

(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2010-518878

(P2010-518878A)

(43) 公表日 平成22年6月3日 (2010. 6. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 P	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁)

(21) 出願番号	特願2009-551932 (P2009-551932)	(71) 出願人	508122068
(86) (22) 出願日	平成20年2月26日 (2008. 2. 26)		アンセルム (アンスティテュ ナシオナ
(85) 翻訳文提出日	平成21年10月23日 (2009. 10. 23)		ル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/052318		シエルシュ メディカル)
(87) 国際公開番号	W02008/104543		フランス国 エフー75013 パリ リ
(87) 国際公開日	平成20年9月4日 (2008. 9. 4)		ュ ドゥ トルビアック 101
(31) 優先権主張番号	07300823.7	(71) 出願人	509240642
(32) 優先日	平成19年2月26日 (2007. 2. 26)		サントル レヌ ユグナン
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		フランス国 エフー92210 サンーク
			ルー リュ ダイイ 35
		(74) 代理人	100074734
			弁理士 中里 浩一
		(74) 代理人	100086265
			弁理士 川崎 仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌患者における転移発生の予測方法

(57) 【要約】

本発明は、患者における乳癌進行の予後診断、さらに詳細には、乳癌に侵されている患者の1以上の組織または臓器中での転移発生の予測に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の工程を含むことを特徴とする、乳癌に侵されている患者における転移発生の生体外予測方法：

a) 検査すべき患者から前以って採集した乳房腫瘍組織サンプルを用意する工程；

b) 前記乳房腫瘍組織サンプルにおいて、1以上の組織または臓器内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーの発現を判定することからなり、前記1種以上の生物学的マーカーを、下記からなる群から選択する工程：

(i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、LST1、MMRN2、SH2D3C、RAMP3、FAM26B、ILK、TM6SF1、C10orf54、CLEC3B、IL2RG、HOM-TES-103、ZNF23、STK35、TNFAIP8L2、RAMP2、ENG、ACRBP、TBC1D10C、C11orf48、EBNA1BP2、HSPE1、GAS6、HCK、SLC2A5、RASA3、ZNF57、WASPIP、KCNK1、GPSM3、ADCY4、AIF1、NCKAP1、AMICA1、POP7、GMFG、PPM1M、CDGAP、GIMAP1、ARHGAP9、APOB48R、OCIAD2、FLRT2、P2RY8、RIPK4、PECAM1、URP2、BTK、APBB1IP、CD37、STARD8、GIMAP6、E2F6、WAS、HLA-DQB1、HVCN1、LOC56902、ORC5L、MEF2C、PLCL2、PLAC9、RAC2、SYNE1、DPEP2、MYEF2、HSPD1、PSCD4、NXT1、LOC340061、ITGB3、AP1S2、SNRPG、CSF1、BIN2、ANKRD47、LIMS2、DARC、PTPN7、MSH6、GGTA1、LRR33、GDPD5、CALCOCO1、FAM110C、BCL6B、LOC641700、ARHGDI1B、DAAM2、TNFRSF14、TPSAB1、CSF2RA、RCS1、FLJ21438、LOC133874、GSN、SLIT3、FYN、NCF4、PTPRC、EVI2B、SCRIB、C11orf31、LOC440731、TFAM、ARPC5L、PARVG、GRN、LMO2、CRSP8、EHBP1L1、HEATR2、NAALADL1、LTB、STRBP、FAM65A、ADARB1、TMEM140、DENND1C、PRPF19、CASP10、SLC37A2、RHOJ、MPHOSPH10、PPIH、RASSF1、HCST、C16orf54、EPB41L4B、LRMP、LAPTM5、PRDM2、CYGB、LYCAT、ACCP5、CMKLR1、UBE1L、MAN2C1、TNFSF12、C7orf24、Cxorf15、CUL1、SMAD7、ITGB7、APOL3、PGRMC1、PPA1、YES1、FBLN1、MRC2、PTK9L、LRP1、IGFBP5、WDR3、GTPBP4、SPI1、SEPLG、OSCAR、LYL1、POLR2H、YWHAQ、ISG20L2、LGI14、KIF5B、NGRN、TYROBP、C5orf4、COX7A2、S100A4、MATK、TMEM33、DOK3、LOC150166、CIRBP、NIN、C10orf72、FMNL1、FAT3、CHKKB/CPT1B、SNRPA1、GIMAP4、C20orf18、LTBP2、GAB3、NQO1、MARCH2、MYO1F、CDS1、SRD5A1、C20orf160、SLAMF7、ACTL6A、ABP1、RAE1、MAF、SEMA3G、P2RY13、ZDHHC7、ERG、FHLL1、CLEC10A、INTS5、MYO15B、CTSW、PILRA、HN1、SCARA5、PRAM1、EBP、SIGLEC9、LGP1、DGUOK、GGCX、RABL5、ZBTB16、TPSAB1、NOP5/NOP58、CCND2、CD200、EPPK1、DKFZp586C0721、CCT6A、RIPK3、ARHGAP25、GNAI2、USP4、FAHD2A、LOC399959、LOC133308、HKDC1、CD93、GTF3C4、ITGB2、ELOVL6、TGFB1I1、ASCC3L1、FES、KCNMB1、AACS、ATP6VOD2、TMEM97、NUDT15、ATP6V1B2、CCDC86、FLJ10154、SCARF2、PRELP、ACHE、GIMAP8、PDE4DIP、NKG7、C20orf59、RHOG、TRPV2、TCP1、TNRC8、TNS1、IBSP、MMP9、NRIP2、OLFML2B、OMD、WIF1、ZEB2、ARL8、COL12A1、EBFおよびEBF3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、C21orf91、TFCP2L1、TTMA、CHODL、CALB2、UGT8、LOC146795、C1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、C20orf42/FERMT1、ELAC1、GYLT1L1B、SPSB1、CHRM3、PTEN、PIGL、CHRM3、CDH3からなる群から選ばれる、肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(iii) TBX3、SYT17、LOC90355、AGXT2L1、LETM2、LOC145820、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、ARPC2、CAB39L、SLC16A3、DHFR1L1、PRRT3、CYP3A5、RPS6KA5、KIAA1505、ATP5S、ZFYVE16、KIAA0701、PEBP1、DDHD2、WWP1、CCNL1、ROBO2、FAM111B、THRAPP2、CRSP9、KARCA1、SLC16A3、ARID4A、TCEAL1、SCAMP1、KIAA0701、EIF5A、DDX46、PEX7、BCL2L11、YBX1、UBE21、REXO2、AXUD1、C10orf2、ZNF548、FBXL16、LOC439911、LOC283874、ZNF587、FLJ20366、KIAA0888、BAG4、CALU、KIAA1961、USP30、NR4A2、FOX A1、FBXO15、WNK4、CDIPT、NUDT16L1、SMAD5、STXBP4、TTC6、LOC113386、TSPYL1、CIP29、C8orf1、SYDE2、SLC12A8、SLC25A18、C7、STAU2、TSC22D2、GADD45G、PHF3、TNRC6C、TCEAL3、RRN3、C5orf24、AHCTF1、LOC92497からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；および、

(iv) LOC644215、BAT1、GPR75、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、PTK2、SQSTM1、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX31、FAM119A、LLGL2、DDX27、TRA16、HOXB13、GNAS、CSPP1、COL8A1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655、RAC3、AP4M1、HEG1、PCBP2、SLC30A7、ATAD3A/ATAD3B、CHI3L1、MUC6、HMG20B、BCL7A、GGN、ARHGEF3、PALLD、TOP1、PCTK1、C20orf4、ZBTB1、MSH6、SETD5、POSTN、MOCS3、GABPA、ZSWIM1、ZNHIT2、LOC653352、ELL、ARPC4、ZNF277、VAV2、HNRPH3、LHX1、FAM83A、DIP2B、RBM10、PMPCA、TYSND1、RAB4B、DLC1、KIAA2018、TES、TFDP2、C3orf10、ZBTB38、PSMD7、RECK、JMJD1C、FLJ20273、CENPB、PLAC2、C6orf111、ATP10D、RNF146、XRR1、NPAS2、APBA2BP、WDR34、SLK、SBF2、SON、MORC3、C3orf63、WDR54、STX7、ZNF512、KLHL9、LOC284889、ETV4、RMND5B、ARMCX1、SLC29A4、TRIB3、LRRC23、DDIT3、THUMP3、MICAL-L2、PA2G4、TSEN54、LAS1L、MEA1、S100PBP、TRAF2、EMILIN3、KIAA1712、PRPF6、CHD9、JMJD1B、ANKS1A、CAPN5、EPC2、WSCR27、CYB561、LLGL1、EDD1からなる群から選ばれる、脳組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

10

c) 1以上の組織または臓器内の転移発生を、1種以上の前記生物学的マーカーが、相応する組織または臓器内での転移を被っていない患者の乳房腫瘍サンプルにおいて測定したその相応する発現量と比較したとき、脱制御発現量を有する場合に予測する工程。

【請求項2】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーを下記からなる群から選択する、請求項1記載の生体外方法；

(i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、MMRN2、LST1、SH2D3CおよびRAMP3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

20

(ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、c21orf91、TFCP2L1、CHODL、CALB2、UGT8、c10orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、KIND1、ELAC1、GYLTL1B、SPSB1、PTENおよびCHRM3からなる群から選ばれる、肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(iii) TBX3、c5orf30、AGXT2L1、LETM2、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、DHFRL1、ARPC2、SLC16A3、GNPTG、PRRT3、RPS6KA5、K1AA1505、ZFYE16およびK1AA0701からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；および、

30

(iv) PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX27、TRA16、HOXB13、CSPP1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655およびRAC3からなる群から選ばれる、脳組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー。

【請求項3】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーを下記からなるマーカー群から選択する、請求項1記載の生体外方法；

(i) KCTD1、BAIAP2L1、PERP、CFD、CD4、COL6A2、FLI1、PSTPIP1、MEGF10、PTPN22、FAM78A、NXF1、MFNGおよびCLEC4Aからなる、骨転移特異性マーカーの群；

(ii) KIND1、ELAC1、ANP32E、PAQR3、ITGB8、c10orf210、SIKE、UGT8、CALB2、CHODL、c21orf91、TFCP2L1、ODF2L、HORMAD1、PLEKHG4およびDSC2からなる、肺転移特異性マーカーの群；

40

(iii) GATA2、SELT、WHSC1L1、MYRIP、ZMAT1、IL20RA、ZNF44、LETM2、AGXT2L1、c5orf30およびTBX3からなる、肝転移特異性マーカーの群；

(iv) PPWD1、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、METTL7A、NPHP3、RSHL1、CSPP1、HOXB13、TRA16、DDX27、PKP2およびINHAからなる、脳転移特異性マーカーの群。

【請求項4】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーを下記からなるマーカー群から選択する、請求項1記載の生体外方法；

(i) BAIAP2L1、PERP、CFD、CD4、COL6A2、FLI1、PSTPIP1、MEGF10、PTPN22、FAM78A、NXF1、MFNGおよびCLEC4Aからなる、骨転移特異性マーカーの群；

50

(ii) KIND1、ANP32E、ITGB8、UGT8、TFCP2L1、HORMAD1およびDSC2からなる、肺転移特異性マーカーの群；

(iii) GATA2、WHSC1L1、LETM2、AGXT2L1およびTBX3からなる、肝転移特異性マーカーの群；

(iv) PPWD1、PDGFRA、ANTXR1、ARRDC3およびDDX27からなる、脳転移特異性マーカーの群。

【請求項 5】

工程b)において、群(i)、(ii)、(iii)および(iv)の各々から選ばれる少なくとも1種の生物学的マーカーを定量する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

工程b)において、群(i)、(ii)、(iii)および(iv)に由来する全ての生物学的マーカーを定量する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

工程b)において、検出および/または定量する前記1種以上の肺特異性生物学的マーカーを、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選択する、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

工程b)において、検出および/または定量する前記1種以上の骨特異性生物学的マーカーを、KCNK1、CLEC4A、MFNG、NXF1、PTPN22、PERP、PSTPIP1、FL11、COL6A2、CD4およびCFDからなる群から選択する、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

工程b)が、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる肺特異性マーカー群に含まれる全ての肺特異性マーカーを検出および/または定量することからなる、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーを、前記乳房腫瘍組織サンプルを遺伝子発現分析法に供することによって定量する、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 11】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーを、前記乳房腫瘍組織サンプルを免疫組織化学分析法に供することによって定量する、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 12】

患者における転移発生の生体外予測用のキットであって、1以上の組織または臓器内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーを定量する手段を含み、前記1種以上の生物学的マーカーが下記からなる群から選ばれることを特徴とする前記キット：

(i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FL11、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、LST1、MMRN2、SH2D3C、RAMP3、FAM26B、ILK、TM6SF1、C10orf54、CLEC3B、IL2RG、HOM-TES-103、ZNF23、STK35、TNFAIP8L2、RAMP2、ENG、ACRBP、TBC1D10C、C11orf48、EBNA1BP2、HSPE1、GAS6、HCK、SLC2A5、RASA3、ZNF57、WASPIP、KCNK1、GPSM3、ADCY4、AIF1、NCKAP1、AMICA1、POP7、GMFG、PPM1M、CDGAP、GIMAP1、ARHGAP9、APOB48R、OCIAD2、FLRT2、P2RY8、RIPK4、PECAM1、URP2、BTK、APBB1IP、CD37、STARD8、GIMAP6、E2F6、WAS、HLA-DQB1、HVCN1、LOC56902、ORC5L、MEF2C、PLCL2、PLAC9、RAC2、SYNE1、DPEP2、MYEF2、HSPD1、PSCD4、NXT1、LOC340061、ITGB3、AP1S2、SNRPG、CSF1、BIN2、ANKRD47、LIMS2、DARC、PTPN7、MSH6、GGTA1、LRRC33、GDPD5、CALCOCO1、FAM110C、BCL6B、LOC641700、ARHGDI1B、DAAM2、TNFRSF14、TPSAB1、CSF2RA、RCS D1、FLJ21438、LOC133874、GSN、SLIT3、FYN、NCF4、PTPRC、EVI2B、SCRIB、C11orf31、LOC440731、TFAM、ARPC5L、PARVG、GRN、LMO2、CRSP8、EHBP1L1、HEATR2、NAALADL1、INPP5D、LTB、STRBP、FAM65A、ADARB1、TMEM140、DENND1C、PRPF19、CASP10、SLC37A2、RHOF、MPHOSPH10、PPIH、RASSF1、HCST、C16orf54、EPB41L4B、LRMP、LAPTM5、PRDM2、CYGB、

10

20

30

40

50

LYCAT、ACP5、CMKLR1、UBE1L、MAN2C1、TNFSF12、C7orf24、Cxorf15、CUL1、SMAD7、ITGB7、APOL3、PGRMC1、PPA1、YES1、FBLN1、MRC2、PTK9L、LRP1、IGFBP5、WDR3、GTPBP4、SP11、SELPLG、OSCAR、LYL1、POLR2H、YWHAQ、ISG20L2、LGI14、KIF5B、NGRN、TYROBP、C5orf4、COX7A2、S100A4、MATK、TMEM33、DOK3、LOC150166、CIRBP、NIN、C10orf72、FMNL1、FAT3、CHKB/CPT1B、SNRPA1、GIMAP4、C20orf18、LTBP2、GAB3、NQO1、MARCH2、MYO1F、CDS1、SRD5A1、C20orf160、SLAMF7、ACTL6A、ABP1、RAE1、MAF、SEMA3G、P2RY13、ZDHHC7、ERG、FHL1、CLEC10A、INTS5、MYO15B、CTSW、PILRA、HN1、SCARA5、PRAM1、EBP、SIGLEC9、LGP1、DGUOK、GGCX、RABL5、ZBTB16、TPSAB1、NOP5/NOP58、CCND2、CD200、EPPK1、DKFZp586C0721、CCT6A、RIPK3、ARHGAP25、GNAI2、USP4、FAHD2A、LOC399959、LOC133308、HKDC1、CD93、GTF3C4、ITGB2、ELOVL6、TGFB1I1、ASCC3L1、FES、KCNMB1、AACS、ATP6VOD2、TMEM97、NUDT15、ATP6V1B2、CCDC86、FLJ10154、SCARF2、PRELP、ACHE、GIMAP8、PDE4DIP、NKG7、C20orf59、RHOG、TRPV2、TCP1、TNRC8、TNS1、IBSP、MMP9、NRIP2、OLFML2B、OMD、WIF1、ZEB2、ARL8、COL12A1、EBFおよびEBF3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、C21orf91、TFCP2L1、TTMA、CHODL、CALB2、UGT8、LOC146795、C1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、C20orf42、ELAC1、GYLTL1B、SPSB1、CHRM3、PTEN、PIGL、CHRM3、CDH3からなる群から選ばれる、肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(iii) TBX3、SYT17、LOC90355、AGXT2L1、LETM2、LOC145820、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、ARPC2、CAB39L、SLC16A3、DHFRL1、PRRT3、CYP3A5、RPS6KA5、KIAA1505、ATP5S、ZFYVE16、KIAA0701、PEBP1、DDHD2、WWP1、CCNL1、ROBO2、FAM111B、THRAP2、CRSP9、KARCA1、SLC16A3、ARID4A、TCEAL1、SCAMP1、KIAA0701、EIF5A、DDX46、PEX7、BCL2L11、YBX1、UBE21、REXO2、AXUD1、C10orf2、ZNF548、FBXL16、LOC439911、LOC283874、ZNF587、FLJ20366、KIAA0888、BAG4、CALU、KIAA1961、USP30、NR4A2、FOX A1、FBXO15、WNK4、CDIPT、NUDT16L1、SMAD5、STXBPA、TTC6、LOC113386、TSPYL1、CIP29、C8orf1、SYDE2、SLC12A8、SLC25A18、C7、STAU2、TSC22D2、GADD45G、PHF3、TNRC6C、TCEAL3、RRN3、C5orf24、AHCTF1、LOC92497からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；および、

(iv) LOC644215、BAT1、GPR75、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、PTK2、SQSTM1、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX31、FAM119A、LLGL2、DDX27、TRA16、HOXB13、GNAS、CSPP1、COL8A1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655、RAC3、AP4M1、HEG1、PCBP2、SLC30A7、ATAD3A/ATAD3B、CHI3L1、MUC6、HMG20B、BCL7A、GGN、ARHGEF3、PALLD、TOP1、PCTK1、C20orf4、ZBTB1、MSH6、SETD5、POSTN、MOC33、GABPA、ZSWIM1、ZNHIT2、LOC653352、ELL、ARPC4、ZNF277、VAV2、HNRPH3、LHX1、FAM83A、DIP2B、RBM10、PMPCA、TYSND1、RAB4B、DLC1、KIAA2018、TES、TFDP2、C3orf10、ZBTB38、PSMD7、RECK、JMJD1C、FLJ20273、CENPB、PLAC2、C6orf111、ATP10D、RNF146、XRR1、NPAS2、APBA2BP、WDR34、SLK、SBF2、SON、MORC3、C3orf63、WDR54、STX7、ZNF512、KLHL9、LOC284889、ETV4、RMND5B、ARMCX1、SLC29A4、TRIB3、LRRC23、DDIT3、THUMP3、MICAL-L2、PA2G4、TSEN54、LAS1L、MEA1、S100PBP、TRAF2、EMILIN3、KIAA1712、PRPF6、CHD9、JMJD1B、ANKS1A、CAPN5、EPC2、WBSCR27、CYB561、LLGL1、EDD1からなる群から選ばれる、脳組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー。

【請求項 13】

肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーを定量する手段を含み、前記1種以上の生物学的マーカーが、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる、請求項12記載のキット。

【請求項 14】

乳癌に侵されている患者の製薬剤による治療処置の抗転移効果のモニタリング用キットであって、1以上の組織または臓器内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーを定量する手段を含み、前記1種以上の生物学的マーカーが下記からなる群から選ばれることを特徴とする前記キット：

- (i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、LST1、MMRN2、SH2D3C、RAMP3、FAM26B、ILK、TM6SF1、C10orf54、CLEC3B、IL2RG、HOM-TES-103、ZNF23、STK35、TNFAIP8L2、RAMP2、ENG、ACRBP、TBC1D10C、C11orf48、EBNA1BP2、HSPE1、GAS6、HCK、SLC2A5、RASA3、ZNF57、WASPIP、KCNK1、GPSM3、ADCY4、AIF1、NCKAP1、AMICA1、POP7、GMFG、PPM1M、CDGAP、GIMAP1、ARHGAP9、APOB48R、OCIAD2、FLRT2、P2RY8、RIPK4、PECAM1、URP2、BTK、APBB1IP、CD37、STARD8、GIMAP6、E2F6、WAS、HLA-DQB1、HVCN1、LOC56902、ORC5L、MEF2C、PLCL2、PLAC9、RAC2、SYNE1、DPEP2、MYEF2、HSPD1、PSCD4、NXT1、LOC340061、ITGB3、AP1S2、SNRPG、CSF1、BIN2、ANKRD47、LIMS2、DARC、PTPN7、MSH6、GGTA1、LRRC33、GDPD5、CALCOCO1、FAM110C、BCL6B、LOC641700、ARHGD1B、DAAM2、TNFRSF14、TPSAB1、CSF2RA、RCS10、D1、FLJ21438、LOC133874、GSN、SLIT3、FYN、NCF4、PTPRC、EVI2B、SCRIB、C11orf31、LOC440731、TFAM、ARPC5L、PARVG、GRN、LMO2、CRSP8、EHBP1L1、HEATR2、NAALADL1、INPP5D、LTB、STRBP、FAM65A、ADARB1、TMEM140、DENND1C、PRPF19、CASP10、SLC37A2、RHOJ、MPHOSPH10、PPIH、RASSF1、HCST、C16orf54、EPB41L4B、LRMP、LAPTM5、PRDM2、CYGB、LYCAT、ACP5、CMKLR1、UBE1L、MAN2C1、TNFSF12、C7orf24、Cxorf15、CUL1、SMAD7、ITGB7、APOL3、PGRMC1、PPA1、YES1、FBLN1、MRC2、PTK9L、LRP1、IGFBP5、WDR3、GTPBP4、SP11、SELPLG、OSCAR、LYL1、POLR2H、YWHAQ、ISG20L2、LGI14、KIF5B、NGRN、TYROBP、C5orf4、COX7A2、S100A4、MATK、TMEM33、DOK3、LOC150166、CIRBP、NIN、C10orf72、FMNL1、FAT3、CHKB/CPT1B、SNRPA1、GIMAP4、C20orf18、LTBP2、GAB3、NQO1、MARCH2、MYO1F、CDS1、SRD5A1、C20orf160、SLAMF7、ACTL6A、ABP1、RAE1、MAF、SEMA3G、P2RY13、ZDHHC720、ERG、FHL1、CLEC10A、INTS5、MYO15B、CTSW、PILRA、HN1、SCARA5、PRAM1、EBP、SIGLEC9、LGP1、DGUOK、GGCX、RABL5、ZBTB16、TPSAP1、NOP5/NOP58、CCND2、CD200、EPPK1、DKFZp586C0721、CCT6A、RIPK3、ARHGAP25、GNAI2、USP4、FAHD2A、LOC399959、LOC133308、HKDC1、CD93、GTF3C4、ITGB2、ELOVL6、TGFB1I1、ASCC3L1、FES、KCNMB1、AACS、ATP6VOD2、TMEM97、NUDT15、ATP6V1B2、CCDC86、FLJ10154、SCARF2、PRELP、ACHE、GIMAP8、PDE4DIP、NKG7、C20orf59、RHOG、TRPV2、TCP1、TNRC8、TNS1、IBSP、MMP9、NRIP2、OLFML2B、OMD、WIF1、ZEB2、ARL8、COL12A1、EBFおよびEBF3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；
- (ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、C21orf91、TFCP2L1、TTMA、CHODL、CALB2、UGT8、LOC146795、C1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、C20orf42、ELAC1、GYLTL1B、SPSB1、CHRM3、PTEN、PIGL、CHRM3、CDH3からなる群から選ばれる、肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；30
- (iii) TBX3、SYT17、LOC90355、AGXT2L1、LETM2、LOC145820、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、ARPC2、CAB39L、SLC16A3、DHFRL1、PRRT3、CYP3A5、RPS6KA5、KIAA1505、ATP5S、ZFYVE16、KIAA0701、PEBP1、DDHD2、WWP1、CCNL1、ROBO2、FAM111B、THRAP2、CRSP9、KARCA1、SLC16A3、ARID4A、TCEAL1、SCAMP1、KIAA0701、EIF5A、DDX46、PEX7、BCL2L11、YBX1、UBE21、REX02、AXUD1、C10orf2、ZNF548、FBXL16、LOC439911、LOC283874、ZNF587、FLJ20366、KIAA0888、BAG4、CALU、KIAA1961、USP30、NR4A2、FOX A1、FBXO15、WNK4、CDIPT、NUDT16L1、SMAD5、STXBP4、TTC6、LOC113386、TSPYL1、CIP29、C8orf1、SYDE2、SLC12A8、SLC25A18、C7、STAU2、TSC22D2、GADD45G、PHF3、TNRC6C、TCEAL3、RRN3、C5orf24、AHCTF1、LOC92497からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；および、40
- (iv) LOC644215、BAT1、GPR75、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、PTK2、SQSTM1、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX31、FAM119A、LLGL2、DDX27、TRA16、HOXB13、GNAS、CSPP1、COL8A1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655、RAC3、AP4M1、HEG1、PCBP2、SLC30A7、ATAD3A/ATAD3B、CHI3L1、MUC6、HMG20B、BCL7A、GGN、ARHGEF3、PALLD、TOP1、PCTK1、C20orf4、ZBTB1、MSH6、SETD5、POSTN、MOC33、GABPA、ZSWIM1、ZNHIT2、LOC653352、ELL、ARPC4、ZNF277、VAV2、HNRPH3、LHX1、FAM83A、DIP2B、RBM10、PMPCA、TYSND1、RAB4B、DLC1、KIAA2018、TES、TFDP2、C3orf10、ZBTB38、PSMD7、RECK、JMJD1C、FLJ20273、CENPB、PLAC2、C6orf111、ATP10D、RNF146、XRR1、NPAS2、APBA2BP、WDR350

4、SLK、SBF2、SON、MORC3、C3orf63、WDR54、STX7、ZNF512、KLHL9、LOC284889、ETV4、RMND5B、ARMCX1、SLC29A4、TRIB3、LRRRC23、DDIT3、THUMP3、MICAL-L2、PA2G4、TSEN54、LAS1L、MEA1、S100PBP、TRAF2、EMILIN3、KIAA1712、PRPF6、CHD9、JMJD1B、ANKS1A、CAPN5、EPC2、WSCR27、CYB561、LLGL1、EDD1からなる群から選ばれる、脳組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー。

【請求項15】

肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーを定量する手段を含み、前記1種以上の生物学的マーカーが、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる、請求項14記載のキット。

【請求項16】

下記の工程を含むことを特徴とする、乳癌に侵されている患者の1以上の組織または臓器内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーの選択方法：

a) 組織サンプル中の1種以上の生物学的マーカーを検出および/または定量する手段を用意する工程；

b) 乳癌患者に由来する複数の転移組織サンプル収集物(これらの収集物は、各々、転移乳癌患者の独自の組織タイプに由来する転移に由来する複数の組織サンプルからなる)を用意する工程；

c) 前記1種以上の生物学的マーカーの各々を、各組織サンプル収集物中に含まれている組織サンプル毎に個別に検出および/または定量する工程；

d) 工程c)において検出および/または定量する生物学的マーカー群において、工程b)において用意した複数の組織サンプル収集物に含まれる1つの組織サンプル収集物中でのみ専ら発現するマーカーを選択し、それによって、1群のマーカー(この群のマーカーは、その発現が乳癌患者の特定の組織内での転移発生の可能性を示すマーカーを含む)を組織サンプル収集物毎に選択する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の乳癌進行の予後診断、さらに詳細には、乳癌に侵されている患者の1以上の組織または臓器内での転移発生の予測に関する。

【背景技術】

【0002】

乳癌は、欧米女性における最も一般的な悪性疾患である。原発性腫瘍ではなくて、離れた臓器内での転移の発生が癌患者における主要な死亡原因である。二次腫瘍が一旦定着すると、長期生存のチャンスは、90%から5%辺りまで落ち込む。ターゲット療法開発の進展にもかかわらず、治療患者のほぼ40%が再発し、最終的には転移性乳癌によって死亡する。転移の基礎をなす分子および細胞メカニズムのより一層良好な理解により、乳癌治療を改善する有効な治療法の開発は改良され得ている。

【0003】

悪性乳房腫瘍は、直ぐ近くの組織および臓器を浸潤し損傷させ得る。悪性腫瘍細胞は、血流またはリンパ系に転移し侵入し得る。乳癌細胞は、乳房外に転移したとき、多くの場合、腕の下リンパ節(腋窩リンパ節)において見出される。癌がこれらの節に到達した場合は、癌細胞が他のリンパ節或いは骨、肝臓、脳または肺臓のような他の臓器に広がり得ることを意味する。また、種々の臓器の乳癌転移は、リンパ節への事前の拡散なしでも生じる。重要で集中的な研究は、転移性乳癌の早期検出、治療および予防に絞られている。

乳癌のリスクにある女性に対する予防、診断および治療方法の合理的な開発は、腫瘍形成過程の分子マップによって促進されるであろう。相対的に、正常な乳腺細胞の乳癌進行の各種段階への推移を介在する分子事象は、殆ど知られていない。同様に、乳癌の1つの段階からもう1つの段階への、最終的には転移に至る細胞の推移を介在する分子事象も殆

10

20

30

40

50

ど知られていない。

【0004】

正常な非癌性細胞と癌性細胞間の相違を特定する分子手法は、重点的な研究の目的である。発癌性細胞に対する正常細胞の遺伝子発現パターンの相違を分析するためのcDNAライブラリーの使用も説明されている。ヒト乳癌における遺伝子発現パターンは、Perou等によって説明されており(1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96 : 9212-9217)、彼らは、培養したヒト“正常”乳房上皮細胞(HMEC)と乳房組織サンプル間の遺伝子発現を、約5000の遺伝子を含むマイクロアレーを使用することによって研究している。Perou等は、クラスタ化アルゴリズムを使用して、HMECおよび組織サンプル中での発現の識別パターンを特定している。Perou等(2000, Nature, Vol. 406 : 747-752)は、ヒト乳房腫瘍のサブタイプを分類するためのクラスタ化遺伝子発現プロファイルの使用を説明している。Hedenfalk等(2001, New Engl. J. Medicine, Vol. 344(8) : 539-548)は、BRCA1変異陽性でBRCA2変異陽性で且つ散発性腫瘍における遺伝子発現プロファイルを説明している。遺伝子発現パターンを使用して乳房腫瘍のサブクラスを識別し、臨床的意義を予測することは、Sorlie等(2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98(19) : 10869-10874)およびWest等(2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98(20) : 11462-11467)によって説明されている。

10

【0005】

原発性腫瘍が転移過程を予測する遺伝子を既に含有し得るという前提に基づき、幾つかのグループは、広範なゲノムマイクロアレー試験を行って遠隔再発の発生および貧弱な生存率と関連する発現プロファイルを特定している。転移過程および/または遠隔再発のマーカーに潜在的に関与する遺伝子を含む数種の高度に予後的な遺伝子サインが報告されている。これらの研究は、主として、再発問題全体に取り組んでいる。

20

また、幾つかの組織または臓器内での乳癌転移に関与する生物学的マーカーを同定することを目的とした研究も当該技術において行われている。この目的においては、ヌードマウスにおいてヒト乳癌異種移植法を使用する生体内試験が、以下で説明するようにして行われている。

【0006】

Kang等(2003, Cancer Cell, Vol. 3 : 537-549)は、骨への乳癌転移に潜在的に関与する1群の遺伝子を、(i) MDBA-MB-231ヒト乳癌細胞系の生体外培養細胞から得られた遺伝子発現プロファイルを(ii) マウスにおいて骨転移を形成する能力について前以って実験的に生体内で選択した同じ細胞系のサブクローンから得られた遺伝子発現プロファイルと比較することによって同定している。これらの著者は、マイクロアレー遺伝子発現分析法を使用して、マウスにおいて骨転移を形成する能力について選択した細胞下位系において、親MDBA-MB-231ヒト乳癌細胞系と比較したとき、数種の遺伝子は不十分に発現し、数種の他の遺伝子は過発現していることを証明している。これらの著者は、MDBA-MB-231ヒト細胞系の場合、骨への転移に関連する細胞機能は、CXCR4、CTGF、IL-11およびOPN遺伝子により、他の遺伝子の潜在的寄与と相俟って発揮されると結論付けている。

30

【0007】

Minn等(2005, Nature, Vol. 436(28) : 518-524)は、同じMDBA-MB-231ヒト乳癌親細胞系を、マウスにおいて肺転移を形成する能力を有する細胞下位系を生体内で選択するのに使用している。その後、これらの著者は、侵襲性の肺転移挙動に関連する遺伝子発現パターンを同定する目的で、高および弱肺転移性細胞集団のトランスクリプトミクスマイクロアレー分析を行っている。54種の候補肺転移形成性(metastagenicity)および毒性遺伝子の最終目録を選択し、MMP1、CXCL1およびPTGS2のような、これらの遺伝子のうちの12種を、それらの無肺転移生存との有意の関連についてさらに同定した。

40

上記で報告した研究においては、著者等は、動物モデルにおいて骨または肺転移を特異的に介在する1群の遺伝子を同定し機能的に確認している。同定した臓器特異性遺伝子サインは、(i) 骨または肺に優先的に転移する原発性乳癌と(ii) 他の部位に転移する原発性乳癌とを区別することを可能にした。

50

最近、1つの研究において、ヒト乳癌の骨特異性転移の予後診断を可能にする分子特性が報告されている。この研究は、骨に再発する原発性乳房腫瘍を他の部位に再発する原発性乳房腫瘍と比較することによって行われている。著者等は、結果として、骨への乳癌転移に関連する1群の遺伝子を同定している(Smid et al., 2006, J Clin Oncol, Vol. 24(15) : 2261-2267)。

【0008】

しかしながら、原発性腫瘍の混合コホートにおける臓器特異性特性の試験は、特異性転移をもたらさない原発性腫瘍と対比しての特異性転移をもたらす原発性腫瘍の確固たる分類を可能にしていない。このことは、おそらく、これら遺伝子サインの予測値が殆どないことによる。

乳癌患者における早期の転移検出は、長期無病生存のチャンスを増大させる目的において、抗癌治療処置を相応に適応化するのに不可欠である。

しかしながら、乳癌患者における転移検出は、その検出が転移の早期段階で行われたとしても、癌帰結の貧弱な予測からなることから、当該技術においては、医療および医療調査の双方の目的において、乳癌腫瘍の潜在的転移を検出する信頼性のある方法を利用可能にすることが益々求められている。また、当該技術においては、乳癌転移癌の形成および発症がおそらく生じるであろう1以上の組織または臓器の予測を与える方法も求められている。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、乳癌に侵されている患者における転移の発生を予測する方法およびキットに関する。

本発明の乳癌転移予測方法は、検査すべき乳癌患者から前以って採集した腫瘍組織サンプルにおいて、転移に向う癌進行を指標する1種以上の生物学的マーカー、さらに正確には、特定の組織、とりわけ、骨、脳、肺および肝臓への転移に向う癌進行を指標する1種以上の生物学的マーカーの発現量を測定する工程を含む。

また、本発明は、上記の転移予測方法を実施するために特別に設計した乳癌転移予測キットにも関する。

また、本発明は、骨、脳、肺および肝臓のような特定の組織における転移に向う癌進行を指標する1種以上の生物学的マーカーを選択する方法にも関する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】原発性腫瘍に対する骨および肺転移関連遺伝子試験。27名の患者コホートからの再発性原発性乳癌の階層的クラスタ解析を、肺(A)および骨(B)転移サインによって行った。相応する患者の無肺転移生存率および無骨転移生存率解析を行った。患者群A2からの腫瘍(最終結果)は、骨転移関連遺伝子を骨再発と類似した形で発現している。患者群B2からの腫瘍(最終結果)は、骨転移関連遺伝子を骨再発と類似した形で発現している。

【図2】臓器特異性サインを使用しての原発性乳癌の分離比解析。図2Aは、無肺転移生存率を示す。図2Bは、無骨転移生存率を示す。図2Cは、全体的無転移生存率を示す。肺転移サインを発現した乳癌患者(図2A、クラスタAに相応)または発現しなかった(緑線)(クラスタB+C)乳癌患者 82名の乳癌患者における無肺転移生存率(カプラン・マイヤー解析)。

【図3】72例のリンパ節転移陰性乳癌群(CRHコホート)における6種遺伝子肺転移サインの挙動。(A)上記6種遺伝子サインによって同定した高リスクおよび低リスク群における遠隔転移(最初および/または唯一の転移部位)の分布(カイ二乗検定)。(B)上記6種遺伝子サインを発現する腫瘍を有する患者等(高リスク群)は、短い無肺転移生存を有していた(ログランク検定)。(CおよびD) 無骨転移生存および無肝転移生存のカプラン・マイヤー曲線は、6種遺伝子サインによって同定した高リスク群と低リスク群間で差を示していなかった。

【図4】3つの独立の乳癌患者群における6種遺伝子肺転移サインの検証。無肺転移生存

10

20

30

40

50

を、MSKコホート(図4A)、EMCコホート(図4B)コホートおよびNKIコホート(図4C)(それぞれ、82名、344名および295名の患者)並びに721名の乳癌患者の複合コホート(図4D)について解析した。カプラン・マイヤー解析は、上記6種遺伝子サインを発現した患者(高リスク群)と発現しなかった患者(低リスク群)を区別していた。肺転移の高予測リスクを有する患者等は、短い無肺転移生存率を有していた。

【図5】肺転移リスク予測における種々の臨床病理マーカーと遺伝子発現サインの積分解析(integration)。(A) 乳癌肺転移の予測は、2つの異なるモデルに由来する予測因子の組合せを脂溶することによって改善されている。(B) 臨床および試験に由来するサインに従う721名の乳癌患者の複合コホート(MSK/EMC/NKI)における肺転移分布。両サインに対して陰性である患者は、黒色で示しており；拡散した帰属(divergent assignment)を示す患者は、青色で示しており；両サインに対して陽性であると判明した患者は、緑色で示している。上記6種遺伝子サインおよびLMSサインは、肺転移に関連する乳癌患者の帰結分類において85%の一致を示した(カッパ係数 = 0.57)。(B) 上記6種遺伝子およびMDA由来肺転移サインに従う乳癌患者(n = 721)のカプラン・マイヤー解析。

【図6】原発性腫瘍に対する骨転移性関連遺伝子試験：患者コホートからの再発性原発性乳癌の階層的クラスタ解析を11遺伝子骨転移サインによって行った。相応する患者の無骨転移生存率解析を実施した。

【発明を実施するための形態】

【0011】

乳癌患者における転移発症の可能性の早期予測を可能にする方法を、本発明によって提供する。

詳細には、本発明は、本明細書において、乳癌患者における1以上の特定の組織または臓器、とりわけ、骨、肺、肝および脳組織または臓器への転移の発生の予測を可能にする方法およびキットを提供する。

本発明によれば、乳癌患者における転移発生の高い可能性を指標する生物学的マーカーの高信頼性組織特異性群を同定した。

これらの高信頼性組織特異性生物学的マーカー群の同定は、本明細書において以下で説明するそのような転移生物学的マーカーの高度に正確なスクリーニング方法の使用に基づき可能になった。

【0012】

従って、本発明の目的は、下記の工程を含むことを特徴とする、乳癌に侵されている患者における転移発生の生体外予測方法からなる：

a) 検査すべき患者から前以って採集した乳房腫瘍組織サンプルを用意する工程；

b) 前記乳房腫瘍組織サンプルにおいて、1以上の組織または臓器内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーの発現を判定することからなり、前記1種以上の生物学的マーカーを、下記からなる群から選択する工程：

(i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、LST1、MMRN2、SH2D3C、RAMP3、FAM26B、ILK、TM6SF1、C10orf54、CLEC3B、IL2RG、HOM-TES-103、ZNF23、STK35、TNFAIP8L2、RAMP2、ENG、ACRBP、TBC1D10C、C11orf48、EBNA1BP2、HSPE1、GAS6、HCK、SLC2A5、RASA3、ZNF57、WASPIP、KCNK1、GPSM3、ADCY4、AIF1、NCKAP1、AMICA1、POP7、GMFG、PPM1M、CDGAP、GIMAP1、ARHGAP9、APOB48R、OCIAD2、FLRT2、P2RY8、RIPK4、PECAM1、URP2、BTK、APBB1IP、CD37、STARD8、GIMAP6、E2F6、WAS、HLA-DQB1、HVCN1、LOC56902、ORC5L、MEF2C、PLCL2、PLAC9、RAC2、SYNE1、DPEP2、MYEF2、HSPD1、PSCD4、NXT1、LOC340061、ITGB3、AP1S2、SNRPG、CSF1、BIN2、ANKRD47、LIMS2、DARC、PTPN7、MSH6、GGTA1、LRR33、GDPD5、CALCOCO1、FAM110C、BCL6B、LOC641700、ARHGDI1B、DAAM2、TNFRSF14、TPSAB1、CSF2RA、RCS D1、FLJ21438、LOC133874、GSN、SLIT3、FYN、NCF4、PTPRC、EVI2B、SCRIB、C11orf31、LOC440731、TFAM、ARPC5L、PARVG、GRN、LMO2、CRSP8、EHBP1L1、HEATR2、NAALADL1、LTB、STRBP、FAM65A、ADARB1、TMEM140、DENND1C、PRPF19、CASP10、SLC37A2、RH0J、MPHOSP H10、PPIH、RASSF1、HCST、C16orf54、EPB41L4B、LRMP、LAPTM5、PRDM2、CYGB、LYCAT、A

CP5、CMKLR1、UBE1L、MAN2C1、TNFSF12、C7orf24、Cxorf15、CUL1、SMAD7、ITGB7、APOL3、PGRMC1、PPA1、YES1、FBLN1、MRC2、PTK9L、LRP1、IGFBP5、WDR3、GTPBP4、SPI1、SELP LG、OSCAR、LYL1、POLR2H、YWHAQ、ISG20L2、LGI14、KIF5B、NGRN、TYROBP、C5orf4、COX 7A2、S100A4、MATK、TMEM33、DOK3、LOC150166、CIRBP、NIN、C10orf72、FMNL1、FAT3、C HKB/CPT1B、SNRPA1、GIMAP4、C20orf18、LTBP2、GAB3、NQO1、MARCH2、MYO1F、CDS1、SRD 5A1、C20orf160、SLAMF7、ACTL6A、ABP1、RAE1、MAF、SEMA3G、P2RY13、ZDHHC7、ERG、FH L1、CLEC10A、INTS5、MYO15B、CTSW、PILRA、HN1、SCARA5、PRAM1、EBP、SIGLEC9、LGP1 、DGUOK、GGCX、RABL5、ZBTB16、NOP5/NOP58、CCND2、CD200、EPPK1、DKFZp586C0721、CC T6A、RIPK3、ARHGAP25、GNAI2、USP4、FAHD2A、LOC399959、LOC133308、HKDC1、CD93、GT F3C4、ITGB2、ELOVL6、TGFB1I1、ASCC3L1、FES、KCNMB1、AACS、ATP6VOD2、TMEM97、NUDT 15、ATP6V1B2、CCDC86、FLJ10154、SCARF2、PRELP、ACHE、GIMAP8、PDE4DIP、NKG7、C20o rf59、RHOG、TRPV2、TCP1、TNRC8、TNS1、IBSP、MMP9、NRIP2、OLFML2B、OMD、WIF1、ZEB 2、ARL8、COL12A1、EBFおよびEBF3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指 標する 1 種以上の生物学的マーカー；

(ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、C21orf91、TFCP2L1、TTMA、CHODL、CALB2、UGT 8、LOC146795、C1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、C20orf42/FERMT1、ELAC1、GYLT L1B、SPSB1、CHRM3、PTEN、PIGL、CHRM3、CDH3からなる群から選ばれる、肺組織内での転 移発生を指標する 1 種以上の生物学的マーカー；

(iii) TBX3、SYT17、LOC90355、AGXT2L1、LETM2、LOC145820、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、ARPC2、CAB39L、SLC16A3、DHFRL1、PRRT3、CYP3A5、RPS6 KA5、KIAA1505、ATP5S、ZFYVE16、KIAA0701、PEBP1、DDHD2、WWP1、CCNL1、ROBO2、FAM11 1B、THRAP2、CRSP9、KARCA1、SLC16A3、ARID4A、TCEAL1、SCAMP1、KIAA0701、EIF5A、DDX 46、PEX7、BCL2L11、YBX1、UBE21、REXO2、AXUD1、C10orf2、ZNF548、FBXL16、LOC439911 、LOC283874、ZNF587、FLJ20366、KIAA0888、BAG4、CALU、KIAA1961、USP30、NR4A2、FOX A1、FBXO15、WNK4、CDIPT、NUDT16L1、SMAD5、STXBP4、TTC6、LOC113386、TSPYL1、CIP29 、C8orf1、SYDE2、SLC12A8、SLC25A18、C7、STAU2、TSC22D2、GADD45G、PHF3、TNRC6C、T CEAL3、RRN3、C5orf24、AHCTF1、LOC92497からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発 生を指標する 1 種以上の生物学的マーカー；および、

(iv) LOC644215、BAT1、GPR75、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3 、PTK2、SQSTM1、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX31、FAM119A、LLGL2、DDX27、TRA16、HOXB1 3、GNAS、CSPP1、COL8A1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655、RAC3、AP4M1、HEG1、PCBP2、SLC30A7、ATAD3A/ATAD3B、CHI3L1、MUC6、HMG20B、BCL7A、GGN、ARHGEF3、PALLD 、TOP1、PCTK1、C20orf4、ZBTB1、MSH6、SETD5、POSTN、MOC33、GABPA、ZSWIM1、ZNHIT2 、LOC653352、ELL、ARPC4、ZNF277、VAV2、HNRPH3、LHX1、FAM83A、DIP2B、RBM10、PMPCA 、TYSND1、RAB4B、DLC1、KIAA2018、TES、TFDP2、C3orf10、ZBTB38、PSMD7、RECK、JMJD1 C、FLJ20273、CENPB、PLAC2、C6orf111、ATP10D、RNF146、XRR1、NPAS2、APBA2BP、WDR3 4、SLK、SBF2、SON、MORC3、C3orf63、WDR54、STX7、ZNF512、KLHL9、LOC284889、ETV4、RMND5B、ARMCX1、SLC29A4、TRIB3、LRRC23、DDIT3、THUMP3、MICAL-L2、PA2G4、TSEN54 、LAS1L、MEA1、S100PBP、TRAF2、EMILIN3、KIAA1712、PRPF6、CHD9、JMJD1B、ANKS1A、C APN5、EPC2、WBSCR27、CYB561、LLGL1、EDD1からなる群から選ばれる、脳組織内での転移 発生を指標する 1 種以上の生物学的マーカー；

c) 1 以上の組織または臓器内の転移発生を、1 種以上の上記生物学的マーカーが、相 応する組織または臓器内での転移を被っていない患者の乳房腫瘍サンプルにおいて測定し たその対応する発現量と比較したとき、脱制御(deregulated)発現量を有する場合に予測 する工程。

【 0 0 1 3 】

本明細書において先に説明したように、従来技術の研究は、転移過程に潜在的に関与す る遺伝子および/または遠隔再発のマーカーを含む数種の遺伝子サインを開示している。 しかしながら、これらの従来技術の研究は、全体的再発問題に対処している。複数のタイ プの転移および転移に至る潜在的に複数の明確な病理過程が存在するので、これらの従来

技術の研究は、正確性の欠如を伴っていた。

とりわけ、複数のこれら従来技術方法によれば、転移特異性生物学的マーカーの選択は、人工的生体内系における、即ち、非ヒト動物、とりわけ、マウスにおけるヒトマーカー発現分析によって行っていた。

さらに、転移特異性生物学的マーカーのスクリーニングは、一般に、人工ヒト細胞系、即ち、1種以上の遺伝子またはタンパク質の発現人工物を除外し得ない確立させたヒト癌細胞系を使用して行われている。生物学的マーカー発現人工物導入の可能性は、マウスのような非ヒト動物系中での生体内細胞投与/選択サイクルを繰返すことによる、親細胞系由来の転移能を有する複数のヒト細胞下位系の選択のような使用するスクリーニング方法の各種特徴によってさらに増大する。

さらにまた、これらの従来技術方法によれば、適切な細胞下位系を、非ヒト動物において、その高転移能について最終的に選択した時点で、識別的遺伝子発現分析を、(i) 親ヒト乳癌細胞系と(ii) 転移能を有する各種細胞下位系間の遺伝子発現量を比較することによって行っている。

【0014】

乳癌における転移特異性マーカーを選択する従来技術方法の正確性を改良することを考慮して、本発明者等は、完全なヒト分析系を使用し、且つ、幾つかの特徴のなかでとりわけ、候補生物学的マーカーの発現量を(i) 興味ある転移組織または臓器と(ii) 1以上の明確な転移組織または臓器間で比較し、それによって、マーカー選択方法の終了時に、前向きに選択している組織特異性転移生物学的生物学的マーカーの高選択性と統計的関連性を可能にする工程を含む、乳癌における転移の高信頼性組織特異性マーカーを選択する独創的な方法を設計している。

本明細書の実施例において示すように、候補生物学的マーカーの発現量を(i) 骨、肺、肝および脳からなる群から選ばれる興味ある転移組織または臓器と(ii) 骨、肺、肝および脳からなる群から選ばれる全ての他の転移組織または臓器間で比較する工程を含むマーカー選択方法を使用したとき、本発明者等は、高い統計的関連性を有する組織特異性乳癌転移生物学的マーカーを $1 \cdot 10^{-4}$ よりも常に低いP値でもって同定しており、このP値は、最も統計的に関連性のある生物学的マーカーにおいては 10^{-6} よりも低い。最初に選択した生物学的マーカーの統計的関連性は、本明細書の実施例において示しているように、乳癌患者の腫瘍組織サンプル中での上記組織特異性マーカーの発現についてアッセイした後に、カプラン・マイヤー解析によって十分に確証されている。

【0015】

本明細書において意図するとき、“生物学的マーカー”は、特異的遺伝子の発現時に合成されるあらゆる検出可能な生成物に及び、従って、遺伝子特異性mRNA、cDNAおよびタンパク質を包含する。

本明細書において使用するとき、“転移の発生を指標する生物学的マーカー”または“転移特異性マーカー”とは、特定の所定の組織内または特定の所定の臓器内で転移を生じているまたは転移を生じているであろう乳房腫瘍中で、上記特定の所定の組織内または上記特定の所定の臓器内で転移を生じていないまたは生じていないであろう乳房腫瘍中での同じ生物学的マーカーの発現と比較したとき、特異的に発現するあらゆる生物学的マーカーを包含する。好ましくは、組織および臓器は、骨、肺、肝および脳からなる群から選ばれる。

“組織特異性”マーカーおよび“組織転移特異性”マーカーなる用語は、本明細書においては互換的に使用する。同様に、“臓器特異性”マーカーおよび“臓器転移特異性”マーカーなる用語も、本明細書においては互換的に使用する。

【0016】

本明細書において意図するとき、“転移の発生の予測”とは、絶対値からなるものではなく、対照的に、乳癌患者において、1以上の特定の組織または臓器への転移の発生の可能性を定量することを可能にする相対値からなる。ある種の実施態様においては、転移発生の予測は、試験する1種以上の生物学的マーカーの各々において得られた発現値から算

10

20

30

40

50

出したP値のような統計値として表す。

本明細書において意図するとき、“腫瘍組織サンプル”とは、(i) 原発性腫瘍全体(全体としての)、(ii) 腫瘍中心からの組織サンプル、(iii) 腫瘍中心以外の腫瘍内の位置からの組織サンプルおよび(iv) 腫瘍組織自体の外側に位置する任意の腫瘍細胞を包含する。ある種の実施態様においては、上記腫瘍組織サンプルは、乳癌患者に対して行った腫瘍切除の外科活動に由来する。ある種の実施態様においては、上記組織サンプルは、腫瘍組織の一片をさらなる分析のために乳癌患者から収集する生検外科活動に由来する。さらなる実施態様においては、上記組織サンプルは、原発性腫瘍組織或いは既に発症している転移に由来する腫瘍細胞を含有する全血サンプル、血清サンプルおよび血漿サンプルのような血液サンプルからなる。さらなる実施態様においては、上記腫瘍サンプルは、原発性腫瘍組織或いは既に発症している転移に由来する腫瘍細胞が産生する腫瘍タンパク質を含有する全血サンプル、血清サンプルおよび血漿サンプルのような血液サンプルからなる。

10

20

30

40

50

【0017】

本明細書において特定した各種生物学的マーカーの名称は、その相補DNA(cDNA)およびゲノムDNA(gDNA)配列のようなその完全アミノ酸および核酸配列を利用するのに使用し得るその国際的に承認された頭字語に相応する。具体的には、本明細書において特定した生物学的マーカーの各々の相応するアミノ酸および核酸配列は、本明細書において“遺伝子記号”とも称するその頭字語名称に基づき、GenBankまたはEMBL配列データベースにおいて検索し得る。本明細書において挙げた全ての遺伝子記号は、GenBank命名法に相応している。従って、生物学的マーカーのDNA (cDNAおよびgDNA)配列並びにアミノ酸配列は、当業者にとって、とりわけ以下のウェブサイトアドレス：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>から十分に入手可能である。また、同じ配列は、以下のウェブサイトアドレス：<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>で利用し得るHugo Gene Nomenclature Committee (HGCN)データベースから検索し得る。

【0018】

本発明に従う生体外予測方法の工程b)においては、1種以上の特定した生物学的マーカーを定量する。生物学的マーカーの定量法は、上記生物学的マーカーの発現量の検出を含む。特異性生物学的マーカーの発現量の検出法は、試験する腫瘍組織サンプル中で発現する相応する特異性mRNAまたはcDNAの量の評価、並びに上記腫瘍組織サンプル中で産生する相応するタンパク質の量の評価を包含する。

本発明に従う方法の工程b)の終了時には、定量値が、使用する1種以上の生物学的マーカーの各々について得られる。

【0019】

先に明記したように、工程b)の特定の実施態様は、下記を含む：

(i) 1種以上の生物学的マーカーの免疫化学法による定量；この定量は、興味ある1種以上のタンパク質マーカーを、腫瘍組織サンプルにおける現場免疫組織化学法により、例えば、上記1種以上のタンパク質マーカー各々に対して特異的に指向する抗体を使用して定量することを含む；

(ii) 1種以上の生物学的マーカーの遺伝子発現分析による定量；この定量は、興味ある1種以上のマーカーmRNAを、例えば、Real-Time PCR Taqman PCR分析を実施することにより、さらにまた、特異的に専用化DNAマイクロアレー、即ち、本明細書において列挙した生物学的マーカーのうちで興味ある生物学的マーカーのいずれにも相応するcDNAと特異的にハイブリッド化する核酸を結合させた基体を含むDNAマイクロアレーを使用することにより、定量することを含む。

【0020】

上記方法のある種の実施態様においては、工程b)は、腫瘍組織サンプルにおいて、上記で特記したマーカー遺伝子のうちの1種以上のマーカー遺伝子の発現量を定量することからなる。一般に、少なくとも2種のマーカー遺伝子の組合せにおける発現量の評価を行う。上記方法の工程b)のこれらの実施態様においては、工程b)の終了時に得られるのは

、腫瘍組織サンプル中に含まれる細胞内で特異的に見出される各マーカー遺伝子について見出される発現量値(核酸またはタンパク質発現量)である。

本発明に従う転移特異性生物学的マーカーの発現量は、組織サンプル中で検出した興味ある相応するmRNAの量を反映する何らかの任意単位、例えば、(i) 組織サンプルのmRNA含有量のリアルタイムPCR分析および(ii) 増幅核酸のDNAマイクロアレイへのハイブリッド化によるような組織サンプルのmRNA含有量のPCR分析によって産生させたcDNA物質が発出する放射能または蛍光シグナルの強度として表し得る。好ましくは、上記発現量値は、絶対発現量値と対照値との比較後に得られた標準化相対値からなり、上記対照値は、正常または腫瘍乳房組織のいずれかからなるかにかかわらないおよび/または非転移性または転移性乳房組織のいずれかからなるかにかかわらない任意の乳房組織サンプルにおいて同じ発現量値を有する遺伝子の発現量値からなる。具体的には、上記対照値は、本明細書の実施例において示しているように、TATAボックス結合タンパク質(TBP)をコード化するmRNA量からなり得る。

10

【0021】

また、上記発現量は、上記組織サンプル中で検出した興味あるタンパク質の量を反映する何らかの任意単位、例えば、興味あるタンパク質に特異的に結合させたラベル化抗体が発出する放射能または蛍光シグナルの強度として表し得る。また、工程b)の終了時に得られる値は、ELISA、SELDI-TOF、FACAまたはウェスタンブロッティングのような当該技術において周知の各種タンパク質検出方法によって測定することのできる興味あるタンパク質(1種以上)の濃度からなり得る。

20

本明細書において特記している生物学的マーカーは、いずれも、(i) 専ら乳癌転移性組織または臓器内で所定の発現量で特異的に発現する、および(ii) 異なる乳癌転移性組織または臓器内で別の発現量で発現する生物学的マーカーからなるので、その場合、原発性腫瘍試験標本に由来する腫瘍組織サンプル中でのその発現の単純な定量が、担乳癌患者が上記組織または臓器内での転移の発生を被りそうであることを予測することを可能にする。

【0022】

さらに、本明細書において特記している1種以上の生物学的マーカーの定量は、担乳癌患者の1以上の特異的組織または臓器内での転移発生の可能性に関するさらなる予測データももたらす；何故ならば、転移発生の可能性が、転移を被っていない患者からの乳房腫瘍サンプル中で前以って測定した1種以上の生物学的マーカーの対照発現値と比較したとき、少なくとも検討する興味ある組織または臓器において、試験する上記1種以上の生物学的マーカーの発現量の脱制御の増大を伴って増大するからである。

30

従って、本明細書において使用するとき、“脱制御発現量”を有する興味ある生物学的マーカーは、本発明に従う生体外予測方法の工程b)を実施したとき、(i) 決して転移を被らない乳癌患者に由来する腫瘍組織サンプル中または(ii) 上記生物学的マーカーが転移特異性である組織または臓器において決して転移を被らない乳癌患者に由来する腫瘍組織サンプル中において前以って測定した上記生物学的マーカーにおける発現量値(“対照”発現値とも称し得る)とは異なる発現量値が見出せる転移特異性生物学的マーカーからなる。

【0023】

40

本発明に従う予測方法の工程c)を実施するに当たっては、当業者であれば、本明細書において説明する、とりわけ、下記の表1、2、5および8において見出せるような転移特異性マーカーの各々についての脱制御発現値を参照し得るであろう。

実施例において示しているように、本明細書において列挙したどの生物学的マーカーも、最低の統計的関連性を有するマーカーが 1.10^{-4} よりも低いP値を有することから、特定の組織中での転移発生を予測するのに高度に関連している。

さらに、転移予測の精度は、上記方法の工程c)において、所定の組織または臓器に対する2種以上の組織特異性生物学的マーカーを工程b)において検出および/または定量したときに上昇する。

従って、本発明に従う予測方法の好ましい実施態様においては、所定の組織または臓器

50

に対する2種以上の生物学的マーカーを、上記方法の工程b)において検出および/または定量する。

上記方法の工程b)において定量する所定の組織または臓器に対して特異性の生物学的マーカー数が多いほど、上記方法の工程c)において得られる予測結果は正確である。

【0024】

所定の組織または臓器に対して特異性の複数の生物学的マーカーを上記方法の工程b)において定量することにより、上記複数のマーカーの実験的発現プロファイルを創生することが可能となり、その場合、この実験的発現プロファイルを、組織特異性転移患者から前以って測定した少なくとも1つの参照発現プロファイルと比較する。具体的には、骨転移が検査する患者において疑われる場合、上記方法の工程b)において使用した骨転移特異性マーカー遺伝子の定量の結果から得られた実験的発現プロファイルを、骨転移に相応する先存参照発現プロファイルと比較する。好ましくは、骨特異性転移マーカーの実験的発現プロファイルを、骨転移を示す患者において前以って測定した同じ遺伝子の参照発現プロファイル並びに他の組織または臓器特異性転移を示す患者から得られた参照発現プロファイルと比較して上記実験的発現プロファイルが骨転移を示す患者から予め測定していた参照発現プロファイルと最も近いことを確認する。

上記予測方法のある種の実施態様においては、工程b)は、組織または臓器各々に対する少なくとも1種の組織特異性生物学的マーカーを定量することを含む。具体的には、上記方法のこれらの実施態様においては、工程b)は、(i) 少なくとも1種の骨特異性生物学的マーカー、(ii) 少なくとも1種の肺特異性生物学的マーカー、(iii) 少なくとも1種の肝特異性生物学的マーカーおよび(iv) 少なくとも1種の脳特異性生物学的マーカーを定量することを含む。

上記方法のある種の実施態様においては、所定の組織または臓器に対して少なくとも2種の組織特異性生物学的マーカーを定量することを含む。工程b)において定量する所定の組織または臓器に対する組織特異性マーカー数が多いほど、検査する担乳癌患者の上記所定の組織中での転移発生の予測は正確である。

【0025】

従って、本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、所定の組織または臓器に対して検査する生物学的マーカー数は、本明細書において開示している組織特異性生物学的マーカーからなる群から選ばれる少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299または300種の所定の組織または臓器に対する明確な組織特異性生物学的マーカーであり、所定の組織または臓器に対する明確な組織特異性生物学的マーカーの最大数は、上記所定の組織または臓器に対して本明細書において開示しているマーカー数に限定される。

本明細書において開示している２種以上の生物学的マーカーの任意の組合せが本発明に完全に包含される。

【００２６】

上記組織または臓器の各々に対する複数の生物学的マーカーを上記方法の工程b)において定量する場合、試験する患者の実験的発現プロファイルを発生させ、その後、このプロファイルを同じ生物学的マーカーの参照発現プロファイルと比較して、実験的発現プロファイルが最も類似している参照発現プロファイルを判定し、そのようにして、その組織または臓器特異性転移を最終的に予測する。

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程c)は、当業者であれば、検査する患者の臓器特異性転移のリスク指数を、工程b)において測定した１種以上の生物学的マーカーの発現量値から出発して算出することによって実施し得るであろう。多くのリスク指数の算出方法が、当業者にとって周知である。

具体的には、当業者であれば、上記リスク指数が標準化コックス(Cox's)回帰係数を荷重として有する荷重(また、試験する遺伝子に依存しない)発現量値の一次結合として定義される検査患者のリスク指数を算出し得るであろう。

$$\text{リスク指数} = A + \sum_{i=1}^n w_i x_i$$

(式中、Aは、定数であり；

w_iは、各マーカーにおける標準化コックス回帰係数であり；

x_iは、マーカーの発現値(対数尺度)であり、

nは、リスクを予測する遺伝子数である)。

基準点は、最高の感度および特異度を確保するためのトレーニングセットのROC曲線から決定する。定数値Aは、リスク指数の基準点をゼロに集中するように選定する。陽性のリスク指数を有する患者は高リスクの臓器特異性群に分類し、陰性のリスク指数を有する患者は低リスクの臓器特異性群に分類する。

【００２７】

工程c)を検査患者の臓器特異性転移のリスク指数を算出することによって実施する本発明に従う予測方法の具体的な実施態様は、下記の表９、１０、１１および１２に示している。

表９は、本発明に従う方法において使用し得る各種肺特異性生物学的マーカーの予測値を示している。表９の詳細を以下に示す。

コホート：EMC-344 TP

結果の要約：

0.99レベルの単変量検定において有意の遺伝子数：23

生存に有意に関連する遺伝子：

表９(単変量検定のp値によってソートしている)

最初の23遺伝子は、公称0.99レベルの単変量検定において有意である。

危険率は、遺伝子発現量の２倍変化における危険率である。

危険率は、exp(b)に等しく、bはコックス回帰係数である。SDは、遺伝子発現量のlog 2の標準偏差である。

【００２８】

表１０は、本発明に従う方法において使用し得る各種肺特異性生物学的マーカーの予測値を示している。表１０の詳細を以下に示す。

コホート：MSK-82 TP

結果の要約：

0.99レベルの単変量検定において有意の遺伝子数：23

生存に有意に関連する遺伝子：

表１０(単変量検定のp値によってソートしている)

最初の23遺伝子は、公称0.99レベルの単変量検定において有意である。

危険率は、遺伝子発現量の2倍変化における危険率である。2の遺伝子発現量。

危険率は、 $\exp(b)$ に等しく、 b はコックス回帰係数である。SDは、上記対数の標準偏差である。

【0029】

表11は、本発明に従う方法において使用し得る各種肺特異性生物学的マーカーの予測値を示している。表11の詳細を以下に示す。

コホート：NKI-295

結果の要約：

0.9レベルの単変量検定において有意の遺伝子数：20

生存に有意に関連する遺伝子：

表11(単変量検定のp値によってソートしている)

最初の20遺伝子は、公称0.9レベルの単変量検定において有意である。

危険率は、遺伝子発現量の2倍変化における危険率である。2の遺伝子発現量。

危険率は、 $\exp(b)$ に等しく、 b はコックス回帰係数である。SDは、遺伝子発現量のlog 2の標準偏差である。

10

【0030】

表12は、本発明に従う方法において使用し得る各種骨特異性生物学的マーカーの予測値を示している。表12の詳細を以下に示す。

コホート：NHI-295

結果の要約：

0.99レベルの単変量検定において有意の遺伝子数：51

生存に有意に関連する遺伝子：

表1(単変量検定のp値によってソートしている)

最初の51遺伝子は、公称0.99レベルの単変量検定において有意である。

危険率は、遺伝子発現量の2倍変化における危険率である。

危険率は、 $\exp(b)$ に等しく、 b はコックス回帰係数である。SDは、遺伝子発現量のlog 2の標準偏差である。

20

また、本発明に従って同定した40種の最高格付け骨特異性生物学的マーカーを下記の表13に示している。

【0031】

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程b)において定量する1種以上の骨特異性生物学的マーカーは、CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTP N22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FL11、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、MMRN2、LST1、SH2D3CおよびRAMP3からなる群から選択する。これらの骨特異性マーカーは、表2において示すように、DNAマイクロアレイ分析後に得られる常に 10^{-6} よりも低いP値でもって、骨組織内での転移発生を予測するのに高い統計的関連性を有する。

30

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程b)において定量する1種以上の肺特異性生物学的マーカーは、DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、c21orf91、TFCP2L1、CHODL、CALB2、UGT8、c1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、KIND1、ELAC1、GYLTL1B、SPSB1、PTENおよびCHRM3からなる群から選択する。これらの肺特異性マーカーは、表2において示すように、DNAマイクロアレイ分析後に得られる常に 10^{-4} よりも低いP値でもって、肺組織または臓器内での転移発生を予測するのに高い統計的関連性を有する。

40

【0032】

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程b)において定量する1種以上の肝特異性生物学的マーカーは、TBX3、c5orf30、AGXT2L1、LETM2、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、DHFR1L1、ARPC2、SLC16A3、GNPTG、PRRT3、RPS6KA5、K1AA1505、ZFYVE16およびK1AA0701からなる群から選択する。これらの肝特異性マーカーは、表2において示すように、DNAマイクロアレイ分析後に得られる常に 10^{-5} よりも低いP値でもって、肝組織または臓器内での転移発生を予測するのに高い統計的関連性を有する。

50

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程b)において定量する1種以上の脳特異性生物学的マーカーは、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX27、TRA16、HOXB13、CSPP1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655およびRAC3からなる群から選択する。これらの脳特異性マーカーは、表2において示すように、DNAマイクロアレー分析後に得られる常に 10^{-5} 以下であるP値をもって、脳組織または臓器内での転移発生を予測するのに高い統計的関連性を有する。

【0033】

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、1種以上の組織特異性生物学的マーカーは、下記の群のマーカーから選択する：

(i) KTC1D1、BAIAP2L1、PERP、CFD、CD4、COL6A2、FLI1、PSTPIP1、MGF10、PTPN22、FAM78A、NXF1、MFNGおよびCLEC4Aからなる骨転移特異性マーカー群； 10

(ii) KIND1、ELAC1、ANP32E、PAQR3、ITGB8、c1orf210、SIKE、UGT8、CALB2、CHODL、c21orf91、TFCP2L1、ODF2L、HORMAD1、PLEKHG4およびDSC2からなる肺転移特異性マーカー群；

(iii) GATA2、SELT、WHSC1L1、MYRIP、ZMAT1、IL20RA、ZNF44、LETM2、AGXT2L1、c5orf30およびTBX3からなる肝転移特異性マーカー群；

(vi) PPWD1、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、METTL7A、NPHP3、RSHL1、CSPP1、HOXB13、TRA16、DDX27、PKP2およびINHAからなる脳転移特異性マーカー群。

【0034】

本発明に従う予測方法のさらに他の実施態様においては、1種以上の組織特異性生物学的マーカーは、下記の群のマーカーから選択する； 20

(i) BAIAP2L1、PERP、CFD、CD4、COL6A2、FLI1、PSTPIP1、MGF10、PTPN22、FAM78A、NXF1、MFNGおよびCLEC4Aからなる骨転移特異性マーカー群；

(ii) KIND1、ANP32E、ITGB8、UGT8、TFCP2L1、HORMAD1およびDSC2からなる肺転移特異性マーカー群；

(iii) GATA2、WHSC1L1、LETM2、AGXT2L1およびTBX3からなる肝転移特異性マーカー群；

(vi) PPWD1、PDGFRA、ANTXR1、ARRDC3およびDDX27からなる脳転移特異性マーカー群。

本発明に従う予測方法のさらなる実施態様においては、工程b)において検出および/または定量する1種以上の肺特異性生物学的マーカーは、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選択する。 30

本発明に従う予測方法のさらなる実施態様においては、工程b)において検出および/または定量する1種以上の骨特異性生物学的マーカーは、KCNK1、CLEC4A、MFNG、NXF1、PTPN22、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4およびCFDからなる群から選択する。これらの骨特異性生物学的マーカーの予測結果は、下記の表8に示している。

【0035】

本明細書の実施例3～6において示すように、上記肺特異性マーカーは、とりわけ表5において示しているように、DNAマイクロアレー分析後に得られる常に 10^{-4} よりも低いP値をもって、肺組織または臓器内での転移発生を予測するのに高い統計的関連性を有する。

肺特異性マーカーDSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1は、表5に示すように、肺転移を有していない乳癌患者または乳癌に侵されていない個々人と比較したとき、乳癌に侵され且つ肺転移を有する個々人において全てアップレギュレートしている。 40

本明細書の実施例3～6において示すように、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1肺特異性マーカーは、肺への選択性乳癌再発を予測する6種遺伝子サインからなる。

本明細書の上記実施例において示すように、6種遺伝子サイン(DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1)は、ネオアジュバントまたはアジュバント療法を何ら受けていないリンパ節陰性乳癌患者群から生成しており、疾病の自然経過に沿ったサイン予後効果を有する分析を可能にしている。従って、上記予測因子は、全身治療に関連する因子によって影響を受けない。

【0036】

この6種遺伝子サインを、本明細書の下記で詳述した実施例において例示しているように、合計721名の患者からなる乳癌の3つの個々のコホートにおいて検証した。即ち、上記6種遺伝子サインを、2つの異なるマイクロアレイプラットフォームから発生させた早期段階の患者の2つの個々のデータ群(n = 295および344)および第3の局所的に進行した乳癌患者群(n = 82)において検証した。個々の試験群の全ておよび合同コホート(n = 721)において、上記6種遺伝子サインは、乳癌肺転移についての強い予測能力を有していた。

本明細書の実施例において示している結果は、上記6種遺伝子サインが、既知の標準臨床パラメーターおよび実験モデルに基づき以前に確立された肺転移サインとは無関係に、リスク層化を改善していることを示している。

【0037】

骨転移に対するビスホスホネート類のような肺転移に対するターゲット療法は存在しないけれども、臓器特異性転移の知識がここ数年重視されており、近い将来、ターゲット療法に至る可能性がある。肺転移のリスクを遺伝子サインに基づき描き出すことにより、これらの高リスク乳癌患者が特異的二次障害をターゲットングするこれらの療法からの利益を享受することが可能であり得る。

従って、本発明に従う予測方法のさらなる実施態様においては、工程b)は、乳房腫瘍組織サンプルにおいて、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーの発現を測定することからなる。

本発明に従う予測方法の上記実施態様においては、上記6種の肺特異性マーカーの2種、3種、4種、5種または全種の発現を測定、即ち、検出および/または定量する。

【0038】

本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、本明細書において開示する各マーカー群に含まれる組織特異性生物学的マーカーの全てを定量に供する。これらの実施態様においては、工程b)は、本明細書において開示する各マーカー群に含まれるどの生物学的マーカーも定量することを含む。さらに正確には、上記方法のこれらの実施態様によれば、工程b)は、本明細書において開示する(i) 骨特異性マーカー、(ii) 肺特異性マーカー、(iii) 肝特異性マーカーおよび(iv) 脳特異性マーカーの各群のなかから選ばれた(i)

骨特異性マーカーの1群、(ii) 肺特異性マーカーの1群、(iii) 肝特異性マーカーの1群および(iv) 脳特異性マーカーの1群に含まれる全ての生物学的マーカーを定量することを含む。

事実、本明細書において開示する転移特異性生物学的マーカーの全てからなる群から選ばれる少なくとも2種転移特異性生物学的マーカーのあらゆる可能性ある組合せの使用は、本発明に従う生体外予測方法を実施する目的において、本発明に包含される。

好ましくは、4種以上の転移特異性生物学的マーカーのあらゆる可能性ある組合せの使用が、各可能性ある組合せが(i) 1種以上の骨転移特異性生物学的マーカー、(ii) 1種以上の肺転移特異性生物学的マーカー、(iii) 1種以上の肝転移特異性生物学的マーカーおよび(iv) 1種以上の肝転移特異性生物学的マーカーを含むことを条件として、本発明に従う生体外予測方法を実施する目的において、本発明に包含される。

【0039】

従って、本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、群(i)、(ii)、(iii)および(vi)の各々から選ばれた少なくとも1種の生物学的マーカーを、工程b)において定量する。

上記予測方法のある種の実施態様においては、特異性群(i)、(ii)、(iii)および(vi)からの全ての生物学的マーカーを、工程b)において定量する。

従って、本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程b)は、乳房腫瘍組織サンプルにおいて、以下の肺特異性マーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の全ての発現を測定する(即ち、検出および/または定量する)ことからなる。

また、本発明に従う予測方法のある種の実施態様においては、工程b)は、乳房腫瘍サンプルにおいて、以下の骨特異性マーカー：KCNK1、CLEC4A、MFNG、NXF1、PTPN22、PERP、P

10

20

30

40

50

STPIP1、FL11、COL6A2、CD4およびCFDの全ての発現を測定する(即ち、検出および/または定量すること)からなる。

工程b)においては、上記1種以上の生物学的マーカーは、上記乳房腫瘍組織サンプルを遺伝子発現分析方法に供することによって定量し得る。

また、工程b)においては、上記1種以上の生物学的マーカーは、上記乳房腫瘍組織サンプルを免疫組織化学分析方法に供することによって定量し得る。

本明細書において開示する組織特異性生物学的マーカーの一般的定量方法を、以下で詳述する。

【0040】

生物学的マーカーの一般的定量方法

本明細書において網羅しているタンパク質生物学的マーカーまたは核酸生物学的マーカーを定量する当業者にとって既知の方法のうちの任意の1つを、本発明の転移予測方法を実施するのに使用し得る。即ち、サンプル中のタンパク質または核酸を検出し定量する当該技術において周知の標準または非標準(新たな)方法のうちの任意の1つを容易に応用し得る。

そのような方法としては、核酸生物学的マーカーの核酸プローブまたはプライマーによる検出または定量がある。

また、そのような方法としては、核酸(例えば、周知のセレックス(Selex)法により結合するよう選定した核酸)および抗体フラグメントを含む抗体のようなタンパク質に特異的に結合する任意のタイプのリガンド分子によるタンパク質生物学的マーカーの検出および定量がある。興味ある生物学的マーカーが酵素からなるある種の実施態様においては、これらの検出および定量方法は、相応する酵素活性の検出および定量も含み得る。

【0041】

とりわけ、抗体類は、現在、表4に列挙している生物学的マーカーのような本明細書に開示している全てではないが殆どの生物学的マーカーに対して既に入手可能である。

さらに、抗体が所定の生物学的マーカーに対してまだ入手可能でない場合または所定の生物学的マーカーに対するさらなる抗体の産生を模索している場合、上記所定の生物学的マーカーに対して特異性の抗体は、抗体産生性ハイブリドーマの産出のような通常の方法によって容易に得ることができる。この方法においては、生物学的マーカータンパク質の完全体またはセグメントを含むタンパク質またはペプチドを合成するかまたは分離する(例えば、上記タンパク質またはペプチドを発現する細胞から精製するか、または上記タンパク質またはペプチドを生体内または生体外にコード化する核酸を既知の方法を使用して転写し翻訳することによって)。脊椎動物、好ましくは、マウス、ラット、ウサギまたはヒツジのような哺乳類を、上記タンパク質またはペプチドを使用して免疫化する。脊椎動物は、必要に応じて(好ましくは)、少なくとももう1回上記のタンパク質またはペプチドで免疫化して、脊椎動物が上記タンパク質またはペプチドに対して強固な免疫応答を示すようにする。脾細胞を免疫化脊椎動物から分離し、当該技術において周知の各種方法のうちの任意の1つの方法を使用して、不死化細胞系と融合させてハイブリドーマを形成させる。その後、この方法で形成させたハイブリドーマを、標準の方法を使用してスクリーニングして、上記生物学的マーカータンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合する抗体を産生する1以上のハイブリドーマを同定する。また、本発明は、この方法によって製造したハイブリドーマおよびそのようなハイブリドーマを使用して製造した抗体にも及ぶ。また、ポリクローナル抗体も同様に使用し得る。

【0042】

本明細書において開示する組織特異性生物学的マーカーの発現は、転写核酸またはタンパク質の発現を検出する多種多様な周知の方法のうちの任意の1つの方法によって評価し得る。そのような方法の非限定的な例としては、分泌した細胞表面、細胞質または細胞核タンパク質の免疫学的検出方法、タンパク質精製法、タンパク質官能または活性アッセイ法、核酸ハイブリッド化法、核酸逆転写法、および核酸増幅法がある。

1つの好ましい実施態様においては、マーカーの発現は、通常の翻訳後修飾の全部また

10

20

30

40

50

は一部を受けているマーカートンパク質のようなマーカートンパク質またはそのフラグメントと特異的に結合する抗体(例えば、放射能標識抗体、発色団標識抗体、フルオロフォア標識抗体、ポリマー骨格抗体または酵素標識抗体)、抗体誘導体(例えば、基体またはタンパク質-リガンド対(例えば、ビオチン-ストレプトタビジン)のタンパク質もしくはリガンドと接合させた抗体)、または抗体フラグメント(例えば、一本鎖抗体、分離抗体超可変ドメイン等)を使用して評価する。

もう1つの好ましい実施態様においては、マーカの発現は、患者の腫瘍組織サンプル中の細胞からmRNA/cDNA(即ち、転写ポリヌクレオチド)を調製することによって、さらに、このmRNA/cDNAをマーカ核酸の補体である参照ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントとハイブリッド化させることによって評価する。cDNAは、必要に応じて、参照ポリヌクレオチドとハイブリッド化させる前に、種々のポリメラーゼ連鎖反応法のうちの任意の1つの方法を使用して増幅させ得る。

【0043】

本発明に従う生体外予測方法の好ましい実施態様においては、1種以上の生物学的マーカを検出および/または定量する工程b)は、DNAマイクロアレーを使用して実施する。具体的には、この好ましい実施態様によれば、サンプルから得られた転写ポリヌクレオチドの混合物を、生物学的マーカ核酸の少なくとも1部(例えば、少なくとも7個、10個、15個、20個、25個、30個、40個、50個、100個、500個またはそれ以上のヌクレオチド残基)に対して相補性のまたはそのような1部と相同性のポリヌクレオチドを固定させている基体と接触させる。相補性または相同性のポリヌクレオチドが上記基体上で識別的に検出可能である(例えば、種々の発色団またはフルオロフォアを使用して或いは異なる選定位置に固定して検出可能である)場合、複数のマーカの発現量を、単一の基体(例えば、選定した位置に固定させたポリヌクレオチドの“遺伝子チップ”マイクロアレー)を使用して同時に評価し得る。1つの核酸と他の核酸とのハイブリッド化を含むマーカ発現評価方法を使用する場合、ハイブリッド化を緊縮ハイブリッド化条件下に実施することが好ましい。

【0044】

生物学的マーカートンパク質または核酸を腫瘍組織サンプル中で検出および/または定量する典型的な方法は、腫瘍組織サンプルを入手することを含む。この方法は、上記生物学的サンプルを、ポリペプチドまたは核酸(例えば、mRNAまたはcDNA)を検出することのできる化合物または薬剤と接触させる工程をさらに含む。従って、本発明の検出方法は、例えば、腫瘍組織サンプル中のmRNA、タンパク質またはcDNAを生体外で検出するのに使用し得る。例えば、mRNAの生体外検出方法としては、ノーザンハイブリッド化および現場ハイブリッド化がある。生物学的マーカートンパク質の生体外検出方法としては、酵素免疫吸着測定法(ELISA)、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫蛍光法およびRT-PCR法がある。そのような検出および/または定量アッセイ法の一般的原理は、生物学的マーカとプローブを含有し得るサンプルまたは反応混合物を、上記マーカとプローブが相互作用して結合するのを可能にする適切な条件および十分な時間で調製し、それによって反応混合物中から取出すおよび/または検出することのできる複合体を形成させることを含む。

【0045】

本明細書において使用するとき、用語“プローブ”は、特定の意図するターゲット分子、例えば、生物学的マーカによってコード化されたまたは生物学的マーカに相応するヌクレオチド転写体またはタンパク質に選択的に結合することのできる任意の分子を称する。プローブは、当業者であれば合成することができ、或いは適切な生物学的調製物に由来し得る。ターゲット分子を検出する目的において、プローブは、本明細書において説明しているようにして、特定の設計して標識化し得る。プローブとして使用し得る分子の例としては、限定するものではないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、および有機分子がある。

生物学的マーカのこれらの検出および/または定量アッセイ法は、種々の方法で実施し得る。

10

20

30

40

50

例えば、そのようなアッセイを行う1つの方法は、上記プローブを、基体とも称する固相支持体上に固定させ、固相上に固定させたターゲットマーカ-プローブ複合体を反応終了時に検出ことを含む。そのような方法の1つの実施態様においては、生物学的マーカの定量のためにアッセイすべき対象者からのサンプルを、担体または固相支持体上に固定させ得る。もう1つの実施態様においては、プローブを固相に固定させ、対象者からのサンプルをこのアッセイの固定させていない成分として反応させる得る逆の場合も可能である。

【0046】

アッセイ成分を固相に固定させるには、多くの確立された方法が存在する。これらの方法は、限定するものではないが、ビオチンとストレプタビジンとの接合によって固定するマーカ-またはプローブ分子を含む。そのようなビオチン化アッセイ成分は、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド) から、当該技術において既知の方法(例えば、ビオチン化キット; Pierce Chemicals社、イリノイ州ロックフォード)を使用して調製し、ストレプタビジンコーティング96ウェルプレート(Pierce Chemical社)のウェル中に固定し得る。ある種の実施態様においては、固定化アッセイ成分を有する表面は、前以って調製し、保存し得る。

そのようなアッセイ用の他の適切な担体または固相支持体としては、上記マーカ-またはプローブが属する群の分子を結合することのできる任意の材料がある。周知の支持体または担体としては、限定するものではないが、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、ハンレイ岩、およびマグネタイトがある。

アッセイを上記の方法によって実施するためには、固定させていない成分を固相に加え、固相上に第2成分を固定させる。反応終了後、複合体化していない成分は、形成された複合体の全てが固相上に固定されたままであるような条件下に除去し得る(例えば、洗浄により)。固相上に固定させたマーカ-プローブ複合体の検出は、本明細書に略述している多くの方法で達成し得る。

【0047】

好ましい実施態様においては、プローブは、固定させていないアッセイ成分である場合、アッセイの検出および読取り目的において、本明細書において説明し且つ当業者にとっては周知である検出可能なラベルによって直接または間接的に標識化し得る。

また、マーカ-プローブ複合体形成を、いずれの成分(マーカ-またはプローブ)もさらに操作または標識化することなく、例えば、蛍光エネルギー移動技術(例えば、Lakowic等の米国特許U.S第5,631,169号; Stavrianopoulos等の米国特許第4,868,103号参照)を使用して、直接検出することも可能である。第1の‘供与体’分子上のフルオロフォア標識を、適切な波長の入射光による励起時に、その発出した蛍光エネルギーを第2の‘受容体’分子上の蛍光標識が吸収し、引続き、この蛍光標識が吸収エネルギーにより蛍光を発し得るように選定する。また、‘供与体’タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを単純に利用し得る。種々の波長の光を発出する標識を選択して、‘受容体’分子標識を‘供与体’の標識と識別し得るようにする。標識間のエネルギー移動の効率は各分子を引き離している距離に関連するので、分子間の空間的関係を評価し得る。結合が分子間で生じる場合、アッセイにおける‘受容体’分子標識の蛍光発光は最大でなければならない。FRET結合事象は、当該技術において周知の標準蛍光検出手段により(例えば、蛍光光度計を使用して)、通常測定する。

【0048】

もう1つの実施態様においては、プローブがマーカ-を認識する能力の測定は、いずれのアッセイ成分(マーカ-またはプローブ)も標識化することなく、リアルタイム生体分子相互作用分析(BIA)のような方法(例えば、Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345; および、Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705参照)を使用して達成し得る。本明細書において使用するとき、“BIA”または“表面プラズモン共鳴”とは、生体特異性相互作用を、

相互作用物のいずれか(例えば、BIAcore)を標識化することなしに、リアルタイムで試験する技術である。結合表面での質量の変化(結合事象を指標する)は、表面近くの光の屈折率の変化(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)を生じ、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用し得る検出可能なシグナルをもたらす。

【0049】

また、もう1つの実施態様においては、同様な診断および予後診断アッセイを、液相中の溶質としてのマーカーおよびプローブによって実施し得る。そのようなアッセイにおいては、複合体化したマーカーとプローブを、複合体化していないアッセイ成分から、限定するものではないが分画遠心、クロマトグラフィー、電気泳動、および免疫沈降のような多くの標準方法のうちの任意の1つの方法によって分離する。分画遠心法においては、マーカー/プローブ複合体を、複合体化していない成分から、複合体の種々のサイズおよび密度に基づく複合体の種々の沈降平衡による1連の遠心分離工程によって分離する(例えば、Rivas, G., and Minton, A. P., 1993,

Trends Biochem Sci. 18(8):284-7参照)。また、標準のクロマトグラフィー法も、複合体化分子を複合体化していない分子から分離するのに使用し得る。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、分子を、サイズにより且つカラムフォーマットでの適切なゲル濾過樹脂の使用により分離する、例えば、相対的に大きな複合体を相対的に小さい複合体化していない成分から分離し得る。同様に、複合体化していない成分と比較したときマーカー/プローブ複合体の相対的異なる電荷特性を利用して、複合体を、複合体化していない成分から、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂を使用することによって識別し得る。そのような樹脂およびクロマトグラフィー法は、当業者にとって周知である(例えば、Heegaard, N. H., 1998, J. Mol.

Recognit. Winter 11(1-6):141-8; Hage, D. S., and Tweed, S. A. J Chromatogr B Bio med Sci Appl 1997 Oct. 10;699(1-2):499-525参照)。また、ゲル電気泳動も複合体化アッセイ成分を結合していない成分から分離するのに使用し得る(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols

in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999参照)。この方法においては、タンパク質または核酸複合体を、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離する。結合相互作用を電気泳動過程において維持するためには、非変性性ゲルマトリックス材料および還元剤の存在しない条件が典型的に好ましい。また、SELDI-TOF法も、活性表面と結合させたまたは結合させてないマトリックスまたはビーズ上或いは抗体コーティング表面またはビーズ上で使用し得る。

特定のアッセイに対しての適切な条件およびアッセイ成分は、当業者にとって周知である。

【0050】

特定の実施態様においては、マーカーmRNAレベルは、現場フォーマットおよび生体外フォーマットの双方により、当該技術において既知の方法を使用して、生物学的サンプル中で測定し得る。用語“生物学的サンプル”は、対象者から分離した組織、細胞、生物学的液体およびその分離物、並びに対象者内に存在する組織、細胞および液体を包含するものとするが、上記生物学的サンプルは、(i) 乳癌に由来する細胞または(ii) 患者由来の乳癌細胞が産生する核酸またはタンパク質を含有しがちであることを条件とする。多くの発現検出方法が、分離したRNAを使用する。生体外方法においては、mRNAの分離に対しては選択しない任意のRNA分離方法を、乳癌からのRNAの精製に使用し得る(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999参照)。さらに、大多数の組織サンプルは、例えば、Chomczynskiの一工程RNA分離法(1989, U.S. Pat. No. 4,843,155)のような当業者にとって周知の方法を使用して容易に加工し得る。

【0051】

分離したmRNAは、限定するものではないが、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブアレーのようなハイブリッド化または増幅アッセイにおいて

使用し得る。mRNAレベル検出のための1つの好ましい診断方法は、分離したmRNAを、検出する遺伝子がコード化するmRNAにハイブリッド化し得る核酸分子(プローブ)と接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、全長cDNAまたはその1部、例えば、長さにおいて少なくとも7、15、30、50、100、250または300個のヌクレオチドを有し且つ本発明のマーカをコード化するmRNAに対し緊縮性条件下に特異的にハイブリッド化するに十分なオリゴヌクレオチドであり得る。本発明の予後アッセイにおいて使用する他の適切なプローブは、本明細書に記載している。mRNAのプローブとのハイブリッド化は、該当するマーカが発現していることを指標する。

【0052】

本発明に従う生体外予測方法の工程b)の最も好ましい実施態様においては、転移特異性生物学的マーカの検出および/または定量は、適切なDNAマイクロアレーを使用することによって実施する。そのようなマーカ検出/定量フォーマットにおいては、mRNAを固体表面上に固定し、プローブと、例えば、分離したmRNAをアガロースゲル上に流しmRNAをゲルからニトロセルロースのような膜に移すことによって接触させる。別のフォーマットにおいては、プローブ(1種以上)を固体表面上に固定し、mRNAを、例えば、Affymetrix遺伝子チップアレー内のプローブ(1種以上)と接触させる。熟練技術者であれば、既知のmRNA検出方法を、本発明のマーカがコード化するmRNAのレベルの検出において使用するのに容易に適応化し得るであろう。本発明方法において使用する発現プロファイルを発生させるために実施する特異的ハイブリッド化方法としては、米国特許第5,143,854号、第5,288,644号、第5,324,633号、第5,432,049号、第5,470,710号、第5,492,806号、第5,503,980号、第5,510,270号、第5,525,464号、第5,547,839号、第5,580,732号、第5,661,028号、第5,800,992号(これら米国特許の開示は、参考として本明細書に合体させる)；並びに、W

O 95/21265号、WO

96/31622号、WO 97/10365号、WO

97/27317号、EP 373 203号およびEP 785

280号に記載されている方法がある。これらの方法においては、発現についてアッセイするフェノタイプ決定遺伝子の各々に対するプローブを含む“プローブ”核酸のアレーを、上述したようなターゲット核酸と接触させる。接触は、ハイブリッド化条件、例えば、上述したような緊縮ハイブリッド化条件下に実施し、その後、結合していない核酸を除去する。得られるハイブリッド化核酸パターンは、精査する遺伝子の各々についての発現に関する情報を提供し、この発現情報は、遺伝子が典型的には如何なるレベルで発現したかどうかに関連し、発現データ、即ち、発現プロファイルは、定性的または定量的の双方であり得る。

【0053】

サンプル中のmRNAマーカレベルを測定する別の方法は、例えば、rtPCR (Mullis、1987年、米国特許第4,683,202号に示されている実施例)、リガーゼ連鎖反応(Barany、1991、Proc. Natl. Acad. Sci.

USA、88:189-193)、自立配列複製(Guatelli et al., 1990、Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwoh et al., 1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA

86:1173-1177)、Q - ベータレプリカーゼ(Lizardi

et al., 1988、Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardi等、米国特許第5,854,033号)および任意の他の核酸増幅法による核酸増幅過程、並びに、その後の当業者にとって周知の方法を使用しての増幅分子の検出を含む。これらの検出スキームは、核酸分子の検出において、そのような分子が極めて少数で存在する場合にとりわけ有用である。本明細書において使用するとき、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域(それぞれ、プラスおよびマイナスストランド、またはその逆)にアニーリングし且つ間に短い領域を含有し得る対の核酸分子であると定義する。一般に、増幅プライマーは、長さで約10~30個のヌクレオチドであり、長さで約50~200個のヌクレオチド領域をフランキングしている。適切な条件下で且つ適切な試薬により、そのようなプライマーは、そのブラ

イマーによってフランキングされたヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

【 0 0 5 4 】

現場方法においては、mRNAは、検出前に乳癌から分離する必要はない。そのような方法においては、細胞または組織サンプルを、既知の組織学的方法を使用して調製/加工する。その後、サンプルを、支持体、典型的にはガラススライド上に固定し、次いで、マーカ

ーをコード化するmRNAにハイブリッド化し得るプローブと接触させる。
マーカ-の絶対発現量に基づく測定を行う別法としては、測定が、マーカ-の標準化発現量に基づき得る。発現量は、マーカ-の絶対発現量を、マーカ-の発現をマーカ-でない遺伝子、例えば、構成的に発現するハウスキーピング遺伝子の発現と比較することによって補正することによって標準化する。標準化用の適切な遺伝子としては、アクチン遺伝子、リボソーム18S遺伝子、GAPDH遺伝子およびTATAボックス結合タンパク質(TBP)のようなハウスキーピング遺伝子がある。この標準化は、1つのサンプルにおける1種以上の興味ある組織特異性生物学的マーカ-の発現量の比較を可能にする。

【 0 0 5 5 】

また、発現量は、相対的発現量として示し得る。マーカ-の相対的発現量を測定するためには、該当するサンプルにおける発現量を測定する前に、マーカ-の発現量を、正常細胞分離物対癌細胞分離物の10以上のサンプル、好ましくは50以上のサンプルにおいて測定する。多数のサンプルにおいてアッセイした遺伝子各々の中央値発現量を決定し、これをマーカ-におけるベースライン発現量として使用する。その後、試験サンプルにおいて測定したマーカ-の発現量(絶対発現量)をそのマーカ-において得られた平均発現値で割る。これによって、相対的発現量が得られる。

本明細書において前記で既に述べたように、本発明の転移予測方法を実施するときに生物学的マーカ-タンパク質を検出および/または定量するための検出/定量試薬は、そのような生物学的マーカ-タンパク質またはそのフラグメントに特異的に結合する抗体、好ましくは検出可能な標識を有する抗体からなり得る。抗体は、ポリクローナル抗体、または、より好ましくはモノクローナル抗体であり得る。無欠抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体(例えば、FabまたはF(ab')₂)を使用し得る。プローブまたは抗体に関連しての用語“標識化”は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングさせる(即ち、物理的に連結させる)ことによるプローブまたは抗体の直接標識化、並びに直接標識化した他の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識化を包含するものとする。間接標識化の例としては、蛍光標識化二次抗体およびDNAプローブのビオチンによる末端標識化を使用して、蛍光標識化ストレプトアビジンによって検出できるようにした一次抗体の検出がある。

【 0 0 5 6 】

当業者であれば、抗体または抗原を結合させるための多くの他の適切な担体を知っているであろうし、また、そのような担体を本発明による使用に適応化し得るであろう。例えば、乳癌から分離したタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、ニトロセルロースのような固相支持体上に固定し得る。その後、支持体を適切な緩衝液で洗浄し、次いで、検出可能な標識化抗体で処理する。次に、固相支持体を緩衝液による2度目の洗浄を行い結合していない抗体を除去し得る。その後、固体支持体上の結合標識量を、通常的手段によって検出することができる。

本発明の転移予測方法を実施する目的において生物学的マーカ-を定量する最も好ましい方法を、以下に説明する。

【 0 0 5 7 】

cDNAマイクロアレイによる生物学的マーカ-の定量

この実施態様によれば、マイクロアレイは、本明細書の全体に亘って開示している転移特異性マーカ-をベースとして構築し得る。これらのマーカ-のような転移特異性検出試薬をマイクロアレイ上に置くことができる。これらの癌転移特異性検出試薬は、PCR法において使用する試薬と異なり得る。しかしながら、これらの試薬は、転移特異性マーカ-

を有する核酸のみがハイブリッド化し陽性結果を示すような条件で設計し使用すべきである。

Affymetrix社(カリフォルニア州)が提供しているマイクロアレーのような現存のマイクロアレーの殆どを、本発明において使用し得る。

当業者であれば、莫大な数のアレー設計が適していることは認識しているであろう。高密度アレーは、興味ある配列に特異的にハイブリッド化する多数のプローブを典型的に含む。所定の遺伝子(1種以上)に対するプローブの製造方法についてはWO 99/32660号を参照されたい。好ましい実施態様においては、アレーは、1種以上の対照プローブを含む。

【0058】

マイクロアレー装置上に固定させた核酸プローブ

高密度アレーチップは、本明細書において説明している転移特異性生物学的マーカーの発現生成物からなるmRNAまたはcDNAと特異的にハイブリッド化する“試験プローブ”を含む。

各試験プローブは、長さにおいて約5～約500個または約5～約200個のヌクレオチド、より好ましくは約10～約100個のヌクレオチド、最も好ましくは約15～約70個のヌクレオチドの範囲にあるオリゴヌクレオチドであり得る。他のとりわけ好ましい実施態様においては、各プローブは、長さにおいて約20個または25個のヌクレオチドである。もう1つの好ましい実施態様においては、各試験プローブは、二本または一本ストランドDNA配列である。DNA配列は、天然源から分離しまたはクローニングするか或いは天然核酸をテンプレートとして使用して天然源から増幅し得る。これらのプローブは、発現を検出するように設計されている転移特異性マーカーの特定の部分配列(subsequence)に対して相補性である配列を有する。

【0059】

興味あるターゲット核酸(1種以上)に結合する試験プローブ以外に、高密度アレーは、多くの対照プローブも含み得る。対照プローブは、本明細書においては標準化対照、発現量対照およびミスマッチ対照と称する3つのカテゴリーに分けられる。標準化対照は、核酸サンプルに加える標識化参照オリゴヌクレオチドまたは他の核酸配列に対して相補性であるオリゴヌクレオチドまたは他の核酸プローブである。ハイブリッド化後の標準化対照から得られるシグナルは、ハイブリッド化条件、標識強度、“読取り”効率、およびアレー間で変化する完全ハイブリッド化のシグナルを生じ得る他の要因における変動に対する対照を提供する。好ましい実施態様においては、アレー中の全ての他のプローブからのシグナル(例えば、蛍光強度)の読みを、対照プローブからのシグナル(例えば、蛍光強度)で割り、それによって測定値を標準化する。実質的にあらゆるプローブが標準化対照として作動し得る。しかしながら、ハイブリッド化効率は、塩基組成およびプローブ長によって変動することを認識されたい。好ましい標準化プローブは、アレーに存在する他のプローブの平均長を反映するように選定する；しかしながら、標準化対照は、長さ範囲をカバーするように選定する。また、標準化対照(1つ以上)は、アレー内の他のプローブの(平均)塩基組成を反映するように選定し得る；しかしながら、好ましい実施態様においては、1個のみまたは数個のプローブを使用し、これらのプローブを、良好にハイブリッド化し(即ち、二次構造のない)、且ついずれのターゲット特異性プローブとも一致しないように選定する。発現量対照は、生物学的サンプル中の構成的発現性遺伝子と特異的にハイブリッド化するプローブである。実質的にあらゆる構成的発現性遺伝子が発現量対照に対する適切なターゲットを提供する。典型的な発現量対照プローブは、ベータ-アクチン遺伝子、トランスフェリンレセプター遺伝子およびGAPDH遺伝子のような構成的発現性“ハウスキーピング遺伝子”の部分配列に対して相補性の配列を有する。また、ミスマッチ対照は、発現量対照におけるまたは標準化対照におけるターゲット遺伝子に対するプローブに備え得る。ミスマッチ対照は、1個以上のミスマッチ塩基の存在を除いてはその相応する試験または対照プローブと同一のオリゴヌクレオチドプローブまたは他の核酸プローブである。ミスマッチ塩基は、プローブがさもないと特異的にハイブリッド化するであろうターゲット配列中の相応する塩基に対して相補性でないように選定した塩基である。1個以上

10

20

30

40

50

のミスマッチを、適切なハイブリッド化条件(例えば、緊縮性条件)下では試験または対照プローブはそのターゲット配列とハイブリッド化するのを期待されるが、ミスマッチプローブはハイブリッド化しない(或いは有意に低い程度にしかハイブリッド化しない)ように選定する。好ましいミスマッチプローブは、中央ミスマッチを含む。従って、例えば、プローブが二十量体である場合、相応するミスマッチプローブは、位置6~14の任意の位置において1個の塩基ミスマッチ(1個のAを1個のG、CまたはTで置換する)(中央ミスマッチ)を除いては同一の配列を有し得る。従って、ミスマッチプローブは、プローブが特異的であるターゲット以外のサンプル中の核酸への非特異結合または交差ハイブリッド化についての対照を提供する。また、ミスマッチプローブは、ハイブリッド化が特異的かまたはそうでないかも指標する。

10

【0060】

DNAマイクロアレー用の固体支持体

差次的発現性遺伝子に対するオリゴヌクレオチドプローブを含む固体支持体は、当業者にとって既知の任意の固体または半固体の支持体材料であり得る。適切な例としては、限定するものではないが、膜、フィルター、組織培養皿、ポリ塩化ビニル皿、ビーズ、試験ストリップ、シリコンまたはガラス系チップ等がある。適切なガラスウェーハおよびハイブリッド化法を広範囲に利用し得る。オリゴヌクレオチドを、直接または間接的に、共有または非共有的に結合させ得る任意の固体表面を使用し得る。ある種の実施態様においては、ある種のオリゴヌクレオチドは共有的に、他のオリゴヌクレオチドは非共有的に同じ固体支持体に結合させるのが望ましくあり得る。好ましい固体支持体は、高密度アレーまたはDNAチップである。これらは、特定のオリゴヌクレオチドプローブをアレー上の所定の位置に含む。各所定の位置は、2以上の分子のプローブを含み得るが、所定の位置内の各分子は同一の配列を有する。そのような所定の位置を機能(feature)と称する。例えば、2、10、100、1000~10,000、10,000または400,000のそのような機能が1つの固体支持体上に存在し得る。個体支持体即ち各プローブを結合させる領域は、およそ1平方センチメートルであり得る。最少数の合成工程によってオリゴヌクレオチドの高密度アレーを形成させる方法は、既知である。オリゴヌクレオチドアナログアレーは、固形基体上で、限定するものではないが光指向化学カップリングおよび機械指向カップリングのような種々の方法によって合成し得る(例えば、Pirrung等に付与された米国特許第5,143,854号、Fodor等に付与された米国特許第5,800,992号、Chee等に付与された米国特許第5,837,832号参照)。

20

30

【0061】

要するに、ガラス表面上でのオリゴヌクレオチドアレーの光指向コンビナトリアル合成は、自動化ホスホラミダイト化学およびチップマスキング法を使用して進行する。1つの特定の実施においては、ガラス表面を、官能基、例えば、光解離性保護基でブロックしたヒドロキシルまたはアミン基を有するシラン試薬によって誘導体化する。フォトリソグラフィーマスクによる光分解を使用して官能基を選択的に露出させると、この官能基は、その後、流入する5'光保護ヌクレオチドホスホラミダイトと直ぐに反応する。このホスホラミダイトは、照射する(従って、光解離性封鎖基の除去によって露出させる)部位のみと反応する。従って、ホスホラミダイトは、前の工程で選択的に露出させた領域にのみ付加する。これらの工程を、所望の配列アレーが固体表面に合成されるまで繰返す。アレーの種々の位置での種々のオリゴヌクレオチドアナログ類のコンビナトリアル合成は、合成中の照射パターンおよびカップリング試薬の付加順序によって決まる。

40

【0062】

上記以外に、オリゴヌクレオチド類のアレーを単一基体上に生成させるのに使用し得る方法は、Fodor等のWO 93/09668号に記載されている。また、高密度核酸アレーも、前以って製造したまたは天然核酸類を所定の位置に付着させることによって製造し得る。合成または天然核酸類を、基体の特定の各位置上に、光指向ターゲッティングおよびオリゴヌクレオチド指向ターゲッティングによって付着させる。もう1つの実施態様は、領域間を移動して核酸類を特定の各位置に付着させるディスペンサーを使用する。

50

発現モニタリング用のオリゴヌクレオチドプローブアレーは、当該技術において既知の任意の方法に従って製造し、使用することができる(例えば、Lockhart et al., Nat. Biotechnol. 14,

1675-1680 (1996); McGall et al., Proc. Nat. Acad. Sci.

USA 93, 13555-13460 (1996)参照)。そのようなプローブアレーは、本明細書において開示する2種以上の遺伝子に対して相補性であるか或いはハイブリッド化する少なくとも2種以上のオリゴヌクレオチドを含み得る。また、そのようなアレーは、本明細書において開示する少なくとも3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、20種、30種、50種、70種またはそれ以上の遺伝子に対して相補性であるか或いはハイブリッド化するオリゴヌクレオチド類も含み得る。

10

【0063】

遺伝子サイン差分分析

遺伝子サイン差分分析(Gene Signature Differential analysis)は、種々のサンプル中で差次的に発現するmRNAまたはcDNAのような核酸を検出するように設計された方法である。

【0064】

ハイブリッド化

核酸ハイブリッド化は、プローブとその相補性ターゲットが相補性塩基対合により安定なハイブリッド二重体を形成することができる条件下に、プローブとターゲット核酸を接触させることを単純に含む(LockhartのWO 99/32660号参照)。その後、ハイブリッド二重体を形成しない核酸を洗い流してハイブリッド化核酸を残存させ、典型的には結合させた検出可能な標識を検出することによって検出する。一般に、核酸が温度の上昇または核酸を含有する緩衝液の塩濃度の低下によって変性されることは認識されている。低緊縮性条件(例えば、低温および/または高塩)下では、ハイブリッド二重体(例えば、DNA-DNA、RNA-RNA、RNA-DNA)は、アニーリングした配列が完全に相補性でない場合でさえも形成する。従って、ハイブリッド化の特異性は、緊縮性が低いほど低下する。逆に、高めの緊縮性(例えば、高めの温度または低めの塩)においては、成功裏のハイブリッド化は、少なめのミスマッチを求めている。当業者であれば、ハイブリッド化条件をあらゆる度合の緊縮性が得られるように選定し得ることは承知しているであろう。好ましい実施態様においては、ハイブリッド化を、低緊縮性、この場合は6倍のSSPE-Tにおいて37 (0.005%のTriton x -100)で実施してハイブリッド化を確実にし、その後、引き続きの洗浄を、高めの緊縮性(例えば、37 で1倍のSSPE-T)で行ってミスマッチハイブリッド二重体を排除する。連続洗浄は、次第に高めの緊縮性(例えば、37 ~50 で0.25倍の低いSSPE-Tに低めて)において、所望レベルのハイブリッド化特異性が得られるまで実施し得る。また、緊縮性は、ホルムアミドのような薬剤を添加することによっても高め得る。ハイブリッド化特異性は、試験プローブへのハイブリッド化と存在し得る各種対照(例えば、発現量対照、標準化対照、ミスマッチ対照等)へのハイブリッド化とを比較することによって評価し得る。

20

30

【0065】

一般に、ハイブリッド化特異性(緊縮性)とシグナル強度間にはトレードオフ(かね合い)が存在する。従って、好ましい実施態様においては、洗浄を、一貫した結果を生じ且つ背景強度よりの約10%よりも高いシグナル強度をもたらす最高の緊縮性で実施する。ハイブリッド化アレーは、連続的に高めの緊縮性溶液で洗浄し、各洗浄の間で読取る。そのようにして生じたデータ群の解析により、ハイブリッド化パターンが認識し得るほどには変化せず且つ興味ある特定のオリゴヌクレオチドプローブについての適切なシグナルをもたらす上記の洗浄緊縮性が明白となる。

40

【0066】

シグナル検出

ハイブリッド化核酸は、典型的には、サンプル核酸に結合させた1種以上の標識を検出することによって検出する。標識は、当業者にとって周知の多くの手段のうちの任意の1つによって取込ませ得る(LockhartのWO 99/32660号参照)。任意の適切な方法を使用して

50

本明細書において開示する 1 種以上のマーカーを検出し得る。例えば、気相イオン分光分析を使用し得る。この方法としては、例えば、レーザー脱着/イオン化質量分析法がある。ある種の実施態様においては、サンプルを、気相イオン分光分析前に、例えば、事前分別、二次元ゲルクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー等によって調製してマーカーの検出を助長し得る。

【0067】

通常の組織スライド(パラフィン埋込みまたは凍結試験標本)における免疫組織化学による生物学的マーカーの定量

ある種の実施態様においては、生物学的マーカーまたは生物学的マーカー群は、当該技術において既知の免疫組織化学法のうちの任意の 1 方法によって定量し得る。

典型的には、さらなる分析においては、1 枚の薄い腫瘍切片を、先ず、興味ある 1 種の生物学的マーカーに対して特異性の標識化抗体と一緒にインキュベートする。洗浄後、上記興味ある生物学的マーカーに結合させた標識化抗体を、標識の種類、例えば、放射能、蛍光または酵素標識に応じた適切な方法で明白にする。複数の標識化は、同時に行い得る。

【0068】

核酸増幅による生物学的マーカーの定量

ある種の実施態様においては、生物学的マーカーまたは生物学的マーカー群は、当該技術において既知の核酸増幅法のうちの任意の 1 方法によって定量し得る。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、そのような生物学的マーカー定量のための高感度且つ強力な方法である。

本発明の転移予測方法を実施するときに生物学的マーカーを定量するのに適切である核酸増幅方法の任意の 1 つの方法を実施するに当っては、ターゲット mRNA またはターゲット cDNA と特異的にハイブリッド化する対のプライマーを必要とする。

興味あるターゲット核酸生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化する対のプライマーは、当該技術において既知の多くの方法のうちの任意の 1 方法によって設計し得る。

ある種の実施態様においては、本発明の生物学的マーカーの各々について、少なくとも 1 対の特異的プライマー並びに相応する検出核酸プローブは、公的“Quantitative PCR プライマーデータベース”において、とりわけ、インターネットアドレス：<http://lpgws.n ci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer>において既に参照しており、全体的に説明している。

他の実施態様においては、特異的対のプライマーは、Nakae 等に付与された米国特許第 6,892,141 号に開示されている方法を使用して設計し得る；該米国特許は、その内容全体を参考として本明細書に合体させる。

【0069】

PCR 方法の多くの特定の適応化が、定性および定量検出の両目的において当該技術において既知である。とりわけ、増幅 PCR 生成物を検出および定量するために蛍光染料を使用する方法は、知られている。また、均質 PCR としても知られる現場増幅および検出法も、以前に開示されている。例えば、Higuchi et al., (Kinetics PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA

Amplification Reactions, Bio/Technology, Vol 11, pp 1026-1030 (1993)); Ishiguro et al., (Homogeneous quantitative Assay of Hepatitis C Virus RNA by Polymerase Chain Reaction in the Presence of a Fluorescent Intercalater, Anal. Biochemistry 229, pp 20-213 (1995)); および、Wittwer et al., (Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid cycle DNA Amplification, Biotechniques, vol.22, pp 130-138 (1997))を参照されたい。

【0070】

また、核酸を定量する多くの他の方法も開発されている(Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98:503-517, 1975; Sharp, P. A., et al., Methods Enzymol. 65:750-768, 1980; Thomas, P. S., Proc. Nat. Acad. Sci., 77:5201-5205, 1980)。さらに最近、サンプル中の核酸の量を測定することのできる PCR および RT-PCR 法も開発されている。例えば、1

つの試みは、反応生成物形成の安定期前の反応の対数期におけるPCR生成物を測定している(Kellogg, D. E., et al., Anal. Biochem. 189:202-208 (1990); および、Pang, S., et al., Nature 343:85-89 (1990))。全てのサンプル中に比較的一定した量で含まれている遺伝子配列を、サンプル増幅効率標準化のために典型的に使用している。しかしながら、この方法は、幾つかの欠点に直面している。この方法は、各サンプルが等投入量の核酸を含むことおよびサンプル間の増幅効率が分析時まで同一であることを必要としている。さらにまた、ゲル電気泳動またはプレート捕捉ハイブリッド化のような通常のPCR定量方法を使用して、全てのサンプルがこの方法が求めているような反応の対数期中に実際に分析されていることを判断するのは困難である。

10

【0071】

定量競合(QC) PCRと称するもう1つの方法は、その名称が暗示しているとおり、各反応において内部対照コンペティターを含ませることに依存している(Becker-Andre, M., Meth. Mol. Cell Biol. 2:189-201 (1991); Piatak, M. J., et al., BioTechniques 14:70-81 (1993); および、Piatak, M. J., et al., Science 259:1749-1754 (1993))。各反応の効率を内部コンペティターに対して標準化している。既知量の内部コンペティターを、各サンプルに典型的に添加している。未知のターゲットPCR生成物を既知のコンペティターPCR生成物と比較して相対的定量値を得ている。この一般的方法に伴う困難性は、ターゲット分子と同じ効率でもって増幅する内部対照の開発にある。

20

【0072】

例えば、使用する核酸増幅方法は、リアルタイム定量PCR分析法からなり得る。

リアルタイムまたは定量PCR (QPCR)は、出発量のDNA、cDNAまたはRNAテンプレートの定量を可能にする。QPCRは、各増幅サイクルによってPCR生成物集積物として増大する蛍光レポーター分子の検出に基づく。蛍光レポーター分子としては、二本鎖DNAと結合する染料(即ち、SYBR

Green I)または配列特異性プローブ(即ち、Molecular Beacon類またはTaqMan[®] Probe類)がある。

好ましい核酸増幅方法は、多重定量PCR、例えば、Therianos等の公開米国特許出願第2005/0089862号に開示されている方法のような定量PCR増幅法である；該米国特許出願は、その内容全体を参考として本明細書に合体させる。

30

具体的には、本発明の生物学的マーカーの定量においては、腫瘍組織サンプルを、生検採集後まもなく瞬間凍結する。その後、“腫瘍組織サンプル”由来の全RNAを分離し、定量する。その後、抽出し定量したRNAの各サンプルを逆転写し、得られるcDNAを、定量する各生物学的マーカーに対する対の特異性プライマーを使用して、PCRによって増幅する。TBP cDNA、18S cDNAおよびGADPH

cDNA、或いは任意の他の周知の“ハウスキーピング”遺伝子と特異的にハイブリッド化するプライマー対のような対照プライマー対を同時に対照として使用する。

【0073】

核酸増幅法を使用しての組織特異性生物学的マーカーの検出および定量の具体的な実施態様は、本明細書の実施例において開示している。

40

本明細書において特記する各種組織特異性生物学的マーカーを検出および/または定量するための核酸プライマーの特異性対の配列は、明確にリストアップしている。

同じ組織特異性生物学的マーカーを検出および/または定量するためのさらなるプライマー対は、当業者であれば、配列データベースにおいて公に入手し得る上記マーカーの核酸配列から出発して入手することができる。

また、本明細書において開示する他の組織特異性マーカーのためのプライマー対も、当業者であれば、配列データベースにおいて公に入手し得る上記マーカーの核酸配列から出発して入手することができる。

【0074】

具体的には、各種組織特異性生物学的マーカーを検出および/または増幅するのに使用

50

し得る特異的プライマー対は、下記に見出される：

(i) 骨転移特異性マーカー：KTCD1 (SEQ ID NO：1および2)、BAIAP2L1 (SEQ ID NO：3および4)、PERP (SEQ ID NO：5および6)、CFD (SEQ ID NO：7および8)、CD4 (SEQ ID NO：9および10)、COL6A2 (SEQ ID NO：11および12)、FLI1 (SEQ ID NO：13および14)、PSTPIP1 (SEQ ID NO：15および16)、MGF10 (SEQ ID NO：17および18)、PTPN22 (SEQ ID NO：19および20)、FAM78A (SEQ ID NO：21および22)、NXF1 (SEQ ID NO：23および24)、MFNG (SEQ ID NO：25および26)、およびCLEC4A (SEQ ID NO：27および28)；

(ii) 肺転移特異性マーカー：KIND1 (SEQ ID NO：29および30)、ELAC1 (SEQ ID NO：31および32)、ANP32E (SEQ ID NO：33および34)、PAQR3 (SEQ ID NO：35および36)、ITGB8 (SEQ ID NO：37および38)、c1orf210 (SEQ ID NO：39および40)、SIKE (SEQ ID NO：41および42)、UGT8 (SEQ ID NO：43および44)、CALB2 (SEQ ID NO：45および46)、CHODL (SEQ ID NO：47および48)、c21orf91 (SEQ ID NO：49および50)、TFCP2L1 (SEQ ID NO：51および52)、ODF2L (SEQ ID NO：53および54)、HORMAD1 (SEQ ID NO：55および56)、PLEKHG4 (SEQ ID NO：57および58)、およびDSC2 (SEQ ID NO：59および60)；

(iii) 肝転移特異性マーカー：GATA2 (SEQ ID NO：61および62)、SELT (SEQ ID NO：63および64)、WHSC1L1 (SEQ ID NO：65および66)、MYRIP (SEQ ID NO：67および68)、ZMAT1 (SEQ ID NO：69および70)、IL20RA (SEQ ID NO：71および72)、ZNF44 (SEQ ID NO：73および74)、LETM2 (SEQ ID NO：75および76)、AGXT2L1 (SEQ ID NO：77および78)、c5orf30 (SEQ ID NO：79および80)、およびTBX3 (SEQ ID NO：81および82)；

(iv) 脳転移特異性マーカー：PPWD1 (SEQ ID NO：83および84)、PDGFRA (SEQ ID NO：85および86)、MLL5 (SEQ ID NO：87および88)、RPS23 (SEQ ID NO：89および90)、ANTXR1 (SEQ ID NO：91および92)、ARRDC3 (SEQ ID NO：93および94)、METTL7A (SEQ ID NO：95および96)、NPHP3 (SEQ ID NO：97および98)、RSHL1 (SEQ ID NO：99および100)、CSPP1 (SEQ ID NO：101および102)、HOXB13 (SEQ ID NO：103および104)、TRA16 (SEQ ID NO：105および106)、DDX27 (SEQ ID NO：107および108)、PKP2 (SEQ ID NO：109および110)、およびINHA (SEQ ID NO：111および112)。

【 0 0 7 5 】

TATAボックス結合タンパク質(TBP)を対照として定量するのに使用し得るプライマー対は、本明細書において開示しているSEQ ID NO：113-114の核酸からなる。

また、核酸配列SEQ ID NO：1～SEQ ID NO：114を有するプライマーは、本明細書の表3に示している。

【 0 0 7 6 】

乳癌の転移を予測するためのキット

また、本発明は、患者の1以上の組織または臓器内(例えば、乳癌患者から前以って採集した腫瘍組織サンプル内)での転移の発生の生体外予測のためのキットのも関する。このキットは、各々が生物学的マーカー核酸またはタンパク質と特異的に結合することのできる複数の試薬を含む。

マーカータンパク質と結合させるのに適する試薬としては、抗体、抗体誘導体、抗体フラグメント等がある。

マーカー核酸(例えば、ゲノムDNA、mRNA、スプライシングしたmRNA、cDNA等)と結合させるのに適する試薬は、相補性核酸類がある。例えば、核酸試薬としては、基体に固定させたオリゴヌクレオチド(標識したまたは標識していない)、基体と結合させていない標識

10

20

30

40

50

化オリゴヌクレオチド、PCRプライマー対、分子ビーコンプローブ等がある。

【 0 0 7 7 】

本発明のもう 1 つの目的は、患者における転移発生の生体外予測用のキットからなり、このキットは、1 以上の組織または臓器内での転移発生を指標する 1 種以上の生物学的マーカーを検出および/または定量する手段を含み、上記 1 種以上の生物学的マーカーが下記からなる群から選ばれることを特徴とする：

- (i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、LST1、MMRN2、SH2D3C、RAMP3、FAM26B、ILK、TM6SF1、C10orf54、CLEC3B、IL2RG、HOM-TES-103、ZNF23、STK35、TNFAIP8L2、RAMP2、ENG、ACRBP、TBC1D10C、C11orf48、EBNA1BP2、HSPE1、GAS6、HCK、SLC2A5、RASA3、ZNF57、WASPIP、KCNK1、GPSM3、ADCY4、AIF1、NCKAP1、AMICA1、POP7、GMFG、PPM1M、CDGAP、GIMAP1、ARHGAP9、APOB48R、OCIAD2、FLRT2、P2RY8、RIPK4、PECAM1、URP2、BTK、APBB1IP、CD37、STARD8、GIMAP6、E2F6、WAS、HLA-DQB1、HVCN1、LOC56902、ORC5L、MEF2C、PLCL2、PLAC9、RAC2、SYNE1、DPEP2、MYEF2、HSPD1、PSCD4、NXT1、LOC340061、ITGB3、AP1S2、SNRPG、CSF1、BIN2、ANKRD47、LIMS2、DARC、PTPN7、MSH6、GGTA1、LRRC33、GDPD5、CALCOCO1、FAM110C、BCL6B、LOC641700、ARHGD1B、DAAM2、TNFRSF14、TPSAB1、CSF2RA、RCS D1、FLJ21438、LOC133874、GSN、SLIT3、FYN、NCF4、PTPRC、EVI2B、SCRIB、C11orf31、LOC440731、TFAM、ARPC5L、PARVG、GRN、LMO2、CRSP8、EHBP1L1、HEATR2、NAALADL1、INPP5D、LTB、STRBP、FAM65A、ADARB1、TMEM140、DENND1C、PRPF19、CASP10、SLC37A2、RHOJ、MPHOSPH10、PPIH、RASSF1、HCST、C16orf54、EPB41L4B、LRMP、LAPTM5、PRDM2、CYGB、LYCAT、ACP5、CMKLR1、UBE1L、MAN2C1、TNFSF12、C7orf24、Cxorf15、CUL1、SMAD7、ITGB7、APOL3、PGRMC1、PPA1、YES1、FBLN1、MRC2、PTK9L、LRP1、IGFBP5、WDR3、GTPBP4、SP11、SELPLG、OSCAR、LYL1、POLR2H、YWHAQ、ISG20L2、LGI14、KIF5B、NGRN、TYROBP、C5orf4、COX7A2、S100A4、MATK、TMEM33、DOK3、LOC150166、CIRBP、NIN、C10orf72、FMNL1、FAT3、CHKB/CPT1B、SNRPA1、GIMAP4、C20orf18、LTBP2、GAB3、NQO1、MARCH2、MYO1F、CDS1、SRD5A1、C20orf160、SLAMF7、ACTL6A、ABP1、RAE1、MAF、SEMA3G、P2RY13、ZDHHC7、ERG、FHL1、CLEC10A、INTS5、MYO15B、CTSW、PILRA、HN1、SCARA5、PRAM1、EBP、SIGLEC9、LGP1、DGUOK、GGCX、RABL5、ZBTB16、TPSAB1、NOP5/NOP58、CCND2、CD200、EPPK1、DKFZp586C0721、CCT6A、RIPK3、ARHGAP25、GNAI2、USP4、FAHD2A、LOC399959、LOC133308、HKDC1、CD93、GTF3C4、ITGB2、ELOVL6、TGFB1I1、ASCC3L1、FES、KCNMB1、AACS、ATP6VOD2、TMEM97、NUDT15、ATP6V1B2、CCDC86、FLJ10154、SCARF2、PRELP、ACHE、GIMAP8、PDE4DIP、NKG7、C20orf59、RHOG、TRPV2、TCP1、TNRC8、TNS1、IBSP、MMP9、NRIP2、OLFML2B、OMD、WIF1、ZEB2、ARL8、COL12A1、EBFおよびEBF3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指標する 1 種以上の生物学的マーカー；
- (ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、C21orf91、TFCP2L1、TTMA、CHODL、CALB2、UGT8、LOC146795、C1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、C20orf42/FERMT1、ELAC1、GYLT1B、SPSB1、CHRM3、PTEN、PIGL、CHRM3、CDH3からなる群から選ばれる、肺組織内での転移発生を指標する 1 種以上の生物学的マーカー；
- (iii) TBX3、SYT17、LOC90355、AGXT2L1、LETM2、LOC145820、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、ARPC2、CAB39L、SLC16A3、DHFR1L1、PRRT3、CYP3A5、RPS6KA5、KIAA1505、ATP5S、ZFYVE16、KIAA0701、PEBP1、DDHD2、WWP1、CCNL1、ROBO2、FAM11B、THRAP2、CRSP9、KARCA1、SLC16A3、ARID4A、TCEAL1、SCAMP1、KIAA0701、EIF5A、DDX46、PEX7、BCL2L11、YBX1、UBE21、REXO2、AXUD1、C10orf2、ZNF548、FBXL16、LOC439911、LOC283874、ZNF587、FLJ20366、KIAA0888、BAG4、CALU、KIAA1961、USP30、NR4A2、FOX A1、FBXO15、WNK4、CDIPT、NUDT16L1、SMAD5、STXBP4、TTC6、LOC113386、TSPYL1、CIP29、C8orf1、SYDE2、SLC12A8、SLC25A18、C7、STAU2、TSC22D2、GADD45G、PHF3、TNRC6C、TCEAL3、RRN3、C5orf24、AHCTF1、LOC92497からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発生を指標する 1 種以上の生物学的マーカー；および、
- (iv) LOC644215、BAT1、GPR75、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、PTK2、SQSTM1、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX31、FAM119A、LLGL2、DDX27、TRA16、HOXB1

3、GNAS、CSPP1、COL8A1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655、RAC3、AP4M1、HEG1、PCBP2、SLC30A7、ATAD3A/ATAD3B、CHI3L1、MUC6、HMG20B、BCL7A、GGN、ARHGEF3、PALLD、TOP1、PCTK1、C20orf4、ZBTB1、MSH6、SETD5、POSTN、MOCS3、GABPA、ZSWIM1、ZNHIT2、LOC653352、ELL、ARPC4、ZNF277、VAV2、HNRPH3、LHX1、FAM83A、DIP2B、RBM10、PMPCA、TYSND1、RAB4B、DLC1、KIAA2018、TES、TFDP2、C3orf10、ZBTB38、PSMD7、RECK、JMJD1C、FLJ20273、CENPB、PLAC2、C6orf111、ATP10D、RNF146、XRR1、NPAS2、APBA2BP、WDR34、SLK、SBF2、SON、MORC3、C3orf63、WDR54、STX7、ZNF512、KLHL9、LOC284889、ETV4、RMND5B、ARMCX1、SLC29A4、TRIB3、LRR32、DDIT3、THUMP3、MICAL-L2、PA2G4、TSEN54、LAS1L、MEA1、S100PBP、TRAF2、EMILIN3、KIAA1712、PRPF6、CHD9、JMJD1B、ANKS1A、CAPN5、EPC2、WSCR27、CYB561、LLGL1、EDD1からなる群から選ばれる、脳組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー。

10

【0078】

また、本発明は、上記予測キットの各種代替実施態様にも及び、これらの実施態様においては、上記予測キットは、本明細書において開示するマーカーの各種組合せを検出および/または定量するためのマーカー検出および/またはマーカー定量手段の組合せを含む。

本発明のある種の実施態様においては、上記予測キットは、乳癌に侵されている患者の肺転移発生の生体外予測用のキットからなり、該キットは、肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーを検出および/または定量するための手段を含み、上記1種以上の生物学的マーカーは、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる。

20

上記予測キットのある種の実施態様においては、上記キットは、以下の肺特異性マーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の2種、3種、4種、5種または全種を検出および/または定量するための手段を含む。

【0079】

さらなる実施態様においては、上記予測キットは、6種の以下のマーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の全部の組合せを検出および/または定量するための手段を含む。

さらなる実施態様においては、上記予測キットは、6種の以下のマーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の全部の組合せを専ら検出および/または定量するための手段を、1種以上の参照マーカー、例えば、アクチンのような普遍的に発現する遺伝子またはタンパク質に相応するマーカーを検出および/または定量するための手段と一緒に含む。

30

最も好ましくは、本発明に従う予測キットは、本明細書において開示する転移特異性生物学的マーカーの核酸発現産物(mRNAまたはcDNA類)にハイブリッド化するプローブを含むDNAマイクロアレイからなる。

【0080】

本発明のもう1つの目的は、乳癌に侵されている患者の製薬剤による治療処置の抗転移効果のモニタリング用キットからなり、このキットは、1以上の組織または臓器内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカーを定量する手段を含み、上記1種以上の生物学的マーカーが下記からなる群から選ばれることを特徴とする：

40

(i) CLEC4A、MFNG、NXF1、FAM78A、KCTD1、BAIAP2L1、PTPN22、MEGF10、PERP、PSTPIP1、FLI1、COL6A2、CD4、CFD、ZFHX1B、CD33、LST1、MMRN2、SH2D3C、RAMP3、FAM26B、ILK、TM6SF1、C10orf54、CLEC3B、IL2RG、HOM-TES-103、ZNF23、STK35、TNFAIP8L2、RAMP2、ENG、ACRBP、TBC1D10C、C11orf48、EBNA1BP2、HSPE1、GAS6、HCK、SLC2A5、RASA3、ZNF57、WASPIP、KCNK1、GPSM3、ADCY4、AIF1、NCKAP1、AMICA1、POP7、GMFG、PPM1M、CDGAP、GIMAP1、ARHGAP9、APOB48R、OCIAD2、FLRT2、P2RY8、RIPK4、PECAM1、URP2、BTK、APBB1IP、CD37、STARD8、GIMAP6、E2F6、WAS、HLA-DQB1、HVCN1、LOC56902、ORC5L、MEF2C、PLCL2、PLAC9、RAC2、SYNE1、DPEP2、MYEF2、HSPD1、PSCD4、NXT1、LOC340061、ITGB3、AP1S2、SNRPG、CSF1、BIN2、ANKRD47、LIMS2、DARC、PTPN7、MSH6、GGTA1、LRR33、GDPD5、CALCOCO1、FAM110C、BCL6B、LOC641700、ARHGD1B、DAAM2、TNFRSF14、TPSAB1、CSF2RA、RCS

50

D1、FLJ21438、LOC133874、GSN、SLIT3、FYN、NCF4、PTPRC、EVI2B、SCRIB、C11orf31、LOC440731、TFAM、ARPC5L、PARVG、GRN、LMO2、CRSP8、EHBP1L1、HEATR2、NAALADL1、INPP5D、LTB、STRBP、FAM65A、ADARB1、TMEM140、DENND1C、PRPF19、CASP10、SLC37A2、RHOJ、MPHOSPH10、PPIH、RASSF1、HCST、C16orf54、EPB41L4B、LRMP、LAPTM5、PRDM2、CYGB、LYCAT、ACP5、CMKLR1、UBE1L、MAN2C1、TNFSF12、C7orf24、Cxorf15、CUL1、SMAD7、ITGB7、APOL3、PGRMC1、PPA1、YES1、FBLN1、MRC2、PTK9L、LRP1、IGFBP5、WDR3、GTPBP4、SPI1、SELPLG、OSCAR、LYL1、POLR2H、YWHAQ、ISG20L2、LGI14、KIF5B、NGRN、TYROBP、C5orf4、COX7A2、S100A4、MATK、TMEM33、DOK3、LOC150166、CIRBP、NIN、C10orf72、FMNL1、FAT3、CHKB/CPT1B、SNRPA1、GIMAP4、C20orf18、LTBP2、GAB3、NQO1、MARCH2、MYO1F、CDS1、SRD5A1、C20orf160、SLAMF7、ACTL6A、ABP1、RAE1、MAF、SEMA3G、P2RY13、ZDHC7、ERG、FHL1、CLEC10A、INTS5、MYO15B、CTSW、PILRA、HN1、SCARA5、PRAM1、EBP、SIGLEC9、LGP1、DGUOK、GGCX、RABL5、ZBTB16、TPSAB1、NOP5/NOP58、CCND2、CD200、EPPK1、DKFZp586C0721、CCT6A、RIPK3、ARHGAP25、GNAI2、USP4、FAHD2A、LOC399959、LOC133308、HKDC1、CD93、GTF3C4、ITGB2、ELOVL6、TGFB1I1、ASCC3L1、FES、KCNMB1、AACS、ATP6VOD2、TMEM97、NUDT15、ATP6V1B2、CCDC86、FLJ10154、SCARF2、PRELP、ACHE、GIMAP8、PDE4DIP、NKG7、C20orf59、RHOG、TRPV2、TCP1、TNRC8、TNS1、IBSP、MMP9、NRIP2、OLFML2B、OMD、WIF1、ZEB2、ARL8、COL12A1、EBFおよびEBF3からなる群から選ばれる、骨組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(ii) DSC2、HORMAD1、PLEKHG4、ODF2L、C21orf91、TFCP2L1、TTMA、CHODL、CALB2、UGT8、LOC146795、C1orf210、SIKE、ITGB8、PAQR3、ANP32E、C20orf42、ELAC1、GYLTL1B、SPSB1、CHRM3、PTEN、PIGL、CHRM3、CDH3からなる群から選ばれる、肺組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；

(iii) TBX3、SYT17、LOC90355、AGXT2L1、LETM2、LOC145820、ZNF44、IL20RA、ZMAT1、MYRIP、WHSC1L1、SELT、GATA2、ARPC2、CAB39L、SLC16A3、DHFR1L1、PRRT3、CYP3A5、RPS6KA5、KIAA1505、ATP5S、ZFYVE16、KIAA0701、PEBP1、DDHD2、WWP1、CCNL1、ROBO2、FAM111B、THRAP2、CRSP9、KARCA1、SLC16A3、ARID4A、TCEAL1、SCAMP1、KIAA0701、EIF5A、DDX46、PEX7、BCL2L11、YBX1、UBE21、REXO2、AXUD1、C10orf2、ZNF548、FBXL16、LOC439911、LOC283874、ZNF587、FLJ20366、KIAA0888、BAG4、CALU、KIAA1961、USP30、NR4A2、FOX A1、FBXO15、WNK4、CDIPT、NUDT16L1、SMAD5、STXBPA、TTC6、LOC113386、TSPYL1、CIP29、C8orf1、SYDE2、SLC12A8、SLC25A18、C7、STAU2、TSC22D2、GADD45G、PHF3、TNRC6C、TCEAL3、RRN3、C5orf24、AHCTF1、LOC92497からなる群から選ばれる、肝組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー；および、

(iv) LOC644215、BAT1、GPR75、PPWD1、INHA、PDGFRA、MLL5、RPS23、ANTXR1、ARRDC3、PTK2、SQSTM1、METTL7A、NPHP3、PKP2、DDX31、FAM119A、LLGL2、DDX27、TRA16、HOXB13、GNAS、CSPP1、COL8A1、RSHL1、DCBLD2、UBXD8、SURF2、ZNF655、RAC3、AP4M1、HEG1、PCBP2、SLC30A7、ATAD3A/ATAD3B、CHI3L1、MUC6、HMG20B、BCL7A、GGN、ARHGEF3、PALLD、TOP1、PCTK1、C20orf4、ZBTB1、MSH6、SETD5、POSTN、MOCS3、GABPA、ZSWIM1、ZNHIT2、LOC653352、ELL、ARPC4、ZNF277、VAV2、HNRPH3、LHX1、FAM83A、DIP2B、RBM10、PMPCA、TYSND1、RAB4B、DLC1、KIAA2018、TES、TFDP2、C3orf10、ZBTB38、PSMD7、RECK、JMJD1C、FLJ20273、CENPB、PLAC2、C6orf111、ATP10D、RNF146、XRR1、NPAS2、APBA2BP、WDR34、SLK、SBF2、SON、MORC3、C3orf63、WDR54、STX7、ZNF512、KLHL9、LOC284889、ETV4、RMND5B、ARMCX1、SLC29A4、TRIB3、LRRC23、DDIT3、THUMP3、MICAL-L2、PA2G4、TSEN54、LAS1L、MEA1、S100BP、TRAF2、EMILIN3、KIAA1712、PRPF6、CHD9、JMJD1B、ANKS1A、CAPN5、EPC2、WSCR27、CYB561、LLGL1、EDD1からなる群から選ばれる、脳組織内での転移発生を指標する1種以上の生物学的マーカー。

【0081】

また、本発明は、上記モニタリングキットの各種代替実施態様にも及び、これらの実施態様においては、上記モニタリングキットは、本明細書において開示するマーカーの各種組合せを検出および/または定量するためのマーカー検出および/またはマーカー定量手段の組合せを含む。

10

20

30

40

50

本発明のある種の実施態様においては、上記モニタリングキットは、乳癌に侵されている患者の肺転移発生の生体外予測用のキットからなり、該キットは、肺組織内での転移発生を指標する１種以上の生物学的マーカーを検出および/または定量するための手段を含み、上記１種以上の生物学的マーカーは、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる。

上記モニタリングキットのある種の実施態様においては、上記モニタリングキットは、以下の肺特異性マーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の２種、３種、４種、５種または全種を検出および/または定量するための手段を含む。

【００８２】

さらなる実施態様においては、上記モニタリングキットは、６種の以下のマーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の全部の組合せを検出および/または定量するための手段を含む。

さらなる実施態様においては、上記モニタリングキットは、６種の以下のマーカー：DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の全部の組合せを専ら検出および/または定量するための手段を、１種以上の参照マーカー、例えば、アクチンのような普遍的に発現する遺伝子またはタンパク質に相応するマーカーを検出および/または定量するための手段と一緒に含む。

本発明の予測キットおよびモニタリングキットは、必要に応じて、本発明の方法を実施するのに有用な追加の成分を含み得る。例えば、上記キットは、相補性核酸をアニーリングするのに或いは抗体を抗体が特異的に結合するタンパク質と結合させるのに適する液体（例えば、SSC緩衝液）、１以上のサンプルコンパートメント、本発明の予測方法またはモニタリング方法の性能を説明する使用説明材料等を含み得る。

【００８３】

抗体を含むキット

ある種の実施態様においては、本発明に従うキットは、抗体の１種または組合せまたは群を含み、各抗体種は、本発明の１種の生物学的マーカーに対して特異的に指向させる。

１つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも２種類の抗体を含む抗体の組合せまたは群を含み、各抗体種は、本明細書において開示する生物学的マーカーの１つに対して指向する抗体からなる群から選ばれる。

本発明に従う抗体キットは、２～２０種類の抗体を含み得、各抗体種は、本発明の１つの生物学的マーカーに対して特異的に指向する。例えば、本発明に従う抗体キットは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０種の抗体を含み得、各抗体種は、本明細書において定義しているような１つの生物学的マーカーに対して特異的に指向する。

本発明に従う生物学的マーカーに対して指向する各種抗体は、表４に示している転移特異性マーカーからなる群から選ばれる生物学的マーカーに対して指向する抗体を包含する。これらの抗体の特定の実施態様は、表４に示している。

抗体からなる検出/定量手段を含む本発明に従う予測キットの特定の実施態様としては、蛍光マイクロスフィア結合抗体サスペンションアレー技術、例えば、Bio-Rad Company社から商標Bio-Plex^Rとして市販されているキット技術がある。

【００８４】

生物学的アッセイにおける磁性マイクロスフィアの興味増大との共在事情は、蛍光マイクロスフィアにおいて実施するアッセイの開発である。マイクロスフィア表面に結合させた或いはマイクロスフィア中に取り込ませた蛍光標識または蛍光物質の使用は、異なる染色発光スペクトルおよび/またはシグナル強度に基づき識別可能である多数のマイクロスフィア群の製造を可能にしている。生物学的アッセイにおいては、これらのマイクロスフィアの蛍光または光散乱をフローサイトメーターまたは画像システムにより測定し得、測定結果を使用してマイクロスフィアのサイズおよび蛍光を測定し、さらにまた、アッセイ系（例えば、“補足サンドイッチアッセイ”における蛍光標識化抗体）と関連する蛍光を、Lee等に付与された米国特許第5,948,627号に記載されているようにして試験し得る；該米国特許は、完全

10

20

30

40

50

に説明するつもりで本明細書に参考として合体させる。ミクロスフィア中に取り込ませた複数の染料の濃度を変えることにより、数百或いは数千もの識別可能なミクロスフィア群を製造し得る。アッセイにおいては、各ミクロスフィア群を異なるターゲットと結合させ、それによって、Chandler等に付与された米国特許第5,981,180号に記載されているように、多数の試験を単一の容器内で単一のサンプルにおいて実施するのを可能にする；該米国特許は、完全に説明するつもりで本明細書に参考として合体させる。

【0085】

蛍光的に識別可能なミクロスフィアは、これらのミクロスフィアを磁気応答性にすることによって改良し得る。蛍光磁性ミクロスフィアの形成方法の例は、Wang等に付与された米国特許第5,283,079号に記載されている；該米国特許は、完全に説明するつもりで本明細書に参考として合体させる。Wang等が説明している方法は、蛍光コアミクロスフィアをマグネタイトとさらなるポリマーとでコーティングするか或いはコアミクロスフィアをマグネタイト、染料および重合可能なモノマーと混合し、重合を開始させてコーティングしたミクロスフィアを形成させることを含む。これらの方法は、蛍光磁性ミクロスフィアの合成にとって比較的簡単な方法である。

さらに、比較的大量の多重アッセイにおいて使用する多数量の正確に染色したミクロスフィアを製造するには、Chandler等に付与された米国特許第5,981,180号に記載されている方法を使用し得る。

【0086】

また、蛍光磁性ミクロスフィアは、Chandler等に付与された米国特許第6,268,222号にも記載されている；該米国特許は、完全に説明するつもりで本明細書に参考として合体させる。この方法においては、ナノスフィアを高分子コアミクロスフィアにカップリングさせ、蛍光且つ磁性の材料を上記コアミクロスフィアまたはナノスフィアのいずれかに結合させている。この方法では、所望の特性を有するミクロスフィアが得られている。

蛍光磁性ミクロスフィアのさらなる実施態様は、Chandler等に付与された米国特許第6,514,295号に記載されている方法のような確立された方法を使用して染色し得る磁気応答性ミクロスフィアである。一般に、この方法は、ミクロスフィアを膨潤させる溶媒を使用し、それによって蛍光物質のミクロスフィア中への移行を可能にしている。これらの染色用溶媒としては、1種以上の有機溶媒がある。

また、磁性ミクロスフィアは、Wang等に付与された米国特許第5,091,206号、Sutorに付与された米国特許第5,648,124号、およびWang等に付与された米国特許第6,013,531号にも記載されている；これらの米国特許は、完全に説明するつもりで本明細書に参考として合体させる。

ある種の他の実施態様においては、本発明に従うキットは、本発明の1種以上の生物学的マーカーと結合する対のリガンドまたは特定の可溶性分子の1つまたは組合せまたは群を含む。

【0087】

核酸プライマーを含むキット

ある種の他の実施態様においては、本発明に従うキットは、プライマー対の1種または組合せまたは群を含み、各プライマー対種は、本発明の1つの生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化する。

1つの実施態様においては、上記キットは、少なくとも2種類のプライマー対を含むプライマー対の組合せまたは群を含み、各プライマー対種は、本明細書において前記で詳述しているSEQ ID NO: 1~112のプライマー対のような、本明細書において開示している生物学的マーカーの1種とハイブリッド化するプライマー対からなる群から選ばれる。

【0088】

本発明に従うプライマーキットは、2~20種類のプライマー対を含み得、各プライマー対種は、本発明の1種の生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化する。例えば、本発明に従うプライマーキットは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種のプライマー対を含み得、各プライマー対種は、本明細書において

定義しているような 1 種の生物学的マーカーに対して特異的にハイブリッド化する。

とりわけ、少なくとも 1 対の特異的プライマー、並びに興味ある 1 種の生物学的マーカーと特異的にハイブリッド化する相応する検出核酸プローブは、公的“Quantitative PCR プライマーデータベース”において、とりわけ、次のインターネットアドレス：<http://pgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer>において既に参照しており、全体的に説明している。

【 0 0 8 9 】

具体的には、本発明に従う予測キットまたはモニタリングキットは、下記に特記するプライマーのうちの、各種組織特異性生物学的マーカーを検出するおよび/または増幅させる 1 種以上の特異性プライマー対を含み得る。

(i) 骨転移特異性マーカー：KTCDD1 (SEQ ID NO : 1および2)、BAIAP2L1 (SEQ ID NO : 3および4)、PERP (SEQ ID NO : 5および6)、CFD (SEQ ID NO : 7および8)、CD4 (SEQ ID NO : 9および10)、COL6A2 (SEQ ID NO : 11および12)、FLI1 (SEQ ID NO : 13および14)、PSTPIP1 (SEQ ID NO : 15および16)、MGF10 (SEQ ID NO : 17および18)、PTPN22 (SEQ ID NO : 19および20)、FAM78A (SEQ ID NO : 21および22)、NXF1 (SEQ ID NO : 23および24)、MFNG (SEQ ID NO : 25および26)、およびCLEC4A (SEQ ID NO : 27および28) ;

(ii) 肺転移特異性マーカー：KIND1 (SEQ ID NO : 29および30)、ELAC1 (SEQ ID NO : 31および32)、ANP32E (SEQ ID NO : 33および34)、PAQR3 (SEQ ID NO : 35および36)、ITGB8 (SEQ ID NO : 37および38)、c1orf210 (SEQ ID NO : 39および40)、SIKE (SEQ ID NO : 41および42)、UGT8 (SEQ ID NO : 43および44)、CALB2 (SEQ ID NO : 45および46)、CHODL (SEQ ID NO : 47および48)、c21orf91 (SEQ ID NO : 49および50)、TFCP2L1 (SEQ ID NO : 51および52)、ODF2L (SEQ ID NO : 53および54)、HORMAD1 (SEQ ID NO : 55および56)、PLEKHG4 (SEQ ID NO : 57および58)、およびDSC2 (SEQ ID NO : 59および60) ;

(iii) 肝転移特異性マーカー：GATA2 (SEQ ID NO : 61および62)、SELT (SEQ ID NO : 63および64)、WHSC1L1 (SEQ ID NO : 65および66)、MYRIP (SEQ ID NO : 67および68)、ZMAT1 (SEQ ID NO : 69および70)、IL20RA (SEQ ID NO : 71および72)、ZNF44 (SEQ ID NO : 73および74)、LETM2 (SEQ ID NO : 75および76)、AGXT2L1 (SEQ ID NO : 77および78)、c5orf30 (SEQ ID NO : 79および80)、およびTBX3 (SEQ ID NO : 81および82) ;

(iv) 脳転移特異性マーカー：PPWD1 (SEQ ID NO : 83および84)、PDGFRA (SEQ ID NO : 85および86)、MLL5 (SEQ ID NO : 87および88)、RPS23 (SEQ ID NO : 89および90)、ANTXR1 (SEQ ID NO : 91および92)、ARRDC3 (SEQ ID NO : 93および94)、METTL7A (SEQ ID NO : 95および96)、NPHP3 (SEQ ID NO : 97および98)、RSHL1 (SEQ ID NO : 99および100)、CSPP1 (SEQ ID NO : 101および102)、HOXB13 (SEQ ID NO : 103および104)、TRA16 (SEQ ID NO : 105および106)、DDX27 (SEQ ID NO : 107および108)、PKP2 (SEQ ID NO : 109および110)、およびINHA (SEQ ID NO : 111および112)。

【 0 0 9 0 】

また、これらのキットは、対照マーカーを検出および/または定量するための 1 種以上のプライマー対も含み得る。具体的には、これらのキットは、本明細書において開示している SEQ ID NO : 113-114 の核酸のような TATA ボックス結合タンパク質 (TBP) を検出および/または定量するためのプライマー対を含み得る。

【 0 0 9 1 】

抗癌治療のモニタリング

10

20

30

40

50

本発明の１種以上の組織特異性生物学的マーカーの発現量に対する薬剤(例えば、薬物化合物)の影響をモニターすることは、患者の治療乳癌の転移潜在力を経時的にモニターすることに応用し得る。例えば、生物学的マーカー発現に影響を与える薬剤の有効性を、抗癌、とりわけ、抗転移治療を受けている対象者の治療中にモニターし得る。

好ましい実施態様においては、本発明は、(i) 薬物投与前の対象者からの投与前サンプルを入手する工程、(ii) 上記投与前サンプル中の本発明の１種以上の選択された生物学的マーカーの発現量を検出する工程、(iii) 対象者からの１以上の投与後サンプルを入手する工程、(iv) 上記投与後サンプル中の生物学的マーカー(１種以上)の発現量を検出する工程、(v) 上記投与前サンプル中の生物学的マーカー(１種以上)の発現量を上記１以上の投与後サンプル中のマーカー(１種以上)の発現量と比較する工程、および(vi) 薬剤の対象者への投与を相応に変更する工程を含む、対象者の薬剤(例えば、作用薬、拮抗薬、ペプチド擬態物、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子または他の薬物候補)による治療の有効性をモニターする方法を提供する。例えば、生物学的マーカー遺伝子(１種以上)の治療途中での発現減少は、有効でない投与量および投与量増大の望ましさを指標し得る。逆に、生物学的マーカー遺伝子(１種以上)の発現増大は、有効な治療および投与量変更の不必要性を指標し得る。

【００９２】

担乳癌患者からの生物学的サンプルの繰返しの採集が上記のモニタリングを実施するには必要であることから、その場合、好ましい生物学的サンプルは、(i) 患者乳癌組織に由来する細胞または(ii) 核酸またはタンパク質のような、患者乳癌組織に由来する細胞が合成する転移特異性マーカー発現生成物を含有しがちな血液サンプルからなる。本明細書において使用するとき、上記「乳癌患者の組織は、原発性腫瘍組織並びに臓器特異性または組織特異性転移組織を包含する。

本明細書において先に既に説明しているように、本発明の転移予測方法の実施は、従来技術方法よりも高い正確性をもって、腫瘍再発の高リスクにあり、免疫療法のようなアジュバント療法からの利益を受け得る患者を指標し得る。

例えば、本発明の転移予測方法の終了時に、転移のない良好な予後を判断した場合、その後の抗癌治療は、何らのアジュバント化学療法を含まないであろう。

しかしながら、本発明の転移予測方法の終了時に、悪い予後を判断した場合、患者に、アジュバント化学療法の適切な組成物を投与する。

【００９３】

従って、本発明は、乳癌患者の癌治療を適応化させる方法にも関し、該方法は、下記の工程を含む：

a) 上記患者から収集した少なくとも１つの腫瘍組織サンプルにおいて、本明細書において開示する転移予測方法を実施する工程；

b) 上記癌患者の癌治療を、骨、肺、肝臓および脳のような１以上の組織または臓器での転移による悪い癌予後が工程a)の終了時に判断された場合に、上記患者にアジュバント化学療法または抗転移療法を施すことによって適応化させる工程。

本発明のもう１つの目的は、対象者の薬剤による治療(アジュバントまたはネオアジュバント)の有効性をモニターするためのキットからなり、このキットは、乳癌患者における転移発生の可能性を指標する本発明の少なくとも１種の生物学的マーカーを定量する手段を含む。

【００９４】

転移を指標する生物学的マーカーの選択方法

また、本発明は、担乳癌患者における１以上の組織または臓器内での転移発生の可能性を指標する１種以上の生物学的マーカーを選択する方法にも関する。

本発明に従う上記組織特異性マーカー選択方法は、好ましくは、下記の工程を含むことを特徴とする：

a) 組織サンプル中の１種以上の生物学的マーカーを検出および/または定量する手段を用意する工程；

10

20

30

40

50

b) 乳癌患者に由来する複数の転移組織サンプル収集物(これらの収集物は、各々、転移乳癌患者の独自の組織タイプに由来する転移に由来する複数の組織サンプルからなる)を用意する工程；

c) 前記1種以上の生物学的マーカーの各々を、各組織サンプル収集物中に含まれている組織サンプル毎に個別に検出および/または定量する工程；

d) 工程c)において検出および/または定量する生物学的マーカー群において、工程b)において用意した複数の組織サンプル収集物に含まれる1つの組織サンプル収集物中でのみ専ら発現するマーカーを選択し、それによって、1群のマーカー(この群のマーカーは、その発現が乳癌患者の特定の組織内での転移発生の可能性を示すマーカーを含む)を組織サンプル収集物毎に選択する工程。

上記のマーカー選択方法のみを実施する目的においては、用語“生物学的マーカー”は、当業者であれば、その通常認識された意味で、即ち、本明細書においては、核酸またはタンパク質のような、任意のヒト遺伝子の発現生成物として使用されたい。

上記選択方法の具体的な実施態様は、本明細書の実施例において十分に説明する。

【0095】

上記選択方法の工程a)を実施するに当たっては、上記マーカー検出および/または定量手段は、抗体のようなマーカータンパク質、またはオリゴヌクレオチドプライマーもしくはプローブのようなマーカー遺伝子特異性核酸を検出または定量する手段を包含する。具体的には、DNAまたは抗体マイクロアレイを、上記選択方法の工程a)において使用し得る。

既知の生物学的マーカーの任意の1種、例えば、任意の既知のタンパク質または任意の遺伝子特異性核酸を特異的に検出および/または定量する手段を、上記選択方法の工程a)において使用し得る。

上記選択方法の工程b)において用意する各々の組織サンプル収集物は、同数の担乳癌個々人から収集する独自の転移組織(例えば、骨、肺、肝臓、脳および皮膚)に由来する多数の転移組織サンプルを含む。好ましくは、各転移組織サンプル収集物は、少なくとも10名の異なる乳癌個々人、最も好ましくは少なくとも20名、25名または30名の異なる乳癌個々人に由来する各サンプルを含む。上記選択方法の終了時に最終的に選択する組織特異性マーカーの統計的関連性は、一般に、試験した異なる乳癌個々人の数、ひいては、工程b)において用意する各収集物中に含ませた転移組織サンプルの数によって増大している。

【0096】

工程c)においては、工程a)において用意した検出および/または定量手段を使用しての工程b)において用意した組織サンプルにおける生物学的マーカーの検出および/または定量は、本明細書のどこかで説明している検出および/または定量方法のいずれか1つの方法に従って実施し得る。

工程d)においては、第1の特定の組織サンプル収集物(例えば、骨転移組織)中で工程c)において検出した各マーカーを、他の全ての組織サンプル収集物(例えば、肺、肝臓および脳)中の同じマーカーについて見出される検出および/または定量結果と比較する。その場合、上記第1の組織サンプル収集物中で、他の組織サンプル収集物と被殻したときに、差次的に発現する(即ち、(i) 発現する、(ii) 発現しない、(iii) 過発現する、および(vi) 過少発現する)マーカーのみを、上記特定の組織(例えば、骨転移組織)中での乳癌転移発生の可能性を指標するマーカーとして正に選択する。工程d)においては、1つの乳癌転移組織中のマーカー発現を他の全ての異なる乳癌転移組織群における上記マーカーの発現と比較することによる統計的に関連する転移組織特異性マーカーの選択は、本明細書の実施例において十分に説明しているように、“1対全体”(“OVA”)対比較と称する。

【0097】

工程d)において試験した各マーカーの統計的関連性は、本明細書の実施例において開示しているように、上記マーカーについてのp値を、例えば、単変量t検定を使用して算出することによって機能させ得る。一般的には、マーカーは、上記選択方法の工程d)においては、p値が 10^{-3} よりも低いときに選択する。

10

20

30

40

50

上記方法の工程d)におけるマーカー選択の統計的信頼性は、本明細書の実施例において開示しているように、多変量並べ替え検定を行って、偽マーカー選択率が10%未満である90%信頼度を示すことによってさらに改善することができる。

工程d)におけるマーカー選択の関連性をさらに改善することを考慮すれば、組織特異性遺伝子からなる全てのマーカー、即ち、第1の特定の正常非癌組織(例えば、骨)において、他の正常非癌組織(例えば、肺、肝臓、脳等)と比較したとき、選択的に差次的に発現する全てのマーカーを取除くようなさらなる選択フィルターを含ませ得る。

【0098】

上記選択方法の工程d)において最初に選択したマーカーの統計的関連性をさらに改善するには、上述したようにして最初に選択したマーカーを、例えば、最初に選択したマーカーを乳癌転移組織サンプルのさらなる収集物においてアッセイすることにより、さらなる選択サイクルに供し得る。このさらなる選択サイクルは、例えば、本明細書の実施例において示しているように、最初に選択したマーカーの、例えば、定量RT-PCR発現分析法によるさらなる発現分析を実施することからなる。また、DNAマイクロアレーも使用し得る。

そのような定量RT-PCR発現分析によれば、最初に選択した各マーカーの発現定量値を、対照値、例えば、TBPのような対照遺伝子の発現定量値に対して標準化する。結果を、正常乳房組織中の値に対する各マーカーのN倍差として表す。その後、最初に選択した各マーカーの統計的関連性を、例えば、本明細書の実施例において説明しているようにして、マン・ウィットニーU検定(SEM)を使用して、95%よりも高い信頼水準(0.05未満のP)にて確認する。

本発明を、如何なる形でも限定することなしに、以下の実施例により、さらに具体的に説明する。

【実施例】

【0099】

実施例1および2

実施例1および2の材料および方法

A. 1. 組織サンプル

ヒト乳癌由来の合計33例の転移癌を、マイクロアレーおよび定量RT-PCR分析において使用した。これらのサンプルを液体窒素中で瞬間凍結し、-196℃で保存した。7例の骨転移癌(溶骨性タイプ)と6例の正常骨サンプルをラクイラ大学(ラクイラ(L'Aquila)、イタリア)から入手し、4例の脳転移癌と4例の正常脳サンプルをIDIBELL(バルセロナ、スペイン)から入手した。他の転移癌サンプル(8例の肺転移癌、8例の肝臓転移癌および6例の皮膚転移癌)の全ておよび35例の乳房原発性腫瘍サンプルは、Centre Rene Huguenin (セント・クラウド(Saint-Cloud)、フランス)から入手した。これらの原発性腫瘍サンプルは、全て、化学療法を受けていない女性患者から切除されていた。正常な乳房、肺、脳および肝臓のRNAサンプルは、Clontech社、Biochain社およびInvitrogen社から購入した。正常組織RNAプールは、少なくとも5例のサンプル各々により調製した。臨床フォローアップによる乳房原発性腫瘍コホート(既知の再発部位：骨、肺およびその他を有する)の公に入手し得るマイクロアレーデータは、NCBIウェブサイトにおいてダウンロードした(GSE2603レコード)。

さらなる乳癌転移癌パラフィン埋込みサンプルは、ベルギーのリエージュ(Liege)大学のDepartment of Pathology (Pr. J. Boniver) (12例の骨、6例の肝臓、4例の肺)、スペインのIDIBELL(6例の脳)、フランスのCentre Rene HugueninのAnatomopathology Department (2例の肺および1例の肝臓)から入手し、免疫組織化学分析において使用した。

【0100】

A. 2. RNA抽出

全RNAは、Gibco社からのTRIzol[®] Reagentを使用して、製造業者が説明しているようにして、ヒトサンプルから分離した。R

10

20

30

40

50

NAは、260nmでの吸光度により定量した(Nanodrop)。RNAサンプルの品質は、アガロースゲル電気泳動および18Sと28SリボソームRNAバンドの完全性により評価した。マイクロアレー分析において使用した全RNAは、RNeasy^R スピンカラム(Qiagen社)を使用して、製造業者のプロトコールに従ってさらに精製した。

【0101】

A. 3. プローブ調製およびマイクロアレーハイブリッド化

サンプル標識化、ハイブリッド化、および染色は、GeneChip^R Expression分析のためのAffymetrix^R

Technical Manual (701021 Rev. 5)のEukaryotic Target

Preparationプロトコール(Affymetrix社)に従って実施した。要するに、500ng~10μgの精製全RNAを使用して、二本鎖cDNAを、GeneChip

Expression 3'-Amplification One-Cycle cDNA合成キットおよびT7-oligo(dT)プライマ

ー(Affymetrix社)を使用して生成させた。得られたcDNAを、GeneChip Sample Cleanup Moduleを使用し、製造業者のプロトコール(Affymetrix社)に従って精製した。精製cDNAを、IVT標識化用のGeneChip

Expression 3'-Amplification Reagents (Affymetrix社)を使用して増幅して、20~70μgのビオチン標識化cRNA(相補RNA)を生成させた。13μgの標識化cRNA(アレー当り)を、94

で30分間細片化した。細片化cRNAを、Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayに、45で16時間ハイブリッド化させた。

【0102】

ハイブリッド化アレーを洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリン(Molecular Probes社)を使用して染色し、ビオチン化抗-ストレプトアビジン(Vector Laboratories社)により、GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix社)を使用して増幅した。各アレーを、Affymetrix GeneChipスキャナー 3000内で、570nmにてスキャンした。5' / 3' GAPDH比は平均で3.5であり、平均背景、ノイズ平均、%プレゼントコール(Present calls)およびプレゼントコールの平均シグナルは、本試験において使用した全てのアレーにおいて匹敵していた。U133 Plus 2.0発現アレーは、47000個の複写体に相当する56000個のプローブ群を含んでいる。

【0103】

A. 4. マイクロアレー統計解析

発現プロフィールを、BRB Array器具、バージョン3.3ベータ3 (Biometric Research Branch, Division of Cancer Treatment and

Diagnosis Molecular Statistics and Bioinformatics Section, National Cancer

Institute; 米国メリーランド州ベテスダ)により解析した。マイクロアレーデータをCELファイルとして収集し、Affymetrixプローブセット集計の算出および四分標準化は、バイオコンダクター(Bioconductor)のRMA関数を使用して実施した。4つの生部位特異性転移サイン、即ち、骨、脳、肝臓および肺転移を開発した。6種の骨、4種の脳、6種の肝臓、5種の肺および2種の皮膚転移癌を使用した。マルチクラス問題は、1連の4通りの“1対全体”(OVA)対比較として分割した。例えば、生骨転移サインは、次のように定義した：“骨転移”対“全て他の転移”、即ち、“骨転移”対“肺+肝+脳+皮膚転移”間で差次的

に発現したプローブを選択した。

2つの分類間で差次的に発現した遺伝子を、単変量t検定を使用して特定した。遺伝子は、そのp値が0.0001未満である場合に、統計的に有意であるとみなした。厳格な有意閾値を使用して偽陽性認定数を抑制した。

【0104】

幾つかの選択フィルターを明確にした。まず、汚染に由来し得る可能性ある宿主組織遺伝子を特定した。遺伝子は、対応する正常組織プール(例えば、骨)において、他の3種の正常組織プールの各々(例えば、肝臓、脳および肺)におけるよりも1.5倍多く発現する場合、推定宿主組織遺伝子とみなす。次に、対応する分類(例えば、骨転移)において25よりも低い幾何平均強度を有するアップレギュレート遺伝子は、除外する。“他の転移”分類

(例えば、肝、脳、肺および皮膚転移)において25よりも低い幾何平均強度を有するダウンレギュレート遺伝子は、除外する。最後に、各プローブは、ヒトゲノムに対して整列させた(NCBIウェブサイトからのBlastソフトウェアを使用して)。プローブは、転写体を認識しないときは保存しなかった。転移サインは、残存する最も差次的に発現した遺伝子(絶対t検定によりソートした)を含んでおり、定量RT-PCRによって試験した。

【0105】

A. 5. 定量RT-PCR発現分析

リアルタイムRT-PCR分析において使用するヒトサンプルのcDNAを、以前に開示されているようにして合成した(Bieche等、2001年)。全てのPCR反応を、ABI Prism 7700 Sequence Detection

System (Perkin-Elmer Applied Biosystems社)およびSYBR Green PCR Core Reagentsキット(Perkin-Elmer

Applied Biosystems社)を使用して行った。10 μ lの希釈サンプルcDNA (2 $\cdot$ gの全RNAから調製)を、15 μ lのPCRマスター混合物に添加した。熱サイクル条件は、95 $^{\circ}$ Cで10分間の初期変性工程、並びに95 $^{\circ}$ Cで15秒間および65 $^{\circ}$ Cで1分間の50サイクルからなっていた。

【0106】

原発性腫瘍および再発由来のヒトRNAを、以前に開示されているようにして、定量リアルタイム逆転写PCR (RT-PCR)アッセイ法を使用して、臓器特異性転移関連遺伝子のうちから選択した56種の遺伝子の発現について分析した(Bieche等、2001年)。これらの遺伝子の発現を、マイクロアレイにより既に試験した19例および10例の新たなサンプル(1例の骨、3例の肺、2例の肝および4例の皮膚再発)を含む29例のヒト乳癌由来転移癌サンプルにおいて測定した。TATAボックス結合タンパク質(TBP)転写体を内生RNA対照として使用し、各サンプルをそのTBP含有量に基づき標準化した。各X遺伝子発現のTBP遺伝子に対するN倍差("N_X"で示す)として表す結果は、式: $N_X = 2^{D_{Ct} \text{ サンプル} - D_{Ct} \text{ TBP}}$ によって得られ、サンプルのD_{Ct} (Dサイクル閾)値は、X遺伝子の平均Ct値をTBP遺伝子の平均Ct値から差引くことによって決定する。その後、各サンプルのN_X値を標準化して、4例の正常乳房サンプルのN_X値の中央値が1の値を有するようにする。リアルタイムRT-PCR増幅において使用する各プライマーのヌクレオチド配列は、表3に示している。全RNA抽出、cDNA合成およびPCR反応条件は、以前に詳細に説明されている(Bieche et al., 2001, Cancer Res, Vol 61(4): 1652-1658)。

2つの集団間の差異は、マン・ウィットニーU検定(SEM)を使用して、信頼水準>95% (P <0.05)において有意と判断した。

【0107】

免疫組織化学

乳癌患者由来の転移癌生検体を、0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.2中4%ホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に埋込んだ。骨試験標本を、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)と塩酸の溶液(脱灰剤II、Labonord社)またはホルマリン(20%)と硝酸(5%)の溶液のいずれかで脱灰処理した。切片を、Reichert-Jung 1150/Autocutミクロトームを使用して切断した。スライド取付け組織切片(4 μ m厚)をキシレン中でパラフィン除去し、100%、95%および80%エタノール中で連続的に水和させた。内生ペルオキシダーゼをPBS中3% H₂O₂中で1時間失活させ、次いで、各スライドを、指示一次抗体と一緒に4 $^{\circ}$ Cで1夜インキュベートした。切片をPBS中で3回洗浄し、抗体結合を、Ultra-Vision

Detection System anti-Polyvalent HRP/DABキットを使用して、製造業者の使用説明書(Lab Vision社)に従って明確にした。最後に、マイヤーヘマトキシリンで対比染色し、蒸留水中で洗浄した。

抗-OMD抗体および-IBSP抗体は、それぞれ、スウェーデンのDick Heinegard氏(ランド(Lund)大学のDepartment of Experimental Medical Science)、およびL.W. Fisher氏(National Institute of Dental

Craniofacial Research, NIH; 米国メリーランド州ベテスダ)から親切に提供された。抗-

KIND1および抗-TOP1抗体はAbcam社から、抗-MMP-9はChemicon社から、抗-DSC2抗体はProgen社から、それぞれ購入した。

【0108】

実施例1：差次的に発現した遺伝子の同定

再発の4つの主要ターゲット臓器、即ち、骨、肺、肝および脳に由来するヒト乳癌転移の転写プロファイルを比較した。従って、マイクロアレー遺伝子発現データ(Affymetrix U133 Plus 2.0チップ)を使用して、手術から得られた23例の転移サンプルを検証した。

上記4つの転移臓器の各々中で特異的に発現した遺伝子を同定するために、1対全体(OV A)分類比較を行って2つの既知の下位群を識別した。以下の組合せを使用した：6例の骨転移対全部で17例の他の転移(非骨転移)、5例の肺転移対18例の他の転移、6例の肝転移対17例の他の転移、および4例の脳転移対19例の他の転移。2つの明確にした群間の遺伝子発現を、臨界的p値を 10^{-4} に設定した単変量t検定を使用することによって比較した。

10

【0109】

前記材料および方法の項で説明したようなフィルタリング基準を適用した後、骨転移癌(267種の遺伝子を示す325種のプローブ)、肺転移癌(23種の遺伝子を示す28種のプローブ)、肝転移癌(83種の遺伝子を示す114種のプローブ)および脳転移癌(123種の遺伝子を示す133種のプローブ)において差次的に発現する遺伝子に相応する4つの遺伝子目録を同定した(表1)。600種の同定プローブ(505種の遺伝子を示す)のうちで、77%がアップレギュレートされ、23%がダウンレギュレートされていた。骨および脳転移関連遺伝子は症例のほぼ30%においてダウンレギュレートされており、一方、肺および肝転移関連遺伝子は約5%においてダウンレギュレートされていた。各臓器特異性転移における20種の最高格付け遺伝子を表2に示している。

20

RNAレベルで行った観察をタンパク質レベルで検証するために、数種の臓器特異性転移遺伝子生成物、即ち、肺転移に関連するDSC2およびKIND1並びに脳転移過程に相応するTOP1の免疫組織化学分析を進めた。予想通り、タンパク質は、殆ど転移細胞によってのみ高度に発現していた。KIND1およびTOP1は転移細胞によって高度に且つ均質に発現しているのに対し、DSC2は腫瘍端部に存在する転移細胞により主として高度に発現しており、肺細胞とのクロストークの存在を示唆していた。

【0110】

1. 1. 臓器特異性転移関連遺伝子を含む主要生物学的過程

30

4つの再発部位に関連する差次的発現遺伝子の全てを、遺伝子オントロジー(Gene Ontology)データベースに対してマッピングした。試験した505種の遺伝子のうち、326種を、“遺伝子オントロジー生物学的過程記述(Gene Ontology Biological Process Description)”について注釈付けした。これらの記述は、主要生物学的過程(即ち、アポトーシス、細胞接着、細胞サイクル、細胞シグナリング、細胞骨格構成、RNAプロセッシング、転写調節)に分類してある種の過程が高度に示されているかどうかを判定した。それによって、“細胞接着”関連遺伝子は、肺転移目録における15の注釈のうちの4(26.6%)において示されていた。肝および脳転移関連遺伝子においては、“転写調節”が、それぞれ、21/58 (32.2%)および20/63 (31.7%)において最も示された記述であった。骨転移遺伝子目録においては、“細胞シグナリング”に関連する遺伝子が最も頻繁に見出されていた(61/190、即ち、32.1%)。さらに、以前に説明されているように、骨転移関連遺伝子は、免疫応答に関与する高割合の遺伝子を含む(Smid等、2006年)。臓器特異性転移遺伝子目録の各々において高度に示された注釈は、再発部位に潜在的に関連している特定の生物学的過程を暗示し得る。

40

【0111】

同定した“既知”のタンパク質のうちで、遺伝子PTEN、PERP、PDGFRA、TBX3のような数種は、癌進行および/または転移癌フェノタイプに既に関与している(Attardi等、2000年；Petrocelli等、2001年；Rowley等、2004年；Oliveira等、2005年；Jechlinger等、2006年)。肝転移関連遺伝子のうちでは、WHSC1L1およびLETM2は、これらが肺癌において共増幅されていると説明されていることから、とりわけ興味がある。そのアップレギュレーション

50

ョンは、おそらくは、癌細胞中の遺伝的事象に基づく(Tonon等、2005年)。脳転移関連遺伝子HOXB13は、乳癌患者の臨床帰結と最近関連付けられた(Ma等、2006年)。さらにまた、骨転移関連遺伝子のうち、MFNGは、ノッチ(Notch)シグナリング経路を調節するマニックフリンジ(Manic Fringe)タンパク質をコード化している。この経路は、前立腺癌の骨転移に関与することが報告されており(Zayzafoon等、2003年)、一方、TNFAIP8L2およびCSF-1は、乳癌骨転移において典型的に見出される破骨細胞形成および活性の増強に関与し得る。

【0112】

1. 2. 骨転移の場合の微環境との相互作用：オステオミミクリー

骨転移において差次的に発現することは判明しているが宿主組織遺伝子を回避するための本発明者等のフィルタリング基準により除外されている(汚染のため)遺伝子のうちで、骨シアロタンパク質(IBSP)およびオステオカルシン(BGLAP)非コラーゲン性骨マトリックスタンパク質のような骨芽細胞系の細胞により発現することが知られている数種の遺伝子を同定した。骨に局在する転移性乳癌細胞は、分析した大多数のサンプルにおいてIBSP、MMP9およびOMDに対して強い免疫反応性を一貫して示していることを観察した。この観察は、骨に転移する乳癌および前立腺癌細胞が骨関連タンパク質を発現することを示唆している以前の報告(Koeneman、1999年；Waltregny、2000年；Huang、2005年)と一致している。この現象は、“オステオミミクリー(osteomimicry)”と称し、骨指向性癌細胞が骨格に転移する性向を説明し得ている(Koeneman、1999年)。

【0113】

1. 3. 臓器特異性転移サイン

その後、上記4つのターゲット臓器内で差次的に発現する遺伝子(表2)を分析して臓器特異性転移サインを明確にした。これらの遺伝子のうちで、56種を、マイクロアレー分析において既に使用した19例の遠隔再発(4例の骨転移、5例の肺転移、6例の肝転移、4例の脳転移)および10例の追加サンプル(1例の骨転移、3例の肺転移、2例の肝転移および4例の皮膚転移)からなる1連の29例の乳癌転移癌に対しての定量RT-PCRによって試験した。

31種の遺伝子(55%)が、比較基準に合格した(OVA比較、マン・ウィットニーU検定、 p 値<0.05)(補足表3)。これらの検証遺伝子の組合せを、階層的クラスタ分析による臓器特異性転移サインとして評価した。デンドログラムによって示しているように、上記サインは、異なる転移群を明白に分類していた。とりわけ、骨転移群は、軟質組織転移群とは別のようであった。本発明者等が限定した“31種遺伝子サイン”は、80種の最高格付け遺伝子よりも同様なパターンを示していた(データは示していない)。

【0114】

1. 4. 臓器特異性転移サインの予測値

現実の仮説は、原発性腫瘍が、転移を強く予測する遺伝子発現プロファイルを既に含んでいる可能性があること、さらにまた、腫瘍細胞も転移部位を予測する組織特異性発現プロファイルを示し得ることである。この仮説を試験するために、82名の乳癌患者のフォローアップを伴うコホートに関連する1連の公に入手可能なマイクロアレーデータ(とりわけ、再発部位)を分析した(Minn等、2005年a)。この群においては、27例の腫瘍が、主として骨または肺において再発していた。従って、本発明者等が同定した肺および骨転移関連遺伝子(U133Aチップ上に存在するそれぞれ6種と10種のための遺伝子)を使用して上記27例の再発性腫瘍をクラスタ分析した(データは示していない)。いずれの場合も、多くの遺伝子が、再発性腫瘍において、相応する再発と同じ形で発現していることを観察した。例えば、骨転移癌中でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子は、それぞれ、骨に再発する乳房腫瘍においては他の部位に再発する乳房腫瘍におけるよりも高いまたは低い発現を示していた。

さらにまた、これらの骨転移遺伝子を高度に発現させる原発性腫瘍は、骨に対して再発しやすいようであった($p = 0.082$ 、 χ^2 検定)。同じ形で、これらの肺転移遺伝子を高度に発現させる原発性腫瘍は、肺にさらに一層有意に再発しやすいようであった($p = 0.002$ 、 χ^2 検定)(図1)。

【0115】

最後に、本発明の臓器特異性サインの予測値を82例の原発性腫瘍の大コホートにおいて評価した。臓器特異性転移サイン(U133Aチップ上に存在するプローブの25種のみによって示された)は、肺転移癌、骨転移癌を主として生じ、さらに、転移をもたらさない腫瘍に相応する3つの主要群への腫瘍分類を可能にした(図2)。

カプラン・マイヤー分析を行って、無臓器特異性転移生存に関連する上記サインの予後値を評価した。肺転移遺伝子を発現する腫瘍を有する患者(群#1)は、悪い無肺転移生存を示していた($p = 0.00066$)が、無骨転移生存は示していなかった(データは示していない)。骨転移遺伝子を発現する腫瘍を有する患者(群#2)は、悪い無骨転移生存を示す傾向を有しており($p = 0.12$)、群#3(骨または肺転移遺伝子のいずれも発現しない腫瘍)に含まれる患者は、より良好な無転移生存を示していた。

これらの結果を確認するために、臓器特異性転移サインの発現分析を、35名の患者の独立のコホートにおける定量RT-PCRによって行った。これらの患者は、Centre Rene Hugueninで治療されており、化学療法は受けておらず、全て骨または肺への再発を示していた。肺転移遺伝子(7種の遺伝子)を高度に発現する腫瘍は、肺にさらに一層有意に再発していた($p = 0.04$ 、 c^2 検定)。これら後者の腫瘍を示す患者は、原発性腫瘍の診断後10年の有意に悪い無肺転移生存を示していた($p = 0.00043$)。しかしながら、骨転移遺伝子を発現する腫瘍は、骨へのより一層の再発はなかった(データは示していない)。

【0116】

実施例3～6A. 実施例3～6の材料および方法A. 1. 患者およびサンプル

試験は、現地倫理規定に従って実施した。まず、手術を受けた乳癌患者に由来する23例の転移癌(5例の肺、6例の肝、4例の脳、2例の皮膚および6例の溶骨性骨転移)のトランスクリプトームを試験した($n = 22$)。その後、追加の10例のサンプルをRT-PCR検証において使用した(3例の肺、2例の肝、4例の皮膚および1例の骨転移) ($n = 10$)。転移癌サンプルの全てを、ラクイラ大学(ラクイラ、イタリア)、IDIBELL (バルセロナ、スペイン)およびCentre Rene

Huguenin (CRH; セント・クラウド、フランス)から入手した。正常組織RNAプールは、6例の骨(ラクイラ)、4例の脳(IDIBELL)から調製し、少なくとも5例の乳房、肺および肝正常サンプルは、Clontech社(パロアルト、米国)、Biochain社(ヘイワード、米国)およびInvitrogen社(フレデリック、米国)から購入した。

【0117】

1連の72例の原発性乳房腫瘍(“CRHコホート”)を、Centre Rene Hugueninで治療しており、且つ全身ネオアジュバントまたはアジュバント療法を受けていないリンパ節転移陰性乳癌患者(フォローアップ中央値、132ヶ月; 範囲、22.6～294ヶ月)から特定の選択した。フォローアップの10年間で、38名の患者が遠隔転移癌を発症していた。これらの患者のうちの11名は、遠隔再発の最初の部位として肺転移癌を発症していた。

また、3つの個々の乳房腫瘍群も分析した; マイクロアレーデータをNCBIウェブサイトから自由にダウンロードし得るどこかで詳細に説明されている“MSK” ($n=82$)、 “EMC” ($n=344$) および “NKI” ($n=295$) の各コホート(4、6、12、14)。要するに、“EMC” および “NKI” コホートは、それぞれ、100%および50%リンパ節転移陰性の早期段階乳癌からなるのに対し、“MSK” 群は、66%リンパ節転移陽性の局所進行性腫瘍からなる。

最後に、肺転移癌および対の乳房腫瘍のパラフィン埋込み切片をリエージュ大学(ベルギー)およびCentre Rene Huguenin(フランス)から入手して、免疫組織学分析を行った。

【0118】

A. 2. 遺伝子発現分析

マイクロアレー分析においては、サンプル標識化、ハイブリッド化および染色は、以前に説明されているようにして実施した(Jackson等、2005年)。Human Genome U133 Plus 2.

0アレーを、Affymetrix

GeneChipスキャナー 3000内で、570nmにてスキャンした。5' / 3' GAPDH比は、平均3.5であった。平均背景、ノイズ平均、%プレゼントコール数(Present calls)およびプレゼントコール数の平均シグナルは、本試験において使用したアレー全てにおいて同様であった。

定量RT-PCR分析においては、他の箇所でも詳述しているcDNA合成およびPCR条件を使用した(34)。全てのPCR反応を、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied

Biosystems社)およびSYBR Green PCR

Core Reagentsキット(Perkin-Elmer Applied Biosystems社)によって行った。TATAボックス結合タンパク質(TBP)転写体を内生RNA対照として使用し、各サンプルをそのTBP含有量に基づいて標準化した(Bieche等、2001年)。

10

【0119】

A. 3. 免疫組織化学

乳癌患者由来の原発性腫瘍および適合性肺転移癌の生検試験標本を固定し、パラフィン中に埋込んだ。4μm厚の切片をキシレン中でパラフィン除去し、段階エタノール濃度において水和させた。内生ペルオキシダーゼを、3% H₂O₂を含有するPBS中で1時間失活させ、次いで、各スライドを指示一次抗体と一緒に4℃で1夜インキュベートした。各切片を洗浄し、抗体結合を、Ultra-Vision Detection System Anti-Polyvalent HRP/DABキット(Lab Vision社)によって明らかにした。最後に、各スライドをマイヤーヘマトキシリンで対比染色し、蒸留水中で洗浄した。抗-FERMT1および抗-DSC2抗体は、それぞれ、Abcam社(ケンブリッジ、米国)およびProgen社(クイーンズランド、オーストラリア)から購入した。

20

【0120】

A. 4. 統計解析

マイクロアレー発現プロフィールを、developed by Richard SimonおよびAmy Peng Lam (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>)が開発したBRB Array器具、バージョン 3.3beta3によって解析した。発現データをCELファイルとして照合し、Affymetrixプロブセット概要計算および変位値標準化を、バイオコンダクターのRMA関数を使用して行った。単変量t検定を使用して、5例の肺転移癌および18例の非肺転移癌(6例の骨、4例の脳、6例の肝および2例の皮膚)間で差次的に発現した遺伝子を同定した。差異は、p値が0.0001未満である場合に統計的に有意であるとみなした。この厳格な閾値は、偽陽性数を抑えるために使用した。

30

【0121】

幾つかの選択フィルターを使用して肺転移関連遺伝子群を精選した。まず、正常肺組織において他の3つの各正常組織プール(骨、肝および脳)におけるよりも1.5倍高い発現量に特徴を有する潜在的宿主組織遺伝子をフィルターに掛けた。これらの遺伝子は、汚染性宿主組織により潜在的に発現したとみなした。次に、肺および非肺転移癌の双方において25よりも低い幾何平均強度を有する遺伝子を除外した。最後に、何らの転写体も認識しない、ヒトゲノムに対して配列した(NCBIウェブサイトからのBlastソフトウェアを使用して)プロブを除外した。

40

興味ある遺伝子を、Unigene識別器を使用することによって、種々のプラットフォーム間にマッピングした。その後、個々の乳癌を、可能な場合、同じプロブによって分析した。遺伝子発現プロフィールがCRHコホートにおける低 - および高 - 肺転移リスク集団を確認し得るかどうかを判断するために、6種遺伝子サインを使用して遺伝子発現値の線形結合として定義するリスク指数を創出した。リスク指数値の分布を検証して、最適カットポイントを75番のパーセンタイル値に決めてCRH群における高および低リスクを区別した。その後、リスク指数関数および高/低リスクカットオフ点をMSK、EMC、NKIおよび組合せコホートに適用した。

生存時間は、カプラン・マイヤー法によって評価し、差異の有意性はログランク検定を使用して判定した。多変量解析は、コックス比例ハザード回帰モデルを使用して行った。

50

【0122】

実施例 3 : 肺転移関連遺伝子の同定

まず、マイクロアレー分析を実施して、5例の肺転移癌および他のターゲット臓器(骨、肝、脳および皮膚)由来の18例の転移癌の遺伝子転写体プロフィールを比較した; いずれも、手術を受けた乳癌患者から入手した。階級比較(class comparison)を、単変量t検定により、 10^{-4} の厳格なp値でもって行い、上記2つの組織カテゴリーにより差次的に発現する遺伝子を同定した。

フィルタリング基準(患者および方法の項参照)を適用した後、主として肺転移癌において過発現した21種の差次的発現遺伝子(19種の既知遺伝子および2種の未知遺伝子)を同定した(表5)。1つの遺伝子、腫瘍抑制遺伝子PTENのみは、ダウンレギュレートされていた。

上記の差次的発現遺伝子を技術的に検証するために、最高格付け遺伝子の発現を、マイクロアレーにより分析された19例のサンプル(4例は利用し得るRNAをもはや含んでいなかった)および3例の肺再発を含む10例の追加の乳癌転移癌を使用しての定量RT-PCRによって試験した。この検証工程によって、有意の発現変化を示す7種の遺伝子、即ち、DSC2、HORMAD1、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1の選択に至った(表5)。

【0123】

さらにまた、これらの観察した差次的発現プロフィールが転移サンプルによるが隣接宿主組織の差次的発現によるものではないことを立証するために、2つの代表的な遺伝子、即ち、DSC2およびFERMT1(上限および下限p値に相応する、表5)についてのタンパク質発現を評価した。強い免疫反応性が、ほぼ上記腫瘍細胞中のみの、周囲の肺組織中でのない両タンパク質において検出された。

特性決定した各遺伝子をGene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)データベース中にマッピングして、これら遺伝子の機能および生物学的過程を調査した(表5)。興味深いことに、肺転移関連遺伝子は、細胞接着およびシグナル変換に主として関与する膜結合分子の過発現量を示していた(DSC2、UGT8、ITGB8、FERMT1)。他の同定遺伝子については極めて僅かしか知られていない(HORMAD1、TFCP2L1およびANP32E)。これらのタンパク質のうちで、転移に特異的に関与することが以前に証明されているものはない。

【0124】

実施例 4 : 肺に対する選択性乳癌障害の予測因子(predictor)の開発

上記7種の肺転移関連遺伝子が原発性乳房腫瘍細胞中で既に発現し得ているのかどうかを、さらに、これらの遺伝子が肺転移の高めなリスクを予測し得るのかどうかを判断するために、qRT-PCRにより、1連の5例の正常乳房組織サンプル、6例の乳癌細胞系(MCF7、T47D、SKBR3、MDA-MB-231、MDA-MB-361およびMDA-MB-435)および44例の原発性乳房腫瘍中でのこれら遺伝子の発現パターンを分析した。全ての正常乳房、全ての細胞系および大多数の原発性腫瘍において極めて弱い発現乃至は無発現を示したHORMAD1 (Ct < 35)以外は、全ての肺転移関連遺伝子が哺乳類起原の組織中で発現していた。従って、HORMAD1は、この試みにおいて、肺転移サインを確立しているとは考えられなかった。

【0125】

上記6種の残りの遺伝子((DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1)を使用して、肺転移の高めなリスクを予測する遺伝子サインを開発した。治療法および転移帰結に基づき特定の選定した72名のリンパ節転移陰性患者のコホート、即ち、CRHコホートを試験した。72名の患者の全員が、ネオアジュバントまたはアジュバント療法を受けていなかった。このことは、上記“肺転移分類因子”の潜在的予測効果が全身治療に関連する因子によって影響を受けないことを意味する。38名の患者が10年以内で遠隔転移癌を発症しており(肺転移を示す11名を含む)、34名の患者は、その初期診断後、少なくとも10年間無病のままであった(表6)。

その後、原発性腫瘍を、上記6種遺伝子サインに基づき算出したリスク指数に従い、肺転移に関して高リスク群または低リスク群に割り当てた。肺転移リスク指数は上記6種遺伝子の発現値の線形結合として定義し、適切なカットオフ点を75番のパーセンタイル値に

10

20

30

40

50

設定した。高レベルのリスク指数を発する腫瘍は、他の腫瘍よりも、肺に有意により頻度高く転移していた($p = 0.04$ 、 c^2 検定；図 3 A)。さらに、そのような腫瘍を有する患者は、有意に短い無肺転移生存を示していた($p = 0.008$ 、図 3 B)。上記6種遺伝子サインは、骨転移(図 3 C)または肝転移(図 3 D)のリスクとは相関していなかった。

【 0 1 2 6 】

実施例 5：上記 6 種遺伝子サインの予測能力の検証

上記6種遺伝子肺転移サインの予測値を検証するために、マイクロアレーデータが公に利用し得る 3 つの独立した乳癌患者コホートの発現プロファイルを分析した(Wang等、2005年；Van de Vijver、2002；Minn等、2005年；Minn等、2007年)。これらの 3 つのデータ群は、早期段階乳癌患者の 2 つの大きなコホート(それぞれ、295名および344名の患者の“NKI”群および“EMC”群)およびより局所的に進行した乳癌コホート(82名の患者の“MSK”コホート)に相応する(Wang等、2005年；Van de Vijver、2002；Minn等、2005年；Minn等、2007年)。

【 0 1 2 7 】

階層的クラスタ分析を個々の群全てに対して行った。3つの異なるコホートにおいて、上記6種遺伝子サインは、肺に転移する高めの性向を有する乳房腫瘍の下位群を区別している(MSK、EMCおよびMKIにおいて、それぞれ、 $p =$

0.04 、 $p = 0.016$ および $p = 0.014$ 、 c^2

検定)。典型的な結果として、MSKおよびNKI乳房腫瘍のクラスタ分析を行っている。

階層的クラスタ分析の結果は、暗示的なだけである。従って、CRHコホートにおけるのと同じ手順を使用して、上記6種遺伝子サインを上記 3 つの個々のコホートにおいて評価した。高リスク群に割り当てた患者は、いずれの場合も、有意に短い無肺転移生存を示しており(MSK、EMCおよびMKI群において、それぞれ、 $p = 0.004$ 、 $p = 0.001$ および $p = 0.039$ 、図 4)、一方、無骨転移生存においては差異がなかった。注目すべきは、NKIコホートにおいて、1種の遺伝子(ANP32E)が相応するチップ中に存在しなかったことから、おそらくは5種のみ遺伝子のサインの検討に基づく少なめの識別が存在していることである。最後に、カプラン・マイヤー解析の複合コホートにおいて行ったところ、上記6種遺伝子サインの肺転移の関する乳癌患者の帰結との極めて有意な相関をもたらしていた($n = 721$ 、 $p < 10^{-5}$)。

【 0 1 2 8 】

実施例 6：標準の臨床病理学変動要因および他の予測サインに対する相関

上記 6 種遺伝子サインが、他のモデルおよび/または標準マーカーによっては得ることのできないさらなる予測情報を提供するかどうかを評価した。まず、NKI群(完全な臨床データが記録されている)を、乳癌について報告されている主要予測分子サインについて分析した。以前の報告と一致して、上記6種遺伝子サインを発現する原発性乳房腫瘍は、他の貧弱な予測分子マーカー(Kang等、2003年；Minn等、2007年)も発現していた。上記6種遺伝子サインによって定義したような肺転移に対してのリスクにある患者の腫瘍は、標準の病理パラメーター(62%ER陰性および70%等級3)並びに70種遺伝子サイン(van 't Veer等、2002年；van de Vijver等、2002年)、創傷治癒サイン(Chang等、2005年；Chang等、2005年)および基底様分子サブタイプ(23、24)(それぞれ、80%、89%および58%)のような以前に報告された貧弱な予測サインによれば、殆ど貧弱な予測であった。

【 0 1 2 9 】

さらに、乳癌患者の上記各コホートにおいて利用し得る臨床病理変動要因を分析したとき、高および低リスク群間に、年齢、リンパ節状態または原発性腫瘍サイズに関する差異は見出せず、一方、殆どの高リスク患者およびその腫瘍は、ホルモンレセプター陰性で且つ等級3であるようであった。

上記6種遺伝子分類因子がこれらの標準臨床パラメーターとは無関係にリスク層化を改善したことを確かするため、多変量コックス比例ハザード解析を複合コホート($n = 721$)に対して行った(エストロゲンレセプターおよびリンパ節状態パラメーターのみが患者全

員について入手可能であった、表 7)。コックスモデルは、上記 6 種遺伝子サインとエストロゲンレセプター状態が肺転移の独立した予測因子であることを示していた(それぞれ、 $p = 0.01$ および 0.04)。上記 6 種遺伝子サインは、乳癌における肺転移後の有意な予測因子である。上記 6 種遺伝子サインは、ER およびリンパ節状態が提供する情報を上回る新規且つ重要な予測情報を追加していた。

【 0 1 3 0 】

最後に、本発明の肺転移サインの予測値を MDA-MB-231 マウスモデルに由来するサイン (LMS) (Minn 等、2007 年) と比較した。これらの 2 つのサインは、オーバーラップを有しない異なる遺伝子群の発現パターンに特徴を有する。721 例のサンプルの同じ群において評価したとき、異なる由来にもかかわらず、これらのサインは、オーバーラップし且つ一致した予測結果を提供していたことを観察している。各サインは、同じ患者を乳癌肺転移の高または低リスク群に割り当てた。事実、2 つのモデルは、その肺転移予測において高レベルの一致を有する。また、LMG⁺ として同定したほぼ全ての腫瘍を、上記 6 種遺伝子サインを有するものとして分類した。LSM と本発明の 6 種遺伝子サインは、乳癌患者の肺転移に関連する帰結分類において 85% の一致を示した (カッパ係数 = 0.57)。これらの結果は、遺伝子オーバーラップが存在せず且つ異なる生物学的モデルを使用しているにもかかわらず、帰結予測が、おそらくはこれらのサインが臓器特異性転移癌フェノタイプを授与する共通の生物学的特性群を追跡していることから常に同様であることを示唆している。

【 0 1 3 1 】

従って、上記 2 つのモデルの一緒の使用がいすれか一方の単独での使用よりも良好なモデルを生ずるかどうかを判断するために、上記 2 つのモデルの共通の知見に基づく 1 つのモデルを独立して誘導した。このモデルのカプラン・マイヤー解析に従う性能は、上記 2 つのモデルの各々よりもとりわけ良好であり (図 5 B)、2 つの異なる試みに由来する遺伝子サインは、“トップダウン” および “ボトムアップ” 戦略にそれぞれ相応する 70 種遺伝子および WR サイン (Chang 等、2005 年) において最近報告されているように、相補的であり得ることを示唆している。

さらに、図 6 に示すように、11 種遺伝子骨転移サインを高度に発現する原発性腫瘍は、より骨に再発しやすい。

また、表 8 は、乳癌の骨および非骨転移癌の階級比較から得られた最高格付け遺伝子を示している。

【 0 1 3 2 】

		表 1				
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーター p 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
221724_s_at	CLEC4A	C タイブレクチンドメイン群 4、メンバーA	p < 0.000001	55.9	22.8	2.45
204153_s_at	MFNG	マニックフリンジ(manic fringe)ホモログ (シ ョウジョウバエ)	p < 0.000001	92.7	34.5	2.69
208922_s_at	NXF1	核 RNA 外輸送因子 1	p < 0.000001	281.2	174.6	1.61
227002_at	FAM78A	配列類似性所有群 78、メンバーA	p < 0.000001	91.2	37.6	2.43
226245_at	KCTD1	カリウムチャネル四量体化ドメイン含有 1	p < 0.000001	60.7	199.2	0.30
227372_s_at	BAIAP2L1	BAI1 - 関連タンパク質 2 様 1	p < 0.000001	23.6	245.8	0.10
206060_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセ プタータイプ 22 (リンバ)	p < 0.000001	64.3	15.6	4.12
232523_at	MEGF10	マルチプル EGF 様ドメイン 10	p < 0.000001	119.6	11.1	10.77
222392_x_at	PERP	PERP、TP53 アポトーシスエフェクター	p < 0.000001	215.2	2340	0.09
211178_s_at	PSTPIP1	プロリン-セリン-スレオニンホスファター ゼ相互作用性タンパク質 1	p < 0.000001	60.2	20	3.01
204236_at	FLI1	フレンド白血病ウイルス組込体 1	p < 0.000001	79.7	16.6	4.80
213290_at	COL6A2	コラーゲン、VI 型、アルファ 2	p < 0.000001	99.2	37.7	2.63
203547_at	CD4	CD4 分子	p < 0.000001	240.3	91.6	2.62
205382_s_at	CFD	補体因子 D (アジプシン)	p < 0.000001	601.4	81.6	7.37
235593_at	ZFHX1B	亜鉛フィンガーホモボックス 1b	p < 0.000001	35.6	12.2	2.92
206120_at	CD33	CD33 分子	p < 0.000001	93.6	40.2	2.33
214181_x_at	LST1	白血球特異性転写体 1	p < 0.000001	242	62.5	3.87

【 0 1 3 3 】

		表 1				
ブロープセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
219091_s_at	MMRN2	マルチメリン(multimerin) 2	p < 0.000001	128.3	43.4	2.96
1552667_a_at	SH2D3C	SH2 ドメイン含有 3C	p < 0.000001	48.3	20.9	2.31
205326_at	RAMP3	レセプター(カルシトニン)活性修飾タンパク質 3	p < 0.000001	163	83.8	1.95
221565_s_at	FAM26B	配列類似性所有群 26、メンバーB	p < 0.000001	164.5	82	2.01
201234_at	ILK	インテグリン結合キナーゼ	p < 0.000001	462.9	208.5	2.22
219892_at	TM6SF1	膜貫通 6 上科メンバー1	p < 0.000001	107.4	19.8	5.42
226345_at		CDNA FLJ12853 fis、クローン NT2RP2003456	p < 0.000001	61.7	200.1	0.31
225373_at	C10orf54	染色体 10 読取り枠 54	p < 0.000001	238.6	77	3.10
205200_at	CLEC3B	C タイプレクチンドメイン群 3、メンバーB	p < 0.000001	201.7	37.9	5.32
204116_at	IL2RG	インターロイキン 2 レセプター、ガンマ(重症複合型免疫不全)	1.00E-06	226	69.2	3.27
209721_s_at	HOM-TES-103	推定タンパク質 LOC25900、イソ型 3	1.00E-06	128.7	62.8	2.05
237861_at	ZNF23	亜鉛フィンガータンパク質 23 (K0X16)	1.00E-06	48.6	29.6	1.64
225649_s_at	STK35	セリン/スレオニンキナーゼ 35	1.00E-06	201.3	542.1	0.37
217744_s_at	PERP	PERP、TP53 アポトーシスエフェクター	2.00E-06	48.6	611.5	0.08
223583_at	TNFAIP8L2	腫瘍壊死因子、アルファ-誘導型タンパク質 8 様 2	2.00E-06	48.5	23	2.11

【 0 1 3 4 】

ブロープセット	遺伝子記号	表 1	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
		遺伝子名称		骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
205779_at	RAMP2	レセプター(カルシトニン)活性修飾タンパク質 2	2.00E-06	122.3	51.2	2.39
201809_s_at	ENG	エンドグリン (Osler-Rendu-Weber 症候群 1)	2.00E-06	330.6	126.4	2.62
223717_s_at	ACRBP	アクロシン結合タンパク質	2.00E-06	53.1	30.3	1.75
228258_at	TBC1D10C	TBC1 ドメイン群、メンバー10C	2.00E-06	112.8	42.4	2.66
221637_s_at	C11orf48	染色体 11 読取り枠 48	2.00E-06	138.7	297.8	0.47
201323_at	EBNA1BP2	EBNA1 結合タンパク質 2	3.00E-06	66.4	190.6	0.35
229099_at		CDNA クロニン MGC : 87549 IMAGE : 30347387	3.00E-06	49.2	124.5	0.40
205133_s_at	HSPE1	熱ショック 10kDa タンパク質 1 (シャペロニン 10)	3.00E-06	338.6	1156.2	0.29
202177_at	GAS6	増殖停止特異性 6	3.00E-06	248.7	60.7	4.10
208018_s_at	HCK	造血細胞キナーゼ	3.00E-06	253.1	46.3	5.47
204430_s_at	SLC2A5	溶質担体群2 (促進グルコース/フルクトーストランスポーター)、メンバー5	3.00E-06	124	22.5	5.51
25562_at	RASA3	RAS p21 タンパク質アクチベーター3	3.00E-06	126.2	63.3	1.99
1554628_at	ZNF57	亜鉛フィンガータンパク質 57	3.00E-06	18.3	57.6	0.32
202665_s_at	WASPIP	Wiskott-Aldrich 症候群タンパク質相互作用性たんぱく質	3.00E-06	104.1	43.8	2.38
204678_s_at	KCNK1	カリウムチャンネル、亜科 K、メンバー1	3.00E-06	20.2	101.9	0.20

【 0 1 3 5 】

ブロープセット	遺伝子記号	表 1 遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
214847_s_at	GPSM3	G タンパク質シグナリングモジュレーター3 (AGS3 様、C. エレガンス)	3,00E-06	115.2	57	2.02
230800_at	ADCY4	アデニル酸シクラーゼ 4	4,00E-06	136.9	82.2	1.67
211133_x_at	LILRB2 / LILRB3	白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含有)、メンバー2 / 白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含有)、メンバー3	4,00E-06	189.6	117.5	1.61
215051_x_at	AIF1	アログラフト炎症因子 1	4,00E-06	644.5	213.6	3.02
202663_at	WASPIP	Wiskott-Aldrich 症候群タンパク質相互作用性たんぱく質	4,00E-06	53.9	19.4	2.78
207738_s_at	NCKAP1	NCK 関連タンパク質 1	4,00E-06	426.5	874.1	0.49
228094_at	AMICA1	接着分子、CXADR 抗原 1 と相互作用する	4,00E-06	110.4	43.7	2.53
209482_at	POP7	プレカサー7 加工物、リボヌクレアーゼ P サブユニット(S、セレヴィシエ)	4,00E-06	162.8	370.4	0.44
204220_at	GMFG	グリパ成熟因子、ガンマ	4,00E-06	457.8	108.8	4.21
226074_at	PPM1M	タンパク質ホスファターゼ 1M (PP2C ドメイン含有)	4,00E-06	102.5	56.6	1.81
226056_at	CDGAP	Cdc42 GTP アーゼ活性化タンパク質	4,00E-06	34.8	18.7	1.86
213095_x_at	AIF1	アログラフト炎症因子 1	4,00E-06	630.7	181.1	3.48
1552318_at	GIMAP1	GTP アーゼ、IMAP 群メンバー1	5,00E-06	25.6	12.6	2.03

【 0 1 3 6 】

10

20

30

40

		表 1				
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
227780_s_at			5.00E-06	152	66.7	2.28
232543_x_at	ARHGAP9	Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 9	5.00E-06	209.6	57.9	3.62
220023_at	APOB48R	アポリボタンパク質 B48 レセプター	5.00E-06	68.1	33.9	2.01
225314_at	OCIAD2	OCLA ドメイン含有 2	5.00E-06	160.7	709.5	0.23
204359_at	FLRT2	フィブロネクチンロイシンリッチ膜貫通タンパク質 2	5.00E-06	259.5	36.6	7.09
229686_at	P2RY8	プリン受容体 P2Y、G タンパク質結合性、8	5.00E-06	72.5	33.3	2.18
221215_s_at	RIPK4	レセプター相互作用性セリン - スレオニンキナーゼ 4	5.00E-06	47.5	169.1	0.28
208981_at	PECAM1	血小板/内皮細胞接着分子 (CD31 抗原)	5.00E-06	440.2	134.3	3.28
204265_s_at	GP3M3	G タンパク質シグナリングモジュレーター-3 (AGS3 様、C. エレガンス)	6.00E-06	370.9	141	2.63
223303_at	URP2	UNC - 112 関連タンパク質 2	6.00E-06	294.1	83.2	3.53
205504_at	BTK	ブルートン(Bruton)無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ	6.00E-06	126.9	48.5	2.62
228931_at			6.00E-06	48.2	135.6	0.36
210784_x_at	LILRB2 / LILRB3	白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含有)、メンバー2 / 白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含有)、メンバー3	6.00E-06	191.6	109.3	1.75
214574_x_at	LST1	白血球特異性転写体 1	6.00E-06	213.9	71.9	2.97

10

【 0 1 3 7 】

		表 1				
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーター p 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連 マーカー						
230925_at	APBB1P	アミロイドベータ(A4)プレカーサータンパク質結合性、群 B、メンバー1 相互作用性タンパク質	6,00E-06	661	167.2	3.95
204192_at	CD37	CD37 分子	6,00E-06	104.9	19.2	5.46
206868_at	STARDB8	START ドメイン含有 8	6,00E-06	99	57.6	1.72
229367_s_at	GIMAP6	GTP アーゼ、IMAP 群メンバー6	6,00E-06	136.7	33	4.14
203957_at	E2F6	E2F 転写因子 6	7,00E-06	63.2	148.9	0.42
230805_at		転写座、XP_511906.1 PREDICTED に強力に類似：KIAA0612 タンパク質[チンパンジー]に類似	6,00E-06	71	35.6	1.99
205400_at	WAS	Wiskott-Aldrich 症候群(湿疹・血小板減少症)	7,00E-06	52	27.8	1.87
38964_r_at	WAS	Wiskott-Aldrich 症候群(湿疹・血小板減少症)	7,00E-06	394.8	239.5	1.65
204674_at	LRMP	リンパ系抑制性膜タンパク質	7,00E-06	135.4	56	2.42
211654_x_at	HLA-DQB1	主要組織適合複合体、クラス II、DQ ベータ 1	7,00E-06	476.5	121.6	3.92
226879_at	HVCN1	水素電位差開放チャネル 1	7,00E-06	127.3	65.9	1.93
203622_s_at	LOC56902	推定 28kDa タンパク質	7,00E-06	128	297.5	0.43
204957_at	ORC5L	起点認識複合体、サブユニット 5 様 (酵母)	7,00E-06	88	194.2	0.45
209199_s_at	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)	7,00E-06	561.9	79.6	7.06
216218_s_at	PLCL2	ホスホリパーゼ C 様 2	7,00E-06	34	10.8	3.15

20

30

【 0 1 3 8 】

プローブセット	遺伝子記号	表 1	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
		遺伝子名称		骨転移	無骨転移	
骨転移関連遺伝子						
227419_x_at	PLAC9	プラセンタ特異性 9	7,00E-06	179.3	58.5	3,06
213603_s_at	RAC2	ras 関連 C3 ボツリヌス毒素担体 2 (rho 群、小 GTP 結合タンパク質 Rac2)	8,00E-06	1278.7	247.4	5,17
209447_at	SYNE1	スペクトリン繰返し含有核エンベロープ 1	8,00E-06	171.8	38.9	4,42
219452_at	DPEP2	ジペプチダーゼ 2	8,00E-06	49.7	22.2	2,24
232676_x_at	MYEF2	ミエリン発現因子 2	8,00E-06	82.2	228.8	0,36
200807_s_at	HSPD1	熱ショック 60kDa タンパク質 1 (シャペロニン)	8,00E-06	2153.1	4492.3	0,48
219183_s_at	PSCD4	プレクストリン相同体、Sec7 およびコイルドコイルドメイン 4	8,00E-06	152.8	67.1	2,28
236517_at	MEGF10	マルチプル EGF 様ドメイン 10	9,00E-06	30.3	8.4	3,61
224451_x_at	ARHGAP9	Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 9	9,00E-06	270.3	65.5	4,13
218708_at	NXT1	NTP2 様外輸送因子 1	9,00E-06	121.4	253.2	0,48
211135_x_at	LILRB2 / LILRB3	白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含有)、メンバー2 / 白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含有)、メンバー3	9,00E-06	185.8	109.8	1,69
224929_at	LOC340061	推定タンパク質 LOC340061	1,00E-05	182.1	74.3	2,45
204628_s_at	ITGB3	インテグリン、ベータ 3 (血小板糖タンパク質 IIIa、抗原 CD61)	1,00E-05	45.1	24.7	1,83

40

【 0 1 3 9 】

		表 1				
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
230413_s_at	AP1S2	アダプター関連タンパク質複合体 1、シグマ 2 サブユニット	1.00E-05	37.5	15.2	2.47
205644_s_at	SNRPG	核内低分子リボ核タンパク質ポリペプチド G	1.00E-05	1079.8	2300.1	0.47
219947_at	CLEC4A	C タイプレクチンドメイン群 4、メンバーA	1.00E-05	70.1	19.8	3.54
1598_g_at	GAS6	増殖停止特異性 6	1.1e-05	625.7	245.8	2.55
209716_at	CSF1	コロニー刺激因子 1 (マクロファージ)	1.1e-05	204.5	110.6	1.85
219191_s_at	BIN2	ブリッジングインテグレーター-2	1.1e-05	237	64.5	3.67
226673_at	SH2D3C	SH2 ドメイン含有 3C	1.1e-05	87.7	46.2	1.90
213715_s_at	ANKRD47	アンキリン繰返しドメイン 47	1.2e-05	67.3	39.4	1.71
222771_s_at	MYEF2	ミエリン発現因子 2	1.1e-05	27.2	84.1	0.32
1552316_a_at	GIMAP1	GTP アーゼ、IMAP 群メンバー1	1.2e-05	62.8	18.5	3.39
220765_s_at	LIMS2	LIM および老化細胞抗原様ドメイン 2	1.2e-05	116	71.7	1.62
230264_s_at	AP1S2	アダプター関連タンパク質複合体 1、シグマ 2 サブユニット	1.2e-05	761	153.1	4.97
208335_s_at	DARC	Duffy 血液型、ケモカインレセプター	1.4e-05	108.4	30.2	3.59
204852_s_at	PTPN7	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ 7	1.4e-05	64.7	27.1	2.39
202911_at	MSH6	mutS ホモログ 6 (大腸菌)	1.5e-05	203.1	370.6	0.55
228376_at	GGTA1	糖タンパク質、アルファ - ガラクトシルトランスフェラーゼ 1	1.5e-05	278.7	72.8	3.83

10

【 0 1 4 0 】

		表 1				
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーター p 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連 マーカー						
235359_at	LRRC33	ロイシンリッチ繰返し含有 33	1.5e-05	93.8	33.1	2.83
32502_at	GDPD5	グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼドメイン含有 5	1.5e-05	140	77.1	1.82
209002_s_at	CALCOCO1	カルシウム結合およびコイルドコイルドメイン 1	1.5e-05	191.5	89.7	2.13
226863_at	FAM110C	配列類似性所有群 110、メンバーC	1.5e-05	17.6	183.1	0.10
228311_at	BCL6B	B 細胞 CLL/リンパ腫 6、メンバーB (亜鉛フィンガータンパク質)	1.5e-05	81.2	49.9	1.63
228339_at	LOC641700	推定タンパク質 LOC641700	1.5e-05	65.4	34	1.92
1555811_at	ARHGDIIB	Rho GDP 解離インヒビター(GDI)ベータ	1.5e-05	141.8	92.3	1.54
212793_at	DAAM2	形態形成のディスヘベルドアソシアテッド (dishevelled associated)アクチベーター-2	1.5e-05	146.1	43	3.40
217549_at		転写座、NP_848718.1 ミトコンドリアリボソームタンパク質 L50 [ハツカネズミ]に強力に類似	1.5e-05	90	46.2	1.95
209354_at	TNFRSF14	腫瘍壊死因子レセプター上科、メンバー14 (ヘルペスウィルス侵入メディエーター)	1.6e-05	138.9	81.1	1.71
215382_x_at	TPSAB1	トリプターゼ アルファベータ 1	1.6e-05	143.1	40	3.58
210340_s_at	CSF2RA	コロニー刺激因子 2 レセプター、アルファ、低親和性(顆粒球:マクロファージ)	1.7e-05	27.6	16.2	1.70

20

【 0 1 4 1 】

		表 1				
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーター p 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
225763_at	RCSD1	RCSD ドメイン含有 1	1.6e-05	166.3	36.3	4.58
228677_s_at	FLJ21438	推定タンパク質 FLJ21438	1.7e-05	131.4	75.5	1.74
244598_at	LOC133874	推定遺伝子 LOC133874	1.7e-05	37.1	22.5	1.65
200696_s_at	GSN	ゲルソリン (アミロイド症、フィンランド型)	1.7e-05	2017.7	659.7	3.06
203813_s_at	SLIT3	slit ホモログ 3 (ショウジョウバエ)	1.7e-05	86.1	35.5	2.43
216033_s_at	FYN	SRC、FGR、YES に関連する FYN 腫瘍遺伝子	1.7e-05	83.1	25.4	3.27
207677_s_at	NCF4	好中球細胞質因子 4、40kDa	1.7e-05	96.2	17	5.66
207238_s_at	PTPRC	タンパク質チロシンホスファターゼ、レセプタータイプ、C	1.8e-05	448.9	75.6	5.94
211742_s_at	EVI2B	エコトロピックウィルス組込み部位 2B	1.8e-05	582.2	93.5	6.23
212556_at	SCRIB	スクリブルド(scribbled)ホモログ (ショウジョウバエ)	1.8e-05	104.2	305.5	0.34
228332_s_at	C11orf31	染色体 11 読取り枠 31	1.8e-05	755.4	1868.8	0.40
237563_s_at	LOC440731	推定 LOC440731	1.8e-05	48.2	202.7	0.24
203176_s_at	TFAM	転写因子 A、ミトコンドリア	1.9e-05	30.1	68.8	0.44
220966_x_at	ARPC5L	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 5 様	1.8e-05	263.1	475.4	0.55
223562_at	PARVG	パルビン(parvin)、ガンマ	1.9e-05	139.6	63.4	2.20
216041_x_at	GRN	グラスリン	2,00E-05	1187.5	416	2.85

40

【 0 1 4 2 】

		表 1				
ブロープセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
204249_s_at	LMO2	LIM ドメイン単独 2 (ロンボチン様 1)	2.1e-05	381.4	96.7	3.94
51176_at	CRSP8	Sp1 転写活性化に必要とする補因子、サブユニット 8、34kDa	2,00E-05	96.6	181	0.53
1557228_at	EHBP1L1	EH ドメイン結合タンパク質 1 様 1	2.1e-05	112.4	68.2	1.65
218460_at	HEATR2	HEAT 繰返し含有 2	2.1e-05	182.5	366.4	0.50
205147_x_at	NCF4	好中球細胞質因子 4、40kDa	2.1e-05	87	23.2	3.75
228424_at	NAALADL1	N - アセチル化アルファ結合酸性ジペプチダーゼ様 1	2.1e-05	70.9	42	1.69
200678_x_at	GRN	グラスリン	2.2e-05	1213.4	436.3	2.78
203331_s_at	INPP5D	イノシトールポリホスフェート - 5 - ホスファターゼ、145kDa	2.2e-05	34.5	17.6	1.96
207339_s_at	LTB	リンホトキシンベータ (TNF 上科、メンバー 3)	2.2e-05	126.8	68.6	1.85
233252_s_at	STRBP	精子細胞核周囲 RNA 結合タンパク質	2.2e-05	33.5	100.9	0.33
45749_at	FAM65A	配列類似性所有群 65、メンバーA	2.2e-05	458.7	298.3	1.54
203865_s_at	ADARB1	アデノシンデアミナーゼ、RNA 特異性、B1 (RED1 ホモログラット)	2.2e-05	151	43.3	3.49
218999_at	TMEM140	膜貫通タンパク質 140	2.3e-05	208.3	86.5	2.41
221080_s_at	DENND1C	DENN/MADD ドメイン含有 1C	2.3e-05	111.6	64	1.74
203103_s_at	PRPF19	PRP19/PSO4 前駆 mRNA 処理因子 19 ホモログ (S、セレヴィシエ)	2.3e-05	209.6	392.9	0.53

10

【 0 1 4 3 】

		表 1				
ブロープセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
203332_s_at	INPP5D	イノシトールポリホスフェート - 5 - ホスファターゼ、145kDa	2.3e-05	165.2	69.6	2.37
205467_at	CASP10	カスパーゼ 10、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	2.3e-05	65.2	39.8	1.64
227371_at	BAIAP2L1	BAI1 関連タンパク質 2 様 1	2.4e-05	28	83.7	0.33
238638_at	SLC37A2	溶質担体群 37 (グリセロール-3 - ホスフェートトランスポーター)、メンバー-2	2.3e-05	66.1	30.9	2.14
238905_at	RHOJ	ras ホモログ遺伝子群、メンバー-J	2.3e-05	41.6	27	1.54
212885_at	MPHOSPH10	M 期リントタンパク質 10 (U3 核内低分子リボ核タンパク質)	2.4e-05	140.5	230.1	0.61
204228_at	PPIH	ペプチジルプロリルイソメラーゼ H (サイクロフィリン H)	2.4e-05	181.6	360.7	0.50
204346_s_at	RASSF1	Ras関連(RalGDS/AF-6)ドメイン群1	2.4e-05	70.8	34.8	2.03
211284_s_at	GRN	グラスリン	2.4e-05	813.4	316.6	2.57
217948_at			2.4e-05	83.7	158.2	0.53
223640_at	HCST	造血細胞シグナル伝達物質	2.5e-05	204.1	74.1	2.75
1559584_a_at	C16orf54	染色体 16 読取り枠 54	2.5e-05	31.6	8.5	3.72
211781_x_at			2.5e-05	43.3	28.2	1.54
220161_s_at	EPB41LAB	赤血球膜タンパク質バンド 4.1 様 4B	2.5e-05	51	306.5	0.17
35974_at	LRMP	リンパ系抑制性膜タンパク質	2.5e-05	39	17.2	2.27
201721_s_at	LAPTM5	リソソーム関連多スパン膜タンパク質 5	2.6e-05	1823.2	278.4	6.55

20

30

【 0 1 4 4 】

ブロープセット	遺伝子記号	表 1 遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
205277_at	PRDM2	PR ドメイン含有 2、ZNF ドメインを有する	2.6e-05	48.4	28.5	1.70
226632_at	CYGB	サイトグロビン	2.6e-05	126.8	34.6	3.66
226996_at	LYCAT	リソカルジオリンアシルトランスフェラーゼ	2.6e-05	120.3	288.5	0.42
204638_at	ACP5	酸性ホスファターゼ 5、タートレート耐性	2.7e-05	695.6	131.7	5.28
210659_at	CMKLR1	ケモカイン様レセプター 1	2.8e-05	29.4	18.8	1.56
1294_at	UBE1L	ユビキチン活性化酵素 E1 様	2.8e-05	142.5	76.4	1.87
203668_at	MAN2C1	マンノシダーゼ、アルファ、群 2C、メンバー 1	2.8e-05	53	27.8	1.91
205611_at	TNFSF12	腫瘍壊死因子(リガンド)上科、メンバー12	2.8e-05	81.7	45.2	1.81
215380_s_at	C7orf24	染色体 7 読取り枠 24	2.8e-05	450.4	1424.9	0.32
227520_at	Cxorf15	染色体 X 読取り枠 15	2.8e-05	63.2	184.2	0.34
228899_at	CUL1	カリン(Cullin) 1	2.9e-05	37.6	132.4	0.28
204790_at	SMAD7	SMAD、DPP ホモログ 7 に対する母体 (ショウジョウバエ)	2.9e-05	212.7	61.6	3.45
205718_at	ITGB7	インテグリン、ベータ 7	3.00E-05	105.4	65	1.62
221087_s_at	APOL3	アポリポタンパク質 L、3	3.00E-05	126	58.4	2.16
201121_s_at	PGRMC1	プロゲステロン受容体膜成分 1	3.1e-05	540.9	1149.9	0.47
217848_s_at	PPA1	ピロホスファターゼ(無機) 1	3.1e-05	1169.5	2990.1	0.39
202933_s_at	YES1	v - yes - 1 ヤマダチ肉腫ウィルス腫瘍遺伝子ホモログ 1	3.2e-05	139.8	508.3	0.28

40

【 0 1 4 5 】

ブローブセット	遺伝子記号	表 1 遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
202995_s_at	FBLN1	フィブリン 1	3.2e-05	271.4	35.7	7.60
209280_at	MRC2	マンノースレセプター、C タイプ 2	3.2e-05	209.1	109	1.92
202009_at	PTK9L	PTK9L タンパク質チロシンキナーゼ 9 様 (A6 関連タンパク質)	3.3e-05	110.5	63	1.75
200785_s_at	LRP1	低密度リボタンパク質関連タンパク質 1 (アルファ - 2 - マクログロブリンレセプター)	3.4e-05	191.5	80.1	2.39
203426_s_at	IGFBP5	インシュリン様成長因子結合タンパク質 5	3.4e-05	57.9	31.5	1.84
207134_x_at	TPSAB1	トリプターゼアルファサブユニット 1	3.4e-05	189.6	36.9	5.14
218882_s_at	WDR3	WD 繰返しドメイン 3	3.4e-05	81.8	208	0.39
218239_s_at	GTPBP4	GTP 結合タンパク質 4	3.5e-05	148.7	367.8	0.40
203425_s_at	IGFBP5	インシュリン - 様成長因子結合タンパク質 5	3.6e-05	78.7	38	2.07
205312_at	SPI1	脾臓フォーカス形成ウイルス(SFFV)プロウイルス統合腫瘍遺伝子 spi1	3.6e-05	63.2	24	2.63
209879_at	SELPLG	セレクトリン P リガンド	3.6e-05	139	55.7	2.50
1554503_a_at	OSCAR	破骨細胞関連レセプター	3.7e-05	26.5	13.5	1.96
210044_s_at	LYL1	リンパ芽球性白血病由来配列 1	3.6e-05	105.3	38.1	2.76
238673_at		転写座	3.8e-05	18.5	122.6	0.15
209302_at	POLR2H	ポリメラーゼ(RNA) II (DNA 指向性) ポリベプチド H	3.8e-05	267.8	626.8	0.43

10

【 0 1 4 6 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連遺伝子						
212426_s_at	YWHAQ	チロシン 3 - モノオキシゲナーゼ/トリプトファン 5 - モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質、シータポリペプチド	3.9e-05	858.9	1978.5	0.43
212766_s_at	ISG20L2	インターフェロン刺激エクソヌクレアーゼ遺伝子 20kDa 様 2	3.9e-05	90	354	0.25
227821_at	LGI4	ロイシンリッチ繰返し LGI 群、メンバー4	3.9e-05	136.9	72.4	1.89
201991_s_at	KIF5B	キネシン群メンバー5B	4.00E-05	759.2	1298.7	0.58
216474_x_at	TPSAB1	トリプターゼアルファサブユニット 1	4.00E-05	280.2	54.6	5.13
228541_x_at	NGRN	ニューグリン(Neugrin)、神経突起伸長関連	4.00E-05	150.8	307.7	0.49
204122_at	TYROBP	TYRO タンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質	4.2e-05	1090.6	210.6	5.18
220751_s_at	C5orf4	染色体 5 読取り枠 4	4.1e-05	207.5	61.9	3.35
201597_at	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)	4.2e-05	1215.4	2497.4	0.49
203186_s_at	S100A4	S100 カルシウム結合タンパク質 A4 (カルシウムタンパク質、カルバスクリン(calvasculin)、メタスタシン、マウス胎盤ホモログ)	4.2e-05	1747.6	256.4	6.82
206267_s_at	MATK	巨核球関連チロシンキナーゼ	4.20e-05	90.1	45.7	1.97
218465_at	TMEM33	膜貫通タンパク質 33	4.20e-05	79.5	203.2	0.39
223553_s_at	DOK3	ドッキングタンパク質 3	4.20e-05	164.7	41.3	3.99

20

【 0 1 4 7 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
229295_at	LOC150166	推定タンパク質 LOC150166	4.3e-05	191.3	75.7	2.53
228519_x_at	CIRBP	低温誘導性 RNA 結合タンパク質	4.4e-05	148.9	75.9	1.96
234299_s_at	NIN	ニネイン(GSK3B 相互作用タンパク質)	4.3e-05	25.5	15.5	1.65
213381_at	C10orf72	染色体 10 読取り枠 72	4.4e-05	48.5	30.3	1.60
204789_at	FMNL1	フォルミン様 1	4.5e-05	101.1	54.2	1.87
236029_at	FAT3	FAT 腫瘍抑制ホモログ 3 (ショウジョウバエ)	4.5e-05	64	10.8	5.93
204193_at	CHKB / CPT1B	コリンキナーゼベータ/カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1B (筋肉)	4.7e-05	263.2	141.2	1.86
206055_s_at	SNRPA1	核内低分子リボタンパク質ポリペプチドA'	4.6e-05	208.5	536.2	0.39
219243_at	GIMAP4	GTP アーゼ、IMAP 群メンバー4	4.7e-05	323.9	130	2.49
221827_at	C20orf18	染色体 20 読取り枠 18	4.7e-05	137.9	357.2	0.39
223690_at	LTBP2	潜在形質転換成長因子ベータ結合タンパク質 2	4.6e-05	559.4	155.4	3.60
228410_at	GAB3	GRB2 - 関連結合タンパク質 3	4.6e-05	83.5	36.5	2.29
201468_s_at	NQO1	NAD(P)H デヒドロゲナーゼ、キノン 1	4.8e-05	160.5	737.6	0.22
210075_at	2-Mar	膜関連リングフィンガー (C3HC4)2	4.7e-05	113.2	49.2	2.30
213733_at	MYO1F	ミオシン IF	4.7e-05	223.2	63.3	3.53
205709_s_at	CDS1	CDP - ジアシルグリセロールシンターゼ (ホスファチジグレートシチジルトランスフェラーゼ) 1	4.9e-05	60.5	302.8	0.20

30

40

【 0 1 4 8 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
211056_s_at	SRD5A1	ステロイド-5-アルファ-レダクターゼ、アルファボリペプチド 1 (3-オキソ-5 アルファ-ステロイド デルタ 4-デヒドロゲナーゼ アルファ 1)	4.8e-05	50.3	127.6	0.39
231991_at	C20orf160	染色体 20 読取り枠 160	4.8e-05	53.2	30	1.77
234306_s_at	SLAMF7	SLAM 群メンバー7	4.9e-05	27.8	16.7	1.66
202666_s_at	ACTL6A	アクチン様 6A	5.00E-05	132.3	425	0.31
236583_at	ABP1	アミロリド結合タンパク質 1 (アミノオキシダーゼ (銅含有))	5.00E-05	45.7	26	1.76
201558_at	RAE1	RAE1 RNA 外輸送 1 ホモログ (S. ポンペ)	5.1e-05	251.1	607.1	0.41
209348_s_at	MAF	v-maf 筋腱膜線維肉腫腫瘍遺伝子ホモログ (鳥類)	5.2e-05	499.3	150.5	3.32
219689_at	SEMA3G	セマ ドメイン、免疫グロブリンドメイン (Ig)、短鎖基本ドメイン、分泌性、(血液病) 3G	5.2e-05	148.3	53.2	2.79
220005_at	P2RY13	プリンレセプターP2Y、G タンパク質結合性、13	5.2e-05	62.6	14.7	4.26
241227_at			5.2e-05	55.1	34.5	1.60
218606_at	ZDHHC7	亜鉛フィンガー、DHHHC タイプ含有 7	5.3e-05	480.4	317.8	1.51
213541_s_at	ERG	v-ets 赤芽球症ウィルス E26 腫瘍遺伝子様 (鳥類)	5.4e-05	51.9	21.2	2.45
227779_at	LOC641700	推定タンパク質 LOC641700	5.4e-05	30.2	18.4	1.64
201540_at	FHL1	4.5 LIM ドメイン 1	5.6e-05	1551.7	177.8	8.73
206682_at	CLEC10A	C タイプレクチンドメイン群 10、メンバーA	5.8e-05	50.7	28.3	1.79

10

【 0 1 4 9 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
53968_at	INTS5	インテグレーター複合体サブユニット 5	5.7e-05	66.4	159.2	0.42
59375_at	MYO15B	ミオシン XVB 偽遺伝子	5.8e-05	75.5	40.6	1.86
214450_at	CTSW	カテプシン W (リンホパイン(lymphopain))	5.8e-05	86.9	42.6	2.04
222218_s_at	PILRA	対免疫グロビン様タイプ 2 レセプターアルファ	5.8e-05	111.9	43.1	2.60
222396_at	HN1	血液学および神経学的に発現させた 1	5.8e-05	116.5	268.9	0.43
235849_at	SCARA5	スカベンジャーレセプタークラス A、メンバー5 (推定)	5.9e-05	147.6	48.4	3.05
241742_at	PRAM1	PML-RARA 調節アダプター分子 1	5.9e-05	68.4	23.7	2.89
202735_at	EBP	エモバミル結合タンパク質(ステロールイソメラーゼ)	6.00E-05	143.9	238.8	0.60
207697_x_at	LILRB2	白血球免疫グロブリン様レセプター、亜科 B (TM および ITIM ドメイン含む)、メンバー2	6.1e-05	107.8	45.7	2.36
210569_s_at	SIGLEC9	シアル酸結合 Ig 様レクチン 9	5.9e-05	28.9	18.7	1.55
227159_at	LGP1	マウス LGP1 のホモログ	5.9e-05	82.3	50.2	1.64
209549_s_at	DGUOK	デオキシグアノシンキナーゼ	6.2e-05	260.4	466.9	0.56
214005_at	GGCX	ガンマ-グルタミルカルボキシラーゼ	6.2e-05	56.6	160.8	0.35
235907_at		転写座	6.1e-05	39.6	117.9	0.34
203281_s_at	UBE1L	ユビキチン活性化酵素 E1 様	6.4e-05	181.1	80.4	2.25
222742_s_at	RABL5	RAB、メンバー-RAS 腫瘍遺伝子群様 5	6.4e-05	187.5	404.5	0.46

20

30

【 0 1 5 0 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
229941_at			6.4e-05	43.1	26.6	1.62
205883_at	ZBTB16	亜鉛フィンガーおよび BTB ドメイン含有 16	6.6e-05	42.3	18.2	2.32
210084_x_at	TPSAB1	トリプターゼ アルファ/ベータ 1	6.6e-05	177.3	41.8	4.24
223096_at	NOP5/NOP58	核小体タンパク質 NOP5/NOP58	6.6e-05	528.3	1218.9	0.43
200953_s_at	CCND2	サイクリン D2	6.8e-05	175.6	50	3.51
209582_s_at	CD200	CD200 分子	6.8e-05	31.2	13.2	2.36
232164_s_at	EPPIK1	エピブラキシン 1	6.7e-05	30	294.4	0.10
220320_at	DOK3	ドッキングタンパク質 3	7.00E-05	47.2	26.2	1.80
1558828_s_at	DKFZp586C0721	推定タンパク質 DKFZp586C0721	7.00E-05	51.5	21.4	2.41
201326_at	CCT6A	シャペロニン含有 TCP1、サブユニット 6A (ゼータ 1)	7.1e-05	255.7	537.7	0.48
228139_at	RIPK3	レセプター相互作用性セリン-スレオニンキナーゼ 3	7.1e-05	51.6	28.7	1.80
38149_at	ARHGAP25	Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 25	7.1e-05	110	42.9	2.56
201040_at	GNAI2	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質)、アルファ抑制活性ポリペプチド 2	7.2e-05	291.3	150.2	1.94
211800_s_at	USP4	ユビキチン特異性ペプチダーゼ 4 (プロト腫瘍遺伝子)	7.2e-05	208.6	107.8	1.94
222056_s_at	FAHD2A	ファミルアセトアセテートヒドrolラーゼドメイン含有 2A	7.3e-05	77.8	164.4	0.47

40

【 0 1 5 1 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーター-p 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
225381_at	LOC399959	BX647608 により支持された推定遺伝子	7.2e-05	65.4	16.2	4.04
229491_at	LOC133308	推定タンパク質 BC009732	7.2e-05	104.7	30.2	3.47
237324_s_at	HKDC1	ヘキソキナーゼドメイン含有 1	7.2e-05	26	16.3	1.60
202877_s_at	CD93	CD93 分子	7.4e-05	124.3	50.5	2.46
225543_at	GTF3C4	基本転写因子 IIIC、ポリペプチド 4、90kDa	7.5e-05	44.5	107.1	0.42
229041_s_at	ITGB2	インテグリン、ペータ 2 (補体成分 3 レセプター 3 および 4 サブユニット)	7.5e-05	90.3	31.5	2.87
204256_at	ELOVL6	ELOVL群メンバー6、長鎖脂肪酸伸長 (FEN1/Elo2、SUR4/Elo3様、酵母)	7.6e-05	28.4	87.8	0.32
209651_at	TGFB1I1	形質転換成長因子ペータ 1 誘導性転写体 1	7.6e-05	160.9	59.9	2.69
229121_at		CDNA FLJ44441 fis、クローン UTERU2020242	7.7e-05	85.7	39.7	2.16
200058_s_at	ASCC3L1	活性化シグナルコインテグレーター 1複合体サブユニット3様 1	7.8e-05	548.2	989.7	0.55
205418_at	FES	ネコ肉腫腫瘍遺伝子	7.9e-05	69.8	38.3	1.82
207741_x_at	TPSAB1 / TPSB2	トリプターゼアルファドペータ 1/トリプターゼペータ 2	7.7e-05	131.2	43.6	3.01
209948_at	KCNMB1	カリウム高伝導率カルシウム活性化チャネル、亜科 M、ペータメンバー1	7.8e-05	76	36.4	2.09

【 0 1 5 2 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移性マーカー						
218434_s_at	AACS	アセトアセチル - CoA シンターゼ	7.8e-05	93.1	225	0.41
1553155_x_at	ATP6V0D2	ATP アーゼ、H+ 輸送性、リソソーム 38kDa、V0 サブユニット d2	8.00E-05	32.5	16.5	1.97
213309_at	PLCL2	ホスホリパーゼ C 様 2	8.00E-05	90.2	32	2.82
212281_s_at	TMEM97	膜貫通タンパク質 97	8.2e-05	55	292.1	0.19
219347_at	NUDT15	nudix (ヌクレオシドニリン酸塩結合成分 X)タイプモチーフ 15	8.1e-05	27.9	90.6	0.31
242402_x_at			8.2e-05	59.5	38.8	1.53
201089_at	ATP6V1B2	ATP アーゼ、H+ 輸送性、リソソーム 56/58kDa、V1 サブユニット B2	8.4e-05	629.6	191.4	3.29
203119_at	CCDC86	コイルドコイルドメイン含有 86	8.6e-05	71.1	127.4	0.56
217249_x_at			8.5e-05	252.2	511.7	0.49
228477_at	FLJ10154	推定タンパク質 FLJ10154	8.5e-05	395.2	219.3	1.80
227557_at	SCARF2	スカベンジャーレセプタークラス F、メンバー 2	8.8e-05	59.1	35.8	1.65
203300_x_at	AP1S2	アダプター - 関連タンパク質複合体 1、シグマ 2 サブユニット	9.00E-05	408.4	108.7	3.76
209583_s_at	CD200	CD200 分子	8.9e-05	178.5	57.9	3.08
226187_at	CDS1	CDP - ジアシルグリセロールシンターゼ (ホスファチダートシチジルトランスフェラーゼ) 1	9.00E-05	41.6	141.5	0.29
204223_at	PRELP	プロリン/アルギニンリッチおよびロイシンリッチ繰返しタンパク質	9.2e-05	336.1	92.1	3.65
205377_s_at	ACHE	アセチルコリンエステラーゼ (Yt 血液型)	9.1e-05	36.9	17.2	2.15

【 0 1 5 3 】

		表 1				
ブローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				骨転移	無骨転移	
骨転移関連マーカー						
210299_s_at	FHL1	4.5 LIM ドメイン 1	9.2e-05	476.2	34.6	13.76
235306_at	GIMAP8	GTP アーゼ、IMAP 群メンバー8	9.2e-05	113.6	32.1	3.54
212390_at	PDE4DIP	ホスホジエステラーゼ 4D 相互作用性タンパク質 (myomegalin)	9.4e-05	480.5	69.5	6.91
213915_at	NKG7	ナチュラルキラー細胞群 7 配列	9.5e-05	94.6	24.5	3.86
225372_at	C10orf54	染色体 10 読取り枠 54	9.3e-05	39.4	20.8	1.89
232922_s_at	C20orf59	染色体 20 読取り枠 59	9.3e-05	55.1	33.9	1.63
203175_at	RHOG	ras ホモログ遺伝子群、メンバーG (rho G)	9.7e-05	385.2	181.5	2.12
219282_s_at	TRPV2	一過性レセプター電位カチオンチャネル、亜科 V、メンバー2	9.6e-05	92	35.8	2.57
222010_at	TCP1	t-複合体 1	9.7e-05	67.9	166.8	0.41
227156_at	TNRC8	トリヌクレオチド繰返し含有 8	9.7e-05	30.5	117.2	0.26
221246_x_at	TNS1	テンシン 1	9.9e-05	253.4	138.5	1.83
224677_x_at	C11orf31	染色体 11 読取り枠 31	9.9e-05	452.7	742.4	0.61

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

表 1						
肺転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肺転移	無肺転移	
204751_x_at	DSC2	デスモコリン 2	p < 0.000001	249.1	30.4	8.19
235651_at			p < 0.000001	158.3	16.4	9.65
223861_at	HORMAD1	HORMA ドメイン含有 1	2.00E-06	219.7	10.2	21.54
228171_s_at	PLEKHG4	プレクストリン 相同ドメイン含有群 G (RhoGef ドメイン含む)メンバー4	2.00E-06	109.5	40.5	2.70
228577_x_at	ODF2L	精子尾部外部緻密線維 2 様	8.00E-06	44.3	15.3	2.90
220941_s_at	C21orf91	染色体 21 読取り枠 91	1.00E-05	96.2	26.7	3.60
227642_at	TFCP2L1	転写因子 CP2 様 1	1.00E-05	278.2	50.6	5.50
229523_at	TTMA	二膜貫通ドメイン群メンバーA	1.30E-05	73.6	20.1	3.66
219867_at	CHODL	コンドロレクチン	1.40E-05	49.2	17.3	2.84
205428_s_at	CALB2	カルビンジン 2、29kDa (カルレチニン)	1.60E-05	327.4	35.6	9.20
228956_at	UGT8	UDP グリコシルトランスフェラーゼ 8 (UDP - ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ)	1.80E-05	191.1	12.4	15.41
227452_at	LOC146795	推定タンパク質 LOC146795	1.80E-05	139.4	25.8	5.40
155426_at	C1orf210	染色体 1 読取り枠 210	2.10E-05	45.4	19.9	2.28
221705_s_at	SIKE	IKK エプシロンサブプレッサー	2.10E-05	30.6	16.5	1.85
211488_s_at	ITGB8	インテグリン、ベータ 8	2.60E-05	25.5	14.7	1.73

10

【 0 1 5 5 】

表 1						
肺転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肺転移	無肺転移	
213372_at	PAQR3	プログステレンおよび脂肪 Q レセプター群メンバーIII	2.90E-05	322.5	57.2	5.64
208103_s_at	ANP32E	酸性(ロイシンリッチ)核リンタンパク質 32 群、メンバーE	3.20E-05	333.7	55.7	5.99
60474_at	KIND1	染色体 20 読取り枠 42	3.60E-05	113.3	16.5	6.87
222869_s_at	ELAC1	elaC ホモログ 1 (大腸菌)	3.60E-05	38	23.3	1.63
227829_at	GYLTL1B	グリコシルトランスフェラーゼ様 1B	3.90E-05	187.1	70.9	2.64
231033_at		全長挿入 cDNA クローン YI40A07	3.90E-05	71.9	16.6	4.33
226075_at	SPSB1	sp1A/リアノジンレセプタードメインおよび SOCS ボックス含有 1	5.60E-05	92.3	31.9	2.89
214596_at	CHRM3	コリン作動性レセプター、ムスカリン系 3	6.10E-05	38	18.8	2.02
225363_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌において突然変異させた)	6.20E-05	235.3	569.9	0.41
242488_at		CDNA FLJ38396 fis、クローン FEBRA2007957	6.20E-5	60.2	19	3.17
213889_at	PIGL	ホスファチジルイノシトールグリカン、群 L	6.60E-05	37.9	21.2	1.79
1553705_a_at	CHRM3	コリン作動性レセプター、ムスカリン系 3	7.00E-05	30.8	16.7	1.84
203256_at	CDH3	カドヘリン 3、1 型、P-カドヘリン(胎盤)	9.50E-05	252.2	41.4	6.09

20

【 0 1 5 6 】

表 1						
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
239847_at		CDNA クローン IMAGE : 6186815	p < 0.000001	107	24.7	4.33
219682_s_at	TBX3	T - ボックス 3 (尺骨乳房症候群)	p < 0.000001	515.5	45.4	11.35
225544_at	TBX3	T - ボックス 3 (尺骨乳房症候群)	p < 0.000001	345.6	57.2	6.04
229053_at	SYT17	シナプトタグミン XVII	p < 0.000001	142.6	17.9	7.97
221823_at	LOC90355	AF038182 によって支持された推定遺伝子 ; BC009203	p < 0.000001	420.5	91.6	4.59
221008_s_at	AGXT2L1	アラニン - グリオキシルートアミノトランスフェラーゼ 2 様 1	0.000001	30.6	8.3	3.69
1557415_s_at	LETM2	ロイシンジッパー - EF - ハンド含有膜貫通タンパク質 2	0.000001	27.1	14.5	1.87
1558881_at	LOC145820	推定タンパク質 LOC145820	0.000001	25.7	14.6	1.76
228718_at	ZNF44	亜鉛フィンガータンパク質 44	0.000002	48.9	16.7	2.93
219115_s_at	IL20RA	インターロイキン 20 レセプター、アルファ	0.000002	63	15.8	3.99
226344_at	ZMAT1	亜鉛フィンガー、マトリン(matrin)タイプ 1	0.000003	144	36.6	3.93
214156_at	MYRIP	ミオシン VIIA および Rab 相互作用性タンパク質	0.000003	37	12	3.08
218173_s_at	WHSC1L1	WolfHirschhorn 症候群候補物 1 様 1	0.000003	80.5	21.5	3.74
225561_at	SELT	セレンタンパク質 T	0.000003	436.3	107.6	4.05
238496_at	WHSC1L1	WolfHirschhorn 症候群候補物 1 様 1	0.000003	135.3	37.6	3.60
209710_at	GATA2	GATA 結合タンパク質 2	0.000003	367.9	80.5	4.57
239638_at		CDNA FLJ33227 fis、クローン ASTRO2001088	0.000004	44	17.6	2.50

30

40

【 0 1 5 7 】

表 1						
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
207988_s_at	ARPC2	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 2、34kDa	0.000005	600	1062.5	0.56
225915_at	CAB39L	カルシウム結合タンパク質 39 様	0.000006	130.3	23.3	5.59
217691_x_at	SLC16A3	溶質担体群 16 (モノカルボン酸トランスポーター)、メンバー3	0.000006	66.9	145.6	0.46
235675_at	DHFR1L1	ジヒドロフォレートレダクターゼ様 1	0.000007	76.5	18.9	4.05
229908_s_at		CDNA : FLJ21189 fs、クローン CAS11887	0.000007	142.6	77.9	1.83
1556308_at	PRRT3	プロリンリッチ膜貫通タンパク質 3	0.000007	173.4	44.7	3.88
242981_at	CYP3A5	シトクロム P450、群 3、亜科 A、ポリペプチド 5	0.000007	57	29	1.97
204635_at	RPS6KA5	リボソームタンパク質 S6 キナーゼ、90kDa、ポリペプチド 5	0.000008	145	52.7	2.75
227091_at	KIAA1505	KIAA1505 タンパク質	0.000008	91.8	36.7	2.50
239859_x_at	ATP5S	ATP シンターゼ、H+輸送性、ミトコンドリア F0 複合体、サブユニット s (因子 B)	0.000008	42.4	24.5	1.73
1555982_at	ZFYVE16	亜鉛フィンガー、FYVE ドメイン含有 16	0.000009	77.4	19.5	3.97
213118_at	KIAA0701	KIAA0701 タンパク質	0.000009	165.6	59.4	2.79
230570_at		転写座	0.000009	95.4	22.8	4.18
236117_at		転写座	0.000009	49.6	19.5	2.54
237083_at		転写座	0.000009	26.6	11.3	2.35
210825_s_at	PEBP1	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 1	0.00001	4026.3	1903.1	2.12

10

【 0 1 5 8 】

表 1						
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
238719_at		転写座	0.00001	92.6	48.8	1.90
225318_at	DDHD2	DDHD ドメイン含有 2	0.000012	489.1	139.8	3.50
212637_s_at	WWP1	WW ドメイン含有 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ 1	0.000012	291.8	45	6.48
229602_at		転写座	0.000013	45.3	21.1	2.15
222312_s_at		CDNA クローン IMAGE : 6186815	0.000014	143.7	53.3	2.70
1555827_at	CCNL1	サイクリン L1	0.000014	33	15.7	2.10
226766_at	ROBO2	迂回性軸索誘導受容体、ホモログ 2 (ショウジョウバエ)	0.000015	27.8	10.1	2.75
244749_at	FAM111B	配列類似性を有する群 111、メンバーB	0.000015	34.5	13.3	2.59
212209_at	THRAP2	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質 2	0.000017	391.1	157.1	2.49
204349_at	CRSP9	Sp1 転写活性化に必要な補因子、サブユニット 9、33kDa	0.000017	119.4	61.5	1.94
217191_x_at			0.000019	50.4	23.6	2.14
227582_at	KARCA1	kelch/アンキリン繰返し含有サイクリン A1 相互作用性タンパク質	0.00002	305.1	81.6	3.74
231069_at		転写座	0.00002	76	18.3	4.15
202856_s_at	SLC16A3	溶質担体群 16 (モノカルボン酸トランスポーター)、メンバー3	0.000021	39.1	244.6	0.16
224076_s_at	WHSC1L1	Wolf Hirschhorn 症候群候補者 1 様 1	0.000022	293.1	84.4	3.47

20

30

【 0 1 5 9 】

表 1						
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
230141_at	ARID4A	AT リッチ相互作用性ドメイン 4A (RBP1 様)	0.000024	59.2	25.3	2.34
204045_at	TCEAL1	転写伸張因子 A (SID)様 1	0.000025	638.9	179.6	3.56
212425_at	SCAMP1	分泌性担体膜タンパク質 1	0.000025	72.9	31.5	2.31
242366_at	KIAA0701	KIAA0701 タンパク質	0.000025	127.8	52.6	2.43
213757_at	EIF5A	真核生物翻訳開始因子 5A	0.000027	194.8	467.4	0.42
228039_at	DDX46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド 46	0.000027	205.3	82.2	2.50
205420_at	PEX7	ペルオキシソーム生合成因子 7	0.000031	101.9	34.3	2.97
204633_s_at	RPS6KA5	リボソームタンパク質 S6 キナーゼ、90kDa、ポリペプチド 5	0.000032	252.3	88.5	2.85
225606_at	BCL2L11	BCL2 様 11 (アポトーシス促進剤)	0.000032	399.4	187.5	2.13
208628_s_at	YBX1	Y ボックス結合タンパク質 1	0.000033	849.7	2307.6	0.37
239437_at		転写座	0.000033	66.6	22.6	2.95
208760_at	UBE2I	ユビキチン結合酵素 E2I (UBC9 ホモログ、酵母)	0.000034	275.1	97.5	2.82
223989_s_at	REXO2	REX2、RNA エクソヌクレアーゼ 2 ホモログ (S. セレヴィシエ)	0.000034	60.4	95	0.64
225557_at	AXUD1	AXIN1 上方調節性 1	0.000035	159.4	74	2.15
1563189_at		CDNA : FLJ20907fs、クローン ADSE00408	0.000036	38.4	17.5	2.19
223126_s_at	C1orf21	染色体 1 読取り枠 21	0.000036	226.4	63	3.59
1553719_s_at	ZNPF548	亜鉛フィンガータンパク質 548	0.000037	45.9	17.7	2.59

40

【 0 1 6 0 】

		表 1				
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
227641_s_at	FBXL16	F ボックスおよびロイシンリッチ繰返しタンパク質 16	0.000038	524.3	92.9	5.64
1558345_a_at	LOC439911	NM_194304 に支持された推定遺伝子	0.000039	93.4	32.3	2.89
1563629_a_at	LOC283874	推定タンパク質 LOC283874	0.000041	72.7	34.5	2.11
231820_x_at	ZNF587	亜鉛フィンガータンパク質 587	0.000041	57.2	22.5	2.54
218692_at	FLJ20366	推定タンパク質 FLJ20366	0.000042	407.2	59.3	6.87
235048_at	KIAA0888	KIAA0888 タンパク質	0.000044	99.8	24.9	4.01
1555848_at		MRNA 全長挿入 cDNA クローン EUROI MA GE1652049	0.000045	87.2	50.6	1.72
228189_at	BAG4	BCL2 関連アタノ遺伝子 4	0.000046	648.4	138.6	4.68
200757_s_at	CALU	カルメニン	0.000049	264.5	444.8	0.59
228768_at	KIAA1961	KIAA1961 遺伝子	0.000052	312.1	142.2	2.19
227572_at	USP30	ユビキチン特異性ペプチダーゼ 30	0.000054	237.6	115.1	2.06
237086_at			0.000055	168.6	18.9	8.92
204622_x_at	NR4A2	核内受容体亜科 4、群 A、メンバー2	0.000056	192.4	38.1	5.05
204667_at	FOXA1	フォークヘッドボックス A1	0.000055	431.6	41.9	10.3
231472_at	FBXO15	F ボックスタンパク質 15	0.000055	79.2	31.6	2.51
229158_at	WNK4	WNK リシン欠乏タンパク質キナーゼ 4	0.00006	80.1	22.8	3.51
1558279_a_at		CDNA FLJ36555fs、 クローン TRACH2008716	0.000061	27.7	12.2	2.27
201253_s_at	CDIPT	CDP - ジアシルグリセロール - イノシトール 3 - ホスファチジルトランスフェラーゼ (ホスファチジルイノシトールシンターゼ)	0.000061	1517.7	776.4	1.95

10

20

30

40

【 0 1 6 1 】

		表 1				
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
214053_at		クローン 23736mRNA 配列	0.000061	198.4	26	7.63
228328_at		CDNA FLJ33653fs、 クローン BRAMY2024715	0.000061	138	53.4	2.58
224477_s_at	NUDT16L1	nudix (ヌクレオシドニリン酸塩結合成分 X) タイモチープ 16 様 1	0.000063	144.7	73.2	1.98
225223_at	SMAD5	SMAD、DPP ホモログ 5 に対する母体 (ショウジョウバエ)	0.000063	276.3	103.4	2.67
237706_at	STXBP4	シタキシン結合タンパク質 4	0.000063	27.1	10.8	2.51
1556666_a_at	TTC6	テトラトリコペプチド繰返しドメイン 6	0.000064	50.3	10.5	4.79
242140_at	LOC113386	外膜タンパク質に類似する	0.000066	350.7	73.2	4.79
1556665_at	TTC6	テトラトリコペプチド繰返しドメイン 6	0.000068	44.3	17.5	2.53
1560648_s_at	TSPYL1	TSPY 様 1	0.000068	27.5	12.5	2.20
229069_s_at	CIP29	サイトカイン誘導タンパク質 29kDa	0.000069	81	43	1.88
204024_at	C8orf1	染色体 8 読取り枠 1	0.000071	54.1	19	2.85
221248_s_at	WHSC1L1	Wolf Hirschhorn 症候群候補物 1 様 1	0.000073	30.4	17.3	1.76
227332_at		ヒトの神経芽細胞腫 Cot 50 標準化の全長 cDNA クローン CS0DD005YE10 (ヒト)	0.000074	52.8	24.8	2.13
238005_s_at		転写座	0.000074	115.6	49	2.36

【 0 1 6 2 】

		表 1				
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
242245_at	SYDE2	シナプス欠乏性 1、Rho GTP アーゼ、ホモログ 2 (シーエレガンス)	0.000075	133.2	22.2	6.00
239024_at	SLC12A8	溶質担体群 12 (カリウム/クロライドトランスポーター)、メンバー8	0.000077	68.2	27.3	2.50
223605_at	SLC25A18	溶質担体群 25 (ミトコンドリア担体)、メンバー18	0.000079	39.7	17	2.34
229167_at		ヒトの胎児脳の全長 cDNA クローン CS0DF014YA22 (ヒト)	0.000079	94.8	51.2	1.85
202992_at	C7	補体成分 7	0.000086	365.4	46.7	7.82
204226_at	STAU2	スタウフェン、RNA 結合タンパク質、ホモログ 2 (ショウジョウバエ)	0.000085	404.1	110.7	3.65
240557_at	TSC22D2	TSC22 ドメイン群、メンバー2	0.000086	40.7	19.8	2.06
204121_at	GADD45G	増殖停止および DNA 損傷誘発性、ガンマ	0.000087	81.3	37.1	2.19
217954_s_at	PHF3	PHD フィンガータンパク質 3	0.000087	476.1	251	1.90
239329_at		転写座	0.000088	78.3	35.3	2.22
222820_at	TNRC6C	トリヌクレオチド繰返し含有 6C	0.000089	219.1	54.3	4.03
227279_at	TCEAL3	転写伸張因子 A (SID) 様 3	0.000089	848.7	306.3	2.77
242139_s_at	LOC113386	エンペローブタンパク質に類似	0.000092	366.7	98.8	3.71
222204_s_at	RRN3	RRN3 RNA ポリメラーゼ I 転写因子ホモログ (S. セレヴィシエ)	0.000097	340.4	125.2	2.72
224876_at	C5orf24	染色体 5 読取り枠 24	0.000097	870.5	444.3	1.96

【 0 1 6 3 】

		表 1				
肝転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				肝転移	無肝転移	
226115_at	AHCTF1	AT フック含有転写因子 1	0.000097	218	81.1	2.69
233198_at	LOC92497	推定タンパク質 LOC92497	0.000099	159.4	57.4	2.78

【 0 1 6 4 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
1559822_s_at	LOC644215	推定タンパク質 LOC644215	p < 0.000001	321.4	111.7	2.88
212384_at	BAT1	HLA-B 関連転写物 1	p < 0.000001	37.5	16.7	2.25
236946_at	GPR75	G タンパク質結合レセプター75	p < 0.000001	36.4	19	1.92
213483_at	PPWD1	ペプチジルプロリルイソメラーゼドメインおよび WD 繰返し含有 1	p < 0.000001	34.8	110.9	0.31
217631_at			p < 0.000001	29.6	15.2	1.95
210141_s_at	INHA	インヒビリン、アルファ	p < 0.000001	27.1	17.4	1.56
235596_at		転写座	p < 0.000001	40.8	23.3	1.75
203131_at	PDGFRA	血小板由来増殖因子受容体、アルファポリペプチド	p < 0.000001	23.1	378.2	0.06
226100_at	MLL5	脊髄/リンパまたは混合系白血病 5 (トリソラクタスホモログ、ショウジョウバエ)	p < 0.000001	36.8	110.5	0.33
231457_at		転写座、変種 420 ホモログ 2(ヒト)の NP_116090.2 サプレッサーに強く類似	1.00E-06	53.4	35	1.53
200926_at	RPS23	リボソームタンパク質 S23	1.00E-06	5022.1	8620.6	0.58
224694_at	ANTXR1	炭疽菌毒素レセプター1	1.00E-06	63.5	464.8	0.14
235984_at			2.00E-06	71.9	27.1	2.65
224797_at	ARRDC3	アレシチンドメイン含有 3	2.00E-06	35.4	205.6	0.17
239121_at	PTK2	PTK2 タンパク質チロシンキナーゼ 2	2.00E-06	32.4	20.1	1.61
244804_at	SQSTM1	シークエストロソーム 1	3.00E-06	98.1	38.8	2.53
207761_s_at	METTL7A	メチルトランスフェラーゼ様 7A	3.00E-06	149.8	1011.8	0.15

【 0 1 6 5 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
223408_s_at			4.00E-06	56.2	29.7	1.89
235410_at	NPHP3	ネフロン癆3 (青年期)	4.00E-06	28.5	123	0.23
214154_s_at	PKP2	プラコフィリン 2	4.00E-06	38.2	25.4	1.50
236210_at	DDX31	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド 31	5.00E-06	51.9	23.6	2.20
225572_at	FAM119A	配列類似性を有する群 119、メンバーA	5.00E-06	80.4	151	0.53
1558154_at	LLGL2	致死性ジャイアント ラルバ(giant larvae)ホモログ 2 (ショウジョウバエ)	5.00E-06	35.6	18.4	1.93
221780_s_at	DDX27	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド 27	6.00E-06	402.7	159.8	2.52
226839_at	TRA16	TR4 オーファンレセプター関連タンパク質 TRA16	6.00E-06	187.1	78.4	2.39
209844_at	HOXB13	ホモオボックス B13	6.00E-06	45.7	25.2	1.81
229274_at	GNAS	GNAS 複合座	6.00E-06	34	15.1	2.25
220072_at	CSPP1	中心体および紡錘体極関連タンパク質 1	7.00E-06	40.1	22.5	1.78
226237_at	COL8A1	コラーゲン、VIII 型、アルファ 1	8.00E-06	24.7	368.2	0.07
220965_s_at	RSHL1	ラジアルスボークヘッド様 1	9.00E-06	76.4	46.7	1.64
213865_at	DCBLD2	ジスコイジン、CUB および LCCL ドメイン含有 2	9.00E-06	27.7	14.6	1.90
212106_at	UBXD8	UBX ドメイン含有 8	9.00E-06	175.9	76.7	2.29
205224_at	SURF2	スルフェイト(surfeit) 2	1.00E-05	95.2	55.7	1.71
225945_at	ZNF655	亜鉛フィンガータンパク質 655	1.00E-05	54.6	351.2	0.16

【 0 1 6 6 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
206103_at	RAC3	ras - 関連 C3 ボツリヌス毒素担体 3 (rho 群、小 GTP 結合タンパク質 Rac3)	1.00E-05	33	17.5	1.89
209837_at	AP4M1	アダプター - 関連タンパク質複合体 4、mu1 サブユニット	1.1e-05	36.4	23.4	1.56
213069_at	HEG1	HEG ホモログ 1 (ゼブラフィッシュ)	1.1e-05	61.3	273.5	0.22
229467_at	PCBP2	ポリ(rC)結合タンパク質 2	1.1e-05	149.8	57.2	2.62
235432_at	NPHP3	ネフロン癆3 (青年期)	1.2e-05	13.5	36.6	0.37
239596_at	SLC30A7	溶質担体群 30 (亜鉛トランスポーター)、メンバー7	1.3e-05	34.1	17.9	1.91
233091_at	ATAD3A / ATAD3B	ATP アーゼ群、AAA ドメイン含有 3A/ATP アーゼ群、AAA ドメイン含有 3B	1.4e-05	45.2	29.5	1.53
216546_s_at	CHI3L1	キチナーゼ 3 様 1 (軟骨糖タンパク質 - 39)	1.4e-05	38.4	24.8	1.55
1565666_s_at	MUC6	ムチン 6、オリゴマー粘液/ゲル形成性	1.5e-05	107	13.4	7.99
210719_s_at	HMG20B	高移動性群 20B	1.5e-05	674	127.9	5.27
203796_s_at	BCL7A	B 細胞 CLL/リンパ腫 7A	1.6e-05	72.2	35.6	2.03
244305_at	GGN	ゲマトゲネチン(gametogenetin)	1.5e-05	49.8	30.1	1.65
241668_s_at			1.6e-05	30.8	17.7	1.74
218501_at	ARHGEF3	Rho G アニンスクレオチド交換因子(GEF)3	1.7e-05	75.8	283.5	0.27
200897_s_at	PALLD	パラジン、細胞骨格関連タンパク質	1.8e-05	247.4	998.9	0.25

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
208900_s_at	TOP1	トポイソメラーゼ(DNAI)	1.8e-05	104,4	30,1	3,47
208823_s_at	PCTK1	PCTAIRE タンパク質キナーゼ 1	1.9e-05	192,7	105,8	1,82
234654_at	C20orf4	染色体 20 読取り枠 4	2.00E-05	27,6	17,5	1,58
213376_at	ZBTB1	亜鉛フィンガーおよび BTB ドメイン含有 1	2,00E-05	42,7	143,4	0,30
229699_at		CDNA FLJ45384f5、 クロール BRHIP3021987	2.1e-05	25,9	75,5	0,34
240148_at	MSH6	mutS ホモログ 6 (大腸菌)	2,00E-05	27,7	16,5	1,68
239957_at	SETD5	SET ドメイン含有 5	2.1e-05	45,6	18,6	2,45
1555778_a_at	POSTN	ペリオスチン、骨芽細胞特異性因子	2.2e-05	16,7	495,4	0,03
206141_at	MOC53	モリブデン補因子合成 3	2.1e-05	71,4	38	1,88
227428_at	GABPA	GA 結合タンパク質転写因子、アルファサブ ユニット 60kDa	2.2e-05	21	39,1	0,54
223607_x_at	ZSWIM1	亜鉛フィンガー、SWIM タイプ含有 1	2.3e-05	130	82,9	1,57
219050_s_at	ZNHIT2	亜鉛フィンガー、HIT タイプ 2	2.40e-05	83,5	50,5	1,65
236700_at	LOC653352	真核生物翻訳開始因子 3 に類似する、サブユ ニット 8	2.3e-05	28,5	12,4	2,30

10

【 0 1 6 8 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
204095_s_at	ELL	伸張因子 RNA ポリメラーゼ II	2.4e-05	67,9	38,2	1,78
217817_at	ARPC4	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユ ニット 4,20kDa	2.4e-05	650,6	194	3,35
215887_at	ZNF277	亜鉛フィンガータンパク質 277	2.4e-05	116,6	61	1,91
205537_s_at	VAV2	vav2 腫瘍遺伝子	2.5e-05	43,9	27,5	1,60
210110_x_at	HNRPH3	不均質核リボヌクレオタンパク質H3(2H9)	2.6e-05	68,1	157,2	0,43
206230_at	LHX1	LIM ホモボックス 1	2.6e-05	52,4	25,8	2,03
238741_at	FAM83A	配列類似性を有する群 83、メンバーA	2.9e-05	85,3	42,2	2,02
242970_at	DIP2B	DIP2 ディスコ相互作用性タンパク質 2 ホモ ログ B (ショウジョウバエ)	2.9e-05	35,6	19,9	1,79
215089_s_at	RBM10	RNA 結合モチーフタンパク質 10	3.1e-05	284,5	160,7	1,77
212088_at	PMPCA	ペプチダーゼ(ミトコンドリア処理性) アルフ ア	3.0e-05	221,1	127,4	1,74
225877_at	TYSND1	トリプシンドメイン含有 1	3.1e-05	92,7	37,4	2,48
237257_at	RAB4B	RAB4B、メンバー-RAS 腫瘍遺伝子群	3.4e-05	135,8	77	1,76

20

【 0 1 6 9 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
224822_at	DLC1	肝癌中欠損 1	3.4e-05	46,7	133	0,35
227433_at	KIAA2018	KIAA2018	3.4e-05	43	146,6	0,29
244870_at	TES	睾丸由来転写体(3LIM ドメイン)	3.5e-05	35	22,8	1,54
226157_at	TFDP2	転写因子 Dp - 2 (E2F 二量化パートナー2)	3.7e-05	40,5	105,1	0,39
224023_s_at	C3orf10	染色体 3 読取り枠 10	3.7e-05	59,8	31,7	1,89
225512_at	ZBTB38	亜鉛フィンガーおよび BTB ドメイン含有 38	3.9e-05	62,9	257,4	0,24
238738_at	PSMD7	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、7 (Mov34 ホモログ)	3.9e-05	49,9	29,4	1,70
205407_at	RECK	kazal モチーフを有する逆転誘導性システイ ンリッチタンパク質	4.1e-05	10,6	43,6	0,24
221763_at	JMJD1C	jumonji ドメイン含有 1C	4.1e-05	77,7	234,7	0,33
229439_s_at	FLJ20273	RNA - 結合タンパク質	4.1e-05	111,6	66,3	1,68
212437_at	CENPB	動原体タンパク質 B、80kDa	4.3e-05	203,4	117,7	1,73
244374_at	PLAC2	プラセンタ特異性 2	4.3e-05	59,1	39,4	1,50
212179_at	C6orf111	染色体 6 読取り枠 111	4.4e-05	92,3	287,6	0,32
213238_at	ATP10D	ATP アーゼ、群 V、タイプ 10D	4.4e-05	25,9	94,9	0,27
223886_s_at	RNF146	リングフィンガータンパク質 146	4.7e-05	108,8	295,9	0,37
230557_at	XRRA1	エクソ線照射耐性関連 1	4.8e-05	33,9	20,2	1,68

30

【 0 1 7 0 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
205460_at	NPAS2	ニューロン PAS ドメインタンパク質 2	5.1e-05	31.8	18.6	1.71
223954_x_at	APBA2BP	アミロイドベータ(A4)プレカーサータンパク質結合性群 A、メンバー2 結合性タンパク質	5.3e-05	126.6	62.8	2.02
224715_at	WDR34	WD 繰返しドメイン 34	5.3e-05	383.8	130.3	2.95
206875_s_at	SLK	STE20 様キナーゼ(酵母)	5.4e-05	104.1	314.6	0.33
242935_at	SBF2	SET 結合因子 2	5.4e-05	42.5	27.1	1.57
210588_x_at	HNRPH3	不均質核リボスクレオタンパク質 H3 (2H9)	5.4e-05	141.1	311.8	0.45
201086_x_at	SON	SON DNA 結合タンパク質	5.8e-05	318.9	689.4	0.46
213000_at	MORC3	MORC 群 CW タイプ亜鉛フィンガー3	5.7e-05	48.6	119.1	0.41
209285_s_at	C3orf83	染色体 3 読取り枠 63	5.9e-05	31.9	87.3	0.37
213891_s_at		CDNA FLJ37747fs、クロニン BRHIP2022986	5.8e-05	100	435.7	0.23
225898_at	WDR54	WD 繰返しドメイン 54	5.9e-05	322	131.1	2.46
212632_at	STX7	シタキシン 7	6.1e-05	72.6	173.3	0.42
225050_at	ZNF512	亜鉛フィンガータンパク質 512	6.00E-05	48.5	130.1	0.37
213233_s_at	KLHL9	kelch 様 9 (ショウジョウバエ)	6.2e-05	135.5	428.4	0.32
1556316_s_at	LOC284889	推定タンパク質 LOC284889	6.4e-05	122.2	34.1	3.58
211603_s_at	ETV4	ets 変異体遺伝子 4 (E1A エンハンサー結合タンパク質、E1AF)	6.5e-05	116.2	61	1.90
213297_at	RMND5B	減数核分裂 5 ホモログ B において必要 (S、セレヴィシエ)	6.6e-05	81.5	49.8	1.64

【 0 1 7 1 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
218694_at	ARMCX1	アルマジロ繰返し含有、X - 結合型 1	6.6e-05	35.1	234.3	0.15
227281_at	SLC29A4	溶質担体群 29 (ヌクレオシドトランスポーター)、メンバー4	6.7e-05	83.6	46.3	1.81
1555788_a_at	TRIB3	tribbles ホモログ 3 (ショウジョウバエ)	7.3e-05	49.8	20.3	2.45
206076_at	LRRC23	ロイシンリッチ繰返し含有 23	7.4e-05	54.4	28.3	1.92
209383_at	DDIT3	DNA 損傷誘発性転写体 3	7.4e-05	470	182.4	2.58
225730_s_at	THUMPDB	THUMP ドメイン含有 3	7.5e-05	70	29.7	2.36
241478_at	MICAL1L2	MICAL 様 2	7.4e-05	102	64.6	1.58
208676_s_at	PA2G4	増殖関連 2G4、38kDa	7.5e-05	650.8	267.7	2.43
241402_at	TSEN54	tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼ 54 ホモログ (S、セレヴィシエ)	7.6e-05	72.7	47.1	1.54
208117_s_at	LAS1L	LAS1 様 (S、セレヴィシエ)	7.8e-05	312.5	190	1.64
218061_at	MEA1	雄増殖抗原 1	7.8e-05	1100.1	583.2	1.89
218370_s_at	S100BPB	S100P 結合タンパク質	7.8e-05	56.7	118.6	0.48
204413_at	TRAF2	TNF レセプター関連因子 2	7.9e-05	81	51.4	1.58
228307_at	EMILIN3	エラスチン微小繊維インターフェイス-3	8.2e-05	58.8	31.2	1.88
228334_x_at	KIAA1712	KIAA1712	8.1e-05	30.3	92.6	0.33
208880_s_at	PRPF6	PRPF6 前駆 mRNA 処理因子 6 ホモログ (S、セレヴィシエ)	8.6e-05	429.3	156.1	2.75
212615_at	CHD9	クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 9	8.5e-05	56.9	185.4	0.31

【 0 1 7 2 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	
201643_x_at	JMJD1B	jumonji ドメイン含有 1B	9.00E-05	160.1	298.1	0.54
236781_at	ANKS1A	アンキリン繰返しおよび無菌アルファモチーフドメイン含有 1A	9.00E-05	35.9	22.4	1.60
205166_at	CAPN5	カルパイン 5	9.1e-05	27.1	16.3	1.66
225838_at	EPC2	ポリコーンホモログエンハンサー2 (ショウジョウバエ)	9.1e-05	71.1	194.1	0.37
1553778_at	WBSR27	Williams Beuren 症候群染色体領域 27	9.5e-05	67.4	42.3	1.59
217200_x_at	CYB561	シトクロム b - 561	9.6e-05	416.8	191.8	2.17
206124_s_at	LLGL1	致死性ジャイアントラルバホモログ 1 (ショウジョウバエ)	9.8e-05	45.1	28.5	1.58
232264_at	EDD1	E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ、HECT ドメイン含有、1	9.9e-05	98	31.8	3.08
241743_at			9.8e-05	39.6	24.2	1.64

【 0 1 7 3 】

		表 1				
脳転移関連マーカー						
プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	パラメーターp 値	幾何平均強度		比率
				脳転移	無脳転移	

臓器特異性再発	プローブセット	遺伝子記号	表 2	パラメーターp 値	比率	遺伝子オントロジー 生物学的過程および経路
			摘要			
骨	221724_s_at	CLEC4A	C タイプレクチンドメイン群 4、メンバーA	p < 1e-07	2,45	免疫応答
	204153_s_at	MFNG	マニックフリンジ(manic fringe)ホモログ (ショウジョウバエ)	p < 1e-07	2,69	Notch シグナル伝達経路
	208922_s_at	NXF1	核 RNA 輸送因子 1	p < 1e-07	1,61	mRNA プロセッシング
	227002_at	FAM78A	配列類似性を有する群 78、メンバーA	p < 1e-07	2,43	
	226245_at	KCTD1	カリウムチャネル四量体化ドメイン含有 1	1,00E-07	0,30	カリウムイオン輸送
	227372_s_at	BAIAP2L1	BAI1 - 関連タンパク質 2 様 1	1,00E-07	0,10	
	206060_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ 22 (リンパ系)	1,00E-07	4,12	シグナル伝達
	232523_at	MEGF10	MEGF10 タンパク質	1,00E-07	10,77	
	222392_x_at	PERP	PERP、TP53 アポトーシスエフェクター	1,00E-07	0,09	アポトーシス調節
	211178_s_at	PSTPIP1	プロリン-セリン-スレオニンホスファターゼ相互作用性タンパク質 1	2,00E-07	3,01	細胞接着
	204236_at	FLI1	フレンド白血病ウイルス組込み 1	2,00E-07	4,80	転写調節
	213290_at	COL6A2	コラーゲン、タイプ VI、アルファ 2	2,00E-07	2,63	細胞外マトリックス組織化
	203547_at	CD4	CD4 抗原 (p55)	2,00E-07	2,62	免疫応答
	205382_s_at	CFD	補体因子 D (アジプシン)	2,00E-07	7,37	免疫応答
	235593_at	ZFHX1B	亜鉛フィンガー-ホモボックス 1b	2,00E-07	2,92	転写調節
	206120_at	CD33	CD33 抗原 (gp67)	3,00E-07	2,33	細胞接着
	219091_s_at	MMRN2	マルチメリン (multimerin) 2	4,00E-07	2,96	
	214181_x_at	LST1	白血球特異性転写体 1	4,00E-07	3,87	免疫応答
	1552667_a_at	SH2D3C	SH2 ドメイン含有 3C	5,00E-07	2,31	細胞内シグナル伝達カスケード
	205326_at	RAMP3	レセプター(カルシトニン)活性修飾タンパク質 3	5,00E-07	1,95	タンパク質輸送

【 0 1 7 4 】

臓器特異性再発	プローブセット	遺伝子記号	表 2	パラメーターp 値	比率	遺伝子オントロジー 生物学的過程および経路
			摘要			
肺	204751_x_at	DSC2	デスモコリン 2	p < 0,000001	8,19	細胞接着
	223861_at	HORMAD1	HORMA ドメイン含有 1	2,00E-06	21,54	
	228171_s_at	PLEKHG4	プレクストリン相同ドメイン含有群 G (RhoGef ドメイン含む)、メンバー4	2,00E-06	2,70	Rho タンパク質シグナル伝達調節
	228577_x_at	ODF2L	精子尾部外部緻密線維 2 様	8,00E-06	2,90	
	220941_s_at	C21orf91	染色体 21 読取り枠 91	1,00E-05	3,60	
	227642_at	TFCP2L1	転写因子 CP2 様 1	1,00E-05	5,50	転写調節
	219867_at	CHODL	コンドロレクチン	1,40E-05	2,84	
	205428_s_at	CALB2	カルビンジン 2、29kDa (カルレチニン)	1,60E-05	9,20	カルシウムイオン結合
	228956_at	UGT8	UDP グリコシルトランスフェラーゼ 8	1,80E-05	15,41	神経系発達
	1554246_at	C1orf210	染色体 1 読取り枠 210	2,10E-05	2,28	
	221705_s_at	SIKE	IKK エプシロンのサブレッサー	2,10E-05	1,85	
	211488_s_at	ITGB8	インテグリン、ベータ 8	2,60E-05	1,73	細胞-マトリックス接着
	213372_at	PAQR3	プログեսチンおよび脂肪 Q レセプター群メンバーIII	2,90E-05	5,64	
	208103_s_at	ANP32E	酸性(ロイシンリッチ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE	3,20E-05	5,99	シナプス形成調節
	60474_at	KIND1	キンドリン 1	3,60E-05	6,87	細胞接着
	222869_s_at	ELAC1	elaC ホモログ 1 (大腸菌)	3,60E-05	1,63	転写調節
	227829_at	GYLTL1B	グリコシルトランスフェラーゼ様 1B	3,90E-05	2,64	シナプス伝達
	226075_at	SPSB1	splA/リアノジンレセプタードメインおよび SOCS ボックス含有 1	5,60E-05	2,89	細胞内シグナル伝達カスケード
	225363_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行性癌 1 において突然変異した)	6,20E-05	0,41	細胞増殖/移動の調節

【 0 1 7 5 】

臓器特異性再発	プローブセット	遺伝子記号	表 2	パラメーターp 値	比率	遺伝子オントロジー 生物学的過程および経路
			摘要			
肝	1553705_a_at	CHRM3	コリン作動性受容体、ムスカリン性 3	7,00E-05	1,84	シグナル伝達
	219682_s_at	TBX3	T ボックス 3 (尺骨乳房症候群)	1,00E-07	11,35	転写調節
	221823_at	C5orf90	染色体 5 読取り枠 30	1,00E-06	4,59	
	221008_s_at	AGXT2L1	アラニン-グリオキシレートアミノトランスフェラーゼ 2 様 1	1,1e-06	3,69	アミノ酸代謝
	1557415_s_at	LETM2	ロイシンジッパー - EF - ハンド含有膜貫通タンパク質 2	1,2e-06	1,87	
	228718_at	ZNF44	亜鉛フィンガータンパク質 44 (KOX7)	1,9e-06	2,93	転写調節
	219115_s_at	IL20RA	インターロイキン 20 レセプター、アルファ	2,3e-06	3,99	血液凝固
	226344_at	ZMAT1	亜鉛フィンガー、マーチンタイプ 1	2,6e-06	3,93	スクレオチド生合成
	214156_at	MYRIP	ミオシン VIIA および Rab 相互作用性タンパク質	2,8e-06	3,08	細胞内タンパク質輸送
	218173_s_at	WHSC1L1	Wolf Hirschhorn 症候群候補物 1 様 1	2,9e-06	3,74	転写調節
	225561_at	SELT	セレンタンパク質 T	3,00E-06	4,05	細胞酸化還元ホメオスタシス
	209710_at	GATA2	GATA 結合タンパク質 2	3,30E-06	4,57	転写調節
	235675_at	DHFR1L1	ジヒドロフォレートレダクターゼ様 1	7,00E-06	4,05	スクレオチド生合成
	207988_s_at	ARPC2	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 2、34kDa	5,00E-06	0,56	細胞運動
	217691_x_at	SLC16A3	溶質担体群 16 (モノカルボン酸輸送因子)、メンバー3	6,00E-06	0,46	輸送
	229908_s_at	GNPTG	N - アセチルグルコサミン - 1 - ホスフェートトランスフェラーゼ、ガンマサブユニット	7,00E-06	1,83	リソソーム
	1556308_at	PRRT3	プロリンリッチ膜貫通タンパク質 3	7,00E-06	3,88	
	204635_at	RPS6KA5	リボソームタンパク質 S6 キナーゼ、90kDa、ポリペプチド 5	8,00E-06	2,75	転写調節
	227091_at	KIAA1505	KIAA1505 タンパク質	8,00E-06	2,50	
	1555982_at	ZFYVE16	亜鉛フィンガー、FYVE ドメイン含有 16	9,00E-06	3,97	エンドサイトーシス調節

【 0 1 7 6 】

10

20

30

40

臓器特異性再発	プローブセット	遺伝子記号	表 2	パラメータ p 値	比率	遺伝子オントロジー 生物学的過程および経路
			摘要			
脳	213118_at	KIAA0701	KIAA0701 タンパク質	9,00E-06	2,79	
	213483_at	PPWD1	ペプチジルプロリリンメラーゼドメインおよび WD 繰返し含有 1	4,00E-07	0,31	タンパク質折り畳み
	210141_s_at	INHA	インヒビリン、アルファ	4,00E-07	1,56	サイトカイン
	203131_at	PDGFRA	血小板由来増殖因子受容体、アルファポリペプチド	5,00E-07	0,06	シグナル伝達
	226100_at	MLL5	骨髄/リンパまたは混合系白血病 5	7,00E-07	0,33	転写調節
	200926_at	RPS23	リボソームタンパク質 S23	1,40E-06	0,58	タンパク質生合成
	224694_at	ANTXR1	炭疽菌毒素受容体 1	1,50E-06	0,14	
	224797_at	ARRDC3	アレクサンドロメイン含有 3	1,70E-06	0,17	
	207761_s_at	METTL7A	メチルトランスフェラーゼ - 様 7A	3,20E-06	0,15	
	235410_at	NPHP3	ネフロン病3 (青年期)	3,70E-06	0,23	キネシン複合体
	214154_s_at	PKP2	ブラコフィリン 2	3,90E-06	1,50	細胞接着
	221780_s_at	DDX27	DEAD (Asp・Glu・Ala・Asp)ボックスポリペプチド 27	5,60E-06	2,52	
	226839_at	TRA16	TR4 オープンレセプター関連タンパク質 TRA16	5,90E-06	2,39	シグナル伝達
	209844_at	HOBX13	ホメオボックス B13	6,40E-06	1,81	転写調節
	220072_at	CSPPI	中心体および紡錘体極関連タンパク質 1	6,50E-06	1,78	微小管構築
	220965_s_at	RSHL1	ラジアルスボクヘッド様 1	8,50E-06	1,64	鉄ホメオスタシス
	213865_at	DCBLD2	ジスコイジン、CUB および LCCL ドメイン含有 2	9,00E-06	1,90	細胞接着/創傷治癒
	212106_at	UBXD8	UBX ドメイン含有 8	9,00E-06	2,29	
	205224_at	SURF2	スルフェイト(surfeit) 2	1,00E-05	1,71	
	225945_at	ZNF655	亜鉛フィンガータンパク質 655	1,00E-05	0,16	転写調節
	206103_at	RAC3	ras 関連 C3 ボツリヌス毒素担体 3	1,00E-05	1,89	シグナル伝達

【 0 1 7 7 】

臓器 特異性 再発	遺伝子 記号	表 3			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	相対的発現の平均		比率	p-値	
		プライマー (5' -> 3')	SEQ ID NO:	前方			後方	臓器特異 性転移			他の 転移
骨	KCTD1	AAA TAC CCT GAA TCC AGA ATC CGA A	1	TGC TGT TTG AGA CTG TCC AAA ACA AT	2	0,47	0,76	0,62	0,0894		
	BAIAP2L1	AGA CCG CGG CTG CTA ACG AT	3	AGT CGG GCG GAG TTT CAC AGT	4	0,93	2,08	0,45	0,0250		
	PERP	CTG TGG TGG AAA TGC TCC CAA GA	5	GCT GCT CTA CCC CAC GCG TAC T	6	0,34	2,36	0,14	0,0018		
	CFD	ACA GCC AGC CCG ACA CCA T	7	TGG CCT TCT CCG ACA GCT GTA	8	2,03	0,22	9,18	0,0012		
	CD4	GTA CAG CTT CCC AGA AGA AGA GCA TA	9	CAT TCA GCT TGG ATG GAC CTT TAG T	10	7,82	2,09	3,74	0,0022		
	COL6A2	GAA ACA ACA ACT GCC CAG AGA AGA	11	CCG AGG TGT CCA GCA CGA A	12	1,35	1,03	1,30	0,0073		
	FLI1	CCT CAG TTA CCT CAG GGA AAG TTC A	13	GGT CGG TGT GGG AGG TTG TAT TAT	14	2,67	0,34	7,81	0,0007		
	PSTPIP1	CAA GAG TTT GAC CGG CTG ACC AT	15	CCG CAC TTC CTC GTA GAG CTC AT	16	5,02	0,84	5,95	0,0018		
	MEGF10	TGC ACG CGG CAC AGA GTC A	17	CCC GCT TTC ATA AAA TCC AGG ACA	18	19,45	0,77	25,26	0,0011		
	PTPN22	ACC ATG GAA AAT TCA ACA TCT TCA A	19	GTT TCG CAA AAT TTT CAA ACT CTT ACT	20	10,14	1,72	5,90	0,0012		
	FAM78A	AGC CAC ATG GAG TTC TAC AAC CAG T	21	AGT CGC TGA TGG CTT GGA TCT T	22	6,74	1,47	4,59	0,0022		
	NXF1	CGA CGT CAA TTC CTT CGT GGT A	23	GAA AAA CAC AGC AAT GTG CTT GTC T	24	1,53	0,66	2,31	0,0018		

【 0 1 7 8 】

臓器 特異性 再発	遺伝子 記号	表 3			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	相対的発現の平均		比率	p 値
		プライマー (5' → 3')	SEQ ID NO:	後方			臓器特異 性転移	他の 転移		
		前方								
肺	MFNG	CCA GGA CCA GGG AAC AGA CAT T	25	CGG AGC AGT TGG TGA CCA CA	26	1.88	0.62	3.04	0.0056	
	CLEC4A	CAC CAT ACA ATG AAA GTT CCA CAT TCT	27	GGG TGA TTT ACG AAA ATT TAG CAC AA	28	5.26	0.67	7.91	0.0009	
	KIND1	AAG GAA CTT GAA CAA GGA GAA CCA CT	29	GGC ACA ACT TCG CAG CCT CTA	30	4.77	1.08	4.41	0.0404	
	ELAC1	AAA GCC AAC TTA AAG CAG GGA GAA T	31	AGC CCA GGA AGG CCA AAG AA	32	0.85	0.67	1.27	0.2220	
	ANP32E	TTT TGA ACT ACT GCA GCA AAT CAC A	33	TCA TCT TCA TCG CCA TCC TCA T	34	3.84	1.69	2.28	0.0168	
	PAQR3	TCG AAG ATG GAT GGC ATT AGA TTA T	35	CAA GTA CAC CTG ACG CCA GTA GTT AT	36	4.01	1.67	2.41	0.1440	
	ITGB8	GAC TGG GCC AAG GTG AAG ACA	37	CCT CTT GAA CAC ACC ATC CAC ATT	38	1.13	0.20	5.67	0.0054	
	C1orf210	GAG GCT GAG ACT CAC TGG TGT CAT	39	CGA AGG CCC AAC AAG TGT TTT	40	1.59	0.99	1.61	0.0797	
	SIKE	CTT GCA ACA GGA AAA CAG AGA GCT A	41	CTG TTT CCG ATA TTT GCT CAT GAT AA	42	1.22	1.10	1.11	0.7500	
	UGT8	AAA GGC ATG GGG ATA TTG CTA GAA	43	CCC TCT GAC GGT AGC TGG GAT	44	3.40	0.36	9.59	0.0021	
CALB2	GAA AGG CTC TGG CAT GAT GTC AA	45	CTG CCA TCT CGA TTT TCC CAT CT	46	17.30	1.32	13.11	0.1073		
CHODL	CTG GAT AGG GCT TTG GAG GAA T	47	TTC ATC TGT GTA CCA GTT TCG GTA CT	48	3.17	0.49	6.51	0.1432		

【 0 1 7 9 】

10

20

30

40

臓器 特異性 再発	遺伝子 記号	表 3			SEQ ID NO:	相対的発現の平均		比率	p 値
		プライマー (5' → 3')	SEQ ID NO:			臓器特異 性転移	他の 転移		
		前方							
	C21orf91	AAG AAA CAC TCT CCT TCT GCC ACA T	49	ATC AGA CTT TGG TAC CCC CTC AAT	50	1,06	0,94	1,12	0,9150
	TFCP2L1	CAG TGG CTT CAC CGC AAC A	51	TTC AGC AAG TCA GCA CCT GAG A	52	2,19	0,29	7,70	0,0005
	ODF2L	CAA ACA AAG GCT TGA CCA TTT TAC A	53	GTT TCA GAC AAC TTG GCT TCC TGA T	54	1,65	1,42	1,16	10,000
	HORMAD1	CAA CAT GAA TCT GGG AGA ATA GTC CT	55	TCC TTT TTG GCA CTG ACT CTT GA	56	153,90	1,60	96,19	0,0025
	PLEKHG4	GGT CTC CGC TGT CCC CTG TA	57	GAT CTC TGA GTC CTC AGC AGT CAA A	58	0,61	0,32	1,91	0,2427
	DSC2	AAT CAA AGT TTT CAG AAG CCT GGA TA	59	CGT ACA TGT TCT CCC TCC TTG GT	60	1,48	0,43	3,41	0,0318
肝臓	GATA2	CAC GAC TAC AGC AGC GGA CTC TT	61	CAC TCC CGG CCT TCT GAA CA	62	4,25	2,62	1,62	0,0239
	SELT	CTG CTC AAG TTC CAG ATT TGT GTT T	63	ATT CTC TCC TTC AAT GCG GAT GT	64	3,00	2,40	1,25	0,0801
	WHSC1L1	TAC TAA AAG AGG AAG CCC CAG TTC A	65	CCC ACC TTG GAC CAC ACA AGA	66	1,99	0,79	2,52	0,0062
	MYRIP	CCA CGA CAA TCC TGC AGA AGA TTA T	67	TCC ACT TGC TGC TCA CTT TTG CT	68	1,21	0,81	1,51	0,1117
	ZMAT1	GCA AGG AAG TGA ACA TCA AAT TAA AGA A	69	AAT CTG CAC ACT CAT TTT GGT AAG AGT C	70	1,15	0,99	1,16	0,2267
	IL20RA	ACC TTC CTG TTT CCA TGC AAC AA	71	GTC ACA CAC TGG GAC CAC GTT CT	72	0,60	0,33	1,81	0,0563

10

【 0 1 8 0 】

臓器 特異性 再発	遺伝子 記号	表 3			SEQ ID NO:	相対的発現の平均		比率	p 値
		プライマー (5' → 3')	SEQ ID NO:	後方		臓器特異 性転移	他の 転移		
		前方							
	ZNF44	TCA GGA GAA ATC CAA GGT GTG ATG T	73	CAA TAC TAT TTC GAA TCT GGC TTA AGG TT	74	0,98	0,68	1,45	0,1433
	LETM2	GCA GAC ATT TGG AAC CAA CAA CCT	75	CCC CTT CCT TGG CAA TTA TTT CAT	76	4,69	1,45	3,24	0,0186
	AGXT2L1	CAG CAA CTC TGC CGG AGA AAC T	77	CGT TGG CTT CGG ATC CTG AAT	78	6,57	0,79	8,37	0,0091
	C5orf30	GAT GCG GAG GAC CGT GTC A	79	TCT CTT CAC CTC CTG TGC ACT TCT	80	2,10	1,71	1,23	0,0505
	TBX3	CCT CTG ATG AGT CCT CCA GTG AAC A	81	CCT CGC TGG GAC ATA AAT CTT TGA	82	2,13	0,68	3,14	0,0075
脳	PPWD1	CTGTGGGTGATGATAAGCAA TGAA	83	CAC TGTCCAGGAAAATAGCC AAGTT	84	0,44	0,92	0,48	0,0260
	PDGFRA	CAT TTA CAT CTA TGT GCC AGA CCC A	85	ATG GCA GAA TCA TCA TCC TCC AC	86	0,02	0,51	0,05	0,0030
	MLL5	CGA ATG AAT GTC CAT CCC CAG ATA	87	TCC AGG TGA ACC AGG CTT GCT	88	0,42	0,60	0,71	0,3700
	RPS23	GGA ATC GTG CTG GAA AAA GTA GGA GT	89	CCA TTC TTG ATC AGC TGG ACC CTT A	90	0,27	0,54	0,50	0,1600
	ANTXR1	ATT CCC TGA GCC GCG AAA TCT	91	CAA GGC ATC GAG TTT TCC CTT GA	92	0,21	0,84	0,24	0,0220
	ARRDC3	TGGGCACGAAAGAGATGATGA TAA	93	GAATGAGGTAGCGAGTGGT GTCTGT	94	0,20	0,49	0,40	0,0120
	METTL7A	CGA GGT GTG CAG AGT GCT GAG A	95	ATC CAG GAC TTG TTG CCA GAA GTA AT	96	0,16	0,65	0,24	0,0240

20

30

【 0 1 8 1 】

臓器 特異性 再発	遺伝子 記号	表 3		SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	相対的発現の平均		比率	p 値	
		プライマー (5' → 3')	SEQ ID NO:			後方	臓器特異 性転移			他の 転移
		前方								
	NPHP3	GCA ATG GAG AGA GCA GCA ACA	97	TTC TTT GGT CTC CCT AAA AAT CTT GA	98	0,29	0,47	0,62	0,3500	
	RSHL1	CCA CTT TCA GAA GAT GCA GAA ATC A	99	CCA GAG GTT GGA GCG CAC A	100	0,37	0,86	0,43	0,6600	
	CSPP1	ATG CAG GAA GGT GCC AAA GTT	101	CAC TAG TGT CAT CTC TGG GCA TTC T	102	0,94	1,20	0,78	0,6800	
	HOXB13	GAT GTG TTG CCA GGG AGA ACA GAA	103	GCC CGC TGG AGT CTG CAA AT	104	34,57	14,75	2,34	0,9400	
	TRA16	TGA GTT CAG TGC TGA ATC GCA ACA	105	CTG GGA GGG GCC CTG GTC T	106	2,20	1,40	1,57	0,2400	
	DDX27	CCA GTG AGA GGT CCT GCC AAG A	107	AAA GGA AGG GCT AGC TCG ATA CTG TT	108	3,82	1,87	2,04	0,0450	
	PKP2	CAC CCG AAA GAT GCT GCA TGT T	109	AGG GAG AGT TTC TTT GGC AAT TTC A	110	0,54	0,38	1,40	0,3000	
	INHA	GCC CGA GGA AGA GGA GGA TGT	111	GCC CTC TGG CAG CTG ACT TGT	112	3,06	3,08	0,99	0,3400	
TBP	TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA	113	CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA	114						

40

【 0 1 8 2 】

表 4		
骨転移関連遺伝子		
遺伝子記号	摘要	抗体例
CLEC4A	C タイプレクチンドメイン群 4、メンバーA	Novus biologicals 社 (ab15854) ; GenWay biotech 社 (15-288-21195)
MFNG	マニックフリンジ(manic fringe)ホモログ(ショウジョウバエ) (分泌性 Notch リガンド)	Abnova 社 H00004242 - M07)
NXF1	核 RNA 外輸送因子 1	scbt 社(sc - 17310、sc - 32319、sc - 25768、sc - 28377、sc - 17311)
FAM78A	配列類似性を有する群 78、メンバーA	
KCTD1	カリウムチャネル四量体化ドメイン含有 1	
BAIAP2L1	BAI1 - 関連タンパク質 2 様 1	Abnova 社 (H00055971 - M01) ; MBL int.corp 社 (M051 - 3)
PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ 22 (リンパ系)	Abnova 社 (H00026191 - M01) ; R&Dsystems 社 (MAB3428)
MEGF10	MEGF10 タンパク質	
PERP	TP53 アポトーシスエフェクター	Novus biologicals 社 (NB 500 - 231) ; Sigma-Aldrich 社 (P5243) ; Research diagnostics 社 (RDI-ALS24284) ; GenWay biotech 社 (18-661-15116)
PSTPIP1	ブロリン - セリン - スレオニンホスファターゼ相互作用性タンパク質 1	Abnova 社 (H00009051 - M01)
骨機能関連遺伝子		
MMP9	マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (ゼラチナーゼ B、92kDa ゼラチナーゼ、92kDaIV 型コラゲナーゼ)	NeoMarkers 社 (RB-1539)
IBSP	インテグリン結合シアロタンパク質 (骨シアロタンパク質、骨シアロタンパク質 II)	Usbiological 社 (S1013-34B)
OMD	オステオモジュリン	Abnova 社 (H00004958-A01)
COMP	軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質	AbCam 社 (ab11056)
MEPE	マトリックス、ASARM モチーフを有する細胞外ホスホ糖タンパク質 (骨)	R&Dsystems 社 (AF3140)

10

【 0 1 8 3 】

表 4		
肺転移関連遺伝子(最高格付け遺伝子)		
遺伝子記号	摘要	抗体例
DSC2	デスモリン 2	scbt 社 (sc-34308、sc-34311、sc-34312) ; Progen Biotechnik 社 (GP542、610120) ; Research diagnostics 社 (RDI-PRO610120、RDI-PROGP542) ; UsBiological 社 (D3221-50)
HORMAD1	HORMA ドメイン含有 1	Abnova 社 (H00084072-M01)
PLEKHG4	プレクストリン相同ドメイン含有、群 G(RhoGef ドメインを有する)、メンバー4	
ODF2L	精子尾部外部緻密線維 2 様	
C21orf91	染色体 21 読取り枠 91	
TFCP2L1	転写因子 CP2 様 1	Abcam 社 (ab3962) ; Novus biological 社 (NB 600 - 22) ; Eurogentec 社 (24220) ; Imgenex 社 (IMG - 4094)
CHODL	コンドロレクチン	R&Dsystems 社 (AF2576) ; Abnova 社 (H00140578 - A01)
CALB2	カルビンジン 2、29kDa (カルレチニン)	Chemicon 社 (AB5054) ; Usbiological 社 (C1036 - 01M)
UGT8	UDP グリコシルトランスフェラーゼ 8 (UDP - ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ)	
C1orf210	染色体 1 読取り枠 210	
SIKE	IKK エプシロンの抑制遺伝子	
ITGB8	インテグリン、ベータ 8	Abnova 社 (H00003696-M01、H00003696-A01) ; GenWay biotech 社 (15-288-21362) ; scbt 社 (sc-10817、sc-25714、sc-6638)
PAQR3	プログステチンおよび脂肪 Q レセプター群メンバーIII	
ANP32E	酸性(ロイシニリッパ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE	GenWay biotech 社 (A21207) ; UsBiological 社 (L1238)
KIND1	キンドリン	Abcam 社 (ab24152) ; scbt 社 (sc-30854)
ELAC1	elaC ホモログ 1 (大腸菌)	Abnova 社 (H00055520-A01)
GYLTL1B	グリコシルトランスフェラーゼ様 1B	

20

30

【 0 1 8 4 】

表 4		
肝転移関連遺伝子		
説明	摘要	抗体例
TBX3	T ボックス 3 (尺骨乳房症候群)	Abnova 社 (H00006926-A01)
C5orf30	AF038182 ; BC009203 に支持された推定遺伝子	
AGXT2L1	アラニン - グリオキシレートアミノトランスフェラーゼ 2 様 1 // アラニン - グリオキシレートアミノトランスフェラーゼ 2 様 1	
LETM2	ロイシンジッパー - EF - ハンド含有膜貫通タンパク質 2	
ZNF44	亜鉛フィンガータンパク質 44	
IL20RA	インターロイキン 20 レセプター、アルファ	LifeSpan biosciences 社 (LS-C722)
ZMAT1	亜鉛フィンガー、マーチンタイプ 1	
MYRIP	ミオシン VIIA および Rab 相互作用性タンパク質	Novus Biologicals 社 (NB 100-1278) ; Everest biotech Ltd 社 (EB06023)
WHSC1L1	Wolf Hirschhorn 症候群候補物 1 様 1	Abcam 社 (ab4514) ; BioCat 社 (AP1904a-AB)
SELT	セレンタンパク質 T	
GATA2	GATA 結合タンパク質 2	Abnova 社(H00002624-M01) ; R&Dsystems 社 (AF2046)
DHFRL1	ジヒドロフォレートレダクターゼ様 1	
ARPC2	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 2、34kDa	
SLC16A3	溶質担体群 16 (モノカルボン酸トランスポーター)、メンバー3	
GNPTG		
PRRT3		
RPS6KA5	リボソームタンパク質 S6 キナーゼ、90kDa、ポリペプチド5	Santa cruz 社 (sc-2591、sc-9392、sc-25417) ; R&Dsystems 社 (AF2518)

40

【 0 1 8 5 】

表 4		
転移関連遺伝子		
遺伝子記号	概要	抗体例
PPWD1	ペプチジルプロリルイソメラーゼドメインおよびWD 繰返し含有 1	
INH1	インヒビリン、アルファ	AbCam 社 (Ab10599)
PDGFRA	血小板由来増殖因子受容体、アルファポリペプチド	Abnova 社 (H00005156-M01)
MLL5	脊髄/リンパまたは混合系白血病 5 (トリソラクスホモログ、ショウジョウバエ)	Abgent 社 (AP6186a) ; Orbigen 社 (PAB-10849)
RPS23	リボソームタンパク質 S23	Abnova 社 (H00006228-A01)
ANTXR1	炭疽菌毒素受容体 1	AbCam 社 (Ab21270)
ARRDC3	アレクチンドメイン含有 3	
METTL7A	メチルトランスフェラーゼ様 7A	
NPHP3	ネフロン病 3 (青年期)	
PKP2	プラコフィリン 2	Novus biologicals 社 (ab19469)

【 0 1 8 6 】

表 5 : 乳癌の肺転移(n=5)および肺転移無し(n=18)の分類比較から得られた肺転移関連遺伝子

プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	機能/生物学的過程	倍率変化	パラメーターp 値
204751_x_at	DSC2*	デスモコリン 2	細胞接着	8.2	p < 0.000001
223861_at	HORMAD1*	HORMA ドメイン含有 1		21.5	2.00E-06
228171_s_at	PLEKHG4*	プレクストリン相同ドメイン含有、群 G、メンバー4	Rho タンパク質シグナル伝達	2.7	2.00E-06
228577_x_at	ODF2L*	精子尾部外部緻密線維 2 様		2.9	8.00E-06
220941_s_at	C21orf91*	染色体 21 読取り枠 91		3.6	1.00E-05
227642_at	TFCP2L1*	転写因子 CP2 様 1	転写調節	5.5	1.00E-05
219867_at	CHODL*	コンドロレクチン	ヒアルロン酸結合	2.8	1.40E-05
205428_s_at	CALB2*	カルビンジン 2、29kDa (カルレチニン)	カルシウムイオン結合	9.2	1.60E-05
228956_at	UGT8*	UDP グリコシルトランスフェラーゼ 8	スフィンゴ糖脂質合成過程	15.4	1.80E-05
1554246_at	C1orf210*	染色体 1 読取り枠 210		2.3	2.10E-05
221705_s_at	SIKE*	IKK エプシロンのサブプレッサー		1.9	2.10E-05
211488_s_at	ITGB8*	インテグリン、ベータ 8	細胞接着/シグナル伝達	1.7	2.60E-05
213372_at	PAQR3*	プログステロンおよび脂肪 Q レセプター群 メンバーIII	レセプター活性	5.6	2.90E-05
208103_s_at	ANP32E*	酸性(ロイシンリッチ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE	ホスファターゼインヒビター活性	6.0	3.20E-05

【 0 1 8 7 】

表 5 (続き)

プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	機能/生物学的過程	倍率変化	パラメーターp 値
60474_at	FERMT1*	フェルミウム群ホモログ 1 (ショウジョウバエ)	細胞接着	6.9	3.60E-05
222869_s_at	ELAC1*	elaC ホモログ 1 (大腸菌)	tRNA プロセッシング	1.6	3.60E-05
227829_at	GYLT1LB	グリコシルトランスフェラーゼ様 1B	スフィンゴ糖脂質合成過程	2.6	3.90E-05
226075_at	SPSB1	splA/リアノジンレセプタードメインおよび SOCS ボックス含有 1	細胞内シグナル伝達カスケード	2.9	5.60E-05
1553705_a_at	CHRM3	コリン作動性受容体、ムスカリン性 3	G - タンパク質結合シグナル伝達	2.0	6.10E-05
225363_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ (多発性進行癌 1 において突然変異させた)	ホスファチジルイノシトールシグナル伝達	0.4	6.20E-05
203256_at	CDH3	カドヘリン 3、1 型、P - カドヘリン(胎盤)	細胞接着	6.1	9.50E-05

*は、qRT - PCRによって試験した遺伝子。着色線は、検証した遺伝子に相当する(マン・ウィットニーU検定)。

【 0 1 8 8 】

表 6 : CRHにおいて治療した72名リンパ節転移陰性患者における臨床および病理学的特性と6種遺伝子分類因子との関連

特性	全患者数 (n=72)	6 種遺伝子分類		P 値*
		高リスク群 (n=18)	低リスク群 (n=54)	
10 年以内の転移				0.79
有	38 (53%)	10 (56%)	28 (52%)	
無	34 (47%)	8 (44%)	26 (48%)	
10 年以内の肺転移				0.04
有	11 (15%)	6 (33%)	5 (9%)	
無	61 (85%)	12 (67%)	49 (91%)	
閉経状態				0.58
前	18 (31%)	6 (40%)	12 (28%)	
後	40 (69%)	9 (60%)	31 (72%)	
巨視的腫瘍サイズ				0.59
≤ 20 mm	23 (33%)	5 (28%)	18 (35%)	
> 20 mm	47 (67%)	13 (72%)	34 (65%)	
SBR 組織学グレード				0.01
I	7 (11%)	0 (0%)	7 (15%)	
II	37 (60%)	7 (44%)	30 (65%)	
III	18 (29%)	9 (56%)	9 (20%)	
エストロゲン受容体状況				< 0.001
陽性	44 (61%)	3 (17%)	41 (76%)	
陰性	28 (39%)	15 (83%)	13 (24%)	
プロゲステロン受容体				0.004
陽性	37 (51%)	4 (22%)	33 (61%)	
陰性	35 (49%)	14 (78%)	21 (39%)	

* Chi²検定

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

表 7 : 721名の乳癌患者における肺転移についての多変量解析

変数	危険率	95% C.I	P 値
6 種遺伝子サイン (陽性対陰性)	2.12	1.2~3.76	0.01
ER 陰性 (有対無)	1.83	1.03~3.26	0.04
リンパ節陽性 (有対無)	0.92	0.52~1.62	0.77

10

【 0 1 9 0 】

表 8 : 乳癌(n=23)の骨転移および非骨転移の比較分類から得られた最高格付け遺伝子

プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	機能/生物学的過程	倍率変化	p 値
204679_at	KCNK1	カリウムチャンネル、亜科 K、メンバー1	カリウムイオン輸送	0.06	p < 1e-07
221724_s_at	CLEC4A	C タイプレクチンドメイン群 4、メンバーA	免疫応答/細胞接着/シグナル伝達	2.45	p < 1e-07
204153_s_at	MFNG	マニックフリンジホモログ(ショウジョウバエ)	Notch シグナル伝達経路	2.69	p < 1e-07
208922_s_at	NXF1	核 RNA 外輸送因子 1	mRNA 輸送	1.61	p < 1e-07
206060_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプター-22 型 (リンパ系)	チロシンホスファターゼ活性/シグナル伝達	4.12	1.00E-07
222392_x_at	PERP	PERP、TP53 アポトーシスエフェクター	細胞接着/アポトーシス	0.09	1.00E-07
211178_s_at	PSTPIP1	プロリン-セリン-スレオニンホスファターゼ相互作用性タンパク質 1	細胞接着/シグナル伝達	3.01	2.00E-07
204236_at	FLI1	フレンド白血病ウィルス組込体 1	転写調節	4.80	2.00E-07
213290_at	COL6A2	コラーゲン、タイプ VI、アルファ 2	細胞接着/細胞外マトリックス組織	2.63	2.00E-07
203547_at	CD4	CD4 抗原 (p55)	免疫応答/細胞接着/シグナル伝達経路	2.62	2.00E-07
205382_s_at	CFD	補体の D 成分 (アジブシン)	免疫応答	7.37	2.00E-07

20

【 0 1 9 1 】

表 9 : EMC-344 と名称付けした患者コホートにおける肺転移特異性マーカーの予測分析

	パラメーターp 値	FDR	危険率	Cox 回帰係数	ログ強度の SD	プローブセット	遺伝子記号
1	0.0011233	0.0258359	1.429	0.357	1.36	208103_s_at	ANP32E
2	0.0033469	0.0384893	1.705	0.534	0.894	221505_at	ANP32E
3	0.0160063	0.122715	1.347	0.298	1.172	204751_x_at	DSC2
4	0.0435256	0.2502722	1.669	0.512	0.639	213372_at	PAQR3
5	0.0635786	0.2512905	1.241	0.216	1.347	219867_at	CHODL
6	0.0791345	0.2512905	1.361	0.308	0.855	219735_s_at	TFCP2L1
7	0.0862416	0.2512905	0.693	-0.367	0.695	221705_s_at	SIKE
8	0.0874054	0.2512905	1.588	0.462	0.59	219677_at	SPSB1
9	0.1819305	0.4021895	1.153	0.142	1.308	205428_s_at	CALB2
10	0.182647	0.4021895	0.818	-0.201	1.154	222176_at	PTEN
11	0.2246446	0.4021895	0.834	-0.182	0.865	204054_at	PTEN
12	0.2258217	0.4021895	0.853	-0.159	1.081	204666_s_at	SIKE
13	0.2273245	0.4021895	0.761	-0.273	0.628	211711_s_at	PTEN
14	0.3015296	0.4953701	1.125	0.118	1.355	60474_at	C20orf42
15	0.337911	0.5128545	1.213	0.193	0.804	220941_s_at	C21orf91
16	0.3616357	0.5128545	1.086	0.083	1.621	218796_at	C20orf42
17	0.3790664	0.5128545	1.059	0.057	2.435	203256_at	CDH3
18	0.4986762	0.6371974	1.069	0.067	1.488	208358_s_at	UGT8
19	0.57957	0.7011632	0.855	-0.157	0.538	204053_x_at	PTEN
20	0.6097071	0.7011632	1.046	0.045	1.737	204750_s_at	DSC2
21	0.7965431	0.8593998	0.926	-0.077	0.511	204665_at	SIKE
22	0.830164	0.8593998	1.037	0.036	0.918	211488_s_at	ITGB8
23	0.8593998	0.8593998	1.023	0.023	1.224	205816_at	ITGB8

30

【 0 1 9 2 】

表9(続き): 表9のマーカの説明

	プローブセット	遺伝子記号	摘要
1	208103_s_at	ANP32E	酸性(ロイシンリッチ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE
2	221505_at	ANP32E	酸性(ロイシンリッチ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE
3	204751_x_at	DSC2	デスモコリン 2
4	213372_at	PAQR3	プログステロンおよび脂肪 Q レセプター群メンバーIII
5	219867_at	CHODL	コンドロレクチン
6	219735_s_at	TFCP2L1	転写因子 CP2 様 1
7	221705_s_at	SIKE	IKK エプシロンのサブレッサー
8	219677_at	SPSB1	splA/リアノジンレセプタードメインおよび SOCS ボックス含有 1
9	205428_s_at	CALB2	カルビンジン 2、29kDa (カルレチニン)
10	222176_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
11	204054_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
12	204666_s_at	SIKE	IKK エプシロンのサブレッサー
13	211711_s_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
14	60474_at	C20orf42	染色体 20 読取り枠 42
15	220941_s_at	C21orf91	染色体 21 読取り枠 91
16	218796_at	C20orf42	染色体 20 読取り枠 42
17	203256_at	CDH3	カドヘリン 3、1 型、P-カドヘリン(胎盤)
18	208358_s_at	UGT8	UDP グリコシルトランスフェラーゼ 8 (UDP-ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ)
19	204053_x_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
20	204750_s_at	DSC2	デスモコリン 2
21	204665_at	SIKE	IKK エプシロンのサブレッサー
22	211488_s_at	ITGB8	インテグリン、ベータ 8
23	205816_at	ITGB8	インテグリン、ベータ 8

【 0 1 9 3 】

表 10: MSK-82 と名称付けた患者コホートにおける肺転移特異性マーカの予測分析

	パラメーターp 値	FDR	危険率	Cox 回帰係数	ログ強度の SD	プローブセット	遺伝子記号
1	0.0003892	0.0089516	2.08	0.732	0.87	205428_s_at	CALB2
2	0.0014922	0.0171603	5.219	1.652	0.332	60474_at	C20orf42
3	0.0024355	0.0186722	2.107	0.745	0.877	204751_x_at	DSC2
4	0.0050329	0.0289392	4.095	1.410	0.426	219677_at	SPSB1
5	0.0099859	0.0459351	1.838	0.609	0.945	208103_s_at	ANP32E
6	0.0121753	0.046672	3.967	1.378	0.548	204053_x_at	PTEN
7	0.0180818	0.0594116	2.72	1.001	0.483	218796_at	C20orf42
8	0.0492486	0.1415897	1.513	0.414	1.255	203256_at	CDH3
9	0.0588468	0.1475319	1.957	0.671	0.587	219735_s_at	TFCP2L1
10	0.0641443	0.1475319	3.023	1.106	0.358	204750_s_at	DSC2
11	0.0775927	0.1622393	2.493	0.913	0.422	219867_at	CHODL
12	0.1165306	0.2233503	2.037	0.711	0.561	211711_s_at	PTEN
13	0.1297388	0.2295379	1.524	0.421	1.021	221505_at	ANP32E
14	0.1614638	0.265262	2.049	0.717	0.373	213372_at	PAQR3
15	0.1929821	0.2959059	5.224	1.653	0.193	204665_at	SIKE
16	0.2148451	0.3088398	2.501	0.917	0.324	220941_s_at	C21orf91
17	0.4649749	0.6290837	1.541	0.432	0.385	208358_s_at	UGT8
18	0.5784291	0.7391039	2.4	0.875	0.163	205816_at	ITGB8
19	0.6368802	0.7709602	1.543	0.434	0.24	204666_s_at	SIKE
20	0.6705386	0.7711194	1.302	0.264	0.417	204054_at	PTEN
21	0.7563827	0.8013443	1.474	0.388	0.218	211488_s_at	ITGB8
22	0.7683003	0.8013443	1.4	0.336	0.224	221705_s_at	SIKE
23	0.8013443	0.8013443	0.547	-0.603	0.118	222176_at	PTEN

【 0 1 9 4 】

表 10(続き): 表 10 のマーカの説明

	プローブセット	遺伝子記号	摘要
1	205428_s_at	CALB2	カルビンジン 2、29kDa (カルレチニン)
2	60474_at	C20orf42	染色体 20 読取り枠 42
3	204751_x_at	DSC2	デスモコリン 2
4	219677_at	SPSB1	splA/リアノジンレセプタードメインおよび SOCS ボックス含有 1
5	208103_s_at	ANP32E	酸性(ロイシンリッチ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE
6	204053_x_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
7	218796_at	C20orf42	染色体 20 読取り枠 42
8	203256_at	CDH3	カドヘリン 3、1 型、P-カドヘリン(胎盤)
9	219735_s_at	TFCP2L1	転写因子 CP2 様 1
10	204750_s_at	DSC2	デスモコリン 2
11	219867_at	CHODL	コンドロレクチン
12	211711_s_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
13	221505_at	ANP32E	酸性(ロイシンリッチ)核リントタンパク質 32 群、メンバーE
14	213372_at	PAQR3	プログステロンおよび脂肪 Q レセプター群メンバーIII
15	204665_at	SIKE	IKK エプシロンのサブレッサー
16	220941_s_at	C21orf91	染色体 21 読取り枠 91
17	208358_s_at	UGT8	UDP グリコシルトランスフェラーゼ 8 (UDP-ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ)
18	205816_at	ITGB8	インテグリン、ベータ 8
19	204666_s_at	SIKE	IKK エプシロンの抑制遺伝子
20	204054_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)
21	211488_s_at	ITGB8	インテグリン、ベータ 8
22	221705_s_at	SIKE	IKK エプシロンのサブレッサー
23	222176_at	PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ(多発性進行癌 1 において突然変異させた)

【 0 1 9 5 】

10

20

30

40

表 1 1 : NKI - 295 と名称付けした患者コホートにおける肺転移特異性マーカーの予測分析

	パラメータ-p 値	FDR	危険率	Cox 回帰係数	ログ強度の SD	Unique id	GB acc	UG クラス	遺伝子記号
1	0.0108108	0.1949653	3.108	1.134	0.403	12233	NM_014553	Hs.119903	TFCP2L1
2	0.0419568	0.1949653	3.946	1.373	0.262	5151	X56807	Hs.95612	DSC2
3	0.0432328	0.1949653	0.115	-2.163	0.21	13428	Contig39922_RC	Hs.86543	GYLTL1B
4	0.0450324	0.1949653	3.656	1.296	0.275	15800	Contig46362_RC	Hs.119903	TFCP2L1
5	0.0528812	0.1949653	3.024	1.107	0.327	17349	Contig49790_RC	Hs.95612	DSC2
6	0.0584896	0.1949653	2.259	0.815	0.372	10488	NM_007088	Hs.106857	CALB2
7	0.0686958	0.1962737	9.446	2.246	0.141	23624	NM_000740	Hs.7138	CHRM3
8	0.0907955	0.2269888	2.069	0.727	0.381	1386	NM_001740	Hs.106857	CALB2
9	0.1562884	0.3473076	3.029	1.108	0.248	4995	AL117435	Hs.188781	PLEKHG4
10	0.2539722	0.4661338	2.258	0.814	0.23	2764	NM_003360	Hs.274293	UGT8
11	0.2841824	0.4661338	0.259	-1.351	0.151	20423	NM_000314	Hs.253309	PTEN
12	0.3003186	0.4661338	2.578	0.947	0.185	19915	NM_017671	Hs.180479	C20orf42
13	0.302987	0.4661338	3.476	1.246	0.13	20151	Contig39667_RC	Hs.293811	C21orf91
14	0.3494798	0.4943692	2.038	0.712	0.264	14424	AL137342	Hs.274293	UGT8
15	0.3707769	0.4943692	3.365	1.213	0.151	7655	AF131840	Hs.458389	SPSB1
16	0.4670792	0.583849	1.397	0.334	0.421	1529	NM_001793	Hs.191842	CDH3
17	0.6470609	0.7612481	2.004	0.695	0.116	18301	NM_017447	Hs.293811	C21orf91
18	0.7465434	0.8294927	0.655	-0.423	0.157	12394	Contig39904_RC	Hs.283725	CHODL
19	0.8688028	0.8848604	0.765	-0.268	0.114	22398	NM_018696	Hs.47572	ELAC1
20	0.8848604	0.8848604	0.876	-0.132	0.197	24006	NM_002214	Hs.355722	ITGB8

【 0 1 9 6 】

表 1 2 : NKI-295 と名称付けした患者コホートにおける骨転移特異性マーカーの予測分析

	パラメータ-p 値	FDR	危険率	Cox 回帰係数	ログ強度の SD	プローブセット	遺伝子記号
1	0.0014664	0.0762528	4.082	1.407	0.443	210629_x_at	LST1
2	0.0070981	0.1002536	5.055	1.620	0.32	204236_at	FLI1
3	0.0095354	0.1002536	2.566	0.942	0.565	214181_x_at	LST1
4	0.0104244	0.1002536	3.094	1.129	0.398	203603_s_at	ZEB2
5	0.0115734	0.1002536	3.664	1.299	0.432	214574_x_at	LST1
6	0.0135848	0.1002536	3.417	1.229	0.435	211582_x_at	LST1
7	0.0159031	0.1002536	3.717	1.313	0.399	215633_x_at	LST1
8	0.0165012	0.1002536	2.377	0.866	0.576	219892_at	TM6SF1
9	0.0179101	0.1002536	1.911	0.648	0.653	219947_at	CLEC4A
10	0.0197086	0.1002536	4.627	1.532	0.342	211581_x_at	LST1
11	0.0212075	0.1002536	2.838	1.043	0.435	221724_s_at	CLEC4A
12	0.0286492	0.1241465	7.748	2.047	0.324	201234_at	ILK
13	0.0328336	0.1313344	8.671	2.160	0.25	210786_s_at	FLI1
14	0.0391372	0.133966	1.46	0.378	1.247	205382_s_at	CFD
15	0.0402882	0.133966	0.483	-0.728	0.94	204678_s_at	KCNK1
16	0.0412203	0.133966	1.725	0.545	0.829	213125_at	OLFML2B
17	0.0479453	0.1466562	1.777	0.575	0.583	205326_at	RAMP3
18	0.0628825	0.1816606	0.311	-1.168	0.68	211056_s_at	SRD5A1
19	0.0718102	0.1965332	2.457	0.899	0.485	213290_at	COL6A2
20	0.0794813	0.2066514	0.598	-0.514	1.02	204679_at	KCNK1
21	0.1353711	0.3352046	2.9	1.065	0.322	211178_s_at	PSTPIP1
22	0.1495017	0.3390126	3.198	1.163	0.299	206120_at	CD33
23	0.1499479	0.3390126	2.876	1.056	0.329	204153_s_at	MFNG
24	0.1698972	0.3681106	1.426	0.355	0.863	202803_s_at	ITGB2
25	0.1801727	0.3738658	2.869	1.054	0.28	204152_s_at	MFNG

【 0 1 9 7 】

	パラメータ-p 値	FDR	危険率	Cox 回帰係数	ログ強度の SD	プローブセット	遺伝子記号
26	0.1869329	0.3738658	0.599	-0.512	0.985	204675_at	SRD5A1
27	0.2215229	0.3957445	0.029	-3.540	0.11	216424_at	CD4
28	0.2236087	0.3957445	0.442	-0.816	0.681	203426_s_at	IGFBP5
29	0.2247289	0.3957445	0.702	-0.354	1.162	211958_at	IGFBP5
30	0.2287178	0.3957445	0.465	-0.766	0.638	203424_s_at	IGFBP5
31	0.2359246	0.3957445	2.613	0.960	0.334	208922_s_at	NXF1
32	0.2553002	0.4137783	0.457	-0.783	0.715	210959_s_at	SRD5A1
33	0.2625901	0.4137783	0.405	-0.904	0.723	207370_at	IBSP
34	0.2831181	0.4330042	0.508	-0.677	0.461	220966_x_at	ARPC5L
35	0.2917092	0.433965	0.696	-0.362	1.082	203425_s_at	IGFBP5
36	0.3194611	0.4610668	0.28	-1.273	0.773	204712_at	WIF1
37	0.3316346	0.4610668	1.386	0.326	0.806	209156_s_at	COL6A2
38	0.3369334	0.4610668	1.925	0.655	0.368	219091_s_at	MMRN2
39	0.3501288	0.4668384	0.826	-0.191	1.406	217744_s_at	PERP
40	0.3756809	0.4883852	0.848	-0.165	1.532	203936_s_at	MMP9
41	0.4433208	0.5622605	1.464	0.381	0.51	203547_at	CD4
42	0.5021384	0.6216952	2.053	0.719	0.194	208010_s_at	PTPN22
43	0.5822182	0.7021499	1.511	0.413	0.371	221565_s_at	FAM26B
44	0.5941268	0.7021499	0.89	-0.117	1.233	211959_at	IGFBP5
45	0.633394	0.731922	1.382	0.324	0.353	206060_s_at	PTPN22
46	0.662699	0.749138	1.246	0.220	0.491	205908_s_at	OMD
47	0.7906842	0.8747995	0.752	-0.285	0.252	215104_at	NRIP2
48	0.9126254	0.9839027	1.084	0.081	0.381	57715_at	FAM26B
49	0.9310478	0.9839027	0.869	-0.140	0.171	215639_at	SH2D3C
50	0.9460603	0.9839027	1.074	0.071	0.269	213783_at	MFNG
51	0.976646	0.9957959	0.985	-0.015	0.558	205907_s_at	OMD

【 0 1 9 8 】

10

20

30

40

表 1 2 (続き): 表 1 2 のマーカーの説明

プローブセット	遺伝子記号	摘要
1 210629_s_at	LST1	白血球特異性転写体 1
2 204236_at	FLI1	フレンド白血球ウイルス組込体 1
3 214181_s_at	LST1	白血球特異性転写体 1
4 203603_s_at	ZEB2	亜鉛フィンガー-E ボックス結合ホモボックス 2
5 214574_s_at	LST1	白血球特異性転写体 1
6 211582_s_at	LST1	白血球特異性転写体 1
7 215633_s_at	LST1	白血球特異性転写体 1
8 219892_at	TM6SF1	膜貫通 6 上科メンバー1
9 219947_at	CLEC4A	C タイブレクチンドメイン群 4、メンバーA
10 211581_s_at	LST1	白血球特異性転写体 1
11 221724_s_at	CLEC4A	C タイブレクチンドメイン群 4、メンバーA
12 201234_at	ILK	インテグリン結合キナーゼ
13 210786_s_at	FLI1	フレンド白血球ウイルス組込体 1
14 205382_s_at	CFD	補体因子 D (アジプシン)
15 204678_s_at	KCNK1	カリウムチャンネル、亜科 K、メンバー1
16 213125_at	OLFML2B	オルファクトメジン様 2B
17 205326_at	RAMP3	レセプター(G タンパク質結合性)活性修飾タンパク質 3
18 211056_s_at	SRD5A1	ステロイド-5-アルファ-レダクターゼ、アルファポリペプチド 1 (3-オキシ-5-アルファ-ステロイドデルタ 4-デヒドロゲナーゼアルファ 1)
19 213290_at	COL6A2	コラーゲン、VI 型、アルファ 2
20 204679_at	KCNK1	カリウムチャンネル、亜科 K、メンバー1
21 211178_s_at	PSTPIP1	プロリン-セリン-スレオニンホスファターゼ相互作用タンパク質 1
22 206120_at	CD33	CD33 分子
23 204153_s_at	MFNG	MFNG O- フコシルペプチド 3- ベータ- N- アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ
24 202803_s_at	ITGB2	インテグリン、ベータ 2 (補体成分 3 レセプター-3 および 4 サブユニット)
25 204152_s_at	MFNG	MFNG O- フコシルペプチド 3- ベータ- N- アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ

【 0 1 9 9 】

プローブセット	遺伝子記号	説明
26 204675_at	SRD5A1	ステロイド-5-アルファ-還元酵素、アルファポリペプチド 1 (3-オキシ-5-アルファ-ステロイドデルタ 4-デヒドロゲナーゼアルファ 1)
27 216424_at	CD4	CD4 分子
28 203426_s_at	IGFBP5	インシュリン様成長因子結合タンパク質 5
29 211958_at	IGFBP5	インシュリン様成長因子結合タンパク質 5
30 203424_s_at	IGFBP5	インシュリン様成長因子結合タンパク質 5
31 208922_s_at	NXF1	核 RNA 外輸送因子 1
32 210959_s_at	SRD5A1	ステロイド-5-アルファ-還元酵素、アルファポリペプチド 1 (3-オキシ-5-アルファ-ステロイドデルタ 4-デヒドロゲナーゼアルファ 1)
33 207370_at	IBSP	インテグリン結合シアロタンパク質 (骨シアロタンパク質、骨シアロタンパク質 ID)
34 220966_s_at	ARPC5L	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 5 様
35 203425_s_at	IGFBP5	インシュリン様成長因子結合タンパク質 5
36 204712_at	WIF1	WNT 抑制因子 1
37 209156_s_at	COL6A2	コラーゲン、VI 型、アルファ 2
38 219091_s_at	MMRN2	マルチメルリン 2
39 217744_s_at	PERP	PERP、TP53 アポトーシスエフェクター
40 203936_s_at	MMP9	マトリックスメタロペプチダーゼ 9 (ゼラチナーゼ B、92kDa ゼラチナーゼ、92kDa IV 型コラゲナーゼ)
41 203547_at	CD4	CD4 分子
42 208010_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ 22 (リンバ系)
43 221565_s_at	FAM26B	配列類似性を有する群 26、メンバーB
44 211959_at	IGFBP5	インシュリン-様成長因子結合タンパク質 5
45 206060_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ 22 (リンバ系)
46 205908_s_at	OMD	オステオモジュリン
47 215104_at	NRIP2	核レセプター相互作用性タンパク質 2
48 57715_at	FAM26B	配列類似性を有する群 26、メンバーB
49 215639_at	SH2D3C	SH2 ドメイン含有 3C
50 213783_at	MFNG	MFNG O- フコシルペプチド 3- ベータ- N- アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ
51 205907_s_at	OMD	オステオモジュリン

【 0 2 0 0 】

表 1 3 : 乳癌(n=23)の骨転移および非骨転移の分類比較から得られた最高格付け遺伝子

プローブセット	遺伝子記号	遺伝子名称	倍率	p 値
203936_s_at	MMP9	マトリックスメタロペプチダーゼ 9	36,73	p < 1e-07
204679_at	KCNK1	カリウムチャンネル、亜科 K、メンバー1	0,06	p < 1e-07
236028_at	IBSP	インテグリン結合シアロタンパク質 (骨シアロタンパク質)	123,76	p < 1e-07
205907_s_at	OMD	オステオモジュリン	41,31	p < 1e-07
221724_s_at	CLEC4A	C タイブレクチンドメイン群 4、メンバーA	2,45	p < 1e-07
204153_s_at	MFNG	マニックフリンジホモログ(ショウジョウバエ)	2,69	p < 1e-07
57715_at	FAM26B	配列類似性を有する群 26、メンバーB	2,29	p < 1e-07
226914_at	ARPC5L	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 5 様	0,35	p < 1e-07
208922_s_at	NXF1	核 RNA 外輸送因子 1	1,61	p < 1e-07
227002_at	FAM78A	配列類似性を有する群 78、メンバーA	2,43	p < 1e-07
226245_at	KCTD1	カリウムチャンネル四量体化ドメイン含有 1	0,31	1,00E-07
227372_s_at	BAI1	BAI1 - 関連タンパク質 2 - 様 1	0,10	1,00E-07
206060_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ 22 (リンバ系)	4,12	1,00E-07
232523_at	MEGF10	MEGF10 タンパク質	10,78	1,00E-07
222392_s_at	PERP	PERP、TP53 アポトーシスエフェクター	0,09	1,00E-07
231879_at	COL12A1	コラーゲン、XII 型、アルファ 1	8,35	1,00E-07
211178_s_at	PSTPIP1	プロリン-セリン-スレオニンホスファターゼ相互作用性タンパク質 1	3,01	2,00E-07

【 0 2 0 1 】

10

20

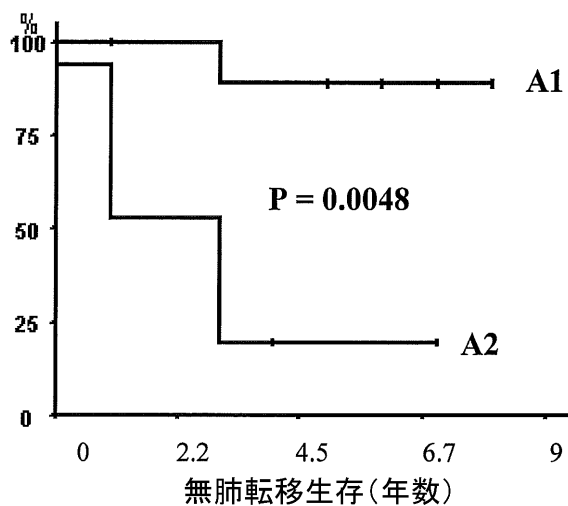
30

40

ブロープセット	遺伝子記号	遺伝子名称	折畳み変化	p 値
204236_at	FLI1	フレンド白血病ウイルス組込体 1	4.80	2,00E-07
213290_at	COL6A2	コラーゲン、VI 型、アルファ 2	2.63	2,00E-07
203547_at	CD4	CD4 抗原 (p55)	2.62	2,00E-07
205382_s_at	CFD	補体の D 成分(アジプシン)	7.37	2,00E-07
204712_at	WIF1	WNT 抑制因子 1	25.94	2,00E-07
235593_at	ZEB2	亜鉛フィンガーホモオボックス 1b	2.92	2,00E-07
206120_at	CD33	CD33 抗原 (gp67)	2.33	3,00E-07
232204_at	EBF	早期 B - 細胞因子	5.00	4,00E-07
219091_s_at	MMRN2	マルチメリン 2	2.96	4,00E-07
214181_x_at	LST1	白血球特異性転写体 1	3.87	4,00E-07
211958_at	IGFBP5	インシュリン様成長因子結合タンパク質 5	4.04	4,00E-07
1552667_a_at	SH2D3C	SH2 ドメイン含有 3C	2.31	5,00E-07
205326_at	RAMP3	レセプター(カルシトニン)活性修飾タンパク質 3	1.95	5,00E-07
202803_s_at	ITGB2	インテグリン、ベータ 2 (抗原 CD18(p95))	8.33	5,00E-07
201234_at	ILK	インテグリン結合キナーゼ	2.22	5,00E-07
227243_s_at	EBF3	早期 B 細胞因子 3	3.70	6,00E-07
219892_at	TM6SF1	膜貫通 6 上科メンバー 1	5.42	6,00E-07
215104_at	NRIP2	核レセプター相互作用性タンパク質 2	1.34	7,00E-07
223245_at	STRBP	精子細胞核周囲 RNA 結合タンパク質	0.29	8,00E-07
226345_at	ARL8	ADP リボシル化因子様 8	0.31	9,00E-07
204675_at	SRD5A1	ステロイド - 5 - アルファ - レダクターゼ、アルファポリペプチド 1	0.15	9,00E-07
225373_at	C10orf54	染色体 10 読取り枠 54	3.10	9,00E-07
213125_at	OLFML2B	オルファクトメジン様 2B	8.01	9,00E-07

10

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

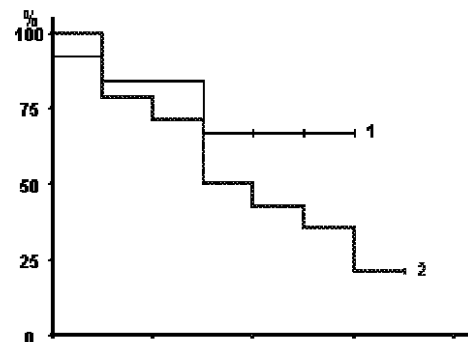
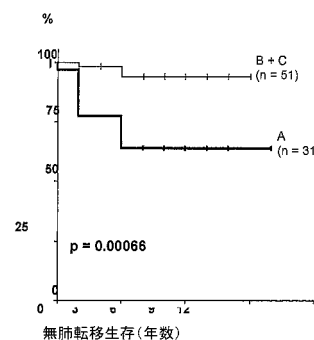
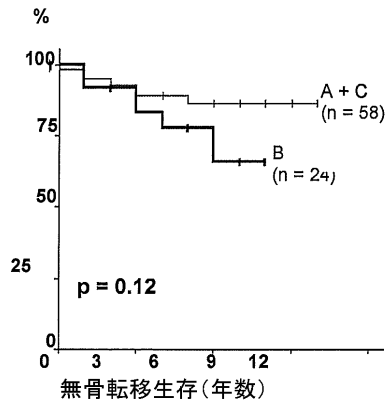


Figure 1B

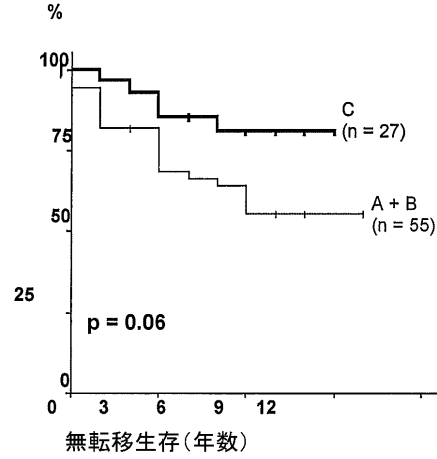
【 図 2 A 】



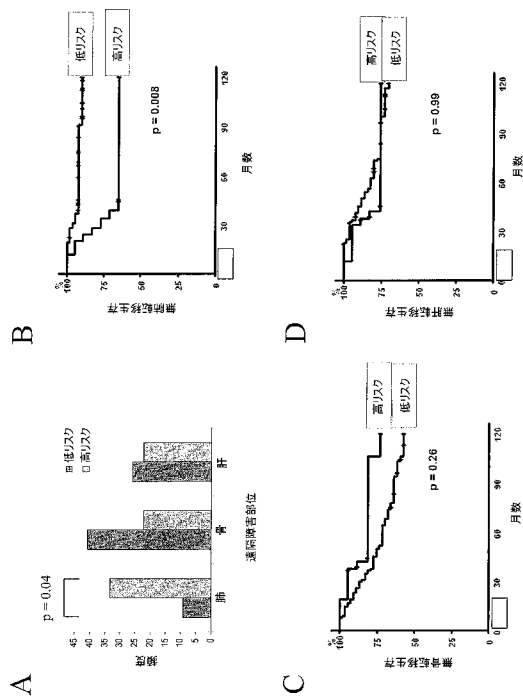
【図 2 B】



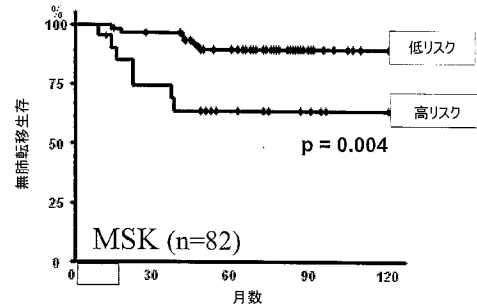
【図 2 C】



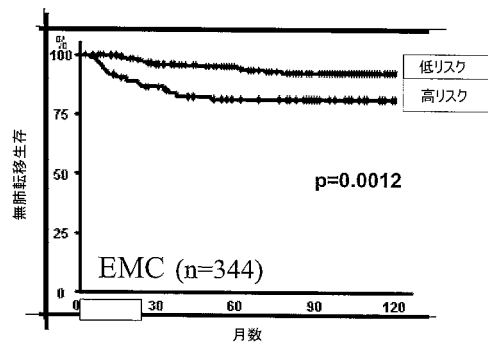
【図 3】



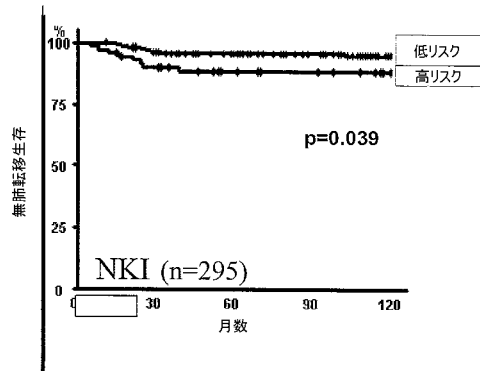
【図 4 A】



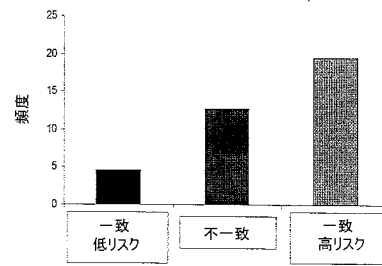
【図 4 B】



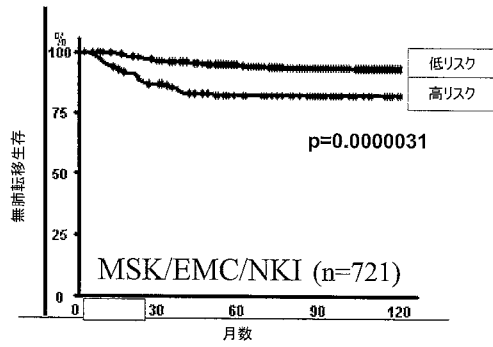
【図 4 C】



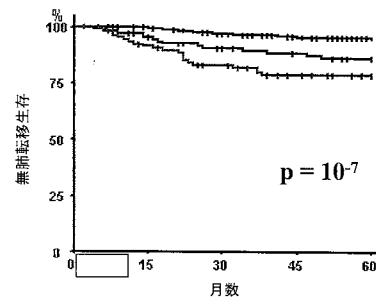
【図 5 A】



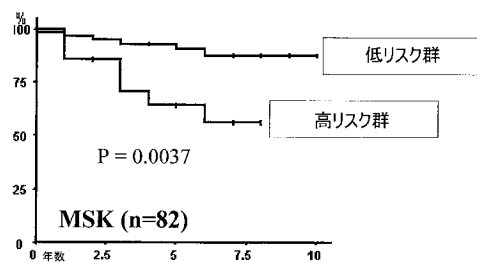
【図 4 D】



【図 5 B】



【図 6】



【配列表】

2010518878000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月26日(2010.1.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の工程を含むことを特徴とする、乳癌に侵されている患者における肺転移発生の生体外予測方法：

- a) 検査すべき患者から前以って収集した乳房腫瘍組織サンプルを用意する工程；
- b) 前記乳房腫瘍組織サンプルにおいて、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群に含まれる1種以上のマーカーの発現量を測定する工程；および、
- c) 肺内での転移の発生を、1種以上の前記肺特異性マーカーが、各マーカーにおける対照発現量値と比較したときに、脱制御発現量を有する場合に予測する工程。

【請求項2】

各マーカーにおける対照発現量値が、(i) 癌転移を被っていない患者由来の乳房腫瘍サンプル、および(ii) 肺内での癌転移を被っていない患者由来の乳房腫瘍サンプルからなる群から選ばれる乳房腫瘍サンプル中で測定した相応する発現量からなる、請求項1記載の方法。

【請求項3】

工程b)において、発現量を測定するマーカー数が、2、3、4、5および6からなる群から選ばれる、請求項1および2のいずれか1項記載の方法。

【請求項4】

工程b)が、DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群に含まれる肺特異性マーカーの全部の発現量を測定することからなる、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

前記マーカーが、mRNA、cDNAおよびタンパク質からなる群から選ばれる、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーの発現量を、前記乳房腫瘍組織サンプルを遺伝子発現分析法に供することによって測定する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

工程b)において、前記1種以上の生物学的マーカーの発現量を、前記乳房腫瘍組織サンプルをタンパク質発現分析法に供することによって測定する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

工程b)を、前記1種以上の肺特異性マーカーに対して特異性のプローブを表面上に固定させて有するDNAマイクロアレイを使用することによって実施する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

工程b)において、核酸増幅反応を、発現を測定する前記1種以上の肺特異性マーカーの各々に対して特異性のプライマー(複数)またはプライマー対を使用することによって実施する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

前記プライマー対が、SEQ ID NO : 59および60 (DSC2)、SEQ ID NO : 51および52 (TFCP2L1)、SEQ ID NO : 43および44 (UGT8)、SEQ ID NO : 37および38 (ITGB8)、SEQ ID NO : 33および34 (ANP32E)、並びに表 5 において “ 60474_at ” として示すプローブセット (FERMT1) からなる群から選ばれる、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

工程b)において、前記 1 種以上の生物学的マーカーの発現量を、前記乳房腫瘍組織サンプルを免疫組織化学分析法に供することによって測定する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 2】

1 種以上の肺特異性マーカーの発現を工程b)において測定し、工程b)が前記マーカーの実験発現プロファイルを創出させることを含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 3】

工程c)において、工程b)において得られる前記実験発現プロファイルを、同一の肺特異性マーカーの対照発現プロファイルと比較する、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる 1 種以上の生物学的マーカーの発現量を測定する手段を含むことを特徴とする、乳癌患者における肺転移の発生の生体外予測用のキット。

【請求項 1 5】

DSC2、TFCP2L1、UGT8、ITGB8、ANP32EおよびFERMT1からなる群から選ばれる 1 種以上の生物学的マーカーの発現量を測定する手段を含むことを特徴とする、乳癌に侵されている患者の製薬剤による治療処置の抗転移有効性のモニタリング用のキット。

【請求項 1 6】

マーカー数が、2、3、4、5および6からなる群から選ばれる、請求項 1 4 および 1 5 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 1 7】

プライマー対の 1 つまたは組合せまたは群を含み、各プライマーが前記 1 種以上の生物学的マーカーの 1 つと特異的にハイブリッド化する、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 1 8】

前記 1 種以上の生物学的マーカーの核酸発現生成物にハイブリッド化するプローブを含むDNAマイクロアレイを含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 1 9】

抗体の組合せまたは群を含み、各抗体が前記 1 種以上の生物学的マーカーの 1 つに対して指向する、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項記載のキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/052318

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array" GEO EXPRESSION, 7 November 2003 (2003-11-07), XP002361326 abstract	12-15
X	SMID MARCEL ET AL: "Genes associated with breast cancer metastatic to bone." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 20 MAY 2006, vol. 24, no. 15, 20 May 2006 (2006-05-20), pages 2261-2267, XP002454667 ISSN: 1527-7755 cited in the application	1-8, 10, 11
Y	abstract; table 2	16
----- -/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September 2008		Date of mailing of the international search report 26/09/2008
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 Bradbrook, Derek

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/052318

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAKIUCHI S ET AL: "Genome-wide analysis of organ-preferential metastasis of human small cell lung cancer in mice" MOLECULAR CANCER RESEARCH, XX, XX, vol. 1, May 2003 (2003-05), pages 485-499, XP002336377 ISSN: 1541-7786 cited in the application	1-8,10, 11
Y	abstract page 486, column 1 - column 2	16
X	WALTREGNY D ET AL: "INCREASED EXPRESSION OF BONE SIALOPROTEIN IN BONE METASTASES COMPARED WITH VISCERAL METASTASES IN HUMAN BREAST AND PROSTATE CANCERS" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 834-843, XP009004698 ISSN: 0884-0431 cited in the application	1-8,10, 11
Y	abstract	16
X	WO 00/22130 A (CHIRON CORP [US]) 20 April 2000 (2000-04-20)	1-8,10, 11
Y	claims 18,19; table 1	16
X	EP 1 754 795 A (VERIDEX LLC [US]) 21 February 2007 (2007-02-21)	1-8,10, 11
Y	example 8	16
X	MINN ANDY J ET AL: "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." NATURE 28 JUL 2005, vol. 436, no. 7050, 28 July 2005 (2005-07-28), pages 518-524, XP002454668 ISSN: 1476-4687 cited in the application	1-8,10, 11
Y	abstract; table 1	16
X	MINN ANDY J ET AL: "Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION JAN 2005, vol. 115, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 44-55, XP002454669 ISSN: 0021-9738 cited in the application	1-8,10, 11
Y	abstract	16
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/052318

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOELFLE U ET AL: "MOLECULAR SIGNATURE ASSOCIATED WITH BONE MARROW MICROMETASTASIS IN HUMAN BREAST CANCER" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 63, no. 18, 15 September 2003 (2003-09-15), pages 5679-5684, XP008062521 ISSN: 0008-5472 abstract; table 1	1-8,10, 11
Y		16
A	VEER VAN 'T L J ET AL: "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 415, no. 6871, 31 January 2002 (2002-01-31), pages 530-536, XP002259781 ISSN: 0028-0836 cited in the application abstract	1-8,10, 11,16
P,X	REBECA SANZ ET AL: "Functional pathways shared by liver and lung metastases: a mitochondrial chaperone machine is up-regulated in soft-tissue breast cancer metastasis" CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS ; OFFICIAL JOURNAL OF THEMETASTASIS RESEARCH SOCIETY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 24, no. 8, 16 November 2007 (2007-11-16), pages 673-683, XP019550035 ISSN: 1573-7276 the whole document	1-8,10, 11,16
P,X	KELTOUMA DRIOUCH ET AL: "Gene arrays for diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer metastasis" CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS ; OFFICIAL JOURNAL OF THEMETASTASIS RESEARCH SOCIETY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 24, no. 8, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 575-585, XP019550026 ISSN: 1573-7276 the whole document	1-8,10, 11,16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/052318

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVIES ELERI LLOYD ET AL: "The role of desmoglein 2 and E-cadherin in the invasion and motility of human breast cancer cells" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 11, no. 2, 1997, pages 415-419, XP009105589 ISSN: 1019-6439 abstract	1-15
P, X	----- MINN ANDY J ET AL: "Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 17 APR 2007, vol. 104, no. 16, 17 April 2007 (2007-04-17), pages 6740-6745, XP002495301 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1-5, 7, 8, 10, 11
P, A	----- GUPTA GAORAV P ET AL: "Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis." NATURE 12 APR 2007, vol. 446, no. 7137, 12 April 2007 (2007-04-12), pages 765-770, XP002495302 ISSN: 1476-4687 the whole document	1-5, 7-15
T	----- LANDEMAINE THOMAS ET AL: "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis." CANCER RESEARCH 1 AUG 2008, vol. 68, no. 15, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 6092-6099, XP002495303 ISSN: 1538-7445 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/052318**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims. -
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-5,7,8,10-12,14(in part),6,9,13,15,16(in full)
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.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2008/052318

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

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

Invention 1: Claims 1-5,7,8,10-12,14(in part),6,16(in full)

A method for predicting the occurrence of metastasis in a patient with breast cancer, comprising determining in a breast tumour tissue sample from said patient the expression of one or marker genes that are indicative of occurrence of metastasis in one or more tissue or organ, compared to its corresponding level in a patient that has not undergone metastasis in the corresponding tissue or organ, wherein said marker gene is CLEC4A or the genes consist of the sets of all the genes listed in claims 1-4 respectively; a kit therefor; a method for selecting markers indicative of metastasis in one or more tissue or organ of a patient affected with breast cancer.

Invention 2: Claims 1-5,7,8,10-12,14 (in part)

A method for predicting the occurrence of metastasis in a patient with breast cancer, comprising determining in a breast tumour tissue sample from said patient the expression of one or marker genes that are indicative of occurrence of metastasis in one or more tissue or organ, compared to its corresponding level in a patient that has not undergone metastasis in the corresponding tissue or organ, wherein said marker gene is MFNG; a kit therefor.

Inventions 3-503: Claims 1-5,7,8,10-12,14 (in part),9,13,15(in full)

A method for predicting the occurrence of metastasis in a patient with breast cancer, comprising determining in a breast tumour tissue sample from said patient the expression of one or marker genes that are indicative of occurrence of metastasis in one or more tissue or organ, compared to its corresponding level in a patient that has not undergone metastasis in the corresponding tissue or organ, wherein said marker gene is respectively each of those listed in claim 1; a kit therefor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/052318

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0022130	A	20-04-2000	AT 386804 T	15-03-2008
			AU 1316200 A	01-05-2000
			EP 1953229 A2	06-08-2008
			EP 1121437 A2	08-08-2001
			JP 2002527066 T	27-08-2002
			US 6468790 B1	22-10-2002
			US 2002009739 A1	24-01-2002
EP 1754795	A	21-02-2007	AR 055594 A1	29-08-2007
			AU 2006203169 A1	22-02-2007
			BR PI0603053 A	20-03-2007
			CA 2553665 A1	02-02-2007
			CN 1995388 A	11-07-2007
			JP 2007049991 A	01-03-2007

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100076451

弁理士 三嶋 景治

(72)発明者 リドロー ロゼット

フランス国 エフ - 9 2 2 3 0 ジュヌヴィリエール リュ サント ジュヌヴィエーヴ 2 5

(72)発明者 ドリウシュ ケルトウーマ

フランス国 エフ - 9 3 2 6 0 レ リラ リュ デ ブリュイエール 7 6

(72)発明者 ランドメーヌ トマ

フランス国 エフ - 9 2 1 0 0 ブーローニュ - ビヤンクール アヴニュー デュ マレシャル
ジュアン 2 5 5

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 CB02 DA14 DA36 FB02 FB03

4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 HA11 HA12

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35

QR55 QR59 QR62 QS25 QS32 QX01

專利名称(译)	乳腺癌患者转移发生的预测方法		
公开(公告)号	JP2010518878A	公开(公告)日	2010-06-03
申请号	JP2009551932	申请日	2008-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	安瑟伦学院国立Rasante埃杜拉尔壳邦医疗中心雷努Yugunan		
申请(专利权)人(译)	安塞姆 (国立研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗) 中心雷努Yugunan		
[标]发明人	リドローロゼット ドリウシュケルトウーマ ランドメーヌトマ		
发明人	リドロー ロゼット ドリウシュ ケルトウーマ ランドメーヌ トマ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/574 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/118		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/574.A G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01		
代理人(译)	中里浩 川崎仁		
优先权	2007300823 2007-02-26 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及患者乳腺癌进展的预后，更具体地涉及预测患有乳腺癌的患者 的一个或多个组织或器官中转移的发生。

		表1				
プロトタイプ	遺伝子記号	遺伝子名称	pバグメータ・値	幾何平均値		
				有転移	無転移	
発がん関連遺伝子						
221724_s_at	CLIC4A	Cタイププレクチンドメイン群4、メンバーA	p < 0.000001	55.9	22.8	
204153_s_at	MFNG	マニックフリンジ(mannic fringe)ホモログ (シロリジン様ドメイン)	p < 0.000001	92.7	34.5	
208922_s_at	XXF1	核RNA外輸送因子1	p < 0.000001	281.2	174.6	
227002_at	FAM78A	配列類似性所有群78、メンバーA	p < 0.000001	91.2	37.6	
226245_at	KCTD11	カリウムチャネル阻害体化ドメイン含有1	p < 0.000001	60.7	199.2	
227372_s_at	BALAP2L1	BALP-関連タンパク質2様1	p < 0.000001	23.6	245.8	
200650_s_at	PTPN22	タンパク質チロシンホスファターゼ、非レセプタータイプ22(リンバ)	p < 0.000001	64.3	15.6	
232523_at	MEGF10	マルチプルEGF様ドメイン10	p < 0.000001	119.6	11.1	
222592_s_at	PERP	PERP、TIF3アポトーシスコファクター	p < 0.000001	215.2	2349	
211178_s_at	PSTPIP1	プロリンセリンスレオニンホスファターゼ相互作用性タンパク質1	p < 0.000001	60.2	20	
204236_at	FLI1	フレンチドッグウイルス遺伝子1	p < 0.000001	79.7	16.6	
213290_at	COL6A2	コラーゲン、VI型、α1(II)鎖2	p < 0.000001	99.2	37.7	
203547_at	CD1	CD1分子	p < 0.000001	240.3	91.6	
205382_s_at	CFD	補体因子D(アジプシン)	p < 0.000001	601.4	81.6	
235553_at	ZFH1B	亜鉛フィンガーホモオボックス1b	p < 0.000001	35.6	12.2	
206120_at	CD83	CD83分子	p < 0.000001	93.6	40.2	
214181_x_at	IST1	白血球特異性転写因子1	p < 0.000001	242	62.5	