

(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2014-519818

(P2014-519818A)

(43) 公表日 平成26年8月21日(2014.8.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>G O 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/50 P	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁)

(21) 出願番号 特願2014-510406 (P2014-510406)  
 (86) (22) 出願日 平成24年5月8日 (2012.5.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月29日 (2013.11.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/036904  
 (87) 国際公開番号 W02012/154722  
 (87) 国際公開日 平成24年11月15日 (2012.11.15)  
 (31) 優先権主張番号 61/484, 271  
 (32) 優先日 平成23年5月10日 (2011.5.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/551, 500  
 (32) 優先日 平成23年10月26日 (2011.10.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513281666  
 ニュークレア バイオテクノロジーズ インコーポレイテッド  
 NUCLEA BIOTECHNOLOGIES, INC.  
 アメリカ合衆国 01201 マサチューセッツ州 ピッツフィールド エルム ストリート 46  
 (74) 代理人 100105957  
 弁理士 恩田 誠  
 (74) 代理人 100068755  
 弁理士 恩田 博宣  
 (74) 代理人 100142907  
 弁理士 本田 淳

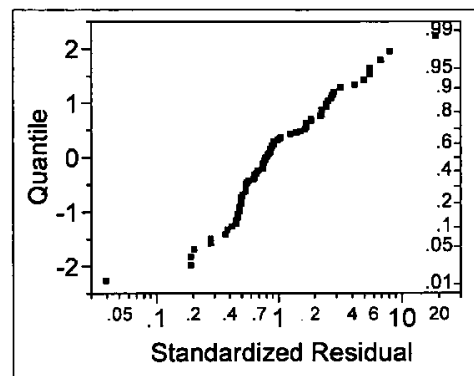
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌用の予測バイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、増殖疾患または病態、特に前立腺癌の進行、退縮および/またはそれからの生存を検出、スクリーニング、診断または決定するための組成物および方法に関する。本発明はまた、前立腺癌患者または前立腺癌を有する疑いのある患者を病期分類または層別化するための新たなアッセイおよびキットを提供する。

FIGURE 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

前立腺癌を有する疑いのある対象を二元層別化する方法であって、

a．前記対象から得られた試料中の F A S、N P Y、U S P 2 a、および A M A C R からなる群から選択される 1 つ以上の予測因子変数のレベルまたはグレードを決定すること；  
ならびに

b．前記 1 つ以上の予測因子変数のレベルまたはグレードに基づき少なくとも 5 年間生存する可能性が高いか否か前記対象を層別化することを含み、前記予測因子変数のグレードは、3 未満である方法。

## 【請求項 2】

前記対象は、前立腺特異的抗原 ( P S A ) の上昇について既にスクリーニングされている、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記予測因子変数は、U S P 2 a である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記予測因子変数は、A M A C R である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記予測因子変数のグレードは、2 未満である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記予測因子変数は、F A S である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記予測因子変数は、N P Y である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

P S A の計測値は、総 P S A である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記対象は、組織生検を受けており、前記生検の評価は、5 ~ 7 の組織グリーソンスコアを明らかにした、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 1 つ以上の予測因子変数のレベルまたはグレードを決定することは、前記 1 つ以上の予測因子変数の R N A レベルまたはタンパク質レベルのいずれかを計測することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

タンパク質レベルを計測する、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

タンパク質レベルを免疫組織化学アッセイにより計測する、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記免疫組織化学アッセイは、1 つ以上の予測因子変数特異的抗体を利用する、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記 1 つ以上の予測因子変数特異的抗体は、検出可能な標識を含有する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

対象における 5 年生存の予測についての免疫組織化学キットまたはアッセイであって、1 つ以上の予測因子変数特異的抗体を含み、それぞれが、検出可能な標識をそれぞれ含むとともに、F A S、N P Y、U S P 2 a、および A M A C R からなる群から選択される免疫組織化学キットまたはアッセイ。

## 【請求項 16】

前立腺特異的抗原 ( P S A ) 遺伝子またはタンパク質を標的化するプローブをさらに含む、請求項 15 に記載の免疫組織化学キットまたはアッセイ。

## 【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

**【技術分野】****【0001】**

本発明は、増殖疾患または病態の進行、退縮および/またはそれからの生存を検出、スクリーニング、診断または決定するための組成物、方法、アッセイおよびキットに関する。

**【背景技術】****【0002】**

アメリカ癌協会によれば、2009年、米国において前立腺癌の190000人を上回る症例が報告され、27000人を上回る関連死が存在した。バイオマーカーとしてのPSA（前立腺特異的抗原）の使用を含む検出の進歩および臨床管理の改善にかかわらず、予測、患者層別化、および治療レジメンの最適化といった領域における臨床ツールが長きにわたり切望されたままである。

**【0003】**

前立腺特異的抗原（PSA）は、前立腺疾患を検出するための生物学的マーカーまたは腫瘍マーカーとして使用されている。PSAは、前立腺の細胞により産生されるタンパク質である。PSA試験は、PSAの血中レベルを計測するが；PSA単独は、前立腺疾患の存在の確実な指標ではない。

**【0004】**

男性が血中で低レベルのPSAを有することが通常である。PSAの参照範囲は、外見上健全な男性のコホートの99%が4ng/mL未満の総PSAレベルを有することを見出した研究に基づき0から4.0ng/mLである。正常の上限値は、4ng/mLよりもかなり低い。PSAのレベルの増加は、前立腺癌の存在を示唆し得；しかしながら、前立腺癌は、PSAレベルの上昇の完全な不存在下でも存在し得、この場合において試験結果は偽陰性である。

**【0005】**

PSAレベルが上昇した男性は、典型的には、前立腺癌の潜在的な存在を評価するために生検を受ける。生検後、前立腺組織の組織病理学的格付けをグリーソンスコア付けにより実施し、それは腫瘍をそれらの最も高頻度の構造に基づき1から5（最大分化から最小分化）に分類し、2つの最も一般的なパターンの合計である組み合わせたスコアを割り当てる。患者は、それらの原発性腫瘍の状態によっても診断され、臓器限局から完全侵襲（T1~4）、リンパ節転移の有無（N0または1）、ならびに遠隔転移の存在および程度（M0および1a~c）である。

**【0006】**

前立腺癌が診断される場合、慣用の治療レジメンは、前立腺の外科的切除および放射線照射法を含む。進行癌の症例において、これらのレジメンは、通常、全身腫瘍組織量および/または循環PSAを低レベルまたは検出不能レベルに最初に低減させるアンドロゲン除去療法に続き、またはその療法により置換されるが、最終的にはほとんどの症例において疾患が再発する。

**【0007】**

前立腺癌において、270kDaの細胞質タンパク質である脂肪酸シターゼ（FAS）が、前立腺上皮内癌（PIN）から始まる大多数の腫瘍の自然史全体にわたり過剰発現される。このタンパク質は、ほとんどの正常なヒト組織中で低レベルから検出不能なレベルで発現される。腫瘍細胞におけるFAS過剰発現についての生化学および代謝基盤は十分理解されていないが、FAS過剰発現は、選択的成長の優位性を腫瘍細胞に付与すると考えられている。高FASレベルを発現する前立腺腫瘍は侵襲性生物学的挙動を示し、過剰発現は、不良予後と関連している。

**【0008】**

男性が加齢するにつれ、良性前立腺病態および前立腺癌の両方がより一般的になり、PSAレベルの増加をもたらす。PSAレベルは、前立腺感染、過敏または良性前立腺過形成（BPH）を含む病態により増加され得る。

10

20

30

40

50

## 【0009】

しかしながら、国立癌研究所 (National Cancer Institute) によれば、PSAレベル単独では、医師に良性前立腺病態と癌とを区別するために十分な情報を与えない。治療は、患者の進行リスクならびに成功の見込みおよび治療のリスクに基づき個別化されることを必要とする。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0010】

【図1】残差 (= 観察値 - 予測値) を示す生存時間方程式の残差五分位数プロットである。

【図2】FAS = 0、グリーンソン = 7、PSA = 13、治療月数 = 3.7、および(再燃の)時間 = 2を有する患者についての分布プロファイルダイアグラムである。

【図3】FAS = 1、グリーンソン = 7、PSA = 13、治療月数 = 3.7、および(再燃の)時間 = 2を有する患者についての分布プロファイルダイアグラムである。

【図4】FAS = 2、グリーンソン = 7、PSA = 13、治療月数 = 3.7、および(再燃の)時間 = 2を有する患者についての分布プロファイルダイアグラムである。

【図5】FAS = 3、グリーンソン = 7、PSA = 13、治療月数 = 3.7、および(再燃の)時間 = 2を有する患者についての分布プロファイルダイアグラムである。

【図6】6つのX変数FAS、グリーンソン、治療前PSA、USP2a、AMACRおよびNPYについてのROC曲線を示す。

【図7】再燃確率(非生存)を示す一連のプロットである。それぞれのプロットは、X軸としての生存時間(0から5)およびY軸上の再燃確率を有する。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0011】

本発明は、前立腺癌患者を層別化する方法であって、患者から得られた試料中のFAS遺伝子の発現のレベルを決定する工程; FAS遺伝子の発現のレベルまたはグレードに基づく患者工程を含む方法を提供する。層別化は、FAS単独または他の遺伝子との組合せに対するものであり得る。一実施形態は、FASおよびUSP2a計測値の組合せを含む。

## 【0012】

本発明の方法は、前記前立腺癌患者からの試料中の前立腺特異的抗原(PSA)のレベルを決定することをさらに含み得る。計測されるPSAは、遊離もしくは総量またはその両方であり得る。本発明によれば、層別化は、患者の年生存、癌の早期再発、癌の遅発再発、疾患関連死、癌退縮度、転移、治療に対する応答性、治療の有効性、および/または前立腺癌への進行の見込みを含み得る1つ以上の臨床管理パラメータに沿うものであり得る。

## 【0013】

本発明の一実施形態において、前立腺癌と診断された患者の臨床転帰を予測する方法であって、FAS遺伝子の発現のレベルを決定することと、1つ以上の臨床管理パラメータをFAS遺伝子の発現のレベルと関連させることを含み、3のFASレベルを負の臨床転帰と関連させる方法が提供される。本方法は、FAS単独または1つ以上の他の遺伝子との組合せにおけるレベルを決定することにより実施することができる。1つ以上の他の遺伝子は、限定されるものではないが、USP2a、NPY、AMACR、およびpAKTを含む。発現レベルの計測値は、前記遺伝子のRNAレベルもしくはタンパク質レベルまたはそれらの組合せのものであり得る。

## 【0014】

本発明は、本発明を実施するための方法、アッセイおよびキットを提供する。これらは、免疫組織化学技術を含み、検出可能な標識により標識されて得る抗体の使用を含み得るアッセイを含む。

## 【0015】

一実施形態において、本発明は、療法的治療の過程を受けたかまたはその最中である患

10

20

30

40

50

者における、腫瘍サイズ、腫瘍グレード、またはアンドロゲン受容体状態とは独立して前立腺癌の早期または遅発再発の見込みを予測する方法であって、前記患者から得られた試料中の組織または血清におけるFAS遺伝子単独または1つ以上のマーカ遺伝子との組合せの発現のレベルを決定することと；前記患者から得られた試料中の組織または血清における決定されたFAS遺伝子の発現のレベルに基づき患者における癌の再発の見込みを予測することを含む方法を提供する。

【0016】

一実施形態において、本発明は、療法的治療の過程を受けたかまたはその最中である患者における腫瘍サイズ、腫瘍グレードまたはアンドロゲン受容体状態とは独立して疾患関連死の見込みを予測する方法であって、前記患者から得られた試料中の組織または血清におけるFAS遺伝子の発現のレベルを決定することと、前記患者から得られた試料中の組織または血清における決定されたFAS遺伝子の発現のレベルに基づき患者における疾患関連死を予測することを含む方法を提供する。

10

【0017】

一実施形態において、前立腺癌を有する疑いのある対象を二元層別化する方法であって、対象からの試料における1つ以上の予測因子変数のレベルまたはグレードを決定することと、次いで前記1つ以上の予測因子変数のレベルまたはグレードに基づき対象を少なくとも5年間生存する可能性が高いと層別化することを含み、予測因子変数のグレードは、3未満である方法が提供される。予測因子変数は、当分野において公知のものおよび本明細書に教示されるもののいずれかから選択することができる。これらは、FAS、NPY、USP2a、およびAMACRからなる群から選択することもできる。対象は、1つ以上の癌マーカ、例えばPSAについて既にスクリーニングされていてよい。対象は、前立腺の1つ以上の生検を既に受けていてもよく、生検は、グリーンソンシステムによる癌病期分類について評価されていてよい。

20

【0018】

特に定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する分野において当業者により一般に理解されるものと同じの意味を有する。本明細書に記載のものと同様または均等な方法および材料を本発明において挙げられた方法の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。

30

【0019】

定義

便宜のため、本明細書、実施例、および付属の特許請求の範囲において用いられるある用語および語句の意味を以下に提供する。定義は、限定を意味するものではなく、本発明のある態様のより明確な理解を提供するために機能する。

【0020】

用語「ゲノム」は、生物の全DNA補足物を含み、例として、核DNA構成成分、染色体DNAまたは染色体外DNA、および細胞質領域（例えば、ミトコンドリアDNA）を含むものとする。

【0021】

用語「遺伝子」は、ポリペプチドまたは前駆体の産生に必要な制御配列および最も多くはコード配列を含む核酸配列を指す。しかしながら、遺伝子は、翻訳されなくてよく、代わりに調節または構造RNA分子をコードする。

40

【0022】

遺伝子は、当分野において公知の任意の源、例として植物、真菌、動物、細菌ゲノムまたはエピソーム、真核、核もしくはプラスミドDNA、cDNA、ウイルスDNA、または化学合成DNAから全体的または部分的に由来し得る。遺伝子は、発現産物の生物学的活性もしくは化学構造、発現速度、または発現制御の様式に影響し得るコードまたは未翻訳領域のいずれかの1つ以上の改変を含有し得る。そのような改変には、限定されるものではないが、1つ以上のヌクレオチドの突然変異、挿入、欠失、および置換が含まれる。

50

遺伝子は、連続コード配列を構成し得、またはそれは適切なスプライスジャンクションにより結合している1つ以上のイントロンを含み得る。

【0023】

用語「遺伝子発現」は、核酸配列が良好な転写およびほとんどの場合において翻訳を受けてタンパク質またはペプチドを産生するプロセスを指す。明確性のため、「遺伝子発現」の計測値が参照される場合、これは、計測値が転写の核酸産物、例えばRNAもしくはmRNAのものまたは翻訳のアミノ酸産物、例えばポリペプチドまたはペプチドのものであり得ることを意味すると理解されるべきである。RNA、mRNA、ポリペプチドおよびペプチドの量またはレベルを計測する方法は、当分野において周知である。

【0024】

用語「遺伝子発現プロファイル」または「GEP」または「遺伝子シグネチャ」は、遺伝子またはその転写産物の存在が、個々に（単一の遺伝子マーカと同様に）もしくはまとめて、またはそのようなものの差次的発現が、ある病態を示す/予測する、特定の細胞または組織タイプにより発現される一群の遺伝子を指す。

【0025】

語句「単一遺伝子マーカ (single-gene marker)」または「単一遺伝子マーカ (single gene marker)」は、遺伝子またはその転写産物の存在が、個々に、そのようなものの差次的発現が、ある病態を示す/予測する、特定の細胞または組織タイプにより発現される単一遺伝子（遺伝子の全てのバリエーションを含む）を指す。

【0026】

本明細書において使用される語句「遺伝子-タンパク質発現プロファイル「GPEP」は、遺伝子およびタンパク質の存在がまとめてまたはそのようなものの差次的発現が、ある病態を示す/予測する、特定の細胞または組織タイプにより発現される一群の遺伝子およびタンパク質を指す。GPEPは、GEPおよびPEPの1つ以上のセットからなる。

【0027】

本明細書において使用される用語「核酸」は、1つ以上のヌクレオチドからなる分子、すなわち、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはその両方を指す。この用語には、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドのモノマーおよびポリマーが含まれ、リボヌクレオチドおよび/またはデオキシリボヌクレオチドは、ポリマーの場合、5'から3'連結を介して一緒に結合している。リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドポリマーは、一本鎖または二本鎖であり得る。しかしながら、連結には、当分野において公知の連結のいずれか、例えば5'から3'連結を含む核酸が含まれ得る。ヌクレオチドは、天然に生じたものであり得、または天然に生じた塩基対と塩基対関係を形成し得る合成により生成されたアナログであり得る。塩基対合関係を形成し得る非天然に生じた塩基の例には、限定されるものではないが、アザおよびデアザピリミジンアナログ、アザおよびデアザプリンアナログ、ならびに他の複素環式塩基アナログが含まれ、ピリミジン環の炭素および窒素原子の1つ以上は、ヘテロ原子、例えば酸素、硫黄、セレン、リンなどにより置換されている。

【0028】

核酸に関する用語「相補的」は、それが核酸に関する場合、ヌクレオチドおよび核酸間のハイブリダイゼーションまたは塩基対合を指し、例えば、二本鎖DNA分子の2つの鎖間などまたはオリゴヌクレオチドプローブと標的との間は相補的である。

【0029】

本明細書において使用される「発現産物」は、生物中の遺伝子が発現される場合に産生される生体分子、例えばタンパク質またはmRNAである。発現産物は、翻訳後修飾を含み得る。遺伝子のポリペプチドは、全長コード配列により、またはコード配列の任意の部分によりコードされ得る。

【0030】

用語「アミノ酸 (amino acid)」および「アミノ酸 (amino acid

10

20

30

40

50

s)」は、全ての天然に生じたL-アルファ-アミノ酸を指す。アミノ酸は、1文字または3文字表記のいずれかにより以下のとおり識別され：アスパラギン酸 (Asp: D)、イソロイシン (Ile: I)、トレオニン (Thr: T)、ロイシン (Leu: L)、セリン (Ser: S)、チロシン (Tyr: Y)、グルタミン酸 (Glu: E)、フェニルアラニン (Phe: F)、プロリン (Pro: P)、ヒスチジン (His: H)、グリシン (Gly: G)、リジン (Lys: K)、アラニン (Ala: A)、アルギニン (Arg: R)、システイン (Cys: C)、トリプトファン (Trp: W)、バリン (Val: V)、グルタミン (Gln: Q)メチオニン (Met: M)、アスパラギン (Asn: N)、ここではアミノ酸が最初に列記され、挿入的に3文字および1文字コードがそれぞれ続く。

10

**【0031】**

用語「アミノ酸配列バリエーション」は、天然配列と比較してアミノ酸配列に一部の差異を有する分子を指す。アミノ酸配列バリエーションは、アミノ酸配列内のある位置において置換、欠失、および/または挿入を保有し得る。通常、バリエーションは、天然配列と少なくとも約70%の同一性を保有し、好ましくは、それらは天然配列と少なくとも約80%、より好ましくは、少なくとも約90%相同である。

**【0032】**

「同一性」は、それがアミノ酸配列に適用される場合、配列をアラインし、最大同一性パーセントを達成すべく必要に応じてギャップを導入した後における、第2の配列のアミノ酸配列中の残基と同一である候補アミノ酸配列中の残基の割合と定義される。アラインメントのための方法およびコンピュータプログラムは、当分野において周知である。同一性は、同一性パーセントの計算に依存するが、計算において導入されるギャップおよびペナルティに起因して値が異なり得ることが理解される。

20

**【0033】**

「ホモログ」は、それがアミノ酸配列に適用される場合、第2の種の第2の配列と実質的な同一性を有する他の種の対応する配列を意味する。

「アナログ」は、親の(元の)ポリペプチドの特性を依然として維持する1つ以上のアミノ酸変化、例えばアミノ酸残基の置換、付加または欠失により異なるポリペプチドバリエーションを含むことを意味する。

**【0034】**

用語「誘導体」は、用語「バリエーション」と同義に使用され、参照分子または出発分子に対して任意の手法で改変または変化された分子を指す。

本発明は、アミノ酸ベース、例としてバリエーションおよび誘導体である数タイプの組成物、例えば抗体を企図する。これらには、置換、挿入、欠失ならびに共有結合バリエーションおよび誘導体が含まれる。したがって、本発明の範囲内には、置換、挿入および/または付加、欠失ならびに共有結合修飾を含有するポリペプチドベースの分子が含まれる。例えば、配列タグまたはアミノ酸、例えば1つ以上のリジンを本発明のポリペプチド配列(例えば、N末端またはC末端において)に付加することができる。配列タグは、ポリペプチド精製または局在化に使用することができる。リジンは、溶解度を増加させるためまたはビオチン化を可能とするために使用することができる。あるいは、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシおよびアミノ末端領域に局在するアミノ酸残基を場合により欠失させ、トランケート配列を提供することができる。あるアミノ酸(例えば、C末端またはN末端残基)を、配列の使用に応じて選択的に欠失させることができる。配列の使用は、例えば、可溶性であるかまたは固体担体に連結しているより大きい配列の一部としての配列の発現としての配列の使用である。

30

40

**【0035】**

「置換バリエーション」は、タンパク質を指す場合、天然または出発配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その場所に同一位置において異なるアミノ酸が挿入されたものである。置換は、分子中の1つのみのアミノ酸が置換された単一置換であり得、またはそれらは2つ以上のアミノ酸が同一分子中で置換された多置換であり得る。

50

## 【0036】

本明細書において使用される用語「保存アミノ酸置換」は、配列中に通常存在するアミノ酸の、サイズ、電荷、または極性が類似する異なるアミノ酸による置換を指す。保存置換の例には、非極性（疎水性）残基、例えばイソロイシン、バリンおよびロイシンを別の非極性残基に代えて置換することが含まれる。同様に、保存置換の例には、ある極性（親水性）残基を別のものに代えて置換すること、例えばアルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、およびグリシンとセリンとの間の置換が含まれる。さらに、塩基性残基、例えばリジン、アルギニンまたはヒスチジンを別のものに代えて置換すること、またはある酸性残基、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸を別の酸性残基に代えて置換することは、保存置換の追加の例である。非保存置換の例には、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンを極性（親水性）残基、例えばシステイン、グルタミン、グルタミン酸もしくはリジンに代えて置換することおよび/または極性残基を非極性残基に代えて置換することが含まれる。

10

## 【0037】

「挿入バリエーション」は、タンパク質を指す場合、1つ以上のアミノ酸が天然または出発配列中の特定の位置におけるアミノ酸に直接隣接して挿入されたものである。アミノ酸に「直接隣接」は、アミノ酸のアルファ - カルボキシまたはアルファ - アミノ官能基のいずれかに連結していることを意味する。

## 【0038】

「欠失バリエーション」は、タンパク質を指す場合、天然または出発アミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失バリエーションは、分子の特定の領域中の1つ以上のアミノ酸が欠失している。

20

## 【0039】

「共有結合バリエーション」は、タンパク質を指す場合、有機タンパク質性または非タンパク質性誘導体化剤による天然または出発タンパク質の修飾、および翻訳後修飾を含む。共有結合修飾は、慣習的には、タンパク質の標的化されたアミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることにより、または選択された組換え宿主細胞中で機能する翻訳後修飾の機序を生かすことにより導入される。得られた共有結合誘導体は、生物学的活性に重要な残基の同定に指向されるプログラムにおいて、免疫アッセイに、または組換え糖タンパク質の免疫アフィニティ精製の抗タンパク質抗体の調製に有用である。そのような修飾は当分野における通常の技能の範囲内であり、過度の実験なしで実施される。

30

## 【0040】

ある翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミンおよびアスパラギン残基は、対応するグルタミンおよびアスパルチル残基に翻訳後に脱アミド化されることが多い。あるいは、これらの残基は、軽度に酸性の条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本発明により使用されるタンパク質中に存在し得る。

## 【0041】

他の翻訳後修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニルヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のアルファ - アミノ基のメチル化が含まれる（T. E. Креighton (T. E. Creighton) タンパク質：構造および分子特性 (Proteins: Structure and Molecular Properties)、W. H. フリーマン & Co. (W. H. Freeman & Co.)、サンフランシスコ、p. 79 ~ 86 (1983年))。

40

## 【0042】

共有結合誘導体には、特に、本発明のタンパク質が非タンパク質性ポリマーに共有結合している融合分子が含まれる。非タンパク質ポリマーは、通常、親水性合成ポリマー、すなわち、他に天然には見出されないポリマーである。しかしながら、天然に存在し、組換えまたはインビトロ法により生成されるポリマーは、天然から単離されたポリマーと同様

50

に有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドン、本発明の範囲内に属する。ポリビニルアルキレンエーテル、そのようなポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールが特に有用である。タンパク質は、種々の非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンに、米国特許第4,640,835号明細書；米国特許第4,496,689号明細書；米国特許第4,301,144号明細書；米国特許第4,670,417号明細書；米国特許第4,791,192号明細書または米国特許第4,179,337号明細書に記載の様式で連結してよい。

#### 【0043】

「特徴部」は、タンパク質を指す場合、分子の独特なアミノ酸配列ベース構成成分と定義される。本発明のタンパク質の特徴部には、表面発現、局所立体構造形状、フォールド、ループ、ハーフループ、ドメイン、ハーフドメイン、部位、末端またはそれらの任意の組合せが含まれる。

10

#### 【0044】

本明細書において使用される用語「表面発現」は、タンパク質を指す場合、最外表面上に出現するタンパク質のポリペプチドベース構成成分を指す。

本明細書において使用される用語「局所立体構造形状」は、タンパク質を指す場合、タンパク質の限定的空間内に局在するタンパク質のポリペプチドベース構造発現を意味する。

#### 【0045】

本明細書において使用される用語「フォールド」は、タンパク質を指す場合、エネルギー最小化時にアミノ酸配列の得られた立体構造を意味する。フォールドは、フォールディングプロセスの2次または3次レベルにおいて生じ得る。2次レベルフォールドの例には、ベータシートおよびアルファヘリックスが含まれる。3次フォールドの例には、エネルギー力の凝集または分離に起因して形成されるドメインおよび領域が含まれる。このように形成される領域には、疎水性および親水性ポケットなどが含まれる。

20

#### 【0046】

本明細書において使用される用語「ターン」は、それがタンパク質立体構造に関する場合、ペプチドまたはポリペプチドの骨格の方向を変え、1、2、3つ以上のアミノ酸残基を含み得る屈曲部を意味する。

30

#### 【0047】

本明細書において使用される用語「ループ」は、タンパク質を指す場合、ペプチドまたはポリペプチドの骨格の方向を反転させ、4つ以上のアミノ酸残基を含むペプチドまたはポリペプチドの構造特徴を指す。オリバラ (Oliva et al.) は、少なくとも5つのクラスのタンパク質ループを同定した (ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J. Mol Biol) 第266巻 (4) : p. 814 ~ 830 ; 1997年)。

#### 【0048】

本明細書において使用される用語「ハーフループ」は、タンパク質を指す場合、それが由来するループのアミノ酸残基の少なくとも半数を有すると同定されたループの部分を指す。ループは、同数のアミノ酸残基を常に含有しなくてよいことが理解される。したがって、ループが奇数のアミノ酸を含有し、または含むと同定される場合、奇数ループのハーフループは、ループの整数部分または次の整数部分 (ループのアミノ酸数 / 2 + / - 0.5 アミノ酸) を含む。例えば、7アミノ酸ループと同定されたループは、3アミノ酸または4アミノ酸のハーフループを生成し得る ( $7 / 2 = 3.5 + / - 0.5$  は、3または4である)。

40

#### 【0049】

本明細書において使用される用語「ドメイン」は、タンパク質を指す場合、1つ以上の同定可能な構造または機能特徴または特性 (例えば、タンパク質 - タンパク質相互作用のための部位として機能する結合能) を有するポリペプチドのモチーフを指す。

#### 【0050】

50

本明細書において使用される用語「ハーフドメイン」は、タンパク質を指す場合、それが由来するドメインのアミノ酸残基の少なくとも半数を有すると同定されたドメインの部分を意味する。ドメインは同数のアミノ酸残基を常に含有しなくてよいことが理解される。したがって、ドメインが奇数のアミノ酸を含有し、または同定される場合、奇数ドメインのハーフドメインは、ドメインの整数部分または次の整数部分（ドメインのアミノ酸数 / 2 + / - 0.5 アミノ酸）を含む。例えば、7アミノ酸ドメインと同定されたドメインは、3アミノ酸または4アミノ酸のハーフドメインを生成し得る（ $7 / 2 = 3.5 + / - 0.5$  は、3または4である）。サブドメインはドメインまたはハーフドメイン内に同定することができ、これらのサブドメインは、それが由来したドメインまたはハーフドメインにおいて同定された構造または機能特性の全て未満を保有することも理解される。本明細書のドメインタイプのいずれかを含むアミノ酸は、ポリペプチドの骨格に沿って連続である必要はない（すなわち、非隣接アミノ酸は、構造的にフォールドしてドメイン、ハーフドメインまたはサブドメインを生成し得る）ことも理解される。

10

**【0051】**

本明細書において使用される用語「部位」は、タンパク質を指す場合、それがアミノ酸ベースの実施形態に関する場合、「アミノ酸残基」および「アミノ酸側鎖」と同義に使用される。部位は、本発明のポリペプチドベース分子内で修飾、操作、変化、誘導体化または変動され得るペプチドまたはポリペプチド内の位置を表す。

**【0052】**

本明細書において使用される用語「1つまたは複数の末端」は、タンパク質を指す場合、ペプチドまたはポリペプチドの先端を指す。そのような先端は、ペプチドまたはポリペプチドの最初または最終の部位のみに限定されるものではなく、追加のアミノ酸を末端領域中に含み得る。本発明のポリペプチドベース分子は、N末端（遊離アミノ基（NH<sub>2</sub>）を有するアミノ酸を末端とする）およびC末端（遊離カルボキシル基（COOH）を有するアミノ酸を末端とする）を有することを特徴とし得る。本発明のタンパク質は、一部の例において、ジスルフィド結合により、または非共有結合により結び付けられた複数のポリペプチド鎖から構成される（マルチマー、オリゴマー）。こうしたタイプのタンパク質は、複数のN末端およびC末端を有する。あるいは、場合により、ポリペプチドの末端は、それらが非ポリペプチドベースの部分（例えば有機コンジュゲート）で始まるかまたは終わるように、修飾されてもよい。

20

30

**【0053】**

特徴部のいずれかが本発明の分子の構成成分であると同定または定義されると、これらの特徴部のいくつかの操作および/または改変のいずれかを、移動、交換、反転、欠失、ランダム化または重複により実施することができる。さらに、特徴部の操作は、本発明の分子への改変と同一の結果をもたらすことが理解される。例えば、ドメインの欠失を含む操作は、全長未満の分子をコードさせるための核酸の改変とまさに同様に分子の長さの変化をもたらす。

**【0054】**

修飾および操作は、当分野において公知の方法、例えば部位特異的突然変異誘発により達成することができる。次いで、得られた修飾分子を、インビトロまたはインビボアッセイ、例えば本明細書に記載のものまたは当分野において公知の任意の他の好適なスクリーニングアッセイを使用して活性について試験することができる。

40

**【0055】**

「タンパク質」は、ペプチド結合により繋ぎ合わされたアミノ酸残基のポリマーを意味する。本明細書において使用されるこの用語は、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを指す。しかしながら、典型的には、タンパク質は、少なくとも50アミノ酸長である。一部の場合、コードされるタンパク質は、約50アミノ酸よりも短い。この場合、ポリペプチドはペプチドと称される。タンパク質が短ペプチドである場合、それは少なくとも約10アミノ酸残基長である。タンパク質は、天然に生じたもの、組換えのもの、もしくは合成のもの、またはそれらの任意の組合せであり

50

得る。タンパク質は、天然に生じたタンパク質またはペプチドの断片も含み得る。タンパク質は、単一分子であり得、または多分子複合体であり得る。タンパク質という用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に生じたアミノ酸の人工化学アナログであるアミノ酸ポリマーに適用することもできる。

【0056】

用語「タンパク質発現」は、検出可能なレベルのアミノ酸配列またはタンパク質が発現されるように核酸配列が翻訳を受けるプロセスを指す。

用語「タンパク質発現プロファイル」または「PEP」または「タンパク質発現シグネチャ」は、タンパク質の存在が個々に（単一タンパク質マーカと同様に）もしくはまとめて、またはそのようなタンパク質の差次的発現が、ある病態を示す/予測する、特定の細胞または組織タイプ（例えば、神経細胞、冠動脈内皮、または疾患組織）により発現される一群のタンパク質を指す。

【0057】

語句「単一タンパク質マーカ (single-protein marker)」または「単一タンパク質マーカ (single protein marker)」は、タンパク質または前記タンパク質をコードする遺伝子の翻訳産物の存在が、個々に、そのようなものの差次的発現が、ある病態を示す/予測する、特定の細胞または組織タイプにより発現される単一タンパク質（タンパク質の全てのバリエーションを含む）を指す。

【0058】

本明細書において使用される「タンパク質の断片」は、別のタンパク質の部分であるタンパク質を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離された全長タンパク質を消化することにより得られたポリペプチドを含み得る。一実施形態において、タンパク質断片は、少なくとも約6つのアミノ酸を含む。別の実施形態において、断片は、少なくとも約10個のアミノ酸を含む。さらに別の実施形態において、タンパク質断片は、少なくとも約16個のアミノ酸を含む。

【0059】

用語「アレイ」および「マイクロアレイ」は、通常、行および列における物体の任意のタイプの規則的配置を指す。アレイが遺伝子および/またはタンパク質発現の試験に関する場合、アレイは、対象の標的を捕捉またはそれに結合させるために使用される表面に固定されたプローブ（オリゴヌクレオチドまたはタンパク質ベースであることが多い）または捕捉剤の配置を指す。対象の標的は、遺伝子、遺伝子発現の産物などであり得る。アレイ上に提示されるプローブ（核酸またはタンパク質）のタイプは、アレイの使用目的に依存する（例えば、ヒト遺伝子またはタンパク質の発現をモニタリングするため）。所与のアレイ上のオリゴヌクレオチドまたはタンパク質捕捉剤は、全て、同一のタイプ、カテゴリー、または群の遺伝子もしくはタンパク質に属する。遺伝子またはタンパク質は、それらが一部の共有特徴、例えば起源の種（例えば、ヒト、マウス、ラット）；疾患状態（例えば、癌）；構造または機能（例えば、タンパク質キナーゼ、腫瘍抑制因子）；または同一の生物学的プロセス（例えば、アポトーシス、シグナル伝達、細胞周期調節、増殖、分化）を共有する場合、同一タイプのものとみなすことができる。例えば、あるアレイタイプは、アレイオリゴヌクレオチドまたはタンパク質捕捉剤のそれぞれが、癌に関連する遺伝子またはタンパク質に対応する「癌アレイ」であり得る。「上皮アレイ」は、特有の上皮遺伝子またはタンパク質に対応するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質捕捉剤のアレイであり得る。同様に、「細胞周期アレイ」は、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質捕捉剤が細胞周期に関連する特有の遺伝子またはタンパク質に対応するアレイタイプであり得る。

【0060】

本発明において使用される用語「免疫組織化学」またはその略称「IHC」は、生物試料中の抗原（例えば、タンパク質）を、前記生物試料中の抗原に対する抗体の結合特性を利用することにより検出するプロセスを指す。

【0061】

10

20

30

40

50

用語「免疫アッセイ」は、抗原への抗体の結合を使用してある物質を同定および計測する試験を指す。免疫アッセイは、疾患を診断するために使用されることが多く、試験結果は、治療（例えば、エストロゲン受容体が前立腺癌において計測される場合）の計画に役立ち得る疾患についての情報を提供し得る。免疫アッセイは、抗体のその抗原への特異的結合を利用する。モノクローナル抗体は、それらが通常、特定の分子の1つの部位にのみ結合するために使用されることが多く、したがってより特異的で正確な試験を提供し、それは他の分子の存在により混同されにくい。使用される抗体は、極めて高い比率の抗原が抗体に結合してアッセイが適切な感度を有することを確保しなければならないため、対象の抗原についての高い親和性を有さなければならない。

【0062】

本明細書において使用される用語「PCR」または「RT-PCR」は、ポリメラーゼ連鎖反応技術の略称であり、合成か発現かにかかわらず核酸レベルの検出または決定のための技術を指す。

【0063】

用語「細胞タイプ」は、所与の源（例えば、組織、器官）からの細胞または所与分化の状態の細胞、または所与の病理もしくは遺伝子構造を伴う細胞を指す。

本明細書において使用される用語「活性化」は、シグナリング経路または生物学的応答の任意の変化、例として、例えば、基底レベルを上回る増加、阻害状態からの基底レベルへの回復、および基底レベルを上回る経路の刺激を指す。

【0064】

用語「差次的発現」は、正常隣接組織に対する疾患組織または細胞における遺伝子またはタンパク質の時間的および組織発現パターンの定量的および定性的差異の両方を指す。例えば、差次的発現される遺伝子は、疾患状態に対して正常状態で活性化または完全に不活性化されたその発現を有し得、または正常状態に対して疾患状態において上方調節（過剰発現）もしくは下方調節（過小発現）され得る。そのような定性的に調節される遺伝子は、対照または疾患状態のいずれかにおいて検出可能であるが、その両方で検出可能でない、所与の組織または細胞タイプ内の発現パターンを示し得る。換言すると、遺伝子またはタンパク質は、遺伝子またはタンパク質の発現が患者の疾患組織または細胞において正常な患者の（無病）組織または細胞および/または対照組織もしくは細胞におけるその発現のレベルよりも高いまたは低いレベルにおいて生じる場合、差次的に発現される。

【0065】

用語「検出可能」は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素（RT）PCR、ディファレンシャルディスプレイ、およびノザン分析の標準的な技術、または当業者に周知の任意の方法を介して検出可能なRNA発現パターンを指す。同様に、タンパク質発現パターンは、標準的な技術、例えばウエスタンブロットを介して「検出」することができる。

【0066】

用語「相補的」は、それがアレイに関する場合、プローブ分子およびその標的の相互作用表面のトポロジー適合性または一致を指す。標的およびそのプローブは相補的と記載することができ、さらに接触表面特徴は互いに相補的である。

【0067】

用語「抗体」は、天然か部分的または全体的に合成により産生されたかにかかわらず免疫グロブリンを意味する。特異的結合能を維持するその全ての誘導体も、この用語に含まれる。この用語は、免疫グロブリン結合ドメインに相同であり、または概ね相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質も包含する。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体は、任意の免疫グロブリンクラスのメンバー、例として、ヒトクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEなどのいずれかであり得る。

【0068】

用語「抗体断片」は、全長未満の抗体の任意の誘導体または部分を指す。一態様において、抗体断片は、全長抗体の特異的結合能の少なくとも実質的な部分を特に結合パートナ

10

20

30

40

50

として保持する。抗体断片の例には、限定されるものではないが、Fab、Fab'、Fab'(ab')<sub>2</sub>、scFv、Fv、dsFv、ダイアボディ、およびFd断片が含まれる。抗体断片は、任意の手段により産生させることができる。例えば、抗体断片は、インタクト抗体の断片化により酵素的または化学的に産生させることができ、またはそれは部分抗体配列をコードする遺伝子から組換えにより産生させることができる。あるいは、抗体断片は、全体的または部分的に合成により産生させることができる。抗体断片は、単鎖抗体断片を含み得る。別の実施形態において、断片は、例えばジスルフィド連結により繋ぎ合わされた複数鎖を含み得る。断片は、多分子複合体も含み得る。機能抗体断片は、典型的には、少なくとも約50個のアミノ酸を含み得、より典型的には、少なくとも約200個のアミノ酸を含む。

10

#### 【0069】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に相同性の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、この集団を含む個々の抗体は、同一であり、および/または同一のエピトープを結合させ、但し、モノクローナル抗体の産生の際に生じ得る考えられるバリエーションは除く。そのようなバリエーションは一般に少量で存在する。典型的には異なる抗原決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基に対して指向される。このタイプの抗体は、単一抗体産生ハイブリドーマの娘細胞により産生される。モノクローナル抗体は、典型的には、それが免疫反応する任意のエピトープについての単一の結合親和性を示す。

20

#### 【0070】

修飾語「モノクローナル」は、実質的に相同性の抗体の集団から得られるという抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を要求するものと解釈されるべきではない。モノクローナル抗体は、1つのタイプの抗原のみを認識する。本明細書のモノクローナル抗体には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である一方、鎖の残部が、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、ならびにそのような抗体の断片が含まれる。抗体の調製は、モノクローナルかポリクローナルにかかわらず当分野において公知である。抗体の産生の技術は当分野において周知であり、例えば、ハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)「抗体、実験室マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1998年、およびハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)「抗体の使用：実験室マニュアル(Using Antibodies: A Laboratory Manual)」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1999年に記載されている。

30

#### 【0071】

モノクローナル抗体は、それぞれが異なるエピトープに免疫特異的である複数の抗体結合部位を有する抗体分子を含有し得る、例えば二重特異的モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法により得ることができる。コーラ(Kohler)およびミルシュタイン(Milstein)(1975年)、ネイチャー(Nature)、第256巻：p.495~497；米国特許第4,376,110号明細書；アウスベルら(Ausubel et al.)(1987年、1992年)、編、分子生物学における現代のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アソシエーション・アンド・ウイリー・インターサイエンス(Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience)、ニューヨーク；ハーロウ(Harlow)およびレーン(Lane)(1988年)、抗体：実験室マニュアル(Antibo

40

50

dies: A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory); コリガンら(Colligan et al.)(1992年、1993年)、編、免疫学における現代のプロトコル(Current Protocols in Immunology)、グリーン・パブリッシング・アソシエーション・アンド・ウイリー・インターサイエンス(Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience)、ニューヨーク; アイヤーら(Iyer et al. )、インディアン・ジャーナル・オブ・メディカル・リサーチ(Ind. J. Med Res. )、(2000年)、第123巻: p. 561~564。

【0072】

「抗体調製物」は、抗体が存在し得る任意の組成物、例えば、血清(抗血清)を包含することを意味する。

抗体は、当業者により検出可能な標識により標識することができる。標識は、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、もしくは酵素補因子、または当分野において公知の任意の他の標識であり得る。一部の態様において、計測が望まれる実体に結合する抗体(一次抗体)は標識されないが、一次抗体に特異的に結合する標識二次抗体の結合により代わりに検出される。

【0073】

本発明の抗体には、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、Fab'断片、Fab発現ライブラリーにより産生された断片、抗イデオタイプ(抗Id)抗体(例として、例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体)、細胞内で作製された抗体(すなわち、イントラボディ)、および上記のいずれかのエピトープ結合断片が含まれる。本発明の抗体は、任意の動物起源、例として、鳥類および哺乳動物からのものであり得る。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリ起源のものである。

【0074】

多重特異的抗体は、本発明のペプチドの複数の異なるエピトープに特異的であり得、または、本発明のペプチド、および異種エピトープ(例えば異種ペプチドまたは固体担体材料)の両方に特異的であり得る。例えば、国際公開第93/17715号; 国際公開第92/08802号; 国際公開第91/00360号; 国際公開第92/05793号; タットら(Tutt et al. )、1991年、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol. )、第147巻: p. 60~69; 米国特許第4,474,893号明細書; 米国特許第4,714,681号明細書; 米国特許第4,925,648号明細書; 米国特許第5,573,920号明細書; 米国特許第5,601,819号明細書; およびコステルニャら(Kostelny et al. )、1992年、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol. )、第148巻: p. 1547~1553参照。例えば、本発明のFASペプチド配列の反復単位を含有するペプチドに対する抗体を産生させることができ、もしくは本発明の2つ以上のFASペプチド配列を含有するペプチドに対する抗体を産生させることができ、またはそれらを組み合わせることができる。

【0075】

さらに、抗体は、本発明のFASペプチドの任意の領域から調製することもできる。さらに、ポリペプチドが受容体タンパク質である場合、受容体全体または受容体の部分、例えば、細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン全体、特異的膜貫通セグメント、細胞内もしくは細胞外ループのいずれか、またはこれらの領域の任意の部分に対する抗体を開発することができる。特異的機能部位、例えば、リガンド結合の部位、または例えば、グリコシル化、リン酸化、ミリスチル化、もしくはアミド化される部位に対する抗体も開発することができる。

10

20

30

40

50

## 【0076】

「増幅」は、意図される特異的標的核酸配列（FAS、USP2a、AMACRなど）の少なくとも一部を含有する標的核酸の複数コピーの産生を意味する。複数コピーは、アンプリコンまたは増幅産物と称することができる。好ましくは、増幅標的は、完全な標的遺伝子配列（イントロンおよびエキソン）未満または発現される標的遺伝子配列（エキソンおよびフランキング非翻訳配列のスプライシング転写物）を含有する。例えば、FAS特異的アンプリコンは、FAS標的ポリヌクレオチドの内部位置にハイブリダイズし、それから重合を開始させる増幅プライマーを使用することによりFAS標的ポリヌクレオチドの部分を増幅させることにより産生させることができる。好ましくは、増幅部分は、種々の周知の方法のいずれかを使用して検出することができる検出可能な標的配列を含有する。

10

## 【0077】

「プライマー」または「増幅プライマー」は、標的核酸またはその相補体の領域に結合し、標的核酸の核酸増幅を促進し得るオリゴヌクレオチドを意味する。ほとんどの場合、プライマーは、核酸ポリメラーゼにより伸長させることができる遊離3'末端を有する。全ての増幅プライマーは、少なくとも1つの標的核酸の鎖との直接の、または標的配列に相補的な鎖との相補的塩基相互作用を介してハイブリダイズし得る塩基配列を含む。増幅プライマーは、より長い核酸産物を産生する酵素活性のための基質として機能する。

## 【0078】

増幅プライマーの「標的結合配列」は、標的特異性を決定する部分である。それというのも、その部分は、標的核酸鎖またはその相補鎖にアニールし得るためである。標的結合配列がハイブリダイズする相補的標的配列は、プライマー結合配列と称される。

20

## 【0079】

増幅産物を「検出する」は、増幅核酸の存在を決定する種々の方法のいずれか、例えば、増幅産物の部分に標識プローブをハイブリダイズさせることなどを意味する。標識プローブは、別の配列に特異的に結合し、例えば、蛍光部分、化学発光部分、放射性同位体、ビオチン、アビジン、酵素、酵素基質、または他の反応基であり得る検出可能な基を含有するオリゴヌクレオチドである。

## 【0080】

「核酸増幅条件」は、環境条件、例として核酸増幅法を使用して標的核酸またはその相補鎖の複数コピーの産生を可能とするために十分な塩濃度、温度、温度サイクリングの有無、核酸ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、および補因子の存在を意味する。核酸増幅の多くの周知の方法は、交互に二本鎖核酸を変性させ、プライマーをハイブリダイズさせるための加熱サイクリングを要求する。

30

## 【0081】

本明細書において使用される用語「バイオマーカ」は、生物学的状態を示す物質を指す。本発明によれば、バイオマーカには、GPEP、PEP、GEPまたはそれらの組合せが含まれる。本発明によるバイオマーカには、本明細書に開示のGPEP、PEP、GEPまたはそれらの組合せの1つ以上のメンバーの存在を同定または指示するために使用される任意の化合物または組成物も含まれる。例えば、本明細書においてPEPのメンバーとして同定されたタンパク質のいずれかに結合させるために作出される抗体は、バイオマーカとして有用とみなすことができるが、抗体自体は二次指標である。

40

## 【0082】

用語「生体試料（biological sample）」または「生体試料（biologic sample）」は、生物（例えば、ヒト患者）から、または生物の構成成分（例えば、細胞）から、もしくは体液（例えば、血液、血清、唾液、尿など）から得られた試料を指す。試料は、任意の生体組織、器官、器官系または体液のものであり得る。試料は、患者に由来する試料である「臨床試料」であり得る。そのような試料には、限定されるものではないが、唾液、血液、血液細胞（例えば、白血球）、羊水、血漿、精液、骨髄、および組織またはコア針、細針もしくは穿刺生検試料、尿、腹水、および胸膜液、

50

またはそれらからの細胞が含まれる。生体試料には、組織の切片、例えば組織学的目的のために採取された冷凍切片も含まれ得る。生体試料は、「患者試料」と称することもできる。

【0083】

用語「病態」は、任意の細胞、器官、器官系または生物の状態を指す。病態は、疾患状態を示すことも、または、単に、実体の生理学的提示もしくは状況を示すこともあり得る。病態は、表現型病態（例えば疾患の巨視的提示）、または遺伝子型病態（例えば病態に関連する基礎遺伝子またはタンパク質発現プロファイル）として特徴付けられ得る。病態は、良性または悪性であり得る。

【0084】

個体における用語「癌」は、発癌性細胞に典型的な特徴、例えば無制御な増殖、不死性、転移潜在性、急速な成長および増殖速度、ならびにある特有の形態学的特徴を保有する細胞の存在を指す。癌細胞は、腫瘍の形態であることが多いが、そのような細胞は、個体内で単独で存在し得、または血流中で独立細胞、例えば白血病細胞として循環し得る。

【0085】

用語「前立腺癌」は、前立腺組織の癌を意味する。

用語「細胞成長」は、原則的に細胞数の成長に関連し、それは細胞繁殖の速度が細胞死（例えば、アポトーシスまたは壊死による）の速度を上回る場合に細胞繁殖（すなわち、増殖）により生じて、細胞の集団のサイズの増加を生成するが、その成長の小構成要素はある状況において個々の細胞の細胞サイズまたは細胞質体積の増加にも起因し得る。したがって、細胞成長を阻害する薬剤は、増殖および細胞死の2つの相反するプロセス間の平衡が変化するように、増殖の阻害または細胞死の刺激のいずれか、またはその両方により阻害し得る。

【0086】

本明細書において使用される用語「腫瘍成長」または「腫瘍転移成長」は、特に記載のない限り、腫瘍学において一般に使用されるとおりに使用され、この用語は、原則的には、主として腫瘍細胞成長の結果としての腫瘍または腫瘍転移の質量または体積の増加に関連する。

【0087】

用語「転移」は、癌が最初に原発性腫瘍として生じた場所から体内の遠隔位置に癌が拡散するプロセスを意味する。転移も、原発性腫瘍の拡散から生じた癌を指す。例えば、前立腺癌を有する者は、そのリンパ系、肝臓、骨または肺において転移を示し得る。

【0088】

本明細書において使用される用語「病変」または「病変部位」は、身体部分または組織の任意の異常な、一般に局在化された構造的変化を指す。石灰化または線維嚢胞性は、本発明の病変の例である。

【0089】

用語「臨床管理パラメータ」は、検出、スクリーニング、診断、患者の病期分類もしくは層別化、または疾患もしくは病態の進行、退縮および/もしくはそれからの生存の決定に重要とみなされる計量値または変数を指す。そのような臨床管理パラメータの例には、限定されるものではないが、年生存、疾患関連死、早期または遅発再発、退縮度、転移、治療への応答性、治療の有効性または前立腺癌への進行の見込みが含まれる。

【0090】

用語「終点」は、経路もしくは進行に沿った最終段階または発生を意味する。

用語「腫瘍評価終点」は、腫瘍の病期、状態または発生に基づく終点観察または計算を意味する。腫瘍評価に基づく終点の例には、限定されるものではないが、生存、無病生存（DFS）、客観的奏効率（ORR）、無増悪期間（TTP）、無増悪生存（PFS）、および治療成功期間（TTF）が含まれる。

【0091】

本明細書において使用される用語「治療する」は、特に記載のない限り、癌を有する患

10

20

30

40

50

者における腫瘍の成長、腫瘍転移、または他の発癌性細胞もしくは新生細胞の進行を部分的または完全に逆転、緩和、阻害することまたはそれらを予防することを意味する。本明細書において使用される用語「治療」は、特に記載のない限り、治療の行為を指す。

【0092】

語句「治療する方法」またはその均等物は、例えば、癌に適用される場合、個体における癌細胞の数を低減、排除もしくは予防するため、または癌の症状を緩和するために設計される行為の手順または過程を指す。癌または別の増殖障害を「治療する方法」は、癌細胞もしくは他の障害が実際に完全に排除されること、細胞もしくは障害の数が実際に低減されること、または癌もしくは他の障害の症状が実際に緩和されることを必ずしも意味しない。癌を治療する方法は、成功の見込みが低い場合であっても実施されることが多いが、個体の既往歴および推定生存予測値を考慮すると、それにもかかわらず全体的に有益な行為の過程と考えられる。

10

【0093】

用語「予測する」は、特定のイベントが将来的に生じるかまたは生じる可能性が極めて高いという記述または主張を意味する。

用語「予後診断する」は、特定の生物学的イベントが将来的に生じるかまたは生じる可能性が高いという記述または主張を意味する。

【0094】

用語「進行」または「癌進行」は、疾患もしくは病態の、またはそれに向かう増進または悪化を意味する。

20

用語「退縮」または「退縮度」は、表現型または遺伝子型のいずれかの癌進行の逆転を指す。癌進行の遅延または停止は、退縮とみなすことができる。

【0095】

用語「層別化する」は、それが患者に関する場合、患者を一連の正の転帰（例えば、無病）から軽度または良好な転帰（例えば、生活の質の改善または生存の増加）、不良な転帰（例えば、終末予後診断または死亡）に沿った予測転帰の群に分けることを意味する。

【0096】

用語「治療有効薬剤」は、研究者、獣医師、医師または他の臨床家により求められている組織、器官、系、生物、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する組成物を意味する。

30

【0097】

用語「治療有効量」または「有効量」は、研究者、獣医師、医師または他の臨床家により求められている組織、器官、系、生物、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する主題化合物または組合せの量を意味する。

【0098】

本明細書において使用される用語「関連する」または「関連」は、2つ以上のランダム変数または観察データ値間の関係を指す。関連は、統計的手段または検定による分析時、関係が使用される統計的検定の有意性の閾値を充足すると見出される場合、総計的であり得る。

【0099】

臨床管理パラメータ

本発明は、前立腺癌を検出、スクリーニング、または診断するため；前立腺癌患者を病期分類または層別化するため；ならびに前立腺癌の進行、退縮および/またはそれからの生存を決定するための組成物、方法およびアッセイに関する。

40

【0100】

その実施において、本発明は、慣習的な診断、予後診断および/または治療パラダイムを増強させるための方法、アルゴリズムおよび他の臨床ツールを提供する。1つ以上の臨床管理パラメータの値の決定における1つ以上のバイオマーカを使用する組合せアプローチも想定される。例えば、FASおよびPSAバイオマーカの両方を計測する本発明の方法は、本明細書に提示されるデータにより説明されるとおり、これらのバイオマーカの1

50

つを計測するにすぎない診断アッセイよりも優れた結果を提供する可能性がある。この二重または多重バイオマーカーアプローチは、画像化技術との組合せにおいて、いっそうさらなる優位性を提供する。したがって、任意の二重、または多重バイオマーカーアプローチ（併用画像を用いるまたは用いない）は、治療から利益を得ないと予測される患者の数を低減させ、したがって、治療を受け損なう患者の数を低減させる可能性があり、顕著に延命し得る。

【0101】

本発明により対処される臨床管理パラメータには、年生存、疾患関連死、早期または遅発再発、退縮度、転移、治療への応答性、治療の有効性およびグリーンスコアが含まれる。比較のためのPSAの計測値も含まれる。

10

【0102】

癌を発現する患者を、癌を発現しない患者と区別することが極めて重要である。60から70歳代の健常な男性における未治療低リスク、低PSA前立腺癌の自然史に関するデータが欠落している。解剖における研究は、40～60歳の男性の3分の1が、前立腺癌を抱えて生活していることを示している。この数は、85歳を過ぎると75%に増加する。それにもかかわらず、男性の3%のみがこの疾患により死亡し、確定試験が存在しないままである。

【0103】

有利には、本発明の実施は、スクリーニングにより引き起こされる損害（偽陽性をもたらす）および不要な後続の評価および治療（例えば、放射線照射、生検、ホルモンおよび手術）、例として、感染または尿閉または失禁、不要なスクリーニング誘導性生検、勃起不全、直腸および/または尿道損傷、精液中の持続性出血、乳房肥大、顔面紅潮、インポテンスおよび/または全体的な生活の質の低減、の低減をもたらし得る。本発明は、根治治療、例えば放射線照射または手術を受ける患者における偽陽性治療レジメンから生じる損害を低減、回避または排除する方法を提供する。この目的のため、本発明は、スクリーニングされ、上昇PSAレベルを有することが見出された男性を、放射線照射、生検または手術を受ける前に、本明細書に記載の予測因子変数の1つ以上についてスクリーニングまたは試験することができる機序を提供する。この確認アッセイまたは「Survive 5」試験は、本明細書において実証されるとおり、現在のPSA計測値またはグリーンスコアよりも良好な生存の予測因子を提供する。

20

30

【0104】

FAS発現が前立腺癌を有するまたは有する疑いのある患者を治療する臨床家に重要な臨床管理パラメータの多くの優勢な予測因子であることが見出されたため、本発明は、組織、細胞および/または血清中での迅速で正確なFAS発現の同定を含む。

【0105】

本方法は、一般に、以下の工程：(a) 生体試料（最適には、細胞または他の細胞もしくは体液を含有する）を癌患者から得る工程；(b) 試料をFASに特異的な検出薬剤と接触させる工程；(c) (b)中のFASの存在、量またはレベルを検出する工程；および(d) FASの存在、量またはレベル（単独または組合せ）を1つ以上の臨床管理パラメータと関連させて前立腺癌の予防、診断または治療を支援する工程を含む。

40

【0106】

生体試料は、細胞または組織であり得、好ましくは、細胞を含有する血清または血漿である。しかしながら、細胞は、組織試料または細胞培養物から、例えばエキスピボまたはインサイチュ法で得ることもできる。

【0107】

検出薬剤は、FASに特異的な核酸プローブ、または抗FAS抗体であり得る。

FASプローブ

本発明は、生体試料中のFAS遺伝子またはタンパク質の検出において有用な新規核酸ベースプローブを提供する。この目的のため、本発明は、生体試料から調製された核酸中のFAS特異的配列を検出する方法において使用されるヒトFAS遺伝子のセグメントに

50

特異的な核酸配列を含む。本発明は、前立腺癌を有する患者からの組織または体液の生体試料から調製された核酸中の有用な癌検出マーカである前立腺関連配列を検出する方法において使用される他の前立腺関連遺伝子マーカ、ヒトPSA、USP2a、pAKT、NPY、および/またはAMACRのセグメントに特異的な核酸配列をさらに含む。試料は、前立腺組織または非前立腺組織であり得る。非前立腺組織には、例えば、血液、リンパ節、乳房または乳房嚢胞、腎臓、肝臓、肺、筋、胃または腸組織が含まれ得る。本発明は、FAS特異的配列、PSA、USP2a、pAKT、NPY、および/またはAMACR配列を個々にまたは組合せで増幅および検出するための核酸配列を組み合わせる好ましい方法も含む。検出に使用される本発明の好ましいプローブ、プライマーおよびプロモータ-プライマー

10

本発明は、FAS特異的RNA種を検出および定量する方法も含む。本発明の他の実施形態は、PSA、USP2a、pAKT、NPY、および/またはAMACRのRNA種を、個々にまたは互いにもしくはFAS配列との組合せにおいて検出する方法を含む。さらに、個々のまたは組合せにおけるこれらのマーカの検出は、臨床的に重要である。それというの、個々の患者からの癌は1つ以上のマーカを発現し得、その結果、マーカの1つ以上の検出が、1つのみのマーカの存在が試験された場合に他で生じ得る診断の間の偽陰性の潜在性を減少させるためである。

#### 【0108】

一実施形態において、市販の抗体を使用して発現を検出することができる。USP2aについての1つのそのような抗体は、アブジェント(Abgent)(サンディエゴ、カリフォルニア;カタログ番号AP2131a)からのUSP2抗体(N末端)である。

20

#### 【0109】

インサイチュハイブリダイゼーション(ISH)および蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)

本発明は、新規プローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーションおよび蛍光インサイチュハイブリダイゼーションを介して標的核酸を検出する方法を提供する。インサイチュハイブリダイゼーション法は、最初に1969年に開発され、以降多くの改善がなされてきた。基本的技術は、水素結合を介するRNAおよび/またはDNAについてのハイブリダイゼーションキネティクスを利用する。十分な長さ(約50~300塩基対)のDNAまたはRNAの配列を標識することにより、選択的プローブを作製してDNAまたはRNAの特定の配列を検出することができる。これらのプローブの組織切片への適用は、DNAまたはRNAを組織領域および細胞タイプ内に局在化することを可能とする。プローブの設計法は、当業者に公知である。ハイブリダイズされるプローブおよび標的の検出は、当分野において公知のいくつかの手法において実施することができる。最も顕著なものは、プローブに付着する検出標識の使用を介するものである。本発明のプローブは、一本鎖または二本鎖であり得、DNA、RNA、またはDNAおよびRNAの混合物であり得る。これらは、任意の核酸ベース構築物も構成し得る。本発明のプローブのための標識は、放射性または非放射性であり得、そのような標識の設計および使用は当分野において周知である。

30

#### 【0110】

##### FAS抗体

一実施形態において、本発明は抗FAS抗体およびELISAアッセイを利用する。抗FAS抗体は、好ましくは、それぞれ2010年10月14日に公開されたPCT国際公開PCT/US2010/030545号明細書および2011年3月17日に公開されたPCT/US2010/046773号明細書に開示のものである。

40

#### 【0111】

FASの検出または捕捉のために本発明において使用される抗体は、ヒトFASに高度に特異的な新規抗FAS抗体である。一実施形態において、FAS検出用の市販抗体が使用される。IHCについて、使用することができる抗体は、ベチル・ラボラトリーズ(Bethyl Laboratories)(モンゴメリー、テキサス)からのアフィニテ

50

イ精製ヒト抗FASN抗体（カタログ番号A301-324A）であり、ELISA試験について、使用することができる抗体には、ノバス・バイオロジカルズ（Novus Biologicals）（リトルトン、コロラド）からの脂肪酸シンターゼ抗体ペア（Fatty Acid Synthase Antibody Pair）（カタログ番号H00002194-AP11）が含まれる。このペアは、ウサギアフィニティ精製ポリクローナル抗FASN（100ug）である捕捉抗体およびマウスモノクローナル抗FASN、IgG1カッパ（20ug）である検出抗体を含有する。

【0112】

一実施形態において、本発明抗体は、配列番号1～5（テーブル1）から選択されるヒトFAS配列に特異的なモノクローナル抗体である。別の実施形態において、本発明抗体は、サンドイッチELISAアッセイにおける捕捉抗体として使用される。

10

【0113】

【表1】

テーブル1:FASペプチド

ハイブリドーマ	FASペプチド	配列番号
A	VAQQQWEPSPGXAP	1
B	PSGPAPTNXGALE	2
C	TLEQQHXVAQQQW	3
D	EVDPGSAELQKVLQGD	4
E	ELSSKADEASELAC	5

20

FAS抗体および検出率

一実施形態において、本明細書に開示のFAS抗体を、前立腺癌の検出において単独またはPSAの計測との組合せのいずれかで使用することができる。計測は、患者の組織、細胞または血清中で行うことができる。

【0114】

グリーソンスコアおよびFAS

本発明の方法の実施において、FAS発現を1つ以上の臨床管理パラメータと組み合わせ、患者の診断、治癒および/または治療における改善を提供することができる。本発明により企図される1つのそのような組合せは、グリーソンスコアとの組合せである。グリーソンスコアまたはグレードは、組織提示の一次または優勢組織パターンおよび二次パターンにより定義される（テーブル2参照）。2つのパターンのそれぞれにスコアを付与し、スコアを最終的なグリーソンスコアのために組み合わせる。

30

【0115】

【表 2】

テーブル2: グリーソンスコア概要

パターン(スコア)	説明
パターン1(スコア1)	癌性前立腺は正常前立腺組織にかなり類似する。 腺は小さく十分に形成されており、密接に充填されている。
パターン2(スコア2)	組織は十分に形成された腺を依然として有するが、 それらはより大きく、それらの間でより多くの組織を有する。
パターン3(スコア3)	組織は認識可能な腺を依然として有するが、細胞はより暗色である。 高倍率において、これらの細胞の一部は腺から離れ、 周囲組織に侵入し始めている。
パターン4(スコア4)	組織は認識可能な腺をほとんど有さない。 多くの細胞が周囲組織に侵入している。
パターン5(スコア5)	組織は認識可能な腺を有さない。 周囲組織全体にわたり細胞層が存在するにすぎない。

10

一実施形態において、5～7のグリーソンスコアとの組合せにおけるFASレベルを使用して前立腺癌を有する患者を層別化または病期分類し、生存または治療への応答性に関する予後診断情報を提供することができる。全てのグリーソンスコア5～7（両端含む）にわたり、FASグレード（またはレベル）0～3が患者試料の88%超を集合的に包含することが見出された。実施例12参照。結果的に、発現レベルについての計測値としてのFASグレード、および5～7のグリーソンスコアの両方を用いる本発明の方法は、顕著な数の個体の層別化を可能とし、それにより生存（または再燃）のより正確な予測を提供する。一連の予測スケールのうち、3のFASレベルおよび5～7のグリーソンスコアが最も予測的である。7のグリーソンスコアが一方の患者の致死を予測するが、他方の患者の致死を予測しないことは公知である。したがって、FASとグリーソンスコアとの組合せは、改善された予測法を提供する。

20

## 【0116】

## 遺伝子発現および発現の局在化

本発明の一実施形態において、FAS発現は、1つ以上の追加の遺伝子の発現に対しておよび/または1つ以上の異なる生検部位において計測される。癌の辺縁および癌から遠位の部位における発現と比較する癌部位内の遺伝子発現の比較は、試料の状態およびそれが癌性になるかどうかについて結論を説明することを可能とする。次いで、これらの結論は、転移および結果的に生存の予測の改善を可能とする。これらの方法において特に有用な遺伝子の1つのセットには、USP2a、pAKTおよびNPYの1つ以上と組み合わせたFASが含まれる。追加の患者パラメータを遺伝子発現データと組み合わせて本方法の予測力を改善することもできる。1つのそのような患者パラメータは年齢である。50～75歳の患者について、本明細書に記載の遺伝子発現プロファイルがより重要である。

30

## 【0117】

## FASおよび退縮度

一実施形態において、FAS発現レベルは、個々の患者についての不良および優秀な転帰間の層別化を可能とする癌退縮の確率の予測因子として使用される。この方法において、FAS発現は退縮度と相関させ、より高いFAS発現レベルが臨床転帰を予測する。FASレベルは不良転帰の優秀な予測因子であることが決定された。

40

## 【0118】

## FASおよび臨床生存

本発明は、前立腺癌を有するまたは有する疑いのある患者の生存の見込みを予測する新たな方法を含む。本明細書に提供されるツールの予測力は、前立腺癌の管理において単独でまたは他の臨床因子との組合せで使用することができるFAS生存モデル(FSM)にフィットした。

## 【0119】

50

## F A S および U S P 2 a 差次的発現

一実施形態において、本発明は、従来、有意な集合的指標の組合せとして公知でなかった予測因子の組合せの使用を提供する。これらの組合せは、前立腺癌の臨床管理において有用な方法、アッセイまたはキットの基礎を形成し得る。

## 【0120】

## 遺伝子 / タンパク質発現プロファイル

前立腺癌に関連する治療パラダイムの予後診断、予測および管理において遺伝子およびタンパク質発現プロファイルを用いるための組成物および方法も本明細書に記載される。

## 【0121】

前立腺癌についての正の治療転帰は、早期検出および治療介入に高度に依存する。最も早期の検出は、前立腺特異的抗原 ( P S A ) の計測を含む身体試験またはアッセイの使用により達成される。しかしながら、これらの技術は、完全な予測力を提供しない。偽陽性およびさらに悪いことに偽陰性が、曖昧で複雑な組織生理学および個体にわたる P S A 試験の変動性の結果として生じ得る。結果的に、これらのアプローチは長期転帰尺度、例えば生存の改善に導かなかった。本発明の G E P および P E P ( 集合的に G P E P ) は、疾患の管理に良い影響を与え得る有価な情報を提供し得る予後診断ツールを臨床家に提供する。本発明によれば、腫瘍学者は、G P E P のメンバーの存在について疑いのある組織をアッセイすることができ、病態が疾患から進行、退縮し、またはより侵襲的になる可能性が高い患者を高精度で同定することができる。この情報は、他の利用可能な臨床情報、例として画像データとまとめると、より有効な疾患の管理を可能とする。

10

20

## 【0122】

本発明の一態様において、患者からの前立腺組織試料または血清中の遺伝子またはタンパク質の発現を、アレイまたは免疫組織化学技術を使用してアッセイして G P E P の遺伝子タンパク質の発現を同定する。

## 【0123】

本発明のある方法は、( a ) 生体試料 ( 好ましくは、前立腺組織または血清 ) を得ること ( b ) 試料を G P E P 、 P E P または G E P の 1 つ以上のメンバーに特異的な核酸プローブまたは抗体と接触させることおよび ( c ) プロファイルのメンバーの 1 つ以上が上方調節 ( 過剰発現 ) されるかどうかを決定することを含む。

## 【0124】

癌進行の見込みを決定するための G P E P の予測値は、上方調節されると見出されるメンバーの数に伴い増加する。G P E P の遺伝子および / またはタンパク質の、好ましくは、少なくとも約 2 つ、より好ましくは、少なくとも約 4 つ、最も好ましくは、約 7 つが過剰発現される。好ましい実施形態において、正常 ( 未疾患 ) 、辺縁組織 ( 病変部位を包囲する患者の前立腺腫瘍被膜からの組織 ) の試料および他の対照組織または体液 ( 例として血清 ) を、原発性病変部位と同一の試薬を使用して同一の条件下で同時にアッセイする。好ましくは、少なくとも 1 つの参照タンパク質の発現も同時に同一条件下で計測する。

30

## 【0125】

一実施形態において、本発明は、前立腺癌患者における疾患の再発 / 転移の見込みを示す遺伝子発現プロファイルおよびタンパク質発現プロファイルを含む。この実施形態において、本発明の方法は、( a ) 前立腺癌を罹患する患者の生体試料 ( 好ましくは、原発性切除腫瘍または血清 ) を得ること ; ( b ) 試料を P E P のタンパク質に対する核酸プローブ ( または抗体 ) と接触させることおよび ( c ) プロファイルのメンバーの 2 つ以上が上方調節 ( 過剰発現 ) されるかどうかを決定することを含む。再発の見込みを決定するための遺伝子プロファイルの予測値は、本発明により上方調節されると見出されるこれらの遺伝子のメンバーの数に伴い増加する。G P E P の遺伝子の、好ましくは、少なくとも約 2 つ、より好ましくは、少なくとも約 4 つ、最も好ましくは、約 7 つが差次的に発現される。生体試料は、好ましくは、患者の組織、例えば、原発性切除腫瘍の試料であり ; 同一患者からの正常 ( 未疾患 ) 組織または血清を対照として使用する。好ましくは、少なくとも 1 つの参照遺伝子の発現も計測する。目下好ましい参照遺伝子は、陽性対照としてのペー

40

50

タ - アクチン (ACTB)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、ベータグルコニダーゼ (GUSB) である一方、陰性対照には、大リボソームタンパク質 (RPLP0) および / またはトランスフェリン受容体 (TRFC) が含まれる。ベータアクチンは IHC のための陽性対照として使用することができる。

【0126】

本発明は、患者試料における遺伝子および / またはタンパク質発現プロファイルを決定するためのアッセイ、ならびにそのアッセイを使用するための説明書をさらに含む。アッセイは、核酸 (例えば、対象の核酸に特異的な核酸プローブを使用) またはタンパク質もしくはペプチド (例えば、対象のタンパク質 / ペプチドに特異的な核酸プローブまたは抗体を使用) の検出に基づくものであり得る。一実施形態において、アッセイは、好ましくは、組織マイクロアレイ (TMA) 中にアレイされた組織試料を、GPEP 中で同定されたタンパク質 / ペプチドに特異的な抗体と接触させる免疫組織化学 (IHC) 試験を含み、検出は、検出された遺伝子と、1つ以上の臨床管理パラメータ、例えば年生存、疾患関連死、早期または遅発再発、退縮度、転移または前立腺癌への進行の見込みとの関係を示すものと解釈する。一実施形態において、アッセイは、好ましくは、組織マイクロアレイ (TMA) 中にアレイされた血清試料を、GPEP 中で同定されたタンパク質 / ペプチドに特異的な抗体と接触させる免疫組織化学 (IHC) 試験を含み、検出は、検出された遺伝子と1つ以上の臨床管理パラメータ、例えば年生存、疾患関連死、早期または遅発再発、退縮度、転移または前立腺癌への進行の見込みとの関係を示すものと解釈する。

10

【0127】

本明細書に記載のバイオマーカーまたは診断方法のいずれかを、治療および / またはモニタリングレジメンの一部として包含して癌への進行または任意の治療法による癌患者の治療の有効性を予測することは、そのようなバイオマーカーも診断工程も含まない治療またはモニタリングレジメンと比べて、そのような治療法またはモニタリングを必要とするまたはそれらから最大の利益を得る患者集団のみが治療またはモニタリングを必要とし、特に、いかなる治療法によっても治療を必要としないまたは治療から利益を得ない (進行が予測されない) と予測された患者は、治療する必要がないという利点を提供する。

20

【0128】

本発明は、前立腺癌を有し得る患者を治療する方法において、1つ以上のGPEPシグネチャを使用して患者の癌への可能性の高い進行を診断して進行を予測する工程; および患者の年齢、または他の治療関連基準を考慮して患者に前立腺癌のための適切な治療レジメンを施す工程を含む方法をさらに提供する。

30

【0129】

遺伝子発現プロファイルの決定

患者の病態が前立腺癌に進行する可能性が高いかどうかを示す遺伝子発現プロファイルを同定するために使用される方法は、本明細書に概ね記載され、本明細書の実施例においてさらに記載される。遺伝子および / またはタンパク質発現プロファイルを同定する他の方法は公知であり; これらの代替法のいずれかを使用することもできる。例えば、チェンら (Chen et al.)、NEJM、第356巻(1): p. 11~20 (2007年); ルーら (Lu et al.)、PLOS・メディシン (PLOS Med.)、第3巻(12): e467 (2006年); ワンら (Wang et al.)、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.)、第2299巻: p. 1564 (2004年); ゴルブラ (Golub et al.) サイエンス (Science)、第286巻: p. 531~537 (1999年) 参照。

40

【0130】

1つの方法の並行試験においては、1つのトラックにおいて、異なる転帰を経験した患者からの正常 (非癌性) 組織および / または疾患組織と比較して過剰 / 過小過剰発現される遺伝子を同定し; 第2のトラックにおいて、同一の正常および疾患試料と比較して染色体挿入または欠失を含む遺伝子を同定する。これらの2つのトラックの分析は、2つのデータセットを生成する。データを分析し、遺伝子発現プロファイルの遺伝子 (すなわち、

50

対象の癌組織中で差次的に発現される遺伝子)を同定するアルゴリズムを使用して相関させる。陽性および陰性対照を用いて結果を正規化することができ、例として同一患者からの正常組織中でも差次的に発現される遺伝子およびタンパク質を排除し、異なる転帰を有する疾患組織であり、遺伝子発現プロファイルが対象の癌に特有であることを確認する。

#### 【0131】

初期工程として、石灰化または線維嚢胞性疾患のいずれかを提示する患者からの生体試料が要求される。組織試料は、前立腺癌に進行したと診断された患者からも得られ、例としてそれぞれの患者からの原発性切除腫瘍、転移リンパ節および正常(未疾患)辺縁前立腺組織の試料である。それぞれの試料に関連する臨床情報、例として化学療法薬、手術、放射線照射による治療または他の治療、治療の転帰および疾患の再発または転移をデータベース中に記録する。臨床情報には、年齢、性別、既往歴、治療歴、症状、家族歴、再発(有/無)などのような情報も含まれる。異なるタイプ(例えば、肺、脳、前立腺)の正常(非癌性)組織の試料および非前立腺癌(例えば、黒色腫、乳癌、卵巣癌)の試料を陽性対照として使用することができる。一組の健常個体からの正常未疾患前立腺組織の試料を陽性対照として使用することができ、癌が再発/転移した患者からの前立腺腫瘍試料を陰性対照として使用することができる。

10

#### 【0132】

次いで、遺伝子発現プロファイル(GEP)を生体試料から総RNAに基づき十分確立された方法に従って作成する。手短に述べると、典型的な方法は、総RNAを生体試料から単離し、RNAを増幅し、cDNAを合成し、cDNAを検出可能な標識により標識し、cDNAをゲノムアレイ、例えばアフィメトリクスU133ジーンチップ(Affymetrix U133 GeneChip)とハイブリダイズさせ、アレイに結合している検出可能な標識からのシグナルの強度を計測することによりゲノムアレイとの標識cDNAの結合を測定することを含む。例えば、参照により本明細書に組み込まれる前掲のルーラ(Lu, et al.)、チェンら(Chen, et al.)およびゴルブラ(Golub, et al.)に記載の方法、ならびにそれらに引用される参照文献参照。得られた発現データをデータベース中に入力する。

20

#### 【0133】

組織試料中のmRNAは、市販のまたは特注プローブまたはオリゴヌクレオチドアレイ、例えばcDNAまたはオリゴヌクレオチドアレイを使用して分析する。これらのアレイの使用は、数千の遺伝子の定常状態mRNAレベルの同時計測を可能とし、それにより効果、例えば無制御細胞増殖の発症、停止またはモジュレーションを同定するための強力なツールを提供する。アレイ上での細胞からの対象の核酸へのプローブのハイブリダイゼーションおよび/または結合は、標識プローブから受けるシグナルの局在および強度を検出および/または計測することにより測定することができ、またはそれを使用してマイクロアレイ上の既知の局在における核酸配列にハイブリダイズする試料からのDNA/RNA配列を検出することができる。シグナルの強度は、試料組織中に存在するcDNAまたはmRNAの量に比例する。多数のアレイおよび技術が利用可能で有用である。試料組織中の遺伝子および/またはタンパク質発現を測定する方法は、例えば、米国特許第6,271,002号明細書;米国特許第6,218,122号明細書;米国特許第6,218,114号明細書;および米国特許第6,004,755号明細書;ならびにワンら(Wang et al.)、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.)、第22巻(9):p.1564~1671(2004年);ゴルブラ(Golub et al.)、(前掲);およびシェナら(Schena et al.)、サイエンス(Science)、第270巻:p.467~470(1995年)に記載されており;これらの全ては参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

#### 【0134】

遺伝子分析態様は、遺伝子発現および挿入/欠失データを調査し得る。第1の工程として、RNAを組織試料から単離し、標識する。並行プロセスを、試料に対して実行して2つのデータセットを展開させる:(1)mRNAレベルに基づく遺伝子の過剰/過小発現

50

；および(2)染色体挿入/欠失データ。次いで、これらの2つのデータセットをアルゴリズムにより相関させる。それぞれの組織試料中の遺伝子の過剰/過小発現を、正常(非癌性)試料および他の対照試料中の遺伝子発現と比較し、癌組織中で差次的に発現される遺伝子のサブセットを同定する。好ましくは、上方および下方調節のレベルを、ハイブリダイズされるマイクロアレイプローブの強度計測値の変化倍率に基づき区別する。約2.0倍以上の差、または約0.05未満のp値が、そのような区別をなすのに好ましい。すなわち、遺伝子が正常細胞に対して疾患または疾患の疑いのある細胞中で差次的に発現されると考えられる前、疾患細胞は正常細胞よりも少なくとも約2倍多いまたは少ない発現の強度を生じると見出される。一般に、差異倍率が高くなれば(またはp値が低くなれば)、診断または予後診断ツールとして使用される遺伝子がより好ましい。本発明の遺伝子シグネチャについて同定された遺伝子は、臨床実験室装置を使用してバックグラウンドを超過する量により正常またはモジュレートされない遺伝子から区別可能なシグナルの発生をもたらす発現レベルを有する。

10

20

30

40

50

#### 【0135】

統計値を使用して、モジュレートされる遺伝子をモジュレートされない遺伝子およびノイズから完全に区別することができる。統計的検定は、多様な試料群間で最も有意に差次的に発現される遺伝子を同定し得る。スチューデントのt検定は、2つの群間で有意差を見出すために使用することができるロバストな統計的検定の一例である。p値が低ければ、遺伝子が異なる群間で差を示す証拠がより説得力を示す。それにもかかわらず、マイクロアレイは2つ以上の遺伝子の同時計測を可能とするため、数万の統計的検定を1回で実行することができる。このため、小さいp値を偶然にのみ観察する可能性は低く、シダック補正を使用する調整または類似の工程および無作為化/並べ替え実験を行うことができる。t検定による約0.05未満のp値は、遺伝子の発現レベルが有意に異なる証拠である。より説得力を示す証拠は、シダック補正を因子化した後の約0.05未満のp値である。それぞれの群における大量の試料について、無作為化/並べ替え検定後の約0.05未満のp値は、有意差の最も説得力を示す証拠である。

#### 【0136】

モジュレートされない遺伝子またはノイズよりも大きいシグナルを生成する遺伝子を選択するために使用することができる別のパラメータは、絶対シグナル差の計測値である。好ましくは、差次的に発現される遺伝子により生成されるシグナルは、正常またはモジュレートされない遺伝子と少なくとも約20%だけ異なる(絶対値換算)。そのような遺伝子が正常またはモジュレートされない遺伝子よりも少なくとも約30%異なる発現パターンを生成することがいっそうより好ましい。評価される遺伝子のより小さいサブセット、例えば30個未満、約20個以下または約10個以下の遺伝子を含むプロフィールについて、発現パターンは、正常またはモジュレートされない遺伝子よりも少なくとも約40%または少なくとも約50%異なり得る。

#### 【0137】

差次的発現分析は、市販のアレイ、例えば、アフィメトリクスU133ジーンチップ(Affymetrix U133 GeneChip)(登録商標)アレイ(アフィメトリクス・インコーポレイテッド(Affymetrix, Inc))を使用して実施することができる。これらのアレイは、チップ上に固定化される全ヒトゲノムについてのプローブのセットを有し、試験試料中の遺伝子の上方および下方調節を測定するために使用することができる。発現産物を検出し得るヒトゲノムDNAまたはプローブが固定される他の基板、例えばアフィメトリクス(Affymetrix)、アジレント・テクノロジー・インコーポレイテッド(Agilent Technologies, Inc.)またはイルミナ・インコーポレイテッド(Illumina, Inc)から入手可能なものを、使用することもできる。本発明において使用される目下好ましい遺伝子マイクロアレイには、アフィメトリクスU133ジーンチップ(Affymetrix U133 GeneChip)(登録商標)アレイおよびアジレント・テクノロジー(Agilent Technologies)ゲノムcDNAマイクロアレイが含まれる。遺伝子発現

分析を実施するための装置および試薬は、市販されている。例えば、アフィメトリクスジーンチップ (Affymetrix GeneChip) (登録商標) システム参照。次いで、分析から得られた発現データをデータベース中に入力する。

#### 【0138】

染色体挿入/欠失分析のため、正常組織の試料と比較したそれぞれの試料の遺伝子についてのデータを得る。挿入/欠失分析は、アレイベース比較ゲノムハイブリダイゼーション (「CGH」) を使用して作成する。アレイCGHは、複数の遺伝子座におけるコピー数変動を同時に計測し、癌および発達障害を研究するためならびに診断および治療標的を開発するために重要なツールを提供する。アレイCGHを実施するためのマイクロチップは、例えばアジレント・テクノロジーズ (Agilent Technologies) から市販されている。アジレント (Agilent) チップは、染色体上の遺伝子の局在を示し、遺伝子シグネチャについての追加のデータを提供する染色体チップである。この試験から1回収集された挿入/欠失データもデータベース中に入力する。

10

#### 【0139】

分析は同一患者からの同一試料について実施して並行データを作成する。同一のチップおよび試料調製物を使用して変動性を低減させる。

「参照遺伝子」「対照遺伝子」または「ハウスキーピング遺伝子」として公知のある遺伝子の発現も、発現プロファイルの正確性を確保する手段として、好ましくは、同時に測定する。参照遺伝子は、多くの組織タイプ、例として癌性および正常組織中で一貫して発現され、したがって遺伝子発現プロファイルを正規化するために有用な遺伝子である。例えば、シルビアら (Silvia et al.)、BMC がん (BMC Cancer)、第6巻: p. 200 (2006年); リーら (Lee et al.)、ゲノム・リサーチ (Genome Research)、第12巻 (2): p. 292~297 (2002年); チャンら (Zhang et al.)、BMC モレキュラー・バイオロジー (BMC Mol. Biol.)、第6巻: p. 4 (2005年) 参照。参照遺伝子の発現を特有の遺伝子発現プロファイル中の遺伝子と並行して測定することにより、遺伝子発現プロファイルの決定に使用される技術が適正に機能しているさらなる保証を提供する。参照遺伝子に関する発現データもデータベース中に入力する。目下好ましい実施形態において、以下の遺伝子を参照遺伝子として使用し: ベータ-アクチン (ACTB)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、ベータグルコニダーゼ (GUSB) を陽性対照とする一方、陰性対照には、大リボソームタンパク質 (RPLP0) および/またはトランスフェリン受容体 (TRFC) が含まれる。ベータアクチンはIHCについての陽性対照として使用することができる。

20

30

#### 【0140】

遺伝子発現プロファイルについてのデータ相関

データベース中の差次的発現データおよび挿入/欠失データは、同様のデータベース中のそれぞれの組織試料に関連する臨床転帰情報と、疾患および/または疾患関連提示の進行ならびに再発の決定または予測のための遺伝子発現プロファイルを決定するアルゴリズムにより相関させることができる。データの相関および予測遺伝子シグネチャの同定に有用な種々のアルゴリズムが利用可能である。例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれるスーら (Xu et al.)、遺伝子調節ネットワーク構築のための円滑な応答表面アルゴリズム (A Smooth Response Surface Algorithm For Constructing A Gene Regulatory Network)、サイシオロジカル・ゲノミクス (Physiol. Genomics) 第11巻: p. 11~20 (2002) に特定されるもののようなアルゴリズムを本明細書に開示の実施形態の実施に使用することができる。

40

#### 【0141】

遺伝子発現プロファイルを同定する別の方法は、最適化アルゴリズム、例えば株式会社ポートフォリオの確立において広く使用される平均分散アルゴリズムの使用を介する。1つのそのような方法は、特許出願の米国特許出願公開第2003/0194734号明細書に

50

詳細に記載されている。本質的に、この方法は、利益の変動性を最小化しながら、使用するために受け取る利益(生成されるシグナル)を最適化するインプットセット(強度により計測される発現)の確立を必要とする。イリザリーら(Irizarry et al.)、ヌクレックアシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、第31巻: e15(2003年)に記載のアルゴリズムを使用することもできる。1つの有用なアルゴリズムは、JMPソフトウェア(JMP Software)から入手可能なJMPゲノミクスアルゴリズムである。

#### 【0142】

遺伝子発現プロファイルを選択する方法は、発見的規則の適用も含み得る。そのような規則は、生物学および臨床結果を生成するために使用される技術の理解に基づき公式化し、次いで最適化法からのアウトプットに適用する。例えば、遺伝子シグネチャ同定の平均分散法を、癌を有する対象において差次的に発現された遺伝子の数についてのマイクロアレイデータに適用することができる。この方法からのアウトプットは、末梢血および疾患組織中で発現される一部の遺伝子を含み得る最適化された遺伝子のセットである。試験法において使用される試料が末梢血から得られ、癌の場合において差次的に発現されるある遺伝子も末梢血中で差次的に発現され得る場合、ポートフォリオが末梢血中で差次的に発現される遺伝子を排除する効率的フロンティアから選択される発見的規則を適用することができる。他の細胞、組織または体液を差次的に発現される遺伝子、タンパク質またはペプチドの評価に使用することもできる。無論、この規則は、例えば、データ事前選択の間に規則を適用することにより効率的フロンティアの形成前に適用することができる。

10

20

#### 【0143】

当該生物学に必ずしも関連しない他の発見的規則を適用することができる。例えば、特定の遺伝子または遺伝子群によりある割合のポートフォリオのみを表すことができる規則を適用することができる。市販のソフトウェア、例えばワグナ(Wagner)ソフトウェアは、これらのタイプの経験則に容易に適合する(ワグナアソシエーツ平均分散最適化アプリケーション(Wagner Associates Mean-Varianc e Optimization Application))。これは、例えば、確度および精度以外の因子が1つ以上の遺伝子を含む望ましさに対して影響を有する場合に有用であり得る。

#### 【0144】

一例として、アルゴリズムを種々の遺伝子(またはポートフォリオ)についての遺伝子発現プロファイルの比較に使用して予後診断を決定づけることができる。ポートフォリオを含む遺伝子のそれぞれの発現プロファイル(RNAかタンパク質レベルかにかかわらず)を媒体、例えばコンピュータ読取可能媒体中に固定する。これは、多数の形態を取り得る。例えば、疾患を示すシグナル(例えば、強度計測値)の範囲が入力される表を確立することができる。次いで、実際の患者データを表中の値と比較して患者試料が正常か疾患かを決定することができる。より洗練された実施形態において、発現シグナル(例えば、蛍光強度)のパターンをデジタルまたはグラフで記録する。次いで、患者試料と同時に使用される遺伝子ポートフォリオからの遺伝子発現パターンを発現パターンと比較する。次いで、パターン比較ソフトウェアを使用して患者試料が疾患の再発を示すパターンを有するかどうかを決定することができる。無論、これらの比較を使用して患者が疾患再発を経験する可能性が高くないかどうかを決定することもできる。次いで、試料の発現プロファイルを対照細胞のプロファイルと比較する。試料発現パターンが癌の再発についての発現パターンと一致する場合、(拮抗する医学的考察の不存在下で)患者は再発患者を治療するのと同様に治療される。試料発現パターンが正常/対照細胞からの発現パターンと一致する場合、患者は、癌について陰性と診断される。

30

40

#### 【0145】

患者の遺伝子シグネチャを分析して癌の予後診断を決定する方法は、コックスハザード分析プログラムの使用を介する。この分析は、(S-プラス)S-Plusソフトウェア(インサイトフルコーポレーション(Insightful Corporation))

50

から市販)を使用して実施することができる。そのような方法を使用して、遺伝子発現プロファイルを再発を明確に表すプロファイルと比較する(すなわち、プロファイル中の遺伝子の組合せについての発現レベルは再発を示す)。確立された閾値を有するコックスハザードモデルを使用して2つのプロファイルの類似性を比較し(既知の再発対患者)、次いで患者プロファイルが閾値を超過するかどうかを決定する。超過する場合、患者を再発する患者として分類し、治療、例えばアジュバント療法を施す。患者プロファイルが閾値を超過しない場合、患者を非再発患者として分類する。他の分析ツール、例えば線形判別分析、ロジスティック回帰およびニューラルネットワークアプローチを使用して同一の質問に回答することもできる。例えば、JMP統計ソフトウェアから利用可能なソフトウェア参照。

10

## 【0146】

多数の他の周知のパターン認識の方法が利用可能である。以下の参考文献は、一部の例を提供する:

重みづけ投票: ゴルブ・TR. (Golub, T R.), スロニム・DK. (Slonim, D K.), タマヤ・P. (Tamaya, P.), ユアール・C (Huard, C), ガッセンベーク・M. (Gaassenbeek, M.), メシロフ・JP. (Mesirov, J P.), コラー・H. (Coller, H.), ロー・L. (Loh, L.), ダウニング・JR. (Downing, J R.), カリギウリ・MA. (Caligiuri, MA.), ブルームフィールド・CD. (Bloomfield, C D.), ランダー・ES. (Lander, E S.) 癌の分子分類: 遺伝子発現モニタリングによるクラス発見およびクラス予測 (Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring)。サイエンス (Science) 第286巻: p. 531~537, 1999年。

20

## 【0147】

サポートベクターマシン: スー・AI. (Su, A I.), ウエルシュ・JB. (Welsh, J B.), サピノソ・LM. (Sapinoso, L M.), ケルン・SG. (Kern, S G.), ディミトロフ・P. (Dimitrov, P.), ラップ・H. (Lapp, H.), シュルツ・PG. (Schultz, P G.), パウエル・SM. (Powell, S M.), モスカルク・CA. (Moskaluk, C A.), フリエルソン・HF. Jr. (Frierson, H F. Jr.), ハンプトン・GM. (Hampton, G M.), 遺伝子シグネチャの使用によるヒト癌の分子分類 (Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures)。キャンサー・リサーチ (Cancer Research) 第61巻: p. 7388~93, 2001年。ラマスワミー・S. (Ramswamy, S.), タマヨ・P. (Tamayo, P.), リフキン・R. (Rifkin, R.), ムクヘルジェー・S. (Mukherjee, S.), イエン・CH. (Yeang, C H.), アンジェロ・M. (Angelo, M.), ラッド・C. (Ladd, C.), ライヒ・M. (Reich, M.), ラツリッペ・E. (Latulippe, E.), メシロフ・JP. (Mesirov, J P.), ポッジオ・T. (Poggio, T.), ジェラルド・W. (Gerald, W.), ローダ・M. (Loda, M.), ランダー・ES. (Lander, E S.), ゴールド・TR. (Gould, T R.)。腫瘍遺伝子発現シグネチャを使用する多クラス癌診断 (Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures) 米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA) 第98巻: p. 15149~15154, 2001年。

30

40

## 【0148】

k近傍法: ラマスワミー・S. (Ramswamy, S.), タマヨ・P. (Tam

50

ayo, P.), リフキン・R. (Rifkin, R.), ムクヘルジェー・S. (Mukherjee, S.), イエン・CH. (Yeang, C. H.), アンジェロ・M. (Angelo, M.), ラッド・C. (Ladd, C.), ライヒ・M. (Reich, M.), ラツリッペ・E. (Latulippe, E.), メシロフ・JP. (Mesirov, J. P.), ポッジオ・T. (Poggio, T.), ジェラルド・W. (Gerald, W.), ローダ・M. (Loda, M.), ランダー・ES. (Lander, E. S.), ゴールド・TR. (Gould, T. R.). 腫瘍遺伝子発現シグネチャを使用する多クラス癌診断 (Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures) 米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA) 第98巻: p. 15149~15154、2001年。

10

## 【0149】

相関係数: ファンフェア LJ (van't Veer L. J.), ダイ H. (Dai H.), ファンドビジヴェル MJ (van de Vijver M. J.), ヒー Y. D. (He Y. D.), ハート A. (Hart A.), マオ M. (Mao M.), ピーターズ HL. (Peters H. L.), ファンデルコイ K. (van der Kooy K.), マートン MJ. (Marton M. J.), ウイツテヴェーン AT. (Witteveen A. T.), シュレイベル GJ. (Schreiber G. J.), ケルクホーフェン RM. (Kerkhoven R. M.), ロバーツ C. (Roberts C.), リンズレイ PS. (Linsley P. S.), ベルナルズ R. (Bernards R.), フレンド SH. (Friend S. H.). 遺伝子発現プロファイリングは前立腺癌の臨床転帰を予測する (Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer), ネイチャー (Nature) 2002年1月31日; 第415巻 (6871): p. 530~6。

20

## 【0150】

遺伝子発現分析は、癌試料に特有の遺伝子発現プロファイル (GEP)、すなわち、癌細胞により差次的に発現される遺伝子を同定する。次いで、例えば、市販の装置および試薬、例えばアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) から入手可能なものを使用して実施することができるリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) を使用してこのGEPを検証する。

30

## 【0151】

## タンパク質発現プロファイルの決定

細胞により発現される全ての遺伝子がタンパク質に翻訳されるわけではなく、したがって、GEPが同定されると、GEP中の差次的に発現される遺伝子の一部または全部に対応するタンパク質も同一細胞または組織により差次的に発現されるかどうかを確認することも望ましい場合がある。したがって、タンパク質発現プロファイル (PEP) を同一の疑いのある組織から作成し、対照組織を使用してGEPを同定する。PEPも使用して他の個体、例えば前立腺癌患者におけるGEPを検証する。

40

## 【0152】

本発明によるPEPを作成する好ましい方法は、免疫組織化学 (IHC) 分析による。この方法において、PEP中のタンパク質に特異的な抗体を使用して対象の個体からの組織試料を調査する。PEPを同定する他の方法は公知であり、例えば、タンパク質特異的核酸プローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーション (ISH) である。例えば、ホーファら (Hofer et al.) 著、クリニカル・キャンサー・リサーチ (Clin. Can. Res.), 第11巻 (16): p. 5722 (2005年); ヴォルムら (Volm et al.) 著、クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・メタスタシス (Clin. Exp. Metast.), 第19巻 (5): p. 385 (2002年) 参照。これらの代替法のいずれかを使用することもできる。

50

## 【0153】

PEPを決定するため、疑いのある組織、転移および正常辺縁前立腺組織の試料を患者から得る。これらは、GEPを同定するために使用される同一の試料である。組織試料ならびに陽性および陰性対照試料を組織マイクロアレイ(TMA)上にアレイして同時分析を可能とする。TMAは、最大約1000個の別個の組織試料がアレイ様式でアSEMBLされて同時組織学分析を可能とする基板、例えばガラススライドからなる。組織試料は、保存生検試料、例えばパラフィン包埋または冷凍組織から得られた組織を含み得る。組織マイクロアレイを作成する技術は、当分野において周知である。例えば、サイモンら(Simon et al.)著、バイオテクニクス(BioTechniques)、第36巻(1): p. 98~105(2004年); カリオニエミら(Kallioniemi et al.)著、国際公開第99/44062号; コノネンら(Kononen et al.)著、ネイチャー・メディシン(Nat. Med)、第4巻: p. 844~847(1998年)参照。1つの方法において、中空針を使用してパラフィン包埋組織中の対象の領域から直径0.6mmほどの小さい組織コアを摘出する。「対象の領域」は、組織学者により所望の疾患または正常組織を含有すると同定されたものである。次いで、これらの組織コアをレシピエントパラフィンブロック中に正確に間隔を空けたアレイパターンで挿入する。このブロックからの切片をマイクロトームを使用して切断し、顕微鏡スライド上にマウントし、次いで標準的組織学的分析により分析する。それぞれのマイクロアレイブロックを約100から約500個の切片に切断することができ、それらを独立試験に供することができる。

10

20

## 【0154】

組織試料中のタンパク質は、タンパク質特異的薬剤、例えば抗体または核酸プローブ、例えばオリゴヌクレオチドまたはアプタマーを使用してTMAを調査することにより分析することができる。抗体は、それらの特異性および利用可能性に起因してこの目的のために好ましい。抗体は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、抗体断片、および/または種々のタイプの合成抗体、例としてキメラ抗体、またはそれらの断片であり得る。抗体は、多数の供給源(例えば、アビーム(Abeam)、セル・シグナリング・テクノロジー(Cell Signaling Technology)またはサンタ・クルズ・バイオテクノロジー(Santa Cruz Biotechnology))から市販されており、または当業者に周知の技術を使用して生成することができる。抗体は、典型的には、抗体の検出を可能とする検出可能な標識、例えば酵素、クロモゲンまたは量子ドットを備える。抗体は、検出可能な標識と直接に、または他方のメンバーが検出可能な標識を含有する結合ペアの一方のメンバーに間接的にコンジュゲートまたはタグ化されていてよい。使用される検出系は、例えば、ベンタナ・メディカル・システムズ・インコーポレイテッド(Ventana Medical Systems, Inc)のウェブサイトに記載されている。量子ドットは、検出可能な標識として特に有用である。量子ドットの使用は、例えば、以下の参考文献に記載されている: ジェイスワルら(Jaiswal et al.)著、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nat. Biotechnol.)、第21巻: p. 47~51(2003年); チャンら(Chan et al.)著、カレント・オピニオン・イン・バイオテクノロジー(Curr. Opin. Biotechnol.)、第13巻: p. 40~46(2002年); チャンら(Chan et al.)著、サイエンス(Science)、第281巻: p. 435~146(1998年)。

30

40

## 【0155】

組織の細胞中の対象のタンパク質を同定するための抗体の使用は、免疫組織化学(IHC)と称され、十分確立されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれるサイモンら(Simon et al.)著、バイオテクニクス(BioTechniques)、第36巻(1): p. 98(2004年); ヘディッケら(Haedicke et al.)著、バイオテクニクス(BioTechniques)、第35巻(1): p. 164(2003年)参照。IHCアッセイは、市販の装置、例えばベンタナ・メディ

50

カル・システムズ・インコーポレイテッド (Ventana Medical Systems, Inc) から入手可能なベンチマーク (Benchmark) 装置を使用して自動化することができる。

【0156】

一実施形態において、TMAは、遺伝子発現試験において、病態が前立腺癌に進行した患者において差次的に発現されると同定された遺伝子によりコードされるタンパク質に特異的な抗体と接触させてそれぞれのタイプの組織中のこれらのタンパク質の発現を測定することができる。TMAを調査するために使用される抗体は、最大レベルの差次的発現を有する遺伝子に基づき選択される。

【0157】

GPEPアッセイ

本発明は、患者の病態が癌に進行する可能性が高いかどうかまたは癌を有する患者が不良予後を有するかどうかを決定または予測するための方法およびアッセイをさらに含む。一態様によれば、組織試料がGEP、PEPまたはGPEPのいずれかを示すかどうかを決定するため、フォーマット化IHCアッセイを使用することができる。このアッセイは、分析を実施するために必要とされる材料、例として試薬 (抗体、検出可能な標識など) の全部または一部および説明書を含むキットに処方することができる。

【0158】

本明細書に記載の組成物のいずれかを、キット中に含めることができる。非限定的な例において、PEP、GEP、またはGPEPを検出するための試薬がキットに含まれる。一実施形態において、本明細書に開示のGPEPの遺伝子の発現産物の1つ以上に対する抗体が含まれる。抗体は、約0.1 μg/mLから約500 μg/mL、約0.1 μg/mLから約50 μg/mLまたは約1 μg/mLから約5 μg/mLまたは記述範囲内のいずれかの値の濃度を提供するように含めることができる。キットは、さらなるプローブ、標識または捕捉薬剤を作出または合成するための試薬または説明書をさらに含み得る。キットは、1つ以上の緩衝液、例えばヌクレアーゼ緩衝液、転写緩衝液、またはハイブリダイゼーション緩衝液、DNAテンプレート、cDNA、プライマー、プローブまたは標識を調製するための化合物、および前記のものいずれかを単離するための構成成分も含み得る。本発明の他のキットは、全ての試薬、緩衝液などを含む核酸またはペプチドアレイを作製するための構成成分を含み得、したがって、例えば、固体担体を含み得る。

【0159】

キットの構成成分は、水性媒体中または凍結乾燥形態で包装することができる。キットの容器手段は、一般に、構成成分を装入し、好ましくは、好適にアリコート化することができる少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジまたは他の容器手段を含む。キット中に2つ以上の構成成分が存在する場合 (標識試薬および標識を一緒に包装することができる)、キットは一般に、追加の構成成分を別個に装入することができる第2、第3または他の追加の容器も含有する。しかしながら、構成成分の種々の組合せを、バイアルまたは類似の容器中に含めることができる。本発明のキットは、典型的には、検出試薬、例えば、核酸またはタンパク質または抗体を含有するための手段、および市販のために密封される他の任意の試薬容器も含む。そのような容器は、所望のバイアルが保持される注射または吹込成形プラスチック容器を含み得る。

【0160】

キットの構成成分が1つ以上の液体溶液中で提供される場合、液体溶液は、水溶液であり、滅菌水溶液が特に好ましい。しかしながら、キットの構成成分は、乾燥粉末として提供することができる。試薬および/または構成成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は、好適な溶媒の添加により再構成することができる。溶媒は、別の容器手段中で提供することもできることが想定される。一部の実施形態において、標識色素は乾燥粉末として提供される。10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000マイクログラムまたは

10

20

30

40

50

少なくともまたは多くともそれらの量の乾燥色素が本発明のキット中で提供されることが企図される。次いで、色素は、任意の好適な溶媒、例えばDMSO中で再懸濁させることができる。

【0161】

キットは、分解から保護する組成物を保存または維持する構成成分も含み得る。そのようなキットは、一般に、好適な手段中で、それぞれの個々の試薬または溶液についての異なる容器を含む。

【0162】

本発明のあるアッセイ法は、個体からの組織試料をGPEPの遺伝子またはタンパク質の一部または全部に特異的な抗体群と接触させ、試料中のこれらの遺伝子またはタンパク質の上方または下方調節の出現を決定することを含む。TMAの使用は、対照試料を含む多数の試料の同時アッセイを可能とする。

10

【0163】

本方法は、好ましくは、対照または「参照タンパク質」を検出および/または定量することを含む。試料中の参照タンパク質を検出および/または定量することは、結果を正規化し、したがってアッセイが適正に機能しているさらなる保証を提供する。目下好ましい実施形態において、以下の参照タンパク質の1つ以上に特異的な抗体が含まれ：ベータ-アクチン(ACTB)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、ベータグルコニダーゼ(GUSB)を陽性対照する一方、陰性対照には、大リボソームタンパク質(RPLP0)および/またはトランスフェリン受容体(TRFC)が含まれる。ベータアクチンはIHCについての陽性対照として使用することができる。

20

【0164】

一実施形態において、アッセイおよび方法は、GPEP中の過剰発現される遺伝子またはタンパク質のみの発現を測定することを含む。本方法は、組織試料を患者から得、試料の遺伝子および/またはタンパク質発現プロファイルを決定し、遺伝子またはタンパク質発現プロファイルから決定することを含む。

【0165】

一実施形態において、アッセイおよび方法は、GPEP中の過剰発現される遺伝子またはタンパク質のみの発現を測定することを含む。本方法は、好ましくは、少なくとも1つの参照タンパク質を含み、それは以下から選択することができ、ベータ-アクチン(ACTB)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、ベータグルコニダーゼ(GUSB)を陽性対照とする一方、陰性対照には、大リボソームタンパク質(RPLP0)および/またはトランスフェリン受容体(TRFC)が含まれる。ベータアクチンはIHCについての陽性対照として使用することができる。

30

【0166】

本発明は、個体、例えば、患者からの組織試料または細胞のIHC分析を実施するための試薬、例としてGPEP中のタンパク質の少なくとも約2つおよび任意の参照タンパク質に特異的な抗体を含有するキットをさらに含む。抗体は、好ましくは、対象のタンパク質への抗体の結合を検出するための手段、例えば、検出可能な標識によりタグ化されている。好ましい検出可能な標識には、蛍光化合物または量子ドットが含まれ；しかしながら、他のタイプの検出可能な標識を使用することができる。抗体についての検出可能な標識は、例えば、ベンタナ・メディカル・システムズ・インコーポレイテッド(Ventana Medical Systems, Inc)から市販されている。

40

【0167】

組織試料中のタンパク質発現を検出および定量する免疫組織化学法は、周知である。いくつかの異なるタンパク質の発現の測定を可能とする任意の方法を使用することができる。例えば、シグノレッティら(Signoretti et al.)、「ヒト前立腺癌におけるHer-2-neu発現およびアンドロゲン非依存性への進行(Her-2-neu Expression and Progression Toward Androgen Independence in Human Prostate Can

50

cer」、ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Instit.)、第92巻(23): p. 1918~25(2000年); グーら(Guet al.)著、「前立腺幹細胞抗原(PSCA)発現は、グリーンスコアが高くなり、前立腺癌の病期および骨転移が進行につれて増加する(Prostate stem cell antigen(PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer)」、オンコジーン(Oncogene)、第19巻: p. 1288~96(2000年)参照。そのような方法は、免疫組織化学(IHC)分析のために設計された自動化装置を使用して効率的に実施することができる。そのようなアッセイを迅速に実施するための装置は、例えば、ベンタナ・モレキュラー・ディスカバリー・システムズ(Ventana Molecular Discovery Systems)またはラボ・ビジョン・インコーポレーション(Lab Vision Corporation)から市販されている。そのような装置を使用する本発明による方法は、製造業者の説明書に従って実施することができる。

10

20

30

40

50

**【0168】**

そのような方法またはアッセイにおいて使用されるタンパク質特異的抗体は容易に入手可能であり、または十分に確立された技術を使用して調製することができる。本明細書に開示のGPEP中のタンパク質に特異的な抗体は、例えば、セル・シグナリング・テクノロジー・インコーポレイテッド(Cell Signaling Technology, Inc)、サンタ・クルズ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド(Santa Cruz Biotechnology, Inc)、またはアビーム(Abeam)から得ることができる。

**【0169】****免疫アッセイ**

本発明は、前立腺癌の診断、予後診断および予測ならびに前立腺癌に関連する臨床管理パラメータの説明において有用な新たなアッセイを提供する。本発明の免疫アッセイは、本明細書に記載の抗FASポリクローナルまたはモノクローナル抗体が生体試料中のFASに特異的に結合することを利用する。任意のタイプの免疫アッセイフォーマット、例として、限定されるものではないが、酵素免疫アッセイ(EIA、ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、化学発光免疫アッセイ(CLIA)、計数免疫アッセイ(CIA)、免疫組織化学(IHC)、凝集、比濁法、混濁法またはウエスタンブロットを使用することができる。これらおよび他のタイプの免疫アッセイは周知であり、文献、例えば、免疫化学(Immunochimistry)、ファン・オス(Van Oss)およびファン・レフェンモルテル(Van Regenmortel)(編)、CRCプレス(CRC Press)、1994年; 免疫アッセイハンドブック(The Immunoassay Handbook)、D. ワイルド(D. Wild)(編)、エルサビエ・エルティエーディ(Elsevier Ltd.)、2005年; ならびに本明細書に開示の参照文献に記載されている。

**【0170】**

本発明に好ましいアッセイフォーマットは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)フォーマットである。ELISAは、溶液中の抗原または抗体を検出および計測するための高感度技術であり、溶液を物質に特異的な固定化抗体が付着された表面上に流し、その物質が存在する場合、それは抗体層に結合し、その存在は、検出を可能とするためにタグ化または標識された抗体の適用により確認および可視化される。ELISAは、抗体の高特異性を酵素アッセイの高感度と、高いターンオーバー数を保有する容易にアッセイされる酵素、例えばアルカリホスファターゼ(AP)またはセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合している抗体または抗原を使用することにより組み合わせ、血清中抗体濃度(抗体力価)の測定および抗原の存在の検出の両方に極めて有用なツールである。

**【0171】**

多くの異なるタイプのELISAが存在し；最も一般的なタイプには、「直接ELISA」、「間接ELISA」、「サンドイッチELISA」および細胞ベースELISA（C-ELISA）が含まれる。ELISAの実施は、特定の抗原についての特異性を有する少なくとも1つの抗体を含む。未知量の抗原を有する試料を固体担体（通常、ポリスチレンマイクロタイタープレート）上に、非特異的（表面への吸着を介する）または特異的（「サンドイッチ」ELISAにおいて同一抗原に特異的な別の抗体による捕捉を介する）に固定化する。抗原を固定化した後、検出抗体を添加し、抗原との複合体を形成させる。検出抗体は酵素に共有結合されていてよく、またはそれ自体、バイオコンジュゲーションを介して酵素に結合している二次抗体により検出することができる。それぞれの工程間で、プレートを典型的には軽度の洗浄剤溶液により洗浄して特異的に結合していないいかなるタンパク質または抗体も除去する。最終洗浄工程後、検出可能な標識によりタグ化された酵素基質を添加することによりプレートを発色させて可視シグナルを生成し、それが試料中の抗原の量を示す。

10

20

30

40

50

#### 【0172】

典型的なマイクロタイタープレートサンドイッチ免疫アッセイにおいて、抗体（「捕捉抗体」）は、基板、例えばマイクロタイタープレート上に吸着または固定化させる。モノクローナル抗体は、それらのより大きい特異性に起因して捕捉抗体として好ましいが、ポリクローナル抗体を使用することもできる。試験試料をプレートに添加すると、プレート上の抗体は試料からの標的抗原に結合し、それをプレート中で保持する。二次抗体（「検出抗体」）または抗体ペアを次の工程において添加すると、それも標的抗原（既にプレート上のモノクローナル抗体に結合している）に結合し、それにより2つの異なる抗体間で抗原「サンドイッチ」を形成させる。

#### 【0173】

次いで、この結合反応を放射免疫アッセイフォーマット（RIA）と同様に放射性同位体により；酵素免疫アッセイフォーマット（EIAまたはELISA）と同様に酵素により；または検出抗体に付着している他の検出可能な標識により計測することができる。標識は、プレートに添加された元の試料中に存在する標的抗原の量に比例する発色シグナルを生成する。免疫アッセイフォーマットに依じて、発色度を裸眼（家庭用妊娠試験と同様）、シンチレーションカウンタ（RIAについて）により、または分光光度プレートリーダー（EIAまたはELISAについて）により検出および計測することができる。

#### 【0174】

次いで、アッセイを以下の一般工程に従って実施する：

工程1：捕捉抗体をプラスチックマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させる（試料は添加しない）；

工程2：試験試料（例えばヒト血清）をプレートのウェルに、既にプレート上に結合している捕捉抗体への標的抗原の結合を可能とするために十分な条件下で添加し、それにより抗原をウェル中で保持させる；

工程3：標的抗原（既にプレート上の捕捉抗体に結合している）に検出抗体または抗体ペア（付着している酵素または他の検出可能な部分を有する）を結合させ、それにより2つの異なる抗体間で抗原「サンドイッチ」を形成させる。検出抗体上の検出可能な標識は、プレートに添加された元の試料中に存在する標的抗原の量に比例する発色シグナルを生成する。

#### 【0175】

抗原ダウン（antigen-down）免疫アッセイと称されることも多い代替的な実施形態において、分析物（抗体でない）を基板、例えばマイクロタイタープレート上にコートし、それを使用して試料に見出される抗体に結合させる。試料を添加すると（例えばヒト血清）、プレート上の抗原が試料からの抗体（例えば、IgE）により結合され、それはウェル中で保持される。次に酵素、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）により標識された種特異的抗体（例えば、抗ヒトIgE抗体）を添加し、それはプレート上の抗原に結合している抗体に結合する。シグナルが大きければ、より多くの抗体

が試料中に存在する。

【0176】

別の実施形態において、免疫アッセイは、競合阻害フォーマットで構築することができる。競合阻害アッセイは、小さい分析物を計測するために使用されることが多い。それというのも、競合阻害アッセイは、標準的なELISAフォーマットにおいて使用されるように2つではなく1つの抗体の結合のみを要求するためである。連続競合阻害アッセイにおいては、試料およびコンジュゲートされた分析物をサンドイッチアッセイと同様の工程で添加する一方、古典的競合阻害アッセイにおいては、これらの試薬を同時に一緒にインキュベートする。

【0177】

典型的な連続競合阻害アッセイフォーマットにおいて、捕捉抗体を基板、例えばマイクロタイタープレート上にコートする。試料を添加すると、捕捉抗体は試料から遊離分析物を捕捉する。次の工程において、検出可能な標識、例えば酵素または酵素基質により標識された既知量の分析物を添加する。標識分析物も、プレート上に吸着している捕捉抗体に結合しようとするが、標識分析物は試料からの事前に結合している分析物の存在により捕捉抗体への結合が阻害される。このことは、モノクローナルが試料からの未標識分析物に既に結合している場合、標識分析物はプレート上のモノクローナルにより結合されないことを意味する。試料中の未標識分析物の量は、標識分析物により生成されるシグナルに反比例する。シグナルが低ければ、より多くの未標識分析物が試料中に存在する。標準曲線は、未標識分析物スタンダードの段階希釈物を使用して構築することもできる。次いで、

【0178】

サンドイッチELISAフォーマットにおいて行うのと同様に、後続の試料値を標準曲線から読取ることができる。古典的競合阻害アッセイフォーマットは、標識（コンジュゲートされた分析物）および未標識分析物（試料から）の同時添加を要求する。次いで、標識および未標識分析物の両方が、プレート上のモノクローナル捕捉抗体上の結合部位に同時に競合する。連続競合阻害アッセイフォーマットと同様に、発色シグナルは試料中の未標識標的分析物の濃度に反比例する。標識分析物の検出は、マイクロタイタープレートリーダー上で読み取ることができる。

【0179】

マイクロタイタープレートに加え、免疫アッセイは、迅速試験、例えば家庭用妊娠試験として構成することもできる。マイクロタイタープレートアッセイと同様に、迅速試験は、抗原と反応する抗体を使用し、サンドイッチフォーマット、競合阻害フォーマット、および抗原ダウンフォーマットとして開発することができる。迅速試験について、抗体および抗原試薬は、多孔膜に結合させ、それは陽性試料と反応する一方、過剰な体液を膜の非反応部分に導く。迅速免疫アッセイは、一般に2つの構成がある：試料をウェル中に簡易に装入し、結果を直ちに読み取るラテラルフロー試験；および試料をウェル中に装入し、ウェルを洗浄し、次いで最終的に分析物 - 検出可能な標識のコンジュゲートを添加し、結果を数分後に読み取ることが要求するフロースルー系。1つの試料をストリップまたはカセット毎に試験する。迅速試験は、マイクロタイタープレートアッセイよりも速く、試料処理をほとんど要求せず、より安価であることが多く、装置の使用なしで有/無の回答を生成する。しかしながら、迅速免疫アッセイは、プレートベース免疫アッセイほど感度も

良くなく、それらは分析物を正確に定量するために使用することもできない。

【0179】

循環細胞中のFASの量を検出するために本発明において使用される好ましい技術は、高度に特異的なモノクローナル抗体を使用して試料抗原を検出するサンドイッチELISAである。サンドイッチELISA法は、以下の一般工程を含む：

1. 既知量の捕捉抗体が結合している表面を調製し；
2. 表面上のいかなる非特異的結合部位も（場合により）遮断し；
3. 抗原含有試料を表面にアプライし；
4. 未結合抗原が除去されるように表面を洗浄し；
5. 結合した抗原に特異的に結合する一次（検出）抗体をアプライし；

10

20

30

40

50

6. 一次抗体に特異的な酵素結合二次抗体をアプライし；
7. 未結合抗体 - 酵素コンジュゲートが除去されるようにプレートを洗浄し；
8. 酵素により検出可能な（例えば、発色または蛍光または電気化学）シグナルに変換される化学物質をアプライし；
9. 吸光度または蛍光または電気化学シグナルを計測して抗原の存在および量を決定する。

**【0180】**

代替的实施形態において、一次抗体（工程5）を酵素に結合させ；この実施形態において、酵素にコンジュゲートされた二次抗体の使用（工程6）は、一次抗体が酵素にコンジュゲートしている場合、必須ではない。しかしながら、二次抗体コンジュゲートの使用は、検出が望まれる全ての抗原についての酵素結合抗体を作出する高価なプロセスを回避する。他の抗体のFc領域に結合する酵素結合抗体を使用することにより、この同一の酵素結合抗体を種々の状況において使用することができる。サンドイッチELISAの主な利点は、粗製または不純試料を使用し、存在し得るあらゆる抗原に依然として選択的に結合する能力である。「捕捉」抗体の第1の層を用いない場合、試料中のあらゆるタンパク質（例として、血清タンパク質）はプレート表面に競合的に吸着し得、固定化される抗原の量を低下させる。

10

**【0181】**

本発明の一実施形態において、固相基板、例えばマイクロタイタープレートまたはストリップは、捕捉抗体を基板の表面に固定または固定化するように処理する。固相の材料は、それが免疫アッセイにおいて使用される通常の固相の材料である限り、特に限定されない。そのような材料の例には、ポリマー材料、例えばラテックス、ゴム、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、スチレン-ブタジエンコポリマー、塩化ポリビニル、ポリビニルアセテート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、スチレン-メタクリレートコポリマー、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレートコポリマー、ニフッ化ポリビニリデン（PVDF）、およびシリコン；アガロース；ゼラチン；赤血球；ならびに無機材料、例えばシリカゲル、ガラス、不活性アルミナ、および磁気物質が含まれる。これらの材料は、単独でまたはそれらの2つ以上の組合せで使用することができる。

20

**【0182】**

固相の形態は、固相が免疫アッセイにおいて使用される通常の固相の形態、例えば、マイクロタイタープレート、試験管、ビーズ、粒子、およびナノ粒子の形態である限り、特に限定されない。粒子には、磁気粒子、疎水性粒子、例えばポリスチレンラテックス、粒子の表面上に親水性基、例えばアミノ基およびカルボキシル基を有するコポリマーラテックス粒子、赤血球およびゼラチン粒子が含まれる。固相は、好ましくは、マイクロタイタープレートまたはストリップ、例えばセル・シグナリング・テクノロジー・インコーポレイテッド（Cell Signaling Technology, Inc）から入手可能なものである。

30

**【0183】**

捕捉抗体は、好ましくは、配列番号1~5のペプチド配列の1つ以上の少なくとも一部に特異的に結合する本明細書に記載の1つ以上のモノクローナル抗FAS抗体である。マイクロタイタープレートまたはストリップが使用される場合、捕捉抗体は、ウェル内に固定化される。タンパク質を固相基板にコートおよび/または固定化する技術は当分野において公知であり、例えば、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、またはそれらの組合せにより達成することができる。例えば、W. ルットマンら（W. Luttmann et al）著、免疫学（Immunology）第4.3.1章（p. 92~94）、エルセビエ・インコーポレイテッド（Elsevier, Inc.）（2006年）およびそれに引用される参考文献参照。例えば、結合物質がアビジンまたはストレプトアビジンである場合、ビオチンが結合した固相を使用してアビジンまたはストレプトアビジンを固相に固定することができる。使用されるべき捕捉抗体、検出抗体および固相の量

40

50

は、好適には、計測されるべき抗原、使用されるべき抗体、および固相のタイプなどに応じて確立することもできる。マイクロタイタープレートを捕捉抗体によりコートするためのプロトコル、例として捕捉抗体の量を計算するツールおよび方法は、例えば、イムノケミストリー・テクノロジー・エルエルシー (Immunochemistry Technologies, LLC) (ブルーミントン、ミネソタ) およびメソ・スケール・ダイアグノスティクス・エルエルシー (Meso Scale Diagnostics, LLC) (ゲイザーズバーグ、メリーランド) についてのウェブサイトに記載されている。

#### 【0184】

検出抗体は、任意の抗FAS抗体であり得る。抗FAS抗体は、例えば、セル・シグナリング・テクノロジー・インコーポレイテッド (Cell Signaling Technologies, Inc.)、サンタ・クルズ・バイオテクノロジー (Santa Cruz Biotechnology)、EMDバイオサイエンスズ (EMD Biosciences) 他から市販されている。検出抗体は、配列番号1~5の1つ以上に特異的な本明細書に開示の抗FAS抗体でもあり得る。一実施形態において、検出抗体は、検出可能な標識、または酵素と直接コンジュゲートされていてよい。検出抗体が検出可能な標識とも酵素ともコンジュゲートされていない場合、検出抗体に特異的に結合する標識二次抗体が含まれる。そのような検出抗体「ペア」は、例えば、セル・シグナリング・テクノロジー・インコーポレイテッド (Cell Signaling Technologies, Inc) から市販されている。

10

20

#### 【0185】

抗体を検出可能な標識により標識する技術は、当分野において十分確立されている。本明細書に使用される用語「検出可能な標識」は、分光光度、光化学、生化学、免疫化学、または化学的手段により検出可能な組成物を指す。検出可能な標識は、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、および酵素補因子、または当分野において公知の任意の他の標識からなる群から選択することができる。例えば、ゾラ (Zola) 著、モノクローナル抗体：技術マニュアル (Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques)、p. 147~158 (CRCプレス・インコーポレイテッド (CRC Press, Inc.) 1987年) 参照。検出可能な標識は、対象抗体に付着させることができ、アッセイ装置の利用可能性および適合可能な免疫アッセイ手順により定められることが多い種々の方法の使用の要求に合致するように選択される。適切な標識には、限定されるものではないが、放射性核種、酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、または - ガラクトシダーゼ)、蛍光部分またはタンパク質 (例えば、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、GFP、またはBFP)、または発光部分 (例えば、エビデント・テクノロジー (Evident Technologies)、トロイ、ニューヨークにより供給されるエビドット (Evidot) (登録商標) 量子ドットまたはクアンツム・ドット・コーポレーション (Quantum Dot Corporation)、パロアルト、カリフォルニアにより供給されるQドット (Qdot) (商標) ナノ粒子) が含まれる。

30

40

#### 【0186】

好ましくは、本発明のサンドイッチ免疫アッセイは、固相上の捕捉抗体 - 抗原 - 検出抗体複合体の形成後、検出抗体に結合している標識二次抗体を計測する工程を含む。標識物質を計測する方法は、標識物質のタイプに応じて適切に選択することができる。例えば、標識物質が放射性同位体である場合、慣用的に公知の装置、例えばシンチレーションカウンタを使用することにより放射性を計測する方法を使用することができる。標識物質が蛍光物質である場合、慣用的に公知の装置、例えばルミノメータを使用することにより蛍光を計測する方法を使用することができる。

標識物質が酵素である場合、酵素基質を酵素と反応させることにより発光または発色を計測する方法を使用することができる。酵素に使用することができる基質には、慣用的に

50

公知の発光基質、比色基質などが含まれる。アルカリホスファターゼが酵素として使用される場合、その基質には、化学発光基質、例えばCDP-スター(CDP-star)(登録商標)(4-クロロ-3-(メトキシスピロ(1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1.1-sup.3.7]デカン)-4-イル)ニナトリウムフェニルホスフェート)およびCSPD(登録商標)(3-(4-メトキシスピロ(1,2-ジオキセタン-3,2-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1.1-sup.3.7]-デカン)-4-イル)ニナトリウムフェニルホスフェート)および比色基質、例えばp-ニトロフェニルホスフェート、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸(BCIP)、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリド(NBT)、ならびにヨードニトロテトラゾリウム(INT)が含まれる。これらの発光または比色基質は、慣用的に公知の分光光度計、ルミノメータなどにより検出することができる。

10

#### 【0187】

一実施形態において、検出可能な標識は、量子ドット(例えば、エビデント・テクノロジーズ(Evident Technologies)、トロイ、ニューヨークにより供給されるエビドット(Evidot)(登録商標)量子ドットまたはクアントム・ドット・コーポレーション(Quantum Dot Corporation)、パロアルト、カリフォルニアにより供給されるQドット(Qdot)(商標)ナノ粒子)を含む。タンパク質、例として抗体を量子ドットにより標識するための技術は、公知である。例えば、ゴールドマンら(Goldman et al.)著、フィジカ・ステータス・ソリジ(Phys. Stat. Sol.)、第229巻(1):p.407~14(2002年);ズドルブノワら(Zdobnova et al.)著、ジャーナル・オブ・バイオメディカル・オプティクス(J. Biomed Opt.)、第14巻(2):p.021004(2009年);ラオら(Lao et al.)著、JACS、第128巻(46):p.14756~14757(2006年);マットゥシら(Mattoussi et al.)著、JACS、第122巻(49):p.12142~12150(2000年);およびメイソンら(Mason et al.)著、メソッズ・イン・モレキュラー・バイオロジー:ナノバイオテクノロジー・プロトコルズ(Methods in Molecular Biology: Nanobiotechnology Protocols)第303巻:p.35~50(スプリングー・プロトコルズ(Springer Protocols)、2005年)参照。量子ドット抗体標識キットは、例えば、インビトロジェン(Invitrogen)(カールズバッド、カリフォルニア)およびミリポア(Millipore)(ビルリカ、マサチューセッツ)から市販されている。

20

30

#### 【0188】

本発明のサンドイッチ免疫アッセイは、1つ以上の洗浄工程を含み得る。洗浄により、未反応試薬を除去することができる。例えば、固相がマイクロタイターウェルのストリップを含む場合、洗浄物質または緩衝液をそれぞれの工程後にウェルと接触させる。使用することができる洗浄物質の例には、2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸緩衝液(MES)、またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などが含まれる。緩衝液のpHは、好ましくは、約pH6.0から約pH10.0である。緩衝液は、洗浄剤または界面活性剤、例えばツイーン20を含有し得る。

40

#### 【0189】

サンドイッチ免疫アッセイは、免疫アッセイに典型的な条件下で実施することができる。免疫アッセイに典型的な条件は、pHが約6.0から10.0であり、温度が約30から45である条件を含む。pHは、緩衝液、例えばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリエタノールアミン塩酸塩緩衝液(TEA)、Tris-HCl緩衝液などにより調節することができる。緩衝液は、通常の免疫アッセイにおいて使用される構成成分、例えば、界面活性剤、保存剤および血清タンパク質を含有し得る。各工程のそれぞれにおいて各構成成分を接触させる時間は、好適には、計測されるべき抗原、使用されるべき抗体、および固相のタイプなどに応じて確立することができる。

50

## 【0190】

## キット

本発明の方法において使用される材料は、周知の手順に従って生成されるキットの調製に好適である。したがって、本発明は、予後転帰または治療への応答を予測するために開示遺伝子の発現を定量するための遺伝子特異的または遺伝子選択的プローブおよび/またはプライマーが含まれ得る薬剤を含むキットを提供する。そのようなキットは、腫瘍試料、特に固定パラフィン包埋組織試料からのRNAの抽出のための試薬および/またはRNA増幅のための試薬を場合により含有し得る。さらに、キットは、試薬を本発明の方法におけるそれらの使用に関する識別記載またはラベルまたは説明書とともに場合により含み得る。キットは、本方法において利用される種々の試薬（典型的には濃縮形態）の1つ以上をそれぞれ有する容器（例として、本方法の自動化実施において使用に好適なマイクロタイタープレート）、例として、例えば、既製マイクロアレイ、緩衝液などを含み得る。

10

## 【0191】

本発明により提供される方法は、全体または一部を自動化することもできる。本発明は、本発明のFAS抗体を使用する免疫アッセイを実施するためのキットをさらに提供する。

## 【0192】

本発明の全ての態様は、例えば、高いピアソン相関係数により証明されるとおり、開示遺伝子（例えば、GEPまたはFASからの1つ以上の遺伝子）と同時発現される限定数の追加の遺伝子が、開示の遺伝子に加え、またはそれに代えて予後診断または予測試験に含まれるように実施することもできる。

20

## 【0193】

本発明を以下の非限定的な実施例によりさらに説明する。

## （実施例）

## 実施例1．遺伝子発現プロファイル（GEP）分析

術後腫瘍コレクションの遺伝子発現プロファイルを、臨床試験（NU9900）において2351人の前立腺癌患者について、および臨床試験（NU9901）において2911人の前立腺癌患者について作成した。2つの試験からの発現データをロバストマイクロアレイ分析（Robust Microarray Analysis）（RMA）により一緒に正規化した。全ての分析について使用される腺癌尺度は、初期疾患検出の12ヵ月以内の生検の中央判定に基づく前立腺組織における病理学的（癌）（PS-pCA）であった。2つの臨床試験サブセットに関連する計量値をテーブル3に示す。

30

## 【0194】

【表3】

テーブル3: 2つの臨床試験サブセットの比較

	試験識別子 (NUC9900) 前立腺腺癌 グリーソングレード5~7	試験識別子 (NUC9901) 前立腺腺癌 グリーソングレード5~7
遺伝子/タンパク質/ 血清バイオマーカーに基づく判定	有	有
患者設定	入院患者	入院患者
患者数	2351	2911
術後腫瘍回収	有	有
前立腺における PS-pCAを有する総患者数	2351	2911
遺伝子アレイタイプ	アフィメトリスHU133A - B	アフィメトリスHU133A - B

10

20

2つの試験からの遺伝子発現データを、生検組織試料を腺癌の患者から得る免疫組織化学法を介して得た。対照試料も得た。次いで、遺伝子発現プロファイル(GEP)を、生体試料から十分確立された方法に従って総RNAに基づき作成した(アフィメトリスジーンチップ発現分析技術マニュアル(Affymetrix GeneChip expression analysis technical manual)、アフィメトリス・インコーポレイテッド(Affymetrix, Inc)、サンタクララ、カリフォルニア参照)。手短に述べると、総RNAを生体試料から単離し、増幅し、cDNAを合成した。次いで、cDNAを検出可能な標識により標識し、アフィメトリスU133ジーンチップ(Affymetrix U133 GeneChip)ゲノムアレイとハイブリダイズさせ、アレイに結合した検出可能なcDNA標識からのシグナルの強度を計測することにより、アレイへのcDNAの結合を定量した。

30

## 【0195】

## 実施例2. 単一遺伝子マーカの同定

遺伝子オントロジー(GO)分析を、リー HKら(Lee HK et al.)著、2005年「遺伝子発現データセットの機能的分析のためのツール(Tool for functional analysis of gene expression data sets)」、BMCバイオインフォマティクス(BMC Bioinformatics)、第6巻:p.269;(遺伝子オントロジーコンソーシアム(The Gene Ontology Consortium)「遺伝子オントロジー:生物学の単一化のためのツール(Gene ontology: tool for the unification of biology)」。ネイチャー・ジェネティクス(Nat. Genet.)2000年5月;第25巻(1):p.25~9、<http://www.geneontology.org>も参照)により記載のとおり、遺伝子スコア再サンプリングアルゴリズム(Gene Score Re-sampling Algorithm)により10000反復で使用した。ジーンゴー(GeneGo)プログラムを使用して遺伝子ネットワークを構築した。初期分析は全ての腺癌の検出を使用した。

40

## 【0196】

## 実施例3. 複数プローブセット予測モデル

予測GPEP(遺伝子-タンパク質発現プロファイル)を開発するため、(a)全ての

50

試料にわたり低発現のプローブセット；および（b）全ての試料にわたり低分散のプローブセットを除去することにより21485個のプローブセットをフィルタリングした。これにより、後続の分析のための12385個のプローブセットをもたらした。正規化log<sub>2</sub>（強度）値は、それぞれのプローブセットについての試験特異的平均を差し引くことによりセンタリングされ、それぞれのプローブセットについてプールされた試験内標準偏差により割ることによってリスケーリングされた。

【0197】

2段階モデル構築アプローチを使用して最良の予測モデルに到達した。

単一遺伝子マーカ

次元縮小についての単一プローブセット分析を実施した。この分析は、ロジスティック回帰または線形回帰のいずれかによる発現レベルと応答状態との関係において2つの試験間で差を示したプローブセットについての初期探索を含む。この分析は609個のプローブセットをもたらした。

10

【0198】

複数遺伝子マーカ

複数プローブセット予測モデルを用いてフィットを試験した。ここで、グリーソングレード5～7の単一プローブセット分析から事前に選択されたプローブセットを出発点として使用した。次いで、正則化分類のために閾値勾配降下（threshold gradient descent）（TGD）法を使用してそれぞれの試験に対する初期予測モデルを別個にフィットさせた。再帰特徴部排除（recursive feature elimination）（RFE）を適用して予測精度の相当な損失なしでモデルを簡易化することを試みた。

20

【0199】

モデル選択基準は、50反復の4倍交差検証からのROC曲線下平均面積（AUC）であった。次いで、それぞれのRFEモデル系列から、ここでは、試験毎に1つで、2つの試験についての選択基準間の最大差を有するモデルを選択した。TGD法も使用して2つの個々のプローブセットの発現に基づき予測モデルを構築した。

【0200】

実施例4．転移の予測因子

PSA（前立腺特異的抗原）、FASおよびFAS/PSAの組合せの計測値の予測能を評価し、検出率を決定した。この率は、（a）全ての前立腺癌患者（グリーソンスコア5～7）についてのそれぞれの病態について、および（b）PSA単独、FAS/PSA組合せまたはFAS単独の発現レベルに基づき推定検出確率>0.5の任意閾値の患者のみについて決定した。分析の結果をテーブル4に示す。データから、疾患バイオマーカとしてのFASの使用がPSAと組み合わせた場合またはPSAなしの場合に予測力を示すことは明らかである。表から、PSA単独は転移検出の不十分な予測因子であることが把握することができる。対照的に、FAS単独は転移および早期転移検出の優秀な予測因子であった。

30

【0201】

【表 4】

テーブル4. 転移の予測因子としてのFAS

モデル	サブセット	試験識別子 (NUC9900)			試験識別子 (NUC9901)		
		R	N	検出率	R	N	検出率
PSA単独	術後評価一 転移の予測	1865	2351	0.79	2439	2911	0.83
FAS/PSA 組合せ	術後評価一 転移の予測	2196	2351	0.93	2719	2911	0.93
FAS単独	術後評価一 転移の予測	2231	2351	0.94	2799	2911	0.95

R=転移疾患の検出の真の数、N=サブセットにおける患者の総数、検出率=R/N。

#### 実施例 5 . 術後前立腺癌の侵襲的変化の予測：単変数および多変数分析

一連の予後診断因子、例として原発性腫瘍サイズ、グリーソングレード 5 ~ 7、組織学的グレード、免疫組織化学 (IHC) による FAS 状態およびアンドロゲン状態を、術後前立腺癌 (PS - pCA) 患者における早期再発 (ERec)、遅発再発 (LRec) および疾患関連死 (DRD) の予測について試験した。

#### 【0202】

試験は、少なくとも 120 ヶ月 (10 年) 追跡調査される 3261 人の男性 (平均年齢 65 歳) からのホルマリン固定パラフィン包埋原発性 PS - pCA 標本の評価を含んだ。回収された標本は、原発性腫瘍サイズ、グリーソングレード 5 ~ 7、組織学的グレード、免疫組織化学 (IHC) による FAS 状態およびアンドロゲン状態について評価した。この試験において、市販の抗 FAS 抗体を使用して IHC および ELISA アッセイを実施した。IHC について、使用される抗体は、ベチル・ラボラトリーズ (Bethyl Laboratories) (モンゴメリー、テキサス) からのアフィニティ精製ヒト抗 FASN 抗体 (カタログ番号 A301 - 324A) であった。ELISA 試験について、使用される抗体は、ノバス・バイオロジカルズ (Novus Biologicals) (リトルトン、コロラド) からの脂肪酸シンターゼ抗体ペア (Fatty Acid Synthase Antibody Pair) (カタログ番号 H00002194 - AP11) であった。このペアは、ウサギアフィニティ精製ポリクローナル抗 FASN である捕捉抗体 (100 ug) およびマウスモノクローナル抗 FASN、IgG1 カップである検出抗体 (20 ug) を含有する。患者は、疾患再発の初期症状前にアジュバント治療を受けなかった。

#### 【0203】

単変数分析時、IHC による FAS 発現レベルは、ERec (早期再発) ( $p < 0.0002$ ) LRec (遅発再発) ( $p < 0.0005$ ) ; および DRD (疾患関連死) ( $p < 0.0003$ ) を独立して予測した。

#### 【0204】

10

20

30

40

50

これらのデータを ( a ) 対照 ( 対照は、F A S の正常組織発現であり、零点として設定した ) に対して 1 % 未満の発現レベルにより表わされる非発現、( b ) 正常対照と比べて 2 5 % 未満の発現レベルにより表わされる境界発現および ( c ) 正常対照と比べて 5 0 % を上回る発現レベルにより表わされる高発現の F A S 発現レベルに層別化した場合、高発現腫瘍を有する ( c ) 群の患者は、9 . 4 の E R e c ( 4 . 8 ~ 2 2 . 4 の範囲 ) : 6 . 4 の L R e c ( 2 . 1 ~ 1 3 . 0 の範囲 ) および 1 9 . 2 の D R D ( 5 . 0 ~ 3 3 . 8 の範囲 ) の相対リスク ( 補正相対ハザード ) を有した。相対リスクまたは補正相対ハザードは、暴露群と非暴露群において生じる事象の確率の比である。

#### 【 0 2 0 5 】

腫瘍サイズ、組織学的グレード、グリーソングレードおよびアンドロゲン受容体状態は、E R e c も、L R e c も、D R D も一貫して予測しなかった。多変数分析時、I H C による F A S 発現レベルは、腫瘍サイズ、グレード、およびアンドロゲン受容体状態とは独立して E R e c、L R e c、および D R D を予測した。

10

#### 【 0 2 0 6 】

結果的に、データは、この一連の P S - p C A 患者において、I H C による F A S 発現レベルが腫瘍サイズ、グレード、およびアンドロゲン受容体状態とは独立して早期および遅発疾患再発ならびに疾患関連死を有意に予測したことを示す。したがって、基礎 F A S 免疫組織化学 ( ベンタナ ( V e n t a n a ) ) E L I S A ベース血清アッセイは、場合により本明細書に開示のアルゴリズムを適用してアッセイを解釈することを含め、正確な予後診断ツールおよび完全な併用診断として機能して追加の画像化関連試験、例えば二次 P E T、C T、超音波または前立腺 M R I を正当化することが結論づけられた。

20

#### 【 0 2 0 7 】

##### 実施例 6 : 抗 F A S モノクローナル抗体の調製

抗 F A S 抗体およびその抗体を用いる免疫組織化学 E L I S A アッセイは、2 0 1 0 年、1 0 月 1 4 日に公開された P C T 国際公開 P C T / U S 2 0 1 0 / 0 3 0 5 4 5 号明細書、および 2 0 1 1 年 3 月 1 7 日に公開された P C T / U S 2 0 1 0 / 0 4 6 7 7 3 号明細書にそれぞれ開示されている。それぞれの内容は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 2 0 8 】

手短に述べると、S C I D マウスを合成 F A S ペプチドにより免疫化し、アイヤーら ( I y e r e t a l . ) 著、インディアン・ジャーナル・オブ・メディカル・リサーチ ( I n d . J . M e d R e s . )、( 2 0 0 0 年 )、第 1 2 3 巻 : p . 6 5 1 ~ 5 6 4 ( 2 0 0 6 ) により記載の一般的手順に従ってハイブリドーマを樹立させることにより、4 つのネズミモノクローナル抗体を調製した。それぞれのマウスを配列番号 1 ~ 5 の 1 つのペプチドにより免疫化した。

30

#### 【 0 2 0 9 】

ヒト化モノクローナル抗体を、カータラ ( C a r t e r e t a l . ) 著、米国科学アカデミー紀要 ( P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A )、第 8 9 巻 : p . 4 2 8 5 ~ 8 9 ( 1 9 9 2 年 ) により記載のとおりハイブリドーマ A、B、D および E に由来するモノクローナル抗体から調製した。ヒト化モノクローナル抗体 ( M A b ) を以下、F A S 1、F A S 2、F A S 4 ( A T C C 寄託番号 : P T A - 1 0 8 1 1 ) および F A S 5 とそれぞれ称する。

40

#### 【 0 2 1 0 】

##### 実施例 7 : 化学発光のための E L I S A プロトコル

黒色ウェルを、適切な緩衝液 ( P B S / P B S - T ( 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 ) ) 中で希釈した 1 0 0  $\mu$  l / ウェルのコート抗体によりコートした。次いで、プレートを 4 ににおいて一晚インキュベートし、プレートシーラによりカバーした。次いで、プレートを 3 0 0  $\mu$  l の 5 x P B S - T により、ウェルウォッシュ・ヴェルサ・プレート ( W e l l w a s h V e r s a P l a t e ) 洗浄器 ( テルモ ( T h e r m o ) ) 上で洗浄した。次いで、プレートを、プレートシーラによりカバーしてインキュベートマイクロプレートシ

50

エーカ (VWR) 中で 100 rpm において振とうさせながら ELISA ブロッカーブロッキング溶液 (ELISA Blocker Blocking Solution) (300  $\mu$ l / ウェル) テルモ (Thermo) により 23 において 2 時間ブロッキングした。その後、プレートを 5 x PBS - T (300  $\mu$ l / ウェル) によりプレート洗浄器上で洗浄した。洗浄後、プレートをベンチ上に置かれたキムワイブ (kimwipe) (登録商標) 上でタッピングして過剰な液体を除去した。

【0211】

スタンダードを予め調製し、7 点希釈 (例えば、500 pg / ml からの PBS - T 中の 1% BSA 中) を含んだ。調製後、100  $\mu$ l のスタンダードまたは適切な緩衝液 (PBS - T、R & D 希釈剤 7、18 など) で新たに希釈された試料を、プレートシェーカ上で 100 rpm で攪拌しながら、プレートシラによりカバーしながら 23 において 2 時間ロードした。次いで、プレートを 5 x PBS - T (300  $\mu$ l / ウェル) によりプレート洗浄器上で洗浄した。

10

【0212】

検出抗体 (100  $\mu$ l / ウェル; 緩衝液、例えば PTS / PBS - T 中で適切な濃度に希釈) を、プレートシラによりカバーされ、プレートシェーカ上で 100 rpm で攪拌しながら 23 において 2 時間インキュベートする。次いで、プレートを 5 x PBS - T (300  $\mu$ l / ウェル) によりプレート洗浄器上で洗浄した。

【0213】

二次抗体 (100  $\mu$ l / ウェルの適切な二次抗体ストレプトアビジン - HRP、PBS 中 1 : 200 希釈) を、プレートシラによりカバーされ、プレートシェーカ上で 100 rpm で攪拌しながら 23 において 20 分間インキュベートする。あるいは、抗種 HRP 抗体を PBS 中 1 : 10000 においてプレートシェーカ上で 100 rpm で攪拌しながら 23 において 1 時間使用した。次いで、プレートを 5 x PBS - T (300  $\mu$ l / ウェル) によりプレート洗浄器上で洗浄した。

20

【0214】

シグナルは、100  $\mu$ l / ウェルの R & D グロセット基質 (R & D Glo set Substrate) を室温においてバイオテック (BioTek) FL800 x プレートリーダー中で 10 分間添加することにより増幅させた。

【0215】

前もって新たに調製した基質は、試薬 A (発光向上を安定化) を試薬 B (過酸化水素を安定化) と 1 : 2 の比で混合することにより作製する。

30

シグナルは、バイオテック (BioTek) FL800 x フルオロメータ (0.5 秒の読取時間) 上で、感度を標準曲線上の最大点に自動調節し、100000 の読取に設定して計測した。

【0216】

本発明において有用な ELISA サンドイッチアッセイには、内容が参照により全体として本明細書に組み込まれる 2011 年 3 月 17 日に公開された PCT 国際公開 PCT / US 2010 / 046773 号明細書に記載のものが含まれることに留意すべきである。

【0217】

40

実施例 8 : 試料調製およびインサイチュハイブリダイゼーションプロトコル

A . FISH のための FFPE 前処理プロトコル

FFPE 前処理の目的は、CEP および LSI DNA FISH プローブを用いる蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) における使用のために、正荷電スライド上に固定されたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片を調製することである。手順は、DNA FISH プローブを使用する場合、FISH について組織浸透性を最大化するように設計した。

【0218】

標本

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本を顕微鏡スライド上で調製した。

50

### 試薬および装置

調製は、キットにおいて提供される試薬（カタログ番号32-801210）の使用を含んだ。キットにおいて：無水エタノール（EtOH）、ヘモディークリーニング剤（Hemo-De Clearing Agent）（サイエンティフィック・セイフティー・ソルベンツ（Scientific Safety Solvents）カタログ番号HD-150）、精製水（蒸留または脱イオン）、コプリンジャー（16枚のスライド/8つの溝の最大キャパシティ）、37および80のウオーターバス（プローブアクセスについて73において1つ）は提供されない。

#### 【0219】

##### パラフィン前処理手順

10

試料スライド調製：使用される試料をホルマリン中で24～48時間固定する。

1. ミクロトームを使用して4～5 μm厚パラフィン切片を切断する。
2. 切片を精製（すなわち、三重蒸留）水のウオーターバス上に40において浮かべる。
3. 切片を正荷電スライド上にマウントする。
4. スライドを風乾させる。
5. スライドを56においてベークする。

#### 【0220】

##### スライドの脱パラフィン化

20

1. スライドをヘモディー（Hemo-De）中に周囲温度において5分間浸漬する。
2. 新たなヘモディー（Hemo-De）を毎回使用して工程1を2回繰り返す。
3. スライドを100%のEtOH中で周囲温度において1分間脱水する。繰り返す。
4. 所望により、スライドを2～5分間風乾させる。

#### 【0221】

##### スライド前処理

1. スライドを前処理溶液中に80において10分間浸漬する。必要により、2つのスライドをコプリンジャー中のそれぞれの溝中に裏を合わせて配置し、それぞれの端部の溝中には1つのスライドを配置することができる。端部のスライドについて、組織切片を有するスライドの面は、ジャーの中央に面してなければならない。

30

2. スライドを精製水中に3分間浸漬する。

#### 【0222】

##### プロテアーゼ前処理

1. スライドを精製水のジャーから取り出す。

2. 過剰の水を、スライド端をペーパータオル上で拭き取ることにより除去する。

3. スライドをプロテアーゼ溶液中に37において15分間浸漬する。（緩衝液の温度が37±1であることを確保してから250 mg（1つの管）プロテアーゼを添加する。必要により、2つのスライドをコプリンジャー中のそれぞれの溝中に裏面を合わせて配置し、それぞれの端部の溝中には1つのスライドを配置することができる。端部のスライドについて、組織切片を有するスライドの面は、ジャーの中央に面してなければならない。

40

4. スライドを精製水中に3分間浸漬する。
5. スライドを2～5分間風乾させる。

#### 【0223】

##### 試料の固定（任意選択）

試料の固定は、試料変性の際の組織損失を最小化するために実施する。この手順は、試料を変性バスマット中で処理する場合に高度に推奨されるが、共変性/ハイブリダイゼーションプロトコルを使用してスライドを処理する場合には必須でない。

1. 1つのコプリンジャーに50 mLの10%緩衝ホルマリンを充填する。3つの他のコプリンジャーに50 mLの70%エタノール、80%エタノールおよび100%エタノールをそれぞれ充填する。

50

2. スライドを10%緩衝ホルマリン中に周囲温度において10分間浸漬する。
3. スライドを精製水中に3分間浸漬する。
4. スライドを風乾させる。
5. 適切なプロンプトプロトコルにより進行させる。

#### B. FISH/ISH分析のための顕微鏡スライド上の中期染色体伸展物の調製

この手順の目的は、細胞遺伝学的分析のための顕微鏡スライド上のヒト中期染色体伸展物および間期核を調製することおよびFISH/ISHハイブリダイゼーション手順のための染色体調製物を調製することである。

#### 【0224】

##### 標本

3:1のメタノール:氷酢酸固定剤中のPHA刺激ヒトリンパ球。標本は「染色体分析のための末梢血細胞の調製(Preparation of Peripheral Blood Cells for Chromosome Analysis)」の下で下記のとおり調製する。

#### 【0225】

##### 試薬及び装置

#### 【0226】

#### 【表5】

項目	供給業者	カタログ番号
氷酢酸、500mL	VWR	JT9511-5
メタノール、1.0L	VWR	JT9049-2
ベンチトップ遠心分離機、4×100mLキャパシティ	VWR	53513-800
BDファルコン遠心分離管、コニカル、15mL	VWR	
VWRスーパーフロストプラスマイクロスライド	VWR	48311-703
球状部を有するガラスパスツールピペットまたはP-1000μピペット		
ガラスカバーを有する矩形染色皿		
蒸留水		
キムワイブ		
ペーパータオル		
位相差顕微鏡		
エタノール系列、70%、85%、100%		
2×SSC用の20×SSC原液		
37°Cウォーターバス		
PHA刺激白血球細胞ペレット		

#### 調製

固定剤:メタノール:氷酢酸、3:1。それぞれの使用前に調製する。

スライド:それぞれのスーパーフロストプラス(Superfrost Plus)スライドをそのフロスト加工表面上でそれに従ってラベルし、スライドを、ガラスカバーを有する矩形染色皿中に配置する。皿に蒸留水を充填し、4において浸してから使用してスライドを冷蔵する。これは、数日前に行うことができ、スライドを4において貯蔵することができる。

#### 【0227】

湿度:推奨周囲条件は25および33%の湿度である。

PHA刺激リンパ球細胞ペレット:PHA刺激リンパ球細胞ペレットを新たな固定剤中で15mLのコニカル管中で調製する。ペレットをその回収後に貯蔵した場合、それを200×gにおいて5分間遠心分離する。上澄みを吸引し、細胞懸濁液にわずかに混濁が見られるために十分な固定剤を添加する。細胞濃度は、症例間で変動し、実験的に決定すべきである。

#### 【0228】

エタノール系列：100%エタノールのv/v希釈物を精製H<sub>2</sub>Oにより調製する。使用の間、気密的にカバーして周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄する。蒸留水を使用してプラスチックコプリンジャー中で70%、85%および100%のエタノールを調製する。

#### 【0229】

2×SSC：100mLの20×SSC(pH5.3)を850mLの精製H<sub>2</sub>Oと十分に混合する。pHを計測し、NaOHによりpH7.0±0.2に調整する。精製H<sub>2</sub>Oを添加して最終容量を1リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。2×SSCをプラスチックコプリンジャー中で調製し、ウォーターバスを使用して37℃に予熱する。

10

#### 【0230】

##### 手順

細胞懸濁液をスライド上に滴下させる。

1. スーパーフロストプラス(Superfrost Plus)顕微鏡スライドを含有する染色皿を4℃の貯蔵から取り出し、実験台上に配置する。
2. 球状部を有するガラスパスツールピペット(またはP-1000ピペット)を使用し、細胞ペレットを固定剤中で穏やかに再懸濁させ、管ラック中にとっておく。
3. 1つの顕微鏡スライドを冷蔵染色ジャーから取り出し、それをフロスト加工端部により保持する。水の薄膜がスライド表面上に残留するように、水をスライドから抜き出す。
4. 適切なチップを有するP-1000ピペットを使用して細胞ペレットを再懸濁させ、次いで300μLの細胞懸濁液を抜き出す。
5. スライドをある角度(約45°)において保持し、細胞懸濁液をスライドの長さ方向下方に流し、フロスト加工端部において出発させる。懸濁液を流すとき、ピペットチップをフロスト加工領域直下のスライドの表面を一端部から他端部に横切って移動させる。
6. スライドの端部を乾燥ペーパータオル上に接触させることにより過剰の細胞懸濁液および固定剤をスライドから抜き出す。
7. スライドを約45°の角度において位置させ、細胞試料側が乾燥するまで向け、固定剤を蒸発させる。
8. スライド調製物を位相差顕微鏡により精査する(以下の注1~4参照)。
- 9a. スライドを意図される分析に必要なほど調製し続ける。
- 9b. 2×SSCを含有するコプリンジャー中にスライドを37℃において30分間配置することによりスライドを熟成させる。スライドをエタノール系列70%、85%および100%にそれぞれ1分間通す。風乾させる。あるいは、スライドを室温においてスライドボックス中で1から4週間熟成させる(以下の注5参照)。
10. スライドを-20℃において長期貯蔵用の乾燥容器中で貯蔵する。
11. 残りの標本を貯蔵する。適切数のスライドを作成した場合、残りの固定剤中の細胞懸濁液を含有する15mLのコニカル管を-20℃において貯蔵する。

20

30

#### 【0231】

##### 注

スライド調製物を位相差顕微鏡により調査して細胞密度および中期伸展を評価する。

1. 細胞密度が大きすぎる場合(位相差顕微鏡上の10×視野当たり約100を上回る核)、数滴の固定剤を細胞懸濁液に15mLのコニカル管中で添加し、細胞を新たなスライド上に滴下する工程を繰り返す。
2. 細胞密度が希薄すぎる場合(10×視野当たり10未満の核)、細胞を含有する15mLのコニカル遠心管を200×gにおいて5分間遠心分離し、過剰の固定剤を吸引し、ペレットを最初に添加したものよりも少ない固定剤中で再懸濁させ、細胞を新たなスライドを用いて滴下する工程を繰り返す。
3. 染色体の大多数が区別不能であるような不適切な伸展が存在する場合、空気流を減少させ、湿度を増加させ、または温度を減少させてスライドをよりゆっくりと乾燥させる。

40

50

細胞境界が区別可能でないような過剰伸展が存在する場合、空気流を増加させ、湿度を減少させ、または周囲温度を増加させてスライドをより速く乾燥させる。

4. 得られた中期細胞は、最小の重複を有するべきであり、可視的な細胞質を有するべきでなく、位相差顕微鏡下で染色体が灰色から暗灰色の媒体として出現する。

5. 細胞遺伝学的調製物の熟成によりタンパク質を変性させ、残留水および固定剤を除去し、ガラスへの材料の接着を向上させる。新たな非熟成スライドを熱変性する場合、それらはそれらの材料のほとんどを損失し、またはそれらの染色体は見かけが歪み、膨張する。スライドを広範に熟成させる場合、染色体が堅固すぎるためハイブリダイゼーション効率は減少する。

#### 【0232】

C. 染色体分析のための末梢血細胞の調製

このプロトコルの目的は、ヒトリンパ球を培養および回収して構造的および数的染色体異常を決定することならびにFISH/ISHハイブリダイゼーション手順のための染色体調製物を調製することである。

#### 【0233】

標本

3 ~ 5 mL のヘパリン添加全血を回収し (グリーン・トップ・バキュテイナー・チューブ (green top vacutainer tube)); ヘパリンナトリウムが推奨される抗凝固剤である。

#### 【0234】

#### 【表6】

#### 試薬及び装置

項目	供給業者	カタログ番号
氷酢酸、500mL	VWR	JT9511-5
メタノール、1.0L	VWR	JT9049-2
カリオマックスコロセミド溶液 (10 μg/mL)、10mL	ギブコ BRL	15212012
カリオマックス (登録商標) 塩化カリウム溶液、0.075M	ギブコ BRL	10575090
PB-MAX (商標) カリオタイプ培地 (1×)、液体	ギブコ BRL	12557021
ポータブルピペットエイドデバイス、リチャージブル	VWR	3498-103
ベントキャップを有するT25培養フラスコ、未処理、コーニング	VWR	89092-698
ベンチトップ遠心分離機、4×100mLキャパシティ	VWR	53513-800
BDファルコン遠心分離管、コニカル、15mL	VWR	
血清用ピペット、ディスポーサル、プラグ付、1mL、2mL、5mL、10mL、25mL	VWR	
VWRスーパーフロスプラスマイクロスライド、72のパック	VWR	48311-703
ウォーターバス、37°C		
5%CO <sub>2</sub> 、37°Cのインキュベータ		

#### 調製

PB-MAX核型分析培地 (1×) : PB-MAX核型分析培地を4 から8 において解凍する。培地を室温に加温し、穏やかに巡回させて混合してから使用する。PB-MAX核型分析培地を解凍し、簡便のためにより小さいアリコートに無菌的に移すことができる。これらのアリコートは冷凍し、使用時に解凍することができるが、複数の冷凍 - 解凍サイクルは回避すべきである。培養培地製品を使用する場合、光への長期曝露を回避する。

#### 【0235】

固定剤 : メタノール氷酢酸、3 : 1。それぞれの使用前に調製する。

カリオマックス ( K a r v o M A X ) ( 登録商標 ) 塩化カリウム溶液、 0 . 0 7 5 M : 低張液を 3 7 °C において予備加温してから使用する。

#### 【 0 2 3 6 】

##### 手順

短期血液培養物から有糸分裂細胞を調製する。

- 1 . 1 0 m L の P B - M A X 核型分析培地をそれぞれの無菌 T - 2 5 フラスコに添加してアッセイを設定する ( 注 1 参照 ) 。
- 2 . 0 . 7 5 m L のヘパリン添加血液をそれぞれの T - 2 5 フラスコに添加する。
- 3 . 細胞培養インキュベータ中で 3 7 °C ( 5 % C O <sub>2</sub> ) において 7 2 時間インキュベートする。フラスコはキャップを緩く閉めて直立させるべきである。
- 4 . 7 2 時間の培養後、 1 0 0 μ l のカリオマックス ( K a r y o M A X ) コルセミド溶液 ( 1 0 u g / m L ) をそれぞれのフラスコに添加し、十分に混合する。 3 7 °C において 3 0 分間インキュベートする。
- 5 . 3 0 分後、培養物を 1 5 m L の遠心管に写し、 1 2 0 0 r p m において 1 0 分間遠心分離する。培地を完全に除去し、但し、約 0 . 5 m L の上澄みを細胞ペレット上に残存させる。
- 6 . 細胞を残留媒体中で穏やかに再懸濁し、約 2 m L の予備加温 ( 3 7 °C ) カリオマックス ( K a r y o M A X ) 塩化カリウム溶液、 0 . 0 7 5 M を一滴ずつ穏やかに攪拌しながら慎重に添加する。追加の 8 m L の K C l を合計 1 0 m L で添加し；十分に混合する ( 注 2 参照 ) 。
- 7 . ウォーターバス中で 3 7 °C において 1 5 分間インキュベートする。
- 8 . 0 . 5 m L の新たに調製した固定剤を添加し、管に再度キャップし、反転させて混合する。
- 9 . 細胞を 1 2 0 0 r p m において 5 分間遠心分離し、上澄みを工程 5 と同様に除去する。
- 1 0 . 細胞を再懸濁させ、 1 0 m L の固定剤を添加することにより細胞を固定し；最初の 2 m L は穏やかに攪拌しながら滴加すべきである。
- 1 1 . 室温において 1 0 分間インキュベートし、細胞を遠心分離し、上澄みを工程 5 と同様に除去する。
- 1 2 . 固定手順をさらに 2 回繰り返す。遠心分離の間に細胞をインキュベートすることは必須でない。
- 1 3 . 最後の遠心分離後、細胞を 5 . 0 m L の固定剤中で再懸濁させる。
- 1 4 . 細胞ペレットを固定剤中で - 2 0 °C において貯蔵する。

#### 【 0 2 3 7 】

##### 注

- 1 . 末梢血中の白血球細胞は、マイトジェンにより刺激すべきであり、中期細胞の調製についての前提条件として細胞分裂を誘導させる。末梢ヒト血液細胞の調製において、T - リンパ球はフィトヘマグルチニンにより刺激する。P B - M A X 核型分析培地は、標準濃度の L - グルタミン、ゲンタマイシン硫酸塩、ウシ胎仔血清およびフィトヘマグルチニンを完全に補給した液体 R P M I - 1 6 4 0 培地から構成される。この配合は、P H A 刺激末梢血培養において使用される A C T ラボラトリー ( A C T L a b o r a t o r y ) マニュアル ( 1 9 9 1 年 ) に参照される末梢血培地に基づく。
- 2 . 低張処理は、細胞の膨張を引き起こし；処理の最適時間は異なる細胞タイプについて変動し、実験的に決定しなければならない。

#### 【 0 2 3 8 】

D . C E P ( 染色体エニュメレーションプローブ ( C h r o m o s o m e E n u m e r a t i o n P r o b e ) ) F I S H プロトコル

標識 C E P ( 染色体エニュメレーションプローブ ) D N A プローブを使用してヒト染色体中期伸展物および間期核を蛍光インサイチュハイブリダイゼーション ( F I S H ) により同定して例えば正常および腫瘍細胞の異数性を同定し、細胞遺伝学的試験における参照

プローブとして機能させ、ハイブリッド細胞系におけるヒト染色体を同定することができる。

【0239】

標本

固定された培養または未培養細胞学的標本の中期染色体および/または間期核を顕微鏡スライド上で調製する。

【0240】

【表7】

試薬及び装置

項目	供給業者	カタログ番号
ライニクラシックスターターキット。20/200/1000 $\mu$ ピペット	ライニン	PR-スタート
ライニンPR-10、0.5-10 $\mu$ L	ライニン	PR-10
リムーバブルカバーラック入りチップ、10 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-10S
リムーバブルカバーラック入りチップ、20 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-20S
リムーバブルカバーラック入りチップ、200 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-200S
リムーバブルカバーラック入りチップ、1000 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-1000S
スライドウオーマースペースセーバ、120V	VWR	15160-795
アナログウオーターバス、2.0L。37°C	VWR	89032-196
アナログウオーターバス、2.0L。70°C	VWR	89032-196
微小遠心管(1.5mL)、ナチュラル、qty250	VWR	20170-650
ミニフュージ、200g、6000rpm、120V	VWR	93000-196
VWRトレーサブルマルチカードタイマー	VWR	89087-400
60mL (2.0oz) ガラスコプリンジャー、ケース6	VWR	25457-006
コプリン染色ジャー、サイエンスウェア、それぞれ	VWR	47751-792
VWRカバーガラス用ピンセット、ストレート	VWR	82027-396
VWRスライドハイブリダイゼーションオープン、または42°Cインキュベータ	VWR	80087-000
ゴムセメント	VWR	100491-938
VWRクリアバス、殺藻剤、8 Oz。	VWR	54847-540
20 $\times$ SSC、1.0L、DEPC処理	VWR	RLMB-045
エタノール系列、70%、85%、100%		
ホルムアミド、500mL	VWR	JTM520-7
キムワイブ		
CEP4スペクトルオレンジプローブ	アボット	06J36-014
CEP17(D17Z1)スペクトルグリーンプローブ	アボット	06J37-027
CEPハイブリダイゼーション緩衝液、2 $\times$ 150 $\mu$ L	アボット	07J36-001
DAPI II対比染色剤、500 $\mu$ L $\times$ 2	アボット	06J50-001
退色防止剤溶液、240 $\mu$ L $\times$ 2	アボット	06J29-010
対照低レベル雌、95%XY、5%XX	アボット	07J21-011
フィルタ及び画像化システムを有する落射蛍光顕微鏡		

調製

注：示される場合、これらの溶液のpHを周囲温度において計測する。特に記載のない限り、ガラス電極を有するpHメータを使用する。

【0241】

2  $\times$  SSC 溶液：100 mL の 20  $\times$  SSC (pH 5.3) を 850 mL の精製 H<sub>2</sub>O と十分に混合する。pH を計測し、NaOH により pH 7.0  $\pm$  0.2 に調整する。精製 H<sub>2</sub>O を添加して最終容量を 1 リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は 6 カ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。2  $\times$  SSC をプラスチックコプリンジャー中で調製し、ウオーターバスを使用して 37 に予熱する。

【0242】

変性溶液（70%のホルムアミド / 2 × SSC）：49 mLの超高純度ホルムアミド、7 mLの20 × SSC（pH 5.3）および14 mLの精製H<sub>2</sub>Oをガラスコプリンジャー中で十分に混合する。pH指示ストリップを使用してpHを計測してpHが7.0～8.0であることを確認する。使用の間、2～8℃においてカバーして貯蔵する。7日後に廃棄する。ガラスコプリンジャー中で調製し、73 ± 1℃に加熱する。

【0243】

0.4 × SSC / 0.3% NP-40 洗浄溶液：20 mLの20 × SSC（pH 5.3）を950 mLの精製H<sub>2</sub>Oと十分に混合する。3 mLのNP-40を添加する。NP-40が完全に溶解されるまで十分に混合する。pHを計測し、NaOHによりpH 7.0～7.5に調整する。精製H<sub>2</sub>Oを添加して溶液の最終容量を1リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。ガラスコプリンジャー中で調製し、73 ± 1℃に加熱する。

10

【0244】

2 × SSC / 0.1% NP-40 洗浄溶液：100 mLの20 × SSC（pH 5.3）を850 mLの精製H<sub>2</sub>Oと十分に混合する。1 mLのNP-40を添加する。pHを計測し、NaOHによりpH 7.0 ± 0.2に調整する。精製H<sub>2</sub>Oを添加して最終容量を1リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。ガラスコプリンジャー中で調製し、73 ± 1℃に加熱する。

20

【0245】

エタノール溶液（70%、85%、100%）：100%エタノールのv/v希釈物を精製H<sub>2</sub>Oにより調製する。使用の間、気密的にカバーして周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄する。蒸留水を使用してプラスチックコプリンジャー中で70%、85%および100%のエタノールを調製する。

【0246】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション手順  
プローブ調製

1. 室温において、7 μLのCEPハイブリダイゼーション緩衝液、1 μLのCEP DNAプローブ、および2 μLの精製H<sub>2</sub>Oを混合する。1～3秒間遠心分離し、ボルテックスにかけ、次いで再度遠心分離する。  
2. 73℃のウオーターバス中で5分間加熱し、次いで45～50℃に設定されたスライドウォーマ上に配置する。  
3. ボルテックスにかけて混合する。管を微小遠心機中で短時間（1～3秒間）回転させて内容物を管の底部に運ぶ。再度穏やかにボルテックスにかけて混合する。

30

【0247】

標本DNA（対照スライドまたはPHA刺激末梢血リンパ球）の変性

1. ハイブリダイゼーションチャンバ（気密容器）を、42℃のインキュベータ中にそれを配置することにより42℃に予備加温させてからスライドを調製する。  
2. 変性溶液をコプリンジャーに添加し、73 ± 1℃のウオーターバス中に少なくとも30分間配置する。使用前に溶液温度を確認する。  
3. 調製スライドを変性溶液中に73 ± 1℃において5分間浸漬することにより標本DNAを変性させる。コプリンジャー当たり1回に5つ以上のスライドを変性させない。変性溶液のpHが7.0～8.0であることをそれぞれの使用前に確認する。  
4. ピンセットを使用することによりスライドを変性溶液から取り出し、70%のエタノール洗浄溶液中に室温において直ちに配置する。スライドを攪拌させてホルムアミドを除去する。スライドをエタノール洗浄物中で1分間立たせる。  
5. スライドを70%のエタノールから取り出す。工程4を85%のエタノール、次いで100%のエタノールを用いて繰り返す。  
6. スライドの底端部を吸取紙に接触させることにより過剰のエタノールをスライドから

40

50

抜き出し、スライドの下面を乾燥実験室ワイブにより拭き取る。

7. スライドを45～50のスライドウオーマ上に2分間以下で配置してからプローブ溶液をアプライする準備が整う。

注：ハイブリダイゼーションのタイミングが、プローブが準備される前に2分を上回ってスライドが準備されるようなものである場合、スライドは100%のエタノールのジャー中で残留すべきである。スライドは、それをスライドウオーマ上に配置する前に風乾させない。

#### 【0248】

##### ハイブリダイゼーション

1. プローブ溶液の10 $\mu$ Lのアリコートのスライドの標的領域にアプライする。直ちに、22mm $\times$ 22mmガラスカバースリップをプローブ溶液上に配置し、溶液をカバースリップ下で均等に拡散させる。気泡はハイブリダイゼーションを妨げ、回避すべきである。

a. 注：カバースリップをアプライする前にプローブ溶液を複数の標的領域上にピペッティングしない。

2. スライドを予備加温42 $^{\circ}$ Cハイブリダイゼーションチャンバ中に配置し、チャンバを気密蓋によりカバーする。

3. スライドを含有するチャンバを42 $^{\circ}$ Cのインキュベータ中に配置し、ハイブリダイゼーションを少なくとも30分間進行させる。

注：一部の標本において、十分なシグナル強度のためにより長いハイブリダイゼーション時間が要求され得る。インキュベーションは、一晚(16時間)実施することができる。

1時間よりも長いインキュベーションについては、カバースリップは除去可能なシーラント、例えばゴムセメントを使用してシールしなければならない。手順を以下に記載する。

A. ゴムセメントを5mLシリンジ中に抜き出す。カバースリップおよびスライドと重なるカバースリップ周縁付近の少量のゴムセメントを滲出させ、それによりカバースリップ周囲にシールを形成させる。

B. スライドを加湿ハイブリダイゼーションチャンバ(容器の側面に貼り付けされた約1インチ $\times$ 3インチの一片の湿潤吸収紙またはペーパータオルを有する気密容器)中に配置する。

C. チャンバを気密蓋によりカバーし、所望により1から16時間インキュベートする。

D. インキュベーション後、ゴムセメントを抜くことによりゴムセメントをカバースリップから除去する。

#### 【0249】

##### ハイブリダイゼーション後洗浄

1. 0.4 $\times$ SSC(pH7.0~7.5)をコプリンジャーに添加する。コプリンジャーを73 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cのウオーバス中に少なくとも30分間配置することにより、または溶液温度が73 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cに到達するまで0.4 $\times$ SSC溶液を予備加温する。

a. 注：適正な温度範囲を維持するため、4つのスライドを加熱洗浄溶液中に一度に配置すべきである。4つより少ないスライドをハイブリダイズさせる場合、室温顕微鏡スライド(標本がアプレイされていない)を使用してスライドの数を4つにすることができる。4つより多いスライドをハイブリダイズさせる場合、それらは2つ以上のバッチ中で洗浄しなければならない。洗浄溶液の温度を73 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cに戻してからそれぞれのバッチを洗浄しなければならない。

2. カバースリップを第1のスライドの標的領域から除去し、0.4 $\times$ SSCを含有する73 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cのコプリンジャー中に直ちにスライドを配置する。スライドを1~3秒間攪拌する。他の3つのスライドについても繰り返し、73 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cにおいて2分間インキュベートする。

3. 注：スライドのいずれも洗浄バス中に配置する前にカバースリップをいくつかのスライドから除去しない。最後のスライドを洗浄バスに添加したときに2分間のインキュベ-

10

20

30

40

50

ションの計時を開始する。

4. それぞれのスライドを洗浄バスから取り出し、 $2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{NP-40}$ のジャー中に室温において5～60秒間配置し、スライドをバス中に配置するときに1～3秒間攪拌する。

5. スライドを暗所において風乾させる（密封された引き出しまたは密封された戸棚内部の棚が十分である）。

6.  $10 \mu\text{L}$ のDAPI対比染色剤（counterstain）をスライドの標的領域にアプライし、ガラスカバースリップをアプライする。シグナル計数前にスライドを暗所に貯蔵する。

#### 【0250】

##### 貯蔵

ハイブリダイズさせたスライド（カバースリップを有する）を $-20^\circ\text{C}$ において暗所で貯蔵する。これらの条件下、スライドを顕著な蛍光シグナル強度の損失なしで最大12ヵ月貯蔵することができる。長期貯蔵については、カバースリップをシールして乾燥を防止し、スライドを $-20^\circ\text{C}$ において貯蔵する。

#### 【0251】

##### シグナル計数 - スライド適合性の評価

以下の基準を使用してスライド適合性を評価する：

A. プローブシグナル強度：シグナルは、明るく、明確で、容易に評価可能であるべきである。シグナルは、明るくコンパクトで卵形状または糸状で拡散性で卵形状のいずれかであるべきである。

B. バックグラウンド：バックグラウンドは、暗色または黒色を呈し、蛍光粒子もかすみも有さないべきである。

C. 交差ハイブリダイゼーション / 標的特異性：プローブは、標的（染色体のセントロメア）のみをハイブリダイズさせ、発光させるべきである。中期伸展物を評価して遺伝子座特異性を確認し、非標的配列へのあらゆる交差ハイブリダイゼーションを同定すべきである。細胞の少なくとも98%は、許容可能なハイブリダイゼーションのための1つ以上のシグナルを示すべきである。

#### 【0252】

##### シグナル計数 - 最適視界および評価可能な核の選択

$25 \times$ 対物レンズを使用してハイブリダイズした領域を検査し、標本分布を試験する。標本が希薄に分布し、間期核がほとんど重複しておらず、いくつかの間期核を視野内で検査することができる領域を選択する。細胞の分布が稠密であり、細胞が重複しており、または個々の核の核境界が識別不能である領域を回避する。細胞の塊を含有する領域を回避する。明確なシグナルを有する細胞のみを計数する。

#### 【0253】

##### シグナル計数 - 計数検査

$40 \times$ または $63 \times$ 対物レンズを使用して選択領域の左上象限における分析を開始し、左から右に検査し、それぞれの評価可能な間期細胞の核境界内のシグナルの数をカウントする。高細胞密度を有するスライド上の領域は、ランダムにスキップして標的領域全体を検査すべきである。500個の間期核を計数および分析するまで検査を継続する。

#### 【0254】

##### シグナル計数 - 間期計数

$40 \times$ または $63 \times$ 対物レンズを使用してそれぞれの評価可能な間期核中の蛍光シグナルを計数する。より高倍率（例えば、 $63 \times$ または $100 \times$ ）の対物レンズを使用してシグナルの分割または拡散についての問題を確認または解決すべきである。これらの指針に従う：

A. ごく近接し、ほぼ同一サイズであるが可視的な結合により連結していない2つのシグナルを2つのシグナルとしてカウントする。

B. シグナルの拡散が連続的であり、許容可能な境界内にある場合、拡散シグナルを1つ

10

20

30

40

50

のシグナルとしてカウントする。

C. 可視的な結合により連結している2つの小さいシグナルを1つのシグナルとしてカウントする。

D. 0、1、2、3、4、または>4つのシグナルを有する核の数を計数する。視野に存在する少なくとも1つのシグナルを有する他の核が存在する場合にのみ、シグナルを有さない核をカウントする。計数の精度が不確かな場合、スライドの別の領域において計数を繰り返す。

E. 不明確なシグナルを有する核は計数しない。

【0255】

E. LSI (遺伝子座特異的識別子 (Locus Specific Identifier)) FISH プロトコル

このプロトコルの目的は、細胞遺伝学的標本上でLSI (遺伝子座特異的識別子 (Locus Specific Identifier)) プローブを使用してFISHを実施することである。標識LSI DNAプローブを使用してヒト中期染色体伸展物および間期核を、ならびに蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) により遺伝子異常を同定する。例えば、LSI BCR/ABLプローブセットは、9q34上のABL遺伝子座および22q1.2上のBCR遺伝子座の融合 (転座 (9;22) (q34;q11)) を検出するために設計されている。

【0256】

標本

固定された培養または未培養細胞学的標本の中期染色体および/または間期核を顕微鏡スライド上で調製する。

【0257】

10

20

【表 8】

## 試薬及び装置

項目	供給業者	カタログ番号
ライニン・クラシック・スターター・キット。20/200/1000 $\mu$ ピペット	ライニン	PR-スタート
ライニンPR-10、0.5~10 $\mu$ L	ライニン	PR-10
リムーバブルカバーラック入りチップ、10 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-10S
リムーバブルカバーラック入りチップ、20 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-20S
リムーバブルカバーラック入りチップ、200 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-200S
リムーバブルカバーラック入りチップ、1000 $\mu$ L。事前滅菌	ライニン	RT-1000S
スライドウオーマースペースセーバ、120V	VWR	15160-795
アナログウオーターバス、2.0L。37°C	VWR	89032-196
アナログウオーターバス、2.0L。70°C	VWR	89032-196
微小遠心管 (1.5mL)、ナチュラル、qty250	VWR	20170-650
ミニフュージ、200g、6000rpm、120V	VWR	93000-196
VWRトレーサブルマルチカラードタイマー	VWR	89087-400
60mL (2.0oz) ガラスコプリンジャー、ケース6	VWR	25457-006
コプリン染色ジャー、サイエンスウェア、それぞれ	VWR	47751-792
VWRカバーガラス用ピンセット、ストレート	VWR	82027-396
VWRスライドハイブリダイゼーションオープン、または42°Cインキュベータ	VWR	80087-000
ゴムセメント	VWR	100491-938
VWRクリアバス、殺藻剤、8 oz。	VWR	54847-540
20 $\times$ SSC、1.0L、DEPC処理	VWR	RLMB-045
エタノール系列、70%、85%、100%		
ホルムアミド、500mL	VWR	JTM520-7
キムワイブ		
ヴェシスLSI BCR/ABLデュアルカラー、 シングルフュージョントランスロケーションプローブ	アボット	05J77-001
LSIハイブリダイゼーション緩衝液、2 $\times$ 150 $\mu$ L	アボット	07J36-001
DAPI II対比染色剤、500 $\mu$ L $\times$ 2	アボット	06J50-001
退色防止剤溶液、240 $\mu$ L $\times$ 2	アボット	06J29-010
対照低レベル雌、95%XY、5%XX	アボット	07J21-011
フィルタ及び画像化システムを有する落射蛍光顕微鏡		

## 調製

示される場合、これらの溶液のpHを周囲温度において計測する。特に記載のない限り、ガラス電極を有するpHメータを使用する。

## 【0258】

2 $\times$ SSC溶液：100mLの20 $\times$ SSC (pH5.3)を850mLの精製H<sub>2</sub>Oと十分に混合する。pHを計測し、NaOHによりpH7.0 $\pm$ 0.2に調整する。精製H<sub>2</sub>Oを添加して最終容量を1リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。2 $\times$ SSCをプラスチックコプリンジャー中で調製し、ウオーターバスを使用して37に予熱する。

## 【0259】

変性溶液 (70%のホルムアミド / 2 $\times$ SSC) : 49mLの超高純度ホルムアミド、7mLの20 $\times$ SSC (pH5.3)および14mLの精製H<sub>2</sub>Oをガラスコプリンジャー中で十分に混合する。pH指示ストリップを使用してpHを計測してpHが7.0~8.0であることを確認する。使用の間、2~8においてカバーして貯蔵する。7日後に廃棄する。ガラスコプリンジャー中で調製し、73+/-1に加熱する。

## 【0260】

0.4 $\times$ SSC / 0.3%NP-40洗浄溶液：20mLの20 $\times$ SSC (pH5.3

)を950 mLの精製H<sub>2</sub>Oと十分に混合する。3 mLのNP-40を添加する。NP-40が完全に溶解されるまで十分に混合する。pHを計測し、NaOHによりpH7.0~7.5に調整する。精製H<sub>2</sub>Oを添加して溶液の最終容量を1リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。ガラスコプリンジャー中で調製し、73+/-1 に加熱する。

#### 【0261】

2xSSC/0.1%NP-40洗浄溶液：100 mLの20xSSC(pH5.3)を850 mLの精製H<sub>2</sub>Oと十分に混合する。1 mLのNP-40を添加する。pHを計測し、NaOHによりpH7.0±0.2に調整する。精製H<sub>2</sub>Oを添加して最終容量を1リットルにする。周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄し、または溶液に混濁もしくは汚染が見られた場合は速やかに廃棄する。ガラスコプリンジャー中で調製し、73+/-1 に加熱する。

10

#### 【0262】

エタノール溶液(70%、85%、100%)：100%エタノールのv/v希釈物を精製H<sub>2</sub>Oにより調製する。使用の間、気密的にカバーして周囲温度において貯蔵する。原液は6ヵ月後に廃棄する。蒸留水を使用してプラスチックコプリンジャー中で70%、85%および100%のエタノールを調製する。

#### 【0263】

##### LSIプローブ調製

室温において、7 uLのLSIハイブリダイゼーション緩衝液、1 uLのLSI DNAプローブ、および2 uLの精製H<sub>2</sub>Oを混合する。1~3秒間遠心分離し、ボルテックスにかけ、次いで再度遠心分離する。使用時まで氷上に配置する。

20

#### 【0264】

##### 蛍光インサイチュハイブリダイゼーション手順

標本DNA(対照スライドまたはPHA刺激末梢血リンパ球)の変性

1. ハイブリダイゼーションチャンバ(気密容器)を、37 のインキュベータ中にそれを配置することにより37 に予備加熱させてからスライドを調製する。

2. 変性溶液をコプリンジャーに添加し、73±1 のウオーターバス中に少なくとも30分間配置する。使用前に溶液温度を確認する。

30

3. 調製スライドを変性溶液中に73±1 において5分間浸漬することにより標本DNAを変性させる。コプリンジャー当たり1回に5つ以上のスライドを変性させない。変性溶液のpHが7.0~8.0であることをそれぞれの使用前に確認する。

4. ピンセットを使用することによりスライドを変性溶液から取り出し、70%のエタノール洗浄溶液中に室温において直ちに配置する。スライドを攪拌させてホルムアミドを除去する。スライドをエタノール洗浄物中で1分間立たせる。

5. スライドを70%のエタノールから取り出す。工程4を85%のエタノール、次いで100%のエタノールを用いて繰り返す。

6. スライドの底端部を吸収紙に接触させることにより過剰のエタノールをスライドから抜き出し、スライドの下面を乾燥実験室ワイブにより拭き取る。

40

7. スライドを45~50 のスライドウオーマ上に2分間以下で配置してからプローブ溶液をアプライする準備が整う。

a. 注：ハイブリダイゼーションのタイミングが、プローブが準備される前に2分を上回ってスライドが準備されるようなものである場合、スライドは100%のエタノールのジャー中で残留すべきである。スライドは、それをスライドウオーマ上に配置する前に風乾させない。

#### 【0265】

##### プローブ調製

1. 調製したプローブを73 のウオーターバス中で5分間加熱する。

2. 45~50 に設定したスライドウオーマ上にスライドを配置する。すぐに使用しな

50

い場合、管をホイルによりカバーしてそれを光から遮断する。

【0266】

ハイブリダイゼーション

1. プローブ溶液の  $10 \mu\text{L}$  のアリコートを手滑の標的領域にアプライする。直ちに、 $22 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$  ガラスカバースリップをプローブ溶液上に配置し、溶液をカバースリップ下で均等に拡散させる。気泡はハイブリダイゼーションを妨げ、回避すべきである。カバースリップをゴムセメントによりシールする。

a. 注：カバースリップをアプライする前にプローブ溶液を複数の標的領域上にピペティングしない。

2. スライドを予備加温  $37^\circ\text{C}$  ハイブリダイゼーションチャンバ中に配置し、チャンバを気密蓋によりカバーする。

3. スライドを含有するチャンバを  $37^\circ\text{C}$  のインキュベータ中に配置し、ハイブリダイゼーションを  $12 \sim 16$  時間進行させる。

【0267】

ハイブリダイゼーション後洗浄

1.  $0.4 \times \text{SSC}$  ( $\text{pH } 7.0 \sim 7.5$ ) をコプリンジャーに添加する。コプリンジャーを  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  のウォータバス中に少なくとも  $30$  分間配置することにより、または溶液温度が  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  に到達するまで  $0.4 \times \text{SSC}$  溶液を予備加温する。

a. 注：適正な温度範囲を維持するため、4つのスライドを加熱洗浄溶液中に一度に配置しなければならない。4つより少ないスライドをハイブリダイズさせる場合、室温顕微鏡スライド（標本がアプレイされていない）を使用してスライドの数を4つにすることができる。4つより多いスライドをハイブリダイズさせる場合、それらは2つ以上のバッチ中で洗浄しなければならない。洗浄溶液の温度を  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  に戻してからそれぞれのバッチを洗浄しなければならない。

2. カバースリップを第1のスライドの標的領域から除去し、 $0.4 \times \text{SSC}$  を含有する  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  のコプリンジャー中に直ちにスライドを配置する。スライドを  $1 \sim 3$  秒間攪拌する。他の3つのスライドについても繰り返し、 $73 \pm 1^\circ\text{C}$  において2分間インキュベートする。

a. 注：スライドのいずれも洗浄バス中に配置する前にカバースリップをいくつかのスライドから除去しない。最後のスライドを洗浄バスに添加したときに2分間のインキュベーションの計時を開始する。

3. それぞれのスライドを洗浄バスから取り出し、 $2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{ NP-40}$  のジャー中に室温において  $5 \sim 60$  秒間配置し、スライドをバス中に配置するときに  $1 \sim 3$  秒間攪拌する。

4. スライドを暗所において風乾させる（密封された引き出しまたは密封された戸棚内部の棚が十分である）。

5.  $10 \mu\text{L}$  の  $\text{DAPI} / \text{I} / \text{I}$  対比染色剤をスライドの標的領域にアプライし、ガラスカバースリップをアプライする。シグナル計数前にスライドを暗所に貯蔵する。

【0268】

貯蔵

ハイブリダイズさせたスライド（カバースリップを有する）を  $-20^\circ\text{C}$  において暗所で貯蔵する。これらの条件下、スライドを顕著な蛍光シグナル強度の損失なしで最大  $12$  ヶ月貯蔵することができる。長期貯蔵については、カバースリップをシールして乾燥を防止し、スライドを  $-20^\circ\text{C}$  において貯蔵する。

【0269】

シグナル分析

スライド適合性の評価

三重バンドパスフィルタ  $\text{DAPI} / \text{FITC} / \text{テキサスレッド}$  は、3つ全てのフルオロフォアの同時観察に最適である。以下の基準を使用してスライド適合性を評価する：

A. プローブシグナル強度：シグナルは、明るく、明確で、容易に評価可能であるべきで

10

20

30

40

50

ある。シグナルは、明るくコンパクトで卵形状または糸状で拡散性で卵形状のいずれかであるべきである。

B. バックグラウンド：バックグラウンドは、暗色または黒色を呈し、蛍光粒子もかすみも有さないべきである。

C. 交差ハイブリダイゼーション/標的特異性：プローブは、標的のみをハイブリダイズさせ、発光させるべきである。中期伸展物を評価して遺伝子座特異性を確認し、非標的配列へのあらゆる交差ハイブリダイゼーションを同定すべきである。

#### 【0270】

最適視界および評価可能な核の選択

25×対物レンズを使用してハイブリダイズした領域を検査し、標本分布を試験する。標本が希薄に分布し、間期核がほとんど重複しておらず、いくつかの間期核を視野内で検査することができる領域を選択する。細胞の分布が稠密であり、細胞が重複しており、または個々の核の核境界が識別不能である領域を回避する。細胞の塊を含有する領域を回避する。明確なシグナルを有する細胞のみを計数する。

10

#### 【0271】

間期計数

63×または100×対物レンズを使用してそれぞれの評価可能な間期核中の蛍光シグナルを分析する。正常細胞中で、これらのプローブは明確な赤色(R)および緑色(G)スポットとして、それぞれの相同物について1つ出現する(2G2R構造をもたらす)。t(9:22)患者において、正常染色体9および22の赤色および緑色シグナルに加え、それぞれ1つの黄色、白色、または黄色-白色(Y)融合シグナルが存在すべきである(1R1G1Y)。

20

#### 【0272】

実施例9：グリーンスコアと遺伝子発現との関係

12人の男性患者から得られた前立腺組織の試験において、遺伝子発現(変動部位における)と、ある予後診断変数との関係を調査した。計測される遺伝子発現変数には、0が発現の未検出を表す、0、微量、1、2または3のグレードスケールでのFAS(脂肪酸シンターゼ; GenBank NM\_004104; 配列番号6)、USP2a、(ユビキチン特異的ペプチダーゼ2; GenBank NM004205(アイソフォーム1:長いバリエーション; 配列番号7)、pAKT(v-aktネズミ胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ1; GenBank NM005163バリエーション1:長いバージョン; 配列番号8)およびNPY(ニューロペプチドY; GenBank NM000905; 配列番号9)のレベルが含まれる。零または未発現は、正常組織中の遺伝子のベースライン発現と等価に設定されたことに留意すべきである。したがって、0のグレードまたはレベルは、発現が当該遺伝子の正常組織の発現と等価であったことを意味する。微量は、正常組織発現と比べて0を上回るが1%未満が検出されたことを意味し、1は、正常組織と比べて1~25%の発現が検出されたことを意味し、2は、正常組織と比べて25~75%の発現が検出されたことを意味し、3は、対照と比較して75~100%の発現が検出されたことを意味する。正常組織において、微量のFAS、USP2aおよびNPYが常に存在する。症例の少なくとも90%において、pAKTが正常組織中に見出される。発現レベルがいかに関連するかを評価した。

30

40

#### 【0273】

さらに、試験は(a)癌性部位(癌)と癌性部位の辺縁からの部位(辺縁)との間で遺伝子発現の有意差が存在するかどうかおよび(b)癌性部位の辺縁からの部位(辺縁)と非癌性部位(正常)からの部位との間で遺伝子発現の有意差が存在するかどうかを調査した。データをテーブル5に示す。

#### 【0274】

【表 9】

テーブル5. 遺伝子発現の比較分析

患者	年齢	T	手術	Dx	FAS	USP2a	pAkt	NPY
患者は4つの計測値を有する (癌性部位から3つ及び非癌性部位から1つ)								
A	85	0	生検	Adeno CA GL6 (3+3)	1	3	1	C3
A	85	0	生検	Adeno CA GL6 (3+3)	微量	3	2	C1
A	85	0	生検	Adeno CA GL6 (3+3)	0	3	2	C3
A	85			正常	無	無	無	C2
B	84	T1b	切除	Adeno CA GL6 (3+3)	0	2	1	C2
B	84	T1b	切除	Adeno CA GL6 (3+3)	無	無	無	NC
B	84	T1b	切除	Adeno CA GL6 (3+3)	1	3	1	C1
B	84			正常	1	3	2	C1; N 微量
C	79	1	切除	Adeno CA GL9 (4+5)	3	2	2	C1, N 微量
C	79	1	切除	Adeno CA GL9 (4+5)	3	2	2	C1
C	79	1	切除	Adeno CA GL9 (4+5)	3	2	2	C1, N 微量
C	79			正常	3 (腫瘍)	2 (腫瘍)	1 (腫瘍)	C1 (腫瘍)
D	74	1	切除	Adeno CA GL8 (4+4)	3	3	1	C1, N1
D	74	1	切除	Adeno CA GL8 (4+4)	無	無	無	無
D	74	1	切除	Adeno CA GL8 (4+4)	3	3	1	C1, N1
D	74			正常	2	3	1	C1, N1

10

20

30

E	68	T1b	切除	良性+癌 GL3	2	2	0	C1,N1
E	68	T1b	切除	良性+癌 GL3	2	2	1	C1, N 微量
E	68	T1b	切除	良性+癌 GL3	2	2	1	C1,N1
E	68			正常	1	3	2	C2
F	78	T1b	切除	Adeno CA GL7 (4+3)	2	1	1	C1
F	78	T1b	切除	Adeno CA GL7 (4+3)	2	2	1	C1
F	78	T1b	切除	Adeno CA GL7 (4+3)	NG	NG	NG	NG
F	78			正常	NG	NG	NG	NG
G	78	T1b	切除	Adeno CA GL8-9	3	3	3	C2
G	78	T1b	切除	Adeno CA GL8-9	3	3	3	C2, N1
G	78	T1b	切除	Adeno CA GL8-9	3	3	3	C2, N 微量
G	78			正常	NG	NG	NG	NG
H	65	T1b	切除	癌 GL8 (4+4)	3	1	2	C2, N1
H	65	T1b	切除	癌 GL8 (4+4)	3	1	1	NG
H	65	T1b	切除	癌 GL8 (4+4)	2	2	1	C3, N2
H	65			正常	1	3	2	C3
I	65	1	切除	混合 Adeno CA	NG	NG	NG	NG
I	65	1	切除	混合 Adeno CA	2	3	2	C1, N1
I	65	1	切除	混合 Adeno CA	2	3	3	C1, N1
I	65			正常	NG	NG	NG	NG
J	80	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4))	2	2	1	C2, N1
J	80	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	NG	NG	NG	NG
J	80	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	NG	烧灼: 完全な 腺なし	烧灼: 完全な 腺なし	NG
J	80			正常	NG	NG	NG	C2, N 微量
K	75	T1b	切除	NULL	T: 3	T: 3	T: 2	T: C1, N1
K	75	T1b	切除	NULL	T: 3	T: 3	T: 1	T: C1, N1
K	75	T1b	切除	NULL	T: 3	T: 3	T: 1	T: C1, N1
K	75			正常	2	3	2	C2, N 微量
L	94	TIS	切除	病巣の Adeno CA GL6 (3+3)	N: 2	N: 3	N: 2	正常 : C1, N 微量
L	94	TIS	切除	病巣の Adeno CA GL6 (3+3)	N: 2	N: 3	N: 2	正常 : C1, N 微量; 腫瘍 : C1, N 微量

10

20

30

40

L	94	TIS	切除	病巣の Adeno CA GL6 (3+3)	3	3	2	C1, N1
L	94			正常	NG	NG	NG	端部における 歪んだ腺; 評価不能
M	72	T1b	切除	Adeno CA GL6 (3+3)	3	2	2	C1, N1
M	72	T1b	切除	Adeno CA GL6 (3+3)	3	2	2	C1, N1
M	72	T1b	切除	Adeno CA GL6 (3+3)	3	2	2	C1, N1
M	72			正常	微量	3	1	C1, N1
患者は癌性部位から3つの計測値のみを有する								
N	64	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	1	1	2	C1, N1
N	64	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	NG	2	微量	端部における 歪んだ腺; 評価不能
N	64	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	2	2	3	端部における 歪んだ腺; 評価不能
O	66	T1b	NULL	Adeno CA GL6 (3+3)	T: 0	T: 2	T: 1	T: C3
O	66	T1b	NULL	Adeno CA GL6 (3+3)	T: 1	T: 1	T: 微量	T: C3, N: 2
O	66	T1b	NULL	Adeno CA GL6 (3+3)	無	無	無	無
P	79	1	切除	Adeno CA GL7 (3+4)	2	2	2	C1, N 微量
P	79	1	切除	Adeno CA GL7 (3+4)	1	1	2	C1, N1
P	79	1	切除	Adeno CA GL7 (3+4)	1	1	2	C1, N 微量
Q	71	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	1	1	1	C3, N1
Q	71	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	1	2	1	C3, N2
Q	71	1	切除	Adeno CA GL9 (5+4)	無	無	無	無
R	64	4	生検	Adeno CA GL7 (4+3)	2	1	2	C 微量
R	64	4	生検	Adeno CA GL7 (4+3)	1	2	2	NG
R	64	4	生検	Adeno CA GL7 (4+3)	無	無	無	無
S	69	X	生検	癌 GL6 (3+3)	0	2	2	C2, N 微量

10

20

30

40

S	69	X	生検	癌 GL6 (3+3)	微量	2	3	C2, N 微量
S	69	X	生検	癌 GL6 (3+3)	0	2	2	C2, N 微量
T	71	X	NULL	BPH 及び CA GL6 (3+3)	N: 1	N: 3	N: 2	C1, N 微量
T	71	X	NULL	BPH 及び CA GL6 (3+3)	N: 微量	N: 3	N: 微量	NG
T	71	X	NULL	BPH 及び CA GL6 (3+3)	N: 1	N: 3	N: 2	正常 : C1, N 微量
U	68	X	NULL	BPH	N: 1	N: 3	N: 微量	正常 : C2, N 微量
U	68	X	NULL	BPH	N: 1	N: 3	N,0	正常 : C2, N 微量
U	68	X	NULL	BPH	N: 1	N: 2	N: 1	正常 : C1
V	69	X	NULL	過形成 & 慢性炎症	N: 1	N: 3	N: 1	正常 : C1, N 微量
V	69	X	NULL	過形成 & 慢性炎症	N: 1	v	N: 1	正常 : C1, N 微量
V	69	X	NULL	過形成 & 慢性炎症	N: 1	N: 2	N: 2	正常 : C1, N 微量
W	59	X	切除	慢性前立腺炎	NG	NG	NG	NG
W	59	X	切除	慢性前立腺炎	NG	NG	NG	NG
W	59	X	切除	慢性前立腺炎	NG	NG	NG	NG
X	66	X	NULL	BPH	N: 1	N: 2	N: 2	正常 : C1, N 微量
X	66	X	NULL	BPH	NG	焼灼: スコアづけ 不能	歪み: スコアづけ 不能	NC
X	66	X	NULL	BPH	N: 1	N: 2	N: 1	正常 : C1
Y	87	X	NULL	線維筋 過形成	無	無	軟組織: ?細胞に 存在する ステイン; 歪み	NG
Y	87	X	NULL	線維筋 過形成	NG	NG	NG	NG
Y	87	X	NULL	線維筋 過形成	NG	NG	NG	NG

10

20

30

40

e n o C A」は、腺癌を意味し；「G L」は、グリーソングレードまたはスコアを意味し；C = 細胞質；N = 核（染色度を数値列挙）；N Gは腺がないことを意味し；N U L Lは、それが手術に関する場合、手術タイプが不明であったことを意味する。

## 【0275】

統計分析の結果：遺伝子発現

データは2つのタイプの患者からなる。患者AからMは、それぞれ4つの試料を有する。癌性部位からの3つの試料および正常部位からの1つの試料である。患者NからYは、癌性部位からの3つの試料のみを含有する。それらの患者は正常部位からの試料を含有しない。正常部位における発現を3つの癌性部位と直接比較すると、分析は、「対応のあるt検定」と類似し、但し、1つおよび3つの観察値からなる対応を除く。したがって、癌性部位における発現は、正常部位よりも高い精度で理解される。S A S統計パッケージJ M P、バージョン8；（カリフォルニア、ノースカロライナ）を使用する場合、フィットモデルプラットフォームを使用して不等配分に合わせて調整した。このモデルにおいて、調査される4つの別個のY変数は、F A S、U S P 2 a、p A K TおよびN P Y発現であった。X変数は部位（癌対辺縁）であった。最小二乗法（L S M e a n s）は、異なる試料サイズに合わせて調整される平均であり、テーブル6に報告する。

## 【0276】

## 【表10】

テーブル6: 癌部位対辺縁部位による遺伝子発現についての最小二乗平均

FAS 発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
癌	1.836	0.149	1.836			
辺縁	0.675	0.258	0.675			
				1.161	0.557-1.765	0.0004
USP2a 発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
癌	1.972	0.198	1.972			
辺縁	1.417	0.342	1.417			
				0.556	0.-0.247 to 1.358	0.1687
pAKT 発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
癌	1.389	0.140	1.389			
辺縁	0.750	0.242	0.750	0.639	0.072 to 1.206	0.0283
NPY 発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
癌	1.139	0.132	1.139			
辺縁	1.169	0.242	1.182	0.043	--	0.9130

表から、癌性部位は辺縁部位よりも高いF A Sレベルを有することが明らかである。差は高度に有意である。U S P 2 aについては、癌性部位においてより高い発現が存在する一方、差は有意でなかった。p A K Tについては、F A Sと同様、発現は癌性部位におい

てより高く、差は有意であった。NPYについては、癌性および辺縁部位においてほぼ等しい発現が存在した。

【0277】

グリーンスコアとの関連

12人の患者からの48個の試料の限定データセットに基づくと、FAS発現はグリーンスコアと最も強い関係を有した。この関係は、統計的に有意であり、 $P = 0.00687$ であった。他の3つの変数は有意でなかった。

【0278】

辺縁および正常部位の発現の評価

癌性組織の辺縁からの正常部位と非癌性部位からの正常部位との間で有意差が存在するかどうかを決定する試みにおいて、10人の追加の患者からの第3のデータセットを作成し、2つの試料を癌性領域の辺縁近傍もしくは辺縁部位（「辺縁」）または遠隔非癌性部位（「正常」）から得た。この分析は、癌性領域の辺縁から採取された試料および非癌性試料に対して4つの別個の遺伝子発現変数FAS、USP2a、pAKTおよびNPY間で差が存在するかどうかを明らかにする意図であった。データをテーブル7に示す。

【0279】

【表11】

テーブル7: 辺縁部位対正常部位による遺伝子発現についての最小二乗平均

FAS発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
辺縁	0.796	0.188	0.777			
正常	-0.012	0.148	-0.000			
				0.808	0.296 to 1.319	0.003
USP2a発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
辺縁	1.742	0.331	1.538			
正常	0.718	0.262	0.850			
				1.025	0.122 to 1.927	0.0274
pAKT発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
辺縁	0.992	0.231	0.846			
正常	0.510	0.182	0.605			
				--	--	0.1286
NPY発現						
	最小二乗平均	標準誤差	平均	差	95%CI範囲	P値
部位						
辺縁	1.199	0.264	1.250			
正常	0.901	0.201	0.870			
				--	--	0.3939

データは、辺縁における部位について、FAS、USP2aおよびpAKTレベルが正

常組織よりも高いことを明らかにした。しかしながら、NPYレベルは、辺縁および正常非癌性部位の両方においてほぼ同等であった。USP2aについては、年齢変数は、わずかに有意な寄与を  $p = 0.0845$  で示す。pAKTおよびNPYについては、年齢変数は、有意な寄与をそれぞれ  $p = 0.0774$  および  $p = 0.5449$  で示す。有意であることが見出された年齢範囲は、50～75歳であった。

#### 【0280】

実施例10：前立腺癌の予後診断指標としてのFAS

内容が参照により全体として本明細書に組み込まれる、2011年3月17日に公開されたPCT国際公開PCT/US2010/046773号明細書に報告された90人の患者コホートの予備調査結果を詳述して、退縮および生存時間に基づき予後診断する方法に関する調査結果が本明細書に開示される。FASと退縮度および臨床生存との間に予測関係が存在することが発見された。

10

#### 【0281】

前立腺癌(PCa)と診断された90人の患者からの生検標本を下記のとおり調製および分析した。全ての患者はアンドロゲン除去により治療されていた。

組織マイクロアレイ(TMA)を、内容が参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0206777A1号明細書の表題「EGFR-TK阻害剤の治療効力に関連する遺伝子およびタンパク質発現プロファイル(Gene and protein expression profiles associated with the therapeutic efficacy of EGFR-TK inhibitors)」に記載のとおり調製した。90個の前立腺癌標本に加え、正常前立腺組織、良性前立腺過形成(BPH)および正常(非癌性)組織を含有するTMAを調製および分析した。

20

#### 【0282】

FAS発現は、米国特許出願公開第2008/0206777A1号明細書に記載の方法による免疫組織化学(IHC)により、MAbD(ペプチド4を用いて生成;配列番号4;ATCC寄託番号PTA-10801)を検出(一次)抗体として使用して測定した。検出抗体は、米国特許出願公開第2008/0206777A1号明細書に記載のとおりビオチン化結合抗体およびストレプトアビジン-HRPを使用して可視化した。90個の前立腺癌試料についての結果を以下のテーブル8に示す。

30

#### 【0283】

表中、FAS(配列番号6)、USP2a(配列番号7)、NPY(配列番号9)、およびAMACR(アルファ-メチルアシル-CoAラセマーゼ、ミトコンドリアタンパク質をコードする核遺伝子、転写バリエーション1、またはAMACR IA; GenBank NM\_014324; 配列番号10)の発現を、0が発現の未検出を表す0、微量、1、2または3のグレードスケールで表す。0または未発現は、正常組織中の遺伝子のベースライン発現と等価に設定したことに留意すべきである。したがって、0のグレードまたはレベルは、発現が当該遺伝子の正常組織の発現と等価であったことを意味する。微量は、正常組織発現と比べて0を上回るが1%未満が検出されたことを意味し、1は、正常組織と比べて1~25%の発現が検出されたことを意味し、2は、正常組織と比べて25~75%の発現が検出されたことを意味し、3は、正常組織と比べて75~100%の発現が対照と比較して検出されたことを意味する。TE-30アレイおよび正常前立腺/BPHスクリーニングアレイについての結果は、FAS発現について陰性であった。

40

#### 【0284】

【表 1 2】

テーブル8: 90例の治療済(アンドロゲン除去)前立腺癌に対する臨床及び病理学的データ

患者番号	年齢	Gスコア	治療前 PSA	FAS	USP2a	AMACR	NPY	MT	DR	TNM 2002	S
1	69	3+4=7	8.7	3	3	1	3	3	不良	pT3aN0R0	1
2	70	3+3=6	7.0	3	3	1	2	1	不良	pT3aNXR0	1
3	72	2+3=5	21.0	1	2	1	0	6	優秀	pT2cN0R0	+5
4	68	2+2=4	14.0	3	2	1	3	7	不良	pT2cNXR0	2
5	60	2+3=5	24.0	0	1	0	2	3	良好	pT2cNXR0	4
6	68	3+3=6	+	2	2	2	3	3	不良	pT3bN0R1	2
7	58	3+3=6	10.2	2	3	2	3	3	不良	pT3a NXR1	2
8	57	3+3=6	9.8	3	3	1	3	3	不良	pT3aNXR0	3
9	70	3+3=6	5.2	2	3	0	3	2	不良	pT2cN0R1	1
10	64	3+3=6	2.6	1	2	1	1	3	良好	pT2cNXR1	1
11	65	3+3=6	5.0	3	3	1	3	5	不良	pT3aN0R0	1
12	66	4+3=7	6.0	3	3	1	3	5	不良	pT3aN0R1	2
13	61	3+3=6	7.6	1	2	1	1	6	良好	pT3aN0R0	+5
14	68	3+4=7	9.7	1	2	1	1	3	良好	pT2cN0R1	4
15	67	3+3=6	9.4	3	3	2	3	6	不良	pT3bN0R0	2
16	57	2+3=5	19.0	3	2	1	3	2	良好	pT2cN0R0	3
17	67	3+3=6	9.5	3	3	1	3	7	不良	pT3bN1R0	2
18	57	3+4=7	34.0	2	3	2	2	4	不良	pT3bNXR1	1
19	58	3+3=6	18.0	1	1	3	1	11	優秀	pT3aN0R0	5
20	72	3+3=6	6.5	3	3	1	3	2	不良	pT3a N0R0	2
21	70	3+3=6	8.7	3	3	1	3	3	不良	pT3a N0R1	2
22	65	4+3=7	16.3	3	3	1	3	5	不良	pT2cN0R1	1
23	68	3+4=7	41.7	0	0	3	0	6	優秀	pT4N0R1	+5
24	62	3+3=6	13.0	3	3	1	3	3	不良	pT3a N0R0	1
25	64	2+3=5	2.4	3	3	1	3	1	不良	pT2bN0R0	1
26	78	3+4=7	13.4	1	1	3	1	2	優秀	pT2c N0R0	5
27	56	3+4=7	17.1	1	3	1	1	24	良好	pT3b N0R1	5
28	65	3+3=6	16.0	2	3	2	3	4	不良	pT3b N0R0	3
29	72	3+3=6	19.0	2	3	2	3	2	不良	pT3a N0R0	2
30	68	3+5=8	2.15	2	3	2	3	1	不良	pT3a N0R0	2
31	66	4+3=7	12.0	3	3	1	3	12	不良	pT3b N1R0	2
32	65	3+3=6	2.4	3	3	1	3	4	不良	pT3b N0R1	2
33	69	3+3=6	7.0	3	3	1	3	1	不良	pT2a NXR0	1

10

20

30

患者番号	年齢	Gスコア	治療前 PSA	FAS	USP2a	AMACR	NPY	MT	DR	TNM 2002	S
34	68	3+3=6	17.5	0	2	0	0	5	良好	pT2c N0R1	5
35	67	3+4=7	7.3	3	3	1	3	6	不良	pT3a NXR1	1
36	53	2+2=4	3.7	1	2	2	1	3	良好	pT2c N0R0	5
37	66	3+3=6	10.6	1	3	1	3	2	不良	pT2c N0R0	3
38	74	3+3=6	15.9	1	2	1	3	2	不良	pT2c N0R0	3
39	69	4+4=8	31.0	0	2	3	0	6	良好	pT2cN0R0	5
40	70	3+3=6	7.3	3	3	1	3	3	不良	pT3b N0R1	1
41	59	4+4=8	27.0	3	3	1	3	2	不良	pT3a N0R0	.5
42	67	3+4=7	16.5	3	3	1	3	1	不良	PT2c NXR0	1
43	62	3+3=6	5.4	1	2	3	1	2	良好	pT3a NXR1	5
44	69	4+4=8	8.2	3	3	1	3	5	不良	PT2c N0R1	1
45	73	3+3=6	1.8	3	3	1	3	2	不良	pT3a NXR0	1
46	59	3+4=7	9.3	3	3	1	2	6	不良	pT2a N0R0	1
47	69	3+3=6	12.6	3	3	1	2	3	不良	pT2c N0R0	1
48	66	4+3=7	13.5	3	3	1	3	6	不良	pT2a N0R0	1
49	50	4+3=7	101.0	3	3	1	3	4	不良	pT4 N1R1	1
50	53	3+3=6	10.0	3	3	1	3	1	不良	pT2a N0R1	1
51	70	4+4=8	10.9	3	3	1	3	3	不良	pT2a N0R0	1
52	55	3+3=6	9.7	3	2	3	3	4	良好	pT2c N0R0	2
53	61	3+3=6	6.4	3	3	1	3	3	不良	pT3b N1R1	2
54	74	3+3=6	28.0	0	0	0	0	6	優秀	pT3b N0R0	+5
55	71	3+4=7	8.3	+3	2	2	2	3	良好	pT3a N0R0	4
56	71	3+3=6	17.0	+3	3	0	3	1	不良	pT2c N0R1	1
57	67	3+3=6	2.0	1	1	1	1	5	優秀	pT2a N0R0	5
58	62	3+3=6	16.6	1	2	1	1	3	良好	pT2c N0R0	4
59	69	3+3=6	6.31	3	3	0	3	1	不良	pT2c NXR0	1
60	72	3+3=6	11.8	3	3	1	3	2	不良	pT2c N0R0	1
61	65	3+3=6	5.2	3	3	0	3	2	不良	pT2c N0R0	1
62	66	3+4=7	7.4	3	3	1	3	1	不良	pT3b N0R1	2
63	66	4+3=7	13.5	0	1	3	0	3	良好	pT3b N0R0	5
64	74	3+3=6	12.8	0	1	3	0	4	優秀	pT2a NXR0	+5
65	66	3+3=6	9.8	3	3	1	3	2	不良	pT3b N0R0	1
66	66	3+3=6	8.1	1	2	3	2	2	良好	pT2c NXR1	5
67	64	3+3=6	1.7	1	2	1	1	7	優秀	pT2a NXR0	5
68	69	3+4=7	5.0	1	2	1	1	3	良好	pT2c N0R0	3
69	54	3+3=6	11.8	3	2	1	3	3	良好	PT3b NXR1	2
70	69	3+3=6	6.2	2	2	2	2	3	良好	PT3a N0R0	2
71	63	3+4=7	8.6	2	2	2	2	3	良好	pT2c NXR0	3
72	59	3+4=7	12.2	3	3	1	3	3	不良	pT2a N0R1	1
73	65	4+3=7	4.8	2	1	2	2	2	良好	pT2a N0R0	1
74	64	3+3=6	7.6	3	3	1	3	1	不良	pT2a N0R0	3
75	72	3+3=6	8.4	3	3	1	3	2	不良	pT2c N0R1	1
76	68	3+4=7	7.8	3	3	1	3	3	不良	pT2b N1R0	1
77	65	3+3=6	24.0	3	1	1	3	5	良好	pT2b N0R0	5
78	65	3+3=6	6.4	3	3	1	3	6	不良	pT3a NXR0	3
79	71	3+4=7	9.6	1	1	1	1	2	不良	pT3a N0R1	3
80	62	4+5=9	27.0	1	0	1	1	4	優秀	pT2a N0R0	5
81	71	3+3=6	11.6	2	2	2	2	3	良好	pT2a N0R0	2
82	67	4+3=7	25.0	3	3	1	3	1	不良	pT3b NXR1	1
83	67	3+3=6	22.9	3	3	1	3	9	不良	pT3b N1R1	1
84	72	3+4=7	7.4	0	0	0	0	3	優秀	pT2b N0R0	5

10

20

30

40

患者番号	年齢	Gスコア	治療前PSA	FAS	USP2a	AMACR	NPY	MT	DR	TNM 2002	S
85	71	4+3=7	1.3	0	0	0	0	4	優秀	PT3b N0R1	5
86	69	4+3=7	4.8	3	3	1	3	3	不良	pT3a N0R1	1
87	68	4+3=7	9.0	+3	3	+	+	1	不良	pT3b N0R0	1
88	70	3+3=6	6.1	1	2	1	1	3	良好	pT3a N0R0	UNK
89	71	4+3=7	20.4	3	3	1	3	1	不良	pT3a N0R0	1
90	65	3+3=6	5.8	3	3	1	3	3	不良	pT3a NXR1	1

表中、「患者」は、患者を意味し、それぞれに任意番号を割り当て、年齢は、それぞれの患者の年齢であり；「G - スコア」は、それぞれの生検からの分割グリーソンスコアを指し；「治療前PSA」は、患者の治療前総PSAレベルをng/mLで指し（治療前PSAグレード0 = 0 ~ 5 ng/mL；1 = 6 ~ 60 ng/mL；2 = 61 ~ 100 ng/mL；および3 = 101 ~ 150 ng/mL）；「FAS」は、遺伝子脂肪酸シターゼを指し；「USP2a」は、遺伝子ユビキチン特異的ペプチダーゼ2を指し；「AMACR」は、遺伝子アルファ - メチルアシル - CoAラセマーゼを指し；「NPY」は、遺伝子ニューロペプチドYを指し；「MT」は、それぞれの患者が治療を受けた月数を指し；「DR」は、退縮度を指し；TNM2002」は、腫瘍、リンパ節、転移グレードづけシステムとして設定された腫瘍グレードを指し；「S」は、患者生存（年数）を指し；「UNK」は、不明を表す。

10

20

30

40

50

## 【0285】

## 実施例11：FASおよび癌退縮

FASと退縮度との関係は基本的に興味深く、したがって、患者生存および退縮データは、SAS統計パッケージ、JMP、バージョン8（カー、ノースカロライナ）を使用して分析した。データは、実施例10のテーブル8に詳述する90人の観察値からなるものであった。51人の観察値は、3つのFAS値、10人についてFAS = 2、19人についてFAS = 1、9人についてFAS = 0を有した。1つの生検（患者87）は、FAS値を有さなかった。退縮度は、不良 - 良好 - 優秀の3つのグレードスケールに基づき査定し、不良は、患者が1 ~ 2年で死亡したことを意味し、良好は、患者が5年以内に疾患を有して生存していることを意味し、優秀は、5年を上回る生存を意味する。最大頻度は、FAS = 3を有する「不良」退縮度を示す。

## 【0286】

## 【表13】

テーブル9：DOR頻度

頻度	退縮度(3グレードシステム)			応答
	不良	良好	優秀	
FAS				
不明	1			1
0		4	5	9
1	3	10	6	19
2	6	4		10
3	46	5		51
全て	56	23	11	90

この状況において、退縮度は、カテゴリ - 応答変数であり、FASは、カテゴリ - 試料変数である。周辺等質性検定は、応答確率がFASレベルにわたり同一であることを検定

する。この分析は、独立性についてのカイ二乗（または尤度比）検定と類似する。両方のタイプの検定は、FASと退縮度との強い関係を0.0001未満のp値で示す。応答等質性検定をテーブル10に示す。

【0287】

【表14】

テーブル10: 応答均一性検定

検定	カイ二乗	確率>カイ二乗
尤度比	65.8534	<.0001*
ピアソン	58.7950	<.0001*

10

これは、より高いFAS数がより不良の退縮度に関連することを示す。

【0288】

FASを数値X変数（退縮度をカテゴリーY変数とする）として使用してさらなる分析を実施した。数値X変数を伴うカテゴリーY変数はロジスティック回帰に導くことを理解すべきである。FASが数値変数であることを仮定することにより、値FAS=2は、FAS=1よりも約2倍強いと仮定する。この仮定の利点は、対数オッズ結果に基づき、応答カテゴリー間の分離がいかに強いかを決定することができることである。

20

【0289】

分析は、退縮度とFASとの関係が高度の有意（p値<0.0001）であることを明らかにした。このことは、既に等質性の検定により示されている。しかしながら、ロジスティック回帰について、以下に付加的に記述することができる：

- ・不良と優秀との対数オッズ、 $p < 0.0001$ で有意；
- ・不良と良好との対数オッズ、 $p < 0.0001$ で有意；
- ・良好と優秀との対数オッズ、 $p = 0.0243$ で有意。

【0290】

FAS値に従う退縮度への分類の推定確率をテーブル11に示す。

【0291】

30

【表15】

テーブル11: 退縮の推定確率

FAS=X	退縮度=Y			n
	不良	良好	優秀	
0	0.015	0.359	0.627	9
1	0.151	0.594	0.255	19
2	0.587	0.374	0.039	10
3	0.905	0.093	0.002	51

40

表中のデータは、「不良」退縮度の推定確率がFASに依存することを示す。「不良」列において、FAS=0の場合、確率は0.015であり、；FAS=1の場合、確率は0.151であり；FAS=2の場合、確率は0.587であり；FAS=3の場合、確率は0.905である。実際の退縮度転帰と、ロジスティック回帰により予測された最も可能性の高い転帰とのクロス分類は、FASが不良結果を極めて十分に予測することを示す。これらのデータをテーブル12に示す。

【0292】

【表 16】

テーブル12:FASの予測力

実際の退縮度	最も可能性の高い退縮度(ロジスティック回帰)			合計
	不良の予測	良好の予測	優秀の予測	
実際の不良	52	3	0	55
実際の良好	9	10	4	23
実際の優秀	0	6	5	11
合計	61	19	9	89

10

R O C (受信者動作特性) 曲線はこれらの数値結果を裏付け、テーブル 13 に示す。

【0293】

【表 17】

テーブル13:受信者動作特性

退縮度(3グレードシステム)	面積
優秀	0.9149
良好	0.7510
不良	0.8888

20

理想的な場合、3つ全てのカテゴリーは1の関連する面積を有する。最悪の場合、それらは感度(y軸)対特異度(x軸)のプロットの斜線をカバーする。2つの極端なカテゴリー: 優秀および不良は、それぞれ0.9149および0.8888の面積を有する。不良または優秀のいずれにも誤分類され得る中程度のカテゴリーの良好は、期待されるとおり最低値を有した。

30

【0294】

実施例 12 : F A S および臨床生存

90人の患者のデータ(実施例10に概説)に基づき、以下の変数を分析した: 予測因子変数としてのグリーンソン、治療前PSA( $\text{ng/ml}$ )、FAS(発現のレベルの0~3グレードシステム)、治療月数。生存時間(年数)は、予測変数である。5人の患者は5年間生存し、これらは打ち切り変数により同定された。主分析は、最初の4つの変数のパラメトリック回帰モデルをフィットさせて生存時間を5つの打ち切り観察値により説明することを含んだ。

【0295】

40

生存時間の説明において圧倒的に最も有意な変数はFASである。尤度比効果検定時、この変数のカイ二乗統計値は次に最も有意な変数よりも1.2倍大きく上回った。グリーンソン( $p = 0.0157$ )および治療月数( $p = 0.0097$ )も、統計的に有意であった。治療前PSAは、全く有意でなかった( $p = 0.6281$ )。他の3つの変数を考慮すると、PSAは生存(再燃)時間の説明に関して何も提供しなかった。結果的に、データに基づくと、FASは生存または再燃までの時間の圧倒的に最も強い指標である一方、治療前PSAは実質的に価値を示さないことが考えられる。

【0296】

パラメトリック生存フィットは、互いにわずかに相関されるにすぎない推定回帰係数を有したことに留意することが重要である。これは、解釈を簡易化し、それぞれの変数につ

50

いての独立する記述を可能とする。コックス比例ハザードモデルは、本質的に類似の結果をもたらし、但し、グリーンソンおよび治療月数は  $= 0.05$  において有意でなかった。コックスモデルを用いると、FASは唯一有意であり、生存時間を説明するための依然として傑出した変数である。

【0297】

4つの予測因子変数の値は、最適アロケーションスキームに従って拡散されなかったことに留意することが重要である（データソースを考慮すると、このことは起こり得ない）。86人の治療前PSA値は30未満であった。PSA値のより大きい拡散（特に、いっそう多くのより大きい値を含むことによる）は、将来結果に対する効果を有し得る。同様に、78人のグリーンソン値は6または7のいずれかであり；2人は4であり；4人は5であり、5人は8である。さらに多くの4、5および8つのスコアを含むことは、グリーンソンの有意性を向上させ得る。最後に、90人の観察値のうち29人は、グリーンソン = 6およびFAS = 3を有した。しかしまた、52人のFASは3であり、この変数は依然として極めて有意である。

【0298】

グリーンソンスコア分析

最も高頻度のグリーンソン値は、49人の観察値についての6であり、次いで29人の観察値についての7である。FASとグリーンソンとのクロス集計は、29人（約3分の1）の観察値がグリーンソン = 6およびFAS = 3の併合カテゴリーに属することを示す。まとめをテーブル14に提供する。

【0299】

【表18】

テーブル14:FAS対グリーンソンスコアのクロス集計(表の主部の値は頻度である)

	Gスコア (4~9)	グリーンソン						FAS 合計数	Gスコア 5~7に ついての FAS 合計数	Gスコア 5~7の%
		4	5	6	7	8	9			
FAS (0~3 グレード)	0	0	1	3	4	1	0	9	8	88
	1	1	1	11	5	0	1	19	17	89
	2	0	0	6	3	1	0	10	9	90
	3	1	2	29	17	3	0	52	48	92
	グリーンソン 合計数	2	4	49	29	5	1	90		

表から、データのほとんど（88%超）がグリーンソンスコア5~7の範囲内に属することを把握することができる。したがって、FASグレードを5から7のグリーンソンスコアと組み合わせて少なくとも術後に臨床生存の組合せ予測因子として使用することができる。

【0300】

パラメトリック生存フィット

次いで、生存を予測するための方程式にデータをフィットさせた。方程式は、Y変数としてのLog（生存時間）をX変数としてのグリーンソン、治療前PSA、FASおよび治療月数とフィットさせる。「打ち切り」変数を使用して5年間生存した患者を同定する。得られる方程式は：

$$\text{Log}(\text{生存時間(年数)}) =$$

$$2.52502 + -0.13595 * \text{グリーンソン} + -0.00180 * \text{治療前PSA} + -0.49465 * \text{FAS} + 0.03869 * \text{治療月数}.$$

【0301】

## 尤度比効果 (LR 効果)

別個の p 値を方程式のそれぞれの項に割り当てるため、尤度比効果を計算した。テーブル 15 はその結果を示す。0.05 未満の p 値は、0 とは有意に異なる効果を示すと解釈される。そのような変数は、生存時間に影響するとみなされる。LR 効果検定は、治療前 PSA を除き PSA が有意であることを示す。治療前 PSA は p 値 = 0.6281 を有し、生存時間に影響しない。3 つの有意な変数のうち、FAS は最大のカイ二乗検定統計値を有する (グリーンソンについての 5.84 および治療月数についての 6.68 に対して 85.29)。このことは、FAS が最も有意な変数であるだけでなく、他の変数と比べて圧倒的に有意であることを示唆する。

【0302】

【表19】

10

テーブル15:尤度比効果検定

ソース	DF	L-Rカイ二乗	確率>カイ二乗	
グリーンソン	1	5.84	0.0157	有意
治療前PSA (ng/ml)	1	0.23	0.6281	有意でない
FAS (0~3グレードシステム)	1	85.29	<0.0001	有意
治療月数	1	6.68	0.0097	有意

20

パラメータ推定値は全て妥当であり、テーブル 16 に概説する。FAS およびグリーンソンは、負係数を有し、このことは値の増加が生存時間を低減させることを示す。治療月数は、正係数を有し、このことはより長い治療が生存時間を増加させることを意味する。PSA の係数は、それが有意でないため無視される。PSA の係数についての 95% 信頼区間 -0.0091 から +0.0056 は、0 を含む。これは、有意でない別の指標である。全ての他の係数の 95% 信頼区間は 0 を含まず、それらが 0 とは有意に異なるという異なった形で現れる。パラメータは、スケールパラメータであり、方程式に直接代入する。

【0303】

【表20】

30

テーブル16. 生存モデルのパラメータ推定値(対数正規)

項	推定値	標準誤差	CL下限	CL上限
切片	2.5250	0.3724	1.7912	3.2681
グリーンソン	-0.1360	0.0556	-0.2466	-0.0262
治療前 PSA (ng/ml)	-0.0018	0.0037	-0.0091	0.0056
FAS (0~3グレードシステム)	-0.4946	0.0427	-0.5802	-0.4109
治療月数	0.0387	0.0147	0.0096	0.0679
$\sigma$	0.4086	0.0315	0.3538	0.4792

40

残差プロットは仮定が対数正規のモデルにより最良に充足されることを示唆したため、対数正規を選択した。ワイブルおよび対数ロジスティックも試みた。ワイブルがデータに十分にフィットしなかった一方、対数ロジスティックは、それが対数正規と類似するため極めて良好にフィットした。しかしながら、対数正規モデルはより容易に理解される。

【0304】

50

方程式の残差分位点プロット（図1）は、残差（＝観察値－予測値）が正常に機能することを示す。線は完全に直線ではないが、ワイブルおよびさらには対数ロジスティックと同様に一方にも多方向にも湾曲してなく曲線を描いてもいない。

#### 【0305】

##### 分布プロファイラ

データから、FASはこの方程式において最も重要な変数であることが明らかである。再燃の確率（1－生存の確率）に対するFASの効果を実視化する別の手法は、分布プロファイラの異なる設定から把握することができる。

#### 【0306】

この実施例において、プロファイラは、再燃確率（y軸）をグリーンソン、治療前PSA、FAS、治療月数および時間（全てx軸上）に対してプロットする5つのグラフからなる。4つの分布プロファイラを図2～5に示す。プロットにおいて、ある値を一定に保持した。これらは：グリーンソン＝7、PSA＝13、治療月数＝3.7、および（再燃の）時間＝2である。これらの値はそれらの平均に最近傍の丸められた値である。

10

#### 【0307】

それぞれのプロファイラにおいて、本発明者らは異なるFAS値：FAS＝0（図2）、FAS＝1（図3）、FAS＝2（図4）およびFAS＝3（図5）を選択した。当業者は、他の変数について異なる値を選択することにより、より多くのプロファイラを構築することができる。

#### 【0308】

##### FAS＝0の分布プロファイラ

FAS＝0ならびにグリーンソン＝7、PSA＝13、治療月数＝3.7、および（再燃の）時間＝2の患者についてのプロファイラは、再燃の確率を0.007205（左軸上）として、0.00106から0.03424の間の95%信頼区間で推定する。グリーンソン、PSA、月数の実線曲線は効果を示さず、このことは、FAS＝0について、再燃の確率が主に時間に依存することを意味する。

20

#### 【0309】

##### FAS＝1の分布プロファイラ

FAS＝1ならびに上記と同様にグリーンソン＝7、PSA＝13、治療月数＝3.7、および（再燃の）時間＝2の患者についてのプロファイラは、再燃の確率を0.108152（左軸上）として、0.05091から0.20138の間の95%信頼区間で推定する。グリーンソンの実線曲線は上方に曲線を描き、このことは目下の設定グリーンソン＝7からの増加が再燃確率の増加をもたらすことを示す。PSAは有意でないが、適正な方向に向いている。治療月数が増加するにつれ、再燃確率は減少する。時間（対再燃確率）の（S字曲線）の変化は、FAS＝0よりもFAS＝1がより急傾斜である。

30

#### 【0310】

##### FAS＝2の分布プロファイラ

FAS＝2ならびに上記と同様にグリーンソン＝7、PSA＝13、治療月数＝3.7、および（再燃の）時間＝2の患者についてのプロファイラは、再燃の確率を0.489644（左軸上）として、0.38432から0.5957の間の95%信頼区間で推定する。この設定について、患者のほぼ半数が2年目までに死亡すると推定される。グリーンソンの実線曲線は、上方に強く曲線を描き、このことは、目下の設定グリーンソン＝7からの増加がFAS＝1よりもいっそう急傾斜の再燃確率の増加をもたらすことを示す。PSAは有意でないが、適正な方向に向いている。治療月数が増加するにつれ、再燃確率は減少する。時間（対再燃確率）の（S字曲線）の変化も、FAS＝0または1のいずれよりもFAS＝2が同様にかなり急傾斜である。

40

#### 【0311】

##### FAS＝3の分布プロファイラ

FAS＝3ならびに上記と同様にグリーンソン＝7、PSA＝13、治療月数＝3.7、および（再燃の）時間＝2の患者についてのプロファイラは、再燃の確率を0.8818

50

9 (左軸上)として、0.79613から0.93835の間の95%信頼区間で推定する。この設定について、患者のほぼ90%が2年目までに死亡すると推定される。グリーンソンの実線曲線は、上方に曲線を描き、このことは、目下の設定グリーンソン=7からの増加が再燃確率の増加をもたらすことを示す。PSAは有意でないが、適正な方向に向いている。治療月数が増加するにつれ、他のFAS値と同様に再燃確率は減少する。時間(対再燃確率)の(S字曲線)の変化は、FAS=3が最も急傾斜である。曲線の急傾斜は、FAS=3のほとんどの患者が特に他の措置が取られない限り、極めて急激に死亡することを補強する。この解釈は、目下の混成患者の代表性に基づくことに留意すべきである。

【0312】

他のモデル

本発明者らは、比例ハザードモデルをデータに十分にフィットさせた。PPHモデルは、この分析が確認することができないある仮定を要求するにもかかわらず、結果は類似する。FASは、群を抜いて最も強い変数である。グリーンソンおよび治療月数は有意でない。PSAも有意でない。

10

【0313】

実施例13：他の指標の相対予測力

FAS発現を包囲する調査結果を考慮して、有用な指標であり得る他の潜在的な計量値を評価した。これらは、USP2a、AMACRおよびNPY遺伝子の遺伝子発現の計量値を含んだ。任意の他の遺伝子が臨床管理パラメータまたは臨床エンドポイントのマーカまたは指標としてFASと同程度に有利かどうかを対処することが望ましかった。

20

【0314】

SAS統計パッケージJMP、バージョン8;(カーリー、ノースカロライナ)を使用してデータを分析した。生データは、実施例10のテーブル8に詳述されている90人の観察値からなるものであった。

【0315】

モザイクプロット(種々の応答レベルについての確率がxレベルの関数であるかどうかの決定に役立つ視覚プロット)の作出は、USP2aおよびNPYがFASに密接に関連することを示した。両方のプロットについて、FAS=3の場合のFASについての最大のカバレッジがUSP2a=3およびNPY=3と一致することが決定された。一部の相違(一部のFAS=3はUSP2a=1または2のものもあり、NPY=2についてのものがある)が存在した一方、ほとんどの転帰はこれら3つの変数(FAS、USP2aおよびNPY)が類似のグレードをもたらすという結論と一致した。モザイクプロットにより、グリーンソンスコアはFASに関連しなかった。関連するとは、グリーンソンスコアを予測因子としてFASに代えて用いることができない、例えば、それが実質的な単独の予測因子でないことを意味する。

30

【0316】

興味深いことに、遺伝子AMACRとFASとの間で反比例関係が同定された。すなわち、AMACRスコアが低い場合、FASスコアが高い。この結果は、AMACR発現も等しく有価な指標であり得るが、値はFAS発現レベルと反比例関係を有することを示唆する。

40

【0317】

任意の2つの遺伝子、例えばFASとUSP2aとの間の一致度を計測するため、カッパ係数を計算した。2つの二元変数が同一物を計測するための2つの個体による試みである場合、コーエンのカッパ(カッパと呼ばれることが多い)を2つの個体間の一致の尺度として使用することができる。カッパは、表の主対角線中のデータ値の割合を計測し、次いでこれらの値を単なる偶然に起因して期待することができる一致の量について調整する。これらをテーブル17に示す。より高いカッパ係数は、2つの値が密接に関連することを示す。

【0318】

【表 2 1】

テーブル17:一致度

比較	一致度	
	カッパ	標準誤差
FAS対USP2a	0.412005	0.066303
FAS対AMACR	0.14604	0.06463
FAS対NPY	0.734385	0.063916

10

データから、最大のカッパ係数により示されるとおりFASおよびNPYが最も密接に関連することを把握することができる。FASおよびUSP2aも密接に関連する。結果的に、USP2aまたはNPYのいずれも前立腺癌の予後診断および/または診断指標として使用することができ、それぞれ73%または41%のレベルで少なくともFASと同様に予測または診断的であり得ることを結論づけることができる。

【0319】

実施例14:個々の予測因子による退縮度の偶然性分析

実施例10のテーブル8に詳述されるデータの分析の別のセットにおいて、SAS統計パッケージ、JMP、バージョン8(カー、ノースカロライナ)を使用して退縮度(DOR)と個々の予測因子/指標との関係を調査した。結果をテーブル18に示す。

20

【0320】

【表 2 2】

テーブル18:退縮度(DOR)対予測因子

比較	関係値		有意性
	カイニ乗p値	分析法	
DOR対治療前PSA (ng/mL)	0.6696	ロジスティック回帰	有意でない
DOR対グリーソンスコア	0.3145	モザイクプロット	有意でない
DOR対FAS	<0.0001	モザイクプロット	有意
DOR対USP2a	<0.0001	モザイクプロット	有意
DOR対AMACR	<0.0001	モザイクプロット	有意
DOR対NPY	<0.0001	モザイクプロット	有意
DOR対治療月数	0.0488	モザイクプロット	有意

30

テーブルから、治療前PSA単独もグリーソンスコア単独も癌退縮度と有意に相関しないことが明らかである。しかしながら、遺伝子FAS、USP2a、AMACRおよびNPYのそれぞれは、癌退縮度の予測と高度に有意な関係を示した。したがって、個々の遺伝子のいずれも退縮度の予後診断についてのマーカーまたはエンドポイントとして機能し得る。

【0321】

実施例15:複数の退縮度の予測因子

退縮度の予測の改善の試みにおいて、予測因子変数の組合せを調査した。ここでも、分析は実施例10のテーブル8に詳述されるデータを含み、SAS統計パッケージ、JMP、バージョン8(カー、ノースカロライナ)を使用した。結果をテーブル19に示す。

40

【0322】

【表 2 3】

テーブル19: 組合せ予測因子

組合せ	カイ二乗p値
FAS 単独	<0.0001
FAS 及び グリーソン	0.2374
FAS 及び USP2a 及び 治療月数	0.0650
FAS 及び USP2a	0.0397
FAS 及び AMACR	0.2997
FAS 及び NPY	0.0003
USP2a 及び 治療月数	0.0001

10

順序ロジスティック回帰からの結果は、FASが有意な変数 ( $p < 0.0001$ ) であったことおよびグリーソンスコアが分析に何も追加しない ( $p = 0.2374$ ) ことを示す。

## 【0323】

FASおよびUSP2aの組合せの使用は、有意な予測方程式を作出する。しかしながら、個々の変数として、FASはアルファ = 0.10においてのみ有意である。方程式の決定係数は0.676であった。方程式への治療月数の追加は、決定係数を0.736に増加させるが、それによってもFASは有意にならない。一方、治療月数の3つの最大値を排除すると、変数はアルファ = 0.10においてのみ有意になる。

20

## 【0324】

FASおよびAMACRの組合せの使用は、有意な予測方程式を作出する。しかしながら、個々の変数として、 $p = 0.2997$ について、AMACRはアルファ = 0.10において有意でない。方程式の決定係数は0.676であった。

## 【0325】

FASおよびNPYの組合せは、個々の変数と比べてあまり改善されない方程式をもたらす。両方の変数はかなり類似するため、NPYが有意であると、FASはNPYにより既に説明されなかったものを何も説明することができなかった。

## 【0326】

USP2aおよび治療月数のみを有するモデルは、高い決定係数 (= 0.7212) を保持し、全体的に有意である。しかしながら、3つの最大観察値は、治療月数の重要性を増加させる傾向にある。これにもかかわらず、両方の予測因子は高度に有意であった。

30

## 【0327】

まとめると、USP2aは退縮度の最も強い予測因子であることならびにFASおよびNPYは極めて類似する予測因子であることが決定された。最後に、許容可能なパラダイムとは対照的に、PSAおよびグリーソンは退縮度の有意な予測因子でなかった。

## 【0328】

実施例16: FASおよびUSP2aの差次的発現: 局所部位対転移部位

FASとUSP2aとの間の発現データの分析は、局所部位と、癌から遠隔の転移部位との間の差次的発現のパターンを明らかにした。これらのレベルをプロットすると、臨床転帰、特に退縮度を予測する関係が出現することが明らかになった。

40

## 【0329】

USP2aおよびFASは、ある時点において試験される場合、退縮度(DOR)に関して癌侵襲性を予測する高度に有意で強力な手段を提供する発現の差次的パターンを示すことが見出されたことが発見された。USP2a発現の増加はFAS発現の増加に導くことが決定された。FAS発現増加時、USP2aレベルはFASレベルの降下前に降下することも決定された。この発現のパターンは、前立腺癌の侵襲性と関連および相関する。結果的に、発現のパターンは、予後診断を正確に行うことができるウインドウを提供する。一実施形態において、USP2a発現を計測し、FAS発現と比較する。USP2a発

50

現 F A S 発現を超過するが、続いて降下する場合、侵襲性の強い指標を仮定することができる。この予後診断のウィンドウは、他では無視し得た。それというのも、F A S の低い計測値がより小さい癌の侵襲形態を示唆し得、それにより臨床家によるあらゆるリスク評価を緩和するためである。換言すると、本発明以前に、低い F A S 発現レベルにより臨床家に U S P 2 a レベルを計測しないことを誤導し、臨床診断を誤導し得た。

【 0 3 3 0 】

実施例 1 7 : 転帰予測の特異度 : F A S および U S P 2 a

U S P 2 a 遺伝子発現により同定された予期せぬ関係を考慮すると、ロジスティックモデルを使用するさらなる分析を実施し、3つのモデルに基づき最も可能性の高い転帰についてデータを作成した。最も可能性の高い退縮度転帰(不良、良好、優秀)は、それぞれのカテゴリーについて最大推定確率に基づき選択した。無論、これはロジスティック回帰の最終結果である。退縮度は、不良 - 良好 - 優秀の3グレードスケールに基づき査定し、不良は、患者が1~2年で死亡したことを意味し、良好は、患者が5年以内に疾患を有して生存していることを意味し、優秀は、疾患を有してまたは有さずに5年を上回る生存を意味する。ここで分析は、実施例 1 0 のテーブル 8 に詳述されるデータを含み、S A S 統計パッケージ、J M P、バージョン 8 (カーリー、ノースカロライナ)を使用した。目安としての決定係数の結果をテーブル 2 0 に示す。

10

【 0 3 3 1 】

【 表 2 4 】

20

テーブル20:3つのロジスティックモデルの決定係数値

組合せ	決定係数
FAS 単独	0.39
USP2a 単独	0.65
FAS 及び USP2a; 個々のp値がFAS=.065及び USP2a<0.0001である場合	0.68

データは、既に U S P 2 a を含む方程式への F A S の追加が決定係数を 0 . 6 5 から 0 . 6 8 に上昇させることを明らかにする。しかし、既に F A S を含む方程式への U S P 2 a の追加は、決定係数を 0 . 3 9 から 0 . 6 8 に上昇させる。

30

【 0 3 3 2 】

次に、実際の転帰と予測転帰とのクロス集計を実施した。完全なモデルは、全ての不良を不良として、全ての良好を良好として、などと分類する。(1) F A S 単独、(2) U S P 2 a 単独、および(3) F A S と U S P 2 a のそれぞれについて最も可能性の高い退縮度を示すデータをテーブル 2 1 ~ 2 3 に示す。

【 0 3 3 3 】

【 表 2 5 】

テーブル21:分割表:DOR対FAS単独

40

カウント	優秀	良好	不良	合計
不良	0	9	53	62
良好	6	10	3	19
優秀	5	4	0	9
実際	11	23	56	90

列カテゴリーは、実際の転帰を表す。行は、F A S 単独を使用して予測された転帰を表す。例えば、合計 1 1 人の実際の「優秀」転帰を有する「優秀」列において、F A S は、それらのうちの 6 人を良好として、5人を優秀として正確に分類する。合計 2 3 人の実際

50

の「良好」転帰を有する「良好」列において、FASは、9人を不良として、10人を良好として、4人を優秀として分類する。以下のテーブル22において、この列は、USP2aがFASよりもかなり良好な予測因子であることが示される。合計56人の実際の「不良」転帰を有する不良の列において、FASは、53人を不良として、3人を良好として分類する。実際の転帰と予測転帰との一致度は、 $\kappa = 0.51$ を有し、これはかなり高い値であるが、USP2aを使用した場合よりも低い。

【0334】

【表26】

テーブル22:分割表:DOR対USP2a単独

カウント	優秀	良好	不良	合計
不良	0	1	52	53
良好	6	22	4	32
優秀	5	0	0	5
実際	11	23	56	90

上記のとおり、列カテゴリーは、実際の転帰を表す。行は、USP2a単独を使用して予測された転帰を表す。ここで、合計11人の実際の優秀転帰を有する「優秀」列において、USP2aは、それらのうちの6人を良好として、5人を優秀として正確に分類する（FASと同一）。合計23人の実際の良好転帰を有する「良好」列において、USP2aは、1人を不良として、22人を良好として、0人を優秀として分類し、これはFAS単独よりもかなり良好である。合計56人の実際の不良転帰を有する「不良」列において、USP2aは、52人を不良として、4人を良好として分類する。実際の転帰と予測転帰との一致度は、 $\kappa = 0.77$ を有し、これは極めて高い値であり、USP2aとFASを使用した場合よりもわずかに低いにすぎない。

【0335】

【表27】

テーブル23:分割表:DOR対FASとUSP2a

カウント	優秀	良好	不良	合計
不良	0	1	52	53
良好	3	22	3	28
優秀	8	0	1	9
実際	11	23	56	90

上記のとおり、列カテゴリーは、実際の転帰を表す。行は、USP2aをFASとの組合せで使用して予測された転帰を表す。合計11人の実際の優秀転帰を有する「優秀」列において、USP2aは、それらのうちの3人を良好として、8人を優秀として正確に分類する。この列において、USP2a + FASの組合せは最大の利益を示す。合計23人の実際の良好転帰を有する「良好」列において、USP2a + FASは、1人を不良として、22人を良好として、0人を優秀として分類し、これはUSP2a単独と同一である。合計56人の実際の不良転帰を有する「不良」列において、USP2a + FASは、52人を不良として、3人を良好として、1人を優秀として分類する。実際の転帰と予測転帰との一致度は、 $\kappa = 0.84$ を有し、これは極めて高い値であり、3つのモデルのうち最大である。

【0336】

まとめると、FAS計測値単独は、不良転帰の分類においてUSP2a単独またはUSP2a + FAS組合せと同様に良好である。しかしながら、良好を良好として分類するのに最良であると見出されたのはUSP2a計測値であった。（同一のことは、USP2a + FASに当てはまる）。

10

20

30

40

50

## 【0337】

さらに、FAS + USP 2 a 組合せは、優秀を優秀として分類するのに特筆すべき利点を提供する。結果的に、臨床家は、USP 2 a 単独およびそのFASとの組合せの計測値を癌退縮の予後診断のためのアッセイに取り込むことを十分に助言される。

## 【0338】

例えば、診断および治療レジメンの規定が不可欠である潜在的な前立腺癌の提示時、USP 2 a は、ファーストラインアッセイであるべきである。レベルは、不良転帰（1～2年後に死亡）の予測においてFASと同様に良好であり、良好転帰（疾患を有して少なくとも5年間の生存）の予測においてFASよりも良好である。これら2つの最も悲観的な予後診断にわたる層別化は、最も重要であり、これら2つの間で考えられる治療プロトコルを説明する単一アッセイは、非常に有価である。ここで、USP 2 a はこの要求を満たすことが示された。二番目のアッセイについて、FASの計測値を追加して優秀転帰の予測の精度を改善することができることが決定された。本発明は、そのような方法、アッセイおよびキットを提供する。

## 【0339】

実施例18：骨転移におけるFASおよびHer 2 / neu の発現

FASおよびHer 2 / neu（公知の癌原遺伝子）の発現の分析は、前立腺患者における発現および不良予後との相関を明らかにした。Her 2 / neu（ErbB - 2または上皮成長因子受容体2としても公知）は、乳癌における侵襲性を伝達することが見出されたタンパク質である。本試験において、両方の遺伝子の発現は、前立腺癌患者の骨転移において上昇することが見出された。

## 【0340】

実施例19：USP 2 a についてのポリクローナル抗血清の産生および特性決定

SPFウサギ（メイン・バイオテクノロジー・サービスズ・インコーポレイテッド（Maine Biotechnology Services, Inc.））を使用してポリクローナル抗血清を生成した。48匹のウサギを使用した。ポリクローナル抗体を以下、USP 2 a - 1およびUSP 2 a - 2と称し、ATCCに寄託した（ATCC寄託番号は、それぞれ\_\_および\_\_である）。

## 【0341】

それぞれのウサギに、テーブル24に示される本発明のペプチドの1つを注射した。

## 【0342】

【表28】

テーブル24：注射されたペプチド

USP2a-1 (配列番号11)	LTRPRTYGPSSLLDYDRGRPL
USP2a-2 (配列番号12)	GGGKRAESQTRGTERPLGS

ウサギを交配させ、次いで得られた抗血清をプールし、USP 2 a（配列番号7）からのペプチドから生じた同一のエピトープを使用してアフィニティ精製した。アフィニティ精製は、以下の手順に従って実施した：

工程1：アフィニティカラム調製

配列番号11または配列番号12のペプチドを1mlの活性化セファロースビーズに結合させることにより免疫アフィニティカラムを調製した。

工程2：抗血清のローディング

抗血清を2 μg / mLの濃度においてペプチド - セファロースカラム上にロードし、37において1時間インキュベートした。

工程3：溶出

カラムを数回洗浄した後、0.02%のアジ化ナトリウムを含有する溶出緩衝液を使用し

10

20

30

40

50

て結合した抗体の溶出を実施した。抗体を含有するフラクションをプールし、免疫精製抗体の最終濃度を、紫外線分光光度計を使用して280nmにおける光学密度を読み取ることにより測定した。

#### 工程4：免疫精製抗体のELISA試験

ブロッキング試薬シーブロック (SeaBlock) を無希釈濃度でウェル中にロードし、37℃において30分間インキュベートした。インキュベーション後、4つの血清試料 (プレブリードRb1、プレブリードRb2、ペプチド1およびペプチド2) をウェル中に6つの異なる濃度において添加した。4つの試料を1:50、1:250、1:1250、1:6250、1:31250、および1:156000の濃度に、15MのPBSを使用して希釈した。これらの濃度の4つの血清のそれぞれをウェルに添加し、次いで室温において30分間インキュベートした。最後に、二次抗体の抗RbHRP (HRP-ロット番号86569) を、1:10000の濃度に0.05%のツイーン20を有する、15MのPBSを使用して希釈し、室温において30分間インキュベートした。試料の最終濃度は、テーブル25および26に示すとおり、紫外線分光光度計を使用して450nmにおける吸光度を読み取ることにより測定した。

【0343】

【表29】

テーブル25:プレブリードRb1及び2試料分析

濃度	抗血清Rb1に対するELISA反応性	抗血清Rb2に対するELISA反応性
1:50	0.33	0.34
1:250	0.24	0.02
1:1250	0.36	0.03
1:6250	0.33	0.01
1:31250	0.20	0.20
1:156000	0.43	0.13

【0344】

【表30】

テーブル26:USP2a-1試料分析

濃度	抗血清USP2aペプチド1に対するELISA反応性	抗血清USP2aペプチド2に対するELISA反応性
1:50	0.79	0.87
1:250	0.58	0.58
1:1250	0.94	0.85
1:6250	0.93	0.63
1:31250	0.86	0.95
1:156000	0.64	0.53

#### 実施例20：5年生存についての感度および特異度ROC曲線

実施例10からのデータを使用して、90人の患者コホートの感度および特異度を二元変数により、5年以上であるそれらの生存時間に応じて生存 (Survive5) および非生存 (NoSurv) に分類した。5年生存変数は、4つの異なる予測因子X変数 (FAS、USP2a、AMACR、およびNPY) ならびにグリーソンスコアおよび治療前PSAによりモデル化した。得られたモデルを使用して最も可能性の高い転帰を予測した (同様に生存または非生存)。実際の転帰を、異なるモデルに基づき予測転帰と比較した。クロス分類から、それぞれの変数の感度および特異度を推定した。次いで、ROC曲線を作成した。

【0345】

Y変数としての5年生存

年生存は数値変数であり、0.5から5の範囲である。基礎ヒストグラムプロットは、かなりの比率の患者が2年より前に死亡したことを示した（平均生存 = 2.45年、標準偏差1.6）。

【0346】

二分変数「5年生存」を使用し、値「Survive5」を5年以上の生存時間（年数）を有する全ての症例に割り当てた。全ての他の症例に「NoSurv」または非生存を割り当てた。合計89人の全症例のうち、20人が少なくとも5年間生存した一方、69人が5年より前に死亡した。したがって、「NoSurv」の確率は0.775であった一方、「Survive5」の確率は0.225であった（実際の転帰に基づく）。

10

【0347】

X変数

以下の予測因子変数を分析したFAS（0～3グレードシステム）；USP2a（0～3グレードシステム）；AMACR（0～3グレードシステム）；NPY（0～3グレード）；グリーソンスコア（5～7のみ）；および治療前PSA（ng/ml）。FAS、USP2a、AMACRおよびNPYは、JMPバージョン8による分析において順序データとして処理した。結果を2段階でまとめた。第1に、退縮度と単一の予測因子との関係を分析した。第2に、退縮度と2つ以上の予測因子との関係を分析した。名義ロジスティック回帰分析を実施し、Y変数「Survive5」が二分変数であるためそれが要求された。主要性能特性のまとめを以下のテーブル27に示す。

20

【0348】

【表31】

テーブル27:ロジスティック結果のまとめ:X変数対5年生存率

変数	R <sup>2</sup>	p値	ROC面積	感度	特異度
FAS	0.567	<.0001	0.937	0.984	0.704
USP2a	0.471	<.0001	0.904	0.957	0.550
AMACR	0.277	<.0001	0.782	0.985	0.400
NPY	0.630	<.0001	0.946	0.969	0.783
グリーソン(5~7)	0.04	0.568	0.550	1	.05
治療前PSA	0.008	0.374	0.589	.986	.000

30

この表のまとめは、以下の基準を含む：R<sup>2</sup>（決定係数）は、全モデルの尺度である。この値は0から1である。より高い値は、モデルがデータにおけるより多くの全体的な変動を説明することを意味し、p値は、統計的有意性の尺度である。典型的には、当分野において、0.05未満のp値が有意なモデルまたは効果として解釈される。ROC面積は、ROC曲線の1つの特性である。ROC曲線は、順位序列にわたり頻度を蓄積するとき真陽性対偽陽性のカウントを含む。ROC曲線は、X軸上の（1 - 特異度）およびY軸上の感度をプロットする。ROC面積下で考えられる最大値は1であり、それは真陽性および真陰性の完全な分離を示す。変数を予測的とすべき場合、1に近い値が望まれる。

40

【0349】

診断試験について、感度および特異度は重要な概念である。感度は、所与のX値（検定または尺度）が病態の存在を正確に予測する確率である。ここで、X変数は、上記に詳述され、病態は、二元変数Survive5（少なくとも5年間の生存または非生存）である。特異度は、病態が存在しないことを検定が正確に予測する確率である。

【0350】

50

データから、FASが2番目に高い $R^2$ 、2番目に大きいROC面積および2番目に高い特異度を有することを決定することができる。それは、NPYよりもわずかに高い感度を有するが、より低い特異度により相殺される。USP2aは、3番目に高い $R^2$ 、3番目に大きいROC面積および3番目に高い特異度を有する。それは、NPYよりもわずかに低い感度を有する。AMACRは、4番目に高い $R^2$ 、4番目に大きいROC面積および4番目に高い特異度を有する。それはより高い感度を有するが、より低い特異度によりかなり相殺される。

#### 【0351】

興味深いことに、グリーンソンおよび治療前PSAの両方は、5年生存との非有意関係を有する。これらの $R^2$ は低く、ROC面積は約0.5である。これらの感度は1であるが、それは特異度=0.5と対をなす。結果的に、ロジスティックモデルは、有意な関係が存在しないため、実質的に全ての患者をNoSurvとして分類する。

10

#### 【0352】

実施例21：それぞれのX変数についての感度および特異度：ROC曲線の比較

ROC曲線は、感度と特異度（または1 - 特異度）との関係を可視化する手法である。

理想的なROC曲線は、病態を有する全てを陽性として、病態を有さない全てを陰性として正確に分類する。理想的なROC曲線下面積は1であり、そのことは、(1 - 特異度) = 0の場合、感度の1への急傾斜の増加を意味する。6つのX変数についてのROC曲線を図6に示す。FASについての急傾斜のROC曲線をグリーンソンスコアからの斜線のROCと比較することにより、グリーンソンが生存転帰の予測においてそれほど有用でないことが実証された。同様に、治療前PSAは、5年生存の予測においてそれほど良好な変数でない。PSA ROCは、PSAが他の変数と同様に順序的でなく連続的であるため、異なって見える（むしろ階段関数に近い）ことに留意されたい。考慮中の6つの変数のROCの比較は、FAS、NPYおよびUSP2aが最大の曲線下面積を有することを明確に示す。グリーンソンおよびPSAは斜線に近いROC曲線を有し、このことは、それらが5年生存率の予測においてそれほど有用でないことを意味する。

20

#### 【0353】

実施例22：対数正規分布を使用する5年生存確率

4つの予測因子変数FAS、NPY、AMACRおよびUSP2aを使用して5年生存確率の推定を改善することができるかどうかおよび治療前PSAまたはグリーンソンスコアと比較してそれらがいかに機能するかを調査する試みにおいて、パラメトリック生存分析を実施した。この分析は、対数正規分布を使用して変動性および線形モデルを表して生存時間と予測因子変数およびまたはグリーンソン/PSAとの関係を表す。一部の観察値は、一部の生存データが5年を上回ったため、左側打ち切りである。

30

#### 【0354】

この試験において、それぞれの症例におけるY変数は生存時間（年数）である。観察値のほとんどを年数に丸めた。数個の観察値は5年において左側打ち切りである。打ち切り変数を分析に含めた。FAS、USP2a、AMACR、NPYは、JMPによる分析において順序データとして処理した。

#### 【0355】

1900症例（男性対象）についてのデータが利用可能であった。患者は、アンドロゲン除去を伴い、放射線療法を受けない前立腺切除後であった。全てについてのグリーンソンスコアは5~7であった。しかしながら、ある症例は生存時間を欠き、別の症例は一部の尺度（AMACRおよびNPY）を欠いた。結果として、1888または1889の観察値のみが分析に利用可能であった。生存確率は、5、6、および7のグリーンソンを有する症例のみを使用して推定した。8つの観察値はこの範囲外であった。このことは、症例数をさらに1881または1880に減らした。しかしながら、これらの症例（グリーンソンスコア4、8、および9を有する）を含めることは、結論を変えることも効果の尺度の推定値を変化させることもなかったことに留意されたい。

40

#### 【0356】

50

分析は、SASインスティテュート(SAS Institute)の製品JMP8を使用して実施した。この試験について、フィット・ライフ・ディストリビューション(Fit Life Distribution)を使用してどの生存分布がもっとも有用であるかを確認し、フィット・ライフ×X(Fit Life by X)プラットフォームの位置モデルを使用して生存確率対異なるレベルの予測因子変数のグラフを作成した。フィット・パラメトリック・サバイバル(Fit Parametric Survival)を特異的数値結果、例えば、それぞれの項の有意性の検定および5年生存/再燃確率の推定値に使用した。全てのプラットフォームは、それらの結果を汎用され十分に理解されている統計的方法の尤度法により得た。

【0357】

生存データをいかなる予測因子も他のX変数も参照せずに評価する第1の分析を行った。この分析の目的は、もっとも有用な生存分布を確認することである。6つの異なる共通生存分布の一般的分析は、対数正規分布がデータに最良にフィットすることを示す。対数正規モデル推定値に基づくと、いかなるX変数も考慮せず、5年生存確率は0.096であった。

【0358】

次いで、4つの予測因子変数を分析し、それぞれは、FAS、USP2aおよびNPYについて最も強い3つの変数として高度に有意であることが示された。テーブル28は、5~7のグリーンスコアを有する症例についての5年生存確率(Surv Prob)を予測因子変数グレードスコアにより分類して示す。

【0359】

【表32】

テーブル28. 5年生存確率

予測因子変数	p値	L-Rカイ二乗	スコア=0 についての 生存確率	スコア=1 についての 生存確率	スコア=2 についての 生存確率	スコア=3 についての 生存確率
FAS	<0.0001	75.4	.608	.303	.011	.001
USP2a	<0.0001	65.3	.694	.309	.166	.002
AMACR	0.0002	19.4	.123	.039	.068	.505
NPY	<0.0001	59.8	.694	.315	.020	.005

生存時間対グリーンスコアのモデルは有意でなかった(テーブル29参照)。しかしながら、グリーンソン=5からグリーンソン=6での生存確率の降下があった。このことは、グリーンソンが他の予測因子変数に追加される場合に有意であることが見出された。これにもかかわらず、グリーンスコアモデルは単独および予測因子変数との組合せの両方でかなり弱かった。

【0360】

【表33】

テーブル29. 生存確率-グリーンソン5~7

	p値	L-Rカイ二乗	スコア=5 についての 生存確率	スコア=6 についての 生存確率	スコア=7 についての 生存確率
グリーンソン	0.401	1.8	.237	.097	.073

10

20

30

40

50

同様に、治療前PSAは有意でなかった ( $p = 0.77$ )。生存確率対PSAスコアの関係は反転し、すなわち、PSAスコアが増加するにつれ、推定生存確率は減少する。

【0361】

【表34】

テーブル30:生存確率-PSA

	p値	L-Rカイニ乗	スコア=5 についての 生存確率	スコア=20 についての 生存確率	スコア=50 についての 生存確率
PSA	0.771	0.084	.089	.095	0.109

10

### 実施例23. 生存に対する予測因子変数の組合せ

実施例22からのデータを利用して、予測因子変数の組合せを予測モデルの改善について調査した。最初に、単一の予測因子変数をグリーンスコアおよびPSAと組み合わせ、次いで複数の予測因子変数をグリーンスコアおよびPSAレベル計測値と組み合わせた。1つの予測因子変数とグリーンスコアおよびPSAを含有するモデルは、極めて類似の結果を示す。テーブル31参照。全ての単一の予測因子変数は有意であった。グリーンおよびPSAは有意でなく、但し、グリーンをNPYと組み合わせた場合は例外であった。このことは、主にNPY = 0または1グレードの場合に生じることが決定された。類似の関係がFASおよびUSP2aについて観察されたが、統計的有意性を達成しなかった。

20

【0362】

【表35】

テーブル31. 生存確率-組合せ

	モデル項	p値	モデル項	p値	モデル項	p値	モデル項	p値
	FAS	<.0001	USP2a	<.0001	AMACR	0.0001	NPY	<.0001
追加	グリーン	0.256	グリーン	0.302	グリーン	0.267	グリーン	0.028
追加	PSA	0.937	PSA	0.790	PSA	0.925	PSA	0.585

30

複数の予測因子変数の組合せも調査し、これらの結果をテーブル32~38に示す。

【0363】

【表 3 6】

テーブル32. 生存確率－組合せFAS／グリーソン／PSA

FAS (0-3)	グリーソンスコア	治療前 PSA (ng/ml)	時間	生存確率	再燃確率	95%下限	95%上限
0	5	12.5	5	<b>0.756</b>	0.244	0.030	0.689
0	6	12.5	5	<b>0.663</b>	0.337	0.107	0.657
0	7	12.5	5	<b>0.526</b>	0.474	0.192	0.770
1	5	12.5	5	<b>0.442</b>	0.558	0.161	0.900
1	6	12.5	5	<b>0.337</b>	0.663	0.453	0.832
1	7	12.5	5	<b>0.219</b>	0.781	0.568	0.916
2	5	12.5	5	<b>0.027</b>	0.973	0.735	0.999
2	6	12.5	5	<b>0.014</b>	0.986	0.925	0.998
2	7	12.5	5	<b>0.005</b>	0.995	0.957	1.000
3	5	12.5	5	<b>0.004</b>	0.996	0.936	1.000
3	6	12.5	5	<b>0.002</b>	0.998	0.991	1.000
3	7	12.5	5	<b>0.000</b>	1.000	0.996	1.000

10

20

【 0 3 6 4】

【表 3 7】

テーブル33. 生存確率－組合せUSP2a／グリーソン／PSA

USP2a (0-3)	グリーソンスコア	治療前 PSA (ng/ml)	時間	生存確率	再燃確率	95%下限	95%上限
0	5	12.5	5	<b>0.810</b>	0.190	0.007	0.757
0	6	12.5	5	<b>0.793</b>	0.207	0.021	0.656
0	7	12.5	5	<b>0.671</b>	0.329	0.056	0.760
1	5	12.5	5	<b>0.389</b>	0.611	0.192	0.924
1	6	12.5	5	<b>0.366</b>	0.634	0.353	0.856
1	7	12.5	5	<b>0.236</b>	0.764	0.496	0.926
2	5	12.5	5	<b>0.200</b>	0.800	0.410	0.972
2	6	12.5	5	<b>0.183</b>	0.817	0.653	0.921
2	7	12.5	5	<b>0.100</b>	0.900	0.743	0.972
3	5	12.5	5	<b>0.003</b>	0.997	0.938	1.000
3	6	12.5	5	<b>0.003</b>	0.997	0.986	1.000
3	7	12.5	5	<b>0.001</b>	0.999	0.994	1.000

30

40

【 0 3 6 5】

【表 3 8】

テーブル34. 生存確率－組合せAMACR／グリーソン／PSA

AMACR (0-3)	グリーソンスコア	治療前 PSA (ng/ml)	時間	生存確率	再燃確率	95%下限	95%上限
0	5	12.5	5	<b>0.334</b>	0.666	0.237	0.942
0	6	12.5	5	<b>0.104</b>	0.896	0.707	0.976
0	7	12.5	5	<b>0.092</b>	0.908	0.705	0.983
1	5	12.5	5	<b>0.163</b>	0.837	0.476	0.978
1	6	12.5	5	<b>0.035</b>	0.965	0.913	0.988
1	7	12.5	5	<b>0.030</b>	0.970	0.915	0.991
2	5	12.5	5	<b>0.256</b>	0.744	0.290	0.969
2	6	12.5	5	<b>0.068</b>	0.932	0.796	0.984
2	7	12.5	5	<b>0.060</b>	0.940	0.800	0.988
3	5	12.5	5	<b>0.807</b>	0.193	0.016	0.660
3	6	12.5	5	<b>0.514</b>	0.486	0.217	0.762
3	7	12.5	5	<b>0.487</b>	0.513	0.224	0.795

10

20

【 0 3 6 6 】

【表 3 9】

テーブル35. 生存確率－組合せNPY／グリーソン／PSA

NPY (0-3)	グリーソンスコア	治療前 PSA (ng/ml)	時間	生存確率	再燃確率	95%下限	95%上限
0	5	12.5	5	<b>0.927</b>	0.073	0.002	0.468
0	6	12.5	5	<b>0.784</b>	0.216	0.047	0.540
0	7	12.5	5	<b>0.591</b>	0.409	0.140	0.733
1	5	12.5	5	<b>0.662</b>	0.338	0.046	0.800
1	6	12.5	5	<b>0.402</b>	0.598	0.354	0.808
1	7	12.5	5	<b>0.210</b>	0.790	0.562	0.927
2	5	12.5	5	<b>0.100</b>	0.900	0.531	0.993
2	6	12.5	5	<b>0.026</b>	0.974	0.890	0.996
2	7	12.5	5	<b>0.006</b>	0.994	0.960	0.999
3	5	12.5	5	<b>0.032</b>	0.968	0.758	0.999
3	6	12.5	5	<b>0.006</b>	0.994	0.978	0.999
3	7	12.5	5	<b>0.001</b>	0.999	0.992	1.000

30

40

テーブル 3 6 ~ 3 8 は、種々の組合せの尤度比効果検定を示す。( \* ) は、統計的有意性を示す。

【 0 3 6 7 】

50

## 【表 4 0】

テーブル36. 生存確率－組合せFAS/USP2a/AMACR/グリーソン/PSA

ソース	DF	L-Rカイニ乗	確率>カイニ乗
FAS (0-3)	3	27.2661977	<.0001*
USP2a (0-3)	3	8.49871757	0.0368*
AMACR (0-3)	3	10.2392597	0.0166*
グリーソンスコア	2	4.9018341	0.0862
治療前PSA (ng/ml)	1	0.03659271	0.8483

10

## 【 0 3 6 8】

## 【表 4 1】

テーブル37. 生存確率－組合せNPY/USP2a/AMACR/グリーソン/PSA

ソース	DF	L-Rカイニ乗	確率>カイニ乗
NPY (0-3)	3	22.6450728	<.0001*
USP2a (0-3)	3	12.0233808	0.0073*
AMACR (0-3)	3	7.78898035	0.0506
グリーソンスコア	5	8.98077582	0.1098
治療前PSA (ng/ml)	1	0.02195676	0.8822

20

## 【 0 3 6 9】

## 【表 4 2】

テーブル38. 生存確率－組合せFAS/NPY/USP2a/AMACR/グリーソン/PSA

ソース	DF	L-Rカイニ乗	確率>カイニ乗
FAS (0-3)	3	13.7001748	0.0033*
NPY (0-3)	3	4.24880878	0.2358
USP2a (0-3)	3	9.3122571	0.0254*
AMACR (0-3)	3	10.9697295	0.0119*
グリーソンスコア	5	7.69334616	0.1740
治療前PSA (ng/ml)	1	0.10599907	0.7447

40

FASおよびNPYを含む全ての変数の使用は、この2つ(NPYおよびFAS)が極めて類似するためNPYが有意でないこと示す。しかしながら、これらのデータについて、FASはより強い変数であると考えられる。

## 【 0 3 7 0】

予測因子変数の3つ(FAS、USP2aおよびAMACR)をグリーソンおよびPSAと組み合わせた場合、3つ全てが有意であったが、グリーソンスコアはアルファ = 0.05において有意でなかった。テーブル39参照。3つ全てが同時に有意であったという事実は、それらが感度と特異度との間の相殺のわずかに異なる態様を説明すること示唆す

50

る。

【 0 3 7 1 】

【 表 4 3 】

テーブル39. 生存確率

モデル項	p値
FAS (0-3)	<.0001
USP2a (0-3)	0.0368
AMACR (0-3)	0.0166
グリーソンスコア	0.0862
治療前 PSA (ng/ml)	0.8483

10

#### 実施例 2 4 : 再燃確率 × 予測因子変数

それぞれの予測因子変数に対する生存時間に関するモデルに別個に基づき、変数による再燃時間（非生存）分布の推定値を計算した。これらの分布を使用してそれぞれの予測因子変数の挙動を説明することができる。データを図 7 に示す。それぞれのプロットは、X 軸としての生存時間（0 から 5）および Y 軸上の再燃確率を有する。異なる分布がそれぞれのグラフに標識される。

20

【 0 3 7 2 】

第 1 のプロット図 7 A は、F A S に対する生存時間に関する。このプロットは、F A S = 3 および F A S = 2 についての曲線が極めて近接することを示す。同様に、F A S = 1 および F A S = 0 の曲線も近接する。これら 2 つの群は、5 年生存の機会をほとんど有さない症例を 5 年生存の機会を有する症例から分けた。4 つの曲線は、生存に関して F A S = 0 が最良であり、F A S = 3 が最悪であるという点で一致する。F A S についての信頼区間推定値は、F A S = 1 と F A S = 0 との差が統計的に有意でないことを示すが、全ての他の差のペアはアルファ = 0 . 0 5 において有意であることを示す。

【 0 3 7 3 】

第 2 のプロット図 7 B は、U S P 2 a に対する生存時間に関する。このプロットは、U S P 2 a = 1 および U S P 2 a = 2 についての曲線が極めて近接することを示す。5 年生存の機会を有する唯一の症例は、U S P 2 a = 0 からのものである。4 つの曲線は、生存に関して U S P 2 a = 0 が最良であり、U S P 2 a = 3 が最悪であるという点で一致する。U S P 2 a についての信頼区間推定値は、U S P 2 a = 1 と U S P 2 a = 0 との差および U S P 2 a および U S P 2 a = 1 についての差が統計的に有意でないことを示すが、全ての他の差のペアはアルファ = 0 . 0 5 において有意であることを示す。

30

【 0 3 7 4 】

第 3 のプロット図 7 C は、A M A C R に対する生存時間に関する。このプロットは、A M A C R = 0、A M A C R = 1 および A M A C R = 2 についての曲線が極めて近接することを示す。5 年生存の機会を有する唯一の症例は、A M A C R = 3 からのものである。4 つの曲線は、生存に関して A M A C R = 3 が最良であり、A M A C R = 0 が最悪であるという点で一致する。A M A C R についての信頼区間推定値は、A M A C R = 1 と A M A C R = 0 との差および A M A C R = 2 および A M A C R = 1 についての差が統計的に有意でないことを示すが、A M A C R = 3 との差の全てのペアはアルファ = 0 . 0 5 において有意であることを示す。

40

【 0 3 7 5 】

第 4 のプロット図 7 D は、N P Y に対する生存時間に関する。外見上、このプロットは、F A S についてのプロットと極めて類似する。このプロットは、N P Y = 3 および N P Y = 2 についての曲線が極めて近接することを示す。同様に、N P Y = 1 および N P Y = 0 の曲線も近接する。これら 2 つの群は、5 年生存の機会をほとんど有さない症例を 5 年

50

生存の機会を有する症例から分けた。4つの曲線は、生存に関して  $NPY = 0$  が最良であり、 $NPY = 3$  が最悪であるという点で一致する。 $NPY$  についての信頼区間推定値は、 $NPY = 3$  と  $NPY = 2$  との差が統計的に有意でないことを示すが、全ての他の差のペアは  $\alpha = 0.05$  において有意であることを示す。

【0376】

第5のプロット図7Eは、グリーンスコアに対する生存時間に関する。このプロットは、グリーンソン = 7 およびグリーンソン = 6 についての曲線が極めて近接することを示す。グリーンソン = 5 についての曲線はそれほど近接しない。3つの曲線は、生存に関してグリーンソン = 5 が最良であり、グリーンソン = 7 が最悪であるという点で一致する。しかしながら、グリーンスコアについての信頼区間推定値は、曲線が  $\alpha = 0.05$  において統計的に有意でないことを示す。

10

【0377】

第6のプロット図7Fは、治療前PSAに対する生存時間に関する。このプロットは、他の変数ともグリーンソンとも違って、PSAが連続変数であるため異なる。プロットはX軸としての治療前PSAおよびY軸としての年生存時間を有する。3つの線は、それぞれのPSAレベルについての生存時間の0.1、0.5および0.9の分位点の推定値を表す。得られた線は不一致であることを把握することができる。PSAレベルが増加するにつれ、生存確率は増加する。そのような不一致結果は、変数が全体的に非有意である場合に生じ得る。このことは、全体の  $p$  レベル = 0.77 であるPSAの症例である。

20

【0378】

#### 実施例25：尿中のFASの検出

一連の患者試料における尿中のFASのレベルを計測し、上皮細胞におけるFASレベルと比較した。全ての患者は男性であり、それぞれ経尿道切除(TUR)を受けていた。リンパ節転移は評価しなかった。データをテーブル40に示す。N/Aは、測定しなかったことを意味する。G1は、第1のグリーンスコアである一方、G2は、第2のグリーンスコアを指し、G合計は、G1およびG2の合計を指す。上皮染色は、0~4のスケールに基づき、0 = 0、1 = 1~25%、2 = 26~50%、3 = 51~75%および4 = 76~100%である。「+」記号を示す任意の計測値は、数値指標をわずかに上回るレベルを指す。「M」は、検出された転移を意味し、「N」は、検出されたリンパ節を意味する。表から、6より大きいグリーンスコアについて、FASが尿中で1~4のスコアで検出されることが明らかである。しかしながら、6未満のグリーンスコアは、FASレベルは低い傾向にある(スコア1および2)。したがって、FASがより高いレベルにおいて尿中に出るグリーングレード閾値が存在すると考えられる。

30

【0379】

【表 4 4】

テーブル40. 尿FAS値

患者 試料ID	年齢	腫瘍タイプ	G1	G2	G合計	腫瘍 グレード	上皮	FAS
A-1a	77	腺癌	3	3	6	T1a	N	3+
A-2a	74	腺癌	3	2	5	T1b	1+	1+
A-3a	74	腺癌	3	2	5	T1b	M	2
A-4a	62	腺癌	2	2	4	T1	3+	1+
A-5a	62	腺癌	2	2	4	T1	2+	1+
A-6a	62	腺癌	2	2	4	T1	M	2
A-7a	62	腺癌	2	2	4	T1	2+	1+
A-8a	62	腺癌	2	2	4	T1	3+	1+
A-9a	62	前立腺- 良性過形成	2	2	4	T1	2+	1+
A-10a	62	腺癌	2	2	4	T1	M	2
A-1b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-2b	85	腺癌	5	4	9	T1b	4+	4
A-3b	85	腺癌	5	4	9	T1b	4+	4
A-4b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-5b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-6b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-7b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-8b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-9b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-10b	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-1c	85	腺癌	5	4	9	T1b	2+	4
A-2c	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-3c	85	腺癌	5	4	9	T1b	4+	3
A-4c	85	腺癌	5	4	9	T1b	4+	4
A-5c	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-6c	85	腺癌	5	4	9	T1b	2+	4
A-7c	85	腺癌	5	4	9	T1b	2+	3
A-8c	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-9c	85	腺癌	5	4	9	T1b	3+	4
A-10c	85	腺癌	5	4	9	T1b	2+	4
A-1d	78	腺癌	3	4	7	T1	1+	3
A-2d	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-3d	78	腺癌	3	4	7	T1	1+	3
A-4d	78	腺癌	3	4	7	T1	M	2
A-5d	78	腺癌	3	4	7	T1	3+	3
A-6d	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-7d	78	腺癌	3	4	7	T1	1+	2
A-8d	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-9d	78	腺癌	3	4	7	T1	N	3
A-10d	78	腺癌	3	4	7	T1	1+	3
A-1e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-2e	78	腺癌	3	4	7	T1	M	3
A-3e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-4e	78	腺癌	3	4	7	T1	1+	2
A-5e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-6e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-7e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	2
A-8e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-9e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	3
A-10e	78	腺癌	3	4	7	T1	2+	4
B-1a	83	腺癌	2	3	5	T1b	2+	1+

10

20

30

40

B-2a	83	腺癌	2	3	5	T1b	M	M
B-3a	83	腺癌	2	3	5	T1b	2+	1+
B-4a	83	腺癌	2	3	5	T1b	2+	2+
B-5a	83	腺癌	2	3	5	T1b	2+	1+
B-6a	83	腺癌	2	3	5	T1b	2+	2+
B-7a	83	腺癌	2	3	5	T1b	1+	1+
B-8a	76	腺癌	3	5	8	T1b	M	M
B-9a	76	腺癌	3	5	8	T1b	3+	3+
B-10a	76	腺癌	3	5	8	T1b	3+	4+
B-1b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	3+
B-2b	76	腺癌	3	5	8	T1b	N	3+
B-3b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	2+
B-4b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	2+
B-5b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	2+
B-6b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	3+
B-7b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	2+
B-8b	76	腺癌	3	5	8	T1b	M	M
B-9b	76	腺癌	3	5	8	T1b	2+	3+
B-10b	76	腺癌	3	5	8	T1b	3+	3+
B-1c	69	腺癌	5	5	10	T1	N	3+
B-2c	69	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
B-3c	69	腺癌	5	5	10	T1	N	3+
B-4c	69	腺癌	5	5	10	T1	3+	2+
B-5c	69	腺癌	5	5	10	T1	N	3+
B-6c	69	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
B-7c	69	腺癌	5	5	10	T1	3+	2+
B-8c	69	腺癌	5	5	10	T1	3+	2+
B-9c	69	腺癌	5	5	10	T1	3+	2+
B-10c	69	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
B-1d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-2d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-3d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-4d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-5d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-6d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-7d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-8d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-9d	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	2+
B-10d	86	腺癌	5	3	8	T1	N	N
B-1e	86	腺癌	5	3	8	T1	1+	1+
B-2e	86	腺癌	5	3	8	T1	M	M
B-3e	86	腺癌	5	3	8	T1	1+	1+
B-4e	86	腺癌	5	3	8	T1	1+	1+
B-5e	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	2+
B-6e	86	腺癌	5	3	8	T1	3+	1+
B-7e	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-8e	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-9c	86	腺癌	5	3	8	T1	2+	1+
B-10e	86	腺癌	5	3	8	T1	3+	2+
B-1f	66	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	2+
B-2f	81	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	2+

10

20

30

40

B-3f	78	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	2+
B-4f	78	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	3+
B-5f	78	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	N	2+
C-1a	69	腺癌	1	2	2	T1b	2+	2+
C-2a	69	腺癌	1	2	2	T1b	N	2+
C-3a	69	腺癌	1	2	2	T1b	2+	1+
C-4a	69	腺癌	1	2	2	T1b	N	2+
C-5a	69	腺癌	1	2	2	T1b	1+	2+
C-6a	69	腺癌	1	2	2	T1b	1+	1+
C-7a	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
C-8a	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-9a	84	腺癌	5	5	10	T1	M	M
C-10a	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-1b	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-2b	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
C-3b	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	2+
C-4b	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-5b	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-6b	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
C-7b	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-8b	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
C-9b	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
C-10b	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
C-1c	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
C-2c	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
C-3c	84	腺癌	5	5	10	T1	M	M
C-4c	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-5c	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
C-6c	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
C-7c	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-8c	84	腺癌	5	5	10	T1	N	1+
C-9c	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-10c	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-1d	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	2+
C-2d	84	良性前立腺肥大	N/A	N/A	10	T1	2+	2+
C-3d	84	良性前立腺肥大	N/A	N/A	10	T1	2+	1+
C-4d	84	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
C-5d	84	腺癌	5	5	10	T1	1+	2+
C-6d	64	腺癌	4	5	9	T1	2+	2+
C-7d	64	腺癌	4	5	9	T1	3+	2+
C-8d	64	腺癌	4	5	9	T1	1+	1+
C-9d	64	腺癌	4	5	9	T1	3+	1+
C-10d	64	腺癌	4	5	9	T1	3+	1+
C-1e	64	腺癌	4	5	9	T1	2+	1+

10

20

30

40

C-2e	64	腺癌	4	5	9	T1	N	1+
C-3e	64	腺癌	4	5	9	T1	2+	0
C-4e	64	腺癌	4	5	9	T1	3+	0
C-5e	64	腺癌	4	5	9	T1	1+	1+
C-6e	64	腺癌	4	5	9	T1	M	M
C-7e	64	腺癌	4	5	9	T1	3+	2+
C-8e	64	腺癌	4	5	9	T1	2+	2+
C-9e	64	腺癌	4	5	9	T1	3+	2+
C-10e	64	腺癌	4	5	9	T1	1+	1+
C-1f	66	良性前立腺肥大	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	2+
C-2f	66	良性前立腺肥大	N/A	N/A	N/A	N/A	1+	1+
C-3f	66	良性前立腺肥大	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	2+
D-1a	73	腺癌	2	3	5	T1	3+	2+
D-2a	73	腺癌	2	3	5	T1	2+	2+
D-3a	73	腺癌	2	3	5	T1	M	M
D-4a	61	腺癌	2	3	5	T1	3+	2+
D-5a	61	腺癌	2	3	5	T1	2+	1+
D-6a	68	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
D-7a	68	腺癌	5	5	10	T1	M	M
D-8a	68	腺癌	5	5	10	T1	3+	1+
D-9a	68	腺癌	5	5	10	T1	3+	1+
D-10a	68	腺癌	5	5	10	T1	3+	2+
D-1b	68	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
D-2b	68	腺癌	5	5	10	T1	4+	2+
D-3b	68	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
D-4b	68	腺癌	5	5	10	T1	M	M
D-5b	68	腺癌	5	5	10	T1	1+	1+
D-6b	68	腺癌	5	5	10	T1	3+	1+
D-7b	68	腺癌	5	5	10	T1	3+	2+
D-8b	68	腺癌	5	5	10	T1	4+	1+
D-9b	68	腺癌	5	5	10	T1	4+	2+
D-10b	68	腺癌	5	5	10	T1	M	M
D-1c	77	腺癌	5	5	10	T1	1+	2+
D-2c	77	腺癌	5	5	10	T1	N	2+
D-3c	77	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
D-4c	77	腺癌	5	5	10	T1	M	M
D-5c	77	腺癌	5	5	10	T1	3+	1+
D-6c	77	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
D-7c	77	腺癌	5	5	10	T1	2+	1+
D-8c	73	腺癌	2	4	6	T1	3+	2+
D-9c	73	腺癌	2	4	6	T1	2+	1+
D-10c	73	腺癌	2	4	6	T1	1+	1+
D-1d	73	腺癌	2	4	6	T1	2+	2+
D-2d	73	腺癌	2	4	6	T1	3+	1+
D-3d	73	腺癌	2	4	6	T1	1+	1+
D-4d	73	腺癌	2	4	6	T1	M	M
D-5d	72	腺癌	3	4	7	T1	M	M
D-6d	72	腺癌	3	4	7	T1	3+	2+
D-7d	72	腺癌	3	4	7	T1	4+	2+

10

20

30

40

D-8d	94	腺癌	3	2	5	T1	4+	2+
D-9d	94	腺癌	3	2	5	T1	2+	1+
D-10d	94	腺癌	3	2	5	T1	2+	1+
D-1e	72	腺癌	5	4	9	T1	3+	2+
D-2e	72	腺癌	5	4	9	T1	4+	2+
D-3e	72	腺癌	5	4	9	T1	3+	1+
D-4e	72	腺癌	5	4	9	T1	3+	2+
D-5e	72	腺癌	5	4	9	T1	3+	2+
D-6e	72	腺癌	5	4	9	T1	4+	2+
D-7e	72	腺癌	5	4	9	T1	1+	1+
D-8e	72	腺癌	5	4	9	T1	2+	2+
D-9e	72	腺癌	5	4	9	T1	N	1+
D-10e	72	腺癌	5	4	9	T1	3+	2+
D-1f	65	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	1+	2+
D-2f	81	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	1+	2+
D-3f	66	前立腺過形成	N/A	N/A	N/A	N/A	1+	1+
D-4f	71	良性前立腺肥大	N/A	N/A	N/A	N/A	1+	2+
D-5f	71	良性前立腺肥大	N/A	N/A	N/A	N/A	3+	3+
対照								
1	32	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
2	6	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
3	6	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
4	32	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
5	101	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	1+	N/A
6	62	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
7	101	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	3+	N/A
8	52	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A
9	62	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
10	32	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	2+	N/A
11	36	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A
12	52	正常	N/A	N/A	N/A	N/A	4+	N/A

10

20

30

40

50

実施例 26 : グリーソン制限を有するおよび有さないフィット「 $X \times Y$ 変数」(Fit “ $X$  by  $Y$  variables”)

変数 FAS、AMACR および USP2a と退縮度との関係を、SAS 統計パッケージ JMP バージョン 8 (カー、ノースカロライナ) を使用してさらに調査した。データは、実施例 10 のテーブル 8 に詳述される 90 人の観察値からなるものであった。これらのデータのうち、 $X \times Y$  フィットをグリーソンスコアのさらなる制限を有しておよび有さずに評価した。この場合、90 人の観察値のうち、グリーソンスコア 5 から 7 を有する 82 人の観察値のみを使用した。

【0380】

2 つの変数を固形腫瘍 (臓器限局) についての代理変数として使用した: FAS (0、1、2、3) および退縮度。それぞれの変数についてクロス集計を実施し、FAS の場合、ケンドールのタウおよびスピアマンのローを順序変数間の関連の尺度として使用して多変数順位相関も実施した。FAS、AMACR および USP2A についてのデータを実施例 27 および 28 に示す。退縮度を含む全ての変数にわたる評価についてのデータを実施例 29 に挙げる。

【0381】

結果は、最も強い関連は、FASとNPYとの間であり、ほとんど同等に強い関連はFASとUSP2Aとの間であることを示した。退縮度に関して、FASはUSP2Aよりも強かった。しかしながら、USP2Aについて、カットオフをUSP2A = 0、1対2、3からUSP2A = 0、1、2対3に変えた場合、相関が存在した。

【0382】

AMACRに関して、FAS = 3の場合、51人の症例のうち48人がAMACR = 1または2を有する。したがって、低いAMACR値は、高いFAS値と関連する。しかしながら、関連は、FASが低い場合、それほど強くない。

【0383】

実施例27：フィットX×Y変数：FAS、AMACRおよびUSP2A

FAS = 0およびFAS = 1を優秀予後の代用として使用し、固形腫瘍（臓器限局）において優秀予後であると推定して、本発明者らは、FAS、AMACRおよびUSP2Aに何か起こるのかを決定することを追求した。28人の症例がそのカテゴリーに属した。12人のUSP2A症例は、0または1のいずれかの値を有した一方、16人は2および3の値を有する。2つのUSP2A群間で非有意差が存在した。19症例はAMACRを0および1の値で有する一方、9人は値を有する。19人と9人との差は、統計的に有意であり、フィッシャーの正確確率検定がP = 0.044であり、片側検定を仮定した。両側検定は、カイ二乗p値 = 0.059を有し、したがって、閾値を逃した。分割表はより全体的な像を提供した。分割表をテーブル41および42に示す。

【0384】

【表45】

テーブル41. FAS(0~3)対USP2A(0~3)の分割表

カウント		USP2A				FAS合計
		USP2A = 0	USP2A = 1	USP2A = 2	USP2A = 3	
FAS	FAS = 0	4	3	2	0	9
	FAS = 1	1	4	12	2	19
	FAS = 2	0	1	4	5	10
	FAS = 3	0	1	5	46	52
USP2A 合計		5	9	23	53	90

10

20

30

【0385】

【表46】

テーブル42. FAS(0~3)対AMACR(0~3)の分割表

カウント		AMACR				FAS合計
		AMACR = 0	AMACR = 1	AMACR = 2	AMACR = 3	
FAS	FAS = 0	5	0	0	4	9
	FAS = 1	0	14	1	4	19
	FAS = 2	0	0	10	0	10
	FAS = 3	4	44	2	1	51
AMACR 合計		9	58	13	9	89

40

再発または転移した腫瘍において、高い値のFAS（3または4）とUSP2AおよびAMACRの値との関係も評価した。FAS = 2およびFAS = 3を不良予後の代用として使用して、61人の症例がそのカテゴリーに属した。2人のUSP2A症例は0または1のいずれかの値を有した一方、60人は2および3の値を有した。実質的に全ての高いFAS値が、高いUSP2A値と関連した。これは、2つのUSP2A群間の明確な有意差である。

【0386】

50

48人の症例は、AMACRを0および1の値で有した一方、13人は値を有した。48人と13人との差も統計的に有意であった ( $p < 0.0001$ )。両側検定はカイ二乗  $p$  値 = 0.059を有し、したがって閾値を逃す。

【0387】

実施例28. フィット  $X \times Y$  変数: FAS、AMACRおよびUSP2A

「優秀」退縮度を「優秀」予後の代用として使用して、本発明者らは、FAS、AMACRおよびUSP2Aに何が起こるのかを決定することを追及した。34人の症例がそのカテゴリーに属し、25人のFAS症例が0または1のいずれかの値を有する一方、9人が2および3の値を有することが見出された。このことは、 $p = 0.006$ で2つのFAS群間の有意差であるとは見出されなかった。さらに、13人のUSP2A症例は0または1のいずれかの値を有した一方、21人は2および3の値を有した。対照的に、これは、2つのUSP2A群間の高度な有意差であった。最後に、19人の症例はAMACRを値0および1で有した一方、15人は値2および3を有した。差は有意でなかった。データをテーブル43~45に示す。

10

【0388】

【表47】

テーブル43. 退縮度(2グレード)対FAS(0~3)の分割表

退縮度	カウント	FAS				退縮度の合計
		FAS = 0	FAS = 1	FAS = 2	FAS = 3	
	不良	0	3	6	47	56
	優秀	9	16	4	5	34
FAS 合計		9	19	10	52	90

20

【0389】

【表48】

テーブル44. 退縮度(2グレード)対USP2A(0~3)の分割表

退縮度	カウント	USP2A				退縮度の合計
		USP2A = 0	USP2A = 1	USP2A = 2	USP2A = 3	
	不良	0	1	3	52	56
	優秀	5	8	20	1	34
USP2A 合計		5	9	23	53	90

30

【0390】

【表49】

テーブル45. 退縮度(2グレード)対AMACR(0~3)の分割表

退縮度	カウント	AMACR				退縮度の合計
		0	1	2	3	
	不良	4	44	7	0	55
	優秀	5	14	6	9	34
AMACR 合計		9	58	13	9	89

40

次に、再発または転移した腫瘍について、同一のパラメータ、例えば、FAS、USP2AおよびAMACRに何が起こるのかを調査した。不良退縮度を不良予後診断の代用として使用して、56人の症例がそのカテゴリーに属した。FAS結果により、FAS = 1を有する3人の症例 (FAS = 0の症例なし) を、FAS = 2およびFAS = 3を有する

50

53人の症例と比較した。結果は高度に有意であった。さらに、1人のUSP2A症例は0または1のいずれかの値を有した一方、55人は2および3の値を有した。実質的に全ての高いFAS値が、高いUSP2A値と関連した。これは、2つのUSP2A群間の明確な有意差である。最後に、48人の症例は、AMACRを0および1の値で有した一方、7人は2および3の値を有した。48人と7人との差も統計的に有意であった ( $p < 0.0001$ )。

## 【0391】

変数FAS、USP2AおよびAMACR間の関連度

次いで、ケンドールの およびスピアマンの (順位相関) を、2つの順序スケール間の関連の2つの尺度を使用して調査した。2つの相関表 (テーブル46および47) は、(FASおよびNPYとは別に) 最も強い関連がFASとUSP2Aとの間にある、すなわち、ケンドールタウ = 0.7152であり、0とは高度に有意に異なることを示す ( $p < 0.0001$ )。同様に、スピアマンの  $\rho = 0.7697$  であり、高度に有意であった。

10

## 【0392】

AMACRとFASとUSP2Aとの間の関連は有意であるが、関連度は有意により低かった。AMACRとFASとの関連は、ケンドールタウ = -0.2452を  $p = 0.0098$  で有し、それは0とは有意に異なる。同様に、スピアマンの  $\rho = -0.7697$  であり、 $p = 0.0208$  で有意であった。FASとNPYとの関連は極めて高度であった。

20

## 【0393】

## 【表50】

テーブル46. ノンパラメトリック:ケンドールの  $\tau$

変数	対する変数	ケンドール $\tau$	確率 $> \tau $
USP2A (0-3)	FAS (0-3)	0.7152	<.0001*
AMACR (0-3)	FAS (0-3)	-0.2452	0.0098*
AMACR (0-3)	USP2A (0-3)	-0.2159	0.0243*
NPY (0-3)	FAS (0-3)	0.8104	0.0000*
NPY (0-3)	USP2A (0-3)	0.7114	<.0001*
NPY (0-3)	AMACR (0-3)	-0.1801	0.0583

30

## 【0394】

## 【表51】

テーブル47. ノンパラメトリック:スピアマンの  $\rho$

変数	対する変数	スピアマン $\rho$	確率 $> \rho $
USP2A (0-3)	FAS (0-3)	0.7697	<.0001*
AMACR (0-3)	FAS (0-3)	-0.2447	0.0208*
AMACR (0-3)	USP2A (0-3)	-0.2225	0.0361*
NPY (0-3)	FAS (0-3)	0.8506	<.0001*
NPY (0-3)	USP2A (0-3)	0.7713	<.0001*
NPY (0-3)	AMACR (0-3)	-0.1872	0.0789

40

実施例29: 90人の観察値のフィット  $X \times X$  群

実施例26に概説されたプロトコルに従って、フィット  $X \times X$  データを以下のテーブル

50

48～54に挙げる。データを以下の7つの報告群A～Gに分類する。それぞれの群について、分割表、検定決定係数値の概説およびカイ二乗統計分析の結果を提供する。細胞の20%が5未満の期待カウントを有したことに留意されたい。

【0395】

A. USP2 (0～3) × FAS (0～3)

【0396】

【表52】

テーブル48A. 分割表

カウント		USP2A				FAS 合計
		USP2A = 0	USP2A = 1	USP2A = 2	USP2A = 3	
FAS	FAS = 0	4	3	2	0	9
	FAS = 1	1	4	12	2	19
	FAS = 2	0	1	4	5	10
	FAS = 3	0	1	5	46	52
USP2A 合計		5	9	23	53	90

10

20

【0397】

【表53】

テーブル48B. 検定パラメータ

N	DF	－対数尤度	決定係数(U)
90	9	35.143656	0.3714

30

【0398】

【表54】

テーブル48C. カイ二乗

検定	カイ二乗	確率 > カイ二乗
尤度比	70.287	<.0001*
ピアソン	75.802	<.0001*

40

B. AMACR (0～3) × FAS (0～3)

【0399】

【表 5 5】

テーブル49A. 分割表

カウント		AMACR				FAS合計
		AMACR = 0	AMACR = 1	AMACR = 2	AMACR = 3	
FAS	FAS = 0	5	0	0	4	9
	FAS = 1	0	14	1	4	19
	FAS = 2	0	0	10	0	10
	FAS = 3	4	44	2	1	51
AMACR 合計		9	58	13	9	89

10

【 0 4 0 0 】

【表 5 6】

テーブル49B. 検定パラメータ

N	DF	一対数尤度	決定係数(U)
89	9	44.366252	0.4871

20

【 0 4 0 1 】

【表 5 7】

テーブル49C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	88.733	<.0001*
ピアソン	111.112	<.0001*

30

C . N P Y ( 0 ~ 3 ) × F A S ( 0 ~ 3 )

【 0 4 0 2 】

【表 5 8】

テーブル50A. 分割表

カウント		NPY				NPY 合計
		NPY = 0	NPY = 1	NPY = 2	NPY = 3	
FAS	FAS = 0	8	0	1	0	9
	FAS = 1	1	15	1	2	19
	FAS = 2	0	0	5	5	10
	FAS = 3	0	0	4	47	51
NPY 合計		9	15	11	54	89

40

【 0 4 0 3 】

50

【表 5 9】

テーブル50B. 検定パラメータ

N	DF	-対数尤度	決定係数(U)
89	9	59.281630	0.6092

【0404】

10

【表 6 0】

テーブル50C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	118.563	<.0001*
ピアソン	152.050	<.0001*

D . F A S ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

20

【0405】

【表 6 1】

テーブル51A. 分割表

カウント	0	1	2	3	
不良	0	3	6	47	56
優秀	9	16	4	5	34
	9	19	10	52	90

30

【0406】

【表 6 2】

テーブル51B. 検定パラメータ

N	DF	-対数尤度	決定係数(U)
90	3	28.189170	0.2797

40

【0407】

【表 6 3】

テーブル51C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	56.378	<.0001*
ピアソン	49.817	<.0001*

E . U S P 2 A ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

10

【 0 4 0 8 】

【表 6 4】

テーブル52A. 分割表

カウント	0	1	2	3	
不良	0	1	3	52	56
優秀	5	8	20	1	34
	5	9	23	53	90

20

【 0 4 0 9 】

【表 6 5】

テーブル52B. 検定パラメータ

N	DF	-対数尤度	決定係数(U)
90	3	42.660746	0.4509

30

【 0 4 1 0 】

【表 6 6】

テーブル52C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	85.321	<.0001*
ピアソン	70.947	<.0001*

40

F . A M A C R ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

【 0 4 1 1 】

【表 6 7】

テーブル53A. 分割表

カウント	0	1	2	3	
不良	4	44	7	0	55
優秀	5	14	6	9	34
	9	58	13	9	89

10

【 0 4 1 2】

【表 6 8】

テーブル53B. 検定パラメータ

N	DF	対数尤度	決定係数(U)
89	3	11.979438	0.1315

【 0 4 1 3】

【表 6 9】

20

テーブル53C. カイ二乗

検定	カイ二乗	確率>カイ二乗
尤度比	23.959	<.0001*
ピアソン	20.915	0.0001*

G . N P Y ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

【 0 4 1 4】

30

【表 7 0】

テーブル54A. 分割表

カウント	0	1	2	3	
不良	0	1	4	50	55
優秀	9	14	7	4	34
	9	15	11	54	89

40

【 0 4 1 5】

【表 7 1】

テーブル54B. 検定パラメータ

N	DF	対数尤度	決定係数(U)
89	3	34.045993	0.3499

【 0 4 1 6】

50

## 【表 7 2】

テーブル54C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	68.092	<.0001*
ピアソン	58.576	<.0001*

実施例 3 0 : 9 0 人全ての観察値の多変数および単変数分析

10

それぞれの変数について、ケンドールのタウおよびスピアマンのローを順序変数間の関連の尺度として使用して多変数および単変数順位相関の両方についてクロス集計を実施した。分析値をテーブル 5 5 ~ 5 8 に示す。相関は R E M L 法により推定する。統計値は、それぞれの列について独立して他の列の欠測値を考慮せずに計算したことに留意すべきである。

【 0 4 1 7】

【表 7 3】

テーブル55. 相関

	FAS (0-3)	USP2A (0-3)	AMACR (0-3)	NPY (0-3)
FAS (0-3)	1.0000	0.7685	-0.2494	0.8897
USP2A (0-3)	0.7685	1.0000	-0.2021	0.7627
AMACR (0-3)	-0.2494	-0.2021	1.0000	-0.2227
NPY (0-3)	0.8897	0.7627	-0.2227	1.0000

20

【 0 4 1 8】

【表 7 4】

30

テーブル56. ノンパラメトリック:ケンドールの  $\tau$ 

変数	対する変数	ケンドール $\tau$	確率 > $ \tau $
USP2A (0-3)	FAS (0-3)	0.7152	<.0001*
AMACR (0-3)	FAS (0-3)	-0.2452	0.0098*
AMACR (0-3)	USP2A (0-3)	-0.2159	0.0243*
NPY (0-3)	FAS (0-3)	0.8104	0.0000*
NPY (0-3)	USP2A (0-3)	0.7114	<.0001*
NPY (0-3)	AMACR (0-3)	-0.1801	0.0583

40

【 0 4 1 9】

【表 7 5】

テーブル57. ノンパラメトリック: スピアマンの  $\rho$ 

変数	対する変数	スピアマン $\rho$	確率 $> p $
USP2A (0-3)	FAS (0-3)	0.7697	<.0001*
AMACR (0-3)	FAS (0-3)	-0.2447	0.0208*
AMACR (0-3)	USP2A (0-3)	-0.2225	0.0361*
NPY (0-3)	FAS (0-3)	0.8506	<.0001*
NPY (0-3)	USP2A (0-3)	0.7713	<.0001*
NPY (0-3)	AMACR (0-3)	-0.1872	0.0789

10

【 0 4 2 0 】

【表 7 6】

テーブル58. 単変数単純統計

列	N	DF	平均	標準偏差	最小	最大
FAS (0-3)	90	89.00	2.1667	1.0836	0.0000	3.0000
USP2A (0-3)	90	89.00	2.3778	0.8815	0.0000	3.0000
AMACR (0-3)	89	88.00	1.2472	0.7728	0.0000	3.0000
NPY (0-3)	89	88.00	2.2360	1.0662	0.0000	3.0000

20

実施例 3 1 : フィット  $Y \times X$  群 ; 5 から 7 のグリーンソンを有する 8 2 人の観察値

実施例 2 6 に概説されたプロトコルに従って、5 ~ 7 のグリーンソンスコアを示す観察値の下位群について、フィット  $X \times X$  データを以下のテーブル 5 9 ~ 6 1 に挙げる。データを以下の 3 つの報告群 A ~ C に分類する。それぞれの群について、分割表、検定決定係数値の概説およびカイ二乗統計分析の結果を提供する。細胞の 2 0 % が 5 未満の期待カウントを有したことに留意されたい。

30

【 0 4 2 1 】

A . USP2A ( 0 ~ 3 )  $\times$  FAS ( 0 ~ 3 )

【 0 4 2 2 】

【表 7 7】

テーブル59A. 分割表

カウント		USP2A				行合計
		USP2A = 0	USP2A = 1	USP2A = 2	USP2A = 3	
FAS	FAS = 0	4	3	1	0	8
	FAS = 1	0	4	11	2	17
	FAS = 2	0	1	4	4	9
	FAS = 3	0	1	4	43	48
列合計		4	9	20	49	82

40

【 0 4 2 3 】

50

【表 7 8】

テーブル59B. 検定パラメータ

N	DF	ー対数尤度	決定係数(U)
82	9	35.540582	0.4161

相関の平方根=0.645

【0424】

10

【表 7 9】

テーブル59C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	71.081	<.0001*
ピアソン	85.210	<.0001*

B . A M A C R ( 0 ~ 3 ) × F A S ( 0 ~ 3 )

20

【0425】

【表 8 0】

テーブル60A. 分割表

カウント		AMACR				FAS合計
		AMACR = 0	AMACR = 1	AMACR = 2	AMACR = 3	
FAS	FAS = 0	5	0	0	3	8
	FAS = 1	0	13	0	4	17
	FAS = 2	0	0	9	0	9
	FAS = 3	4	40	2	1	47
AMACR 合計		9	53	11	8	81

30

【0426】

【表 8 1】

テーブル60B. 検定パラメータ

N	DF	ー対数尤度	決定係数(U)
81	9	41.699608	0.5040

40

【0427】

【表 8 2】

テーブル60C. カイ二乗

検定	カイ二乗	確率>カイ二乗
尤度比	83.399	<.0001*
ピアソン	105.444	<.0001*

C . N P Y ( 0 ~ 3 ) × F A S ( 0 ~ 3 )

10

【 0 4 2 8 】

【表 8 3】

テーブル61A. 分割表

カウント		NPY				FAS 合計
		NPY = 0	NPY = 1	NPY = 2	NPY = 3	
FAS	FAS = 0	7	0	1	0	8
	FAS = 1	1	13	1	2	17
	FAS = 2	0	0	5	4	9
	FAS = 3	0	0	4	43	47
NPY 合計		8	13	11	49	81

20

【 0 4 2 9 】

【表 8 4】

テーブル61B. 検定パラメータ

N	DF	−対数尤度	決定係数(U)
81	9	52.583504	0.5915

30

【 0 4 3 0 】

【表 8 5】

テーブル61C. カイ二乗

検定	カイ二乗	確率>カイ二乗
尤度比	105.167	<.0001*
ピアソン	136.227	<.0001*

40

実施例 3 2 : 退縮度 ( 2 グレード ) による ; グリーソン 5 から 7 を有する症例についてのフィット  $Y \times X$  群

実施例 2 6 に概説されたプロトコルに従って、5 ~ 7 のグリーソンスコアを示す観察値の下位群について、退縮度により、フィット  $X \times X$  データを以下のテーブル 6 2 ~ 6 5 に挙げる。データを以下の 4 つの報告群 A ~ D に分類する。それぞれの群について、分割表、検定決定係数値の概説およびカイ二乗統計分析の結果を提供する。細胞の 2 0 % が 5 未満の期待カウントを有したことに留意されたい。

【 0 4 3 1 】

50

A . F A S ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

【 0 4 3 2 】

【 表 8 6 】

テーブル62A. 分割表

	FAS				
カウント(FAS)	0	1	2	3	
不良	0	3	5	43	51
優秀	8	14	4	5	31
	8	17	9	48	82

10

【 0 4 3 3 】

【 表 8 7 】

テーブル62B. 検定パラメータ

N	DF	一対数尤度	決定係数(U)
82	3	24.230772	0.2664

20

【 0 4 3 4 】

【 表 8 8 】

テーブル62C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	48.462	<.0001*
ピアソン	42.992	<.0001*

30

B . U S P 2 A ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

【 0 4 3 5 】

【 表 8 9 】

テーブル63A. 分割表

	USP2A				
カウント(USP2A)	0	1	2	3	
不良	0	1	2	48	51
優秀	4	8	18	1	31
	4	9	20	49	82

40

【 0 4 3 6 】

【表 9 0】

テーブル63B. 検定パラメータ

N	DF	対数尤度	決定係数(U)
82	3	39.851573	0.4666

【 0 4 3 7】

【表 9 1】

10

テーブル63C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	79.703	<.0001*
ピアソン	66.398	<.0001*

C . A M A C R ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

【 0 4 3 8】

20

【表 9 2】

テーブル64A. 分割表

カウント(AMACR)	AMACR				
	0	1	2	3	
不良	4	40	6	0	50
優秀	5	13	5	8	31
	9	53	11	8	81

30

【 0 4 3 9】

【表 9 3】

テーブル64B. 検定パラメータ

N	DF	対数尤度	決定係数(U)
81	3	10.607920	0.1282

40

【 0 4 4 0】

【表 9 4】

テーブル64C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	21.216	<.0001*
ピアソン	18.519	0.0003*

D . N P Y ( 0 ~ 3 ) × 退縮度 ( 2 グレード )

10

【 0 4 4 1】

【表 9 5】

テーブル65A. 分割表

カウント(NPY)	NPY				
	0	1	2	3	
不良	0	1	4	45	50
優秀	8	12	7	4	31
	8	13	11	49	81

20

【 0 4 4 2】

【表 9 6】

テーブル65B. 検定パラメータ

N	DF	-対数尤度	決定係数(U)
81	3	29.305661	0.3297

30

【 0 4 4 3】

【表 9 7】

テーブル65C. カイニ乗

検定	カイニ乗	確率>カイニ乗
尤度比	58.611	<.0001*
ピアソン	50.769	<.0001*

40

実施例 3 3 : 5 から 7 のグリーンソンを有する多変数および単変数観察値

それぞれの変数について、ケンドールのタウおよびスピアマンのローを順序変数間の関連の尺度として使用して多変数および単変数順位相関の両方についてクロス集計を実施した。分析値をテーブル 6 6 ~ 6 9 に示す。相関は R E M L 法により推定する。統計値は、それぞれの列について独立して他の列の欠測値を考慮せずに計算したことに留意すべきである。

【 0 4 4 4】

【表 9 8】

テーブル66. 相関

	FAS (0-3)	USP2A (0-3)	AMACR (0-3)	NPY (0-3)
FAS (0-3)	1.0000	0.7899	-0.1953	0.8819
USP2A (0-3)	0.7899	1.0000	-0.2189	0.7775
AMACR (0-3)	-0.1953	-0.2189	1.0000	-0.1745
NPY (0-3)	0.8819	0.7775	-0.1745	1.0000

10

【 0 4 4 5】

【表 9 9】

テーブル67. 単変数単純統計

列	N	DF	平均	標準偏差	最小	最大
FAS (0-3)	82	81.00	2.1829	1.0787	0.0000	3.0000
USP2A (0-3)	82	81.00	2.3902	0.8714	0.0000	3.0000
AMACR (0-3)	81	80.00	1.2222	0.7746	0.0000	3.0000
NPY (0-3)	81	80.00	2.2469	1.0551	0.0000	3.0000

20

【 0 4 4 6】

【表 1 0 0】

テーブル68. ノンパラメトリック: ケンドールの  $\tau$ 

変数	対する変数	ケンドール $\tau$	確率 $> \tau $
USP2A (0-3)	FAS (0-3)	0.7339	<.0001*
AMACR (0-3)	FAS (0-3)	-0.1959	0.0493*
AMACR (0-3)	USP2A (0-3)	-0.2132	0.0340*
NPY (0-3)	FAS (0-3)	0.8033	<.0001*
NPY (0-3)	USP2A (0-3)	0.7164	<.0001*
NPY (0-3)	AMACR (0-3)	-0.1450	0.1460

30

【 0 4 4 7】

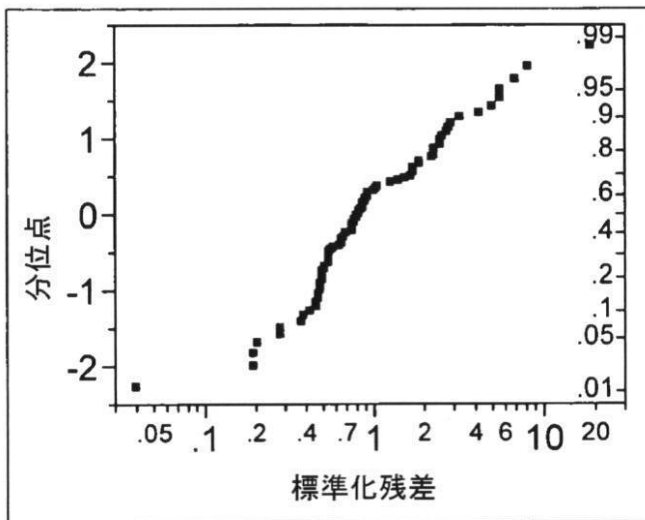
【表 1 0 1】

テーブル69. ノンパラメトリック: スピアマンの $\rho$ 

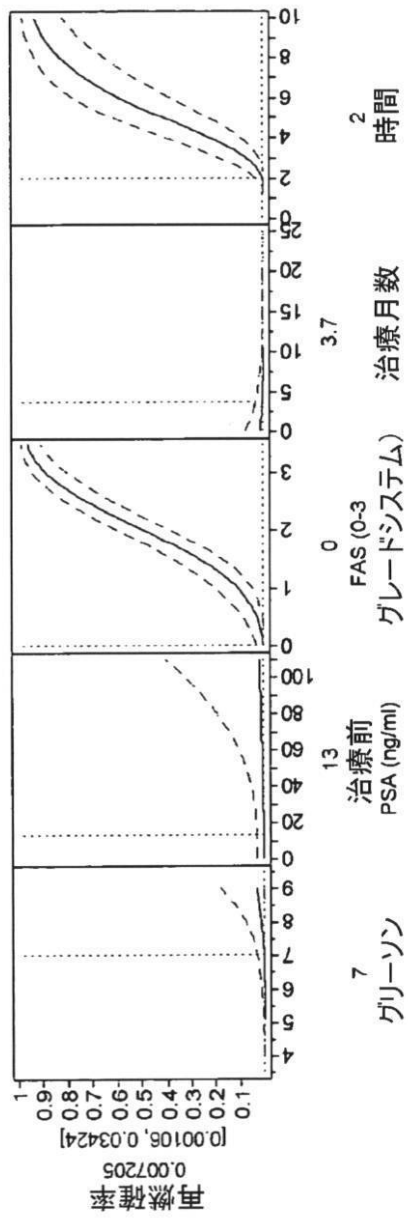
変数	対する変数	スピアマン $\rho$	確率 $> \rho $
USP2A (0-3)	FAS (0-3)	0.7819	<.0001*
AMACR (0-3)	FAS (0-3)	-0.1905	0.0885
AMACR (0-3)	USP2A (0-3)	-0.2185	0.0501
NPY (0-3)	FAS (0-3)	0.8433	<.0001*
NPY (0-3)	USP2A (0-3)	0.7713	<.0001*
NPY (0-3)	AMACR (0-3)	-0.1475	0.1888

10

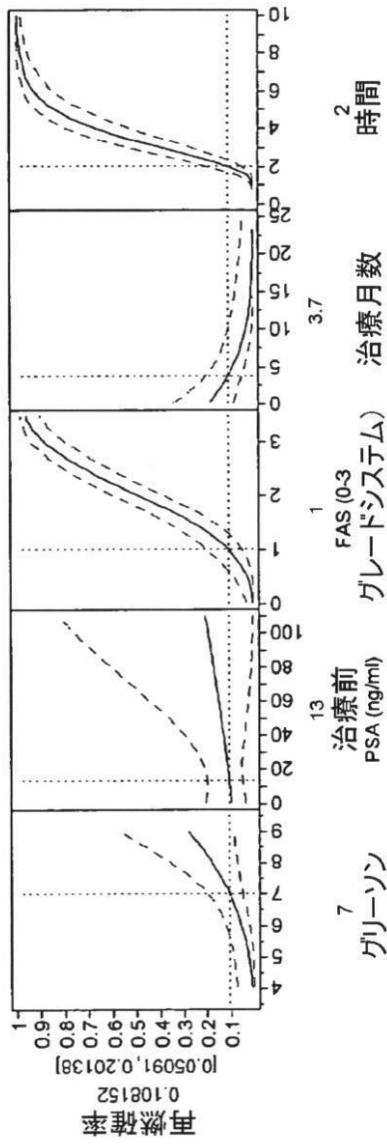
【図 1】



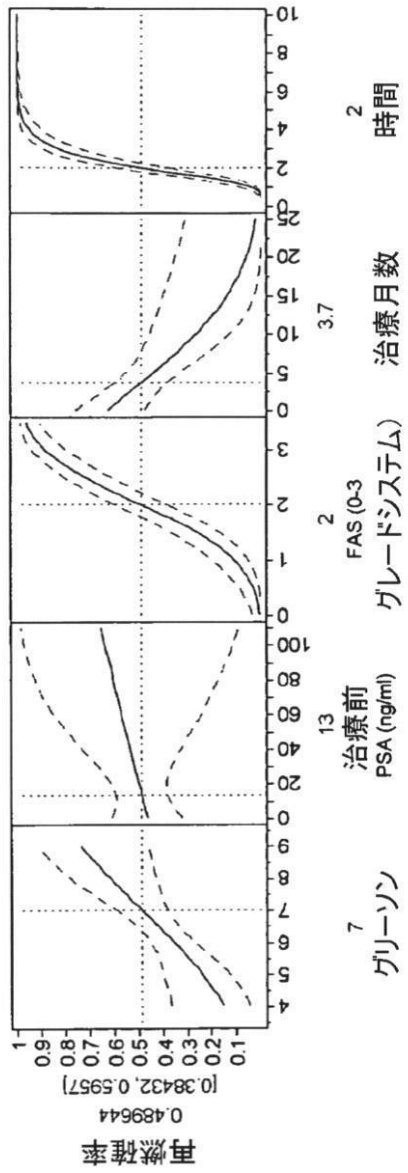
【 図 2 】



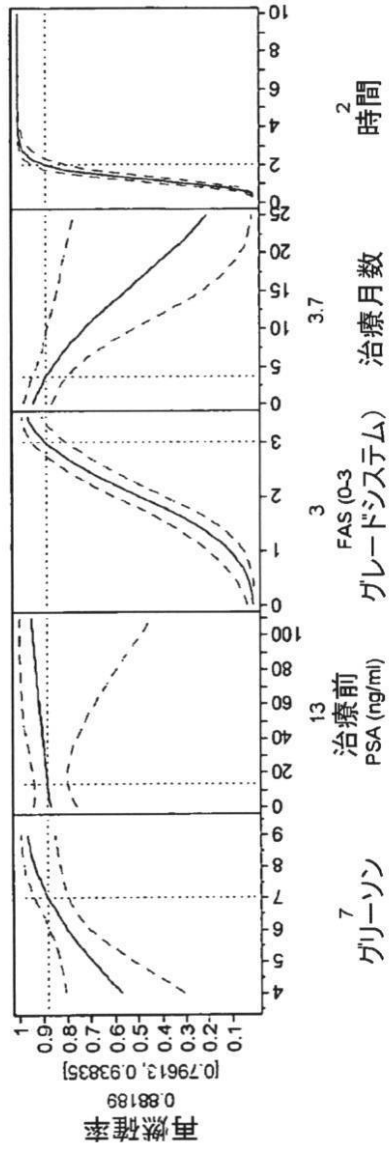
【 図 3 】



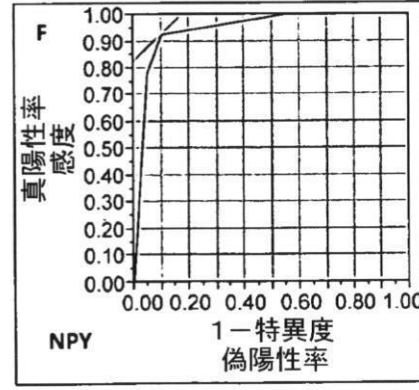
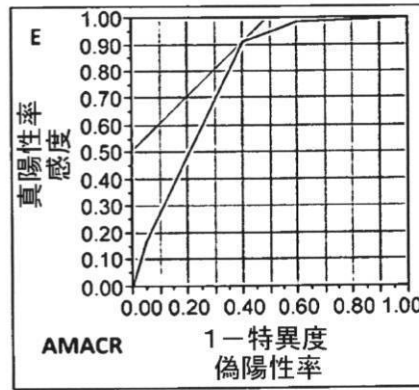
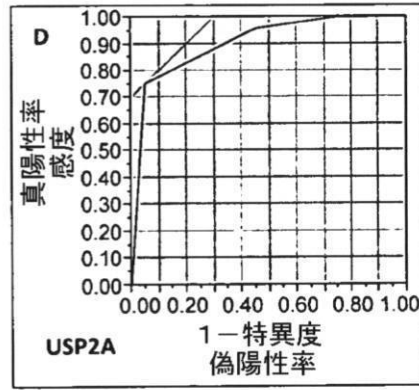
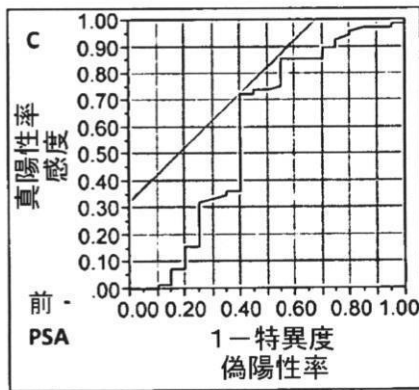
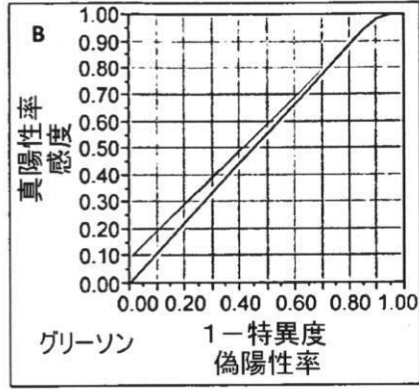
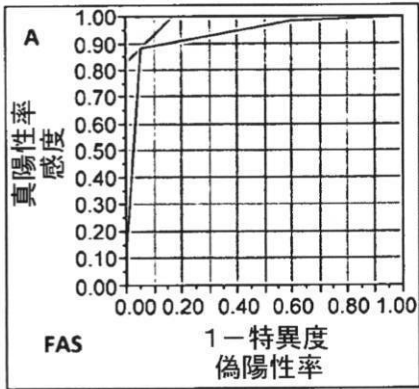
【 図 4 】



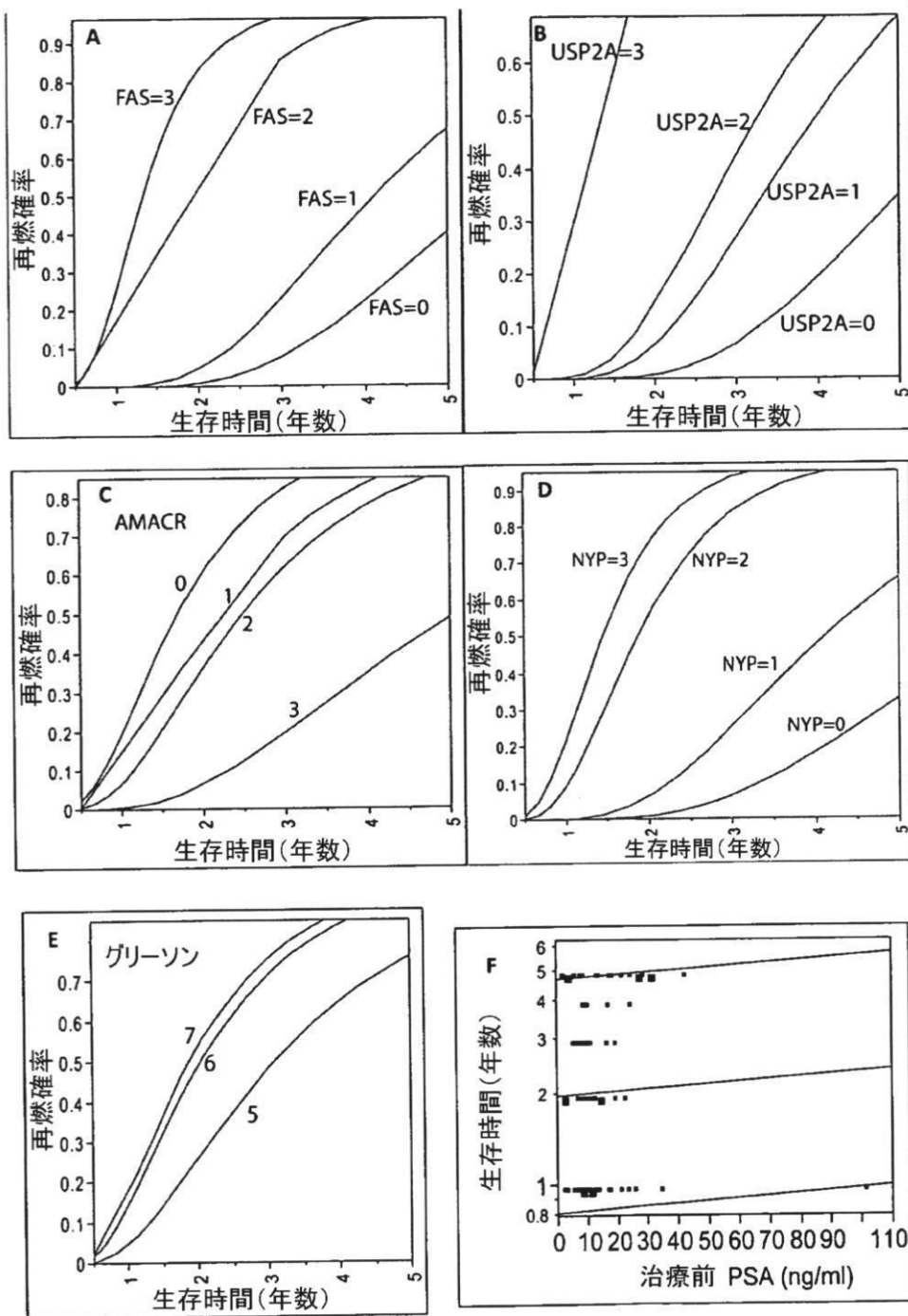
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2014519818000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2012/036904

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/574 (2012.01) USPC - 424/9.1; 435/7.1; 506/9, 17; 702/19 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - G01N 33/574 (2012.01) USPC - 424/9.1; 435/7.1, 7.23; 506/9, 17; 702/19 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) PatBase, Google Patent, PubMed, ProQuest		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2010/065840 A1 (MCLELLAND et al) 10 June 2010 (10.06.2010) entire document This document can be viewed by entering the doc number at the following url: <a href="http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP">http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP</a>	1-7, 9-16 ----- 8
Y	WO 2008/067065 A2 (SRIVASTAVA et al) 05 June 2008 (05.06.2008) entire document	8
A	US 2010/0143247 A1 (FENSKE et al) 10 June 2010 (10.06.2010) entire document	1-16
A	US 7,666,595 B2 (RUBIN et al) 23 February 2010 (23.02.2010) entire document	1-16
A	LIU et al. Quantitative analysis of a panel of gene expression in prostate cancer-with emphasis on NPY expression analysis. J Zhejiang Univ Sci B 2007 8(12):853-859 [retrieved on 09 July 2012]. Retrieved from Google Scholar: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2100155/pdf/JZUSB08-0853.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2100155/pdf/JZUSB08-0853.pdf</a> > entire document	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 July 2012		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(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 ムラカ、パトリック ジェイ .

アメリカ合衆国 0 1 2 0 1 マサチューセッツ州 ピッツフィールド ストラットフォード ア  
ベニュー 8 エイ

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA14 DA36

4B024 AA12 CA04 CA09 CA11 CA20 HA11 HA12 HA15

4B063 QA01 QA19 QQ52 QQ79 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34

专利名称(译)	前列腺癌的预测生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014519818A</a>	公开(公告)日	2014-08-21
申请号	JP2014510406	申请日	2012-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	新克莱尔生物技术公司 NUCLEA生物标志物		
申请(专利权)人(译)	新克莱尔生物技术公司		
[标]发明人	ムラカパトリックジェイ		
发明人	ムラカ、パトリック ジェイ.		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57434 G01N2800/56		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/574.ZNA.A G01N33/50.P G01N33/53.M C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	61/484271 2011-05-10 US 61/551500 2011-10-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于检测，筛选，诊断或确定增殖性疾病或病症，特别是前列腺癌的进展，消退和/或存活组合物和方法。本发明还提供用于对前列腺癌患者或怀疑患有前列腺癌的患者进行分期或分层的新测定法和试剂盒。

