

(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2007-506426

(P2007-506426A)

(43) 公表日 平成19年3月22日(2007.3.22)

(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 Z N A A	2 G O 4 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 2 9
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-527773 (P2006-527773)	(71) 出願人	504445356 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成16年9月24日 (2004.9.24)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成18年3月17日 (2006.3.17)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/014438	(72) 発明者	中村 祐輔 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17 番33号
(87) 国際公開番号	W02005/028676	(72) 発明者	片桐 豊雅 東京都品川区東五反田5-4-14-40 2
(87) 国際公開日	平成17年3月31日 (2005.3.31)		
(31) 優先権主張番号	60/505,571		
(32) 優先日	平成15年9月24日 (2003.9.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌を診断する方法

## (57) 【要約】

乳癌 (BRC) を検出および診断するための方法を本明細書に記載する。1つの態様において、本診断方法は、BRC細胞と正常細胞とを識別するBRC関連遺伝子の発現レベルを決定することを含む。もう1つの態様において、本診断方法は、BRC細胞の中でのDCIS細胞とIDC細胞とを識別するBRC関連遺伝子の発現レベルを決定することを含む。本発明はさらに、リンパ節転移を伴う乳癌細胞において特有の変化した発現パターンを有するBRC関連遺伝子を用いて、乳癌転移を予測し予防するための手段を提供する。さらに本発明は、乳癌の治療において有用な治療薬のスクリーニング方法、乳癌を治療する方法、および対象への乳癌に対するワクチン接種の方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象における乳癌または乳癌を発症する素因を診断する方法であって、患者由来の生物試料における乳癌関連遺伝子の発現のレベルを決定する段階を含み、該試料の発現レベルが該遺伝子の正常対照レベルと比較して上昇または低下していることによって、該対象が乳癌に罹患しているまたは乳癌を発症するリスクを有することが示される方法。

## 【請求項2】

乳癌関連遺伝子がBRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択され、さらに、試料の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇していることによって、対象が乳癌に罹患しているまたは乳癌を発症するリスクを有することが示される、請求項1記載の方法。

10

## 【請求項3】

試料の発現レベルが正常対照レベルより少なくとも10%高い、請求項2記載の方法。

## 【請求項4】

乳癌関連遺伝子がBRC番号176～373、399～447および472～512の遺伝子からなる群より選択され、さらに試料の発現レベルが正常対照レベルと比較して低下していることによって、対象が乳癌に罹患しているまたは乳癌を発症するリスクを有することが示される、請求項1記載の方法。

## 【請求項5】

試料の発現レベルが正常対照レベルより少なくとも10%低い、請求項4記載の方法。

20

## 【請求項6】

乳癌がIDCである、請求項1記載の方法。

## 【請求項7】

乳癌関連遺伝子がBRC番号448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択され、さらに試料の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇していることによって、対象がIDCに罹患しているまたはIDCを発症するリスクを有することが示される、請求項6記載の方法。

## 【請求項8】

試料の発現レベルが正常対照レベルより少なくとも10%高い、請求項7記載の方法。

## 【請求項9】

乳癌関連遺伝子がBRC番号472～512の遺伝子からなる群より選択され、さらに試料の発現レベルが正常対照レベルと比較して低下していることによって、対象がIDCに罹患しているまたはIDCを発症するリスクを有することが示される、請求項6記載の方法。

30

## 【請求項10】

試料の発現レベルが正常対照レベルより少なくとも10%低い、請求項9記載の方法。

## 【請求項11】

複数の乳癌関連遺伝子の発現レベルを決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項12】

遺伝子発現レベルが、以下からなる群より選択される方法によって決定される、請求項1記載の方法：

40

(a) 乳癌関連遺伝子のmRNAを検出する段階、

(b) 乳癌関連遺伝子によってコードされるタンパク質を検出する段階、および

(c) 乳癌関連遺伝子によってコードされるタンパク質の生物活性を検出する段階。

## 【請求項13】

検出がDNAアレイ上で行われる、請求項12記載の方法。

## 【請求項14】

患者由来の生物試料が上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項15】

患者由来の生物試料が乳癌細胞を含む、請求項1記載の方法。

50

## 【請求項 16】

患者由来の生物試料が乳癌細胞由来の上皮細胞を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 17】

BRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される、2つまたはそれ以上の乳癌関連遺伝子に関する遺伝子発現のパターンを含む、乳癌基準発現プロファイル。

## 【請求項 18】

BRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される、2つまたはそれ以上の乳癌関連遺伝子に関する遺伝子発現のパターンを含む、乳癌基準発現プロファイル。

10

## 【請求項 19】

BRC番号176～373、399～447および472～512からなる群より選択される、2つまたはそれ以上の乳癌関連遺伝子に関する遺伝子発現のパターンを含む、乳癌基準発現プロファイル。

## 【請求項 20】

乳癌を治療または予防するための化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 被験化合物を、BRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；ならびに

(c) ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階

20

を含む方法。

## 【請求項 21】

乳癌を治療または予防するための化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 候補化合物を一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞と接触させる段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される段階；ならびに

(b) 対照と比較して、BRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させるか、またはBRC番号176～373、399～447および472～512の遺伝子からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを上昇させる、候補化合物

30

を含む方法。

## 【請求項 22】

細胞が乳癌細胞を含む、請求項21記載の方法。

## 【請求項 23】

乳癌を治療または予防するための化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 被験化合物を、BRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；ならびに

(c) BRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較して抑制するか、またはBRC番号176～373、399～447および472～512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較して高める、被験化合物を選択する段階を含む方法。

40

## 【請求項 24】

乳癌を治療または予防するための化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 候補化合物を、一つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域および該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触さ

50

せる段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される段階；

(b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに

(c) 該マーカー遺伝子がBRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される、上方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現もしくは活性を低下させるか、または該マーカー遺伝子がBRC番号176～373、399～447および472～512の遺伝子からなる群より選択される、下方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを高める候補化合物を選択する段階

を含む方法。

10

【請求項25】

乳癌がIDCであって、

(a) 被験化合物をBRC番号448～449および451～512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；ならびに

(c) ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階

を含む、請求項20記載の方法。

【請求項26】

乳癌がIDCであって、

(a) 候補化合物を一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞と接触させる段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号448～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される段階；ならびに

20

(b) 対照と比較して、BRC番号448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させるか、またはBRC番号472～512の遺伝子からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを上昇させる、候補化合物を選択する段階

を含む、請求項21記載の方法。

【請求項27】

細胞がIDC細胞を含む、請求項26記載の方法。

【請求項28】

30

乳癌がIDCであって、

(a) 被験化合物を、BRC番号448～449および451～512からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；ならびに

(c) BRC番号448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較して抑制するか、またはBRC番号472～512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較して高める、被験化合物を選択する段階、

40

を含む、請求項23記載の方法。

【請求項29】

乳癌がIDCであって、

(a) 候補化合物を、一つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域および該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号448～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される段階；

(b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに

(c) 該マーカー遺伝子がBRC番号448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される、上方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子

50

の発現もしくは活性を低下させるか、または該マーカー遺伝子がBRC番号472～512の遺伝子からなる群より選択される、下方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを高める、候補化合物を選択する段階を含む、請求項24記載の方法。

【請求項30】

(a) BRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される2つもしくはそれ以上の核酸配列、または(b)それらによってコードされるポリペプチド、と結合する検出用試薬を含むキット。

【請求項31】

BRC番号123～169、171～449および451～512の遺伝子からなる群より選択される一つまたは複数の核酸配列と結合する2つまたはそれ以上の核酸を含むアレイ。

10

【請求項32】

対象における乳癌を治療または予防する方法であって、アンチセンス組成物を該対象に投与する段階を含み、該アンチセンス組成物がBRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択されるコード配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む方法。

【請求項33】

対象における乳癌を治療または予防する方法であって、siRNA組成物を該対象に投与する段階を含み、該siRNA組成物がBRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される核酸配列の発現を低下させる方法。

20

【請求項34】

siRNAが、SEQ ID NO: 25、28、および31のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】

対象における乳癌を治療または予防するための方法であって、BRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択されるいずれか1つの遺伝子によってコードされるタンパク質と結合する、抗体またはその免疫活性断片の薬学的有効量を、該対象に投与する段階を含む方法。

【請求項36】

対象における乳癌を治療または予防する方法であって、以下を含むワクチンを該対象に投与する段階を含む方法：(a) BRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471の遺伝子からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチド、(b) 該ポリペプチドの免疫活性断片、または(c) 該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

30

【請求項37】

抗腫瘍免疫を誘導するための方法であって、抗原提示細胞を、ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターと接触させる段階を含み、該ポリペプチドがBRC番号123～169、171～175、374～398、448～449および451～471からなる群より選択される遺伝子によってコードされるか、またはその断片である方法。

40

【請求項38】

抗原提示細胞を対象に投与する段階をさらに含む、請求項37記載の抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

【請求項39】

対象における乳癌を治療または予防する方法であって、(a) BRC番号176～373、399～447および472～512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドの発現、または(b) それによってコードされるポリペプチドの活性を高める化合物を該対象に投与する段階を含む方法。

【請求項40】

対象における乳癌を治療または予防するための方法であって、請求項20～24のいずれか

50

一項記載の方法によって得られる化合物を投与する段階を含む方法。

【請求項 4 1】

対象における乳癌を治療または予防する方法であって、(a) BRC番号176~373、399~447および472~512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチド、または(b)それによってコードされるポリペプチドを含む、作用因子の薬学的有効量を該対象に投与する段階を含む方法。

【請求項 4 2】

乳癌がIDCであって、アンチセンス組成物が、BRC番号448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択されるコード配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、請求項32記載の方法。

【請求項 4 3】

乳癌がIDCであって、siRNA組成物がBRC番号448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択される核酸配列の発現を低下させる、請求項33記載の方法。

【請求項 4 4】

siRNAが、SEQ ID NO: 25、28、および31のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

乳癌がIDCであって、抗体またはその断片が、BRC番号448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択されるいずれか1つの遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する、請求項35記載の方法。

【請求項 4 6】

乳癌がIDCであって、ワクチンが、(a) BRC番号448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチド、(b) 該ポリペプチドの免疫活性断片、または(c) 該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項36記載の方法。

【請求項 4 7】

IDCに対する抗腫瘍免疫を誘導するための方法であって、抗原提示細胞に、ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターを接触させる段階を含み、該ポリペプチドがBRC番号448~449および451~471からなる群より選択される遺伝子によってコードされるか、またはその断片である方法。

【請求項 4 8】

抗原提示細胞を対象に投与する段階をさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項 4 9】

乳癌がIDCであって、化合物が、(a) BRC番号472~512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドの発現または(b)それによってコードされるポリペプチドの活性を高める、請求項39記載の方法。

【請求項 5 0】

乳癌がIDCであって、化合物が請求項25~29のいずれか一項記載の方法によって得られる、請求項40記載の方法。

【請求項 5 1】

乳癌がIDCであって、さらに作用因子が、(a) BRC番号472~512の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチド、または(b)それによってコードされるポリペプチドを含む、請求項41記載の方法。

【請求項 5 2】

乳癌を治療または予防するための組成物であって、BRC番号123~169、171~175、374~398、448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたはsiRNAの薬学的有効量を含む組成物。

【請求項 5 3】

siRNAが、SEQ ID NO: 25、28、および31のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項52記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項54】

乳癌を治療または予防するための組成物であって、BRC番号123~169、171~175、374~398、448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する、抗体またはその断片の薬学的有効量を含む組成物。

## 【請求項55】

乳癌を治療または予防するための組成物であって、有効成分としての請求項20~24のいずれか一項記載の方法によって選択される化合物の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

## 【請求項56】

乳癌がIDCであって、ポリヌクレオチドがBRC番号448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択される、請求項52記載の組成物。

10

## 【請求項57】

siRNAが、SEQ ID NO: 25、28、および31のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む、請求項56記載の組成物。

## 【請求項58】

乳癌がIDCであって、タンパク質がBRC番号448~449および451~471の遺伝子からなる群より選択される遺伝子によってコードされる、請求項54記載の組成物。

## 【請求項59】

乳癌がIDCであって、化合物が請求項25~29のいずれか一項記載の方法によって選択される、請求項55記載の組成物。

20

## 【請求項60】

乳癌の浸潤を治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法であって、  
(a) 被験化合物を、BRC番号374~447の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；  
(b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および  
(c) ポリペプチドに結合する被験化合物を選択する段階  
を含む方法。

## 【請求項61】

乳癌の浸潤を治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法であって、  
(a) 候補化合物を一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞と接触させる段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号374~447の遺伝子からなる群より選択される段階；および  
(b) 対照と比較して、BRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させるか、またはBRC番号399~447の遺伝子からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを上昇させる、候補化合物を選択する段階  
を含む方法。

30

## 【請求項62】

細胞が乳癌細胞を含む、請求項61記載の方法。

## 【請求項63】

乳癌の浸潤を治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法であって、  
(a) 被験化合物を、BRC番号374~447の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと接触させる段階；  
(b) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；および  
(c) BRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較して抑制するか、またはBRC番号399~447の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される該ポリペプチドの生物活性と比較して高める、被験化合物を選択する段階

40

50

を含む方法。

【請求項64】

乳癌の浸潤を治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 候補化合物を、一つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域および該転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号374~447の遺伝子からなる群より選択される段階；

(b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；および

(c) 該マーカー遺伝子がBRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択される上方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現もしくは活性を低下させるか、または該マーカー遺伝子がBRC番号399~447の遺伝子からなる群より選択される下方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを高める、候補化合物を選択する段階

10

を含む方法。

【請求項65】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防する方法であって、アンチセンス組成物を該対象に投与することを含み、該アンチセンス組成物がBRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択されるコード配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含む方法。

【請求項66】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防する方法であって、siRNA組成物を該対象に投与する段階を含み、該siRNA組成物がBRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択される核酸配列の発現を低下させる方法。

20

【請求項67】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防するための方法であって、BRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を該対象に投与する段階を含む方法。

【請求項68】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防する方法であって、以下を含むワクチンを該対象に投与する段階を含む方法：(a) BRC番号374~398の遺伝子からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチド、(b) 該ポリペプチドの免疫活性断片、または(c) 該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

30

【請求項69】

乳癌の浸潤に対する抗腫瘍免疫を誘導するための方法であって、抗原提示細胞に、ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターを接触させる段階を含み、該ポリペプチドがBRC番号374~398からなる群より選択される遺伝子によってコードされるかまたはその断片である方法。

【請求項70】

抗原提示細胞を対象に投与する段階をさらに含む、請求項69記載の方法。

【請求項71】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防する方法であって、(a) BRC番号399~447の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドの発現または(b) 該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの活性を高める化合物を、該対象に投与する段階を含む方法。

40

【請求項72】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防するための方法であって、請求項60~64のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物を投与する段階を含む方法。

【請求項73】

対象における乳癌の浸潤を治療または予防する方法であって、(a) BRC番号399~447の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたは(b) 該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む、作用因子の薬学的有効量を該対象に投与すること

50

を含む方法。

【請求項74】

乳癌の浸潤を治療または予防するための組成物であって、BRC番号374～398の遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を含む組成物。

【請求項75】

乳癌の浸潤を治療または予防するための組成物であって、BRC番号374～398の遺伝子からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を含む組成物。

【請求項76】

乳癌の浸潤を治療または予防するための組成物であって、有効成分として請求項60～64のいずれか一項記載の方法によって選択される化合物の薬学的有効量、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項77】

対象における乳癌の転移を予測するための方法であって、

(a) 該対象から採取した標本における一つまたは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを検出する段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子がBRC番号719～752の遺伝子からなる群より選択される段階；

(b) 該標本における一つまたは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを転移陽性症例および転移陰性症例のものと比較する段階；ならびに

(c) 標本の発現レベルが転移陽性症例と同程度であることによって乳癌の転移のリスクが高いことが示され、標本の発現レベルが転移陰性症例と同程度であることによって乳癌の転移のリスクが低いことが示される段階

を含む方法。

【請求項78】

段階(c)が以下の段階を用いて予測スコアを算出する段階をさらに含む、請求項77記載の方法：

i) 以下の式：

$$V_i = |x_i - (\mu_r + \mu_n) / 2|$$

によって得票の多さ (magnitude of the vote) ( $V_i$ ) を算出する段階であって、式中、 $x_i$  は試料における発現レベルであり、 $\mu_r$  は転移陰性症例における平均発現レベルであり、 $\mu_n$  は転移陽性症例における平均発現レベルである段階、

ii) 以下の式：

$$PS = ((V_r - V_n) / (V_r + V_n)) \times 100$$

によってPS値を算出する段階であって、式中、 $V_r$  および  $V_n$  はそれぞれ転移陰性症例および転移陽性症例に関する総得票数である段階、ならびに

iii) PS値が15.8未満であれば対象が乳癌の転移を有するリスクが高いと判定され、PS値が15.8を上回れば乳癌の転移を有するリスクが低いと判定される段階。

【請求項79】

BRC番号719～752の遺伝子からなる群より選択される2つまたはそれ以上の遺伝子の遺伝子発現のパターンを含む、乳癌基準発現プロファイル。

【請求項80】

遺伝子発現が、リンパ節転移を伴う患者またはリンパ節転移を伴わない患者の乳癌細胞に由来する、請求項79記載の発現プロファイル。

【請求項81】

(a) BRC番号719～752の遺伝子からなる群より選択される2つもしくはそれ以上の核酸配列または (b) 該遺伝子によってコードされるポリペプチドと結合する、検出用試薬を含むキット。

【請求項82】

BRC番号719～752の遺伝子からなる群より選択される一つまたは複数の核酸配列に結合

10

20

30

40

50

する、2つまたはそれ以上の核酸を含むアレイ。

【請求項 8 3】

乳癌の治療または乳癌転移の予防のための化合物をスクリーニングする方法であって、  
 (1) 被験化合物を、BRC番号719~752の遺伝子からなる群より選択される遺伝子によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(2) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および

(3) ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階

を含む方法。

【請求項 8 4】

乳癌の治療または乳癌転移の予防のための化合物をスクリーニングする方法であって、  
 (1) 被験化合物を、BRC番号719~752の遺伝子からなる群より選択される遺伝子によってコードされるポリペプチドと接触させる段階；

(2) 段階(a)のポリペプチドの生物活性を検出する段階；ならびに

(3) VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される遺伝子によってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して低下させるか、またはUBA52、GenBankアクセッション番号AA634090、CEACAM3、C21orf97、KIAA1040、EEF1D、FUS、GenBankアクセッション番号AW965200およびKIAA0475からなる群より選択される遺伝子によってコードされるポリペプチドの生物活性を、被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して上昇させる、被験化合物を選択する段階を含む方法。

【請求項 8 5】

乳癌の治療または乳癌転移の予防のための化合物をスクリーニングする方法であって、  
 (1) 被験化合物を一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞と接触させる段階であって、該マーカー遺伝子がBRC番号719~752の遺伝子からなる群より選択される段階；ならびに

(2) VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択されるマーカー遺伝子のうち一つもしくは複数の発現レベルを、被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して低下させるか、またはUBA52、GenBankアクセッション番号AA634090、CEACAM3、C21orf97、KIAA1040、EEF1D、FUS、GenBankアクセッション番号AW965200およびKIAA0475からなる群より選択されるマーカー遺伝子のうち一つもしくは複数の発現レベルを、被験化合物の非存在下で検出される生物活性と比較して上昇させる、化合物を選択する段階を含む方法。

【請求項 8 6】

一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞が乳癌細胞を含む、請求項85記載の方法。

【請求項 8 7】

乳癌の治療または乳癌転移の予防のための化合物をスクリーニングする方法であって、  
 (1) BRC番号719~752の遺伝子からなる群より選択される遺伝子の転写調節領域および該転写調節領域の下流かつ制御下にあるレポーター遺伝子を含む、ベクターを構築する段階；

(2) 段階(1)のベクターを用いて細胞を形質転換する段階；

(3) 被験化合物を段階(2)の細胞と接触させる段階；

(4) レポーター遺伝子の発現または活性を検出する段階；ならびに

(5) 該マーカー遺伝子が、VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択さ

れる上方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現もしくは活性を低下させるか、または該マーカー遺伝子が、UBA52、GenBankアクセッション番号AA634090、CEACAM3、C21orf97、KIAA1040、EEF1D、FUS、GenBankアクセッション番号AW965200およびKIAA0475からなる群より選択される下方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現もしくは活性を高める、被験化合物を選択する段階を含む方法。

【請求項 88】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための方法であって、請求項 83～87のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物の薬学的有効量を対象に投与する段階を含む方法。

10

【請求項 89】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための方法であって、VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される一つまたは複数の遺伝子に対するアンチセンス核酸またはsiRNAの薬学的有効量を対象に投与する段階を含む方法。

【請求項 90】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための方法であって、VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を対象に投与する段階を含む方法。

20

【請求項 91】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための方法であって、ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターの薬学的有効量を対象に投与する段階を含み、該ポリペプチドがUBA52、GenBankアクセッション番号AA634090、CEACAM3、C21orf97、KIAA1040、EEF1D、FUS、GenBankアクセッション番号AW965200およびKIAA0475からなる群より選択される遺伝子によってコードされるか、またはその断片である方法。

30

【請求項 92】

抗腫瘍免疫を誘導するための方法であって、抗原提示細胞を、ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターと接触させる段階を含み、該ポリペプチドがVAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される遺伝子によってコードされるか、またはその断片である方法。

【請求項 93】

抗原提示細胞を対象に投与する段階をさらに含む、請求項92記載の抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

40

【請求項 94】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための組成物であって、請求項 83～87のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物の薬学的有効量を含む組成物。

【請求項 95】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための組成物であって、VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される、一つまたは複数の遺伝子に対するアンチセンス核酸またはsiRNAの薬学的有効量を含む組成物。

【請求項 96】

50

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための組成物であって、VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する、抗体またはその断片の薬学的有効量を含む組成物。

【請求項 97】

対象における乳癌の治療または乳癌転移の予防のための組成物であって、(a) ポリペプチド、(b) 該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または(c) 該ポリヌクレオチドを含むベクターの薬学的有効量を含み、該ポリペプチドがVAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される遺伝子によってコードされるか、またはその断片である組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、乳癌の検出および診断の方法、ならびに乳癌および乳癌転移を治療および予防する方法に関する。

【0002】

本出願は、2003年9月24日に提出された米国特許仮出願第60/505,571号の恩典を主張し、その内容はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

乳癌は遺伝的に不均一な疾患であり、女性で最も一般的な悪性腫瘍である。全世界で毎年、推定で約80万件の新たな症例が報告されている(Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999). CA Cancer J Clin 49: 33-64)。本疾患の治療のための同時併用的な選択肢のうち第一のものは乳房切除術である。原発性腫瘍の外科的除去を行っても、診断時点では検出不可能な微小転移のために局所または遠隔部位での再発が起こる可能性がある(Saphner T, Tommey DC, Gray R (1996). J Clin Oncol, 14, 2738-2746)。このような残存細胞または前癌細胞を死滅させることを狙いとして、手術後には通常、アジュバント療法として細胞毒性薬剤が投与される。

30

【0004】

従来化学療法薬による治療は経験に拠ることが多く、ほとんどは組織学的腫瘍パラメーターに基づき、具体的な機序は解明されていない。このため、標的指向性薬剤が乳癌に対する基礎的な治療となりつつある。タモキシフェンおよびアロマターゼ阻害薬はこの種のものを代表する2つであり、転移性乳癌を有する患者にアジュバントまたは化学予防薬として用いた場合に大きな反応があることが証明されている(Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N (1998). J Natl Cancer Inst, 90, 1371-1388; Cuzick J (2002). Lancet 360, 817-824)。しかし、その欠点は、これらの薬剤に対する感受性があるのはエストロゲン受容体を発現している患者のみであることである。最近では、副作用、特に長期のタモキシフェン治療が子宮内膜癌を引き起こす可能性、ならびにアロマターゼを処方された患者のうち閉経後の女性における骨折への有害な影響に関する懸念さえ生じている(Coleman RE (2004). Oncology. 18 (5 Suppl 3), 16-20)。副作用および薬剤耐性の出現のために、同定された作用機序に基づく、選択的で有用な薬剤の新たな分子標的を探索することが明らかに必要になっている。

40

【0005】

乳癌は、非常に多くの遺伝的変化との関連性がある複合的な疾患である。これらの異常

50

が乳癌発生の原因であるか否かはほとんど分かっていないが、これらは、異型乳管過形成、非浸潤性乳管癌（DCIS）および浸潤性乳管癌（IDC）の段階を含む、正常細胞の形質転換と概して同一視しうる多段階過程によって起こることが報告されている。前癌病変のうち浸潤癌に進行するのは一部分に過ぎず、それ以外の病変は自然退行するという証拠が得られている。原発性乳癌の発生、その進行およびその転移の形成をもたらす分子的関与に関するこの説明は、予防および治療を目標とする新たな戦略の主な焦点となる。

【0006】

cDNAマイクロアレイ解析によって作成された遺伝子発現プロファイルは、個々の癌の性質に関して、従来の組織病理学的方法が与えるよりもかなり多くの詳細を提供することができる。このような情報が有望とされている理由は、新生物性疾患の治療および新規薬剤の開発のための臨床的戦略を進歩させる可能性があるという点にある（Petricoin, E. F., 3rd, Hackett, J. L., Lesko, L. J., Puri, R. K., Gutman, S. I., Chumakov, K., Woodcock, J., Feigal, D. W., Jr., Zoon, K. C. and Sistare, F. D. 「Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective.」 *Nat Genet*, 32 Suppl: 474-479, 2002）。この目標のため、本発明者らは、種々の組織からの一つまたは複数の腫瘍の発現プロファイルをcDNAマイクロアレイによって解析した（Okabe, H. et al., 「Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression.」 *Cancer Res*, 61: 2129-2137, 2001; Hasegawa, S. et al., 「Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23,040 genes.」 *Cancer Res*, 62: 7012-7017, 2002; Kaneta, Y. et al., and Ohno, R. 「Prediction of Sensitivity to ST1571 among Chronic Myeloid Leukemia Patients by Genome-wide cDNA Microarray Analysis.」 *Jpn J Cancer Res*, 93: 849-856, 2002; Kaneta, Y. et al., 「Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray.」 *Int J Oncol*, 23: 681-691, 2003; Kitahara, O. et al., 「Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia.」 *Cancer Res*, 61: 3544-3549, 2001; Lin, Y. et al. 「Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas.」 *Oncogene*, 21: 4120-4128, 2002; Nagayama, S. et al., 「Genome-wide analysis of gene expression in synovial sarcomas using a cDNA microarray.」 *Cancer Res*, 62: 5859-5866, 2002; Okutsu, J. et al., 「Prediction of chemosensitivity for patients with acute myeloid leukemia, according to expression levels of 28 genes selected by genome-wide complementary DNA microarray analysis.」 *Mol Cancer Ther*, 1: 1035-1042, 2002; Kikuchi, T. et al., 「Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs.」 *Oncogene*, 22: 2192-2205, 2003）。

【0007】

最近ではcDNAマイクロアレイを利用した数千種もの遺伝子の発現レベルが検討された結果、種々のタイプの乳癌における個別のパターンが発見されている（Sgroi, D. C. et al., 「In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression.」 *Cancer Res*, 59: 5656-5661, 1999; Sorlie, T. et al., 「Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.」 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10869-10874, 2001; Kauraniemi, P. et al., 「New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays.」 *Cancer Res*, 61: 8235-8240, 2001; Gruberger, S. et al., S. 「Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns.」 *Cancer Res*, 61: 5979-5984, 2001; Dressman, M. e

t al., 「Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer.」 *Cancer Res*, 63: 2194-2199, 2003)。

【0008】

乳癌における遺伝子発現プロファイルに関する研究により、診断マーカーまたは予後判定プロファイルのための候補として役立つ可能性のある遺伝子が同定されている。しかし、乳癌細胞は高度の炎症反応を伴う固形腫瘍 (solid mass) として存在し、種々な細胞成分を含むため、主として腫瘍塊から得られたこれらのデータは乳癌発生過程における発現変化を十分には反映できない。したがって、以前に公開されたマイクロアレイデータは混成の (heterogenous) プロファイルを反映している可能性が高い。

【0009】

発癌メカニズムを解明するように計画された研究によって、いくつかの抗腫瘍物質の分子標的の同定が既に促進されている。例えば、Rasに関連する増殖-シグナル伝達経路を阻害するように当初開発されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) (この活性は翻訳後のファルネシル化に依存する) は、動物モデルにおいてRas依存的腫瘍を治療するために有効であることが示されている (He et al., *Cell* 99: 335-45 (1999))。同様に、抗癌剤と、原癌遺伝子受容体HER2/neuに拮抗するための抗HER-2モノクローナル抗体であるトラスツズマブを併用したヒトに対する臨床試験が実施されており、乳癌患者の臨床応答および総生存率の改善が得られている (Lin et al., *Cancer Res.* 61: 6345-9 (2001))。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活化するチロシンキナーゼ阻害剤STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球の形質転換において重要な役割を果たしている慢性骨髄性白血病を治療するためにようやく開発されてきている。これらの種類の物質は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制するように設計されている (Fujita et al., *Cancer Res.* 61: 7722-6 (2001))。よって、癌性細胞において一般的に上方制御されている遺伝子産物が、新規抗癌剤を開発するための有力な標的として役立つ可能性があることは理解できる。

【0010】

CD8+細胞障害性Tリンパ球 (CTL) は、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原 (TAA) に由来するエピトープペプチドを認識して、腫瘍細胞を溶解することがさらに証明されている。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以来、免疫学的アプローチを用いて他にも多くのTAAが発見されている (Boon, *Int. J. Cancer* 54: 177-80 (1993) ; Boon and van der Bruggen, *J. Exp. Med.* 183: 725-9 (1996) ; van der Bruggen et al., *Science* 254: 1643-7 (1991) ; Brichard et al., *J. Exp. Med.* 178: 489-95 (1993) ; Kawakami et al., *J. Exp. Med.* 180: 347-52 (1994))。新しく発見されたTAAのいくつかにおいては、免疫治療の標的として現在臨床開発が行われている。これまで発見されたTAAには、MAGE (van der Bruggen et al., *Science* 254: 1643-7 (1991))、gp100 (Kawakami et al., *J. Exp. Med.* 180: 347-52 (1994))、SART (Shichijo et al., *J. Exp. Med.* 187: 277-88 (1998))、およびNY-ESO-1 (Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1914-8 (1997)) が含まれる。一方、腫瘍細胞において特に過剰発現されることが示されている遺伝子産物は、細胞性免疫応答を誘導する標的として認識されることが示されている。そのような遺伝子産物には、p53 (Umano et al., *Brit. J. Cancer* 84: 1052-7 (2001))、HER2/neu (Tanaka et al., *Brit. J. Cancer* 84: 94-9 (2001))、CEA (Nukaya et al., *Int. J. Cancer* 80: 92-7 (1999)) 等が含まれる。

【0011】

TAAに関する基礎および臨床研究における著しい進歩にもかかわらず (Rosenberg et al., *Nature Med.* 4: 321-7 (1998) ; Mukherji et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8078-82 (1995) ; Hu et al., *Cancer Res.* 56: 2479-83 (1996))、結腸癌を含む腺癌の治療に現在利用できるのは、ごく限られた数の候補TAAに過ぎない。癌細胞において豊富に発現されると共にさらにその発現が癌細胞に限定されるTAAは、免疫療法の標的として有望な候補物質となるであろう。さらに、強力な特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導する新規TAAが同定されれば、様々なタイプの癌におけるペプチドワクチン法の臨床応用を促

10

20

30

40

50

進すると期待される (Boon and van der Bruggen, J. Exp. Med. 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., Science 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., J. Exp. Med. 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., J. Exp. Med. 180: 347-52 (1994); Shichijo et al., J. Exp. Med. 187: 277-88 (1998); Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-8 (1997); Harris, J. Natl. Cancer Inst. 88: 1442-5 (1996); Butterfield et al., Cancer Res. 59: 3134-42 (1999); Vissers et al., Cancer Res. 59: 5554-9 (1999); van der Burg et al., J. Immunol. 156: 3308-14 (1996); Tanaka et al., Cancer Res. 57: 4465-8 (1997); Fujie et al., Int. J. Cancer 80: 169-72 (1999); Kikuchi et al., Int. J. Cancer 81: 459-66 (1999); Oiso et al., Int. J. Cancer 81: 387-94 (1999) )。

10

## 【0012】

ペプチド刺激された特定の健康なドナー由来の末梢血単核細胞 (PBMC) は、ペプチドに反応して著しいレベルの IFN- $\gamma$  を産生するが、 $^{51}\text{Cr}$ -放出アッセイにおいて HLA-A24 または -A0201 拘束的に腫瘍細胞に対して細胞障害性を発揮することはまれであることは繰り返し報告されている (Kawano et al., Cancer Res. 60: 3550-8 (2000); Nishizaka et al., Cancer Res. 60: 4830-7 (2000); Tamura et al., Jpn. J. Cancer Res. 92: 762-7 (2001) )。しかし、HLA-A24 および HLA-A0201 はいずれも、白人集団のみならず、日本人集団における一般的な HLA 対立遺伝子である (Date et al., Tissue Antigens 47: 93-101 (1996); Kondo et al., J. Immunol. 155: 4307-12 (1995); Kubo et al., J. Immunol. 152: 3913-24 (1994); Imanishi et al., Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference, Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williams et al., Tissue Antigen 49: 129 (1997) )。このように、これらの HLA によって提示される癌の抗原性ペプチドは、日本人および白人における癌の治療において特に有用となる可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性 CTL の誘導は、通常、高濃度のペプチドの使用によって、CTL を効果的に活性化する高レベルの特異的なペプチド/MHC 複合体を抗原提示細胞 (APC) 上に生成する結果であろうことは知られている (Alexander-Miller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4102-7 (1996) )。

20

## 【0013】

このため、癌に関係する発癌機構の解明、および新規抗癌剤を開発するための有望な標的の同定を目的とした取り組みとして、本発明者らは 23,040 種の遺伝子を提示する cDNA マイクロアレイを用いて、12 例の非浸潤性乳管癌 (DCIS) および 69 例の浸潤性乳管癌 (IDC) を含む乳癌細胞の精製集団において見られる、遺伝子発現プロファイルの大規模な全ゲノム解析を行った。

30

## 【発明の開示】

## 【0014】

## 発明の概要

本発明は、乳癌 (BRC) と関連する遺伝子発現パターンの発見に基づく。乳癌において差次的に発現される遺伝子は、本明細書において「BRC 核酸」または「BRC ポリヌクレオチド」と総称され、コードされる対応するポリペプチドは「BRC ポリペプチド」または「BRC タンパク質」と呼ばれる。

40

## 【0015】

したがって、本発明は、患者由来の生物学的試料 (組織試料など) における BRC 関連遺伝子の発現レベルを決定することによる、対象における乳癌に対する素因を診断または判定する方法を提供する。「BRC 関連遺伝子」という用語は、BRC 細胞における発現レベルが正常細胞と比較して異なることを特徴とする遺伝子を指す。正常細胞は乳房組織から得られたものである。本発明の文脈において、BRC 関連遺伝子は、表 3~8 に列挙された遺伝子 (すなわち BRC 番号 123~512 の遺伝子) である。遺伝子の発現レベルがその遺伝子の正常対照レベルと比較して変化していること、例えば上昇または低下していることにより、対象が BRC に罹患している、または BRC を発症するリスクを有することが示される。

## 【0016】

50

本発明の文脈において、「対照レベル」という語句は、対照試料で検出されるタンパク質発現レベルを指し、これには正常対照レベルおよび乳癌対照レベルの両方が含まれる。対照レベルは、単一の参照集団に由来する単一の発現パターンであっても、または複数の発現パターンに由来する単一の発現パターンであってもよい。例えば、対照レベルが、以前に試験を行った細胞からの発現パターンのデータベースであってもよい。「正常対照レベル」とは、正常で健康な個体において、または乳癌に罹患していないことが判明している個体の集団において検出される遺伝子の発現レベルを指す。正常個体とは、乳癌の臨床症状がない個体のことである。これに対して、「BRC対照レベル」とは、BRCに罹患した集団で認められるBRC関連遺伝子の発現プロファイルを指す。

【0017】

被験試料において検出される、表3、5および7に列挙された一つまたは複数のBRC関連遺伝子（すなわち、BRC番号123~175、374~398および448~471）の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇していることにより、（試料を入手した）対象がBRCに罹患しているか、またはBRCを発症するリスクを有することが示される。対照的に、被験試料中に検出される、表4、6および8に列挙された一つまたは複数のBRC関連遺伝子（すなわち、BRC番号176~373、399~447および472~512）の発現レベルが正常対照レベルと比較して低下していることにより、対象がBRCに罹患していること、またはBRCを発症するリスクを有することが示される。

【0018】

または、試料におけるBRC関連遺伝子の一群の発現を、同じ遺伝子一群のBRC対照レベルと比較することもできる。試料での発現とBRC対照での発現との間に類似性があれば、（試料を提供した）対象がBRCに罹患している、またはBRCを発症するリスクを有することが示される。

【0019】

本発明によれば、遺伝子発現レベルは、対照レベルと比較して10%、25%、または50%上昇または低下している場合に「変化している」とみなされる。または、発現レベルは、対照レベルと比較して少なくとも0.1倍、少なくとも0.2倍、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍またはそれ以上上昇または低下している場合に変化しているとみなしてもよい。発現は、例えばアレイ上で、BRC関連遺伝子プローブと患者由来の組織試料の遺伝子転写物とのハイブリダイゼーションを検出することによって決定

【0020】

本発明の文脈において、患者由来の組織試料は、被験対象から、例えば、BRCを有することが判明しているかその疑いがある患者から得られる任意の試料である。例えば、組織には上皮細胞が含まれてもよい。より具体的には、組織は乳管癌からの上皮細胞でありうる。

【0021】

本発明はまた、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子のうち2つまたはそれ以上に関する遺伝子発現レベルを含む、BRC基準発現プロファイルも提供する。または、BRC基準発現プロファイルが、表3、5および7に列挙されたBRC関連遺伝子または表4、6および8に列挙されたBRC関連遺伝子のうち2つまたはそれ以上に関する発現レベルを含んでもよい。

【0022】

本発明はさらに、BRC関連遺伝子を発現する被験細胞を被験化合物と接触させること、BRC関連遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性を決定することによって、BRC関連遺伝子、例えば表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子の発現または活性を阻害または増強する作用因子を同定する方法も提供する。被験細胞は、乳癌から得られた上皮細胞などの上皮細胞であってもよい。上方制御されるBRC関連遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性が、その遺伝子または遺伝子産物の正常対照レベルまたは活性と比較して低下していることにより、被験作用因子がBRC関連遺伝子の阻害因子であることが示され、これはBRCの症状、例えば、表3、5および7に列挙された一つまたは複数のBRC関連遺伝子の発

10

20

30

40

50

現を緩和するために用いてもよい。または、下方制御されるBRC関連遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性が、遺伝子または遺伝子産物の正常対照レベルまたは活性と比較して上昇していることにより、被験作用因子がBRC関連遺伝子の発現または機能に対する増強因子であることが示され、これはBRCの症状、例えば、表4、6および8に列挙された一つまたは複数のBRC関連遺伝子の低発現を緩和するために用いてもよい。

#### 【0023】

本発明はまた、一つまたは複数のBRC核酸またはBRCポリペプチドと結合する検出試薬を含むキットも提供する。一つまたは複数のBRC核酸と結合する核酸のアレイも提供される。

#### 【0024】

本発明の治療方法には、対象におけるBRCを治療または予防する方法であって、アンチセンス組成物を対象に投与する段階を含む方法が含まれる。本発明の文脈において、アンチセンス組成物は特異的な標的遺伝子の発現を低下させる。例えば、アンチセンス組成物は、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子からなる群より選択されるBRC関連遺伝子配列に対して相補的なヌクレオチドを含みうる。または、本方法が、低分子干渉RNA (siRNA) 組成物を対象に投与する段階を含んでもよい。本発明の文脈において、siRNA組成物は、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子からなる群より選択されるBRC核酸の発現を低下させる。さらにもう1つの方法において、対象におけるBRCの治療または予防を、リボザイム組成物を対象に投与することによって実施することもできる。本発明の文脈において、核酸特異的なリボザイム組成物は、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子からなる群より選択されるBRC核酸の発現を低下させる。実際、表に列挙されたBRC関連遺伝子に対するsiRNAの阻害作用が確認された。例えば、表7のBRC-456 (GenBankアクセッション番号AF237709、TOPK; T-LAK細胞から生じるプロテインキナーゼ) に対するsiRNAが乳癌細胞の細胞増殖を阻害することが、実施例の項で明確に示されている。したがって、本発明において、表3、5および7に列挙されたBRC関連遺伝子、特にBRC-456は、乳癌の好ましい治療標的である。他の治療方法には、対象に、表4、6および8に列挙されたBRC関連遺伝子のうちの一つもしくは複数の発現、または表4、6および8に列挙されたBRC関連遺伝子のうちの一つもしくは複数によってコードされるポリペプチドの活性を高める化合物を投与するものが含まれる。

#### 【0025】

本発明はまた、ワクチンおよびワクチン接種方法も含む。例えば、対象におけるBRCを治療または予防する方法が、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチド、またはこのようなポリペプチドの免疫学的活性断片を含むワクチンを対象に投与する段階を含んでもよい。本発明の文脈において、免疫学的活性断片とは、完全長の天然型タンパク質よりも長さは短いものの、完全長タンパク質によって誘導される免疫応答に類似した免疫応答を誘導するポリペプチドのことである。例えば、免疫学的活性断片は、少なくとも8残基長であって、T細胞またはB細胞などの免疫細胞を刺激しうるものであるべきである。免疫細胞の刺激は、細胞増殖、サイトカイン (例えば、IL-2) の生成、または抗体の産生を検出することによって測定可能である。

#### 【0026】

さらに、本発明は、乳癌の転移を治療または予防するための標的分子を提供する。本発明によれば、表11に列挙された遺伝子 (すなわち、BRC番号719~752の遺伝子) が、リンパ節転移を伴う乳癌細胞において特有の変化した発現パターンを有する遺伝子として同定された。したがって、VAMP3、MGC11257、GSPT1、DNM2、CFL1、CLNS1A、SENP2、NDUFS3、NOP5/NOP58、PSMD13、SUOX、HRB2、LOC154467、THTPA、ZRF1、LOC51255、DEAF1、NEU1、UGCGL1、BRAF、TUFM、FLJ10726、DNAJB1、AP4S1およびMRPL40からなる群より選択される、上方制御される遺伝子またはそれらの遺伝子産物の発現または活性の抑制を介して、乳癌の転移を治療または予防することができる。または、癌細胞におけるUBA52、GenBankアクセッション番号AA634090、CEACAM3、C21orf97、KIAA1040、EEF1D、FUS、GenBankアクセ

10

20

30

40

50

ション番号AW965200およびKIAA0475の発現または活性を増強することによって、乳癌の転移を治療または予防することもできる。

【0027】

本発明はまた、乳癌の転移を予測するための方法も提供する。詳細には、本方法は、表11に列挙された遺伝子からなる群より選択されるマーカー遺伝子の発現レベルを測定する段階を含む。これらのマーカー遺伝子は、本明細書において、リンパ節転移を伴う患者の乳癌細胞において特有の変化した発現パターンを有する遺伝子として同定されている。このため、対象由来の試料において検出された発現レベルが、参照試料におけるリンパ節転移陽性症例または陰性症例の平均発現レベルと近いかなかを判定することによって、対象における乳癌の転移を予想することができる。

10

【0028】

上方制御される遺伝子の中から、本発明者らは、発現データを得ることができた乳癌の39症例中30例(77%)で、特に浸潤性乳管癌標本が得られた36症例中29例(81%)で、3倍を上回って過剰発現された、T-LAK細胞から生じるプロテインキナーゼ(TOPK)と呼ばれるA7870を同定した。その後の半定量的RT-PCRからも、A7870が、乳管細胞または正常乳房を含む正常ヒト臓器と比較して、12例の臨床乳癌試料中7例および20個の乳癌細胞株中17個で上方制御されることが確認された。ノーザンブロット分析により、A7870転写産物は乳癌細胞株ならびに正常ヒト精巣および胸腺のみで発現されることが判明した。TOPK抗体を用いた免疫細胞化学染色により、乳癌細胞株T47D、BT20およびHBC5において内因性A7870の細胞内局在は細胞質中および核膜周辺に観察された。低分子干渉RNA(sirna)による乳癌細胞の処置は、A7870の発現を効果的に阻害するとともに乳癌細胞株T47DおよびBT-20の細胞/腫瘍成長を抑制し、このことからこの遺伝子が細胞の成長増殖に重要な役割を果たすことが示唆された。これらの所見は、A7870の過剰発現が乳癌発生に關与する可能性とともに、乳癌患者に対する特異的治療法のための有望な戦略となる可能性があることを示唆する。

20

【0029】

特に定義していなければ、本明細書において用いた科学技術用語は全て、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記述の方法および材料と類似または同等の方法および材料を、本発明の実践または試験において用いることができるが、適した方法および材料を下記に記述する。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および例は、説明するために限られ、制限することを意図しない。

30

【0030】

本明細書に記述の方法の一つの長所は、乳癌の明白な臨床症状を検出する前に疾患が同定されることである。本発明のその他の特徴および長所は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【0031】

発明の詳細な説明

本明細書で用いる「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」という用語は、別に特記する場合を除き、「少なくとも1つの」を意味する。

40

【0032】

一般に、乳癌細胞は、高度の炎症反応を有するとともに種々の細胞成分を含む固形腫瘍として存在する。このため、これまでに発表されたマイクロアレイデータは混成のプロファイルを反映している可能性が高い。

【0033】

これらの問題を考慮して、本発明者らは、乳癌細胞および正常乳房上皮乳管細胞の精製された集団をレーザーマイクロビームマイクロダイセクション(LMM)法によって調製し、23,040遺伝子を提示するcDNAマイクロアレイを用いて、12例の非浸潤性乳管癌(DCIS)および69例の浸潤性乳管癌(IDC)を含む81例のBRCの全ゲノム遺伝子発現プロファイル

50

、解析した。これらのデータは、乳癌発生に関する重要な情報を提供するだけでなく、その産物が診断マーカーとしておよび/または乳癌患者の治療のための分子標的として役立つとともに、臨床的に意味のある情報を提供する可能性がある、候補遺伝子の同定を容易にする。

#### 【0034】

本発明は部分的には、BRCの患者の上皮細胞と癌との間で、多数の核酸の発現パターンが変化しているという発見に基づく。遺伝子の発現の差異は網羅的cDNAマイクロアレイシステムによって同定された。

#### 【0035】

12例のDCISおよび69例のIDCを含む81例のBRC由来の癌細胞の遺伝子発現プロファイルを、23,040個の遺伝子を提示するcDNAマイクロアレイをレーザーマイクロディセクション法と組み合わせて用いることにより解析した。レーザーマイクロディセクション法によってのみ選択された、BRCと診断された患者からの癌細胞と正常乳管上皮細胞の発現パターンを比較することにより、102個の遺伝子(表3、5および7に示されている)がBRC細胞で高頻度に上方制御されるものとして同定され、そのうち100個の遺伝子を本発明のBRC関連遺伝子として選択した。同様に、288個の遺伝子(表4、6および8に示されている)が、BRC細胞で高頻度に下方制御されるものとして同定された。さらに、患者の血清中または痰中の癌関連タンパク質を検出する能力を有する候補分子マーカーの選別を行い、ヒトBRCにおけるシグナル抑制方法の開発のための標的となる可能性のあるものがいくつか発見された。表3および4は、それらのうち、DCISおよびIDCを含むBRCと正常組織との間で発現が変化している遺伝子の一覧を提供する。DCISおよびIDCにおいて通常、上方制御または下方制御されている遺伝子は、それぞれ表3および表4に示されている。DCISからIDCへの移行において発現が上昇または低下する遺伝子は、それぞれ表5および表6に列記されている。さらに、正常組織と比較してIDCにおいて通常、上方制御または下方制御される遺伝子は、それぞれ表7および表8に列記されている。

#### 【0036】

本明細書で同定された、差次的に発現されるこれらの遺伝子には、BRCマーカーおよびBRC遺伝子標的としての診断上の有用性がみられ、その発現は、BRC症状の治療または軽減を目的に変化されうる。または、本明細書で同定された、DCISとIDCとの間で差次的に発現される遺伝子には、IDCをDCISと区別するためのマーカーおよびBRC遺伝子標的としての診断上の有用性がみられ、IDC症状の治療または軽減を目的にその発現が変化されうる。

#### 【0037】

BRC患者において発現レベルが変化している(すなわち、上昇または低下している)遺伝子は表3~8にまとめられており、本明細書において「BRC関連遺伝子」、「BRC核酸」、または「BRCポリヌクレオチド」と総称され、対応するコードされるポリペプチドは「BRCポリペプチド」または「BRCタンパク質」と呼ばれる。別に指示する場合を除き、「BRC」とは、本明細書中に開示した配列のうち任意のものを指す(例えば、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子)。前述の遺伝子群はデータベースのアクセッション番号とともに示している。

#### 【0038】

細胞の試料における種々の遺伝子の発現を測定することにより、BRCを診断することができる。同様に、種々の物質に反応したこれらの遺伝子の発現を測定することにより、BRCを治療するための物質を同定することができる。

#### 【0039】

本発明は、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子の少なくとも1つ、最大ですべての発現を決定すること(例えば、測定すること)を含む。既知の配列に関するGenBank(商標)データベースの登録情報によって得られる配列情報を使用し、当業者に周知の手法を用いてBRC関連遺伝子を検出および測定することができる。例えば、BRC関連遺伝子に対応する配列データベース登録情報中の配列を、例えばノーザンブロットハイブリダイゼーション分析において、BRC関連遺伝子に対応するRNA配列を検出するためのプローブを構築するため

に用いることができる。プローブは、典型的には参照配列のうちの少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも200ヌクレオチドを含む。別の例としては、これらの配列は、例えば増幅に基づいた検出方法（逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応など）におけるBRC核酸を特異的に増幅するためのプライマーを構築するのに用いることができる。

#### 【0040】

続いて、被験細胞集団、例えば患者由来の組織試料における、BRC関連遺伝子の一つまたは複数の発現レベルを、参照集団における同じ遺伝子の発現レベルと比較する。参照細胞集団は、比較されるパラメーターが既知である一つまたは複数の細胞、すなわち、乳管癌細胞（例えば、BRC細胞）または正常乳管上皮細胞（例えば、非BRC細胞）を含む。

10

#### 【0041】

被験細胞集団における遺伝子発現のパターンが、参照細胞集団と比較してBRCまたはそれに対する素因を示すか否かは、参照細胞集団の組成に依存する。例えば、参照細胞集団が非BRC細胞から構成される場合には、被験細胞集団と参照細胞集団との間で遺伝子発現パターンに類似性があることにより、被験細胞集団が非BRCであると示される。その反対に、参照細胞集団がBRC細胞から構成される場合には、被験細胞集団と参照細胞集団との間で遺伝子発現プロファイルに類似性があることにより、被験細胞集団がBRC細胞を含むと示される。

#### 【0042】

被験細胞集団におけるBRCマーカー遺伝子の発現レベルは、それと参照細胞集団における対応するBRCマーカー遺伝子の発現レベルとの違いが1.0倍を上回る、1.5倍を上回る、2.0倍を上回る、5.0倍を上回る、10.0倍を上回る、またはそれ以上の倍数を上回るならば「変化している」とみなされる。

20

#### 【0043】

被験細胞集団と参照細胞集団との間の差次的な遺伝子発現は、対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子に対して標準化することができる。例えば、対照核酸は、細胞が癌状態にあるか非癌状態にあるかによっての差がないことが判明している核酸である。対照核酸の発現レベルは、被験集団および参照集団におけるシグナルレベルを標準化するのに用いることができる。対照遺伝子の例には、例えば、 $\alpha$ -アクチン、グリセルアルデヒド-リン酸デヒドロゲナーゼ、およびリポソームタンパク質P1が非制限的に含まれる。

30

#### 【0044】

被験細胞集団は複数の参照細胞集団と比較することができる。多数の参照集団のそれぞれは既知のパラメーターに関して差があってもよい。したがって、被験細胞集団を、例えばBRC細胞を含むことが判明している第1の参照細胞集団、ならびに例えば非BRC細胞（正常細胞）を含むことが判明している第2の参照集団と比較してもよい。被験細胞は、BRC細胞を含むことが判明しているかまたはBRC細胞を含むことが疑われる対象からの組織試料または細胞試料中に含まれてもよい。

#### 【0045】

被験細胞は、体組織または体液、例えば、生体液（例えば、血液または痰など）から得られる。例えば、被験細胞を乳房組織から精製してもよい。好ましくは被験細胞集団は上皮細胞を含む。上皮細胞は、好ましくは乳管癌であるか乳管癌であることが疑われる組織からのものである。

40

#### 【0046】

参照細胞集団中の細胞は、被験細胞の組織型と類似した組織型に由来すべきである。任意には、参照細胞集団は細胞株、例えば、BRC細胞株（すなわち、陽性対照）または正常非BRC細胞株（すなわち、陰性対照）である。または、対照細胞集団は、アッセイされるパラメーターまたは条件に関して既知である細胞の分子情報のデータベースに由来していてもよい。

#### 【0047】

対象は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物の例には、例えば、ヒト、非ヒト霊長動

50

物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシが非制限的に含まれる。

【0048】

本明細書に開示した遺伝子の発現は、当技術分野で公知の方法を用いて、タンパク質レベルまたは核酸レベルで決定することができる。例えば、遺伝子発現を決定するには、これらの核酸配列の一つまたは複数を特異的に認識するプローブによるノーザンハイブリダイゼーション分析を用いてもよい。または、遺伝子発現は、例えば、差次的に発現される遺伝子配列に対して特異的なプライマーを用いて逆転写に基づくPCRアッセイにより測定することもできる。発現はまた、タンパク質レベルで、すなわち、本明細書に記載の遺伝子によってコードされるポリペプチドのレベルまたはその生物学的活性を測定することによって決定することもできる。この種の方法は当技術分野で周知であり、例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体を利用したイムノアッセイが非制限的に含まれる。遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性は一般に周知である。

10

【0049】

乳癌の診断

本発明の文脈において、BRCは、被験細胞集団（すなわち、患者由来の生物学的試料）からの一つまたは複数のBRC核酸の発現レベルを測定することによって診断される。好ましくは被験細胞集団は、上皮細胞、例えば、乳房組織から得られた細胞を含む。遺伝子発現を、血液または他の体液（尿など）から測定することもできる。他の生物学的試料をタンパク質レベルの測定のために用いることもできる。例えば、診断しようとする対象から得た血液または血清中のタンパク質レベルを、イムノアッセイまたは従来の生物学的アッセイによって測定することができる。

20

【0050】

一つまたは複数のBRC関連遺伝子、例えば、表3～8に列挙されたBRC関連遺伝子の発現を、被験細胞試料または生物学的試料において決定し、アッセイした一つまたは複数のBRC関連遺伝子に付随する正常対照発現レベルと比較する。正常対照レベルとは、BRCに罹患していないことが判明している集団で一般に認められるBRC関連遺伝子の発現プロファイルのことである。患者由来の組織試料における一つまたは複数のBRC関連遺伝子の発現レベルに変化（例えば、上昇または低下）があることにより、対象がBRCに罹患しているかBRCを発症するリスクを有することが示される。例えば、被験集団における、表3、5、および7に列挙された、上方制御されたBRC関連遺伝子のうち一つまたは複数の発現が正常対照レベルと比較して上昇していることにより、その対象がBRCに罹患しているかBRCを発症するリスクを有することが示される。逆に、被験集団における、表4、6および8に列挙された一つまたは複数の下方制御されるBRC関連遺伝子の発現が正常対照レベルと比較して低下していることにより、その対象がBRCに罹患している、またはBRCを発症するリスクを有することが示される。

30

【0051】

被験集団におけるBRC関連遺伝子のうち一つまたは複数が、正常対照レベルと比較して変化していることにより、その対象がBRCに罹患している、またはBRCを発症するリスクを有することが示される。例えば、BRC関連遺伝子群（表3～8に列挙された遺伝子）のうち、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれ以上が変化していることにより、その対象がBRCに罹患している、またはBRCを発症するリスクを有することが示される。

40

【0052】

BRCの組織病理学的分化度の同定：

本発明は、対象におけるBRCの組織学的分化度を特定するための方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

(a) 検査する対象から採取した組織試料における一つまたは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを検出する段階であって、一つまたは複数のマーカー遺伝子が表1および表10に列挙された遺伝子からなる群より選択される段階；ならびに

(b) 一つまたは複数のマーカー遺伝子の検出された発現レベルを、高分化型症例およ

50

び低分化型症例に付随してみられる発現レベルと比較する段階；

(c) 一つまたは複数のマーカー遺伝子の検出された発現レベルが高分化型症例のものと同程度である場合に、組織試料が高分化型であると判定され、一つまたは複数のマーカー遺伝子の検出された発現レベルが低分化型症例のものと同程度である場合に、組織試料が低分化型であると判定される段階。

【0053】

本発明において、BRCの組織学的分化度を特定するためのマーカーは、表1および10に示された231個の遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子であってよい。これらの遺伝子のヌクレオチド配列およびそれらによってコードされるアミノ酸配列は当技術分野で公知である。遺伝子のアクセッション番号については表1および表10を参照されたい。

10

【0054】

BRC関連遺伝子の発現を阻害または増強する作用因子の同定：

BRC関連遺伝子の発現またはその遺伝子産物の活性を阻害する作用因子は、BRCに関連して上方制御される遺伝子を発現する被験細胞集団を被験作用因子と接触させた後に、BRC関連遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性を決定することによって同定することができる。作用因子の存在下での、BRC関連遺伝子の発現レベルまたはその遺伝子産物の活性レベルが、被験作用因子の非存在下でのその発現または活性レベルと比較して低下していることにより、その作用因子がBRCに関連して上方制御される遺伝子の阻害因子であって、BRCを阻害するのに有用であることが示される。

20

【0055】

または、BRCに関連して下方制御される遺伝子の発現またはその遺伝子産物の活性を増強する作用因子は、BRCに関連して下方制御される遺伝子を発現する被験細胞集団を被験作用因子と接触させた後に、BRCに関連して下方制御される遺伝子の発現レベルまたは活性を決定することによって同定することができる。作用因子の存在下での、BRC関連遺伝子の発現レベルが、被験作用因子の非存在下でのその発現または活性レベルと比較して上昇していることにより、その作用因子がBRCに関連して上方制御される遺伝子の発現またはその遺伝子産物の活性を増大させることが示される。

【0056】

被験細胞集団は、BRC関連遺伝子を発現する任意の細胞であってもよい。例えば、被験細胞集団には、乳房組織由来の細胞などの上皮細胞が含まれうる。さらに、被験細胞は癌細胞由来の不死化細胞株であってもよい。または、被験細胞は、BRC関連遺伝子をトランスフェクトされた細胞、またはレポーター遺伝子と機能的に結合したBRC関連遺伝子由来の調節配列（例えば、プロモーター配列）をトランスフェクトされた細胞であってもよい。

30

【0057】

対象におけるBRCの治療有効性の評価

本明細書で同定された、差次的に発現されるBRC関連遺伝子は、BRCの治療の経過をモニターすることも可能にする。この方法では、BRCに対する治療を受けようとする対象から被験細胞集団を得る。必要に応じて、治療前、治療中、および/または治療後といった種々の時点で被験細胞集団を対象から入手する。続いて、細胞集団におけるBRC関連遺伝子の一つまたは複数の発現を決定し、BRCの状態が判明している細胞を含む参照細胞集団と比較する。本発明の文脈において、参照細胞は、関心対象の治療を受けていない必要がある。

40

【0058】

参照細胞集団がBRC細胞を含まない場合には、被験細胞集団および参照細胞集団におけるBRC関連遺伝子の発現に類似性があることにより、関心対象の治療が有効であることが示される。しかし、被験細胞集団および正常対照参照細胞集団においてBRC関連遺伝子の発現に差があれば、臨床的な成果または予後がそれほど好ましくないことが示される。同様に、参照細胞集団がBRC細胞を含む場合には、被験細胞集団および参照細胞集団におけるBRC

50

関連遺伝子の発現に差があることにより、関心対象の治療が有効であることが示されるが、被験集団および癌対照参照細胞集団におけるBRC関連遺伝子の発現に類似性があれば、臨床的な成果または予後がそれほど好ましくないことが示される。

【0059】

さらに、治療後に入手した対象由来の生物学的試料において決定された一つまたは複数のBRC関連遺伝子の発現レベル（すなわち、治療後レベル）を、治療開始前に入手した対象由来の生物学的試料において決定された一つまたは複数のBRC関連遺伝子の発現レベル（すなわち、治療前レベル）と比較することもできる。BRC関連遺伝子が上方制御される遺伝子である場合、治療後試料における発現レベルが低下していることによって関心対象の治療が有効であることが示され、一方、治療後試料における発現レベルが上昇しているまたは維持されていることにより、臨床的な成果または予後がそれほど好ましくないことが示される。反対に、BRC関連遺伝子が下方制御される遺伝子である場合、治療後試料における発現レベルが上昇していることによって関心対象の治療が有効であることが示され、一方、治療後試料における発現レベルが低下しているまたは維持されていることにより、臨床的な成果または予後がそれほど好ましくないことが示されうる。

10

【0060】

本明細書で用いる場合、「有効な」という用語は、治療が、対象における、病理学的に上方制御される遺伝子の発現低下、病理学的に下方制御される遺伝子の発現増大、または乳管癌の大きさ、波及度もしくは転移能の低下をもたらすことを指す。関心対象の治療が予防的に適用される場合、「有効な」という用語は、治療が乳房腫瘍の形成を遅延もしくは防止する、または臨床的なBRCの症状を遅延、予防、もしくは軽減することを示す。乳房腫瘍の評価は、標準的な臨床プロトコルを用いて行える。

20

【0061】

さらに、有効性を、BRCの診断または治療のための任意の既知の方法に付随して判定することもできる。例えば、BRCを、症候性の異常、例えば、体重減少、腹痛、背部痛、食欲不振、悪心、嘔吐、および全身倦怠感、衰弱、および黄疸を特定することによって診断することができる。

【0062】

特定の個体にとって適切なBRC治療用の治療物質の選択

個体における遺伝的構成の差によって、個体が様々な薬剤を代謝する相対的能力に差が起りうる。対象において代謝されて抗BRC物質として作用する物質は、対象の細胞において、癌性状態に特徴的な遺伝子発現パターンから非癌性状態に特徴的な遺伝子発現パターンへの変化を誘導することによって顕在化しうる。したがって、物質が対象において適したBRC阻害物質であるか否かを決定するために、本明細書に開示される発現差のあるBRC関連遺伝子によって、選択された対象由来の被験細胞集団において、治療効果があるまたは予防効果があると推定されるBRC阻害物質が適切かどうかを調べることができる。

30

【0063】

特定の対象にとって適切であるBRCの阻害物質を同定するために、対象からの被験細胞集団を治療剤に曝露して、表3～8に列挙されたBRC関連遺伝子の一つまたは複数の発現を決定する。

40

【0064】

本発明の方法における文脈では、被験細胞集団は、BRC関連遺伝子を発現するBRC細胞を含む。好ましくは、被験細胞は上皮細胞である。例えば、被験細胞集団を候補物質の存在下でインキュベートし、被験細胞集団の遺伝子発現パターンを測定して、一つまたは複数の参照プロファイル、例えばBRC参照発現プロファイルまたは非BRC参照発現プロファイルと比較することができる。

【0065】

BRCを含む参照細胞集団と比較して、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子の一つもしくは複数の発現が減少するか、または表4、6、および8に列挙されたBRC関連遺伝子の一つもしくは複数の発現が被験細胞集団において増加することは、物質に治療効果を発

50

揮する可能性があることを示している。

【0066】

本発明の文脈において、被験物質はいかなる化合物または組成物であってよい。被験物質の例には、限定されないが免疫調節剤が含まれる。

【0067】

治療剤を同定するためのスクリーニングアッセイ

本明細書に開示した、差次的に発現されるBRC関連遺伝子を、BRCを治療するための候補治療剤を同定するのに用いることもできる。本発明の方法は、候補治療剤が、BRC状態に特徴的な表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子のうち一つまたは複数の発現プロファイルを、非BRC状態に特徴的な遺伝子発現パターンへと変換させうるか否かを判定することを目的に、候補治療剤をスクリーニングすることを含む。

10

【0068】

本方法では、細胞を被験物質または複数の被験物質（逐次的にまたは組み合わせで）に対して曝露させ、細胞における表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子のうち一つまたは複数の発現を測定する。被験集団でアッセイしたBRC関連遺伝子の発現プロファイルを、被験物質に曝露されていない参照細胞集団における同じBRC関連遺伝子の発現レベルと比較する。

【0069】

低発現遺伝子の発現を刺激しうるか、または過剰発現される遺伝子の発現を抑制しうる物質は、臨床的に有益な可能性がある。このような物質はさらに、動物または被験対象における乳管癌増殖を防止する能力に関して試験することができる。

20

【0070】

さらなる態様において、本発明は、BRCの治療における標的となる可能性のある候補物質をスクリーニングするための方法を提供する。以上に詳述したように、マーカー遺伝子の発現レベルまたはそれらの遺伝子産物の活性を制御することにより、BRCの発症および進行を制御することができる。このため、BRCの治療における標的となる可能性のある候補物質を、このような発現レベルおよび活性を癌状態または非癌状態の指標として用いるスクリーニング方法によって同定することができる。本発明の文脈において、このようなスクリーニングは、例えば、以下の段階を含みうる：

- a) 被験化合物を、表3、4、5、6、7、または8に列挙された遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに接触させる段階；
- b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および
- c) ポリペプチドと結合する被験化合物を選択する段階。

30

【0071】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含みうる：

- a) 候補化合物を、表3、4、5、6、7、または8に列挙された遺伝子からなる群より選択される一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞に接触させる段階；および
- b) 表3、5、および7に列挙された遺伝子からなる群より選択される、一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させるか、または表4、6、および8に列挙された遺伝子からなる群より選択される、一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを上昇させる候補化合物を選択する段階。

40

マーカー遺伝子を発現する細胞には、例えば、BRCから樹立された細胞株が含まれる；このような細胞は本発明の上記のスクリーニングに用いることができる。

【0072】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含みうる：

- a) 被験化合物を、表3、4、5、6、7、または8に列挙された遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに接触させる段階；
- b) 段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および
- c) 被験化合物の非存在下で検出される生物学的活性と比較して、表3、5、および7に列挙された遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペ

50

チドの生物学的活性を抑制するか、または表4、6、および8に列挙された遺伝子からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの生物学的活性を高める化合物を選択する段階。

【0073】

本発明のスクリーニング方法に用いるためのタンパク質は、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列を用いて組換えタンパク質として得ることができる。マーカー遺伝子およびそれによってコードされるタンパク質に関する情報に基づき、当業者は、タンパク質の任意の生物学的活性をスクリーニングのための指標として選択し、選択した生物学的活性に関するアッセイのために適した任意の測定方法を選択することができる。

【0074】

または、本発明のスクリーニング方法は、以下の段階を含んでもよい：

- a) 候補化合物を、表3、4、5、6、7、または8に列挙された遺伝子からなる群より選択される一つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域とその転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入された細胞に接触させる段階；
- b) 該レポーター遺伝子の発現または活性を測定する段階；ならびに
- c) 該マーカー遺伝子が表3、5、および7に列挙された遺伝子からなる群より選択される、上方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現または活性を減少させるか、または該マーカー遺伝子が表4、6、および8に列挙された遺伝子からなる群より選択される、下方制御されるマーカー遺伝子である場合、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを高める、候補化合物を選択する段階。

【0075】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。本発明のスクリーニング方法に適したレポーター構築物は、マーカー遺伝子の転写調節領域を用いることによって調製しうる。マーカー遺伝子の転写調節領域が当業者に既知である場合には、その既知の配列情報を用いることによってレポーター構築物を調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域がまだ同定されていない場合には、転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントを、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいてゲノムライブラリーから単離することができる。

【0076】

スクリーニングによって単離された化合物は、マーカー遺伝子の発現またはマーカー遺伝子にコードされるタンパク質の活性を阻害し、かつ乳癌の治療または予防に適用することができる薬物の開発において候補となる。

【0077】

その上、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換されている化合物も同様に、本発明のスクリーニング法によって得ることができる化合物として含まれる。

【0078】

本発明の方法によって単離された化合物をヒト、ならびにマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジーのような他の哺乳類のための薬剤として投与する場合、単離された化合物を直接投与してもよく、または既知の薬学的調製法を用いて投与剤形に調製してもよい。例えば、必要に応じて、薬物は、糖衣錠、カプセル剤、エリキシル剤およびマイクロカプセルとして経口摂取されるか、または水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体との滅菌溶液もしくは懸濁液の注射剤形で非経口摂取されうる。例えば、化合物は、薬学的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩液、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、着香料、賦形剤、溶剤、保存剤、結合剤などと共に、一般的に許容される投薬実施に必要な単位投与剤形で混合することができる。これらの調製物に含まれる活性成分の量によって、指示範囲内の適した用量を得ることができる。

【0079】

錠剤およびカプセル剤に混合することができる添加剤の例には、以下に限定されないが

10

20

30

40

50

、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントゴム、およびアラビアゴムのような結合剤；結晶セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、ゼラチンおよびアルギン酸のような膨張剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ショ糖、乳糖、またはサッカリンのような甘味料；ならびにペパーミント、アカモノ油、およびチェリーのような着香料が含まれる。単位投与剤形がカプセル剤である場合、油のような液体担体を上記の成分にさらに含めることができる。注射用滅菌組成物は、注射用に適した蒸留水のような溶剤を用いて通常の投薬実施に従って調製することができる。

**【0080】**

生理食塩液、グルコース、ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムのような補助剤を含む他の等張液は、注射用水溶液として用いることができる。これらは、例えば、エタノールのようなアルコール；プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールのような多価アルコール；ポリソルベート80（商標）およびHCO-50のような非イオン性界面活性剤といった適した溶解剤と共に用いることができる。

10

**【0081】**

ゴマ油または大豆油を油脂性液体として用いることができ、安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールを溶解剤として共に用いてもよく、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液のような緩衝液；塩酸プロカインのような鎮痛剤；ベンジルアルコールおよびフェノールのような安定化剤；ならびに/または抗酸化剤と共に調製してもよい。調製された注射剤は適したアンプルに充填してもよい。

20

**【0082】**

当業者に周知の方法を用いて、本発明の薬学的組成物を患者に、例えば動脈内、静脈内、または経皮注射として投与してもよく、鼻腔内、気管支内、筋肉内、または経口投与として投与してもよい。投与の用量および方法は、患者の体重および年齢ならびに投与法に応じて変化する；しかし、当業者は、適した投与法を日常的に選択することができる。該化合物がDNAによってコードされうる場合、DNAを遺伝子治療のベクターに挿入して、治療を行うためにベクターを患者に投与することができる。投与の用量および方法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化するが、当業者はそれらを適切に選択することができる。

**【0083】**

例えば、本発明のタンパク質に結合してその活性を調節する化合物の用量は、症状に依存するが、用量は、正常な成人（体重60 kg）に経口投与する場合、一般に約0.1 mg～約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg～約50 mg/日、より好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

30

**【0084】**

正常な成人（体重60 kg）に化合物を注射剤形で非経口投与する場合、患者、標的臓器、症状および投与法によって多少の差があるが、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1～約20 mg/日、およびより好ましくは約0.1～約10 mg/日を静脈内注射することが都合がよい。他の動物の場合においては、慣行的に体重60 kgに換算して適切な用量を計算してもよい。

40

**【0085】**

乳癌の転移に対する治療薬を同定するためのスクリーニングアッセイ：

本発明は、乳癌の転移を治療または予防するための標的分子を提供する。本発明のBRC転移に関するスクリーニングアッセイは、上記のBRCに対する方法に従い、BRC転移との関連性のあるマーカー遺伝子を用いて行うことができる。

**【0086】**

本発明において、表11に列挙された遺伝子からなる群より選択されるマーカー遺伝子は、スクリーニングのために有用である。この表に示された34個の遺伝子はリンパ節転移と関連している。これらの遺伝子のうち、リンパ節陽性腫瘍において25個の遺伝子（+）は相対的に上方制御され、9個の遺伝子（-）は下方制御される（表11および図10）。本発明

50

によって得られた、上方制御される遺伝子のうち一つもしくは複数の発現またはそれらの遺伝子産物の活性を抑制する作用因子は、リンパ節転移を伴うBRCの治療または予防のために有用である。または、本発明によって得られた、一つもしくは複数の下方制御される遺伝子の発現またはそれらの遺伝子産物の活性を増強する作用因子も、リンパ節転移を伴うBRCの治療または予防のために有用である。

**【0087】**

本発明において、表11に列挙された遺伝子の発現レベルを調節する作用因子は、BRC関連遺伝子の発現を阻害または増強する作用因子の同定と同じ方法で同定することができる。または、それらの遺伝子産物の活性を調節する作用因子を、BRC関連遺伝子の産物を阻害または増強する作用因子の同定と同じ方法で同定することもできる。

10

**【0088】**

乳癌を有する対象の予後の評価

本発明はまた、BRCを有する対象の予後を評価する方法であって、被験細胞集団における一つまたは複数のBRC関連遺伝子の発現を、全疾患病期にわたる患者から得られた参照細胞集団における同じBRC関連遺伝子の発現と比較する段階を含む方法も提供する。被験細胞集団および参照細胞集団における一つもしくは複数のBRC関連遺伝子の遺伝子発現を比較することにより、または対象から得られた被験細胞集団の経時的な遺伝子発現のパターンを比較することにより、対象の予後を評価することができる。

**【0089】**

例えば、表3、5、および7に列挙されたような上方制御されるBRC関連遺伝子の一つもしくは複数の発現が正常対照と比較して上昇すること、または表4、6、および8に列挙されたような下方制御されるBRC遺伝子のうち一つもしくは複数の発現が正常対照と比較して低下することは、予後がそれほど好ましくないことを意味する。その反対に、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子のうちの一つまたは複数の発現が正常対照と比較して類似していることは、対象の予後が比較的好ましいことを意味する。好ましくは、対象の予後を、表3、4、5、6、7、および8に列挙された遺伝子からなる群より選択される遺伝子の発現プロファイルと比較することによって評価できる。発現プロファイルを比較するために分類スコア(CS)を用いることもできる。

20

**【0090】**

キット

本発明にはまた、BRC検出試薬、例えばBRC核酸の一部と相補的なオリゴヌクレオチド配列のような、一つもしくは複数のBRC核酸に特異的に結合するかもしくはそれを同定する核酸か、またはBRC核酸にコードされる一つもしくは複数のタンパク質に結合する抗体が含まれる。検出試薬は、キットの形で共に包装されていてもよい。例えば検出試薬、例えば核酸または抗体(固相マトリクスに結合させるか、またはそれらをマトリクスに結合させるための試薬とは別に包装される)、対照試薬(陽性および/または陰性)、ならびに/または検出標識は、異なる容器に包装されていてもよい。アッセイを行うための説明書(例えば、書面、テープ、VCR、CD-ROM等)がキットに含まれていてもよい。キットのアッセイフォーマットは、当技術分野でいずれも既知であるノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAであってもよい。

30

40

**【0091】**

例えば、BRC検出試薬は、少なくとも一つのBRC検出部位を形成するために多孔性ストリップのような固相マトリクスに固定することができる。多孔性ストリップの測定または検出領域には、それぞれに核酸を含む多数の部位が含まれてもよい。試験ストリップはまた、陰性および/または陽性対照のための部位を含んでもよい。または、対照部位は、試験ストリップとは異なるストリップに存在していてもよい。任意で、異なる検出部位は、異なる量の固定された核酸を含んでもよく、すなわち第一の検出部位はより多い量を含み、それに続く部位ではより少ない量を含んでもよい。被験試料を加えると、検出可能なシグナルを示す部位の数が、試料に存在するBRCの量の定量的指標を提供する。検出部位は、任意の適した検出可能な形状で構成されてもよく、典型的に試験ストリップの幅に及ぶバ

50

—またはドットの形状である。

【0092】

または、キットは、一つまたは複数の核酸を含む核酸基質アレイを含みうる。アレイ上の核酸は、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子によって示される一つまたは複数の核酸配列を特異的に同定する。表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子によって表される核酸の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、もしくは50個またはそれ以上の発現は、アレイ試験小片またはチップへの結合レベルによって同定されうる。基質アレイは、例えば固相基質上、例えば参照として本明細書にその内容全体が組み入れられる米国特許第5,744,305号に記載される「チップ」上に存在しうる。

【0093】

アレイと複数性

本発明にはまた、一つまたは複数の核酸を含む核酸基質アレイも含まれる。アレイ上の核酸は、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子によって示される一つまたは複数の核酸配列に特異的に対応する。表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子によって表される核酸の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、もしくは50個またはそれ以上の発現レベルは、アレイに結合する核酸を検出することによって同定されうる。

【0094】

本発明にはまた、単離された複数の核酸（すなわち、二つまたはそれ以上の核酸の混合物）が含まれる。核酸は、液相または固相に存在し、例えばニトロセルロースメンブレンのような固相支持体に固定されていてもよい。複数には、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子によって示される核酸の一つまたは複数が含まれる。様々な態様において、複数には、表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子によって表される核酸の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、もしくは50個またはそれ以上が含まれる。

【0095】

乳癌を阻害する方法

本発明はさらに、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子のうちの一つまたは複数の発現（またはその遺伝子産物の活性）を低下させるか、または表4、6、および8に列挙されたBRC関連遺伝子のうちの一つまたは複数の発現（またはその遺伝子産物の活性）を上昇させることにより、対象におけるBRCの症状を治療または軽減するための方法も提供する。適した治療用化合物を、BRCに罹患している対象またはBRC発症のリスク（もしくはそれに対する感受性）を有する対象に対して、予防的または治療的に投与することができる。このような対象は、標準的な臨床的方法を用いて、または表3~8に列挙されたBRC関連遺伝子のうちの一つまたは複数の異常な発現レベルもしくはその遺伝子産物の異常な活性を検出することにより、同定することができる。本発明の文脈において、適した治療薬には、例えば、細胞周期調節、細胞増殖、およびプロテインキナーゼ活性の阻害物質が含まれる。

【0096】

本発明の治療方法は、BRC細胞の由来である同じ種類の組織の正常細胞と比較して、BRC細胞において発現が低下している遺伝子（「下方制御される」または「低発現される」遺伝子）の一つまたは複数の遺伝子産物の発現、機能、またはその両方を増大させる段階を含む。これらの方法において、対象は、対象における低発現される（下方制御される）遺伝子のうち一つまたは複数の量を増加させる化合物の有効量によって治療される。投与は全身的でも局所的でもよい。適した治療用化合物には、低発現される遺伝子のポリペプチド産物、その生物活性断片、ならびに低発現される遺伝子をコードしBRC細胞における発現を可能にする発現制御エレメントを有する核酸；例えば、BRC細胞にとって内因性であるこのような遺伝子の発現レベルを増大させる作用因子（すなわち、低発現される一つまたは複数の遺伝子の発現を上方制御するもの）が含まれる。このような化合物の投与は、対象の乳房細胞における、異常に低発現される一つまたは複数の遺伝子の影響に対抗し、対象の臨床状態を改善する。

【0097】

10

20

30

40

50

または、本発明の治療方法は、乳房細胞において発現が異常に上昇している遺伝子（「上方制御される」または「過剰発現される」遺伝子）の一つまたは複数の遺伝子産物の発現、機能またはその両方を低下させる段階を含む。発現は、当技術分野で公知のいくつかのやり方のうち任意のものによって阻害させることができる。例えば、過剰発現される一つまたは複数の遺伝子の発現を阻害するまたはそれに拮抗する核酸を、例えば、過剰発現される一つまたは複数の遺伝子の発現を妨害するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAを、対象に投与することによって発現を阻害することができる。

**【0098】****アンチセンス核酸**

上記のように、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子のヌクレオチド配列に対応するアンチセンス核酸は、遺伝子の発現レベルを低下させるために用いることができる。乳癌において上方制御される、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子に対応するアンチセンス核酸は、乳癌の治療のために有用である。具体的には、本発明のアンチセンス核酸は、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子またはそれらに対応するmRNAと結合することによって作用し、それによって遺伝子の転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、および/または表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を阻害し、それらによってタンパク質の機能を阻害することができる。本明細書で用いる「アンチセンス核酸」という用語には、標的配列に対して完全に相補的なヌクレオチドと、アンチセンス核酸が標的配列と特異的にハイブリダイズするという条件付きで、一つまたは複数のヌクレオチドにミスマッチがあるヌクレオチドとの両方が含まれる。例えば、本発明のアンチセンス核酸には、少なくとも15個の連続したヌクレオチドの範囲にわたって少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは少なくとも80%またはそれ以上、より好ましくは少なくとも90%またはそれ以上、さらにより好ましくは少なくとも95%またはそれ以上の相同性を有するポリヌクレオチドが含まれる。相同性の決定には当技術分野で知られたアルゴリズムを用いる。

**【0099】**

本発明のアンチセンス核酸は、BRCに関連したマーカー遺伝子によってコードされるタンパク質を産生する細胞に対して、これらのタンパク質をコードするDNAまたはmRNAと結合することによって作用し、その転写または翻訳を阻害して、mRNAの分解を促進し、タンパク質の発現を阻害して、その結果タンパク質の機能を阻害する。

**【0100】**

本発明のアンチセンス核酸は、核酸に対して不活性の適切な基剤と混合することにより、リニメント剤または湿布剤などの外用製剤の形にすることができる。

**【0101】**

同じく、必要に応じて、賦形剤、等張剤、溶解補助剤、安定剤、保存料、鎮痛薬などを添加することにより、本発明のアンチセンス核酸を、錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻薬、および凍結乾燥製剤として製剤化することもできる。これらは既知の方法に従って調製可能である。

**【0102】**

本発明のアンチセンス核酸は、罹患部位に直接適用することにより、またはそれが罹患部位に到達するように血管内に注入することにより、患者に投与することができる。持続性および膜透過性を高めるためにアンチセンス封入用媒質を用いることもできる。その例には、リポソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチンまたはこれらの誘導体が非制限的に含まれる。

**【0103】**

本発明のアンチセンス核酸誘導体の投与量は、患者の状態に従って適切に調整でき、所望の量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは0.1~50mg/kgの範囲の用量を投与することができる。

**【0104】**

本発明のアンチセンス核酸は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、そのため、本発明

のタンパク質の生物学的活性を抑制するのに有用である。さらに、本発明のアンチセンス核酸を含む発現阻害物質も、本発明のタンパク質の生物学的活性を阻害しうるため、有用である。

#### 【0105】

本発明の方法は、細胞における、上方制御されるBRC関連遺伝子の発現、例えば、細胞の悪性転換に起因する上方制御を変化させるために用いることができる。標的細胞におけるsiRNAと表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子のいずれか1つに対応する転写物との結合は、細胞によるタンパク質産生の低下を引き起こす。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも10ヌクレオチドであり、天然の転写物程度の長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは19~25ヌクレオチド長である。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは75、50、25ヌクレオチド長未満である。

10

#### 【0106】

本発明のアンチセンス核酸には、修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。例えば、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ抵抗性を付与するためにチオエート化オリゴヌクレオチドを用いることもできる。

#### 【0107】

また、マーカー遺伝子に対するsiRNAを、マーカー遺伝子の発現レベルを低下させるために用いることもできる。本明細書において「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を妨げる二本鎖RNA分子を指す。細胞中のDNAがRNAが転写されて生じる鋳型であるものを含め、siRNAを細胞に導入するための標準的な手法を用いることができる。本発明の文脈において、siRNAは、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子等の上方制御されるマーカー遺伝子に対するセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、例えばヘアピンのように、単一の転写物が標的遺伝子由来のセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方を有するように構築される。

20

#### 【0108】

表3、5、および7に列挙されたようなBRC関連遺伝子のsiRNAは、標的mRNAとハイブリダイズし、正常な一本鎖mRNA転写物と会合することによって、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子によりコードされるポリペプチドの産生を低下または阻害し、それにより翻訳を妨げ、タンパク質の発現を妨げる。本発明の文脈において、siRNAは好ましくは、500、200、100、50、または25ヌクレオチド長未満である。より好ましくは、siRNAは19~25ヌクレオチド長である。TOPK siRNAの作製のための核酸配列の例には、標的配列としてのSEQ ID NO: 25、28、および31のヌクレオチドの配列が含まれる。siRNAの阻害活性を高める目的で、ヌクレオチド「u」を、標的配列のアンチセンス鎖の3'末端に付加することもできる。付加する「u」の数は、少なくとも2個、一般的には2~10個、好ましくは2~5個である。付加された「u」は、siRNAのアンチセンス鎖の3'末端に一本鎖を形成する。

30

#### 【0109】

表3、5、および7に列挙されたようなBRC関連遺伝子のsiRNAは、mRNA転写物と結合しうる形態で、細胞に直接導入することができる。または、siRNAをコードするDNAを、ベクター中にある状態で送達することもできる。

#### 【0110】

ベクターは、例えば、BRC関連遺伝子標的配列を、前記配列に隣接する機能的に結合した調節配列を有する発現ベクター中に、両方の鎖の発現が(DNA分子の転写によって)可能になるような様式でクローニングすることによって作製しうる( Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P. and Rossi, J. (2002) 「Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells.」 Nature Biotechnology 20: 500-505)。BRC関連遺伝子のmRNAに対するアンチセンスであるRNA分子を第1のプロモーター(例えば、クローニングされたDNAの3'側にあるプロモーター配列)によって転写させ、BRC関連遺伝子のmRNAに対するセンス鎖であるRNA分子を第2のプロモーター(例えば、クローニングされたDNAの5'側にあるプロモーター配列)によって転写させる。センス鎖およびアンチセンス鎖をインビボでハイブ

40

50

リダイズさせて、BRC関連遺伝子のサイレンシングのためのsiRNA構築物を生成させる。または、2つの構築物を利用して、siRNA構築物のセンス鎖およびアンチセンス鎖を作製することもできる。クローニングされたBRC関連遺伝子は、単一の転写物が標的遺伝子由来のセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方を有するような、ヘアピンなどの二次構造を有する構築物をコードすることができる。

#### 【0111】

ヘアピンループ構造を形成させる目的で、任意のヌクレオチド配列からなるループ配列をセンス配列とアンチセンス配列との間に配置することができる。したがって、本発明は、一般式5'-[A]-[B]-[A']-3'（式中、[A]は表3、5、または7から選択される遺伝子の配列に対応するリボヌクレオチド配列であり、[B]は3~23ヌクレオチドからなるリボヌクレオチド配列であり、[A']は[A]の相補配列からなるリボヌクレオチド配列である）を有するsiRNAも提供する。領域[A]は[A']とハイブリダイズし、すると領域[B]からなるループが形成される。ループ配列は好ましくは3~23ヌクレオチド長である。ループ配列は例えば、以下の配列からなる群より選択することができる（[http://www.ambion.com/techlib/tb/tb\\_506.html](http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)）。さらに、23ヌクレオチドからなるループ配列によって活性のあるsiRNAを得ることもできる（Jacque, J.-M., Triques, K. and Stevenson, M. (2002) 「Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.」 *Nature* 418: 435-438）。

10

CCC、CCACC、またはCCACACC: Jacque, J. M. Triques, K. and Stevenson, M. (2002) 「Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.」 *Nature*, Vol. 418: 435-438

20

UUCG: Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P. and Rossi, J. (2002) 「Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells.」 *Nature Biotechnology* 20: 500-505. Fruscoloni, P., Zamboni, M. and Tocchini-Valentini, G. P. (2003) 「Exonucleolytic degradation of double-stranded RNA by an activity in *Xenopus laevis* germinal vesicles.」 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(4): 1639-1644.

UUCAAGAGA: Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. and Sharp, P. A. (2002) 「Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression.」 *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 457-467.

30

#### 【0112】

したがって、ループ配列を、CCC、UUCG、CCACC、CCACACC、およびUUCAAGAGAからなる群より選択することができる。好ましいループ配列はUUCAAGAGA（DNAでは「ttcaagaga」）である。本発明の文脈における使用に適したヘアピンsiRNAの例には以下が含まれる。

TOPK-siRNAに対して:

gaacgauauaaagccagcc-[b]-ggcuggcuuuauaucguuc (SEQ ID NO: 25の標的配列に対して);

cuggaugaaucacaccaga-[b]-ucugguaucauccag (SEQ ID NO: 28の標的配列に対して);

guguggcuugcguaauaa-[b]-uuuuuacgcaagccacac (SEQ ID NO: 31の標的配列に対して)。

#### 【0113】

適切なsiRNAのヌクレオチド配列は、Ambionのウェブサイト（[http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)）から入手可能なsiRNA設計コンピュータープログラムを用いて設計することができる。コンピュータープログラムは、以下のプロトコールに基づいてsiRNA合成のためのヌクレオチド配列を選択する。

40

#### 【0114】

siRNA標的部位の選択

1. 対象となる転写物のAUG開始コドンから始めて、AAジヌクレオチド配列を求めて下流にスキャンする。有望なsiRNA標的部位として、各AAおよび3'隣接ヌクレオチド19個の出現を記録する。Tuschlらは、5'および3'非翻訳領域（UTR）および開始コドン近傍（75塩基以内）の領域が、調節タンパク質結合部位により富んでいる可能性があることから、これらに対してsiRNAを設計しないことを推奨している。UTR-結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨害しうる。

50

2. 有望な標的部点をヒトゲノムデータベースと比較して、他のコード配列と有意な相同性を有する如何なる標的配列も検討から除外する。相同性検索は、NCBIサーバー、www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/において認められうるBLASTを用いて行うことができる。

3. 合成のために適格な標的配列を選択する。アンピオンでは、好ましくは、評価すべき遺伝子の長さに沿っていくつかの標的配列を選択することができる。

#### 【0115】

BRC関連遺伝子配列に隣接する調節配列は同一でもよく、またはそれらの発現を独立的に、または時間的もしくは空間的に調節しうるように異なってもよい。siRNAは、BRC関連遺伝子鑄型のそれぞれを、例えば核内低分子RNA (snRNA) U6由来のRNA pol III転写単位またはヒトH1 RNAプロモーターを含むベクター中にクローニングすることにより、細胞内で転写される。ベクターを細胞に導入するために、トランスフェクション促進物質を用いることができる。FuGENE (Roche diagnostics)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen)、およびNucleofector (和光純薬工業)は、トランスフェクション促進物質として有用である。

10

#### 【0116】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは、本発明のポリペプチドの発現を阻害するので、本発明のポリペプチドの生物学的活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現阻害物質は、それらが本発明のポリペプチドの生物学的活性を阻害できるという点において有用である。したがって、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む組成物は、乳癌を治療するのに有用である。

20

#### 【0117】

抗体

または、BRCにおいて過剰発現された遺伝子の一つまたは複数の遺伝子産物の機能は、遺伝子産物に結合する化合物、さもなければ遺伝子産物の機能を阻害する化合物を投与することによって阻害されうる。例えば、化合物は、一つまたは複数の過剰発現された遺伝子産物に結合する抗体である。

#### 【0118】

本発明では、抗体、特に上方制御されたマーカー遺伝子にコードされるタンパク質に対する抗体、またはそのような抗体の断片の使用に言及する。本明細書において用いられるように、「抗体」という用語は、抗体を合成するために用いられる抗原(すなわち上方制御されたマーカー遺伝子の遺伝子産物)またはそれに近縁の抗原のみと相互作用する(すなわち結合する)、特異的構造を有する免疫グロブリン分子を指す。さらに、抗体は、それがマーカー遺伝子にコードされるタンパク質の一つまたは複数に結合する限り、抗体断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはHおよびL鎖からのFv断片が適当なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であってもよい(Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883 (1988))。より詳しく述べると、抗体断片は、抗体をパインまたはペプシンのような酵素によって処理することによって産生してもよい。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築して、発現ベクターに挿入し、適当な宿主細胞において発現させてもよい(例えば、Co M.S. et al., J. Immunol. 152: 2968-2976 (1994); Better M. and Horwitz A.H., Methods Enzymol. 178: 476-496 (1989); Pluckthun A. and Skerra A., Methods Enzymol. 178: 497-515 (1989); Lamoyi E., Methods Enzymol. 121: 652-663 (1986); Rousseaux J. et al., Methods Enzymol. 121: 663-669 (1986); Bird R.E. and Walker B.W., Trends Biotechnol. 9: 132-137 (1991)を参照されたい)。

30

40

#### 【0119】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)のような多様な分子に結合させることによって修飾してもよい。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で慣例的である。

50

## 【0120】

または、抗体には、ヒト以外の抗体に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域とを有するキメラ抗体、またはヒト以外の抗体に由来する相補性決定領域（CDR）、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域（FR）および定常領域を含むヒト化抗体が含まれる。そのような抗体は、既知の技術を用いて調製することができる。

## 【0121】

癌細胞において起こる特異的な分子変化に対する癌治療は、進行乳癌を治療するためのトラスツズマブ（ハーセプチン）、慢性骨髄性白血病のためのイマチニブメチレート（グリベック）、非小細胞肺癌（NSCLC）のためのゲフィチニブ（イレッサ）、ならびにB細胞リンパ腫およびマンツル細胞リンパ腫のためのリツキシマブ（抗CD20 mAb）のような抗癌剤の臨床開発および規制認可によって確認されている（Ciardiello F, Tortora G. 「A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor.」 Clin Cancer Res. 2001 Oct; 7(10): 2958-70. Review.; Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. 「Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.」 N Engl J Med. 2001 Mar 15; 344(11): 783-92.; Rehwald U, Schulz H, Reiser M, Sieber M, Staak JO, Morschhauser F, Driessen C, Rudiger T, Muller-Hermelink K, Diehl V, Engert A. 「Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group.」 Blood. 2003 Jan 15; 101(2): 420-424.; Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S and Bhalla KN. (2000). Blood, 96, 2246-2253)。これらの薬物は、形質転換した細胞のみを標的とすることから、臨床的に有効であり、従来の抗癌剤より許容性が良好である。したがって、そのような薬物は、癌患者の生存および生活の質を改善するのみならず、分子標的癌治療の考え方が正当であることを証明している。さらに、標的薬物は、標準的な化学療法と併用して用いた場合に、その有効性を増強することができる（Gianni, L. (2002), Oncology 63 suppl 1, 47-56; Klejman A., Rushen L., Morrione A., Slupianek A and Skorski T. (2002), Oncogene 21: 5868-5876)。したがって、将来の癌治療はおそらく、従来の薬物を血管新生および浸潤性のような腫瘍細胞の異なる特徴をねらった標的特異的薬物と併用することを含むであろう。

## 【0122】

これらの調節方法は、エクスピボもしくはインピトロで行うこともでき（例えば、細胞を物質とともに培養することにより）、またはインピボで行うこともできる（例えば、物質を対象に投与することにより）。本方法は、タンパク質もしくはタンパク質の組み合わせ、または核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせを、差次的に発現される遺伝子の異常な発現またはそれらの遺伝子産物の異常な活性を相殺する治療法として投与することを含む。

## 【0123】

遺伝子および遺伝子産物のそれぞれ発現レベルまたは生物学的活性が（疾患または障害に罹患していない対象と比較して）上昇していることによって特徴づけられる疾患および障害は、過剰発現される一つまたは複数の遺伝子の活性に拮抗する（すなわち、それを低下させるまたは阻害する）治療薬によって治療される可能性がある。活性に拮抗する治療薬は、治療的または予防的に投与することができる。

## 【0124】

したがって、本発明の文脈において利用しうる治療薬には、例えば以下のものが含まれる：（i）過剰発現または低発現される一つまたは複数の遺伝子のポリペプチド、またはその類似体、誘導体、断片もしくは相同体；（ii）過剰発現される遺伝子または遺伝子産物に対する抗体；（iii）過剰発現または低発現される一つまたは複数の遺伝子をコードする核酸；（iv）アンチセンス核酸、または「機能欠損」である核酸（すなわち、一つま

たは複数の過剰発現される遺伝子の核酸内部への非相同的挿入のため) ; (v) 低分子干渉RNA (siRNA) ; または (vi) 調節物質 (すなわち、阻害物質、過剰発現または低発現されるポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させるアゴニストおよびアンタゴニスト)。機能欠損アンチセンス分子は、相同組換えによってポリペプチドの内因性機能を「ノックアウト」するために用いられる (例えば、Capecchi, Science 244: 1288-1292 1989を参照)。

#### 【0125】

生物学的活性の低下 (疾患または障害に罹患していない対象と比較して) によって特徴づけられる疾患および障害は、活性を上昇させる (すなわち、それに対するアゴニストである) 治療薬によって治療してもよい。活性を上方制御する治療薬は、治療的または予防的に投与することができる。用いる治療薬は、ポリペプチド (またはその類似体、誘導体、断片もしくはホモログ)、または生物学的利用能を高めるアゴニストを含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0126】

レベルの上昇または低下は、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、患者の組織試料を得て (例えば、生検組織から)、これをRNAまたはペプチドレベル、発現されたペプチドの構造および/または活性 (またはその発現が変化している遺伝子のmRNA) に関してインビトロでアッセイすることによって、容易に検出することができる。当技術分野において周知である方法には、イムノアッセイ (例えば、ウェスタンブロット解析、免疫沈降後のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学等)、および/またはmRNAの発現を検出するハイブリダイゼーションアッセイ (例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、インサイチューハイブリダイゼーション等) が含まれるがこれらに限定されない。

20

#### 【0127】

予防的投与は、疾患もしくは障害が予防されるように、またはその進行が遅れるように、疾患の明白な臨床症状が発現する前に行われる。

#### 【0128】

本発明の治療方法は、細胞を、差次的に発現される遺伝子の遺伝子産物の活性のうち一つまたは複数調節する作用因子と接触させる段階を含んでもよい。タンパク質活性を調節する作用因子の例には、核酸、タンパク質、このようなタンパク質の天然の同族リガンド、ペプチド、ペプチド模倣物およびその他の低分子が含まれるが、これらに限定されない。例えば、適した作用因子は、差次的に低発現される一つまたは複数の遺伝子の一つまたは複数のタンパク質活性を賦活化しうる。

30

#### 【0129】

乳癌に対するワクチン接種

本発明はまた、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子 (すなわち、上方制御される遺伝子) からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象における乳癌を治療または予防する方法にも関する。ポリペプチドの投与は、対象において抗腫瘍免疫を誘導する。抗腫瘍免疫を誘導するために、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの免疫学的活性断片、または該ポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを、治療または予防が必要な患者に投与する。さらに、表5および7に列挙されたBRC関連遺伝子からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチドは、乳癌およびIDCの浸潤に対してそれぞれ抗腫瘍免疫を誘導しうる。ポリペプチドまたはその免疫学的活性断片はBRCに対するワクチンとして有用である。場合によっては、タンパク質またはその断片は、T細胞受容体 (TCR) に結合した形で投与してもよく、またはマクロファージ、樹状細胞 (DC)、もしくはB-細胞のような抗原提示細胞 (APC) によって提示された形で投与してもよい。DCの強い抗原提示能のため、APCの中では、DCを用いることが最も好ましい。

40

50

## 【0130】

本発明において、BRCに対するワクチンとは、動物に接種すると抗腫瘍免疫を誘導する能力を有する物質を指す。本発明によると、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子にコードされるポリペプチドまたはその断片は、表3、5、および7に列挙されたBRC関連遺伝子を発現するBRC細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導する可能性があるHLA-A24またはHLA-A\*0201拘束性エピトープであることが示唆された。このように、本発明はまた、ポリペプチドを用いて抗腫瘍免疫を誘導する方法も含む。一般的に、抗腫瘍免疫には、以下のような免疫応答が含まれる：

- 腫瘍に対する細胞障害性リンパ球の誘導、
- 腫瘍を認識する抗体の誘導、および
- 抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

10

## 【0131】

したがって、あるタンパク質が、動物への接種時にこれらの免疫応答のいずれか一つを誘導する場合、そのタンパク質は、抗腫瘍免疫誘導効果を有すると決定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、宿主におけるタンパク質に対する免疫系の反応をインビボまたはインビトロで観察することによって検出することができる。

## 【0132】

例えば、細胞障害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。特に、生体内に入る外来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によってT細胞およびB細胞に提示される。APCによって提示された抗原に対して抗原特異的に応答するT細胞は、抗原による刺激によって細胞障害性T細胞（または細胞障害性Tリンパ球；CTL）に分化した後増殖する（これはT細胞の活性化と呼ばれる）。したがって、あるペプチドによるCTL誘導は、APCによるT細胞へのペプチドの提示およびCTLの誘導を検出することによって評価することができる。さらに、APCは、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化する効果を有する。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞も同様に抗腫瘍免疫において重要であることから、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用は、これらの細胞の活性化効果を指標として用いて評価することができる。

20

## 【0133】

APCとして樹状細胞（DC）を用いてCTLの誘導作用を評価する方法は、当技術分野で周知である。DCは、APCの中でも最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、被験ポリペプチドをまずDCに接触させて、このDCをT細胞に接触させる。DCに接触させた後に、対象細胞に対して細胞障害作用を有するT細胞が検出されれば、被験ポリペプチドが細胞障害性T細胞の誘導活性を有することを示している。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば<sup>51</sup>Cr標識腫瘍細胞の溶解を指標として用いて検出することができる。または、<sup>3</sup>H-チミジン取り込み活性またはLDH（乳糖デヒドロゲナーゼ）放出を指標として用いて腫瘍細胞の損傷の程度を評価する方法も同様に周知である。

30

## 【0134】

DCとは別に、末梢血単核球（PBMC）も同様にAPCとして用いてもよい。CTLの誘導は、GM-CSFおよびIL-4の存在下でPBMCを培養することによって増強されることが報告されている。同様に、CTLは、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびIL-7の存在下でPBMCを培養することによって誘導されることが示されている。

40

## 【0135】

これらの方法によってCTL誘導活性を有することが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化効果およびその後のCTL誘導活性を有するポリペプチドであると見なされる。したがって、腫瘍細胞に対してCTLを誘導するポリペプチドは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドに接触させることによって腫瘍に対するCTLの誘導能を獲得したAPCは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示により細胞障害性を獲得したCTLも同様に、腫瘍に対するワクチンとして用いることができる。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を用いるそのような腫瘍の治療法は、細胞免疫療法と呼ばれる。

50

## 【0136】

一般的に、細胞免疫療法のためにポリペプチドを用いる場合、CTL誘導効率は、異なる構造を有する複数のポリペプチドを組み合わせ、それらをDCに接触させることによって増加することが知られている。したがって、DCをタンパク質断片によって刺激する場合、複数のタイプの断片の混合物を用いることが有利である。

## 【0137】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することによって確認することができる。例えば、ポリペプチドに対する抗体が、そのポリペプチドで免疫した実験動物において誘導される場合、そして腫瘍細胞の増殖がそれらの抗体によって抑制される場合、ポリペプチドは、抗腫瘍免疫の誘導能を有すると見なすことができる。

10

## 【0138】

抗腫瘍免疫は本発明のワクチンを投与することによって誘導され、抗腫瘍免疫の誘導によって、BRCを治療および予防することができる。癌の治療または癌の発症の予防には、癌性細胞の増殖の阻害、癌の退縮、および癌の発生抑制のような段階のいずれかが含まれる。癌を有する個体の死亡率および疾病率の低下、血液中の腫瘍マーカーのレベルの減少、癌に伴う検出可能な症状の軽減等も同様に、癌の治療または予防に含まれる。そのような治療および予防効果は好ましくは統計学的に有意である。例えば、細胞増殖疾患に対するワクチンの治療または予防効果を、ワクチン投与を行わない対照と比較する観察において、5%またはそれ未満は有意水準である。例えば、スチューデントのt-検定、マン-ホイットニーのU検定、またはANOVAを統計解析に用いてもよい。

20

## 【0139】

免疫学的活性を有する上記のタンパク質またはそのタンパク質をコードするベクターをアジュバントと併用してもよい。アジュバントは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続して）投与した場合にタンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバン等が含まれるがこれらに限定されない。さらに、本発明のワクチンは、薬学的に許容される担体と適当に組み合わせてもよい。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩液、リン酸緩衝液、培養液等が含まれる。さらに、ワクチンは必要に応じて、安定化剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤等を含んでもよい。ワクチンは、全身または局所投与されうる。ワクチン投与は、1

30

## 【0140】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを用いる場合、腫瘍を例えばエキスピボ法によって治療または予防することができる。より詳しく述べると、治療または予防を受ける対象のPBMCを採取して、細胞をエキスピボでポリペプチドに接触させて、APCまたはCTLの誘導後、細胞を対象に投与してもよい。APCはまた、ポリペプチドをコードするベクターをエキスピボでPBMCに導入することによって誘導することができる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは、投与前にクローニングすることができる。標的細胞を障害する高い活性を有する細胞をクローニングして増殖させることによって、細胞免疫療法をより効率よく行うことができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLを用いて、細胞が由来する個体に対してのみならず、他の個体由来の類似のタイプの腫瘍に対する細胞免疫療法のために用いてもよい。

40

## 【0141】

さらに、本発明のポリペプチドの薬学的有効量を含む、癌のような細胞増殖疾患を治療または予防するための薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、抗腫瘍免疫を惹起するために用いてもよい。

## 【0142】

BRCまたは悪性BRCを阻害するための薬学的組成物

本発明の文脈において、適切な薬学的製剤には、経口、直腸内、鼻腔内、局所（口腔内および舌下を含む）、腔内、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内を含む）投与

50

に適した製剤、または吸入もしくは吹入による投与に適した製剤が含まれる。好ましくは、投与は静脈内である。製剤は任意で用量単位ごとに個別に包装される。

【0143】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれが活性成分の規定量を含むカプセル剤、カシエ剤、または錠剤が含まれる。適切な製剤にはまた、粉剤、顆粒剤、溶液、懸濁液、および乳液が含まれる。活性成分は、任意でポラス舐剤またはペーストとして投与される。経口投与用の錠剤およびカプセル剤は、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、および/または湿潤剤のような通常の賦形剤を含んでもよい。錠剤は、任意で一つまたは複数の製剤成分との圧縮または成形によって作製してもよい。圧縮錠は、粉剤または顆粒剤のような流動状の活性成分を、任意で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤、および/または分散剤と混合して、適した装置において圧縮することによって調製してもよい。成形錠剤は、不活性液体希釈剤によって湿らせた粉末化合物の混合物に適した機械において成形することによって作製してもよい。錠剤は、当技術分野で周知の方法に従ってコーティングしてもよい。経口液体調製物は、例えば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳液、シロップ剤、もしくはエリキシル剤の形であってもよく、または使用前に水もしくは他の適した溶剤によって構成するための乾燥製品として提供してもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤、非水性溶剤（食用油が含まれてもよい）、および/または保存剤のような通常の添加剤を含んでもよい。錠剤は任意で、活性成分の徐放または制御放出を提供するように調製してもよい。錠剤の包装は、毎月服用される錠剤1錠を含んでもよい。

10

20

【0144】

非経口投与用の適切な製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、制菌剤および対象とするレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含んでもよい水性および非水性滅菌注射剤、ならびに懸濁剤および/または濃化剤を含む水性および非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または複数回用量で容器、例えば密封アンプルおよびバイアルに入れてもよく、滅菌液体担体、例えば生理食塩液、注射用水を使用直前に加えるだけでよい凍結乾燥状態で保存してもよい。または、製剤は、連続注入用であってもよい。即時調合注射溶液および懸濁液は、既に記述した種類の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製してもよい。

【0145】

直腸投与用の適切な製剤には、カカオバターまたはポリエチレングリコールのような標準的な担体を含む坐剤が含まれる。口内への、例えば口腔内または舌下への局所投与用の適切な製剤には、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントのような着香基剤に活性成分を含むトローチ剤、ならびにゼラチンとグリセリンまたはショ糖とアカシアのような基剤に活性成分を含む香錠が含まれる。鼻腔内投与の場合、本発明の化合物を液体スプレー、もしくは分散性の粉末として、または点鼻剤の形態で用いてもよい。点鼻剤は、一つまたは複数の分散剤、溶解剤、および/または懸濁剤も含む水性または非水性基剤によって調製してもよい。

30

【0146】

吸入による投与の場合、吸入器、ネブライザー、加圧パックまたはエアロゾルスプレーを送達するための他の都合のよい手段によって化合物を都合よく送達することができる。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適したガスのような適した噴射剤を含んでもよい。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、一定量を送達するための弁を提供することによって決定してもよい。

40

【0147】

または、吸入または吹入による投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合物と、乳糖またはデンプンのような適した粉末基剤との粉末混合物の形状をとってもよい。粉末組成物は、単位投与剤形、例えば、粉末が吸入器または吹入器を利用して投与されるカプセル剤、カートリッジ、ゼラチンまたはプリスターパックの形としてもよい。

【0148】

50

他の製剤には、治療剤を放出する埋め込み可能装置および接着パッチが含まれる。

【0149】

望ましければ、活性成分を持続的に放出するように適合された上記の製剤を用いてもよい。薬学的組成物はまた、抗菌剤、免疫抑制剤、および/または保存剤のような他の活性成分を含んでもよい。

【0150】

上記で特に言及した成分の他に、本発明の製剤には、当該製剤のタイプに関して当技術分野において通常の他の物質が含まれていてもよいと理解すべきである。例えば経口投与に適した製剤は着香料を含んでもよい。

【0151】

好ましい単位投与製剤は、下記に引用するように、活性成分またはその適当な分画の有効量を含む。

【0152】

上記の条件のそれぞれに関して、組成物、例えばポリペプチドおよび有機化合物は、約0.1~約250 mg/kg/日の用量範囲で経口または注射によって投与されうる。成人ヒトの用量範囲は一般的に、約5 mg~約17.5 g/日、好ましくは約5 mg~約10 g/日、および最も好ましくは約100 mg~約3 g/日である。錠剤または個別の単位で提供される他の単位投与剤形は、便宜上、同一単位量を複数回投与した量で有効性を示すような単位量、例えば約5 mg~約500 mg、通常約100 mg~約500 mgを含みうる。

【0153】

用いられる用量は、対象の年齢および性別、治療しようとする詳細な障害およびその重症度を含む、さまざまな要因に依存すると考えられる。また、投与の経路も状態およびその重症度に依存して変化しうる。いずれにしても、適切で最適な投与量は、当業者により、上述した要因を考慮した上で慣行的に計算されうる。

【0154】

本発明のいくつかの局面を以下の実施例に記載しているが、これらは、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定するものではない。以下の実施例は、BRC細胞において差次的に発現される遺伝子の同定および特性決定を例示的に説明したものである。

【0155】

実施例

疾病状態、例えば、BRCにおいて差次的に発現される遺伝子を同定するために、罹患組織（例えば、BRC由来の上皮細胞）および正常組織から入手した組織を評価した。アッセイは以下の通りに行った。

【0156】

患者および組織試料

癌研究会附属病院乳腺外科部門（Department of Breast Surgery, Cancer Institute Hospital、東京、日本）で治療を受けた81例の患者（非浸潤性乳管癌12例および浸潤性乳管癌69例、2cm~5cm（T2）、年齢の中央値45歳、21~68歳の範囲）から、インフォームドコンセントを伴って原発性乳癌を入手し（表12）、このことに関しては全ての患者からインフォームドコンセントを得た。臨床情報を診療記録から入手し、かつそれぞれの腫瘍を病理学者が病理組織学的なサブタイプおよびグレードに従って診断した。腫瘍組織を用いて腫瘍の種類を評価した（世界保健機構（World Health Organization）の分類および日本癌学会の分類による）。臨床病期はJBCSのTNM分類に従って判断した。リンパ節陽性症例とリンパ節陰性症例との間に有意差は観察されなかった。血管侵入性増殖および広範囲にわたるリンパ球浸潤の存在は病理学者が判定した。エストロゲン受容体（ER）およびプロゲステロン受容体（PgR）の発現はEIAにより判定した（13fmol/mgタンパク質未満であればER陰性、BML）。閉経前乳癌患者15例または閉経後患者12例からの正常乳管細胞の混合物をそれぞれ正常対照として用いた。試料はすべて直ちに凍結し、-80 で保存した。

【0157】

組織試料およびLMM

腫瘍に関する臨床情報および病理学的情報は表12に詳述されている。試料はTissueTek OCT媒質 (Sakura) 中に包埋した後に使用時まで-80 で保存した。凍結標本をクリオスタットで連続的に切片化して8 $\mu$ mの切片とし、分析する領域を規定するためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。癌細胞と非癌細胞の交差汚染を避けるために、EZ Cut LMM System (SL Microtest GmbH) を製造元のプロトコールにいくつかの修正を加えて用いることによって、これら2つの集団を調製した。貯蔵工程および組織採取の間の影響を最小化するために、癌組織を同じ手順によって慎重に取り扱った。RNAの質を調べるために、各症例の残りの組織から抽出した全RNAを変性アガロースゲル中で電気泳動し、リボソームRNAバンドの存在によってそれらの質を確認した。

#### 【0158】

##### RNA抽出およびT7に基づくRNA増幅

レーザーで捕捉した細胞の各集団から、全RNAを350 $\mu$ lのRLT可溶化バッファー (QIAGEN) 中に抽出した。抽出したRNAを、30単位のDNase I (QIAGEN) により室温で30分間処理した。70 において10分間失活させた後に、製造元の推奨に従ってRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い、RNAを精製した。DNase Iで処理したRNAすべてを、Ampliscribe T7転写キット (Epicentre Technologies) を用いた、T7に基づく増幅に供した。2回の増幅により、各試料に関して28.8~329.4 $\mu$ gの増幅RNA (aRNA) が得られ、一方、15例の閉経前患者または12例の閉経後患者からの正常試料からのRNAを増幅した場合には、それぞれ合計2240.2 $\mu$ gおよび2023.8 $\mu$ gが得られた。それぞれの癌性乳管細胞および非癌性乳管細胞からのaRNAの2.5 $\mu$ gアリコート、それぞれCy5-dCTPおよびCy3-dCTP (Amersham Biosciences) の存在下で逆転写させた。

#### 【0159】

##### cDNAマイクロアレイ

National Center for Biotechnology Information (NCBI) のUniGeneデータベース (ビルド番号131) から選択した23,040種のcDNAを含む「ゲノムワイド」cDNAマイクロアレイシステムを確立した。cDNAマイクロアレイスライドの製作については別稿に記載されている (Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Katagiri T and Nakamura Y. 「Identification by cDNA Microarray of Genes Involved in Ovarian Carcinogenesis.」 *Cancer Res.*, 60, 5007-11, 2000)。手短かに述べると、種々のヒト臓器から単離したポリ(A)+RNAを鋳型として用いる逆転写PCRによってcDNAを増幅した ; アンプリコンの長さは反復配列またはポリ(A)配列を含まずに200~1100bpの範囲とした。Lucidea Array Spotter (Amersham Biosciences) を用いて、PCR産物を7型スライドガラス (Amersham Bioscience) 上に2箇所ずつスポットした ; 4,608種または9,216種の遺伝子を単一のスライド上に2箇所ずつスポットした。それぞれ同じ52種類のハウスキーピング遺伝子および2種類の陰性対照遺伝子もスポットした、3種類の異なるスライドのセット (合計23,040種の遺伝子) を調製した。

#### 【0160】

##### ハイブリダイゼーションおよびデータの収集

ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、すべての工程をAutomated Slide Processor (Amersham Biosciences) により行った点を除き、以前に記載されたプロトコールに従って行った (Giuliani, N. et al., V. 「Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease.」 *Blood*, 100: 4615-4621, 2002)。各ハイブリダイゼーションシグナルの強度を、ArrayVisionコンピュータプログラム (Amersham Biosciences) により測定光度を算出し、バックグラウンド強度を差し引いた。52種のハウスキーピング遺伝子からの平均化シグナルを用いて、平均Cy5/Cy3比が得られるように、各標的スポットに対するCy5 (腫瘍) およびCy3 (対照) の蛍光強度を調整した。低いシグナル強度から得られるデータの信頼性は低いため、各スライド上のシグナル強度に対してカットオフ値を設定し、Cy3色素およびCy5色素の両方でカットオフ値よりも低いシグナル強度が得られた場合には、遺伝子をさらなる分析から除外した。各発現レベルに関するカット

10

20

30

40

50

オフ値は、バックグラウンド変動に従って自動的に計算された。Cy5およびCy3のシグナル強度がいずれもカットオフ値より低い場合には、その試料において対応する遺伝子の発現は存在しないとして評価した。Cy5/Cy3比は相対的な発現比として算出した。他の遺伝子に関しては、各試料の生データを用いてCy5/Cy3比を算出した。

#### 【0161】

23,040個のスポットからのCy3およびCy5のシグナル強度を定量し、ArrayVisionソフトウェア (Imaging Research, Inc., St. Catharines, Ontario, Canada) を用いて、バックグラウンドを差し引くことによって解析した。続いて、各標的スポットに関するCy5 (腫瘍) およびCy3 (対照) の蛍光強度を、アレイ上の52個のハウスキーピング遺伝子の平均Cy3/Cy5比が1と等しくなるように調整した。低いシグナル強度から得られるデータの信頼性は低いため、各スライド上でカットオフ値を以前に記載されたように設定し (Ono K., et al., Identification by cDNA Microarray of Genes Involved in Ovarian Carcinogenesis. *Cancer Res.*, 60, 5007-11, 2000)、Cy3色素およびCy5色素の両方でカットオフ値よりも低いシグナル強度が得られた場合には、それらの遺伝子をさらなる分析から除外した (Saito-Hisaminato, A., Katagiri, T., Kakiuchi, S., Nakamura, T., Tsunoda, T. and Nakamura, Y. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNA Res.*, 9: 35-45, 2002)。他の遺伝子に関しては、各試料の生データを用いてCy5/Cy3比を算出した。

10

#### 【0162】

##### 混入率の算出：

cDNAマイクロアレイを用いた29個の正常ヒト組織における遺伝子発現プロファイルによると、ペリリピン (PLIN) および脂肪酸結合タンパク質4 (FABP4) は脂肪組織および乳腺組織でのみ発現された (Saito-Hisaminato, A. et al., Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNA Res.*, 9: 35-45, 2002)。これらを、マイクロダイセクションされた正常乳管上皮細胞の集団に存在する脂肪細胞の割合の評価に用いた。正常全乳腺 (Clontech) から単離されたポリA+RNA、およびマイクロダイセクションされた正常乳管上皮細胞のそれぞれのaRNAを、それぞれCy5-dCTPおよびCy3-dCTPの存在下で逆転写させた。マイクロアレイスライド上でのハイブリダイゼーションの後に、Cy5/Cy3比を算出した。それぞれの比の平均を、閉経前患者および閉経後患者における乳腺組織およびマイクロダイセクションされた正常乳管細胞を用いた結果によって決定した。

20

30

#### 【0163】

##### 遺伝子発現プロファイルによる、81例の乳癌を伴う102例の試料のクラスター分析：

遺伝子および腫瘍の両方に対して教師なし階層クラスタリングの方法を適用した。102例の試料の分類に関して再現性のあるクラスターを得るために、実験の80%で有効データが得られていて、その発現比が1.1を上回る標準偏差で変化した710個の遺伝子を選択した。分析は、M. Eisenが作成した、ウェブ上で入手可能なソフトウェア (「Cluster」および「TreeView」) (<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD/restech.html>) を用いて行った。クラスタリングアルゴリズムを適用する前に、各スポットに関する蛍光比を対数変換し、続いて実験的偏りを除くために各試料に関してデータの中央値のセンタリングを行った上で平均連結法を用いた。

40

#### 【0164】

##### DCISとIDCとの間で上方制御または下方制御される遺伝子の同定：

各遺伝子の相対的発現比 (Cy5/Cy3強度比) を、4つのカテゴリーのいずれかに分類した：(A) 上方制御される (発現比 > 2.0)；(B) 下方制御される (発現比 < 0.5)；(C) 変化なし (発現比が0.5~2.0の間)；および (D) 発現されず (またはわずかな発現はあるが検出のカットオフレベル未満)。これらのカテゴリーを用いて、試料間での発現比の変化が共通している遺伝子のセットを検出した。各群において通常上方制御または下方制御される候補遺伝子を検出するために、23,040個の遺伝子の全体的な発現パターンをまずスクリーニングして、分類された群の50%超に存在し、発現比が > 3.0または < 1/3である

50

遺伝子を選択した。

【0165】

半定量的RT-PCR：

上方制御される5つの遺伝子を選択し、半定量的RT-PCR実験を適用することによってそれらの発現レベルを調べた。各試料からのaRNAの1μgのアリコート、ランダムプライマー (Taniguchi, K., et al., Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1 and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21: 4863-4871, 2002) およびSuperscript II (Life Technologies, Inc.) を用いて一本鎖cDNAへと逆転写した。各cDNA混合物を、表9に示したプライマーセットを用いるPCR増幅を次に行うために希釈した。GAPDHの発現を内部対照として用いた。PCR反応は、産物強度が直線的増幅期に確実にあるようにサイクル数に関して最適化した。

10

【0166】

乳癌における組織病理学的状態、ER状態、およびリンパ節転移の原因となる遺伝子の同定：

識別性のある遺伝子を、以下の2つの基準を用いて選択した：(1)シグナル強度が、症例の少なくとも70% (ER状態) または50% (組織病理学的状態およびリンパ節転移) でカットオフレベルを上回る；(2)症例の $|Med_r - Med_n|$ が1を上回る (ER状態) または0.5を上回る (組織病理学的状態およびリンパ節転移) (ここでMedは、リンパ節陽性症例または陰性症例における対数変換された相対的発現比から得られた中央値である)。次に、ランダム順列検定を、一方の群 (A群) ともう一方の群 (B群) との間で差次的に発現される遺伝子を同定するために適用した。平均 ( $\mu$ ) および標準 ( $\sigma$ ) 偏差を、A群 ( $r$ ) およびB群 ( $n$ ) の症例における各遺伝子の対数変換された相対的発現比から算出した。各遺伝子に関する識別スコア (DS) は以下の通りに定義した：

20

$$DS = (\mu_r - \mu_n) / (\sigma_r + \sigma_n)$$

順列検定は、個々の遺伝子がA群とB群とを識別する能力を評価する目的で行い；2つのクラス間での試料のランダムな並び替えを10,000回行った。各遺伝子のDSデータセットは正規分布を示したため、ユーザー定義によるグループ分けに関してP値を算出した (Golub, T. et al., Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537, 1999)。

30

【0167】

リンパ節転移に関する予測スコアの算出：

予測スコアを、以前に記載された手順に従って算出した (Golub, T. et al., Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537, 1999)。各遺伝子 ( $g_i$ ) は、試料における発現レベル ( $x_i$ ) が参照試料におけるリンパ節陰性または陽性のいずれの平均発現レベルに近いかに応じて、リンパ節陰性またはリンパ節陽性のいずれかに票を投じる。得票の多さ ( $v_i$ ) は、試料における発現レベルの、2つのクラスの平均からの偏差を反映する：

$$V_i = |x_i - (\mu_r + \mu_n) / 2|$$

【0168】

得票を合計して、リンパ節陰性 ( $V_r$ ) およびリンパ節陽性 ( $V_n$ ) に関する総得票を得た上で、PS値を以下の通りに算出する：

40

$PS = (V_r - V_n) / (V_r + V_n) \times 100$ 、これはリンパ節陰性またはリンパ節陽性のいずれかの方向への優位度を反映している。PS値は-100~100の範囲にあり；PSの絶対値が高いほど、強力な予測であることを示す。

【0169】

分類の評価およびLeave-One-Out検定：

分類スコア (CS) を、各遺伝子セットにおけるリンパ節陰性 ( $PS_r$ ) およびリンパ節陽性 ( $PS_n$ ) の予測スコアから、以下の通りに算出した。：

$$CS = (\mu_{PS_r} - \mu_{PS_n}) / (\sigma_{PS_r} + \sigma_{PS_n})$$

50

## 【0170】

CSの値が大きいほど、2つの群が予測スコアシステムによってより良好に分離されることを示す。leave-one-out検定に関しては、1つの試料を保留した上で、残りの試料を用いて順列p値および平均発現レベルを算出し、続いて保留した試料のクラスを、その予測スコアを算出することによって評価した。この手順を20例の試料のそれぞれに関して繰り返した。

## 【0171】

細胞株

ヒト乳癌細胞株HBL-100、HCC1937、MCF-7、MDA-MB-435s、YMB1、SKBR3、T47D、BT-20、BT-474、BT-549、HCC1143、HCC1500、HCC1599、MDA-MB-157、MDA-MB453、OUCB-F、ZR-75-1、COS-7細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、それぞれの寄託者の推奨に従って培養した。HBC4、HBC5およびMDA-MB-231細胞株は、財団法人癌研究会癌化学療法センター分子薬理部 (Molecular Pharmacology, Cancer Chemotherapy Centre of the Japanese Foundation for Cancer Research) の矢守博士により寄贈いただいた。細胞はすべて適切な培地中で培養した。すなわち、RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) をHBC4、HBC5、T47D、YMB1、OUCB-F、ZR-75-1、BT-549、HCC1143、HCC1500、HCC1599およびHCC1937に対して使用し (2mM L-グルタミンを添加) ; ダルベッコ変法イーグル培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) をBT474、HBL100、COS7に対して使用し ; 0.1mM必須アミノ酸 (Roche)、1mMピルビン酸ナトリウム (Roche)、0.01mg/mlインスリン (Sigma) を加えたEMEM (Sigma) をBT-20およびMCF-7に対して使用し ; McCoy (Sigma) をSKBR3に対して使用し (1.5mM L-グルタミンを添加) ; L-15 (Roche) をMDA-MB-231、MDA-MB-157、MDA-MB453およびMDA-MB-435Sに対して使用した。それぞれの培地には、10% ウシ胎仔血清 (Cansera) および1% 抗生物質/抗菌性溶液 (Sigma) を加えた。MDA-MB-231細胞およびMDA-MB-435S細胞は、CO<sub>2</sub> を含まない加湿空気雰囲気中で37 に保った。他の細胞株は、5% CO<sub>2</sub> を含む加湿空気雰囲気中で37 に保った。臨床試料 (乳癌および正常乳管) は、すべての患者からインフォームドコンセントを得た上で、手術標本から入手した。

## 【0172】

ノーザンブロット分析

すべての乳癌細胞株から、RNeasyキット (QIAGEN) を製造元の指示に従って用いて全RNAを抽出した。DNA分解酵素I (Nippon Gene、大阪、日本) による処理の後に、mRNA精製キット (Amersham Biosciences) を製造元の指示に従って用いて、mRNAを単離した。各mRNAの1μgのアリコート、正常成人の乳房 (Biochain)、肺、心臓、肝臓、腎臓、骨髄 (BD, Clontech, Palo Alto, CA) から単離したポリA (+) RNAとともに1%変性アガロースゲル上で分離し、ナイロン膜に転写した (乳癌ノーザンブロット)。乳癌ノーザンブロットおよびヒト多組織ノーザンブロット (Clontech, Palo Alto, CA) を、RT-PCRによって調製したA7870の [<sup>32</sup>P]-dCTP標識PCR産物とハイブリダイズさせた (下記参照)。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、供給元の推奨に従って行った。ブロットのオートラジオグラフィは増感スクリーンを用いて-80 で14日間行った。A7870 (320bp) に対する特異的プローブは、以下のプライマーセット : 5'-AGACCCTAAAGATCGTCCTTCTG-3' (SEQ ID NO : 13) および5'-GTGTTTAAAGTCAGCATGAGCAG-3' (SEQ ID NO : 14) を用いるRT-PCRによって調製し、メガプライムDNA標識システム (Amersham bioscience) により放射性標識した。

## 【0173】

免疫細胞化学染色

A7870発現ベクターを構築するため、A7870 cDNAの全コード配列を、KOD-Plus DNAポリメラーゼ (Toyobo、大阪、日本) を用いるPCRによって増幅した。そのPCR産物を、pCAGGS n3FH-HA発現ベクターのEocRI部位およびXhoI部位に挿入した。この構築物 (pCAGGS-A7870-HA) をDNAシーケンシングによって確認した。次に、外因性A7870の細胞内局在をまず調べるために、本発明者らは外因性発現用にCOS7細胞を1×10<sup>5</sup> 個/ウェルで播いた。24時間後に、FuGENE 6トランスフェクション試薬 (Roche) を製造元の指示に従って用いて、C

OS7細胞に対してそれぞれ1 $\mu$ gのpCAGGS-A7870-HAを一時的にトランスフェクトした。次に、細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むPBSにより15分間固定し、0.1% Triton X-100を含むPBSを4で2.5分間用いて透過させた。続いて、非特異的なハイブリダイゼーションをブロックするために、細胞を3% BSAを含むPBSにより4で12時間覆った。次に、A7870-HAをトランスフェクトしたCOS7細胞を、1:1000に希釈したマウス抗HA抗体 (SANTA CRUZ) および1:1000に希釈した抗TOPKポリクローナル抗体 (Cell Signaling) とともにインキュベートした。PBSで洗浄した後に、両方のトランスフェクト細胞を、1:5000に希釈したAlexa594結合抗マウス二次抗体 (Molecular Probe) によって染色した。

#### 【0174】

本発明者らはさらに、 $2 \times 10^5$  個/ウェルの乳癌細胞株T47D、BT-20およびHBC5における内因性A7870タンパク質の細胞内局在についても確認した。細胞を、ヒトPBK/TOPKのc末端にある数アミノ酸に対応する合成ペプチドからなるウサギ抗TOPKポリクローナル抗体 (1:1000希釈) で処置した。PBSで洗浄した後に、細胞を、1:3000に希釈したAlexa488結合抗ウサギ二次抗体 (Molecular Probe) によって染色した。核は4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) で対比染色した。蛍光画像はTCS SP2A0BS顕微鏡 (Leica、東京、日本) を用いて得られた。

#### 【0175】

##### psiU6BX3.0を用いた、A7870特異的siRNA発現ベクターの構築

本発明者らは、ベクターに基づくRNAiシステムを、以前の報告に従って、psiU6BX3.0 siRNA発現ベクターを用いて確立した (Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, L. M. Miwa N, Lin YM, Nakamura Y (2003) Cancer Res, 63, 6116-6120)。A7870に対するsiRNA発現ベクター (psiU6BX-A7870) は、psiH1BX3.0ベクターのBbsI部位への、表13中の二本鎖オリゴヌクレオチドのクローニングによって調製した。対照プラスミドであるpsiU6BX-SCおよびpsiU6BX-LUCは、SC (スクランブル対照) 用の5'-TCCC GCGCGCTTTGTAGGATTCGTTCAAGAGACG AATCCTACAAAGCGCGC-3' (SEQ ID NO: 15) および5'-AAAAGCGCGCTTTGTAGGATTCGTTCTCTGAACG AATCCTACAAAGCGCGC-3' (SEQ ID NO: 16) ; LUC (ルシフェラーゼ対照) 用の5'-TCCC GGTAC GCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCGCGTACG-3' (SEQ ID NO: 17) および5'-AAAACGTAC GCGGAATACTTCGATCTCTTGAATCGAAGTATTCCGCGTACG-3' (SEQ ID NO: 18) の二本鎖オリゴヌクレオチドを、それぞれpsiU6BX3.0ベクターのBbsI部位にクローニングすることによって調製した。

#### 【0176】

##### A7870の遺伝子サイレンシング作用

ヒト乳癌細胞株T47DまたはBT-20を15cm皿に播き ( $4 \times 10^6$  細胞/皿)、FuGENE6試薬を供給元 (Roche) の推奨に従って用いて、psiU6BX-LUC (ルシフェラーゼ対照)、陰性対照としてpsiU6BX-SC (スクランブル対照)、およびpsiU6BX-A7870の各16 $\mu$ gでトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、細胞をコロニー形成アッセイ ( $2 \times 10^6$  細胞/10cm皿)、RT-PCR ( $2 \times 10^6$  細胞/10cm皿)、およびMTTアッセイ ( $2 \times 10^6$  細胞/ウェル) のために再び播いた。T47DまたはBT-20細胞におけるA7870導入細胞を、それぞれ0.7mg/mlまたは0.6mg/mlのネオマイシン (Geneticin, Gibco) を含む培地を用いて選択した。その後、本発明者らは培地を3週間にわたり2日毎に交換した。siRNAの機能を評価するために、ネオマイシン選択後11日目に細胞から全RNAを抽出し、A7870およびGAPDHに対する以下の特異的なプライマーセットを用いる半定量的RT-PCRにより、siRNAのノックダウン作用を確認した; 内部対照としてGAPDH用に5'-ATGGAATCCCATCACCATCT-3' (SEQ ID NO: 19) および5'-GGTTGAGCACAGGTACTTTATT-3' (SEQ ID NO: 20)、ならびにA7870用に5'-GCC TTCATCATCCAAACATT-3' (SEQ ID NO: 21) および5'-GGCAAATATGTCTGCCTTGT-3' (SEQ ID NO: 22)。

#### 【0177】

さらに、T47DまたはBT-20細胞株を用いた、siRNAを発現するトランスフェクタントを、それぞれネオマイシンを含む選択培地中で23日間増殖させた。4%パラホルムアルデヒドで固定した後に、トランスフェクトした細胞をコロニー形成を評価するためにギムザ液で

10

20

30

40

50

染色した。細胞の生存度を定量するためにMTTアッセイを行った。ネオマイシンを含む培地中で10日間培養した後に、MTT溶液（臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム）（Sigma）を濃度0.5mg/mlで添加した。37℃で2.5時間インキュベートした後に、酸-SDS（0.01N HCl/10% SDS）を添加した。紺青色の結晶を溶解するために、この懸濁液を激しく混合し、37℃で一晩インキュベートした。570nmでの吸光度をMicroplate Reader 550（BioRad）を用いて測定した。siRNAの機能を評価するために、選択から7日後に細胞から全RNAを抽出し、選択後10日目にCell Counting Kit-8（Dojindo）を製造元のプロトコールに従って用いてMTTアッセイを行う。Microplate Reader 550（BioRad）を用いて、吸光度を波長570nmで測定する。コロニー形成アッセイに関しては、細胞を4%パラホルムアルデヒドで15分間固定し、その後ギムザ液（Merck）で染色した。各実験は3連で行った。

10

【0178】

### 結果

#### 乳癌の正確な遺伝子発現プロファイルに基づく分類分析：

乳癌は腫瘍塊の中に癌細胞の少数集団を含み、正常上皮乳管細胞から発生するため、周囲の非癌細胞または正常でない乳管上皮細胞の混入を避けるためにマイクロダイセクション法を行った。乳房組織中の細胞の大部分は脂肪細胞であるため、この臓器における癌特異的発現プロファイルを分析するために乳房組織全体を用いることは適切でないと考えられた。図1に示されているように、DCIS（症例10326T）、IDC（10502T）および正常乳管上皮（10341N）の各臨床標本由来の代表例をマイクロダイセクションした。これにより、以降の遺伝子発現プロファイルをより正確に得ることが可能になる。普遍的な対照としての役割を果たす、正常乳管上皮細胞のマイクロダイセクションされた集団に混入した脂肪細胞の割合を、以前に記載されたように、脂肪および乳腺組織で高発現される2つの遺伝子（すなわち、PLINおよびFABP4）のシグナル強度を測定することによって調べた（Saito-Hisaminato, A., et al., Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. DNA Res, 9: 35-45, 2002）。これらの遺伝子のシグナル強度を、多数の脂肪細胞を含む全乳腺組織で調べたところ、これらの遺伝子のシグナル強度の比の平均は約99.4%であった。マイクロダイセクションされた正常乳管上皮細胞における比は約0.6%であった（「材料および方法」の混入率の項を参照されたい）。したがって、対照細胞の集団における混入脂肪細胞の平均的な割合は、マイクロダイセクション後には0.6%であると推定された。まず、遺伝子群に対して、102個の臨床試料、すなわちマイクロダイセクションされた81個の異なる乳癌臨床標本、10個体においてマイクロダイセクションされた11個の異なる組織型、2個の全乳癌組織、マイクロダイセクションされた6個の正常乳管細胞、および2個の全乳腺組織）における、それらの発現パターンの類似性に基づき、教師なし二次元階層クラスタリングアルゴリズムを適用した。再現性のあるクラスターが710個の遺伝子から得られた（「材料および方法」を参照）。102個の試料にわたるそれらの発現パターンを図2Aに示す。試料軸には、102個の試料が、それらの発現プロファイルに基づいて3つの主な群（群A、B、およびC）にクラスター化されている。次に、この分類を臨床的パラメーター、特にEIAを用いて判定したエストロゲン受容体（ER）と関連づけた。55例のER陽性腫瘍のうち、45例は腫瘍樹状図の同じ分枝（B群）にクラスター化され、このことからER状態の傾向が示唆された。さらに、独立した実験で標識およびハイブリダイゼーションを行った、異なる組織型の10例のうち7例（試料番号10864、10149、10818、10138、10005、10646および10435）は、同じ群内に非常に近接してクラスター化された。特に、これらのうち、重複した1例（10149a1および10149a1T）はまた、最も短い分枝中にクラスター化され、このことからこのマイクロアレイデータの再現性および信頼性が裏づけられた。注目されることに、C群はマイクロダイセクションされた非癌細胞、およびマイクロダイセクションされた1例の腫瘍症例を除く乳癌の全組織を含んでおり、このことはこのデータが正確な乳癌特異的発現プロファイルを示すことを示唆している。

20

30

40

【0179】

50

さらに、8例の乳癌患者からマイクロダイセクションされた2つの分化病変を有する16例の試料において、89個の遺伝子の二次元階層クラスター分析を行った。その結果、表現型の異なる病変を有する乳癌試料は近接していた(図2B)。次に、マイクロダイセクションを行った8例の癌標本由来の、表現型が高分化型および低分化型の患者を一致させた病変において、差次的に発現される遺伝子を同定するためにランダム順列検定を行った。図2Cに示されているように、差次的に発現される25個の遺伝子を用いたクラスター分析により、高分化型と低分化型の浸潤性乳管癌細胞を区別することができる。これらの25個の遺伝子(表1)には、浸潤および細胞増殖における役割の可能性が以前に報告されている、以下の重要な因子がいくつか含まれていた: TNFSF11、ITGA5、およびNFAT5 (Giuliani, N., et al., Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease). Blood, 100: 4615-4621, 2002; Sebastien J. et al., The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. Nature cell biology, 4: 540-544, 2002; Klein, S. et al., Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. Mol Cell Biol, 22: 5912-5922, 2002)。

10

20

30

40

50

#### 【0180】

次に、IDCにおける41例のER陽性腫瘍および28例のER陰性腫瘍において差次的に発現される遺伝子を同定するために、ランダム順列検定を行った。これらの試料はすべて閉経前患者由来であった。順列P値0.0001未満でER陽性とER陰性とを識別することができた97個の遺伝子を列挙した(「材料および方法」参照)(図3および表2)。それらのうち、96個の遺伝子を本発明のBRC関連遺伝子として選択した。ER陰性群と比較してER陽性群においてこれらの遺伝子のうち92個では発現レベルが高く、他の5個では低かった。これらの遺伝子のうち、GATA結合タンパク質3(GATA3)、トレフォイル因子3(TFF3)、サイクリンD1(CCND1)、MAPKKホモログ(MAP2K4)およびメタロプロテアーゼ組織阻害因子1(TIMP1)、インスリン受容体基質1(IRS1)、Xボックス結合タンパク質1(XBP1)、GLI-KruppelファミリーメンバーGLI3(GLI3)は、ER陽性のものにおいて過剰発現されていた(表2)。さらに、エストロゲン受容体(ESR1)は、p値の大きさに基づいて6番目の遺伝子として順位付けられたため(図3の下図)、ERの発現プロファイルに従って乳癌を識別しうる可能性がある。

#### 【0181】

DCISまたはIDCにおいて通常上方制御または下方制御される遺伝子の同定:

乳癌の発生の基礎をなす機序を明らかにするために、DCISおよびIDCにおいて通常、上方制御または下方制御される遺伝子をそれぞれ調べた。77例の乳癌(DCIS 8例およびIDC 69例の閉経前患者)における遺伝子発現プロファイルにより、通常発現に変化がみられる325個の遺伝子が同定された(図4A、4B)。78個の遺伝子は通常、正常乳管細胞におけるレベルと比較して3倍を上回って上方制御されるが(図4A、図4B、表3、表5)、247個の遺伝子は乳癌細胞において発現が1/3未満に低下した(図4A、4B、表4、6)。特に、図4Bに示されているように、25個の遺伝子の発現レベルは、DCISからIDCへの移行において上昇し、49個の遺伝子のそれは低下した(表5および表6)。発現が上昇した遺伝子の中には、乳癌で過剰発現されると既に報告されているフィブロネクチン(FN1)が含まれていた(表4)(Mackay, A. et al., cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. Oncogene, 22: 2680-2688, 2003; Lalani, E. N. et al., Expression of the gene coding for a human mucin in mouse mammary tumor cells can affect their tumorigenicity. J Biol Chem, 266: 15420-15426, 1991.22; Martin-Lluesma, S., et al., A. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. Science, 297: 2267-2270, 2002)。一方、発現が低下した遺伝子の中には、腫瘍抑制因子として機能することが知られているST5およびSCHIP1も含まれていた(表6)。

#### 【0182】

次に、IDCのみで特異的に発現の変化がみられる遺伝子について調べた。その結果、24個の上方制御される遺伝子(図4C、表7)および41個の下方制御される遺伝子(図4C、表8)が同定された。上方制御される遺伝子のうち、ERBB2、CCNB1、BUB1Bは、乳癌発生に関与することが既に知られている(Latta, E. K., et al., The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol*, 15: 1318-1325, 2002; Takeno, S., et al., Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 94: 2874-2881, 2002; Slamon, D. J., et al., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235: 177-182, 1987)。下方制御される遺伝子の中には、AXINによって誘導され、肺癌、肝臓癌、結腸癌および腎臓癌において下方制御されることが多い遺伝子であるAXUD1(Ishiguro, H., et al., Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene*, 20: 5062-5066, 2001)が含まれることから、AXUD1は乳癌の発生にも関与している可能性が示唆される。

10

#### 【0183】

選択された遺伝子の半定量的RT-PCRによる検証:

cDNAマイクロアレイ解析によって得られた発現データの信頼性を確認するため、情報の得られた高分化型症例において高度に上方制御されていた3個の遺伝子(アクセッション番号A1261804、AA205444、AA167194)、および有益な低分化型症例において同様に高度に上方制御されていた2個の遺伝子(AA676987およびH22566)に対して、半定量的RT-PCR実験を行った。被験症例の大部分において、RT-PCRの結果はマイクロアレイ解析の結果とよく一致した(図5、表9)。

20

#### 【0184】

乳癌細胞において上方制御される遺伝子としての、T-LAK細胞起源のプロテインキナーゼと呼ばれるA7870の同定

本発明者らは、IDCにおいて上方制御される24個の遺伝子を同定した(表7)。それらのうち、本発明者らは、T-LAK細胞から生じるプロテインキナーゼ、TOPK(Genbankアクセッション番号NM\_018492)と呼ばれ、mRNA転写産物が8つのエクソンからなる1899塩基長であって、染色体8p21.2上に位置する、A7870に注目した。A7870の発現は、発現データが入手可能であった乳癌症例39例中30例(77%)において上昇しており、特に浸潤性乳管癌標本を含む36症例中29例(81%)で上昇していた。この遺伝子の乳癌における発現パターンを確かめるために、本発明者らは、乳癌細胞株および(正常乳房細胞を含む)正常ヒト組織を用いた半定量的RT-PCR分析を行った。その結果、A7870は12個の臨床的乳癌標本(高分化型)中7個で、正常乳管細胞および他の正常組織と比較して発現が上昇し(図6a)、20個の乳癌細胞株のうち17個で過剰発現される(図6b)ことが見いだされた。この遺伝子の発現パターンをさらに調べるために、本発明者らは、ヒト多組織および乳癌細胞株を用いて、A7870のcDNA断片(320bp)をプローブとして用いるノーザンブロット分析を行った(図7a)。その結果、正常ヒト精巣および胸腺では2つの転写産物(約1.9kbおよび1.8kb)のみが発現されていた。乳癌ノーザンブロットを用いてこれらの転写産物の発現パターンをさらに調べたところ、本発明者らは、この両方の転写産物が正常ヒト組織と比較して、乳癌細胞株において特異的に過剰発現されることを見いだした(図7b)。

30

40

#### 【0185】

A7870の乳癌特異的に発現される転写産物の単離

A7870の2つの転写産物のシーケンシング解析により、A7870の2つの変種は同じオープンリーディングフレーム(ORF)を含むため、本発明者らは、二重特異性のマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ(MAPKK)ファミリーに関連するセリン/トレオニンキナーゼであるタンパク質をコードする、TOPK(Genbankアクセッション番号NM\_018492)に注目した。SMARTコンピュータ予測により、TOPKはpfam、pキナーゼモチーフを32~320残基に含むことが示され、これによりこのタンパク質は、細胞形態形成および細胞増殖にお

50

いて役割を果たすシグナル伝達経路に關与する可能性が示唆される。

【0186】

A7870の細胞内局在

A7870の特徴をさらに詳細に調べるために、本発明者らは、哺乳動物細胞におけるこれらの遺伝子産物の細胞内局在を調べた。まず、A7870タンパク質を発現するプラスミド(pCAGGS-A7870-HA)をCOS7細胞に一過性にトランスフェクトしたところ、抗HAタグ抗体およびTOPKポリクローナル抗体を用いた免疫細胞化学分析により、外因性A7870タンパク質が細胞質に局在し、特にトランスフェクトされた全てのCOS7細胞において核膜周囲に強いシグナルがみられることが判明した(図8a)。さらに、本発明者らは、抗TOPKポリクローナル抗体を用いる免疫細胞化学染色により、内因性タンパク質の細胞内局在を調べた。この場合も同様に、A7870タンパク質はT47D、BT-20およびHBC5細胞において細胞小器官および核周囲にあることが観察された(図8b)。

10

【0187】

A7870の発現を低下させるように設計された低分子干渉RNA(siRNA)の増殖阻害作用

A7870の増殖促進の役割を評価するために、本発明者らは、A7870の過剰発現を示した乳癌細胞株T47DおよびBT-20において、哺乳動物ベクターに基づくRNA干渉(RNAi)法(「材料および方法」参照)によって内因性A7870の発現をノックダウンした。A7870の発現レベルを半定量的RT-PCR実験によって調べた。A7870(si1、si3およびsi4)特異的siRNAは、対照siRNA構築物(psiU6BX-LUCまたは-SC)と比較して発現を有意に抑制した。A7870特異的siRNAによる細胞増殖阻害を確認するため、本発明者らはコロニー形成アッセイおよびMTTアッセイをそれぞれ行った。その結果、A7870 siRNA構築物の導入によりこれらの乳癌細胞の増殖が抑制され、これはこの遺伝子の発現が低下した上記の結果に一致した。それぞれの結果は3回の独立した実験によって検証された。したがって、本発明者らの所見は、A7870が乳癌の細胞増殖において重要な機能を有することを示唆している。

20

【0188】

組織病理学的型において差次的に発現される遺伝子の同定、および個々の患者における表現型の差異：

本発明の1つの目標は、一部の患者において、異なる表現型で一貫して上方制御または下方制御される遺伝子を見出すことであった。しかし、乳癌は不均一な様々な表現型を示すため、顕微鏡による組織病理学的な分化は、図2に示されたような遺伝子発現パターンによる教師なし分類を用いて、明確には識別されなかった。この観察をさらに詳細に調べるために、ランダム順列検定を行い、高分化型と低分化型症例とを識別しうる206個の遺伝子を抽出した。これらの206個の識別性のある遺伝子はすべて、31例の高分化型癌と24例の低分化型癌の間で $P < 0.01$ のレベルで有意であった(図9、表10)。これらの206個の遺伝子を用いた二次元階層クラスター分析により、IDCの異なる構成要素(高分化型、中分化型および低分化型)に関して群を分類することができた。A群クラスターには、低分化型試料で著しく発現が亢進していた遺伝子(横の列における分枝1)；細胞外マトリックス構造(COL1A2、COL3A1およびP4HA2)、細胞接着(LOXL2、THBS2およびTAGLN2)が含まれ、B群クラスターには、主として高分化型および中分化型の試料において発現が亢進していた遺伝子(横の列における分枝2)；転写調節(BTF、WTAP、HTATSF1)、細胞周期調節因子(CDC5L、CCT7)が含まれた。しかしながら、B群における2例の低分化型試料(試料番号10709および10781)は、低分化型よりむしろ高分化型の特徴に類似した発現パターンを示した。いくつかの高分化型試料は、低分化型に特徴的ないくつかの遺伝子の共発現を示した。

30

40

【0189】

リンパ節転移に関する予測スコアの開発：

乳癌では、腋窩リンパ節への浸潤が最も重要な予後因子である(Shek, L. L. and Godolphin, W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. Cancer Res, 48: 5565-5569, 1988)。選択した遺伝子の発現プロファイルを用いて、腋

50

窩リンパ節転移の予測のためのスコア化パラメーターを得るための式を開発するために、20例のリンパ節陽性症例および20例のリンパ節陰性症例の発現プロファイルと比較した。上記の基準に従って、0.0001未満の順列p値を示した93個の識別性のある遺伝子をまず選択した。続いて、候補リストから、リンパ節陽性症例と陰性症例との最も良い分離を示した上位34個の遺伝子を得た(表11)。図10Aに示されているように、これらの34個の遺伝子を用いた階層クラスター分析により、40例の乳癌症例がすべて、リンパ節の状態にしたがって2つの群のいずれかに分類された。

#### 【0190】

最終的に、34個の遺伝子のセットの発現プロファイルを用いて、リンパ節陽性症例をリンパ節陰性症例と明確に識別しうる予測スコアシステムを構築した。このスコアシステムをさらに検証するために、スコアシステムの構築に用いたものではない20例のリンパ節陽性症例および20例のリンパ節陰性症例のスコアを算出した(「材料および方法」参照)。陽性転移群および陰性群に属する40例の患者が明確に区別される境界スコアを15.8とし(図10B)、15.8を上回るスコアを「陽性」、15.8またはそれ未満を「陰性」とした。システムをさらに明確にするために、識別性のある遺伝子の選択のための最初の手順に含まれなかった17例のリンパ節陽性症例および20例の陰性症例に関して、原発性腫瘍からの転移の予測スコアを算出した。図10Bおよび10Cに示されているように、リンパ節転移を伴う17症例のうち全症例が本明細書の定義による陽性スコアを示し、一方、リンパ節転移を伴わない20症例のうち18例(90%)は陰性スコアを示した。77症例のうち75例(97%)はリンパ節の状態に従って正しく位置づけられたが、2例のリンパ節陰性症例は誤って位置づけられたか、または境界領域もしくは陽性領域に位置づけられた。

#### 【0191】

##### 考察

乳癌は、遺伝因子、環境因子およびホルモン因子間の相互作用の結果として発生する多因子疾患である。乳癌の明確な病理学的病期が記載されているが、これらの病期の間の分子的な差異はほとんど明らかになっていない(McGuire, W. L. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. J Natl Cancer Inst, 83: 154-155, 1991.; Eifel, P., et al., National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer. November 1-3, 2000. J Natl Cancer Inst, 93: 979-989, 2001.; Fisher, B., et al., Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N Engl J Med, 347: 1233-1241, 2002)。

#### 【0192】

遺伝子発現の全ゲノム解析、および乳癌の純粋な癌細胞集団を単離するレーザーマイクロダイセクション(LMM)法の開発は、癌特異的分類を有する分子標的遺伝子に関する検索、様々な種類の腫瘍、特に乳癌における治療および結果の予測を可能にする。

#### 【0193】

脂肪細胞は乳腺組織の90%超を占め、癌腫が発生する元となる臓器内の上皮細胞は極めてわずかな割合にしか相当しないため、癌組織全体および正常乳腺全体を用いた遺伝子発現プロファイルの分析は、調べる組織における特定の細胞の混合物によって大きな影響を受ける。脂肪細胞、線維芽細胞および炎症細胞の割合の違いは、乳癌発生に關与する遺伝子の著しく特異的な発現を覆い隠す可能性がある。したがって、手術標本から得られる癌細胞および正常上皮細胞の集団をできる限り精製するため、LMMシステムを用いた(Hasegawa, S., et al. Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23,040 genes. Cancer Res, 62: 7012-7017, 2002; Kitahara, et al. and Tsunoda, T. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. Cancer Res, 61: 3544-3549, 2001; Kikuchi, T., et al. Expression profiles of non-small cell

lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene*, 22: 2192-2205, 2003.; Gjerdrum, L. M., et al., Laser-assisted microdissection of membrane-mounted paraffin sections for polymerase chain reaction analysis: identification of cell populations using immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Mol Diagn*, 3: 105-110, 2001) (図1)。マイクロダイセクションされた細胞集団の純度を評価するために、脂肪組織および乳腺において高発現されるPLINおよびFABP4の発現を、cDNAマイクロアレイを用いて、29個の正常ヒト組織における遺伝子発現プロファイルにより解析した (Saito-Hisaminato, A., et al., Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNA Res*, 9: 35-45, 2002)。ダイセクション手順の後、正常乳管上皮細胞中に混入している脂肪細胞の割合は0.6%未満であると推定された。特に、PLINの発現レベルを調べた場合 (Nishiu, J., et al., Isolation and chromosomal mapping of the human homolog of perilipin (PLIN), a rat adipose tissue-specific gene, by differential display method. *Genomics*, 48: 254-257, 1998)、LMM技術に供した細胞集団の純度は約100%になる可能性があった。図2に示されているように、教師なしクラスター分析からは、乳癌全組織はLMMによりマイクロダイセクションされた乳癌細胞と区別されるが、正常乳管細胞および乳腺は同じ分枝にクラスター化されることが示された。このため、いくつかの研究では、乳癌特異的発現プロファイルを正確に得るために、乳癌細胞と、乳癌の起源となる正常乳管上皮細胞のマイクロダイセクションが不可欠である。LMMとcDNAマイクロアレイ解析との併用により、乳癌の発生および進行を取り巻く正確な分子イベントを解明し、乳癌細胞の多段階癌発生および腫瘍の不均一性の機序を理解するための、強力なアプローチが提供される。

#### 【0194】

図2Aに示されているように、発現プロファイルに基づく教師なし分類分析により、原発性乳癌が2つの群に分けられること、およびEIAによるER状態と関連することを示すことができる。ER陽性腫瘍およびER陰性腫瘍は全く異なる遺伝子発現表現型を呈することが見いだされた。この結果は、これらの2つの組織学的に異なる病変が、乳癌の発生において重要な役割を果たす可能性のある異なる生物学的性質を有することを示唆し、さらにER状態を利用してアジュバント存在下でのホルモン療法の必要性を確認しうることを示唆する (Eifel, P., et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer. November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst*, 93: 979-989, 2001.; Hartge, P. Genes, hormones, and pathways to breast cancer. *N Engl J Med*, 348: 2352-2354, 2003)。加えて、教師あり統計分析により、ホルモン依存的な進行を調べるために、ER陽性をER陰性と区別することができた遺伝子のサブセットを選択し、抗癌薬のための新規な分子標的を探索した。閉経前患者からなるこれらの二群間で発現が有意差に異なる97個の遺伝子を、ランダム順列検定によって同定した (図3)。これらの遺伝子の中には、SAPK経路の中心に位置するメディエーターであるMAP2K4が含まれた。本研究および他の研究で乳癌におけるER発現との強い関連性を示す遺伝子である、Cyclin D1 (May, F. E. and Westley, B. R. Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J Pathol*, 182: 404-413, 1997) も含まれていた。エストロゲンは正常乳腺における増殖および分化の重要な調節因子であり、乳癌の発生および進行においても重要である (Shek, L. L. and Godolphin, W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Res*, 48: 5565-5569, 1988)。エストロゲンはERを介して遺伝子発現を調節するが、下流の遺伝子標的に対するエストロゲンの作用、補助因子の役割、および他のシグナル伝達経路との相互干渉の詳細については決して十分には解明されていない。乳癌全体の約3分の2は診断時点ではER陽性であるため、この受容体の発現は生物学的および治療的に重要な意味を持つ。最近、新規な選択的エストロゲン受容体調節物質 (SERM) がER陽性乳癌患者に対するホルモン治療薬として開発されつつあるた

め、ER状態と関連性のあるこれらの遺伝子はSERMの新規な分子標的候補である可能性がある (Smith, I.E. and Dowsett, M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*, 348: 2431-2442, 2003)。これらの所見は、発現プロファイルおよびER状態の比較が、ER依存的乳癌細胞の細胞増殖および進行のホルモン性調節を解明するための有用な情報を提供することを示唆する。

#### 【0195】

乳癌および他のヒト悪性腫瘍に対する、分子に基づく治療法の開発および利用には、患者組織の詳細な分子遺伝学的分析が必要である。組織学的な証拠からは、浸潤性乳癌に先立って、いくつかの前癌状態が存在することが示唆される。これらの組織学的病変には、異型乳管過形成、異型小葉過形成、非浸潤性乳管癌 (DCIS) および上皮内小葉癌が含まれる (Lakhani, S. R. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*, 187: 272-278, 1999)。これらの病変は、正常乳房上皮または乳癌が生じる乳管小葉単位終末から、最終的な浸潤性乳癌までの組織学的な連続体のいずれかに該当すると考えられる。いくつかのモデルが、前癌と新生物の間の遺伝的異常を説明するために提案されている。

10

#### 【0196】

DCISとIDCとの比較のように、病理学的に異なる病期の間で高頻度に、発現の上昇または低下を示す種々の遺伝子が観察され、その結果として合計325個の遺伝子が同定された。これらの遺伝子は、乳癌の病理的段階の分子的基盤をなす可能性があり、これらの遺伝子の発現レベルは進行期腫瘍段階と関連した。DCISおよびIDCにおいて通常上方制御される78個の遺伝子 (表3、表5) および通常下方制御される247個の遺伝子 (表4、表6) も同定された。上方制御される遺伝子のうち、乳癌において過剰発現されることが報告されていたNAT1、HEC、GATA3およびRAI3は、前浸潤期にも発現される可能性があることが指摘された (Geylan, Y. S., et al., Arylamine N-acetyltransferase activities in human breast cancer tissues. *Neoplasma*, 48: 108-111, 2001.; Chen, Y., et al., HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis. *Mol Cell Biol*, 17: 6049-6056, 1997.; Bertucci, F., et al., Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet*, 9: 2981-2991, 2000.; Cheng, Y. and Lotan, R. Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 273: 35008-35015, 1998)。一方、本発明において下方制御される遺伝子として含まれたTGFBR2は、悪性度の低下を招くことが知られている (Sun, L., et al., Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem*, 269: 26449-26455, 1994)。これらの所見は、これらの遺伝子がDCISからIDCへの移行に関与する可能性を示唆する。

20

30

#### 【0197】

具体的には、DCISからIDCへの移行において発現が上昇または低下する、25個の上方制御される遺伝子 (表5) および49個の下方制御される遺伝子 (表6) が同定された。上方制御されるエレメントのリストには、シグナル伝達経路および細胞周期に関与し、浸潤癌の発生において重要な役割を果たすタンパク質ならびに転写因子をコードする遺伝子が含まれた。FoxM1およびCyclin B1の過剰発現は、様々な腫瘍で報告されている。FoxM1の過剰発現はCyclin B1発現を刺激する (Leung TW, et al., 2001)。CCNB1はG2期の通過および有糸分裂に必要な細胞周期制御タンパク質である (Pines, J. and Hunter, T. Cyclins A and B1 in the human cell cycle. *Ciba Found Symp*, 170: 187-196; discussion 196-204, 1992)。TOP2A阻害因子は肺癌治療における化学療法薬として広く用いられている (Miettinen, H. E., et al., High topoisomerase II alpha expression associates with high proliferation rate and poor prognosis in oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26: 504-512, 2000)。BUB1Bは、分裂チェックポイントを経ての腫瘍進行および遺伝子不安定性に寄与する、染色体不安定性表現型の原因となる可能性がある

40

50

(Bardelli, A., et al. Carcinogen-specific induction of genetic instability. Proc Natl Acad Sci U S A, 98: 5770-5775, 2001)。MMP11はその発現が患者の生存期間に直接的に有害な影響を及ぼすことが示された (Boulay, A., et al. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. Cancer Res, 61: 2189-2193, 2001)。ECM1は血管新生作用を有し、乳癌細胞で発現されている (Han, Z., et al., Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. Faseb J, 15: 988-994, 2001)。これらの機能のほとんどは依然として不明であるが、これらの遺伝子の機能解析の評価により、これらが浸潤活性の媒介において役割を果たしていることが示される。

10

**【0198】**

本報告において、本発明者らは、全ゲノムcDNAマイクロアレイを用いた乳癌の正確な発現プロファイルにより、正常ヒト組織と比較して乳癌細胞で顕著に過剰発現される新規遺伝子、A7870を単離した。さらに本発明者らは、乳癌細胞をsiRNAで処理すると標的遺伝子A7870の発現が効果的に阻害され、乳癌の細胞/腫瘍成長が有意に抑制されることを示した。これらの所見は、A7870が腫瘍細胞の成長増殖に重要な役割を果たすとともに、抗癌薬の開発のための有望な標的である可能性を示す。

**【0199】**

MAPKKファミリーの新たなメンバーであるTOPKと呼ばれるA7870を、乳癌におけるその顕著な発現亢進のため研究用に選択した。本発明者らは、約1.8kbおよび1.9kbの転写産物が癌特異的な発現を示すことを同定した。これらの転写産物は5'UTR配列が異なり、ORFは同一であった。本発明者らは、乳癌細胞をsiRNAで処理するとA7870の発現が効果的に阻害され、乳癌の細胞/腫瘍成長が有意に抑制されることを示した。これらの所見は、A7870が腫瘍細胞の成長増殖に重要な役割を果たすとともに、抗癌薬の開発のための有望な標的である可能性を示す。

20

**【0200】**

しかし、いくつかの基準は、疾患の進行および臨床的結果を予測する能力の点で完全ではない。より侵襲性の強い疾患を有する患者は、アジュバント化学療法またはホルモン療法により恩恵を受けることができ、これは現在、年齢、腫瘍のサイズ、腋窩リンパ節の状態、組織型および癌の病的段階、ならびにホルモン受容体状態といった複数の基準の組み合わせによって同定されている。組織学的に異なる腫瘍は、遺伝子のサブセットによって分類されており、このプロセスは病理学的に関連する情報を提供する。大部分の研究者は、腫瘍が組織学的に著しく高い割合で低分化状態を示す場合、患者の予後は不良であることを示唆している。

30

**【0201】**

本研究による驚くべき結果は、各患者における異なる組織型の発現プロファイルに著しい類似性があったことである。マイクロダイセクションおよび全体的な遺伝子発現解析により、浸潤および予後と関連性のある遺伝子発現の変化を、高分化型および低分化型の乳癌細胞からのmRNA発現プロファイルを用い、教師あり分析を用いて調べた。発現プロファイルに基づく教師なし分類分析により、乳癌は2つの群に分けることができ、異なる病理学的病変と関連することを示すことができる。各患者からなるこれらの二群間で発現に有意差がみられる25個の遺伝子を、ランダム順列検定によって同定した (図2C)。これらの遺伝子のうち、活性化T細胞核因子5 (NFAT5) は癌細胞の遊走促進に限定され、このことはこれらの転写因子によって誘導される異なる遺伝子がある可能性を強く示す (Sebastien J. et al., The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. Nature cell biology, 4: 540-544, 2002)。トロンボスポンジン2 (THSB2) は、細胞接着および細胞遊走に役割を果たすと思われる細胞外マトリックスタンパク質である。LMMに基づくアプローチの重要な利点の一つは、1つの標本から種々の表現型を有する癌細胞を選択しうる点である。遺伝子発現パターンの体系的分析により、浸潤の生物学的機序および病理過程を解明する手段が提供される。

40

50

## 【0202】

さらに、リンパ節転移は腫瘍進行における決定的な段階であり、乳癌患者の予後が不良である主な要因である (Shek, L. L. and Godolphin, W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Res*, 48: 5565-5569, 1988) が、診断時に臨床的に検出可能な転移を示す患者はわずかに過ぎない。診断時点でのリンパ節の状態は、将来の再発および全生存期間の最も重要な尺度であるが、これはせいぜい不完全な代用物に過ぎない。例えば、検出可能なリンパ節の併発がみられなかった患者の約3分の1で、10年以内に疾患が再発する (Saphner, T., et al., Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol*, 14: 2738-2746, 1996)。前哨リンパ節生検は腋窩リンパ節の調査において精度の高い処置であることが示されており、これは乳癌の手術関連死を顕著に減少させるとともに、腋窩切除の回避をも可能にした。核グレード、患者の年齢、腫瘍サイズといった他のパラメーターは、腋窩リンパ節の状態を予測することができず、前哨リンパ節生検によってリンパ節の状態を有効に診断することも不可能である。このため、リンパ節陽性腫瘍とリンパ節陰性腫瘍との間で差次的に発現される遺伝子のサブセットが今回同定されたことは、臨床的診断および正確な生物物理学的イベントの理解を向上させることに貢献しうる。クラスター分析 (図10) は、リンパ節転移のある症例を転移を伴わない症例と区別することを示唆している。リンパ節転移の状態に応じた2つの患者群の区別に寄与した遺伝子は、転移に関する分子マーカーとして役立つ可能性がある (Ramaswamy, S., et al., A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 33: 49-54, 2003)。例えば、これらの34個の遺伝子のうち、脂肪肉腫における転移についてTLSとして知られているFUSは、リンパ節陰性癌では減少し、ヒト骨髄性白血病において転写因子ERG-1をコードする遺伝子とともに転移する。野生型FUSの重要な機能の一つは、ゲノムの維持、特にゲノム安定性の維持である (Hicks, G. G., et al., Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet*, 24: 175-179, 2000)。転移陽性群における遺伝子のいくつかは陰性群と比較して発現レベルが上昇していた。例えば、EEF1Dに関しては、腫瘍におけるEF-1の発現がより高いことから、インピボでの悪性転換は細胞周期への進入および移行のために翻訳因子、mRNAおよびタンパク質合成の増加を必要とすることが示唆された。CFL1、Rhoタンパク質シグナル伝達およびRhoファミリーGTPアーゼは、細胞骨格および細胞遊走を調節し、腫瘍で通常過剰発現されている (Yoshizaki, H., et al., Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol*, 162: 223-232, 2003; Arthur, W. T., et al., Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res*, 35: 239-246, 2002)。B-RafキナーゼであるBRAFは、増殖因子刺激の結果としてMEKのリン酸化および活性化をすることが示された。これらの遺伝子のうちの一部の機能は依然として不明であるが、これらの遺伝子産物の機能を解明することにより、乳癌の転移におけるそれらの役割が明らかになる可能性がある。

## 【0203】

再発の原因および臨床的な経過は現時点では不明である。さらに、利用しうる臨床的、病理学的および遺伝的なマーカーに基づいて結果を高い信頼性で予測することも不可能である。これらの34個の遺伝子の発現プロファイルを利用する本発明の予測スコアシステムは、予後予測の改善のために有用である可能性はあるものの、臨床な段階に導入するためには多数の症例を用いた検証が必要と思われる。いずれにしても、本発明は、従来の組織学的診断では正しく理解されていない癌細胞の生物学的性質に関する、正確な情報を提供と考えられる。

## 【0204】

癌細胞で起こる特定の分子変化に向けた癌治療法は、進行乳癌の治療のためのトラスツズマブ (ハーセプチン) などの抗癌薬の臨床開発および規制認可によって実証されている

(Coussens, L., et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230: 1132-1139, 1985)。この薬剤は臨床的に有効であり、これは形質転換細胞のみを標的とするために従来の抗癌薬よりも耐容性が優れている。したがって、この薬剤は癌患者の生存および生活の質を改善するだけでなく、分子標的癌療法の概念をも実証している。さらに、標的薬剤は、標準的な化学療法と併用した場合に、それらの効力を増強する (Gianni, L. and Grasselli, G. Targeting the epidermal growth factor receptor a new strategy in cancer treatment. *Suppl Tumori*, 1: S60-61, 2002.; Klejman, A., et al., Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene*, 21: 5868-5876, 2002)。このため、将来の癌治療はおそらく、従来の薬剤と、血管新生および浸潤性のような癌細胞の種々の特徴を対象とする標的特異的薬剤との併用を含むと考えられる。さらに、本発明は、乳癌を有する女性の血中または乳頭吸引液中に異常な量で存在する物質のような新規腫瘍マーカーを、早期乳癌を検出するために日常的に用いられるのに十分な信頼性がある可能性も示している。

10

**【0205】**

現在、進行乳癌の患者に対して用いる有効な治療法は存在しない。このため、新たな治療アプローチおよびオーダーメイドの治療法が至急に必要である。乳癌において上方制御および下方制御される遺伝子を含む、本発明の癌特異的発現プロファイルは、患者の治療のための分子標的を同定するための有用な情報を提供するはずである。

**【0206】**

20

(表1) 組織学的表現型における高分化型と低分化型との間で発現に変化がみられる遺伝子の一覧

BR C 番号	アクセッション 番号	記号	名称	p 値
1	AF053712	TNFSF11	腫瘍壊死因子(リガンド) スーパーファミリー、メンバー11	1.2E-06
2	BF973104	LOC201725	仮想タンパク質 LOC201725	3.2E-05
3	AV752313	KPNA6	カリオフィリン $\alpha$ 6 (インポーチン $\alpha$ 7)	1.1E-04
4	AK026898	FOXP1	フォークヘッドボックス P1	7.4E-04
5	AA148107	ITGA5	インテグリン、 $\alpha$ 5 (フィブロネクチン受容体、 $\alpha$ ポリペプチド)	7.9E-04
6	AK001067	NFAT5	活性化 T 細胞核因子 5、張力応答性	8.2E-04
7	AB007919	KIAA0450	KIAA0450 遺伝子産物	1.8E-03
8	BG026429	SFRS2	スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ 2	2.0E-03
9	M87770	FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体 2(細菌発現性キナーゼ、ケラチノサイト増殖因子受容体、頭蓋顔面骨形成不全症 1、クルーゾン症候群、パイフェル症候群、ジャクソン-ワイス症候群)	2.1E-03
10	L02785	SLC26A3	溶質担体ファミリー26、メンバー3	2.7E-03
11	BF037402		ヒト、クローン MGC : 17296 IMAGE : 3460701、mRNA、全コード配列	2.8E-03
12	L12350	THBS2	トロンボスポンジン 2	2.8E-03
13	N36875		ヒト、クローン IMAGE:4994678、mRNA	3.8E-03
14	AL135342		EST、ニューロン糸状タンパク質 [ヒト] と弱い類似性 [ヒト]	4.3E-03
15	AL049426	SDC3	シンデカン 3(N-シンデカン)	4.5E-03
16	AW961424	KIAA1870	KIAA1870 タンパク質	5.2E-03
17	AA523117	DC-TM4F2	TM4SF9 に類似したテトラスパニン	5.5E-03
18	Z11531	EEF1G	真核生物翻訳伸長因子 1 $\gamma$	6.1E-03
19	AI423028	SMARCD3	SWI/SNF 関連性、マトリックス結合性、アクチン依存性のクロマチン調節因子、サブファミリーd、メンバー3	6.8E-03
20	AB002391	MN7	D15F37 (偽遺伝子)	7.1E-03
21	D32050	AARS	アラニル-tRNA 合成酵素	7.2E-03
22	BE876949	RAB7	RAB7、RAS 癌遺伝子ファミリーのメンバー	7.9E-03
23	AW291083		EST	8.0E-03
24	AI568910		EST	8.2E-03
25	AK023480	SRP72	シグナル認識粒子 72kDa	8.7E-03

10

20

30

40

【 0 2 0 7 】

(表 2) ER陽性腫瘍とER陰性腫瘍との間で発現に変化がみられる遺伝子の一覧

BR C 番号	アクセッション 番号	記号	名称	p 値
26	AW949747	GATA3	GATA 結合タンパク質 3	3.2E-20
27	BE868254	ESTs	EST	2.2E-14
28	AF037335	CA12	炭酸脱水酵素 XII	1.6E-13
29	BF724977	ASB13	アンキリンリピート、SOCSボックス含有13	8.5E-13
30	NM_004636	SEMA3B	セマドメイン、免疫グロブリンドメイン (Ig)、短鎖塩基性ドメイン、分泌性(セマトフ オリン)3B	9.7E-13
31	NM_000125	ESR1	エストロゲン受容体 1	1.2E-12
32	M73554	CCND1	サイクリン D1 (PRAD1: 副甲状腺腺腫 1)	3.9E-12
33	NM_005544	IRS1	インスリン受容体基質 1	4.4E-12
34	M14745	BCL2	B 細胞 CLL/リンパ腫 2	5.1E-12
35	BE826171	BCMP11	乳癌膜タンパク質 11	2.8E-11
36	AI087270	SIAH2	seven in absentia ホモログ 2 (ショウジョウ バエ)	2.8E-11
37	L07033	HMGCL	3-ヒドロキシメチル-3-メチルグルタルル- 補酵素 A リアーゼ(ヒドロキシメチルグル タル酸尿症)	2.8E-11
38	AB014523	ULK2	unc-51 様キナーゼ 2 (C. elegans)	4.0E-11
39	AL137588	DKFZp434 K1210	仮想タンパク質 DKFZp434K1210	5.2E-11
40	AL137566	EST	ヒト mRNA; cDNA DKFZp586G0321 (ク ローン DKFZp586G0321 由来)	5.4E-11
41	AF038421	GFRA1	GDNF ファミリー受容体 $\alpha$ 1	8.4E-11
42	AI194045	FE65L2	FE65 タンパク質 2	9.2E-11
43	BG163478	ESTs	EST、BAI1_ヒト脳特異的血管新生阻害因 子 1 前駆体と弱い類似性 [ヒト]	1.1E-10
44	M31627	XBP1	X ボックス結合タンパク質 1	1.1E-10
	AA156269	EST	ヒト、クローン IMAGE:4794107、mRNA	1.3E-10
46	NM_006763	BTG2	BTG ファミリー、メンバー2	1.9E-10
47	AW504052	SEC15L	SEC15 (出芽酵母)様	2.1E-10
48	NM_005400	PRKCE	プロテインキナーゼ C、 $\epsilon$	2.3E-10
49	AI628151	XBP1	X ボックス結合タンパク質 1	2.7E-10
50	AF043045	FLNB	フィラミン B、 $\beta$ (アクチン結合タンパク質 278)	3.5E-10
51	U31383	GNG10	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(G タンパク質)、 $\gamma$ 10	4.6E-10
52	L10333	RTN1	レティキュロン 1	5.6E-10

10

20

30

40

53	AK025099	SIGIRR	一本鎖 Ig IL-1R 関連分子	6.2E-10
54	AL039253	LIV-1	LIV-1 タンパク質、エストロゲン調節性	7.4E-10
55	AW949662	KIAA0239	KIAA0239 タンパク質	8.0E-10
56	D13629	KTN1	キネクチン 1 (キネシン受容体)	1.5E-09
57	NM_000165	GJA1	ギャップ結合タンパク質、 $\alpha$ 1、43kDa (コネキシン 43)	1.5E-09
58	AA533079	C1orf21	第 1 染色体オープンリーディングフレーム 21	1.8E-09
59	AF251056	CAPS2	カルシフォスフィン 2	1.9E-09
60	AF061016	UGDH	UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ	2.0E-09
61	U92544	MAGED2	黒色腫抗原、ファミリー D、2	2.1E-09
62	BE617536	RPL13A	リボソームタンパク質 L13a	2.4E-09
63	AK024102	MYST1	MYST ヒストンアセチルトランスフェラーゼ 1	2.5E-09
64	BF212902	EST	ヒト mRNA; cDNA DKFZp564F053 (クローン DKFZp564F053 由来)	2.8E-09
65	AK025480	FLJ21827	仮想タンパク質 FLJ21827	3.0E-09
66	AI376713	ESTs	EST、仮想タンパク質 FLJ20378 [ヒト] と弱い類似性 [ヒト]	3.6E-09
67	AI028483	ESTs	EST	3.8E-09
68	AK022249	EST	ヒト cDNA FLJ12187 fis、クローン MAMMA1000831	4.2E-09
69	AI568527	EST	ヒト cDNA FLJ34849 fis、クローン NT2NE2011687	5.0E-09
70	AL133074	TP53INP1	腫瘍タンパク質 p53 誘導性核タンパク質 1	5.3E-09
71	AF022116	PRKAB1	プロテインキナーゼ、AMP 活性化、 $\beta$ 1 非触媒性サブユニット	6.1E-09
72	AF007170	C1orf34	第 1 染色体オープンリーディングフレーム 34	9.7E-09
73	AF042081	SH3BGRL	SH3 ドメイン結合グルタミン酸リッチタンパク質様	1.2E-08
74	AK027813	MGC10744	仮想タンパク質 MGC10744	1.4E-08
75	M57609	GLI3	GLI-Kruppel ファミリーメンバー GLI3 (早期癒合指症候群)	1.7E-08
76	AL359600	EST	ヒト mRNA; cDNA DKFZp547C136 (クローン DKFZp547C136 由来)	1.9E-08
77	BQ006049	TIMP1	メタロプロテイナーゼ組織阻害因子 1 (赤血球増強活性、コラゲナーゼ阻害因子)	2.1E-08
78	AF111849	HELO1	酵母長鎖多価不飽和脂肪酸伸長酵素 2 のホモログ	2.2E-08
79	AL157499	RAB5EP	ラバプチン(rabaptin)-5	2.2E-08
80	AK023199	EST	ヒト cDNA FLJ13137 fis、クローン NT2RP3003150	2.5E-08
81	J05176	SERPINA3	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害因子、クレード A ( $\alpha$ -1 アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー 3	3.2E-08
82	AA028101	KIAA0303	KIAA0303 タンパク質	3.3E-08

10

20

30

40

83	AI300588	MAP2K4	マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ 4	4.1E-08
84	AA682861	ESTs	EST、仮想タンパク質 FLJ20378 [ヒト] と中等度の類似性 [ヒト]	4.6E-08
85	M26393	ACADS	アシル-補酵素 A デヒドロゲナーゼ、C-2~C-3 短鎖	5.4E-08
86	NM_001609	ACADSB	アシル-補酵素 A デヒドロゲナーゼ、短鎖/分枝鎖	5.5E-08
87	U91543	CHD3	クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 3	5.7E-08
88	AK023813	FLJ10081	仮想タンパク質 FLJ10081	6.0E-08
89	BF111711	FLJ20727	仮想タンパク質 FLJ20727	7.0E-08
90	AL049987	EST	ヒト mRNA; cDNA DKFZp564F112 (クローン DKFZp564F112 由来)	7.2E-08
91	AW081894	EST	EST	8.2E-08
92	AK000350	FLJ20343	仮想タンパク質 FLJ20343	1.1E-07
93	AA418493	DPP7	ジペプチジルペプチダーゼ 7	1.1E-07
94	BE674061	PIN4	タンパク質(ペプチジル-プロリル-シス/トランスイソメラーゼ)NIMA 相互作用性、4(パルブリン)	1.2E-07
95	AB011155	DLG5	discs, large(ショウジョウバエ)ホモログ 5	1.2E-07
96	L15203	TFF3	トレフォイル(trefoil) 因子 3(腸管性)	1.4E-07
97	NM_001552	IGFBP4	インスリン様増殖因子結合タンパク質 4	1.4E-07
98	M57230	IL6ST	インターロイキン 6 シグナル伝達因子(gp130、オンコスタチン M 受容体)	1.5E-07
99	N92706	EST	ヒト cDNA FLJ38461 fis、クローン FEBRA2020977	1.5E-07
100	M30704	AREG	アンフィレギュリン(シュワン腫由来増殖因子)	1.8E-07
101	AB004066	BHLHB2	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン含有、クラス B、2	2.2E-07
102	M15518	PLAT	プラスミノーゲン活性化因子、組織性	2.3E-07
103	BM697477	ShrmL	Shroom 関連タンパク質	2.4E-07
104	R45979	CELSR1	カドヘリン、EGF LAG 7 回貫通性 G 型受容体 1(flamingo ホモログ、ショウジョウバエ)	3.0E-07
105	AL049365	EST	ヒト mRNA; cDNA DKFZp586A0618 (クローン DKFZp586A0618 由来)	6.5E-07
106	NM_003225	TFF1	トレフォイル因子 1(乳癌において発現されるエストロゲン誘導性配列)	7.1E-07
107	AI733356	EST	ヒト cDNA FLJ31746 fis、クローン NT2RI2007334	7.8E-07
108	AF078853	KIAA1243	KIAA1243 タンパク質	8.2E-07
109	N30179	PLAB	前立腺分化因子	1.0E-06
110	BG026429	SFRS2	スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ 2	2.4E-06

10

20

30

40

111	AU149272	ESTs	EST	2.5E-06
112	J03827	NSEP1	ヌクレアーゼ感受性エレメント結合タンパク質 1	3.0E-06
113	AJ276469	C20orf35	第 20 染色体オープンリーディングフレーム 35	3.4E-06
114	AW295100	LOC201562	仮想タンパク質 LOC201562	3.9E-06
115	J03817	GSTM1	グルタチオン S-トランスフェラーゼ M1	4.8E-06
116	AF288571	LEF1	リンパ系エンハンサー結合因子 1	5.1E-06
117	AF069301	PECI	ペルオキシソーム D3,D2-エノイル-CoA イソメラーゼ	5.3E-06
118	AA621665	EST	EST	6.7E-06
119	AI739486	ESTs	EST	8.0E-06
120	X81438	AMPH	アンフィフィシン(乳癌 128kDa 自己抗原を有する Stiff-Man 症候群)	8.7E-06
121	U89606	PDXK	ピリドキサール(ピリドキシン、ビタミン B6)キナーゼ	8.8E-06
122	NM_017555	EGLN2	egl nine ホモログ 2 (C. elegans)	9.2E-06

10

## 【 0 2 0 8 】

(表 3) DCISおよびIDCにおいて通常上方制御される遺伝子

20

BRC 番号	アクセッション番号	記号	名称
123	D90041	NAT1	N-アセチルトランスフェラーゼ 1(アリールアミン N-アセチルトランスフェラーゼ)
124	M13755	G1P2	インターフェロン、 $\alpha$ 誘導性タンパク質(クローン IFI-15K)
125	D88308	SLC27A2	溶質担体ファミリー27(脂肪酸輸送体)、メンバー2
126	AW235061	SLC1A1	溶質担体ファミリー1(神経/上皮性高親和性グルタミン酸輸送体、システム Xag)、メンバー1
	NM_004170		
127	K02215	AGT	アンギオテンシノーゲン(セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害因子、クレード A( $\alpha$ -1 アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー8)
128	AB032261	SCD	ステアロイル-CoA デサチュラーゼ( $\delta$ -9-デサチュラーゼ)
129	NM_000909	NPY1R	ニューロペプチド Y 受容体 Y1
130	AF017790	HEC	癌において高発現、ロイシン 7 回反復配列リッチ
131	NM_007019	UBE2C	ユビキチン結合酵素 E2C
132	AF065388	TSPAN-1	テトラスパン 1
133	N70334	DUSP10	二重特異性ホスファターゼ 10
134	AA621719	NM_005496	SMC4 染色体構造維持因子 4 様 1(酵母)
135	AA676987		EST
136	AK001402	NM_018131	C10orf3
137	AW949747	NM_002051	GATA3
138	AK001472	NM_018685	ANLN
			アニリン(anillin)、アクチン結合タンパク質(scrap  homolog、ショウジョウバエ)
139	AA789233	NM_000088	COL1A1
			コラーゲン、I 型、 $\alpha$ 1
140	AF070632		ヒトクローン 24405 mRNA 配列
141	H04544	NPY1R	ニューロペプチド Y 受容体 Y1
142	AI015982	CDCA1	細胞分裂周期関連 1
143	NM_003979	RAI3	レチノイン酸誘導型 3
144	BF516445	NM_053277	CLIC6
			塩素イオン細胞内チャンネル 6
145	AI361654		
146	AI077540	NM_178530	
			ヒト cDNA FLJ38379 fis、クローン FEBRA2002986
147	AI261804		
			ヒト MSTP020 (MST020) mRNA、全コード配列
148	AK026559	TPM3	トロポミオシン 3
149	J03473	ADPRT	ADP-リボシルトランスフェラーゼ(NAD <sup>+</sup> ; ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ)

10

20

30

40

150	NM_000187		HGD	ホモゲンチジン酸 1,2-ジオキシゲナーゼ(ホモゲンチジン酸オキシダーゼ)
151	L43964		PSEN2	プレセニリン 2(アルツハイマー病 4)
152	J05581		MUC1	ムチン 1、膜貫通性
153	AA602499	XM_379784	GLCCI1	グルコシルチコイド誘導転写物 1
154	U37707		MPP3	膜タンパク質、パルミトイル化 3(MAGUK p55 サブファミリーメンバー3)
155	AB030905		CBX3	クロモボックスホモログ 3(HP1 $\gamma$ ホモログ、ショウジョウバエ)
156	AL138409	NM_198278		ヒト mRNA; cDNA DKFZp313L231 (クローン DKFZp313L231 由来)
157	AV756928		SEC61G	Sec61 $\gamma$
158	AI205684	NM_021979	HSPA2	熱ショック 70kDa タンパク質 2
159	BE739464	NM_015161	ARL6IP	ADP リボシル化因子様 6 相互作用性タンパク質
160	AI081356	NM_203463	LOC253782	仮想タンパク質 LOC253782
161	AA167194		LOC253782	仮想タンパク質 LOC253782
162	M90516		GFPT1	グルタミン-フルクトース-6-リン酸トランスアミナーゼ 1
163	AL133074	NM_033285	TP53INP1	腫瘍タンパク質 p53 誘導性核タンパク質 1
164	AL137257			ヒト、クローン IMAGE:5296692、mRNA
165	AK025240	NM_147128	LOC223082	LOC223082
166	AJ007042		WHSC1	Wolf-Hirschhorn 症候群候補 1
167	U42068		GRP58	グルコース調節型タンパク質、58kDa
168	AJ132592		ZNF281	ジンクフィンガータンパク質 281
169	W93638			EST
	AW977394		C9orf12	第 9 染色体オープンリーディングフレーム 12
171	AI347925	NM_001540	HSPB1	熱ショック 27kDa タンパク質 1
172	AK026587		NET-6	4回膜貫通型スーパーファミリーメンバーテトラスパン NET-6
173	AI264621		LASS2	LAG1 longevity assurance ホモログ 2 (出芽酵母)
174	AA767828	XM_035527	FLJ10980	仮想タンパク質 FLJ10980
175	AU142881	NM_018184	FLJ10702	仮想タンパク質 FLJ10702

10

20

30

【 0 2 0 9 】

(表 4) DCISおよびIDCにおいて通常下方制御される遺伝子

BR C 番号	アクセッション番号	記号	名称	
176	X52186	ITGB4	インテグリン、β4	
177	NM_006297	XRCC1	チャイニーズハムスター細胞において X線不完全修復補修1	
178	X73460	RPL3	リボソームタンパク質 L3	
179	NM_001436	FBL	フィブリラリン	
180	X59373	HOXD10	ホメオボックス D10	
181	J04208	IMPDH2	IMP (イノシンーリン酸)デヒドロゲナーゼ 2	
182	L24203	TRIM29	tripartite モチーフ含有 29	
183	L10340	NM_001958	EEF1A2	真核生物翻訳伸長因子 1α2
184	J04621	SDC2	シンデカン 2(ヘパラン硫酸プロテオグリカン 1、細胞表面結合性、フィブログリカン)	
185	L08424	ASCL1	achaete-scute 複合体様 1(ショウジョウバエ)	
186	AI376713	EST	EST、仮想タンパク質 FLJ20378 [ヒト] と弱 い類似性 [ヒト]	
187	AK026966	EST	ヒト cDNA: FLJ23313 fis、クローン HEP11919	
188	NM_001050	SSTR2	ソマトスタチン受容体 2	
189	AA632025	EST	EST	
190	N22918	NM_144641	FLJ32332	仮想タンパク質 FLJ32332
191	AF272043	ITM2C	内在性膜タンパク質 2C	
192	M58459	RPS4Y	リボソームタンパク質 S4、Y 連鎖性	
193	AI133697	EST	ヒト、クローン MGC : 16362 IMAGE : 3927795、mRNA、全コード配列	
194	AA780301	NM_003793	CTSF	カテプシン F
195	M92843	ZFP36	ジンクフィンガータンパク質 36、C3H 型、ホ モログ(マウス)	
196	AA570186	EST	ヒト HeLa 細胞のクローン CS0DK007YB08 のヒト全長 cDNA 5-PRIME 末端(ヒト)	
197	R56906	EST	EST	
198	AF208860	NM_014452	TNFRSF21	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メ ンバー21
199	AK025216	TAZ	PDZ 結合モチーフを有する転写コアクチベ ーター(TAZ)	
200	AA758394	PTPN1	プロテインチロシンホスファターゼ、非受容 体型 1	
201	AA628530	NM_016368	ISYNA1	ミオイノシトール 1-リン酸合成酵素 A1
202	AF161416	NM_003749	IRS2	インスリン受容体基質 2
203	AL045916	EST	EST	

10

20

30

40

204	AW340972		EST	ヒト cDNA : FLJ22864 fis、クローン KAT02164
205	AI189414		RNPC2	RNA 結合領域(RNP1、RRM)含有 2
206	AV705636		EIF3S6IP	真核生物翻訳開始因子 3、サブユニット 6 相互作用タンパク質
207	U28977		CASP4	カスパーゼ 4、アポトーシス関連システインプロテアーゼ
208	AV708528	NM_018579	MSCP	ミトコンドリア溶質担体タンパク質
209	AA022956	NM_024667	FLJ12750	仮想タンパク質 FLJ12750
210	AI928443		EST	ヒト cDNA FLJ38855 fis、クローン MESAN2010681
211	U14966		RPL5	リボソームタンパク質 L5
212	AI857997		TPBG	栄養芽層糖タンパク質
213	BF697545		MGP	マトリックス Gla タンパク質
214	AW575754	NM_152309	FLJ35564	仮想タンパク質 FLJ35564
215	AI352534	NM_001753	CAV1	カベオリン 1、カベオラタンパク質、22kDa
216	NM_001985		ETFB	電子伝達フラビントタンパク質、 $\beta$ ポリペプチド
217	AI743134	NM_006216	SERPINE2	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害因子、クレード E(ネキシシ、プラスミノーゲン活性化因子阻害因子 1 型)、メンバー 2
218	AW444709	NM_001777	CD47	CD47 抗原(Rh 関連抗原、インテグリン関連シグナル伝達因子)
219	BF688910	NM_001300	COPEB	コアプロモーターエレメント結合タンパク質
220	AI818579	NM_181847	EST	ヒト、クローン IMAGE : 3625286、mRNA、部分的コード配列
221	S95936		TF	トランスフェリン
222	AF074393		RPS6KA5	リボソームタンパク質 S6 キナーゼ、90kDa、ポリペプチド 5
223	NM_000591		CD14	CD14 抗原
224	AK027181	NM_031426	IBA2	イオン化カルシウム結合アダプター分子 2
225	X73079		PIGR	多量体免疫グロブリン受容体
226	NM_001343		DAB2	disabled ホモログ 2、マイトジェン応答性リンタンパク質(ショウジョウバエ)
227	M31452		C4BPA	補体第 4 成分結合タンパク質、 $\alpha$
228	X07696		KRT15	ケラチン 15
229	AF016004		GPM6B	糖タンパク質 M6B
230	NM_004078		CSRP1	システイン-グリシン-リッチタンパク質 1
231	L36645		EPHA4	EphA4
232	D78011		DPYS	ジヒドロピリミジナーゼ
233	W60630	NM_032801	JAM3	接合部接着分子 3
234	AW956111		D4S234E	第 4 染色体上の DNA セグメント(ユニーク)234 発現配列
235	AF035752		CAV2	カベオリン 2
236	D37766		LAMB3	ラミニン、 $\beta$ 3

10

20

30

40

237	U66406		EFNB3	エフリン-B3	
238	X52001		EDN3	エンドセリン 3	
239	NM_000856		GUCY1A3	グアニル酸シクラーゼ 1、可溶性、 $\alpha 3$	
240	U60115		FHL1	four and half LIM ドメイン 1	
241	D14520	NM_001730	KLF5	Kruppel 様因子 5(腸管)	
242	M99487		FOLH1	葉酸加水分解酵素(前立腺特異的膜抗原)1	
243	U09873		FSCN1	ファシンホモログ 1、アクチン束化タンパク質 (ムラサキウニ)	
244	AF017418		MEIS2	Meis1、骨髄性エコトロピックウイルス組込み 部位 1 ホモログ 2(マウス)	10
245	AF038540	NM_206900	RTN2	レティキュロン 2	
246	AF049884	NM_021069	ARGBP2	Arg/Abl 相互作用性タンパク質 ArgBP2	
247	NM_001122		ADFP	脂肪分化関連タンパク質	
248	Y09926		MASP2	マンナン結合性レクチンセリンプロテアーゼ 2	
249	M58297		ZNF42	ジンクフィンガータンパク質 42(骨髄性特異的 レチノイン酸応答性)	
250	AF035811		PNUTL2	peanut 様 2(ショウジョウバエ)	
251	L22214		ADORA1	アデノシン A1 受容体	
252	AF177775		CES1	カルボキシエステラーゼ 1(単球/マクロファージ セリンエステラーゼ 1)	20
253	U07643		LTF	ラクトトランスフェリン	
254	S76474	NM_006180	NTRK2	神経栄養性チロシンキナーゼ、受容体、2 型	
255	BE299605	NM_012219	MRAS	筋 RAS 癌遺伝子ホモログ	
256	NM_006225		PLCD1	ホスホリパーゼ C、 $\delta 1$	
257	NM_005036		PPARA	ペルオキシソーム増殖活性化受容体、 $\alpha$	
258	M22324		ANPEP	アラニル(膜)アミノペプチダーゼ(アミノペプ チダーゼ N、アミノペプチダーゼ M、ミクロソ ーム性アミノペプチダーゼ、CD13、p150)	30
259	BE877416		TGFBR2	トランスフォーミング増殖因子、 $\beta$ 受容体 II (70/80kDa)	
260	BE561244		RPL18A	リボソームタンパク質 L18a	
261	AL048962		EST	ヒト、クローン IMAGE : 4243767、mRNA	
262	L08895		MEF2C	MADS ボックス転写エンハンサー因子 2、ポ リペプチド C(筋細胞エンハンサー因子 2C)	
263	U48707		PPP1R1A	タンパク質ホスファターゼ 1、調節(阻害因子) サブユニット 1A	
264	X56134		RPLP2	リボソームタンパク質、ラージ P2	
265	D84239		FCGBP	IgG 結合タンパク質の Fc 断片	40
266	AK026181		PHLDA1	プレクストリン相同様ドメイン、ファミリー A、メンバー 1	
267	K01144		CD74	CD74 抗原(主要組織適合性複合体の不変ポリ ペプチド、クラス II 抗原関連)	
268	U25138		KCNMB1	カリウム高コンダクタンスカルシウム活性型 チャンネル、サブファミリー M、 $\beta$ メンバー 1	

269	X85337	NM_053025	MYLK	ミオシン、軽鎖ポリペプチドキナーゼ
270	D83597		LY64	リンパ球抗原 64 ホモログ、放射能防御性 105kDa(マウス)
271	NM_004024		ATF3	活性化転写因子 3
272	BF126636		SAA1	血清アミロイド A1
273	D13789		MGAT3	マンノシル( $\beta$ -1,4)-糖タンパク質 $\beta$ -1,4-N-ア セチルグルコサミニルトランスフェラーゼ
274	L41142		STAT5A	シグナル伝達因子および転写活性化因子 5A
275	AB040969		KIAA1536	KIAA1536 タンパク質
276	NM_002153		HSD17B2	ヒドロキシステロイド(17- $\beta$ )デヒドロゲナーゼ 2
277	AV646610	NM_001546	ID4	DNA 結合阻害因子 4、ドミナントネガティブ ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質
278	X03663		CSF1R	コロニー刺激因子 1 受容体、以前の McDonough ネコ肉腫ウイルス(v-fms)癌遺伝 子ホモログ
279	U47025		PYGB	ホスホリラーゼ、グリコーゲン ; 脳
280	M81349		SAA4	血清アミロイド A4、構成性
281	AI264201	NM_000399	EGR2	初期増殖応答因子 2(Krox-20 ホモログ、ショウ ジョウバエ)
282	U18018		ETV4	ets バリアント遺伝子 4(E1A エンハンサー結 合タンパク質、E1AF)
283	NM_004350		RUNX3	runt 関連転写因子 3
284	BF337516		CRYAB	クリスタリン、 $\alpha$ B
285	AF027208		PROML1	プロミン様 1(マウス)
286	D17408		CNN1	カルポニン 1、塩基性、平滑筋
287	NM_004010		DMD	ジストロフィン(筋ジストロフィー、Duchenne 型および Becker 型)
288	BF183952		CSTA	シスタチン A(ステフィン A)
289	M16445		CD2	CD2 抗原(p50)、ヒツジ赤血球受容体
290	AF055015		EYA2	eyes absent ホモログ 2(ショウジョウバエ)
291	AI745624		ELL2	ELL 関連 RNA ポリメラーゼ II、伸長因子
292	AK025329		DKFZP566H073	DKFZP566H073 タンパク質
293	BE745465	NM_012427	KLK5	カリクレイン 5
294	AK024578	NM_031455	DKFZP761F241	仮想タンパク質 DKFZp761F241
295	AI870306	XM_380171	IRX1	iroquois ホメオボックスタンパク質 1
296	H37853	NM_022343	C9orf19	第 9 染色体オープンリーディングフレーム 19
297	BF000047		EST	ヒト全長挿入物 cDNA クローン ZA79C08
298	AF126780		RetSDR2	レチナール短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ 2
299	AI700341		EST	EST、仮想タンパク質 FLJ20489 [ヒト] と弱 い類似性 [ヒト]

10

20

30

40

300	M87770		FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体 2(細菌発現性キナーゼ、ケラチノサイト増殖因子受容体、頭蓋顔面骨形成不全症 1、クルーズン症候群、パイフェル症候群、ジャクソン-ワイス症候群)
301	AA452368	NM_144595	FLJ30046	仮想タンパク質 FLJ30046
302	NM_021200		PLEKHB1	プレクストリン相同ドメイン含有、ファミリーB(エベクチン)メンバー1
303	AK026343		hIAN2	ヒト免疫関連ヌクレオチド 2
304	AF251040		C5orf6	第 5 染色体オープンリーディングフレーム 6
305	M87507		CASP1	カスパーゼ 1、アポトーシス関連システインプロテアーゼ(インターロイキン 1、 $\beta$ 、コンバターゼ)
306	M97675		ROR1	受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1
307	NM_020549		CHAT	コリンアセチルトランスフェラーゼ
308	X00457	NM_033554	HLA-DPA1	主要組織適合複合体、クラス II、DP $\alpha$ 1
309	W72411	NM_003722	TP73L	腫瘍タンパク質 p73 様
310	AI769569		EST	EST
311	K02765		C3	補体第 3 成分
312	AW971490		FLJ14906	仮想タンパク質 FLJ14906
313	AF077044		RPAC2	マウス RNA ポリメラーゼ 1-3 のオルソログの可能性が高いもの(16kDa サブユニット)
314	H70803	NM_015278	KIAA0790	KIAA0790 タンパク質
315	AL050367	XM_167709	LOC221061	仮想タンパク質 LOC221061
316	AK001643	NM_018215	FLJ10781	仮想タンパク質 FLJ10781
317	AW182273		EST	ヒト cDNA FLJ31517 fis、クローン NT2RI2000007
318	W67951		EST	第 6 染色体が抑制された黒色腫細胞で発現される、ヒト S6 A-5 mRNA
319	AL117605		EST	ヒト mRNA ; cDNA DKFZp564N1063(クローン DKFZp564N1063 由来)
320	AI376418		EST	ヒト cDNA FLJ35169 fis、クローン PLACE6012908
321	AA683373		EST	EST
322	AK022877		EST	ヒト cDNA FLJ12815 fis、クローン NT2RP2002546
323	NM_002258		KLRB1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリー B、メンバー1
324	M69225		BPAG1	水泡性類天疱瘡抗原 1、230/240kDa
325	AW299572	NM_015461	EHZF	初期造血性ジンクフィンガー
326	BE044467	NM_005737	ARL7	ADP-リボシル化因子様 7
327	AA938297	NM_017938	FLJ20716	仮想タンパク質 FLJ20716
328	AA706316	NM_033317	ZD52F10	仮想的遺伝子 ZD52F10
329	AI827230	NM_153000	APCDD1	線腫症下方制御1
330	AK000251		FLJ20244	仮想タンパク質 FLJ20244

10

20

30

40

331	N62352	NM_020925	KIAA1573	KIAA1573 タンパク質
332	H53164		ICSBP1	インターフェロンコンセンサス配列結合タンパク質 1
333	BE394824		WFDC2	WAP 4-ジスルフィド性コアドメイン 2
334	AL117462	NM_015481	ZFP385	マウスジンクフィンガータンパク質 385 のオルソログ様
335	NM_003186		TAGLN	トランスゲリン(transgelin)
336	U58514		CHI3L2	キチナーゼ 3 様 2
337	AB026125		ART-4	ART-4 タンパク質
338	AL080059	NM_033512	KIAA1750	KIAA1750 タンパク質
339	AA747005		SDCCAG43	血清学的に定義された結腸癌抗原 43
340	NM_005928		MFGE8	乳脂球状 EGF 因子 8 タンパク質
341	D62470	NM_004796	NRXN3	ニューレキシン 3
342	N29574		RAGD	Rag D タンパク質
343	K02276		MYC	v-myc 骨髄球症ウイルス癌遺伝子ホモログ(トリ)
344	D78611		MEST	中胚葉特異的転写物ホモログ(マウス)
345	NM_022003		FXD6	FXD6 ドメイン含有イオン輸送調節因子 6
346	BF508973		RPL13	リボソームタンパク質 L13
347	NM_001615		ACTG2	アクチン、 $\gamma$ 2、平滑筋、腸内
348	R41532		EST	EST、POL2_マウスレトロウイルス関連 POL ポリタンパク質 [以下を含む: 逆転写酵素; エンドヌクレアーゼ] と弱い類似性 [マウス]
349	AA142875		EST	EST
350	U03688		CYP1B1	シトクロム P450、ファミリー1、サブファミリーB、ポリペプチド 1
351	W94363		EST	ヒト全長挿入物 cDNA クローン ZE12G01
352	W44613		HSJ001348	差次的に発現される CO16 遺伝子の cDNA
353	AL118812		EST	ヒト mRNA ; cDNA DKFZp761G1111(クローン DKFZp761G1111 由来)
354	D56064		MAP2	微小管結合タンパク質 2
355	BF966838	NM_172069	KIAA2028	PH(プレクストリン相同)ドメインと類似
356	AI338625	NM_014344	FJX1	four jointed box 1 (ショウジョウバエ)
357	AI263022		EST	EST
358	AL050107	NM_015472	TAZ	PDZ 結合モチーフを有する転写コアクチベーター(TAZ)
359	AI056364	NM_033210	FLJ14855	仮想タンパク質 FLJ14855
360	AI351898	NM_032581	DRCTNNB1A	Ctnnb1 により下方制御されるもの、a
361	AV700003		ARL6IP2	ADP-リボシル化様因子 6 相互作用タンパク質 2
362	NM_000700		ANXA1	アネキシン A1
363	M81141		HLA-DQB1	主要組織適合複合体、クラス II、DQ $\beta$ 1
364	AI598227	NM_024911	FLJ23091	仮想タンパク質 FLJ23091
365	BG034740		ROPN1	ロップリン(ropporin)、ロフィリン(rhophilin) 結合タンパク質 1
366	AB011175		TBC1D4	TBC1 ドメインファミリー、メンバー4

10

20

30

40

367	AK024449		PP2135	PP2135 タンパク質
368	AW978770		DKFZP566A152 4	仮想タンパク質 DKFZp566A1524
369	AI821113		EST	ヒト cDNA FLJ36327 fis、クローン THYMU2005748
370	AI057450		SLC13A2	溶質担体ファミリー13(ナトリウム依存性ジ カルボン酸輸送体)、メンバー2
371	X86693		SPARCL1	SPARC 様 1(mast9、ヘビン)
372	AI224952	NM_173640	FLJ40906	仮想タンパク質 FLJ40906
373	D13639		CCND2	サイクリン D2

10

## 【 0 2 1 0 】

(表5) DCISからIDCへの移行において発現が上昇する遺伝子

BR C 番号	アクセッション番号	記号	名称	
374	U74612	FOXMI	フォークヘッドボックス M1	
375	U63743	KIF2C	キネシンファミリーメンバー2C	
376	D88532	PIK3R3	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、調節サブユニット、ポリペプチド3(p55、 $\gamma$ )	
377	NM_005532	IFI27	インターフェロン、 $\alpha$ 誘導性タンパク質 27	
378	D14657	KIAA0101	KIAA0101 遺伝子産物	
379	AF030186	GPC4	グリピカン 4	
380	Z11566	STMN1	スタスミン 1/腫瘍性タンパク質 18	
381	U90914	NM_001304	CPD	カルボキシペプチダーゼ D
382	NM_002534	OAS1	2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 1、40/46kDa	
383	S67310	BF	B 因子、プロペルジン	
384	AA192445	NM_020182	TMEPAI	膜貫通性、前立腺アンドロゲン誘導 RNA
385	AB003103	PSMD12	プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン)26S サブユニット、非 ATP アーゼ、12	
386	BE878057	NM_030796	DKFZP564 K0822	仮想タンパク質 DKFZp564K0822
387	AB003698	CDC7L1	CDC7 細胞分裂周期 7 様 1 (出芽酵母)	
388	M91670	E2-EPF	ユビキチン担体タンパク質	
389	AK023414	FLJ13352	仮想タンパク質 FLJ13352	
390	L09235	ATP6V1A1	ATP アーゼ、H <sup>+</sup> 輸送性、リソソーム性 70kDa、V1 サブユニット A、アイソフォーム 1	
391	AF007152	ABHD3	アブヒドロラーゼドメイン含有 3	
392	U33632	KCNK1	カリウムチャンネル、サブファミリーK、メンバー1	
393	AA621719	NM_005496	SMC4L1	SMC4 染色体構造維持因子 4 様 1(酵母)
394	AF176228	DNMT3B	DNA (シトシン-5)-メチルトランスフェラーゼ 3 $\beta$	
395	H22566	NM_080759	DACH	dachshund ホモログ(ショウジョウバエ)
396	AI185804	NM_212482	FN1	フィブロネクチン 1
397	AI189477	NM_002168	IDH2	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2(NADP <sup>+</sup> )、ミトコンドリア
398	AA205444	AP1S2	アダプター関連タンパク質複合体 1、 $\sigma$ 2 サブユニット	

10

20

30

【 0 2 1 1 】

(表 6) DCISから IDCへの移行において発現が低下する遺伝子

40

	アクセッション番号	記号	名称
399	AF070609	NM_004172	SLC1A3 溶質担体ファミリー1(グリア高親和性グルタミン酸輸送体)、メンバー3
400	U85267		DSCR1 ダウン症候群重要領域遺伝子 1
401	NM_005397		PODXL ポドカリキシン(podocalyxin)様
402	D13811		AMT アミノメチルトランスフェラーゼ(グリシン切断系タンパク質 T)
403	X53586		ITGA6 インテグリン、 $\alpha 6$
404	L13288		VIPR1 血管作動性腸管ペプチド受容体 1
405	M12125		TPM2 トロポミオシン 2( $\beta$ )
406	M65066	NM_002735	PRKAR1B プロテインキナーゼ、cAMP 依存性、調節性、I型、 $\beta$
407	AJ001183		SOX10 SRY (性決定領域 Y)ボックス 10
408	AW241712		MXI1 MAX 相互作用タンパク質 1
409	AL160111		KIAA1649 KIAA1649 タンパク質
410	X93920		DUSP6 二重特異性ホスファターゼ 6
411	AF132734	NM_021807	SEC8 分泌タンパク質 SEC8
412	AI133467		EST
413	D88153		HYA22 HYA22 タンパク質
414	AF014404		PTE1 ペルオキシソーム性アシル-CoA チオエステラーゼ
415	BE907755	NM_013399	C16orf5 第 16 染色体オープンリーディングフレーム 5
416	AA135341	NM_021078	GCN5L2 GCN5 アミノ酸合成の全般制御 5 様 2(酵母)
417	AL110126		ヒト mRNA ; cDNA DKFZp564H1916(クローン DKFZp564H1916 由来)
418	BE254330	NM_003045	ヒト mRNA ; cDNA DKFZp564D016(クローン DKFZp564D016 由来)
419	BE264353		RBP1 レチノール結合タンパク質 1、細胞性
420	W75991		ヒト、クローン IMAGE : 4249217、mRNA
421	AF091434		PDGFC 血小板由来増殖因子 C
422	W67577		CD74 CD74 抗原(主要組織適合性複合体の不変ポリペプチド、クラス II 抗原関連)
423	NM_002996		CX3CL1 ケモカイン(C-X3-C モチーフ)リガンド 1
424	AA024459		EST
425	NM_000163		GHR 成長ホルモン受容体
426	AA858162	NM_032160	NCAG1 NCAG1
427	BE327623		EST、仮想タンパク質 FLJ20234 [ヒト] と弱い類似性 [ヒト]
428	BE671156		MAPRE2 微小管結合タンパク質、RP/EB ファミリー、メンバー2

10

20

30

40

429	D12614		LTA	リンホトキシン $\alpha$ (TNFスーパーファミリー、メンバー1)
430	L13720		MGC5560	仮想タンパク質 MGC5560
431	U15131		ST5	腫瘍形成抑制因子 5
432	Y00711		LDHB	乳酸デヒドロゲナーゼ B
433	AI651212			ヒト cDNA FLJ31125 fis、クローン IMR322000819
434	M31159		IGFBP3	インスリン様増殖因子結合タンパク質 3
435	NM_014447		HSU52521	アーファプチン(arfaptin)1
436	AB011089		TRIM2	tripartite モチーフ含有 2
437	BF969355	NM_002612	PDK4	ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、イソ 酵素 4
438	AK025950	XM_371114	KIAA1695	仮想タンパク質 FLJ22297
439	D86961	NM_005779	LHFPL2	脂肪腫 HMGIC 融合パートナー様 2
440	AK025953			ヒト cDNA : FLJ22300 fis、クローン HRC04759
441	AJ223812		CALD1	カルデスモン 1
442	R40594			ヒト cDNA : FLJ22845 fis、クローン KAIA5195
443	AF145713		SCHIP1	シュワノミン相互作用タンパク質 1
444	AK024966		FLJ21313	仮想タンパク質 FLJ21313
445	NM_005596		NFIB	核因子 I/B
446	NM_001613		ACTA2	アクチン、 $\alpha$ 2、平滑筋、大動脈
447	H03641	XM_376328	FAM13A1	配列類似性を有するファミリー13、メンバー A1

10

20

## 【 0 2 1 2 】

(表7) IDCにおいて通常上方制御される遺伝子

BR C 番号	アクセッション番号	記号	名称	
448	X14420	COL3A1	コラーゲン、III型、 $\alpha 1$ (Ehlers-Danlos 症候群 IV型、常染色体優性)	
449	AF044588	PRC1	細胞質分裂のタンパク質調節因子 1	
	AF161499	HSPC150	ユビキチン結合酵素に類似した HSPC150 タンパク質	
451	AA789233	NM_000088	COL1A1	コラーゲン、I型、 $\alpha 1$
452	U16306	CSPG2	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2(バージョン)	
453	NM_004425	ECM1	細胞外マトリックスタンパク質 1	
454	NM_006855	KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) 小胞体タンパク質保持受容体 3	
455	AI972071	NM_031966	CCNB1	サイクリン B1
456	AF237709	NM_018492	TOPK	T-LAK 細胞から生じるプロテインキナーゼ
457	BE747327	HIST1H1C	ヒストン 1、H1c	
458	J03464	COL1A2	コラーゲン、I型、 $\alpha 2$	
459	AI080640	NM_006408	AGR2	anterior gradient 2 ホモログ(アフリカツメガエル)
460	AA971042	RHPN1	ロフィリン、Rho GTP アーゼ結合タンパク質 1	
461	AI419398	MGC33662	仮想タンパク質 MGC33662	
462	AI149552	NM_004448	EST、ERB2_ヒト受容体タンパク質-チロシンキナーゼ erbB-2 前駆体(p185erbB2)(NEU 前癌遺伝子)(C-erbB-2)(チロシンキナーゼ型細胞表面受容体 HER2)(MLN 19)と中等度の類似性 [ヒト]	
463	D14874	ADM	アドレノメデュリン	
464	X03674	NM_000402	G6PD	グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ
465	NM_002358	MAD2L1	MAD2 分裂停止欠損様 1(酵母)	
466	BF214508	CYCS	シトクロム c、体細胞性	
467	BG030536	NM_001067	TOP2A	トポイソメラーゼ(DNA)II $\alpha$ 170kDa
468	X57766	MMP11	マトリックスメタロプロテイナーゼ 11(ストロメライン 3)	
469	AA029900	NM_015170	SULF1	スルファターゼ 1
470	AF053306	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 ホモログ $\beta$ (酵母)	
471	AF074002	LGALS8	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、8(ガレクチン 8)	

10

20

30

40

【 0 2 1 3 】

(表 8) IDCにおいて通常下方制御される遺伝子

BR C 番号	アクセッション番号	記号	名称	
472	NM_004484	GPC3	グリピカン3	
473	NM_006219	PIK3CB	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、触媒性、 $\beta$ ポリペプチド	
474	BE793000	RBP1	レチノール結合タンパク質1、細胞性	
475	AL117565	NM_033027	AXUD1	AXIN1上方制御1
476	BF055342	ZNF6	ジンクフィンガータンパク質6 (CMPX1)	
477	U03688	CYP1B1	シトクロム P450、ファミリー1、サブファミリーB、ポリペプチド1	
478	AF038193	NM_004311		ヒト、クローン IMAGE : 3610040、mRNA
479	X72760	NM_002292	LAMB2	ラミニン、 $\beta$ 2(ラミニンS)
480	J03817	GSTM1	グルタチオンS-トランスフェラーゼ M1	
481	M69226	MAOA	モノアミンオキシダーゼ A	
482	BF690180	NM_006990	WASF2	WAS タンパク質ファミリー、メンバー2
483	AL133600	STAM2	シグナル伝達アダプター分子(SH3 ドメインおよびITAM モチーフ)2	
484	AF215981	GPR2	G タンパク質共役受容体 2	
485	BG149764		ヒト、クローン IMAGE : 5286091、mRNA、部分的コード配列	
486	AF067800	CLECSF6	C型(カルシウム依存性、炭水化物認識ドメイン)レクチン、スーパーファミリーメンバー6	
487	AA713487	PIK3R1	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、調節サブユニット、ポリペプチド1(p85 $\alpha$ )	
488	AA828505	FBXW7	Fボックス・WD-40ドメインタンパク質7(archipelago ホモログ、ショウジョウバエ)	
489	AK021865	CKIP-1	CK2相互作用タンパク質1 ; HQ0024cタンパク質	
490	AK001605	FLJ10743	仮想タンパク質 FLJ10743	
491	AI041186	HSPC182	HSPC182 タンパク質	
492	AA873363	NM_144650	ADH8	アルコールデヒドロゲナーゼ 8
493	NM_013409	FST	フォリスタチン	
494	AK000322	FLJ20315	仮想タンパク質 FLJ20315	
495	AB020637	XM_290546	KIAA0830	KIAA0830 タンパク質
496	AA872040	INHBB	インヒビン、 $\beta$ B(アクチビン AB $\beta$ ポリペプチド)	
497	NM_004430	EGR3	初期増殖応答因子 3	
498	D59989		EST	
499	D78013	DPYSL2	ジヒドロピリミジナーゼ様 2	
500	AI081821		ヒト mRNA ; cDNA DKFZp313M0417(クローン DKFZp313M0417)	
501	AA309603	KIAA1430	KIAA1430 タンパク質	

10

20

30

40

502	NM_004107		FCGRT	IgG の Fc 断片、受容体、輸送体、 $\alpha$
503	AW268719			ヒト cDNA FLJ32438 fis、クローン SKMUS2001402
504	BF446578	NM_145313	LOC221002	CG4853 遺伝子産物
505	BG054844	NM_005168	ARHE	ras ホモログ遺伝子ファミリー、メンバーE
506	AF054987		ALDOC	アルドラーゼ C、フルクトース-ビスリン酸
507	AI052390		FLJ20071	ジメクリン(dymeclin)
508	NM_004530		MMP2	マトリックスメタロプロテイナーゼ 2(ゼラチナーゼ A、72kDa ゼラチナーゼ、72kDa IV 型 コラーゲナーゼ)
509	AF054999	NM_001431	EPB41L2	赤血球膜タンパク質バンド 4.1 様 2
510	AU151591	NM_182964	NAV2	ニューロンナビゲーター2
511	AA447744			EST
512	R61253		ST6GalII	$\beta$ -ガラクトシド $\alpha$ -2,6-シアリルトランスフェラーゼ II

10

## 【 0 2 1 4 】

(表 9) 半定量的 RT-PCR 実験用のプライマー配列

アクセッション番号	記号	順方向プライマー	逆方向プライマー
AI261804	EST	5'-CTGTTCTGGC TTCGTTA TGT TCT-3' (SEQ ID NO:1)	5'-AGAAAATACG GTCCTCT TGT TGC-3' (SEQ ID NO:2)
AA205444	AP1S2	5'-CACTGTAATG CACGAC ATTT GA-3' (SEQ ID NO:3)	5'-GTTACAGCTT AGCACAA GGC ATC-3' (SEQ ID NO:4)
AA167194	LOC253782	5'-ACCTCTGAGT TTGATTT CCC AA-3' (SEQ ID NO:5)	5'-CGAGGCTTGT AACAATC TAC TGG-3' (SEQ ID NO:6)
AA676987	EST	5'-GAAACTGTAC GGGGGT TAAA GAG-3' (SEQ ID NO:7)	5'-CATCAATGTG GTGAGTG ACA TCT-3' (SEQ ID NO:8)
H22566	DACH	5'-AAGCCCTTGG AACAGA ACAT ACT-3' (SEQ ID NO:9)	5'-CAGTAAACGT GGTTCCTC ACA TTG-3' (SEQ ID NO:10)
NM_018492	TOPK	5'-AGACCCTAAAGATCGTC CTTCTG-3' (SEQ ID NO:13)	5'-GTGTTTAAAGTCAGCATG AGCAG-3' (SEQ ID NO:14)
NM_002046	GAPD	5'-CGACCACTTT GTCAAG CTCA-3' (SEQ ID NO:11)	5'-GGTTGAGCAC AGGGTAC TTT ATT-3' (SEQ ID NO:12)

20

30

## 【 0 2 1 5 】

(表 10) 単一の症例における高分化型と低分化型との間で発現に変化がみられる遺伝子の一覧

40

BR C 番号	アクセッション番号	記号	名称	p 値
513	AV729269 XM_371074	DKFZP564D 166	推定アンキリン反復配列含有タンパク質	3.1E-07
514	AI246554 NM_014222	NDUFA8	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノ ン)1 $\alpha$ 部分複合体、8、19kDa	1.4E-06
515	J04080	C1S	補体第 1 成分、s 小成分	1.4E-05
516	N93264	EST	ヒト、クローン IMAGE : 4908933、 mRNA	1.4E-05
517	NM_002318	LOXL2	リシルオキシダーゼ様 2	1.6E-05
518	J03464	COL1A2	コラーゲン、I 型、 $\alpha 2$	2.4E-05
519	U01184 NM_002018	FLII	flightless I ホモログ(ショウジョウバエ)	2.5E-05
520	X63556	FBN1	フィブリニン 1(Marfan 症候群)	3.8E-05
521	X78137	PCBP1	ポリ(rC)結合タンパク質 1	4.6E-05
522	AK021534	EST	ヒト cDNA FLJ11472 fis、クローン HEMBA1001711	6.3E-05
523	AK024012	NPD002	NPD002 タンパク質	6.3E-05
524	AI200892	BIK	BCL2 相互作用阻止因子(アポトーシ ス誘導性)	9.1E-05
525	J03040	SPARC	分泌性タンパク質、酸性、システインリ ッチ(オステオネクチン)	9.3E-05
526	AW970143	C6orf49	第 6 染色体オープンリーディングフレ ーム 49	1.0E-04
527	D62873	EST	ヒト、クローン IMAGE : 5288080、 mRNA	1.2E-04
528	D42041	G2AN	$\alpha$ グルコシダーゼ II $\alpha$ サブユニット	1.2E-04
529	AI376418	EST	ヒト cDNA FLJ35169 fis、クローン PLACE6012908	1.7E-04
530	AK026744 NM_024911	FLJ23091	仮想タンパク質 FLJ23091	1.8E-04
531	AF026292	CCT7	TCP1 含有シャペロニン、サブユニッ ト 7( $\eta$ )	2.0E-04
532	Y10805	HRMT1L2	HMT1 hnRNP メチルトランスフェラ ーゼ様 2 (出芽酵母)	2.1E-04
533	L12350	THBS2	トロンボスポンジン 2	2.1E-04
534	AK025706	AMPD2	アデノシンーリン酸デアミナーゼ 2(ア イソフォーム L)	2.4E-04
535	BE618804	PIG11	p53 誘導型タンパク質	2.5E-04
536	AV713686	RPS29	リボソームタンパク質 S29	2.8E-04
537	M26481	TACSTD1	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子 1	2.8E-04

10

20

30

40

538	D00099		ATP1A1	ATP アーゼ、Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> 輸送性、 $\alpha$ 1 ポリペプチド	2.9E-04
539	AA946602		ORMDL2	ORM1 様 2 (出芽酵母)	2.9E-04
540	NM_001533		HNRPL	ヘテロ核リボ核タンパク質 L	3.9E-04
541	BG107866		SIVA	CD27 結合(Siva)タンパク質	4.4E-04
542	W72297	NM_017866	FLJ20533	仮想タンパク質 FLJ20533	4.4E-04
543	U76992		HTATSF1	HIV TAT 特異的因子 1	4.8E-04
544	AA191454	NM_198897	FIBP	線維芽細胞増殖因子(酸性)細胞内結合タンパク質	4.9E-04
545	BE903483		RPS20	リボソームタンパク質 S20	5.4E-04
546	AJ005282		NPR2	ナトリウム利尿ペプチド受容体 B/グアニル酸シクラーゼ B(心房ナトリウム利尿ペプチド受容体 B)	5.5E-04
547	D86322		CLGN	カルメジン	5.7E-04
548	AA621665		EST	EST	5.8E-04
549	M77349		TGFBI	トランスフォーミング増殖因子、 $\beta$ 誘導型、68kDa	6.3E-04
550	BE176466		ZAP3	ZAP3 タンパク質	6.6E-04
551	AA776882	NM_030795	STMN4	スタスミン様 4	7.1E-04
552	AI261382	NM_016334	SH120	推定 G タンパク質共役受容体	7.1E-04
553	AB007618		COX7A2L	シトクロム c オキシダーゼサブユニット VIIa ポリペプチド 2 様	7.2E-04
554	D21261		TAGLN2	トランスゲリン 2	7.5E-04
555	M68864		LOC51035	ORF	7.7E-04
556	AB007836		TGFB11	トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 1 誘導転写物 1	8.1E-04
557	AA173339		EST	EST	8.4E-04
558	D87810		PMM1	ホスホマンノムターゼ 1	8.4E-04
559	M15798	NM_183356	ASNS	アスパラギン合成酵素	8.7E-04
560	AW072418		B7	B7 タンパク質	9.0E-04
561	D38293		AP3M2	アダプター関連タンパク質複合体 3、 $\mu$ 2 サブユニット	9.5E-04
562	NM_018950		HLA-F	腫瘍組織適合性複合体、クラス I、F	1.0E-03
563	NM_001219		CALU	カルメニン(calumenin)	1.1E-03
564	J04162		FCGR3A	IgG の Fc 断片、低親和性 IIIa、(CD16) に対する受容体	1.1E-03
565	U09873		FSCN1	ファシンホモログ 1、アクチン束化タンパク質(ムラサキウニ)	1.1E-03
566	N51082	NM_080759	DACH	dachshund ホモログ(ショウジョウバエ)	1.3E-03
567	NM_004199		P4HA2	プロコラーゲン-プロリン、2-オキシグルタレート 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、 $\alpha$ ポリペプチド II	1.3E-03

10

20

30

40

568	BE904196		GNB1	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質)、 $\beta$ ポリペプチド 1	1.3E-03
569	L08895		MEF2C	MADS ボックス転写エンハンサー因子 2、ポリペプチド C(筋細胞エンハンサー因子 2C)	1.3E-03
570	AK022670	NM_016649	C20orf6	第 20 染色体オープンリーディングフレーム 6	1.3E-03
571	AW157725		POLR2F	ポリメラーゼ(RNA)II(DNA 依存性)ポリペプチド F	1.4E-03
572	NM_004939		DDX1	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) ボックスポリペプチド 1	1.4E-03
573	X65463	NM_021976	RXRB	レチノイド X 受容体、 $\beta$	1.5E-03
574	Z68179		LY6E	リンパ球抗原 6 複合体、座位 E	1.5E-03
575	BF976420		SNRPF	核内低分子リボ核タンパク質ポリペプチド F	1.5E-03
576	D79986		BTF	Bcl-2 関連転写因子	1.5E-03
577	AK001023		NUBP2	ヌクレオチド結合タンパク質 2(MinD ホモログ、大腸菌)	1.6E-03
578	BE065329		EST	EST	1.6E-03
579	L34600		MTIF2	ミトコンドリア翻訳開始因子 2	1.7E-03
580	D13630		BZW1	塩基性ロイシンジッパー・W2 ドメイン 1	1.7E-03
581	X15880	NM_001848	COL6A1	コラーゲン、VI 型、 $\alpha 1$	1.7E-03
582	AB003723		PIGQ	ホスファチジルイノシトールグリカン、クラス Q	1.7E-03
583	L36645		EPHA4	EphA4	1.7E-03
584	BF974358		RPS27	リボソームタンパク質 S27 (メタロパンスティミュリン 1)	1.8E-03
585	AA747449		HIP2	ハンチンチン相互作用タンパク質 2	1.9E-03
586	AA283813		FLJ12150	仮想タンパク質 FLJ12150	2.0E-03
587	L38995	NM_003321	TUFM	Tu 翻訳伸長因子、ミトコンドリア	2.0E-03
588	N67293		EST	ヒト cDNA FLJ11997 fis、クローン HEMBB1001458	2.1E-03
589	AB014549		KIAA0649	KIAA0649 遺伝子産物	2.1E-03
590	D38305		TOB1	ERBB2 伝達因子、1	2.2E-03
591	L40391	NM_006827	TMP21	膜貫通性輸送タンパク質	2.2E-03
592	H28960		EST	EST	2.2E-03
593	U86753		CDC5L	CDC5 細胞分裂周期 5 様(分裂酵母)	2.3E-03
594	AI143226		BLP1	BBP 様タンパク質 1	2.3E-03
595	M57730		EFNA1	エフリン A1	2.3E-03
596	AI928868		UBR1	ユビキチンタンパク質リガーゼ E3 成分 n-レコグニン 1	2.3E-03
597	AF077044		RPAC2	マウス RNA ポリメラーゼ 1-3(16kDa サブユニット)のオルソログ様	2.3E-03

10

20

30

40

598	AF097431		LEPRE1	ロイシンプロリン-リッチプロテオグリカン(レプレカン)1	2.4E-03
599	NM_004350		RUNX3	runt 関連転写因子 3	2.4E-03
600	AL162047		NCOA4	核受容体コアクチベータ 4	2.5E-03
601	BF915013		EST	ヒト cDNA FLJ37302 fis、クローン BRAMY2016009	2.5E-03
602	Z37166		BAT1	HLA-B 関連転写物 1	2.5E-03
603	M81349		SAA4	血清アミロイド A4、構成性	2.6E-03
604	AL137338	NM_007214	SEC63L	SEC63 タンパク質	2.6E-03
605	AI745624		ELL2	ELL 関連 RNA ポリメラーゼ II、伸長因子	2.6E-03
606	BG167522		HSPC016	仮想タンパク質 HSPC016	2.6E-03
607	U58766		TSTA3	組織特異的移植抗原 P35B	2.7E-03
608	J04474	NM_000709	BCKDHA	分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ E1、 $\alpha$ ポリペプチド(メープルシロップ尿症)	2.7E-03
609	H15977	NM_021116	EST	ヒト cDNA FLJ30781 fis、クローン FEBRA2000874	2.8E-03
610	AL049339	NM_001304	CPD	カルボキシペプチダーゼ D	2.8E-03
611	AL133555	NM_080821	C20orf108	第 20 染色体オープンリーディングフレーム 108	2.9E-03
612	AW662518		FLJ10876	仮想タンパク質 FLJ10876	2.9E-03
613	BE883507	NM_003663	CGGBP1	CGG トリプレットリピート結合タンパク質 1	2.9E-03
614	BE797472		RPL17	リボソームタンパク質 L17	3.0E-03
615	U41371		SF3B2	スプライシング因子 3b、サブユニット 2、145kDa	3.0E-03
616	L39068		DHPS	デオキシヒプシン合成酵素	3.1E-03
617	NM_004517		ILK	インテグリン結合キナーゼ	3.1E-03
618	U14972		RPS10	リボソームタンパク質 S10	3.2E-03
619	U61500		TMEM1	膜貫通性タンパク質 1	3.3E-03
620	NM_002719		PPP2R5C	プロテインホスファターゼ 2、調節サブユニット B(B56)、 $\gamma$ アイソフォーム	3.3E-03
621	AF053233		VAMP8	小胞関連膜タンパク質 8(エンドブレビン(endobrevin))	3.3E-03
622	NM_002822	NM_198974	PTK9	PTK9 タンパク質チロシンキナーゼ 9	3.3E-03
623	U16996		DUSP5	二重特異性ホスファターゼ 5	3.3E-03
624	AV705747	NM_006276	SFRS7	スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ 7、35kDa	3.3E-03
625	AF178984		IER5	最初期応答因子 5	3.3E-03
626	Z29093		DDR1	ジスコイジンドメイン受容体ファミリー、メンバー1	3.3E-03
627	AB024536		ISLR	ロイシンリッチリピートを含む免疫グロブリンスーパーファミリー	3.3E-03
628	BF791601		EMP2	上皮膜タンパク質 2	3.3E-03
629	AF061737		SPC18	シグナルペプチダーゼ複合体(18kD)	3.3E-03

10

20

30

40

630	AB002386		EZH1	zeste エンハンサーホモログ 1 (ショウジョウバエ)	3.5E-03
631	AA634090		EST	ヒト、ヘテロ核リボ核タンパク質 A1 と類似、クローン IMAGE : 2900557、mRNA	3.5E-03
632	AK023674		FLJ13612	神経細胞で発現されるカルシウム結合タンパク質のオルソログ様	3.6E-03
633	D13626		GPR105	G タンパク質共役受容体 105	3.7E-03
634	AK026849	XM_371844	TSPYL	TSPY 様	3.8E-03
635	Y18643		METTL1	メチルトランスフェラーゼ様 1	3.9E-03
636	AF176699		FBXL4	F ボックス・ロイシンリッチリピートタンパク質 4	3.9E-03
637	NM_003977		AIP	アリアル炭化水素受容体相互作用タンパク質	3.9E-03
638	AK000498		HARS	ヒスチジル tRNA 合成酵素	4.0E-03
639	U05237	NM_004459	FALZ	胎児性アルツハイマー抗原	4.0E-03
640	BF696304	NM_032832	FLJ14735	仮想タンパク質 FLJ14735	4.0E-03
641	X14420		COL3A1	コラーゲン、III 型、 $\alpha$ 1 (Ehlers-Danlos 症候群 IV 型、常染色体優性)	4.1E-03
642	BE796098		NDUFS8	NADH デヒドロゲナーゼ (ユビキノン) Fe-S タンパク質 8、23kDa (NADH-補酵素 Q レダクターゼ)	4.3E-03
643	X60221		ATP5F1	ATP 合成酵素、H <sup>+</sup> 輸送性、ミトコンドリア F0 複合体、サブユニット b、アイソフォーム 1	4.4E-03
644	AA135341	NM_021078	GCN5L2	GCN5 アミノ酸合成の全般制御 5 様 2 (酵母)	4.6E-03
645	AF009368		CREB3	cAMP 応答性エレメント結合タンパク質 3 (human)	4.7E-03
646	BF970013		SPC12	シグナルペプチダーゼ 12kDa	4.7E-03
647	W45522		ATPIF1	ATP アーゼ阻害因子 1	4.7E-03
648	AI733356	NM_006306	EST	ヒト cDNA FLJ31746 fis、クローン NT2RI2007334	4.8E-03
649	AW117927		EIF3S9	真核生物翻訳開始因子 3、サブユニット 9 $\eta$ 、116kDa	4.8E-03
650	AF275798	NM_012073	CCT5	TCP1 含有シャペロニン、サブユニット 5 ( $\epsilon$ )	5.0E-03
651	AI937126		WTAP	ウィルムス腫瘍 1 関連タンパク質	5.0E-03
652	AK024891	NM_203463	LOC253782	仮想タンパク質 LOC253782	5.1E-03
653	D13629		KTN1	キネクチン 1 (キネシン受容体)	5.2E-03
654	AI682994		AHCYL1	S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素様 1	5.3E-03

10

20

30

40

655	BF980325	NM_005742	ATP6V1C2	ATPアーゼ、H <sup>+</sup> 輸送性、リソソーム性 42kDa、V1サブユニットCアイソフォーム2	5.3E-03
656	AI378996	NM_005381	NCL	ヌクレオリン	5.3E-03
657	D88153		HYA22	HYA22タンパク質	5.3E-03
658	S67310		BF	B因子、プロペルジン	5.4E-03
659	AW438585		EST	ヒト、クローン IMAGE : 5273745、 mRNA	5.4E-03
660	M12267		OAT	オルニチンアミノトランスフェラーゼ (脳回転状萎縮)	5.5E-03
661	AB001636		DDX15	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) ボ ックスポリペプチド15	5.7E-03
662	D13315		GLO1	グリオキサラーゼ I	5.9E-03
663	AF244931		WDR10	WD反復ドメイン10	5.9E-03
664	AL050094		IDH3B	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ3 (NAD <sup>+</sup> ) $\beta$	6.0E-03
665	AK022881		KIAA1272	KIAA1272タンパク質	6.0E-03
666	AI720096		RPL29	リボソームタンパク質L29	6.1E-03
667	Y12781		TBL1X	トランスデュースイン( $\beta$ )様1X連鎖性	6.2E-03
668	AI014538	NM_138384	LOC92170	仮想タンパク質 BC004409	6.2E-03
669	NM_020987		ANK3	アンキリン3、ランビエ絞輪(アンキリンG)	6.3E-03
670	NM_004387		NKX2-5	NK2転写因子関連、座位5(ショウジョウバエ)	6.3E-03
671	J03817		GSTM1	グルタチオンS-トランスフェラーゼM1	6.3E-03
672	BF435769		EST	EST、仮想タンパク質 FLJ20378[ヒト] と弱い類似性 [ヒト]	6.5E-03
673	AL390147		DKFZp547D065	仮想タンパク質 DKFZp547D065	6.5E-03
674	AA961412	NM_003333	UBA52	ユビキチンA-52残基リボソームタン パク質融合産物1	6.6E-03
675	NM_002702		POU6F1	POUドメイン、クラス6、転写因子1	6.6E-03
676	M58050		MCP	膜補助因子タンパク質(CD46、栄養芽 層-リンパ球交差反応抗原)	6.6E-03
677	NM_001293		CLNS1A	塩素イオンチャンネル、ヌクレオチド 感受性、1A	6.7E-03
678	BF213049		COX7A2	シトクロムcオキシダーゼサブユニット VIIaポリペプチド2(肝臓)	6.7E-03
679	AF236056		GOLPH2	ゴルジリントタンパク質2	6.7E-03
680	U79285	NM_021079	NMT1	N-ミリスチルトランスフェラーゼ1	6.8E-03
681	AB027196		RNF10	リングフィンガータンパク質10	6.9E-03
682	AA036952		FLJ30973	仮想タンパク質 FLJ30973	7.0E-03
683	AW732157	NM_052963	TOP1MT	ミトコンドリアトポイソメラーゼI	7.1E-03

10

20

30

40

684	AL049319	NM_032804	FLJ14547	仮想タンパク質 FLJ14547	7.3E-03
685	BE613161		EST	ヒト cDNA FLJ37042 fis、クローン BRACE2011947	7.3E-03
686	U28749		HMGA2	高移動度群 AT-hook 2	7.3E-03
687	BF793677		MGC49942	仮想タンパク質 MGC49942	7.4E-03
688	BG032216	NM_017746	FLJ20287	仮想タンパク質 FLJ20287	7.4E-03
689	AL449244		PP2447	仮想タンパク質 PP2447	7.5E-03
690	AK024103		EST	ヒト cDNA FLJ14041 fis、クローン HEMBA1005780	7.5E-03
691	U17838		PRDM2	ZNF ドメインを有する PR ドメイン含有 2	7.5E-03
692	D86479	NM_001129	AEBP1	AE 結合タンパク質 1	7.5E-03
693	D50420		NHP2L1	NHP2 非ヒストン性染色体タンパク質 2 様 1(出芽酵母)	7.5E-03
694	D87258		PRSS11	プロテアーゼ、セリン、11(IGF 結合)	7.5E-03
695	BF434108	NM_014187	HSPC171	HSPC171 タンパク質	7.6E-03
696	NM_000705		ATP4B	ATP アーゼ、H+/K+交換性、 $\beta$ ポリペ プチド	7.7E-03
697	AF077599		SBB103	仮想的 SBB103 タンパク質	7.7E-03
698	NM_001530		HIF1A	低酸素誘導性因子 1、 $\alpha$ サブユニット (塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス 転写因子)	7.8E-03
699	AB023204		EPB41L3	赤血球膜タンパク質バンド 4.1 様 3	7.8E-03
700	AA253194	NM_022121	PIGPC1	p53 誘導型タンパク質 PIGPC1	7.9E-03
701	BE502341	NM_139177	C17orf26	第 17 染色体オープンリーディングフ レーム 26	7.9E-03
702	AL050265		TARDBP	TAR DNA 結合タンパク質	8.0E-03
703	AK001643	NM_018215	FLJ10781	仮想タンパク質 FLJ10781	8.3E-03
704	BG179412		COX7B	シトクロム c オキシダーゼサブユニッ ト VIIb	8.6E-03
705	X03212		KRT7	ケラチン 7	8.8E-03
706	L07033		HMGCL	3-ヒドロキシメチル-3-メチルグルタリ ル-補酵素 A リアーゼ(ヒドロキシメチ ルグルタル酸尿症)	9.0E-03
707	M19383		ANXA4	アネキシン A4	9.0E-03
708	NM_001273		CHD4	クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合 タンパク質 4	9.1E-03
709	NM_004461		FARSL	フェニルアラニン tRNA 合成酵素様	9.1E-03
710	AI192880		CD44	CD44 抗原(ホーミング機能および Indian 血液型体系)	9.1E-03
711	AF038961		MPDU1	マンノース-P-ドリコール利用欠損因子 1	9.5E-03
712	U67322		C20orf18	第 20 染色体オープンリーディングフ レーム 18	9.5E-03
713	AA521017		EST	EST	9.5E-03

10

20

30

40

714	AA811043	NM_003730	RNASE6PL	リボヌクレアーゼ 6 前駆体	9.9E-03
715	AA536113		TMEPAI	膜貫通性、前立腺アンドロゲン誘導型 RNA	9.9E-03
716	BF973104		LOC201725	仮想タンパク質 LOC201725	9.9E-03
717	NM_000293		PHKB	ホスホリラーゼキナーゼ、 $\beta$	9.9E-03
718	NM_000548		TSC2	結節性硬化症 2	1.0E-02

## 【 0 2 1 6 】

(表 1 1) リンパ節陽性腫瘍とリンパ節陰性腫瘍との間で発現に変化がみられる遺伝子の一覧

BR C 番号	アクセッション番号	記号	名称	P 値	+ または -	
719	BF686125		UBA52	ユビキチン A-52 残基リボソームタンパク質融合産物 1	8.1E-09	-
720	AA634090			ヒト、ヘテロ核リボ核タンパク質 A1 に類似、クローン IMAGE : 2900557, mRNA	1.4E-07	-
721	L00692		CEACAM3	癌胎児性抗原関連細胞接着分子 3	4.2E-07	-
722	AW954403	NM_004781	VAMP3	小胞関連膜タンパク質 3(セルブレビン)	2.2E-06	+
723	AA865619		C21orf97	第 21 染色体オープンリーディングフレーム 97	2.6E-06	-
724	W74502	NM_032350	MGC11257	仮想タンパク質 MGC11257	2.4E-05	+
725	NM_002094		GSPT1	G1/S 期移行因子 1	2.7E-05	+
726	T55178		KIAA1040	KIAA1040 タンパク質	3.2E-05	-
727	L36983		DNM2	ダイナミン 2	4.1E-05	+
728	Z21507		EEF1D	真核生物翻訳伸長因子 1 δ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質)	5.2E-05	-
729	AI581728	NM_005507	CFL1	コフィリン 1(非筋性)	8.0E-05	+
730	NM_001293		CLNS1A	塩素イオンチャンネル、ヌクレオチド感受性、1A	9.0E-05	+
731	BF680847		SENP2	セントリン(sentrin)特異的プロテアーゼ	9.0E-05	+
732	AF100743		NDUFS3	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)Fe-S タンパク質 3、30kDa(NADH-補酵素 Q レダクターゼ)	9.8E-05	+
733	NM_004960		FUS	融合物、t(12 ; 16)悪性脂肪肉腫由来	9.8E-05	-
734	AK023975	NM_015934	NOP5/NOP58	核小体タンパク NOP5/NOP58	1.3E-04	+
735	AF083245		PSMD13	プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)26S サブユニット、非 ATP アーゼ、13	1.5E-04	+
736	AA129776		SUOX	亜硫酸オキシダーゼ	1.8E-04	+
737	U55766	NM_007043	HRB2	HIV-1 rev 結合タンパク質 2	2.0E-04	+
738	BF526092		LOC154467	仮想タンパク質 BC003515	2.1E-04	+
739	BF677579	XM_370754	THTPA	チアミントリホスファターゼ	2.3E-04	+
740	X98260		ZRF1	zuotin 関連因子 1	2.3E-04	+
741	BE440010		LOC51255	仮想タンパク質 LOC51255	2.7E-04	+

10

20

30

40

742	AF007165	NM_021008	DEAF1	deformed 表皮自己調節因子 1(ショウジョウバエ)	2.7E-04	+
743	X78687		NEU1	シアリダーゼ 1(リソソーム性シアリダーゼ)	3.0E-04	+
744	AW965200			ヒト、クローン IMAGE : 5286019、mRNA	3.1E-04	-
745	AK023240		UGCGL1	UDP-グルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ様 1	3.1E-04	+
746	M95712		BRAF	v-raf マウス肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ B1	3.7E-04	+
747	L38995	NM_003321	TUFM	Tu 翻訳伸長因子、ミトコンドリア	3.9E-04	+
748	AW014268		FLJ10726	仮想タンパク質 FLJ10726	4.2E-04	+
749	D49547		DNAJB1	DnaJ (Hsp40) ホモログ、サブファミリーB、メンバー1	4.4E-04	+
750	BE466450		AP4S1	アダプター関連タンパク質複合体 4、 $\sigma 1$ サブユニット	4.5E-04	+
751	AB007944		KIAA0475	KIAA0475 遺伝子産物	4.9E-04	-
752	AF034091		MRPL40	ミトコンドリアリボソームタンパク質 L40	5.1E-04	+

10

20

【 0 2 1 7 】

( 表 1 2 ) 組織臨床学的情報

ID	実施年齢	閉経状態	T	N	M	病期	組織型	リンパ球浸潤物	血管侵入	ER	PgR
MMK010003	51	前	2	1	0	2	a3	3	0	+	+
MMK010004	47	前	2	1	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010005	44	前	2	0	0	2	a1	1	0	+	+
MMK010013	45	前	2	1	0	2	a1	1	0	-	-
MMK010016	44	前	2	0	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010025	46	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010031	29	前	2	2	0	3	a3	3	0	-	-
MMK010037	62	後	0	0	0	0	Ia	0	0	+	+
MMK010042	47	前	2	1	0	2	a3	1	2	+	+
MMK010086	42	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010102	51	前	2	1	0	3	a2	3	0	+	+
MMK010110	39	前	2	0	0	2	a1	2	0	-	-
MMK010129	52	前	2	2	0	3	a1	2	0	-	-
MMK010135	41	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010138	38	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010145	51	前	2	1	0	2	a3	0	0	+	+
MMK010147	49	前	2	1	0	2	a1	1	0	+	+
MMK010149	35	前	2	0	0	2	a3	1	0	-	-
MMK010175	38	前	2	0	0	2	a3	0	0	+	+
MMK010178	51	前	0	0	0	0	Ia	0	0	+	+
MMK010207	40	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010214	42	前	2	1	0	2	a1	0	0	-	-
MMK010247	48	前	2	1	0	2	a2	3	0	-	-
MMK010252	52	前	2	1	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010255	47	前	2	0	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010302	46	前	2	1	0	2	a2	2	1	-	-
MMK010304	48	前	2	1	0	2	a3	1	0	+	+
MMK010326	53	後	0	0	0	0	Ia	0	0	-	-
MMK010327	43	前	2	1	0	2	a1	1	1	+	+
MMK010341	42	前	2	1	0	2	a1	2	0	+	+
MMK010370	46	前	2	1	0	2	a3	2	0	+	+
MMK010397	38	前	2	1	0	2	a3	3	2	+	+
MMK010411	46	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010431	50	前	2	0	0	2	a3	0	0	-	-
MMK010435	49	前	2	1	0	2	a3	0	0	+	+
MMK010453	49	前	2	1	0	2	a3	3	0	+	+
MMK010471	42	前	2	1	0	2	a1	3	0	-	-
MMK010473	40	前	2	1	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010478	38	前	2	2	0	3	a2	0	0	+	+

10

20

30

40

MMK010491	46	前	2	0	0	2	a3	1	0	+	+
MMK010497	44	前	0	0	0	0	Ia	0	0	-	+
MMK010500	45	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010502	51	前	2	0	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010508	51	前	2	1	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010521	21	前	2	0	0	2	a1	1	1	-	-
MMK010552	49	前	2	0	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010554	51	前	2	0	0	2	a3	2	0	+	+
MMK010571	45	前	2	1	1	4	a3	3	0	+	+
MMK010591	40	前	0	0	0	0	Ia	0	0	-	+
MMK010613	37	前	0	0	0	0	Ia	0	0	-	+
MMK010623	39	前	2	1	0	2	a1	3	0	+	+
MMK010624	39	前	2	1	0	2	a1	3	0	+	+
MMK010626	48	前	2	0	0	2	a1	1	1	-	-
MMK010631	41	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010640	35	前	0	0	0	0	Ia	0	0	+	+
MMK010644	47	前	2	2	0	2	a3	3	0	+	+
MMK010646	37	前	2	1	0	2	a3	1	0	+	+
MMK010660	46	前	2	0	0	2	a1	0	0	-	-
MMK010671	45	前	2	0	0	2	a1	0	0	-	-
MMK010679	68	後	0	0	0	0	Ia	0	0	+	+
MMK010680	58	後	0	0	0	0	Ia	0	0	-	+
MMK010709	33	前	2	0	0	2	a3	0	2	-	-
MMK010711	51	前	0	0	0	0	Ia	0	0	-	+
MMK010724	40	前	2	1	0	2	a3	3	2	+	+
MMK010744	41	前	0	0	0	0	Ia	0	0	+	+
MMK010758	40	前	2	1	0	2	a1	0	1	+	+
MMK010760	42	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010762	50	前	2	1	0	2	a3	3	1	+	+
MMK010769	33	前	2	0	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010772	45	前	2	1	0	2	a3	2	0	-	-
MMK010779	46	前	2	1	0	2	a2	0	1	-	-
MMK010780	31	前	2	0	0	2	a2	0	0	-	-
MMK010781	44	前	2	0	0	2	a3	0	2	+	+
MMK010794	52	前	2	1	0	2	a3	2	1	+	+
MMK010818	51	前	2	0	0	2	a1	0	2	+	+
MMK010835	42	前	0	0	0	0	Ia	0	0	+	+
MMK010846	47	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+
MMK010858	42	前	2	1	0	2	a3	2	3	+	+
MMK010864	52	前	2	1	0	2	a1	0	1	-	-
MMK010869	45	前	2	0	0	2	a1	0	1	-	-
MMK010903	47	前	2	0	0	2	a1	0	0	+	+

10

20

30

40

【 0 2 1 8 】

( 表 1 3 )

Si1-F	5'-CACCGAACGATATAAAGCCAGCCTTCAAGAGAGGC TGGCTTTATATCGTTC-3'	SEQ ID N O.23
Si1-R	5'-AAAAGAACGATATAAAGCCAGCCTCTCTTGAAGG CTGGCTTTATATCGTTC-3'	SEQ ID N O.24
Si1-Target	5'-GAACGATATAAAGCCAGCC-3'	SEQ ID N O.25
Si3-F	5'-CACCCCTGGATGAATCATAACCAGATTCAAGAGATCT GGTATGATTCATCCAG-3'	SEQ ID N O.26
Si3-R	5'-AAAAGTGGATGAATCATAACCAGATCTCTTGAATCT GGTATGATTCATCCAG-3'	SEQ ID N O.27
Si3-Target	5'-CTGGATGAATCATAACCAGA-3'	SEQ ID N O.28
Si4-F	5'-CACCGTGTGGCTTGCGTAAATAATTCAAGAGATTA TTTACGCAAGCCACAC-3'	SEQ ID N O.29
Si4-R	5'-AAAAGTGTGGCTTGCGTAAATAATTCTTGAATTATTT ACGCAAGCCACAC-3'	SEQ ID N O.30
Si4-Target	5'-GTGTGGCTTGCGTAAATAA-3'	SEQ ID N O.31

10

## 【0219】

20

産業上の利用可能性

レーザービームを用いた切除法 (laser-capture dissection) とゲノム全体のcDNAマイクロアレイとの組み合わせによって得られた、本明細書に記載の乳癌の遺伝子発現解析によって、癌の予防および治療の標的となる特異的遺伝子が同定された。これらの発現差のある遺伝子サブセットの発現に基づいて、本発明は、乳癌を同定および検出するための分子診断マーカーを提供する。

## 【0220】

本明細書に記載の方法はまた、乳癌の予防、診断、および治療のさらなる分子標的の同定に有用である。本明細書において報告したデータは、乳癌の包括的な理解を増大させて、新規診断方法の開発を促進し、治療薬および予防剤の分子標的を同定する手がかりを提供する。そのような情報は、乳房腫瘍形成のより深い理解に寄与し、乳癌を診断、治療、および究極的には予防するための新規方法を開発するための指標を提供する。

30

## 【0221】

本明細書において引用した全ての特許、特許出願、および刊行物は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。さらに、特定の態様を参照して本発明を詳細に説明してきたが、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく様々な変更および改変を本発明に加えることができることは、当業者に明らかであると考えられる。

## 【0222】

さらに、本発明を、詳細に、その特定の態様に言及しながら説明してきたが、前記の記載は例示的および説明的な性質のものであって、本発明およびその好ましい態様を例示することを意図していることが理解されるであろう。当業者は、慣行的な実験により、発明の精神および範囲から逸脱することなく、さまざまな変更および修正をそれに加えることを直ちに認識すると考えられる。したがって、本発明は以上の記載によって規定されるのではなく、添付の特許請求の範囲およびそれらの等価物によって規定されることが意図される。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0223】

【図1】マイクロダイセクション前の細胞 (レーンA)、マイクロダイセクション後の細胞 (レーンB) およびマイクロダイセクションされた細胞 (レーンC) の像を示す。DCIS細胞、IDC細胞および正常乳管上皮細胞のマイクロダイセクションを、レーザーマイクロビ

50

ームマイクロダイセクション (LMM) 法を用いて行った。各標本からの、DCIS細胞 (症例10326T)、IDC細胞 (10502T) および正常乳管上皮細胞 (10341N) をヘマトキシリンおよびエオシン染色した切片からマイクロダイセクションした。

【図2】102例の試料にわたる、710個の遺伝子の教師なし二次元階層クラスタ分析の結果を示す。図2(A)において、横の各行は乳癌患者を表し、縦の各々の列は単一の遺伝子を示す。赤色および緑色で示された各ウェルの色はそれぞれ、転写産物レベルが、全試料にわたるその遺伝子の中央値より高いこと、および低いことを示す。星印は主な組織型を示し、シャープ印は同一症例における少数の組織型を示す。四角は重複症例 (10149a1および10149a1T) を示す。黒い四角は変化がなかった発現を示す。ERはEIAによって測定したER状態を指し、LNはリンパ節転移の状態を指し、ESR1はこのマイクロアレイにおけるESR1の発現プロファイルを指す。図2(B)は、8例の乳癌患者からマイクロダイセクションした、2つの分化病変を有する16例の試料にわたる、89個の遺伝子の二次元階層クラスタ分析を示す。図2(C)は、25個の遺伝子を用いたクラスタ分析を示し、これは高分化型および低分化型の浸潤性乳管癌細胞の間で発現に差異があることを示す。

【図3】ランダム順列検定によって選択した97個の遺伝子を用いた、遺伝子の教師あり階層クラスタ分析を示す。横の行には、41例のER陽性試料および28例のER陰性試料 (閉経前患者から選択) が示されている。縦の列には、97個の遺伝子を相対的発現比の類似性に従って異なる分枝にクラスタ化した。図2(A)と同様に、下方の主分枝にある遺伝子はESR1の発現レベルと類似した様式で選択的に発現された。上方の分枝にあるものはESR1と反比例した。

【図4】正常乳管と比較してDCISで、さらにDCISと比較してIDCで発現の変化がみられる遺伝子を示す。図4(A)は、DCISおよびIDCにおいて通常、上方制御または下方制御される251個の遺伝子のクラスタを示す。図4(B)は、DCISからIDCへの移行において発現が上昇または低下する74個の遺伝子のクラスタを示す。図4(C)は、IDCにおいて特異的に上方制御または下方制御される65個の遺伝子のクラスタを示す。

【図5】高発現される遺伝子の半定量的RT-PCRによる検証の結果を示す。具体的には、5個の遺伝子 (高分化型の12症例におけるA1261804、AA205444およびAA167194、ならびに低分化型の12症例におけるAA676987およびH22566) およびGAPDH (内部対照) の発現を半定量的RT-PCRによって調べた。マイクロアレイのシグナルは半定量的RT-PCR実験の結果に対応した。正常乳管細胞は、このマイクロアレイに用いた15人の閉経前患者における正常乳管上皮細胞から調製した。MGはヒト全乳腺を指す。

【図6】半定量的RT-PCRの結果を示す。(a) 12人の乳癌患者、(b) 乳癌細胞株 (HBC4、HBC5、HBL100、HCC1937、MCF7、MDA-MB-231、SKBR3、T47D、YMB1、BT-20、BT-474、BT-549、HCC1143、HCC1500、HCC1599、MDA-MB-157、MDA-MB-435S、MDA-MB-453、OCUB-FおよびZR-75-1) 由来の腫瘍細胞、ならびに正常ヒト組織におけるA7870の発現レベルを示す。

【図7】(a) 種々のヒト組織、ならびに(b) 乳癌細胞株および正常なヒトの生命維持に必要な臓器における、A7870転写産物のノーザンプロット分析の結果を示す。

【図8】(a) トランスフェクトされたCOS7細胞における外因性A7870、ならびに(b) T47D、BT-20およびHBC5細胞における外因性A7870の細胞内局在を示す。

【図9】ランダム順列検定によって選択した206個の遺伝子を用いた、遺伝子の教師あり階層クラスタ分析を示す。横の行には、69例の試料 (IDC患者から選択) が示されている。縦の列には、97個の遺伝子が、相対的発現比の類似性に従って異なる分枝にクラスタ化された。分枝1および分枝2にある遺伝子は、低分化型および高分化型の発現レベルに類似して選択的に発現された。

【図10】図10(A)は、予測スコアシステムを確立するため、ランダム順列検定後に分類の評価およびleave-one-out検定によって選択した34個の遺伝子を用いた、二次元階層クラスタ分析の結果を示す。上方の主分枝にある遺伝子はリンパ節転移を伴う症例で選択的に発現され; 下方の分枝にあるものはリンパ節陰性症例でより高度に発現された。図10(B)は、非転移性 (リンパ節陰性) 腫瘍を転移性 (リンパ節陽性) 腫瘍と区別するための、10(A)にみられる遺伝子の強度を示す。四角はリンパ節陽性症例を表し; 三角は

10

20

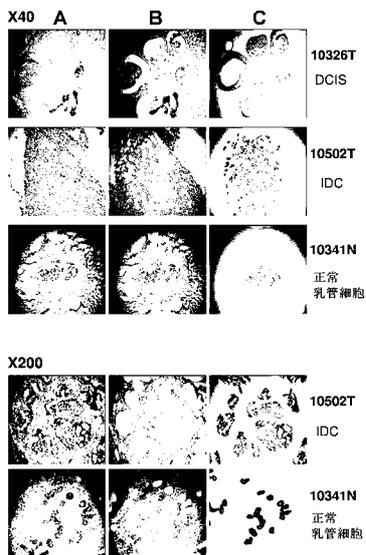
30

40

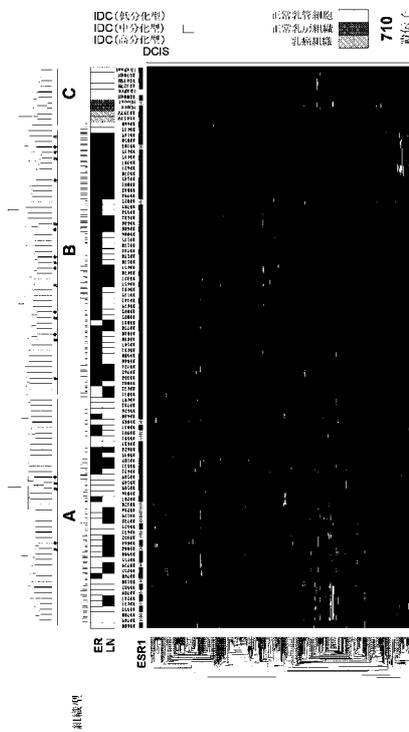
50

陰性症例を表す。17個の白四角はリンパ節陽性の被験症例を表し、20個の白三角はリンパ節陰性の被験症例を表し、これらは予測スコアの確立に用いなかったものである。図10(C)は、転移に関する予測スコアと実施後の臨床情報との間の相関を示す。

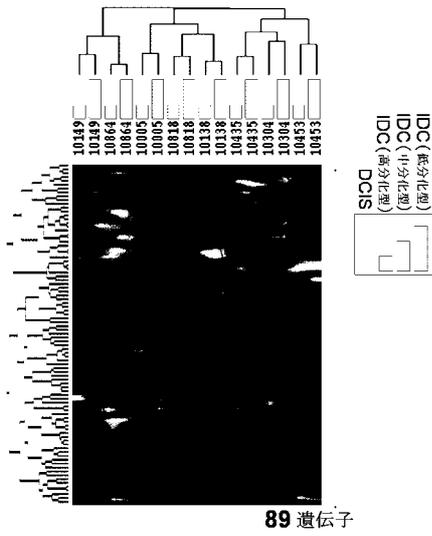
【図1】



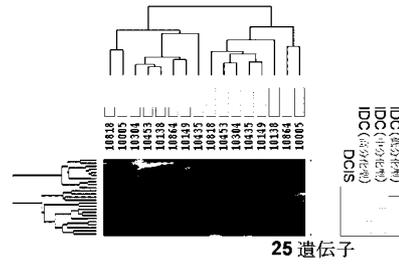
【図2A】



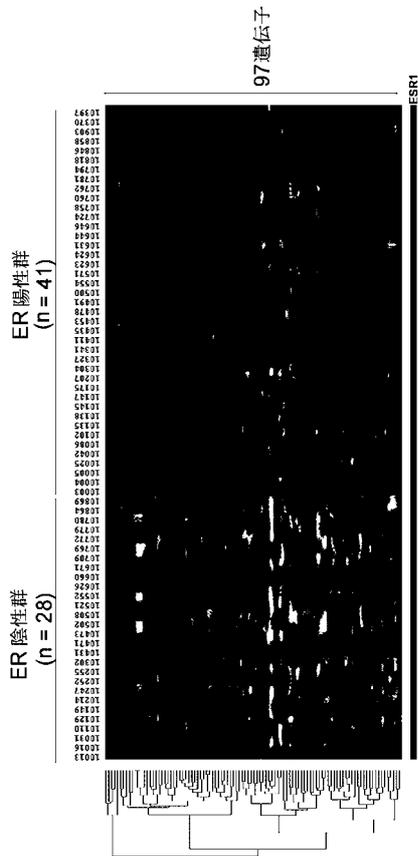
【 図 2 B 】



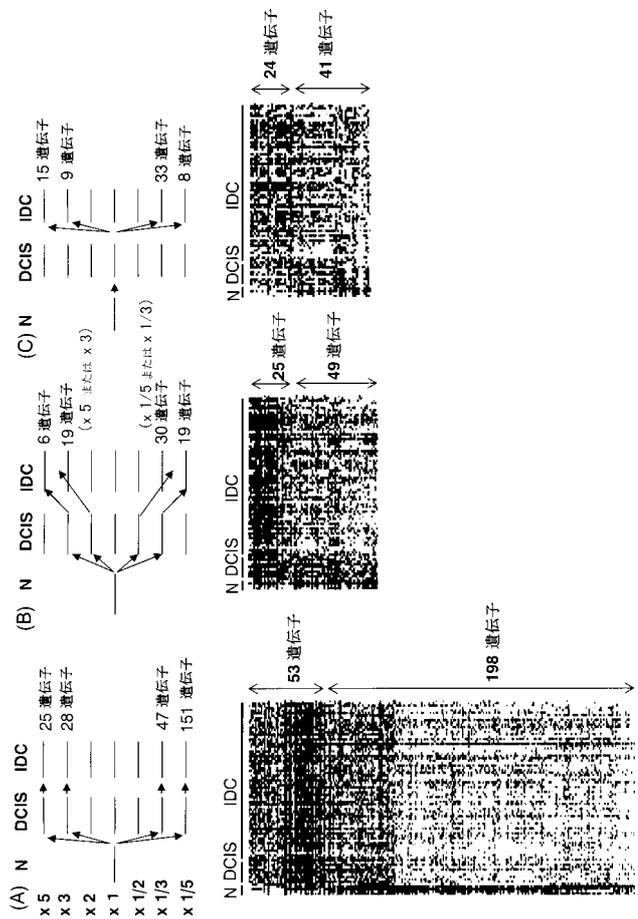
【 図 2 C 】



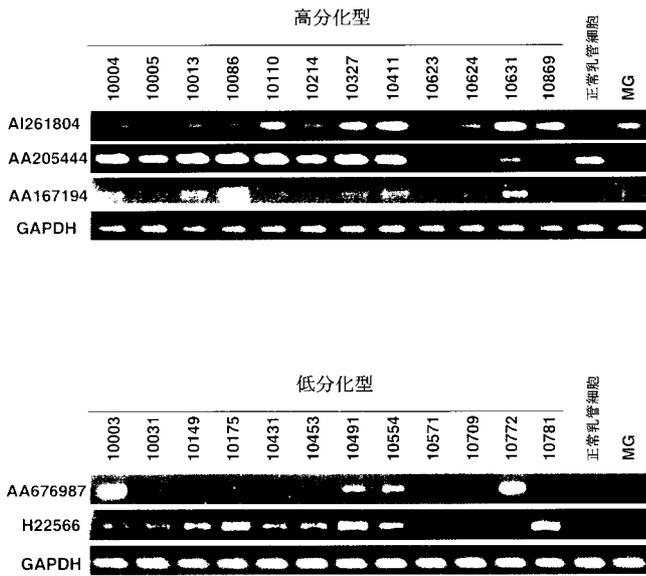
【 図 3 】



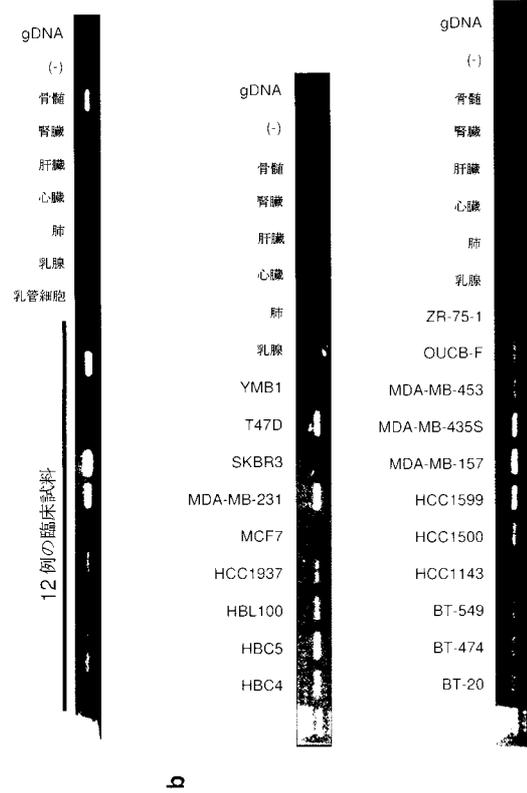
【 図 4 】



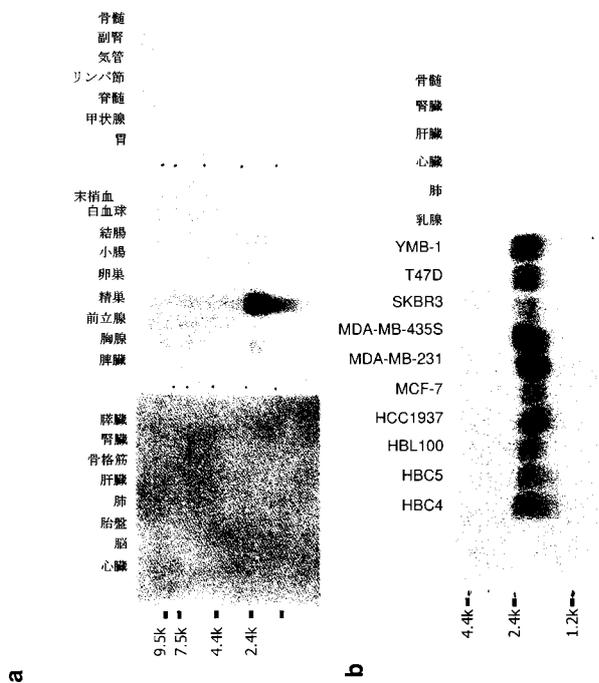
【 図 5 】



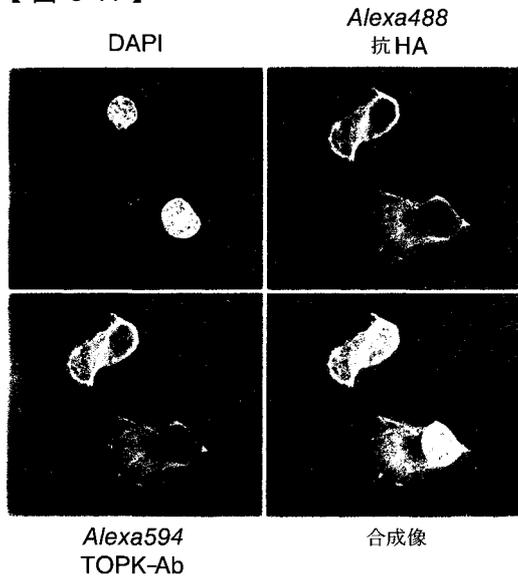
【 図 6 】



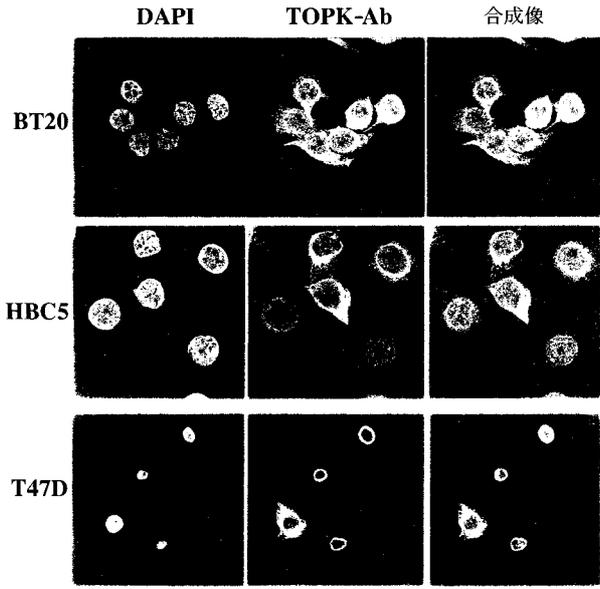
【 図 7 】



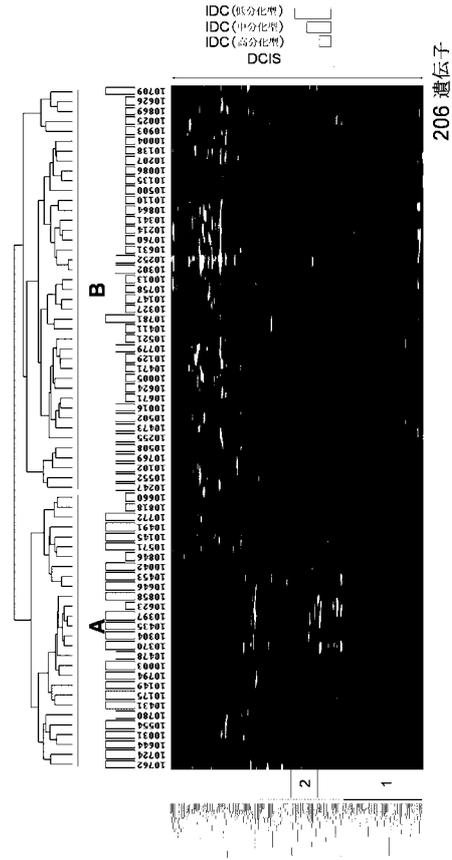
【 図 8 A 】



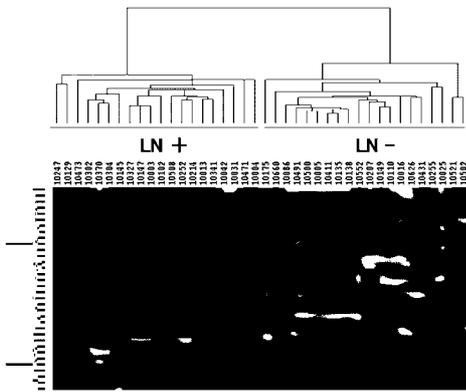
【 図 8 B 】



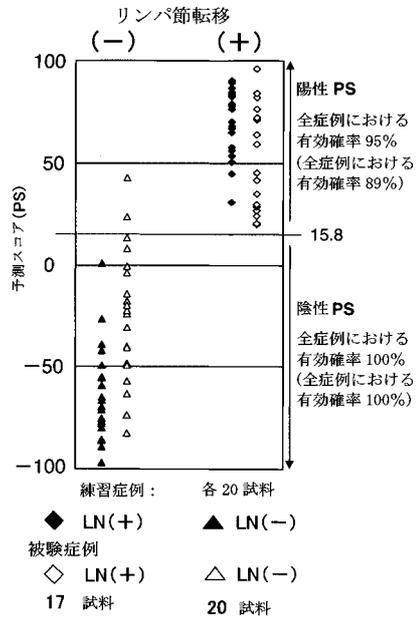
【 図 9 】



【 図 10 A 】



【 図 10 B 】



【図 10C】

全症例	リンパ節の状態	リンパ節の状態		合計
		(+)	(-)	
PS	陽性	37	2	39
	陰性	0	38	38
合計		37	40	77

P<0.001  
(独立性に関する X<sup>2</sup>乗検定)

被験症例	リンパ節の状態	リンパ節の状態		合計
		(+)	(-)	
PS	陽性	17	2	19
	陰性	0	18	18
合計		17	20	37

P<0.001  
(独立性に関する X<sup>2</sup>乗検定)

【配列表】

2007506426000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/JP2004/014438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12N9/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C12N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/104418 A1 (ZHANG CHAO ET AL) 5 June 2003 (2003-06-05)  abstract page 4, left-hand column, paragraph 5	1-38, 41-48, 51-54, 56-58, 60-70, 73-75
X	US 2003/157544 A1 (GISH KURT C ET AL) 21 August 2003 (2003-08-21)  abstract page 1, right-hand column, paragraph 6 page 2, right-hand column, paragraphs 2,3  -/-	1-38, 41-48, 51-54, 56-58, 60-70, 73-75
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  24 February 2005		Date of mailing of the international search report  08.08.2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Grötzing, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/JP2004/014438

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADAM PAUL J ET AL: "Arylamine N-acetyltransferase-1 is highly expressed in breast cancers and conveys enhanced growth and resistance to etoposide in vitro." MOLECULAR CANCER RESEARCH, vol. 1, no. 11, September 2003 (2003-09), pages 826-835, XP002317345 ISSN: 1541-7786 abstract page 827, left-hand column, last paragraph page 829, right-hand column, paragraph 1 page 831, left-hand column, paragraph 2	1-38, 41-48, 51-54, 56-58, 60-70, 73-75
X	PEROU C M ET AL: "Molecular portraits of human breast tumours" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 406, no. 6797, 17 August 2000 (2000-08-17), pages 747-752, XP002203006 ISSN: 0028-0836 abstract page 750; figure 3	1-38, 41-48, 51-54, 56-58, 60-70, 73-75
X	GEYLAN Y S ET AL: "Arylamine N-acetyltransferase activities in human breast cancer tissues" NEOPLASMA (BRATISLAVA), vol. 48, no. 2, 2001, pages 108-111, XP008027627 ISSN: 0028-2685 abstract page 110, right-hand column, line 4 - line 10	32-38, 41-48, 51-54
A	SGROI D C ET AL: "IN VIVO GENE EXPRESSION PROFILE ANALYSIS OF HUMAN BREAST CANCER PROGRESSION" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 22, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 5656-5661, XP000994514 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document	1-38, 41-48, 51-54, 56-58, 60-70, 73-75

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/JP2004/014438

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DRESSMAN MARLENE A ET AL: "Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer." CANCER RESEARCH, vol. 63, no. 9, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 2194-2199, XP002317347 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document</p>	<p>1-38, 41-48, 51-54, 56-58, 60-70, 73-75</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/014438**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 39, 40, 49, 50, 55, 59, 71, 72, 76, 88, and 94  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 32 to 38, 41 to 48, 51, 65 to 70, 73, and 89 to 93 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: 39, 40, 49, 50, 55, 59, 71, 72, 76, 88, and 94  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1-38 (partially), 41-48 (partially), 51-54 (partially), 56-58 (partially)  
60-70 (partially), 73-75 (partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/JP2004/014438

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

Inventions 1-388: Claims 1-38 (partially), 41-48 (partially), 51-54 (partially), 56-58 (partially), 60-70 (partially), 73-75 (partially)

Methods and means for diagnosing breast cancer, and medical uses involving one of the 388 different known genes mentioned in claims 2 and 4.

Invention 389: Claims 77-87 (partially), 89-93 (partially), 95-97 (partially)

Methods and means for predicting breast cancer metastasis, and medical uses involving one of the 34 different known genes mentioned in claim 77.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

## Continuation of Box II.1

Although claims 32 to 38, 41 to 48, 51, 65 to 70, 73, and 89 to 93 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 39, 40, 49, 50, 55, 59, 71, 72, 76, 88, and 94

Present claims 39, 40, 49, 50, 55, 59, 71, 72, 76, 88, and 94 relate to the medical use of candidate compounds defined only by reference to a desirable characteristic (e.g., the ability to suppress the biological activity of one of the gene products used in a screening method). The claims cover the medical use of all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for not a single of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the methods/medical uses by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/JP2004/014438

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003104418 A1	05-06-2003	NONE	
US 2003157544 A1	21-08-2003	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	H
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>G 0 1 N 37/00 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	M
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N 37/00	1 0 2
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z

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

(72) 発明者 中鶴 修一

埼玉県さいたま市中央区下落合 2 丁目 6 - 2

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 DA14 DA36 DA78 FB02 FB03 FB15  
 4B024 AA01 AA12 AA19 AA20 BA80 CA04 CA09 CA12 CA20 DA02  
 DA03 EA04 FA02 GA13 HA11 HA13 HA14 HA17 HA20  
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15  
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79  
 QQ89 QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR55 QR56  
 QR62 QR77 QR80 QR84 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01  
 QX02  
 4C084 AA02 AA13 AA19 DC50 NA14 ZB261  
 4C085 AA03 AA14 AA16 BB31 CC22 DD62  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007506426A5</a>	公开(公告)日	2007-11-08
申请号	JP2006527773	申请日	2004-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	中村祐輔 片桐豊雅 中鶴修一		
发明人	中村 祐輔 片桐 豊雅 中鶴 修一		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/00 C12Q1/02 A61K31/7088 A61K39/395 A61K39/00 A61K45/00 A61K38/00 A61P35/00 A61K48/00 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	C12Q1/6886 C07K14/4702 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/57415 G01N2500/04		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.F C12M1/00.A C12Q1/02 A61K31/7088 A61K39/395.T A61K39/00.H A61K45/00 A61K37/02 A61P35/00 A61K48/00 G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B024/HA20 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/CC22 4C085/DD62 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/505571 2003-09-24 US		
其他公开文献	JP2007506426A JP4620670B2		

#### 摘要(译)

本文描述了用于检测和诊断乳腺癌 ( BRC ) 的方法。在一个实施方案中, 诊断方法包括确定区分BRC细胞和正常细胞的BRC相关基因的表达水平。在另一个实施方案中, 诊断方法包括确定BRC相关基因的表达水平, 其区分DCC细胞和BRC细胞中的IDC细胞。本发明进一步提供了使用BRC相关基因预测和预防乳腺癌转移的方法, 所述BRC相关基因在具有淋巴结转移的乳腺癌细胞中具有独特的改变的表达模式。本发明进一步提供筛选可用于治疗乳腺癌的治疗剂的方法, 治疗乳腺癌的方法, 以及对受试者接种抗乳腺癌的方法。

