

(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2020-507081

(P2020-507081A)

(43) 公表日 令和2年3月5日 (2020. 3. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 6 3
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 P	
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-556417 (P2019-556417)	(71) 出願人	503209342
(86) (22) 出願日	平成30年1月3日 (2018. 1. 3)		ナショナル タイワン ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	令和1年8月29日 (2019. 8. 29)		台湾 1 O 6 タイペイ ルーズベルト
(86) 国際出願番号	PCT/CN2018/070383		ロード セクション 4 ナンバー 1
(87) 国際公開番号	W02018/127055	(74) 代理人	100114775
(87) 国際公開日	平成30年7月12日 (2018. 7. 12)		弁理士 高岡 亮一
(31) 優先権主張番号	62/442, 077	(74) 代理人	100121511
(32) 優先日	平成29年1月4日 (2017. 1. 4)		弁理士 小田 直
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元
		(72) 発明者	ヤン, パンーチル
			台湾, 1 O 6, タイペイ, ルーズベルト
			ロード, セクション 4, 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺がん幹細胞のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本明細書中、がんを有するか、有する疑いがあるか、またはがんのリスクのある対象から得た生体試料などの試料を、がんの予後不良を表す上記試料におけるがん幹細胞の存在を評価するために、解析するための方法およびキットを提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料を解析するための方法であって、

(i) がん幹細胞を含む疑いのある試料を準備するステップと、

(i i) 前記試料における C D 1 4 のレベルを測定するステップと

を含む、方法。

【請求項 2】

ステップ (i i) が、C D 1 4 タンパク質のレベルを測定するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (i i) を、可溶型であるかまたは細胞表面に発現した、C D 1 4 タンパク質のレベルを測定するために行う、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 C D 1 4 タンパク質のレベルを、免疫組織化学的アッセイ、イムノブロッティングアッセイ、またはフローサイトメトリーアッセイにより測定する、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (i i) が、C D 1 4 をコードする核酸のレベルを測定するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C D 1 4 をコードする核酸のレベルを、リアルタイム逆転写 P C R (R T - P C R) アッセイまたは核酸マイクロアレイアッセイにより、測定する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料における C D 4 4 のレベルを測定するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料が、がんを有するかまたはがんを有する疑いのあるヒトの患者の生体試料である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記生体試料が、体液の試料または組織の試料である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記組織の試料が、腫瘍部位または疑わしい腫瘍部位から得られている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

C D 1 4 のレベル、または C D 1 4 および C D 4 4 のレベルに基づき、前記試料におけるがん幹細胞の存在を決定するステップであって、上昇したレベルの C D 1 4 または上昇したレベルの C D 1 4 および C D 4 4 が、前記試料におけるがん幹細胞の存在を表す、ステップをさらに含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

ヒトの患者が、肺がん、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がんであるがんを有するか、または有する疑いがある、請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ヒトの患者が、非小細胞肺がん (N S C L C) を有する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ヒトの患者の生存率を決定するステップであって、上昇したレベルの C D 1 4 または上昇したレベルの C D 1 4 および C D 4 4 が、不十分な生存率を表す、ステップをさらに含む、請求項 11 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記ヒトの患者をがんのための治療に供するステップをさらに含む、請求項 11～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

予後不良に関連するがんを検出するための方法であって、

(i) がんを有する対象の試料を準備するステップと、

(ii) 前記試料における CD14 のレベルを測定するステップと、

(iii) 前記対象が予後不良に関連するがんを有するかどうかを決定するステップであって、前記試料における CD14 のレベルが所定のレベルより高い場合に、前記対象を、予後不良に関連するがんを有すると識別する、ステップとを含む、方法。

10

【請求項 17】

前記試料における CD44 のレベルを測定するステップであって、CD14 のレベルおよび CD44 のレベルの両方が所定のレベルより高い場合に、前記対象を、予後不良に関連するがんを有すると識別する、ステップをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象が、肺がん、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がんを有するヒトの患者である、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヒトの患者が、非小細胞肺がんを有する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

20

対象のがんの予後診断のための、CD14 のレベル、および任意選択で CD44 のレベルを測定するための 1 つ以上の検出試薬の使用であって、前記がんの予後診断が、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法により行われる、使用。

【請求項 21】

がん幹細胞の濃度を高めるための方法であって、

(i) がん幹細胞を含む疑いのある試料を準備するステップと、

(ii) 前記試料から、CD14⁺細胞または CD14⁺/CD44^{Hi}細胞を単離するステップと

を含む、方法。

【請求項 22】

30

前記がん幹細胞が、肺がん幹細胞、肝臓がん幹細胞、結腸がん幹細胞、また膵臓がん幹細胞である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記がん幹細胞が、非小細胞肺がん幹細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下、2017 年 1 月 4 日に出願の米国仮特許出願第 62/442,077 号に対する優先権を主張する。この全内容は、本明細書中参照として組み込まれている。

40

【背景技術】

【0002】

肺がんは、世界的にみて最も一般的な致死性の悪性腫瘍であり、非小細胞肺がん (NSCLC) は、最も一般的な種類の肺がんである。ドライバー遺伝子の同定および具体的な標的療法の成功により、多くの肺がん患者は、治療に対して良好な初期応答を示す。しかしながら、大部分の患者は、最終的に、薬剤耐性を発症し、1 年以内に再発する。

【0003】

従来のがん治療の戦略は、種類が特定されていないがん細胞を標的としている。しかしながら肺がんなどの固形腫瘍は、多くの場合、組織化した異種の細胞の集団を含む。腫

50

瘍の微小環境（またはニッチ）を形成する複雑な細胞間相互作用は、大部分の悪性腫瘍を引き起こし得る、がん幹細胞（C S C）と呼ばれる細胞の小さな集団と結びついている。C S Cおよび腫瘍のニッチは共に、がんの再発、転移、および薬剤耐性に、主要な役割を果たしている。

【0004】

よって、がん（たとえば肺がん）、たとえば予後不良に関連するがんを有する対象を同定するために、C S Cに関するバイオマーカーを同定すること、ならびに、信頼できる診断方法および予後方法を開発することに、強く関心が集まっている。また、このようなバイオマーカーは、肺がんの機構に関する研究に有用であり、肺がんに有効な新規の治療の開発を促進するであろう。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、がん幹細胞（たとえば肺がん幹細胞）の新規のバイオマーカー、たとえばC D 1 4、またはC D 1 4およびC D 4 4の組み合わせの同定に少なくとも部分的に基づくものである。C D 1 4およびC D 4 4は、分化したがん細胞と比較して、がん関連線維芽細胞（C A F）と共培養した肺がん幹細胞に差次的に存在することが、トランスクリプトームおよびプロテオームの解析を介して見いだされている。さらに、C D 1 4およびC D 4 4は、肺がん患者の予後不良に関連することが判明した。さらに、C D 1 4はまた、肝臓がん、結腸がん、および膵臓がんを含む様々な種類のがん細胞に存在することが判明した。

【0006】

よって、本開示の一態様は、試料を解析するための方法であって、（i）がん幹細胞を含む疑いのある試料を準備するステップと、（i i）上記試料における、C D 1 4のレベル、および同様に任意選択でC D 4 4のレベルを測定するステップを含む、方法を提供する。

【0007】

一部の実施形態では、本方法は、C D 1 4タンパク質のレベル、C D 4 4タンパク質のレベル、またはその両方を測定するステップを含む。一部の例では、試料における膜結合型のC D 1 4タンパク質のレベルおよび／または膜結合型のC D 4 4のレベルを測定する。他の実施形態では、試料における循環性（可溶性）C D 1 4のレベルおよび／または循環性（可溶性）C D 4 4のレベルを測定する。C D 1 4および／またはC D 4 4のタンパク質レベルは、免疫組織化学的アッセイ、イムノブロットングアッセイ、E L I S A、またはフローサイトメトリーアッセイにより、測定され得る。

【0008】

一部の実施形態では、本方法は、C D 1 4をコードする核酸、C D 4 4をコードする核酸、またはその両方のレベルを測定するステップを含む。一部の実施形態では、C D 1 4をコードする核酸のレベル、C D 4 4をコードする核酸のレベル、またはその両方を、リアルタイム逆転写P C R（R T－P C R）アッセイまたは核酸マイクロアレイアッセイにより、測定する。

【0009】

本明細書中記載のアッセイ方法のいずれかで解析される試料は、がん、たとえば肺がん（たとえば非小細胞肺がんまたはN S C L C）、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がんを有するか、または有する疑いのあるヒトの患者の生体試料であり得る。一部の実施形態では、生体試料は、本明細書中記載のヒトの患者から、たとえば腫瘍部位または疑わしい腫瘍部位から入手され得る、組織の試料である。他の実施形態では、生体試料は、本明細書中記載のヒトの患者由来の体液の試料である。

【0010】

本明細書中記載のアッセイ方法のいずれかは、さらに、C D 1 4のレベル、C D 1 4のレベル、またはC D 1 4およびC D 4 4の組み合わせに基づき、試料におけるがん幹細胞（たとえば肺がん幹細胞、肝臓がん幹細胞、結腸がん幹細胞、または膵臓がん幹細胞）の

10

20

30

40

50

存在を決定するステップを含み得る。上昇したレベルのCD14、上昇したレベルのCD44、または上昇したレベルのCD14およびCD44は、試料におけるがん幹細胞の存在を表す。

【0011】

あるいはまたはさらに、本明細書に記載のアッセイ方法のいずれかは、生体試料を入手するヒトの患者の生存率を決定するステップをさらに含み得る。上昇したレベルのCD14、上昇したレベルのCD44、または上昇したレベルのCD14およびCD44は、不十分な生存率を表す。一部の実施形態では、さらに本方法は、がんに関する治療、たとえば肺がん（たとえばNSCLC）に関する治療、肝臓がんに関する治療、結腸がんに関する治療、または膵臓がんに関する治療に、上記ヒトの患者を供するステップを含む。

10

【0012】

別の態様では、予後不良に関連するがんを検出するための方法であって、(i)がんを有する対象の試料を準備するステップと、(ii)上記試料におけるCD14のレベル、および同様に任意選択でCD44のレベルを測定するステップと、(iii)上記試料におけるCD14のレベル、またはCD14およびCD44の両方のレベルに基づき、上記対象が予後不良に関連するがんを有するかどうかを決定するステップとを含む、方法を提供する。試料におけるCD14のレベル、またはCD14およびCD44の両方のレベルが所定のレベルよりも高い場合、対象は、予後不良に関連するがんを有すると同定される。一部の例では、がんは、肺がん（たとえばNSCLC）、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がんとしてすることができる。

20

【0013】

別の態様では、がん幹細胞（たとえば本明細書に記載のがん幹細胞）の濃度を高めるための方法であって、(i)肺がん幹細胞を含む疑いのある試料を準備するステップと、(ii)上記試料から、CD14⁺細胞および任意選択でCD14⁺/CD44^{hi}細胞を単離するステップとを含む、方法を提供する。

【0014】

また本明細書中において、対象のがんの予後診断のための、CD14のレベル、および任意選択でCD44のレベルを測定するための1つ以上の検出試薬の使用が提供され、ここのがんの予後診断は、本明細書に記載のアッセイ方法のいずれかにより行われ得る。

【0015】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細を、以下の説明で記載する。本開示の他の特性または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、同じく添付の特許請求の範囲から、明らかとなるであろう。

30

【0016】

以下の図面は、本明細書の一部を形成しており、本開示の特定の態様をさらに実証するために含まれており、本開示は、本明細書中提供されている特定の実施形態の詳細な説明と併用してこれら図面のうちの1つ以上を参照することにより、良好に理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、CD14およびCD44が、肺がん幹細胞(LCSC)の幹細胞性の維持に関与することを示している。A:コロニーあたりのNanoG陽性幹細胞を、画像ベースのハイコンテンツ解析を介して解析した。CLS1細胞は、CAFと共培養させたものと、CAFと共培養させないものを準備した(N=4)。スケールバー、50μM。上部のパネル:写真画像;下部のパネル:定量的な図。B:脂肪細胞への分化(adipogenic differentiation)後に、油滴を染色するオイルレッドOで陽性に染色されたCLS1/CAF細胞(上部のパネル)。図面に表されるように異なる時点での、脂肪細胞の分化に供されたCLS1/CAF細胞における、脂肪細胞のマーカーであるPPARγおよびLPLのRT-Q-PCR解析(下部パネル)。C:骨形成細胞への分化(osteogenic differentiation)後に、カルシ

40

50

ウム沈着部を染色するアリザリンレッドSで陽性に染色されたCLS1/CAF細胞（上部のパネル）。図面に表されるように異なる時点での、骨芽細胞への分化（osteoblast differentiation）に供されたCLS1/CAF細胞における、骨芽細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼおよびオステオカルシンのRT-Q-PCR解析（下部パネル）。D：CLS1/CAF共培養物（ $N \geq 3$ 匹のマウス）、分化したCLS1細胞（ $N \geq 3$ 匹のマウス）由来のマウスの異種移植片腫瘍の発生率を、NSGマウスに異なる細胞数（ 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、および10個の細胞）の皮下注射後に決定した。CSCの腫瘍をイニシエーションする頻度（tumor-initiating frequency：TIF）を、Localclimiting dilution analysisソフトウェアを使用して計算した。CI、信頼区間。E：がん幹細胞マーカーのスクリーニング戦略の概略的な図示。CSC/CAFおよび分化したがん細胞（CLS1 p. 6）に、Affymetrix マイクロアレイおよび膜のプロテオミクスを行い、表面タンパク質が高度に発現したCSC/CAFを同定した。候補のマーカーは、公開されたコホートを介して、患者の生存と相関していた。F：患者は、高い（high）または低い（low）CD44およびCD14の発現を有すると表した（カットオフ値＝リスクスコアの中央値）。結果は、高発現のグループと低発現のグループとの間の無再発生存率（relapse-free survival）の有意差をカプランマイヤー法で示した。P値は、両側ログランク検定から得た。がん細胞におけるCD44およびCD14の発現レベルを組み合わせることにより、患者を、3つのグループ：高いCD44/高いCD14のグループ、低いCD44/低いCD14のグループ、およびその他に分けた。この結果は、全生存率および無再発生存率の有意差をカプランマイヤー法で示した。P値は、両側ログランク検定から得た。

【図2】図2は、ステージIのNSCLC患者のがん細胞におけるCD44およびCD14の臨床上的有意性を示す。A：外科的切除を受けたステージIのNSCLCを有する80名の患者の臨床コホートから得た原発性腫瘍の検体の一連の解剖に由来するがん細胞におけるCD44およびCD14のIHC染色。がん細胞においてCD44の低い発現（スコア<リスクスコアの中央値）および高い発現（スコア $\geq$ リスクスコアの中央値）を伴う異なる患者から、画像を得た（原寸の倍率、100倍）。また、がん細胞においてCD14の負（スコア＝0）および正（スコア>0）のグループの異なる患者から、画像を得た（原寸の倍率、100倍）。BおよびC：患者は、高いまたは低いCD44の発現（カットオフ値＝リスクスコアの中央値）；負または正のCD14の発現を有すると表した。この結果は、高い発現グループと低い発現グループとの間における全生存率（パネルB）および無再発生存率（パネルC）の有意差をカプランマイヤー法で示した。P値は、両側ログランク検定から得た。がん細胞におけるCD44およびCD14の発現レベルを組み合わせることにより、患者を、3つのグループ：高いCD44/正のCD14のグループ、低いCD44/負のCD14のグループ、およびその他に分けた。この結果は、全生存率および無再発生存率の有意差をカプランマイヤー法で示した。P値は、両側ログランク検定から得た。

【図3】図3は、CAFフィーダー細胞と共培養したがん細胞の細胞表面上のCD44およびCD14の濃度の高さを示す。A：CD44およびCD14のRT-Q-PCRのバリデーション。CLS1細胞は、CLS1のスフィアに由来しており、スフィアから単一細胞に分離され、その後、異なる回数の継代（p3、p6、およびp14）で、CAFを伴うことなく継代培養した。CAFは、フィーダー細胞の対照として作用した。データは、平均値 $\pm$ S.E.M（ $N=3$ ）を表す。B：患者（ $N=4$ 名の患者）から得たCAFと共に培養するかまたは培養していないがん細胞（EKVX）におけるCD44、CD14、およびNanogのRT-Q-PCR解析。この結果は、異なる患者のNFまたはCAF（L2、L5、およびL8）と共培養したがん細胞の有意差をMANOVA検定において示した。C：CAFと培養したCLS1細胞（CLS1/CAF）、またはCAFを伴わずに培養したCLS1細胞（CLS1 p. 6）におけるCD44およびCD14のタンパク質発現を、免疫蛍光染色（パネル左）およびウェスタンブロット解析（パネル右

）を介して推定した。D：RT-QPCR解析を、原発性肺がん細胞（CL152細胞）から選別したCD14⁺CD44^{H i}、CD14⁻CD44^{H i}、およびCD14⁻CD44^{L o w}の集団における幹細胞性マーカーのNanogおよびOct3/4の発現を評価するために行った（N=3）。E：EGF（20ng/ml）およびbFGF（20ng/ml）を含むMCDB201培地で21日間培養した後の原発性肺がん細胞（CL152細胞）から選別したCD14⁺CD44^{H i}、CD14⁻CD44^{H i}およびCD14⁻CD44^{L o w}の集団のスフィアを形成する能力（下部パネル）および形態（上部のパネル）。スケールバー、100μm。F：CLS1肺がん細胞（N≥3匹のマウス）から選別したCD14⁺CD44^{H i}、CD14⁻CD44^{H i}、およびCD14⁻CD44^{L o w}の集団由来のマウスの異種移植片腫瘍の発生率を、NSGマウスへ異なる細胞数（1×10²および10個の細胞）の皮下注射の後に決定した。CSCの腫瘍をイニシエーションする頻度（TIF）を、L-calc limiting dilution analysisソフトウェアを使用して計算した。CI、信頼区間。

【図4】図4は、原発性肺がん細胞から選別したCD14⁺CD44^{H i}集団が、高い腫瘍をイニシエーションする能力を有することを示す。上部パネル：異なる原発性肺がん細胞：CL100（パネルA）、CL141（パネルB）、およびCL152（パネルC）において二重染色したCD44およびCD14のフローサイトメトリー解析。異なる原発性肺がん細胞は、様々な二重陽性の集団（CL100では5.8%、CL141では0.2%、およびCL152細胞では3.5%）を示した。下部パネル：原発性肺がん細胞：CL100（パネルD）、CL141（パネルE）、およびCL152（パネルF）（N=6匹のマウス）から選別したCD14⁺CD44^{H i}、CD44^{H i}CD14⁻、およびCD14⁻CD44^{L o w}の集団由来のマウス異種移植片腫瘍の発生率を、SCIDマウスへの異なる細胞数（1×10⁴、1×10³、および1×10²個の細胞）の皮下注射の後に決定した。CSCの腫瘍をイニシエーションする頻度（TIF）を、L-calc limiting dilution analysisソフトウェアを使用して計算した。CI、信頼区間。

【図5】図5は、CAFフィーダー細胞と共培養したがん細胞の細胞表面のCD44、CD14、およびNanogの濃度の高さを示す。A：患者（N=3名の患者）から得たCAFを伴うかまたは伴わずに培養したがん細胞（A549）におけるCD44、CD14、およびNanogのレーザーにより捕捉したコロニー細胞解析。B：CAFフィーダー細胞を伴うかまたは伴わずに培養したCLS1細胞におけるCD44およびCD14のフローサイトメトリー解析。

【図6】図6は、がん細胞の細胞表面のCD44およびCD14のフローサイトメトリー解析を示す。CD44およびCD14は、異なる肺がん細胞株（A549、EKVX、PC9、およびHCC827）および原発性肺がん細胞（CL25、CL83、CL97、CL100、CL141、およびCL152）において二重染色されたCD44およびCD14の二重陽性の集団を、解析した。

【発明を実施するための形態】

【0018】

がん幹細胞（CSC）は、腫瘍原性幹細胞様の多能性細胞の亜集団を表す。CSCは、自己再生することができ、特定の細胞種に分化することができ、および／またはがんへと発達することができる。「がん幹細胞性」の表現型は、発がんの陰に隠れた駆動力であり得る。CSCは、化学療法耐性もしくは放射線耐性および／または転移の原因であることが示唆されている。CSCが、白血病、および肺がんを含む様々な固形腫瘍に存在することを示すエビデンスが増加している。「幹細胞性」を維持するために、大部分の幹細胞は、微小環境との直接的な接触または線維芽細胞などの「フィーダー細胞」とのクロストークに依存している。がんの状況下では、CSCは幹細胞性を維持するために、がん関連線維芽細胞（CAF）との直接的な接触に依存し得る。このような相互作用は、腫瘍の成長および／または転移のためのニッチを形成し得る。

【0019】

本開示は、トランスクリプトームおよびプロテオームの解析を介して、CAFと共培養したCSCで高度に発現しているCD14およびCD44を含むマーカーの同定に、少なくとも部分的に基づくものである。たとえばCD14は、CSC（たとえば肺がん、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がんのCSC）の新規のバイオマーカーとして同定されている。CSCは、分化したがん細胞よりも高い発現レベルで、細胞表面にタンパク質のバイオマーカー（たとえばCD14およびCD44）を示すことが決定された。よって、このようなタンパク質バイオマーカー（たとえばCD14およびCD44）のレベルは、CSCの存在および／またはレベルと相関しており、よって、がん患者由来の腫瘍の検体における不十分な予後と相関している。

【0020】

よって、本開示の一部の態様は、CD14のレベル、および同様に任意選択でCD44のレベル（膜結合型の分子または循環性の分子（可溶性CD14もしくは可溶性CD44））に基づき、がん幹細胞を含む疑いのある生体試料などの試料を解析するための方法を提供する。このようなアッセイ方法は、臨床目的に有用であり得、たとえば、がんの予後不良を表し得る試料中のがん幹細胞の存在を決定するため、がん幹細胞の存在／レベルに基づき治療の候補を選択するため、がんの進行をモニタリングするため、がんに対する治療の有効性を評価するため、治療工程を決定するため、対象ががんの再発に関するリスクがあるかどうかを評価するために有用であり得る。また、本明細書中記載のアッセイ方法は、非臨床的な適用にも有用であり得、たとえば、例としてがんの発達および転移の機構、および／またはがんに関与する生物学的な経路／プロセスを研究することを含む研究目的のため、ならびに当該研究に基づきがんに関する新規の治療を開発するために、有用であり得る。

【0021】

がん幹細胞（CSC）バイオマーカーを決定するためのアッセイ方法

本明細書中、がん幹細胞に関連し得るバイオマーカーの存在および／またはレベルを決定するために試料を解析するためのアッセイ方法を提供する。

【0022】

（i）CSCに関するバイオマーカー

本明細書中使用される場合、特定の細胞（たとえばCSC）の集団を表す用語「バイオマーカー」または「バイオマーカーセット」は、当該特定の細胞の集団において、異なる細胞の集団における生物学的な分子（たとえばタンパク質）または生物学的な分子のセットのレベルから逸脱したレベルで存在する、同生物学的な分子（たとえばタンパク質）または生物学的な分子のセットを表す。たとえば、CSCを表すバイオマーカーは、CSCにおいて、同じ種類の分化したがん細胞または非がん細胞における同じマーカーのレベルと比較して上昇したレベルまたは低下したレベルを有し得る。本明細書中記載のCSCバイオマーカーは、CSCにおいて、同じ種類の分化したがん細胞または非がん細胞における同じマーカーのレベルから、少なくとも20%（たとえば30%、50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、またはそれ以上）逸脱（増大または低下）するレベルを有し得る。このようなバイオマーカー／バイオマーカーセットは、診断／予後での適用、および非臨床的な適用（たとえば研究目的のため）の両方で使用することが可能である。

【0023】

一部の例では、本バイオマーカーは、CD14を含む。CD14は、糖タンパク質であり、細菌由来のリポ多糖（LPS）の共受容体であり、リポ多糖結合タンパク質（LBP）の存在下でLPSに結合する。CD14には、2つのアイソフォーム：膜結合型（mCD14）および可溶型（sCD14）が存在する。いずれかの型も、がん幹細胞のバイオマーカーとして作用することができる。ヒトのmCD14およびsCD14のアミノ酸配列は、GenBankの寄託番号NP_001167575.0、PDB:4GLP_A、UniGene:Hs.163867、およびGeneCards GCID:GC05M140594に提供されている。

【0024】

あるいはまたはさらに、本バイオマーカーは、CD44を含み得る。CD44は、細胞間相互作用、細胞接着、および遊走に関与する細胞表面の糖タンパク質である。これは、ヒアルロン酸の受容体であり、また、他のリガンド、たとえばオステオポンチン、コラーゲン、およびマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）と相互作用することもできる。ヒトのCD44のアミノ酸配列は、GenBankの寄託番号ACI46596.1に提供されている。

【0025】

CD14およびCD44に加えて、CPおよびABCA8もまた、CAFと比較してがん幹細胞に差次的に存在することが見いだされており、よって、本明細書中記載のアッセイ方法におけるマーカーとして使用することができる。

【0026】

がん幹細胞（たとえば肺がん幹細胞、肝臓がん幹細胞、結腸がん幹細胞、または膵臓がん幹細胞）を表す例示的なバイオマーカーを、以下の表1に提供する。

【表1】

表1. がん幹細胞のマーカー

遺伝子 記号	説明	臨床上的関連性		CLS1/CAF/CLS1p.6	
		ハザード比	P値	タンパク 質レベル	RNA レベル
CD14	単球分化抗原 CD14	1.45	1.23×10^{-3}	2.2	3.1
CD44	CD44 分子 (Indian blood group)	1.29	3.69×10^{-2}	3.2	9.7
CP	セルロプラスミン	1.16	2.72×10^{-1}	2.2	38.6
ABCA8	ATP-結合カセット, サブファミ リーA (ABC1), メンバー8	1.07	5.38×10^{-1}	3.4	3.4

【0027】

また、単独または組み合わせて採取された、本明細書中記載のCSCバイオマーカーのいずれか（たとえばCD14、またはCD14およびCD44の組み合わせ）は、肺がん幹細胞を含む疑いのある試料を解析するため、本明細書中記載のアッセイ方法に使用することができる。当該アッセイ方法から得られた結果は、限定するものではないが、本明細書中記載のものを含む臨床的または非臨床的な適用に使用することができる。

【0028】

(ii) 生体試料の解析

がん幹細胞（たとえば肺がん幹細胞、肝臓がん幹細胞、結腸がん幹細胞、または膵臓がん幹細胞）を含み得るいずれの試料も、当該分野で知られているアッセイ方法および／または本明細書中記載のアッセイ方法により、解析することができる。本明細書中記載の方法は、がん幹細胞を含む疑いのある試料を準備するステップを含む。一部の例では、試料は、in vitroのアッセイ由来であってもよく、たとえばCSCの事象および／または機構を研究するためのin vitroにおける細胞培養物であってもよい。一部の例では、本明細書中記載のアッセイ方法により解析される試料は、生体試料とすることができる。本明細書中使用される場合、「生体試料」は、対象由来の組織、たとえば血液、血漿、またはタンパク質を含む組成物を表す。生体試料は、対象から採取した最初の未処理の試料、またはその後処理した試料、たとえば部分的に精製した形態もしくは保存した形態とすることができる。一部の実施形態では、生体試料は、体液の試料、たとえば血清、血漿、涙、尿、または唾液の試料とすることができる。あるいは、生体試料は、組織の試料、たとえば腫瘍部位または疑わしい腫瘍部位（がん細胞を含む疑いのある組織部位）から得られた組織の試料であり得る。一部の実施形態では、複数の（たとえば少なくとも2、3、4、5、またはそれ以上の）生体試料が、たとえば疾患の進行を評価するかまた

は治療の有効性を評価するために、経時的または特定の時間間隔で、対象から回収され得る。

【0029】

生体試料は、当該分野で知られているいずれかの手段を使用して、対象から得ることができる。たとえば、この試料は、対象から試料（たとえば腫瘍組織の試料）を除去することにより、たとえば外科的な手法（たとえば開胸）、生検の手法、針吸引、または胸腔穿刺を介して、得ることができる。

【0030】

用語「患者」、「対象」、または「個体」は、互換可能に使用されてもよく、本明細書中記載の解析を必要とする対象を表す。一部の実施形態では、対象は、ヒトまたは非ヒトの哺乳動物である。一部の実施形態では、対象は、たとえば肺がん、結腸がん、肝臓がん、または膵臓がんといった、がんを有する疑いがあるかまたはがんのリスクがあるヒトの対象である。このような対象は、がんに関連する1つ以上の症状を呈し得る。あるいはまたはさらに、このような対象は、がんに関する1つ以上のリスク因子、たとえばがんに関連する環境因子または遺伝的因子（たとえば汚染への曝露）を有し得る。

10

【0031】

あるいは、本明細書中記載の解析を必要とする対象は、肺がん、結腸がん、肝臓がん、または膵臓がんなどのがんを有する患者であり得る。このような対象は、現在再発していてもよく、または過去に当該疾患を罹患していてもよい（たとえば現在は再発していてもよい）。一部の例では、対象は、がんの治療中、たとえば外科手術、化学療法、免疫療法、または放射線療法を含む治療中であり得るヒトの患者である。他の例では、このようなヒトの患者は、当該治療を受けていなくてもよい。

20

【0032】

一部の例では、がんは肺がんである。肺がんの例として、限定するものではないが、非小細胞肺がん（NSCLC）、腺がん、上皮内腺がん（AIS）、微小浸潤腺がん（MIA）、扁平上皮がん、大細胞がん、大細胞神経内分泌腫瘍、小細胞肺がん（SCLC）、中皮腫、およびカルチノイド腫瘍が挙げられる。

【0033】

本明細書中記載の試料のいずれかは、本明細書中記載の1つ以上のCSCバイオマーカーのレベルを測定するステップを含む、本明細書中記載のアッセイ方法を使用する解析に供することができる。一部の例では、本バイオマーカーは、CD14（膜結合型もしくは可溶性）またはCD44（膜結合型もしくは可溶性）である。他の例では、本バイオマーカーは、CD14およびCD44の組み合わせである。本明細書中開示されるバイオマーカーのレベル（たとえば量）、または本バイオマーカーのレベルの変化は、従来のアッセイまたは本明細書中記載のアッセイを使用して評価することができる。

30

【0034】

本明細書中使用される場合、用語「測定する（measuring）」もしくは「測定（measurement）」、またはあるいは「検出する（detecting）」もしくは「検出（detection）」は、試料の中のある物質の存在、不存在、量（quantity）または量（amount）（有効量であり得る）を評価することを意味する。これは、当該物質の定性的または定量的な濃度レベルの導出、または対象の値もしくは分類を評価することを含む。

40

【0035】

一部の実施形態では、バイオマーカーのレベルは、生体試料などの試料におけるタンパク質を直接検出することにより、評価または測定される。あるいはまたはさらに、タンパク質のレベルは、生体試料において間接的に、たとえばタンパク質の活性のレベルを検出すること（酵素的アッセイ）により、評価または測定することができる。

【0036】

タンパク質（CD14および／またはCD44）のレベルは、免疫アッセイを使用して測定され得る。免疫アッセイの例として、限定するものではないが、免疫ブロッテ

50

ィングアッセイ（たとえばウェスタンブロット）、免疫組織化学的アッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、免疫蛍光アッセイ（I F）、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）（たとえばサンドイッチE L I S A）、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光法ベースの検出アッセイ、磁式イムノアッセイ（m a g n e t i c i m m u n o a s s a y）、ラテラルフローアッセイ、および関連技術が挙げられる。本明細書中提供されるバイオマーカーを検出するためのさらなる適切なイムノアッセイは、当業者に明らかである。

【0037】

このようなイムノアッセイは、目的のバイオマーカー、たとえばC D 1 4またはC D 4 4に特異的な作用物質（たとえば抗体）の使用を含み得る。目的のバイオマーカーに「特異的に結合する」抗体などの検出試薬（d e t e c t i o n a g e n t）は、当該分野で良好に理解されている用語であり、このような特異的な結合を判定するための方法も、当該分野でよく知られている。抗体は、別のバイオマーカーよりも、特定の目的のバイオマーカーと、高頻度に、迅速に、長い期間、かつ／または高い親和性で反応または結合する場合に、「特異的な結合」を呈すると言われている。また、この定義を読むことにより、たとえば、第1の目的のペプチドに特異的に結合する抗体は、第2の目的のペプチドに特異的または優先的に結合してもよく、または結合しなくてもよいことが理解される。よって「特異的な結合」または「優先的な結合」は、必ずしも排他的な結合を（含み得るが）必要とするものではない。必ずしもというわけではないが、一般的に、結合に対する言及は、優先的な結合を意味する。一部の例では、目的のペプチドまたはそのエピトープに「特異的に結合する」抗体は、他のペプチドまたは同じ抗原の他のエピトープに結合しなくてもよい。

【0038】

本明細書中使用される場合、用語「抗体」は、少なくとも1つの免疫グロブリンの可変ドメインまたは免疫グロブリンの可変ドメイン配列を含むタンパク質を表す。たとえば、抗体は、重鎖（H）可変領域（本明細書中V_Hと略される）および軽鎖（L）可変領域（本明細書中V_Lと略される）を含み得る。別の例では、抗体は、2つの重鎖（H）可変領域および2つの軽鎖（L）可変領域を含む。用語「抗体」は、抗体の抗原結合フラグメント（たとえば一本鎖抗体、F a bおよびs F a bフラグメント、F（a b'）₂、F dフラグメント、F vフラグメント、s c F v、およびドメイン抗体（d A b）フラグメント（d e W i l d t e t a l . , E u r J I m m u n o l . 1 9 9 6 ; 2 6（3）：6 2 9－3 9.））、ならびに完全な抗体を包有する。抗体は、I g A、I g G、I g E、I g D、I g M（およびそれらのサブタイプ）の構造上の特徴を有し得る。抗体は、任意の供給源由来であってもよいが、霊長類（ヒトおよび非ヒトの霊長類）の抗体または霊長類化抗体が好ましい。

【0039】

一部の実施形態では、本明細書中記載の抗体は、検出可能な標識とコンジュゲートすることができ、目的のペプチドと検出試薬の結合を、検出可能な標識から放出されるシグナルの強度に基づき決定することができる。あるいは、検出試薬に特異的な二次抗体を使用することができる。1つ以上の抗体が、検出可能な標識に結合してもよい。当該分野で知られている任意の適切な標識を、本明細書中記載のアッセイ方法に使用することができる。一部の実施形態では、検出可能な標識は、フルオロフォアを含む。本明細書中使用される場合、用語「フルオロフォア」（「蛍光標識」または「蛍光色素」とも呼ばれる）は、所定の励起波長で光エネルギーを吸収し、異なる波長で光エネルギーを発する部分を表す。一部の実施形態では、検出部分は、酵素であるか、または酵素を含む。一部の実施形態では、酵素は、無色の基質から有色の産物を産生する酵素（たとえばβ-ガラクトシダーゼ）である。

【0040】

一部の例では、本明細書中記載のアッセイ方法は、細胞表面のバイオマーカー、たとえば試料に含まれている細胞上にある膜結合型のC D 1 4および／またはC D 4 4のレベルを測定するために、使用される。このような細胞は、規定の実務を介して回収されてもよ

く、細胞表面のバイオマーカーのレベルは、従来の方法、たとえばFACSを介して測定することができる。

【0041】

他の例では、本明細書中記載のアッセイ方法は、血液の試料または血漿の試料であり得る、試料における循環性バイオマーカー（可溶性バイオマーカー）、たとえばCD14のレベルを測定するために使用される。当該分野で知られているアッセイのいずれか、たとえばイムノアッセイを、当該バイオマーカーのレベルを測定するために使用することができる。

【0042】

本開示がイムノアッセイに限定されないことは、当業者に明らかである。質量分析などの抗体に基づくものではない検出アッセイもまた、本明細書中提供される肺のCSCバイオマーカーの検出および／または定量化に有用である。発色性の物質に依存するアッセイもまた、本明細書中提供される肺のCSCバイオマーカーの検出および／または定量化に有用であり得る。

【0043】

あるいは、試料中のCSCバイオマーカーをコードする核酸のレベルを、従来の方法を介して測定することができる。一部の実施形態では、CSCバイオマーカーをコードする核酸の発現レベルを測定することは、mRNAを測定することを含む。一部の実施形態では、CSCバイオマーカーをコードするmRNAの発現レベルは、リアルタイム逆転写（RT）Q-PCRまたは核酸マイクロアレイを使用して、測定することができる。バイオマーカーの核酸配列を検出するための方法として、限定するものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写-PCR（RT-PCR）、in situ PCR、定量PCR（Q-PCR）、リアルタイム定量PCR（RT-Q-PCR）、in situ ハイブリダイゼーション、サザンブロット、ノーザンブロット、配列解析、マイクロアレイ解析、レポーター遺伝子の検出、または他のDNA/RNAハイブリダイゼーションのプラットフォームが挙げられる。

【0044】

所望のバイオマーカーに特異的に結合するいずれかの結合試薬が、試料中のバイオマーカーのレベルを測定するために、本明細書中記載の方法およびキットで使用されてもよい。一部の実施形態では、この結合試薬は、所望のタンパク質バイオマーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーである。他の実施形態では、結合試薬は、コードされた核酸またはその一部に相補的な1つ以上のオリゴヌクレオチドであってもよい。一部の実施形態では、試料は、異なるタンパク質バイオマーカーに結合する1超の結合試薬と、同時または連続して接触してもよい（たとえばマルチプレックス解析）。

【0045】

目的のバイオマーカーのレベルを測定するために、試料を、適切な条件下で結合試薬（検出試薬）と接触させることができる。一般的に、用語「接触する（contact）」は、存在する場合に、試料中の、結合試薬と目的のバイオマーカーとの間の複合体の形成に十分な適切な時間の間の、試料または試料から回収した細胞と結合試薬の曝露を表す。一部の実施形態では、接触は、試料を支持膜の表面を通すように移動させる毛細管現象により、行われる。

【0046】

一部の実施形態では、アッセイは、単一のアッセイ形式を含む低スループットのプラットフォームで行われてもよい。たとえば、低スループットのプラットフォームは、診断方法、疾患および／もしくは治療の進行のモニタリング、ならびに／または疾患もしくは障害が特定の治療から利益を得ることができるかの予測のため、生体試料（たとえば生体組織、組織抽出物）中のタンパク質の存在および量を測定するために使用され得る。

【0047】

一部の実施形態では、支持部材に結合試薬を固定することが必要であり得る。結合試薬を固定するための方法は、結合試薬の性質および支持部材の材料などの要因に応じて決定

10

20

30

40

50

され、特定のバッファーを必要とし得る。このような方法は、当業者にとって明らかである。たとえば、本明細書中記載の生体試料におけるバイオマーカーセットは、同様に本明細書中に記載されているキットおよび／または検出装置のいずれかを使用して、測定され得る。

【0048】

本明細書中に提供されるものなどのがん幹細胞バイオマーカーの検出および／または定量化のために使用される検出アッセイの種類は、本アッセイを使用する特定の状況（たとえば臨床的適用または研究のための適用）、ならびに検出されるバイオマーカーの種類および数、ならびに／または並行して行われる患者の試料の種類および数により決定される。

10

【0049】

本明細書中記載のアッセイ方法は、臨床上の目的および非臨床上の目的の両方のために、使用され得る。一部の例を、本明細書中に提供する。

【0050】

診断および／または予後への適用

本明細書中記載のアッセイ方法により測定される、対象に由来する生体試料中の1つ以上のCSCバイオマーカーのレベルは、様々な臨床目的のため、たとえば、対象（たとえばヒトの患者）由来の生体試料におけるがん細胞、特に肺がん幹細胞を検出するため、予後不良に関連するがんを有する対象を同定するため、対象におけるがんの発達の進行をモニタリングするため、対象のがんに関する治療の有効性を評価するため、特定の治療に適した患者を同定するため、対象におけるがんの再発を予測するため、ならびに／または疾患の発達、予後の結果、および／もしくは現在の治療の有効性に基づくがんの治療の調節のために、使用することができる。よって、本明細書中記載の1つ以上のCSCバイオマーカー、たとえばCD14またはCD14およびCD44の組み合わせのレベルに基づく、がん、たとえば予後不良に関連するがんに関する診断方法および予後方法が、本明細書中に記載される。がんの例示的な種類として、肺がん（たとえばNSCLCなどの本明細書中に記載される肺がん）、肝臓がん、結腸がん、および膵臓がんが挙げられる。

20

【0051】

必要に応じて、本明細書中に記載のアッセイ方法により決定される試料中のバイオマーカーのレベルは、正規化した値を得るために、同じ試料における内部標準または標準試料（所定の量のバイオマーカーを有する）で、正規化され得る。次に、バイオマーカーの生の値または正規化した値を、参照試料または対照試料における値と比較することができる。参照試料または対照試料中のバイオマーカーの値と比較して上昇した値の、対象から得た試料中の同バイオマーカーの値は、試料におけるCSCの存在を表す。対象がCSCを保有することは、対象が、本明細書中記載の目的のがん、たとえば予後不良に関連するがんを有し得るか、またはがん発達のリスクがあるがんを有し得ることを表す。

30

【0052】

一部の実施形態では、対象から得た試料中のバイオマーカーのレベルを、当該バイオマーカーに関する所定の閾値と比較することができ、この値より上昇していることは、対象がCSCを保有し、よって目的のがん、たとえば予後不良に関連するか、またはがん発達および／もしくは転移のリスクがある目的のがんを有し得ることを、表し得る。

40

【0053】

対照試料または参照試料は、解析のため試料を入手する対象と同じ民族、年齢、および／または性別であり得る、健常な個体から得た生体試料であり得る。あるいは、対照試料または参照試料は、既知の量の評価されるバイオマーカーを含む。一部の実施形態では、対照試料または参照試料は、対照の対象から得た生体試料である。

【0054】

本明細書中使用される場合、対照の対象は、健常な個体、すなわち、タンパク質のレベルを測定する時点で目的のがん（たとえばNSCLCなどの肺がん、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がん）を明らかに有さない個体、または当該疾患の病歴を有さない個体であ

50

り得る。また、対照の対象は、好ましくは、本明細書中記載のアッセイ方法により対象を解析する際に特徴（たとえば年齢、性別、または民族）が一致する健常な対象の集団を表し得る。

【0055】

対照のレベルは、所定のレベルまたは閾値とすることができる。このような所定のレベルは、目的の疾患を有さないかまたは目的の疾患のリスクがない対象の集団におけるタンパク質のレベル（たとえば、健常な対象の集団における平均レベル）を表すことができる。またこれは、目的の疾患を有する対象の集団におけるタンパク質のレベルを表すこともできる。

【0056】

所定のレベルは、様々な形態を取ることができる。たとえばこれは、中央値または平均値などの単一のカットオフ値とすることができる。一部の実施形態では、このような所定のレベルは、比較上のグループ、たとえば1つの定義したグループが目的のがんを有することが知られており、別の定義したグループが目的のがんを有さないことが知られているグループなどに基づき、確立することができる。あるいは、所定のレベルは、ある範囲、たとえば対照の集団におけるタンパク質のレベルを表す範囲とすることができる。

【0057】

一部の例では、所定のレベルは、本明細書中記載される目的のがんに関連するリスクスコアの中央値とすることができる。リスクスコアの中央値は、1つ以上のバイオマーカーのレベルにより表される、低リスクの集団と高リスクの集団を区別するためのよく知られた基準点であり、よって、特定の状態（たとえばがんの発症、がんの予後、または治療有効性）の高リスク対低リスクを表す。たとえば、Chen et al., N. Engl. J. Med. 356 (1): 11-20 (2007)を参照されたい。これは、本明細書中記載の診断方法／予後方法のカットオフ値として使用することができる。一部の例では、リスクスコアの中央値は、以下のように決定することができる。バイオマーカーのレベルは、健常な患者（目的の疾患を有さない患者）および目的の疾患（たとえば本明細書中記載されるものなどのがん）を有する患者において、決定することができる。試験される患者におけるバイオマーカーのレベルの頻度の分布をプロットして、各患者に関するリスクスコアを決定することができ、これは、目的の疾患に関連した、試験した患者のリスクプロファイルを表す。その後、このリスクスコアは、高リスクまたは低リスクのグループに患者を分類するために使用される。トレーニングデータセットにおいて、極値の影響を回避するために、かつ2つのグループ（高リスクのグループvs低リスクのグループ）の患者の数を等しくするために、50パーセンタイル（リスクスコアの中央値）を、本明細書中記載の方法で使用される所定の値であり得る、カットオフ値として使用することができる。

【0058】

本明細書中記載の対照のレベルは、規定の技術により決定することができる。一部の例では、対照のレベルは、本明細書中同様に記載される対照試料において従来の方法（たとえば本明細書中記載の試験試料におけるタンパク質のレベルを入手するための同じアッセイ）を行うことにより、得ることができる。他の例では、タンパク質のレベルは、対照の集団のメンバーから入手することができ、この結果は、対照の集団におけるタンパク質のレベルを表す対照のレベル（所定のレベル）を得るために、たとえばコンピュータプログラムにより解析することができる。

【0059】

本明細書中記載の参照値と、候補対象から得た試料におけるバイオマーカーのレベルを比較することにより、候補対象が、予後不良に関連する目的のがんを有するか、またはリスクがあるかどうかを決定することができる。たとえば、候補対象の試料においてバイオマーカーのレベルが参照値と比較して増大していた場合、候補対象は、予後不良に関連する標的のがんを有するか、またはリスクがあると同定され得る。参照値が、がん幹細胞を保有する、かつ／または予後不良に関連するがんを有する対象の集団におけるバイオマ

10

20

30

40

50

カーのレベルの値の範囲を表す場合、この範囲内にある候補者の試料におけるバイオマーカーの値は、候補対象が予後不良に関連する目的のがんを有するか、当該がんのリスクがあることを表している。

【0060】

本明細書中使用される場合、「上昇したレベル」または「参照値を超えるレベル」は、バイオマーカーのレベルが、対照試料におけるバイオマーカーのレベルの所定の閾値などの参照値よりも高いことを意味する。対照レベルは、本明細書中に詳述されている。上昇したレベルのバイオマーカーは、たとえば、参照値を1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上超えるバイオマーカーのレベルを含む。一部の実施形態では、試験試料におけるバイオマーカーのレベルは、参照試料におけるバイオマーカーのレベルよりも少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.6、7、8、9、10、50、100、150、200、300、400、500、1000、10000倍、または5超高い。

10

【0061】

一部の例では、バイオマーカーは、CD14を含む。ヒトの患者などの候補対象から得た試料におけるCD14の存在（膜結合型および／もしくは可溶性のCD14）、または対照の対象由来の同じ種類の試料と比較して上昇したレベルの当該試料におけるCD14は、候補対象におけるがん幹細胞の存在を表し、同様にがんの予後不良を表す。

20

【0062】

一部の例では、本バイオマーカーは、さらにCD44を含み得る。候補対象から得た試料において高い発現レベルのCD44は、任意選択で本明細書に記載の上昇したレベルのCD14と組み合わせて、候補対象におけるがん幹細胞の存在を表し、同様にがんの予後不良を表す。一部の例では、高い発現レベルのCD44は、たとえば対応する目的のがんのリスクスコアの中央値以上の、所定のレベルよりも高い発現レベルを表す。

【0063】

一部の実施形態では、候補対象は、目的のがん（たとえばNSCLCなどの肺がん、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がん）の症状を有するヒトの患者である。たとえば、対象は、疲労感、咳、息切れ、胸痛、食欲不振、体重減少、嗝声、吐血、慢性気管支炎、慢性肺炎、喘鳴、またはそれらの組み合わせを有する。他の実施形態では、対象は、試料を回収する時点で目的のがんの症状を有していないか、目的のがんの症状の病歴を有していないか、または目的のがんの病歴を有していない。さらなる他の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、免疫療法、またはそれらの併用に耐性がある。

30

【0064】

本明細書に記載される方法で、目的のがんのがん幹細胞を保有するか、または目的のがん（たとえば予後不良に関連する肺がん）を有すると同定された対象は、本明細書に記載されるように、化学療法での治療などの適切な治療に供され得る。

【0065】

また、本明細書に記載のアッセイ方法およびキットは、バイオマーカーのレベルと本明細書中に記載されるがんなどの目的のがんとの間の相関関係を前提として、そのようながんに関する治療の有効性の評価のために使用することができる。たとえば、複数の生体試料（たとえば組織の試料または体液の試料）を、治療の前および後、または治療工程の間のいずれかで、治療を行う対象から回収することができる。バイオマーカーのレベルは、本明細書に記載のアッセイ方法のいずれかにより測定することができ、これによりバイオマーカーの値（たとえば量）を決定することができる。たとえば、上昇したレベルのバイオマーカーが、対象が肺がんを有することを表し、バイオマーカーのレベルが、治療の後または治療工程にわたり減少する（早期に回収した試料中のバイオマーカーと比較した、後に回収した試料中のバイオマーカーのレベル）場合、このことは治療が有効であることを表す。一部の例では、治療は、化学療法薬などの治療薬の有効量を含む。化学療法薬の

40

50

例として、限定するものではないが、カルボプラチン（Paraplatin）またはシスプラチン（Platinol）、ドセタキセル（Docetaxel、Taxotere）、ゲムシタビン（Gemzar）、nab-パクリタキセル（Abraxane）、パクリタキセル（Taxol）、ペメトレキセド（Alimta）、およびビノレルビン（Navelbine）が挙げられる。

【0066】

対象が治療に応答しないことが同定された場合、治療薬をより高い用量および／または高い投与頻度で、同定した対象に投与する。一部の実施形態では、治療に応答性があるか、またはさらなる治療が必要ないと同定された対象では、治療薬の用量または投与頻度は、維持、減少、または中止される。あるいは、異なる治療を、第1の治療に応答しないと見いだされた対象に使用することができる。

10

【0067】

他の実施形態では、バイオマーカーまたはバイオマーカーセットの値は、同様に、たとえば化学療法薬により治療可能であり得る本明細書に記載されるがんなどの目的のがんを同定することに信頼性があり得る。この方法を行うために、目的のがんを有する対象から回収した試料（たとえば組織の試料または体液の試料）中のバイオマーカーのレベルは、適切な方法、たとえばウェスタンブロットまたはRT-Q-PCRアッセイなどの本明細書に記載の方法により測定することができる。バイオマーカーのレベルが参照値よりも上昇している場合、このことは、化学療法薬がこの疾患の治療に有効であり得ることを表す。疾患が化学療法薬に対して感受性がある（当該化学療法薬により治療できる）と同定された場合、本方法はさらに、有効量の化学療法薬、たとえばカルボプラチン（Paraplatin）またはシスプラチン（Platinol）、ドセタキセル（Docetaxel、Taxotere）、ゲムシタビン（Gemzar）、nab-パクリタキセル（Abraxane）、パクリタキセル（Taxol）、ペメトレキセド（Alimta）、およびビノレルビン（Navelbine）を、当該疾患を有する対象に投与するステップを含むことができる。

20

【0068】

同様に、本明細書に記載されるがんなどの目的のがんの重症度を評価する方法も、本開示の範囲内にある。たとえば、本明細書に記載される場合、目的のがんは、休止状態（寛解）にあってもよく、この間、対象は、当該疾患の症状を感じない。たとえば、肺がんの再発は、通常、対象が、限定するものではないが、疲労感、咳、息切れ、胸痛、食欲不振、体重減少、嘔声、吐血、慢性気管支炎、慢性肺炎、喘鳴、またはそれらの組み合わせを含む肺がんの症状を感じ得る再発性のエピソードである。一部の実施形態では、1つ以上のバイオマーカーのレベルは、対象が、目的のがんの再発（たとえば肺がんの再発）を将来経験するか、現在経験しているか、または近い将来経験するかどうかを表す。一部の実施形態では、本方法は、目的のがんを有する対象から得た試料中のバイオマーカーのレベルを、同じ対象由来の試料、たとえば寛解時に同じ対象から得た試料または再発の間に同じ対象から得た試料と比較するステップを含む。

30

【0069】

非臨床的な適用

40

さらに、本明細書に記載のCSCバイオマーカーのいずれかのレベルは、非臨床上の使用のため、たとえば研究目的のために使用され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、がん幹細胞の事象および／または機構を研究するため（たとえばがんの発達および／または転移においてがん幹細胞が関わる新規の生物学的な経路またはプロセスの発見のため）に、使用され得る。

【0070】

一部の実施形態では、バイオマーカーセットのレベルは、本明細書に記載されるように、肺がんのための新規の治療薬の開発に信頼性があり得る。たとえば、バイオマーカーのレベルは、新規の治療（たとえば臨床試験）を受けた対象から得た試料で測定され得る。一部の実施形態では、バイオマーカーセットのレベルは、新規治療の前、間、または後に

50

、対象における新規治療の有効性またはがんの進行を表し得る。

【0071】

さらに、本明細書中記載のCSCバイオマーカーのうちの1つ以上は、がん幹細胞の濃度を高めるために使用されてもよく、これは、がん生物学に関する研究および目的のがん幹細胞を特異的に標的とする新規の抗がん剤の開発を含む様々な目的のために使用することができる。本明細書中に使用される場合、「肺がん幹細胞の濃度を高めること」との表現は、肺がん幹細胞が、生体試料に存在する他の物質を十分に含まないように、生体試料から肺がん幹細胞を単離または分離することを意味する。一部の実施形態では、肺がん幹細胞の濃度を高めることは、非幹細胞から肺がん幹細胞を分離することを含む。

【0072】

タンパク質バイオマーカーを測定するためのキットおよび検出装置

また本開示は、本明細書中記載の1つ以上のバイオマーカーのレベルの測定に使用するためのキットおよび検出装置を提供する。このようなキットまたは検出装置は、表1に列挙されるものなどの目的のバイオマーカーに特異的に結合する1つ以上の結合試薬を含み得る。たとえば、このようなキットまたは検出装置は、表1から選択される1つのタンパク質バイオマーカーに特異的な少なくとも1つの結合試薬を含み得る。場合により、キットまたは検出装置は、本明細書中記載のタンパク質バイオマーカーセットのうちの2つ以上のメンバーに特異的な結合試薬を含む。

【0073】

一部の実施形態では、結合試薬（たとえば検出試薬）のうちの1つ以上は、バイオマーカーセットのタンパク質に特異的に結合する抗体とすることができる。一部の実施形態では、1つ以上の結合試薬は、アプタマー、たとえばバイオマーカーセットのタンパク質に特異的に結合する、ペプチドアプタマーまたはオリゴヌクレオチドアプタマーである。

【0074】

一部の実施形態では、キットはさらに、バイオマーカーセットのタンパク質に対する試薬の結合性を検出するための検出試薬（たとえば結合試薬に結合する抗体）を含む。検出試薬は、標識とコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、検出試薬は、結合試薬のうちの少なくとも1つに特異的に結合する抗体である。一部の実施形態では、結合試薬は、検出試薬により同定でき、検出試薬と直接的または間接的に結合できるタグを含む。

【0075】

本キットまたは本検出装置では、結合試薬のうちの1つ以上は、支持部材、たとえば膜、ビーズ、スライド、またはマルチウェルプレートに固定化され得る。アッセイに適した支持部材の選択は、試料の数および試薬とコンジュゲートした標識から放出されるシグナルを検出する方法などの様々な要因に応じて決定される。

【0076】

一部の実施形態では、支持部材は、ニトロセルロース膜、ポリビニリデンフルオリド（PVDF）膜、またはセルロースアセテート膜などの膜である。一部の例では、本アッセイは、ウェスタンブロットアッセイ形式または核酸マイクロアレイアッセイ形式であり得る。

【0077】

一部の実施形態では、支持部材は、ELISAプレートなどのマルチウェルプレートである。一部の実施形態では、本明細書中記載のイムノアッセイは、高スループットプラットフォームで行うことができる。一部の実施形態では、マルチウェルプレート、たとえば24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、またはそれ以上の数のウェルプレートが、高スループットのイムノアッセイに使用され得る。個々のイムノアッセイを、並行して各ウェルで行うことができる。よって、一般的に、アッセイのスループットを増大させるため、並行して複数のマルチウェルを測定するようにプレートリーダーを使用することが望ましい。一部の実施形態では、並行してマルチウェル（たとえば4ウェル、16ウェル、24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、またはそれ以上のウェル

10

20

30

40

50

）をイメージングできるプレートリーダーを、このプラットフォームに使用することができる。たとえば、市販のプレートリーダー（たとえばPerkin Elmer, Waltham, MAから入手可能なプレートビジョンシステム（plate vision system））が使用され得る。このプレートリーダーは、動力学ベースの蛍光解析を行うことができる。プレートビジョンシステムは、高い集光効率（high collection efficiency optics）を有し、並行して行う96ウェルプレート解析に特化して設計された光学を有する。さらなる適切な並行プレートリーダーとして、限定するものではないが、SAFIRE（Tecan, San Jose, CA）、FLIPRETTRA（登録商標）（Molecular Devices, Union City, CA）、FDSS7000（Hamamatsu, Bridgewater, NJ）、およびCellLux（Perkin Elmer, Waltham, MA）が挙げられる。

10

【0078】

また本キットは、本明細書中記載されるように、限定するものではないが、コーティングバッファー、ブロックングバッファー、ウォッシュバッファー、および／またはストップピングバッファーなどの1つ以上のバッファーを含むことができる。

【0079】

一部の実施形態では、本キットは、本明細書中記載の方法のいずれかに従い使用するための説明書を含むことができる。含まれている説明書は、ヒトの患者などの対象から回収した生体試料中のバイオマーカーセット（たとえばタンパク質または核酸）のレベルを測定するため、キットに含まれている成分を使用する方法の説明を含むことができる。

20

【0080】

本キットの使用に関連する説明書は、概して、本明細書中記載のアッセイ方法を行うための、各成分の量およびに適切な条件に関する情報を含む。本キット中の成分は、単位剤形、バルクパッケージ（たとえば複数回投与のパッケージ）、またはサブユニット用量にあってもよい。本開示のキットに供給される説明書は、通常はラベルまたは添付文書（たとえば本キットに含まれる紙のシート）上に記載された説明であるが、機械で可読な説明書（たとえば磁気記憶ディスクまたは光学記憶ディスク上に保有される説明）も同様に許容可能である。

【0081】

ラベルまたは添付文書は、本キットが、バイオマーカーセットのレベルを評価するために使用されることを示すものである。説明書は、本明細書中記載の方法のいずれかを行うために提供され得る。

30

【0082】

本開示のキットは、適切にパッケージングされている。適切なパッケージングとして、限定するものではないが、バイアル、ビン、ジャー、可撓性パッケージ（たとえば密閉されたマイラーバッグまたはプラスチックバッグ）などが挙げられる。同様に、PCRの機械、核酸アレイ、またはフローサイトメトリーシステムなどの特定の装置と組み合わせて使用するためのパッケージも企図されている。

【0083】

キットは、任意に、対照試料および／または標準試料もしくは参照試料などの、解釈に必要な情報などの追加的な構成要素を提供してもよい。通常、本キットは、容器、および当該容器上にあるかまたは当該容器に関連したラベルまたは添付文書を含む。一部の実施形態では、本開示は、上述のキットの中身を含む製造物品を提供する。

40

【0084】

がんの治療

本明細書中記載の方法を使用して同定される、本明細書中記載される目的のがん（たとえば、予後不良に関連し得る、肺がん、肝臓がん、結腸がん、または膵臓がん）のリスクがある対象または当該がんを罹患している対象は、いずれかの適切な治療薬で治療され得る。一部の実施形態では、記載の方法のアウトプット、たとえばバイオマーカーセットの

50

レベルを測定することに基づき、対象に関する治療を選択するステップを含む方法が提供される。

【0085】

一部の実施形態では、本方法は、アッセイのアウトプット、たとえばバイオマーカーの検出に基づく対象への投与のため、治療薬を選択または投与するステップ、たとえば化学療法、放射線療法、外科的療法、および／または免疫療法を選択するステップまたは行うステップのうちの1つまたは両方を含む。

【0086】

一部の実施形態では、治療薬は、対象へ1回以上投与される。治療薬、たとえば化学療法、放射線療法、外科的療法、および／または免疫療法が、肺がんの治療のための併用療法の一部として、別の療法と共に投与または行われてもよい。併用療法、たとえば化学療法および放射線療法は、複数の異なる構成で提供され得る。第1の療法は、他の療法の投与の前または後に行われ得る。一部の状況では、第1の療法および別の療法（たとえば治療薬）は、同時、または時間的に近い範囲で（たとえば同じ治療セッションの間などの、複数の療法の間が短い時間間隔で）、行われる。第1の薬および他の療法はまた、より大きな時間間隔で投与または行われてもよい。

【0087】

一部の実施形態では、化学療法薬が、対象に投与される。化学療法薬の例として、限定するものではないが、カルボプラチンまたはシスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、Na b-パクリタキセル、パクリタキセル、ペメトレキセド、およびビノレルビンが挙げられる。

【0088】

一部の実施形態では、放射線療法が、対象に行われる。放射線療法の例として、限定するものではないが、電離放射線照射、ガンマ線照射、中性子線による放射線療法、電子線放射線療法、陽子線（proton）療法、小線源治療、全身性のラジオアイソトープおよび放射線増感剤が、挙げられる。

【0089】

一部の実施形態では、外科的療法が、対象に行われる。外科的療法の例として、限定するものではないが、肺葉切除、楔状切除、区域切除、および肺切除術が挙げられる。

【0090】

一部の実施形態では、免疫療法薬が、対象に投与される。一部の実施形態では、免疫療法薬は、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤である。一部の実施形態では、免疫療法薬はニボルマブである。一部の実施形態では、免疫療法薬はペムブロリズマブである。

【0091】

化学療法のさらなる例として、限定するものではないが、白金製剤、たとえばカルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、ロバプラチン、トリプラチン（Triplatin）、四硝酸塩、ピコプラチン（Picoplatin）、プロリンダック（Prolindac）、アロプラチン（Aroplatin）および他の誘導体；トポイメソラーゼI阻害剤、たとえばカンプトテシン、トポテカン、イリノテカン／SN38、ルビテカン、ベロテカン（Belotecan）、および他の誘導体；トポイメソラーゼII阻害剤、たとえばエトポシド（VP-16）、ダウノルビシン、ドキソルビシンの薬剤（たとえば、ドキソルビシン、ドキソルビシンHCl、ドキソルビシン類似体、またはリポソームにおけるドキソルビシンおよびその塩もしくは類似体）、ミトキサントロン、アクリルビシン、エピルビシン、イダルビシン、アムルビシン、アムサクリン、ピラルビシン、バルルビシン、ゾルビシン、テニポシドおよび他の誘導体；代謝拮抗薬、たとえば葉酸代謝拮抗薬ファミリー（Folic family）（メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、アミノプテリン、および類縁体）；プリン拮抗薬（チオグアニン、フルダラビン、クラドリビン、6-メルカプトプリン、ペントスタチン、クロファラビンおよび類縁体）およびピリミジン拮抗薬（シタラビン、フロクスウリジン、アザシチジン、テガフル、カルモフル、カペシタビン（Capa

10

20

30

40

50

c i t a b i n e)、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、5-フルオロウラシル(5FU)、および類縁体);アルキル化剤、たとえばナイトロジェンマスタード(たとえば、シクロホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、メクロレタミン、イホスファミド、メクロレタミン、トロホスファミド、プレドニムスチン、ベンダムスチン、ウラムスチン、エストラムスチン、および類縁体);ニトロソウレア(たとえば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ホテムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、ストレプトゾシン、および類縁体);トリアゼン(たとえば、ダカルバジン、アルトレタミン、テモゾロミド、および類縁体);スルホン酸アルキル(たとえば、ブスルファン、マンノスルファン、トレオスルファン、および類縁体);プロカルバジン;ミトブロニトール、およびアジリジン(たとえば、カルボコン、トリアジコン、ThioTEPA、トリエチレンメラミン(triethylenemalamine)、および類縁体);抗菌薬、たとえばヒドロキシウレア、アントラサイクリン(たとえば、ドキソルビシンの薬剤、ダウノルビシン、エピルビシン、および他の誘導体);アントラセンジオン(たとえば、ミトキサントロンおよび類縁体);ストレプトマイセスファミリー(たとえば、ブレオマイシン、マイトマイシンC、アクチノマイシン、プリカマイシン);ならびに紫外線が、挙げられる。

10

【0092】

さらに詳述することなく、当業者は、上記の説明に基づき、本開示を最も完全な度合で利用できると思われる。よって、以下の特定の実施形態は、単なる例示として解釈すべきであり、いかなる方法であっても残りの本開示を限定するものではない。本明細書中引用されるすべての刊行物は、本明細書中言及される目的または主題のために、参照として組み込まれている。

20

【0093】

実施例

実施例1:原発性肺がん細胞と比較して肺がん幹細胞(CSC)に差次的に存在するタンパク質の同定

材料および方法

肺がん細胞株

ヒトのNSCLC細胞株のNCI-A549、EKVX、PC9、およびHCC827は、米国国立がん研究所(米国国立衛生研究所、Bethesda, MD, USA)またはアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC、Manassas, VA, USA)から入手した。ヒトの肺がん細胞株(CLS1、CL100、CL141、およびCL152)は、肺がん患者由来の初代培養を使用して確立した。これら細胞は、20%のO2および5%のCO2からなる湿潤した雰囲気下、37℃で、10%のFBSを補充したRPMI 1640培地で培養した。

30

【0094】

肺のCSCおよびCAFを培養するための共培養システム

ヒトの肺のCSCおよびCAFを、肺がん患者からすばやく切除した肺腫瘍組織から確立した。腫瘍および対となる正常な組織を、切除から30分以内に回収して、初代の肺のCSC、CAF、およびNFの培養物を、改変したプロトコルを使用して単離した。肺のCSCを、NSCLC患者から切除した組織のがん関連領域から単離し、フィーダー細胞、すなわち間質線維芽細胞と共に培養および維持した。これら試料は、ヒトの対象での研究に関して承認されたIRBプロトコルに従い、調達し、利用した。全ての患者から、記載済みのインフォームドコンセントを入手した。がんではない関連の間質は、外科的な切除の時点での肉眼での検査およびその後の組織学的な解析により決定される際に、新生物の病変から少なくとも5cm離れた場所で、切除から30分以内に、病理学者により(無菌条件下で)サンプリングされた。

40

【0095】

これら組織を、改変を伴う以前に記載されたプロトコルに基づき処理した。簡潔に述べると、組織を細分化し、4℃のS-MEM培地(GIBCO)において、デオキシリボヌクレアーゼ1(1mg/ml; Bioshop)およびプロテアーゼ(1mg/ml; S

50

igma) の存在下で、6～12時間インキュベートした。消化させた後、細胞の塊を、40 μ mのセルストレーナー (Falcon) を介してふるいにかけ、単一細胞懸濁液を得た。回収した細胞を、20%のO₂および5%のCO₂を含む湿潤した雰囲気下、37℃で、改変した培養条件の24ウェルプレート中、10%のFBSを含むRPMI 1640培地において、異なる細胞密度 (5×10⁵) で培養した。30日間の培養の後、スフィア様のコロニーを、周囲の間質細胞と共に同定することができた。スフィア様の細胞の継代培養を、以前に記載されるものに一部改変を加えて行った。このスフィアを、7～10日後に穏やかな遠心分離 (58g) を介して回収し、酵素を用い (10分間、0.05%のトリプシン、0.53mMのEDTA 4Naにおいて; Invitrogen)、かつ熱処理したパストールピペットを使用して機械的に、分離した。分離物から得た細胞を、40 μ mのふるいを通し、単一細胞の状態に関して顕微鏡を用いて解析した。1mlあたり5,000個の生細胞の密度の細胞を、フィーダーとしての間質細胞 (5×10⁵細胞/ウェル) をあらかじめ播種したプレートにプレーティングした。単一細胞/ウェルのクローンの実験のため、細胞を、FACS (FACS Arie1) の間セルソーターを使用して96ウェルプレートにプレーティングした。このウェルは、フィーダー細胞 (2,000細胞/ウェル) をあらかじめ播種したものであった。肺のCSCの継代培養を、以前に記載されたものに一部改変を加えて行った。簡潔に述べると、スフィアを、穏やかな遠心 (800rpm)、酵素的消化 (10分間、0.25%のトリプシン、1mMのEDTA含有; Invitrogen)、および機械的な破碎を介して回収した。この分離物から得た肺のCSCを、100 μ mのストレーナーに通し、ふるいにかけた細胞を、顕微鏡を用いて解析した。1mlあたり5,000個の生細胞の密度の単一細胞を、CAFフィーダー細胞 (5×10⁵細胞/ウェル) をあらかじめ播種した10cmのディッシュにプレーティングした。

【0096】

画像ベースのハイコンテンツアッセイ

肺のCSCまたはがん細胞 (200細胞/ウェル) を、CAF (2,000細胞/ウェル) をあらかじめ播種した96ウェルプレートに添加し、一晚プレートに付着させた。異なる処理を行った後に、細胞を処理した後、Nanog (ReproCELL; 1:300) 一次抗体 (がん幹細胞マーカーとして) およびマウス抗ヒトCD90 FITCコンジュゲート型 (5E10; BD Pharmingen; 1:100) 抗体 (CAFのマーカーとして) を用いた免疫蛍光プロトコルを、4℃で一晩行った。次に、一次抗体を、TRITCコンジュゲート型二次抗体 [ヤギ抗ウサギIgG (H+L) コンジュゲート、Invitrogen] と共に、室温で2時間インキュベートした。この核を、Hoechst 33342色素 (Invitrogen) で対比染色した。二次抗体のバックグラウンド蛍光レベルを決定するために、各プレートは、二次抗体のみを含む対照のウェル (Hoechst 33342色素で染色) を備えていた。染色した細胞の画像を、オートメーション化された蛍光顕微鏡のプラットフォームを使用して、入手した。

【0097】

画像の取得および解析

染色した細胞を、4倍の対物レンズを備えたハイコンテンツ解析プラットフォームを使用して、撮像した。各波長で、ウェルあたり12の領域を撮像し、さらなる画像解析のために合成した。これら画像を、MetaXpress (登録商標) ソフトウェア (Molecular Devices) を使用して解析した。第1に、がん細胞の核 (FITC染色を伴わない細胞、CD90-) を、Multi-Wavelength Cell Scoringを使用して同定した。区分けしたがん細胞の核を、Morphology Filterを使用して、拡大し、平滑化することにより、細胞クラスターのマスク (cell cluster mask) を作製した。TexRedで染色した陽性の細胞を、Nanog陽性の細胞として決定した。

【0098】

リアルタイム逆転写 (RT) Q-PCR

10

20

30

40

50

C L S 1 / C A F および C L S 1 に関する、幹細胞性関連遺伝子の発現レベルおよび A f f y m e t r i x マイクロアレイのデータのバリデーションを、A B I P r i s m 7 9 0 0 S e q u e n c e r (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用した R T Q - P C R を介して行った。プライマーは、P r i m e r E x p r e s s 3 . 0 (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して設計されたものであった (表 2) 。 β アクチンを、内部対照として使用した。発現レベルを、 β アクチンに対して正規化し、 $-\Delta C T = -[C T \text{ 目的物質 (target)} - C T \beta \text{ アクチン}]$ として定義した。相対発現の比率を、対照と比較した倍数変化として計算した ($2^{-\Delta \Delta C T}$)。実験は、三連で行った。

【表 2】

表 2. Q - P C R に関するプライマーのリスト

遺伝子記号	UniGene ID	フォワードプライマー	リバースプライマー
Oct3/4	Hs.249184	TTCAGCCAAACGACCATCTG (SEQ ID NO: 1)	GAACCACACTCGGACCACAT C (SEQ ID NO: 2)
Nanog	Hs.661360	CACCAGTCCCAAAGGCAAAC (SEQ ID NO: 3)	GCCTTCTGCGTCACACCATT (SEQ ID NO: 4)
CD14	Hs.163867	CACAGAGGAGGGAACTGAATGAC (SEQ ID NO: 5)	AACTCTTCGGCTGCCTCTGA (SEQ ID NO: 6)
CD44	Hs.502328	TGGACACTCACATGGGAGTCAAGA (SEQ ID NO: 7)	CGACTGTTGACTGCAATGCA (SEQ ID NO: 8)
ACTB	Hs.520640	CTGGAACGGTGAAGGTGACA (SEQ ID NO: 9)	CGGCCACATTGTGAACCTTG (SEQ ID NO: 10)

【0099】

脂肪細胞への分化

がん幹細胞が脂肪細胞系列に分化し得るかどうかを試験するために、C A F と共培養した C L S 1 細胞、および陽性対照としての間葉系幹細胞を、A d i p o g e n e s i s A s s a y (M i l l i p o r e , C a t . # S C R 0 2 0) のプロトコルに従い試験した。簡潔に述べると、細胞を、10%の F B S、100 U / m l のペニシリン、および 100 μ g / m l のストレプトマイシンを含む R P M I 培地において、 6×10^4 細胞 / ウェルの密度で、24 ウェルプレートに播種した。コンフルエンスに達した後、脂肪細胞分化に関する細胞を、1 μ M のデキサメタゾン、10 μ g / m l のインスリン、100 μ M のインドメタシン、および 0.5 m M のイソブチルメチルキサンチン (I B M X) を補充した基本的な増殖培地からなる脂肪細胞分化誘導培地 (M i l l i p o r e , C a t . # S C R 0 2 0) において、21 日間培養した。この培地を、3 日ごとに交換した。21 日間の培養後に、脂肪細胞の形成を、4%の P F A で細胞を固定し、オイルレッド O 色素を用いて室温で 50 分間染色することにより、評価した。A x i o v e r t 200 顕微鏡を使用して、写真を撮影した。脂肪細胞への分化の間の遺伝子発現解析のため、総 m R N A を、分化の過程の間の 0 日目、7 日目、または 14 日目に、脂肪細胞分化培地で増殖させた細胞から回収した。リアルタイム R T - P C R を、本明細書に記載されるようにこれら試料で、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体- γ (P P A R - γ) およびリポタンパク質リパーゼ (L P L) について行った。

【0100】

骨芽細胞への分化

がん幹細胞が骨形成細胞系列へ分化し得るかどうかを試験するために、C A F と共培養した C L S 1 細胞、および陽性対照としての間葉系幹細胞を、0.1 μ M のデキサメタゾン、0.2 m M のアスコルビン酸 2-リン酸、および 10 m M のグリセロール 2-リン酸を補充した基本的な増殖培地を使用した O s t e o g e n e s i s A s s a y (M i l l i p o r e , C a t . # S C R 0 2 8) のプロトコルに従い、14 日間解析した。簡潔に述べると、細胞を、10%の F B S、100 U / m l のペニシリン、および 100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを含む R P M I 培地において 6×10^4 細胞/ウェルの密度で、ビトロネクチン/コラーゲンでコーティングした 24 ウェル培養プレートに播種した。この培地を、3 日ごとに交換した。14 日後に、細胞を、P B S で 2 回洗浄し、氷冷した 70 % のエタノールにおいて、室温で 1 時間固定した。カルシウム沈着物を、アリザリンレッド S (M i l l i p o r e , C a t . # 2 0 0 3 9 9 9) を用いて室温で 30 分間染色することにより解析した。骨芽細胞への分化の間の遺伝子発現解析のため、総 m R N A を、分化の過程の間の 0 日目、3 日目、または 7 日目に、骨芽細胞分化培地において増殖させた細胞から回収した。リアルタイム R T - P C R を、これら試料で、A P およびオステオカルシン (O C) について行った。

【0101】

10

膜のプロテオームプロファイリング

膜タンパク質の試料を、C A F と共培養した C L S 1 細胞または C A F と共培養していない C L S 1 細胞から抽出し、試料を、内部標準物質の添加、ゲル支援型消化 (g e l - a s s i s t e d d i g e s t i o n) 、および三連の L C - M S / M S 解析に供した。細胞株由来の三連の L C - M S / M S の実行を通した標識フリーの定量化を、中央研究院化学研究所 (I n s t i t u t e o f C h e m i s t r y , A c a d e m i a S i n i c a) の Y u - J u C h e n 博士の研究室により開発された I D E A L - Q ソフトウェアにより行った。ペプチドの比率を、正規化したペプチドの比率の加重平均により、決定した。

【0102】

20

遺伝子発現のプロファイリング

C L S 1 / C A F および C L S 1 の遺伝子発現のプロファイリングマップを、製造社のプロトコルに従い A f f y m e t r i x G e n e C h i p システム (A f f y m e t r i x , I n c . , S a n t a C l a r a , C A , U S A) を使用して入手した。遺伝子発現のプロファイリングを、製造社のプロトコルに従い A f f y m e t r i x G e n e C h i p システム (A f f y m e t r i x , I n c . , S a n t a C l a r a , C A , U S A) を使用して行った。

【0103】

アレイのデータを、国立台湾大学のゲノム医薬のマイクロアレイのコア設備 (M i c r o a r r a y C o r e F a c i l i t y f o r G e n o m i c M e d i c i n e) により処理した。簡潔に述べると、C A F、肺の C S C、およびがん細胞から単離した総 R N A を使用して、T 7 - (d T) ₂ プライマーで c D N A を作製した (S u p e r s c r i p t C h o i c e S y s t e m , G i b c o B R L L i f e T e c h n o l o g i e s) 。ビオチン標識したリボヌクレオチドを、B i o A r r a y h i g h - y i e l d R N A t r a n s c r i p t ラベリングキット (E n z o D i a g n o s t i c , I n c .) を使用して合成し、h u m a n G e n o m e U 1 3 3 P l u s 2 . 0 c h i p (A f f y m e t r i x) を使用してハイブリダイゼーションを行った。

30

【0104】

結果

40

肺の C S C は、C A F フィーダー細胞と共培養する場合に、がん幹細胞性および高い腫瘍原性を維持する。

持続性の C S C / C A F 共培養物のプラットフォームを、原発性肺がん細胞と比較して肺がん幹細胞 (C S C) に差次的に存在するタンパク質の同定のために使用した。C A F と共培養した C L S 1 細胞 (C L S 1 / C A F) は、多くの N a n o g ⁺ 細胞の集団を維持し (図 1、パネル A)、脂肪細胞および骨芽細胞へ分化する能力を維持し (図 1、パネル B および C)、少ない数の細胞 (100 個未満の細胞) を注入した際にマウスの異種移植片において腫瘍をもたらす性質を維持した (図 1、パネル D)。しかしながら、C A F が継代培養の間に除去されると、このようながん幹細胞性の特徴は失われ、N a n o g 陽性の集団が減少し (図 1、パネル A)、腫瘍をイニシエーションする頻度が 1 / 11 から

50

1 / 1774へと減少することが観察された（図1、パネルD）。よって、CSC / CAF共培養物のモデルは、がん幹細胞を培養するためおよびがん細胞の幹細胞性を維持するためのプラットフォームを提供する。

【0105】

高レベルのCD14およびCD44は、原発性肺がん細胞と比較してCSCに存在する。

周辺のカフェと相互作用するCSCの細胞表面タンパク質を同定するために、本出願人は、CSC / CAFおよび分化したがん細胞のトランスクリプトームおよび膜のプロテオームのプロファイリングを行い、次に、CSCマーカーのスクリーニング戦略を行った（図1、パネルE）。この解析により、CD14およびCD44の細胞表面タンパク質が、分化したがん細胞と比較してCSC / CAFにおいてアップレギュレートされていることが証明された。その後の解析は、プロファイリングデータ（上記の表1）の上部にあるCD14およびCD44のタンパク質に焦点を当てたものであった。

【0106】

候補のCSCマーカーを調査するために、CD14およびCD44の発現を、公開されている日本のコホート由来のステージIの肺がん患者152名の臨床上のハザード比と関連させた。これら結果は、腫瘍細胞において高レベルのCD14の発現を伴う患者が、低レベルのCD14の発現を伴う患者と比較して、有意に不十分な無再発生存率を実証することを表した（ $P < 0.05$ 、カプランマイヤー分析；図1、パネルF）。患者の予後に関するCD14およびCD44の解析により、腫瘍細胞において高レベルのCD14およびCD44の発現を伴う患者は、腫瘍細胞において低レベルのCD14およびCD44の発現を伴う患者と比較して、より悪い無再発生存率を実証することが明らかとなった（CD14 + CD44、 $P < 0.05$ 、カプランマイヤー分析；図1、パネルF）。

【0107】

実施例2：予後不良と関連したCD14およびCD44

材料および方法

患者および腫瘍の検体

肺腫瘍組織の検体を、1995年12月28日～2005年12月26日の間に国立台湾大学病院（台湾、台北）で完全な外科手術を受けた、組織学的にNSCLCが確認された患者（N = 80）から入手した。この調査は、国立台湾大学病院の治験審査委員会（Institutional Review Board of the National Taiwan University Hospital）により承認されたものであった（201103028RC）。登録された患者は、ステージIと分類されており、以前に、ネオアジュバントの化学療法または放射線療法で治療されていなかった。全患者が、インフォームドコンセントを提供した。全ての検体は、ホルマリンで固定し、切片化し、H & Eで染色し、顕微鏡を介して観察した。病理学的なステージ分類は、肺がんに関する国際的なステージ分類システムに従い、Yih-Leong Chang博士により行われた。

【0108】

肺がん患者由来の腫瘍の試料の免疫組織化学的解析

腫瘍の試料の免疫組織化学的解析を、標準的な手法に従い行い、本明細書に記載されるように改変した。CD14（clone EPR3653；Epitomics；1：400希釈）およびCD44（clone DF1485；BioGenex；1：200希釈）に関して二重の免疫組織化学的染色を行った。脱パラフィンおよび再水和を行った後、厚さ5 μmの切片に、熱処理型の抗原賦活化（antigen retrieval）を、1 mMのTris-EDTAバッファーを用いて、それぞれ10分間行った。過酸化水素およびUltra V Blockでブロッキングした後に、検体を、室温で2時間、一次抗体と共にインキュベートした。TBSTバッファー（Trisバッファー [TBS：50 mM、pH 7.6] + 0.1%のTween 20）を用いて、洗浄ステップを行った。二重染色を、ウサギ抗ヒト抗体（CD14）に関するHRPコンジュゲート型

10

20

30

40

50

ポリマー、およびマウス抗ヒト抗体（CD44）に関するアルカリホスファターゼコンジュゲート型ポリマーを使用することにより、multivision polymer detection system（Thermo scientific；TL-012-MARH）を用いて行った。Nanogタンパク質発現のIHC解析のために使用される切片を、最初に、Antigen Retrieval AR-10 Solution（Biogenex）またはAntigen Retrieval Citra Solution（Biogenex）において121℃で10分間オートクレーブした。次に、試料を、3%のH₂O₂-メタノールで処理し、順次、室温で、Ultra V Block（Lab Vision Corporation）との10分間のインキュベーション、およびウサギのモノクローナル抗Nanog（D73G4, Cell signaling；1：300）との2時間のインキュベーションに供した。免疫染色の検出を、製造社の説明に従いSuper Sensitive Non-Biotin Polymer HRP Detection System（BioGenex）を使用して行った。

【0109】

結果

腫瘍形成の早期におけるCD14およびCD44の臨床上的関連性および重要性を判定するために、ステージIのNSCLCを有する80名の患者から腫瘍の検体を回収し、各検体の切片を、免疫組織化学的解析を介してCD14およびCD44に対する抗体で染色した。代表的な組織の切片を、図2のパネルAに示す。これら患者の臨床上的特徴を、表3および表4に提供する。

【表3】

表3. 肺がん患者におけるCD14およびCD44の発現の臨床上的特徴

	High (%)	Low (%)	p 値
CD14	N=12	N=68	
年齢（平均値 ± SD）	63.2 ± 6.6*	62.9 ± 10.1*	0.937†
性別			
女性	3 (25.0)	38 (55.9)	0.063‡
男性	9 (75.0)	30 (44.1)	
細胞種			
腺がん	9 (75.0)	55 (80.9)	0.698‡
その他	3 (25.0)	13 (19.1)	
大きさ（平均値 ± SD）	3.4 ± 1.2*	3.4 ± 1.9*	0.999†
CD44	N=39	N=41	
年齢（平均値 ± SD）	62.5 ± 9.8*	63.4 ± 9.6*	0.704†
性別			
女性	16 (41.0)	25 (61.0)	0.117‡
男性	23 (59.0)	16 (39.0)	
細胞種			
腺がん	32 (82.1)	32 (78.1)	0.782‡
その他	7 (18.0)	9 (22.0)	
大きさ（平均値 ± SD）	3.6 ± 1.7*	3.3 ± 1.8*	0.393†

*：データは、平均値±標準偏差として表されている。

†：分散解析（ANOVA）

‡：フィッシャーの正確確率検定

【表 4】

表 4. 肺がん患者における CD14 + CD44 の発現の臨床上的特徴

	CD44 ^{high} CD14 ⁺	CD44 ^{high} または CD14 ⁺	CD44 ^{low} CD14 ⁺	p 値
CD14 + CD44	N=10	N=31	N=39	
年齢 (平均値 ± SD)	63.1 ± 7.2*	62.4 ± 10.3*	63.4 ± 9.8*	0.922†
性別				
女性	3 (30.0)	13 (41.9)	25 (64.1)	0.062‡
男性	7 (70.0)	18 (58.1)	14 (35.9)	
細胞種				
腺がん	7 (70.0)	27 (87.1)	30 (76.9)	0.382‡
その他	3 (30.0)	4 (12.9)	9 (23.1)	
大きさ (平均値 ± SD)	3.7 ± 1.1*	3.5 ± 1.9*	3.3 ± 1.8*	0.827†

* : データは、平均値 ± 標準偏差として表されている。

† : 分散解析 (ANOVA)

‡ : フィッシャーの正確確率検定

【0110】

腫瘍細胞における CD14 の発現レベルをスコア付けし、陽性または陰性の CD14 タンパク質発現のカテゴリに二分した。腫瘍細胞における CD44 の発現レベルをスコア付けし、high (スコア ≥ リスクスコアの中央値) または low (スコア < リスクスコアの中央値) の CD44 タンパク質の発現のカテゴリに二分した。多変量の Cox 比例ハザード回帰分析を使用して、患者の生存と様々な独立した予後因子の関連を評価した (表 5)。

【表 5】

表 5. がん幹細胞マーカーの全生存率に関する共変量の年齢、性別、細胞種、および腫瘍の大きさをを用いた多変量の Cox 比例ハザード回帰分析

	ハザード比	95% HR C. I.	p 値*	
CD14				
CD14	2.79	1.29	6.03	0.009
年齢	0.99	0.96	1.03	0.664
性別	1.54	0.78	3.03	0.217
細胞種†	0.76	0.36	1.62	0.478
大きさ	1.20	1.05	1.37	0.009
CD44				
CD44	9.25	3.78	22.64	<0.0001
年齢	1.00	0.97	1.03	0.998
性別	1.38	0.70	2.73	0.351
細胞種†	0.80	0.37	1.72	0.564
大きさ	1.11	0.97	1.27	0.128
C D 1 4 および C D 4 4 の組み合わせ				
CD14+CD44	3.33	2.12	5.24	<0.0001
年齢	0.99	0.96	1.02	0.534
性別	1.32	0.67	2.60	0.425
細胞種†	0.90	0.42	1.92	0.775
大きさ	1.17	1.02	1.34	0.022

* : Cox 比例ハザード回帰におけるハザード比の Wald 検定

95% C I : 95% の信頼区間

† : 他の細胞種 (参照グループ) と比較した腺がん

【0111】

結果により、独立した予後因子は、CD14 の発現 (ハザード比 (HR) = 2.79、95% C I = 1.29 ~ 6.03; P = 0.009、Cox 比例ハザード回帰分析) および CD44 の発現 (HR = 9.25、95% C I = 3.78 ~ 22.64; P < 0.0001、Cox 比例ハザード回帰分析) を含んでいたことが明らかとなった。転移に関連す

る独立した予後因子は、CD14の発現（HR = 2.63、95%CI = 1.09 ~ 6.35；P = 0.032、比例ハザード回帰分析）およびCD44の発現（HR = 5.89、95%CI = 2.17 ~ 16.01；P < 0.0001、Cox比例ハザード回帰分析、表6）であった。

【表6】

表6. がん幹細胞のマーカーの無再発生存率に関する、共変量の年齢、性別、細胞種、および腫瘍の大きさをを用いた多変量のCox比例ハザード回帰分析

	ハザード比	95% HR C.I.		p 値*
CD14				
CD14	2.63	1.09	6.35	0.032
年齢	1.01	0.97	1.06	0.565
性別	2.28	0.94	5.49	0.067
細胞種†	1.35	0.46	3.92	0.585
大きさ	1.05	0.85	1.28	0.670
CD44				
CD44	5.89	2.17	16.01	0.001
年齢	1.02	0.98	1.07	0.362
性別	2.35	1.00	5.55	0.050
細胞種†	1.55	0.53	4.57	0.423
大きさ	0.96	0.77	1.19	0.684
CD14 および CD 4 4 の組み合わせ				
CD14 + CD44	2.88	1.68	4.94	0.0001
年齢	1.02	0.97	1.07	0.490
性別	2.02	0.85	4.81	0.112
細胞種†	1.59	0.54	4.65	0.401
大きさ	1.00	0.81	1.25	0.973

* : Cox 比例ハザード回帰におけるハザード比の Wald 検定

95%CI : 95% の信頼区間

[†] : 他の細胞種（参照グループ）と比較した腺がん

【0112】

患者の予後に関するCD44およびCD14の発現レベルの個々の作用および組み合わせの作用の解析により、腫瘍細胞においてCD44およびCD14の両方の発現レベルが高い患者は、腫瘍細胞においてCD44およびCD14の発現レベルが低い患者と比較して、最も悪い全生存率（CD44 + CD14、P < 0.0001、カプランマイヤー分析；図2のパネルB；HR = 3.33、95%CI = 2.12 ~ 5.24；P < 0.0001、Cox比例ハザード回帰分析；表5）および無再発生存率（CD14 + CD44、P < 0.05、カプランマイヤー分析；図2のパネルC；HR = 2.88、95%CI = 1.68 ~ 4.94；P = 0.0001、Cox比例ハザード回帰分析；表6）を実証したことが明らかとなった。さらにこれらの結果は、CD44および／またはCD14が、早期のNSCLC患者において転移（P = 0.0001、Cox比例ハザード回帰分析）および全生存率（P < 0.0001、Cox比例ハザード回帰分析）を予測するための新規の予後指標を提供することを証明している（表5および表6）。

【0113】

これらの結果は、腫瘍細胞においてCD14および／またはCD44の発現レベルが高い患者は、発現レベルが低い患者と比較して有意に不十分な全生存率および無再発生存率を示すことを表した。

【0114】

実施例3：高濃度のCD44 + CD14 + 肺がん幹細胞をもたらすCAFとの共培養

材料および方法

免疫蛍光顕微鏡

細胞を、室温でリン酸緩衝食塩水（PBS）において4%のバラホルムアルデヒドで固定した。標準的な免疫蛍光プロトコルに従った。ブロッキングおよびハイブリダイゼーションを、PBS中3%（wt/vol）のウシ血清アルブミン（BSA）において行った

。Nanogを標的とするモノクローナル抗体 (mAb) (ReproCELL; 1:300)、CD90 FITCコンジュゲート型 (5E10; BD Pharmingen; 1:100) 抗体、CD44 FITCコンジュゲート型 (G44-26; BD Pharmingen; 1:10) 抗体、およびCD14 PEコンジュゲート型 (HCD14; Biolegend; 1:20) 抗体を使用した。染色した細胞を、MetaXpress (登録商標) (Molecular Devices) を伴い、Axiovert 200顕微鏡 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) および共焦点レーザー走査顕微鏡 (C1si, Nikon, Japan) を使用して観察した。

【0115】

ウェスタンブロット解析

具体的な手順は、標準的な手法に従い行われた。Nanogに関する一次抗体 (D73G4; 1:1000) は、Cell Signaling Technology, Inc. から購入し、CD44に関する一次抗体 (MAB4073; 1:1000) は、Cell Marqueから購入し、CD14に関する一次抗体 (EPR3653; 1:1000) は、Cell Marqueから購入した。モノクローナルなマウスの抗βアクチン (Chemicon, Millipore; 1:5000) を、ローディングの対照として使用した。次に、膜をTBSTで3回洗浄し、次に、TBST/2%のスkimミルクにおいて西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート型二次抗体 (1:5,000) と共にインキュベーションを行った。結合した抗体は、Enhanced Chemiluminescence System (Santa Cruz, CA) を使用して検出した。化学発光シグナルを、Fujifilm LAS 3000システム (Fujifilm, Tokyo, Japan) を使用して撮像した。全ての実験は、二連で少なくとも3回行った。

【0116】

超低接着表面 (Ultra-low) によるスフィア形成アッセイ

超低接着表面によるスフィア形成アッセイを、標準的な手法に従い行い、本明細書中記載されるように改変した。20ng/mlのEGF (Sigma) および20ng/mlのbFGF (Invitrogen) を補充したMCDB201無血清培地 (Invitrogen) における肺のCSCの単一細胞懸濁液を、超低接着性 (ultra-low adherent) の24ウェルプレート (Corning, Corning, NY, USA; ウェルあたり200個の生細胞) に播種した。この培地に、週に2回、新鮮な増殖因子を補充した。3週間後に、スフィアを、Axiovert 200顕微鏡下で観察した。

【0117】

結果

CD14およびCD44の発現が、分化したがん細胞と比較してCSC/CAF共培養モデルで高まることを検証するために、CLS1/CAFの遺伝子発現プロファイルを、異なる継代を介し、フィーダー細胞を伴わずに培養したCLS1-分化したがん細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した。この比較により、CLS1細胞とCAFの共培養物は、CAFを伴わずに継代培養したがん細胞と比較してCD14およびCD44の発現を誘導することが示された (図3、パネルA)。

【0118】

CD14およびCD44が様々な腫瘍由来のCAFと共培養した肺がん細胞において増大するかどうかをさらに評価するために、CAFを、異なる肺がん患者から単離した。異なるがん細胞株 (A549細胞およびEKVX細胞) からレーザーにより捕捉したコロニー細胞は、高いCD14およびCD44の発現レベルを示した (図3、パネルBおよび図5のパネルA)。患者から単離した12個のCAFの試料の特徴を、表7に示す。

【表 7】

表 7. 患者の人口統計、腫瘍のステージ、病理学的診断

患者	年齢	性別	TNM	ステージ	組織構造	初代培養細胞
L2	47	F	T2aNO	IIA	ADC	CAF および NF
L5	72	M	T2bNO	IIA	ADC	CAF および NF
L8	84	M	T4NO	IIIB	SCC	CAF および NF
CLS1	87	M	T2NO	IIIA	ASC	がん細胞および CAF

10

【0119】

免疫蛍光染色およびウェスタンブロットにより、CD14 および CD44 が、分化した CLS1 細胞よりも肺の CSC (CLS1/CAF) においてはるかに多く発現したことが確認された (図 3 のパネル C)。フローサイトメトリーの解析により、CD44 および CD14 が、肺の CSC (CLS1/CAF) においてより高いレベルで発現し (CD14 : 55 % ; CD44 : 98.1 %)、分化後に CD44 および CD14 の発現レベルが低減した (CD14 : 11 % ; CD44 : 30.3 %) ことが示された (図 5 のパネル B)。異なる肺がん細胞株 (A549、EKVX、PC9、および HCC827) ならびに原発性肺がん細胞 (CL25、CL83、CL97、CL100、CL141、および CL152) において CD44 陽性の集団および CD14/CD44 二重陽性の集団のパーセンテージを決定し、この結果は、CD44 陽性の集団が、異なる肺がん細胞において多く含まれていたことを証明した (79.6 ± 29.7 %、図 6)。CD44/CD14 二重陽性の集団のパーセンテージは、これらががん細胞において有意に低減していた (19.0 ± 23.9 %)。この解析により、CD44 および CD14 は、腫瘍のニッチにおけるがん幹細胞マーカーを十分表すことが明らかである。

20

【0120】

実施例 4 : CD44^H i CD14⁺ がん細胞は、高い、腫瘍をイニシエーションする頻度を有する。

材料および方法

30

フローサイトメトリー

がん幹細胞マーカーの集合を解析し、フローサイトメトリーにより選別した。ヒト抗原 CD44 FITC コンジュゲート型 (G44-26 ; BD Pharmingen ; 1 : 10) および CD14 PE コンジュゲート型 (HCD14 ; Biolegend ; 1 : 20) の抗体は、商業的に購入された。肺がん細胞株および原発性肺がん細胞は、室温で 30 分間、PBS における CD14 および CD44 の二重染色により染色した。30 分後に、染色した細胞を洗浄して過剰な未結合の抗体を洗い出し、ソーティングバッファー (PBS 中 1 mM の EDTA および 2 % の FBS) に再懸濁した。フローソーティングを、BD FACSAria III セルソーター (Becton Dickinson) を使用して行い、解析を、FACSCalibur (Becton Dickinson) で行った。ソーティングした試料の細胞に関して、単一細胞のソーティングを確保するために、細胞の凝集物を、前方散乱の高さ (forward-scatter height) 対前方散乱の幅 (forward-scatter width) (FSC-H 対 FSC-W) および側方散乱面積 (side-scatter area) 対側方散乱の幅 (side-scatter width) (SSC-A 対 SSC-W) により排除した。死細胞を、ヨウ化プロピジウム (PI、死細胞染色、Molecular Probes) (で染色した) 細胞を除外することにより排除し、単一細胞実験のため、頑強な生細胞のソーティングの有効性を高めた。

40

【0121】

結果

50

肺がん細胞株および原発性肺がん細胞におけるCD44^{Hi}CD14⁺の集団の、がん幹細胞の作用上の定義を表す腫瘍をイニシエーションする能力を測定した。選別した肺がん細胞（CLS1細胞）を、限定した希釈（ 1×10^4 、 1×10^3 、および 1×10^2 細胞／マウス）で、NOD／SCID／IL2R γ （NSG）マウスに皮下注射した。肺がん細胞株（CLS1）から選別したCD44^{Hi}CD14⁺集団は、CD44^{Hi}CD14⁻集団と比較して（1／278）高い、腫瘍をイニシエーションする頻度（1／10）を示した。CD44^{Low}CD14⁺の集団は、判定されなかった。

【0122】

肺がん細胞株（CLS1細胞およびA549細胞）ならびに原発性肺がん細胞（CL100、CL141、およびCL152）から選別したCD44^{Hi}CD14⁺の集団の腫瘍をイニシエーションする頻度も、同様に測定した。これら細胞集団を、限定した希釈（ 1×10^4 、 1×10^3 、および 1×10^2 細胞／マウス）で、SCIDマウスに皮下注射した。CD44^{Hi}CD14⁺集団は、CD44^{Hi}CD14⁻集団およびCD44^{Low}CD14⁻の集団由来のがん細胞と比較して、異種移植片において、高い腫瘍をイニシエーションする頻度を証明した（表8および図4のパネルA～F）。これら結果から、肺がん細胞のCD44^{Hi}CD14⁺集団は、腫瘍原性幹様細胞であり得ることが示唆される。

【表8】

表8. CSCマーカーにより選別されたがん細胞のTIFCの頻度

細胞株	グループ	注射した細胞数	腫瘍発生率	TIF	カイ二乗検定
A549	CD44 ^{Hi} CD14 ⁺	1×10^4	6/6	1/670	P=0.003
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁺	1×10^3	4/6	(1/271-1/1652)	
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁺	1×10^2	2/6		
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁻	1×10^4	4/6	1/4119	
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁻	1×10^3	4/6	(1/1692-1/10028)	P=0.005
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁻	1×10^2	1/6		
	CD44 ^{Low} CD14 ⁻	1×10^4	2/3	1/4248	
	CD44 ^{Low} CD14 ⁻	1×10^3	3/6	(1/1393-1/12952)	
CLS1	CD44 ^{Hi} CD14 ⁺	1×10^4	6/6	1/670	P=0.005
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁺	1×10^3	4/6	(1/271-1/1652)	
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁺	1×10^2	2/6		
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁻	1×10^4	4/6	1/5685	
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁻	1×10^3	5/6	(1/2352-1/13740)	P=0.007
	CD44 ^{Hi} CD14 ⁻	1×10^2	1/6		
	CD44 ^{Low} CD14 ⁻	1×10^4	6/6	1/4326	
	CD44 ^{Low} CD14 ⁻	1×10^3	0/6	(1/1784-1/10489)	
	CD44 ^{Low} CD14 ⁻	1×10^2	0/6		

CSCの腫瘍をイニシエーションする頻度（TIFC）は、Leucalimiting dilution analysisのウェブサイトを使用して計算した。CI、信頼区間；N.D.、決定されず。カイ二乗検定を、CD44^{Hi}CD⁻およびCD44^{Low}CD14⁻の試験グループについて分析した。

【0123】

本明細書中記載されるトランスクリプトームおよびプロテオームの解析は、CD14および／またはCD44が、CAF培養物と比較してCSC／CAF共培養物において高い

レベルで存在することを同定した。本明細書中同定されたタンパク質のいずれかは、肺がん幹細胞に関するバイオマーカー（個別または組み合わせたバイオマーカー）として、たとえば、試料中の肺がん幹細胞の存在を決定するための方法、予後不良に関連する肺がんを有する患者を同定するための方法、治療の候補を選択するための方法、肺がんの進行をモニタリングするための方法、肺がんに対する治療の有効性を評価するための方法、治療工程を決定するための方法、対象に肺がんの再発のリスクがあるかどうかを評価するための方法において、ならびに／または、たとえば、新規治療の開発に関して信頼性があり得る、肺がんの機構および／もしくは肺がんに関与する生物学的な経路／プロセスを研究することを含む、研究目的のために、使用することが可能である。

【0124】

10

実施例5：様々な種類のがん幹細胞でのCD14の発現

肝臓がん細胞、結腸がん細胞、および膵臓がん細胞を含む様々な種類のがん細胞を、製造社のプロトコルに従いPEコンジュゲート型抗CD14抗体（HCD14；Biolegend；PBS中1：20）を用いて、室温で30分間染色した。アイソタイプ抗体を、非特異的な結合に対する陰性対照として使用した。次に、これら細胞をPBSにより洗浄して未結合の抗体を除去し、ソーティングバッファのPBS（PBS中1mMのEDTAおよび2%のFBS）に再懸濁し、BD FACSAria（商標）Fusion（Becton Dickinson）のセルソーターを使用して、蛍光活性化セルソーティング（FACS）解析に供した。

【0125】

20

以下の図9に示す通り、CD14の発現が、様々な種類のがん細胞で観察された。

【表9】

表9．様々な種類のがん細胞株におけるCD14の発現

細胞株	がんの種類	CD14 (%)
Huh7	肝細胞がん	10.3
HCT116	結腸直腸がん	0.9
MiaPaca2	膵臓がん	9.2
BXPC3	膵臓腺がん	9.8

30

【0126】

この試験の結果は、CD14が、様々な種類のがん細胞、たとえばがん幹細胞に関するバイオマーカーとして使用できることを表している。

【0127】

他の実施形態

本明細書中開示した全ての特性は、任意の組み合わせで組み合わせられ得る。本明細書中開示される各特性は、同じ目的、均等の目的、または類似の目的を供給する代替の特性と置き換えられ得る。よって、他が明記されていない限り、開示される各特性は、包括的な一連の均等または類似の特性の単なる例である。上記の説明から、当業者は、本開示の本質的な特徴を容易に解明することができ、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な利用および条件に適合するように本開示の様々な変更および修正を行うことができる。よって、他の実施形態も同様に特許請求の範囲内にある。

40

【0128】

均等物および範囲

当業者は、単なる規定の実験を使用して、本明細書中記載される本開示の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するか、または解明することができるであろう。本開示の範囲は、上記の説明に限定されると意図されてはならず、むしろ、添付の特許請求の範囲に記載される通りである。

【0129】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、文脈と

50

反対または他の記載が明記されていない限り、1または1超を意味し得る。あるグループの1つ以上のメンバー間に「または（or）」を含む特許請求の範囲または記載は、文脈と反対または他の記載が明記されていない限り、当該グループのメンバーのうちの1つ、1超、または全てが、所定の製品もしくはプロセスに存在している場合、所定の製品もしくはプロセスで使用される場合、または所定の製品もしくはプロセスに関連している場合を満たすと意図されている。本開示は、グループの正確に1つのメンバーが、所定の製品もしくはプロセスに存在する実施形態、所定の製品もしくはプロセスで使用される実施形態、または所定の製品もしくはプロセスに関連している実施形態を含む。本開示は、グループのメンバーの1超または全てが、所定の製品もしくはプロセスに存在する実施形態、所定の製品もしくはプロセスで使用される実施形態、または所定の製品もしくはプロセスに関連している実施形態を含む。

10

【0130】

さらに、本開示は、列挙した特許請求の範囲のうちの1つ以上に由来する1つ以上の限定、要素、項、および記述用語が別の特許請求の範囲に導入される、全てのバリエーション、組み合わせ、および並べ替えを包有する。たとえば、他の特許請求の範囲に従属するいずれの特許請求の範囲も、同じベースの特許請求の範囲に従属する他のいずれかの特許請求の範囲に見いだされる1つ以上の限定を含むように修正することができる。要素が、列挙として、たとえばマーカッシュ群の形式で提示されている場合、この要素の各下位群も同様に開示されており、いずれの要素も、当該群から除外される可能性がある。一般に、本開示または本開示の態様が特定の要素および／または特性を含むとみなされる場合、本開示の特定の実施形態または本開示の態様は、当該要素および／もしくは特性からなるか、または当該要素および／もしくは特性から本質的になることを理解すべきである。簡便性のため、これら実施形態は、本明細書中これらの言葉で（in haec verba）具体的に記載されてはいない。また、用語「含む（comprising）」および「含む（containing）」は、オープンと意図されており、追加的な要素またはステップの包有を許容することに留意されたい。範囲が提供される場合、エンドポイントが含まれる。さらに、他の意味が記載されているかまたは文脈および当業者の理解から明らかではない限り、範囲として表されている値は、文脈が他の意味を明記しない限り、当該範囲の下限の単位の10分の1までの、本開示の異なる実施形態に記載された範囲内のいずれかの特定の値または下位範囲を担うことができる。

20

30

【0131】

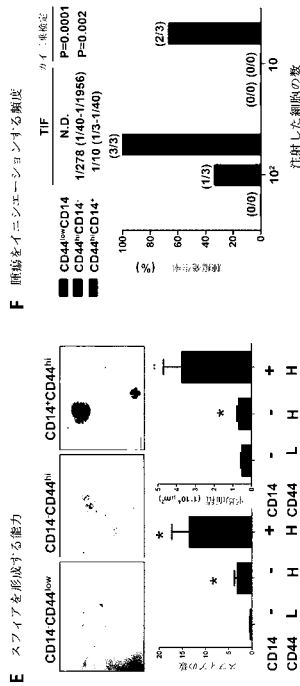
本願は、全てが参照として本明細書中に組み込まれている、様々な、発行済みの特許、公開済みの特許出願、学術論文、および他の刊行物に言及している。組み込まれた参考文献のいずれかと本明細書との間に矛盾が存在する場合、本明細書が統制を行う。さらに、従来技術の範囲内にある本開示のいずれかの特定の実施形態は、特許請求の範囲のいずれか1つ以上から明らかに除外され得る。このような実施形態は、当業者に知られているとみなされるため、当該実施形態は、この除外が本明細書中明らかに記載されていない場合であっても除外され得る。本開示のいずれかの特定の実施形態は、従来技術の存在に関連しないかどうかに関わらず、何等かの理由のため、いずれかの特許請求の範囲から除外され得る。

40

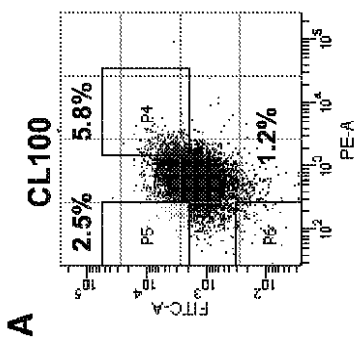
【0132】

当業者は、本明細書中記載の特定の実施形態に対する多くの均等物を、単なる規定の実験を使用して認識するか、または解明できるであろう。本明細書中記載される本実施形態の範囲は、上記の説明に限定されると意図されてはならず、むしろ添付の特許請求の範囲に記載される通りである。当業者は、この説明に対する様々な変更および修正が、以下の特許請求の範囲に定義される限り、本開示の趣旨または範囲から逸脱することなくなされ得ることを理解するものである。

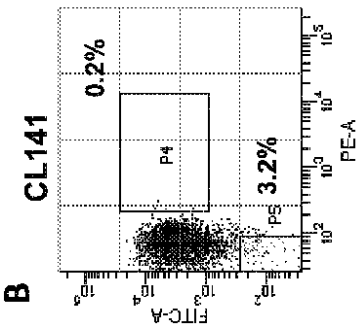
【図 3 - 3】



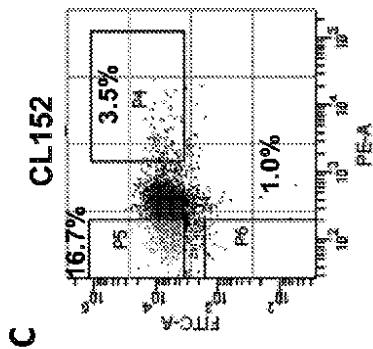
【図 4 A】



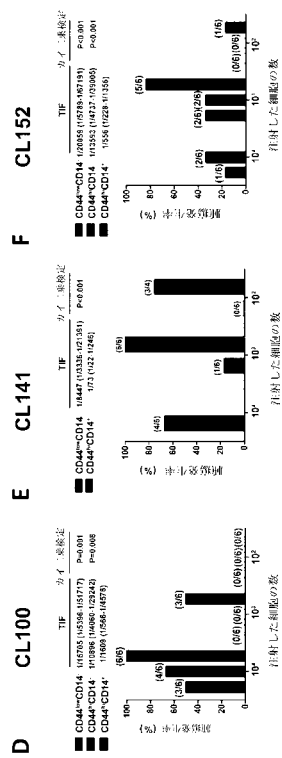
【図 4 B】



【図 4 C】

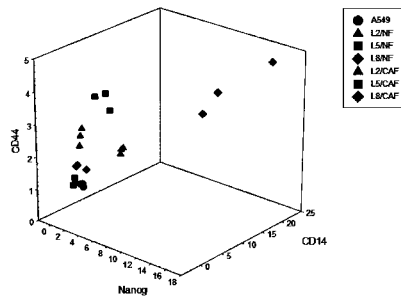


【図 4】

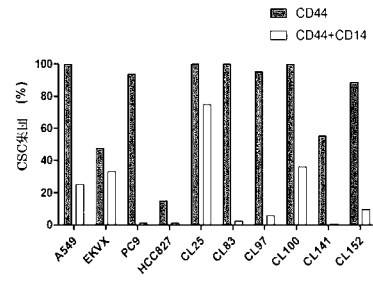


【図 5】

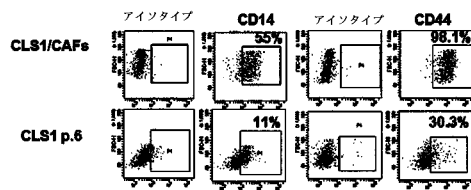
A



【図 6】



B



【手続補正書】

【提出日】 令和1年10月3日 (2019.10.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 配列表

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【配列表】

[2020507081000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/070383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/574(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i 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) G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, CNTXT, EPTXT, USTXT: cancer stem cell+, CSC+, CD14, CD44, analyz+, detect+, measur+, marker+, cancer, enrich+, lung cancer, yang pan-chyr		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013126993 A1 (UNIV. MCMASTER) 06 September 2013 (2013-09-06) claims 76, 86, 87, description, paragraph 00166	1-23
Y	WO 2013126993 A1 (UNIV. MCMASTER) 06 September 2013 (2013-09-06) claims 76, 86, 87, description, paragraph 00166	11-15, 17-23
Y	CN 105102614 A (UNIV. OKAYAMA ET. AL.) 25 November 2015 (2015-11-25) claims 1, 6, 11, 14, description, paragraph 0005	11-15, 17-23
Y	CN 106053821 A (UNIV. JILIN MEDICAL) 26 October 2016 (2016-10-26) claims 1-3, description, paragraph 0006	11-15, 17-23
Y	LEUNG, E. L. et al. "Non-Small Cell Lung Cancer Cells Expressing CD44 Are Enriched for Stem Cell-Like Properties." PLOS ONE, Vol. 5, No. 11, 19 November 2010 (2010-11-19), e14062, pages 1-13	11-15, 17-23
A	WO 0212447 A2 (UNIV. MICHIGAN) 14 February 2002 (2002-02-14) the whole document	1-23
☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 March 2018		Date of mailing of the international search report 26 March 2018
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer LIAO, Wenying Telephone No. (86-10)53961920

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/070383**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOBBA, A. R. M. et. al. "Differential Expression of CD90 and CD14 Stem Cell Markers in Malignant Breast Cancer Cell Lines." <i>CYTOMETRY PartA.</i> , Vol. 81A, 22 October 2012 (2012-10-22), pages 1084-1091	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/070383

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/070383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2013126993	A1	06 September 2013	AU	2012222812	A1	02 May 2013
				EP	2820148	A4	28 October 2015
				US	2013331381	A1	12 December 2013
				JP	2014509323	A	17 April 2014
				WO	2012116432	A1	07 September 2012
				CA	2865819	A1	07 September 2013
				EP	2820148	A1	07 January 2015
				EP	2680853	A1	08 January 2014
				ES	2639555	T3	27 October 2017
				US	9566282	B2	14 February 2017
				EP	2680853	A4	06 August 2014
				US	2013065887	A1	14 March 2013
				EP	2820148	B1	26 July 2017
CN	105102614	A	25 November 2015	JP	WO2014148562	A1	16 February 2017
				US	2015079626	A1	19 March 2015
				EP	2977450	A1	27 January 2016
				WO	2014148562	A1	25 September 2014
				EP	2977450	A4	14 December 2016
CN	106053821	A	26 October 2016	None			
WO	0212447	A2	14 February 2002	US	2007190647	A1	16 August 2007
				US	2004037815	A1	26 February 2004
				CA	2417909	A1	14 February 2002
				US	6984522	B2	10 January 2006
				EP	1343871	A2	17 September 2003
				US	2011033481	A1	10 February 2011
				US	2014037644	A1	06 February 2014
				JP	2004527211	A	09 September 2004
				US	2007259969	A1	08 November 2007
				EP	2359863	A2	24 August 2011
				US	2017175083	A1	22 June 2017
				WO	0212447	A3	24 April 2003
				EP	2359863	A3	15 August 2012
				US	7115360	B2	03 October 2006
				AU	7813401	A	18 February 2002
				ES	2553796	T3	11 December 2015
				US	2006073125	A1	06 April 2006
				US	7850961	B2	14 December 2010
				AU	2001278134	B2	11 October 2007
				EP	1343871	B1	07 October 2015
				US	2002119565	A1	29 August 2002
				US	9089556	B2	28 July 2015
				US	9492538	B2	15 November 2016
				US	2006051325	A1	09 March 2006
				US	2009004205	A1	01 January 2009
				WO	0212447	B1	03 July 2003
				CA	2417909	C	29 September 2015
				US	7713710	B2	11 May 2010
				US	2007212737	A1	13 September 2007
				US	2007231325	A1	04 October 2007
				JP	5352037	B2	27 November 2013

International application No.

PCT/CN2018/070383

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2012295350 A1	22 November 2012
		US 7754206 B2	13 July 2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C 1 2 Q	1/6886	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886	Z
C 1 2 Q	1/6837	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z
C 1 2 Q	1/6851	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWEEN

(72)発明者 チェン, フェイーウェン
台湾, 10617, タイペイ, ルーズベルト ロード, セクション 4, ナンバー 1

(72)発明者 チェン, ワンージウン
台湾, 10617, タイペイ, ルーズベルト ロード, セクション 4, ナンバー 1

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA13 DA36
4B063 QA19 QQ03 QQ08 QR08 QR62 QS25 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	肺癌干细胞的生物标志物		
公开(公告)号	JP2020507081A	公开(公告)日	2020-03-05
申请号	JP2019556417	申请日	2018-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立台湾大学		
申请(专利权)人(译)	国立台湾大学		
发明人	ヤン,バン-チル チェン,フェイ-ウエン チェン,ワン-ジウン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/50 G01N37/00 C12Q1/6886 C12Q1/6837 C12Q1/6851		
CPC分类号	G01N33/57419 G01N33/57423 G01N33/57438 G01N33/57492 G01N2333/70585 G01N2333/70596 C12Q1/6886 C12Q2600/112 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.Y G01N33/574.A G01N33/50.P G01N37/00.102 C12Q1/6886.Z C12Q1/6837.Z C12Q1/6851.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA36 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/442077 2017-01-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供的方法和试剂盒用于分析样品，例如得自患有癌症，怀疑患有癌症或有癌症风险的受试者的生物样品，以评估样品中癌症干细胞的存在，这表明癌症预后不良。。

(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2020-507081A (P2020-507081A) 令和2年3月5日(2020.3.5)
(51) Int. Cl.		F I	テーマコード(参考) 2 G 0 4 5 4 B 0 6 3
G O 1 N 3 3 / 6 8 (2006.01)		G O 1 N 3 3 / 6 8 Z N A	
G O 1 N 3 3 / 5 3 (2006.01)		G O 1 N 3 3 / 5 3 Y	
G O 1 N 3 3 / 5 7 4 (2006.01)		G O 1 N 3 3 / 5 7 4 A	
G O 1 N 3 3 / 5 0 (2006.01)		G O 1 N 3 3 / 5 0 P	
G O 1 N 3 7 / 0 0 (2006.01)		G O 1 N 3 7 / 0 0 I O 2	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2019-556417 (P2019-556417)	(71) 出願人	503209342 ナショナル タイワン ユニバーシティ 台湾 106 タイペイ ルーズベルト ロード セクション 4 ナンバー 1
(93) (22) 出願日	平成30年1月3日(2018.1.3)	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(93) 翻訳文提出日	令和1年8月29日(2019.8.29)	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(93) 国際出願番号	PCT/CN2018/070383	(74) 代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代
(93) 国際公開番号	W02018/127055	(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(93) 国際公開日	平成30年7月12日(2018.7.12)	(72) 発明者	ヤン,バン-チル 台湾,106、タイペイ, ルーズベルト ロード, セクション 4, 1 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	62/442,077		
(32) 優先日	平成29年1月4日(2017.1.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 肺がん幹細胞のためのバイオマーカー