

(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2008-504034
(P2008-504034A)

(43) 公表日 平成20年2月14日(2008.2.14)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁)

(21) 出願番号 特願2007-518362 (P2007-518362)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月24日 (2005. 6. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年2月22日 (2007. 2. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/022846
 (87) 国際公開番号 W02006/002433
 (87) 国際公開日 平成18年1月5日 (2006. 1. 5)
 (31) 優先権主張番号 60/582, 906
 (32) 優先日 平成16年6月25日 (2004. 6. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505060347
 ベリデックス・エルエルシー
 Veridex, LLC
 アメリカ合衆国、07059 ニュージャ
 ージー州、ウォレン、テクノロジー・ドラ
 イブ 33
 33 Technology Drive
 , Warren, NJ 07059, U.
 S. A.
 (74) 代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延
 (74) 代理人 100123434
 弁理士 田澤 英昭
 (74) 代理人 100101133
 弁理士 濱田 初音

最終頁に続く

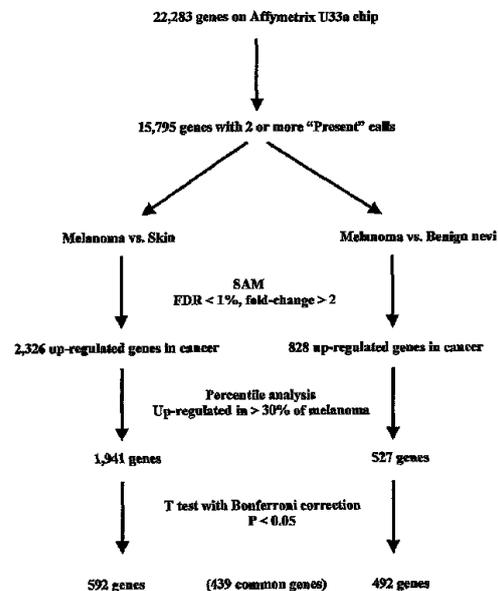
(54) 【発明の名称】 黒色腫を検出するための方法および試薬

(57) 【要約】

【課題】 黒色腫に対する術中アッセイの感度および特異度を改善すること。

【解決手段】 特定遺伝子の特異的発現がカットオフ値を超えて黒色腫を示すか否かを決定することによって、悪性メラニン形成細胞を同定するためのアッセイを行う。該アッセイは、リンパ節組織について手術中に行うことができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

黒色腫を同定する方法において、

a . 組織試料を得る段階と、

b . P L A B (配列 I D 番号 : 1) および L 1 C A M (配列 I D 番号 : 2) ; または、
P L A B、L 1 C A M および N T R K 3 (配列 I D 番号 : 3)、

に対応する m R N A をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、
を含み、

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在
することを示す、

方法。

【請求項 2】

黒色腫を同定する方法において、

a . 組織試料を得る段階と、

b . 配列 I D 番号 : 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号 : 7 ~ 9、および、配列 I D 番号 : 1
0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号 : 1 3 ~ 1 5 ; または、

配列 I D 番号 : 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号 : 7 ~ 9、および、配列 I D 番号 : 1 0 ~
1 2 もしくは配列 I D 番号 : 1 3 ~ 1 5、および、配列 I D 番号 : 1 6 ~ 1 8、

から成る群から選ばれるプライマー/プローブのセットによって認識される m R N A をコ
ードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、

を含み、

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在
することを示す、

方法。

【請求項 3】

悪性メラニン形成細胞を良性メラニン形成細胞から識別する方法において、

a . 組織試料を得る段階と、

b . P L A B (配列 I D 番号 : 1) および L 1 C A M (配列 I D 番号 : 2) ; または、
P L A B、L 1 C A M および N T R K 3 (配列 I D 番号 : 3)、

をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、

を含み、

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に悪性メラニン
形成細胞が存在することを示す、

方法。

【請求項 4】

悪性メラニン形成細胞を良性メラニン形成細胞から識別する方法において、

a . 組織試料を得る段階と、

b . 配列 I D 番号 : 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号 : 7 ~ 9、および、配列 I D 番号 : 1
0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号 : 1 3 ~ 1 5 ; または、

配列 I D 番号 : 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号 : 7 ~ 9、および、配列 I D 番号 : 1 0 ~
1 2 もしくは配列 I D 番号 : 1 3 ~ 1 5、および、配列 I D 番号 : 1 6 ~ 1 8、

から成る群から選ばれるプライマー/プローブのセットによって認識される遺伝子の、前
記試料中の発現レベルを測定する段階と、

を含み、

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に悪性メラニン
形成細胞が存在することを示す、

方法。

【発明の詳細な説明】**【開示の内容】****【0001】**

10

20

30

40

50

〔発明の背景〕

皮膚の悪性黒色腫(malignant melanoma)は、一般的な進行性ガンであり、発生率が増大している。そのことは、重大な医療問題であり、2004年の米国において、新たに55,100人を超える患者が予想されており、死亡率は約14.5%である〔キャンサー・ファクツ・アンド・フィギュアズ(Cancer Facts and Figures)(2003), 米国癌協会(American Cancer Society)(2003)〕。黒色腫の発生率は、他のあらゆる悪性疾患の発生率に比べて、より速く上昇し続けている〔ド・ブラウト(De Braud)等(2003)〕。初期の局所黒色腫の予後(prognosis)は、有利であり、5年全生存率(5-year overall survival)は90%を超えるが、領域リンパ節(regional lymph node)が絡んでくると、5年全生存率は10~46%に低下する〔ボールチ(Balch)等(2001)〕。したがって、領域リンパ節(LN)の状態(status)は、黒色腫患者が生存する場合の最も重要な予後因子(prognostic factor)となる。前哨リンパ節(SLN:見張りリンパ節)技術の導入〔モートン(Morton)(1992)〕によって、微小転移(micrometastasis:微小癌組織の転移)検出の感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色(hematoxylin and eosin)(H&E)染色法単独と比べて、増大してきた〔ユー(Yu)等(1999)およびメッシーナ(Messina)等(1999)〕。それにもかかわらず、組織学的分析は、免疫組織化学(IHC)によって改善されたとしても、腫瘍細胞を認識する光学顕微鏡法の能力によって制限されている。リンパ節中の黒色腫をより高感度で検出するために、最近、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription-polymerase chain reaction)(RT-PCR)分析が提案されてきた。多くの研究によると、十分に特性化されたメラニン形成細胞(melanocyte:メラノサイト)特異マーカー(例えば、チロシナーゼ(tyrosinase)およびMART-1)を用いた場合、リンパ節中にこれらの遺伝子転移が存在することが例証されたか、さもなければ、日常の組織学およびIHCによって陰性であることが分かった〔シャイバーズ(Shivers)等(1998)およびクオ(Kuo)等(2003)〕。しかし、これらの遺伝子は、腫瘍細胞に特異的ではなく、良性組織と悪性組織とを識別するのに使用することができない。実際に、それらの遺伝子は、良性カプセル母斑(capsular nevi)の存在下、偽陽性の結果を生じさせた〔タケウチ(Takeuchi)等(2004)、スターズ(Starz)等(2003)およびガッツマー(Gutzmer)等(2002)〕。良性母斑が、黒色腫の前哨リンパ節において稀な事象ではないということを考慮すれば、現行のRT-PCRアッセイは、黒色腫の微小転移を診断するのに臨床的には有用でない。最近の研究では、アッセイの特異性を増大させるために、RT-PCRアッセイのためのガン特異マーカーを含むマルチマーカー・パネル(multi-marker panel)が提案されている〔フーン(Hoon)等(2004)〕。新規な黒色腫特異マーカーの同定は、依然として黒色腫研究の重要な問題の1つである。

【0002】

幾種類かのタンパク質は、黒色腫およびその転移部と関連することが示された。これらのタンパク質またはそれらの誘導体は、転移を同定するための免疫組織化学検査において使用されてきた。それらには、L1CAM〔ティース(Thies)等(2002)、フォーゲル(Fogel)等(2003)〕およびS-100〔ディエゴ(Diego)等(2003)〕が含まれる。

【0003】

転移性黒色腫の検出感度を増大させるために、核酸試験が提案された(米国特許公報第2002/0110820号および同第2003/0232356号)。研究には、MAGE3、チロシナーゼ(tyrosinase)、MART-1、MITF-MもしくはIL-1、R1、エンドセリン(endothelin)-2、エフリン(efrin)-A5、IGF結合タンパク質7、HLA-A0202重鎖、アクティビン(Activin)A(Aサブユニット)、TNF-RII、SPC4、CNTFR、または、gp100(HMB45)遺伝子を包含するマーカーが使用された〔ボスティック(Bostick)等(1999)、フーン(Hoon)等(2001)、パルミエーリ(Palmeri)等(2001)、ライトソン(Wrightson)等(2001)、ガッツマー等(2002)、デービズ(Davids)等(2003)、スターズ等(2003)、リンボルディ(Rimbold

10

20

30

40

50

i)等(2003)、クック(Cook)等(2003)、ライントゲン等(2004)、米国特許公報第2002/0098535号および同第2003/0049701号、米国特許第5,512,437号、同第5,512,444号、同第5,612,201号、同第5,759,783号、同第5,844,075号、同第6,025,474号、同第6,057,105号、同第6,235,525号、同第6,291,430号、同第6,338,947号、同第6,369,211号、同第6,426,217号、同第6,475,727号、同第6,500,919号、同第6,527,560号、同第6,599,699号明細書、国際公開番号(WO)96/29430号明細書]。これらのマーカーは、測定された場合、黒色腫の診断に単独で用いるのに十分であることは見出だされていない[リッチョーニ(Riccioni)等(2002)、ガッツマー等(2002)、デービズ等(2003)、ゴイドス(Goydos)等(2003)およびプリチャード(Prichard)等(2003)]。

【0004】

これらのマーカーの多くは、他の新生物[例えば、明細胞肉腫、胆道ガンおよび胃ガンに対するME20M(GP100)]をも標示することが分かってきた[ヒラガ(Hiraga)等(1997)、オカダ(Okada)等(2001)、オカミ(Okami)等(2001)、アントネスク(Antonescu)等(2002)、シーガル(Segal)等(2003)]。MAGE3は、乳房、肝細胞、腎臓、神経、肺および食道の新生物を包含する多数の新生物をも標示する[ヤマナカ(Yamanaka)等(1999)、オオカ(Ooka)等(2000)、スズキ(Suzuki)等(2000)、チューン(Cheung)等(2001)およびワイザー(Weiser)等(2001)]。幾種類かの黒色腫抗原エンコーディング遺伝子(melanoma antigen-encoding genes)も、肺ガンにおいて発現する[ヨシマツ(Yoshimatsu)等(1998)]。

【0005】

これらのマーカーは他のガンおよび良性メラニン形成細胞において陽性発現を示したので、それらマーカーは、高感度であるが、非特異性であることが分かった。加えて、チロシナーゼは、正常リンパ節中に存在するシュワン細胞(Schwann cells)において発現する。特異性のみが欠如しているので、新たなマーカーまたは追加のマーカーを用いるアッセイが必要となる。H&E(ヘマトキシリン・エオジン染色)組織学および免疫組織化学検査(IHC)は、依然として、「前哨リンパ節中の黒色腫および母斑細胞を同定するための最も基準になる検査(gold standard)」である[スターズ等(2003)]。術中セッティング(intra-operative setting)における検出組織によって、これの必要性はなお更に重大となる。

【0006】

リンパ節関連事項は、多くの充実性腫瘍(solid tumors)における最強の予後因子であり、リンパ節の微小転移の検出は、病理学者および外科医にとって大きな関心事である。現行のリンパ節評価は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)染色による組織切片(tissue sections)の顕微鏡検査と免疫組織化学検査(IHC)とを包含し、しかも、3つの大きな制限:(a)細胞の小さいフォーカス(foci)は容易に見落とされること;(b)結果は、速やかには入手することができないこと、これは、前哨リンパ節の処置におけるあらゆる陽性結果は、腋窩リンパ節を除去するための第2の手術を必要とすることを意味する;および、(c)僅かに1つまたは2つの組織切片が調べられること;を受け、したがって、各々のリンパ節の大部分は、検査されないままとなる。シリアルセクションニング(serial sectioning:連続切片化)は、サンプリング誤差を克服するのに役立つことができ、また、免疫組織化学検査は、細胞の小さいフォーカスを同定するのに役立つことができる。しかし、この組合せは、日常分析としては、高コストであり、時間がかかる。

【0007】

領域リンパ節を切開することについての外科的決定は、リンパ節の術中凍結切片分析(intra-operative frozen section analysis)に基づく場合がある。しかし、これらの方法の感度は、比較的乏しく、標準ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)病理学と比べて50~70%の範囲であり、高い率で第2の手術が必要となる。したがって、病理学者らは通常、黒色腫患者に対して、術中凍結切片分析もタッチプリント細胞学的分析(touch print cytology analysis)も実施していない。黒色腫に対する術中アッセイの感度および特異度が改善されれば、腫瘍学に著しい利益をもたらすであろう。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

生体試料における数千もの遺伝子の発現を同時に監視するために、高密度マイクロアレイが用いられてきた。研究の結果、良性病変および悪性病変において特異的に発現する遺伝子だけでなく、予後因子としての価値(prognostic value)があるかもしれない遺伝子も同定された[ルオ(Luo)等(2001)およびワン(Wang)等(2004)]。8,150 cDNAsのためのプローブ(probes)を備えたマイクロアレイ(microarray)を用いて、悪性黒色腫の遺伝子発現プロファイル解析(gene expression profiling)が行われた[ビットナー(Bittner)等(2000)]。これらの研究者は、進行性腫瘍の挙動と関連しているかもしれない幾つかの遺伝子を同定した。最近の研究では、少数種の黒色腫細胞株と正常メラニン形成細胞株との遺伝子発現プロファイルを比較することによって、黒色腫中で変調された(modulated)、特異的に発現する遺伝子と経路(pathways)とを同定することができた[タケウチ(Takeuchi)等(2004)]。

10

【 0 0 0 9 】

〔 発明の概要 〕

臨床的に関連のある広範囲な組織試料に関する遺伝子発現プロファイル解析(gene expression profiling)が、本発明によって提供される。22,000のプローブセットを有するアフィメトリクス(Affymetrix)Hu133Aマイクロアレイによって、45個の初期悪性黒色腫組織、18個の良性皮膚母斑組織、および、7個の正常皮膚組織からの全RNAをハイブリダイズさせた。良性組織と比較し悪性黒色腫に対して特異的に発現した複数の遺伝子を同定した。特異的に発現したそれら遺伝子の経路解析によって、神経組織の成長とアミロイドプロセッシング・シグナリング経路(signaling pathway)の活性化とに関連する遺伝子の過剰表現(over-representation)が明らかとなった。ワンステップの定量的RT-PCRアッセイを用いて、初期悪性黒色腫試料、良性母斑試料、黒色腫リンパ節転移部試料および黒色腫非含有リンパ節試料を含む臨床的に関連のある諸試料のパネルにおいて、2つの黒色腫特異遺伝子(PLABおよびL1CAM)の組合せについて試験した。

20

【 0 0 1 0 】

本発明は、組織試料を得る段階と、分化因子(differentiation factor)の(PLAB, MIC1)(配列ID番号:1)およびL1細胞粘着分子(cell adhesion molecule)の(L1CAM)(配列ID番号:2);または、PLAB、L1CAMおよび神経栄養性チロシンキナーゼ受容体(neurotrophic tyrosine kinase receptor)3型の(NTRK3)(配列ID番号:3)、に対応するmRNAをコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、によって黒色腫を同定する方法であって、所定のカットオフレベル(cut-off levels)を超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す該方法を提供する。本発明は更に、組織試料を得る段階と、プライマー/プローブのセットの配列ID番号:4~6もしくは配列ID番号:7~9、および、配列ID番号:10~12もしくは配列ID番号:13~15;または、配列ID番号:4~6もしくは配列ID番号:7~9、および、配列ID番号:10~12もしくは配列ID番号:13~15、および、配列ID番号:16~18によって認識されるmRNAをコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、によって黒色腫を同定する方法であって、所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す該方法を提供する。

30

40

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、組織試料を得る段階と、PLABおよびL1CAM;または、PLAB、L1CAMおよびNTRK3、をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階とによって、悪性メラニン形成細胞を良性メラニン形成細胞から識別する方法であって、所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す該方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明は更に、組織試料を得る段階と、プライマー/プローブのセットの配列ID番号:4~6もしくは配列ID番号:7~9、および、配列ID番号:10~12もしくは配

50

列 I D 番号： 1 3 ~ 1 5 ; または、配列 I D 番号： 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号： 7 ~ 9、および、配列 I D 番号： 1 0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号： 1 3 ~ 1 5、および、配列 I D 番号： 1 6 ~ 1 8 によって認識される遺伝子の、前記試料中の発現レベルを分析し測定する段階とによって、悪性メラニン形成細胞を良性メラニン形成細胞から識別する方法であって、所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す該方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、患者から組織試料を得る段階と、 P L A B および L 1 C A M ; または、 P L A B、 L 1 C A M および N T R K 3、をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを分析し測定する段階とによって、前記患者を処置するプロトコルを決定する方法であって、所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す該方法を提供する。

10

【 0 0 1 4 】

本発明は更に、患者から組織試料を得る段階と、プライマー/プローブのセットの配列 I D 番号： 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号： 7 ~ 9、および、配列 I D 番号： 1 0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号： 1 3 ~ 1 5 ; または、配列 I D 番号： 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号： 7 ~ 9、および、配列 I D 番号： 1 0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号： 1 3 ~ 1 5、および、配列 I D 番号： 1 6 ~ 1 8 によって認識される遺伝子の、前記試料中の発現レベルを分析し測定する段階とによって、前記患者を処置するプロトコルを決定する方法であって、所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す該方法を提供する。

20

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、追加的なマーカー遺伝子および対照遺伝子であって、それらの発現が特許請求の範囲に記載の諸方法の助けとなる該遺伝子を提供する。これらの追加的遺伝子には、発現上昇する配列 I D 番号： 2 9 ~ 4 6 7、および、発現低下する配列 I D 番号： 4 6 8 ~ 9 7 8 が包含される。

【 0 0 1 6 】

第 1 のマーカーは、 P L A B である場合があり、本明細書では、あらゆる変異株 (variant)、対立遺伝子 (allele)、等をコードする遺伝子として規定され、配列 I D 番号： 1 を包含する。 P L A B はまた、パーラルカー (Paralkar) 等 (1 9 9 8) に記述されており、受入番号 AF003934 によって表わされる。 P L A B はまた、プライマー/プローブセットの配列 I D 番号： 4 ~ 9 によって認識される m R N A をコードする遺伝子として規定される。

30

【 0 0 1 7 】

第 2 のマーカーは、 L 1 C A M である場合があり、本明細書では、あらゆる変異株、対立遺伝子、等をコードする遺伝子として規定され、配列 I D 番号： 2 を包含する。 L 1 C A M はまた、ハスペル (Haspel) 等 (2 0 0 3) および米国特許第 6,107,476 号明細書に記述されており、受入番号 NM_000425 によって表わされる。 L 1 C A M はまた、プライマー/プローブセットの配列 I D 番号： 1 0 ~ 1 5 によって認識される m R N A をコードする遺伝子として規定される。

40

【 0 0 1 8 】

本発明は更に、細胞試料中に黒色腫が存在するか否かを決定するアッセイを行うためのキットにおいて、核酸増幅用および検出用の試薬を備えた、キットを提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、本発明の方法において得られた P C R 生成物の増幅および検出を行うためのプライマー/プローブのセットを提供する。これらのセットには、次のもの：

配列 ID 番号：4 (PLAB フォワードプライマー) ggcagaatctctcgtccgca
 配列 ID 番号：5 (PLAB リバースプライマー) ggacagtgggtccccgttg
 配列 ID 番号：6 (PLAB プローブ) cccagctggagttgcacttgcggcc
 配列 ID 番号：7 (PLAB アップープライマー) gaacaccgacctcgtccc
 配列 ID 番号：8 (PLAB ロウアープライマー) ggcggccccgagagata
 配列 ID 番号：9 (PLAB プローブ) cgccagaagtgcggctgggattt
 配列 ID 番号：10 (L1CAM フォワード) gctgggactgggaacagaact 10
 配列 ID 番号：11 (L1CAM リバース) ggagcagagatggcaaagaaa
 配列 ID 番号：12 (L1CAM プローブ) ttccccaccatctgctgt
 配列 ID 番号：13 (L1CAM アップー) ccacagatgacatcagcctcaa
 配列 ID 番号：14 (L1CAM ロウアー) ggtcacaccagctcttctt
 配列 ID 番号：15 (L1CAM プローブ) tggcaagcccgaagtgcagttcctt
 配列 ID 番号：16 (NTRK3 プライマー) gccccggcacccttta
 配列 ID 番号：17 (NTRK3 プライマー) aacctgccagtgggtgat 20
 配列 ID 番号：18 (NTRK3 プローブ) cagatgggtgtttc
 配列 ID 番号：19 (Ty r アップー) actcagcccagcatcattcttc
 配列 ID 番号：20 (Ty r ロウアー) atggctgtgtactcctccaatc
 配列 ID 番号：21 (Ty r プローブ) ctctcctcttggcagattgtctgtagctt
 配列 ID 番号：22 (PBGD アップー) ccacacacagcctactttccaa
 配列 ID 番号：23 (PBGD ロウアー) taccacgcgaatcactctca
 配列 ID 番号：24 (PBGD プローブ) aacggcaatgctggctgcaacggcggaatt 30

が 包 含 さ れ る

【 0 0 2 0 】

本 発 明 は 更 に、 本 発 明 の 諸 方 法 に お い て 利 用 さ れ る P C R 法 に よ っ て 得 ら れ る ア ン プ リ コ ン (amplicon) を 提 供 す る。 こ れ ら の ア ン プ リ コ ン に は、 次 の も の：

配列 ID 番号：25 (PLAB アンプリコン)
 gaacaccgacctcgtccccggcccctgcagtccggatactcacgccagaagtgcggctgggatccggcggccacctgca
 cctgcgtatctctcgggccgcc
 配列 ID 番号：26 (L1CAM アンプリコン) 40
 ccacagatgacatcagcctcaagtgtgaggccagtggcaagcccgaagtgcagttccgctggacgagggatgggttcca
 cttcaaaccgaaggaagagctgggtgtgacc
 配列 ID 番号：27 (チロシナーゼ・アンプリコン)
 actcagcccagcatcattctcctcttggcagattgtctgtagccgattggaggagtacaacagccat
 配列 ID 番号：28 (PBGD アンプリコン)
 ccacacacagcctactttccaagcggagccatgtctggtaacggcaatgctggctgcaacggcggaagaaaacagcccaa
 agatgagagtgattcgcgtgggta

が 包 含 さ れ る

50

【 0 0 2 1 】

本明細書に記述される他の遺伝子には、発現上昇するマーカー（配列ID番号：29～467）、発現低下するマーカー（配列ID番号：468～978）、MART1（配列ID番号：980）、ME20M（GP100；配列ID番号：981）およびMAGE-3（配列ID番号：982）、ならびに、それらの発現を検出するのに使用される様々なプライマーおよびプローブ（配列ID番号：983～1011）が包含される。

【 0 0 2 2 】

〔詳細な記述〕

本発明は、黒色腫を定性的かつ定量的に同定する方法と、悪性黒色腫を良性黒色腫から識別する方法と、不確定な病理学的特徴を有する色素細胞性病変(melanocytic lesions)を診断する方法と、黒色腫患者を処置するプロトコルを決定する方法とを提供する。これらの方法は更に、患者の予後と、患者の監視と、薬剤の開発とを行う場合の手助けとなる。これらの方法は、本明細書で提供されるmRNAsをコードする様々なマーカー遺伝子の発現レベルを分析し測定する段階であって、所定のカットオフレベルを超える遺伝子発現は、分析された試料の中に悪性メラニン形成細胞が存在することを示す該段階に基づく。

10

【 0 0 2 3 】

皮膚の黒色腫は、発生率が増大している一般的な進行性ガンである。黒色腫特異の統制解除遺伝子(deregulated genes)を同定することによって、リンパ節(LN)の病期診断アッセイ(staging assays)を行うための分子マーカー(molecular markers)と、更には、黒色腫の腫瘍形成(tumorigenesis)に関する洞察性とを提供することができるであろう。45個の初期の黒色腫の試料と、18個の良性皮膚母斑の試料と、7個の正常皮膚組織の試料とから分離した全てのRNAを、2,2000のプローブセットを有するアフィメトリクス(Affymetrix)U133Aマイクロアレイで解析した。階層的クラスタリング(Hierarchical clustering)によって、良性母斑試料および正常皮膚試料から黒色腫試料を明確に分離し得ることが明らかとなった。悪性黒色腫に関連する新規な遺伝子を同定した。初期悪性黒色腫の試料、良性母斑の試料、および、正常皮膚の試料と、更には、悪性黒色腫のリンパ節転移部、および、黒色腫非含有リンパ節とに関するワンステップ定量(one-step quantitative)RT-PCRアッセイによって、2種類の黒色腫特異遺伝子、PLABおよびL1CAM、の特異的遺伝子発現(differential gene expression)について試験を行った。それらのマーカーの性能を、従来の黒色腫マーカー（例えば、チロシナーゼ(tyrosinase)、gp100およびMART1）と比較した。それらの結果によって、RT-PCRアッセイにおいてPLABおよびL1CAMの組合せを用いて、良性メラニン形成細胞または悪性メラニン形成細胞を含有する、臨床的に関連のある複数の試料を識別することができることが例証された。

20

30

【 0 0 2 4 】

高密度cDNAおよびオリゴヌクレオチドのマイクロアレイ(microarrays)によって、数千個の遺伝子の発現を同時に監視することができる。マイクロアレイ技術は、mRNAの存在量の定量的測定を提供し、しかも、遺伝子発現に基づきマーカーを発見するための道具(tool)として容認された。ガン研究の関連では、マイクロアレイ解析によって、良性病変および悪性病変、様々な種類のガンにおいて特異的に発現する遺伝子、または、予後因子として意義(prognostic significance)を有する遺伝子が同定された[ルオ(Luo)等(2001)、スー(Su)等(2001)、ヘンシャル(Henshall)等(2003)およびワン(Wang)等(2004)]。悪性黒色腫に関する最初の遺伝子発現プロファイル解析では、8,150個のcDNAのためのプローブを有するマイクロアレイが使用され、進行性腫瘍の挙動に関連するかもしれない遺伝子が同定された[ビットナー(Bittner)等(2000)]。彼らの研究で分析された試料には、正常または良性のメラニン形成細胞を含有する組織が含まれていなかったため、悪性黒色腫に特異的に発現した遺伝子は同定されなかった。良性母斑中のメラニン形成細胞含有量は、正常皮膚とは著しく違って、黒色腫中のメラニン形成細胞含有量に近い。

40

50

【 0 0 2 5 】

もう1つの研究では、黒色腫または良性母斑から得られた2つのプール試料(pooled samples)はcDNAアレイに対して雑種形成が行われ、黒色腫由来試料または母斑由来試料に選択的に発現した遺伝子が見出だされた[セイコラ(Seykora)等(2003)]。他の研究者らは、黒色腫の遺伝子発現を監視するために、黒色腫細胞株に基づいて作り出されたSAGE(連続遺伝子発現解析)ライブラリーの解析またはハイブリッドサブトラクション(subtractive hybridization: 差引きハイブリッド形成法)を使用した[ヒップフェル(Hipfel)等(2000)およびウィーララトナ(Weeraratna)(2004)]。最近、少数種の黒色腫細胞株とメラニン形成細胞株との遺伝子発現プロフィールを比較することによって、黒色腫中で変調された(modulated)、特異的に発現する遺伝子と経路(pathways)とが同定された[フック(Hoek)等(2004)]。これらの研究によって、黒色腫の遺伝的特徴のための堅実な基礎は提供されるが、黒色腫を良性組織から明瞭に識別することのできるマーカーは全く存在しない。現在使用されている幾種類かのマーカー(例えば、チロシナーゼおよびMart-1)は、良性組織と悪性組織とを識別することができない[タケウチ等(2004)]。結果的に、これらのマーカーは、使用法が、疾患の、リンパ節に基づく術中病期診断のような用途に限定されてきた。

10

【 0 0 2 6 】

悪性黒色腫および良性色素細胞性病変から十分なRNA試料を入手することが困難であること、組織が不均質であること、ならびに、精製RNA中にメラニン(melanin)が存在することは、これらの研究において依然として主要問題のままである。本明細書に開示される研究では、45個の初期悪性黒色腫と18個の良性皮膚母斑と7個の正常皮膚組織とから分離した全てのRNAを、2,2000のプローブセットを有するアフィメトリクス(Affymetrix)Hu133Aマイクロアレイで雑種形成を行った。修飾RNAの抽出法は、マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションのシグナル(microarray hybridization signals)を増大させる、メラニン非含有RNA試料を生成するために開発された。階層的クラスタリング(Hierarchical clustering)によって、良性母斑試料および正常皮膚試料から黒色腫試料を明確に分離し得ることが明らかとなった。マイクロアレイの有意差分析(Significance Analysis of Microarray)(SAM)法、t-検定、および、百分位数分析(percentile analysis)によって、黒色腫試料中の439種の発現上昇した遺伝子(配列ID番号: 29~467)と、511種の発現低下した遺伝子(配列ID番号: 468~978)とを同定した。更に、十分に特性化された遺伝子[例えば、me20m(gp100)、メラノコチン受容体1およびL1CAM]と、NTKR3およびPLABを包含する、以前は黒色腫と関係のなかった新規な多くの遺伝子とを同定した。特異的に発現する遺伝子の経路解析(pathway analysis)によって、神経組織の成長および機能、アミロイドプロセッシング(amyloid processing)、ならびに、インテグリンシグナリング(integrin signaling)の経路に関連する遺伝子の過剰表現(over-representation)が明らかになった。それらの選定された遺伝子の特異的発現を確認するために、RT-PCRアッセイを行った。

20

30

【 0 0 2 7 】

提供される方法は、黒色腫の転移を検出するのに十分な特異度と感度とを有する。利用可能な現行方法と比べると、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)および免疫組織化学(IHC)の伝統的方法は、臨床的に受け入れられることが示されるものの、PCR法は、本発明より前には受け入れられなかった。表1は、特許請求の範囲で請求される本発明より前の現行方法の欠点と利点とを示す。

40

【 0 0 2 8 】

【表 1】

方法	感度	特異性
H&E	低い	100%
IHC	低い	100%
PCR	高い	低い

本発明において、特異性は、H & E および IHC の陰性リンパ節との比較に基づき、好ましくは少なくとも 95% であり、更に好ましくは特異性は少なくとも 97% であり、最も好ましくは特異性は少なくとも 99% である。感度は、H & E および IHC の陽性リンパ節との比較に基づき、好ましくは少なくとも 80% であり、更に好ましくは感度は少なくとも 85% であり、最も好ましくは感度は少なくとも 90% である。特異度および感度は好ましくは、それぞれ、H & E および IHC の陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも 97% であり、H & E および IHC の陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも 85% である。

10

【0029】

所定のカットオフレベルは好ましくは、転移性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細胞または正常組織に比べて、少なくとも 2 倍の過剰発現である。

【0030】

本発明の好ましい方法は、組織試料から核酸を抽出するための迅速な技術と、転移 (metastasis) を示す核酸断片を増幅し検出する方法とを用いる。核酸断片は、マーカー遺伝子によってコードされた mRNA を、定性的かつ定量的に測定する。組織試料には、領域リンパ節と前哨リンパ節との両方、皮膚病巣、および、他の生体組織検査材料が包含される。

20

【0031】

本明細書で提供される方法によって、微小転移巣の術中検出が可能となり、医師は、更なるリンパ節を切除すべきか否か、また、適切な処置のプロトコルを直ちに実施すべきか否かを決定することが可能となる。表 2 に示されるように、リンパ節 (LN) が黒色腫について陽性であることが分かれば、領域リンパ節は切除され、次いで、インターフェロン治療を提案することができるであろう。標準的な生体組織検査法は、1 週間以上かかる場合があり、陽性結果であれば、領域リンパ節を除去するための追加の手術が必要であり、随伴的にインターフェロン治療が遅れる。

30

【0032】

【表 2】

臨床病期	1° 腫瘍 (T)	リンパ節	転移部	処置
病期 I	T1: ≤ 1 mm	陰性	非存在	切除 1 cm
	T2: 1.01-2.00 mm	陰性	非存在	切除 1-2 cm
病期 II	T3: 2.01-4.00 mm	陰性	非存在	切除 2 cm
	T4: > 4.01 mm	陰性	非存在	切除 2 cm
病期 III	あらゆる厚さ	陰性	非存在	切除+リンパ節の完全切開+インターフェロンの臨床試行
病期 IV	あらゆる厚さ	陰性	存在	インターフェロンの臨床試行、対症療法

40

前記アッセイを行うために用いられる組織を十分にサンプリングすることが重要である。サンプリングには、組織試料の適切な切除および処理だけでなく、RNA の抽出も含まれる。組織試料が一旦入手されたら、存在するあらゆるガン細胞が検出されるように、該組織試料を適切に処理することが重要である。

50

【 0 0 3 3 】

本発明の最も好ましい具体例において、リンパ節のサンプリングはまた、手術中でも、手術中以外においても注意が払われる。リンパ節におけるガン細胞の分布は均一ではないので、該リンパ節の複数の切片をサンプリングすることが好ましい。全ての前哨リンパ節 (S L N) は、病理学的評価を行うために提出することが望ましい。前哨リンパ節材料は通常、ホルマリンで固定して、ホルマリン固定のパラフィン埋め込み (paraffin embedded) 組織試料として試験する。前哨リンパ節の、同等に代表される部分は、分子解析 (新鮮な組織) および組織学 (固定された組織) のために処理する。一般的なリンパ節サンプリング手順は、コクラン (Cochran) 等 (2 0 0 1) およびコクラン等 (2 0 0 4) に記述されている。病理学による同一リンパ節試料の試験と分子ベースの試験との両方を達成するための1つの方法は、最長の直径でリンパ節を二分することである。次いで、各々の半分は、少なくとも4個のフルフェイス切片 (full-faced sections) に分割し、少なくとも1個の外側切片と内側切片とは固定材料として病理学試験に用い、また、少なくとも1個の外側切片と内側切片とは分子試験に用いる。リンパ節および他の組織における転移部および微小転移巣の分布は均一ではないので、転移部が見逃されないように、十分大きい試料を入手することが望ましい。本方法におけるこのサンプリング組織への1つのアプローチは、大きい組織試料を均質化し、その後、後続の分子試験で用いるために十分に混合された均質化試料を希釈することである。

10

【 0 0 3 4 】

リンパ節組織の試料の場合、細胞の破碎を行なう前、全ての脂肪組織を除去することが好ましい。手動による、細胞および組織の破碎は、当該技術分野で知られているいかなる手段 [例えば、米国特許第4,715,545号明細書に記述されている使い捨て組織粉碎器、または、使い捨てプローブを備えたオムニ (Omni) G L H 1 1 5 (バージニア州ウォレントン (Warrenton)、オムニ・インターナショナル社 (Omni International)) のような市販のホモジナイザー (homogenizer)] によっても行うことができる。均質化時間は、1 ~ 2分以内であり、より好ましくは30 ~ 45秒である。次いで、試料は、マーカの発現レベルを分析して測定する前、RNAを精製するために処理することができる。適切なRNA精製方法は、カラム [例えば、カリフォルニア州バレンシア (Valencia)、キアゲン社 (QIAGEN Inc.)、アールニアシー・ミニ・カラム (Rneasy mini column)、キア・シュレッダー (QI A shredder)、または、適切な代用品] を含む。

20

30

【 0 0 3 5 】

組織試料から核酸を抽出するためには、様々な技術を利用することができる。典型的な市販の核酸抽出用キットは、核酸を抽出するのに少なくとも15分かかる。本発明の好ましい術中方法において、核酸は、8分未満、好ましくは6分未満で抽出される。

【 0 0 3 6 】

無傷のRNAを成功裏に分離する方法は、4つの段階：細胞または組織を効果的に破碎する段階、核タンパク質複合体を変性する段階、内因性リボヌクラーゼ (endogenous ribonuclease) (R N a s e) を不活性化する段階、および、汚染しているDNAとタンパク質とを除去する段階を含む。細胞抽出物中に存在するリボヌクラーゼを不活性化する -メルカプトエタノール (- m e) とイソチオシアン酸グアニジニウム (guanidinium isothiocyanate) (G I T C) との破碎特性および保護特性によって、それらの物質は第1の段階のための好ましい試薬となる。それらの試薬をドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 等の界面活性剤と合わせて使用した場合、核タンパク質複合体の破碎が達成され、それによって、該RNAが溶液中に放出され、タンパク質から分離されることが可能となる。組織は、GITC含有リシスバッファー (lysis buffer) 中で均質化され、エタノールを添加することによって、RNAがシリカ膜に結合する適切な状態が創り出される。遠心分離によって、沈降したタンパク質と細胞のDNAとの溶解物を清澄化することができ、または、該遠心分離は、カラムによって実施することが好ましい。RNAの精製は、シリカまたは他の物質を含有するスピncラム (spin column) で行うことが好ましい。

40

【 0 0 3 7 】

50

R N A は、上述のスピンカラムによって沈降し、また、遠心分離時間は、30秒以下であることが好ましい。試料は典型的には、等量の70%エタノールで希釈し、次いで、該カラムに注ぐ前、完全に混合する。該カラムは、洗浄した後、遠心分離で乾燥させ、次いで、R N A は、リボヌクレアーゼ (R N a s e) 非含有水の中に溶出させて、遠心分離によって回収する。この迅速なプロトコルの全時間は、8分未満であり、好ましくは6分未満である。

【0038】

要約すれば、前記の迅速なR N A 抽出法は、次の諸段階：

組織試料を得る段階と、

前記組織を均質化して、ホモジネートを生成する段階と、

R N A 結合性物質を含有する基質(substrate)、または、R N A 結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、

R N A を、前記R N A 結合性物質に結合させる段階と、

あらゆる汚染物質、干渉物質および非結合R N A を除去するのに十分な条件の下、前記前記基質を洗浄する段階と、

前記基質から結合R N A を溶出する段階と、

を含む。

【0039】

この迅速な抽出法に関連する試薬は、製造業者によって提供される試薬である場合があり、例えば、

リシス/結合性バッファー(Lysis/Binding buffer) (好ましくは、4.5 M イソチオシアン酸グアニジニウム (G I T C)、100 mM NaPO_4)、

ウォッシュバッファー(Wash buffer) I (好ましくは、5 M G I T C に入っている37%エタノール、20 mM トリス - H C l)、

ウォッシュバッファーII (好ましくは、20 mM NaCl に入っている80%エタノール、20 mM トリス - H C l)、および

溶出用の、ヌクレアーゼ(nuclease)非含有の無菌2回蒸留水(sterile double distilled water)、

である場合がある。

【0040】

1つの方法において、上述の、核酸を分離するための過程を行う前、組織試料は、秤量して、8 ml または 14 ml のポリプロピレン培養試験管の中に入れ、次いで、ドライアイスで予備冷却する。次いで、凍結した組織試料は、解凍しないで約50 mg 以下の複数の断片に分割する。バッファーは全て、アールニアシー・ミニ・キット(Rneasy mini kit)において、キアゲン社(QIAGEN)によって提供されるものである。表3に基づき、多量のホモゲナイゼーション(homogenization: 均質化) (リシス) バッファーを、該組織に添加する。

【0041】

10

20

30

【表 3】

組織の重量 (mg)	ホモゲナイゼーションバッファー(ml)
≤100	2
100-149	2
150-199	3
200-249	4
250-299	5
300-349	6
350-399	7
400-449	8
450-499	9
500-550	10
>550	*

10

* 550 mg を超える組織を、複数の等量部分に分割して、個々の試料として処理する。100 mg を超える組織のためのリシスバッファー (lysis buffer) の容量を計算するための別法は、組織 50 mg 当り 1 ml を添加し、100 mg 未満の組織には 2 ml を使用することである。

【0042】

前記組織試料は、次いで、例えば、グレード 6 にパワー設定されたオムニ (Omni) GLH 115、アダプター (Adaptor) A100、および、使い捨てプローブによって均質化する。ホモジネートは、次いで、等量の 70% エタノールと混合し、次いで、例えば、スピード 10 (最大)、約 10 秒に設定された VWR モデル G560 で渦巻きを起こすことによるか、または、ピペットで 4 ~ 5 回移すことによって、完全に混合する。ホモジネート / エタノールの混合物は、次いで、表 4 に基づく容量で、真空マニホールド (vacuum manifold) に搭載された Rneasy ミニカラム (mini column) に注がれる。その結果、安定した量 (約 5 mg / カラム) の元の組織が負荷され、このようにして、各々の組織試料について同等の RNA 収率が得られる。

20

【0043】

【表 4】

30

組織の重量 (mg)	(推奨される) ホモジネート / エタノール混合物の容積 (μl)
30-39	700
40-49	500
50-59	400
60-69	350
70-79	300
80-89	250
90-99	225
> 100	200

40

次いで、前記カラムを真空にして、前記液体を除去する。真空を停止して、700 ml で 2 回洗浄を行う。最初は RWI バッファーを用い、2 回目は RPE バッファーを用い、それぞれ、濾過によって除去する。真空は、各々の場合、800 ~ 1200 ミリバールである。該カラムは、次いで、1.5 ml の回収チューブ (collection tube) の中に入れ、次いで、エッペンドルフ型 (Eppendorf) 5415 D 遠心分離機を用い 13,200 rpm で 30 秒間遠心分離を行って乾燥させる。該カラムは、新たな 1.5 ml 回収チューブに移す。その膜に、50 μl のリボヌクレアーゼ (RNase) 非含有水を直接添加し、次いで、該カラムは、エッペンドルフ型 5415 D 遠心分離機を用い 13,200 rpm で 3

50

0 秒間遠心分離を行って、RNAを溶出させる。該RNAの品質は、アギレント・バイオアナライザー(Agilent Bioanalyzer)で決定し、また、該RNAは、-70 で保管する。

【0044】

メラニンは、逆転写反応および増幅反応の効率に負の影響を与えることがある。したがって、試料が、かなりの量のメラニンを含有している疑いを受けている場合(例えば、初期の黒色腫または良性の皮膚母斑の試料の場合)、メラニンを除去する過程を試み、また、前哨リンパ節のアッセイを行う場合はメラニン形成細胞の含有量が低いので、それほど問題ではない。必要に応じて、メラニンを除去して、逆転写および/または核酸の増幅を高める。

10

【0045】

メラニンは典型的には、上述の濾過段階の間に除去される。高濃度のメラニンを含有する組織の場合、より少ない組織[キアゲン社のアールニアシー・ミニ・カラム(Rneasy mini column)1個当たり約5mg]を使用することが望ましい。

【0046】

試料中に残留メラニンが生じる結果となるもう1つの方法を使用する場合、除去段階には、ポリマービード系(polymer beads system)[例えば、バイオゲル(Bio-Gel)P-60(カリフォルニア州ハーキュリーズ(Hercules)、バイオ・ラッドラボトリーズ(Bio-Rad Laboratories)]を利用するマトリックスを使用することが含まれる。そのような方法は、サチアム・アシー(Satyamoorthy)等(2002)によって記述されている。この方法は本質的に、10mM酢酸ナトリウム(pH4.2)に入れたバイオゲル(Bio-Gel)材料の50%(w/v)混合物を調製する段階を含む。該混合物の約300μLをマイクロ遠心分離チューブに入れて、1000rpmで1分間遠心分離を行う。上澄み液は捨てて、該ビードは、ミニ・カラムまたは類似の容器に入れる。次いで、(先ず、それらを該容器中で低温放置した後)該ビードを含有する該容器にホモジネートを通させる。上澄み液を回収する。十分なアッセイ容量のために必要ならば、10mM酢酸ナトリウムの追加の100μLアリコートで該ビードを更に洗浄する段階を使用して、メラニン非含有試料の追加容量を得ることができる。黒いメラニンは、該容器に保持されている該ビードの上に明確に現われるであろう。メラニン色素を除去するためには、ワン(Wang)等(2001)が記述するように、シリカベースフィルターをも使用することができる。

20

30

【0047】

本発明の術中方法の重要な面は、迅速なマーカー検出である。そのような方法が術中アッセイのために容認される時間内(即ち、約35分以下)で行うことができるという条件で、高感度で信頼できる特異的ないかなる方法をも使用することができる。

【0048】

mRNAレベルを測定して遺伝子発現を決定する場合、アッセイは、当該技術分野で知られているいかなる手段によっても行うことができ、また、アッセイには、PCR法、ローリングサークル増幅(Rolling Circle Amplification)(PCA)法、リガーゼ連鎖反応(Ligase Chain Reaction)(LCR)法、ストランド・ディスプレイメント増幅(Strand Displacement Amplification)(SDA)法、核酸配列ベース増幅(Nucleic Acid Sequence Amplification)(NASBA)法およびその他の方法のような方法が包含される。包含される迅速な分子診断法は最も好ましくは、定量的なPCR法であり、QRT-PCR法が包含される。検出段階は、当該技術分野で知られているいかなる手段によっても行うことができ、マイクロアレイ法、遺伝子チップ法および蛍光法を包含する。

40

【0049】

典型的なPCRには、標的核酸種を選択的に増幅する複数の増幅段階またはサイクルが含まれる。典型的なPCRには、3つの段階:標的核酸が変性される変性段階と、一連のPCRプライマー(フォワード型(forward)プライマーおよびバックワード型(backward)プライマー)がDNAストランドヘアニールするアニーリング段階と、耐熱性DNAがプライマーを延伸する延伸段階とが含まれる。この段階を複数回繰り返すことによって、D

50

N A断片は増幅されて、標的DNA配列に対応するアンプリコン(amplicon)が生じる。典型的なPCRには、変性段階、20サイクル以上のアニーリング段階および延伸段階が含まれる。アニーリング段階および延伸段階はしばしば、同時に実施されることがあり、その場合のサイクルは、2つの段階のみを含む。

【0050】

本発明の好ましい方法において、RT-PCR増幅反応は、RT-PCRを利用しながら、術中診断を行うのに適した時に行い、これらの段階の各々の長さは、数分の範囲ではなく数秒の範囲である場合がある。具体的には、少なくとも約5 /秒のサーマルランプ速度(thermal ramp rate)を生じさせることのできる幾つかの新しいサーマルサイクラー(thermal cyclers)で、30分以下のRT-PCR増幅が使用される。増幅は、25分未満で行うことがより好ましい。このことを考慮して、PCRサイクルの各々の段階のために与えられる後続のタイムは、ランプタイム(ramp times)を含まない。変性段階は、10秒以下の間行うことができる。実際、幾つかのサーマルサイクラーは、変性段階の最適所要時間となり得る「0秒」間のセッティング(settings)を有する。即ち、サーマルサイクラーは、十分に変性温度を達成させる。アニーリング段階および延伸段階は、それぞれ10秒未満であることが最も好ましく、また、アニーリング/延伸段階の組合せは、同一温度で行われる場合、10秒未満となることがある。幾つかの均質なプローブ検出方法は、迅速なアッセイ性能を最大にするために、延伸を行うための別個の段階を必要とすることがある。非特異的な副反応の形成と全増幅時間との両方を最小限に抑えるために、アニーリング温度は典型的には、50より高い。アニーリング温度は、55より高いことがより好ましい。

10

20

【0051】

実験者の介入がない、RT-PCRの単一複合反応(single combined reaction)は、幾つかの理由、即ち、(1)実験者が誤る危険性が減少すること、(2)標的または生成物が汚染する危険性が減少すること、および、(3)アッセイ速度が増大すること、により望ましい。該反応は、1種類または2種類のポリメラーゼから成ることがある。2種類のポリメラーゼの場合、これらの酵素の一方は典型的には、RNAベースのDNAポリメラーゼ(逆転写酵素(reverse transcriptase))であり、また、他方は、耐熱性のDNAベースのDNAポリメラーゼである。アッセイ性能を最大にするためには、これらの酵素機能の両方のための「ホットスタート(hot start)」技術の形態を利用することが好ましい。米国特許第5,411,876号および同第5,985,619号明細書は、様々な「ホットスタート」アプローチの例を提供する。好ましい方法には、効果的なDNA重合のために必要な諸成分の1種以上を封鎖する1種以上の熱活性化法(thermoactivation methods)を使用する段階が包含される。米国特許第5,550,044号および同第5,413,924号明細書には、そのような方法において使用するための試薬を調製するための方法が記述されている。米国特許第6,403,341号明細書には、PCR試薬の諸成分の1つの化学的変性(chemical alteration)を含む封鎖アプローチが記述されている。最も好ましい具体例において、RNA依存性ポリメラーゼの活性とDNA依存性ポリメラーゼの活性との両方は、単一酵素中に存在する。効率的な増幅を行うために必要とされる他の成分には、ヌクレオシドトリホスフェート(nucleoside triphosphates)、二価塩、および、バッファー成分が包含される。ある場合に、非特異性核酸および酵素安定剤は有効である。

30

40

【0052】

好ましいRT-PCRにおいて、幾つかのサーマルサイクラーのより速いランプタイムを利用するために、PCR成分および幾種類かの逆転写酵素の量は変則的である。具体的には、プライマーの濃度は非常に高い。

【0053】

逆転写酵素反応のための、典型的な遺伝子特異性プライマーの濃度は、約20nM未満である。迅速な逆転写酵素反応を約1~2分程度で達成するために、該逆転写酵素のプライマー濃度は、20nMを超えるまで、好ましくは少なくとも約50nMまで、典型的には約100nMまで上昇させる。標準的なPCRのプライマー濃度は、100nM~30

50

0 n M の範囲である。T m の変動を補正するために、より高い濃度を標準的な P C R で使用することができる。しかし、ここにおける目的のための前記プライマー濃度は、T m の補正が全く必要でない状況のためのものである。T m の補正が必要であるか、または望ましい場合、比例的にいったん高いプライマー濃度を経験的に決定し使用することができる。迅速な P C R を達成するために、P C R のプライマー濃度は典型的には、250 n M より高く、好ましくは約300 n M より高く、典型的には約500 n M である。

【0054】

商業的に使用される診断装置もまた、陰性の結果の場合の特定の増幅反応の作動を確認する、1つ以上の、内部のポジティブコントロール(internal positive control)を利用することが好ましい。R T - P C R において確認されなければならない偽陰性結果の潜在的原因には、不十分な R N A 量、R N A の分解、R T および / または P C R の抑制、ならびに、実験者の誤りが包含される。

10

【0055】

タンパク質レベルを測定して遺伝子発現を決定する場合、十分な特異度と感度とが得られるという条件で、当該技術分野で知られているいかなる方法も適切である。例えば、タンパク質レベルは、該タンパク質に特異な抗体または抗体断片に結合させ、次いで、抗体結合タンパク質の量を測定することによって測定することができる。抗体は、検出を容易にするための、放射性試薬、蛍光試薬または他の検出可能試薬によって標識化することができる。検出方法は、酵素結合免疫吸着測定法(enzyme-linked immunosorbent assay) (E L I S A) および免疫ブロット(immunoblot)技術を包含するが、それらに限定されない。

20

【0056】

本発明は、組織試料中の悪性メラニン形成細胞を同定するのに十分な特異度と感度とを提供する。その方法は、マーカーによってコードされた m R N A を測定することによって、とりわけマーカー遺伝子の発現を決定する。本発明の好ましいマーカーは、悪性メラニン形成細胞を有する組織では、良性メラニン形成細胞または正常組織と比べて、少なくとも2倍の過剰発現を示す。本明細書に開示される結果によると、第1のマーカーは臨床的に関連のある情報を提供するには不十分であるものの、1種以上の第2のマーカーと組み合わせたときに得られる情報は、臨床医が現在信頼している、ヘマトキシリン・エオジン染色(H & E) および免疫組織化学(I H C)の「ゴールド基準(gold standard: 最も基準になる検査)」に匹敵するということが分かる。第3のマーカーおよび対照遺伝子(control genes)は、第1のマーカーおよび第2のマーカーを補強して、特異性および / または感度を更に増大させることができる。

30

【0057】

次の諸実施例に記述されるように、それらのマーカーは、図1に示されるプロトコルによって同定した。このように、本発明は、図1のプロトコルと、本明細書に開示される諸実施例とに従うことによって、黒色腫特異のマーカーを同定するための方法を提供する。

【0058】

第1のマーカーは、P L A B である場合があり、本明細書では、配列 I D 番号: 1 を包含する、いずれかの変異株(variant)、対立遺伝子、等をコードする遺伝子として規定される。P L A B はまた、パラルカー(Paralkar)等(1998)によって記述されており、また、受入番号AF003934で表わされる。P L A B は、前立腺ガン[リユー(Liu)等(2003)、カラン(Karan)等(2003)およびナカムラ(Nakamura)等(2003); 米国特許第5,994,102号、同第6,107,476号、同第6,465,181号、同第6,500,638号、同第6,521,227号明細書; 米国特許公開第2002/0048784号、同第2003/0013097号および同第2003/0059431号明細書]ならびに結腸直腸ガン[ブラウン(Brown)等(2003)、バックホールツ(Buckhaults)等(2001)および米国特許公開第2002/0160382号]の病因論と関係がある。

40

【0059】

第2のマーカーは、L 1 C A M であり、本明細書では、配列 I D 番号: 2 を包含する、

50

いずれかの変異株 (variant)、対立遺伝子、等をコードする遺伝子として規定される。L1CAMはまた、ハスペル (Haspel) 等 (2003)、ならびに、米国特許第5,872,225号および同第5,969,124号明細書に記述されており、また、受入番号NM_000425で表わされる。

【0060】

本発明は、幾つかの機能的カテゴリー (functional categories) に分類される第3のマーカ-を更に規定する。このように、これらの機能的カテゴリーの中に見出だされる追加的なマーカ-を使用することができる。実施例においていっそう詳細に記述されるように、黒色腫特異の発現上昇した (up-regulated) 遺伝子は、神経組織の成長と細胞周期制御 (cell cycle control) との機能的カテゴリーに分類され、また、黒色腫特異の発現低下した (down-regulated) 遺伝子は、組織の成長と細胞分化との機能的カテゴリーに分類される。

10

【0061】

第3のマーカ-には、配列ID番号：3, 29~978および999が包含される。表5に多数の第3のマーカ-を記述し、また、表15に全てをまとめる。

【0062】

NTRK3は、シュトラウスベルク (Strausberg) 等 (2002)、マーケッティ (Marchetti) 等 (2003)、ヒサオカ (Hisaoka) 等 (2002)、マグレガー (McGregor) 等 (1999)、ライデン (Ryden) 等 (1996) ; 米国特許第5,348,856号、同第5,844,092号、同第5,910,574号明細書 ; ならびに、米国特許公開第2002/0155480号および同第2003/014283号明細書に記述されており、受入番号BC013693またはS76476.1によって表わされる。NTRK3は、プライマー/プローブのセットの配列ID番号：16~18によって認識されるmRNAをコードする遺伝子としても規定される。

20

【0063】

チロシナーゼ (tyrosinase) は、マンデルコーン - モンソン (Mandelcorn-Monson) 等 (2003) および米国特許第6,153,388号明細書によって記述されており、受入番号 (Accession No.) NM_000372で表わされる。チロシナーゼはまた、プライマー/プローブのセットの配列ID番号：19~21で認識されるmRNAをコードする遺伝子として規定される。

【0064】

【表 5 - 1】

遺伝子	参考文献	受入番号
PBGD	ライチ (Raich) 等 (1986)	NM 000190
CITED1	フェナー (Fenner) 等 (1998)	NM 004143
PEX6	ラーズ-ロスチャイルド (Raas-Rothschild) 等 (2002)	NM 000287
CAPG	ファン・インペ (Van Impe) 等 (2003)	NM 001747
DUSP4	スミス (Smith) 等 (1997)	NM 001394
GDF1	デュシー (Ducy) 等 (2000)	NM 001492
E2-EpF	リュウ (Liu) 等 (1992)	NM 014501
me20m	マレッシュ (Maresh) 等 (1994)	U01874
CDH3	パテル (Patel) 等 (2003)	NM 001793
SMARCD3	リング (Ring) 等 (1998)	NM 003078
PKM2	ラフトナー (Luftner) 等 (2003)	NM 002654
GPI	ツツミ (Tsutsumi) 等 (2003)	NM 000175
Pig10	ポリャク (Polyak) 等 (1997)	AF010413
CPEB1	ウェルク (Welk) 等 (2001)	NM 030594
HOXHB9	カタラ (Catala) 等 (2002)	AI738662
トランケイト (truncated) カルシウム結合タンパク質	ワシントン大学-メルク EST プロジェクト ・ヒリアー (The Washington University- Merck EST Project Hillier) 等 (1995)	N30649
SAAS	キクチ (Kikuchi) 等 (2003)	NM 013271
HS1-2	エドガー (Edgar) 等 (2002)	NM 007011
HCN2	スティーパー (Stieber) 等 (2003)	NM 001194
MBP	カムホルツ (Kamholz) 等 (1996)	M13577
AD3LPAD5	リー (Li) 等 (1995)	U34349
PLOD3	ワン (Wang) 等 (2002)	NM 001084
MC1R	サラザール (Salazar) 等 (2002)	
MIF	シミズ (Shimizu) 等 (1999)	NM 002415
HOXB7	ケア (Care) 等 (1996)	NM 004502
AIM1	レイ (Ray) 等 (1997)	XM 166300
EpHB6	ハフナー (Hafner) 等 (2003)	NM 004445
AKT1	マジュムダール (Majumder) 等 (2004)	NM 005163
AKT2	ゴスマノフ (Gosmanov) 等 (2004)	NM 001626
AKT3	スー (Xu) 等 (2003)	NM 005465
APH-1A	スー (Xu) 等 (2003)	NM 016022
APP	マスターズ (Masters) 等 (1985)	NM 201414
BACE	パストリノ (Pastorino) 等 (2004)	NM 138973
BACE2	パストリノ (Pastorino) 等 (2004)	NM 012104
CAPN1	アルツナウアー (Alznauer) 等 (2004)	NM 005186
CAPN2	アレクサ (Alexa) 等 (2004)	NM 001748

10

20

30

40

【表 5 - 2】

CDK5	チャ(Qi)等(2004)	NM 004935
CDK5R1	カン(Kam)等(2004)	NM 003885
CSNK1A1	ブルジオ(Burzio)等(2002)	NM 001892
CSNK1D	リー(Li)等(2004)	NM 139062
CSNK1E	スウィアテク(Swiatek)等(2004)	NM 152221
CSNK2A1	ヒルガード(Hilgard)等(2004)	NM 001895
CSNK2A2	セーベニ(Szebeni)等(2003)	NM 001896
CSN2K2B	リー(Lee)等(2004)	NM 001320
GSK3B	チェン(Chen)等(2003)	NM 182946
MAPK1	ニシハラ(Nishihara)等(2004)	NM 138957
MAPK14	ベンドッチ(Bendotti)等(2004)	NM 139014
MAPK3	ニシハラ等(2004)	NM 002746
MAPT	ユウ(Yu)等(2004)	NM 016841
NCSTN	シロタニ(Shirovani)等(2004)	NM 015331
PEN2	マーロウ(Marlow)等(2003)	NM 172341
PRKACA	サクウィ(Sakwe)等(2004)	NM 207518
PRKACB	ドウウィベディ(Dwivedi)等(2004)	NM 002731
PRKACG	チャン(Zhang)等(2004)	NM 002732
PRKARIA	グロンホルム(Gronholm)等(2003)	NM 212472
PRKAR2A	マクドゥーガル(MacDougall)等(2003)	NM 004157
PRKAR2B	ドウウィベディ(Dwivedi)等(2004)	NM 002736
PRKCE	シェクトマン(Schechtman)等(2004)	NM 005400
PSEN1	ピツィ(Pitsi)等(2004)	NM 000021
PSEN2	ザッチ(Zatti)等(2004)	NM 012486
PSFL	クラーク(Clark)等(2003)	NM 031301
ABL1	ガスタフソン(Gustafson)等(2004)	NM 007313
ACK1	アームド(Ahmed)等(2004)	NM 005781
ACTN4	メネツ(Menez)等(2004)	NM 004924
ARF1	カダジャ(Kadaja)等(2004)	NM 001658
ARPC1B	カネダ(Kaneda)等(2002)	
BCAR3	クラーク(Clark)等(2003)	NM 003567
BRAF	ササキ(Sasaki)等(2004)	NM 004333
CDC42	チェン(Chen)等(2004)	NM 044472
CRK	ストレットフ(Stoletov)等(2004)	NM 016823
CRKL	チャン(Zhang)等(2003)	NM 005207
DDEF1	オダ(Oda)等(2003)	NM 018482
DOCK1	グリムスリー(Grimsley)等(2004)	NM 001380
FYN	リー(Lee)等(2004)	NM 153048
GIT1	ヘンデラー(Haendeler)等(2003)	NM 014030
GRB2	チョウ(Zhou)等(2004)	NM 203506
GRF2	アロザレナ(Arozarena)等(2004)	NM 006909
HRAS	ノムラ(Nomura)等(2004)	NM 005343
JUN	シュマス(Schmuth)等(2004)	NM 002228
KRAS2	チャー(Qi)等(2004)	NM 033360
MAP2K1	レー(Rhee)等(2004)	NM 002755

10

20

30

40

【表 5 - 3】

MAP2K2	チェン(Chen)等(2004)	NM_030662
MAP2K4	ウー(Woo)等(2004)	NM_003010
MAP3K11	チャング(Zhang)等(2004a)	NM_002419
MAPK8	フジイ(Fujii)等(2004)	NM_139049
MYLK	ウーリ(Oury)等(2004)	NM_053032
NRAS	ライフエンベルガー(Reifenberger)等(2004)	NM_002524
PAK1	セルズ(Sells)等(1997)	HSU24152
PAK2	キルヒホフ(Kirchhoff)等(2004)	NM_002577
PAK3	キタノ(Kitano)等(2003)	NM_002578
PAK4	バラック(Barac)等(2004)	NM_005884
PAK6	チン(Ching)等(2003)	NM_020168
PAK7	ジャッファー(Jaffer)等(2002)	NM_020341
PTK2	ゴルボフスカヤ(Golubovskaya)等(2004)	NM_005607
PXN	サイトウ等(2004)	NM_002859
RAC1	ポントウ(Pontow)等(2004)	NM_198829
RAF1	アクラ(Akula)等(2004)	NM_002880
RAP1A	ノムラ(Nomura)等(2004)	NM_002884
RAP2B	エベリン(Evellin)等(2002)	NM_002886
SHC1	ヤンノニ(Yannoni)等(2004)	NM_183001
SOS1	バックス(Buchs)等(2004)	NM_005633
SRC	エンシーナス(Encinas)等(2004)	NM_198291
TLN1	トレムス(Tremuth)等(2004)	NM_006289
VASP	トクオ(Tokuo)等(2004)	NM_003370
VCL	イザド(Izard)等(2004)	NM_003373
WASPIP	リューティ(Luthi)等(2003)	NM_003387
ZYX	リー(Li)等(2004)	NM_003461

10

20

30

第3のマーカ-は、結果として得られるアッセイが十分な感度と特異度とを有するという条件で、第1のマーカ-もしくは第2のマーカ-と置き換えること、および/または、第1のマーカ-もしくは第2のマーカ-を補足することができる。

【0066】

任意のあらゆる増幅ベースの分子診断装置の特異度は、排他的ではないが大幅に、プライマーセットの素性(identity)に依存する。プライマーセットは、フォワード(forward)オリゴヌクレオチドプライマーとリバース(reverse)オリゴヌクレオチドプライマーとの対であって、標的DNAにアニールして標的配列の増幅を可能にし、そうすることによって、標的配列特異のアンプリコン(amplicon)を生成する該対である。それらのプライマーは、関心ある疾患状態のマーカ-を増幅することができなければならない。本発明の場合、これらのマーカ-は、黒色腫に向けられる。

40

【0067】

前記反応はまた、特異的シグナル(specific signal)を検出する幾つかの手段を含んでいなければならない。このことは、関心ある標的配列の重合によって誘導されるDNA配列の領域を検出する試薬を用いることにより成し遂げることが好ましい。検出するのに好ましい試薬は、関心ある特異的な核酸配列に結合されるとき、特異な測定可能シグナルを提供する。これらの方法はしばしば、関心ある該配列に結合されるとき、蛍光を増大させる核酸プローブを伴う。本発明の方法に係る諸反応の進捗は、各々のPCRプライマーセットのためのアンプリコンの生成の相対速度を解析することによって監視する。

【0068】

本発明は、特許請求される方法において、プライマー/プローブのセットとそれらの使

50

用法とを更に含む。それらの配列は、

配列 ID 番号：4 (PLAB フォワードプライマー) *ggcagaatctctgcccga*

配列 ID 番号：5 (PLAB リバースプライマー) *ggacagtgggtccccgttg*

配列 ID 番号：6 (PLAB プローブ) *cccagctggagttgcacttgcggcc*

配列 ID 番号：7 (PLAB アップープライマー) *gaacaccgacctcgtccc*

配列 ID 番号：8 (PLAB ロウアープライマー) *ggcggccc gagagata*

配列 ID 番号：9 (PLAB プローブ) *cgccagaagtgcggctgggattt*

配列 ID 番号：10 (L1CAM フォワード) *gctgggactgggaacagaact*

配列 ID 番号：11 (L1CAM リバース) *ggagcagagatggcaaagaaa*

配列 ID 番号：12 (L1CAM プローブ) *ttccccaccatctgctgt*

配列 ID 番号：13 (L1CAM アップー) *ccacagatgacatcagcctcaa*

配列 ID 番号：14 (L1CAM ロウアー) *ggcacaccccagctcttcctt*

配列 ID 番号：15 (L1CAM プローブ) *tggcaagcccgaagtgcagttcctt*

配列 ID 番号：16 (NTRK3 プライマー) *gccccggcaccctita*

配列 ID 番号：17 (NTRK3 プライマー) *aacctgccagtggggat*

配列 ID 番号：18 (NTRK3 プローブ) *cagatgggtgttttc*

配列 ID 番号：19 (Ty r アップー) *actcagcccagcatcattcttc*

配列 ID 番号：20 (Ty r ロウアー) *atggctgtgtactcctccaatc*

配列 ID 番号：21 (Ty r プローブ) *cttctcctcttggcagattgtctgtagctt*

配列 ID 番号：22 (PBGD アップー) *ccacacacagcctactttccaa*

配列 ID 番号：23 (PBGD ロウアー) *tacccacgcgaatcactctca*

配列 ID 番号：24 (PBGD プローブ) *aacggcaatgcggctgcaacggcgggaatt*

10

20

30

である。

【0069】

アンプリコンの生成を監視する段階は、多数の試薬および方法によって達成することができる。それらの試薬および方法は、蛍光プライマー (fluorescent primers) および蛍光プローブ (fluorogenic probes)、ならびに、二重鎖 DNA に結合する蛍光色素を伴うが、それらに限定されない。分子ビーコン (Molecular beacons)、スコープオンズ (Scorpions)、および、他の検出スキームも使用することができる。PCR を監視する一般的な方法は、蛍光加水分解プローブアッセイ (fluorescent hydrolysis probe assay) を利用する。この方法は、幾つかの耐熱性 DNA ポリメラーゼ (例えば、Taq または Tfl DNA ポリメラーゼ) の 5' -ヌクレアーゼ活性を利用して、PCR 過程の間、オリゴマープローブを切断する。

40

【0070】

本発明は、本発明の方法で使用される PCR 法によって得られる複数のアンプリコンを更に提供する。これらのアンプリコンには、次のものが包含される。

配列 ID 番号：25 (PLABアンプリコン)

gaacaccgacctcgtcccggcccctgcagtcgggatactcacgccagaagtgcggctgggatccggcgccacctgca
cctgcgtatctctcggggccgcc

配列 ID 番号：26 (L1CAMアンプリコン)

ccacagatgacatcagcctcaagtgtgaggccagtggaagcccgaagtgcagttccgctggacgagggatggtgtcca
cttcaaaccaaggaagagctgggtgtgacc

配列 ID 番号：27 (チロシナーゼ・アンプリコン)

actcagcccagcatcattctctcctctggcagattgtctgtagccgattggaggagtacaacagccat

10

配列 ID 番号：28 (PBGDアンプリコン)

ccacacacagcctactttccaagcggagccatgtctggtaacggcaatgcggctgcaacggcggaagaaaacagcccaa
agatgagagtgattcgcgtgggta

【0071】

前記オリゴマーは、延伸条件の下、増幅された標的配列にアニールするように選定する。前記プローブは典型的には、その5'末端に蛍光レポーター(fluorescent reporter)を有し、その3'末端に該レポーターの蛍光クエンチャー(fluorescent quencher)を有する。該オリゴマーが無傷である限り、該レポーターからの蛍光シグナルは抑制される。しかし、該オリゴマーが延伸過程の間に消化される時、該蛍光レポーターはもはや該クエンチャーに接近していない。任意のアンプリコンのための遊離した蛍光レポーターの相対的蓄積(relative accumulation)は、対照試料のための同一アンプリコンの蓄積、および/または、対照遺伝子の蓄積に匹敵することがある。該対照遺伝子は、例えば、RNA集団中の任意のRNAの任意のcDNAの生成物の相対存在比(relative abundance)を決定するためのアクチン(α -Actin)またはPBGDを包含するが、それらに限定されない。蛍光加水分解プローブアッセイのための生成物および試薬は、例えばアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)から、商業的に容易に入手することができる。

20

【0072】

適切な検出試薬は、通常、「スコピオンズ(Scorpions)」と呼ばれ、米国特許第6,326,145号および同第5,525,494号明細書に記述されている。これらの試薬は、テイルドプライマー(tailed primer)と集積シグナリング系(integrated signaling system)とを有する1種以上の分子を含有する。前記プライマーは、テンプレート結合性領域(template binding region)と、リンカーおよび標的結合性領域(target binding region)を有するテイル(tail)とを含有する。テイル中の標的結合性領域は、該プライマーのエクステンション生成物(extension product)の相補的な配列にハイブリダイズする(hybridizes)。この標的特異性のハイブリダイゼーションの結果は、ハイブリダイゼーションが検出可能な変化を受けるシグナリング系に連結される。PCRにおいて、標的結合性領域およびテイル領域は好都合にも、該テイル領域が単鎖のまま(即ち、複写されないまま)であるような具合に、配列する。このように、該テイル領域は、PCR増幅生成物中では増幅不可能である。該リンカーは、プライマーテンプレート上の、ポリメラーゼ関与の鎖延長部分(polymerase mediated chain extension)を保護するブロッキング部分(blocking moiety)を含有する。

30

40

【0073】

最も好ましい検出試薬は、TaqMan(登録商標)プローブ[ニュージャージー州ランチブルグ(Branhburg)、ロッシュ・ダイアグノスティクス(Roche Diagnostics)]であり、それらは、米国特許第5,210,015号、同第5,487,972号および同第5,804,375号明細書に記述されている。これらのプローブは本質的に、PCRにおいて使用されるポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ活性(exonuclease activity)によってプローブ上で蛍

50

光クエンチャー (fluor-quencher) の組合せが分離されることによる核酸検出を伴う。それらのマーカーまたは対照のいずれに対しても、適切な蛍光化合物であればいかなるものも使用することができる。そのような蛍光化合物は、Texas Red、Cal Red、Fam、Cy3およびCy5を包含するが、それらに限定されない。1つの具体例において、次の蛍光化合物は、注目される前記マーカーに対応する。PLAB:Fam、LICAM:Texas Red、または、Cal Red、チロシナーゼ:C1、PBGD:Cy5。

【0074】

PCRおよびQRT-PCRにおいてアンプリコンの蓄積を制御し監視するための装置ならびにソフトウェアも、容易に入手することができる。それらの装置およびソフトウェアには、カリフォルニア州サニーベール(Sunnyvale)、セファイド社(Cepheid)から市販されているスマート・サイクラー・サーモサイクラー(Smart Cycler thermocycler)と、アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems)から市販されているABI Prism 7700 配列検出装置(Sequence Detection System)が包含される。

10

【0075】

遺伝子発現アッセイを行う場合、関心ある組織に構成的に発現される遺伝子を使用することが好ましい。PBGDは通常、幾つかの因子に起因して内部対照(internal control)として使用される。PBGDは、ヒトにおける未知の偽遺伝子を含有しておらず、PBGDは、ヒト組織に構成的に発現し、また、PBGDは、比較的低いレベルで発現し、したがって、関心ある標的配列の増幅を抑制するとは思えない。PBGDを対照として使用すれば、偽陰性結果のあらゆる潜在的源(potential sources)に起因する誤った報告結果が最小限に抑えられるか、または排除される。

20

【0076】

前述のQRT-PCRを行うための方法を商業化する場合、特定の核酸を検出するための幾つかのキットは、とりわけ有用である。1つの具体例において、該キットは、複数のマーカーを増幅して検出するための複数種の試薬を有する。該キットは任意的に、リンパ節の組織から核酸を抽出するための、試料前処理用試薬および/または物品(例えば、チューブ)を備えている。該キットは、試料が汚染する危険性を最小限に抑えるための物品(例えば、リンパ節の切開および前処理のための、使い捨ての外科用メスおよび表層)を更に備えることができる。

30

【0077】

好ましいキットには、上述のワンチューブ(one-tube)QRT-PCR過程のために必要な試薬、例えば、逆転写酵素、逆転写酵素プライマー、対応するPCRプライマーセット(好ましくは、マーカーおよび対象のためのもの)、耐熱性DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)、ならびに、1種以上の適切な試薬が入っている。前記の適切な試薬は、例えば、スコピオンプローブ(scorpion probe)、蛍光加水分解プローブアッセイ(fluorescent hydrolysis probe assay)のためのプローブ、分子ビーコンプローブ(molecular beacon probe)、二重鎖DNAに特異な蛍光色素または単一色素プライマー(例えば、臭化エチジウム(ethidium bromide))を包含するが、それらに限定されない。それらのプライマーは、上述の高濃度を生じる量であることが好ましい。耐熱性DNAポリメラーゼは通常、様々な製造業者から商業的に入手することができる。キットの追加的材料には、適切な反応用チューブもしくはガラスビン、任意的にマグネシウムを含有するバリエーション組成物(典型的には、ワックスビード(wax bead)); 必要なバッファーおよび試薬(例えば、dNTPs)を包含する、逆転写酵素もしくはPCR段階のための反応混合物(典型的には10X); ヌクレアーゼ非含有水もしくはRNase(リボヌクレアーゼ)非含有水; RNase抑制剤; 1種以上の対照核酸; ならびに/または、QRT-PCRのPCR段階および/もしくは逆転写酵素の中で使用することのできる、追加的なあらゆるバッファー、化合物、補因子(co-factors)、イオン成分、タンパク質および酵素、ポリマー、等、が入っていることがある。キットには任意的に、核酸抽出用試薬および材料が入っている。キットには、取扱説明書も入っていることが好ましい。

40

50

【 0 0 7 8 】

次の諸実施例は、特許請求の範囲に記載される発明を説明するために提供されるが、該発明を限定するものではない。本明細書で引用される参考文献は全て、言及されることによって本明細書に組み入れられる。

【 0 0 7 9 】

実施例 1

組織の前処理

凍結した新鮮な悪性黒色腫試料、良性皮膚母斑試料、正常皮膚試料、黒色腫のリンパ節転移部試料および黒色腫非含有リンパ節試料を、ゲノミクス・コラボラティブ社(Genomics Collaborative, Inc.) [マサチューセッツ州ケンブリッジ(Cambridge)]、アステランド(Asterand) [ミシガン州デトロイト(Detroit)]、クリノミクス(Clinomics) [マサチューセッツ州ピッツフィールド(Pittsfield)] およびプロテオジェネックス(Proteogenex) [カリフォルニア州ロサンゼルス]、アーデイス(Ardais) [マサチューセッツ州レキシントン(Lexington)] およびインパス(Impath) [マサチューセッツ州ウェストバラ(Westborough)] から入手した。全ての組織供給元は、本研究で使用される組織試料が、治験審査委員会(Institutional Review Board)の認可する、対応する病院のプロトコルと生命倫理の原則とにしたがって採取されたことを宣言した。患者の人口統計学と病理学との情報も収集した。診断を確実にし、かつ、試料の保存と腫瘍の含有量とを評価するために、各々の試料の病理組織学的特徴を吟味した。

10

【 0 0 8 0 】

マイクロアレイ解析のために選定された黒色腫の一次組織と良性母斑の一次組織とは、50%を超えるメラニン形成細胞含有率を有し、組織構造は混合されなかった。悪性黒色腫の患者から黒色腫陽性のリンパ節を採取した。その際、黒色腫の診断は、IHC(免疫組織化学検査)(S100およびHMB45)と組合せたH&E(ヘマトキシリン・エオジン染色)によって確認した。黒色腫非含有リンパ節は、患者の病歴において黒色腫を有さなかった該患者から得、また、黒色腫が存在しないことは、S100およびHMB45のための抗体を用いるIHCおよびH&Eによって確認した。

20

【 0 0 8 1 】

合計70個の一次組織試料由来のRNAを使用して、遺伝子発現のプロフィールを解析し、黒色腫特異の遺伝子を同定した。試料には、45個の一次悪性黒色腫と、18個の良性皮膚母斑と、7個の正常皮膚組織とが入っていた。本研究対象に含まれる初期の黒色腫の大部分は、疾患の初期を示し、4mm未満の厚さを有している。このことは、標準的な黒色腫患者の母集団と一致している[アイトケン(Aitken)等(2004)]。患者の人口統計的特性、臨床的特性および病理学特性は、表6に示され、表7にまとめられる。

30

【 0 0 8 2 】

加えて、77個の悪性黒色腫のリンパ節転移部の試料と、18個の黒色腫非含有リンパ節組織の試料とを使用して、定量的なワンステップPCRアッセイを行った。黒色腫陽性リンパ節は、類上皮細胞および紡錘細胞の初期の黒色腫から得られた転移部を有する、腋窩リンパ節、頸部リンパ節および鼠径リンパ節を有した。18個の黒色腫非含有リンパ節のうち10個は、他のガン患者から採取したものの、これらのリンパ節の中には病理学者によってガン細胞が全く見出されず、また、8個のリンパ節は、非悪性病巣から採取された。

40

【 0 0 8 3 】

【表 6 - 1】

試料ID	年齢	性別	人種	診断	位置	T段階	M&M段階	クラークレベル
430MM	n/a	女	白人系	正常皮膚	体幹			
431MM	n/a	女	白人系	正常皮膚	体幹			
432MM	n/a	女	白人系	正常皮膚	体幹			
433MM	n/a	女	白人系	正常皮膚	体幹			
435MM	n/a	女	白人系	正常皮膚	体幹			
437MM	n/a	女	白人系	正常皮膚	体幹			
485MM	37	男	白人系	正常皮膚	皮膚、特定不能			
487MM	35	女	白人系	異型母斑、軽症	顔			
489MM	56	女	白人系	複合母斑	顔			
490MM	16	女	白人系	複合母斑	頭皮および頸部			
491MM	15	男	白人系	複合母斑	体幹			
493MM	35	女	白人系	複合母斑	体幹			
495MM	18	女	白人系	良性母斑、特定不能	体幹			
496MM	21	男	白人系	真皮内母斑	下肢および股関節部			
497MM	12	男	白人系	真皮内母斑	下肢および股関節部			
498MM	44	女	白人系	良性母斑、特定不能	体幹			
499MM	48	女	白人系	良性母斑、特定不能	顔			
500MM	65	男	白人系	真皮内母斑	体幹			
501MM	30	男	白人系	複合母斑	下肢および股関節部			
502MM	20	女	白人系	複合母斑	体幹			
503MM	35	男	白人系	真皮内母斑	下肢および股関節部			
504MM	23	男	白人系	複合母斑	体幹			
507MM	53	男	白人系	異型母斑、中程度	体幹			
508MM	28	男	白人系	複合母斑	体幹			
509MM	43	男	白人系	真皮内母斑	体幹			
392MM	58	女	白人系	類上皮黒色腫	体幹	T3	NOM0	4
397MM	51	女	白人系	類上皮黒色腫	下肢および股関節部	T2	NOM0	3
405MM	46	男	白人系	類上皮黒色腫	上肢および肩	T2	NOM0	3
407MM	64	女	白人系	類上皮黒色腫	体幹	T1	NOM0	2
409MM	54	女	白人系	類上皮黒色腫	頭皮および頸部	T2	NOM0	3
440MM	61	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	下肢および股関節部	T1	NOM0	2
441MM	78	男	白人系	紡錘細胞黒色腫	顔	T4	NOM0	5
442MM	52	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T2	NOM0	3
443MM	51	女	白人系	紡錘細胞黒色腫	体幹	T2	NOM0	3
444MM	49	女	白人系	紡錘細胞黒色腫	下肢および股関節部	T3	NOM0	4
445MM	76	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T3	NOM0	4
446MM	86	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	頭皮および頸部	T1	NOM0	2
447MM	48	男	白人系	類上皮黒色腫	皮膚、特定不能	T3	NOM0	4
448MM	72	女	白人系	類上皮黒色腫	上肢および肩	T2	NOM0	3
449MM	62	男	アジア系	類上皮黒色腫	下肢および股関節部	T3	N1M0	n/a
450MM	90	女	白人系	類上皮黒色腫	上肢および肩	T4	N1M1	n/a
452MM	43	男	白人系	類上皮黒色腫	皮膚、特定不能	T3	NOM0	n/a
453MM	48	女	白人系	類上皮黒色腫	体幹	T3	NOM0	n/a
454MM	69	男	白人系	類上皮黒色腫	上肢および肩	T3	NOM0	n/a
455MM	55	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	皮膚、特定不能	T2	NOM0	n/a
456MM	63	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	下肢および股関節部	T2	NOM0	3

10

20

30

40

【表 6 - 2】

457MM	69	男	白人系	紡錘細胞黒色腫	体幹	T1	NOM0	2
459MM	86	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	下肢および股関節部	T2	NOM0	3
460MM	64	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T3	NOM0	4
461MM	66	男	白人系	類上皮黒色腫	体幹	T1	NOM0	2
463MM	58	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	体幹	T1	NOM0	2
464MM	53	男	白人系	類上皮黒色腫	顔	T2	NOM0	3
465MM	77	女	白人系	類上皮黒色腫	上肢および肩	T3	NOM0	4
466MM	79	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T1	NOM0	2
468MM	86	女	白人系	紡錘細胞黒色腫	上肢および肩	T2	NOM0	3
469MM	43	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	頭皮および頸部	T1	NOM0	2
470MM	81	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T2	NOM0	3
472MM	38	女	白人系	紡錘細胞黒色腫	上肢および肩	T1	NOM0	2
473MM	69	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T1	NOM0	3
475MM	77	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	顔	T3	NOM0	4
476MM	87	女	白人系	紡錘細胞黒色腫	上肢および肩	T3	NOM0	4
477MM	82	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	頭皮および頸部	T2	NOM0	3
478MM	78	女	白人系	類上皮黒色腫	顔	T3	NOM0	4
480MM	59	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T2	NOM0	3
481MM	85	男	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T3	NOM0	4
482MM	66	男	白人系	類上皮黒色腫	顔	T3	NOM0	4
483MM	85	女	白人系	類上皮黒色腫	体幹	T4	NOM0	5
484MM	70	女	白人系	悪性黒色腫、特定不能	上肢および肩	T1	NOM0	3
511MM	69	男	白人系	類上皮黒色腫	皮膚、特定不能	T3	N1M0	4
512MM	45	男	白人系	類上皮黒色腫	体幹	T4	NOM0	3

10

20

30

【 0 0 8 4 】

【表 7】

特性	黒色腫 (%)	良性母斑 (%)	正常皮膚 (%)
平均年齢	65.51 ± 14.55	33.17 ± 15.60	n/a
性別			
女	22 (48.9)	9 (50)	6
男	23 (51.1)	0 (50)	1
解剖学的位置			
顔	5 (11.1)	3 (17)	
頭皮および頸部	4 (8.0)	1 (6)	
体幹	9 (20)	10 (55)	6 (86)
上肢および肩	17 (37.8)		
下肢および股関節部	6 (13.3)	4 (22)	
皮膚、特定不能	4 (8.9) 30		1 (14)
組織診			
類上皮細胞	20 (44.4)		
紡錘細胞	7 (15.6)		
悪性黒色腫、特定不能	18 (40)		
複合母斑		8 (44)	
真皮内母斑		5 (28)	
異型母斑		2 (11)	
良性母斑、特定不能		3 (17)	
正常皮膚			7 (100)
T段階 (厚さ)			
T1	11 (24.4)		
T2	14 (31.1)		
T3	16 (35.6)		
T4	4 (8.9)		
N段階			
N0	42 (93.3)		
N1	3 (6.7)		
M段階			
M0	44 (97.8)		
M1	1 (2.2)		
クラークレベル			
2	9 (20)		
3	16 (35/6)		
4	12 (26.7)		
5	2 (4.4)		
n/a	6 (13.3)		

【 0 0 8 5 】

実施例 2

悪性黒色腫試料および良性皮膚母斑試料由来のRNAの分離

キアゲン(Qiagen) RNeasy (登録商標)ミニ・キット(Mini Kit) [カリフォルニア州バレンシア(Valencia)、キアゲン社(QIAGEN Inc.)] を使用し、また、RNA試料中の残留メラニンを最小限に抑えるために、プロトコルを一部変更した。メラニン形成細胞を含有する組織については、各々の患者から得られた4個の反復試験用組織試料であって、それぞれ約5mgの重量である該組織試料を使用し、別々に処理した。組織試料は、機械的ホモジナイザー [Ultra Turrex T8、ドイツ国、シュタウフェン(Staufen)、IKA - ベルケ社(Werke)] によって、10μlのβ-メルカプトエタノール [ミズーリ州セントルイス(St. Louis)、シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co.)] を含有する1.0mlのRLTバッファー (キアゲン社) で均質化した。均質化を行った後、諸試料は、キアゲン(Qiagen) RNeasy (登録商標) カラムに装填し、次いで、遠心分離を行った。フロースルー(flow-through)を捨てた後、RW1バッファー700mlを添加し、該カラムは、室温に5分間保持し、次いで、遠心分離を行った。この段階は、3回繰り返した。次いで、標準キアゲン(QIAGEN) RNeasy (登録商標) ミニ・キット(Mini Kit)

プロトコルに従った。シリカゲルの膜からRNAを取り除くため、ツーステップ(two-step)溶出を行った。同一の個々の患者の組織から得られた全RNAは、貯留して、更なる分析に使用した。

【0086】

メラニン形成細胞をかなりの割合では含有していない組織からRNAを分離するために、標準トリゾール(Trizol)プロトコルを使用した。組織は、トリゾール試薬[カリフォルニア州カールズバッド(Carlsbad)、インビトロゲン社(Invitrogen)]で均質化した。遠心分離を行った後、上部の液相は回収し、次いで、全RNAは、イソプロピルアルコールを用い-20で沈降させた。RNAのペレットは、75%エタノールで洗浄し、水で溶解し、使用されるまで-80で保管した。RNA品質は、アジレント(Agilent)2100バイオアナライザー(Bioanalyzer)RNA600ナノ(Nano)アッセイ[カリフォルニア州パロアルト(Palo Alto)、アジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies)]を用いて調べた。

10

【0087】

標準製造者のプロトコル(standard manufacturer protocol)に従い、22,000個のプロブセットを有する高密度オリゴヌクレオチド・アレイHu133A遺伝子チップ(Gene Chip)[カリフォルニア州サンタクララ(Santa Clara)、アフィメトリクス社(Affymetrix)]を用いて、標識cRNAを前処理し、ハイブリダイズさせた。アフィメトリクス社のプロトコルとスキャナーとを使用して、アレイを走査した。後続の分析を行うために、各々のプロブセットは、別個の遺伝子(separate gene)と見なした。各々の遺伝子の発現値は、アフィメトリクス遺伝子チップ(Affymetrix Gene Chip)解析用ソフトウェアMAS5.0を用いて算出した。全てのチップは、3つの品質管理基準を満たした。「プレゼント(present)」コール(call)は35%を超え;スケールファクター(scale factor)は、600の目標強度まで測定したとき、12未満であり、バックグラウンドレベル(background level)は150未満であった。皮膚細胞からRNAを分離することは困難である[ヒッペル(Hipfel)等(1998)]ので、「プレゼント(present)」コールの通常の割合よりも小さいカットオフ(cut-off)を選択し、結果として、より低い全遺伝子発現レベルが得られた。

20

【0088】

実施例3

データ解析

遺伝子発現のデータは、フィルターにかけて、2個以上の試料の中に「プレゼント(present)」と呼ばれる遺伝子のみを有するようにした。このフィルターは、それらの試料中の発現を変化させなかった遺伝子を除去するために使用した。前記アレイ上に存在した22,000個の遺伝子のうち15,795個は、このフィルターを通過し、階層的クラスタリング(hierarchical clustering)のために使用された。クラスタリングを行なう前、各々の遺伝子発現シグナルは、データセットにおける全試料の中央値の発現量(median expression)によって分割した。この正規化段階によって、遺伝子発現の大きさの影響は最小限に抑えられ、また、クラスタリング解析において類似の発現パターンを有する複数の遺伝子はグループ分けされた。GeneSpring6.1を使用して、遺伝子と試料との両者に、ピアソン相関係数(Pearson correlation)を用いた平均連結(average linkage)階層的クラスタリングを実施した。

30

40

【0089】

特異的に発現する遺伝子を同定するために、本発明者らは、黒色腫試料を、良性母斑試料および正常皮膚試料と別々に比較した。第1の解析は、45個の黒色腫試料と7個の正常皮膚試料とから成り;第2の解析は、45個の黒色腫試料と18個の母斑試料とから成った。これらの2つのデータセットは、図1に示される下記手順によって別々に解析した。遺伝子の選別には、マイクロアレイの有意差分析(significance analysis of microarray)[SAM; タッシャー(Tusher)等(2001)]とt検定とを用いた。SAMのパラメータは、1,000の組合せで、 $t = 2.5$ およびフォールドチェンジ(fold change) =

50

2.0と設定した。欠測値は存在せず、また、デフォルト乱数(default random number)を使用した。次いで、百分位数分析(percentile analysis)を行った。発現上昇した遺伝子について、黒色腫試料の30百分位数を、正常皮膚試料の最大値または母斑試料の最大値と比較した。前記の選別された遺伝子が、前記諸試料の2つのグループの間に有意な特異的発現を有していることを確実にするために、ボンフェローニ補正(Bonferroni correction)によるスチューデント(Student) t検定をも、カットオフ $p < 0.05$ で行った。最終段階として、本発明者らは、黒色腫/良性遺伝子のリストと黒色腫/正常遺伝子のリストとの間の共通遺伝子を同定し、結果として、図1に示される黒色腫において、発現上昇した遺伝子の単一のリストが得られた。そのとき、439個の共通遺伝子は、表15-1~表15-22に記述される通りの配列ID番号: 29~467に対応する。それらの結果は、表8-1~表8-10に示す。

【0090】

【表8-1】

PSID	黒色腫における中央値の発現量	フォールドチェンジ (ガン試料対良性母斑試料)	フォールドチェンジ (ガン試料対正常皮膚試料)
200078 s at	3954	2	3
200601 at	9254	2	7
200612 s at	2396	2	5
200644 at	7240	3	6
200660 at	14659	3	4
200707 at	3153	2	51
200736 s at	7305	3	3
200737 at	2423	2	2
200783 s at	1028	2	2
200825 s at	3746	3	3
200827 at	1593	2	2
200837 at	5817	2	5
200838 at	19225	8	17
200839 s at	28353	5	7
200859 x at	9665	3	7
200910 at	7780	2	4
200950 at	8419	3	7
200954 at	3132	2	6
200966 x at	27388	2	3
200967 at	6154	2	4
200968 s at	5587	2	7

10

20

30

【表 8 - 2】

200972 at	8943	3	3
201038 s at	1480	2	2
201051 at	5439	2	5
201105 at	33285	4	5
201106 at	7546	2	4
201188 s at	1730	2	8
201189 s at	3870	3	3
201195 s at	6005	4	18
201202 at	1860	3	2
201251 at	23965	5	11
201252 at	901	2	3
201271 s at	1648	2	5
201291 s at	601	3	42
201313 at	2414	5	6
201346 at	3359	2	2
201393 s at	2166	2	5
201416 at	4845	4	4
201417 at	2905	2	4
201470 at	18525	4	4
201474 s at	2471	5	22
201485 s at	1398	2	10
201486 at	1105	2	3
201536 at	2441	2	4
201614 s at	651	2	4
201660 at	4713	7	3
201661 s at	3336	6	5
201662 s at	2693	5	3
201670 s at	3047	2	12
201714 at	993	2	3
201765 s at	5475	4	5
201792 at	3897	3	4
201804 x at	5609	3	3
201819 at	2575	5	3
201850 at	11103	10	20
201880 at	1833	2	3
201910 at	3854	4	4
201911 s at	2154	3	4
201931 at	2578	3	2
201954 at	25901	9	15
201976 s at	7697	2	6
202069 s at	855	2	3
202070 s at	2490	4	5
202111 at	1380	3	9
202154 x at	10260	3	4
202185 at	8493	4	6
202188 at	1269	3	9
202219 at	5630	3	7

10

20

30

40

【表 8 - 3】

202224 at	2650	3	4
202225 at	1534	2	2
202260 s at	7877	6	6
202295 s at	15129	6	4
202329 at	3438	4	4
202367 at	898	2	2
202370 s at	4669	3	2
202478 at	7922	3	11
202503 s at	2424	3	5
202589 at	3494	2	6
202603 at	3772	3	2
202705 at	1058	4	4
202737 s at	2865	3	4
202779 s at	3400	9	55
202785 at	1134	2	6
202862 at	2540	6	4
202898 at	4736	4	63
202954 at	1357	2	2
202958 at	2401	4	3
202961 s at	19648	4	5
202986 at	2052	3	28
203011 at	1346	2	2
203022 at	1068	2	2
203069 at	560	15	13
203071 at	958	19	3
203094 at	968	2	2
203145 at	513	2	2
203167 at	2523	3	5
203217 s at	6416	3	5
203234 at	725	3	3
203256 at	7799	5	31
203262 s at	2482	2	2
203300 x at	5278	3	16
203315 at	3273	2	2
203366 at	847	2	2
203396 at	3946	2	3
203452 at	579	4	12
203456 at	1132	2	3
203502 at	657	3	3
203518 at	2943	3	7
203554 x at	5056	3	4
203557 s at	839	2	2
203570 at	2553	4	15
203590 at	3093	3	7
203643 at	1380	3	8
203663 s at	9720	5	3
203668 at	1963	2	3

10

20

30

40

【表 8 - 4】

203693 s at	588	3	3
203695 s at	1548	6	3
203723 at	4087	5	9
203729 at	9154	2	14
203730 s at	517	3	3
203731 s at	691	3	2
203775 at	1251	4	3
203827 at	3380	11	8
203878 s at	2036	8	5
204014 at	7184	10	46
204015 s at	2207	5	15
204033 at	2154	7	7
204092 s at	664	3	3
204099 at	2496	6	6
204170 s at	1362	3	4
204197 s at	2889	3	4
204198 s at	4024	3	3
204202 at	875	3	3
204228 at	1299	2	3
204244 s at	538	4	4
204247 s at	689	3	27
204252 at	5294	5	7
204262 s at	1003	4	5
204423 at	689	4	3
204436 at	3113	3	3
204458 at	908	3	3
204467 s at	1910	3	6
204584 at	9677	21	15
204585 s at	805	13	17
204647 at	1693	3	3
204654 s at	3894	4	25
204709 s at	312	24	16
204778 x at	537	2	4
204779 s at	1641	4	4
204857 at	2736	3	297
204932 at	241	3	3
204973 at	1478	3	7
204995 at	496	4	6
205051 s at	3875	4	3
205142 x at	937	2	3
205169 at	267	2	7
205373 at	579	10	8
205376 at	815	2	3
205405 at	2302	4	11
205447 s at	567	13	5
205458 at	3288	6	8
205566 at	2684	7	8

10

20

30

40

【表 8 - 5】

205591 at	1190	5	3
205681 at	1316	8	12
205690 s at	9179	8	9
205691 at	226	7	5
205717 x at	8127	3	3
205813 s at	430	11	9
205937 at	301	7	5
205945 at	772	2	4
205996 s at	909	2	3
206128 at	364	3	3
206307 s at	534	8	4
206332 s at	4671	2	2
206397 x at	1436	6	43
206441 s at	3681	6	31
206462 s at	9953	53	24
206503 x at	419	8	9
206617 s at	898	4	19
206630 at	23194	3	46
206688 s at	2989	3	2
206696 at	6446	7	191
206777 s at	683	4	7
206864 s at	421	5	5
206976 s at	3375	4	3
207038 at	1986	9	47
207060 at	497	4	5
207144 s at	593	17	24
207163 s at	3217	3	10
207183 at	230	6	6
207592 s at	350	5	14
207614 s at	2139	2	6
207622 s at	882	2	16
207828 s at	997	3	3
208002 s at	3142	3	7
208089 s at	1374	3	6
208308 s at	12282	4	9
208540 x at	5257	2	2
208644 at	2242	2	3
208657 s at	1547	2	4
208677 s at	5414	3	14
208696 at	7351	4	3
208710 s at	1112	3	44
208723 at	4402	3	6
208744 x at	1673	4	49
208837 at	3997	2	3
208916 at	1630	3	5
208928 at	1439	4	7
208956 x at	7772	3	2

10

20

30

40

【表 8 - 6】

208974 x at	6025	2	6
208975 s at	1085	2	3
209015 s at	1739	4	4
209036 s at	8944	3	3
209053 s at	269	7	10
209072 at	6299	4	18
209079 x at	12870	3	3
209081 s at	3160	3	2
209123 at	4686	4	3
209132 s at	4385	5	12
209172 s at	268	3	3
209197 at	820	3	3
209198 s at	491	3	3
209247 s at	1486	2	2
209254 at	1384	4	7
209255 at	4283	6	8
209256 s at	4949	8	6
209283 at	12529	5	3
209345 s at	1678	2	2
209407 s at	1461	2	6
209515 s at	5827	5	15
209773 s at	1243	3	5
209825 s at	765	2	3
209827 s at	4884	7	7
209828 s at	1146	4	5
209848 s at	32959	7	74
209875 s at	3038	21	12
209932 s at	7126	3	5
210052 s at	1085	3	6
210073 at	337	4	6
210111 s at	7841	5	3
210127 at	391	2	9
210854 x at	2100	2	6
210926 at	574	2	3
210948 s at	396	2	4
210951 x at	2501	2	13
211013 x at	498	8	13
211052 s at	1399	3	2
211066 x at	12431	2	2
211373 s at	2063	5	6
211564 s at	1992	3	2
211752 s at	2183	2	2
211759 x at	5674	2	3
211833 s at	502	2	28
212000 at	339	3	14
212070 at	13437	2	4
212081 x at	1457	2	4

10

20

30

40

【表 8 - 7】

212119 at	4415	2	5
212178 s at	2976	3	14
212193 s at	3646	3	10
212247 at	1716	3	3
212285 s at	4252	2	4
212312 at	1234	4	2
212338 at	1598	3	4
212402 at	3019	3	4
212472 at	1987	5	5
212473 s at	3747	5	4
212512 s at	1441	3	2
212520 s at	2188	2	4
212552 at	2611	2	2
212715 s at	1085	3	4
212739 s at	2736	2	3
212744 at	959	3	5
212745 s at	376	2	15
212793 at	3123	4	5
212796 s at	2511	2	2
213002 at	1439	2	3
213007 at	968	3	4
213008 at	1086	6	10
213096 at	924	3	3
213131 at	1392	3	3
213169 at	4028	5	4
213215 at	1926	4	3
213217 at	5848	10	6
213241 at	9479	4	23
213274 s at	18263	12	26
213275 x at	17604	7	3
213330 s at	1233	2	7
213333 at	1845	2	3
213338 at	932	6	4
213392 at	1022	2	2
213474 at	723	2	3
213496 at	2322	3	7
213573 at	1643	2	3
213587 s at	10416	18	9
213638 at	1827	26	102
213670 x at	1959	2	4
213720 s at	2248	2	3
213746 s at	4187	3	14
213836 s at	2605	8	5
213895 at	1279	3	4
213960 at	11768	80	29
214023 x at	1602	7	9
214068 at	2148	9	10

10

20

30

40

【表 8 - 8】

214104 at	814	2	3
214201 x at	746	2	3
214581 x at	510	5	6
214614 at	542	10	9
214632 at	358	2	2
214656 x at	2977	2	2
214687 x at	26310	2	3
214708 at	249	2	3
214710 s at	575	2	3
214714 at	2366	4	9
214717 at	471	4	4
214752 x at	6462	3	4
214778 at	311	3	27
214841 at	913	9	11
214893 x at	214	10	9
214896 at	3071	8	11
215025 at	2365	149	93
215115 x at	12421	34	15
215126 at	4940	8	19
215155 at	505	6	4
215311 at	10093	86	30
215812 s at	1176	3	13
215836 s at	9406	3	3
216194 s at	5011	3	3
216973 s at	1732	6	4
217033 x at	10961	21	19
217104 at	317	6	3
217226 s at	2191	3	3
217297 s at	838	3	21
217377 x at	12402	27	18
217419 x at	2742	3	5
217624 at	349	21	20
217799 x at	1724	2	11
217827 s at	4762	2	2
217867 x at	9024	3	9
217871 s at	19519	3	11
217891 at	1271	2	3
218009 s at	1557	4	3
218030 at	1316	2	3
218074 at	3594	2	4
218143 s at	4007	3	5
218151 x at	1384	2	2
218152 at	1440	2	3
218161 s at	941	5	5
218175 at	3563	3	2
218330 s at	3853	7	4
218349 s at	588	3	14

10

20

30

40

【表 8 - 9】

218359 at	796	3	5
218376 s at	1931	4	4
218447 at	2209	2	3
218542 at	409	3	6
218564 at	433	2	4
218608 at	627	3	4
218678 at	11356	14	20
218774 at	1061	2	5
218786 at	732	3	2
218824 at	1351	3	5
218839 at	1996	38	7
218856 at	3199	5	4
218888 s at	906	6	5
218931 at	911	3	2
218952 at	2661	7	7
218956 s at	1840	4	3
218980 at	1627	3	8
218996 at	1859	4	6
219011 at	113	4	3
219039 at	1852	2	5
219040 at	480	3	10
219041 s at	3435	4	2
219051 x at	1127	3	8
219066 at	621	4	2
219143 s at	3618	9	13
219148 at	426	2	3
219152 at	365	13	10
219219 at	859	2	3
219361 s at	1033	3	7
219372 at	376	2	2
219408 at	421	3	36
219478 at	5485	80	18
219491 at	547	3	12
219522 at	822	4	3
219537 x at	411	3	6
219555 s at	402	12	21
219578 s at	1419	17	26
219634 at	686	3	15
219637 at	355	3	3
219703 at	378	3	3
219742 at	409	3	9
219895 at	528	6	3
219933 at	1399	2	2
220116 at	748	5	8
220155 s at	5010	5	6
220178 at	5915	9	15
220454 s at	581	2	2

10

20

30

40

【表 8 - 1 0】

220864 s at	8416	3	3
220948 s at	11794	2	3
220973 s at	497	4	3
220974 x at	2540	2	2
220980 s at	3598	3	2
221059 s at	2438	5	3
221483 s at	9194	3	3
221484 at	3834	3	3
221538 s at	3971	3	3
221558 s at	2356	3	5
221577 x at	4897	28	38
221641 s at	1199	2	4
221688 s at	3740	2	4
221710 x at	728	2	2
221732 at	931	3	2
221759 at	1261	4	21
221797 at	430	2	7
221799 at	1601	5	3
221815 at	3293	17	144
221882 s at	1144	5	6
221902 at	2491	4	4
221909 at	243	22	17
221962 s at	1132	2	6
222116 s at	4208	2	4
222153 at	445	3	8
222155 s at	1264	3	10
222175 s at	2415	3	6
222196 at	224	3	6
222199 s at	2152	2	3
222206 s at	383	4	12
222212 s at	3715	3	4
222231 s at	2724	3	2
222234 s at	754	4	12
222240 s at	1331	3	3
222294 s at	2193	3	5
32811 at	4194	2	3
40560 at	1629	3	5
44783 s at	8503	14	6
46665 at	7835	4	3
55093 at	3032	4	4
63825 at	10096	14	74
87100 at	737	6	70

10

20

30

40

【 0 0 9 5】

本発明者らは、黒色腫において、良性母斑試料と比べて少なくとも10倍の過剰発現を有する諸遺伝子の選抜候補リストを選定した。完全なアレイデータセット(array dataset)は、国立バイオテクノロジー情報センター/ジェンバンク・ジオデータベース(NCBI/Genbank GEO database)に提出された(シリーズ・エントリー・ペンディング(series entry pending))。

【 0 0 9 6】

50

階層的クラスタリングによって、4つの異なるクラスターが明らかとなった(図2)。2つのクラスターは、黒色腫試料の大部分(45個のうち43個)から成った;第3のクラスターは、良性母斑試料の大部分(18個のうち15個)を含み、また、第4のクラスターは、7個全ての正常皮膚試料を含んだ。黒色腫試料それら自体は、一方のクラスターは35個の試料を含み、他方のクラスターは10個の試料を含む、2つのクラスターを形成した。小さいクラスターを形成した試料は、類上皮(epithelioid)黒色腫のみを表わし、視覚的に、より少ないメラニン含有し、かつ、P R A M E 遺伝子およびM I A 遺伝子のより高い発現を例証した($p < 0.05$)。少ない段階IIIおよびIVの腫瘍は全て、小さいクラスターにグループ分けされた。大きいクラスターは、N T R K 3 およびネスチン(nestin)(N E S)のより高い発現を示した($p < 0.05$)。黒色腫試料および良性母斑試料は全て、既知のメラニン形成細胞のマーカー(例えば、チロシナーゼおよびM A R T - 1)の同等に高い発現を例証し、それによって、これらの試料中に類似のメラニン形成細胞含有量が存在することが確認された。本発明者らのデータによって、黒色腫試料、良性母斑試料および正常皮膚試料は異なる遺伝子発現プロファイルを有しており、しかも、分子ベースで類別し得るということが示される。表9に、黒色腫およびそれらの関連する機能性カテゴリーに高く発現した選別遺伝子をまとめる。

【0097】

【表 9】

psid	名称	黒色腫における 中央値の発現量	良性母斑試料/ 正常皮膚試料における 中央値の発現量	フォールド チェンジ
神経系の成長および機能				
215025_at	NTRK3	2365.1	19.9	118.8
204709_s_at	KNSL5	311.8	13.5	23.1
204585_s_at	L1CAM var 1	805.2	49	16.4
218678_at	NES	11355.5	703.6	16.1
202260_s_at	STXBP1	7877.1	1312	6.0
204995_at	p35	496.3	89.2	5.6
208308_s_at	GP1	12281.7	2238.2	5.5
201340_s_at	ENC1	390.8	74.9	5.2
209072_at	MBP	6299.1	1215.9	5.2
細胞の移動				
214614_at	HOXB9	541.6	54.4	10.0
205447_s_at	MAP3K12	566.5	76.5	7.4
組織の形態				
206397_x_at	GDF1	1436.1	130.1	11.0
205458_at	MC1R	3287.6	458.1	7.2
ガン細胞の浸潤				
213274_s_at	CSTTB	18262.9	1261.4	14.5
208677_s_at	BSG	5413.8	1088	5.0
細胞サイクルの制御				
219578_s_at	CPEB1	1418.5	75.6	18.8
207144_s_at	CITED1	593.4	33.5	17.7
204252_at	CDK2	5293.7	869.3	6.1
211373_s_at	PSEN2	2063.3	403.2	5.1
細胞死				
221577_x_at	PLAB	4896.9	173.9	28.2
205681_at	BCL2A1	1316.4	135.1	9.7
未知				
204545_at	PEX6	379.1	23.9	15.9
201850_at	CAPG	11103.2	725.6	15.3
204014_at	DUSP4	7183.6	601.3	11.9
202779_s_at	E2-EPF	3400	323.3	10.5
201954_at	ARPC1B	25900.7	2470	10.5
209848_s_at	me20m	32958.9	3778.4	8.7
213112_s_at	SQSTM1	260.4	33.9	7.7
218952_at	SAAS	2660.7	368.7	7.2
204099_at	SMARCD3	2496.2	428.2	5.8
206999_at	IL12RB2	354	61.3	5.8
201251_at	PKM2	23964.7	4228.2	5.7
202185_at	PLOD3	8493.2	1541.7	5.5

実施例 4

黒色腫に特異的に発現した遺伝子の同定

70個の遺伝子発現プロファイルの全てを使用して解析した。黒色腫試料グループ、良性母斑試料グループおよび正常皮膚試料グループに対する「プレゼント・コール」の中央値%は、43.8%、46.9%および41.7%であった。60個のマイクロアレイ(

10

20

30

40

50

86%)は、最小値の3倍以内の範囲のスケールリングファクター(scaling factors)を有した。3より大きいスケールリングファクターを有するチップは、試料のカテゴリ、黒色腫試料、良性母斑試料および正常皮膚試料の間で同等に分布した。

【0098】

非監視の、管理されていない(unsupervised)階層的クラスタリングの結果によって、黒色腫試料、良性母斑試料および正常皮膚試料の分離が異なることが明らかとなった(図2)。本発明者らは、黒色腫試料の大部分(45個のうち43個)から成る2つのクラスターと、7個全ての正常皮膚試料、3個の良性母斑試料および2個の黒色腫試料を含んだ第3のクラスターと、18個の良性母斑試料のうち14個を含んだ第4のクラスターとを有する4つのクラスターを観察した。それらの試料の源は、クラスタリングに影響を与えなかった。異なる源に由来する試料は、試料の種類(黒色腫、良性母斑および正常皮膚)に従って一緒にクラスターを成した。クラスタリングパターン(clustering patterns)の安定性を更に吟味するために、本発明者らは、クラスター分析を行う前、遺伝子のフィルタリング(filtering)に別のカットオフを用いた。具体的には、本発明者らは、黒色腫試料、良性母斑試料および正常皮膚試料の各々の中に少なくとも10%の「プレゼント(present)」コール(calls)を有する遺伝子を保持した。このカットオフによって、本発明者らは、15,306個の遺伝子を得て、階層的クラスタリングを繰り返した。患者試料のクラスターパターンは、前記2つの「プレゼント」コールからの15,795個からのものと同一であった。

10

【0099】

黒色腫試料とクラスターを成した単一の母斑試料は、黒色腫のインサイチュー・プレゼント(in-situ present)を全く有さない、変則的な(中程度の)母斑試料である。正常皮膚試料とクラスターを成した3個の母斑試料は全て、複合母斑(compound nevi)試料であり、それらのうち1個は、他の母斑試料に比べてより低い率のメラニン形成細胞含有量を有した。黒色腫試料それら自体は、2つのクラスターを形成し、大きい方のクラスターは34個の試料であり、小さい方のクラスターは9個の試料であった。小さい方のクラスターを形成した試料は、類上皮(epithelioid)黒色腫のみを示し、視覚的に、より少ないメラニンを含有した。本発明者らの研究で使用された、少ない段階IIIおよびIVの腫瘍は全て、小さい方のクラスターにグループ分けされた。大きい方のクラスターは、混合された組織構造の試料の、類上皮細胞、紡錘細胞および黒色腫から構成され、メラミンの存在はより著しかった。大きい方のクラスターには、段階Iおよび段階IIの試料のみが入った。

20

30

【0100】

黒色腫に関連し、はっきり識別することのできる遺伝子クラスターが見出だされた。これは、黒色腫試料における発現上昇した遺伝子(図2のA, B, C)と発現低下した遺伝子(図2のE)とによって特徴付けることができる。同時に、黒色腫試料および良性母斑試料は、既知のメラニン形成細胞マーカー(例えば、MART-1)の発現が高いことを例証し、そのことによって、これらの試料におけるメラニン形成細胞の含有量は同等であり、かつ、メラニン形成細胞特異のマーカーはそれらを識別することができないということが確認された。本発明者らのデータによって、黒色腫試料、良性母斑試料および正常皮膚試料は、はっきり識別することのできる遺伝子発現プロファイルを有しており、かつ、それらの分子ベースで類別することができるということが示される。

40

【0101】

悪性黒色腫において発現上昇した遺伝子を同定するために、本発明者らは、ボンフェローニ補正によるt検定と百分位数分析とを組合せてSAMを適用した(図1)。ボンフェローニ補正のt検定および百分位数分析は、それぞれ、複数の試験組織、および、前記の複数の腫瘍試料の異質性(heterogeneity)を検討するために使用した。これらの解析の結果として、439個の遺伝子を選定し、表15-1~表15-22に配列ID番号:29~467としてまとめる。本発明者らは、黒色腫において発現上昇した439個の遺伝子の中から、黒色腫試料における過剰発現が良性試料における発現の10倍を超える33個の遺伝子の選抜候補リスト(short list)を選定した。これら33個の遺伝子には、悪性黒

50

色腫と関連のある既知の多くの遺伝子 [例えば、NTRK3 (スー(Xu)等(2003))、L1CAM (フォーゲル(Fogel)等(2003))およびティース(Thies)等(2002))、me20m (アダマ(Adema)等(1994))だけでなく新規な諸遺伝子] が包含される。表10に、黒色腫試料における過剰発現が10倍を超える遺伝子を示す。

【0102】

【表10】

Psid	説明	黒色腫における中央値の発現量	フォールドチェンジ (ガン試料対良性母斑試料)	フォールドチェンジ (ガン試料対正常皮膚試料)
215025 at	NTRK3	2365	149	93
215311 at	EUROIMAGE 21920	10093	86	30
213960 at	EUROIMAGE 51358	11768	80	29
219478 at	WFDC1	5485	80	18
218839 at	HEY1	1996	38	7
215115 x at	TEL oncogene	12421	34	15
221577 x at	PLAB	4897	28	38
217377 x at	ETV6-NTRK3 fusion	12402	27	18
213638 at	PHACTR1	1827	26	102
204709 s at	KNSL5	312	24	16
221909 at	Hyp protein FLJ14627	243	22	17
204584 at	L1CAM	9677	21	15
209875 s at	SPP1	3038	21	12
217624 at	PDAP1	349	21	20
203071 at	SEMA3B	958	19	3
213587 s at	C7ORF32	10416	18	9
221815 at	ABHD2	3293	17	144
219578 s at	CPEB1	1419	17	26
207144 s at	CITED1	593	17	24
203069 at	SV2A	560	15	13
218678 at	NES	11356	14	20
219152 at	PODXL2	365	13	10
205447 s at	MAP3L12	567	13	5
213274 s at	CTSB	18263	12	26
219555 s-at	BMO39	402	12	21
203827 at	WIPI49	3380	11	8
205813 s at	MAT1A	430	11	9
201850 at	CAPG	11103	10	20
205373 at	CTNNA2	579	10	8
214614 at	HLXB9	542	10	9
213217	ADCY2	5848	10	6
204014 at	DUSP4	7184	10	46
214893	HCN2	214	10	9

本発明者らは、NTRK3、PLAB、L1CAMを包含する、黒色腫に過剰発現した3種の遺伝子を更に選定して、マイクロアレイの結果(図3)の定量的リアルタイムRT-PCRによる確認を行った。PLABは、新規な遺伝子であり、黒色腫におけるその特異的発現は、本発明者らが最良に認識する前には報告されていなかった。L1CAMおよびNTRK3の、黒色腫における特異的発現は、タンパク質レベルでのみ例証されていた[スー等(2003)、フォーゲル等(2003)およびティース等(2002)]。更に、本発明者らは、相補的な原理(complementary basis)に基づき、本発明者らの研究において良性組織/正常組織から黒色腫を類別するためには、PLABおよびL1CAMが最良の組合せであることを確認した。GP100は、黒色腫に特異なマーカーであることが知られており、正の対照(positive control)として選定した。前記RT-PCRアッセイを行うため、本発明者らは、14個の初期の黒色腫試料、7個の良性母斑試料および5個の正常皮膚試料であって、前記のマイクロアレイの研究のために使用した同一の組織から分離された該試料のパネル(panel)を使用した。各々の遺伝子の発現値は、ハウスキ

ーピング対照遺伝子(housekeeping control gene) P B G D に対して正規化した(normalized)。L 1 C A M、N T R K 3、P L A B および g p 1 0 0 に対する R T - P C R 結果とマイクロアレイ結果との間の相関係数は、それぞれ、0 . 7 9、0 . 8 6、0 . 8 7 および 0 . 8 8 である。この結果は、該 R T - P C R 結果が該マイクロアレイデータと非常によく一致していることを示している。

【 0 1 0 3 】

実施例 5

特異的発現遺伝子の経路解析(pathway analysis)

インジェニユイティ(Ingenuity) (登録商標) 経路解析ソフトウェアアプリケーション(Pathway Analysis Software Application) [カリフォルニア州マウンテンビュー(Mountain View)、インジェニユイティ社(Ingenuity)] を用いて、黒色腫に特異的に発現する遺伝子の機能解析を行った。0 . 0 5 未満の p 値を有する標準的経路(canonical pathways) または機能的カテゴリーを選定した。無作為に選定した遺伝子を用いて、標準的経路の同定の特異性について試験した。

【 0 1 0 4 】

黒色腫を良性組織および正常組織から識別する潜在的機構(potential mechanism)に関する更なる識見を得るために、本発明者らは、インジェニユイティ経路解析ソフトウェアを使用して、黒色腫に関連する標準的経路を同定した。それらの結果を解析して、アミロイドプロセッシングにおける遺伝子の多くは、黒色腫試料において発現上昇されることが明らかとなった。本発明者らの観察結果が特異的であることを立証するために、本発明者らは、アフィメトリクス(Affymetrix) H u 1 3 3 A マイクロアレイから遺伝子の3つの無作為リストを選定し、次いで、それらのインジェニユイティ経路解析を行った。これらのリストはいずれも、アミロイドプロセッシング(amyloid processing)に対しても、他のどの標準的経路に対しても、有意な関連性を示さなかった。黒色腫に関するこの標準的経路の活性化を確認するため、該経路に関する全ての遺伝子の遺伝子発現データを検索した。黒色腫組織と良性母斑組織 / 正常皮膚組織との間の特異的発現の p 値とフォールドチェンジ(fold-change)とを算出した。アミロイドプロセッシング経路に含まれる34個の遺伝子[エスラー(Esler)等(2001)およびジアンコッチ(Giancotti)等(1999)]のうち25個は、発現上昇の傾向を例証し、また、それらの19個(56%)に対する特異的発現は、統計的に有意であった(p値<0.05; 図4)。本発明者らは、追加的対照として、類似番号の遺伝子を有する2つの代謝経路(metabolic pathways)を無作為に選定した。アラニン(alanine)合成経路に関する63個の遺伝子のうち、それらの8個(13%)は、有意な発現上昇を示し、p値は0.05未満であった。ヒスチジン(histidine)合成経路に関する47個の遺伝子のうち、僅か2個の遺伝子(4%)は、同一の判定基準を使用して見出だされた。本発明者らのデータによって初めて、アミロイドプロセッシング経路の活性化が悪性黒色腫に含まれることが、強く示された。

【 0 1 0 5 】

実施例 6

マイクロアレイ結果の R T - P C R による確認

各々の試料からの全RNA 10 μg を、D N a s e I で処理し、次いで、製造業者の取扱説明書[カリフォルニア州カールズバッド(Carlsbad)、インビトロジェン社(Invitrogen)] に従い、スーパースク립ト(Superscript)II 逆転写酵素を用いて、オリゴ(dT)プライマーで逆転写させた。対照遺伝子 P B G D は、事前に試験が行なわれ、ハウスキーピング遺伝子として報告された[バンデサンペレ(Vandesompele)等(2003)]。m e 2 0 m (g p 1 0 0)、L 1 C A M、N T R K 3 および対照遺伝子 P B G D のためのプライマーと M G B プローブとは、プライマー・エクスプレス(Primer Express)ソフトウェアを用いて設計した[カリフォルニア州フォスターシティ(Foster City)、アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems)]。P L A B (M I C 1) 遺伝子プローブは、T A M R A ベースであった。なぜなら、M G B ベースプローブを設計するには、配列が不十分であったからである。プライマー/プローブ配列は、次の通りである。

【 0 1 0 6 】

【表 1 1】

説明	配列	配列 ID 番号
me20m フォワード	TGTGTCTCTGGCTGATACCAACA	983
me20m リバース	TTCTTGACCAGGCATGATAAGCT	984
me20m プローブ	(6-FAM) CTGGCAGTGGTCAGC	985
L1CAM フォワード	GCTGGGACTGGGAACAGAACT	10
L1CAM リバース	GGAGCAGAGATGGCAAAGAAA	11
L1CAM プローブ	(6-FAM) TCCCCACCATCTGCTGT	12
NTRK3 フォワード	GCCCCGGCACCCCTTTA	16
NTRK3 リバース	AACCCTGCCAGTGGTGGAT	17
NTRK3 プローブ	(6-FAM) CAGATGGGTGTTTTC	18
PLAB フォワード	GGCAGAATCTTCGTCCGCA	4
PLAB リバース	GGACAGTGGTCCCCGTTG	5
PLAB プローブ	(6-FAM) CCCAGCTGGAGTTGCACTTGC GGCC(TAMRA)	6
PBGD フォワード	CTGCTTCGCTGCATCGCTGAAA	986
PBGD リバース	CAGACTCCTCCAGTCAGGTACA	987
PBGD プローブ	(6-FAM) CCTGAGGCACCTGGAAGGAGGCTGCAGTGT(TAMRA)	988

プライマーおよびプローブは全て、90%を超える最適増幅効率を得るために試験を行った。標準曲線は、 $10 \sim 10^6$ の範囲のコピー数(copy numbers)を有する、標的遺伝子のPCR生成物の、6個の10倍希釈物で構成された。RT-PCRによる増幅は、テンプレートcDNA 50 ngと、2×TaqMan(登録商標)ユニバーサルPCRマスター混合物(12.5 μL)[カリフォルニア州フォスターシティ、アプライド・バイオシステムズ社]と、500 nMのフォワードプライマーおよびリバースプライマーと、250 nMのプローブとを含有する20 μL反応混合物で実施した。反応は、ABI PRISM 7900 HT配列検出装置(Sequence Detection System)[カリフォルニア州フォスターシティ、アプライド・バイオシステムズ社]で行った。サイクリング条件は、50 で2分間のAmplifyase UNG活性化、95 で10分間のポリメラーゼ活性化、95 で15秒間の50サイクル、および、60秒間のアニーリング温度(60)であった。各々のアッセイにおいて、テンプレートcDNAと共に標準曲線およびブランク試料液(no-template control)は、関心ある遺伝子と対照遺伝子との両方の複製の中に含めた。各々の標的遺伝子の相対量は、 C_t と表わした。 C_t は、対照遺伝子の C_t によって減算された、標的遺伝子の C_t と同等である。

【 0 1 0 7 】

前記マイクロアレイ解析によって同定された、黒色腫特異の遺伝子を確認するために、4種の遺伝子(L1CAM、NTRK3、PLABおよびgp100)を選定して、定量的リアルタイムRT-PCRによる確認を行った(図4)。各々の遺伝子の発現値は、ハウスキーピング対照PBGDに対して正規化した。L1CAM、NTRK3、PLABおよびgp100についての、該RT-PCR結果と該マイクロアレイ結果との間の相関係

数はそれぞれ、0.79、0.86、0.87および0.88であり、このことは、該RT-PCR結果が、マイクロアレイのデータと非常によく一致することを示している。

【0108】

実施例7

RNAに特異的なプライマーを用いたワンステップ定量的RT-PCRアッセイ、および、カットオフの設定

選定された遺伝子の発現の評価は、初期の黒色腫、良性母斑、正常皮膚、黒色腫リンパ節の転移部、および、黒色腫非含有リンパ節由来のRNAを用いたワンステップRT-PCRによって行った。それら反応におけるRNAの入力質量および入力品質のための対照に対するハウスキーピング遺伝子として、 β -アクチンを使用した。DNase処置は使用しなかった。その代わりに、プライマーまたはプローブは、それらがゲノムDNAについて記録しないよう、イントロンに及ぶように設計した。該RT-PCRのために全RNA 8 ngを使用した。全RNAは、TaqMan (登録商標)ワンステップ(One Step)PCRマスター・ミックス・リジェンツ・キット(Master Mix Reagents Kit) [カリフォルニア州フォスターシティー、アプライド・バイオシステムズ社]に入っている40Xマルチスクライブ(Multiscribe)およびRNaseインヒビター混合物を使用して、全RNAを逆転写させた。次いで、UNGを含有しない2xマスター混合物にcDNAをさらし、次いで、ABI 7900HT配列検定装置 [カリフォルニア州フォスターシティー、アプライド・バイオシステムズ社]によって、10 μ Lの反応サイズ(reaction size)を使用する384ウェルブロックフォーマット(384-well block format)でPCR増幅を行った。プライマーおよびプローブの濃度は、それぞれ、4 μ Mおよび2.5 μ Mであった。反応混合物は、逆転写を行うために48 で30分間低温放置し、次いで、95 で10分間のアンプリタック(Amplitaq)活性化段階にかけ、最終的に、95 で15秒間の変性段階と60 で1分間のアニールおよび延伸の段階との40サイクルにかけた。各々のプレートによる標準曲線は、8 pgから80 ngまで作り出され、 R^2 値が0.99より大きくなった時、サイクル閾(Cycle Threshold) (Ct) 値を受け入れた。

【0109】

それらの反応で使用した配列は次の通りであり、それぞれ、5' - 3'方向に記載されている。

【0110】

10

20

30

【表 1 2】

説明	配列	配列 ID 番号
L1CAM フォワード	CCACAGATGACATCAGCCTCAA	13
L1CAM リバース	GGTCACACCCAGCTCTTCCTT	14
L1CAM プローブ	TGGCAAGCCCGAAGTGCAGTTCC	15
Tyrosinase フォワード	CTTTAGAAATACACTGGAAGGATTTGCTA	1000
Tyrosinase リバース	CATTGTGCATGCTGCTTTGA	1001
Tyrosinase プローブ	TCCACTTACTGGGATAGCGGATGCCTC	1002
MART1 フォワード	ACTTCATCTATGGTTACCCCAAGAA	1003
MART1 リバース	TCCCAGCGGCCTCTTCA	1004
MART1 プローブ	CACGGCCACTCTTACACCACGGC	1005
HMB45 フォワード	CTTAAGGCTGGTGAAGAGACAAGTC	1006
gp100 リバース	CAGGATCTCGGCACITTTCAATAC	1007
gp100 プローブ	TCGATATGGTTCCTTTTCCGTCACCCTG	1008
PLAB フォワード	ATTCGAACACCGACCTCGTC	1009
PLAB リバース	CGCAGGTGCAGGTGGC	1010
PLAB プローブ	GATACTCACGCCAGAAGTGCGGCT	1011

各々の試料について、 $C_t = C_t(\text{標的遺伝子}) - C_t(\text{アクチン})$ を算出した。

C_t は、臨床的RT-PCRアッセイにおいて広く用いられており、また、簡便法(straightforward method)として選定された[クロニン(Cronin)等(2004)]。初期試料とリンパ節試料とを含む、黒色腫試料と非黒色腫試料との間の C_t についてのt検定を行った。本発明者らは、次いで、 C_t を用いて、各々の患者に対する2つのスコア(scores)を組み立てた。一方のスコアは、黒色腫に特異な2個の遺伝子、PLABおよびL1CAM、の組合せから誘導した。他方のスコアは、従来の3個の黒色腫マーカー、チロシナーゼ、gp100およびMART1、の組合せから誘導した。該スコアは、重みとして対応する統計量tを有する、試験した遺伝子の C_t 値の重み付き合計として規定された。2つのスコアは、同一尺度でそれらと比較するために、同一の意味を有するように正規化した。

【0111】

本発明者らは、悪性黒色腫(初期黒色腫および黒色腫リンパ節転移部)試料、良性メラニン形成細胞(良性皮膚母斑)試料ならびに正常(正常皮膚および黒色腫非含有リンパ節)試料を含む様々な臨床的組織試料で、RT-PCRによって、黒色腫遺伝子に著しく過剰発現した2個、PLABおよびL1CAM、の組合せを調べた。初期組織は、マイクロアレイ研究のために使用したものと同一であったが、リンパ節試料は全て、独立した患者から得られた。従来の黒色腫マーカー(例えば、チロシナーゼ、gp100およびMART1)も、対照として同一試料で調べた。なぜなら、それらは、現行の臨床研究における黒色腫分子アッセイのために最も一般的に使用されているマーカーであるからである[リンボルディ(Rimboldi)等(2003)、エーブラハムセン(Abrahamsen)等(2005)およびカムムラ(Kammula)等(2004)]。算出されたスコアは、PLABおよびL1CAMについては図4Aに、また、チロシナーゼ、gp100およびMART1については図4Bに示した。これらの結果によって、悪性黒色腫(初期黒色腫およびリンパ節転移部

）試料と良性母斑および正常リンパ節との間でP L A BおよびL 1 C A Mの発現に有意差があることが例証された。対照的に、従来 of 3 個のマーカ-は、良性試料および黒色腫試料に類似の発現レベルを示した。遺伝子マーカ-の、良性組織と悪性組織とを類別する能力を更に例証するために、本発明者らは、2つのカットオフを調べた。第1のカットオフは初期の正常試料における最大スコアとして設定し、また、第2のカットオフは、良性母斑試料における最大スコアとして設定した。本発明者らは、各々のカットオフについて、リンパ節試料の感度を評価した。該正常試料に基づいて決定されたカットオフを用いれば、新規なマーカ-および従来 of マーカ-は、それぞれ、90%および83%の感度を提供した。該良性試料に基づいて決定されたカットオフを用いれば、新規なマーカ-および従来 of マーカ-の感度は、それぞれ、88%および42%であった。これらの結果によって、それらの新規なマーカ-は、良性メラニン形成細胞および悪性メラニン形成細胞を含む組織を識別する、より優れた能力を潜在的に有することが示される。

10

【0112】

実施例8

多重アッセイ(Multiplex Assay)

材料および方法

各々の反応は、下記のもの：

フォワードプライマー	400 nM	
リバースプライマー	500 nM	
P L A Bプローブ	150 nM	20
チロシナーゼプローブ	300 nM	
L 1 C A Mプローブ	200 nM	
P B G Dプローブ	200 nM	
T t h	5 U	
A b T P 6 - 2 5	1 μg	
グリセロール	10%	
T r i s - H C l	3.7 mM	
N a C l	4 mM	
E D T A	0.004 mM	
T w e e n - 2 0	0.22%	30
N P - 4 0	0.02%	
D T T	0.04 mM	
水酸化ナトリウム	20.5 mM	
ピシン(bicine)	50 mM	
酢酸カリウム	115 mM	
ウシアルブミン	5 μg	
トレハロース(trehalose)	0.15 M	
d N T P	それぞれ0.2 mM	
M g C l ₂	0.5 mM	
M n S O ₄	3.5 mM	40
プライマー	それぞれ300 nM	
プローブ	それぞれ200 nM、	

を含有する25 μLの最終容量で設定した。

表13に、それらのプライマーおよびプローブの配列を提供する。

【0113】

【表 1 3】

配列 ID 番号:	配列 5'-3'	機能
43	gaacaccgacctcgtccc	PLAB アッププライマー
44	ggcggcccagagagata	PLAB ロウアプライマー
45	Fam-cgccagaagtgcggctgggat-BHQ1-tt	PLAB プローブ
55	actcagcccagcatcattctc	Tyr アッププライマー
56	atggctgtgtactcctccaatc	Tyr ロウアプライマー
57	Q570-cttctcctcttggcagattgtctgtagc BHQ2-tt	Tyr プローブ
49	ccacagatgacatcagcctcaa	LICAM アッププライマー
50	ggtcacaccccagctctcctt	LICAM ロウアプライマー
51	CalRed-tggcaagcccgaagtgcagtcc-BHQ2-tt	LICAM プローブ
58	ccacacacagcctacttccaa	PBGD アッププライマー
59	taccacagcgaatcactctca	PBGD ロウアプライマー
60	Q670-aacggcaatgcggctgcaacggcggaa-BHQ2-tt	PBGD プローブ

前記諸反応は、FamチャネルのPLAB、Cy3チャネルのチロシナーゼ、Texas RedチャネルのLICAM、および、Cy5チャネルのPBGDを用いて行った。使用したサイクリングのプロトコルは、以下に記述されるが、完了するのに30分かかる。

- 95 × 15 秒、
- 65 × 420 秒、
- 95 で 5 秒間、
- 62 で 15 秒間 - 蛍光読み値 (fluor read)

の 40 ° サイクル

【 0 1 1 4 】

使用した閾値は、Famチャネルで30、Cy3チャネルで20、Texas Redチャネルで20、Cy5チャネルで20である。Cy3チャネルおよびTexas Redチャネルで使用した閾値は、低下させることができる。表14に、得られた結果をまとめる。

【 0 1 1 5 】

【表 1 4】

マーカーの最良の組合せ

マーカー	感度 (%) (95%CI)	特異度 (%) (95%CI)
LICAM + PLAB	82 (73-89)	96 (87-100)
チロシナーゼ + ME20M (GP100)	63 (52-72)	100 (94-100)
LICAM + PLAB + チロシナーゼ	87 (79-93)	96 (87-100)

Ctカットオフ:

- LICAM 27
- PLAB 29
- チロシナーゼ 23
- ME20M (gp100) 23.5

【 0 1 1 6 】

注意: これらのデータは、ヘマトキシリン・エオジン染色の病理学(H&E pathology)に対してのみ基準となる。前記の4つの反応の各々における増幅効率は高く、しかも、該反応はまた、(全ての場合において、 > 0.99 である R^2 値によって判定されるように) 5 logsを上回る直線性である。したがって、これらのデータは、ワーキング4プレックスの迅速アッセイを例証する。これらのデータは、PLABが、LICAMと共に達成される第1のマーカーであり、かつ、相補的であり、感度を更に増大させることを示唆

している。必要に応じて、第3のマーカ―としてのチロシナーゼを添加すれば、L1CAMおよびPLABが更に相補されて、感度が増大する。チロシナーゼは、必要ならば、残りのマーカ―の性能に悪影響を及ぼすことなく、アッセイから取り除くことができる。

【0117】

解説

本発明者らは、リンパ節分子の病期診断アッセイにおいて潜在的に使用される、黒色腫特異の遺伝子マーカ―を見出だすために、初期黒色腫、良性母斑および正常皮膚組織の試料の遺伝子発現プロファイル解析を行った。悪性黒色腫試料に特異的にかつ非常によく発現する新規な複数の遺伝子を同定した。実験設計に良性母斑を含ませることが、本発明者らの研究の秘訣(key)であった。良性母斑中のメラニン形成細胞含有量は、正常皮膚とは

10

対照的に、黒色腫中のメラニン形成細胞含有量に近い。このことは、組織学的評価に加えて、黒色腫試料と母斑組織試料との両方に対する、従来黒色腫マーカ―(例えば、チロシナーゼおよびMART1)の発現レベルが同等に高いことによって確認された。類似の細胞組成(cellular composition)によって、本発明者らは、メラニン形成細胞の系統分化(lineage differentiation)と関連するだけでなく、メラニン形成細胞の悪性転換(malignant transformation: 悪性化)と特異的に関連する遺伝子発現の変化を監視することができた。その結果、本発明者らは、黒色腫に対して特異的に過剰発現する新規な複数の遺伝子を同定した。黒色腫に対して非常によく過剰発現するそれら新規な遺伝子の1つである、前立腺特異因子(PLAB、MICI)は、トランスフォーミング増殖因子-スーパーファミリー(transforming growth factor-beta superfamily)のメンバーであり、他の悪性疾患と関連していることも知られている[ベ(Bae)等(2003)およびウェルシュ(Welsh)等(2003)]。PLABは、細胞粘着(cell adhesion)を減少させ[ヤマウチ(Yamauchi)等(2003)]、黒色腫の進行におけるその潜在的役割に影響を与える。黒色腫に対する過剰発現遺伝子の経路解析は、これらの遺伝子の多くが神経組織の機能(functioning)および成長に属していることを示し、また、メラニン形成細胞の脱分化(dedifferentiation)と多能化性前駆細胞(pluripotent progenitor cell)に関連する過程の活性化とは、黒色腫の成長および進行にとって重要であるのかもしれないということを示唆した。更に、標準的経路(canonical pathways)の解析によって、アミロイドプロセッシングに関連する神経組織は、黒色腫に有意に変調される(modulated)ことが分かった。アミロイド

20

30

40

【0118】

我々本発明者らは、我々の結果をハク(Haqq)等(2005)の最近の研究と比較した。ハク等の研究における20,862個のプロープを含有するcDNAマイクロアレイを使用して、良性母斑試料、初期黒色腫試料および転移性黒色腫試料のプロファイルをまとめた。その試料セットには、転移性黒色腫、初期黒色腫および良性母斑が含まれた。彼等の研究においては、良性母斑組織と初期悪性黒色腫組織とが類別された類似のクラスタリング結果が見出だされた。両方の研究において、黒色腫を良性母斑から識別することのできる共通の遺伝子であって、キネシン様(kinesin-like)5(KNSL5)、前立腺分化因子(PLAB)、CITED1、オステオポンチン(osteopontin)(SPP1)、カテプシン(cathepsin)B(CSTB)、カドヘリン(cadherin)3(CDH3)、プレセニリン(pr

50

esenilin) 2 (P S E N 2) を包含する遺伝子が報告された。

【 0 1 1 9 】

ワンステップ R T - P C R アッセイに関する本発明者らの結果によって、新規な黒色腫特異遺伝子である P L A B および L 1 C A M は、初期黒色腫組織に対してだけでなく、黒色腫リンパ節転移部に対しても発現することが例証された。更に、前記の新規遺伝子は、悪性黒色腫を良性母斑から識別する能力によって、黒色腫診断装置の分子試験のための従来の諸マーカーに比べてより優れた候補となる。臨床的研究で更なる確認を行うことによって、これらの新規遺伝子は、分子的病期診断アッセイ (molecular staging assay) のための特異マーカーとして開発されて、前哨リンパ節 (S L N) の生体組織検査操作が行われる間に黒色腫の微小転移を検出することができるであろう。これらの新規遺伝子のもう 1 つの潜在的用途は、不確実な病理学的特徴を有する色素細胞性病変を診断するものである。

10

【 0 1 2 0 】

前述の発明は、理解を明瞭にする目的で、説明図および実施例によってある程度詳細に記述されてきたものの、それらの説明図および実施例は、本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきでない。

【 0 1 2 1 】

【表 15 - 1】

配列、説明、名称および配列 I D 番号

1			PLAB	
2			L1CAM	
3			NTRK	
4				PLABフォワードプライマー
5				PLABリバースプライマー
6				PLABプローブ
7				PLABアッパープライマー
8				PLABロウアープライマー
9				PLABプローブ
10				L1CAMフォワードプライマー
11				L1CAMリバースプライマー
12				L1CAMプローブ
13				L1CAMアッパープライマー
14				L1CAMロウアープライマー
15				L1CAMプローブ
16				NTRKプライマー
17				NTRKプライマー
18				NTRKプローブ
19				チロシナーゼ・アッパープライマー
20				チロシナーゼ・ロウアープライマー
21				チロシナーゼ・プローブ
22				PBGDアッパープライマー
23				PBGDロウアープライマー
24				PBGDプローブ
25				PLABアンプリコン
26				L1CAMアンプリコン
27				チロシナーゼ・アンプリコン
28				PBGDアンプリコン
29	200078_s_at	BC005876		H+輸送性ATPase、リソソーム
30	200601_at	U48734		非筋肉 α -アクチニン
31	200612_s_at	NM_001282	AP2B1	アダプター関連タンパク質複合体2, β 1
32	200644_at	NM_023009	MACMARCKS	マクロファージ・ミリスチル化アラニン リッチCキナーゼ基質
33	200660_at	NM_005620	S100A11	S100カルシウム結合性タンパク質A11
34	200707_at	NM_002743	PRKCSH	タンパク質キナーゼC基質80K-H
35	200736_s_at	NM_000581	GPX1	グルタチオンペルオキシダーゼ1
36	200737_at	NM_000291	PGK1	ホスホグリセレートキナーゼ1
37	200783_s_at	NM_005563	LAP18	白血病関連リンタンパク質p18
38	200825_s_at	NM_006389	ORP150	酸素調整タンパク質(150kD)
39	200827_at	NM_000302	PLOD	プロコラーゲン-リシン, 2-オキシグル タレート 5-ジオキシゲナーゼ
40	200837_at	NM_005745	DXS1357E	アクセサリタンパク質BAP31BAP29
41	200838_at	NM_001908	CTSB	カテプシンB
42	200839_s_at	NM_001908	CTSB	
43	200859_x_at	NM_001456	FLNA	フィラミンA, α
44	200910_at	NM_005998	CCT3	シャペロン含有TCP1、サブ3(Y)
45	200950_at	NM_006409	ARPC1A	アクチン関連タンパク質23複合体、 サブ1A
46	200950_at	NM_006409	ARPC1A	
47	200966_x_at	NM_000034	ALDOA	アルドラーゼA、フルクトース-ビスリン酸
48	200967_at	NM_000942	PPIB	ペプチジルプロピル・イソメラーゼB
49	200968_s_at	NM_000942	PPIB	
50	200972_at	BC000704		テトラスパン3

10

20

30

40

【表 15 - 2】

51	201038_s_at	BE560202		推定されるHLAクラスII関連タンパク質1
52	201051_at	BE560202		推定されるHLAクラスII関連タンパク質1
53	201105_at	NM_002305	LGALS1	レクチン、ガラクトシド結合性、可溶性、1
54	201106_at	NM_002085	GPX4	グルタチオンペルオキシダーゼ4
55	201188_s_at	D26351	ITPR3	3型イノシトール1,4,5-トリリン酸受容体
56	201189_s_at	NM_002224	ITPR3	L-型アミノ酸トランスポーター1
57	201195_s_at	AB018009		増殖性細胞核抗原
58	201202_at	NM_002592	PCNA	ピルビン酸キナーゼ、筋肉
59	201251_at	NM_002654	PKM2	プロテアソーム26Sサブユニット、ATPase、4
60	201252_at	NM_006503	PSMC4	RNA-結合性タンパク質転写産物変異体1
61	201271_s_at	NM_016732	RALY	トポイソメラーゼ(DNA)II α
62	201291_s_at	NM_001067		エノラーゼ
63	201313_at	NM_001975	ENO2	仮想タンパク質FLJ21432
64	201346_at	NM_024551	FLJ21432	インスリン様成長因子2受容体
65	201393_s_at	NM_000876	IGF2R	SRY-ボックス4
66	201416_at	NM_003107		SRY-ボックス4
67	201417_at	NM_003107		グルタチオン-S-転移酵素様；
68	201470_at	NM_004832	GSTTLp28	グルタチオン転移酵素 ω
69	201474_s_at	NM_002204	ITGA3	インテグリン、 α 3転写産物変異体a
70	201485_s_at	BC004892	RCN2	レチキュロカルビン2、EF-ハンドカルシウム結合性ドメイン
71	201486_at	NM_002902	RCN2	
72	201536_at	AL048503		DKFZp586M1524
73	201614_s_at	NM_003707	RUVBL1	RuvB(大腸菌相同体)様1
74	201660_at		FACL3	脂肪酸-補酵素Aリガーゼ、長鎖3
75	201661_s_at	NM_004457	FACL3	
76	201662_s_at	D89053		アシル-補酵素Aシンセターゼ3
77	201670_s_at	M68956	MARCKS80K-L	ミリストイル化アラニンリッチCキナーゼ基質
78	201714_at	NM_001070	TUBG1	チューブリン、 γ 1
79	201765_s_at	AL523158		ヘキソサミニダーゼA
80	201792_at	NM_001129	AEBP1	AE結合性タンパク質1
81	201804_x_at	NM_001281	CKAP1	細胞骨格関連タンパク質1
82	201819_at	NM_005505	CD36L1	CD36抗原様1
83	201850_at	NM_001747	CAPG	キャッピングタンパク質ゲルソリン様
84	201880_at	NM_005744		アリアドネ(ショウジョウバエ)相同体ユビキチン結合酵素E2結合性タンパク質、1
85	201910_at	BF213279	FARP1	RhoGEFおよびプレクストリン・ドメイン1
86	201911_s_at	NM_005766	FARP1	
87	201931_at	NM_000126	ETFA	電子伝達フラビタンパク質、 α
88	201954_at	NM_005720	ARPC1B	ポリペプチド
89	201976_s_at	NM_012334	MYO10	アクチン関連タンパク質23com,サブ1A
90	202069_s_at	A1826060	IDH3A	ミオシンX
91	202070_s_at	NM_005530	IDH3A	イソクエン酸脱水素酵素3 α
92	202111_at	NM_003040	SLC4A2	溶質キャリアファミリー4アニオン交換体mem2
93	202154_x_at	NM_006086	TUBB4	チューブリン、 β ,4
94	202185_at	NM_001084	PLOD3	プロコラーゲン-リシン、2-オキソグルタレート5-ジオキシゲナーゼ

10

20

30

40

【表 15 - 3】

95	202188_at	NM_014669	KIAA0095	KIAA0095遺伝子産物
96	202219_at	NM_005629	SLC6A8	溶質キャリアファミリー6, メンバー8
97	202224_at	NM_016823		v-crkトリ肉腫ウィルスCT10ガン遺伝子相同体
98	202225_at	NM_016823		v-crkトリ肉腫ウィルスCT10ガン遺伝子相同体
99	202260_s_at	NM_003165	STXBP1	シタキシン結合性タンパク質1
100	202295_s_at	NM_004390	CTSH	カテプシンH
101	202329_at	NM_004383	CSK	c-srcチロシンキナーゼ
102	202367_at	NM_001913	CUTL1	cut (ショウジョウバエ) 様1
103	202370_s_at	NM_001755	CBFB	コア結合性因子, β サブユニット転写産物変異体2
104	202478_at	NM_021643	GS3955	GS3955タンパク質
105	202503_s_at	NM_014736	KIAA0101	KIAA0101遺伝子産物
106	202589_at	NM_001071	TYMS	チミジル酸生成酵素
107	202603_at	N51370		ジスインテグリンおよびメタロプロテアーゼドメイン10
108	202705_at	NM_004701	CCNB2	サイクリンB2
109	202737_s_at	NM_012321	LSM4	U6 snRNA関連Sm様タンパク質
110	202779_s_at	NM_014501	E2-EPF	ユビキチンキャリアタンパク質
111	202785_at	NM_005001	NDUFA7	NADH脱水素酵素1 α サブコンプレックス, 7
112	202862_at	NM_000137	FAH	フマリリアセト酢酸
113	202898_at	NM_014654	KIAA0468	KIAA0468遺伝子産物
114	202954_at	NM_007019	UBCH10	ユビキチンキャリアタンパク質E2-C
115	202958_at	NM_002833	PTPN9	タンパク質チロシンホスファターゼ, 非受容体9型
116	202961_s_at	NM_004889	ATP5J2	ATPシンターゼ, H ⁺ 輸送性, ミトコンドリアFO複合体, サブユニットf, アイソフォーム2
117	202986_at	NM_014862	KIAA0307	KIAA0307遺伝子産物
118	203011_at	NM_005536	IMPA1	イノシトール (ミオ) -1 (または4)-モノリン酸塩1
119	203022_at	NM_006397	RNASEHI	リボヌクレアーゼHI, ラージサブユニット
120	203069_at	NM_014849	KIAA0736	KIAA0736遺伝子産物
121	203071_at	NM_004636	SEMA3B	セマドメイン, Igドメイン, ショートベジックドメイン, 分泌されたもの, 3B
122	203094_at	NM_014628	KIAA0110	cDNAから予想される遺伝子
123	203145_at	NM_006461	DEEPEST	紡錘体・コイルドコイル関連
124	203167_at	NM_003255	TIMP2	メタロプロテイナーゼ2の組織インヒビター
125	203217_s_at	NM_003896	SIAT9	シアリルトランスフェラーゼ
126	203234_at	NM_003364	UP	ウリジンホスホリラーゼ
127	203256_at	NM_001793	CDH3	カドヘリン3, 1型, P-カドヘリン (胎盤)
128	203262_s_at	NM_004699	DXS9928E	染色体X9928発現配列
129	203300_x_at	NM_003916	AP1S2	アダプター関連タンパク質複合体1, σ 2サブユニット
130	203315_at	BC000103		NCKアダプタータンパク質2,
131	203366_at	NM_002693	POLG	ポリメラーゼ (DNAディレクテッド), γ
132	203396_at	NM_002789	PSMA4	プロテアソーム・サブユニット, α 型, 4
133	203452_at	NM_012200	B3GAT3	β -1,3-グルクロン酸転移酵素3
134	203456_at	NM_007213	JM4	JM4タンパク質
135	203502_at	NM_001724	BPGM	2,3-ビスホスホグリセリン酸 Δ ターゼ
136	203518_at	NM_000081	CHS1	チェディアック・東症候群1
137	203554_x_at	NM_004219	PTTG1	下垂体腫瘍トランスフォーミング1

10

20

30

40

【表 15 - 4】

138	203557_s_at	NM_000281	PCBD	肝細胞核因子1 α の6-ピルボイル-テトラヒドロプテリンシンターゼ二量体化補助因子
139	203570_at	NM_005576	LOXL1	リシルオキシダーゼ様1
140	203590_at	NM_006141	DNCL12	ダイニン, 細胞, 軽鎖・中間鎖ポリペプチド2
141	203643_at	NM_006494	ERF	Ets2転写抑制因子
142	203663_s_at	NM_004255	COX5A	シトクロムcオキシダーゼサブユニットVa
143	203668_at	NM_006715	MAN2C1	マンノシダーゼ, α , クラス2C, メンバー1
144	203693_s_at	NM_001949	E2F3	E2F転写因子3
145	203695_s_at	NM_004403	DFNA5	難聴, 常染色体優性5
146	203723_at	NM_002221	ITPKB	イノシトール1,4,5-トリスホスフェート3キナーゼB
147	203729_at	NM_001425	EMP3	上皮膜タンパク質3
148	203730_s_at	BF196931	ZFP95	マウスのZfp952に相同する垂鉛フィンガータンパク質
149	203731_s_at	NM_014569	ZFP95	
150	203775_at	NM_014251	SLC25A13	溶質キャリアファミリー-25, メンバー13
151	203827_at	NM_017983	FLJ10055	仮想タンパク質FLJ10055
152	203878_s_at	NM_005940	MMP11	マトリックスメタロプロテイナーゼ11
153	204014_at	NM_001394	DUSP4	二重特異性ホスファターゼ4
154	204015_s_at	BC002671	DUSP4	
155	204033_at	NM_004237	TRIP13	甲状腺ホルモン受容体インターアクター13
156	204092_s_at	NM_003600	STK15	セリントレオニンキナーゼ15
157	204099_at	NM_003078	SMARCD3	SWISNF関連, マトリックス関連, クロマチンのアクチン依存性レギュレータ, サブファミリー-d, メンバー3
158	204170_s_at	NM_001827	CKS2	CDC28タンパク質キナーゼ2
159	204197_s_at	NM_004350	RUNX3	ラント(runt)関連転写因子3
160	204198_s_at	AA541630	RUNX3	
161	204202_at	NM_017604	KIAA1023	KIAA1023タンパク質
162	204228_at	NM_006347	USA-CYP	サイクロフィリン
163	204244_s_at	NM_006716	ASK	S相キナーゼ活性化剤
164	204247_s_at	NM_004935	CDK5	サイクリン依存性キナーゼ5
165	204252_at	M68520		cdc2関連タンパク質キナーゼ
166	204262_s_at	NM_000447	PSEN2	プレセニリン2転写産物変異体1
167	204423_at	NM_013255	MKLN1	ムスケリン(muskelin)1, 細胞内媒介物含有ケルヒモチーフ(kelch motifs)
168	204436_at	NM_025201	PP1628	仮想タンパク質PP1628
169	204458_at	AL110209		DKFZp564A0122
170	204467_s_at	NM_000345	SNCA	シヌクレイン, α 転写産物変異体NACP140
171	204584_at	AI653981	L1CAM	L1細胞粘着分子, MASA転写産物変異体1
172	204585_s_at	NM_000425	L1CAM	
173	204647_at	NM_004838	HOMER-3	Homer, 神経前初期遺伝子, 3
174	204654_s_at	NM_003220	TFAP2A	転写因子AP-2 α
175	204709_s_at	NM_004856	KNSL5	キネシン様5
176	204778_x_at	AW102783	HOXB7	ホメオボックスB7
177	204779_s_at	NM_004502	HOXB7	
178	204857_at	NM_003550	MAD1L1	MAD1様1
179	204932_at	BF433902		TNF受容体スーパーファミリー, メンバー11b
180	204973_at	NM_000166	GJB1	ギャップ結合タンパク質, β 1, 32kD
181	204995_at	AL567411		サイクリン依存性キナーゼ5, レギュレータサブユニット1(p35)
182	205051_s_at	NM_000222	KIT	v-kitハーディー・ズッカーマン4ネコ肉腫ウィルスガン遺伝子相同体

10

20

30

40

【表 15 - 5】

183	205142_x_at	NM_000033	ABCD1	ATP-結合性カセット, サブファミリーD (ALD), メンバー1	
184	205169_at	NM_005057	RBBP5	網膜芽細胞腫結合タンパク質5	
185	205373_at	NM_004389	CTNNA2	カテニン α 2	
186	205376_at	NM_003866	INPP4B	イノシトールポリホスフェート-4-ホスファターゼ, II型, 105kD	
187	205405_at	NM_003966	SEMA5A	セマドメイン, トロンボスポンジン7回繰返し, 膜貫通ドメインおよびショート細胞質ドメイン5A	
188	205447_s_at	BE222201		ミトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ12	10
189	205458_at	BG034972		メラノコルチン1受容体	
190	205566_at	NM_007011	HS1-2	想定される膜貫通タンパク質	
191	205591_at	NM_006334	AMY	神経芽細胞腫(神経組織)タンパク質	
192	205681_at	NM_004049	BCL2A1	BCL2関連タンパク質A1	
193	205690_s_at	NM_003910	G10	母系G10転写産物	
194	205691_at	NM_004209	SYNGR3	synaptogyrin 3	
195	205717_x_at	NM_002588	PCDHGC3	プロトカドヘリン γ サブファミリー-C, 3	
196	205813_s_at	NM_000429	MAT1A	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ1, α	
197	205937_at	NM_006569	CGR11	EF-ハンドドメインによる細胞成長の調節	
198	205945_at	NM_000565	IL6R	インターロイキン6受容体	20
199	205996_s_at	NM_013411	AK2 B	アデニレートキナーゼ2	
200	206128_at	AI264306		アドレナリン作用性, α -2C-, 受容体	
201	206307_s_at	NM_004472	FOXD1	フォークヘッドボックス(forkhead box)D1	
202	206332_s_at	NM_005531	IFI16	インターフェロン, γ -誘導性16	
203	206397_x_at	NM_001492	GDF1	成長分化因子1	
204	206441_s_at	NM_017828	FLJ20452	仮想タンパク質FLJ20452	
205	206462_s_at	NM_002530	NTRK3	神経栄養性チロシンキナーゼ, 受容体, 3型	
206	206503_x_at	NM_002675	PML	前骨髄球性白血病	
207	206617_s_at	NM_002910	RENBP	レニン結合タンパク質	
208	206630_at	NM_000372	TYR	チロシナーゼ	
209	206688_s_at	NM_006693	CPSF4	開裂およびポリアデニル化特異因子4, 30kDサブユニット	30
210	206696_at	NM_000273	OA1	眼球白化1	
211	206777_s_at	NM_000496	CRYBB2	クリスタリン, β B2	
212	206864_s_at	NM_003806	HRK	ハラキリ(harakiri), BCL2-相互作用性タンパク質	
213	206976_s_at	NM_006644	HSP105B	熱ショック 105kD	
214	207038_at	NM_004694	SLC16A6	溶質キャリアファミリー16メンバー6	
215	207060_at	NM_001427	EN2	エングレイルド(engrailed)相同体2	
216	207144_s_at	NM_004143	CITED1	Cbpb300相互作用性トランス活性化因子, GluAspリッチカルボキシ末端ドメイン含有, 1	
217	207163_s_at	NM_005163	AKT1	v-aktマウス胸腺腫ウィルスガン遺伝子相同体1	40
218	207183_at	NM_006143	GPR19	Gタンパク質連結受容体19	
219	207592_s_at	NM_001194	HCN2	過分極活性化環状ヌクレオチドドアーゲート(gated)カリウムチャネル2	
220	207614_s_at	NM_003592	CUL1	カリン(cullin)1	
221	207622_s_at	NM_005692	ABCF2	ATP結合カセット, サブファミリー-F, メンバー2	
222	207828_s_at	NM_005196	CENPF	セントロメアタンパク質F	

【表 15 - 6】

223	208002_s_at	NM_007274	HBACH	サイトソル(cytosolic)アシル補酵素Aチオエステル加水分解酵素	
224	208089_s_at	NM_030794	FLJ21007	仮想タンパク質FLJ21007	
225	208308_s_at	NM_000175	GPI	グルコースリン酸イソメラーゼ	
226	208540_x_at	NM_021039	S100A14	S100カルシウム結合タンパク質A14	
227	208644_at	M32721		ポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ	
228	208657_s_at	AF142408		細胞分裂制御タンパク質セプチンD1	
229	208677_s_at	AL550657		ベイシジン(Basigin)	
230	208696_at	AF275798		PNAS-102	
231	208710_s_at	AI424923		アダプター関連タンパク質複合体3, δ1サブユニット	10
232	208723_at	BC000350		ユビキチン特異プロテアーゼ11	
233	208744_x_at	BG403660		熱ショック 105kD	
234	208837_at	BC000027		インテグラル型Iタンパク質	
235	208916_at	AF105230	SLC1A5	中性アミノ酸輸送体	
236	208928_at	AF258341		NADPH-シトクロムP450還元酵素	
237	208956_x_at	U62891	DUT	デオキシウリジントリホスファターゼ	
238	208974_x_at	BC003572		カリオフィリン(インポーチン)β1	
239	208975_s_at	L38951		インポーチンβサブユニット	
240	209015_s_at	BC002446		DNAJファミリーメンバーのMRJ遺伝子	
241	209036_s_at	BC001917		リンゴ酸脱水素酵素2, NAD	
242	209053_s_at	AF083389		ウォルフ・ヒルシュホーン症候群候補1	20
243	209072_at	M13577	MBP	ミエリン塩基性タンパク質	
244	209079_x_at	AF152318	PCDH-gamma-A1	プロトカドヘリンγA1	
245	209081_s_at	NM_030582	COL18A1	コラーゲン, XVIII型, α1	
246	209123_at	BC000576		キノイドジヒドロプテリジン還元酵素	
247	209132_s_at	BE313890		仮想タンパク質FLJ20452	
248	209172_s_at	U30872		マイトシン	
249	209197_at	AA626780		KIAA0080タンパク質	
250	209198_s_at	BC004291		シナプトタグミン(synaptotagmin)11に類似	
251	209247_s_at	BC001661		ATP結合カセット, サブユニットファミリーF, メンバー2	
252	209254_at	AF277177		KIAA0265タンパク質	30
253	209255_at	AF277177		KIAA0265タンパク質	
254	209256_s_at	AF277177		PNAS-119	
255	209283_at	AF007162		未知のmRNA	
256	209345_s_at	AL561930		ホスファチジルイノシトール4-キナーゼII型	
257	209407_s_at	AF068892		Dukes型B結腸腺ガンのトランケイテッド・サブプレッシン(truncated suppressin)	
258	209515_s_at	U38654		Rab27a	
259	209773_s_at	BC001886		リボヌクレオチド還元酵素M2ポリペプチド	
260	209825_s_at	BC002906		ウリジンモノホスフェートキナーゼに類似	
261	209827_s_at	NM_004513	IL16	インターロイキン16	
262	209828_s_at	M90391		想定されるIL-16タンパク質前駆体	
263	209848_s_at	U01874		me20m	
264	209875_s_at	M83248		ネフロポンチン(nephropontin)	40
265	209932_s_at	U90223		デオキシウリジントリホスフェート・ヌクレオチド加水分解酵素前駆体	
266	210052_s_at	AF098158		制限発現増殖(restricted expressed proliferation)関連タンパク質100	
267	210073_at	L32867		α2,8-シアル酸転移酵素	
268	210111_s_at	AF277175		PNAS-138	
269	210127_at	BC002510		低分子GTPase RAB6B	

【表 15 - 7】

270	210854_x_at	U17986		GABAノルアドレナリン輸送体
271	210926_at	AY014272	FKSG30	FKSG30
272	210948_s_at	AF294627	LEF1	リンパ球エンハンサー因子1イソ型
273	210951_x_at	AF125393		Rab27イソ型
274	211013_x_at	AF230411		3要素モチーフタンパク質TRIM19 λ
275	211052_s_at	BC006364		クローンMGC:12705
276	211066_x_at	BC006439		プロトカドヘリンγサブファミリーA, 5に類似
277	211373_s_at	U34349	AD3LPAD5	7回膜貫通ドメイン
278	211564_s_at	BC003096		LIMドメインタンパク質に類似
279	211752_s_at	BC005954		クローンMGC:14592
280	211759_x_at	BC005969		クローンMGC:14625
281	211833_s_at	U19599		BAX δ
282	212000_at	AB002363		KIAA0365遺伝子産物
283	212070_at	AL554008		Gタンパク質連結受容体56
284	212081_x_at	AF129756	MSH55	MSH55
285	212119_at	BF348067		ホスファチジルイノシトールグリカン, クラスF
286	212178_s_at	AK022555		FLJ12493 fis
287	212193_s_at	BE881529		KIAA0731タンパク質
288	212247_at	AW008531		KIAA0225タンパク質
289	212285_s_at	AF016903		IMAGE:3506210
290	212312_at	AL117381		クロム(chrom)20のクローンRP5-857M17
291	212338_at	AA621962		KIAA0727タンパク質
292	212402_at	BE895685		KIAA0853タンパク質
293	212472_at	BE965029		FLJ22463 fis
294	212473_s_at	BE965029		FLJ22463 fis
295	212512_s_at	AA551784		共活性化因子関連アルギニンメチル化酵素-1
296	212520_s_at	AI684141		SWISNF関連
297	212552_at	BE617588		ヒポカルシン様
298	212715_s_at	AB020626		KIAA0819タンパク質
299	212739_s_at	AL523860		非転移性細胞4
300	212744_at	AI813772		クローンHQ0692
301	212745_s_at	AI813772		クローンHQ0692
302	212793_at	BF513244		KIAA0381タンパク質
303	212796_s_at	BF195608		KIAA1055タンパク質
304	213002_at	BF347326	MARCKS, 80K-L	ミリストイル化アラニン-リッチタンパク質 キナーゼC基質
305	213007_at	BG478677		ポリメラーゼ(DNAディレクテッド(directed)), γ
306	213008_at	BG478677		ポリメラーゼ(DNAディレクテッド), γ
307	213096_at	T51252		KIAA0481遺伝子産物
308	213131_at	R38389		オルファクトメディン関連ER局所性
309	213169_at	BG109855		クローンTUA8 Cri-du-チャット(chat)領域
310	213215_at	AI910895		クローンEUROIMAGE42138
311	213217_at	AU149572		アデニレートシクラーゼ(cyclase)2 (脳)
312	213241_at	AF035307		クローン23785
313	213274_s_at	BE875786		カテプシンB
314	213275_x_at	BE875786		カテプシンB
315	213330_s_at	BE886580		ストレス誘発性リン酸化タンパク質1
316	213333_at	AL520774		リンゴ酸塩脱水素酵素2, NAD
317	213338_at	BF062629		DKFZP586E1621タンパク質
318	213392_at	AW070229		Gタンパク質連結受容体, ファミリーC, グループ5, メンバーB
319	213474_at	AI890903		ESTs

10

20

30

40

【表 15 - 8】

320	213496_at	AW592563		KIAA0455遺伝子産物
321	213573_at	AA861608		カリオフィリン (インポーチン) β 1
322	213587_s_at	AI884867		リボソームタンパク質L26
323	213638_at	AW054711		染色体6p24のPAC 257A7
324	213670_x_at	AI768378		KIAA0618遺伝子産物
325	213720_s_at	AI831675		SWISNF関連, マトリックス関連, クロマチンのアクチン依存性レギュレータ, サブファミリー-a, メンバー4
326	213746_s_at	AW051856		フィラミンA, α
327	213836_s_at	AW052084		KIAA1001タンパク質
328	213895_at	BF445047		上皮膜タンパク質1
329	213960_at	T87225		CLONE=IMAGE:22392
330	214023_x_at	AL533838		チュブリン, β ポリペプチド
331	214068_at	AF070610		クローン24505
332	214104_at	AI703188		G-タンパク質連結受容体
333	214201_x_at	AA742237		HLA-B関連転写産物-2
334	214581_x_at	BE568134		細胞死受容体6
335	214614_at	AI738662		ホメオボックスHB9
336	214632_at	AA295257		ニューロピリン(neutropilin)2
337	214656_x_at	BE790157		ミオシンIB
338	214687_x_at	AK026577		FLJ22924 fis
339	214708_at	BG484314		シントロフィン(syntrophin), β 1
340	214710_s_at	BE407516		サイクリンB1
341	214714_at	AK022360		FLJ12298 fis
342	214717_at	AL137534		DKFZp434H1419
343	214752_x_at	AI625550		フィラミン(filamin)A, α
344	214778_at	AB011541		MEGF8
345	214841_at	AF070524		クローン24453
346	214893_x_at	AI421964		過分極活性化環状ヌクレオチド-ゲートド(gated)カリウムチャンネル2
347	214896_at	AL109671		EUROIMAGE 29222
348	215025_at	S76476		trkC{代替的にはスプライスト(spliced)}
349	215115_x_at	AI613045		ets変異体遺伝子6 (TELガン遺伝子)
350	215126_at	AL109716		EUROIMAGE 208948
351	215155_at	J04178	HEXA	異常 β -ヘキソサミニダーゼ α 鎖
352	215311_at	AL109696		EUROIMAGE 21920
353	215812_s_at	U41163	SLC6A10	クレアチン輸送体
354	215836_s_at	AK026188		FLJ22535 fis
355	216194_s_at	AD001527		CAPNSおよびPOL2R1含有のchrom1-コスミド f24590由来DNA
356	216973_s_at	S49765		ホメオボックスB7
357	217033_x_at	S76475	trkC	神経栄養性チロシンキナーゼ受容体, 3型
358	217104_at	AL109714		EUROIMAGE 327506
359	217226_s_at	M95929	PHOX1	ペアド中胚葉(paired mesoderm)ホメオボックス1
360	217297_s_at	AF143684	MYO9b	非因襲的ミオシン(myosin)IXb
361	217377_x_at	AF041811	ETV6-NTRK3 fusion	ETS関連タンパク質成長因子受容体チロシンキナーゼ融合タンパク質
362	217419_x_at	AK021586		FLJ11524 fis
363	217624_at	AA464753		ESTs
364	217799_x_at	NM_003344	UBE2H	ユビキチン接合酵素E2H
365	217827_s_at	NM_016630	ACP33	酸クラスタータンパク質33
366	217867_x_at	NM_012105	BACE2	アミロイド前駆体タンパク質(APP) β サイト切断酵素

10

20

30

40

【表 15 - 9】

367	217874_at	NM_003849	SUCLG1	コハク酸塩-補酵素Aリガーゼ, GDP形成性, α サブユニット
368	217891_at	NM_022744	FLJ13868	仮想タンパク質FLJ13868
369	218009_s at	NM_003981	PRC1	細胞質分裂1のタンパク質レギュレータ
370	218030_at	NM_014030	GIT1	Gタンパク質連結受容体キナーゼ-インターアクター(interactor)1
371	218074_at	NM_016062	LOC51647	CGI-128タンパク質
372	218143_s at	NM_005697	SCAMP2	分泌キャリア(secretory carrier)膜タンパク質2
373	218151_x at	NM_024531	FLJ11856	仮想タンパク質FLJ11856
374	218152_at	NM_018200	HMG20A	高移動度群(high-mobility group)20A
375	218161_s at	NM_017882	FLJ20561	仮想タンパク質FLJ20561
376	218175_at	NM_025140	FLJ22471	仮想タンパク質FLJ22471
377	218330_s at	NM_018162	FLJ10633	仮想タンパク質FLJ10633
378	218349_s at	NM_017975	FLJ10036	仮想タンパク質FLJ10036
379	218359_at	NM_024958	FLJ23329	仮想タンパク質FLJ23329
380	218376_s at	NM_022765	FLJ11937	仮想タンパク質FLJ11937
381	218447_at	NM_020188	DC13	DC13タンパク質
382	218542_at	NM_018131	FLJ10540	仮想タンパク質FLJ10540
383	218564_at	BC002574	FLJ10520	仮想タンパク質FLJ10520
384	218618_s at	NM_022763	FLJ23399	仮想タンパク質FLJ23399
385	218678_at	NM_024609	FLJ21841	仮想タンパク質FLJ21841
386	218774_at	NM_014026	HSPC015	HSPC015タンパク質
387	218786_at	NM_016575	TU12B1-TY	TU12B1-TYタンパク質
388	218824_at	NM_018215	FLJ10781	仮想タンパク質FLJ10781
389	218839_at	NM_012258	HEY1	YRPWモチーフ1と関連するヘアリーエンハンサー-オブ-スプリット(hairyenhancer-of-split)
390	218856_at	NM_016629	LOC51323	仮想タンパク質LOC51323
391	218888_s at	NM_018092	FLJ10430	仮想タンパク質FLJ10430
392	218931_at	NM_022449	FLJ12538	仮想タンパク質FLJ12538
393	218952_at	NM_013271	SAAS	グラニン様神経内分泌ペプチド前駆体
394	218956_s at	NM_015545	KIAA0632	KAAA0632タンパク質
395	218980_at	NM_025135	KIAA1695	仮想タンパク質FLJ22297
396	218996_at	NM_013342	TFPT	TCF3(E2A)融合パートナー(fusion partner)
397	219011_at	NM_020904	PLEKHA4	プレクストリン(pleckstrin)相同ドメイン含有, ファミリーAメンバー4
398	219039_at	NM_017789	FLJ20369	仮想タンパク質FLJ20369
399	219040_at	NM_024535	FLJ22021	仮想タンパク質FLJ22021
400	219041_s at	NM_014374	AP4	亜鉛フィンガー(zinc finger)タンパク質
401	219051_x at	NM_024042	MGC2601	仮想タンパク質MGC2601
402	219066_at	NM_021823	MDS018	仮想タンパク質MDS018
403	219066_at	NM_021823	MDS018	仮想タンパク質MDS018
404	219148_at	NM_018492	TOPK	PDZ結合キナーゼ; T細胞由来タンパク質キナーゼ
405	219152_at	NM_015720	PODLX2	
406	219219_at	NM_017854	FLJ20512	エンドグリカン(endoglycan)
407	219361_s at	NM_022767	FLJ12484	仮想タンパク質FLJ20512
408	219372_at	NM_014055	CDV-1	仮想タンパク質FLJ12484
409	219408_at	NM_019023	FLJ10640	CDV-1タンパク質
410	219478_at	NM_021197	WFDC1	仮想タンパク質FLJ10640
411	219491_at	NM_024036	MGC3103	WAP 4-ジスルフィド・コアドメイン1
412	219522_at	NM_014344	FJX1	仮想タンパク質MGC3103 fjx1相同の想定される分泌リガンド
413	219537_x at	NM_016941	DLL3	δ (ショウジョウバエ(Drosophila)) 様3

10

20

30

40

【表15-10】

414	219555_s_at	NM_018455	BM039	特徴付けられていない骨髄タンパク質BM039
415	219578_s_at	NM_030594	FLJ13203	仮想タンパク質FLJ13203
416	219634_at	NM_018413	C4ST	コンドロイチン(chondroitin)スルホ基転移酵素
417	219637_at	NM_025139	FLJ12584	仮想タンパク質FLJ12584
418	219703_at	NM_018365	FLJ11222	仮想タンパク質FLJ11222
419	219742_at	NM_030567	MGC10772	仮想タンパク質MGC10772
420	219895_at	NM_017938	FLJ20716	仮想タンパク質FLJ20716
421	219933_at	NM_016066	LOC51022	CGI-133タンパク質
422	220116_at	NM_021614	KCNN2	カリウム代謝中間体/低コンダクタンス活性化チャンネル, サブファミリーN, メンバー2
423	220155_s_at	NM_023924	FLJ13441	仮想タンパク質FLJ13441
424	220178_at	NM_021731	PP3501	仮想タンパク質PP3501
425	220454_s_at	NM_020796	SEMA6A	セマドメイン, 膜貫通ドメイン(transmembrane domain)および細胞質ドメイン, 6A
426	220864_s_at	NM_015965	LOC51079	CGI-39タンパク質; 細胞死調節(cell death regulatory)タンパク質GRIM19
427	220948_s_at	NM_000701	ATP1A1	ATPase, Na+K+輸送性, α 1ポリペプチド
428	220973_s_at	NM_030974		仮想タンパク質DKFZp434N1923
429	220974_x_at	NM_030971	BA108L7.2	ラットトリカルボキシレートキャリア様に類似
430	220980_s_at	NM_031284		仮想タンパク質DKFZp434N195
431	221059_s_at	NM_021615	CHST6	炭水化物スルホ基転移酵素6
432	221483_s_at	AF084555	ARPP-19	オカダ酸(okadaic acid)誘発性およびcAMP調節リン酸化タンパク質19
433	221484_at	NM_004776		UDP-Gal: β GlcNAc β 1,4-ガラクトシル転移酵素(galactosyltransferase), ポリペプチド5
434	221538_s_at	AL136663		DKFZp564A176
435	221558_s_at	AF288571	LEF1	リンパ球エンハンサー因子-1
436	221577_x_at	AF003934		前立腺分化因子
437	221641_s_at	AF241787		CGI16-イソ型
438	221688_s_at	AL136913		PKFZp586L0118
439	221710_x_at	BC006241		仮想タンパク質FLJ10647
440	221732_at	AK026161		FLJ22508 fis
441	221759_at	AL583123		CLONE=CSQDL009YN09
442	221797_at	AY007126		クローンCDABP0028
443	221799_at	AB037823		KIAA1402タンパク質
444	221815_at	BE671816		ESTs
445	221882_s_at	AI636233		5-スパン膜貫通タンパク質M83
446	221902_at	AL567940		CLONE=CS0DF036YK19
447	221909_at	BF984207		ESTs
448	221962_s_at	AI829920		ユビキチン接合(ubiquitin-conjugating)酵素E2H
449	222116_s_at	AL157485		DKFZp762O207
450	222153_at	AK023133		FLJ13071 fis
451	222155_s_at	AK021918		FLJ11856 fis
452	222175_s_at	AK000003		FLJ00003タンパク質
453	222196_at	AK000470		FLJ20463 fis
454	222199_s_at	AK001289		FLJ10427 fis
455	222206_s_at	AA781143		UOROIMAGE 2021883
456	222212_s_at	AK001105		FLJ10243 fis
457	222231_s_at	AK025328		FLJ21675 fis
458	222234_s_at	AK022644		FLJ12582 fis
459	222240_s_at	AL137749		DKFZp434A0612

10

20

30

40

【表 15 - 11】

460	222294 s at	AW971415		ESTs
461	32811 at	X98507		ミオシン(myosin)-1 β
462	40560 at	U28049	TXB2	TBX2
463	44783 s at	R61374		IMAGE-37665
464	46665 at	AI949392		IMAGE-2470926
465	55093 at	AA534198		IMAGE-993116
466	63825 at	AI557319		
467	87100 at	AI832249		
468	200017 at	NM_002954	RPS27A	リボソームタンパク質S27a
469	200606 at	NM_004415	DSP	デスモブラキン(desmoplakin)(DPI, DPII)
470	200632 s at	NM_006096	NDRG1	N-myc下流調節(downstream-regulated)
471	200636_s_at	NM_002840	PTPRF	タンパク質チロシンホスファターゼ (phosphatase), 受容体型, F
472	200795 at	NM_004684	SPARCL1	SPARC様1
473	200810 s at	NM_001280	CIRBP	低温誘導性(cold inducible)RNA結合タンパク質
474	200897 s at	NM_016081	KIAA0992	パラディン(Palladin)
475	200953 s at	NM_001759	CCND2	サイクリン(cyclin)D2
476	200965_s_at	NM_006720	ABLIM-s	アクチン結合LIMタンパク質1転写産物 変異体
477	201012 at	NM_000700	ANXA1	アネキシン(annexin)A1
478	201041 s at	NM_004417	DUSP1	二重特異性(dual specificity)ホスファターゼ
479	201125 s at	NM_002213	ITGB5	インテグリン(integrin), $\beta 5$
480	201200_at	NM_003851	CREG	E1A誘導遺伝子の細胞リプレッサー
481	201286 at	Z48199	シンデカン1	シンデカン(syndecan)-1遺伝子 (エクソン2~5)
482	201328_at	AL575509		v-etsトリ赤芽球症ウイルス(avian erythroblastosis virus)E26ガン遺伝子相同体2
483	201425_at	NM_000690	ALDH2	アルデヒド脱水素酵素2, ミトコンドリア 遺伝子
484	201427 s at	NM_005410	SEPP1	セレノタンパク質P, プラズマ遺伝子
485	201432 at	NM_001752	CAT	カタラーゼ(Catalase)
486	201540 at	NM_001449	FHL1	4.5個のLIMドメイン1
487	201667 at	NM_000165	GJA1	ギャップ結合タンパク質, $\alpha 1$, 43kD
488	201681 s at	AB011155	KIAA0583	KIAA0583
489	201798 s at	NM_013451	FER1L3	fer-1 (C.エレガンス(elegans)) 様3 (ミオフェルリン(myoferlin))
490	201820 at	NM_000424	KRT5	ケラチン5
491	201829 at	AW263232	NET1	神経上皮細胞転移酵素遺伝子1
492	201830 s at	NM_005863	NET1	神経上皮細胞転移酵素遺伝子1
493	201839_s_at	NM_002354	TACSTD1	腫瘍関連カルシウムシグナルトランス デューサー(transducer)1
494	201842_s_at	AI826799		EGF-含有フィブリリン(fibulin)様細胞外 マトリックスタンパク質1
495	201843_s_at	NM_004105	EFEMP1	EGF-含有フィブリリン様細胞外マトリ ックスタンパク質1転写産物変異体 (transcript variant)
496	201983 s at	AW157070		上皮成長因子受容体
497	201984 s at	NM_005228	EGFR	上皮成長因子受容体
498	202054_s_at	NM_000382	ALDH3A2	アルデヒド脱水素酵素3ファミリー, メンバーA2
499	202085 at	NM_004817	TJP2	密着結合タンパク質(tight junction protein)2
500	202193 s at	NM_001144	AMFR	自己分泌型ガン細胞運動刺激因子受容体
501	202196 s at	NM_013253	DKK3	ディックコップ (アフリカツメガエル) 相同体3
502	202242 at	NM_004615	TM4SF2	膜貫通型4スーパーファミリーメンバー2
503	202267 at	NM_005562	LAMC2	ラミニン(laminin), $\gamma 2$, 転写産物変異体1

10

20

30

40

【表 15 - 12】

504	202286_s_at	J04152	GA733-1	胃腸腫瘍関連抗原
505	202289_s_at	NM_006997	TACC2	トランスフォーミング(transforming), コイルドコイル(coiled-coil)含有タンパク質2
506	202350_s_at	NM_002380	MATN2	マトリリン2, 前駆体, 転写産物変異体1
507	202387_at	NM_004323	BAG1	BCL2-関連アザノジーン(athanogene)
508	202489_s_at	BC005238		FXVDドメイン含有イオン輸送制御因子3
509	202525_at	NM_002773	PRSS8	プロテアーゼ, セリン(serine), 8 (プロスタシン)
510	202552_s_at	NM_016441	CRIM1	システイン-リッチ運動ニューロン1
511	202565_s_at	NM_003174	SVIL	スーパービルリン(supervillin)転写産物変異体1
512	202575_at	NM_001878	CRABP2	細胞質のレチノイン酸結合タンパク質2
513	202597_at	AU144284		インターフェロン調節因子6
514	202668_at	BF001670		エフリン(efrin)-B2
515	202712_s_at	NM_020990	CKMT1	クレアチンキナーゼ, ミトコンドリア遺伝子1 核遺伝子ミトコンドリアタンパク質
516	202746_at	AL021786		クロム(chrom)Xq21.1-21.2のPAC 696H22
517	202826_at	NM_003710	SPINT1	セリン(serine)プロテアーゼ阻害物質, クニッツ(Kunitz)t1
518	202890_at	T62571		微小管(microtubule)関連タンパク質7
519	202936_s_at	NM_000346	SOX9	SRY-box9
520	202994_s_at	Z95331		クロム(chrom)22q13のクローンCTA-941F9
521	203037_s_at	NM_014751	KIAA0429	KIAA0429遺伝子産物
522	203074_at	NM_001630	ANXA8	アネキシン(annexin)A8
523	203081_at	NM_020248	LOC56998	β カテニン-相互作用性タンパク質ICAT
524	203126_at	NM_014214	IMPA2	イノシトール (ミオ) -1(または4)-モノホスファターゼ(monophosphatase)2
525	203178_at	NM_001482	GATM	グリシニアミジノトランスフェラーゼ
526	203240_at	NM_003890	FC(γ)BP	IgG Fc結合タンパク質
527	203327_at	N22903		インスリン分解酵素
528	203355_s_at	NM_015310	KIAA0942	KIAA0942タンパク質
529	203407_at	NM_002705	PPL	ペリプラキン(Periplakin)
530	203408_s_at	NM_002971	SATB1	特有のATリッチ配列結合タンパク質1
531	203430_at	NM_014320	SOUL	想定されるヘム結合タンパク質
532	203453_at	NM_001038	SCNN1A	Naチャンネル, 非電圧ゲート(nonvoltage-gated)1 α
533	203485_at	NM_021136	RTN1	レチクロン(reticulon)1
534	203549_s_at	NM_000237	LPL	リポタンパク質リパーゼ
535	203571_s_at	NM_006829	APM2	脂肪特異2
536	203585_at	NM_007150	ZNF185	亜鉛フィンガータンパク質185(LIMドメイン)
537	203636_at	BE967532	MID1	ミッドライン(midline)1 (オピッツBBB症候群)
538	203637_s_at	NM_000381	MID1	
539	203638_s_at	NM_022969	FGFR2	FGF受容体2転写産物変異体2
540	203678_at	NM_014967	KIAA1018	KIAA1028タンパク質
541	203687_at	NM_002996	SCYD1	低誘発性(small inducible)サイトカインサブファミリーD(Cys-X3-Cys)メンバー1
542	203726_s_at	NM_000227	LAMA3	ラミニン(laminin), α 3
543	203786_s_at	NM_003287	TPD52L1	腫瘍タンパク質D52様1
544	203797_at	AF039555	VSNL1	ビシニン(visinin)様タンパク質1
545	203799_at	NM_014880	KIAA0022	KIAA0022遺伝子産物
546	203812_at	AB011538		MEGF5
547	203881_s_at	NM_004010		ジストロフィン転写産物変異体Dp427p2
548	203910_at	NM_004815	PARG1	PTPL1関連RhoGAP1
549	203917_at	NM_001338	CXADR	コクサッキー(coxsackie)ウィルスおよびアデノウィルス受容体
550	203961_at	AL157398	NEBL	ネブレット(nebulette)タンパク質

10

20

30

40

【表 15 - 13】

551	203962_s_at	NM_006393	NEBL	
552	203963_at	NM_001218	CA12	炭酸脱水酵素XII
553	203992_s_at	AF000992	UTX	ユビキタス(ubiquitous)TPRモチーフ, Xイソ型 代替的転写産物1
554	203997_at	NM_002829	PTPN3	タンパク質チロシンホス ファターゼ, 非受容体3型
555	204005_s_at	NM_002583	PAWR	PRKC, アポトーシス, WT1, レギュレータ
556	204019_s_at	NM_015677		仮想タンパク質DKFZP586F1318
557	204036_at	AW269335		内皮分化, リゾホスファチジン酸Gタンパク 質連結受容体, 2
558	204037_at	AW269335		内皮分化, リゾホスファチジン酸Gタンパク 質連結受容体, 2
559	204042_at	AB020707		KIAA0900タンパク質
560	204058_at	AL049699		染色体6q13-15のクローン747H23
561	204059_s_at	NM_002395	ME1	リンゴ酸酵素1, NADP(+)-依存性, サイトソ ル(cytosolic)
562	204072_s_at	NM_023037	13CDNA73	想定される遺伝子産物
563	204112_s_at	NM_006895	HNMT	ヒスタミンN-メチルトランスフェラーゼ
564	204135_at	NM_014890	DOC1	卵巣ガン1において発現低下する
565	204136_at	NM_000094	COL7A1	コラーゲン, VII型, $\alpha 1$
566	204151_x_at	NM_001353	AKR1C1	アルド-ケト還元酵素ファミリー1, メンバーC1
567	204154_at	NM_001801	CDO1	システイン(cysteine)ジオキシゲナーゼ, I型
568	204168_at	NM_002413	MGST2	マイクロソームグルタチオン(microsomal glutathione)S-トランスフェラーゼ2
569	204201_s_at	NM_006264	PTPN13	タンパク質チロシンホスファターゼ, 非受容体13型
570	204204_at	NM_001860	SLC31A2	溶質キャリアファミリーメンバー2
571	204224_s_at	NM_000161	GCH1	GTPシクロヒドロラーゼ(cyclohydrolase)1
572	204254_s_at	NM_000376	VDR	ビタミンD受容体
573	204345_at	NM_001856	COL16A1	コラーゲン, XVI型, $\alpha 1$
574	204351_at	NM_005980	S100P	S100カルシウム結合タンパク質P
575	204359_at	NM_013231	FLRT2	フィブロネクチンロイシン(fibronectin leucine)リッチ膜貫通タンパク質2
576	204363_at	NM_001993	F3	凝固因子III
577	204379_s_at	NM_000142	FGFR3	線維芽細胞(fibroblast)成長因子受容体3
578	204388_s_at	NM_000240	MAOA	モノアミンオキシダーゼA
579	204389_at	NM_000240	MAOA	モノアミンオキシダーゼA
580	204400_at	NM_005864	EFS2	シグナル変換(signal transduction)タンパク質
581	204421_s_at	M27968	FGF	塩基性線維芽細胞成長因子
582	204422_s_at	NM_002006	FGF2	線維芽細胞成長因子2 (塩基性)
583	204424_s_at	AL050152		神経特異性転写調整因子DAT1
584	204455_at	NM_001723	BPAG1	水疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid)抗原1
585	204503_at	NM_001988	EVPL	エンボプラキン(envoplakin)
586	204517_at	BE962749	cyclophilin C	ペプチジルプロピル異性化酵素C
587	204519_s_at	NM_015993	LOC51090	プラスモリピン(plasmolipin)
588	204537_s_at	NM_004961	GABRE	γ -アミノブチル酸A受容体, ϵ 転写産物 変異体1
589	204591_at	NM_006614	CHL1	LiCAMに相同する細胞粘着(cell adhesion) 分子
590	204600_at	NM_004443	EPHB3	EphB3
591	204671_s_at	BE677131		KIAA0957タンパク質
592	204675_at	NM_001047	SRD5A1	ステロイド-5- α -還元酵素, α ポリペプチド1

10

20

30

40

【表 15 - 14】

593	204718_at	NM_004445	EPHB6	EphB6
594	204719_at	NM_007168	ABCA8	ATP結合性カセット, サブファミリーA メンバー8
595	204734_at	NM_002275	KRT15	ケラチン15
596	204749_at	NM_004538	NAP1L3	ヌクレオソームアセンブリータンパク質1様
597	204753_s_at	A1810712		肝白血病因子
598	204754_at	A1810712		肝白血病因子
599	204755_x_at	M95585	HLF	白血病因子
600	204765_at	NM_005435	ARHGEF5	Rhoグアニンヌクレオチド因子5
601	204773_at	NM_004512	IL11RA	インターロイキン11受容体, α
602	204773_at	NM_004512	IL11RA	
603	204855_at	NM_002639	SERPINB5	セリン (またはシステイン) プロテイナー ゼ阻害物質, クレドB, メンバー5
604	204872_at	NM_007005	BCE-1	BCE-1タンパク質
605	204937_s_at	NM_016325	ZNF274	亜鉛フィンガータンパク質274
606	204942_s_at	NM_000695	ALDH3B2	アルデヒドデヒドロゲナーゼ (dehydrogenase)3ファミリーメンバーB2
607	204952_at	NM_014400	C4.4A	GPIアンカー転移関連タンパク質相同体
608	204971_at	NM_005213	CSTA	シスタチン(cystatin)A(ステフィン(stefin)A)
609	204975_at	NM_001424	EMP2	上皮膜(epithelial membrane)タンパク質2
610	204990_s_at	NM_000213	ITGB4	インテグリン(integrin), β 4
611	205014_at	NM_005130	HBP17	ヘパリン結合成長因子結合性
612	205019_s_at	NM_004624	VIPR1	血管作動性(vasoactive)腸ペプチド受容体1
613	205081_at	NM_001311	CRIP1	システイン(cysteine)リッチタンパク質1
614	205109_s_at	NM_015320	ARHGEF4	Rhoグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)4
615	205128_x_at	NM_000962	PTGS1	プロstagランジン・エンドペルオキシド・シターゼ(prostaglandin-endoperoxide synthase)1
616	205185_at	NM_006846	SPINK5	セリンプロテアーゼ阻害物質, カザール(Kazal)t, 5
617	205200_at	NM_003278	TNA	テトラネクチン(tetranectin)
618	205206_at	NM_000216	KAL1	カルマン(Kallmann)症候群1配列
619	205236_x_at	NM_003102	SOD3	スーパーオキシドジスムターゼ3, 細胞外
620	205251_at	NM_022817	PER2	ペリオド(period)相同体, 転写産物変異体1
621	205259_at	NM_000901	NR3C2	核受容体サブファミリー-3, 群C, メンバー-2
622	205286_at	U85658		転写調整因子ERF-1
623	205349_at	NM_002068	GNA15	グアニンヌクレオチド結合タンパク質, α 15
624	205363_at	NM_003986	BBOX1	ブチロベタイン(γ)2-オキソグルタレート (oxoglutarate)ジオキシゲナーゼ1
625	205382_s_at	NM_001928	DF	補体成分D (アジプシン(adipsin))
626	205384_at	NM_005031	FXVD1	FXVDドメイン含有イオン輸送レギュレー タ1変異体a
627	205403_at	NM_004633	IL1R2	インターロイキン1受容体, II型
628	205404_at	NM_005525	HSD11B1	ヒドロキステロイドデヒドロゲナーゼ1
629	205407_at	NM_021111	RECK	kazalモチーフを有する転換誘発性(reversion- inducing)システイン・リッチタンパク質
630	205440_s_at	NM_000909	NPY1R	神経ペプチドY受容体Y1
631	205455_at	NM_002447	MST1R	マクロファージ刺激性1受容体
632	205464_at	NM_000336	SCNN1B	Naチャネル, 非電圧ゲーテッド1, β
633	205470_s_at	NM_006853	KLK11	カリクレイン(kallikrein)11
634	205490_x_at	BF060667	connexin 31	ギャップ結合(gap junction)タンパク質, β 3, 31kD
635	205498_at	NM_000163	GHR	成長ホルモン受容体
636	205559_s_at	NM_006200	PCSK5	プロタンパク質コンパターゼ・スプチリンケシン(subtilisinexin)5型

10

20

30

40

【表 15 - 15】

637	205560 at	NM 006200	PCSK5	
638	205569 at	NM_014398	TSC403	リソソーム関連膜糖タンパク質に類似
639	205613 at	NM 016524	LOC51760	BKタンパク質
640	205668 at	NM 002349	LY75	リンパ球抗原75
641	205672 at	NM_000380	XPA	色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum), 相補群A
642	205709 s at	NM 001263	CDS1	CDP-ジアシルグリセロールシクターゼ1
643	205730 s at	NM 014945	KIAA0843	KIAA0843タンパク質
644	205765 at	NM 000777	CYP3A5	cyt P450, サブファミリー-III A, ポリペプチド5
645	205807 s at	NM 020127	TUFT1	タフテリン(tuftelin)1
646	205857 at	AI269290		溶質キャリアファミリー-18, メンバー-2
647	205883 at	NM 006006	ZNF145	亜鉛フィンガータンパク質145
648	205900 at	NM 006121	KRT1	ケラチン1
649	205933 at	NM 015559	KIAA0437	KIAA0437タンパク質
650	205977 s at	NM 005232	EPHA1	EphA1
651	206032 at	AI797281		est: we86g02.x1
652	206033 s at	NM 001941	DSC3	デスモコリン3 転写産物変異体 Dsc3a
653	206068 s at	AI367275		アシル補酵素Aデヒドロゲナーゼ, 長鎖
654	206093 x at	NM 007116	TNXA	テネイシン(tenascin)XA
655	206122 at	NM 006942	SOX20	SRY-box20
656	206149 at	NM_022097	LOC63928	肝細胞腺腫抗原遺伝子520
657	206170 at	NM 000024	ADRB2	アドレナリン作動性, β -2-, 受容体, 表面
658	206192 at	L20815		Sタンパク質
659	206201 s at	NM 005924	MEOX2	間葉(mesenchyme)ホメオボックス2
660	206276 at	NM 003695	E48	リンパ球抗原6複合体 locus D
661	206315 at	NM 004750	CRLF1	サイトカイン受容体様因子1
662	206363 at	NM_005360	MAF	v-maf筋腱膜線維腫ガン遺伝子相同体
663	206385 s at	NM 020987	ANK3	アンキリン3, ランビエ絞輪, 転写産物変異体1
664	206400 at	NM 002307	LGALS7	レクチン, ガラクトシド結合性, 可溶性, 7
665	206453 s at	NM 016250	NDRG2	N-myc下流調節(downstream-regulated)遺伝子2
666	206481 s at	NM 001290	LDB2	LIMドメイン結合性2
667	206482 at	NM 005975	PTK6	PTK6タンパク質チロシナーゼ6
668	206515 at	NM 000896	CYP4F3	cyt P450, サブファミリー-IV F, ポリペプチド3
669	206539 s at	NM 023944	CYP4F12	シトクロームP450イソ型4F12
670	206581 at	NM 001717	BNC	バソヌクリン(basonuclin)
671	206637 at	NM 014879	KIAA0001	KIAA0001遺伝子産物
672	206655 s at	NM 000407	GP1BB	糖タンパク質Ib (血小板), β ポリペプチド
673	206693 at	NM 000880	IL7	インターロイキン(interleukin)7
674	206884 s at	NM 003843	SCEL	サイリエン(sciellin)
675	207002 s at	NM 002656	PLAGL1	多形性腺腫(pleiomorphic adenoma)遺伝子様1
676	207023 x at	NM 000421	KRT10	ケラチン10
677	207076 s at	NM 000050	ASS	アルギノコハク酸シンテターゼ(synthetase)
678	207121 s at	NM 002748	MAPK6	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ6
679	207655 s at	NM 013314	SLP65	B細胞リンカータンパク質
680	207720 at	NM 000427	LOR	ロリクリン(loricrin)
681	207761 s at	NM 014033		DKFZP586A0522タンパク質
682	207843 x at	NM 001914	CYB5	シトクロームb-5
683	207908 at	NM 000423	KRT2A	ケラチン2A
684	207943 x at	NM_006718	PLAGL1	多形性腺腫遺伝子様転写産物変異体2

10

20

30

40

【表 15 - 16】

685	207955_at	NM_006664	SCYA27	低誘発性サイトカインサブファミリーA (Cys-Cys), メンバー27
686	207996_s_at	NM_004338	C18ORF1	染色体18 オープン・リーディング・フレーム1
687	208096_s_at	NM_030820		仮想タンパク質DKFZp564B052
688	208146_s_at	NM_031311	LOC54504	セリンカルボキシペプチターゼ卵黄形成様
689	208161_s_at	NM_020037	ABCC3	ATP結合カセットサブファミリーCメンバー3
690	208190_s_at	NM_015925	LISCH7	肝特異性bHLH-Zip転写調整因子
691	208228_s_at	M87771	K-sam-III	分泌FGF受容体
692	208609_s_at	NM_019105	TNXB	テネイシン(tenascin)XB
693	208614_s_at	M62994		甲状腺自己抗原
694	208651_x_at	M58664		CD24シグナルトランスデューサ
695	208690_s_at	BC000915		LIMタンパク質に類似
696	208798_x_at	AF204231	GM88	88-kDaゴルジ(Golgi)タンパク質
697	209047_at	AL518391		アクアポリン(aquaporin)1
698	209159_s_at	AV724216		NDRGファミリー, メンバー4
699	209160_at	AB018580	hluPGFS	アルド-ケト還元酵素ファミリー1, メンバーC3
700	209211_at	AF132818	CKLF	結腸クルッペル(Kruppel)様因子
701	209212_s_at	AB030824		転写調整因子BTEB2
702	209289_at	AI700518		核因子IB
703	209290_s_at	BC001283		核因子IBに類似
704	209309_at	D90427		亜鉛- α 2-糖タンパク質
705	209318_x_at	BG547855		多形性腺腫(pleiomorphic adenoma)遺伝子様1
706	209335_at	AI281593		デコリン(decorin)
707	209348_s_at	AF055376	c-maf	ショートフォーム(short form)転写調整因子C-MAF
708	209351_at	BC002690		ケラチン
709	209357_at	AF109161	MRG1	p35srj
710	209366_x_at	M22865		シトクロム(cytochrome) b5
711	209368_at	AF233336	EPHX2	可溶性エポキシド加水分解酵素
712	209386_at	AI346835		膜貫通4スーパーファミリーメンバー1
713	209392_at	L35594	オートタキシン	エクトヌクレオチド(ectonucleotide) ピロホスファターゼホスホジエステラーゼ2
714	209465_x_at	AL565812		プレイオトロフィン(pleiotrophin)
715	209493_at	AF338650	AIPC	PDZドメイン含有タンパク質AIPC
716	209540_at	NM_000618	ソマトメジンC	インスリン様成長因子1
717	209550_at	U35139		NECDIN関連タンパク質
718	209558_s_at	AB013384	HIP1R	ハンチングチン相互作用性タンパク質-1関連
719	209590_at	AL157414		染色体20のクローンRP11-560A15
720	209602_s_at	AI796169		GATA結合タンパク質3
721	209603_at	AI796169		GATA結合タンパク質3
722	209604_s_at	BC003070		GATA結合タンパク質3, クローンMGC:2346
723	209605_at	D87292	ロダネース	チオ硫酸スルフトランスフェラーゼ
724	209656_s_at	AL136550		DKFZp761J17121
725	209679_s_at	BC003379		クローン643, クローンMGC:5115由来の hypタンパク質
726	209684_at	AL136924		DKFZp586G2120
727	209687_at	U19495	HIRH	インタークリン(interocrine)- α
728	209691_s_at	BC003541	FLJ10488	仮想タンパク質FLJ10488
729	209699_x_at	U05598		ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ
730	209732_at	NM_005127		C型レクチンに類似, スーパーファミリーメンバー2
731	209763_at	AL049176		染色体Xq22.1-23のクローン141H5
732	209771_x_at	AA761181		CD24抗原

10

20

30

40

【表 15 - 17】

733	209863_s_at	AF091627		CUSP
734	209866_s_at	R50822		KIAA0768タンパク質
735	209975_at	AF182276	CYP2E1	シトクロムP450-2E1
736	210059_s_at	BC000433		ミトジェン活性化タンパク質キナーゼ13
737	210096_at	J02871		肺(lung)シトクロムP450 BI
738	210128_s_at	U41070		P2プリン受容体
739	210298_x_at	AF098518	FHL1	41/2LIMドメイン1タンパク質イソ型B
740	210347_s_at	AF080216		C2H2型亜鉛フィンガータンパク質
741	210372_s_at	AF208012	TPD52L2	腫瘍タンパク質D52様2
742	210397_at	U73945		β -デフェンシン(defensin)-1
743	210619_s_at	AF173154	HYAL1	ヒアルロノグルコサミニダーゼ1 isof 2
744	210633_x_at	M19156	KRT10	酸性ケラチン-10
745	210715_s_at	AF027205	kop	クニッツ(Kunitz)型プロテアーゼ阻害物質
746	210880_s_at	AB001467	Efs2	
747	210958_s_at	BC003646		クローンMGC:4693
748	211043_s_at	BC006332	Lcb	クラスリン(clathrin), 軽鎖ポリペプチド
749	211105_s_at	U80918	NF-ATcC	転写調整因子
750	211382_s_at	AF220152	TACC2	転移性, 酸性コイルドコイル含有タンパク質2
751	211458_s_at	AF180519		GABA-A受容体関連
752	211596_s_at	AB050468		膜糖タンパク質LIG-1
753	211597_s_at	AB059408	SMAP31-12	
754	211653_x_at	M33376		擬クロルデコン(pseudo-chlordecone)還元酵素
755	211712_s_at	BC005830		クローンMGC:1925
756	211734_s_at	BC005912		Fc断片IgE, 高親和性I, α ポリペプチドのためのrec
757	211841_s_at	U94510		死(death)9のリンパ球関連受容体, 代替的にはスプライスト
758	211986_at	BG287862	desmoyokin	AHNAKヌクレオタンパク質
759	212148_at	BF967998		FLJ12900 fis
760	212204_at	AF132733		DKFZP564G2022タンパク質
761	212242_at	AL565074		チューブリン(tubulin), α 1 (精巣特異的)
762	212327_at	AK027231		FLJ23578 fis, KIAA1102タンパク質
763	212328_at	AK027231		FLJ23578 fis, KIAA1102タンパク質
764	212390_at	AB007923		KIAA0477遺伝子産物
765	212538_at	AL576253		KIAA1058タンパク質
766	212543_at	U83115.1		ノンレンズ(non-lens) β クリスタリン様
767	212589_at	BG168858		ガン遺伝子TC21
768	212593_s_at	N92498		FLJ22071 fis, クローンHEP11691
769	212724_at	BG054844		ras相同体遺伝子ファミリー, メンバーE
770	212741_at	AA923354		モノアミン酸化酵素A
771	212823_s_at	AU147160		KIAA0599タンパク質
772	212841_s_at	AI692180		PTPRF相互作用性タンパク質, 結合性タンパク質2
773	212850_s_at	AA584297		低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質4
774	212875_s_at	AP001745		クロム(chrom)21オープンリーディングフレーム(open reading frame)25
775	212992_at	AI935123		ESTs
776	213029_at	AL110126		DKFZp564H1916
777	213032_at	AL110126		DKFZp564H1916
778	213050_at	AA594937		KIAA0633タンパク質
779	213068_at	AI146848		皮膚タンパク質
780	213071_at	AI146848		皮膚タンパク質

10

20

30

40

【表15-18】

781	213106_at	AI769688		23664および23905 mRNA配列
782	213110_s_at	AW052179		コラーゲン, IV型, $\alpha 5$
783	213122_at	AI096375		KIAA1750タンパク質, パーシャル(partial)cds
784	213135_at	U90902		クローン23612
785	213194_at	BF059159		Hs.301198 ラウンドアバウト(roundabout)相同体
786	213227_at	BE879873		プロゲステロン(progesterone)膜結合性
787	213280_at	AK000478		FLJ20471 fis
788	213285_at	AV691491		DKFZp564D1462
789	213287_s_at	X14487		酸性 (I型) サイトケラチン10
790	213353_at	BF693921		ATP結合カセット, サブファミリーA, メンバー5
791	213359_at	W74620		ヘテロ核リボヌクレオタンパク質D
792	213369_at	AI825832		DKFZp434A132
793	213375_s_at	N80918		染色体(chromo)13への新規遺伝子マッピング
794	213397_x_at	AI761728		DnJ相同体, サブファミリーC, メンバー8
795	213451_x_at	BE044614		テネイシン(tenascin)XB
796	213456_at	AI927000		DKFZp564D206
797	213506_at	BE965369		プロテイナーゼ活性化受容体-2
798	213556_at	BE673445		染色体19, コスミド(cosmid) R28379
799	213618_at	AB011152		KIAA0580
800	213695_at	L48516	PON3	パラオキシナーゼ(paraoxonase)3
801	213707_s_at	NM_005221	DLX5	ディスタルレス(distal-less)ホメオボックス5
802	213725_x_at	AI693140		DKFZp586F071
803	213737_x_at	AI620911		
804	213800_at	X04697		補体因子H38-kDa N-term
805	213817_at	AL049435		DKFZp586B0220
806	213820_s_at	T54159		仮想タンパク質MGC10327
807	213844_at	NM_019102	HOXA5	ホメオボックスA5
808	213848_at	AI655015		DKFZp586F2224
809	213891_s_at	AI927067		FLJ11918 fis
810	213924_at	BF476502		仮想タンパク質FLJ11585
811	213929_at	AL050204		DKFZp586F1223
812	213933_at	AW242315		DKFZp586M0723
813	213935_at	AF007132		クローン23551
814	213942_at	AL134303		DKFZp547K034 r1
815	213992_at	AI889941		コラーゲン, IV型, $\alpha 6$
816	213994_s_at	AI885290		スポンジン1, 細胞外マトリックス
817	214058_at	M19720		L-mycタンパク質
818	214132_at	BG232034		ATPシンターゼ, H ⁺ 輸送性, ミトコンドリア F1複合体, γ ポリペプチド1
819	214164_x_at	BF752277		アダプター関連タンパク質複合体1, $\gamma 1$ サブユニット
820	214234_s_at	X90579		cyp関連偽遺伝子(pseudogene)
821	214235_at	X90579		cyp関連偽遺伝子
822	214247_s_at	AU148057		神経膠腫で調節
823	214598_at	AL049977		DKFZp564C122
824	214696_at	AF070569		クローン24659
825	214753_at	AW084068		BRCA2領域
826	214823_at	AF033199		C2H2亜鉛フィンガータンパク質偽遺伝子
827	215034_s_at	AI189753		FLJ13302 fis
828	215062_at	AL390143		DKFZp547N074
829	215129_at	AJ000008		C2ドメイン含有P13-キナーゼ

10

20

30

40

【表15-19】

830	215239 x at	AU132789		亜鉛フィンガータンパク質273
831	215243 s at	AF099730	GJB3	コネクシン(connexin)31
832	215388 s at	X56210	FHR-1	補体因子H関連1
833	215513 at	AF241534	HYMAI	胞状奇胎関連およびインプリンテッド
834	215516 at	AC005048		BACクローン CTB-15P3 fr 7q22-q31.2
835	215536_at			DMA, DMB, HLA-Z1, IPP2, LMP2, TAP1, LMP7, TAP2, DOB, DQB2及びRING8, 9, 13及び14遺伝子
836	215659 at	AK025174		FLJ21521
837	215704 at	AL356504		クローンRP1-14N1染色体1q21.1-21.3
838	215726 s at	M22976		シトクロムb5
839	215867 x at	AL050025		DKFZp564D066
840	216199 s at	AL109942		クローンRP3-473J16染色体6q25.3-26
841	216268 s at	U77914		可溶性タンパク質ジャギド(Jagged)
842	216333_x_at	M25813		P450c21に相補的な非同定遺伝子
843	216379 x at	AK000168		CD24シグナルトランスデューサー
844	216594 x at	S68290		クロルデコン(chlordecone)還元酵素相同体
845	216699 s at	L10038		カリクレインのためのプレ-プロ-タンパク質
846	217087 at	AF005081	xp32	皮膚特異性タンパク質
847	217528 at	BF003134		ESTs
848	217707 x at	A1535683		ESTs
849	217901 at	BF031829		デスマogleイン(desmoglein)2
850	217961 at	NM_017875	FLJ20551	仮想タンパク質FLJ20551
851	218002_s_at	NM_004887	SCYB14	低誘発性サイトカインサブファミリーB (Cys-X-Cys), メンバー14
852	218170 at	NM_016048	LOC51015	CGI-111タンパク質
853	218180 s at	NM_022772	FLJ21935	仮想タンパク質FLJ21935
854	218186 at	NM_020387	CATX-8	CATX-8タンパク質
855	218237 s at	NM_030674	ATA1	アミノ酸輸送体系A1
856	218326 s at	NM_018490	GPR48	Gタンパク質連結受容体48
857	218434 s at	NM_023928		仮想タンパク質FLJ12389
858	218451 at	NM_022842		仮想タンパク質FLJ22969
859	218499 at	NM_016542	LOC51765	セリントレオニタンパク質キナーゼMASK
860	218546 at	NM_024709		仮想タンパク質FLJ14146
861	218552 at	NM_018281		仮想タンパク質FLJ10948
862	218603 at	NM_016217	LOC51696	Dros headcaseの相同体のためのhHDC
863	218644 at	NM_016445	PLEK2	プレクストリン(pleckstrin)2 (マウス) 相同体
864	218651 s at	NM_018357		仮想タンパク質FLJ11196
865	218657_at	NM_016339	LOC51195	リンク・グアニンヌクレオチド交換因子II
866	218675 at	NM_020372	LOC57100	有機カチオン輸送体
867	218677 at	NM_020672	LOC57402	S100型カルシウム結合タンパク質A14
868	218692 at	NM_017786		仮想タンパク質FLJ20366
869	218704 at	NM_017763		仮想タンパク質FLJ20315
870	218718 at	NM_016205	PDGFC	血小板由来成長因子C
871	218736 s at	NM_017734		仮想タンパク質FLJ20271
872	218751 s at	NM_018315		仮想タンパク質FLJ11071
873	218764 at	NM_024064		仮想タンパク質MGC5363
874	218792 s at	NM_017688		仮想タンパク質FLJ20150
875	218796 at	NM_017671		仮想タンパク質FLJ20116
876	218804 at	NM_018043		仮想タンパク質FLJ10261
877	218806 s at	AF118887	VAV-3	VAV-3タンパク質
878	218807 at	NM_006113	VAV3	vav3ガン遺伝子

10

20

30

40

【表 15 - 20】

879	218816_at	NM_018214		仮想タンパク質FLJ10775
880	218820_at	NM_020215		仮想タンパク質DKFZp761F2014
881	218849_s_at	NM_006663	RAI	RelA関連阻害物質
882	218854_at	NM_013352	SART-2	T細胞による、有棘細胞ガン抗原認識
883	218901_at	NM_020353	LOC57088	リン脂質スクランブラーゼ(scramblase)4
884	218919_at	NM_024699		仮想タンパク質FLJ14007
885	218963_s_at	NM_015515		DKFZP434G032タンパク質
886	219010_at	NM_018265		仮想タンパク質FLJ10901
887	219054_at	NM_024563		仮想タンパク質FLJ14054
888	219064_at	NM_030569		仮想タンパク質MGC10848
889	219073_s_at	NM_017784		仮想タンパク質FLJ20363
890	219090_at	NM_020689	NCKX3	ナトリウム・カリウムイオン交換体
891	219093_at	NM_017933		仮想タンパク質FLJ20701
892	219095_at	NM_005090	PLA2G4B	ホスホリパーゼA2, 群IVB
893	219109_at	NM_024532		仮想タンパク質FLJ22724
894	219115_s_at	NM_014432	IL20RA	インターロイキン(interleukin)20受容体, α
895	219229_at	NM_013272	SLC21A11	溶質キャリアファミリー-21, メンバー11
896	219232_s_at	NM_022073		仮想タンパク質FLJ21620
897	219263_at	NM_024539		仮想タンパク質FLJ23516
898	219298_at	NM_024693		仮想タンパク質FLJ20909
899	219313_at	NM_017577		仮想タンパク質DKFZp434C0328
900	219368_at	NM_021963	NAP1L2	ヌクレオソームアセンブリータンパク質1様2
901	219388_at	NM_024915		仮想タンパク質FLJ13782
902	219395_at	NM_024939		仮想タンパク質FLJ21918
903	219410_at	NM_018004		仮想タンパク質FLJ10134
904	219411_at	NM_024712		仮想タンパク質FLJ13824
905	219423_x_at	NM_003790	TNFRSF12	TNF受容体スーパーファミリー, メンバー12
906	219436_s_at	NM_016242	LOC51705	エンドムチン(endomucin)-2
907	219461_at	AJ236915		pak5タンパク質
908	219476_at	NM_024115		仮想タンパク質MGC4309
909	219489_s_at	NM_017821		仮想タンパク質FLJ20435
910	219497_s_at	NM_022893	BCL11A	B細胞CLLリンパ腫11A
911	219518_s_at	NM_025165		仮想タンパク質FLJ22637
912	219528_s_at	NM_022898	BCL11B	B細胞リンパ腫白血病(lymphomaleukaemia)11B
913	219532_at	NM_022726	ELOVL4	シュタルガルト病(Stargardt disease)3
914	219597_s_at	NM_017434	DUOX1	二重酸化酵素(dual oxidase)1
915	219689_at	NM_020163	LOC56920	セマホリン(semaphorin) sem 2
916	219729_at	NM_016307	PRX2	ペアド(paired)関連ホメオボックスタンパク質
917	219764_at	NM_007197	FZD10	フリズルド(frizzled)(ショウジョウバエ)相同体10
918	219806_s_at	NM_020179	FN5	FN5タンパク質
919	219825_at	NM_019885	P450RAI-2	cyt P450レチノイド代謝性
920	219908_at	NM_014421	DKK2	ディックコップ(dickkopf)相同体2
921	219936_s_at	NM_023915	GPR87	Gタンパク質連結受容体87
922	219938_s_at	NM_024430	PSTPIP2	プロリン・セリン・トレオニン ホスファターゼ相互作用性タンパク質
923	219970_at	NM_017655		仮想タンパク質FLJ20075
924	219976_at	NM_015888	HOOK1	フック(hook)1タンパク質
925	219995_s_at	NM_024702		仮想タンパク質FLJ13841
926	219998_at	NM_014181		HSPC159タンパク質
927	220016_at	NM_024060		仮想タンパク質MGC5395
928	220056_at	NM_021258	IL22R	インターロイキン(interleukin)22受容体
929	220066_at	NM_022162	NOD2	NOD2タンパク質
930	220076_at	NM_019847	ANKH	強直症(ankylosis), 進行性相同体

10

20

30

40

【表 15 - 21】

931	220161 s at	NM 019114	EHM2	EHM2遺伝子
932	220225 at	NM 016358	IRX4	イロクィス(iroquois)ホメオボックスタンパク質4
933	220230 s at	NM 016229	LOC51700	シトクロム(cytochrome)b5還元酵素b5R.2
934	220262 s at	NM 023932		仮想タンパク質MGC2487
935	220266 s at	NM 004235	KLF4	クルッペル(Kruppel)様因子4(gut)
936	220289 s at	NM 017977		仮想タンパク質FLJ10040
937	220318 at	NM 017957	FLJ20778	エプシン(epsin)3
938	220413 at	NM 014579	ZIP2	亜鉛輸送体
939	220414 at	NM 017422	CLSP	カルモデュリン(calmodulin)様皮膚タンパク質
940	220428 at	NM 015717	LANGERIN	ランゲルハンス細胞特異のc型レクチン
941	220432 s at	NM 016593	CYP39A1	オキシステロール(oxysterol)7 α -水酸化酵素
942	220518 at	NM 024801		仮想タンパク質FLJ21551
943	220625 s at	AF115403		Ets転写調整因子ESE-2b
944	220723 s at	NM 025087		仮想タンパク質FLJ21511
945	220724 at	NM 025087		仮想タンパク質FLJ21511
946	220911 s at	NM 025081		KIAA1305タンパク質
947	220945 x at	NM 018050		仮想タンパク質FLJ10298
948	221127 s at	NM 006394	RIG	グリオマ(glioma)で調節
949	221215 s at	NM 020639	ANKRD3	アンキリンリピート(ankyrin repeat)ドメイン3
950	221541 at	AL136861		DKFZp434B044
951	221667 s at	AF133207		タンパク質キナーゼH11
952	221747 at	AL046979		DKFZp586K0617
953	221748 s at	AL046979		DKFZp586K0617
954	221760 at	BG287153		マンノシダーゼ, α , クラス1A, メンバー1
955	221796 at	AA707199		hypタンパク質FLJ20093に類似
956	221841 s at	BF514079		クルッペル(Kruppel)様因子4(gut)
957	221854 at	AI378979		ESTs
958	221922 at	AW195581		KIAA0761
959	221950 at	AI478455		エンプティスピラクルズ(empty spiracles)相同体2
960	222043 at	AI982754		クラステリン(clusterin)
961	222102 at	NM 000847	GSTA3	グルタチオンS転移酵素A3
962	222236 s at	AK000253		FLJ20246 fis
963	222256 s at	AK000550		FLJ20543 fis
964	222288 at	AI004009		ESTs
965	222290 at	AA731709		ESTs
966	222303 at	AV700891		ESTs
967	266 s at	L33930		CD24シグナルトランスデューサ
968	33322 i at	X57348		クローン9112
969	33323 r at	X57348		クローン9112
970	35666 at	U38276		セマホリン(semaphorin)IIIファミリー相同体
971	38340 at	AB014555		KIAA0655タンパク質
972	39248 at	N74607		za55a01.s1
973	40016 g at	AB002301		KIAA0303遺伝子
974	40093 at	X83425		LU遺伝子ルセラン式血液型糖タンパク質
975	40472 at	AF007155		クローン23763未知のmRNA
976	57588 at	R62432		yg52e11.s1
977	60474 at	AA469071		ne17f11.s1
978	91826 at	AI219073		qg16e08.x1
979			PBGD	
980			MART1	
981			Me20m	
982			MAGE-3	
983				Me20mフォワードプライマー

10

20

30

40

【表 1 5 - 2 2】

984			Me20mリバースプライマー
985			Me20mプローブ
986			PBGDフォワードプライマー
987			PBGDリバースプライマー
988			PBGDプローブ
999			チロシナーゼ
1000			チロシナーゼ・フォワード
1001			チロシナーゼ・リバース
1002			チロシナーゼ・プローブ
1003			MART1フォワード
1004			MART1リバース
1005			MART1プローブ
1006			HMB45フォワード
1007			gp100リバース
1008			gp100プローブ
1009			PLABフォワード
1010			PLABリバース
1011			PLABプローブ

10

【 0 1 3 2 】

〔実施の態様〕

20

(1) 黒色腫を同定する方法において、

a . 組織試料を得る段階と、

b . P L A B (配列 I D 番号 : 1) および L 1 C A M (配列 I D 番号 : 2) ; または、
P L A B、L 1 C A M および N T R K 3 (配列 I D 番号 : 3)、
に対応する m R N A をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、
を含み、

所定のカットオフレベル (cut-off levels) を超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料
中に黒色腫が存在することを示す、

方法。

(2) 実施態様 1 に記載の方法において、

30

チロシナーゼ (配列 I D 番号 : 9 9 9) をコードする遺伝子の発現レベルを測定する段
階、

を更に含む、方法。

(3) 実施態様 1 に記載の方法において、

前記試料中で構成的に発現した遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(4) 実施態様 3 に記載の方法において、

前記遺伝子は、P B G D (配列 I D 番号 : 9 7 9) をコードする、方法。

(5) 実施態様 1 に記載の方法において、

配列 I D 番号 : 2 9 ~ 9 7 8 から成る群から選ばれる p s i d に対応する m R N A をコ
ードする少なくとも 1 種の遺伝子の発現レベルを測定する段階、

40

を更に含む、方法。

(6) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、

前記試料は、リンパ節から得られる、方法。

(7) 実施態様 6 に記載の方法において、

前記リンパ節は、前哨リンパ節である、方法。

(8) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、

前記試料は、生体組織検査法によって得られる、方法。

(9) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、

手術中に実施される、方法。

50

- (10) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、
前記黒色腫は、微小転移巣である、方法。
- (11) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、
特異度および感度は、黒色腫の転移部を検出するのに十分である、方法。
- (12) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色(hematoxylin and eosin) (H & E) 陰性リンパ節(negative nodes)と免疫組織化学(immunohistochemical) (IHC) 陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも 95% である、方法。
- (13) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも 97% である、方法。 10
- (14) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも 99% である、方法。
- (15) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節(positive nodes)と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも 80% である、方法。
- (16) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも 85% である、方法。 20
- (17) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも 90% である、方法。
- (18) 実施態様 1 1 に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも 97% であり、かつ、前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも 85% である、方法。
- (19) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、
前記の所定のカットオフレベルは、悪性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細胞または正常組織と比べて少なくとも 2 倍の過剰発現である、方法。 30
- (20) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、
遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップによって測定される、方法。
- (21) 実施態様 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記試料から抽出した RNA のポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction) (PCR) によって行われる核酸増幅によって決定される、方法。
- (22) 実施態様 2 1 に記載の方法において、
前記ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 生成物は、配列 ID 番号：25 ~ 28 の少なくとも 1 種を含有する、方法。
- (23) 実施態様 2 2 に記載の方法において、
前記 PCR 生成物は、蛍光化合物を含有する、方法。 40
- (24) 実施態様 2 3 に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、Fam、Texas Red、Cal Red、C1、Cy5 および Cy3 から成る群から選ばれる、方法。
- (25) 実施態様 2 4 に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、適用可能である、PLAB : Fam ; L1CAM : Texas Red、または、Cal Red ; チロシナーゼ : C1 ; PBGD : Cy5 に対応する、方法。
- (26) 実施態様 2 1 に記載の方法において、
前記 PCR は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) である、方法。 50

- (27) 実施態様26に記載の方法において、
前記RT-PCRは、1種以上の内部対照試薬を更に含有する、方法。
- (28) 実施態様21に記載の方法において、
a. 前記試料を均質化してホモジネート(homogenate)を生成する段階と、
b. RNA結合性物質を含有する基質(substrate)、または、RNA結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、
c. RNAを、前記RNA結合性物質に結合させる段階と、
d. あらゆる汚染物質、干渉物質(interferents)および非結合RNAを除去するのに十分な条件の下、前記基質を洗浄する段階と、
e. 前記基質から結合RNAを溶出する段階と、
10
によって、前記RNAが前記試料から抽出される、方法。
- (29) 実施態様1~5のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料中のメラニンを減少させる段階、
を更に含む、方法。
- (30) 実施態様29に記載の方法において、
前記試料を均質化してホモジネートを生成し、次いで、メラニンが付着するか、結合するか、または、固定されるマトリックスに前記ホモジネートを通過させることによって、メラニン濃度を減少させる、方法。
- (31) 実施態様30に記載の方法において、
前記マトリックスは、ポリマービーズ(polymer beads)を含有する、方法。
20
- (32) 実施態様30に記載の方法において、
前記マトリックスは、シリカを含有する、方法。
- (33) 実施態様28に記載の方法において、
前記RNAは、約8分間未満で抽出される、方法。
- (34) 実施態様28に記載の方法において、
前記RNAは、約6分間未満で抽出される、方法。
- (35) 実施態様1~5のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質を測定することによって測定される、方法。
- (36) 実施態様35に記載の方法において、
前記タンパク質は、前記タンパク質に特異な抗体によって検出される、方法。
30
- (37) 黒色腫を同定する方法において、
a. 組織試料を得る段階と、
b. 配列ID番号：4~6もしくは配列ID番号：7~9、および、配列ID番号：10~12もしくは配列ID番号：13~15；または、
配列ID番号：4~6もしくは配列ID番号：7~9、および、配列ID番号：10~12もしくは配列ID番号：13~15、および、配列ID番号：16~18、
から成る群から選ばれるプライマー/プローブのセットによって認識されるmRNAをコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、
40
を含み、
所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す、
方法。
- (38) 実施態様37に記載の方法において、
チロシナーゼ(配列ID番号：999)をコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。
- (39) 実施態様37に記載の方法において、
前記試料中で構成的に発現した遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。
50

- (40) 実施態様39に記載の方法において、
前記遺伝子は、PBGD(配列ID番号:979)をコードする、方法。
- (41) 実施態様37に記載の方法において、
配列ID番号:29~978から成る群から選ばれるpsidに対応するmRNAをコードする少なくとも1種の遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。
- (42) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料は、リンパ節から得られる、方法。
- (43) 実施態様42に記載の方法において、
前記リンパ節は、前哨リンパ節である、方法。 10
- (44) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料は、生体組織検査法によって得られる、方法。
- (45) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
手術中に実施される、方法。
- (46) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
前記黒色腫は、微小転移巣である、方法。
- (47) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
特異度および感度は、黒色腫の転移部を検出するのに十分である、方法。
- (48) 実施態様47に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)陰性リンパ節と免疫組織化学 20
(IHC)陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも95%である、方法。
- (49) 実施態様47に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ
節との比較に基づき少なくとも97%である、方法。
- (50) 実施態様47に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ
節との比較に基づき少なくとも99%である、方法。
- (51) 実施態様47に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節 30
との比較に基づき少なくとも80%である、方法。
- (52) 実施態様47に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節
との比較に基づき少なくとも85%である、方法。
- (53) 実施態様47に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節
との比較に基づき少なくとも90%である、方法。
- (54) 実施態様47に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ
節との比較に基づき少なくとも97%であり、かつ、前記感度は、ヘマトキシリン・エオ
ジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%で 40
ある、方法。
- (55) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
前記所定のカットオフレベルは、悪性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細胞
または正常組織と比べて少なくとも2倍の過剰発現である、方法。
- (56) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップによって測定される、方法。
- (57) 実施態様37~41のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記試料から抽出したRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によっ
て行われる核酸増幅によって決定される、方法。
- (58) 実施態様57に記載の方法において、 50

前記ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）生成物は、配列ID番号：25～28の少なくとも1種を含有する、方法。

（59）実施態様57に記載の方法において、

前記PCR生成物は、蛍光化合物を含有する、方法。

（60）実施態様59に記載の方法において、

前記蛍光化合物は、Fam、Texas Red、Cal Red、C1、Cy5およびCy3から成る群から選ばれる、方法。

（61）実施態様60に記載の方法において、

前記蛍光化合物は、適用可能である、PLAB：Fam；L1CAM：Texas Red、または、Cal Red；チロシナーゼ：C1；PBGD：Cy5に対応する、方法。

10

（62）実施態様57に記載の方法において、

前記PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）である、方法。

（63）実施態様62に記載の方法において、

前記RT-PCRは、1種以上の内部対照試薬を更に含有する、方法。

（64）実施態様57に記載の方法において、

a．前記試料を均質化してホモジネートを生成する段階と、

b．RNA結合性物質を含有する基質、または、RNA結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、

c．RNAを、前記RNA結合性物質に結合させる段階と、

20

d．あらゆる汚染物質、干渉物質および非結合RNAを除去するのに十分な条件の下、前記基質を洗浄する段階と、

e．前記基質から結合RNAを溶出する段階と、

によって、前記RNAが前記試料から抽出される、方法。

（65）実施態様37～41のいずれか1項に記載の方法において、

前記試料中のメラニンを減少させる段階、

を更に含む、方法。

（66）実施態様65に記載の方法において、

前記試料を均質化してホモジネートを生成し、次いで、メラニンが付着するか、結合するか、または、固定されるマトリックスに前記ホモジネートを通過させることによって、メラニン濃度を減少させる、方法。

30

（67）実施態様66に記載の方法において、

前記マトリックスは、ポリマービーズを含有する、方法。

（68）実施態様66に記載の方法において、

前記マトリックスは、シリカを含有する、方法。

（69）実施態様64に記載の方法において、

前記RNAは、約8分間未満で抽出される、方法。

（70）実施態様64に記載の方法において、

前記RNAは、約6分間未満で抽出される、方法。

（71）実施態様37～41のいずれか1項に記載の方法において、

40

遺伝子発現は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質を測定することによって測定される、方法。

（72）実施態様71に記載の方法において、

前記タンパク質は、前記タンパク質に特異な抗体によって検出される、方法。

（73）悪性メラニン形成細胞を良性メラニン形成細胞から識別する方法において、

a．組織試料を得る段階と、

b．PLAB（配列ID番号：1）およびL1CAM（配列ID番号：2）；または、

PLAB、L1CAMおよびNTRK3（配列ID番号：3）、

をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、

を含み、

50

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に悪性メラニン形成細胞が存在することを示す、

方法。

(74) 実施態様73に記載の方法において、

チロシナーゼ(配列ID番号:999)をコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(75) 実施態様73に記載の方法において、

前記試料中で構成的に発現した遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(76) 実施態様75に記載の方法において、

前記遺伝子は、PBGD(配列ID番号:979)をコードする、方法。

(77) 実施態様73に記載の方法において、

配列ID番号:29~978から成る群から選ばれるpsidに対応するmRNAをコードする少なくとも1種の遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(78) 実施態様73~77のいずれか1項に記載の方法において、

前記試料は、リンパ節から得られる、方法。

(79) 実施態様78に記載の方法において、

前記リンパ節は、前哨リンパ節である、方法。

(80) 実施態様73~77のいずれか1項に記載の方法において、

前記試料は、生体組織検査法によって得られる、方法。

(81) 実施態様73~77のいずれか1項に記載の方法において、

手術中に実施される、方法。

(82) 実施態様73~77のいずれか1項に記載の方法において、

前記黒色腫は、微小転移巣である、方法。

(83) 実施態様73~77のいずれか1項に記載の方法において、

特異度および感度は、黒色腫の転移部を検出するのに十分である、方法。

(84) 実施態様83に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)陰性リンパ節と免疫組織化学(IHC)陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも95%である、方法。

(85) 実施態様83に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも97%である、方法。

(86) 実施態様83に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも99%である、方法。

(87) 実施態様83に記載の方法において、

前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも80%である、方法。

(88) 実施態様83に記載の方法において、

前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%である、方法。

(89) 実施態様83に記載の方法において、

前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも90%である、方法。

(90) 実施態様83に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも97%であり、かつ、前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%で

10

20

30

40

50

ある、方法。

- (9 1) 実施態様 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法において、
前記所定のカットオフレベルは、悪性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細胞または正常組織と比べて少なくとも 2 倍の過剰発現である、方法。
- (9 2) 実施態様 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法において、
遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップによって測定される、方法。
- (9 3) 実施態様 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記試料から抽出した RNA のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって行われる核酸増幅によって決定される、方法。
- (9 4) 実施態様 9 3 に記載の方法において、
前記ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 生成物は、配列 I D 番号 : 2 5 ~ 2 8 の少なくとも 1 種を含有する、方法。 10
- (9 5) 実施態様 9 3 に記載の方法において、
前記 P C R 生成物は、蛍光化合物を含有する、方法。
- (9 6) 実施態様 9 5 に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、F a m、T e x a s R e d、C a l R e d、C 1、C y 5 および C y 3 から成る群から選ばれる、方法。
- (9 7) 実施態様 9 6 に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、適用可能である、P L A B : F a m ; L 1 C A M : T e x a s R e d、または、C a l R e d ; チロシナーゼ : C 1 ; P B G D : C y 5 に対応する、方法。 20
- (9 8) 実施態様 9 3 に記載の方法において、
前記 P C R は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) である、方法。
- (9 9) 実施態様 9 8 に記載の方法において、
前記 R T - P C R は、1 種以上の内部対照試薬を更に含有する、方法。
- (1 0 0) 実施態様 9 3 に記載の方法において、
a . 前記試料を均質化してホモジネートを生成する段階と、
b . RNA 結合性物質を含有する基質、または、RNA 結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、
c . RNA を、前記 RNA 結合性物質に結合させる段階と、 30
d . あらゆる汚染物質、干渉物質および非結合 RNA を除去するのに十分な条件の下、前記基質を洗浄する段階と、
e . 前記基質から結合 RNA を溶出する段階と、
によって、前記 RNA が前記試料から抽出される、方法。
- (1 0 1) 実施態様 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法において、
前記試料中のメラニンを減少させる段階、
を更に含む、方法。
- (1 0 2) 実施態様 1 0 1 に記載の方法において、
前記試料を均質化してホモジネートを生成し、次いで、メラニンが付着するか、結合するか、または、固定されるマトリックスに前記ホモジネートを通過させることによって、メラニン濃度を減少させる、方法。 40
- (1 0 3) 実施態様 1 0 2 に記載の方法において、
前記マトリックスは、ポリマービーズを含有する、方法。
- (1 0 4) 実施態様 1 0 2 に記載の方法において、
前記マトリックスは、シリカを含有する、方法。
- (1 0 5) 実施態様 1 0 0 に記載の方法において、
前記 RNA は、約 8 分間未満で抽出される、方法。
- (1 0 6) 実施態様 1 0 0 に記載の方法において、
前記 RNA は、約 6 分間未満で抽出される、方法。
- (1 0 7) 実施態様 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法において、 50

遺伝子発現は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質を測定することによって測定される、方法。

(108) 実施態様107に記載の方法において、

前記タンパク質は、前記タンパク質に特異な抗体によって検出される、方法。

(109) 悪性メラニン形成細胞を良性メラニン形成細胞から識別する方法において、

a. 組織試料を得る段階と、

b. 配列ID番号：4～6もしくは配列ID番号：7～9、および、配列ID番号：10～12もしくは配列ID番号：13～15；または、

配列ID番号：4～6もしくは配列ID番号：7～9、および、配列ID番号：10～12もしくは配列ID番号：13～15、および、配列ID番号：16～18、
から成る群から選ばれるプライマー/プローブのセットによって認識される遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、

を含み、

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に悪性メラニン形成細胞が存在することを示す、

方法。

(110) 実施態様109に記載の方法において、

チロシナーゼ(配列ID番号：999)をコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(111) 実施態様109に記載の方法において、

前記試料中で構成的に発現した遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(112) 実施態様110に記載の方法において、

前記遺伝子は、PBGD(配列ID番号：979)をコードする、方法。

(113) 実施態様109に記載の方法において、

配列ID番号：29～978から成る群から選ばれるpsidに対応するmRNAをコードする少なくとも1種の遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(114) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、

前記試料は、リンパ節から得られる、方法。

(115) 実施態様114に記載の方法において、

前記リンパ節は、前哨リンパ節である、方法。

(116) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、

前記試料は、生体組織検査法によって得られる、方法。

(117) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、

手術中に実施される、方法。

(118) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、

前記黒色腫は、微小転移巣である、方法。

(119) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、

特異度および感度は、黒色腫の転移部を検出するのに十分である、方法。

(120) 実施態様119に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)陰性リンパ節と免疫組織化学

(IHC)陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも95%である、方法。

(121) 実施態様119に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも97%である、方法。

(122) 実施態様119に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも99%である、方法。

10

20

30

40

50

- (123) 実施態様119に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも80%である、方法。
- (124) 実施態様119に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%である、方法。
- (125) 実施態様119に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも90%である、方法。
- (126) 実施態様119に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも97%であり、かつ、前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%である、方法。 10
- (127) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、
前記の所定のカットオフレベルは、悪性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細胞または正常組織と比べて少なくとも2倍の過剰発現である、方法。
- (128) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップによって測定される、方法。
- (129) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記試料から抽出したRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって行われる核酸増幅によって決定される、方法。 20
- (130) 実施態様129に記載の方法において、
前記ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物は、配列ID番号：25～28の少なくとも1種を含有する、方法。
- (131) 実施態様129に記載の方法において、
前記PCR生成物は、蛍光化合物を含有する、方法。
- (132) 実施態様131に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、Fam、Texas Red、Cal Red、C1、Cy5およびCy3から成る群から選ばれる、方法。 30
- (133) 実施態様132に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、適用可能である、PLAB:Fam; L1CAM:Texas Red、または、Cal Red; チロシナーゼ:C1; PBGD:Cy5に対応する、方法。
- (134) 実施態様128に記載の方法において、
前記PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)である、方法。
- (135) 実施態様134に記載の方法において、
前記RT-PCRは、1種以上の内部対照試薬を更に含有する、方法。
- (136) 実施態様129に記載の方法において、
a. 前記試料を均質化してホモジネートを生成する段階と、
b. RNA結合性物質を含有する基質、または、RNA結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、
c. RNAを、前記RNA結合性物質に結合させる段階と、
d. あらゆる汚染物質、干渉物質および非結合RNAを除去するのに十分な条件の下、前記基質を洗浄する段階と、
e. 前記基質から結合RNAを溶出する段階と、
によって、前記RNAが前記試料から抽出される、方法。 40
- (137) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料中のメラニンを減少させる段階、
を更に含む、方法。 50

- (138) 実施態様136に記載の方法において、
前記試料を均質化してホモジネートを生成し、次いで、メラニンが付着するか、結合するか、または、固定されるマトリックスに前記ホモジネートを通過させることによって、メラニン濃度を減少させる、方法。
- (139) 実施態様136に記載の方法において、
前記マトリックスは、ポリマービーズを含有する、方法。
- (140) 実施態様136に記載の方法において、
前記マトリックスは、シリカを含有する、方法。
- (141) 実施態様136に記載の方法において、
前記RNAは、約8分間未満で抽出される、方法。 10
- (142) 実施態様136に記載の方法において、
前記RNAは、約6分間未満で抽出される、方法。
- (143) 実施態様109～113のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質を測定することによって測定される、方法。
- (144) 実施態様143に記載の方法において、
前記タンパク質は、前記タンパク質に特異な抗体によって検出される、方法。
- (145) 患者を処置するプロトコルを決定する方法において、
a. 前記患者から組織試料を得る段階と、
b. PLAB (配列ID番号: 1) および L1CAM (配列ID番号: 2) ; または、
PLAB、L1CAM および NTRK3 (配列ID番号: 3) 、
をコードする遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、
を含み、
所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す、
方法。 20
- (146) 実施態様145に記載の方法において、
チロシナーゼ (配列ID番号: 999) をコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。 30
- (147) 実施態様145に記載の方法において、
前記試料中で構成的に発現した遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。
- (148) 実施態様147に記載の方法において、
前記遺伝子は、PBGD (配列ID番号: 979) をコードする、方法。
- (149) 実施態様145に記載の方法において、
配列ID番号: 29～978から成る群から選ばれるpsidに対応するmRNAをコードする少なくとも1種の遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。
- (150) 実施態様145～149のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料は、リンパ節から得られる、方法。 40
- (151) 実施態様150に記載の方法において、
前記リンパ節は、前哨リンパ節である、方法。
- (152) 実施態様145～149のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料は、生体組織検査法によって得られる、方法。
- (153) 実施態様145～149のいずれか1項に記載の方法において、
手術中に実施される、方法。
- (154) 実施態様145～149のいずれか1項に記載の方法において、
前記黒色腫は、微小転移巣である、方法。
- (155) 実施態様145～149のいずれか1項に記載の方法において、 50

特異度および感度は、黒色腫の転移部を検出するのに十分である、方法。

(156) 実施態様155に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)陰性リンパ節と免疫組織化学(IHC)陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも95%である、方法。

(157) 実施態様155に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも97%である、方法。

(158) 実施態様155に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも99%である、方法。

10

(159) 実施態様155に記載の方法において、

前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも80%である、方法。

(160) 実施態様155に記載の方法において、

前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%である、方法。

(161) 実施態様155に記載の方法において、

前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも90%である、方法。

(162) 実施態様155に記載の方法において、

前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも97%であり、かつ、前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%である、方法。

20

(163) 実施態様145~149のいずれか1項に記載の方法において、

前記の所定のカットオフレベルは、悪性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細胞または正常組織と比べて少なくとも2倍の過剰発現である、方法。

(164) 実施態様145~149のいずれか1項に記載の方法において、

遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップによって測定される、方法。

(165) 実施態様145~149のいずれか1項に記載の方法において、

遺伝子発現は、前記試料から抽出したRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって行われる核酸増幅によって決定される、方法。

30

(166) 実施態様165に記載の方法において、

前記ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物は、配列ID番号:25~28の少なくとも1種を含有する、方法。

(167) 実施態様165に記載の方法において、

前記PCR生成物は、蛍光化合物を含有する、方法。

(168) 実施態様167に記載の方法において、

前記蛍光化合物は、Fam、Texas Red、Cal Red、C1、Cy5およびCy3から成る群から選ばれる、方法。

40

(169) 実施態様168に記載の方法において、

前記蛍光化合物は、適用可能である、PLAB:Fam;L1CAM:Texas Red、または、Cal Red;チロシナーゼ:C1;PBGD:Cy5に対応する、方法。

(170) 実施態様152に記載の方法において、

前記PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)である、方法。

(171) 実施態様170に記載の方法において、

前記RT-PCRは、1種以上の内部対照試薬を更に含有する、方法。

(172) 実施態様165に記載の方法において、

a. 前記試料を均質化してホモジネートを生成する段階と、

50

b . R N A 結合性物質を含有する基質、または、R N A 結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、

c . R N A を、前記 R N A 結合性物質に結合させる段階と、

d . あらゆる汚染物質、干渉物質および非結合 R N A を除去するのに十分な条件の下、前記基質を洗浄する段階と、

e . 前記基質から結合 R N A を溶出する段階と、

によって、前記 R N A が前記試料から抽出される、方法。

(1 7 3) 実施態様 1 4 5 ~ 1 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法において、前記試料中のメラニンを減少させる段階、
を更に含む、方法。

10

(1 7 4) 実施態様 1 7 3 に記載の方法において、前記試料を均質化してホモジネートを生成し、次いで、メラニンが付着するか、結合するか、または、固定されるマトリックスに前記ホモジネートを通過させることによって、メラニン濃度を減少させる、方法。

(1 7 5) 実施態様 1 7 4 に記載の方法において、前記マトリックスは、ポリマービーズを含有する、方法。

(1 7 6) 実施態様 1 7 4 に記載の方法において、前記マトリックスは、シリカを含有する、方法。

(1 7 7) 実施態様 1 7 2 に記載の方法において、前記 R N A は、約 8 分間未満で抽出される、方法。

20

(1 7 8) 実施態様 1 7 2 に記載の方法において、前記 R N A は、約 6 分間未満で抽出される、方法。

(1 7 9) 実施態様 1 4 5 ~ 1 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法において、遺伝子発現は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質を測定することによって測定される、方法。

(1 8 0) 実施態様 1 7 9 に記載の方法において、前記タンパク質は、前記タンパク質に特異な抗体によって検出する、方法。

(1 8 1) 患者を処置するプロトコルを決定する方法において、

a . 前記患者から組織試料を得る段階と、

b . 配列 I D 番号 : 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号 : 7 ~ 9 、 および、配列 I D 番号 : 1 0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号 : 1 3 ~ 1 5 ; または、

30

配列 I D 番号 : 4 ~ 6 もしくは配列 I D 番号 : 7 ~ 9 、 および、配列 I D 番号 : 1 0 ~ 1 2 もしくは配列 I D 番号 : 1 3 ~ 1 5 、 および、配列 I D 番号 : 1 6 ~ 1 8 、

から成る群から選ばれるプライマー/プローブのセットによって同定される遺伝子の、前記試料中の発現レベルを測定する段階と、

を含み、

所定のカットオフレベルを超える前記遺伝子発現レベルが、前記試料中に黒色腫が存在することを示す、

方法。

40

(1 8 2) 実施態様 1 8 1 に記載の方法において、

チロシナーゼ (配列 I D 番号 : 9 9 9) をコードする遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(1 8 3) 実施態様 1 8 1 に記載の方法において、

前記試料中で構成的に発現した遺伝子の発現レベルを測定する段階、

を更に含む、方法。

(1 8 4) 実施態様 1 8 1 に記載の方法において、

前記遺伝子は、P B G D (配列 I D 番号 : 9 7 9) をコードする、方法。

(1 8 5) 実施態様 1 8 4 に記載の方法において、

配列 I D 番号 : 2 9 ~ 9 7 8 から成る群から選ばれる p s i d に対応する m R N A をコ

50

- ードする少なくとも1種の遺伝子の発現レベルを測定する段階、
を更に含む、方法。
- (186) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料は、リンパ節から得られる、方法。
- (187) 実施態様186に記載の方法において、
前記リンパ節は、前哨リンパ節である、方法。
- (188) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料は、生体組織検査法によって得られる、方法。
- (189) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
手術中に実施される、方法。 10
- (190) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
前記黒色腫は、微小転移巣である、方法。
- (191) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
特異度および感度は、黒色腫の転移部を検出するのに十分である、方法。
- (192) 実施態様191に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)陰性リンパ節と免疫組織化学
(IHC)陰性リンパ節との比較に基づき少なくとも95%である、方法。
- (193) 実施態様191に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ
節との比較に基づき少なくとも97%である、方法。 20
- (194) 実施態様191に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ
節との比較に基づき少なくとも99%である、方法。
- (195) 実施態様191に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節
との比較に基づき少なくとも80%である、方法。
- (196) 実施態様191に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節
との比較に基づき少なくとも85%である、方法。
- (197) 実施態様191に記載の方法において、
前記感度は、ヘマトキシリン・エオジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節
との比較に基づき少なくとも90%である、方法。 30
- (198) 実施態様191に記載の方法において、
前記特異性は、ヘマトキシリン・エオジン染色陰性リンパ節と免疫組織化学陰性リンパ
節との比較に基づき少なくとも97%であり、かつ、前記感度は、ヘマトキシリン・エオ
ジン染色陽性リンパ節と免疫組織化学陽性リンパ節との比較に基づき少なくとも85%で
ある、方法。
- (199) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
前記の所定のカットオフレベルは、悪性黒色腫を有する組織では、良性メラニン形成細
胞または正常組織と比べて少なくとも2倍の過剰発現である、方法。 40
- (200) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップによって測定される、方法。
- (201) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記試料から抽出したRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によっ
て行われる核酸増幅によって決定される、方法。
- (202) 実施態様201に記載の方法において、
前記ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物は、配列ID番号:25~28の少なくと
も1種を含有する、方法。
- (203) 実施態様201に記載の方法において、
前記PCR生成物は、蛍光化合物を含有する、方法。 50

- (204) 実施態様203に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、Fam、Texas Red、Cal Red、C1、Cy5およびCy3から成る群から選ばれる、方法。
- (205) 実施態様204に記載の方法において、
前記蛍光化合物は、適用可能である、PLAB:Fam; L1CAM:Texas Red、または、Cal Red; チロシナーゼ:C1; PBGD:Cy5に対応する、方法。
- (206) 実施態様201に記載の方法において、
前記PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)である、方法。
- (207) 実施態様206に記載の方法において、
前記RT-PCRは、1種以上の内部対照試薬を更に含有する、方法。 10
- (208) 実施態様201に記載の方法において、
a. 前記試料を均質化してホモジネートを生成する段階と、
b. RNA結合性物質を含有する基質、または、RNA結合物質が固定される基質に前記ホモジネートを接触させる段階と、
c. RNAを、前記RNA結合性物質に結合させる段階と、
d. あらゆる汚染物質、干渉物質および非結合RNAを除去するのに十分な条件の下、前記基質を洗浄する段階と、
e. 前記基質から結合RNAを溶出する段階と、
によって、前記RNAが前記試料から抽出される、方法。 20
- (209) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
前記試料中のメラニンを減少させる段階、
を更に含む、方法。
- (210) 実施態様209に記載の方法において、
前記試料を均質化してホモジネートを生成し、次いで、メラニンが付着するか、結合するか、または、固定されるマトリックスに前記ホモジネートを通過させることによって、メラニン濃度を減少させる、方法。
- (211) 実施態様210に記載の方法において、
前記マトリックスは、ポリマービーズを含有する、方法。
- (212) 実施態様210に記載の方法において、
前記マトリックスは、シリカを含有する、方法。 30
- (213) 実施態様208に記載の方法において、
前記RNAは、約8分間未満で抽出される、方法。
- (214) 実施態様208に記載の方法において、
前記RNAは、約6分間未満で抽出される、方法。
- (215) 実施態様181~185のいずれか1項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記遺伝子によってコードされたタンパク質を測定することによって測定される、方法。
- (216) 実施態様215に記載の方法において、
前記タンパク質は、前記タンパク質に特異な抗体によって検出される、方法。 40
- (217) 組成物において、
配列ID番号: 4~6、配列ID番号: 7~9、配列ID番号: 46~48、配列ID番号: 13~15、配列ID番号: 16~18、配列ID番号: 19~21、および、配列ID番号: 22~24から成る群から選ばれる少なくとも1つのプライマー/プローブのセットを含有する、組成物。
- (218) 組成物において、
配列ID番号: 25~28から成る群から選ばれる少なくとも1つのアンプリコン(amplicon: 増幅される産物)を含有する、組成物。
- (219) 組織試料中に黒色腫が存在するか否かを決定するアッセイを行うためのキットにおいて、 50

核酸増幅用および検出用の試薬を備えた、キット。

(220) 実施態様219に記載のキットにおいて、

前記試薬が、配列ID番号：1～3から成る群から選ばれるmRNAをコードする少なくとも1種の遺伝子の発現を検出するための配列を有するプライマーを含有している、キット。

(221) 実施態様219に記載のキットにおいて、

RT-PCR試薬を備えている、キット。

【0133】

参照文献

WO 96/29430	
2003/0232356	
2002/0160382	
2002/0155480	
2002/0110820	10
2002/0098535	
2003/0059431	
2003/0049701	
2002/0048784	
2003/014283	
2003/0013097	
6,500,919	
4,715,545	
5,210,015	
5,348,856	
5,411,876	20
5,413,924	
5,487,972	
5,512,437	
5,512,444	
5,525,494	
5,550,044	
5,612,201	
5,759,783	
5,804,375	
5,844,075	30
5,844,092	
5,872,225	
5,910,574	
5,969,124	
5,985,619	
5,994,102	
6,025,474	
6,057,105	
6,107,476	
6,153,388	
6,235,525	40
6,291,430	
6,326,145	
6,338,947	
6,369,211	
6,403,341	
6,426,217	
6,465,181	

6,475,727
 6,500,638
 6,521,227
 6,527,560
 6,599,699

- Abrahamsen et al. (2004) Quantification of melanoma mRNA markers in sentinel nodes: pre-clinical evaluation of a single-step real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay *J Molec Diag* 6:253-259 10
- Abrahamsen et al. (2005) Pathologic assessment of melanoma sentinel nodes: a role for molecular analysis using quantitative real-time reverse transcription-PCR for MART1 and tyrosinase messenger RNA *Clin Cancer Res* 11:1425-1433
- Adema et al. (1994) Molecular characterization of the melanocyte lineage specific antigen gp100 *J Biol Chem* 69:20126-20133
- Ahmed et al. (2004) Cdc42-dependent nuclear translocation of non-receptor tyrosine kinase, ACK *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314:571-579
- Aitken et al. (2004) Population screening for melanoma: current evidence and a community based randomized trial. In "Textbook of Melanoma" Ed. by JF Thompson, DL Morton and BBR Kroon. Martin and Dunitz 20
- Akula et al. (2004) Raf promotes human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection *Oncogene* 23:5227-5241
- Alexa et al. (2004) Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca²⁺ ions *J. Biol. Chem.* 279:20118-20126
- Altzner et al. (2004) Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis *J. Biol. Chem.* 279:5947-5957
- Antonescu et al. (2002) Molecular diagnosis of clear cell sarcoma: detection of EWS-ATF1 and MTF-M transcripts and histopathological and ultrastructural analysis of 12 cases *J. Mol. Diag.* 4:44-52
- Arozarena et al. (2004) Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors *Mol. Cell. Biol.* 24:1516-1530 30
- Bae et al. (2003) Gene expression patterns as potential molecular biomarkers for malignant transformation in human keratinocytes treated with MNNG, arsenic or a metal mixture *Toxicol Sci* 74:32-42
- Balch et al. (2001) Final version of the American Joint Committee on cancer staging system for cutaneous melanoma *J Clin Oncol* 19:3635-3648
- Baldi et al. (2003) Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a cDNA array study *Exp Dermatol* 12:213-218
- Barac et al. (2004) Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor *J. Biol. Chem.* 279:6182-6189 40
- Bendotti et al. (2004) Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63:113-119
- Bittner et al. (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling *Nature* 406:536-540
- Bostick et al. (1999) Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients *J. Clin. Oncol.* 17:3238-3244

Brown et al. (2003) MIC-1 Serum Level and Genotype: Associations with Progress and Prognosis of Colorectal Carcinoma *Clin. Cancer Res.* 9:2642-2650

Buckhaults et al. (2001) Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors *Cancer Res.* 61:6996-7001

Burzio et al. (2002) Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1alpha from zebrafish (*Danio rerio*) *J. Cell. Biochem.* 86:805-814

Buchs et al. (2004) Normal p21Ras/MAP kinase pathway expression and function in PBMC from patients with polycystic ovary disease *Int. J. Mol. Med.* 13:595-599

Cancer Facts and Figures 2003. American Cancer Society, 2003.

Care et al. (1996) HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas *Mol. Cell. Biol.* 16:4842-4851

Carlson et al. (2003) Biomarkers in melanoma: staging, prognosis and detection of early metastasis *Expert Rev Mol Diagn* 3:89-116

Catala et al. (2002) Genetic control of caudal development *Clin. Genet.* 61:89-96

Chen et al. (2003) Molecular characterization of human ninein protein: two distinct subdomains required for centrosomal targeting and regulating signals in cell cycle *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:975-983

Karan et al. (2003) Dysregulated expression of MIC-1/PDF in human prostate tumor cells *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 305:598-604

Chen et al. (2004) MEK1,2 response element mediates angiotensin II-stimulated plasminogen activator inhibitor-1 promoter activation *Blood* 103:2636-2644

Chen et al. (2004) Cdc42 and the actin-related protein/neural Wiskott-Aldrich syndrome protein network mediate cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* *Infect. Immun.* 72:3011-3021

Cheung et al. (2001) Detection of microscopic disease: comparing histology, immunocytology, and RT-PCR of tyrosine hydroxylase, GAGE, and MAGE *Med. Ped. Oncol.* 36:210-212

Ching et al. (2003) Identification of an autoinhibitory domain of p21-activated protein kinase 5 *J. Biol. Chem.* 278:33621-33624

Clark et al. (2003) The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment *Genome Res.* 13:2265-2270

Cochran et al. (2001) Current practice and future directions in pathology and laboratory evaluation of the sentinel node *Ann Surg Oncol.* 8(9 Suppl):13S-17S

Cochran et al. (2004) Optimized assessment of sentinel lymph nodes for metastatic melanoma: implications for regional surgery and overall treatment planning *Ann. Surg. Oncol.* 11:156S-161S

Cook et al (2003) The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma *J. Pathol.* 200:314-319

Cronin et al. (2004) Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay *Am J Pathol* 164:35-42

Davids et al. (2003) Accurate molecular detection of melanoma nodal metastases: an assessment of multimarker assay specificity, sensitivity, and detection rate *Mol. Pathol.* 56:43-51

de Braud et al. (2003) Malignant melanoma *Critical Review In*

10

20

30

40

50

Oncology/Hematology 47:35-63

Diego et al. (2003) Prognostic Significance of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction–Negative Sentinel Nodes in Malignant Melanoma *Ann. Surg. Oncol.* 10:396-402

Ducy et al. (2000) The family of bone morphogenetic proteins *Kidney Int.* 57:2207-2214

Dwivedi et al. (2004) Protein kinase A in postmortem brain of depressed suicide victims: altered expression of specific regulatory and catalytic subunits *Biol. Psychiatry* 55:234-243

Edgar et al. (2002) Cloning and tissue distribution of three murine alpha/beta hydrolase fold protein cDNAs *Biophys. Biochim. Res. Comm.* 292:617-625

Encinas et al. (2004) Tyrosine 981, a novel ret autophosphorylation site, binds c-Src to mediate neuronal survival *J. Biol. Chem.* 279:18262-18269

Esler et al. (2001) A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces *Science* 293:1449-1454

Evellin et al. (2002) Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B *J. Biol. Chem.* 277:16805-16813

Fenner et al. (1998) MSG1 (melanocyte-specific gene 1): mapping to chromosome Xq13.1, genomic organization, and promoter analysis *Genomics* 51:401-407

Fogel et al. (2003) L1 adhesion molecule (CD171) in development and progression of human malignant melanoma *Cancer Letters* 189:237-247

Fujii et al. (2004) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C200-C208

Gangemi et al. (2004) Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells *J Neurochem* 89:286-306

Giancotti et al. (1999) Integrin signaling *Science* 285:1028-1032

Golubovskaya et al. (2004) Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: nuclear factor kappa B and p53 binding sites *Biochim. Biophys. Acta* 1678:111-125

Gosmanov et al. (2004) Impaired expression and insulin-stimulated phosphorylation of Akt-2 in muscle of obese patients with atypical diabetes *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287:E8-E15

Goydos et al. (2003) Patterns of recurrence in patients with melanoma and histologically negative but RT-PCR-positive sentinel lymph nodes *J. Am. Coll. Surg.* 196:196-204

Grimsley et al. (2004) Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration *J. Biol. Chem.* 279:6087-6097

Gronholm et al. (2003) Merlin links to the cAMP neuronal signaling pathway by anchoring the R1beta subunit of protein kinase A *J. Biol. Chem.* 278:41167-41172

Guan et al. (2003) ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is down regulated by aberrant methylation in human melanoma *Int J Cancer* 107:202-208

Gustafson et al. (2004) Bcr-Abl Regulates Protein Kinase C α (PKC α) Transcription via an Elk1 Site in the PKC α Promoter *J. Biol. Chem.* 279:9400-9408

Gutzmer et al. (2002) Specificity of tyrosinase and HMB45 PCR in the detection of melanoma metastases in sentinel lymph node biopsies *Histopathol* 41:510-518

Haendeler et al. (2003) GIT1 mediates Src-dependent activation of phospholipase Cgamma by angiotensin II and epidermal growth factor *J. Biol. Chem.* 278:49936-

10

20

30

40

50

49944

Hafner et al. (2003) Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma *Int. J. Oncol.* 23:1553-1559

Haqq et al. (2005) The gene expression signature of melanoma progression *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6092-6097

Haspel et al (2003) *Front. Biosci.* 8:S1210-S1225

Hendrix et al. (2002) *Cancer Res* 62:665-668

Henshall et al. (2003) *Cancer Res.* 63:4196-4203

Hilgard et al. (2004) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287:G192-G201

Hipfel et al. (1998) RNA isolation from human skin tissues for colorimetric differential display *J Biochem Biophys Method* 37:131-135

Hipfel et al. (2000) *Br. J. Cancer* 82:1149-1157

Hiraga et al. (1997) *Virchows Archiv.* 431:45-51

Hisaoka et al. (2002) *J. Pathol.* 197:661-667

Hoek et al. (2004) Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas *Cancer Res* 64:5270-5282

Hoon et al. (2001) *J. Invest. Dermatol.* 117:375-378

Hoon et al. (2004) Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumor and plasma from cutaneous melanoma patients *Oncogene* 23:4014-4022

Izard et al. (2004) *Nature* 427:171-175

Jaffer et al. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:713-717

Kadaja et al. (2004) *Oncogene* 23:2523-2530

Kam et al. (2004) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30:225-232

Kamholz et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4962-4966

Kammula et al. (2004) Serial follow-up and prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction-staged sentinel lymph nodes from melanoma patients *J Clin Oncol* 22:3989-3996

Kaneda et al. (2002) *Int. J. Cancer* 100:57-62

Kikuchi et al. (2003) An N-terminal fragment of ProSAAS (a granin-like neuroendocrine peptide precursor) is associated with tau inclusions in Pick's disease *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:646-654

Kirchhoff et al. (2004) *J. Virol.* 78:6864-6874

Kitano et al. (2003) *Mol. Biol. Evol.* 20:1281-1289

Kuo et al. (2003) Prediction of disease outcome in melanoma patients by molecular analysis of paraffin- embedded sentinel lymph nodes *J Clin Oncol* 21:3566-3572

Lee et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:6834-6839

Lee et al. (2004) *J. Neurosci.* 24:2304-2312

Li et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:121180-12184

Li et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:15938-15945

Li et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:20401-20410

Liu et al (2003) *Cancer Res.* 63:5034-5040

Liu et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:15829-15835

Liu et al. (2003) Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells *Cancer Res* 63:5034-40

Luftner et al. (2003) Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine-phosphorylated metabolite in advanced breast cancer *Anticancer Res.* 23(2A):991-997

10

20

30

40

50

- Luo et al. (2001) Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling *Cancer Res* 61:4683-4688
- Luthi et al. (2003) *Exp. Hematol.* 31:150-158
- MacDougall et al. (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:2194-2205
- Majumder et al. (2004) *Nat. Med.* 10:594-601
- Mandelcorn-Monson et al. (2003) *J. Invest. Dermatol.* 121:550-556
- Marchetti et al. (2003) *J. Cell. Biochem.* 88:865-872
- Maresh et al. (1994) *DNA Cell. Biol.* 13:87-95 10
- Marlow et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:502-509
- McGregor et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4540-4545
- McMasters (2003) Molecular staging of melanoma: sensitivity, specificity and the search of clinical significance *Ann Surg Oncol* 10:336-337
- Menez et al. (2004) *Oncogene* 23:2630-2639
- Messina et al. (1999) Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma *Am J Surg Pathol* 23:686-690
- Monaco (2004) Evidence regarding a role for CDK5 dysregulation in Alzheimer's disease *Curr Alzheimer Res* 1:33-38
- Morton et al. (1992) Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma *Arch Surg* 127:392-399 20
- Nakamura et al. (2003) Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues *Br. J. Cancer* 88:1101-1104
- Nishihara et al. (2004) Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK *J. Biol. Chem.* 279:26176-26183
- Nomura et al. (2004) Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations *J. Biol. Chem.* 279:22664-22673
- Oda et al. (2003) CrkL directs ASAP1 to peripheral focal adhesions *J. Biol. Chem.* 278:6456-6460 30
- Okada et al. (2001) Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay *Cancer* 92:2056-2064
- Okami et al. (2001) Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma *Clin. Cancer Res.* 6:2326-2332
- Ooka et al. (2000) Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients *Oncol. Rep.* 7:561-566
- Oury et al. (2004) ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation *J. Biol. Chem.* 279:26266-26273 40
- Palmieri et al. (2001) Detection of occult melanoma cells in paraffin-embedded histologically negative sentinel lymph nodes using a reverse transcriptase polymerase chain reaction assay *J. Clin. Oncol.* 19:1437-1443
- Paralkar et al. (1998) Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family *J. Biol. Chem.* 273:13760-13767
- Pastorino et al. (2004) BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo *Mol. Cell. Neurosci.* 25:642-649

- Patel et al. (2003) Cadherin switching in ovarian cancer progression *Int. J. Cancer* 106:172-177
- Pitsi et al. (2004) Presenilin 1 stabilizes the C-terminal fragment of the amyloid precursor protein independently of gamma-secretase activity *J. Biol. Chem.* 279:25333-25338
- Masters et al. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4245-4249
- Polyak et al. (1997) A model for p53-induced apoptosis *Nature* 389:300-305 10
- Pontow et al. (2004) Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion *J. Virol.* 78:7138-7147
- Prichard et al. (2003) The role of molecular staging in malignant melanoma *Eur. J. Surg. Oncol.* 29:306-314
- Qi et al. (2004) α -Chimaerin exists in a functional complex with the Cdk5 kinase in brain *FEBS Lett.* 561:177-180
- Qi et al. (2004) Essential Role of p38 {gamma} in K-Ras Transformation Independent of Phosphorylation *J. Biol. Chem.* 279:22138-22144
- Qin et al. (2004) p53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas *Mol Cancer Therap* 3:895-902 20
- Raas-Rothschild et al. (2002) A PEX6-defective peroxisomal biogenesis disorder with severe phenotype in an infant, versus mild phenotype resembling Usher syndrome in the affected parents *Am. J. Hum. Genet.* 70:1062-1068
- Raich et al. (1986) Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase *Nucl. Acids Res.* 14:5955-5968
- Ray et al. (1997) AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3229-3234
- Reifenberger et al. (2004) Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas *Int. J. Cancer* 109:377-384 30
- Reintgen et al. (2004) The staging of malignant melanoma and the Florida Melanoma Trial *Ann. Surg. Oncol.* 11(3Suppl):186S-191S
- Rhee et al. (2004) MEK is a key modulator for TLR5-induced interleukin-8 and MIP3alpha gene expression in non-transformed human colonic epithelial cells *J. Biol. Chem.* 279:25179-25188
- Riccioni et al. (2002) The sentinel lymph node in melanoma: utilization of molecular biology (RT-PCR) to detect occult metastases *Pathologica* 94:190-195
- Riboldi et al. (2003) Detection of micrometastasis in sentinel lymph nodes from melanoma patients: direct comparison of multimarker molecular and immunopathological methods *Melanoma Res* 13:511-520 40
- Ring et al. (1998) Five SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) genes are dispersed in the human genome *Genomics* 51:140-143
- Ryden et al. (1996) Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis *Br. J. Cancer* 74:773-779
- Saito et al. (2004) Immunohistochemical diagnosis of a rare case of epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumor with multiple metastases *Jpn. J. Ophthalmol.*

48:199-207

Sakwe et al. (2004) Involvement of protein kinase C-alpha and -epsilon in extracellular Ca(2+) signalling mediated by the calcium sensing receptor *Exp. Cell Res.* 297:560-573

Salazar-Onfray et al. (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker *Br. J. Cancer* 87:414-422

Salazar-Onfray et al. (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker *Br J Cancer* 87:414-422

Sasaki et al. (2004) BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype *J. Invest. Dermatol.* 123:177-183

Satyamoorthy et al. (2002) A versatile method for the removal of melanin from ribonucleic acids in melanocytic cells *Mel. Res.* 12:449-452

Schechtman et al. (2004) A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation *J. Biol. Chem.* 279:15831-15840

Schmuth et al. (2004) The effect of LXR activators on AP-1 proteins in keratinocytes *J. Invest. Dermatol.* 123:41-48

Segal et al. (2003) Classification of clear-cell sarcoma as a subtype of melanoma by genomic profiling *J. Clin. Oncol.* 21:1775-1781

Sells et al. (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells *Curr. Biol.* 7:202-210

Seykora et al. (2003) Gene expression profiling of melanocytic lesions *Am J Dermatopathol* 25:6-11

Shimizu et al. (1999) High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis *Biochem Biophys Res Commun* 264:751-758

Shirotani et al. (2004) Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1 *J. Neurochem.* 89:1520-1527

Shivers et al. (1998) Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome *JAMA* 280:1410-1415

Smith et al. (1997) Chromosomal localization of three human dual specificity phosphatase genes (DUSP4, DUSP6, and DUSP7) *Genomics* 42:524-7

Starz et al. (2003) Tyrosinase RT-PCR as a supplement to histology for detecting melanoma and nevus cells in paraffin sections of sentinel lymph nodes *Mod Pathol* 16:920-929

Stieber et al. (2003) Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4 *J. Biol. Chem.* 278:33672-33680

Stoletov et al. (2004) Nck and Crk mediate distinct VEGF-induced signaling pathways that serve overlapping functions in focal adhesion turnover and integrin activation *Exp. Cell Res.* 295:258-268

Strausberg et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16899-16903

Su et al. (2001) Evaluation of acute hepatic failure treated at the Department of Medicine III, Kyushu University Hospital: indications for living-donor liver transplantation *Cancer Res.* 61:7388-7993

Suzuki et al. (2000) Power spectral analysis of R-R interval variability before and during the sinusoidal heart rate pattern in fetal lambs *Int. J. Oncol.* 15:1227-1232

10

20

30

40

50

Swiatek et al. (2004) Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling J. Biol. Chem. 279:13011-13017

Szebeni et al. (2003) Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23 J. Biol. Chem. 278:9107-9115

Taback et al. (2000) The clinical utility of multimarker RT-PCR in the detection of occult metastasis in patients with melanoma Recent Results Cancer Res 158:78-92

Takeuchi et al. (2004) Prognostic significance of molecular upstaging of paraffin-embedded sentinel lymph nodes in melanoma patients J Clin Oncol 22:2671-2680

The Washington University-Merck EST Project Hillier et al. (1995)

Thies et al. (2002) Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma Eur J Cancer 38:1708-1716

Tokuo et al. (2004) Myosin X transports Mena/VASP to the tip of filopodia Biochem. Biophys. Res. Commun. 319:214-220

Tremuth et al. (2004) A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain J. Biol. Chem. 279:22258-22266

Tsutsumi et al. (2003) Regulation of cell proliferation by autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase signaling J. Biol. Chem. 278:32165-32172

Tusher et al. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response Proc Natl Acad Sci USA 98:5116-5121

Van Impe et al. (2003) The Nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins J. Biol. Chem. 278:17945-17952

Vandesompele et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes Genome Biol 3:1-11

Wang et al. (2001) Optimal procedure for extracting RNA from human ocular tissues and expression profiling of the congenital glaucoma gene *FOXC1* using quantitative RT-PCR Mol. Vision 7:89-94

Wang et al. (2002) The third activity for lysyl hydroxylase 3: galactosylation of hydroxylysyl residues in collagens in vitro Matrix Biol. 21:559-566

Wang et al. (2004) Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer J. Clin Oncol 22:1564-1571

Weeraratna (2004) Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome Oncogene 23:2264-2274

Weiser et al. (2001) Induction of MAGE-3 expression in lung and esophageal cancer cells Ann. Thorac. Surg. 71:295-301

Welk et al. (2001) Identification and characterization of the gene encoding human cytoplasmic polyadenylation element binding protein Gene 263:113-20.

Welsh et al. (2003) Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum Proc Natl Acad Sci USA 100:3410-3415

Wilson et al. (2000) An early requirement for FGF signaling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo Curr Bio 10:421-429

Woo et al. (2004) Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction Oncogene 23:1845-1853

Wrightson et al. (2001) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

10

20

30

40

50

analysis of nonsentinel nodes following completion lymphadenectomy for melanoma J. Surg. Res. 98:47-51

Xu et al. (2003) Transforming growth factor-beta1 stimulated protein kinase B serine-473 and focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation dependent on cell adhesion in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells Biochem. Biophys. Res. Commun. 312:388-396

Xu et al. (2003) Expression of neurotrophin receptor Trk-C in nevi and melanomas J Cutan Pathol 30:318-322 10

Yamanaka et al. (1999) Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma Int. J. Mol. Med. 2:57-60

Yamauchi et al. (2003) Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway Proc Natl Acad Sci USA 100:14421-14426

Yang et al. (2003) Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation Mol Cancer Therapy 2:1023-1029

Yannoni et al. (2004) P66^{ShcA} interacts with MAPKAP kinase 2 and regulates its activity FEBS Lett. 564:205-211

Yoshimatsu et al. (1998) Expression of the melanoma antigen-encoding gene in human lung cancer J. Surg. Oncol. 67:126-129 20

Yu et al. (1999) Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes Cancer 86:617-627

Yu et al. (2004) A minimal length between tau exon 10 and 11 is required for correct splicing of exon 10 J. Neurochem. 90:164-172

Zatti et al. (2004) The presenilin 2 M239I mutation associated with familial Alzheimer's disease reduces Ca²⁺ release from intracellular stores Neurobiol. Dis. 15:269-278

Zhang et al. (2003) Negative regulation of T cell antigen receptor-mediated Crk-L-C3G signaling and cell adhesion by Cbl-b J. Biol. Chem. 278:23978-23983

Zhang et al. (2004) Characterization of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Cgamma expressed and purified from sf9 cells Protein Expr. Purif. 35:156-169 30

Zhang et al. (2004a) Hsp90/p50cdc37 is required for mixed-lineage kinase (MLK) 3 signaling J. Biol. Chem. 279:19457-19463

Zhou et al. (2004) A novel crosstalk mechanism between nuclear receptor-mediated and growth factor/Ras-mediated pathways through PNRG-Grb2 interaction Oncogene 23:5394-5404 40

【 0 1 3 4 】

【 図 1 】 データ解析の流れ図である。

【 図 2 】 全ての試料の中に少なくとも2つの「プレゼント」コールを有する15,795個の遺伝子に関する階層的クラスタリングである。各々のカラムは試料であり、各々の列(row)は遺伝子である。赤色(red)は発現上昇(up-regulation)であり、緑色(green)は発現低下(down-regulation)である。紫色(purple)は黒色腫試料であり、黄色(yellow)は良性母斑試料であり、青色(blue)は正常皮膚試料である。

【 図 3 】 選定された遺伝子のマイクロアレイ発現 (A) およびリアルタイム R T - P C R による確認データ (B) である。左から最初の14個の試料は黒色腫試料 (赤色) であり、次の7個は良性母斑試料 (黄色) であり、最後の5個は正常皮膚試料 (青色) である。マイクロアレイ・プロットのx軸は強度値を示し、PCRプロットのx軸は 2^{-Ct} [式中、 2^{-Ct} は Ct (標的遺伝子) - Ct (P B G D) である] である。

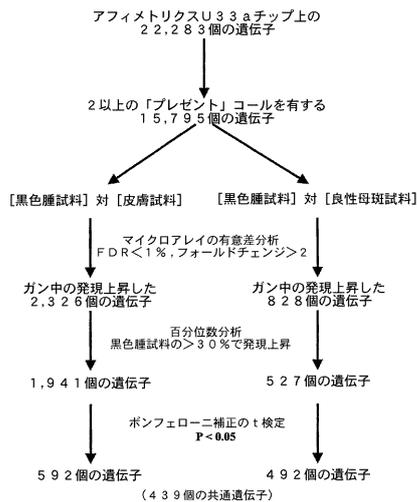
10

【 図 4 】 インジェニイティ (Ingenuity) (登録商標) 経路解析ソフトウェアアプリケーション (Pathway Analysis Software Application) から採用された、アミロイドプロセッシング経路である。黒色腫で発現上昇した遺伝子は赤色であり、黒色腫で発現低下した遺伝子は緑色である。各々の遺伝子記号は、黒色腫試料と良性母斑試料 / 正常皮膚試料との間の発現レベルのフォールドチェンジ (fold change) を伴う。

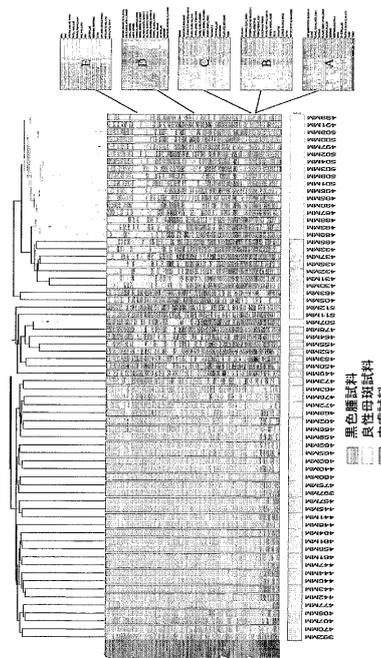
【 図 5 】 P L A B および L 1 C A M (A) と、従来の黒色腫マーカー [g p 1 0 0 、 チロシナーゼ (配列 I D 番号 : 9 9 9) および M A R T 1] (B) とのワンステップ定量的 R T - P C R アッセイである。各々のプロットのx軸は、新規なマーカーまたは従来のマーカーに対するスコアを表わしている。各々の試料のカテゴリに対する中央値スコアが表示されている。各々のプロットには、正常皮膚試料 (緑色) および良性母斑試料 (赤色) に基づく2つのカットオフレベルが表示されている。

20

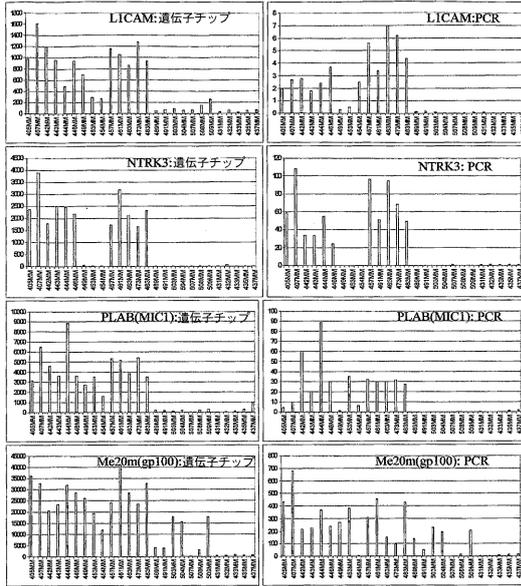
【 図 1 】



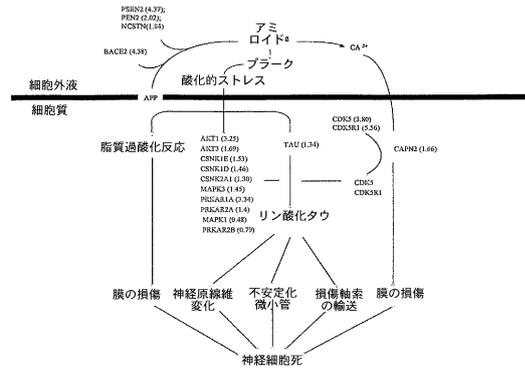
【 図 2 】



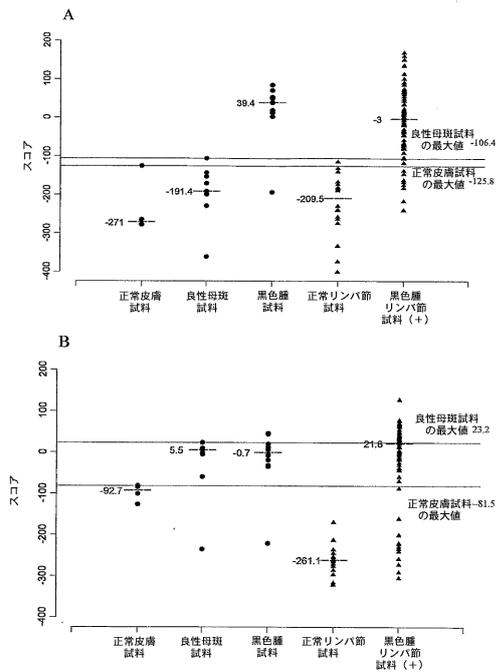
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2008504034000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2005/022846
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FOGEL MINA ET AL: "L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma." CANCER LETTERS, vol. 189, no. 2, 28 January 2003 (2003-01-28), pages 237-247, XP002377433 ISSN: 0304-3835 abstract	1-221
A	XU XIAOWEI ET AL: "Expression of neurotrophin receptor Trk-C in nevi and melanomas." JOURNAL OF CUTANEOUS PATHOLOGY, vol. 30, no. 5, May 2003 (2003-05), pages 318-322, XP002377434 ISSN: 0303-6987 abstract	1-221
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		** 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
9 May 2006	19/05/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Costa Roldán, N	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/022846

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIHINEN PIA P ET AL: "New prognostic factors and developing therapy of cutaneous melanoma." ANNALS OF MEDICINE, vol. 35, no. 2, 2003, pages 66-78, XP009065071 ISSN: 0785-3890 abstract	1-221
A	THIES ANKA ET AL: "Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER (OXFORD, ENGLAND : 1990) SEP 2002, vol. 38, no. 13, September 2002 (2002-09), pages 1708-1716, XP002377435 ISSN: 0959-8049 abstract	1-221
A	BITTNER M ET AL: "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling" NATURE (LONDON), vol. 406, no. 6795, 3 August 2000 (2000-08-03), pages: 536-540, XP000990000 ISSN: 0028-0836 abstract	1-221
A	WO 02/27028 A (ATAIRGIN TECHNOLOGIES, INC; SKINNER, MICHAEL, K; PATTON, JODI, L; CHAU) 4 April 2002 (2002-04-04) example 1	
A	WO 01/27295 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES OEFFENTLICHEN RECHTS; SC) 19 April 2001 (2001-04-19) figure 1	
A	WO 2004/019886 A (CYTOCURE LLC; DURDA, PAUL, J; KURNICK, JAMES, T; DUNN, IAN, S) 11 March 2004 (2004-03-11) example 1	
A	WO 01/94629 A (AVALON PHARMACEUTICALS) 13 December 2001 (2001-12-13) abstract	
P,X	WO 2005/044990 A (BAYER HEALTHCARE LLC; MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEAR) 19 May 2005 (2005-05-19) the whole document	1-221

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/022846

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	TALANTOV DMITRI ET AL: "Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. 15 OCT 2005, vol. 11, no. 20, 15 October 2005 (2005-10-15), pages 7234-7242, XP002377436 ISSN: 1078-0432 the whole document	1-221

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/022846

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-216 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2005/022846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0227028	A	04-04-2002	AU 9484201 A
			US 2004110197 A1
WO 0127295	A	19-04-2001	AU 1993701 A
			DE 19949594 A1
WO 2004019886	A	11-03-2004	EP 1228224 A1
			AU 2003268275 A1
WO 0194629	A	13-12-2001	CA 2497151 A1
			EP 1542609 A2
WO 2005044990	A	19-05-2005	AU 6455901 A
			CA 2411601 A1
			EP 1358349 A2
			JP 2004509612 T
			NONE

フロントページの続き

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

(72)発明者 ワン・イーシン

アメリカ合衆国、 9 2 1 3 9 カリフォルニア州、 サン・ディエゴ、 ユニット・E、 エル・カミノ
・リアル 1 2 5 1 1

(72)発明者 タラントフ・ディミトリ

アメリカ合衆国、 9 2 1 3 0 カリフォルニア州、 サン・ディエゴ、 ナンバー・2 3 8、 シグネチ
ャー・ポイント 1 3 0 1 9

(72)発明者 マズムダー・アブジット

アメリカ合衆国、 0 7 9 2 0 ニュージャージー州、 バスキング・リッジ、 カーライル・ロード
3 5

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA01 CA09 CA12 CA20 HA11

4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR35 QR55 QR59

QR62 QS25 QS32 QX02