

(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2011-518313

(P2011-518313A)

(43) 公表日 平成23年6月23日 (2011.6.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	4 C O 8 4
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 C O 8 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-543128 (P2010-543128)	(71) 出願人	503115205
(86) (22) 出願日	平成21年1月13日 (2009.1.13)		ボード オブ トラスティーズ オブ ザ
(85) 翻訳文提出日	平成22年9月1日 (2010.9.1)		レランド スタンフォード ジュニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/000224		ユニバーシティ
(87) 国際公開番号	W02009/091547		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3
(87) 国際公開日	平成21年7月23日 (2009.7.23)		0 6 - 1 8 5 0, パロ アルト, エル カ
(31) 優先権主張番号	61/011, 324		ミーノ レアル 1 7 0 5
(32) 優先日	平成20年1月15日 (2008.1.15)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 急性骨髄性白血病幹細胞のマーカー

(57) 【要約】

急性骨髄性白血病幹細胞 (AMLSC) のマーカーが同定される。これらのマーカーは、正常な対応細胞と比べて差次的に発現され、診断標的および治療標的として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表1に示す差次的に発現されるマーカーまたはマーカーの組合せに対して特異的な反応物に、患者試料を接触させる段階；

マーカーを発現する癌細胞の数を定量する段階

を含む、患者に由来する急性骨髄性白血病を特徴付けるための方法であって、マーカーを発現する癌細胞の存在によりAML癌幹細胞の存在が示される、方法。

【請求項 2】

定量する段階がフローサイトメトリーによって実施される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

定量する段階が免疫組織化学によって実施される、請求項1記載の方法。

10

【請求項 4】

試料が血液試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

患者がAMLに罹患していると診断されている、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

患者がAMLの治療を受けている、請求項7記載の方法。

【請求項 7】

患者がヒトである、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

請求項1～7記載の方法のいずれかにおいて使用するためのキット。

20

【請求項 9】

AMLSCに対する有効性について化学療法候補作用物質をスクリーニングする方法であって、

該作用物質を、請求項1記載の細胞組成物または表1に示すポリペプチドと接触させる段階、および

AMLSCに対する該作用物質の有効性を判定する段階を含む、方法。

【請求項 10】

AML癌幹細胞をターゲティングするかまたは枯渇させる方法であって、

30

AMLSCをターゲティングするかまたは枯渇させるために、表1に示すマーカーまたはマーカーの組合せに特異的に結合する作用物質に、反応物血液細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 11】

作用物質が抗体である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

作用物質が、表1に示す2種のマーカーに結合する二重特異性抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

AMLを診断または病期分類するための方法であって、

40

表1に挙げたものより選択される遺伝子配列の発現の上方調節を測定する段階を含む、方法。

【請求項 14】

測定する段階が、子宮頸部細胞の試料中のmRNAまたはポリペプチドの量の増加または減少を検出することを含む、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

アレイへのハイブリダイゼーションによって発現が測定される、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

表1に示す2つまたはそれ以上の配列をアレイが含む、請求項15記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【背景技術】

【0001】

発明の背景

基本的な癌研究は、癌をもたらす遺伝的变化を特定することに焦点をあわせてきた。これにより、腫瘍形成および悪性転換に関与している分子経路および生化学的経路に関する我々の理解は大きく前進した。しかしながら、細胞生物学に関する我々の理解は遅れている。線維芽細胞または細胞株などのモデル細胞の増殖および生存に対する特定の変異の影響は予測できるものの、個々の癌に関与している実際の細胞に対するこのような変異の影響はほとんど当て推量である。

【0002】

腫瘍は、蓄積した変異を介して無限増殖能力を獲得した腫瘍形成性癌細胞によって開始される異常器官と考えることができる。腫瘍を異常器官とするこの観点から考えると、腫瘍が発生する方法をより良く理解するために正常幹細胞生物学の原理を適用することができる。多くの観察結果から、正常幹細胞と腫瘍形成性細胞の類似性が適切であることが示唆されている。正常幹細胞および腫瘍形成性細胞の両方とも、豊かな増殖能力および新しい(正常または異常)組織を生じる能力を有する。腫瘍および正常組織の両方とも、表現型特徴が異なり増殖能力が異なる細胞の異種性組合せから構成される。

【0003】

大半の腫瘍はクローン起源であるため、元の腫瘍形成性癌細胞は、無限増殖能力を有する癌細胞、ならびに増殖能力が限られた癌細胞または増殖能力の無い癌細胞を含む、表現型的に多様な子孫を生じる。このことから、腫瘍形成性癌細胞が、正常幹細胞の自己複製および分化に類似したプロセスを経ることが示唆される。腫瘍形成性細胞は、正常幹細胞が受けるものに類似した器官形成の異常かつ十分に調節されないプロセスを経る癌幹細胞と考えることができる。腫瘍の異種性の一部は、引き続き存在する変異誘発が原因で生じるが、異種性はまた、癌細胞の異常分化によって生じる可能性も高い。

【0004】

多くのタイプの腫瘍が異種表現型の癌細胞を含み、腫瘍が発生する元の組織において通常起こる分化の様相を反映していることが十分に実証されている。腫瘍中の癌細胞による正常分化マーカーの多様な発現から、腫瘍の異種性の一部は、腫瘍細胞の異常分化の結果として起こることが示唆される。この例には、慢性骨髄性白血病における骨髄系マーカーの多様な発現、末梢神経外胚葉性腫瘍内での神経細胞マーカーの多様な発現、および乳癌内での乳タンパク質またはエストロゲン受容体の多様な発現が含まれる。

【0005】

癌細胞のごく一部しか大規模に増殖できないことが、白血病および多発性骨髄腫に関して最初に大々的に実証された。白血病細胞間のクローン形成能の差は、正常造血細胞間のクローン形成能の差を反映するため、クローン原性白血病細胞が白血病性幹細胞として説明された。また、これらの細胞の表現型が異種性であること、ならびに培養状態およびインビボでクローン原性である細胞はわずかな割合であることも、固形癌に関して示されている。白血病性幹細胞の状況とちょうど同じように、これらの観察結果は、ごく少数の癌細胞のみが実際に腫瘍形成性であること、およびこれらの腫瘍形成性細胞が癌幹細胞の役割を果たすという仮説につながった。

【0006】

この仮説を裏付けるように、最近の研究では、白血病および他の血液学的悪性腫瘍と同様に、乳癌細胞の腫瘍形成性集団および非腫瘍形成性集団を細胞表面マーカーの発現に基づいて単離できることが示されている。乳癌の多くの症例において、ごく一部の細胞集団だけが、新しい腫瘍を形成する能力を有した。この研究は、乳癌におけるCSCの存在を強く裏付ける。固形腫瘍中に存在する癌幹細胞の存在に関するさらなる証拠が、中枢神経系(CNS)悪性腫瘍において見出されている。正常神経幹細胞を培養するために使用されるものと類似した培養技術を用いたところ、神経細胞CNS悪性腫瘍はインビトロでクローン原性であり、インビボで腫瘍を開始させる癌細胞の小集団を含むが、腫瘍中の残りの細胞は

10

20

30

40

50

これらの特性を有さないことが示された。

【0007】

幹細胞は、自己複製によって自身を永続化させ、分化によって特定の組織の成熟細胞を生成する能力を有する細胞と定義される。大半の組織では、幹細胞はまれである。結果として、幹細胞の特性を研究するには、幹細胞をプロスペクティブに同定し、慎重に精製しなければならない。おそらく、幹細胞の最も重要かつ有用な特性は、自己複製という特性である。この特性を通じて、幹細胞と癌細胞との著しい類似点を見出すことができる：腫瘍はしばしば正常幹細胞の形質転換から生じ得、類似したシグナル伝達経路が幹細胞および癌細胞の自己複製を調節し得、癌は、腫瘍形成を推進する自己複製能力が無限である珍しい細胞を含み得る。

10

【0008】

癌幹細胞の存在は、癌療法に強く関連する。現在のところ、腫瘍中の表現型的に多様な癌細胞のすべてが、あたかも無制限の増殖能力を有し、転移能力を獲得できるかのように扱われている。しかしながら、長年に渡って、少数の播種性癌細胞が、転移性疾患を決して発症しない患者の原発腫瘍から離れた部位で検出され得ることが認識されている。1つの可能性は、播種性癌細胞が検出可能な腫瘍を形成できるよりも前に播種性癌細胞を死滅させる免疫監視が著しく効果的であるというものである。別の可能性は、大半の癌細胞は新しい腫瘍を形成する能力を欠き、希少な癌幹細胞の播種のみが転移性疾患をもたらし得るというものである。そうであれば、治療法の目標は、この癌幹細胞集団を特定し死滅させることでなければならない。

20

【0009】

癌幹細胞のプロスペクティブな同定および単離により、幹細胞によって発現される診断マーカーおよび治療標的のより効率的な同定が可能になると考えられる。治療法は腫瘍塊を縮小する能力によって確認されるため、既存の治療法のほとんどは腫瘍細胞の大集団に対して開発されている。しかしながら、癌内部の大半の細胞の増殖能力は限定されているため、腫瘍を縮小する能力は主に、これらの細胞を死滅させる能力を反映している。癌幹細胞をより特異的に対象とする治療法は、より長持ちする応答および転移性腫瘍の治療をもたらす可能性がある。

【0010】

造血は、拘束度の高い前駆細胞を徐々に生じ、最終分化を遂げた血液細胞を最終的に生じる造血幹細胞(HSC)によって開始される、組織化された発生的階層制を経る(Bryder et al., 2006)。HSCの概念は新しいものではなかったが、1988年に初めて、蛍光活性化細胞選別(FACS)を用いて、細胞表面マーカーに基づいてマウス骨髄からこの集団をプロスペクティブに単離できることが示された(Spangrude et al., 1988)。その時以来、マウスHSCの表面免疫表現型は次第に改良され、その結果、非常に優れた感度で機能的HSCを単離して、細胞1.3個中1個という精度を得ることができる(Kiel et al., 2005)。マウスHSCをプロスペクティブに単離する我々の能力は過去20年間で劇的に向上したものの、ヒト造血系の最初期の事象に関する我々の理解は遥かに遅れている。

30

【0011】

癌幹細胞は、例えば、Pardal et al. (2003) Nat Rev Cancer 3, 895-902; Reya et al. (2001) Nature 414, 105-11; Bonnet & Dick (1997) Nat Med 3, 730-7; Al-Hajj et al. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100, 3983-8; Dontu et al. (2004) Breast Cancer Res 6, R605-15; Singh et al. (2004) Nature 432, 396-401において考察されている。

40

【0012】

多分化能前駆細胞を含むヒト臍帯血中の多分化能造血前駆細胞の階層の同定は、特に、多分化能前駆細胞を同定するマーカーの教示に関して、参照により本明細書に具体的に組み入れられるMajeti et al. (2007) Cell Stem Cell 1(6):635-45において見出すことができる。

【発明の概要】

50

【0013】

急性骨髄性白血病幹細胞(AMLSC)のマーカーが本明細書において提供される。これらのマーカーは、正常な対応細胞と比べてAMLSCにおいて差次的に発現されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。マーカーの使用には、治療的抗体またはリガンドに対する標的としての使用、薬物開発のための標的としての使用、およびAMLSC細胞集団の同定または選択のための使用が含まれる。

【0014】

AMLSCマーカーは、新規の急性骨髄性白血病、再発した急性骨髄性白血病、または難治性急性骨髄性白血病の患者を治療するための治療的モノクローナル抗体の標的として有用である。このようなモノクローナル抗体はまた、慢性骨髄性白血病、真性赤血球増加症、本態性血小板増加症、ならびに特発性の骨髄線維症および骨髄化生などを含む、骨髄異形成症候群(MDS)および骨髄増殖性障害(MPD)などの前白血病状態の治療において有用である。抗体には、遊離抗体およびそれに由来する抗原結合断片、ならびに結合体、例えば、ペグ化抗体、薬物結合体、放射性同位体結合体、または毒素結合体などが含まれる。

10

【0015】

いくつかの態様において、モノクローナル抗体の組合せが、ヒトAMLまたは前白血病状態の治療において使用される。1つの態様において、CD47に対するモノクローナル抗体、例えば、CD47とSIRP α の相互作用をブロックする抗体は、1種または複数種のその他のAMLSCマーカー、例えば、CD96、CD97、CD99、CD180、PTHR2、およびHAVCR2(TIM3とも呼ばれる)などに対するモノクローナル抗体と組み合わせられ、この組成物は、単一の抗体の使用と比べると、AML LSCの食作用および排除を強化する際に相乗的であり得る。

20

【0016】

これらのAMLSCマーカーは、急性骨髄性白血病患者または上記に概説した前白血病状態の患者に自家移植するにあたって使用するための自己由来幹細胞産物(動員された末梢血または骨髄)をエクスピボで浄化する際に使用するためのモノクローナル抗体の標的として有用である。前述したように、AML LSCに特異的な細胞表面分子に対するモノクローナル抗体の組合せは、LSCを排除する際に相乗的であり得る。

【0017】

AMLSCマーカーは、限定されるわけではないが、血液標本および/または骨髄標本からのAMLまたは前白血病状態の一次診断、脳脊髄液および他の体液の白血病転移(involverment)の評価、間欠期の疾患進行のモニタリング、ならびに微小残存病変状態のモニタリングを含む、臨床的診断用途において有用である。

30

【0018】

モノクローナル抗体の代替物として、AMLSCマーカーのリガンドを、単一の作用物質としてまたは組み合わせで使用して、AMLまたは上記に概説した前白血病状態においてそれらをターゲティングすることができる。患者に直接投与するためまたは自己由来幹細胞産物をエクスピボで浄化するために、リガンドは、遊離でもよく、または結合されていてもよい。いくつかの特異的な分子およびそれらのリガンドには、限定されるわけではないが、CD96に結合するCD155-Fc融合タンパク質;PTHR2に結合するTIP39;HAVCR2に結合するガレクチン-9が含まれる。

40

【0019】

AMLSC細胞は、原発腫瘍試料からプロスペクティブに単離または同定され得、癌幹細胞の自己複製および分化に関する機能的アッセイ法において癌幹細胞の独特な特性を有する。

【0020】

本発明のいくつかの態様において、白血病中に存在する幹細胞に基づいて、急性骨髄性白血病を検出、分類、または臨床的病期分類するための方法が提供され、その際、幹細胞の数が多いほど、より侵襲性の高い癌表現型を示す。病期分類は予後および治療のために有用である。いくつかの態様において、腫瘍試料は、免疫組織化学およびインサイチューハイブリダイゼーションなどを含む組織化学によって、本明細書において提供される1種

50

または複数種のAMLSCマーカーを発現するCD34⁺CD38⁻細胞の存在について解析される。このような細胞の存在は、AMLSCの存在を示唆する。

【0021】

本発明の別の態様において、AMLSCを単離するための方法であって、候補細胞集団を本明細書において提供される1種または複数種のAMLSCマーカーに特異的な結合反応物と接触させる段階、およびそれらの反応物に結合した細胞を選択する段階を含む方法が提供される。これらの細胞は、CD34⁺CD38⁻としてさらに選択してもよい。これらの細胞は、実験的評価のため、ならびにこれらの細胞で特異的に発現される遺伝子を同定する際に有用なmRNA種を含む系統および細胞に特異的な産生物の供給源として、ならびにそれらに影響を及ぼし得る因子または分子を発見するための標的として、有用である。AMLSCは、例えば、細胞に対する影響に基づいて化合物をスクリーニングする方法において使用され得る。これは、その化合物を本発明の細胞集団と組み合わせること、次いで、その化合物に起因する任意の調節的効果を測定することを含む。これは、生存力、毒性、代謝変化、または細胞機能に対する影響に関する細胞の検査を含んでよい。本明細書において説明するAMLSCの表現型により、疾患の進行、再発、および薬物耐性の発達を予測する手段が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】AML LSCと正常骨髄のHSCおよびMPPとの差次的な遺伝子発現。(A)骨髄HSC(n=4)とAML LSC(n=9)または骨髄MPP(n=4)とAML LSC(n=9)とで少なくとも2倍差次的に発現されることが判明した遺伝子を示すヒートマップ。遺伝子の中央値に対する発現を示す(p<0.05、FDR 5%)。(B)MPPまたはHSCよりもAML LSCにおいて少なくとも2倍高発現されることが判明した膜貫通型タンパク質の選別リスト。NS:有意ではない。

20

【図2】CD47はAML LSCにおいての方が高発現される。動員された末梢血(MPB)HSCおよびAML LSCのCD47発現をフローサイトメトリーによって検査した。(A)アイソタイプ対照と比べたCD47発現を示す代表的なフローサイトメトリープロット。(B)分析した全試料におけるCD47発現の要約。平均値を表示している。

30

【図3】抗CD47抗体は、初代ヒトAML LSCのインビトロでのマクロファージ食作用を刺激する。2つの初代ヒトAML試料からFACSによってAML LSCを精製し、蛍光色素CFSEで標識し、アイソタイプ対照抗体(A)または抗CD47抗体(B)の存在下でマウス骨髄由来マクロファージと共にインキュベートした。免疫蛍光顕微鏡検査法により、蛍光標識したLSCがマクロファージ内部に存在するかどうかこれらの細胞を評価した。(C)マクロファージ100個当たりの摂取された細胞の数を算出することによって、各条件における食作用指数を決定した。

【図4】抗CD47抗体は、初代ヒトAML LSCのインビトロでのマクロファージ食作用を刺激する。初代ヒトAML試料2つからFACSによってAML LSCを精製し、蛍光色素CFSEで標識した。アイソタイプを一致させた対照抗体(左)または抗CD47抗体(右)の存在下で、これらの細胞をマウス骨髄由来マクロファージと共にインキュベートした。マクロファージを回収し、蛍光標識した抗マウスマクロファージ抗体で染色し、フローサイトメトリーによって解析した。mMac+CFSE+という二重陽性事象によって、CFSEで標識したLSCを貪食したマクロファージが確認される。(A、B)2つの独立した初代AML LSC試料。

40

【図5】抗CD47抗体は、初代ヒトAMLのインビボでの生着を阻害する。新生仔NOGマウスに移植する前に、2つの初代ヒトAML試料を、処理しないか(対照、n=3)、または抗ヒトCD47抗体(抗CD47、n=6)でコーティングした。13週後、マウスを屠殺し、ヒトCD45+CD33+骨髄性白血病細胞の存在についてフローサイトメトリーによって骨髄を解析した。

【図6】図6A~B。正常HSCと比べた、AML LSCにおけるCD99発現。正常ヒト骨髄HSC(n=3)および新規なヒトAML LSC(n=7)のいくつかの試料においてCD99発現を検査した。HSCおよびLSCにおけるCD99発現の代表的なヒストグラム(左)および全標本の正規化した平均蛍光強度(MFI)の要約(右)を示す。AML LSCにおける平均CD99発現はHSCと比べて5.6倍に増大していた(p=0.05)。

50

【図 7】図7A～B。正常HSCと比べた、AML LSCにおけるCD97発現。正常ヒト骨髄HSC(n=3)および新規なヒトAML LSC(n=7)のいくつかの試料においてCD97発現を検査した。HSCおよびLSCにおけるCD97発現の代表的なヒストグラム(左)および全標本の正規化した平均蛍光強度(MFI)の要約(右)を示す。AML LSCにおける平均CD97発現はHSCと比べて7.9 倍に増大していた (p=0.03)。

【図 8】図8A～B。正常HSCと比べた、AML LSCにおけるCD180発現。正常ヒト骨髄HSC(n=3)および新規なヒトAML LSC(n=7)のいくつかの試料においてCD180発現を検査した。HSCおよびLSCにおけるCD180発現の代表的なヒストグラム(左)および全標本の正規化した平均蛍光強度(MFI)の要約(右)を示す。AML LSCにおける平均CD180発現はHSCと比べて60倍に増大していた (p=0.20)。

【図 9】図9A～B。正常HSCと比べた、AML LSCにおけるTIM3発現。正常ヒト骨髄HSC(n=3)および新規なヒトAML LSC(n=14)のいくつかの試料においてTIM3発現を検査した。HSCおよびLSCにおけるTIM3発現の代表的なヒストグラム(左)および全標本の正規化した平均蛍光強度(MFI)の要約(右)を示す。AML LSCにおける平均TIM3発現はHSCと比べて9倍に増大していた (p=0.01)。

【図 10】正常HSCと比べた、AML LSCにおけるPTH2R発現。正常ヒト骨髄HSC(n=3)および新規なヒトAML LSC(n=9)のいくつかの試料においてPTH2R発現を検査した。qRT-PCRによって発現を測定し、対照としての β -アクチンを基準として表す。AML LSCにおける平均PTH2R発現はHSCと比べて21倍に増大していた (p<0.001)。

【発明を実施するための形態】

【0023】

態様の詳細な説明

本発明は、急性骨髄性白血病幹細胞(AMLSC)において差次的に発現されるポリヌクレオチド、ならびにそれにコードされるポリペプチドを同定する。ひとまとめにしてAMLSCマーカーと呼ぶことができるこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドが、癌細胞の増殖を検出、評価、および低減するために使用される方法が提供される。方法は、1つのマーカーまたはマーカーの組合せを使用してよく、その際、組合せは、2つ、3つ、またはそれ以上のマーカーを含んでよく、いくつかの態様において、1つ、2つ、またはそれ以上のマーカーと組み合わせてCD47を含む。本発明は、白血病状態および前白血病状態の予防、治療、検出、または調査に使用される。

【0024】

いくつかの態様において、本発明のマーカーはAMLSC細胞表面で発現される。いくつかの態様において、マーカーは、対応物である非形質転換細胞、例えば、ヒト造血幹細胞、および/またはヒト造血性多分化能前駆細胞の発現レベルの少なくとも2倍のレベルで発現され、その際、発現は、転写、mRNA蓄積、および/またはタンパク質蓄積のレベルとして測定され得る。他の態様において、マーカーは、対応物である非形質転換細胞の発現レベルより少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍またはそれ以上のレベルで発現される。

【0025】

本発明は、発現プロファイルに基づいて癌を診断し、白血病状態および前白血病状態を分類および治療する際に、本明細書において説明するマーカーを使用する方法を提供する。これらの方法は、AMLSCを検出するため、対象におけるAMLおよび癌の重症度(例えば、腫瘍グレードおよび腫瘍量など)の診断を容易にするため、対象の予後の判定を容易にするため、ならびに治療法に対する対象の応答性を評価するために有用である。本発明の検出方法は、インビトロもしくはインビボで、単離した細胞において、または組織全体もしくは体液、例えば、血液試料およびリンパ節生検試料などにおいて実施することができる。

【0026】

本明細書において使用される場合、「癌幹細胞において差次的に発現される遺伝子」および「癌幹細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチド」という用語は本明細書に

10

20

30

40

50

において同義的に使用され、一般に、癌性ではない同じ細胞型の細胞と比べた場合、癌幹細胞において差次的に発現される遺伝子に相当または対応するポリヌクレオチドを意味し、例えば、mRNAは、少なくとも約25%、少なくとも約50%～約75%、少なくとも約90%、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、または少なくとも約50倍もしくはそれ以上異なる(例えば、高いまたは低い)レベルで存在する。AMLSCと正常対応細胞であるヒト造血幹細胞(HSC)(限定されるわけではないが、表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺または表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻を有する細胞が含まれる)およびヒト造血性多分化能前駆細胞(MPP)(限定されるわけではないが、表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺または表現型Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻を有する細胞が含まれる)とを比較することができる。「癌幹細胞のポリペプチドマーカー」という用語は、癌幹細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを意味する。

10

【0027】

本発明のいくつかの態様において、上記に定義したように、これらのマーカーはヒトHSCまたはMPPと比べた場合、AMLSCの大多数に存在することがフローサイトメトリーによって実証されている。このようなマーカーにはCD47、CD96、CD97、およびCD99が非限定的に含まれる。

【0028】

本発明の他の態様において、マーカーはヒトHSCにもヒトMPPにも存在しないが、AMLSCで高発現される。このようなマーカーには、表1に示すものが非限定的に含まれる。

20

【0029】

他の態様において、これらのマーカーは、ヒトHSCまたはMPPと比べた場合、AMLSCにおいて差次的に発現される。このようなマーカーには、表1に示すものが非限定的に含まれる。

【0030】

遺伝子に対応または相当するポリヌクレオチドまたは配列とは、そのポリヌクレオチドの配列の少なくとも一部分がその遺伝子または核酸遺伝子産物(例えば、mRNAもしくはcDNA)中に存在することを意味する。対象核酸はまた、ポリヌクレオチドが遺伝子に対応または相当する場合には、そのポリヌクレオチドに基づいて「同定」され得る。ポリヌクレオチドに基づいて同定される遺伝子は、その遺伝子のゲノム配列のエキソン内に全体が存在する同定(identifying)配列の全体もしくは一部分を有してよく、または、ポリヌクレオチド配列の別の部分が別のエキソン中に(例えば、連続したポリヌクレオチド配列が、スプライシングの前または後のいずれかに、遺伝子の発現産物であるmRNA中に存在するように)存在してもよい。「同定配列」とは、ポリヌクレオチド配列またはその相補物を一意的に同定するかまたは定める、連続したヌクレオチドからなる配列の最小断片である。

30

【0031】

ポリヌクレオチドは、正常細胞と比べて癌幹細胞(CSC)において改変されている遺伝子に相当または対応し得る。CSC中の遺伝子は、ポリヌクレオチドに対する欠失、置換、または転位を含んでよく、かつ、改変された調節配列を有してよく、または、例えばスプライス変異遺伝子産物をコードしてよい。CSC中の遺伝子は、内在性レトロウイルス、転位因子、または他の天然もしくは非天然の核酸の挿入によって改変され得る。

40

【0032】

関心対象の配列には、表1に示すものが含まれ、これらは正常対応細胞と比べてAMLSCにおいて差次的に発現される。

【0033】

また、第一の分類によって、かつその情報に基づいて治療法を最適化して、望ましくない毒性を最小限に抑えつつ、望ましくない標的細胞への抗増殖治療薬の送達を最適化する適切な治療法、用量、治療様式などを選択するための方法も提供される。治療は、有効な抗増殖活性を提供しつつ望ましくない毒性を最小限に抑える治療薬を選択することによって最適化される。

50

【0034】

本発明は、急性骨髄性白血病の予防、治療、検出、または調査に使用される。急性白血病は、造血幹細胞の悪性転換の結果として現れるクローンの芽細胞による正常骨髄の置換を特徴とする、急速に進行する白血病である。急性白血病には、急性リンパ芽球性白血病(ALL)および急性骨髄性白血病(AML)が含まれる。ALLはCNSにしばしば影響を与えるのに対し、急性単芽球性白血病は歯肉に影響を与え、AMLは任意の部位に局在した集団に影響を与える(顆粒球性肉腫または緑色腫)。AMLは成人を襲う最も一般的な急性白血病であり、その発病率は年齢とともに高まる。AMLは全体としては比較的珍しい疾患であり、米国における癌による死亡の約1.2%を占めるが、その発病率は人口が高齢化するにつれて上昇すると予想されている。

10

【0035】

通常、主症状は非特異的であり(例えば、疲労、発熱、倦怠感、体重減少)、正常な造血の失敗を反映する。貧血および血小板減少症が非常によく起こる(75~90%)。WBC計数値は減少するか、正常であるか、または増加し得る。WBC計数値が著しく減少していなければ、芽細胞は通常、血液塗抹標本中に存在する。ALLの芽球は、組織化学的研究、細胞遺伝学、免疫表現型検査、および分子生物学的研究によってAMLの芽球と区別することができる。通常の染色剤、ターミナルトランスフェラーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、Sudan black B、ならびに特異的エステラーゼおよび非特異的エステラーゼを用いたスメア検査に加えられる。

20

【0036】

「診断」とは、本明細書において使用される場合、疾患または障害に対する対象の罹病性の判定、対象が疾患または障害に現在冒されているかどうかの判定、疾患または障害に冒された対象の予後(例えば、癌状態、癌の病期、または治療法に対する癌の応答性の特定)、および治療測定学(therametrics)の使用(例えば、治療法の効果または有効性に関する情報を提供するための対象の状態のモニタリング)を一般に含む。

【0037】

「生物試料」という用語は、生物から得られる様々な試料タイプを包含し、診断的アッセイ法またはモニタリングアッセイ法において使用することができる。この用語は、血液試料および生物に由来する他の液体試料、固形組織試料、例えば、生検標本もしくは組織培養物またはそれに由来する細胞およびその子孫を包含する。この用語は、調達後に任意の方法で、例えば、試薬による処理、可溶化、または特定の成分の濃縮によって操作された試料を包含する。この用語は臨床試料を包含し、また、細胞培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生物学的流体、および組織試料も含む。

30

【0038】

「治療」、「治療すること」、および「治療する」などの用語は、所望の薬理学的効果および/または生理的効果を得ることを一般に意味するために本明細書において使用される。この効果は、疾患もしくはその症状を完全もしくは部分的に予防するという点で予防的であってよく、かつ/または、疾患および/もしくは疾患に起因しうる有害作用に対する部分的もしくは完全な安定化もしくは治癒という点で治療的であってよい。本明細書において使用される「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、(a)疾患もしくは症状に罹患しやすい可能性があるが、それを有するとまだ診断されていない対象において疾患もしくは症状が起こるのを防止すること;(b)疾患症状を抑制すること、すなわち、その発達を阻止すること;または(c)疾患症状を緩和すること、すなわち、疾患もしくは症状の退行を引き起こすこと、を含む。

40

【0039】

「個体」、「対象」、「宿主」、および「患者」という用語は、本明細書において同義的に使用され、診断、治療、または治療法が望まれる任意の哺乳動物対象、特にヒトを意味する。

【0040】

「宿主細胞」は、本明細書において使用される場合、組換えベクターまたは他の移入が

50

リヌクレオチドのレシピエントとして使用され得るか、または使用された、単細胞実体として培養される微生物または真核細胞もしくは真核細胞株を意味し、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を含む。天然、偶発的、または意図的な変異が原因で、単一の細胞の子孫の形態またはゲノム相補物もしくは全DNA相補物が元の親と必ずしも完全に同一ではない場合があることが理解されよう。

【0041】

「癌」、「新生物」、「腫瘍」、および「癌腫」という用語は、本明細書において同義的に使用され、比較的自律的な増殖を示し、その結果、細胞増殖制御の著しい低下を特徴する異常増殖表現型を示す細胞を意味する。一般に、本出願における検出または治療のための関心対象の細胞には、前癌性(例えば良性)細胞、悪性細胞、前転移性細胞、転移性細胞、および非転移性細胞が含まれる。癌性細胞の検出は、特に関心対象である。「正常細胞」の文脈で使用される「正常」という用語は、形質転換されていない表現型の細胞、または検査される組織型の非形質転換細胞の形態を示す細胞を意味することを意図している。「癌性表現型」とは、一般に、癌のタイプによって変化し得る、癌性細胞に特徴的である様々な生物学的現象のいずれかを意味する。一般に、癌性表現型は、例えば、細胞の成長もしくは増殖の異常(例えば、制御不能な成長もしくは増殖)、細胞周期の調節の異常、細胞運動性の異常、細胞間相互作用の異常、または転移などに基づいて確認される。

10

【0042】

「治療的標的」とは、(例えば、発現および生物活性などの調整によって)その活性を調整すると、癌性表現型が調整され得る遺伝子または遺伝子産物を意味する。全体を通して使用されるように、「調整」とは、指定された現象の増加または減少を意味することを意図している(例えば、生物活性の調整とは、生物活性の増加または生物活性の減少を意味する)。

20

【0043】

急性骨髄性白血病

急性骨髄性白血病(Acute Myelocytic Leukemia)(AML、Acute Myelogenous Leukemia; Acute Myeloid Leukemia)。AMLでは、異常に分化した長命の骨髄系前駆細胞の悪性転換および制御不能な増殖の結果、未熟な血液形態の数が循環血中で多くなり、正常骨髄が悪性細胞によって置換される。症状には、疲労、蒼白、挫傷および出血しやすくなること、発熱、ならびに感染が含まれ;白血病浸潤の症状(多くの場合、皮膚症状として)は患者の約5%にしか存在しない。末梢血塗抹標本および骨髄の検査は診断的である。治療には、寛解を実現するための導入化学療法および再発を回避するための寛解後化学療法(幹細胞移植を併用または併用しない)が含まれる。

30

【0044】

AMLにはいくつかの亜型があり、これらは、形態、免疫表現型、および細胞化学の点で互いから区別される。顕著な細胞型に基づいて5つのクラスが説明されており、骨髄性、骨髄性単球性、単球性、赤血球性、および巨核球性が含まれる。急性前骨髄球性白血病は、特に重要な亜型であり、AMLの全症例の10~15%を占め、若年齢群(年齢中央値31歳)および特定の民族性(ラテンアメリカ系)を襲い、患者は一般に凝血障害を示す。

40

【0045】

寛解導入率は50~85%に及ぶ。報告によれば、長期の無病生存は、患者の20~40%で起こり、幹細胞移植で治療した若年患者では40~50%に上昇する。

【0046】

予後因子は、治療のプロトコールおよび強さを決定するのに助ける;予後特徴が著しく不良である(negative)患者には、潜在的利益が治療毒性の増大を正当化すると考えられるため、より強い形態の治療法が通常施される。最も重要な予後因子は白血病細胞核型である;好ましい核型には、t(15;17)、t(8;21)、およびinv16(p13;q22)が含まれる。負の因子には、加齢、先行する脊髄形成異常段階、二次性白血病、高いWBC計数値、およびアウエル小体の欠如が含まれる。FAB分類またはWHO分類は単独では応答を予測していない。

50

【0047】

初期療法は、寛解を導入しようとするが、AMLは応答する薬物が少ないため、ALLとは大きく異なる。基本的な導入治療プログラムは、5～7日間の持続的IV輸注または高用量によるシタラピンを含む；この期間中、ダウノルビシンまたはイダルビシンが3日間IV投与される。いくつかの治療プログラムは、6-チオグアニン、エトポシド、ビンクリスチン、およびプレドニゾンを含むが、それらの寄与は不明である。通常、治療により、感染症または出血を伴う顕著な骨髄抑制が起こる；骨髄回復の前にかかなりの潜伏期がある。この期間中、注意深い予防的かつ支持的な治療が不可欠である。

【0048】

ポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列ならびに抗体

本発明は、ヒトAMLSCにおいて差次的に発現される遺伝子に相当するポリヌクレオチドおよびポリペプチドを提供する。これらのポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびそれらの断片には、限定されるわけではないが、診断用のプローブおよびプライマー、プローブおよびプライマーの出発原料、癌の診断および治療法において有用な抗体に対する免疫原、ならびに本明細書において説明する同種のものが含まれる用途がある。

【0049】

核酸組成物には断片およびプライマーが含まれ、これらは、少なくとも約15bp長、少なくとも約30bp長、少なくとも約50bp長、少なくとも約100bp、少なくとも約200bp長、少なくとも約300bp長、少なくとも約500bp長、少なくとも約800bp長、少なくとも約1kb長、少なくとも約2.0kb長、少なくとも約3.0kb長、少なくとも約5kb長、少なくとも約10kb長、少なくとも約50kb長であり、通常、約200kb長未満である。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドの断片は、ポリヌクレオチドのコード配列である。また、本明細書において提供される配列の変異体または縮重変異体も含まれる。一般に、本明細書において提供されるポリヌクレオチドの変異体は、スミス-ウォーターマンホモロジー検索アルゴリズムをMPSRCHプログラム(Oxford Molecular)で実施して測定した場合に、提供される配列の同一サイズの断片と比べて、少なくとも約65%を上回る、少なくとも約70%を上回る、少なくとも約75%を上回る、少なくとも約80%を上回る、少なくとも約85%を上回る、もしくは少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%を上回る、またはそれ以上(すなわち100%)である配列同一性の断片を有する。配列類似性を有する核酸は、低ストリンジエンシー条件下、例えば、50、10×SSC(0.9M生理食塩水/0.09Mクエン酸ナトリウム)でのハイブリダイゼーションによって検出することができ、これらは、1×SSC中55での洗浄に供した場合に、結合されたままである。配列同一性は、高ストリンジエンシー条件下、例えば、50またはそれ以上、0.1×SSC(9mM生理食塩水/0.9mMクエン酸ナトリウム)でのハイブリダイゼーションによって測定することができる。ハイブリダイゼーションの方法および条件は当技術分野において周知であり、例えば、米国特許第5,707,829号を参照されたい。提供されるポリヌクレオチド配列と実質的に同一である核酸、例えば、対立遺伝子変異体、遺伝子の遺伝的に改変された変種などは、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で、提供されるポリヌクレオチド配列に結合する。

【0050】

本明細書において説明するポリヌクレオチドに特異的なプローブは、本明細書において開示するポリヌクレオチド配列を用いて作製することができる。これらのプローブは通常、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列の断片である。これらのプローブは化学合成することができるか、または制限酵素を用いて、より長いポリヌクレオチドから作製することができる。プローブは、例えば、放射性タグ、ビオチン標識タグ、または蛍光タグで標識することができる。好ましくは、プローブは、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列のいずれか一つの同定配列に基づいて設計される。

【0051】

本明細書において説明する核酸組成物は、例えば、ポリペプチドを作製するために、生物試料(例えば、ヒト細胞の抽出物)中のmRNAまたはそのような試料から作製されたcDNAを検出するためのプローブとして、ポリヌクレオチドのさらなるコピーを生成させるために、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製するために、および一本鎖DN

10

20

30

40

50

Aプローブとして、または三重鎖を形成するオリゴヌクレオチドとして、使用することができる。

【0052】

本明細書において説明するプローブは、例えば、試料中の本明細書において提供されるポリヌクレオチドまたはその変異体のいずれか一つの存在または不在を判定するために使用することができる。これらの用途および他の用途を下記により詳細に説明する。1つの態様において、リアルタイムPCR解析を用いて遺伝子発現を解析する。

【0053】

本発明によって企図されるポリペプチドには、開示されるポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドが対応する遺伝子、ならびに、遺伝コードの縮重が原因で、開示されるポリヌクレオチドと配列が同一ではない核酸にコードされるものが含まれる。本発明によって企図されるその他のポリペプチドには、配列リストのポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドが含まれる。したがって、本発明は、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列のいずれか一つの配列を有するポリヌクレオチドまたはその変異体にコードされるポリペプチドをその範囲内に含む。

【0054】

概して、本明細書において使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、列挙されたポリヌクレオチドにコードされる完全長ポリペプチドと列挙されたポリヌクレオチドによって表される遺伝子にコードされるポリペプチドの両方、ならびにそれらの一部分または断片を意味する。また、「ポリペプチド」は、天然タンパク質の変異体も含み、このような変異体は、天然タンパク質と相同または実質的に同様であり、天然タンパク質と同じまたは異なる種に由来してよい。一般に、変異体ポリペプチドは、本明細書において説明する差次的に発現されるポリペプチドと少なくとも約80%、通常、少なくとも約90%、およびさらに普通には少なくとも約98%の配列同一性を有する配列を有する。変異体ポリペプチドは、天然にまたは非天然にグリコシル化されていてよい。すなわち、ポリペプチドは、天然に存在する対応するタンパク質において見出されるグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有する。

【0055】

本明細書において開示するポリペプチドの断片、特に生物学的に活性な断片、および/または機能的ドメインに対応する断片が、関心対象である。関心対象の断片は、典型的には、少なくとも約10アミノ酸長~少なくとも約15アミノ酸長であり、通常、少なくとも約50アミノ酸長であり、300アミノ酸長ほどの長さまたはそれより長くてもよいが、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列のいずれか一つの配列を有するポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドまたはそのホモログに同一であるアミノ酸ストレッチを断片が有すると考えられる約1000アミノ酸長を通常は超えない。例えば、「少なくとも20アミノ酸長」の断片は、例えば、寄託ライブラリーに含まれるcDNAクローン中のcDNAまたはその相補鎖にコードされるポリペプチドに由来する20個またはそれ以上の連続したアミノ酸を含むと意図される。この文脈において、「約」は、具体的に挙げた値またはアミノ酸数個(5個、4個、3個、2個、もしくは1個)分大きいもしくは小さい値を含む。本明細書において説明するタンパク質変異体は、本発明の範囲内のポリヌクレオチドにコードされる。遺伝コードを用いて、対応する変異体を構築するのに適切なコドンを選択することができる。これらのポリヌクレオチドを用いてポリペプチドを作製することができ、前述および後述の公知の方法により、これらのポリペプチドを用いて抗体を作製することができる。

【0056】

本発明のポリペプチドは、硫酸沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましく

は、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)を精製のために使用する。

【0057】

ポリペプチドはまた、直接単離されたか培養されたかを問わず、体液、組織、および細胞を含む天然供給源から精製された産生物;化学合成手順による生成物;ならびに、例えば、細菌細胞、酵母高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む原核性宿主または真核性宿主から組換え技術によって産生させた産生物、から回収することができる。

【0058】

ポリペプチド、mRNA(特に、独特の二次構造および/または三次構造を有するmRNA)、cDNA、または完全な遺伝子を含む遺伝子産物を調製し、実験目的、診断目的、および治療目的のための抗体を産生させるために使用することができる。AMLSC細胞または亜型を同定するために抗体を使用することができる。本明細書において説明するようにして、ポリヌクレオチドまたは関連cDNAを発現させ、抗体を調製する。これらの抗体は、そのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチド上のエピトープに特異的であり、細胞調製物もしくは組織調製物中、またはインビトロ発現系の無細胞抽出物中の対応する未変性タンパク質を沈殿させるか、またはそれに結合することができる。

【0059】

抗体は、細胞および生物試料の免疫表現型検査のために使用することができる。差次的に発現された遺伝子の翻訳産物はマーカーとして有用である場合がある。特異的エピトープまたはエピトープの組合せに対するモノクローナル抗体により、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングが可能になる。モノクローナル抗体を用いて様々な技術を利用して、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングすることができ、これらの技術には、抗体でコーティングした磁性ビーズを用いた磁気分離、固体マトリックス(すなわちプレート)に結合させた抗体を用いた「パンニング」、およびフローサイトメトリーが含まれる(例えば、米国特許第5,985,660号およびMorrison et al. Cell, 96:737-49 (1999)を参照されたい)。これらの技術により、生検標本の免疫組織化学において;ならびに、癌細胞によって血液および他の生物学的流体中に放出されるマーカーの存在を検出する際に、細胞の特定の集団をスクリーニングすることが可能になる。

【0060】

多くの態様において、対象の遺伝子または遺伝子産物のレベルが測定される。測定するとは、直接的(例えば、遺伝子産物の絶対的レベルを決定もしくは推定することによって)または第2の対照生物試料にレベルを比較することによって相対的に、第1の生物試料中の遺伝子産物のレベルを定性的または定量的に推定することを意味する。多くの態様において、第2の対照生物試料は、癌に罹患していない個体から得られる。当技術分野において理解されるように、遺伝子発現の標準的な対照レベルが一度公知になると、比較用の標準としてそれを繰り返し使用することができる。他の対照試料には癌組織の試料が含まれる。

【0061】

これらの方法を用いて、癌細胞において差次的に発現される遺伝子のmRNAレベルを検出および/または測定することができる。いくつかの態様において、これらの方法は、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、本明細書において説明する差次的に発現される遺伝子に対応するポリヌクレオチドと試料を接触させる段階;および、もしあればハイブリダイゼーションを検出する段階を含む。適切な対照と比べた場合に差次的なハイブリダイゼーションの検出は、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドが試料中に存在することを暗示する。適切な対照には、例えば、癌細胞において差次的に発現されるポリヌクレオチドを含まないことが公知である試料が含まれる。ハイブリダイゼーションを可能にする条件は当技術分野において公知であり、上記でより詳細に説明した。

【0062】

また、適切に標識したポリヌクレオチドを用いて、限定されるわけではないが、インサイチュハイブリダイゼーション、PCR(polymerase chain reaction)、RT-PCR(reverse transcription-PCR)、および「ノーザン」プロット法もしくはRNAプロット法、アレイ、マ

マイクロアレイなど、またはこのような技術の組合せを含む任意の公知の方法によって検出を遂行することもできる。ポリヌクレオチドに対する様々な標識および標識方法が当技術分野において公知であり、本発明のアッセイ方法において使用することができる。特異的ハイブリダイゼーションは、適切な対照と比較することによって判定することができる。

【0063】

例えば、マイクロアレイ形式、ノーザンブロットなどにおいて、標識された核酸プローブを用いて、提供されるポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出することができる。ハイブリダイゼーションの量を定量して、例えば特定の条件下での発現の相対量を決定することができる。プローブは、発現を検出するための細胞へのインサイチューハイブリダイゼーションのために使用される。また、プローブは、ハイブリダイズする配列を診断用に検出するためにインビボで使用することもできる。プローブは放射性同位体で標識してよい。発色団、蛍光体、および酵素など他のタイプの検出可能標識を使用することもできる。

【0064】

ポリヌクレオチドアレイは、試料中の多数のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを分析できるハイスループットな技術を提供する。この技術は、差次的な発現を試験するための道具として使用することができる。アレイを作製する様々な方法、ならびにこれらの方法の変形法が当技術分野において公知であり、本発明で使用するために企図される。例えば、結合されたプローブを有する二次元のマトリックスまたはアレイ中の基板(例えば、ガラス、ニトロセルロースなど)上にポリヌクレオチドプローブをスポットすることによってアレイを作り出すことができる。プローブは、共有結合または非特異的な相互作用、例えば疎水性相互作用のいずれかによって基板に結合され得る。

【0065】

急性骨髄性白血病幹細胞の特徴付け

急性骨髄性白血病において、癌幹細胞の特徴付けにより、この決定的に重要な細胞集団、特にそれらの自己複製能力を特異的にターゲティングする新しい治療薬の開発が可能になって、より有効な治療法が得られる。

【0066】

ヒト急性骨髄性白血病において、自己複製能力と分化能力の両方を備えた腫瘍形成性癌細胞の部分集団が存在することが本明細書において示される。これらの腫瘍形成性細胞は腫瘍維持を担っており、また、腫瘍形成性ではない異常に分化する子孫を多数生じ、したがって、癌幹細胞の基準を満たす。腫瘍形成能力は、本発明のマーカーを差次的に発現する癌細胞の部分集団に含まれる。

【0067】

本発明のいくつかの態様において、AML癌細胞の総数と比べて患者試料中のAMLSCの数を測定し、その際、AMLSCの比率が高いことは、癌表現型を有する細胞の継続的な自己複製能力を示す。患者試料中のAMLSCの定量は、参照集団、例えば、血液試料、寛解患者試料などの患者試料と比較することができる。いくつかの態様において、AMLSCの定量は、治療過程の間に実施され、AML癌細胞の数およびAMLSCであるそのような細胞の百分率が、治療法の過程の前、間、およびその追跡検査として定量される。望ましくは、癌幹細胞をターゲティングする治療法により、患者試料中のAMLSCの総数および/または百分率が減少する。

【0068】

本発明の他の態様において、抗癌剤は、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに特異的に結合することによってAMLSCをターゲティングする。このような態様において、抗癌剤には、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに特異的な抗体およびその抗原結合派生物が含まれ、これらは細胞障害性部分に結合されていてもよい。AMLSCの枯渇は、AML治療において有用である。枯渇により、最大約30%、または最大約40%、または最大約50%、または最大約75%もしくはそれ以上の循環血中AMLSCの減少が達成される。枯渇は、インビボまたはエクスピボのいずれかでAMLSCを枯渇させる作用物質を用いることによ

て達成することができる。

【0069】

AMLSCは、特定のマーカーに関する表現型に基づいて、かつ/またはそれらの機能的表現型に基づいて同定される。いくつかの態様において、AMLSCは、関心対象のマーカーに特異的な反応物を細胞に結合させることによって、同定および/または単離される。解析しようとする細胞は生細胞でよく、または固定もしくは包埋された細胞でよい。

【0070】

いくつかの態様において、関心対象のマーカーに特異的な反応物は、直接的または間接的に標識されていてよい抗体である。このような抗体には、通常、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに特異的な抗体が含まれる。

10

【0071】

癌治療

本発明はさらに、癌細胞の増殖を低減させる方法も提供する。これらの方法は、本明細書において提供される特異的なマーカーもしくはマーカーの組合せを有する癌細胞の数を減少させるか、癌細胞において差次的に発現される遺伝子の発現を低減させるか、または癌関連ポリペプチドのレベルを低下させるか、かつ/もしくはその活性を低下させることを提供する。一般に、これらの方法は、癌細胞を結合物質、例えば、本明細書において提供されるマーカーまたはマーカーの組合せに特異的な抗体またはリガンドに接触させる段階を含む。

【0072】

20

「癌細胞の増殖を低減させること」には、癌細胞の増殖を低減させること、および非癌細胞が癌細胞になる発生率を低下させることが含まれるが、それらに限定されるわけではない。癌細胞増殖の低減が実現されたかどうかは、限定されるわけではないが、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取込み、ある期間に渡る細胞数の計数、AML関連マーカーの検出および/または測定などを含む、任意の公知のアッセイ法を用いて容易に判定することができる。

【0073】

本発明は、癌細胞増殖を低減させ、かつ癌を治療するのに十分な量で、癌細胞増殖を低減させる物質をそれを必要とする個体に投与する段階を一般に含む、癌を治療するための方法を提供する。ある物質、または特定の量のその物質が、癌を治療する上で有効であるかどうかは、限定されるわけではないが、生検、造影X線撮影による研究、CATスキャン、および個体の血液中の癌関連腫瘍マーカーの検出を含む、様々な公知の癌診断アッセイ法のいずれかを用いて評価することができる。物質は、全身的または局所的、通常は全身的に投与することができる。

30

【0074】

物質、例えば、癌細胞増殖を低減させる化学療法薬は、癌細胞にターゲティングすることができる。したがって、いくつかの態様において、本発明は、薬物-抗体複合体を対象に投与する段階を含む、癌細胞に薬物を送達する方法を提供し、本方法において、抗体は癌関連ポリペプチドに特異的であり、薬物は癌細胞増殖を低減させる薬物であり、様々なこれらの薬物が当技術分野において公知である。ターゲティングは、癌関連ポリペプチドに特異的な抗体に薬物を結合する(例えば、薬物-抗体複合体を形成するように、直接またはリンカー分子を介して、共有結合的または非共有結合的に連結する)ことによって達成することができる。薬物を抗体に結合する方法は当技術分野において周知であり、本明細書において詳述する必要はない。

40

【0075】

病期分類および診断

急性骨髄性白血病は、癌幹細胞の存在の解析によって病期分類される。病期分類は予後診断および治療のために有用である。本発明の1つの態様において、急性骨髄性白血病患者由来の試料は、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに特異的な反応物で染色される。染色パターンの解析により、AMLSCの相対的分布が提供され、この分布から白血病の病期が予測される。いくつかの態様において、試料は、免疫組織化学およびインサイチュ

50

ーハイブリダイゼーションなどを含む組織化学によって、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せを発現するCD34⁺CD38⁻細胞の存在について解析される。このような細胞の存在は、AMLSCの存在を示唆する。

【0076】

1つの態様において、患者試料は、対照または標準的な試験値と比較される。別の態様において、患者試料は、前白血病試料と、または疾患の過程の1つもしくは複数の時点と比較される。

【0077】

組織切片、スライドなどを含む、急性骨髄性白血病組織を含む試料は、癌幹細胞の存在を示すマーカーに特異的な反応物で染色される。試料は、凍結したもの、包埋したもの、および組織マイクロアレイ中に存在するものなどでよい。これらの反応物、例えば抗体、ポリヌクレオチドプローブなどは、検出可能に標識されてもよく、または染色手順において間接的に標識されてもよい。本明細書において提供されるデータから、前駆細胞の数および分布が、白血病の病期の指標となることが実証される。

【0078】

このようにして導き出された情報は、疾患の加速に対する感受性、罹病状態の状況、および時間経過、薬物治療、または他の様式などの環境変化に対する応答を含む、予後および診断の際に有用である。これらの細胞はまた、治療物質および治療薬に応答する能力に関して分類すること、調査目的のために単離すること、ならびに遺伝子発現についてスクリーニングすることなどができる。分類に有用なマーカーの存在を判定するために、遺伝的解析、プロテオミクス、細胞表面染色、または他の手段によって臨床試料をさらに特徴付けることができる。例えば、遺伝的異常は、疾患への罹病性もしくは薬物応答性の原因であり得、またはこのような表現型に関係し得る。

【0079】

差次的な細胞解析

患者試料中のAMLSCの存在は、白血病の病期を示し得る。さらに、AMLSCの検出を用いて、治療法に対する応答をモニターし、予後を助けることができる。AMLSCの存在は、幹細胞の表現型を有する細胞を定量することによって判定することができる。細胞表面表現型解析のほかに、「幹細胞」特徴を有する試料中の細胞を定量することも有用である場合があり、この特徴は、機能的基準、例えば、自己複製する能力およびインビボで(例えば異種移植モデルにおいて)腫瘍を生じる能力などによって判定することができる。

【0080】

本発明の方法で使用するための臨床試料は、様々な供給源、特に血液から得ることができるが、場合によっては、骨髄、リンパ、脳脊髄液、および滑液などの試料を使用してもよい。このような試料は、解析に先立って、遠心分離、水ひ、密度勾配分離、アフエーシス、親和性選択、パンニング法、FACS、ヒパク(Hypaque)を用いた遠心分離などによって分離することができ、普通は、単核画分(PBMC)が使用される。試料が一度得られると、それは、直接使用するか、凍結するか、または適切な培地中で短期間維持してよい。様々な培地が、細胞を維持するために使用され得る。これらの試料は、血液の抜き取り、静脈穿刺、または生検など任意の簡便な手順によって得ることができる。普通、試料は、少なくとも約 10^2 個の細胞、より普通には、少なくとも約 10^3 個の細胞、および好ましくは 10^4 個、 10^5 個またはそれ以上の細胞を含む。典型的には、これらの試料はヒト患者に由来するが、動物モデル、例えば、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、げっ歯動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、霊長類なども使用され得る。

【0081】

細胞試料を分散または懸濁するために、適切な溶液を使用してよい。一般に、このような溶液は、便宜的にウシ胎児血清または他の天然に存在する因子を補充され、低濃度(一般に5~25mM)の許容される緩衝液と組み合わせた、平衡塩類溶液、例えば、生理食塩水、PBS、ハンクス平衡塩類溶液などである。簡便な緩衝液には、HEPES、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液などが含まれる。

10

20

30

40

50

【0082】

細胞染色の解析では、従来の方法を使用する。正確な計数を与える技術には、様々な程度の精巧さ、例えば、複数のカラーチャンネル、小角および鈍角の光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなどを有することができる蛍光標示式細胞分取器が含まれる。死細胞に関連した色素(例えばヨウ化プロビジウム)を使用することによって、死細胞からこれらの細胞を選別することができる。

【0083】

親和性反応物は、上記に示した細胞表面分子に対して特異的な受容体またはリガンドでよい。抗体反応物のほかに、ペプチド-MHC抗原およびT細胞受容体のペアを使用することができる;ペプチドリガンドおよび受容体;ならびにエフェクター分子および受容体分子など。抗体およびT細胞受容体はモノクローナルまたはポリクローナルでよく、トランスジェニック動物、免疫化した動物、不死化したヒトB細胞または動物B細胞、抗体またはT細胞受容体をコードするDNAベクターをトランスフェクトした細胞などによって産生され得る。抗体の調製および特異的結合メンバーとして使用するためのそれらの適性に関する詳細は、当業者に周知である。

【0084】

親和性反応物としての抗体の使用が、特に関心対象である。便宜的に、これらの抗体は、分離する際に使用するための標識と結合される。標識には、直接的な分離を可能にする磁性ビーズ、支持体に結合されたアビジンもしくはストレプトアビジンを用いて除去できるビオチン、蛍光標示式細胞分取器と共に使用できる蛍光色素、または特定の細胞型の分離を容易にする同種のもが含まれる。使用される蛍光色素には、フィコビリントタンパク質、例えば、フィコエリトリンおよびアロフィコシアニン、フルオレセイン、ならびにテキサスレッドが含まれる。しばしば、各抗体を異なる蛍光色素で標識して、各マーカーに対する個別の選別を可能にする。

【0085】

細胞懸濁液にこれらの抗体を添加し、利用可能な細胞表面抗原に結合するのに十分な一定期間、インキュベートする。インキュベーションは通常少なくとも約5分であり、通常、約30分未満である。分離効率が抗体の不足によって制限されないように、反応混合物中の抗体濃度が十分であることが望ましい。適切な濃度は、滴定によって決定される。細胞を分離する場となる培地は、細胞の生存能力を維持する任意の培地である。好ましい培地は、0.1~0.5%のBSAを含むリン酸緩衝化生理食塩水である。ウシ胎児血清、BSA、HSAなどをしばしば添加された、ダルベッコ改変イーグル培地(dMEM)、ハンクス塩基性塩溶液(Hank's Basic Salt Solution)(HBSS)、ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水(dPBS)、RPMI、イスコフの培地、5mM EDTAを含むPBSなどを含む様々な培地が市販されており、細胞の性質に応じて使用してよい。

【0086】

次いで、以前に説明されているようにして、細胞表面マーカーの発現に関して、標識した細胞を定量する。

【0087】

患者試料から得た差次的な前駆細胞解析と参照用の差次的な前駆細胞解析の比較は、適切な演繹プロトコール、AIシステム、統計学的比較などを用いることによって遂行する。正常細胞および類似した罹病組織に由来する細胞など参照用の差次的な前駆細胞解析と比較することにより、疾患病期分類の指標が提供され得る。参照用の差次的な前駆細胞解析のデータベースをまとめることができる。特に関心対象の解析では、例えば、疾患の慢性病期および前白血病病期の患者を追跡し、その結果、疾患の加速が早期に観察される。本発明の方法は、臨床症状の発現に先立つ加速の検出を提供し、したがって、早期の治療的介入、例えば、化学療法の開始、化学療法用量の増加、および化学療法薬の選択の変更などを可能にする。

【0088】

AMLSC組成物

10

20

30

40

50

AMLSCは、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せを差次的に発現する細胞を濃縮する技術によって、細胞の複合混合物から分離することができる。組織から細胞を単離するために、分散または懸濁用に適切な溶液を使用してよい。一般に、このような溶液は、便宜的にウシ胎児血清または他の天然に存在する因子を添加され、低濃度(一般に5~25mM)の許容される緩衝液と組み合わせた、平衡塩類溶液、例えば、生理食塩水、PBS、ハンクス平衡塩類溶液などである。簡便な緩衝液には、HEPES、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液などが含まれる。

【0089】

分離した細胞は、細胞の生存能力を維持し、通常、採集チューブの底に血清のクッションを有する任意の適切な培地中に採取してよい。ウシ胎児血清をしばしば添加された、dMEM、HBSS、dPBS、RPMI、イスコフの培地などを含む様々な培地が市販されており、細胞の性質に応じて使用してよい。

【0090】

AMLSCを著しく濃縮した組成物が、この様式で実現される。対象集団は、細胞組成物の50%または約50%もしくはそれ以上でよく、好ましくは、細胞組成物の75%または約75%もしくはそれ以上でよく、90%またはそれ以上でよい。所望の細胞は、表面の表現型に基づいて、自己複製能力、腫瘍形成能力などに基づいて、同定される。濃縮した細胞集団は、直ちに使用してもよく、または、液体窒素温度で凍結し、長期間保存して、解凍し再利用できるようにしてもよい。細胞は、10%DMSO、90%FCS培地中で保存してよい。AMLSCを濃縮した細胞集団は、後述するように、様々なスクリーニングアッセイ法および培養において使用することができる。

【0091】

濃縮したAMLSC集団は、様々な培養条件下、インビトロで増殖させることができる。培地は、液体または半固体、例えば、寒天、メチルセルロースなどを含むものでよい。細胞集団は、ウシ胎児血清(約5~10%)、L-グルタミン、チオール、特に2-メルカプトエタノール、ならびに抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンを通常は添加された、イスコフ改変DMEMまたはRPMI-1640などの適切な栄養培地中に便宜的に懸濁することができる。

【0092】

培養物は、細胞が応答性である増殖因子を含んでよい。本明細書において定義されるように、増殖因子とは、膜貫通型受容体への特異的作用を介して、培養状態または無傷の組織中の細胞の生存、増殖、および/または分化を促進できる分子である。増殖因子には、ポリペプチドおよび非ポリペプチド因子が含まれる。細胞を培養する際に、多種多様の増殖因子を使用してよい。例えば、LIF、スチール因子(c-kitリガンド)、EGF、インスリン、IGF、Flk-2リガンド、IL-11、IL-3、GM-CSF、エリスロポエチン、トロンプオエチンなどである。

【0093】

増殖因子に加えて、またはその代わりに、線維芽細胞、間質細胞、または他のフィーダー層細胞との同時培養で対照細胞を増殖させてもよい。造血細胞の増殖に使用するのに適した間質細胞は、当技術分野において公知である。これらには、「ホイットロック-ウィッティ(Whitlock-Witte)」(Whitlock et al. [1985] Annu Rev Immunol 3:213-235)培養条件または「デクスター(Dexter)」培養条件(Dexter et al. [1977] J Exp Med 145:1612-1616)において使用される骨髓間質;および異種性胸腺間質細胞が含まれる。

【0094】

スクリーニングアッセイ法

本発明のマーカーまたはマーカーの組合せを発現するAMLSCはまた、癌幹細胞において活性である因子および化学療法剤を検出するためのインビトロのアッセイ法およびスクリーニングのためにも有用である。ヒト細胞において活性である作用物質を求めるスクリーニングアッセイ法が特に関心対象である。タンパク質結合に関するイムノアッセイ法;細胞増殖、分化、および機能的活性の測定;ならびに因子の産生などを含む多種多様のアッ

セイ法をこの目的のために使用することができる。他の態様において、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに対応する単離されたポリペプチドは、薬物スクリーニングアッセイ法において有用である。

【0095】

生物学的に活性な作用物質、抗増殖性薬物などを求めるスクリーニングアッセイ法において、マーカーまたはAMLSC組成物を、関心対象の作用物質と接触させ、細胞において生じるパラメーター、例えば、マーカーの発現および細胞生存能力など;またはポリペプチドの酵素活性もしくは受容体活性に対する結合の有効性もしくは影響をモニタリングすることによって、作用物質の効果を評価する。細胞は、新しく単離したもの、培養したもの、および遺伝的に改変したものなどでよい。これらの細胞は、クローン培養物の環境的に誘導された変異体でよい:例えば、独立した培養物に分割し、異なる条件下、例えば、薬物を併用または併用せずに、サイトカインまたはその組合せの存在下または不在下で、増殖させてよい。応答のタイミングを含む、細胞が作用物質、特に薬理学的作用物質に応答する様式は、細胞の生理的状态の重要な反映物である。

10

【0096】

パラメーターは、細胞の定量可能な構成要素、特に、望ましくはハイスループットな系において正確に測定できる構成要素である。パラメーターは、細胞表面決定基、受容体、タンパク質またはその立体構造的改変物もしくは翻訳後修飾物、脂質、炭水化物、有機分子もしくは無機分子、核酸、例えば、mRNA、DNAなど、もしくはそのような細胞構成要素に由来する一部分、またはそれらの組合せを含む、任意の細胞構成要素または細胞産生物でよい。大半のパラメーターは定量的な読み出し情報を提供するが、場合によっては、半定量的または定性的な結果が許容される。読み出し情報には、単一の測定値が含まれてよく、または、平均、中央値、もしくは分散などが含まれてよい。特徴として、同じアッセイ法の多様性が原因で、各パラメーターに対してある範囲のパラメーター読み出し値が得られる。ばらつきが予想され、試験パラメーターの各セットに対するある範囲の値は、単一の値を与えるために使用される一般的な統計学的方法と共に標準的な統計学的方法を用いて得られる。

20

【0097】

スクリーニングするための関心対象の作用物質には、有機金属分子、無機分子、遺伝子配列などを含んでよい、多数の化学的クラス、主として有機分子を包含する公知および未知の化合物が含まれる。本発明の重要な局面は、毒性試験などを含む、候補薬物を評価することである。

30

【0098】

複合生物学的物質のほかに、候補作用物質には、構造的相互作用、特に水素結合のために必要な官能基を含む有機低分子が含まれ、典型的には、少なくとも1つのアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基、しばしば少なくとも2つの化学官能基を含む。候補作用物質は、1つまたは複数の上記の官能基で置換された、環式炭素構造体もしくは複素環系構造体、および/または芳香族構造体もしくは多環芳香族構造体をしばしば含む。また、候補作用物質は、ペプチド、ポリヌクレオチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造的類似体、またはそれらの組合せを含む生体分子の中にも存在する。

40

【0099】

薬理学的に活性な薬物、遺伝学的に活性な分子などが含まれる。関心対象の化合物には、化学療法剤、ホルモン、またはホルモン拮抗物質などが含まれる。本発明のために適切な薬学的物質の例は、「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、GoodmanおよびGilman, McGraw-Hill, New York, New York, (1996)、第9版の以下のセクション: Water, Salts and Ions; Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism; Drugs Affecting Gastrointestinal Function; Chemotherapy of Microbial Diseases; Chemotherapy of Neoplastic Diseases; Drugs Acting on Blood-Forming organs; Hormones and Hormone Antagonists; Vitamins, Dermatology; および Toxicology (すべて参照により本

50

明細書に組み入れられる)において説明されているものである。また、毒素、ならびに生物兵器および化学兵器も含まれる。例えば、Somani, S.M. (編)、「Chemical Warfare Agents」、Academic Press, New York, 1992)を参照されたい。

【0100】

試験化合物には前述の分子のクラスすべてが含まれ、内容物が未知である試料をさらに含んでよい。植物のような天然供給源に由来する天然化合物の複合混合物は、関心対象である。多くの試料は溶液中に化合物を含むものの、適切な溶媒中に溶解され得る固形試料も分析することができる。関心対象の試料には、環境試料、例えば、地下水、海水、鉱業廃棄物など;生物試料、例えば、作物から調製された溶解物、組織試料など;製造試料、例えば、薬剤を調製する間の経時変化;ならびに解析のために調製された化合物ライブラリーなどが含まれる。関心対象の試料には、潜在的な治療価値に関して評価される化合物、すなわち薬物候補が含まれる。

10

【0101】

また、「試料」という用語は、付加的な成分、例えば、イオン強度、pH、タンパク質の総濃度などに影響を及ぼす成分が添加された、前述の流体も含む。さらに、少なくとも部分的な分画または濃縮を達成するように試料を処理してもよい。生物試料は、化合物の分解を低減させるよう注意が払われるならば、例えば窒素雰囲気下で保存してよく、凍結してよく、またはそれを組み合わせでよい。使用される試料の体積は、測定可能な検出を可能にするのに十分であり、通常、約0.1~1mlの生物試料が十分である。

【0102】

候補作用物質を含む化合物は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む多種多様の供給源から得られる。例えば、多数の手段が、ランダム化されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む、生体分子を含む多種多様な有機化合物のランダム合成および指向性(directed)合成のために利用可能である。あるいは、細菌抽出物、真菌抽出物、植物抽出物、および動物抽出物の形態の天然化合物ライブラリーも利用可能であるか、または容易に作製される。さらに、天然または合成によって作製されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的手段、物理的手段、および生化学的手段によって容易に改変され、コンビナトリアルライブラリーを作製するために使用され得る。公知の薬理学的作用物質を指向性の化学的改変またはランダムな化学的改変、例えば、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化(amidification)などに供して、構造的類似体を作製することができる。

20

30

【0103】

作用物質を欠く細胞と通常は組み合わせ、少なくとも1つの細胞試料、通常は複数の細胞試料に作用物質を添加することによって、作用物質を生物活性についてスクリーニングする。作用物質に応じたパラメーターの変化を測定し、例えば、作用物質の存在下および不在下で、他の作用物質を用いて得られる参照培養物などと比較することによって、結果を評価する。

【0104】

便宜的に、作用物質は溶液として、または容易に溶解できる形態で、培養中の細胞の培地へ添加される。作用物質は、フロースルー系で、ストリームとして、間欠的もしくは連続的に添加してよく、または代替として、化合物の大きな塊を個々にもしくは追加的に、そうでなければ静的な溶液に添加してよい。フロースルー系では、2種の流体が使用され、一方は生理学的に中性の溶液であり、他方は、添加される試験化合物を含む同じ溶液である。第1の流体が細胞の上を通り過ぎ、第2の流体がそれに続く。単一の溶液を用いる方法では、試験化合物の大きな塊を、細胞を取り囲む体積の培地に添加する。培地の成分の総濃度は、大きな塊の添加によっても、フロースルー方法における2種の溶液の合間にも、顕著に変化するべきではない。

40

【0105】

好ましい作用物質製剤は、製剤全体に顕著な影響を与える可能性がある、保存剤のような付加的な成分を含まない。したがって、好ましい製剤は、生物学的に活性な化合物およ

50

び生理学的に許容される担体、例えば、水、エタノール、DMSOなどから本質的になる。しかしながら、化合物が溶媒を含まない液体である場合には、製剤は化合物それ自体から本質的になり得る。

【0106】

様々な濃度に対する差次的な応答を得るために、様々な作用物質濃度を用いて複数のアッセイ法を並行して実行してよい。当技術分野において公知であるように、典型的には、作用物質の有効濃度を決定するために、1:10または他の対数スケールの希釈から得られる濃度範囲を使用する。必要であれば、2回目の一連の希釈によってこれらの濃度をさらに精密にしてよい。典型的には、これらの濃度の内の1つが陰性対照としての機能を果たす。すなわち、濃度ゼロもしくは作用物質の検出レベル未満、または表現型に検出可能な変化を与えない作用物質濃度以下の濃度である。

10

【0107】

選択されたマーカーの存在を定量するために、様々な方法が利用され得る。存在している分子の量を測定するために、簡便な方法は、蛍光性、発光性、放射性、酵素的に活性などでよい検出可能な部分、特に、高い親和性でのパラメーターへの結合に関して特異的な分子で、分子を標識することである。蛍光性部分は、事実上任意の生体分子、構造体、または細胞型を標識するために容易に入手可能である。免疫蛍光性部分は、特異的タンパク質だけでなく、特異的立体構造、切断産物、またはリン酸化に似た部位修飾物にも結合するように指定することができる。個々のペプチドおよびタンパク質は、例えば、細胞内部の緑色蛍光タンパク質キメラとしてそれらを発現させることによって、自己蛍光を発するように操作することができる(総説については、Jones et al. (1999) Trends Biotechnol. 17(12):477-81を参照されたい)。したがって、抗体は、その構造体の一部分として蛍光色素を提供するように遺伝的に改変することができる。選択した標識に応じて、蛍光標識以外を用いて、ラジオイムノアッセイ法(RIA)または酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ホモジニアス酵素免疫測定法、および関連する非酵素的技術などのイムノアッセイ技術を用いて、パラメーターを測定することができる。核酸、特にメッセンジャーRNAの定量もまた、パラメーターとして関心対象である。これらは、核酸ヌクレオチドの配列に依存するハイブリダイゼーション技術によって測定することができる。技術には、ポリメラーゼ連鎖反応法ならびに遺伝子アレイ技術が含まれる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. 編、John Wiley & Sons, New York, NY, 2000; Freeman et al. (1999) Biotechniques 26(1):112-225; Kawamoto et al. (1999) Genome Res 9(12):1305-12; および Chen et al. (1998) Genomics 51(3):313-24を参照されたい。

20

30

【0108】

AMLSCの枯渇

AMLSCの枯渇は、AML治療において有用である。枯渇はいくつかの方法によって実現することができる。枯渇は、最大約30%、または最大約40%、または最大約50%、または最大約75%もしくはそれ以上の標的集団減少と定義される。通常、有効な枯渇は、標的集団のレベルに対する特定の疾患状態の感受性に基づいて決定される。したがって、ある種の状態の治療では、約20%の枯渇でさえ有益となり得る。

40

【0109】

ターゲティングされたAMLSCを特異的に枯渇させるマーカー特異的作用物質は、インビトロまたはインビボで患者血液に接触させるために使用され、接触段階の後、ターゲティングされた集団中の生存能力があるAMLSCの数に減少が認められる。このような目的のための例示的な作用物質は、ターゲティングされたAMLSCの表面の本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに特異的に結合する抗体である。このような目的のための抗体の有効量は、例えば前述したような所望のレベルまで、ターゲティングされた集団を減少させるのに十分である。このような目的のための抗体は、ヒトにおいて低い抗原性を有してもよく、またはヒト化抗体でよい。

【0110】

本発明の1つの態様において、標的集団を枯渇させるための抗体は、インビボで患者血

50

液に添加される。別の態様において、抗体はエクスピボで患者血液に添加される。関心対象の抗体でコーティングされたビーズを血液に添加してよく、次いで、当技術分野において一般的な手順を用いて、これらのビーズに結合された標的細胞を血液から除去することができる。1つの態様において、これらのビーズは磁性であり、磁石を用いて除去される。あるいは、抗体がビオチン標識される場合、アビジンまたはストレプトアビジンなどを吸着させた固相上に抗体を間接的に固定化することも可能である。固相、通常はアガロースビーズまたはセファロースビーズは、短時間の遠心分離によって血液から分離される。抗体をタグ化し、そのような抗体およびそれらの抗体に結合された任意の細胞を除去するための多数の方法が、当技術分野においてごく普通である。一度、所望の程度の枯渇が実現されたら、血液は患者に戻される。エクスピボで標的細胞を枯渇させると、静脈内投与に付随する注入反応のような副作用が減少する。さらなる利点は、この手順は、ヒトにおいて抗原性が低い抗体またはヒト化抗体に限定される必要がないため、利用可能な抗体のレパートリーがかなり拡大することである。

10

【0111】

いくつかの態様において、枯渇のための抗体は二重特異性抗体である。二機能性抗体としても公知の「二重特異性抗体(bispecific antibody)」および「二重特異性抗体(bispecific antibodies)」は、第1の抗原またはハプテンに特異的な少なくとも1つの第1の抗原結合部位および第2の抗原またはハプテンに特異的な少なくとも1つの第2の抗原結合部位を有するおかげで、2つの異なる抗原を認識する抗体を意味する。このような抗体は、組換えDNA法によって作製することができ、または、当技術分野において公知の方法によって化学的に作製された抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。二重特異性抗体には、2つの異なる抗原を認識できるすべての抗体もしくは抗体の結合体、またはポリマー型の抗体が含まれる。二重特異性抗体には、二価の特徴を保持するように還元および再編成された抗体、ならびに各抗原に対していくつかの抗原認識部位を有し得るように化学的に結合された抗体が含まれる。

20

【0112】

本発明の方法において使用するための二重特異性抗体は、本明細書において説明する少なくとも1つのAMLSC抗原に結合し、本明細書において説明する2つまたはそれ以上のAMLSC抗原に結合し得る。関心対象の抗原組合せには、非限定的に、CD47+CD96、CD47+CD99、CD47+Tim3、CD47+CD97が含まれる。いくつかの態様において、抗体の1つの特異性は低い親和性、例えば、約 10^{-9} 未満の結合定数、通常、約 10^{-8} 未満の結合定数を有し、約 10^{-7} を超える結合定数でよい。

30

【0113】

本発明の方法を実践するのに適した抗体は、好ましくはモノクローナル抗体および多価抗体であり、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体でよく、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって作製された断片、および/または上記のいずれかの結合断片が含まれる。本発明の一定の態様において、抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体断片であり、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合されたFv(sdFv)、およびV_LドメインまたはV_Hドメインのいずれかを含む断片が含まれるが、それらに限定されるわけではない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、単独で、または次のものの全体もしくは一部分と組み合わせ、可変領域を含んでよい：ヒンジ領域、CH₁ドメイン、CH₂ドメイン、CH₃ドメイン、およびCLドメイン。また、可変領域とヒンジ領域、CH₁ドメイン、CH₂ドメイン、CH₃ドメイン、およびCLドメインとの任意の組合せを含む抗原結合断片も本発明に含まれる。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ科動物、ウマ、またはニワトリに由来する。本明細書において使用される場合、「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、ヒトB細胞から、または1つもしくは複数のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックな動物から単離された抗体が含まれる。

40

【0114】

50

本発明の方法を実践するのに適した抗体は、二重特異性、三重特異性、またはより多くの多重特異性のものでよい。さらに、本発明の抗体は、バースタンダー細胞としての顆粒球(好中球)、NK細胞、およびCD4⁺細胞に対する毒性を低リスクで有し得る。

【0115】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。全長二重特異性抗体の従来作製は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(2つの鎖は異なる特異性を有する)の同時発現に基づいている(Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組合せにより、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生じ、このうち1種のみが、正確な二重特異性構造を有する。通常はアフィニティークロマトグラフィーステップによって実施される正確な分子の精製は、かなり厄介であり、産生物の収率は低い。同様の手順がWO 93/08829およびTraunecker et al, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

10

【0116】

WO96/27011に記載されている別のアプローチによれば、抗体分子のペアの接触面を操作して、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の百分率を最大化することができる。このような接触面は、抗体定常ドメインのCH₃ドメインの少なくとも一部分を含んでよい。この方法では、第1の抗体分子の境界に由来する1つまたは複数の小型のアミノ酸側鎖が、より大型の側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置き換えられる。大型アミノ酸側鎖をより小型のもの(例えば、アラニンまたはトレオニン)で置換することによって、大型側鎖に同一または類似したサイズの代償的な「空洞」が、第2の抗体分子の境界上に作り出される。これにより、ホモ二量体など他の望まれない最終産物よりもヘテロ二量体の収量を増加させるためのメカニズムが提供される。代替の方法では、2つの異なる単鎖可変領域を熱安定性抗原(HSA)に連結する。HSAをリンカーとして使用すると、血清半減期が長くなり、免疫原性が低いという利点がある。

20

【0117】

二重特異性抗体には、架橋された抗体または「ヘテロ結合体」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ結合体中の抗体のうち一方をアビジンに結合し、他方をビオチンに結合させることができる。このような抗体は、例えば、望まれない細胞に対して免疫系細胞をターゲティングするために(米国特許第4,676,980号)、および、HIV感染症を治療するために(WO 91/00360、WO 92/200373、およびEP 03089)提案されている。ヘテロ結合体抗体は、任意の簡便な架橋方法を用いて作製することができる。適切な架橋剤は、当技術分野において周知であり、いくつかの架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号において開示されている。

30

【0118】

また、抗体断片から二重特異性抗体を作製するための技術も文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学的連結によって調製することができる。Brennan et al., Science, 229:81 (1985)では、無傷の抗体をタンパク質分解によって切断してF(ab')₂断片を生成させる手順が説明されている。これらの断片をジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元して、隣接するジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を妨害する。次いで、生成したFab'断片をチオニトロ安息香酸(thionitrobenzoate)(TNB)誘導体に変換する。次いで、メルカプトエチルアミン(mercaptoet-hylamine)で還元することによって、Fab'-TNB誘導体のうちの一方をFab'-チオールに再変換し、等モル量の方のFab'-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成させる。作製された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための作用物質として使用され得る。

40

【0119】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し単離するための様々な技術もまた、説明されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて作製された。Kos-telny et al., J. Immunol, 148(5):1547-1553 (1992)。Fosタンパク質およびJunタンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって、2つの異なる

50

抗体のFab'部分に連結されている。抗体ホモ二量体のヒンジ領域を還元して単量体を形成させ、次いで、再度酸化して抗体ヘテロ二量体を形成させた。この方法もまた、抗体ホモ二量体を作製するために使用され得る。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によって説明された「ダイアボディ」技術により、二重特異性抗体断片を作製するための代替メカニズムが提供された。これらの断片は、短いため同じ鎖の2つのドメイン間の対合は起こさせないリンカーによって、軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。したがって、1つの断片の V_H ドメインおよび V_L ドメインは、別の断片の相補的な V_L ドメインおよび V_H ドメインと対になることを余儀なくされ、それによって、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)二量体を用いることによって二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略もまた、報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。あるいは、抗体は、Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)において説明されている「直鎖抗体」でもよい。手短に言えば、これらの抗体は、一对の抗原結合領域を形成する、一对の直列型Fdセグメント(V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1})を含む。直鎖抗体は、二重特異性または単特異性でよい。

10

20

30

40

50

【0120】

本発明の文脈において、抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、抗体断片(例えば、Fabおよび $F(ab')_2$)、キメラ抗体、二機能性抗体または二重特異性抗体、および四量体抗体複合体が含まれると理解される。抗体は、T細胞表面の選択された抗原に、例えば $10^7 M^{-1}$ 以上の適切な親和性(結合定数)で結合する場合、それらの抗原に対して反応性であると理解される。さらに、本発明の方法において使用され得る抗体はまた、結合親和性の観点から説明または指定することができ、 $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ 、 $10^{-4} M$ 、 $5 \times 10^{-5} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-13} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $5 \times 10^{-14} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $5 \times 10^{-15} M$ 、 $10^{-15} M$ 未満の解離定数またはKdを有するものが含まれる。

【0121】

抗体は従来の技術を用いて断片化することができ、全長抗体について前述したのと同じ様式で、有用性について断片をスクリーニングすることができる。例えば、 $F(ab')_2$ 断片は、抗体をペプシンで処理することによって生成させることができる。得られた $F(ab')_2$ 断片を、ジスルフィド架橋を還元するように処理して、Fab'断片を作製することができる。

【0122】

本発明はまた、キメラ抗体誘導体、すなわち、非ヒト動物可変領域およびヒト定常領域を組み合わせた抗体分子も企図する。キメラ抗体分子は、例えば、マウス、ラット、または他の種の抗体に由来する抗原結合ドメインをヒト定常領域と共に含んでよい。キメラ抗体を作製するための様々なアプローチが説明されており、分化細胞または腫瘍細胞の表面の選択された抗原を認識する免疫グロブリン可変領域を含むキメラ抗体を作製するために使用することができる。例えば、Morrison et al., 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,6851; Takeda et al., 1985, Nature 314:452; Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Boss et al., 米国特許第4,816,397号; Tanaguchi et al., 欧州特許公報EP171496; 欧州特許公報第 0173494号、英国特許GB 2177096Bを参照されたい。

【0123】

化学的結合は、E-アミノ基またはヒンジ領域チオール基を有するホモ2官能性反応物およびヘテロ2官能性反応物の使用に基づいている。5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DNTB)のようなホモ2官能性反応物は、2つのFabの間にジスルフィド結合を生じさせ、O-フェニレンジマレイミド(O-PDM)は、2つのFabの間にチオエーテル結合を生じさせる(Brenner et al., 1985, Glennie et al., 1987)。N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ(pyridylditio))プロピオナート(SPDP)のようなヘテロ2官能性反応物は、クラスもアイソタイプも問わずに、抗体およびFab断片の露出したアミノ基と結合する(Van Dijk et al., 1989)。

【0124】

本発明の抗体、すなわち、表1に示す抗原を発現する癌幹細胞を含む他の癌と同様に癌を治療するのに有用である抗体には、修飾された、すなわち、抗体が抗原に結合するのを共有結合が妨げないように、任意のタイプの分子を抗体に共有結合することによる、誘導体が含まれる。例えば、限定されるわけではないが、抗体誘導体には、例えば、公知の保護基/ブロック基、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによるグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、誘導体化によって修飾された抗体が含まれる。限定されるわけではないが、特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含む公知の技術によって、多数の化学修飾のいずれかを実施することができる。さらに、誘導体は、1つまたは複数の非古典的なアミノ酸を含んでよい。

10

【0125】

本明細書において説明するAMLSCを差次的に同定するのに十分な染色試薬を含むキットが提供され得る。関心対象の組合せは、本発明のマーカーまたはマーカーの組合せに特異的な1種または複数種の試薬を含んでよく、さらに、CD96、CD34、およびCD38に特異的な抗体を含んでよい。染色試薬は、好ましくは抗体であり、検出可能に標識されてもよい。また、キットは、試験管、緩衝剤など、および使用取扱い説明書も含んでよい。

【0126】

本明細書で引用する各刊行物は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0127】

本発明は、説明される特定の方法論、プロトコール、細胞株、動物の種または属、および試薬に限定されず、したがって、様々であり得ることを理解すべきである。また、本明細書において使用される専門用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図しないことも理解すべきである。

【0128】

本明細書において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈において特に規定がない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞(a cell)」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「培養物(the culture)」への言及は、1つまたは複数の培養物および当業者に公知であるその等価物への言及を含み、以下同様である。特に指示がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。

30

【実施例】

【0129】

実施例1

正常な対応物と比べてヒト急性骨髄性白血病幹細胞において優先的に発現される細胞表面分子の同定

ヒト多分化能前駆細胞、すなわちAML LSCの起源細胞のプロスペクティブな同定。AML LSCにおいて優先的に発現される細胞表面分子の同定は、AML LSCになるための形質転換を経る正常造血階層内の細胞を決定することによって、非常に容易になる。両方の幹細胞集団でLin-CD34+CD38-細胞が豊富であることから、AML LSCは造血幹細胞(HSC)から生じるというのがこの分野での有力な見解であった。しかしながら、ヒトHSCはCD90を発現することが示されているが、AML LSCはCD90-である。さらに、長期寛解状態のt(8;21)AML患者に由来するHSCはAML1-ETO転位産生物を含むことが判明したことから、HSCは前白血病性であること、およびAML LSCへの完全な形質転換はもっと後の(downstream)前駆細胞において起こることが示唆された。

40

【0130】

HSCが実際にAML LSCの起源細胞であること、およびこれらの細胞が形質転換の結果とし

50

てCD90発現を失うことは確かに起こり得るが、AML LSCがもっと後のLin-CD34+CD38-CD90-細胞から生ずることもまた、起こり得る。本発明者らは、NOD/SCID/IL-2R γ 欠損(NOG)新生仔異種移植モデルを使用して、CD90およびCD45RAの発現に基づいて同定されたLin-CD34+CD38-脾帯血の部分集団の機能を分析した。Lin-CD34+CD38-CD90+細胞は、長期の多系列生着を起こし、二次的移植物を形成するのに成功し、したがってHSCを含んだ。精製したLin-CD34+CD38-CD90-CD45RA-細胞を移植すると、一次レシピエントにおける多系列生着のレベルは低下し、長期の二次的移植物を形成する能力は統計学的に有意に低下した。実際に、精製細胞50個を移植すると、これらの細胞はLin-CD34+CD38-CD90+HSCとは違って長期の生着に失敗した。したがって、Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA-細胞は多分化能であり、限定された自己複製能力を有する。これらの細胞は多分化能前駆細胞(MPP)と呼ばれ、AML LSCの存在し得る起源細胞に相当する。

10

【0131】

正常な対応物、すなわちHSCおよびMPPと比べてAML LSCにおいて優先的に発現される細胞表面分子を同定するための、遺伝子発現プロファイリングの使用。正常な対応物と比べてヒト急性骨髄性白血病幹細胞(AML LSC)において優先的に発現される細胞表面分子には、下記に概説する治療的用途がある。このような分子を同定するための1つの戦略は、AML LSCならびに正常なHSCおよびMPPの遺伝子発現プロファイルを作製し、差次的に発現される遺伝子を得るためにそれらと比較することであった。

【0132】

正常骨髄のHSCおよびMPP(n=4)ならびにAML LSC(n=9)をFACSによって精製した。全RNAを調製し、増幅し、AffymetrixヒトDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせた。統計学的解析により、HSCとLSCとでは差次的に発現される4037個の遺伝子、およびMPPとLSCとでは差次的に発現される4208個の遺伝子が同定された($p<0.05$ 、誤発見率5%)(図1A)。これらの差次的に発現される遺伝子の調査により、HSCおよびMPPと比べて少なくとも2倍優先的にAML LSCで発現される288個および318個の細胞表面分子がそれぞれ同定された。AML LSCにおける優先的発現が最大である多くのメンバーを含む、このリストの選択されたメンバーを示す(図1B、表1)。

20

【0133】

【表 1】

変化率	Genbank	遺伝子記号	説明
94.34	M27331	TRGC2	T細胞受容体 γ 定常2
57.47	NM_005816	CD96	CD96 抗原
47.17	AI862120	MAMDC2	MAMドメイン含有2
32.36	AF348078	SUCNR1	コハク酸受容体1
32.05	M16768	TRGC2	T細胞受容体 γ 定常2
30.96	NM_002182	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリタンパク質
29.85	M13231	TRGC2	T細胞受容体 γ 定常2
27.55	NM_003332	TYROBP	TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質
26.88	NM_004271	LY86	リンパ球抗原86
20.96	NM_014879	P2RY14	プリン受容体P2Y、Gタンパク質共役型、14
18.38	BC020749	CD96	CD96 抗原
18.38	NM_005048	PTHR2	副甲状腺ホルモン受容体2
17.73	AI625747	ADRB1	アドレナリン β 1受容体
17.36	NM_015376	RASGRP3	RASグアニル放出タンパク質3 (カルシウムおよびDAGによって調節される)
16.84	U62027	C3AR1	補体成分3a受容体1
14.49	AW025572	HAVCR2	A型肝炎ウイルス細胞受容体2
12.48	AF285447	HCST	造血細胞シグナル伝達因子
11.92	AI805323	LGR7	ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体7
11.67	NM_001197	BIK	BCL2相互作用キラー(アポトーシス誘導)
11.53	NM_018092	NETO2	ニューロピリン(NRP)およびトロイド(TLL)様2
11.07	N74607	AQP3	アクアポリン3
10.88	BF439675	CD69	CD69抗原(p60、初期T細胞活性化抗原)
10.48	NM_001769	CD9	CD9 抗原(p24)
10.32	AF167343	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリタンパク質
9.52	AA814140	C5orf18	染色体5オープンリーディングフレーム18
8.77	NM_005582	CD180	CD180 抗原
7.46	AF039686	GPR34	Gタンパク質共役型受容体 34
7.30	AI056776	ITGA6	インテグリン、 α 6
7.19	AJ277151	TNFRSF4	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4
6.99	AI738675	SELPLG	セレクチンPリガンド
6.85	AA888858	PDE3B	ホスホジエステラーゼ3B、cGMPによって阻害される
6.80	AU149572	ADCY2	アデニル酸シクラーゼ2(脳)
6.80	NM_002299	LCT	ラクターゼ
6.58	NM_005296	GPR23	Gタンパク質共役型受容体 23
6.45	NM_004106	FCER1G	IgEのFc断片、高親和性受容体
6.29	AI741056	SELPLG	セレクチンPリガンド
6.25	AW406569	MGC15619	
6.06	M81695	ITGAX	インテグリン、 α X
5.92	NM_003494	DYSF	ジスフェリン
5.85	AI860212	PAG1	スフィンゴ糖脂質マイクロドメインと結合した リンタンパク質1
5.75	NM_013447	EMR2	egf様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2

10

20

30

40

5.62	NM 017806	LIME1	Lck相互作用膜貫通型アダプター1
5.62	AK092824	AMN	アムニオンレス(amnionless)ホモログ(マウス)
5.59	AF345567	GPR174	Gタンパク質共役型受容体174
5.29	BC041928	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリタンパク質
5.26	L03419	FCGR1A	IgGのFc断片、高親和性Ia、受容体(CD64);Fc- γ 受容体I B2
5.24	BG230586	SLC7A6	溶質運搬体ファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体、y+系)、メンバー6
5.18	AF015524	CCRL2	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体様2
5.13	AA631143	SLC45A3	溶質運搬体ファミリー45、メンバー3
5.10	AJ240085	TRAT1	T細胞受容体関連膜貫通型アダプター1
5.05	AW183080	GPR92	Gタンパク質共役型受容体92
5.03	NM 002120	HLA-DOB	主要組織適合性複合体、クラスII、DQ β
5.03	NM 015364	LY96	リンパ球抗原96
4.90	NM 020399	GOPC	ゴルジ関連PDZおよびコイルドコイルモチーフ含有
4.88	AK026133	SEMA4B	セマフォリン
4.88	BC041664	VMD2	卵黄様黄斑ジストロフィー2
4.85	NM 152592	C14orf49	染色体14オープンリーディングフレーム49
4.85	AA923524	RASGRP4	RASグアニル放出タンパク質4
4.85	BC008777	ITGAL	インテグリン、 α L
4.67	AF014403	PPAP2A	ホスファチジン酸ホスファターゼ2A型
4.65	AK097698	SORCS2	ソルチリン関連VPS10ドメイン含有受容体2
4.63	X14355	FCGR1A	IgGのFc断片、高親和性Ia、受容体(CD64)
4.55	NM 001629	ALOX5AP	アラキドン酸5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質
4.50	AU155968	C18orf1	染色体18オープンリーディングフレーム1
4.44	AK075092	HERV-FRD	HERV-FRDプロウイルス祖先Envポリタンパク質
4.42	NM 020960	GPR107	Gタンパク質共役型受容体107
4.37	BC000039	FAM26B	配列類似性を有するファミリー26、メンバーB
4.35	NM 153701	IL12RB1	インターロイキン12受容体、 β 1
4.35	AI762344	PTGER1	プロスタグランジンE受容体1(亜型EP1)、42kDa
4.31	NM 006459	SPFH1	SPFHドメインファミリー、メンバー1
4.27	NM 003126	SPTA1	スペクトリン、 α 、赤血球1(楕円赤血球症2)
4.22	AL518391	AQP1	アクアポリン1(チャネル形成内在性タンパク質、28kDa)
4.12	AK026188	PCDHGC3	プロトカドヘリン γ サブファミリーC
4.10	AU146685	EDG2	内皮分化、リゾホスファチジン酸Gタンパク質共役型受容体、2
4.05	BE673587	SLC14A1	溶質運搬体ファミリー14(尿素輸送体)、メンバー1(キッド式血液型)
4.02	BF129969	TSPAN2	テトラスパニン2
4.00	AW243272	KCNK5	カリウムチャネル、サブファミリーK、メンバー5
3.98	T68858	DHRS3	デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ(SDRファミリー)メンバー3
3.94	AI827849	VTI1A	t-SNAREとの相互作用を介した小胞輸送 ホモログ1A(酵母)
3.86	AL134012	NRXN2	ニューレキシン2
3.83	BG230614	CD47	CD47 抗原
3.80	AI869717	MGC15523	MGC15523
3.80	AI458583	SIMP	免疫優性MHC関連ペプチドの供給源
3.79	NM 002183	IL3RA	インターロイキン3受容体、 α (低親和性)
3.79	AA608820	NRXN2	ニューレキシン2
3.73	NM 000206	IL2RG	インターロイキン2受容体
3.72	BC002737	VAMP2	シナプトブレビン2
3.72	BC005884	BID	BH3相互作用ドメインデスアゴニスト;BH3相互作用ドメインデスアゴニスト
3.68	AI688418	PLXNA2	プレキシニンA2
3.68	BC003105	PTP4A3	プロテインチロシンホスファターゼIVA型、メンバー3
3.68	NM 001772	CD33	CD33 抗原(gp67)
3.65	BC007524	SPAG9	精子関連抗原9

10

20

30

40

3.64	AI344200	SLC25A35	溶質運搬体ファミリー25、メンバー35
3.64	BC005253	KLHL20	ケルチ様20(ショウジョウバエ(<i>Drosophila</i>))
3.60	AI335263	NETO2	ニューロピリン(NRP)およびトロイド(TLL)様2
3.58	BF381837	C20orf52	染色体20オープンリーディングフレーム52
3.51	NM_002886	RAP2A	RAP2A
3.50	NM_007063	TBC1D8	TBC1ドメインファミリー、メンバー8(GRAMドメインを有する)
3.45	AK027160	BCL2L11	BCL2-様11(アポトーシス促進因子)
3.44	BF055366	EDG2	内皮分化、リゾホスファチジン酸Gタンパク質共役型受容体、2
3.42	NM_003608	GPR65	Gタンパク質共役型受容体65
3.41	AI675453	PLXNA3	プレキシニンA3
3.40	AV734194	DPP8	ジペプチジルペプチダーゼ8
3.38	BC000232	C5orf18	染色体5オープンリーディングフレーム18
3.36	BC001956	KIAA1961	KIAA1961 遺伝子
3.34	NM_013332	HIG2	低酸素誘導性タンパク質2
3.31	BC029450	SLC33A1	溶質運搬体ファミリー33(アセチル-CoA輸送体)、メンバー1
3.30	AW008505	C18orf1	染色体18オープンリーディングフレーム1
3.29	BF693956	CD47	CD47 抗原
3.28	BF677986	KIAA1961	KIAA1961 遺伝子
3.27	AI433691	CACNA2D4	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\alpha 2/\delta$ サブユニット4
3.26	AB014573	NPHP4	ネフロン癆4
3.25	AL582804	LY9	リンパ球抗原9
3.25	BG236280	CD86	CD86 抗原
3.24	AA639289	SLC26A7	溶質運搬体ファミリー26、メンバー7
3.24	NM_005211	CSF1R	コロニー刺激因子1受容体
3.24	AI051254	TRPM2	一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリーM、メンバー2
3.23	AW292816	ABHD2	アブヒドロラーゼ(abhydrolase)ドメイン含有2
3.23	BC040275	RASGRF1	Rasタンパク質特異的グアニンヌクレオチド放出因子1
3.22	NM_021911	GABRB2	γ -アミノ酪酸(GABA)A受容体、 $\beta 2$
3.19	AI660619	SLC7A6	溶質運搬体ファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体、y+系)、メンバー6
3.19	NM_001860	SLC31A2	溶質運搬体ファミリー31(銅輸送体)、メンバー2
3.18	NM_015680	C2orf24	染色体2オープンリーディングフレーム24
3.17	AW058600	SLC36A1	溶質運搬体ファミリー 36
3.16	AU145049	HIP1	ハンチンチン相互作用タンパク質1
3.15	NM_005770	SERF2	小型EDRKに富む(small EDRK-rich)因子2
3.15	NM_003566	EEA1	初期エンドソーム抗原1、162kD
3.14	NM_020041	SLC2A9	溶質運搬体ファミリー2(促進されたグルコース輸送体)、メンバー9
3.14	W90718	SLC24A4	溶質運搬体ファミリー 24
3.13	AI423165	TICAM2	tol1様受容体アダプター分子2
3.12	AI674647	SPPL2A	シグナルペプチドペプチダーゼ様2A
3.11	NM_004121	GGTLA1	γ -グルタミルトランスフェラーゼ様活性1
3.10	NM_004546	NDUFB2	NADHデヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1 β 部分複合体、2、8kDa
3.05	X15786	RET	ret癌原遺伝子(多発性内分泌腺腫および髄様甲状腺癌1、ヒルシュスプルング病)
3.05	AF181660	MPZL1	ミエリンタンパク質ゼロ様1
3.05	BG230614	CD47	CD47抗原(Rh関連抗原、インテグリン関連シグナル伝達因子)
3.00	AI571996	STAM2	シグナル伝達アダプター分子(SH3ドメインおよびITAMモチーフ)2

10

20

30

40

2.99	NM_000201	ICAM1	細胞間接着分子1 (CD54)、ヒトライノウイルス受容体
2.93	NM_025244	TSGA10	精巢特異的、10
2.93	AU147538	PRKCE	プロテインキナーゼC、 ϵ
2.92	NM_024576	OGFRL1	オピオイド増殖因子受容体様1
2.91	AI248055	ABCC4	ATP結合カセット、サブファミリーC (CFTR/MRP)、メンバー 4
2.86	AA503877	CEPT1	コリン/エタノールアミンホストランスフェラーゼ1
2.84	BC030993	FLJ21127	仮定的タンパク質 FLJ21127
2.82	AA829818	LY86	リンパ球抗原 86
2.82	NM_001859	SLC31A1	溶質運搬体ファミリー31 (銅輸送体)、メンバー1
2.81	M74721	CD79A	CD79A抗原 (免疫グロブリン結合 α)
2.79	AI986112	MGAT4B	マンノシル (α -1, 3-)-糖タンパク質 β -1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、イソ酵素B
2.79	NM_030930	UNC93B1	unc-93 ホモログB1 (C.エレガンス (C. elegans)); unc-93 ホモログB1 (C.エレガンス)
2.79	X74039	PLAUR	プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ受容体
2.78	BF514291	LY86	リンパ球抗原 86
2.75	BC005253	KLHL20	ケルチ様20 (ショウジョウバエ)
2.73	AB036432	AGER	終末糖化産物特異的受容体
2.71	NM_007245	ATXN2L	アタキシン2様
2.71	NM_016072	GOLT1B	ゴルジ輸送1ホモログB (S.セレビシエ (S. cerevisiae))
2.71	AI453548	ZDHC8	亜鉛フィンガー、DHC型含有8
2.70	AI636233	TMEM8	膜貫通型タンパク質8 (5個の膜貫通ドメイン)
2.69	BE502509	T3JAM	TRAF3 相互作用タンパク質3
2.69	AW117765	PEX13	ペルオキシソーム生合成因子13
2.69	AW052216	IL17RB	インターロイキン17受容体B
2.67	NM_003853	IL18RAP	インターロイキン18受容体アクセサリタンパク質
2.66	NM_002490	NDUFA6	NADH デヒドロゲナーゼ (ユビキノ) 1 α 部分複合体、6、14kDa
2.65	NM_016639	TNFRSF12A	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー12A
2.65	AI363185	FLJ20255	仮定的タンパク質 FLJ20255
2.65	NM_052931	SLAMF6	SLAMファミリーメンバー6
2.65	AW571669	TNFRSF19L	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19様
2.64	AA654142	CEECAM1	脳内皮細胞接着分子1
2.62	AW510783	TMEM63A	膜貫通型タンパク質 63A
2.61	W95007	ACSL4	アシル-CoA合成酵素長鎖ファミリーメンバー4
2.60	S76475	NTRK3	神経栄養性チロシンキナーゼ、受容体、3型
2.60	AJ130713	SIGLEC7	シアル酸結合Ig様レクチン7
2.56	NM_003775	EDG6	内皮分化、Gタンパク質共役型受容体6
2.55	AI978986	MAMDC4	MAM ドメイン含有4
2.54	AF010447	MR1	主要組織適合性複合体、クラスI関連
2.54	NM_006068	TLR6	tol1様受容体6
2.53	AF041811	NTRK3	神経栄養性チロシンキナーゼ、受容体、3型
2.53	AW953521	SERF2 ; HYPK	小型EDRKに富む因子2; ハンチンチン相互作用タンパク質K
2.51	AW293276	CD53	CD53 抗原
2.49	AK023058	PLXNA2	プレキシシン A2
2.49	AI125204	C6orf128	染色体6オープンリーディングフレーム128
2.49	NM_000392	ABCC2	ATP結合カセット、サブファミリーC (CFTR/MRP)、メンバー2
2.46	BC032474	TIRAP	tol1-インターロイキン1受容体 (TIR) ドメイン含有アダプタータンパク質

10

20

30

40

2.44	NM_031211	IMAA	SLC7A5 偽遺伝子
2.44	AI797836	CD5	CD5 抗原 (p56-62)
2.41	W72082	C1QR1	補体成分 1
2.40	AA708616	DPP9	ジペプチジルペプチダーゼ 9
2.40	BM987094	DLGAP4	discs、大型(ショウジョウバエ)ホモログ関連タンパク質4
2.40	AL713719	LOC283501	ATPアーゼ、クラスVI、11A型
2.39	AI628734	PRLR	プロラクチン受容体
2.39	NM_012110	CHIC2	システインに富む疎水性ドメイン 2
2.38	AK022002	TFR2	トランスフェリン受容体 2
2.37	NM_001555	IGSF1	免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー1
2.36	AA426091	C19orf15	染色体19オープンリーディングフレーム15
2.36	BE547542	GOPC	ゴルジ関連PDZおよびコイルドコイルモチーフ含有
2.36	NM_004231	ATP6V1F	ATPアーゼ、H ⁺ 輸送、リソソーム14kDa、V1サブユニットF
2.36	AJ130712	SIGLEC7	シアル酸結合Ig様レクチン 7
2.36	NM_017905	TMCO3	膜貫通ドメインおよびコイルドコイルドメイン3
2.35	AB054985	CACNB1	カルシウムチャネル、電位依存性、 β 1サブユニット
2.35	NM_005003	NDUFAB1	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1、 α/β 部分複合体、1、8kDa
2.35	NM_001251	CD68	CD68 抗原
2.35	AA700869	PSCD2	プレクストリン相同性、Sec7ドメインおよびコイルドコイルドメイン2(サイトヘシン-2)
2.35	U94903	CD44	CD44 抗原(ホーミング機能およびインド式血液型分類法)
2.35	NM_003841	TNFRSF10C	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10c、細胞内ドメイン無しのデコイ
2.33	NM_004541	NDUFA1	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1 α 部分複合体、1、7.5kDa
2.33	BE567130	KLRK1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーK、メンバー1
2.31	NM_017460	CYP3A4	シトクロムP450、ファミリー3、サブファミリーA、ポリペプチド4
2.31	AI339536	DSC1	デスモコリン1
2.31	NM_001783	CD79A	CD79A 抗原(免疫グロブリン結合 α); CD79A 抗原(免疫グロブリン結合 α)
2.30	AA333161	VT11A	t-SNAREとの相互作用を介した小胞輸送 ホモログ1A(酵母)
2.30	AW134823	CD6	CD6 抗原; CD6 抗原
2.30	AL137537	ATP8B2	ATPアーゼ、クラスI、8B型、メンバー2
2.29	AI671983	SLC2A9	溶質運搬体ファミリー2(促進されたグルコース輸送体)、メンバー9
2.29	AA018187	C22orf3	染色体22オープンリーディングフレーム3
2.29	AL117415	ADAM33	ADAMメタロペプチダーゼドメイン 33
2.29	NM_002588	PCDHGC3	プロトカドヘリン γ サブファミリー C
2.29	NM_020960	GPR107	G タンパク質共役型受容体 107
2.29	AK074635	GENX-3414	ゲネトニン (Genethonin)1
2.29	BE138575	ITGB5	インテグリン、 β 5
2.28	NM_003830	SIGLEC5	シアル酸結合Ig様レクチン5;シアル酸結合Ig様レクチン5
2.28	NM_013319	UBIAD1	UbiA プレニルトランスフェラーゼドメイン含有1
2.28	M63889	FGFR1	線維芽細胞増殖因子受容体1(fms関連チロシンキナーゼ2、ブファイファー症候群)
2.27	H67156	MSCP	溶質運搬体ファミリー25、メンバー 37
2.27	BC006215	SMEK2	KIAA1387タンパク質; KIAA1387タンパク質
2.27	AL109653	SLITRK2	SLITおよび NTRKに似たファミリー、メンバー2
2.27	NM_007011	ABHD2	アブヒドロラーゼドメイン含有 2
2.26	AI767210	MGC11332	仮定的タンパク質MGC11332
2.26	BF723605	NRCAM	神経細胞接着分子

10

20

30

40

2.26	R08129	CDA08	T細胞免疫調節性タンパク質
2.26	AF052059	SEL1L	lin-12様のsel-1抑制因子(C.エレガンス)
2.26	NM_005729	PPIF	ペプチジルプロリルイソメラーゼF(シクロフィリンF)
2.25	BE858032	ARL2L1	ADP-リボシル化因子様2様1
2.25	AI950390	C14orf118	染色体14オープンリーディングフレーム118
2.24	NM_017767	SLC39A4	溶質運搬体ファミリー39(亜鉛輸送体)、メンバー4
2.24	AL110273	SPTAN1	スペクトリン、 α 、非赤血球1(α -ホドリン)
2.24	AI077660	CDA08	T細胞免疫調節性タンパク質
2.23	AA488687	SLC7A11	溶質運搬体ファミリー7、(カチオン性アミノ酸輸送体、y ⁺ 系)メンバー11
2.23	NM_000634	IL8RA	インターロイキン8受容体、 α
2.22	AL390177	MGC34032	溶質運搬体ファミリー44、メンバー5
2.21	NM_001531	MR1	主要組織適合性複合体、クラスI関連
2.21	NM_003183	ADAM17	ADAMメタロペプチダーゼドメイン17(腫瘍壊死因子、 α 、変換酵素)
2.20	AC003999	SCAP2	srcファミリー関連リンタンパク質2
2.20	BC014416	SLC33A1	溶質運搬体ファミリー33(アセチル-CoA輸送体)、メンバー1
2.20	AF226731	ADORA3	アデノシン A3 受容体
2.19	AI608725	ICAM1	細胞間接着分子1 (CD54)、ヒトライノウイルス受容体
2.19	U41163	SLC6A8 FLJ43855	溶質運搬体ファミリー6(神経伝達物質輸送体、クレアチン)、メンバー8;ナトリウムおよびクロリド依存性クレアチン輸送体に類似
2.19	AU147799	LRRC15	ロイシンリッチリピート含有15
2.18	AW337166	LOC255104	膜貫通ドメインおよびコイルドコイルドメイン4
2.18	NM_006505	PVR	ポリオウイルス受容体
2.18	AI638420	CLIC4	細胞内塩素イオンチャネル4
2.18	AI167482	SCUBE3	シグナルペプチド、CUBドメイン、EGF様3
2.18	AI739514	HAS3	ヒアルロナンシンターゼ3
2.18	NM_005971	FXYD3	FXYDドメイン含有イオン輸送調節因子3
2.17	AL022398	TRAF3IP3	TRAF3 相互作用タンパク質 3
2.17	U90940	FCGR2C	IgGのFc断片、低親和性IIc、受容体 (CD32)
2.16	BC023540	SORCS1	ソルチリン関連VPS10ドメイン含有受容体1
2.16	AV713913	OSTM1	大理石骨病関連膜貫通型タンパク質1
2.15	NM_024505	NOX5	NADPHオキシダーゼ、EFハンドカルシウム結合ドメイン5
2.15	BC006178	SEC22L3	SEC22小胞トラフィッキングタンパク質様3(S.セレビスエ); SEC22小胞トラフィッキングタンパク質様3(S.セレビスエ)
2.15	BG151527	GRIK5	グルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイナート5
2.14	AW001754	NEGR1	神経細胞成長調節因子1
2.14	NM_013979	BNIP1	BCL2/アデノウイルスE1B 19kDa相互作用タンパク質1
2.14	NM_018643	TREM1	骨髄性細胞上で発現される誘発受容体 1
2.12	NM_005284	GPR6	G タンパク質共役型受容体 6
2.11	AA454190	ZDHHC20	亜鉛フィンガー、DHHC型含有20
2.11	AB048796	TMPRSS13	膜貫通型プロテアーゼ、セリン13
2.11	AL044520	NYD-SP21	精巣発達関連 NYD-SP21
2.11	BE463930	TMAP1	マトリックス再構築関連7
2.10	NM_152264	SLC39A13	溶質運搬体ファミリー 39(亜鉛輸送体)、メンバー13
2.08	AL530874	EPHB2	EPH 受容体 B2
2.07	NM_018668	VPS33B	液胞タンパク質選別33B(酵母)
2.07	NM_024531	GPR172A	G タンパク質共役型受容体172A
2.07	NM_023038	ADAM19	ADAMメタロペプチダーゼドメイン19(メルトリン β)
2.07	BC001281	TNFRSF10B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b
2.07	AF217749	PCDHB9	プロトカドヘリン β 9

10

20

30

40

2.06	AB030077	FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体2(細菌によって発現されるキナーゼ、ケラチノサイト増殖因子受容体、頭蓋顔面異骨症1、クルーゾン症候群、プファイファー症候群、ジャクソン-ワイス症候群)
2.06	AL137432	SUSD1	sushiドメイン含有1
2.05	NM_004518	KCNQ2	カリウム電位依存性チャネル、KQT様サブファミリー、メンバー2
2.04	AI672363	VPS33B	液胞タンパク質選別33B(酵母)
2.04	NM_006671	SLC1A7	溶質運搬体ファミリー1(グルタミン酸輸送体)、メンバー7
2.03	AA215519	DLGAP1	Discs、大型(ショウジョウバエ)ホモログ関連タンパク質1
2.02	NM_004648	PTPNS1	プロテインチロシンホスファターゼ、非受容体型基質1
2.02	NM_002564	P2RY2	プリン受容体P2Y、Gタンパク質共役型、2
2.01	BF511678	SCUBE3	シグナルペプチド、CUBドメイン、EGF様3
2.01	BC013385	CLEC7A	C型レクチンドメインファミリー7、メンバーA

【 0 1 3 4 】

【表 2】

変化率	Genbank	遺伝子記号	説明	
57.47	NM_005816	CD96	CD96 抗原	
32.36	AF348078	SUCNR1	コハク酸受容体 1	
30.96	NM_002182	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリタンパク質	
27.55	NM_003332	TYROBP	TYRO タンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質	
26.88	NM_004271	LY86	リンパ球抗原 86	
20.96	NM_014879	P2RY14	プリン受容体 P2Y、Gタンパク質共役型、14	
18.38	NM_005048	PTHR2	副甲状腺ホルモン受容体 2	
17.73	AI625747	ADRB1	アドレナリン β -1受容体	10
17.36	NM_015376	RASGRP3	RAS グアニル放出タンパク質3(カルシウムおよび DAGに調節される)	
16.84	U62027	C3AR1	補体成分3a受容体1	
14.49	AW025572	HAVCR2	A型肝炎ウイルス細胞受容体2	
12.48	AF285447	HCST	造血細胞シグナル伝達因子	
11.92	AI805323	LGR7	ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体7	
11.67	NM_001197	BIK	BCL2相互作用キラー(アポトーシス誘導)	
11.53	NM_018092	NETO2	ニューロピリン(NRP)およびトロイド(TLL)様2	
11.07	N74607	AQP3	アクアポリン3	
10.48	NM_001769	CD9	CD9 抗原 (p24)	20
8.77	NM_005582	CD180	CD180 抗原	
7.46	AF039686	GPR34	Gタンパク質共役型受容体 34	
7.19	AJ277151	TNFRSF4	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4	
6.85	AA888858	PDE3B	ホスホジエステラーゼ3B、cGMPによって阻害される	
6.80	AU149572	ADCY2	アデニル酸シクラーゼ2(脳)	
6.80	NM_002299	LCT	ラクターゼ	
6.58	NM_005296	GPR23	Gタンパク質共役型受容体 23	
6.45	NM_004106	FCER1G	IgEのFc断片、高親和性I、受容体; γ ポリペプチド	
6.25	AW406569	MGC15619	仮定的タンパク質 MGC15619	
6.06	M81695	ITGAX	インテグリン、 α X(抗原CD11C(p150)、 α ポリペプチド)	30
5.92	NM_003494	DYSF	ジスフェリン、肢帯型筋ジストロフィー2B(常染色体劣性)	
5.75	NM_013447	EMR2	egf様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2	
5.62	NM_017806	LIME1	Lck 相互作用膜貫通型アダプター 1	
5.62	AK092824	AMN	アムニオンレスホモログ(マウス)	
5.59	AF345567	GPR174	Gタンパク質共役型受容体 174	
5.26	L03419	FCGR1A LOC440607	IgGのFc断片、高親和性Ia、受容体(CD64); Fc- γ 受容体I B2	
5.18	AF015524	CCRL2	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体様2	40
5.13	AA631143	SLC45A3	溶質運搬体ファミリー45、メンバー 3	
5.10	AJ240085	TRAT1	T細胞受容体関連膜貫通型アダプター1	
5.05	AW183080	GPR92	Gタンパク質共役型受容 92	
5.03	NM_002120	HLA-DOB	主要組織適合性複合体、クラスII、D0 β	
5.03	NM_015364	LY96	リンパ球抗原 96	

【表 3】

変化率	Genbank	遺伝子記号	説明	
57.47	NM_005816	CD96	CD96 抗原	
32.36	AF348078	SUCNR1	コハク酸受容体1	
30.96	NM_002182	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリタンパク質	
27.55	NM_003332	TYROBP	TYRO タンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質	
26.88	NM_004271	LY86	リンパ球抗原 86	
20.96	NM_014879	P2RY14	プリン受容体P2Y、Gタンパク質共役型、14	
18.38	NM_005048	PTHR2	副甲状腺ホルモン受容体 2	
17.73	AI625747	ADRB1	アドレナリン β -1受容体	10
17.36	NM_015376	RASGRP3	RAS グアニル放出タンパク質3(カルシウムおよび DAGに調節される)	
16.84	U62027	C3AR1	補体成分3a受容体1	
14.49	AW025572	HAVCR2	A型肝炎ウイルス細胞受容体2	
12.48	AF285447	HCST	造血細胞シグナル伝達因子	
11.92	AI805323	LGR7	ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体7	
11.67	NM_001197	BIK	BCL2相互作用キラー(アポトーシス誘導)	
11.53	NM_018092	NETO2	ニューロピリン(NRP)およびトロイド(TLL)様2	
11.07	N74607	AQP3	アクアポリン 3	
10.88	BF439675	CD69	CD69 抗原(p60、初期T細胞活性化抗原)	20
10.48	NM_001769	CD9	CD9 抗原(p24)	
9.52	AA814140	C5orf18	染色体5オープンリーディングフレーム18	
8.77	NM_005582	CD180	CD180 抗原	
7.46	AF039686	GPR34	G タンパク質共役型受容体 34	
7.30	AI056776	ITGA6	インテグリン、 α 6	
7.19	AJ277151	TNFRSF4	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4	
6.99	AI738675	SELPLG	セレクトインPリガンド	
6.85	AA888858	PDE3B	ホスホジエステラーゼ3B、cGMPによって阻害される	
6.80	AU149572	ADCY2	アデニル酸シクラーゼ2(脳)	
6.80	NM_002299	LCT	ラクターゼ	30
6.58	NM_005296	GPR23	Gタンパク質共役型受容体 23	
6.45	NM_004106	FCER1G	IgEのFc断片、高親和性I、受容体、 γ ポリペプチド	
6.25	AW406569	MGC15619	仮定的タンパク質 MGC15619	

6.06	M81695	ITGAX	インテグリン、 α X(抗原CD11C(p150)、 α ポリペプチド)	
5.92	NM_003494	DYSF	ジスフェリン、肢帯型筋ジストロフィー2B (常染色体劣性)	
5.85	AI860212	PAG1	スフィンゴ糖脂質マイクロドメインと結合した リントパク質1	
5.75	NM_013447	EMR2	egf様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2	
5.62	NM_017806	LIME1	Lck 相互作用膜貫通型アダプター1	
5.62	AK092824	AMN	アムニオンレスホモログ(マウス)	
5.59	AF345567	GPR174	G タンパク質共役型受容体 174	
5.26	L03419	FCGR1A ; LOC440607	IgGのFc断片、高親和性Ia、受容体(CD64); Fc- γ 受容体I B2	10
5.24	BG230586	SLC7A6	溶質運搬体ファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体、 γ 系)、メンバー6	
5.18	AF015524	CCRL2	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体様2	
5.13	AA631143	SLC45A3	溶質運搬体ファミリー45、メンバー3	
5.10	AJ240085	TRAT1	T 細胞受容体関連膜貫通型アダプター1	
5.05	AW183080	GPR92	G タンパク質共役型受容体 92	
5.03	NM_002120	HLA-DOB	主要組織適合性複合体、クラスII、D0 β	
5.03	NM_015364	LY96	リンパ球抗原 96	
4.90	NM_020399	GOPC	ゴルジ関連PDZおよびコイルドコイルモチーフ含有	20
4.88	AK026133	SEMA4B	sema ドメイン、免疫グロブリンドメイン(Ig)、 膜貫通ドメイン(TM)および短い細胞質内ドメイン、 (セマフォリン)4B	
4.88	BC041664	VMD2	卵黄様黄斑ジストロフィー2(ベスト病、 ベストロフィン)	
4.85	NM_152592	C14orf49	染色体14オープンリーディングフレーム 49	
4.85	AA923524	RASGRP4	RAS グアニル放出タンパク質 4	
4.85	BC008777	ITGAL	インテグリン、 α L(抗原CD11A(p180))	
4.67	AF014403	PPAP2A	ホスファチジン酸ホスファターゼ2A型	
4.65	AK097698	SORCS2	ソルチリン関連VPS10ドメイン含有受容体2	30
4.63	X14355	FCGR1A	IgGのFc断片、高親和性Ia、受容体(CD64)	
4.55	NM_001629	ALOX5AP	アラキドン酸5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質	
4.50	AU155968	C18orf1	染色体18オープンリーディングフレーム1	
4.44	AK075092	HERV-FRD	HERV-FRDプロウイルス祖先Envポリタンパク質	
4.42	NM_020960	GPR107	G タンパク質共役型受容体 107	
4.37	BC000039	FAM26B	配列類似性を有するファミリー26、メンバーB	
4.35	NM_153701	IL12RB1	インターロイキン12受容体、 β 1	
4.35	AI762344	PTGER1	プロスタグランジンE受容体1(亜型EP1)、42kDa	
4.31	NM_006459	SPFH1	SPFHドメインファミリー、メンバー1	
4.27	NM_003126	SPTA1	スペクトリン、 α 、赤血球1(楕円赤血球症2)	40
4.22	AL518391	AQP1	アクアポリン1(チャネル形成内在性タンパク質、28kDa)	
4.12	AK026188	PCDHGC3	プロトカドヘリン γ サブファミリー C	
4.10	AU146685	EDG2	内皮分化、リゾホスファチジン酸Gタンパク質 共役型受容体、2	
4.05	BE673587	SLC14A1	溶質運搬体ファミリー14(尿素輸送体)、 メンバー1(キッド式血液型)	
4.02	BF129969	TSPAN2	テトラスパニン 2	
4.00	AW243272	KCNK5	カリウムチャネル、サブファミリーK、メンバー5	

3.98	T68858	DHRS3	デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ (SDRファミリー) メンバー3	
3.94	AI827849	VTI1A	t-SNAREとの相互作用を介した小胞輸送 ホモログ1A(酵母)	
3.86	AL134012	NRXN2	ニューレキシン 2	
3.83	BG230614	CD47	CD47 抗原 (Rh関連抗原、インテグリン関連シグナル 伝達因子)	
3.80	AI869717	MGC15523	仮定的タンパク質 MGC15523	
3.80	AI458583	SIMP	免疫優性MHC関連ペプチドの供給源	
3.79	NM_002183	IL3RA	インターロイキン3受容体、 α (低親和性)	10
3.79	AA608820	NRXN2	ニューレキシン 2	
3.73	NM_000206	IL2RG	インターロイキン2受容体、 γ (重症複合免疫不全)	
3.72	BC002737	VAMP2	小胞結合膜タンパク質2 (シナプトブレビン2)	
3.72	BC005884	BID	BH3 相互作用ドメインデスアゴニスト; BH3 相互作用ドメインデスアゴニスト	
3.68	AI688418	PLXNA2	プレキシン A2	
3.68	BC003105	PTP4A3	プロテインチロシンホスファターゼ IVA型、メンバー3	
3.68	NM_001772	CD33	CD33 抗原 (gp67)	
3.66	AI955119	VAMP2	小胞結合膜タンパク質2 (シナプトブレビン2)	20
3.65	BC007524	SPAG9	精子関連抗原 9	
3.64	AI344200	SLC25A35	溶質運搬体ファミリー25、メンバー35	
3.64	BC005253	KLHL20	ケルチ様20 (ショウジョウバエ)	
3.58	BF381837	C20orf52	染色体20オープンリーディングフレーム52	
3.51	NM_002886	RAP2A ; RAP2B	RAP2A、RAS癌遺伝子ファミリーのメンバー RAP2B、RAS癌遺伝子ファミリーのメンバー	
3.50	NM_007063	TBC1D8	TBC1 ドメインファミリー、メンバー8 (GRAMドメインを有する)	
3.45	AK027160	BCL2L11	BCL2-様11 (アポトーシス促進因子)	
3.44	BF055366	EDG2	内皮分化、リゾホスファチジン酸Gタンパク質共役型 受容体、2	
3.42	NM_003608	GPR65	G タンパク質共役型受容体 65	30
3.41	AI675453	PLXNA3	プレキシン A3	
3.40	AV734194	DPP8	ジペプチジルペプチダーゼ 8	
3.36	BC001956	KIAA1961	KIAA1961 遺伝子	
3.34	NM_013332	HIG2	低酸素誘導性タンパク質 2	
3.31	BC029450	SLC33A1	溶質運搬体ファミリー 33 (アセチル-CoA輸送体)、 メンバー 1	
3.28	BF677986	KIAA1961	KIAA1961 遺伝子	
3.27	AI433691	CACNA2D4	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\alpha 2/\delta$ サブユニット4	
3.26	AB014573	NPHP4	ネフロン癆 4	
3.25	AL582804	LY9	リンパ球抗原 9	
3.25	BG236280	CD86	CD86 抗原 (CD28 抗原リガンド2、B7-2抗原)	40
3.24	AA639289	SLC26A7	溶質運搬体ファミリー26、メンバー7	
3.24	NM_005211	CSF1R	コロニー刺激因子1受容体、以前はマクドノー (McDonough) ネコ肉腫ウイルス (v-fms) 癌遺伝子ホモログ; コロニー刺激因子1受容体、以前はマクドノーネコ肉腫 ウイルス (v-fms) 癌遺伝子ホモログ	
3.24	AI051254	TRPM2	一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリーM、 メンバー2	

3.23	AW292816	ABHD2	アブヒドロラーゼドメイン含有 2	
3.23	BC040275	RASGRF1	Ras タンパク質特異的グアニンヌクレオチド放出因子1	
3.22	NM_021911	GABRB2	γ -アミノ酪酸(GABA)A受容体、 β 2	
3.19	AI660619	SLC7A6	溶質運搬体ファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体、 y^+ 系)、メンバー6	
3.19	NM_001860	SLC31A2	溶質運搬体ファミリー31(銅輸送体)、メンバー2	
3.18	NM_015680	C2orf24	染色体2オープンリーディングフレーム24	
3.17	AW058600	SLC36A1	溶質運搬体ファミリー36(プロトン/アミノ酸共輸送体)メンバー1	10
3.16	AU145049	HIP1	ハンチンチン相互作用タンパク質1	
3.15	NM_005770	SERF2	小型EDRKに富む因子 2	
3.15	NM_003566	EEA1	初期エンドソーム抗原1、162kD	
3.14	NM_020041	SLC2A9	溶質運搬体ファミリー2(促進されたグルコース輸送体)、メンバー9	
3.14	W90718	SLC24A4	溶質運搬体ファミリー 24 (ナトリウム/カリウム/カルシウム交換体)、メンバー4	
3.13	AI423165	TICAM2	toll様受容体アダプター分子2	
3.12	AI674647	SPPL2A	シグナルペプチドペプチダーゼ様 2A	
3.11	NM_004121	GGTLA1	γ -グルタミルトランスフェラーゼ様活性 1	20
3.10	NM_004546	NDUFB2	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1 β 部分複合体、2、8kDa	
3.05	X15786	RET	ret 癌遺伝子(多発性内分泌腺腫および髄様甲状腺癌1、ヒルシュスブルング病)	
3.05	AF181660	MPZL1	ミエリンタンパク質ゼロ様 1	
3.00	AI571996	STAM2	シグナル伝達アダプター分子(SH3ドメインおよびITAMモチーフ)2	
2.99	NM_000201	ICAM1	細胞間接着分子1(CD54)、ヒトライノウイルス受容体	
2.93	NM_025244	TSGA10	精巣特異的、10	
2.93	AU147538	PRKCE	プロテインキナーゼC、 ϵ	
2.92	NM_024576	OGFRL1	オピオイド増殖因子受容体様 1	30
2.91	AI248055	ABCC4	ATP 結合カセット、サブファミリーC(CFTR/MRP)、メンバー4	
2.86	AA503877	CEPT1	コリン/エタノールアミンホスホトランスフェラーゼ1	
2.84	BC030993	FLJ21127	仮定的タンパク質 FLJ21127	
2.82	NM_001859	SLC31A1	溶質運搬体ファミリー31(銅輸送体)、メンバー1	
2.81	M74721	CD79A	CD79A 抗原(免疫グロブリン結合 α)	
2.79	AI986112	MGAT4B	マンノシル(α -1, 3-)-糖タンパク質 β -1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、イソ酵素B	
2.79	NM_030930	UNC93B1	unc-93 ホモログB1(C.エレガンス);unc-93 ホモログB1(C.エレガンス)	40
2.79	X74039	PLAUR	プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ受容体	
2.75	BC005253	KLHL20	ケルチ様 20 (ショウジョウバエ)	
2.73	AB036432	AGER	終末糖化産物特異的受容体	
2.71	NM_007245	ATXN2L	アタキシン2様	
2.71	NM_016072	GOLT1B	ゴルジ輸送1ホモログB(S.セレビシエ)	
2.71	AI453548	ZDHC8	亜鉛フィンガー、DHHC型含有8	
2.70	AI636233	TMEM8	膜貫通型タンパク質8(5個の膜貫通ドメイン)	

2.69	BE502509	T3JAM	TRAF3相互作用タンパク質 3	
2.69	AW117765	PEX13	ペルオキシソーム生合成因子 13	
2.69	AW052216	IL17RB	インターロイキン17受容体 B	
2.67	NM_003853	IL18RAP	インターロイキン18受容体アクセサリタンパク質	
2.66	NM_002490	NDUFA6	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1 α 部分複合体、6、14kDa	
2.65	NM_016639	TNFRSF12A	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー12A	
2.65	AI363185	FLJ20255	仮定的タンパク質 FLJ20255	
2.65	NM_052931	SLAMF6	SLAMファミリーメンバー 6	
2.65	AW571669	TNFRSF19L	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19様	10
2.64	AA654142	CEECAM1	脳内皮細胞接着分子 1	
2.62	AW510783	TMEM63A	膜貫通型タンパク質 63A	
2.61	W95007	ACSL4	アシル-CoA合成酵素長鎖ファミリーメンバー4	
2.60	S76475	NTRK3	神経栄養性チロシンキナーゼ、受容体、3型	
2.60	AJ130713	SIGLEC7	シアル酸結合Ig様レクチン7	
2.56	NM_003775	EDG6	内皮分化、Gタンパク質共役型受容体6	
2.55	AI978986	MAMDC4	MAM ドメイン含有 4	
2.54	AF010447	MR1	主要組織適合性複合体、クラスI関連	
2.54	NM_006068	TLR6	toll様受容体 6	
2.53	AF041811	NTRK3	神経栄養性チロシンキナーゼ、受容体、3型	20
2.53	AW953521	SERF2 ; HYPK	小型EDRKに富む因子2;ハンチンチン相互作用タンパク質K	
2.51	AW293276	CD53	CD53 抗原	
2.49	AK023058	PLXNA2	プレキシシン A2	
2.49	AI125204	C6orf128	染色体6オープンリーディングフレーム 128	
2.49	NM_000392	ABCC2	ATP結合カセット、サブファミリーC(CFTR/MRP)、メンバー2	
2.46	BC032474	TIRAP	toll-インターロイキン1受容体(TIR)ドメイン含有アダプタータンパク質	
2.44	NM_031211	IMAA ; LOC388221 ; LOC440345 ; LOC440354 ; LOC595101 ; LOC641298	SLC7A5 偽遺伝子 ; SLC7A5 偽遺伝子 ; NPIP様遺伝子座 ; NPIP様遺伝子座 ; 仮定的 タンパク質 LOC440345 ; 仮定的タンパク質 LOC440345 ; PI-3- キナーゼ関連キナーゼ SMG-1 偽遺伝子 ; PI-3- キナーゼ関連キナーゼ SMG-1 偽遺伝子 ; PI-3- キナーゼ関連キナーゼ SMG-1 偽遺伝子 ; PI-3- キナーゼ関連キナーゼ SMG-1 偽遺伝子 ; PI-3- キナーゼ関連キナーゼ SMG-1 - 様遺伝子座 ; PI-3- キナーゼ関連キナーゼSMG-1 - 様遺伝子座	30
2.44	AI797836	CD5	CD5 抗原 (p56-62)	
2.41	W72082	C1QR1	補体成分1、亜成分q、受容体1;補体成分1、 亜成分q、受容体1	
2.40	AA708616	DPP9	ジペプチジルペプチダーゼ 9	40
2.40	BM987094	DLGAP4	discs、大型(ショウジョウバエ)ホモログ関連 タンパク質4	
2.40	AL713719	LOC283501	ATPアーゼ、クラスVI、11A型	
2.39	AI628734	PRLR	プロラクチン受容体	
2.39	NM_012110	CHIC2	システインに富む疎水性ドメイン 2	
2.38	AK022002	TFR2	トランスフェリン受容体 2	
2.37	NM_001555	IGSF1	免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー1	
2.36	AA426091	C19orf15	染色体19オープンリーディングフレーム15	
2.36	BE547542	GOPC	ゴルジ関連PDZおよびコイルドコイルモチーフ含有	

2.36	NM_004231	ATP6V1F	ATPアーゼ、H ⁺ 輸送、リソソーム14kDa、V1サブユニットF	
2.36	AJ130712	SIGLEC7	シアル酸結合Ig様レクチン7	
2.36	NM_017905	TMCO3	膜貫通ドメインおよびコイルドコイルドメイン3	
2.35	AB054985	CACNB1	カルシウムチャネル、電位依存性、 β 1サブユニット	
2.35	NM_005003	NDUFAB1	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1、 α/β 部分複合体、1、8kDa	
2.35	NM_001251	CD68	CD68 抗原	
2.35	AA700869	PSCD2	プレクストリン相同性、Sec7ドメインおよびコイルドコイルドメイン2(サイトヘシン-2)	
2.35	U94903	CD44	CD44 抗原(ホーミング機能およびインド式血液型分類法)	10
2.35	NM_003841	TNFRSF10C	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10c、細胞内ドメイン無しのデコイ	
2.33	NM_004541	NDUFA1	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1 α 部分複合体、1、7.5kDa	
2.33	BE567130	KLRK1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーK、メンバー1	
2.31	NM_017460	CYP3A4	シトクロムP450、ファミリー3、サブファミリーA、ポリペプチド4	
2.31	AI339536	DSC1	デスモコリン1	
2.31	NM_001783	CD79A	CD79A 抗原(免疫グロブリン結合 α); CD79A 抗原(免疫グロブリン結合 α)	20
2.30	AA333161	VTI1A	t-SNAREとの相互作用を介した小胞輸送ホモログ1A(酵母)	
2.30	AW134823	CD6	CD6 抗原; CD6 抗原	
2.30	AL137537	ATP8B2	ATPアーゼ、クラスI、8B型、メンバー2	
2.29	AI671983	SLC2A9	溶質運搬体ファミリー2(促進されたグルコース輸送体)、メンバー9	
2.29	AA018187	C22orf3	染色体22オープンリーディングフレーム3	
2.29	AL117415	ADAM33	ADAMメタロペプチダーゼドメイン33	
2.29	NM_002588	PCDHGC3 ; PCDHGB4 ; PCDHGA8 ; PCDHGA12 ; PCDHGC5 ; PCDHGC4 ; PCDHGB7 ; PCDHGB6 ; PCDHGB5 ; PCDHGB3 ; PCDHGB2 ; PCDHGB1 ; PCDHGA11 ; PCDHGA10 ; PCDHGA9 ; PCDHGA7 ; PCDHGA6 ; PCDHGA5 ; PCDHGA4 ; PCDHGA3 ; PCDHGA2 ; PCDHGA1	プロトカドヘリン γ サブファミリー C, 3 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 4 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 8 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 12 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー C, 5 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー C, 4 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 7 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 6 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 5 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 3 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 2 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー B, 1 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 11 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 10 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 9 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 7 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 6 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 5 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 4 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 3 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 2 ; プロトカドヘリン γ サブファミリー A, 1	30
2.29	NM_020960	GPR107	Gタンパク質共役型受容体 107	40

2.29	AK074635	GENX-3414	ゲネトニン 1	
2.29	BE138575	ITGB5	インテグリン、 β 5	
2.28	NM_003830	SIGLEC5	シアル酸結合Ig様レクチン5;シアル酸結合Ig様 レクチン5	
2.28	NM_013319	UBIAD1	UbiAプレニルトランスフェラーゼドメイン含有1	
2.28	M63889	FGFR1	線維芽細胞増殖因子受容体1(fms関連チロシン キナーゼ2、プファイファー症候群)	
2.27	H67156	MSCP	溶質運搬体ファミリー 25、メンバー 37	
2.27	BC006215	SMEK2	KIAA1387 タンパク質 ; KIAA1387 タンパク質	
2.27	AL109653	SLITRK2	SLITおよび NTRK に似たファミリー、メンバー2	
2.27	NM_007011	ABHD2	アブヒドロラーゼドメイン含有 2	10
2.26	AI767210	MGC11332	仮定的タンパク質 MGC11332	
2.26	BF723605	NRCAM	神経細胞接着分子	
2.26	R08129	CDA08	T細胞免疫調節性タンパク質	
2.26	AF052059	SEL1L	lin-12様のsel-1抑制因子(C. エレガンス)	
2.26	NM_005729	PPIF	ペプチジルプロリルイソメラーゼF(シクロフィリンF)	
2.25	BE858032	ARL2L1	ADP-リボシル化因子様2様1	
2.25	AI950390	C14orf118	染色体 14 オープンリーディングフレーム118	
2.24	NM_017767	SLC39A4	溶質運搬体ファミリー 39 (亜鉛輸送体)、メンバー4	
2.24	AL110273	SPTAN1	スペクトリン、 α 、非赤血球1(α -ホドリン)	
2.24	AI077660	CDA08	T細胞免疫調節性タンパク質	20
2.23	AA488687	SLC7A11	溶質運搬体ファミリー 7、 (カチオン性アミノ酸輸送体、y+系)メンバー11	
2.23	NM_000634	IL8RA	インターロイキン8受容体、 α	
2.22	AL390177	MGC34032	溶質運搬体ファミリー 44、メンバー 5	
2.21	NM_001531	MR1	主要組織適合性複合体、クラスI関連	
2.21	NM_003183	ADAM17	ADAM メタロペプチダーゼドメイン17(腫瘍壊死因子、 α 、変換酵素)	
2.20	AC003999	SCAP2	src ファミリー関連リンタンパク質 2	
2.20	BC014416	SLC33A1	溶質運搬体ファミリー 33 (アセチル-CoA輸送体)、 メンバー1	
2.20	AF226731	ADORA3	アデノシンA3受容体	
2.19	AI608725	ICAM1	細胞間接着分子1(CD54)、ヒトライノウイルス受容体	30
2.19	U41163	SLC6A8 ; FLJ43855	溶質運搬体ファミリー6(神経伝達物質輸送体、 クレアチン)、メンバー8;ナトリウムおよび クロリド依存性クレアチン輸送体に類似	
2.19	AU147799	LRRC15	ロイシンリッチリピート含有 15	
2.18	AW337166	LOC255104	膜貫通ドメインおよびコイルドコイルドメイン4	
2.18	NM_006505	PVR	ポリオウイルス受容体	
2.18	AI638420	CLIC4	細胞内塩素イオンチャネル 4	
2.18	AI167482	SCUBE3	シグナルペプチド、CUBドメイン、EGF様3	
2.18	AI739514	HAS3	ヒアルロナンシンターゼ 3	
2.18	NM_005971	FXYD3	FXYD ドメイン含有イオン輸送調節因子 3	40
2.17	AL022398	TRAF3IP3	TRAF3 相互作用タンパク質 3	
2.17	U90940	FCGR2C	IgGのFc断片、低親和性IIc、受容体 (CD32)	
2.16	BC023540	SORCS1	ソルチリン関連VPS10ドメイン含有受容体1	
2.16	AV713913	OSTM1	大理石骨病関連膜貫通型タンパク質1	
2.15	NM_024505	NOX5	NADPH オキシダーゼ、EF- ハンドカルシウム結合 ドメイン5	

2.15	BC006178	SEC22L3	SEC22小胞トラフィックタンパク質様3(S. セレビスエ);SEC22小胞トラフィックタンパク質様3 (S. セレビスエ)	
2.15	BG151527	GRIK5	グルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイナート5	
2.14	AW001754	NEGR1	神経細胞成長調節因子 1	
2.14	NM_013979	BNIP1	BCL2/アデノウイルスE1B 19kDa相互作用タンパク質1	
2.14	NM_018643	TREM1	骨髄性細胞上で発現される誘発受容体 1	
2.12	NM_005284	GPR6	G タンパク質共役型受容体 6	
2.11	AA454190	ZDHHC20	亜鉛フィンガー、DHH型含有20	
2.11	AB048796	TMPRSS13	膜貫通型プロテアーゼ、セリン 13	
2.11	AL044520	NYD-SP21	精巣発達関連 NYD-SP21	10
2.11	BE463930	TMAP1	マトリックス再構築関連 7	
2.10	NM_152264	SLC39A13	溶質運搬体ファミリー 39 (亜鉛輸送体)、メンバー13	
2.08	AL530874	EPHB2	EPH 受容体 B2	
2.07	NM_018668	VPS33B	液胞タンパク質選別33B(酵母)	
2.07	NM_024531	GPR172A	Gタンパク質共役型受容体 172A	
2.07	NM_023038	ADAM19	ADAM メタロペプチダーゼドメイン19(メルトリンβ)	
2.07	BC001281	TNFRSF10B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 10b	
2.07	AF217749	PCDHB9	プロトカドヘリンβ 9	
2.06	AB030077	FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体2(細菌によって発現されるキナーゼ、ケラチノサイト増殖因子受容体、頭蓋顔面異骨症1、クルーゾン症候群、プファイファー症候群、ジャクソン-ワイズ症候群)	20
2.06	AL137432	SUSD1	sushi ドメイン含有 1	
2.05	NM_004518	KCNQ2	カリウム電位依存性チャネル、KQT様サブファミリー、メンバー 2	
2.04	AI672363	VPS33B	液胞タンパク質選別33B(酵母)	
2.04	NM_006671	SLC1A7	溶質運搬体ファミリー1(グルタミン酸輸送体)、メンバー 7	
2.03	AA215519	DLGAP1	Discs、大型(ショウジョウバエ)ホモログ関連タンパク質1	
2.02	NM_004648	PTPNS1	プロテインチロシンホスファターゼ、非受容体型基質1	30
2.02	NM_002564	P2RY2	プリン受容体P2Y、Gタンパク質共役型、2	
2.01	BF511678	SCUBE3	シグナルペプチド、CUBドメイン、EGF様3	
2.01	BC013385	CLEC7A	C型レクチンドメインファミリー7、メンバーA	

【 0 1 3 6 】

CD47は生着を容易にし、食作用を阻害し、AML LSCにおいて、より高発現される。ナチュラルキラー(NK)エフェクター細胞を介した先天性免疫系が、非自己細胞および異常細胞を排除する際に機能することが長い間認識されている。NK細胞は、多くの正常細胞上に存在するリガンドに結合する様々なNK細胞活性化受容体によって認識された標的細胞を排除する;しかしながら、自己主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子発現は、NK阻害性受容体に結合することによって細胞を保護することができる。

【 0 1 3 7 】

これらの阻害性受容体は、SHP-1チロシンホスファターゼおよびSHP-2チロシンホスファターゼを動員および活性化する免疫受容体チロシンベース抑制(ITIM)モチーフをしばしば含み、その結果、活性化受容体からのシグナル伝達を阻害する。マクロファージおよび樹状細胞などの単球由来エフェクター細胞もまた、いくつかの活性化受容体によって媒介される、非自己細胞および異常細胞の排除に関与していることを示唆する証拠が蓄積されつつある。これらのエフェクター細胞はまた、SHP-1ホスファターゼおよびSHP-2ホスファターゼを動員および活性化して、食作用を阻害することができるITIMモチーフを含む阻害性受容体であるシグナル調節タンパク質α(SIRPα)を発現する。いくつかの研究で、CD47が

40

50

SIRP α のリガンドであることが確認された。CD47は広範囲で発現される膜貫通型タンパク質であり、いくつかのインテグリンと物理的に結合するため、インテグリン関連タンパク質(IAP)として最初は同定された。

【0138】

CD47は、血小板活性化、細胞の運動性および接着、ならびに白血球の接着、遊走、および食作用を含むいくつかのプロセスに関係があるとされている。CD47-SIRP α 相互作用は、いくつかの研究の結果から、食作用阻害に関係があるとされている。第1に、野生型ではないCD47欠損マウスの赤血球(RBC)は、野生型マウスに輸血した場合、脾臓マクロファージによって血流から迅速に除かれ、この作用はCD47-SIRP α 相互作用に依存していた。野生型ではないCD47欠損リンパ球および骨髄細胞もまた、類遺伝子性野生型レシビエントに移植すると、マクロファージおよび樹状細胞を介した食作用によって迅速に除かれた。さらなる証拠から、CD47-SIRP α 相互作用が、IgGまたは補体でオプソニン化した細胞を認識することによって刺激された食作用を阻害できることが示唆された。したがって、CD47は、SIRP α に結合し、優性な阻害シグナルを送達することによって、マクロファージおよび樹状細胞の食作用の決定的に重要な調節因子として機能する。

10

【0139】

本発明者らは、ヒトAML LSCおよび正常HSCにおけるCD47発現をフローサイトメトリーによって測定した。正常な動員されたヒト末梢血の試料3つに由来するHSC(Lin-CD34+CD38-CD90+)およびヒトAMLの試料7つに由来するAML LSC(Lin-CD34+CD38-CD90-)を、CD47の表面発現に関して解析した(図2)。CD47は、正常HSCの表面では低レベルで発現された;しかしながら、AML LSCならびにバルク白血病芽球においては、CD47は平均で約5倍に高発現された。

20

【0140】

抗ヒトCD47モノクローナル抗体は食作用を刺激し、AML LSCの生着を阻害する。AML LSCにおけるCD47過剰発現が、エフェクター細胞上のSIRP α との相互作用を介してこれらの細胞の食作用を妨げるモデルを試験するために、本発明者らは、CD47-SIRP α 相互作用を混乱させることが公知であるCD47に対するモノクローナル抗体を使用した。B6H12と呼ばれるマウス抗ヒトCD47モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをATCCから取得し、精製抗体を作製するために用いた。最初に、本発明者らは、インビトロの食作用アッセイ法を実施した。ヒトAMLの試料2つから、初代ヒトAML LSCをFACSによって精製し、次いで、蛍光色素CFSEを添加した。これらの細胞をマウス骨髄由来マクロファージと共にインキュベートし、免疫蛍光顕微鏡検査法(図2)およびフローサイトメトリー(図3)を用いてモニターして、貪食された細胞を確認した。どちらの場合も、アイソタイプ対照抗体の存在下では食作用は観察されなかった;しかしながら、抗CD47抗体を添加した場合は、顕著な食作用が検出された。したがって、モノクローナル抗体によるヒトCD47の遮断により、マウスマクロファージによるこれらの細胞の食作用を刺激することができる。

30

【0141】

次に、本発明者らは、抗CD47抗体がインビボでAML LSC生着を阻害する能力を調査した。NOG新生仔マウスに移植する前に、2つの初代ヒトAML試料を処理しないか、または抗CD47抗体でコーティングした。13週後、これらのマウスを屠殺し、フローサイトメトリーによってヒト白血病の骨髄生着について解析した(図5)。対照マウスは、白血病の生着を示したのに対し、抗CD47でコーティングした細胞を移植したマウスは、生着をほとんど~全く示さなかった。これらのデータから、モノクローナル抗体によるヒトCD47の遮断により、AML LSC生着を阻害できることが示唆される。

40

【0142】

CD96は、ヒト急性骨髄性白血病幹細胞に特異的な細胞表面分子である。最初はTactileと呼ばれたCD96は、T細胞活性化の際に著しく上方調節されるT細胞表面分子として最初に同定された。CD96は、休止中のT細胞およびNK細胞では低レベルで発現され、両方の細胞型において刺激されると強く上方調節される。これは、他の造血細胞では発現されず、その発現パターンの調査により、それ以外では一部の腸上皮に存在するだけであることが示

50

された。CD96の細胞質内ドメインは、推定上のITIMモチーフを含むが、これがシグナル伝達において機能するかは公知ではない。CD96は、CD155を発現する標的細胞へのNK細胞の接着を促進して、活性化NK細胞の細胞障害性を刺激する。

【0143】

遺伝子発現解析によって確認された分子の優先的細胞表面発現。CD47およびCD96以外に、CD123、CD44、およびCD33を含む、図2Bに挙げた分子の内のいくつかは、AML LSC上で発現されることが公知である。残りの分子は、ヒトAML LSCにおいての方が正常な対応物と比べて優先的に発現されることが以前に報告も確認もされていない。本発明者らは、これらの分子の内の2つの細胞表面発現をフローサイトメトリーによって検査して、正常HSCと比べてAML LSCにおける優先的発現が存在するか判定した。

10

【0144】

図1Bの他の候補遺伝子を評価するために、本発明者らは、未処理のアレイ発現値に基づいて、正常HSC上で発現される可能性が低い分子を求めてこのリストをスクリーニングした。次に、公開されている報告書を用いて、本発明者らは、モノクローナル抗体が白血病細胞の他にはほとんど標的を持たないと思われる極めて限定された発現パターンを有する遺伝子を同定するために、これらの遺伝子の組織発現パターンを調査した。これらの方法に基づいて、2つの有望な遺伝子を同定した：副甲状腺ホルモン受容体2およびA型肝炎ウイルス細胞受容体2(TIM-3:T細胞免疫グロブリンムチン3としても公知)。副甲状腺ホルモン受容体2(PTH2R)は通常、膵臓および中枢神経系のいくつかの領域で発現される。その主なりガンドは、隆起漏斗系ペプチド39(TIP39)と呼ばれるペプチドである。A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)は通常、Tリンパ球の部分集団で発現される。その主なりガンドは、ガレクチン-9と名付けられた分子である。

20

【0145】

その他の配列の検証では、特異的抗体およびフローサイトメトリーによる試験を利用し、正常な多分化能前駆細胞と比較する。

【0146】

実施例2

CD99は、T細胞上で最も高発現される表面糖タンパク質であり、T細胞において細胞接着の際に機能し得る。正常なヒト臍帯血の試料3つに由来するHSC(Lin-CD34+CD38-CD90+)およびヒトAMLの試料7つに由来するAML LSC(Lin-CD34+CD38-CD90-)におけるCD99発現をフローサイトメトリーによって測定した(図6)。CD99は、正常HSCの表面では低レベルで発現された；しかしながら、AML LSCにおいては、CD99は平均で約5倍に高発現された。CD97は通常、最も成熟した造血細胞で発現され、活性化されたリンパ球上で上方調節され、そこで細胞の遊走および接着の際に機能し得る。遺伝子発現プロファイリングにより、HSCおよびMPPではCD97の発現が低い～無く、AML LSCにおいては約10倍に高発現されることが示されている。正常臍帯血HSCおよびAML LSCにおけるCD97発現をフローサイトメトリーによって検査したところ、HSC試料では発現が無く、AML LSC試料7個中5個で高発現であることが判明した(図7)。

30

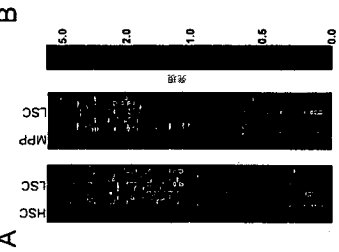
【0147】

本発明者らは、(正常な骨髄および臍帯血の両方に由来する)HSCのいくつかの試料および新規のヒトAMLの複数の試料におけるCD97、CD99、CD180、およびTIM3(HAVCR2)の表面発現をフローサイトメトリーによって検査した。本発明者らは、AML LSCにおけるこれらの各分子の発現が増大しており、HSCにおける発現は低い～無いことを見出した(図8～10)。本発明者らはまた、骨髄HSCおよびAML LSC中のPTH2Rの発現を、フローサイトメトリー用に有効なモノクローナル抗体がこの抗原に関しては入手できないため、定量的リアルタイムPCRによって調査した。本発明者らは、HSCではPTH2Rが発現されず、AML LSCでは発現が増大していることを見出した。

40

【図 1】

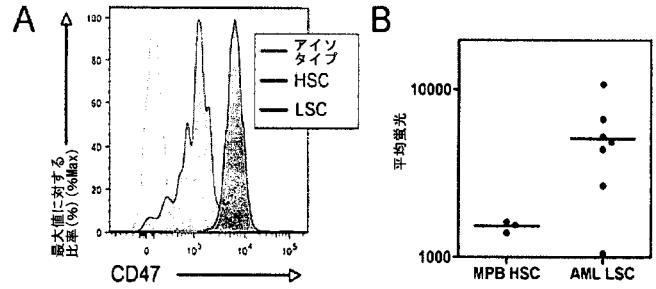
遺伝子	CD96 発現	CD96 発現率	CD96 発現率
インターロイキン6受容体α/βヘテロ二量体	57.5	57.5	57.5
インターロイキン6受容体β	31.0	31.0	31.0
インターロイキン6受容体α	27.4	27.4	27.4
インターロイキン6受容体β	26.9	26.9	26.9
インターロイキン6受容体α	19.4	19.4	19.4
インターロイキン6受容体β	18.2	18.2	18.2
インターロイキン6受容体α	16.8	16.8	16.8
インターロイキン6受容体β	14.5	14.5	14.5
インターロイキン6受容体α	13.5	13.5	13.5
インターロイキン6受容体β	11.4	11.4	11.4
インターロイキン6受容体α	11.3	11.3	11.3
インターロイキン6受容体β	10.9	10.9	10.9
インターロイキン6受容体α	10.5	10.5	10.5
インターロイキン6受容体β	9.8	9.8	9.8
インターロイキン6受容体α	7.3	7.3	7.3
インターロイキン6受容体β	6.6 NS	6.6 NS	6.6 NS
インターロイキン6受容体α	6.1 NS	6.1 NS	6.1 NS
インターロイキン6受容体β	5.6 NS	5.6 NS	5.6 NS
インターロイキン6受容体α	3.8 NS	3.8 NS	3.8 NS
インターロイキン6受容体β	3.0	3.0	3.0
インターロイキン6受容体α	3.7	3.7	3.7
インターロイキン6受容体β	4.3	4.3	4.3
インターロイキン6受容体α	2.2	2.2	2.2
インターロイキン6受容体β	2.3	2.3	2.3



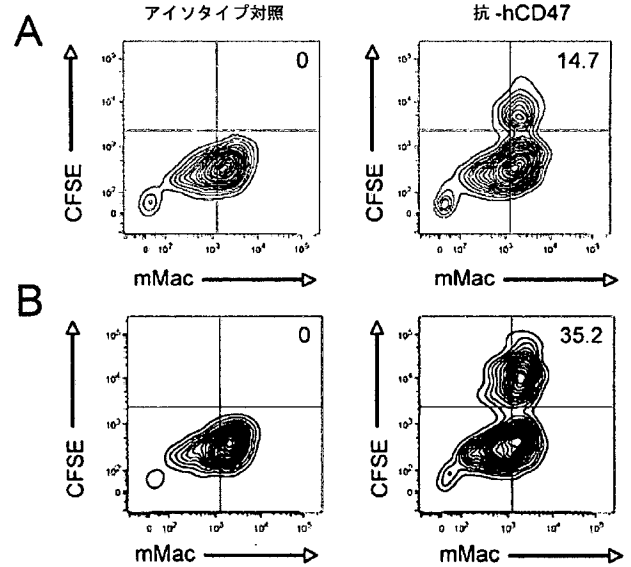
【図 3】



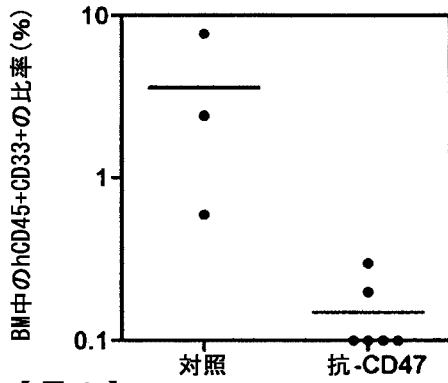
【図 2】



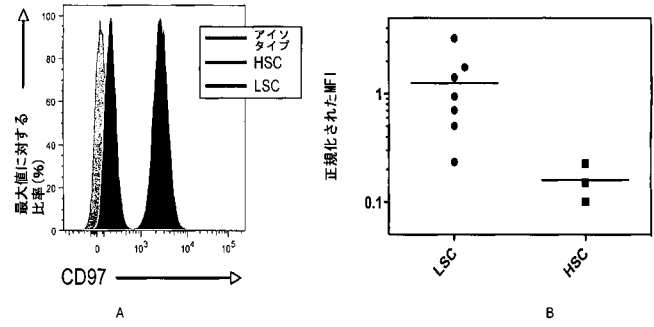
【図 4】



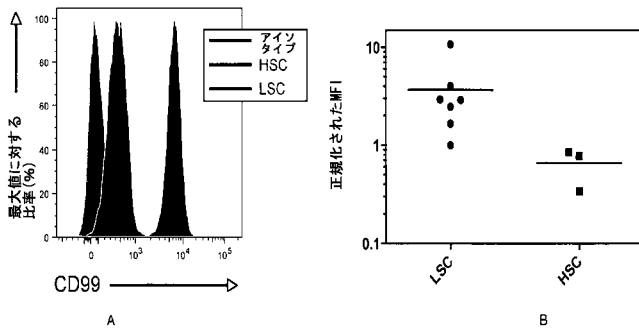
【図 5】



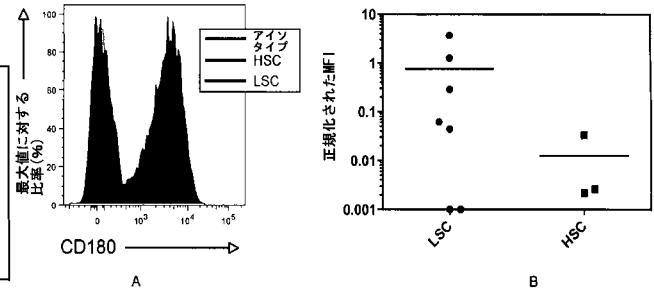
【図 7】



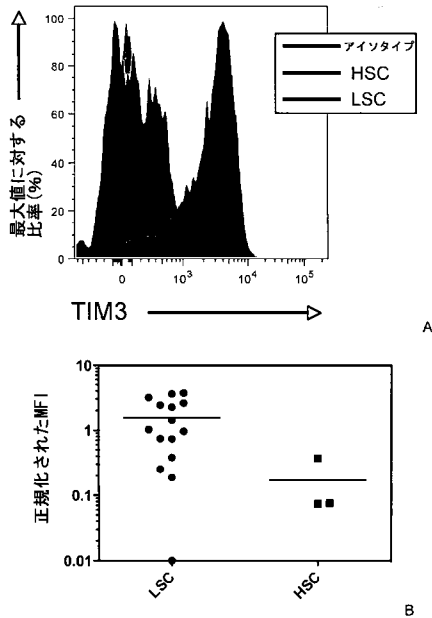
【図 6】



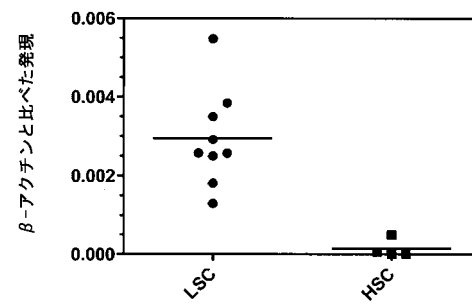
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【手続補正書】

【提出日】平成22年10月19日(2010.10.19)

【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】

表1に示す差次的に発現されるマーカーまたはマーカーの組合せに対して特異的な反応物に、患者試料を接触させる段階；

マーカーを発現する癌細胞の数を定量する段階を含む、患者に由来する急性骨髄性白血病を特徴付けるための方法であって、マーカーを発現する癌細胞の存在によりAML幹細胞(AMLSC)の存在が示される、方法。

【請求項 2】

定量する段階がフローサイトメトリーによって実施される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

定量する段階が免疫組織化学によって実施される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

試料が血液試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

患者がAMLに罹患していると診断されている、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

患者がAMLの治療を受けている、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

患者がヒトである、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

マーカーがTIM3、CD97、CD99およびCD180より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

請求項1記載の方法において使用するためのキット。

【請求項 10】

AMLSCに対する有効性について化学療法候補作用物質をスクリーニングする方法であって、

表1に示すポリペプチドを発現しているAMLSCを、候補作用物質と接触させる段階、および

該AMLSCに対する該作用物質の有効性を判定する段階を含む、方法。

【請求項 11】

AML癌幹細胞をターゲティングするかまたは枯渇させる方法であって、

AMLSCをターゲティングするかまたは枯渇させるために、表1に示すマーカーまたはマーカーの組合せに特異的に結合する作用物質に、反応物血液細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 12】

作用物質が抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

マーカーがCD97、CD99、CD180およびTIM3より選択される、請求項11記載の方法。

【請求項 14】

作用物質が、表1に示す2種のマーカーに結合する二重特異性抗体である、請求項12記載の方法。

【請求項 15】

請求項11記載の方法において使用するための治療用製剤。

【請求項 16】

AMLを診断または病期分類するための方法であって、
表1に挙げたものより選択される遺伝子配列の発現の上方調節を測定する段階を含む、
方法。

【請求項 17】

測定する段階が、癌細胞の試料中のmRNAまたはポリペプチドの量の増加または減少を検出することを含む、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

アレイへのハイブリダイゼーションによって発現が測定される、請求項16記載の方法。

【請求項 19】

表1に示す2つまたはそれ以上の配列をアレイが含む、請求項18記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

本発明の別の態様において、AMLSCを単離するための方法であって、候補細胞集団を本明細書において提供される1種または複数種のAMLSCマーカーに特異的な結合反応物と接触させる段階、およびそれらの反応物に結合した細胞を選択する段階を含む方法が提供される。これらの細胞は、 $CD34^+CD38^-$ としてさらに選択してもよい。これらの細胞は、実験的評価のため、ならびにこれらの細胞で特異的に発現される遺伝子を同定する際に有用なmRNA種を含む系統および細胞に特異的な産生物の供給源として、ならびにそれらに影響を及ぼし得る因子または分子を発見するための標的として、有用である。AMLSCは、例えば、細胞に対する影響に基づいて化合物をスクリーニングする方法において使用され得る。これは、その化合物を本発明の細胞集団と組み合わせること、次いで、その化合物に起因する任意の調節的効果を測定することを含む。これは、生存力、毒性、代謝変化、または細胞機能に対する影響に関する細胞の検査を含んでよい。本明細書において説明するAMLSCの表現型により、疾患の進行、再発、および薬物耐性の発達を予測する手段が提供される。

【請求項101】

表1に示す差次的に発現されるマーカーまたはマーカーの組合せに対して特異的な反応物に、患者試料を接触させる段階；

マーカーを発現する癌細胞の数を定量する段階
を含む、患者に由来する急性骨髄性白血病を特徴付けるための方法であって、
マーカーを発現する癌細胞の存在によりAML癌幹細胞の存在が示される、方法。

【請求項102】

定量する段階がフローサイトメトリーによって実施される、請求項101記載の方法。

【請求項103】

定量する段階が免疫組織化学によって実施される、請求項101記載の方法。

【請求項104】

試料が血液試料である、請求項101記載の方法。

【請求項105】

患者がAMLに罹患していると診断されている、請求項101記載の方法。

【請求項106】

患者がAMLの治療を受けている、請求項105記載の方法。

【請求項107】

患者がヒトである、請求項101記載の方法。

【請求項108】

請求項101～107記載の方法のいずれかにおいて使用するためのキット。

[請求項109]

AMLSCに対する有効性について化学療法候補作用物質をスクリーニングする方法であって

、
該作用物質を、請求項101記載の細胞組成物または表1に示すポリペプチドと接触させる
段階、および

AMLSCに対する該作用物質の有効性を判定する段階
を含む、方法。

[請求項110]

AML癌幹細胞をターゲティングするかまたは枯渇させる方法であって、

AMLSCをターゲティングするかまたは枯渇させるために、表1に示すマーカーまたはマ
ーカーの組合せに特異的に結合する作用物質に、反応物血液細胞を接触させる段階を含む、
方法。

[請求項111]

作用物質が抗体である、請求項110記載の方法。

[請求項112]

作用物質が、表1に示す2種のマーカーに結合する二重特異性抗体である、請求項111記載
の方法。

[請求項113]

AMLを診断または病期分類するための方法であって、

表1に挙げたものより選択される遺伝子配列の発現の上方調節を測定する段階を含む、方
法。

[請求項114]

測定する段階が、子宮頸部細胞の試料中のmRNAまたはポリペプチドの量の増加または減
少を検出することを含む、請求項113記載の方法。

[請求項115]

アレイへのハイブリダイゼーションによって発現が測定される、請求項114記載の方法。

[請求項116]

表1に示す2つまたはそれ以上の配列をアレイが含む、請求項115記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/00224															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/574; C12Q 1/68 (2009.01) USPC - 435/7.23; 435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)-G01N 33/574; C12Q 1/68 (2009.01) USPC-435/7.23; 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC 435/7.21, 7.2, 7.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar cd5, cd33, cd44, cd9, cd6, cd69, cd96, cervix, cervical, upregulated, acute myeloid leukemia, marker, biomarker, bispecific, antibody, array, stage, staging, stem cell, cytometry																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>US 2007/0287163 A1 (GEUIJEN et al.) 13 December 2007 (13.12.2007) (para [0016], [0021], [0022], [0024], [0025], [0035], [0041], [0053], [0055], [0082])</td> <td>1-11, and 13-15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2005/0142539 A1 (HERMAN et al.) 30 June 2005 (30.06.2005) (para [0237], [0266])</td> <td>12, and 16</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 6,733,743 B2 (JORDAN et al.) 11 May 2004 (11.05.2004) (abstract)</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 6,491,917 B1 (THOMAS et al.) 10 December 2002 (10.12.2002) (abstract)</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2007/0287163 A1 (GEUIJEN et al.) 13 December 2007 (13.12.2007) (para [0016], [0021], [0022], [0024], [0025], [0035], [0041], [0053], [0055], [0082])	1-11, and 13-15	Y	US 2005/0142539 A1 (HERMAN et al.) 30 June 2005 (30.06.2005) (para [0237], [0266])	12, and 16	A	US 6,733,743 B2 (JORDAN et al.) 11 May 2004 (11.05.2004) (abstract)	1-16	A	US 6,491,917 B1 (THOMAS et al.) 10 December 2002 (10.12.2002) (abstract)	1-16
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 2007/0287163 A1 (GEUIJEN et al.) 13 December 2007 (13.12.2007) (para [0016], [0021], [0022], [0024], [0025], [0035], [0041], [0053], [0055], [0082])	1-11, and 13-15															
Y	US 2005/0142539 A1 (HERMAN et al.) 30 June 2005 (30.06.2005) (para [0237], [0266])	12, and 16															
A	US 6,733,743 B2 (JORDAN et al.) 11 May 2004 (11.05.2004) (abstract)	1-16															
A	US 6,491,917 B1 (THOMAS et al.) 10 December 2002 (10.12.2002) (abstract)	1-16															
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 23 February 2009 (23.02.2009)		Date of mailing of the international search report 02 MAR 2009															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	Y
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 35/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(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, MK, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マジェティ ラビンドラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 スタンフォード アラストラデロ ロード 1 0 5 0 ビル
ディング エー スタンフォード インスティテュート フォー ステム セル バイオ アンド
リジェネラティブ メディシン

(72)発明者 ウェイスマン アービング エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ジェファーソン アベニュー 4 1
4 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB24 CB01 DA14 DA36 FA37 FB02 FB03
4C084 AA02 AA17 AA20 NA14 ZB271 ZC412
4C085 AA14 AA16 AA34 BB11 BB31 BB41 BB43 CC02 CC21 CC22
CC23 DD62 DD63 EE01

专利名称(译)	急性髓性白血病干细胞标记物		
公开(公告)号	JP2011518313A	公开(公告)日	2011-06-23
申请号	JP2010543128	申请日	2009-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	マジェティラビンドラ ウェイスマンアービングエル		
发明人	マジェティ ラビンドラ ウェイスマン アービング エル.		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 G01N37/00 A61K45/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/02 C07K16/2803 C07K16/2896 C07K2317/75 C07K2317/76 C12N5/0093 C12N5/0694 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/136 G01N33/5011 G01N33/57426 G01N2500/04 A61K2039/507 C07K16/28 C07K16/30 C07K2317/24 C07K2317/73		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/543.597 G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53. M G01N33/574.A G01N37/00.102 A61K45/00 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K39/395.Y A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.111		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045 /FB02 2G045/FB03 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA14 4C084/ZB271 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA34 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085 /CC02 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/011324 2008-01-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

鉴定了急性髓性白血病干细胞 (AMLSC) 的标记物。与正常对应细胞相比，标志物差异表达，并且可用作诊断和治疗靶标。

変化率	Genbank	遺伝子記号	説明
94.34	M27331	TRGC2	T細胞受容体γ定常2
57.47	NM_005816	CD96	CD96 抗原
47.17	A1862120	MAMDC2	MAMドメイン含有2
32.36	AF348078	SUCNR1	コホレセ受容体1
32.05	M16768	TRGC2	T細胞受容体γ定常2
30.96	NM_002182	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリータンパク質
29.85	M13231	TRGC2	T細胞受容体γ定常2
27.55	NM_003332	TYROBP	TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質
26.88	NM_004271	LY86	リンパ球抗原96
20.96	NM_014879	P2RY14	プリン受容体P2Y、Gタンパク質共役型、14
18.38	BC020748	CD96	CD96 抗原
18.38	NM_005048	PTHR2	副甲状腺ホルモン受容体2
17.73	A1625747	ADRB1	アドレナリンβ1受容体
17.36	NM_015376	RASGRP3	RASタンパク質放出タンパク質3 (カルシウムおよびDAGによって調節される)
16.84	U62027	C3AR1	補体成分3a受容体1
14.49	AW025572	HAVCR2	A型肝炎ウイルス細胞受容体2
12.48	AF285447	HCST	造血細胞シグナル伝達因子
11.92	A1805323	LGR7	ロニンリクタンリポイド含有Gタンパク質共役型受容体7
11.67	NM_001197	BIK	BCL2相互作用キラー(アポトーシス誘導)
11.53	NM_018092	NETO2	ニムロピリン(NRP)およびトロイド(TLL)様2
11.07	N74607	AQP3	アクアポリン3
10.88	BF439675	CD69	CD69抗原(gp0、初期T細胞活性化抗原)
10.48	NM_001769	CD9	CD9 抗原(p24)
10.32	AF167343	IL1RAP	インターロイキン1受容体アクセサリータンパク質
9.52	AA814140	C5orf18	染色体5オープンリーディングフレーム18
8.77	NM_005582	CD180	CD180 抗原
7.46	AF039686	GPR34	Gタンパク質共役型受容体34
7.30	A1056776	ITGA6	インテグリン、α6
7.19	AJ277151	TNFRSF4	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4
6.99	A1738675	SEPLG	セレクチンリガンド
6.85	AA888858	PDE3B	ホスホジエステラーゼ3b、cGMPによって阻害される
6.80	AU149572	ADCY2	アデニル酸シクラーゼ2(膜)
6.80	NM_002299	LCT	ラクターゼ
6.58	NM_005296	GPR23	Gタンパク質共役型受容体23
6.45	NM_004106	FCER1G	IgEのα鎖片、高親和性受容体
6.29	A1741056	SEPLG	セレクチンリガンド
6.25	AW406569	MGC15619	インテグリン、αX
6.06	M61695	ITGAX	インテグリン、αX
5.92	NM_003494	DYSF	ジスフェリン
5.85	A1860212	PAG1	スフィンゴ脂質マイクドメインと結合したリ
5.75	NM_013447	EMR2	ect様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2