインは少なくとも 15 種のバイオマーカーを含む)。

30

【 0 0 1 5 】

一実施形態では、NSCLC は I 期 NSCLC、II 期 NSCLC、またはそれらの組み合わせである。NSCLC は、扁平上皮癌および / または腺癌からなる群に特定することができる。

40

【 0 0 1 6 】

一実施形態では、対象とはヒトである。別の実施形態では、試験試料は、新鮮細胞、凍結細胞、FFPE 細胞であってよい。別の実施形態では、発現レベルを、定量的 PCR またはアレイを用いて決定する。

【 0 0 1 7 】

さらに別の実施形態では、発現を分析してリスクスコアを生成するステップを、コックス回帰またはパラメトリック生存予測変数 (parametric survival predictor) などの統計的分析を用いて実施する。

【 0 0 1 8 】

50

別の態様では、本発明は、NSCLC癌を有する対象を選択的に治療する方法であって、外科的切除後の、NSCLCに罹患している対象から試験試料を得るステップと、表1、表2および/または表3において特定されている少なくとも1種または複数のバイオマーカーの、または表1、表2および/または表3において特定されているバイオマーカーの任意の組み合わせの試験試料における発現レベルを決定してリスクスコアを生成するステップと、対象を、リスクスコアに基づいて高リスク群または低リスク群に分類するステップと、高リスク群に属すると分類された対象にアジュバント療法を投与する、または低リスク群に属すると分類された対象にアジュバント療法を投与しないステップとを含む方法を包含する。

【0019】

さらに別の態様では、本発明は、表1、表2および/または表3において特定されている1種または複数のバイオマーカーの発現を測定するための複数の作用剤と、使用説明書とを含むキットを包含する。さらに別の態様では、本発明は、肺癌の対象にアジュバント療法が有益であるかどうかを予測するためのキットであって、表1、表2および/または表3において特定されている1種または複数のバイオマーカーの発現を測定するための複数の作用剤と、発現を分析し、リスクスコアを生成して、患者にアジュバント療法が有益であるかどうかを予測するための手段とを含むキットを包含する。発現を測定するための作用剤は、特定されているバイオマーカーのmRNAと相補的なポリヌクレオチドのアレイを含んでよい。発現を測定する作用剤は、qRT-PCRのための複数のPCRプローブおよび/またはプライマーを含んでよい。キットは、表1、表2および表3において特定されている少なくとも1種のバイオマーカー、例えば、CBX7、STX1A、またはTPX2などを測定するための作用剤を含んでよい。

【0020】

別の態様では、本発明は、表1、表2および/または表3に示されている少なくとも2種のバイオマーカーなどの発現産物に対して相補的およびハイブリダイズ可能である1種または複数のポリヌクレオチドプローブを含むアレイを包含する。

【0021】

さらに別の態様では、本発明は、複数の単離された核酸配列を含む組成物であって、各単離された核酸配列が、表1に示されているバイオマーカー、例えば、バイオマーカーCBX7、STX1AおよびTPX2のRNA産物とハイブリダイズする、前記3種の遺伝子のRNA発現のレベルを測定するために使用される、組成物を包含する。

【0022】

さらに別の態様では、本発明は、NSCLCの対象の予後を予測する、またはNSCLCの対象を分類するためのコンピュータ製品であって、NSCLCを有する対象由来の試料における、表1、表2および/または表3において特定されている1種または複数のバイオマーカーの発現レベルに対応するデータを受け取るための手段と、各遺伝子についての発現値を生成するための手段と、予後に関連づけられる参照発現プロファイルを含むデータベースへの発現値の入力に基づいてリスクスコアを生成するための手段とを含み、リスクスコアにより、生存に関する予後を予測するまたは対象を高リスク群または低リスク群に分類する、コンピュータ製品を包含する。

【0023】

さらに別の態様では、本発明は、上記の方法のうちの任意の1つの方法で使用するためのコンピュータ製品を包含する。

【0024】

「バイオマーカー」とは、対象における生物学的状態の指標として有用な分子である。本主題を参照して、本明細書に開示されているバイオマーカーは、発現の変化を示し、その存在を、予後判定、または、対象が、特定の治療を受けることが有益であるかどうかを予測することに用いることができる分子であってよい。対象のバイオマーカーは、バイオマーカーの発現の変化を検出することによって決定することができる。発現の変化により、DNA遺伝子配列情報の、転写されたRNA（最初のスプライシングされていないRN

10

20

30

40

50

A 転写物もしくは成熟 mRNA) またはコードされるタンパク質産物への変換が説明される。本明細書に開示されているバイオマーカーとしては、表 1、2 および 3 に列挙されているバイオマーカーのいずれか、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられ、それらは転写された RNA またはコードされるタンパク質産物であってよい。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】モジュール 1、2 および 3 の標準化スコアのペアワイズ散布図を示すグラフであり、これらが腫瘍に関して異なる情報を伝達することが実証されている。

【図 2 A】3 つのサイン (モジュール 1、2、および 3) を患者に、別々に、または組み合わせて、外科手術後 5 年に達するまで適用した場合の、それらの予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 2 B】3 つのサイン (モジュール 1、2、および 3) を患者に、別々に、または組み合わせて、外科手術後 5 年に達するまで適用した場合の、それらの予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 2 C】3 つのサイン (モジュール 1、2、および 3) を患者に、別々に、または組み合わせて、外科手術後 5 年に達するまで適用した場合の、それらの予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 2 D】3 つのサイン (モジュール 1、2、および 3) を患者に、別々に、または組み合わせて、外科手術後 5 年に達するまで適用した場合の、それらの予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 3 A】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 1 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 3 B】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 1 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 3 C】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 1 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 3 D】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 1 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 3 E】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 1 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 3 F】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 1 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 全生存分析曲線を示すグラフである。

【図 4 A】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュールモジュール 2 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

【図 4 B】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュールモジュール 2 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

【図 4 C】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュールモジュール 2 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

【図 4 D】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュールモジュール 2 の予後判定性能を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 4 E】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュールモジュール 2 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 4 F】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュールモジュール 2 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 5 A】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 3 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 5 B】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 3 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 5 C】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 3 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 5 D】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 3 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 5 E】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 3 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 5 F】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、モジュール 3 の予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 6 A】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、複合スコアの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 6 B】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、複合スコアの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 6 C】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、複合スコアの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 6 D】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、複合スコアの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 6 E】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、複合スコアの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 6 F】外科手術後 5 年に達するまでの、患者に対する、病期、組織像および年齢による層別化の下での、複合スコアの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 7 A】38 種の遺伝子一覧のサブセットとして構築されたいくつもの例示的なサインの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 7 B】38 種の遺伝子一覧のサブセットとして構築されたいくつもの例示的なサインの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 7 C】38 種の遺伝子一覧のサブセットとして構築されたいくつもの例示的なサインの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

【図 7 D】38 種の遺伝子一覧のサブセットとして構築されたいくつもの例示的なサインの予後判定性能を示すカプラン・マイヤー生存分析曲線を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 7 E】38種の遺伝子一覧のサブセットとして構築されたいくつもの例示的なサインの予後判定性能を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

【図 7 F】38種の遺伝子一覧のサブセットとして構築されたいくつもの例示的なサインの予後判定性能を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

【図 8 A】肺癌の死亡百分率（100%から生存を引いたものと等しい）を特許請求されたサインのリスクスコアの関数として示し、1年、2年、3年、4年および5年の経過観察時間におけるそのような予後判定を示すグラフである。

【図 8 B】肺癌の死亡百分率（100%から生存を引いたものと等しい）を特許請求されたサインのリスクスコアの関数として示し、5年死亡率を腫瘍病期1期および2期によって層別化したリスクスコアの関数として示すグラフである。

【図 9】M. D. Anderson Cancer Center から公的に入手可能な、FFPE 材料から得られたデータセットにおける生存能 (survival performance) を示す Kaplan-Meier 生存分析曲線を示すグラフである。

【図 10 A】FF/Affymetrix と FFPE/qNPA、ならびに FF/Affymetrix と FFPE/nanoString を比較したペアワイズ散布図を示すグラフである。

【図 10 B】FF/Affymetrix と FFPE/qNPA、ならびに FF/Affymetrix と FFPE/nanoString を比較したペアワイズ散布図を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、早期肺癌を有する個体の予後判定または分類のために用いることができる方法の一部に基づく。本発明は、疾患再発のリスクが高く、アジュバント療法が推奨される可能性がある患者、ならびに再発リスクが低く、アジュバント療法が有益でない可能性がある患者を特定することをさらに含む。一例では、本明細書に記載されている予後判定および予測方法は、肺癌試験試料における複数のバイオマーカーの示差的な発現に基づく。本発明のバイオマーカーとしては38種の遺伝子 (CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、CTSH、PPFIBP2、CD302、SFTPB、HSD17B6、DLC1、ADRB2、PARM1、KLRB1、MS4A1、STX1A、KLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、ITGA5、VEGFC、EEF1A2、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、TK1、CCNA2、GPH、CCNB1、MELK、HMMR、EIF2S1、TEAD4、HMGA1、RIMS2、H2AFZ)、またはそれらの組み合わせを挙げることができ、これらは生物学的機能を含めた基準に基づいて3つのモジュール (表1、2、および3) に分割することができる。表1 (本明細書ではモジュール1とも称される) は、腫瘍抑制に關与する遺伝子を含み、表2 (本明細書ではモジュール2とも称される) は、血管新生に關与する遺伝子を含み、表3 (本明細書ではモジュール3とも称される) は、増殖に關与する遺伝子を含む。

【0027】

血管新生または増殖に關与するマーカー (それぞれ表2および表3) などの一部のバイオマーカーは、早期肺癌において対照 (例えば、早期肺癌の患者 (I期およびII期) におけるこれらの遺伝子の平均の発現) と比較して過剰発現しているが、腫瘍抑制に關与する他のバイオマーカーは対照 (例えば、早期肺癌の患者 (I期およびII期) におけるこれらの遺伝子の平均の発現) と比較して過小発現している (表1) ことが発見された。

【0028】

バイオマーカー

本発明のバイオマーカー (複数可) は、表1、表2、および/または表3に列挙されている1種または複数のバイオマーカー、またはそれらの遺伝子産物を含む。本発明は、表1、表2、および/または表3に列挙されているバイオマーカーが示差的に発現しているという発見に基づく。表1、表2、および/または表3において特定されている1種また

10

20

30

40

50

は複数のバイオマーカーの発現プロファイルレベルを分析することによって、早期肺癌の個体の予後を決定することが可能である。

【 0 0 2 9 】

一例では、本発明の方法は、表 1 の 1 種または複数のバイオマーカーを測定するステップを含む。例えば、本発明の方法では、表 1 の少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、少なくとも 5 種、少なくとも 6 種、少なくとも 7 種、少なくとも 8 種、少なくとも 9 種、少なくとも 10 種、少なくとも 11 種、少なくとも 12 種、少なくとも 13 種、少なくとも 14 種または少なくとも 15 種のバイオマーカーを測定する。一例では、表 1 の 1 種の遺伝子、CBX7 の発現レベルを測定する。別の例では、表 1 の 2 種のバイオマーカー、CBX7 および TMPRSS2 の発現レベルを測定する。さらに別の例では、表 1 の 3 種のバイオマーカー、CBX7、TMPRSS2 および GPR116 の発現レベルを測定する。さらに別の例では、表 1 の 4 種のバイオマーカー、CBX7、TMPRSS2、GPR116 および KCNJ15 の発現レベルを測定する。さらに別の例では、表 1 の 5 種のバイオマーカー、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15 および PTPN13 の発現レベルを測定する。

【 0 0 3 0 】

【 表 1 】

遺伝子の記号	Entrez ID	説明	受託	記号別名
CBX7	23492	クロモボックスホモログ7	NM_175709.3	
TMPRSS2	7113	膜貫通プロテアーゼ、セリン2	NM_005656.3; NM_001135099.1	FLJ41954; PP9284; PRSS10
GPR116	221395	Gタンパク質-共役受容体116	NM_015234.4; NM_001098518.1	DKFZp564O1923; FLJ90640; KIAA0758; KPG_001
KCNJ15	3772	内向き整流性カリウムチャンネル、サブファミリーJ、メンバー15	NM_170736.1; NM_170737.1; NM_002243.3	IRKK; KIR1.3; KIR4.2; MGC13584
PTPN13	5783	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体13型(APO-1/CD95(Fas)-関連ホスファターゼ)	NM_080684.2; NM_006264.2; NM_080685.2; NM_080683.2	DKFZp686J1497; FAP-1; PNP1; PTP-BAS; PTP-BL; PTPIE; PTPL1; PTPLE
CTSH	1512	カタプシンH	NM_004390.3	ACC-4; ACC-5; CPSB; DKFZp686B24257; MGC1519; minichain
PPFIBP2	8495	PTPRF相互作用タンパク質、結合タンパク質2(リフリンペータ2)	NM_003621.2	Celp1; DKFZp781K06126; MGC42541
CD302	9936	CD302分子	NM_001198763.1; NM_001198764.1; NM_014880.4	BIMLEC; CLEC13A; DCL-1; DCL1; FLJ43091; KIAA0022; MGC22301
SFTP3	6439	サーファクタントタンパク質B	NM_198843.2; NM_000542.3	PSP-B; SFTB3; SFTP3; SMDP1; SP-B
HSD17B6	8630	水酸化ステロイド(17-ペータ)デヒドロゲナーゼ6ホモログ(マウス)	NM_003725.2	HSE; RODH; SDR9C6
DLC1	10395	肝癌における欠失1	NM_182643.2; NM_024767.3; NM_006094.4; NM_001164271.1	ARHGAP7; FLJ21120; HP; p122-RhoGAP; STARD12
ADRB2	154	アドレナリン作動性ペータ2-受容体、表面	NM_000024.5	ADRB2R; ADRBR; B2AR; BAR; BETA2AR
PARM1	25849	前立腺アンドロゲン調節性ムチン様タンパク質1(prostate androgen-regulated mucin-like protein 1)	NM_015393.3	Cipar1; DKFZP564O0823; PARM-1; WSC4
KLRB1	3820	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーB、メンバー1	NM_002258.2	CD161; CLEC5B; hNKR-P1A; MGC138614; NKR; NKR-P1; NKR-P1A; NKRPIA
MS4A1	931	膜貫通4ドメイン、サブファミリーA、メンバー1	NM_152866.2; NM_021950.3	B1; Bp35; CD20; CVID5; LEU-16; MGC3969; MS4A2; S7

表1

【 0 0 3 1 】

別の例では、本発明の方法は、表 2 の 1 種または複数のバイオマーカーを測定するステップを含む。例えば、本発明の方法では、表 2 の少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少な

くとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種または少なくとも8種のバイオマーカーの発現を測定する。一例では、表2の1種の遺伝子、STX1Aの発現レベルを測定する。一例では、表2の2種のバイオマーカー、STX1AおよびKLK6の発現レベルを測定する。別の例では、表2の3種のバイオマーカー、STX1A、KLK6およびSLC16A3の発現レベルを測定する。別の例では、表2の4種のバイオマーカー、STX1A、KLK6、SLC16A3およびPYGLの発現レベルを測定する。さらに別の例では、表2の5種のバイオマーカー、STX1A、KLK6、SLC16A3、PYGLおよびLDHAの発現レベルを測定する。

【0032】

【表2】

遺伝子の記号	Entrez ID	説明	受託	記号別名
STX1A	6804	シンタキシン 1A(脳)	NM_004603.3; NM_001165903.1	HPC-1; P35-1; STX1; SYN1A
KLK6	5653	カリクレイン-関連ペプチダーゼ 6	NM_002774.3; NM_001012964.1; NM_001012965.1	Bssp; hK6; Klk7; MGC9355; PRSS18; PRSS9; SP59
SLC16A3	9123	溶質輸送体ファミリー16、メンバー3(モノカルボン酸トランスポーター4)	NM_001042422.1; NM_001042423.1; NM_004207.2	MCT3; MCT4; MGC138472; MGC138474
PYGL	5836	ホスホリラーゼ、グリコーゲン、肝臓	NM_002863.4; NM_001163940.1	GSD6
LDHA	3939	乳酸デヒドロゲナーゼ A	NR_028500.1; NM_001165415.1; NM_005566.3; NM_001165416.1; NM_001135239.1; NM_001165414.1	GSD11; LDH1; LDHM; PIG19
ITGA5	3678	インテグリン、アルファ5 (フィブロネクチン受容体、アルファホリペプチド)	NM_002205.2	CD49e; FNRA; VLA5A
VEGFC	7424	血管内皮成長因子C	NM_005429.2	Flt4-L; VRP
EEF1A2	1917	真核生物翻訳伸長因子1アルファ2	NM_001958.2	EEF1AL; EF-1-alpha-2; EF1A; FLJ41696; HS1; STN; STNL

表2

【0033】

別の例では、本発明の方法は、表3の1種または複数のバイオマーカーを測定するステップを含む。例えば、本発明の方法では、表3の少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、少なくとも11種、少なくとも12種、少なくとも13種、少なくとも14種または少なくとも15種のバイオマーカーを測定する。一例では、表3の1種の遺伝子、TPX2の発現レベルを測定する。別の例では、表3の2種のバイオマーカー、TPX2およびUCK2の発現レベルを測定する。別の例では、表3の3種のバイオマーカー、TPX2、UCK2およびPHKA1の発現レベルを測定する。別の例では、表3の4種のバイオマーカー、TPX2、UCK2、PHKA1およびEIF4A3の発現レベルを測定する。さらに別の例では、表3の5種のバイオマーカー、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3およびTK1の発現レベルを測定する。

【0034】

10

20

30

40

【表 3】

遺伝子の記号	EntrezID	説明	受託	記号別名
TPX2	22974	TPX2、微小管結合、ホモログ(アフリカツメガエル(<i>Xenopus laevis</i>))	NM_012112.4	C20orf1; C20orf2; DIL-2; DIL2; FLS353; GD:C20orf1; HCA519; HCTP4; p100; REPP86
UCK2	7371	ウリジン-シチジンキナーゼ 2	NM_012474.4	DKFZp686M04245; TSA903; UK; UMPK
PHKA1	5255	ホスホリラーゼキナーゼ、アルファ 1(筋肉)	NM_001172436.1; NM_002637.3; NM_001122670.1	MGC132604; PHKA
EIF4A3	9775	真核生物翻訳開始因子 4A3	NM_014740.3	DDX48; DKFZp686O16189; eIF4AIII; KIAA0111; MGC10862; NMP265; NUK34
TK1	7083	チミジンキナーゼ 1、可溶性	NM_003258.4	TK2
CCNA2	890	サイクリン A2	NM_001237.3	CCN1; CCNA
GGH	8836	ガンマ-グルタミルヒドロラーゼ(コンジュガーゼ、ホリルポリガンマグルタミルヒドロラーゼ (folypolygammaglutamyl hydrolase))	NM_003878.2	GH
CCNB1	891	サイクリン B1	NM_031966.2	CCNB
MELK	9833	母性胚性ロイシンジッパーキナーゼ	NM_014791.2	HPK38; KIAA0175
HMMR	3161	ヒアルロナン媒介性運動性受容体(hyaluronan-mediated motility receptor)(RHAMM)	NM_012485.2; NM_001142557.1; NM_001142556.1; NM_012484.2	CD168; IHABP; MGC119494; MGC119495; RHAMM
EIF2S1	1965	真核生物翻訳開始因子 2、サブユニット 1 アルファ、35kDa	NM_004094.4	EIF-2; EIF-2A; EIF-2alpha; EIF2; EIF2A
TEAD4	7004	TEA ドメインファミリーメンバー 4	NM_003213.3; NM_201441.2; NM_201443.2	EFTR-2; hRTEF-1B; MGC9014; RTEF1; TCF13L1; TEF-3; TEF3; TEFR-1
HMGAI1	3159	高移動性群 AT フック 1	NM_145903.2; NM_002131.3; NM_145899.2; NM_145902.2; NM_145901.2; NM_145905.2	HMG-R; HMGAI1A; HMG1Y; MGC12816; MGC4242; MGC4854
RIMS2	9699	調節性シナプス膜エキソサイトシス(regulating synaptic membrane exocytosis)2	NM_001100117.2; NM_014677.4	DKFZp781A0653; KIAA0751; OBOE; RAB3IP3; RIM2
H2AFZ	3015	H2A ヒストンファミリー、メンバー Z	NM_002106.3	H2A.z; H2A/z; H2AZ; MGC117173

表3

【 0 0 3 5 】

本発明のバイオマーカーは、発現のレベルまたは遺伝子産物が早期肺癌の個体の予後判定のための予測的なマーカーまたはバイオマーカーとしての機能を果たす、表 1、表 2 および表 3 において特定されているバイオマーカーの任意の組み合わせも含んでよい。一例では、表 1、表 2 および表 3 の各表から 1 種ずつ選択した遺伝子、例えば、C B X 7、S T X 1 A および T P X 2 の発現レベルを測定する。別の例では、表 1、表 2 および表 3 のそれぞれから 2 種ずつ選択したバイオマーカー、例えば、表 1 の C B X 7 および T M P R S S 2、表 2 の S T X 1 A および K L K 6 ならびに表 3 の T P X 2 および U C K 2 の発現レベルを測定する。表 1、2 および 3 からのバイオマーカーの種々の組み合わせ例については以下の表 4 を参照されたい。表 4 に示されている組み合わせが限定として解釈されることは意図しておらず、表 1 ~ 3 に示されているバイオマーカーを任意に組み合わせることができる。

【 0 0 3 6 】

10

20

30

40

【表 4】

バイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせ	p 値
CBX7	4.90E-06
CBX7 TMRSS2	1.10E-07
CBX7 TMRSS2 GPR116	1.90E-07
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15	1.10E-08
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13	5.50E-09
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH	2.60E-09
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2	3.60E-10
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302	2.10E-10
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB	1.10E-10
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6	1.90E-10
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1	1.60E-10
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2	8.50E-11
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 PARM1	8.40E-11
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 PARM1 KLRB1	3.60E-11
CBX7 TMRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 PARM1 KLRB1 MS4A1	5.90E-12
STX1A	3.20E-04
STX1A KLK6	1.40E-05
STX1A KLK6 SLC16A3	1.50E-06
STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL	6.90E-08
STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA	2.10E-08
STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5	3.00E-08
STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC	1.40E-08
STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2	6.90E-08
TPX2	2.20E-05
TPX2 UCK2	4.30E-07
TPX2 UCK2 PHKA1	5.40E-08
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3	1.30E-08
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1	2.60E-08
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2	6.60E-08
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH	4.40E-08
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1	1.50E-07
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK	2.60E-07
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR	2.80E-07
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1	1.70E-07
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4	1.20E-07
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1	1.60E-07

10

20

30

【表 4 - 1】

TEAD4 HMGA1		
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4 HMGA1 RIMS2	7.60E-08	
TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4 HMGA1 RIMS2 H2AFZ	7.00E-08	
CBX7 STX1A TPX2	3.10E-09	
CBX7 TMPRSS2 STX1A KLK6 TPX2 UCK2	1.60E-10	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 STX1A KLK6 SLC16A3 TPX2 UCK2 PHKA1	6.10E-11	10
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3	1.90E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1	1.80E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2	3.20E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH	1.40E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1	3.10E-12	20
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK	2.80E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR	4.00E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1	3.50E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4	2.60E-12	30
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 PARM1 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4 HMGA1	3.50E-12	
CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 PARM1 KLRB1 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4 HMGA1 RIMS2	1.90E-12	

表 4 の続き

【表 4 - 2】

CBX7 TMPRSS2 GPR116 KCNJ15 PTPN13 CTSH PPFIBP2 CD302 SFTPB HSD17B6 DLC1 ADRB2 PARM1 KLRB1 MS4A1 STX1A KLK6 SLC16A3 PYGL LDHA ITGA5 VEGFC EEF1A2 TPX2 UCK2 PHKA1 EIF4A3 TK1 CCNA2 GGH CCNB1 MELK HMMR EIF2S1 TEAD4 HMGA1 RIMS2 H2AFZ	9.60E-13	40
---	----------	----

表 4 の続き

【0037】

別の例では、表 1、表 2、および表 3 のそれぞれから、少なくとも任意の 3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、10 種の遺伝子を選択する。例えば、一実施形態では、少なくとも 15 種のバイオマーカーを選択し、ここでは、表 1 から任意の 5 種のバイオマーカーを選択し（例えば、CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15 および PTPN13 または CBX7、TMPRSS2、CTSH、PPFIBP2 および CD302；または SFTPB；HSD17B6；DLC1；ADRB2 および PARM1）

、表 2 から任意の 5 種のバイオマーカーを選択し（例えば、STX1A、KCLK6、SLC16A3、PYGLおよびLDHAまたはSLC16A3、PYGL、ITGA5、VEGFC、およびEEF1A2またはSTX1A、KCLK6、SLC16A3、PYGLおよびLDHA）、表 3 から任意の 5 種のバイオマーカーを選択する（TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、およびTK1またはCCNA2、GGH、CCNB1、MELKおよびHMMRまたはEIF2S1、TEAD4、HMGA1、RIMS2、およびH2AFZ）。

【0038】

別の実施形態では、本発明のバイオマーカーは、以下の遺伝子のうちの任意の 1 種、または以下の遺伝子の任意の組み合わせを含む：CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、CTSH、PPFIBP2、CD302、SFTPB、HSD17B6、DLC1、ADRB2、PARM1、KLRB1、MS4A1、STX1A、KCLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、ITGA5、VEGFC、EEF1A2、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、TK1、CCNA2、GGH、CCNB1、MELK、HMMR、EIF2S1、TEAD4、HMGA1、RIMS2、H2AFZ。別の実施形態では、本発明のバイオマーカーは、以下の遺伝子のうちの少なくとも 15 種、20 種、25 種、30 種、35 種、36 種、37 種または 38 種を含む：CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、CTSH、PPFIBP2、CD302、SFTPB、HSD17B6、DLC1、ADRB2、PARM1、KLRB1、MS4A1、STX1A、KCLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、ITGA5、VEGFC、EEF1A2、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、TK1、CCNA2、GGH、CCNB1、MELK、HMMR、EIF2S1、TEAD4、HMGA1、RIMS2、H2AFZ。特定の実施形態では、以下の 37 種のバイオマーカーを選択する：CBX7、TMPRSS2、GPR116、KCNJ15、PTPN13、CTSH、PPFIBP2、CD302、SFTPB、HSD17B6、DLC1、ADRB2、PARM1、KLRB1、MS4A1、STX1A、KCLK6、SLC16A3、PYGL、LDHA、ITGA5、VEGFC、TPX2、UCK2、PHKA1、EIF4A3、TK1、CCNA2、GGH、CCNB1、MELK、HMMR、EIF2S1、TEAD4、HMGA1、RIMS2、H2AFZ。

【0039】

一例では、発現プロファイルは、表 1、表 2、および / または表 3 に列挙されている 1 種または複数のバイオマーカーの mRNA のレベルを示す値のセットであってよい。別の例では、発現プロファイルは、表 1、表 2、および / または表 3 に列挙されているバイオマーカーによりコードされる 1 種または複数のタンパク質またはポリペプチドを示す値のセットを含んでよい。

【0040】

試料の調製

外科的切除を受けた、早期肺癌を有する個体から取得した任意の適切な細胞の試験試料を使用して、本発明の複数のバイオマーカーの発現を決定することができる。早期肺癌の種類および分類は変動してよい。肺癌は I 期および / または II 期の肺癌であってよい。試験試料は扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌を含めた非小細胞肺癌（NSCLC）であってよく、また、サブグループに関係なく全ての組織型（histotype）であってよい。

【0041】

一般に、細胞または組織試料の試験試料は、癌の対象から、生検または外科的切除によって得る。外科的切除は、治癒的または非治癒的 / RO であってよい。細胞、組織、または体液の試料は、針穿刺吸引生検によって取り出すことができる。このためには、シリンジに取り付けた細い針を、皮膚を通して対象の臓器または組織内に挿入する。一般には、超音波またはコンピュータ断層撮影法（CT）画像法を用いて対象の領域に針を誘導する。針が組織に挿入されたら、シリンジで真空を創り出し、その結果、針を通して細胞また

10

20

30

40

50

は体液を吸引し、シリンジ内に収集することができる。細胞または組織の試料は、切開生検またはコア生検によって取り出すこともできる。このためには、円錐状、円柱状、またはほんの少しの組織を対象の領域から取り出す。この種類の生検の誘導にはCT画像法、超音波、または内視鏡が一般に使用される。より詳細には、癌性の病変全体を、切除生検または外科的切除によって取り出すことができる。本発明では、試験試料は、一般には、外科的切除の一部として取り出された細胞の試料である。

【0042】

例えば組織の試験試料は、後で使用するために、例えば、RNA later (Ambion; Austin Tex.) 内で貯蔵することもでき、急速冷凍し、-80 で貯蔵することもできる。生検組織試料は、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、または酢酸/エタノールなどの固定液を用いて固定することもできる。固定した組織試料はワックス(パラフィン)または可塑性樹脂に包埋することができる。包埋した組織試料(または凍結した組織試料)は切って薄い切片にすることができる。固定したまたはワックス包埋した組織試料からRNAまたはタンパク質を抽出することもできる。

10

【0043】

癌の対象は、一般に、霊長類などの哺乳動物の対象である。例示的な実施形態では、対象はヒトである。

【0044】

細胞の試料または組織の試料を癌の対象から取り出したら、それを、当技術分野で周知であり、下に記載されている技法を用いてRNAまたはタンパク質を単離するために加工してもよい。

20

【0045】

一例では、RNAを、種々の方法、例えば、チオシアン酸ゲアニジン溶解、その後のCsCl遠心分離(Chirgwinら、Biochemistry 18:5294-5299、1979)によって、組織または細胞試料から抽出することができる。単細胞のRNAは、単細胞からcDNAライブラリーを調製するための方法に記載の通り得ることができる(例えば、Dulac、Curr. Top. Dev. Biol. 36:245、1998; Jenaら、J. Immunol. Methods 190:199、1996を参照されたい)。RNA試料を、特定の種についてさらに濃縮することができる。一実施形態では、例えば、ポリ(A)+RNAを、RNA試料から単離することができる。具体的には、ポリ-Tオリゴヌクレオチドを固体支持体上に固定化して、mRNAに対する親和性リガンドとして機能させることができる。この目的のためのキット、例えば、Message Makerキット(Life Technologies、Grand Island、N. Y.)が市販されている。一実施形態では、RNA集団を、表1~3において詳説されている対象の配列について濃縮することができる。濃縮は、例えば、プライマー特異的cDNA合成、またはcDNAの合成および鋳型指向性in vitro転写に基づく多数回の線形増幅によって実現することができる(例えば、Wangら、Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 86:9717、1989を参照されたい)。

30

【0046】

バイオマーカーの発現の検出

一例では、方法は、被験癌患者の腫瘍試料からの、表1、表2、および/または表3に列挙されている1種または複数のバイオマーカー、またはそれらの遺伝子産物の発現を決定するステップを含む。表1、表2、および/または表3に列挙されているバイオマーカーのそれぞれの遺伝子配列は、当技術分野で公知の方法、例えば、遺伝子またはその遺伝子産物を特異的に検出するために使用することができる作用剤を使用して検出することができる。

40

【0047】

例示的な検出剤は、本明細書に開示されている遺伝子に対応する核酸とハイブリダイズする核酸プローブ、およびこれらの遺伝子のコード産物に結合する抗体である。表1、表2、および/または表3に列挙されているバイオマーカーは、対立遺伝子変異体および他のファミリーメンバーを含めた天然に存在する配列も包含するものとする。本発明のバイ

50

オマーカーは、暗号の縮退によって生じる、列挙されている配列と相補的な配列、および十分に相同な配列、およびストリンジェントな条件下で表1、表2、および/または表3に列挙されているバイオマーカーとハイブリダイズする配列も包含する。

【0048】

一実施形態では、方法は、ヌクレオチド配列、例えば、少なくとも10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、25ヌクレオチドまたは40ヌクレオチド、ならびに表1、表2、および/または表3に列挙されている核酸配列のコード配列の一部と相補的であるコード配列の全てに至るまで、またはほぼ全てを含む核酸プローブを用意するステップと、癌性細胞を有する哺乳動物から組織試料を得るステップと、核酸プローブを、NSCLCの患者から取得した生検材料から得たRNAとストリンジェントな条件下で接触させるステップと(例えば、ノーザンブロットまたは*in situ*ハイブリダイゼーションアッセイにおいて)、プローブとRNAのハイブリダイゼーションの量を決定するステップとを含む。

10

【0049】

ハイブリダイゼーションの条件は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、N.Y. (1989)、6.3.1-6.3.6に見いだすことができる。高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、摂氏約45度でのハイブリダイゼーション、その後、0.2×SSC、0.1パーセントSDS中、摂氏50~65度での1回または複数回洗浄である。「十分に相同」とは、バイオマーカーのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列が、第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と十分にまたは最低限に同一または等価である(例えば、同様の側鎖を有するアミノ酸残基)アミノ酸残基またはヌクレオチドを含有し、したがって、第1のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列が共通の構造ドメインまたは構造モチーフおよび/または共通の機能活性を共有することを意味する。例えば、一般的な構造ドメインを共有し、ドメインのアミノ酸配列にわたって少なくとも約50パーセントの相同性、少なくとも約60パーセントの相同性、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、および少なくとも約90~95パーセントの相同性を有するアミノ酸配列またはヌクレオチド配列が、本明細書では十分に相同であると定義される。さらに、少なくとも約50パーセント相同、少なくとも約60~70パーセント相同、少なくとも約70

20

30

【0050】

2つの配列間の配列の比較および相同性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して実現することができる。配列を比較するために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77に改変されたKarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBFASTおよびXBFASTプログラム(バージョン2.0)に組み込まれる。BLASTヌクレオチド検索を、NBFASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施して、本発明のTRL核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBFASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施して、表1、表2、および/または表3に列挙されているバイオマーカーによりコードされるタンパク質配列と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較する目的でギャップ挿入されたアラインメントを得るために、Altschulら、(1997) Nucleic Acids Research 25(17):3389-3402に記載の通り、Gapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBFASTおよびNBFAST)の初期状態のパラメータを使用することができる。http://www.ncbi.nlm

40

50

m.nih.govを参照されたい。配列を比較するために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、MyersおよびMiller、CABIOS (1989) のALIGNアルゴリズムである。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重量残基表(PAM120 weight residue table)、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用することができる。

【0051】

RNAの濃縮および/または増幅の間に、またはその後、核酸を標識することができる。例えば、検出可能な標識とコンジュゲートしたdNTP、例えば、蛍光標識したdNTPの存在下で逆転写を行うことができる。別の実施形態では、cDNAまたはRNAプローブを、検出可能な標識の不在下で合成することができ、その後、例えば、ビオチン化したdNTPまたはrNTPを組み入れること、またはいくつかの同様の手段(例えば、ビオチンのブソレン誘導体をRNAと光架橋すること)によって標識することができ、その後、標識したストレプトアビジン(例えば、フィコエリトリンとコンジュゲートしたストレプトアビジン)または等価物を添加する。

10

【0052】

対象の蛍光部分または標識としては、クマリンおよびその誘導体(例えば、7-アミノ-4-メチルクマリン、アミノクマリン); Bodipy FLおよびcascade blueなどのポディピー色素; フルオレセインおよびその誘導体(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、Oregon green); ローダミン色素(例えば、Texas red、テトラメチルローダミン); エオシンおよびエリスロシン; シアニン色素(例えば、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7); FluorX、ランタニドイオンの大環状キレート(例えば、quantum dye(商標)); チアゾールオレンジ-エチジウムヘテロ二量体、TOTAB、ダンシルなどの蛍光エネルギー移動色素が挙げられる。本発明の装置またはアッセイで検出されることが望ましい要素と連結する官能性を有する、または、そのような官能性を組み入れるように修飾することができる個々の蛍光化合物も利用することができる(例えば、Kricka、1992、Nonisotopic DNA Probe Techniques、Academic Press San Diego; Calif. を参照されたい)。化学発光標識としては、ルシフェリンおよび2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えば、ルミノールが挙げられる。

20

【0053】

バイオマーカー遺伝子産物の発現の検出

表1、表2および/または表3に列挙されている1種または複数のバイオマーカーによりコードされるタンパク質産物の存在の検出は、当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いることによって行うことができる。例えば、特定の対象のタンパク質を検出するために用いることができる対象の作用剤、例えば抗体の使用。本発明において有用なポリペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体および/またはモノクローナル抗体を作出するための方法は当業者に公知であり、例えば、Dymeckiら、(J. Biol. Chem. 267:4815、1992); BoersmaおよびVan Leeuwen、(J. Neurosci. Methods 51:317、1994); Greenら、(Cell 28:477、1982); およびArnheiterら、(Nature 294:278、1981)において見ることができる。一実施形態では、免疫測定法を用いて細胞試料中のタンパク質のレベルを定量化することができる。本発明は、特定のアッセイ手順に限定されず、したがって、均一な手順と不均一な手順のどちらも含むものとする。本発明に従って行うことができる例示的な免疫測定法としては、蛍光偏光免疫測定法(FPIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、酵素免疫測定法(EIA)、比濁分析阻害免疫測定法(nephelometric inhibition immunoassay)(NIA)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、および放射免疫測定法(RIA)が挙げられる。指標部分、または標識基を対象抗体に付着させ、多くの場合アッセイ装置および適合する免疫測定法の手順の利用可能性によって規定される、方法の種々の使用の必要性に合致するように選択することができる。上記の種々の免疫測定法の実施において用いられる一般的な技法は当業者に公知である。あるいは、ポリアクリルアミドゲル上でタンパク質を電気泳動により分離することを含み、分離したタンパク質を染

30

40

50

色した後、各タンパク質の相対量を、その光学濃度を評価することによって数量化することができるウエスタンブロット分析などの他の方法を用いることができる。あるいは、ドットブロットアッセイ、FACSまたは免疫組織学的検査などの他の方法を使用することができる。

【0054】

組織試料を、ホルマリン、グルタルアルデヒド、メタノールなどの試薬を用いて固定する。次いで、試料を、マーカーポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体（例えば、モノクローナル抗体）と一緒にインキュベートする。この抗体は、その後結合を検出するために標識とコンジュゲートすることができる。試料を、免疫複合体が形成されるのに十分な時間インキュベートする。次いで、抗体の結合を、この抗体とコンジュゲートした標識によって検出する。抗体を標識していない場合、例えば、抗マーカーポリペプチド抗体のアイソタイプに対して特異的である第2の標識抗体を用いることができる。使用することができる標識の例としては、放射性核種、蛍光剤、化学発光体、酵素などが挙げられる。

10

【0055】

酵素を使用する場合、酵素の基質を試料に加えて、着色または蛍光産物をもたらすことができる。コンジュゲートに使用するための適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼなどが挙げられる。市販されていない場合、そのような抗体-酵素コンジュゲートは、当業者に公知の技法によって容易に作出される。

20

【0056】

さらに別の実施形態では、本発明では、本発明のマーカーポリペプチドに対して生じる抗体のパネルを使用することが意図されている。

【0057】

mRNAの検出

本発明の重要な態様は、外科的切除後の、早期肺癌に罹患している対象から取得した肺癌の腫瘍生検材料における、表1、表2および/または表3において特定されている1種または複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することである。発現レベルを分析し、リスクスコアを生成するために使用することができる。

【0058】

一例では、異なる試料集団におけるmRNAのレベルを比較するための遺伝子発現プロファイリングに逆転写酵素PCR(RT-PCR)を用いることができる。該方法は、当技術分野で公知の任意の技法を用いて、例えば、Qiagenなどの商業的な製造者からの精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを、製造者の説明書または完全なDNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE (登録商標)、Madison, WI)に従って使用することによってmRNAを単離することを含む。逆転写ステップでは、一般には、発現プロファイリングの状況および目的に応じて特異的なプライマー、ランダムな六量体、またはオリゴ-dTプライマーを使用して刺激し、次いで、得られたcDNAをその後のPCR反応において鋳型として使用することができる。次いで、TaqMan (登録商標) RT-PCRを、例えば、市販の設備を使用して実施することができる。

30

40

【0059】

RT-PCR技法のごく最近の変形はリアルタイム定量的PCRであり、これは、二重標識した蛍光発生プローブ（すなわち、TaqMan (登録商標) プローブ）によってPCR産物の蓄積を測定するものである。リアルタイムPCRは、正規化のために各標的配列に対する内部の競合剤を使用する定量的競合的PCR、およびRT-PCRのために、試料中に含めた正規化遺伝子、またはハウスキーピング遺伝子を使用する定量的比較的PCRのどちらにも適合する。さらなる詳細については、例えば、Heldら、Genome Research 6:986-994 (1996)を参照されたい。

【0060】

50

別の例では、表1、表2および/または表3において特定されているバイオマーカーのうち1種または複数に対応する1種または複数のプローブを含むマイクロアレイを使用する。上記の方法により、アレイ表面に、標識した標的核酸のハイブリダイゼーションパターンが生じる。得られた、標識した核酸のハイブリダイゼーションパターンは、種々のやり方で、標的核酸の特定の標識に基づいて選択される特定の検出様式で可視化または検出することができる。代表的な検出手段としては、シンチレーション計数、オートラジオグラフィ、蛍光測定、熱量測定、光放出測定、光散乱などが挙げられる。

【0061】

一例では、検出方法では、市販されているアレイスキャナー(Affymetrix、Santa Clara、Calif.)、例えば、417 Arrayer、418 Array Scanner、またはAgilent Gene Array Scannerを利用する。このスキャナーは、インターフェースおよび使いやすいソフトウェアツールを伴うシステムコンピュータで制御される。出力は、種々のソフトウェアアプリケーションに直接インポートすることができる、または種々のソフトウェアアプリケーションから直接読み取ることができる。

10

【0062】

本発明で使用される場合、比較するための対照は、当業者が決定することができる。一態様では、カットオフ値としての機能を果たす値を選択することによって対照を決定する。例えば、値は、例えば、生存良好の試験試料と生存不良(bad survival)の試験試料；または個体にアジュバント療法が有益になる試験試料とそれが有益にならない試験試料；または、個体に血管新生阻害剤または増殖の阻害剤などの特定の薬物を投与することが有益になる試験試料を区別する値であってよい。アジュバント療法が有益である可能性がある患者とは、全生存、長期生存、無再発生存、および無遠隔再発生存(distant recurrence-free survival)などの当技術分野において通常使用される測定値を含めた患者の状態の任意の測定値が改善されることを意味する。

20

【0063】

遺伝子発現のレベルを決定するための他の方法としては、Sequenom, Inc. (San Diego, CA)によって開発されたMass ARRAYに基づく遺伝子発現プロファイリング方法および遺伝子発現の連続分析(serial analysis of gene expression)(SAGE)(Velculescuら、Science 270:484-487(1995)；およびVelculescuら、Cell 88:243-51(1997)が挙げられる。

30

【0064】

FFPE材料における遺伝子発現のレベルを決定するためのさらに他の方法は、qNPA(商標)技術(HTG Molecular Diagnostics, Inc.、Arizona)およびnanoString(商標)技術(Seattle)であり、この方法ではRNA抽出も増幅も必要ない。qNPA技術を用いて、FFPE試料をまずHTG溶解緩衝液に曝露させ、次いで、本明細書に記載のバイオマーカーのmRNAと相補的なヌクレアーゼ保護プローブを溶液に加える。プローブが可溶性であり架橋した対象のRNAバイオマーカーの全てとハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション後、S1ヌクレアーゼを加え全ての非特異的な一本鎖核酸を破壊し、化学量論的な量のバイオマーカー-mRNAプローブ2重鎖を生じさせる。次いで、塩基加水分解により、2重鎖からプローブを遊離させる。次いで、プローブをプログラムされたArray Plateに移し、検出リンカーを加え、プローブと検出リンカーの両方をアレイ上に捕捉する。次いで、Array Plateを洗浄し、HRP標識した検出プローブを加え、インキュベートする。次いで、アレイプレートを洗浄し、化学発光基質を加える。最後に、Array Plateを画像処理し、全てのウェル中のバイオマーカーのそれぞれの発現を測定する。NanoString技術を用い、バイオマーカーmRNA当たり、溶液中のmRNAとハイブリダイズする塩基プローブを2~50種使用する。レポータープローブによりシグナルが運ばれ、捕捉プローブにより、データ収集のために複合体を固定化することが可能になる。ハイブリダイゼーション後、過剰なプローブを除去し、プローブ/標的複合体をア

40

50

ラインメントし、計数カートリッジ内に固定化する。

【0065】

本発明の方法では、上記の1種または複数のバイオマーカーの発現レベルを、下記の通り測定し、分析し、リスクスコアを生成するために使用する。発現閾値を、例えば、生存良好を有する個体および生存不良 (bad survival) を有する個体を選択するために、予後判定的に使用することができる。

【0066】

アッセイしたRNAの量の差異と使用したRNAの質の変動性をどちらも補正する(正規化する)必要がある。したがって、アッセイでは、一般には、GAPDHおよびCyp1などの周知のハウスキーピング遺伝子を含めた特定の正規化遺伝子の発現を測定し、組み入れる。あるいは、正規化は、アッセイしたバイオマーカーまたはその大きなサブセットの全ての平均または中央値のシグナル(Ct)に基づいてよい(全体的な正規化手法)。遺伝子ごとに、測定された正規化された患者の腫瘍mRNAの量を、肺癌組織の参照セットにおいて見いだされる量と比較する。この参照セット内の肺癌組織の数(N)は、異なる参照セット(全体として)が基本的に同じように挙動することを確実にするために十分多くあるべきである。この条件に合致する場合、特定のセット内に存在する個々の肺癌組織の同一性は、アッセイしたバイオマーカーの相対的な量に対する有意な影響力を持たなくなる。

【0067】

本発明の方法では、各バイオマーカーの発現を測定し、一般には、それを発現値に変換する。次いで、これらの発現値を使用して、加重平均することによってリスクスコアを生成する。リスクスコアを、較正データベースにより、パラメトリック式またはノンパラメトリックなデータ駆動モデルのいずれかによって死亡、転移または再燃のリスクに関連づける。このデータベースは、既知の発現値、リスクスコアおよび臨床的経過観察を有する試料の参照セットから構築される。リスクスコア較正は、各モジュール(表1、2または3)に対して別々に利用可能であってもよく、組織像、腫瘍病期分類または他の特性、例えば、患者の年齢などによって定義される特定の疾患サブタイプに特異的であってもよい。治療応答予測のために、特定の療法で治療する(または治療しない)患者について別々の較正式またはデータベースを構築する。複合的なリスクスコア(特定の加重を伴う表1、2、または3のモジュールの組み合わせ)も、それ自体の較正式またはデータベースと一緒に用いることができる。プロトコールを作成する臨床判断を、上記の較正されたリスクスコアまたは予測された生存または事象(再燃または転移)までの時間に従って行うことができる。

【0068】

算出されたリスクスコアは、対象に対する適切な治療方針を決定するためにも用いることができる。高リスクスコア(すなわち、短い生存時間または予後不良)を有する対象は、アジュバント療法を受けることが有益である可能性がある。アジュバント療法は、適切な化学療法剤、例えば、パラプラチン(カルボプラチン)、プラチノール(シスプラチン)、タキソテル(ドセタキセル)、アドリアマイシン(ドキソルピシン)、ペブシド(エトポシド)、ジェムザール(ゲムシタピン)、イフェックス(イホスファミド)、カンプトサー(イリノテカン)、タキソール(パクリタキセル)、アリムタ(ペメトレキセド)およびハイカムチン(トポテカン)および/または放射線療法を含んでよい。負のリスクスコア(すなわち、長い生存時間または予後良好)を有する対象は、追加的な治療は有益でない可能性がある。

【0069】

別の例では、特定の表の遺伝子セットを使用して生成したリスクスコアを使用して、特定の療法の方針を決定することができる。例えば、表2のバイオマーカーの分析に基づく個体のリスクスコアが高い場合、個体は、アバスチン、スラフィニブ(srafinib)、スニチニブまたはパゾパニブなどの血管新生阻害剤を含むアジュバント療法を受けることが有益である可能性がある。あるいは、表3のバイオマーカーの分析に基づく個体のリスクス

10

20

30

40

50

コアが高い場合、個体はトポイソメラーゼ阻害剤（I & I I）、タキサン、アントラサイクリン、抗チューブリン、代謝拮抗薬またはアルキル化剤などの抗増殖剤を含むアジュバント療法を受けることが有益である可能性がある。

【0070】

データ分析

試料の分析操作を容易にするために、デバイスからリーダーによって得られるデータを、デジタルコンピュータを使用して分析することができる。一般には、コンピュータは、デバイスからデータを受け取り、保管するため、ならびに集めたデータを分析し、報告するため、例えば、バックグラウンドの引き算、制御が適正に実施されたことを検証すること、シグナルを正規化すること、蛍光データを解釈してハイブリダイズした標的の量を決定すること、バックグラウンドの正規化などのために適切にプログラムされる。

10

【0071】

キット

本発明は、さらに、本明細書に記載のバイオマーカーの発現レベルを決定するためのキットを提供する。キットは、肺癌の対象の予後を決定するために有用であり得る。キットは、表1～3において特定されているバイオマーカーのいずれかの、それらの任意の組み合わせのプローブを含むマイクロアレイおよび/またはプローブを付着させることができる任意の他の固体支持体を含んでよく、固体支持体を用いて、試験試料の遺伝子発現を測定することができる。一実施形態では、キットは、コンピュータシステムのメモリにロードすることができる発現プロファイル分析ソフトウェアを含み、測定された発現値をリスクコアに変換することができるコンピュータ可読の媒体を含む。キットは、核酸対照、緩衝液、および使用説明書をさらに含んでよい。

20

【0072】

当業者には、本発明の実施において使用することができる、本明細書に記載のものと同様または同等である多くの方法および材料が理解されよう。実際に、本発明は、記載されている方法および材料に決して限定されない。本発明では、以下の用語が下で定義されている。

(実施例)

【実施例1】

【0073】

肺患者のコホートのNovartisデータセットと種々の公開データセットの組み合わせを試験した。患者の選択基準および臨床的特性についての記載は、公開データセットについてはそれぞれの原著論文に見いだすことができる（以下を参照されたい）。Novartisデータセットについては、外科的切除を受けたNSCLC患者から412の患者試料を採取した。CT-スキャン、疑わしいリンパ節（CTで $>1\text{cm}$ ）のFDG-PETおよびMRIを含めた標準の病期分類手順を実施した。NSCLC組織学的検査を実施して、NSCLCが扁平上皮癌、腺癌またはBACなどの他のものであるかを決定した。TNMに基づく病期分類も実施して、NSCLCがI期であるかII期であるかを定義した。新鮮凍結組織をゲノム分析のためにバンキングした。主要評価項目は全生存であった。全生存とは、最初の外科手術からの時間（年単位）を指し、少なくとも3年、例えば5年間などの無再燃または無再発である期間によって定義することができる。

30

40

【0074】

本実施例で使用した公開データセット：

【0075】

【表 5】

データセット の名称	施設	参考文献	供給源	発現マイクロ アレイブ ラットフォ ーム
DFCI	ダナ・ファーバ ー癌研究所 (Dana-Farber Cancer Institute)	Shedden ら 2008	caArray https://array.nci.nih.gov/caarray/project/jacob-00182	Affymetrix U133A
HLM	モフィット癌セ ンター(Moffitt Cancer Center)	Shedden ら 2008	caArray https://array.nci.nih.gov/caarray/project/jacob-00182	Affymetrix U133A
JBR	オンタリオ癌研 究所(Ontario Cancer Institute)、プリ ンス・マーガレ ット病院(Prince Margaret Hospital)	Zhu ら 2010	GEO GSE14814 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14814	Affymetrix U133A
MI	ミシガン大学癌 センター (University of Michigan Cancer Center)	Shedden ら 2008	caArray https://array.nci.nih.gov/caarray/project/jacob-00182	Affymetrix U133A
MIT	マサチューセツ ツ工科大学 (Massachusetts Institute of Technology)	Bhattacharje e ら 2001	http://broad.institute.org/mpr/lung	Affymetrix U95A
MSKCC	メモリアル・ス ローン・ケタリ ング癌センター (Memorial Sloan- Kettering Cancer Center)	Shedden ら 2008	caArray https://array.nci.nih.gov/caarray/project/jacob-00182	Affymetrix U133A

10

20

30

【表 5 - 1】

NCCH	カロライン大学 チャペルヒル校 (University of Caroline at Chapel Hill)	Wilkerson ら 2010	GEO GSE17710 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer
y/
acc.cgi?acc=GSE17710">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer y/ acc.cgi?acc=GSE17710	Agilent UNC カス タムアレ イ 44k
NU1	名古屋大学 (Nagoya University)	Takeuchi ら 2006	GEO GSE11969 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer
y/
acc.cgi?acc=GSE11969">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer y/ acc.cgi?acc=GSE11969	Agilent カ スタムア レイ 21.6k
VRX	Veridex, LLC	Raponi ら 2006	GEO GSE4573 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer
y/
acc.cgi?acc=GSE4573">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer y/ acc.cgi?acc=GSE4573	Affymetrix U133A
WU	ワシントン大学 (Washington University)	Lu ら 2006	GEO GSE6253 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer
y/
acc.cgi?acc=GSE6253">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/quer y/ acc.cgi?acc=GSE6253	Affymetrix U133A, U133B, U95Av2

表5の続き

10

【0076】

20

データセットの参考文献は以下を含む：

Bhattacharjee Aら Proc Natl Acad Sci U S A 98:13790-5、2001 ; Takeuchi ら (2006) J Clin Oncol 24:1679-88 ; Raponi ら (2006) Cancer Res 66:7466-72 ; Lu ら (2006) PLoS Med 3:e467 ; Shedden ら (2008) Nat Med 14:822-7 ; Hou ら (2010) PLoS One 5:e10312 ; Wilkerson ら (2010) Clin Cancer Res 16:4864-75 ; Zhu ら (2010) J Clin Oncol 28:4417-24

【0077】

公開データセットの遺伝子発現マイクロアレイの処理

分析のためのデータセットを準備する手順は、Wirapati ら、2008 Breast Cancer Research 10:R65に記載されている手順と同様であり、以下の通り簡潔に概説される：

30

1．遺伝子発現データについては、原著者により提供された、正規化または前処理した発現値を改変せずに使用した

2．マイクロアレイプラットフォーム内のプローブまたはプローブセットを、同じ参照配列データベース (RefSeqバージョン39) に再マッピングした

3．早期 (I期およびII期) の患者のみを本実施例に用い、全てのデータセットから全部で $n = 834$ であった (I期は $n = 571$ 、II期は $n = 263$)。全ての組織型が含まれるが、大部分は腺癌 ($n = 585$) または扁平上皮癌 ($n = 226$) であり、他の組織型は $n = 23$ のみである。

【0078】

サイン遺伝子を、包括的な遺伝子発現および Novartis により新しく生成された肺癌データセット (2つのコホート、全部で患者412人、未発表) および公的に入手可能な遺伝子発現データセットからなる臨床データベースの大規模総合分析によって特定した。サイン遺伝子を選択し、それらを、他の種類の癌との発現パターンの類似性および生物学的機能を含めた基準に基づいて3つのモジュール (表1、2、および3) に群分けした。公的に入手可能なデータセットは、予後判定性能を下で概説されている方法を用いてそれぞれ独立に検証することができるように選択した。

40

【0079】

バイオマーカーサイン (表1、2、および/または3に明記されているバイオマーカーのセット) を適用する際に、欠けている遺伝子は無視した。生のスコアを、特定のプラットフォームに存在していた遺伝子の発現値を平均することによって各サインに割り当てた

50

。生のスコアの平均を引き算し、標準偏差で割ることによって標準化スコアを出した。平均および標準偏差を各データセットについて別々に決定した。各患者について3つの異なるスコアを出した。それらはモジュール1、2、または3と称され、それぞれ表1、2、または3の遺伝子セットに対応する。

【0080】

3つのモジュールからのスコアから同様の情報はもたらされなかったことを実証するために、図1においてスコアのペアワイズ分布の散布図を作成した。モジュール1とモジュール3は、それらの腫瘍抑制（モジュール1）および増殖（モジュール3）における生物学的関与に従って、ほぼ反対方向に作用している。これらの2つのモジュールにより非常に類似した予後情報をもたらすことができるが、正確に検出するために発現の相互関係が技術的に重要であった。したがって、一方のモジュールの値が低いことは、他方のモジュールの値が高ければ、単に平均の発現が低いと解釈される（検出の技術的不全ではなく）。モジュール2については、モジュール1および3とわずかな相関が示されたが、興味深い非対称のパターンが伴った。モジュール1と2の両方の値が低い可能性はあるが、両方の値が高い可能性は低い。他方では、モジュール2の値が高いことは、モジュール3の値が高いことを必要とすると思われるが、逆は真ではない（すなわち、モジュール3の値が高い腫瘍の一部ではモジュール2の値が低い場合がある）。

10

【0081】

サインの予後判定性能の評価

モジュールスコアのそれぞれの臨床的な有用性を示すために、カプラン・マイヤー曲線（KaplanおよびMeier *J. Am. Statist. Assoc.* 53:457-481, 1953）を用い、定量的スコアを使用して生存分析を実施して、患者を四分位数（患者の25%を含有する群）に分けた。

20

【0082】

図2A～Cには、3つのサイン（モジュール1、2、および3）を別々に適用した場合のそれらの予後判定性能が、外科手術後5年に達するまでの患者の全生存のカプラン・マイヤー生存分析によって示されている。患者をスコアの四分位数に従ってQ1、Q2、Q3、およびQ4の4群にカテゴリー化し、これらは、それぞれ第1四分位数、第2四分位数、第3四分位数、および第4四分位数に対応する。このカテゴリー化により、リスクの変化をスコアの関数として考察することが可能になる。選択した曲線の対をコックス回帰分析を使用して比較し、その結果は、ハザード比（HR）およびその95%信頼区間、および効果なしに対する仮説検定のp値（HR = 1）を示している。各曲線の右側の数は5年生存のパーセントである。最初の3つのパネルでは、各サインはそれ自体の予後判定値を有することが実証されている。図2D（「組み合わせ」）には、3つのモジュールの単純な組み合わせ（-モジュール1 + モジュール2 + モジュール3）によって得られるリスクスコアの結果が示されている。

30

【0083】

3つのスコアを組み合わせた予後判定システムの例は、図2Dにも示されている。スコアは単に合計し、モジュール1については-1を掛けて効果の方向を逆にした。いくつかの個々のモジュールに対する劇的な改善は見られなかったが、スコアに応じたリスクの漸次的移行はいっそう大きかった。

40

【0084】

要約すると、個々のサイン（モジュール1、2または3）、ならびにそれらの組み合わせ（モジュール1、2および3）について、患者のサブグループの生存（または同等に、疾患関連死亡率）を区別する能力が示された。全ての場合において、少なくとも最も遠い四分位数の間に実質的かつ統計的に有意な差異が観察される。

【0085】

臨床病理学的因子との関連におけるサインの性能

提唱されたサインにより、組織像、腫瘍病期分類および診断時の年齢などのよく確立された因子に新しい予後情報が付加されることを示すために、上記と同様の分析を実施した

50

が、データを群に層別化した。この例示的な実施例では、各因子によって別々に層別化し、それらを、各群の標本サイズが十分になるように2つの主要な群に分けることのみを示した。以下の因子を考察する：

- ・腫瘍病期分類：I期対II期
- ・組織像：腺癌対扁平上皮癌
- ・診断時の年齢：65歳以下対66歳超（これはデータにおける患者の年齢の中央値である）。

【0086】

サイン（モジュール1、2、および3）のそれぞれ、および組み合わせが、それぞれ、図3A～F、図4A～F、図5A～Fおよび図6A～Fに別々に示されている。詳細には、図3A～Fには、病期、組織像および診断時の年齢による層別化の下でのモジュール1の予後判定性能が示されている。四分位数は図2の場合と同じである（すなわち、グループ分けを最初に、層別化の前に行う）。ここで、示されている通り、予後判定力は、各層の範囲内のままである。図4A～Fには、病期、組織像および診断時の年齢による層別化の下でのモジュール2の予後判定性能が示されている。図5A～Fには、病期、組織像および診断時の年齢による層別化の下でのモジュール3の予後判定性能が示されている。図6A～Fには、病期、組織像および診断時の年齢による層別化の下でのモジュール1、2、および3の複合スコアの予後判定性能が示されている。

10

【0087】

ほとんどの場合、サイン（個別におよび組み合わせで）の予後判定力がなお観察された。これは、提唱されたサインにより、従来因子を越えた追加的な予後判定がもたらされたことを示している。すなわち、サインは、存在する因子と高度に相関する単なる代理のマーカではない。詳細には、同じ腫瘍病期の患者を、さまざまなリスクにさらに区別することができる。リスクの順序づけが逆転する可能性があるため、これは病期分類システムの単なる精密化ではない。例えば、I期におけるリスクが最も高い患者の群は、実際にはII期患者の生存の平均よりも生存が悪い。

20

【0088】

臨床病理学的因子が存在する種々の状況における分析によっても、これらの因子もサインの適用に組み入れることができることが強調される。例えば、扁平上皮癌について、個々のサインでは実質的なリスク識別が示されなかったが、複合スコアにより、最上位の四分位数が残りの四分位数よりも実質的に悪い転帰を有することが示される。

30

【0089】

図7A～Fには、表1、2、および/または3から遺伝子のサブセットを選択することによって得られる、特許請求されたサインのいくつかの例示的な変形の予後判定性能が示されている。生存に従って患者を区分する能力は、完全な遺伝子のセットを有さないものにはなかった。3種の遺伝子（表1、2および3のそれぞれから1種）で構成される最小のサインはすでにかなり良い性能であった（パネルA）。群間の区分は、遺伝子の数が増加するにつれ改善される（パネルB～D）。任意に選択した15種の遺伝子は性能がよい（パネルEおよびF）。

40

【0090】

個別化療法の意思決定

リスク予測システムでは、本実施例で用いたものと同様の臨床データおよび遺伝子発現データのデータベースを利用して、代替の治療（治療しないことを含む）の下でのリスクの予想を可能にする。このシステムは、AdjuvantOnline（Ravdinら 2001、J. Clin. Oncol. 19:980）と、特許請求された発明のスコアも包含する以外は同様である。

【実施例2】

【0091】

表1、2および/または3に開示されているバイオマーカーの、肺癌の患者への典型的な適用。

【0092】

50

1. 小さく、手術可能な原発腫瘍を伴う肺癌と診断された患者は、病変を除去するために外科手術を受ける。腫瘍組織の一部を標準の病理学的手順、例えば、腫瘍サイズ、腫瘍組織型（例えば、腺癌、扁平上皮癌、または他の種類など）を決定することなどによって検査する。標準のガイドラインを用いて、腫瘍サイズ、リンパ節転移または他の遠位の部位への転移の存在に基づいて腫瘍病期分類を決定する。標準の臨床病理学的測定から得られた情報により、本発明の予後判定的かつ予測的な適用を改変し、増強することができるが、これは必要条件ではなく、不可欠な部分ではない。

【0093】

2. 特許請求された発明のために、腫瘍組織の一部を供給材料として、凍結組織、パラフィン包埋組織または新鮮組織のいずれかとして使用する。組織に対して全トランスクリプトームRNA抽出を実施する。

10

【0094】

3. 特定の遺伝子のセット（本発明において特許請求された）についてRNAの相対的な数量の測定を、以下の手順のいずれかによって実施する：

- ・ qNPA技術またはnanoString技術
- ・ 特定の遺伝子の定量的RT-PCR
- ・ 選択されたプローブまたは全トランスクリプトームのいずれかを含有するマイクロアレイとのハイブリダイゼーション
- ・ RNAのハイスループットな配列決定（RNA-seq）、その後コンピュータによる選択および関連性のある遺伝子の定量化

20

【0095】

4. それぞれについてのRNAの相対的な存在量を、患者全てにわたって一定の発現を有することが予測される対照遺伝子のセットに対するコンピュータによる正規化手順（Popoviciら（2009）Selecting control genes for RT-QPCR using public microarray data. BMC Bioinformatics. 2009年2月2日;10:42）、または、存在する肺腫瘍からの同様の測定値のデータベースに対する正規化（McCallら（2010）Biostatistics. 2010年4月;11(2):242-53. Epub 2010年1月22日）のいずれかによって較正する。

【0096】

5. 相対的な存在量を対数転換し、セット内の多数の遺伝子からの加重平均を計算する。重みは単純に+1または-1（遺伝子発現の変化の転帰に対する効果に応じて正のサインまたは負のサイン）（Sotiriouら（2006）J Natl Cancer Inst. 2006年2月15日;98(4):262-72.）であってよく、特定の測定技法に対して較正した数であってよい。これらの加重平均は、その後のリスク算出において入力として使用する生のリスクスコアとみなされる。各サインモジュールはそれ自体のリスクスコアを有する。

30

【0097】

6. リスクプロファイル計算器により、将来の任意の時点（外科手術の数年後に測定される）について、個々の患者の無病状態、無転移状態または生存のいずれかの確率の予想/予測がもたらされる。予想の信頼度は、参照データベースの分量および品質に左右される時間特異的な信頼区間によって特徴づけられる。短期の予想は、一般には、より多くのデータによって裏付けられており、したがって長期予測と比較してより信頼できる（信頼区間が狭いことによって示される通り）。リスクプロファイル計算器チャートの例が図8Aに示されており、そこでは特定の患者について測定されたリスクスコアが肺癌死亡率に書き換えられている（参照データベースに基づき、最近接カプラン・マイヤー推定値を使用）。

40

【0098】

7. リスク予想は、本発明によってもたらされるリスクスコア以外の情報、例えば、患者の年齢および性別、Karnofsky性能スコア、腫瘍サイズおよびリンパ節の状態などによって調節することができる。これらの因子を全て所与の患者についての特定のリスクプロファイルに組み込みことは、よく確立された生存回帰方法（Therneau TM, Grambsch PM (2000) Modelling survival data: extending the Cox model. Springer, New Yo

50

rk)、例えば、

- ・パラメトリック回帰モデル(例えば指数関数モデルまたはWeibullモデルを使用する)

- ・セミパラメトリックな方法(コックス回帰)

- ・可能性のある因子の組み合わせのそれぞれについての Kaplan-Meier または保険統計的方法などの経験的な生存曲線推定

などを用いて行うことができる。

【0099】

リスク予測を腫瘍の病期によってどのように調節するか例が図8Bに示されている。予測通り、病期2期の患者は病期1期患者よりも5年死亡率が高い。しかし、リスクスコアが高い(標準化されたリスクスコア単位でゼロよりも高い)病期1期患者のサブセットは、病期2期患者の平均の死亡率(破線の曲線)と非常に類似した死亡率を示す。これは、病期1期(現行のガイドラインの下では治療されない)の患者の一部が実際には多くの病期2期患者(現行のガイドラインの下で治療される)と同様のリスクを有するので、病期分類単独によるアジュバント化学療法では不十分な場合があることを示している。

【0100】

リスク予想は、疾患転帰の記録を持つ患者の過去の知見、臨床病理学的変数および特許請求された発明の測定値のデータベースに対して較正することができる。データベースは、新規の患者からの情報を用いて定期的に更新されてもよい。このシステムは、癌患者の生存を種々の臨床病理学的変数の関数として予想するために広く使用されているツールである AdjuvantOnline (Ravdinら(2001) J Clin Oncol. 2001年2月15日;19(4):980-91)と同様である。我々は、このシステムを、ゲノム技術およびトランスクリプトーム技術から得られる多様式スコアを含むように拡張する。

【0101】

8. リスク計算器に入力する調節因子は、一般に使用されるアジュバント療法(例えば、白金ベースの化学療法など)または抗血管新生薬を含んでよい。この応答予測適用の筋書きでは、予想された、代替治療または治療なしの下での転帰の確率に対応する2つ以上のリスクプロファイルが提示される。

【実施例3】

【0102】

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍材料へのサインの適用。

【0103】

組織の調製およびそれぞれのプラットフォームに適した生データの前処理手順の後に、特許請求されたサイン(リスクスコアを導くための遺伝子のセットおよび式)を、Affymetrix、qNPAまたはnanoStringなどの技術プラットフォームからの発現データに直接適用することができる。

【0104】

図9には、M.D. Anderson Cancer Centerから公的に入手可能な、FFPE材料から得られたデータセット(Xieら 2011 Clin Cancer Res 17:5705-14; Gene Expression Omnibus accession GSE29013)における生存能(survival performance)が示されている。ここでは、一般に、FFPEからのAffymetrixデータは質が低い(ノイズレベルが大きい、発現値の呼び出し不在数が多い)にもかかわらず、それでも有意な予後判定力が観察されている。

【0105】

サインリスクスコアにより、FFPEを用いたqNPAデータおよびnanoStringデータにおいて新鮮凍結組織を用いたAffymetrixと同じ予後値を潜在的にもたらすことができるかどうかを評価するために、同じ肺癌患者由来の材料で比較した(未発表のデータ)。図10A~Bには、FF/AffymetrixとFFPE/qNPA、ならびにFF/AffymetrixとFFPE/nanoStringを比較したペアワイズ散布図が示されている。高い相関(それぞれ0.86および0.87)が観察

10

20

30

40

50

され、これは、特許請求されたサインが、技術プラットフォームの選択にも、組織の保存方法にも左右されないことを示している。

【図1】

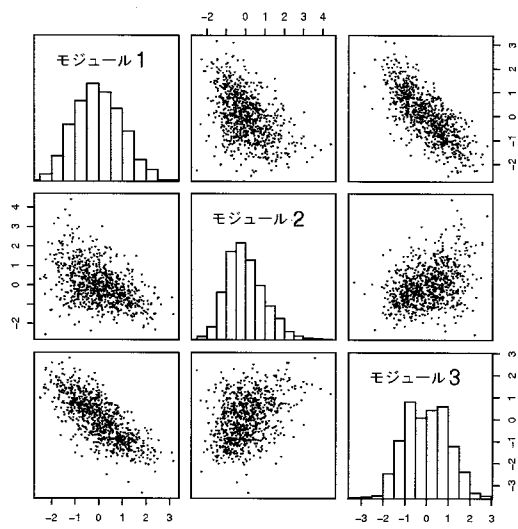
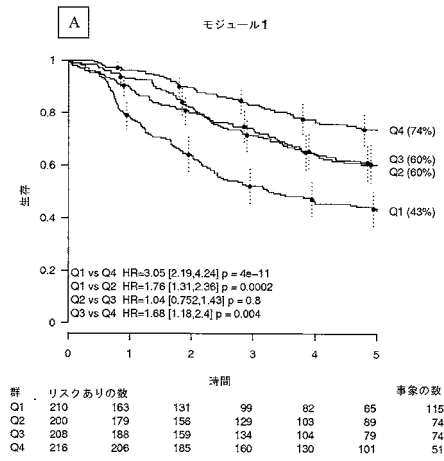


Fig. 1

【図2A】



【図 2 B】

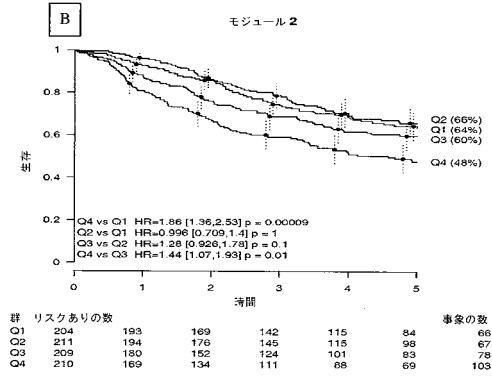
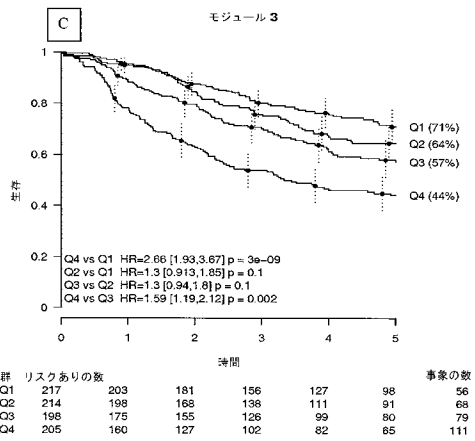


Fig. 2

【図 2 C】



【図 2 D】

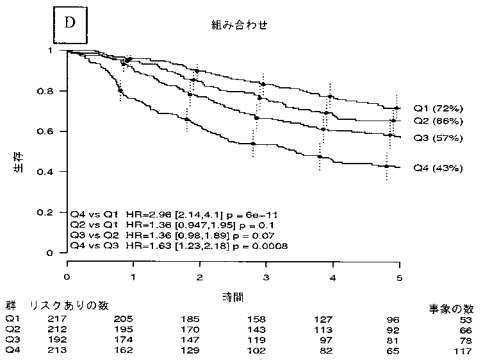


Fig. 2

【図 3 B】

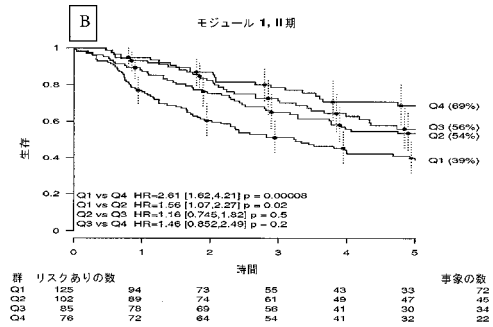
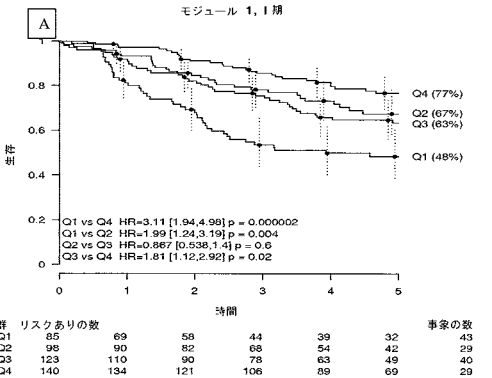
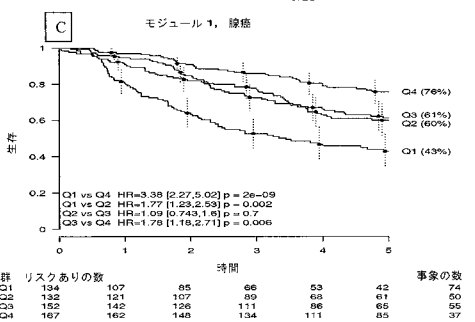


Fig. 3

【図 3 A】



【図 3 C】



【図 3 D】

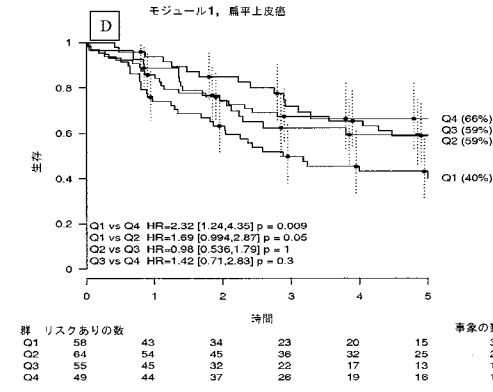


Fig. 3

【図 3 E】

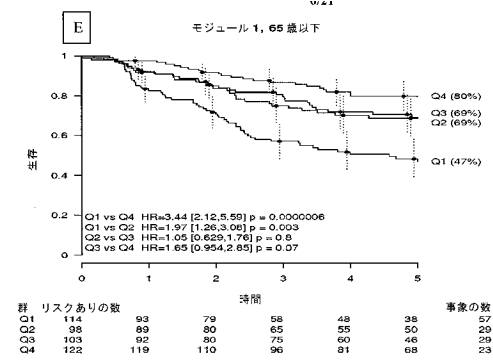
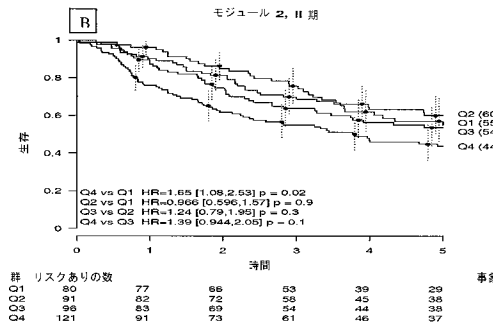


Fig. 4

【図 4 B】



【図 3 F】

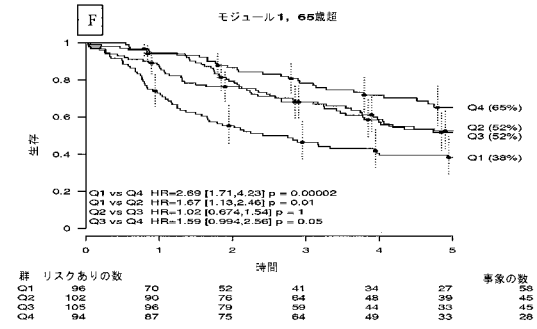


Fig. 3

【図 4 A】

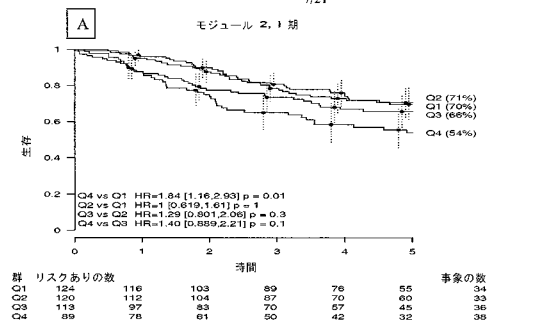
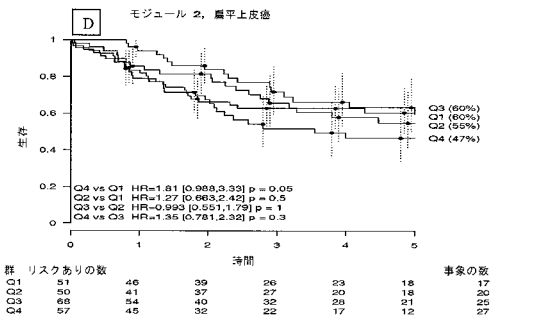
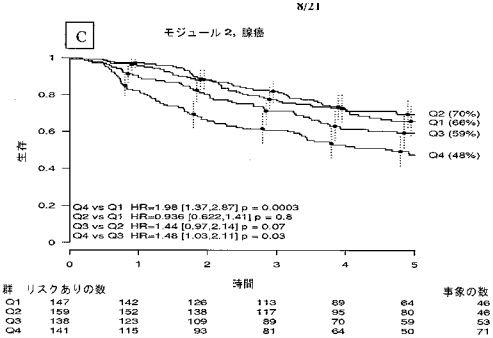


Fig. 4

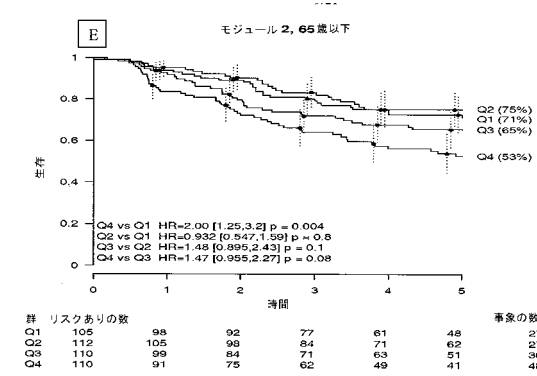
【図 4 D】



【図 4 C】



【図 4 E】



【図 4 F】

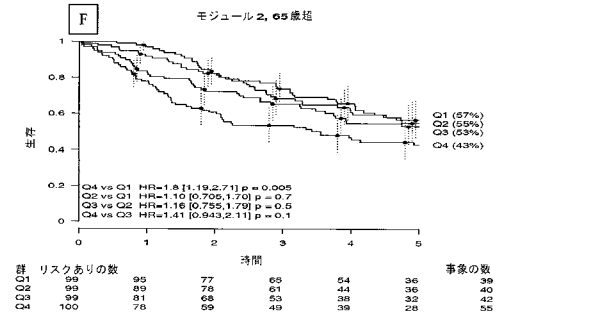


Fig. 4

【図 5 B】

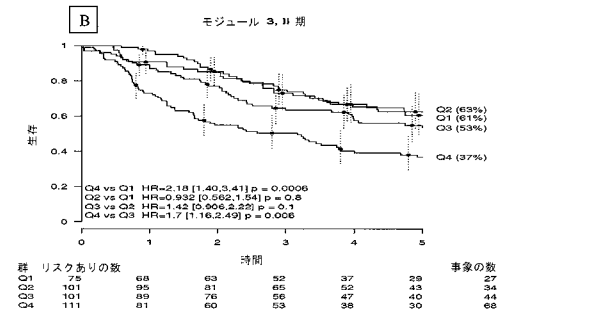
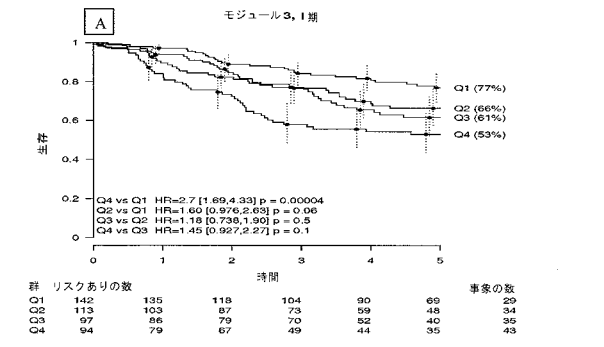
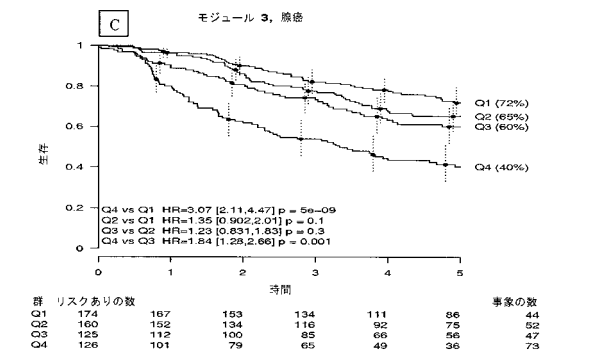


Fig. 5

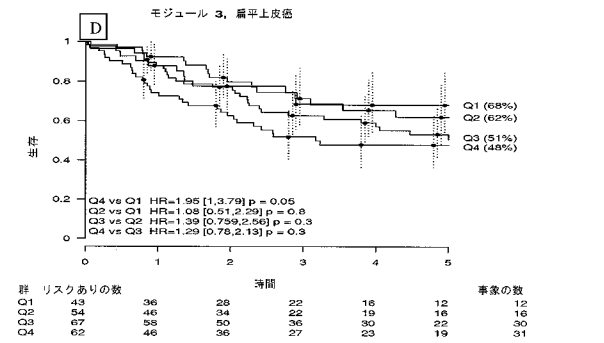
【図 5 A】



【図 5 C】



【図 5 D】



【図 5 F】

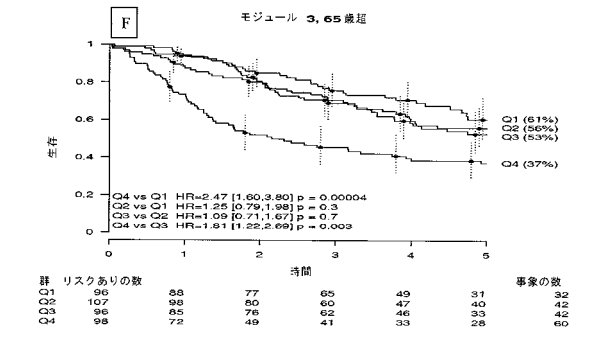
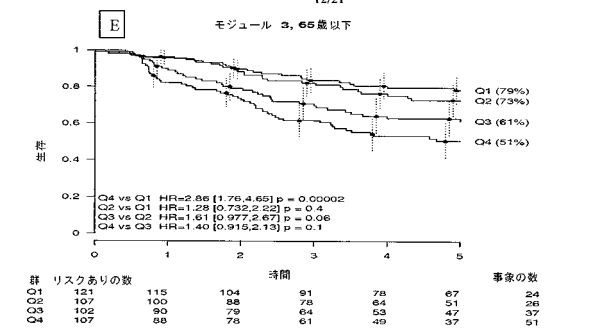


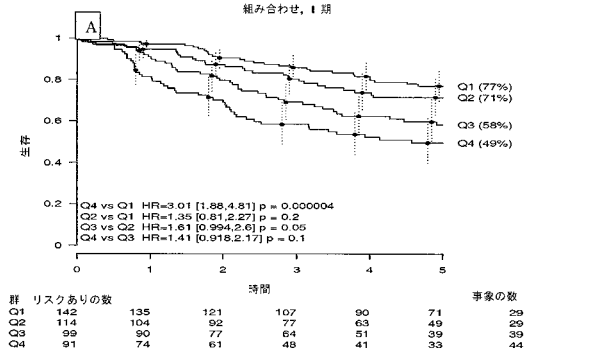
Fig. 5

Fig. 5

【図 5 E】



【図 6 A】



【図 6 B】

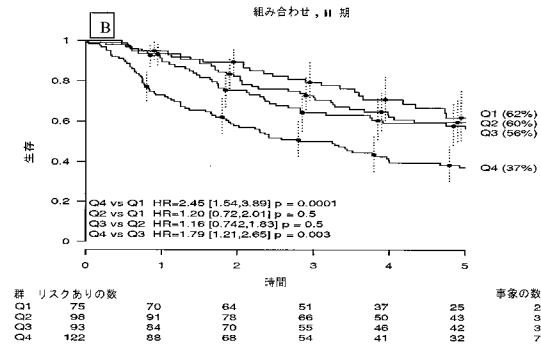
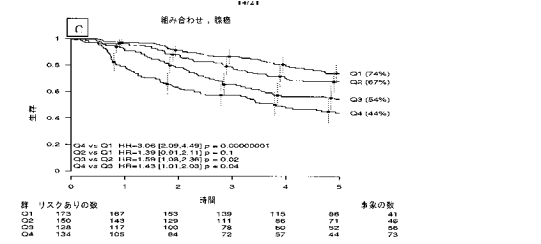
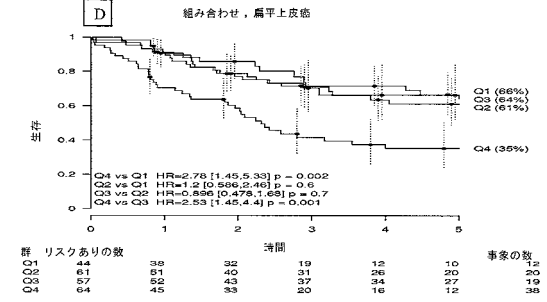


Fig. 6

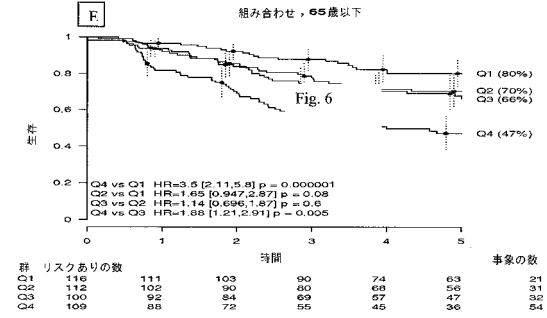
【図 6 C】



【図 6 D】



【図 6 E】



【図 6 F】

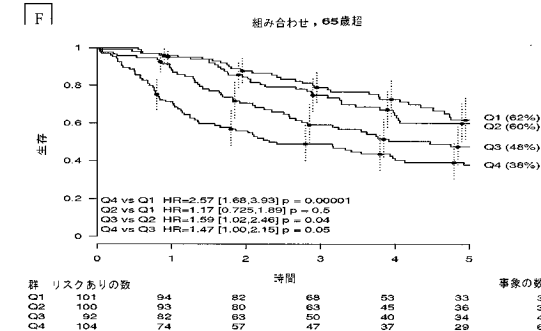


Fig. 6

【図 7 B】

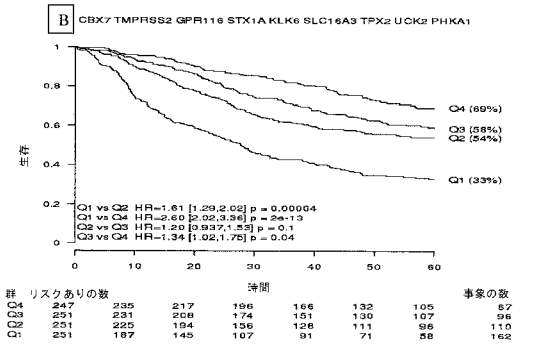
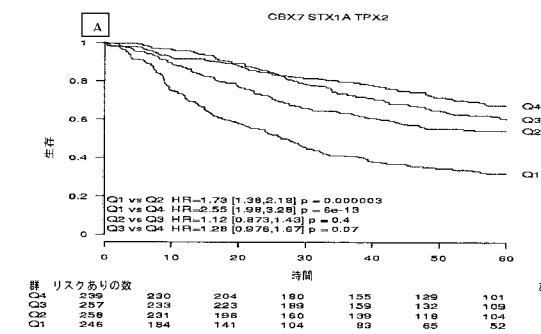
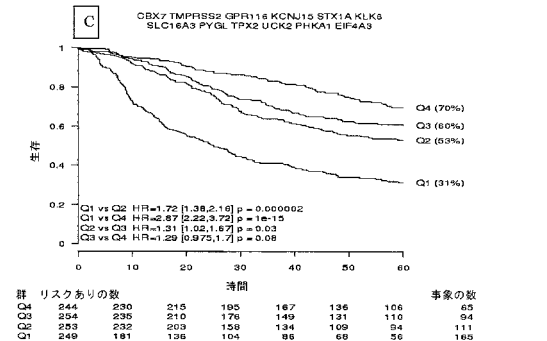


Fig. 7

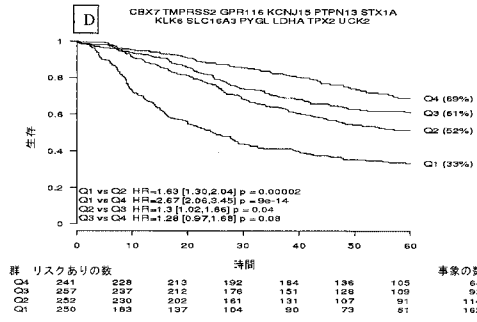
【図 7 A】



【図 7 C】



【図7D】



【図7F】

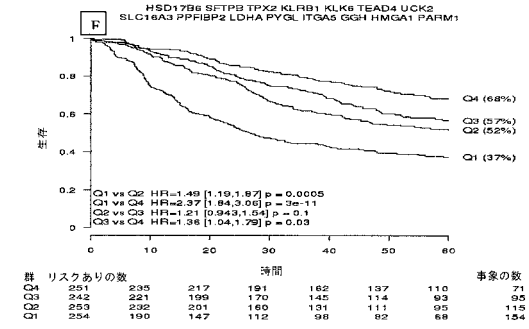
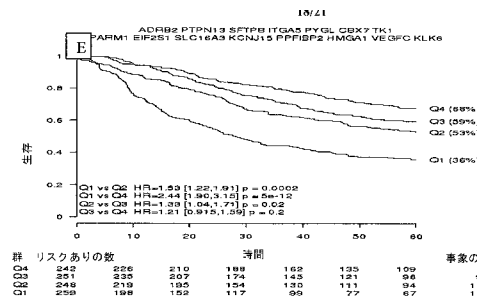


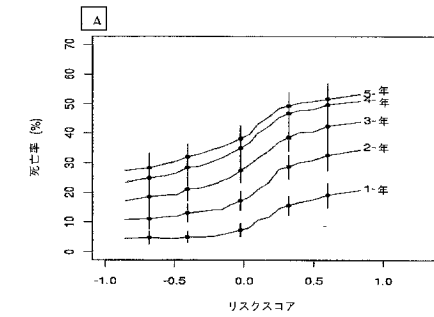
Fig 7

Fig. 7

【図7E】



【図8A】



【図8B】

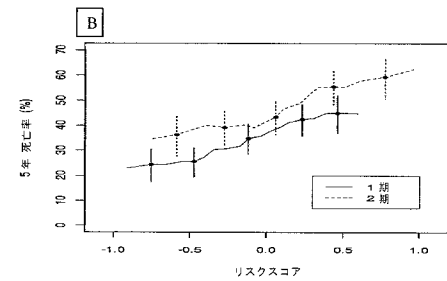
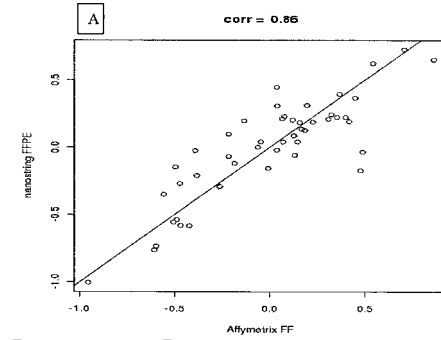


Fig. 8

【図10A】



【図10B】

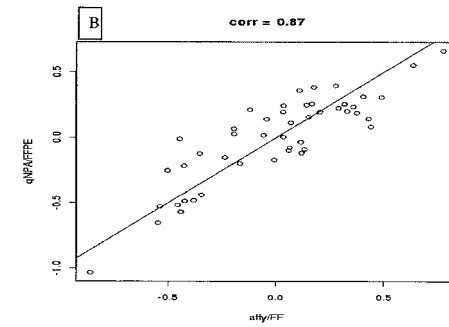


Fig. 10

【図9】

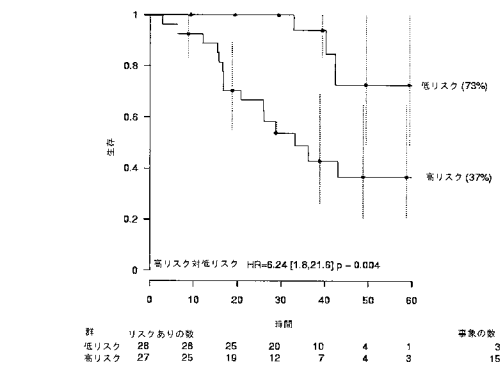


Fig. 9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/059784**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-35(partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/059784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/063121 A1 (UNIV HEALTH NETWORK [CA]; TSAO MING-SOUND [CA]; BOUTROS PAUL C [CA]; L) 10 June 2010 (2010-06-10) the whole document	1-35
A	SUZANNE K LAU ET AL: "Three-gene prognostic classifier for early-stage non-small-cell lung cancer", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 25, no. 35, 10 December 2007 (2007-12-10), pages 5562-5569, XP008145645, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2007.12.0352 figure 1; table 1	1-35
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 July 2012		09/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Botz, Jürgen

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/059784

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOUTROS PAUL C ET AL: "Prognostic gene signatures for non-small-cell lung cancer.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 24 FEB 2009 LNKD- PUBMED:19196983, vol. 106, no. 8, 24 February 2009 (2009-02-24), pages 2824-2828, XP002679415, ISSN: 1091-6490 figures 1,4	1-35
A	----- KADARA HUMAM ET AL: "Identification of Gene Signatures and Molecular Markers for Human Lung Cancer Prognosis using an In vitro Lung Carcinogenesis System", CANCER PREVENTION RESEARCH, vol. 2, no. 8, August 2009 (2009-08), pages 702-711 URL, XP002679416, -----	1-35
X	PALLANTE P ET AL: "The loss of the CBX7 gene expression represents an adverse prognostic marker for survival of colon carcinoma patients", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 46, no. 12, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 2304-2313, XP027189167, ISSN: 0959-8049 [retrieved on 2010-06-09] the whole document -----	32,33
X	KARAMITOPOULOU EVA ET AL: "Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 46, no. 8, May 2010 (2010-05), pages 1438-1444, XP002679417, ISSN: 0959-8049 the whole document -----	32,33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/059784

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010063121 A1	10-06-2010	US 2012004116 A1	05-01-2012
		WO 2010063121 A1	10-06-2010

International Application No. PCT/ EP2012/ 059784

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-35(partially)

INVENTION NUMBER 1:

A method for prognosing a subject with non-small cell lung cancer (NSCLC) comprising: obtaining a test sample from a subject suffering from NSCLC following surgical resection; determining the expression level of at least three or more biomarkers identified in each of TABLE 1, TABLE 2, TABLE 3 and analyzing the expression level to generate a risk score, wherein the risk score can be used to provide a prognosis of the subject, wherein one of the at least three biomarkers comprises the biomarker CBX7 as well as a method for prognosing a subject as detailed in claim 2, identical in wording to claim 1 with the exception that analysis of the expression level of at least one biomarker from TABLE 1, TABLE 2, TABLE 3 takes place and a risk score is generated wherein the risk score can be used to provide a prognosis of the subject and whereby said at least one biomarker again is CBX7, also, a method of predicting prognosis in a subject with non-small cell lung cancer following surgical resection, comprising determining expression of one or more biomarkers listed in TABLES 1, 2, and / or TABLE 3, wherein an increase in expression of one or more biomarkers listed in Table 2 and / or Table 3 and a decrease in expression of one or more of the biomarkers listed in Table 1 compared to a control is used to predict whether the subject is in a high risk group having poor survival or a low risk group having good survival whereby the at least one biomarker again is CBX7, a method of selecting a therapy for a subject with NSCLC as detailed in claim 13, a method of selectively treating a subject having NSCLC cancer as detailed in claim 15 making each time use of the biomarker CBX7, a kit for comprising a plurality of agents for measuring the expression of one or more biomarkers identified in Table 1, Table 2 and / or Table 3 and instructions for use making use of and comprising CBX7, an array comprising one or more polynucleotide probes complementary and hybridizable to an expression product of at least two biomarkers shown in Table 1, 2 and / or Table 3 whereby said one expression product is CBX7, a composition comprising a plurality of isolated nucleic acid sequences wherein each isolated nucleic acid sequence hybridizes to an RNA product of the biomarker CBX7 wherein the composition is used to measure the level of RNA expression and finally a computer product for predicting a prognosis for a subject with NSCLC involving the biomarker CBX7.

2-37. claims: 1-35(partially)

Idem for inventions 2 - 37 with each invention focussing on the individual biomarkers listed starting with TMRSS2,

International Application No. PCT/ EP2012/ 059784

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

listed as second biomarker in Table 1, and ending with the
last biomarker listed in Table 3, the latter being H2AFZ;

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 M

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

(72) 発明者 ミッシアグリア, エドアルド
 スイス国 ツェーハー - 1 0 1 5 ローザンヌ, ユーエヌアイエル, カルチエ ゾルゲ, ビーエー
 ティー . ゲノポーデ, ルーム 2 0 2 9 , エスアイビー - スイス インスティテュート オブ バイ
 オインフォーマティックス

(72) 発明者 ウィラパティ, プラティアクシャ
 スイス国 ツェーハー - 1 0 1 5 ローザンヌ, ユーエヌアイエル, カルチエ ゾルゲ, ビーエー
 ティー . ゲノポーデ, ルーム 2 0 2 1 , エスアイビー - スイス インスティテュート オブ バイ
 オフォーマティックス

(72) 発明者 ロッシ, シモナ
 スイス国 ツェーハー - 1 0 1 5 ローザンヌ, ユーエヌアイエル, カルチエ ゾルゲ, ビーエー
 ティー . ゲノポーデ, ルーム 2 0 2 9 , エスアイビー - スイス インスティテュート オブ バイ
 オインフォーマティックス

(72) 発明者 クロール, ウェルナー
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州、ケンブリッジ, 4 5 シドニー ストリート
 2 1 1 7 イー, ノバルティス ファーマシューティカルズ コーポレーション

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA12 HA14
 4B029 AA08 BB20 CC08 FA12 FA15
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QR32 QR56 QS25 QS34 QX02
 QX07

專利名称(译)	肺癌的生物标志物		
公开(公告)号	JP2014516531A	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2014511892	申请日	2012-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ミッシアグリアエドアルド ウイラパティプラティアクシャ ロッシシモナ クロールウェルナー		
发明人	ミッシアグリア,エドアルド ウイラパティ,プラティアクシャ ロッシ,シモナ クロール,ウェルナー		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 C12N15/09 G01N37/00 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A C12M1/00.A C12N15/00.F G01N37/00.102 G01N33/574.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B029/AA08 4B029/BB20 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	61/490021 2011-05-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明部分地涉及使用一种或多种生物标志物确定个体中早期肺癌的预测的方法。

遺伝子の記号	Entrez ID	説明	変種	記号別名
CBX7	23492	タロモホックスホモログ7	NM_175709.3	
TMPRSS2	7113	豚耳通プロテアーゼ、セリン2	NM_005656.3; NM_001135099.1	FLJ41954; PP9284; PRSS10
GPR116	221395	Gタンパク質-共役受容体116	NM_015234.4; NM_001098518.1	DKFZp564O1923; FLJ90640; KIAA0758; KPG_001
KCNJ15	3772	内面き整流性カリウムチャンネル、サブファミリーJ、メンバー15	NM_170736.1; NM_170737.1; NM_002243.3	IRKK; KIR1.3; KIR4.2; MGC13584
PTPN13	5783	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体13型(APO-1/CD95(Fas)-関連ホスファターゼ)	NM_080684.2; NM_005264.2; NM_080685.2; NM_080683.2	DKFZp686J1497; FAP-1; PNP1; PTP-BAS; PTP-BL; PTP1E; PTP1L; PTPLE
CTSH	1512	カタプシンH	NM_004390.3	ACC-4; ACC-5; CP5B; DKFZp686B24257; MGC1519; mimicham
PPFIBP2	8495	PTPRF相互作用タンパク質、結合タンパク質2(リッリンメンバー2)	NM_003621.2	Ctip1; DKFZp781K06126; MGC42541
CD302	9936	CD302分子	NM_001198763.1; NM_001198764.1; NM_014880.4	BIMLEC; CLEC13A; DCL-1; DCL1; FLJ43091; KIAA0022; Mgc_22361
SFTPB	6439	サーファクタントタンパク質B	NM_198843.2; NM_000542.3	SP-B; SFTB3; SFTP3; SMDP1; SP-B
HSD17B6	8630	水酸化ステロイド(17-β)アセトゲナーゼ6ホモログ(マウス)	NM_003725.2	HSE; RODH; SDR9C6
DLC1	10395	肺癌における欠失1	NM_182643.2; NM_024767.3; NM_006094.4; NM_001164271.1	ARHGAP7; FLJ21120; HP; p122-8b5GAP; STAR12
ADRB2	154	アドレナリン作動性ベータ2-受容体、表面	NM_000024.5	ADRB2R; ADRBR; B2AR; BAR; BETA2AR
PARM1	25849	前立腺アンドロゲン調節性転写因子タンパク質1(prostate androgen-regulated nuclear-like protein 1)	NM_015393.3	Cipar1; DKFZp564O0823; PARM-1; WSC4
KLRB1	3820	キラー細胞タンパク質受容体サブファミリーB、メンバー1	NM_002258.2	CD161; CLEC5B; hNKR-P1A; MGC138614; NKR; NKR-P1; NKR-PLA; NKR-PLA
MS4A1	931	豚耳通4-ドメイン、サブファミリーA、メンバー1	NM_152866.2; NM_021950.3	B1; Bp35; CD20; CVI05; LEU-16; MGC3969; MS4A2; S7

表1