

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2011年6月3日(03.06.2011)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2011/065533 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)  
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/071258
- (22) 国際出願日: 2010年11月29日(29.11.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2009-272501 2009年11月30日(30.11.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野口 眞三郎 (NOGUCHI, Shinzaburo) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 直居 靖人 (NAOI, Yasuto) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号

国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 岸 和希 (KISHI, Kazuki) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 平尾 紘一 (HIRAO, Koichi) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人サンクレスト国際特許事務所 (SunCrest Patent and Trademark Attorneys); 〒6500023 兵庫県神戸市中央区栄町通四丁目1番11号 Hyogo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINATION OF SENSITIVITY TO PRE-OPERATIVE CHEMOTHERAPY FOR BREAST CANCER

(54) 発明の名称: 乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法

[図1]

		AA		CC	
		判別式による判定結果			
BB 病理学の検査		npCR	pCR	特異度	65.7%
				23	12
		pCR			
		0	15		
		NPV	PPV		
		100.0%	55.6%		
		DD			

AA RESULTS OF DETERMINATION ACCORDING TO DETERMINATION FORMULA  
 BB PATHOLOGIC TEST  
 CC DEGREE OF SPECIFICITY  
 DD SENSITIVITY

(57) Abstract: RNA that is extracted from a sample collected from a subject is amplified to prepare a measurement sample, the expression amounts of genes included in a specific gene group are measured using the measurement sample, and the sensitivity to a pre-operative chemotherapy for breast cancer is determined based on the results obtained by analyzing the expression amounts.

(57) 要約: 被験者から採取された検体から抽出されたRNAを増幅し、測定用試料を調製し、当該測定用試料を用いて、特定遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定し、前記発現量を解析した結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する。



WO 2011/065533 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

**発明の名称**：乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法に関する。

### 背景技術

[0002] 乳癌の治療においては、腫瘍縮小による温存率の向上を目的とした抗癌剤による乳癌術前化学療法が広く普及している。Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)によるメタアナリシスにおいては、術前化学療法を受けた患者と術後化学療法を受けた患者との間では、乳癌の再発の抑制および生存率の向上に関して、差が無いことが示されている。

[0003] しかも、前記EBCTCGによるメタアナリシスでは、術前化学療法を受けた患者においては、術前化学療法を受けていない患者に比べて、乳房温存率が有意に高くなっていることが示されている。また、前記EBCTCGによるメタアナリシスでは、術前化学療法により病理学的完全奏功 (pCR) の得られた症例では、その後の予後が良好である傾向があることも示されている。そのため、pCRは、術前化学療法を受けた患者における乳癌の予後予測因子として有用であると考えられている。また、このような背景から、乳癌における術前化学療法は、今後ますます普及していくものと予想されている。

[0004] しかしながら、術前化学療法は、乳癌の全ての症例に対して有効であるとは限らないため、術前化学療法に反応しない症例では、手術への移行も含めた他の対応が必要となっている。

このように、個々の腫瘍の術前化学療法に対する反応性 (術前化学療法に対する感受性) を考慮して、治療の個別化 (tailoring) が求められている。しかしながら、術前化学療法に対する感受性を精度良く判定する製品が実現化されていないため、現状では難しい。

- [0005] ところで、乳癌の治療に際しては、治療開始前に、組織が乳癌組織であるかどうかの診断を行なうために、例えば、穿刺吸引生検、コア針生検、吸引装置付き針生検装置を用いた生検（例えば、マンモトーム生検など）等によって、乳癌組織を含む微量な生物試料を得ることができる。
- [0006] 近年、このような微量な生物試料から抽出された核酸を用い、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報解析を行なうことが可能になっている。前記網羅的遺伝子発現情報解析より、予後などの生物学的特性の違いや治療に対する感受性の違いを癌の個性として遺伝子の発現量で定量化して識別することや、性質が似ている複数の症例で共通の発現パターンを示す遺伝子群を同定すること、類似の発現パターンを示す遺伝子群がある症例を分類することなどが試みられている（例えば、特許文献 1 参照）。
- [0007] 前記特許文献 1 には、検体における特定の遺伝子の発現を多変量解析して、その解析結果を指標として遺伝子の発現パターンが類似する群ごとに検体を分類し、分類結果から乳癌などの状態を予測することが記載されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0008] 特許文献1：国際公開第02/072828号パンフレット

### 発明の概要

- [0009] しかしながら、術前化学療法に対する感受性などをより精度良く判定する方法が求められているのが現状である。
- [0010] 本発明は、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定することができる乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法を提供することを目的とする。
- [0011] すなわち、本発明は、
- [1] (A) 被験者から採取された検体からRNAを抽出する工程、
  - (B) 前記工程(A)で抽出されたRNAを用いて測定用試料を調製する工程、
  - (C) 前記工程(B)で得られた測定用試料を用いて、表1および表2に記

載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量を測定する工程であって、前記遺伝子の発現量が、表 3 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を少なくとも含むものである工程、

(D) 前記工程 (C) で測定された前記遺伝子の発現量を解析する工程、および

(E) 前記工程 (D) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程、

を含む、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法、

[2] 前記工程 (D) において、前記発現量を、クラス分け手法を用いて解析する、前記 [1] に記載の方法、

[3] 前記クラス分け手法が、Between-group analysis である、前記 [2] に記載の方法、

[4] 前記工程 (C) において、表 1 および表 2 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定し、測定された各遺伝子の発現量と、下記式 (1) :

[0012] [数1]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0133 \quad (1)$$

[0013] [式 (1) 中、 $i$  は表 1 および表 2 に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$  は表 4、表 5 および表 6 に記載された遺伝子番号  $i$  の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$  は下記式 (2) :

[0014] [数2]

$$X_i = y_i + \text{abs}[\text{round}(\min(y_{ij}) - 1)] \quad (2)$$

[0015] [式 (2) 中、 $j$  は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$  は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の検体番号  $j$  の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$  は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$  は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$  は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$  は下記式 (3)

:

[0016] [数3]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s_i} \quad (3)$$

[0017] (式(3)中、 $x_i$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。)に示される遺伝子番号*i*の遺伝子の標準化された発現量を示す。)により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\Sigma_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。)

で表される判別式とを用い、前記判別式の解*D*が正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解*D*がゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する、前記[3]に記載の方法、

[5] 前記工程(C)において、表3に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定し、測定された各遺伝子の発現量と、下記式(4)：

[0018] [数4]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0069 \quad (4)$$

[0019] {式(1)中、*i*は表3に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表7に記載された遺伝子番号*i*の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式(5)：

[0020] [数5]

$$X_i = y_i + \text{abs} \left[ \text{round} \left\{ \min(y_{ij}) - 1 \right\} \right] \quad (5)$$

[0021] [式(2)中、*j*は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の検体番号*j*の検体での標準化された発現量を示し、*min*は括弧内の値の最小値を示し、*round*は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、*abs*は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式(6)

:

[0022]

[数6]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s_i} \quad (6)$$

[0023] (式(6)中、 $x_i$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号*i*の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。)に示される遺伝子番号*i*の遺伝子の標準化された発現量を示す。)により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\Sigma_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。]

で表される判別式とを用い、前記判別式の解Dが正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解Dがゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する、前記〔3〕に記載の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法、

〔6〕 前記工程(D)において、前記発現量を、階層的クラスタ分析により解析する、前記〔1〕に記載の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法、

〔7〕 前記工程(D)において、前記発現量を、スコア化手法により解析する、前記〔1〕に記載の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法、

〔8〕 前記各遺伝子の発現量を、前記各遺伝子に対応する核酸を少なくとも有するマイクロアレイを用いて測定する前記〔1〕に記載の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法、ならびに

〔9〕 前記検体が、治療前生検により被験者から採取された検体である、前記〔1〕に記載の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法に関する。

[0024] 本発明の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法によれば、乳癌の術前化学療法に対する感受性を精度良く判定することができるという優れた効果を奏する。

### 図面の簡単な説明

[0025] [図1]実施例1において、トレーニングセットの50例の乳癌患者の検体につ

いて、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す図である。

[図2]実施例2において、バリデーションセットの34例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す図である。

[図3]実施例3において、トレーニングセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく樹形図である。

[図4]実施例3において、バリデーションセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく樹形図である。

[図5]実施例4において、トレーニングセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく第一主成分スコアおよび第二主成分スコアの散布図である。

[図6]実施例4において、バリデーションセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく第一主成分スコアおよび第二主成分スコアの散布図である。

[図7]実施例5において、プローブ数と感度×特異度との関係を示すグラフである。

[図8]実施例6において、トレーニングセットの50例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す図である。

[図9]実施例7において、バリデーションセットの34例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す図である。

[図10]実施例8において、トレーニングセットの50例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す図である。

[図11]実施例9において、バリデーションセットの34例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す図である。

**発明を実施するための形態**



[0026] 本発明の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法は、（Ａ）被験者から採取された検体からRNAを抽出する工程、  
（Ｂ）前記工程（Ａ）で抽出されたRNAを用いて測定用試料を調製する工程、  
（Ｃ）前記工程（Ｂ）で得られた測定用試料を用いて、表１および表２に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量を測定する工程であって、前記遺伝子の発現量が、表３に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を少なくとも含むものである工程、  
（Ｄ）前記工程（Ｃ）で測定された前記遺伝子の発現量を解析する工程、および  
（Ｅ）前記工程（Ｄ）で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程、  
を含む方法である。

[0027]

[表1]

表1

No	プローブセット.ID	遺伝子記号	UniGene.ID	GenBankアクセッション番号
1	1560850_at	---	Hs.553018	BC016831
2	215397_x_at	---	Hs.661288	AU148086
3	239090_at	FAM161A	Hs.440466	BF110321
4	234222_at	---	Hs.677309	AK024999
5	222073_at	COL4A3	Hs.570065	AI694562
6	1553025_at	GPR126	Hs.715560	NM_020455
7	206685_at	HCG4	Hs.660431	NM_018985
8	1553502_a_at	AKAP2 /// PALM2 /// PALM2-AKAP2	Hs.591908	NM_053016
9	234275_at	---	Hs.671963	AL050116
10	1554607_at	CNKSR2	Hs.555917	AF418269
11	214746_s_at	ZNF467	Hs.112158	BE549732
12	211234_x_at	ESR1	Hs.208124	AF258449
13	211235_s_at	ESR1	Hs.208124	AF258450
14	222835_at	THSD4	Hs.387057	BG163478
15	217613_at	TMEM144	Hs.176227	AW173720
16	207847_s_at	MUC1	Hs.89603	NM_002456
17	206157_at	PTX3	Hs.591286	NM_002852
18	205225_at	ESR1	Hs.208124	NM_000125
19	219153_s_at	THSD4	Hs.387057	NM_024817
20	239520_at	---	Hs.156398	AW376860
21	228375_at	IGSF11	Hs.112873	BE221674
22	206794_at	ERBB4	Hs.390729	NM_005235
23	1555052_a_at	SYT9	Hs.177193	BC029605
24	226506_at	THSD4	Hs.387057	AI742570
25	220524_at	EPB41L4B	Hs.591901	NM_024823
26	234612_at	---	Hs.677309	AK024999
27	1552508_at	KCNE4	Hs.348522	NM_080671
28	1562524_at	---	Hs.680472	BC043587
29	223500_at	CPLX1	Hs.478930	BC002471
30	232336_at	ZSWIM5	Hs.656613	AI479419
31	203747_at	AQP3	Hs.234642	NM_004925
32	1553882_at	---	Hs.617329	NM_145302
33	215552_s_at	ESR1	Hs.208124	AI073549
34	206999_at	IL12RB2	Hs.479347	NM_001559
35	209604_s_at	GATA3	Hs.524134	BC003070

[0028] [表2]

表2

No	プローブセット.ID	遺伝子記号	UniGene.ID	GenBankアクセッション番号
36	1553873_at	KLHL34	Hs.448572	NM_153270
37	211695_x_at	MUC1	Hs.89603	AF348143
38	218613_at	PSD3	Hs.434255	NM_018422
39	232243_at	MCPH1	Hs.709634	AU159380
40	203892_at	WFDC2	Hs.2719	NM_006103
41	233494_at	ERBB4	Hs.390729	AK024204
42	228058_at	LOC124220	Hs.105887	AI559190
43	209693_at	ASTN2	Hs.601562	AF116574
44	229779_at	COL4A4	Hs.591645	BF476080
45	214440_at	NAT1	Hs.591847	NM_000662
46	240625_at	---	---	AW511032
47	233498_at	ERBB4	Hs.390729	AK024204
48	228741_s_at	HCN3	Hs.706960	AA569959
49	209706_at	NKX3-1	Hs.55999	AF247704
50	222379_at	KCNE4	Hs.348522	AI002715
51	227425_at	REPS2	Hs.186810	AI984607
52	1553622_a_at	FSIP1	Hs.129598	NM_152597
53	1563128_at	---	Hs.680649	BC017904
54	215551_at	ESR1	Hs.208124	AI073549
55	1564630_at	EDN1	Hs.713645	BC036851
56	242093_at	SYTL5	Hs.662334	AW263497
57	1555817_s_at	---	---	BC008840
58	211233_x_at	ESR1	Hs.208124	M12674
59	227232_at	EVL	Hs.125867	T58044
60	203570_at	LOXL1	Hs.65436	NM_005576
61	209603_at	GATA3	Hs.524134	AI796169
62	219532_at	ELOVL4	Hs.101915	NM_022726
63	234057_at	---	Hs.677421	AF264623
64	215407_s_at	ASTN2	Hs.601562	AK024064
65	205635_at	KALRN	Hs.8004	NM_003947
66	226647_at	TMEM25	Hs.564188	AL562445
67	1552507_at	KCNE4	Hs.348522	NM_080671
68	204469_at	PTPRZ1	Hs.489824	NM_002851
69	230791_at	---	Hs.661175	AU146924
70	233887_at	GPR126	Hs.715560	AL033377

[0029]

[表3]

**表3**

No	プローブセット.ID
1	239090_at
2	232243_at
3	240625_at
4	222379_at
5	1553622_a_at
6	219532_at
7	234057_at
8	215407_s_at
9	205635_at
10	226647_at
11	1552507_at
12	230791_at
13	233887_at

[0030] 前記表1および表2において、「No」は、遺伝子番号を示す。「プローブセット.ID」は、アフィメトリックス社製のマイクロアレイ〔商品名：GeneChip（登録商標）System〕において、基材上に固定されたプローブの11～20個をまとめたプローブセットそれぞれにつけられているID番号を示す。「UniGene.ID」は、NCBIが公開しているデータベースであるUniGeneのID番号を示す。GenBankアクセッション番号は、前記アフィメトリックス社製のマイクロアレイ〔商

品名：GeneChip（登録商標） System]において、基材上に固定されたプローブそれぞれの配列の設計に用いられた公開データベース GenBankのアクセッション番号を示す。また、表3は、表1および表2に記載のプローブセットに含まれる13個のプローブセットを示している。

[0031] 本発明者らは、前記表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定し、かかる発現量を網羅的に解析した結果に基づいて乳癌術前化学療法に対する感受性を評価した場合に、前記感受性を精度良く判定できることを見出した。また、本発明者らは、前記表1および表2に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量のうち、表3に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を少なくとも測定することにより、前記感受性を精度良く判定できることを見出した。さらに、特に、前記発現量を、多変量解析を取り入れたクラス分け手法によって解析したとき、乳癌術前化学療法に対する感受性を、精度良く判定できることを見出した。本発明は、かかる知見に基づき完成させたものである。なお、本明細書において、「表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量」の用語は、表1および表2に記載のプローブセット、IDに対応する表1および表2に記載のGenBankアクセッション番号で示される核酸を保持する遺伝子の発現量を意味する。また、本明細書において、「表1および表2に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量」の用語は、表1および表2に記載のプローブセット、IDに対応する表1および表2に記載のGenBankアクセッション番号で示される核酸のなかから選ばれた核酸を保持する遺伝子の発現量を意味する。さらに、本明細書において、「表3に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量」の用語は、表3に記載のプローブセット、IDに対応する表1および表2に記載のGenBankアクセッション番号で示される核酸のなかから選ばれた核酸を保持する遺伝子の発現量を意味する。GenBankは、米国生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）により提供されているデータベースであり、ウェブページ<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

v/sites/entrez?db=nucleotideなどにより利用可能である。そして、前記表1および表2に記載のGenBankアクセッション番号が付された配列は、上記データベースより入手することができる。また、前記GenBankアクセッション番号は、2009年3月11日時点での最新リリースでの番号を示す。なお、本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝子転写産物としてのRNAが抽出される塩基配列の単位であればよく、EST (expressed sequence tag) も含む概念である。

[0032] 本発明の判定方法では、まず、被験者から採取された検体からRNAを抽出する〔工程(A)〕。

[0033] 前記検体は、治療前生検により被験者から採取した検体が好ましい。前記検体としては、具体的には、治療前生検により被験者から採取した組織などが挙げられる。ここで、生検としては、例えば、穿刺吸引生検、コア針生検、吸引装置付き針生検装置〔例えば、ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)製、商品名：マンモトーム(登録商標)など〕を用いた生検(「マンモトーム生検」という)等が挙げられる。これらの中では、容易にかつ低負荷で検体を得ることができることから、前記マンモトーム生検が好ましい。

[0034] 検体からのRNAの抽出は、公知の方法によって行なうことができる。また、検体からのRNAの抽出は、RNAを抽出するための市販のキットを用いることもできる。ここで、市販のキットとしては、インビトロジェン社製、商品名：Trizol(登録商標)や、キアゲン社製、商品名：Qiagen RNeasy kit(登録商標)などが挙げられる。

[0035] つぎに、前記工程(A)で抽出されたRNAを用いて測定用試料を調製する〔工程(B)〕。

[0036] 本工程(B)では、遺伝子の発現量、すなわち、当該遺伝子に対応する転写産物(mRNA、cDNAなど)の産生量などを測定するのに適した測定用試料を調製する。具体的には、測定用試料は、例えば、前記工程(A)で抽出されたRNAよりmRNAを精製すること、前記工程(A)で抽出され

たRNAを用いて、対応するcDNAを増幅することなどによって調製することができる。また、本発明においては、遺伝子の発現量を測定することが可能であるのであれば、前記工程（A）で抽出されたRNAをそのまま測定用試料として用いてもよい。

[0037] 前記mRNAの精製は、公知の精製方法を用いて行なうことができる。また、mRNAの精製には、市販の精製キットを用いてもよい。

[0038] また、cDNAの増幅は、公知の方法を用いて行なうことができる。cDNAの増幅には、cDNAの増幅するための市販のキットを用いることもできる。ここで、前記市販のキットとしては、例えば、ニューゲン・テクノロジーズ（NuGEN Technologies）社製、商品名：WT-Ovation™ FFPE System V2などが挙げられる。

[0039] つぎに、前記工程（B）で得られた測定用試料を用いて、表1および表2に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量を測定する。ここで、前記遺伝子の発現量は、表3に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を少なくとも含むものである〔工程（C）〕。

[0040] 前記工程（C）では、発現量を測定する対象となる遺伝子は、表3に記載の遺伝子群の全遺伝子を少なくとも含んでいればよく、用いられる遺伝子の数や種類は、特に限定されるものではない。すなわち、前記工程（C）で用いられる遺伝子として、前記表1および表2に記載の遺伝子群の70個全ての遺伝子を選択してもよい（第1の態様）。また、前記工程（C）で用いられる遺伝子として、表3に記載の遺伝子群を選択してもよい（第2の態様）。さらに、前記工程（C）で用いられる遺伝子として、前記表1および表2に記載の遺伝子群のなかから、表3に記載の遺伝子群と、他の遺伝子とを選択してもよい（第3の態様）。

[0041] 本工程（C）において、遺伝子の発現量は、例えば、マイクロアレイ、定量的RT-PCR、定量的PCR、ノーザンブロット解析などにより測定することができる。これらのなかでは、前記遺伝子群の各遺伝子の発現量を迅速、かつ簡便に測定することができることから、マイクロアレイを用いて測定

することが好ましい。この場合、前記発現量は、以下の工程において、マイクロアレイにおける蛍光強度のまま用いてもよい。

[0042] マイクロアレイによる遺伝子の発現量の測定は、公知の方法を用いて行うことができる。具体的には、例えば、ヒトゲノムの発現解析が可能なマイクロアレイであるアフィメトリクス (Affymetrix) 社製の商品名: Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いることにより、表 1 および表 2 に記載のプローブセット ID で示される 70 個のプローブによって、前記遺伝子群の各遺伝子の発現量を一度に測定することができる。

[0043] つぎに、前記工程 (C) で測定された前記遺伝子の発現量を解析する [工程 (D)]。その後、前記工程 (D) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する [工程 (E)]。

[0044] 前記工程 (D) において、前記発現量は、例えば、クラス分け手法、階層的クラスタ分析およびスコア化手法を用いて、解析することができる。ここで、前記発現量は、測定された発現量の生データを、例えば、ハウスキーピング遺伝子の発現量などによって正規化したものを用いることができる。

[0045] 前記クラス分け手法として、公知の方法を用いることができる。かかるクラス分け手法としては、例えば、Between-group analysis (BGA) [カルヘイン (Culhane, A. C.) ら、バイオインフォマティクス (Bioinformatics)、2002年、第18巻、pp. 1600-1608参照)、「マイクロアレイデータの Between-group analysis (Between-group analysis of microarray data)」を参照]、サポートベクターマシン (SVM)、対角線形判別 (DLDA) および k 最近傍分類 (kNN)、決定木、Random Forest、ニューラルネットなどが挙げられる。これらのなかでは、乳癌術前化学療法に対して感受性であるものと、非感受性であるものとを良好にクラス分けをすることができる観点から、BGA が好ましい。かかるクラス分け手法を用いて発現量を



解析する場合、前記発現量に基づいて、乳癌術前化学療法に対して感受性である検体と、非感受性である検体とにクラス分けがされる。したがって、この場合、前記工程（E）においては、かかるクラス分けの結果によって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定することができる。前記解析には、例えば、前記工程（C）で用いられた遺伝子の数や種類（前記第1の態様～第3の態様）に応じて、BGAを用いて構築された判別式を用いることができる。

[0046] 例えば、第1の態様の場合、まず、前記工程（C）において、前記表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定する。そして、測定された各遺伝子の発現量と、下記式（1）で表される判別式とを用いて判定を行なうことができる。

[0047] [数7]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0133 \quad (1)$$

[0048] [式（1）中、 $i$ は表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表4、表5および表6に記載された遺伝子番号 $i$ の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式（2）：

[0049] [数8]

$$X_i = y_i + \text{abs}[\text{round}(\min(y_{ij}) - 1)] \quad (2)$$

[0050] [式（2）中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の検体番号 $j$ の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は、下記式（3）：

[0051] [数9]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s_i} \quad (3)$$

[0052] ( $x_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。) に示される遺伝子番号  $i$  の遺伝子の標準化された発現量を示す。) により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\Sigma_i$  は各遺伝子に渡る総和を示す。} 。

[0053]

[表4]

表4

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
1	1560850_at	-0.7467
2	215397_x_at	-0.7402
3	239090_at	1.7379
4	234222_at	-0.7109
5	222073_at	1.7298
6	1553025_at	1.7240
7	206685_at	-0.6963
8	1553502_a_at	1.7145
9	234275_at	-0.6798
10	1554607_at	1.7000
11	214746_s_at	-0.6773
12	211234_x_at	-0.6685
13	211235_s_at	-0.6617
14	222835_at	-0.6597
15	217613_at	-0.6561
16	207847_s_at	-0.6524
17	206157_at	1.6722
18	205225_at	-0.6474
19	219153_s_at	-0.6468
20	239520_at	1.6665
21	228375_at	1.6536
22	206794_at	-0.6301
23	1555052_a_at	-0.6289
24	226506_at	-0.6269
25	220524_at	1.6439

[0054]

[表5]

表5

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
26	234612_at	-0.6202
27	1552508_at	-0.6187
28	1562524_at	-0.6156
29	223500_at	-0.6105
30	232336_at	-0.6059
31	203747_at	-0.6045
32	1553882_at	-0.6038
33	215552_s_at	-0.6033
34	206999_at	1.6223
35	209604_s_at	-0.6013
36	1553873_at	1.6187
37	211695_x_at	-0.5975
38	218613_at	-0.5952
39	232243_at	-0.5949
40	203892_at	-0.5943
41	233494_at	-0.5921
42	228058_at	-0.5917
43	209693_at	-0.5876
44	229779_at	1.6077
45	214440_at	-0.5851
46	240625_at	1.6058
47	233498_at	-0.5831
48	228741_s_at	-0.5812
49	209706_at	-0.5800
50	222379_at	-0.5781

[0055]

[表6]

表6

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
51	227425_at	-0.5767
52	1553622_a_at	-0.5750
53	1563128_at	-0.5743
54	215551_at	-0.5641
55	1564630_at	1.5842
56	242093_at	-0.5619
57	1555817_s_at	-0.5590
58	211233_x_at	-0.5585
59	227232_at	-0.5576
60	203570_at	-0.5533
61	209603_at	-0.5501
62	219532_at	1.5704
63	234057_at	-0.5478
64	215407_s_at	-0.5455
65	205635_at	1.5650
66	226647_at	-0.5439
67	1552507_at	-0.5427
68	204469_at	1.5615
69	230791_at	1.5547
70	233887_at	1.5520

[0056] また、前記第2の態様の場合、前記工程(C)において、まず、前記表3

に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定する。そして、測定された各遺伝子の発現量と、下記式（４）で表される判別式とを用いて判定を行なうことができる。

[0057] [数10]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0069 \quad (4)$$

〔式（４）中、 $i$ は表３に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表７に記載された遺伝子番号  $i$  の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式（５）：

[0058] [数11]

$$X_i = y_i + \text{abs} \left[ \text{round} \left\{ \min(y_{ij}) - 1 \right\} \right] \quad (5)$$

[0059] 〔式（５）中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の検体番号  $j$  の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式（６）：

[0060] [数12]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s} \quad (6)$$

[0061] 〔式（６）中、 $x_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。）に示される遺伝子番号  $i$  の遺伝子の標準化された発現量を示す。〕により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\sum_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。〕。

[0062]

[表7]

表7

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
1	239090_at	1.2094
2	232243_at	-0.9563
3	240625_at	1.0867
4	222379_at	-0.9407
5	1553622_a_at	-0.9379
6	219532_at	1.0538
7	234057_at	-0.9126
8	215407_s_at	-0.9104
9	205635_at	1.0488
10	226647_at	-0.9089
11	1552507_at	-0.9078
12	230791_at	1.0393
13	233887_at	1.0368

[0063] さらに、前記第3の態様の例としては、表8および表9（表1および表2に記載の遺伝子群の遺伝子のうち、表3に記載の遺伝子群を含む50個の遺伝子）に記載の遺伝子群の各遺伝子を用いる判定などが挙げられる。この場合、表8および表9に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定する。そして、測定された各遺伝子の発現量と、下記式（7）で表される判別式とを用いて判定を行なうことができる。

[0064] [数13]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0113 \quad (7)$$

{式(7)中、 $i$ は表8および表9に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表8および表9に記載された遺伝子番号 $i$ の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式(8)：

[0065] [数14]

$$X_i = y_i + \text{abs} \left[ \text{round} \left\{ \min(y_{ij}) - 1 \right\} \right] \quad (8)$$

[0066] [式(8)中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の検体番号 $j$ の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式(9)：

[0067] [数15]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s} \quad (9)$$

[0068] (式(9)中、 $x_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。)に示される遺伝子番号 $i$ の遺伝子の標準化された発現量を示す。)により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\sum_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。}。

[0069]



[表8]

表8

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
1	239090_at	1.8188
2	217613_at	-0.6658
3	206157_at	1.7507
4	219153_s_at	-0.6561
5	228375_at	1.7313
6	220524_at	1.7213
7	234612_at	-0.6285
8	1552508_at	-0.6269
9	1562524_at	-0.6237
10	223500_at	-0.6184
11	232336_at	-0.6136
12	203747_at	-0.6122
13	1553882_at	-0.6115
14	215552_s_at	-0.6110
15	209604_s_at	-0.6089
16	1553873_at	1.6951
17	211695_x_at	-0.6050
18	218613_at	-0.6026
19	232243_at	-0.6022
20	203892_at	-0.6016
21	233494_at	-0.5993
22	228058_at	-0.5989
23	209693_at	-0.5947
24	229779_at	1.6838
25	214440_at	-0.5920

[0070]

[表9]

表9

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
26	240625_at	1.6817
27	233498_at	-0.5900
28	228741_s_at	-0.5881
29	209706_at	-0.5868
30	222379_at	-0.5848
31	227425_at	-0.5833
32	1553622_a_at	-0.5816
33	1563128_at	-0.5809
34	215551_at	-0.5703
35	1564630_at	1.6593
36	242093_at	-0.5680
37	1555817_s_at	-0.5650
38	211233_x_at	-0.5644
39	227232_at	-0.5636
40	203570_at	-0.5591
41	209603_at	-0.5558
42	219532_at	1.6450
43	234057_at	-0.5534
44	215407_s_at	-0.5510
45	205635_at	1.6394
46	226647_at	-0.5493
47	1552507_at	-0.5481
48	204469_at	1.6358
49	230791_at	1.6287
50	233887_at	1.6259

[0071] 前記判別式を用いて発現量を解析する場合、前記判別式の  $x_i$  (例えば、 $i = 1, 2, \dots, 70$ ) に、順に、当該検体の当該遺伝子の発現量の値を代入し、解Dを求める。この場合、前記工程 (E) においては、解Dが正の

値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解Dがゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定することができる。

[0072] 前記階層的クラスタ分析は、例えば、被験者から採取した検体の発現量のデータ（あるいは発現量に関する蛍光強度のデータ）と、術前化学療法により病理学的完全奏功（pCR）が得られたことが既知の検体の群の発現量のデータ（あるいは発現量に関する蛍光強度のデータ）と、非奏功であることが既知の検体の群の発現量のデータ（あるいは発現量に関する蛍光強度のデータ）とを用い、前記発現量（あるいは発現量に関する蛍光強度）に基づいて検体間の類似度を示す距離を計算し、この距離に基づいて種々のクラスタを形成し、クラスタを統合して、樹形図を作成することにより行なうことができる。ここで、前記距離としては、例えば、Pearson相関係数、ユークリッド距離などが挙げられる。また、クラスタの統合は、例えば、ward法、最遠隣法、重心間距離法などにより行なうことができる。これらのなかでは、Pearson相関係数およびward法を用いることにより、乳癌術前化学療法に対して感受性であるものと、非感受性であるものを良好に分けることができる。この場合、前記工程（E）においては、かかる階層的クラスタ分析の結果によって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定することができる。

[0073] 前記スコア化手法として、公知の方法を用いることができる。かかるスコア化手法としては、例えば、主成分分析、重回帰分析、ロジスティック回帰分析、Partial Least Squareなどが挙げられる。これらのなかでは、乳癌術前化学療法に対して感受性であるものと、非感受性であるものを良好に分けることができる観点から、主成分分析が好ましい。かかるスコア化手法を用いて発現量を解析する場合、前記発現量に基づいて、乳癌術前化学療法に対して感受性である検体のスコアと、非感受性である検体のスコアとが分けられるようスコア化がされる。したがって、この場合、前記工程（E）においては、かかるスコア化の結果によって、乳癌術前化

学療法に対する感受性を判定することができる。

[0074] 以上のように、本発明の乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法によれば、表1および表2に記載の遺伝子群の遺伝子の発現量であって、かつ少なくとも表3に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を用いているので、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定することができる。

## 実施例

[0075] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0076] [実施例1]

### (1) 被験者からの検体の採取

2003年から2008年の間に大阪大学医学部附属病院で術前化学療法が施された90人の乳癌患者それぞれから、採取針（サイズ11G）を取り付けた吸引装置付き針生検装置〔ジョンソン・エンド・ジョンソン（株）製、商品名：マンモトーム（登録商標）〕を用いて検体を採取した。検体の採取後すぐに、当該検体を、液体窒素に入れ、使用時まで、 $-80^{\circ}\text{C}$ で長期間保存した。

[0077] (2) 被験者の分類

前記(1)における検体の採取後、前記90人の患者に、術前化学療法として、12週間にわたる毎週1回のパクリタキセル（paclitaxel） $80\text{mg}/\text{m}^2$ の投与、つづく3週間毎に計4回のエピルビシン（epirubicin） $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、シクロホスファミド（cyclophosphamide） $500\text{mg}/\text{m}^2$ および5-FU  $500\text{mg}/\text{m}^2$ の投与を行った。また、前記術前化学療法終了後、当該90人の患者に、乳房温存手術または乳房切除術を施し、さらにセンチネルリンパ節生検術または腋窩リンパ節郭清術を施した。

[0078] その後、組織病理学的検査によって病理学的診断と抗癌剤の効果の判定とを行ない、前記90人の患者を、病理学的完全奏功群（pCR群）と非奏功群（npCR群）とに分類した。ここで、「pCR」とは、腫瘍が完全消失

しているか、または腫瘍が乳管内だけに残存し浸潤部位が無い状態をいう。  
また、「npCR」とは、前記pCR以外の状態をいう。

[0079] (3) 検体からのRNAの抽出およびcDNAの調製

前記(1)で得られた検体(約20mg)より、RNA抽出用試薬〔インビトロジェン(Invitrogen)社製、商品名:TRIzol(登録商標)〕を用いて、RNAを抽出して、RNA試料を得た。得られたRNA試料中のRNAの量を、分光光度計〔(株)バイオメディカルサイエンス製、商品名:Nano-Drop ND-1000〕によって測定した。また、分析装置(アジレント・テクノロジー(株)製、商品名:Agilent バイオアナライザー)を用いて、得られたRNA試料中のRNAのRIN(RNA Integrity Number)を計測し、かかるRINに基づいて当該RNA試料の品質を判定した。以下の実験においては、RNAの量が550ng以上であり、概ねRIN>6のRNA試料を用いた。

[0080] 前記RNA試料(RNA50ng相当量)と、転写産物増幅用キット〔ニューゲン・テクノロジーズ(NuGEN Technologies)社製、商品名:WT-Ovation™ FFPE System V2〕に添付のランダムプライマーとを用いて、first-strand cDNAおよびsecond-strand cDNAを合成し、Ribo-SPIA™増幅技術によって、cDNAを増幅した。このようにして、90例の検体に対応する90種類のcDNAを得た。

[0081] (4) 遺伝子発現解析

断片化・標識用試薬〔ニューゲン・テクノロジーズ(NuGEN Technologies)社製、商品名:FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2〕を用いて、前記(3)で得られたcDNAを、ビオチンで標識するとともに、断片化した。

[0082] 得られた断片化ビオチン標識cDNAを、ヒトゲノム発現解析用アレイ〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名:Human Genome U133 Plus 2.0 Array〕上の核酸(プロー

ブセット)と一晚ハイブリダイズさせた。なお、前記断片化ビオチン標識cDNAと前記アレイ上の核酸(プローブセット)とのハイブリダイゼーションは、製造者〔アフィメトリクス(Affymetrix)社〕による推奨条件に従って行なった。

[0083] つぎに、ハイブリダイゼーション後のアレイを、マイクロアレイ洗浄・染色処理専用機器〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名: GeneChip(登録商標) Fluidics Station 450〕に供して、前記アレイ上の核酸(プローブセット)にハイブリダイズしたcDNAを蛍光染色し、洗浄した。

[0084] その後、前記アレイをレーザスキャナー〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名: GeneChip(登録商標) Scanner 3000〕に供して、前記アレイ上の核酸(プローブセット)にハイブリダイズしたcDNAの蛍光標識物質に基づくシグナルを読み取り、蛍光強度を定量化した。得られた蛍光強度のデータをソフトウェア〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名: GeneChip(登録商標) Operating Software〕によって処理して、CELファイルを得た。前記CELファイルを遺伝子発現解析およびデータの品質チェックに用いた。このようにして、90例の検体それぞれにおける前記プローブセットのプローブに対応する核酸に基づく蛍光強度のデータについて、CELファイルを得た。

[0085] (5) 遺伝子の選択、および乳癌術前化学療法に対する感受性の判定のための判別式の構築

以下、得られた90例のCELファイルのデータの前処理(正規化)は、解析ソフトウェア〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名: Affymetrix Expression Consoleソフトウェア〕のMAS5統計アルゴリズム(ターゲット値500)を用いて行なった。また、それ以外の解析は、全て統計解析ソフトウェアR(<http://www.r-project.org/>)および統計解析ソフトウェ

アBioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) を用いて実施した。

[0086] 製造者〔アフィメトリクス (Affymetrix) 社〕のガイドライン〔(Affymetrix, GeneChip (登録商標) Expression Analysis Data Analysis Fundamentals, 2004.) に基づいて、90例の検体それぞれの蛍光強度のデータにおける品質管理パラメータ〔ノイズ (Raw-Q)、ハウスキーピング遺伝子である $\beta$ アクチン遺伝子、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子などの3' / 5' 比、スケーリング・ファクター (Scaling factor)、Present Call% (P-call%)〕を評価した。前記90例の検体それぞれの蛍光強度のデータについて、前記ヒトゲノム発現解析用アレイ上の全54675個のプローブセットを用いた場合のデータに関して、主成分分析 (PCA) を行ない、品質を評価した。

[0087] そして、前記90例の検体それぞれの蛍光強度のデータのうち、PCAの第一主成分によって母集団から外れる6例のデータを除外し、残りの84例の検体それぞれの蛍光強度のデータを、以下の解析に用いた。なお、84例の検体それぞれの蛍光強度のデータにおいては、品質管理パラメータのうち、 $\beta$ アクチン遺伝子の3' / 5' 比が概ね21未満であり、GAPDH遺伝子の3' / 5' 比が概ね3.0未満であり、P-call%が60%を超え、かつ70%未満の範囲であり、スケーリング・ファクターが概ね10%未満であった。ところが、前記6例の検体それぞれの蛍光強度のデータにおいては、 $\beta$ アクチン遺伝子の3' / 5' 比、GAPDH遺伝子の3' / 5' 比、P-call%およびスケーリング・ファクターの1項目以上で、前記84例の検体それぞれの蛍光強度のデータの場合の品質管理パラメータのものと顕著に異なる値を示していた。

[0088] つぎに、前記84例の検体それぞれの蛍光強度のデータを、トレーニングセット50例とバリデーションセット34例とに振り分けた。このとき、ト

レーニングセットにおける pCR 率とバリデーションセットにおける pCR 率とがほぼ等しくなるように、pCR 群および npCR 群それぞれから、無作為に振り分けを実施した。トレーニングセットにおける pCR 率は、30% (15 例 / 50 例) であり、バリデーションセットにおける pCR 率は、32.3% (11 例 / 34 例) であった。以降の解析については、別途記載のあるもの以外は全てトレーニングセットのデータに対して適用した。

[0089] 前記トレーニングセットに振り分けられた 50 例の検体それぞれの蛍光強度のデータについて、log<sub>2</sub> 変換を行なった。そして、前記プローブセットのうち、ハウスキーピング遺伝子などに対応するプローブセット (コントロールプローブ) を除いて、前記 50 例の検体の 30% 以上において、シグナルの信頼度である Absolute Call が "present" となっており、かつ変動係数 cv が 0.15 以上となっているプローブセット (7983 個のプローブセット / 全 54675 個のプローブセット) を用いた場合のデータについて、遺伝子発現の解析に用いた。

[0090] その後、各プローブセットに対応する核酸を保持する遺伝子の発現量 (前記遺伝子に基づく蛍光強度) を、下記式 (10) :

$$\left[ \frac{\text{発現量 (蛍光強度) の測定値 (生データ)} - \text{発現量 (蛍光強度) の平均値}}{\text{標準偏差}} \right] \quad (10)$$

によって正規化した。

[0091] また、pCR 群と npCR 群との間で有意に蛍光強度、すなわち発現量の差が見られるプローブセットに対応する遺伝子を選択するため、並び替え回数 1000 の条件下で、SAM (Significance Analysis of Microarrays) によって、各々の p 値を計算した [「SAM」については、トゥシャー (Tusher, V. G.) ら、「電離放射線応答に適用したマイクロアレイの有意性分析 (Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation respo



nse)」、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、2001年、第98巻、pp. 5116-5121参照]。そして、SAMによって計算したp値の低い順に、500個のプローブセットに対応する核酸を保持する遺伝子の選択を行なった。

[0092] つぎに、判別式の構築には、BGAを用いた。最適な判定精度が得られるように、pCR群の重みを1~10まで変化させた。そして、各々の重み付けの下で、Sequential Forward Filteringによって乳癌術前化学療法に対する感受性の判定に最適なプローブセット数を求めた。

具体的には、前記500個のプローブセットから、p値の低い順に、500個に達するまで、5個ずつ選択するプローブセットの個数を増加させながら、当該プローブセットを選択し、判別式の構築を行なった。そして、感度と特異度との積が最大となるプローブセットの個数を決定した。なお、感度は、病理学的診断結果がpCRであり、かつpCRと予測された検体の数を、病理学的診断結果がpCRである検体の数で除算することによって求めた。また、特異度は、病理学的診断結果がnpCRであり、かつnpCRと予測された検体の数を、病理学的診断結果がnpCRである検体の数で除算することによって求めた。

[0093] 前記遺伝子の選択から判別式の構築までのプロセスを、3-Fold Cross-Validationにて繰り返し、各重み付け条件下での感度および特異度を平均値で推定した。推定の結果、最適な重み付け条件は4であり、その条件下において最適なプローブセットは、表10、表11および表12に示されるように、SAMによって計算したp値の低い順で上位70番目までのプローブセット(表1および表2参照)となった。

[0094]

[表10]

表10

No	プローブセットID	npCR群での 蛍光強度 の平均	pCR群での 蛍光強度 の平均	Fold Change	pCR群での 発現傾向	SAM p値	判別式での 重み係数
1	1560850_at	368.3	127.7	2.88	減少	0.0003013	-0.7467
2	215397_x_at	1082.8	236.2	4.58	減少	0.0003178	-0.7402
3	239090_at	40.6	91.1	2.25	増加	0.0003859	1.7379
4	234222_at	182.4	51.5	3.54	減少	0.0004070	-0.7109
5	222073_at	53.6	159.4	2.97	増加	0.0004154	1.7298
6	1553025_at	238.8	707.3	2.96	増加	0.0004366	1.7240
7	206685_at	228.8	89.7	2.55	減少	0.0004622	-0.6963
8	1553502_a_at	175.3	508.5	2.90	増加	0.0004718	1.7145
9	234275_at	580.6	187.5	3.10	減少	0.0005378	-0.6798
10	1554607_at	101.5	335.3	3.30	増加	0.0005419	1.7000
11	214746_s_at	261.3	129.8	2.01	減少	0.0005528	-0.6773
12	211234_x_at	1751.6	479.3	3.65	減少	0.0005988	-0.6685
13	211235_s_at	1737.0	464.9	3.74	減少	0.0006365	-0.6617
14	222835_at	2449.1	771.9	3.17	減少	0.0006499	-0.6597
15	217613_at	95.6	43.8	2.18	減少	0.0006747	-0.6561
16	207847_s_at	1509.4	455.3	3.32	減少	0.0007011	-0.6524
17	206157_at	140.2	546.9	3.90	増加	0.0007080	1.6722
18	205225_at	5962.1	1752.8	3.40	減少	0.0007359	-0.6474
19	219153_s_at	514.9	162.0	3.18	減少	0.0007398	-0.6468
20	239520_at	27.6	67.1	2.43	増加	0.0007465	1.6665
21	228375_at	52.4	143.2	2.73	増加	0.0008517	1.6536
22	206794_at	532.5	166.3	3.20	減少	0.0008744	-0.6301
23	1555052_a_at	236.3	42.4	5.58	減少	0.0008841	-0.6289
24	226506_at	844.0	297.5	2.84	減少	0.0009050	-0.6269
25	220524_at	49.7	86.3	1.74	増加	0.0009389	1.6439

[0095]

[表11]

表 11

No	プローブセットID	npCR群での 蛍光強度 の平均	pCR群での 蛍光強度 の平均	Fold Change	pCR群での 発現傾向	SAM p値	判別式での 重み係数
26	234612_at	290.0	99.1	2.93	減少	0.0009672	-0.6202
27	1552508_at	903.4	127.3	7.10	減少	0.0009832	-0.6187
28	1562524_at	307.8	84.8	3.63	減少	0.0010145	-0.6156
29	223500_at	904.8	181.3	4.99	減少	0.0010700	-0.6105
30	232336_at	214.7	124.4	1.73	減少	0.0011208	-0.6059
31	203747_at	100.9	43.6	2.32	減少	0.0011374	-0.6045
32	1553882_at	619.5	122.5	5.06	減少	0.0011483	-0.6038
33	215552_s_at	3896.2	1073.0	3.63	減少	0.0011528	-0.6033
34	206999_at	70.9	161.3	2.27	増加	0.0011799	1.6223
35	209604_s_at	6315.3	2230.8	2.83	減少	0.0011814	-0.6013
36	1553873_at	47.3	246.9	5.22	増加	0.0012257	1.6187
37	211695_x_at	1384.0	357.1	3.88	減少	0.0012309	-0.5975
38	218613_at	363.2	100.9	3.60	減少	0.0012589	-0.5952
39	232243_at	85.6	46.0	1.86	減少	0.0012632	-0.5949
40	203892_at	480.4	135.7	3.54	減少	0.0012696	-0.5943
41	233494_at	881.8	297.2	2.97	減少	0.0013010	-0.5921
42	228058_at	1199.4	376.6	3.18	減少	0.0013055	-0.5917
43	209693_at	447.8	171.0	2.62	減少	0.0013621	-0.5876
44	229779_at	47.0	143.2	3.05	増加	0.0013733	1.6077
45	214440_at	3077.4	517.4	5.95	減少	0.0014009	-0.5851
46	240625_at	47.8	94.9	1.98	増加	0.0014025	1.6058
47	233498_at	1525.9	475.7	3.21	減少	0.0014285	-0.5831
48	228741_s_at	169.6	85.9	1.97	減少	0.0014560	-0.5812
49	209706_at	297.0	122.4	2.43	減少	0.0014750	-0.5800
50	222379_at	1405.7	177.4	7.92	減少	0.0015032	-0.5781

[0096]

[表12]

表 12

No	プローブセットID	nCR群での 蛍光強度の 平均	pCR群での 蛍光強度 の平均	Fold Change	pCR群での 発現傾向	SAM p値	判別式での 重み係数
51	227425_at	872.9	222.9	3.92	減少	0.0015264	-0.5767
52	1553622_a_at	1170.3	191.6	6.11	減少	0.0015499	-0.5750
53	1563128_at	43.1	26.8	1.61	減少	0.0015602	-0.5743
54	215551_at	1223.6	394.7	3.10	減少	0.0017343	-0.5641
55	1564630_at	224.5	858.8	3.83	増加	0.0017485	1.5842
56	242093_at	763.0	233.6	3.27	減少	0.0017746	-0.5619
57	1555817_s_at	277.8	78.5	3.54	減少	0.0018286	-0.5590
58	211233_x_at	2021.1	611.5	3.31	減少	0.0018392	-0.5585
59	227232_at	929.3	262.5	3.54	減少	0.0018533	-0.5576
60	203570_at	206.2	118.3	1.74	減少	0.0019415	-0.5533
61	209603_at	4368.7	1515.3	2.88	減少	0.0020080	-0.5501
62	219532_at	48.5	132.1	2.73	増加	0.0020200	1.5704
63	234057_at	435.7	173.3	2.51	減少	0.0020561	-0.5478
64	215407_s_at	320.0	114.6	2.79	減少	0.0021017	-0.5455
65	205635_at	69.8	124.6	1.78	増加	0.0021339	1.5650
66	226647_at	197.6	89.9	2.20	減少	0.0021392	-0.5439
67	1552507_at	583.7	98.3	5.94	減少	0.0021637	-0.5427
68	204469_at	26.1	115.1	4.42	増加	0.0022059	1.5615
69	230791_at	772.6	1324.0	1.71	増加	0.0023593	1.5547
70	233887_at	45.1	105.1	2.33	増加	0.0024278	1.5520

[0097] 上記の条件に基づいて、全トレーニングセットのデータを用いて最終的な判別式を構築した。構築された判別式は、下記式（1）で示される判別式である。

[0098] [数16]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0133 \quad (1)$$

[0099] [式(1)中、 $i$ は表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表4、表5および表6に記載された遺伝子番号  $i$  の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式(2) :

[0100] [数17]

$$X_i = y_i + \text{abs}[\text{round}(\min(y_{ij}) - 1)] \quad (2)$$

[0101] [式(2)中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の検体番号  $j$  の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式(3) :

[0102] [数18]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s_i} \quad (3)$$

[0103] (式(3)中、 $x_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。)に示される遺伝子番号  $i$  の遺伝子の標準化された発現量を示す。)により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\sum_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。}。

[0104] ここで、前記式(1)で表される判別式の解  $D$  が正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解  $D$  がゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する。

[0105] (6) 判別式による判定結果と、病理学的診断結果との対比

トレーニングセットに振り分けられた全50例の検体について測定された発現量のデータ(蛍光強度のデータ)と、前記式(1)で表される判別式と

を用いて、全50例の検体がpCR群およびnpCR群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定した。そして、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診断結果と前記式(1)で表される判別式による判定結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例1において、トレーニングセットの50例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果との関係を調べた結果を図1に示す。

[0106] 図1に示された結果から、トレーニングセットに振り分けられた全50例の検体のうち、前記式(1)で表される判別式によって、23例の検体がnpCR群の乳癌患者の検体に該当すると判定され、27例の検体がpCR群の乳癌患者の検体に該当すると判定されることがわかる。すなわち、前記式(1)で表される判別式を用いた場合には、前記23例の検体は、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体であり、一方、前記27例の検体は、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体であると判定されることがわかる。

[0107] また、病理学的診断結果を真値として前記式(1)で表される判別式の性能を評価した場合、感度100%、特異度65.7%、陰性適中率(NPV)100%、および陽性適中率(PPV)55.6%であることがわかる。

[0108] したがって、これらの結果から、前記表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量と前記式(1)で表される判別式とを用いることによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることが示唆される。

[0109] [実施例2]

(判別式の判定精度の評価)

バリデーションセットに振り分けられた全34例の検体について測定された発現量のデータ(蛍光強度のデータ)と、前記式(1)で表される判別式とを用いて、全34例の検体がpCR群およびnpCR群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定することによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定した。また、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診

断結果と前記式（１）で表される判別式による判定結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例２において、バリデーショナルセットの３４例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を図２に示す。

[0110] 図２に示された結果から、バリデーショナルセットに振り分けられた全３４例の検体のうち、前記式（１）で表される判別式によって、１５例の検体が  $n p C R$  群の乳癌患者の検体に該当すると判定され、１９例の検体が  $p C R$  群の乳癌患者の検体に該当すると判定されることがわかる。すなわち、前記式（１）で表される判別式を用いた場合には、前記１５例の検体は、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体であり、一方、前記１９例の検体は、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体であると判定されることがわかる。

[0111] また、病理学的診断結果を真値として判別式の性能を評価した場合、感度 90.9%、特異度 60.9%、陰性適中率（NPV）93.3%、および陽性適中率（PPV）52.6%であることがわかる。

[0112] このように、バリデーショナルセットに振り分けられた全３４例の検体においても、トレーニングセットに振り分けられた検体の場合と同様に、前記式（１）で表される判別式によって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることがわかる。また、前記表１および表２に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量と前記式（１）で表される判別式とを用いることによって、用いた検体に関係なく、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることが示唆される。

[0113] [実施例３]

階層的クラスタ分析による判定

実施例１において、トレーニングセットに振り分けられた検体それぞれの蛍光強度（発現量）のデータおよびバリデーショナルセットに振り分けられた検体それぞれの蛍光強度（発現量）のデータについて、Pearson相関係数およびward法を用いて、階層的クラスタ分析を行ない、樹形図を

作成した。実施例 3 において、トレーニングセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく樹形図を図 3 に示す。また、実施例 3 において、バリデーションセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく樹形図を図 4 に示す。

[0114] 図 3 および図 4 に示された結果から、樹形図を分割するように付された太線を境界として、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体と、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体とを分けることができることがわかる。したがって、これらの結果から、前記表 1 および表 2 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を用いて、階層的クラスタ分析を行なうことによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることがわかる。

[0115] [実施例 4]

主成分分析による判定

実施例 1 において、トレーニングセットに振り分けられた検体それぞれの蛍光強度（発現量）のデータについて、表 1 および表 2 に記載の遺伝子を用いて主成分分析を行い、各遺伝子の変換係数を算出し、第一および第二主成分スコアを算出した。また、実施例 1 において、バリデーションセットに振り分けられた検体それぞれの蛍光強度（発現量）のデータについて、当該遺伝子の変換係数に従い第一主成分スコアおよび第二主成分スコアを算出した。実施例 4 において算出された変換係数を表 13 および表 14 に示す。また、実施例 4 において、トレーニングセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく第一主成分スコアおよび第二主成分スコアの散布図を図 5 に示す。また、実施例 4 において、バリデーションセットの検体それぞれの発現量のデータに基づく第一および第二主成分スコアの散布図を図 6 に示す。なお、図 5 および図 6 中、PCA 1 は、第一主成分スコアを示し、PCA 2 は、第二主成分スコアを示す。図中、白丸は、pCR 群、クロスは、npCR 群である。

[0116]



[表13]

表13

No	プローブセットID	第一主成分での変換係数	第二主成分での変換係数
1	1560850_at	-0.1858	0.1671
2	215397_x_at	-0.1646	-0.0591
3	239090_at	0.0234	-0.0635
4	234222_at	-0.1277	-0.0309
5	222073_at	0.0575	0.0890
6	1553025_at	0.0801	-0.0870
7	206685_at	-0.0365	-0.0669
8	1553502_a_at	0.0694	-0.0455
9	234275_at	-0.1767	-0.1893
10	1554607_at	0.0721	-0.1067
11	214746_s_at	-0.0661	0.0754
12	211234_x_at	-0.2238	-0.3035
13	211235_s_at	-0.1761	-0.2260
14	222835_at	-0.1478	-0.1009
15	217613_at	-0.0629	0.1111
16	207847_s_at	-0.0926	0.0493
17	206157_at	0.1226	-0.1365
18	205225_at	-0.1862	-0.2088
19	219153_s_at	-0.1117	-0.0787
20	239520_at	0.0545	-0.0176
21	228375_at	0.0316	-0.0714
22	206794_at	-0.1518	0.1122
23	1555052_a_at	-0.1275	-0.0158
24	226506_at	-0.1240	-0.0906
25	220524_at		-0.0378
26	234612_at	-0.1408	-0.0081
27	1552508_at	-0.1035	0.0903
28	1562524_at	-0.1789	-0.1481
29	223500_at	-0.1586	0.0877
30	232336_at	-0.0659	-0.0053
31	203747_at	-0.0533	0.0866
32	1553882_at	-0.1530	0.0316
33	215552_s_at	-0.1971	-0.2350
34	206999_at	0.0582	0.0025
35	209604_s_at	-0.1632	0.0211

[0117]

[表14]

表 14

No	プローブセットID	第一主成分での変換係数	第二主成分での変換係数
36	1553873_at	0.0858	-0.1169
37	211695_x_at	-0.0988	-0.0050
38	218613_at	-0.0622	0.1130
39	232243_at	-0.0319	0.0183
40	203892_at	-0.0543	0.0893
41	233494_at	-0.1659	0.1037
42	228058_at	-0.0911	0.0366
43	209693_at	-0.0742	0.1127
44	229779_at	0.0885	0.0319
45	214440_at	-0.1484	0.1073
46	240625_at	0.0554	-0.0294
47	233498_at	-0.1784	0.1480
48	228741_s_at	-0.0365	0.1336
49	209706_at	-0.0681	0.0466
50	222379_at	-0.1200	0.1290
51	227425_at	-0.0826	-0.0166
52	1553622_a_at	-0.2138	0.3121
53	1563128_at	-0.0496	0.1036
54	215551_at	-0.1776	-0.2431
55	1564630_at	0.0781	-0.0145
56	242093_at	-0.2065	0.3391
57	1555817_s_at	-0.1519	-0.0394
58	211233_x_at	-0.1924	-0.2641
59	227232_at	-0.1003	0.0442
60	203570_at	-0.0437	0.0356
61	209603_at	-0.1616	0.0092
62	219532_at	0.0312	-0.0424
63	234057_at	-0.0900	-0.0786
64	215407_s_at	-0.0740	0.0938
65	205635_at	0.0611	-0.0512
66	226647_at	-0.0680	0.0499
67	1552507_at	-0.0961	0.0639
68	204469_at	0.0958	0.0844
69	230791_at	0.0901	-0.0078
70	233887_at	0.0834	-0.0100
	定数項	42.8961	3.3191

[0118] 図5および図6に示された結果から、横軸の第一主成分スコアがゼロとなる所を境界として、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体と、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体とを分けることができることがわかる。したがって、これらの結果から、前記表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を用いて、主成分分析を行なうことによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることがわかる。

[0119] [実施例5]

実施例 1 で得られた 70 個の遺伝子のなかから、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定するのに十分な遺伝子の組み合わせを、以下に示される変数減少 (Backward-elimination) 法によって調べた。

[0120] 実施例 1 で得られた 70 個の遺伝子のうちの任意の遺伝子 A を除外し、残りの 69 個の遺伝子の組み合わせを選択した。つぎに、選択された 69 個の遺伝子の組み合わせを用い、pCR 群の重み付け条件を 4 とし、実施例 1 と同様にして、BGA を用いて判別式を構築し、3-Fold Cross-Validation を行ない、感度および特異度を評価した。なお、判別式の構築に際して、感度および特異度の評価には、前記実施例 1 と同様のトレーニングセットを用いた。3-Fold Cross-Validation では、トレーニングセットの症例を 3 群に分割した。そして、これらのうちの 2 群を判別式の構築に用い、残りの 1 群を感度および特異度の評価に用いた。

[0121] また、遺伝子 A の代わりに、実施例 1 で得られた 70 個の遺伝子のうちの遺伝子 A 以外の遺伝子を除外して 69 個の遺伝子の組み合わせを選択したことを除き、前記と同様にして、実施例 1 で得られた 70 個の遺伝子のうちの 69 個の遺伝子の組み合わせを用い、遺伝子 A 以外の遺伝子を除外する 69 通りの各々について、判別式を構築した。これら 69 通りの判別式について、前記と同様にして、感度および特異度を評価した。そして、69 個の遺伝子の組み合わせの、遺伝子 A を除外した前記の場合を含む、全 70 通りのなかから、感度と特異度との積の値が最大となる組み合わせを選択した。このようにして、選択された組み合わせを構成する遺伝子のなかから、感度と特異度との積の値を小さくする原因となっている遺伝子を除外した。

[0122] 以下、前記と同様にして、組み合わせを構成する遺伝子の数が 2 個となるまで、感度と特異度との積の値を小さくする原因となっている遺伝子の除外を繰り返した。そして、組み合わせを構成する遺伝子数 (プローブ数) に対して、感度と特異度との積 (感度 × 特異度) の値をプロットした。実施例 5 において、プローブ数と、感度 × 特異度との関係を調べた結果を図 7 に示す

。

[0123] 図7に示された結果から、遺伝子数（プローブ数）が13～24個のとき、感度と特異度との積（感度×特異度）が最も大きくなることがわかる。すなわち、この結果から、感度と特異度との積（感度×特異度）を最大値とする最少の遺伝子数（プローブ数）は、13個であることがわかる。これら13個の遺伝子は、前記表3に示されるとおりである。また、構築された判別式は、下記式（4）で示される判別式である。

[0124] [数19]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0069 \quad (4)$$

〔式（4）中、 $i$ は表3に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表7に記載された遺伝子番号 $i$ の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式（5）：

[0125] [数20]

$$X_i = y_i + \text{abs} \left[ \text{round} \left\{ \min(y_{ij}) - 1 \right\} \right] \quad (5)$$

[0126] 〔式（5）中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の検体番号 $j$ の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式（6）：

[0127] [数21]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s} \quad (6)$$

[0128] 〔式（6）中、 $x_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。）に示される遺伝子番号 $i$ の遺伝子の標準化された発現量を示す。〕により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\sum_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。〕。

[0129] ここで、前記式（４）で表される判別式の解Dが正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解Dがゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する。

[0130] [実施例 6]

実施例 1 において、トレーニングセットに振り分けられた全 50 例の検体について測定された発現量のデータ（蛍光強度のデータ）と、前記式（４）で表される判別式とを用いて、全 50 例の検体が pCR 群および npCR 群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定した。そして、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診断結果と前記式（４）で表される判別式による判定結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 6 において、トレーニングセットの 50 例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果との関係を調べた結果を図 8 に示す。

[0131] 図 8 に示された結果から、トレーニングセットに振り分けられた全 50 例の検体のうち、前記式（４）で表される判別式によって、23 例の検体が npCR 群の乳癌患者の検体に該当すると判定され、27 例の検体が pCR 群の乳癌患者の検体に該当すると判定されることがわかる。すなわち、前記式（４）で表される判別式を用いた場合には、前記 23 例の検体は、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体であり、一方、前記 27 例の検体は、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体であると判定されることがわかる。

[0132] また、病理学的診断結果を真値として前記式（４）で表される判別式の性能を評価した場合、感度 100%、特異度 65.7%、陰性適中率（NPV）100%、および陽性適中率（PPV）55.6%であることがわかる。

[0133] したがって、これらの結果から、前記表 3 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量と前記式（４）で表される判別式とを用いることによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることが示唆される。

[0134] [実施例 7]

実施例 1 において、バリデーショナルセットに振り分けられた全 34 例の検体について測定された発現量のデータ（蛍光強度のデータ）と、前記式（4）で表される判別式とを用いて、全 34 例の検体が pCR 群および npCR 群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定することによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定した。また、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診断結果と前記式（4）で表される判別式による判定結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 7 において、バリデーショナルセットの 34 例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を図 9 に示す。

[0135] 図 9 に示された結果から、バリデーショナルセットに振り分けられた全 34 例の検体のうち、前記式（4）で表される判別式によって、14 例の検体が npCR 群の乳癌患者の検体に該当すると判定され、20 例の検体が pCR 群の乳癌患者の検体に該当すると判定されることがわかる。すなわち、前記式（4）で表される判別式を用いた場合には、前記 14 例の検体は、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体であり、一方、前記 20 例の検体は、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体であると判定されることがわかる。

[0136] また、病理学的診断結果を真値として前記式（4）で表される判別式の性能を評価した場合、感度 81.8%、特異度 52.2%、陰性適中率（NPV）85.7%、および陽性適中率（PPV）45.0%であることがわかる。

[0137] このように、バリデーショナルセットに振り分けられた全 34 例の検体においても、トレーニングセットに振り分けられた検体の場合と同様に、前記式（4）で表される判別式によって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることがわかる。また、前記表 3 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量と前記式（4）で表される判別式とを用いることによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を十分な精度で判定できることが示唆される。

[0138] [実施例 8]

実施例 5 において、遺伝子数（プローブ数）が 50 個のときに感度と特異度との積（感度×特異度）が最大値となる遺伝子の組み合わせは、表 8 および表 9 に示される遺伝子群の組み合わせである。また、構築された判別式は、下記式（7）で表される判別式である。

[0139] [数22]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0113 \quad (7)$$

〔式（7）中、 $i$  は表 8 および表 9 に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$  は表 8 および表 9 に記載された遺伝子番号  $i$  の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$  は下記式（8）：

[0140] [数23]

$$X_i = y_i + \text{abs} \left[ \text{round} \left\{ \min(y_{ij}) - 1 \right\} \right] \quad (8)$$

[0141] 〔式（8）中、 $j$  は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$  は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の検体番号  $j$  の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$  は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$  は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$  は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$  は下記式（9）：

[0142] [数24]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s} \quad (9)$$

[0143] 〔式（9）中、 $x_i$  は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$  は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$  は遺伝子番号  $i$  の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。）に示される遺伝子番号  $i$  の遺伝子の標準化された発現量を示す。〕により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\sum_i$  は各遺伝子に渡る総和を示す。〕。

[0144] 実施例 1 において、トレーニングセットに振り分けられた全 50 例の検体について測定された発現量のデータ（蛍光強度のデータ）と、前記式（7）で表される判別式とを用いて、全 50 例の検体が pCR 群および npCR 群

のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定した。そして、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診断結果と前記式（7）で表される判別式による判定結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例8において、トレーニングセットの50例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果との関係を調べた結果を図10に示す。

[0145] 図10に示された結果から、トレーニングセットに振り分けられた全50例の検体のうち、前記式（7）で表される判別式によって、23例の検体がnpCR群の乳癌患者の検体に該当すると判定され、27例の検体がpCR群の乳癌患者の検体に該当すると判定されることがわかる。すなわち、前記式（7）で表される判別式を用いた場合には、前記23例の検体は、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体であり、一方、前記27例の検体は、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体であると判定されることがわかる。

[0146] また、病理学的診断結果を真値として前記式（7）で表される判別式の性能を評価した場合、感度100%、特異度65.7%、陰性適中率（NPV）100%、および陽性適中率（PPV）55.6%であることがわかる。

[0147] したがって、これらの結果から、前記表8および表9に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量と前記式（7）で表される判別式とを用いることによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることが示唆される。

[0148] [実施例9]

実施例1において、バリデーションセットに振り分けられた全34例の検体について測定された発現量のデータ（蛍光強度のデータ）と、前記式（7）で表される判別式とを用いて、全34例の検体がpCR群およびnpCR群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定することによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定した。また、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診断結果と前記式（7）で表される判別式による判定結果



とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 9 において、バリデーショナルセットの 34 例の乳癌患者の検体について、判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を図 11 に示す。

[0149] 図 11 に示された結果から、バリデーショナルセットに振り分けられた全 34 例の検体のうち、前記式 (7) で表される判別式によって、15 例の検体が n p C R 群の乳癌患者の検体に該当すると判定され、19 例の検体が p C R 群の乳癌患者の検体に該当すると判定されることがわかる。すなわち、前記式 (7) で表される判別式を用いた場合には、前記 15 例の検体は、乳癌術前化学療法に対して非感受性である乳癌患者の検体であり、一方、前記 19 例の検体は、乳癌術前化学療法に対して感受性である乳癌患者の検体であると判定されることがわかる。

[0150] また、病理学的診断結果を真値として前記式 (7) で表される判別式の性能を評価した場合、感度 81.8%、特異度 56.5%、陰性適中率 (NPV) 86.7%、および陽性適中率 (PPV) 47.4% であることがわかる。

[0151] このように、バリデーショナルセットに振り分けられた全 34 例の検体においても、トレーニングセットに振り分けられた検体の場合と同様に、前記式 (7) で表される判別式によって、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることがわかる。また、前記表 8 および表 9 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量と前記式 (7) で表される判別式とを用いることによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を十分な精度で判定できることが示唆される。

[0152] 以上説明した結果から、表 1 および表 2 に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量のうち、表 3 に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を少なくとも測定することにより、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度良く判定できることが示唆される。

## 請求の範囲

[請求項1]

- (A) 被験者から採取された検体からRNAを抽出する工程、
  - (B) 前記工程(A)で抽出されたRNAを用いて測定用試料を調製する工程、
  - (C) 前記工程(B)で得られた測定用試料を用いて、表1および表2に記載の遺伝子群から選ばれた遺伝子の発現量を測定する工程であって、前記遺伝子の発現量が、表3に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を少なくとも含むものである工程、
  - (D) 前記工程(C)で測定された前記遺伝子の発現量を解析する工程、および
  - (E) 前記工程(D)で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程、
- を含む、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定方法。

[表1]

表1

No	プローブセット.ID	遺伝子記号	UniGene.ID	GenBankアクセッション番号
1	1560850_at	---	Hs.553018	BC016831
2	215397_x_at	---	Hs.661288	AU148086
3	239090_at	FAM161A	Hs.440466	BF110321
4	234222_at	---	Hs.677309	AK024999
5	222073_at	COL4A3	Hs.570065	AI694562
6	1553025_at	GPR126	Hs.715560	NM_020455
7	206685_at	HCG4	Hs.660431	NM_018985
8	1553502_a_at	AKAP2 /// PALM2 /// PALM2-AKAP2	Hs.591908	NM_053016
9	234275_at	---	Hs.671963	AL050116
10	1554607_at	CNKSR2	Hs.555917	AF418269
11	214746_s_at	ZNF467	Hs.112158	BE549732
12	211234_x_at	ESR1	Hs.208124	AF258449
13	211235_s_at	ESR1	Hs.208124	AF258450
14	222835_at	THSD4	Hs.387057	BG163478
15	217613_at	TMEM144	Hs.176227	AW173720
16	207847_s_at	MUC1	Hs.89603	NM_002456
17	206157_at	PTX3	Hs.591286	NM_002852
18	205225_at	ESR1	Hs.208124	NM_000125
19	219153_s_at	THSD4	Hs.387057	NM_024817
20	239520_at	---	Hs.156398	AW376860
21	228375_at	IGSF11	Hs.112873	BE221674
22	206794_at	ERBB4	Hs.390729	NM_005235
23	1555052_a_at	SYT9	Hs.177193	BC029605
24	226506_at	THSD4	Hs.387057	AI742570
25	220524_at	EPB41L4B	Hs.591901	NM_024823
26	234612_at	---	Hs.677309	AK024999
27	1552508_at	KCNE4	Hs.348522	NM_080671
28	1562524_at	---	Hs.680472	BC043587
29	223500_at	CPLX1	Hs.478930	BC002471
30	232336_at	ZSWIM5	Hs.656613	AI479419
31	203747_at	AQP3	Hs.234642	NM_004925
32	1553882_at	---	Hs.617329	NM_145302
33	215552_s_at	ESR1	Hs.208124	AI073549
34	206999_at	IL12RB2	Hs.479347	NM_001559
35	209604_s_at	GATA3	Hs.524134	BC003070

[表2]

表2

No	プローブセット.ID	遺伝子記号	UniGene.ID	GenBankアクセッション番号
36	1553873_at	KLHL34	Hs.448572	NM_153270
37	211695_x_at	MUC1	Hs.89603	AF348143
38	218613_at	PSD3	Hs.434255	NM_018422
39	232243_at	MCPH1	Hs.709634	AU159380
40	203892_at	WFDC2	Hs.2719	NM_006103
41	233494_at	ERBB4	Hs.390729	AK024204
42	228058_at	LOC124220	Hs.105887	AI559190
43	209693_at	ASTN2	Hs.601562	AF116574
44	229779_at	COL4A4	Hs.591645	BF476080
45	214440_at	NAT1	Hs.591847	NM_000662
46	240625_at	---	---	AW511032
47	233498_at	ERBB4	Hs.390729	AK024204
48	228741_s_at	HCN3	Hs.706960	AA569959
49	209706_at	NKX3-1	Hs.55999	AF247704
50	222379_at	KCNE4	Hs.348522	AI002715
51	227425_at	REPS2	Hs.186810	AI984607
52	1553622_a_at	FSIP1	Hs.129598	NM_152597
53	1563128_at	---	Hs.680649	BC017904
54	215551_at	ESR1	Hs.208124	AI073549
55	1564630_at	EDN1	Hs.713645	BC036851
56	242093_at	SYTL5	Hs.662334	AW263497
57	1555817_s_at	---	---	BC008840
58	211233_x_at	ESR1	Hs.208124	M12674
59	227232_at	EVL	Hs.125867	T58044
60	203570_at	LOXL1	Hs.65436	NM_005576
61	209603_at	GATA3	Hs.524134	AI796169
62	219532_at	ELOVL4	Hs.101915	NM_022726
63	234057_at	---	Hs.677421	AF264623
64	215407_s_at	ASTN2	Hs.601562	AK024064
65	205635_at	KALRN	Hs.8004	NM_003947
66	226647_at	TMEM25	Hs.564188	AL562445
67	1552507_at	KCNE4	Hs.348522	NM_080671
68	204469_at	PTPRZ1	Hs.489824	NM_002851
69	230791_at	---	Hs.661175	AU146924
70	233887_at	GPR126	Hs.715560	AL033377

[表3]

表3

No	プローブセット.ID
1	239090_at
2	232243_at
3	240625_at
4	222379_at
5	1553622_a_at
6	219532_at
7	234057_at
8	215407_s_at
9	205635_at
10	226647_at
11	1552507_at
12	230791_at
13	233887_at

[請求項2] 前記工程（D）において、前記発現量を、クラス分け手法を用いて解析する、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 前記クラス分け手法が、Between-group analysisである、請求項2に記載の方法。

[請求項4] 前記工程（C）において、表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定し、測定された各遺伝子の発現量と、下記式（1）：

[数1]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0133 \quad (1)$$

〔式（1）中、 $i$ は表1および表2に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表4、表5および表6に記載された遺伝子番号 $i$ の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式（2）：

[数2]

$$X_i = y_i + \text{abs}[\text{round}(\min(y_{ij}) - 1)] \quad (2)$$

〔式（2）中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の検体番号 $j$ の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式（3）：

[数3]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s_i} \quad (3)$$

（式（3）中、 $x_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。）に示される遺伝子番号 $i$ の遺伝子の標準化された発現量を示す。）により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\sum_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。〕

で表される判別式とを用い、前記判別式の解 $D$ が正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解 $D$ がゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する、請求項3に記載の方法。

[表4]

表4

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
1	1560850_at	-0.7467
2	215397_x_at	-0.7402
3	239090_at	1.7379
4	234222_at	-0.7109
5	222073_at	1.7298
6	1553025_at	1.7240
7	206685_at	-0.6963
8	1553502_a_at	1.7145
9	234275_at	-0.6798
10	1554607_at	1.7000
11	214746_s_at	-0.6773
12	211234_x_at	-0.6685
13	211235_s_at	-0.6617
14	222835_at	-0.6597
15	217613_at	-0.6561
16	207847_s_at	-0.6524
17	206157_at	1.6722
18	205225_at	-0.6474
19	219153_s_at	-0.6468
20	239520_at	1.6665
21	228375_at	1.6536
22	206794_at	-0.6301
23	1555052_a_at	-0.6289
24	226506_at	-0.6269
25	220524_at	1.6439

[表5]

表5

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
26	234612_at	-0.6202
27	1552508_at	-0.6187
28	1562524_at	-0.6156
29	223500_at	-0.6105
30	232336_at	-0.6059
31	203747_at	-0.6045
32	1553882_at	-0.6038
33	215552_s_at	-0.6033
34	206999_at	1.6223
35	209604_s_at	-0.6013
36	1553873_at	1.6187
37	211695_x_at	-0.5975
38	218613_at	-0.5952
39	232243_at	-0.5949
40	203892_at	-0.5943
41	233494_at	-0.5921
42	228058_at	-0.5917
43	209693_at	-0.5876
44	229779_at	1.6077
45	214440_at	-0.5851
46	240625_at	1.6058
47	233498_at	-0.5831
48	228741_s_at	-0.5812
49	209706_at	-0.5800
50	222379_at	-0.5781

[表6]



表6

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
51	227425_at	-0.5767
52	1553622_a_at	-0.5750
53	1563128_at	-0.5743
54	215551_at	-0.5641
55	1564630_at	1.5842
56	242093_at	-0.5619
57	1555817_s_at	-0.5590
58	211233_x_at	-0.5585
59	227232_at	-0.5576
60	203570_at	-0.5533
61	209603_at	-0.5501
62	219532_at	1.5704
63	234057_at	-0.5478
64	215407_s_at	-0.5455
65	205635_at	1.5650
66	226647_at	-0.5439
67	1552507_at	-0.5427
68	204469_at	1.5615
69	230791_at	1.5547
70	233887_at	1.5520

[請求項5]

前記工程（C）において、表3に記載の遺伝子群の各遺伝子の発現量を測定し、測定された各遺伝子の発現量と、下記式（4）：

[数4]

$$D = \frac{\sum_i w_i \times X_i}{\sum_i X_i} + 0.0069 \quad (4)$$

{式(1)中、 $i$ は表3に記載の遺伝子群の各遺伝子に付与された遺伝子番号を示し、 $w_i$ は表7に記載された遺伝子番号 $i$ の遺伝子に対応する重み係数を示し、 $X_i$ は下記式(5)：

[数5]

$$X_i = y_i + \text{abs} \left[ \text{round} \left\{ \min(y_{ij}) - 1 \right\} \right] \quad (5)$$

[式(5)中、 $j$ は各検体に付与された検体番号を示し、 $y_{ij}$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の検体番号 $j$ の検体での標準化された発現量を示し、 $\min$ は括弧内の値の最小値を示し、 $\text{round}$ は括弧内の値の小数点以下第一位を四捨五入した値を示し、 $\text{abs}$ は括弧内の値の絶対値を示し、 $y_i$ は下記式(6)：

[数6]

$$y_i = \frac{x_i - u_i}{s_i} \quad (6)$$

(式(6)中、 $x_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量を示し、 $u_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る平均値を示し、 $s_i$ は遺伝子番号 $i$ の遺伝子の発現量の検体に渡る標準偏差を示す。)に示される遺伝子番号 $i$ の遺伝子の標準化された発現量を示す。)により標準化され正規化された遺伝子の発現量を示し、 $\Sigma_i$ は各遺伝子に渡る総和を示す。}

で表される判別式とを用い、前記判別式の解 $D$ が正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解 $D$ がゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する、請求項3に記載の方法。

[表7]

表7

No	プローブセット.ID	判別式での 重み係数
1	239090_at	1.2094
2	232243_at	-0.9563
3	240625_at	1.0867
4	222379_at	-0.9407
5	1553622_a_at	-0.9379
6	219532_at	1.0538
7	234057_at	-0.9126
8	215407_s_at	-0.9104
9	205635_at	1.0488
10	226647_at	-0.9089
11	1552507_at	-0.9078
12	230791_at	1.0393
13	233887_at	1.0368

[請求項6] 前記工程（D）において、前記発現量を、階層的クラスタ分析により解析する、請求項1に記載の方法、

[請求項7] 前記工程（D）において、前記発現量を、スコア化手法により解析する、請求項1に記載の方法。

[請求項8] 前記各遺伝子の発現量を、前記各遺伝子に対応する核酸を少なくとも有するマイクロアレイを用いて測定する、請求項1に記載の方法。

[請求項9] 前記検体が、治療前生検により被験者から採取された検体である、請求項1に記載の方法。

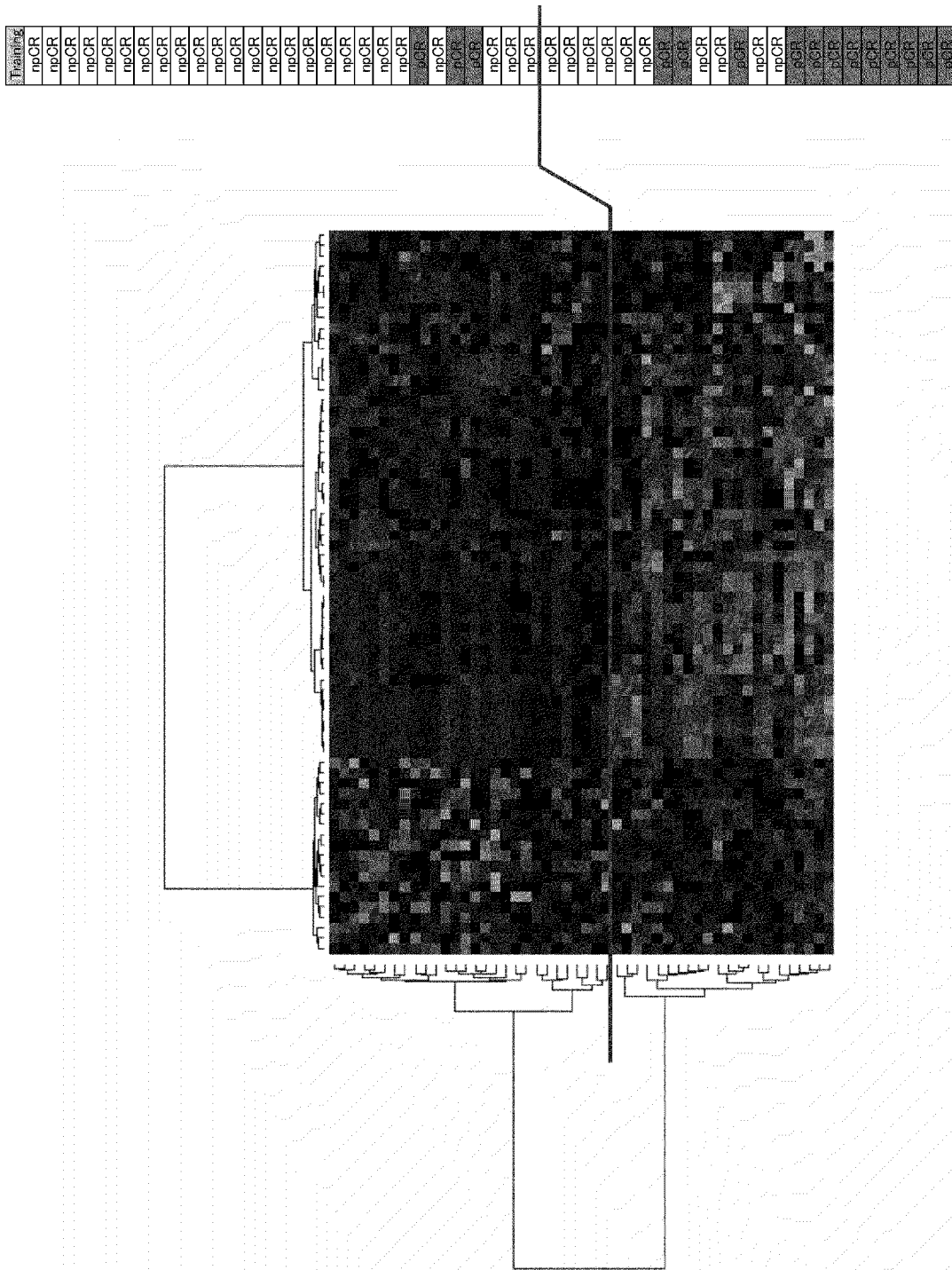
[図1]

		判別式による判定結果			
		npCR	pCR		
病理学の検査	npCR	23	12	特異度	65.7%
	pCR	0	15	感度	100.0%
		NPV	PPV		
		100.0%	55.6%		

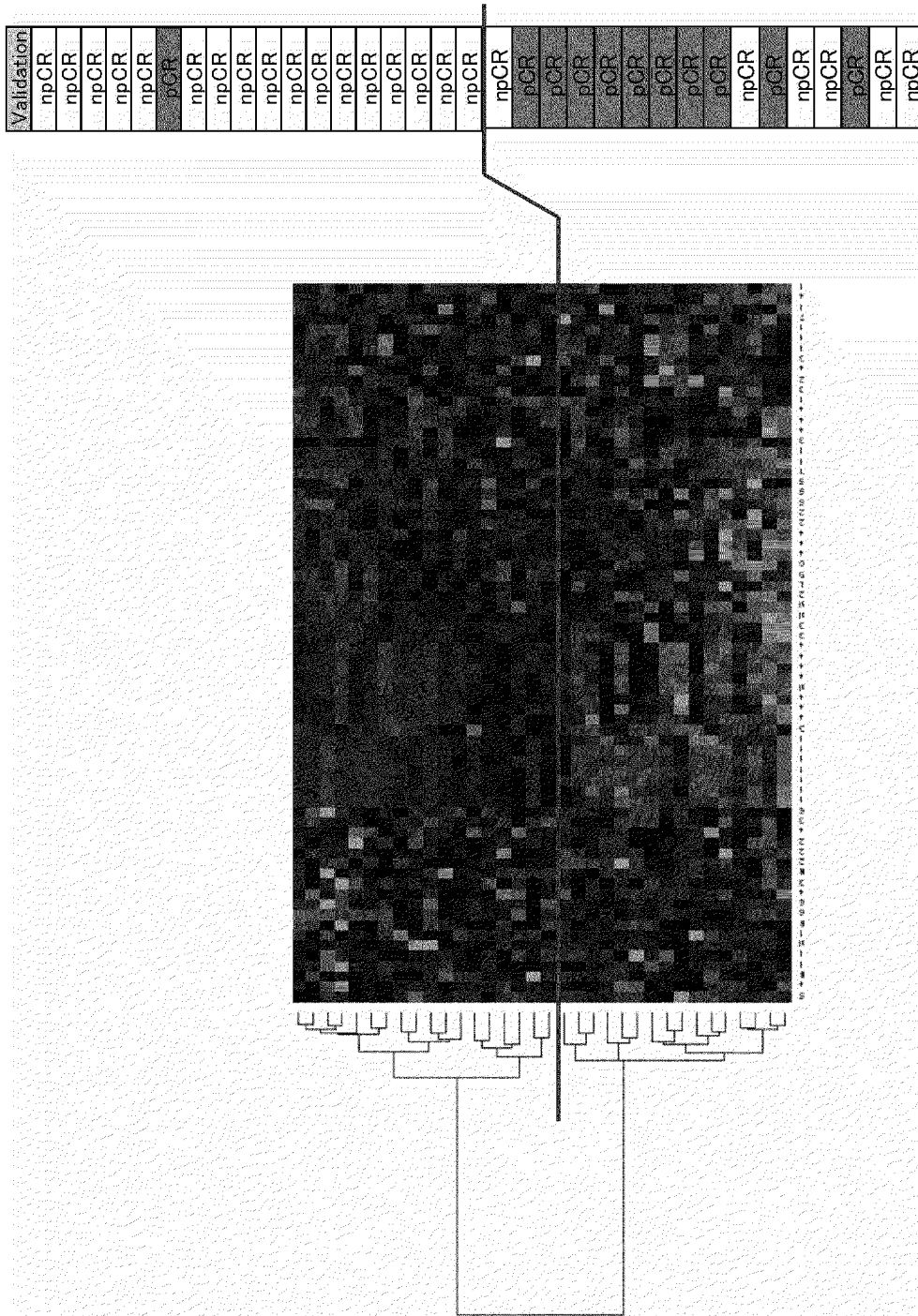
[図2]

		判別式による判定結果			
		npCR	pCR		
病理学の検査	npCR	14	9	特異度	60.9%
	pCR	1	10	感度	90.9%
		NPV	PPV		
		93.3%	52.6%		

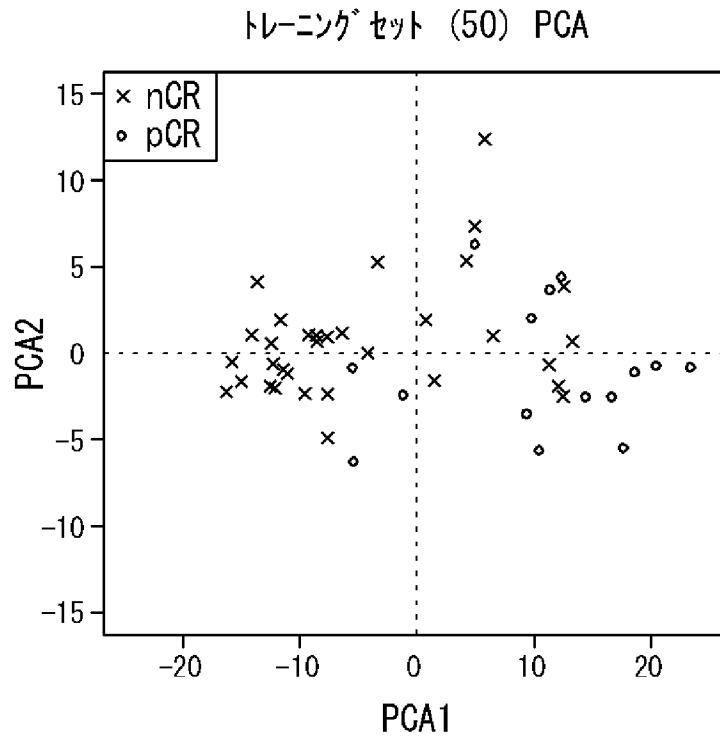
[ 3 ]



[] 4

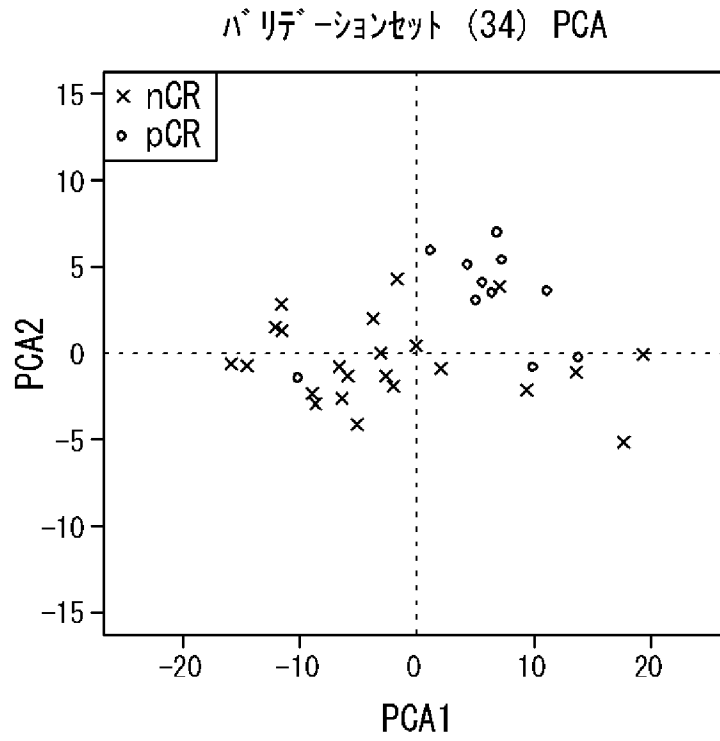


[図5]

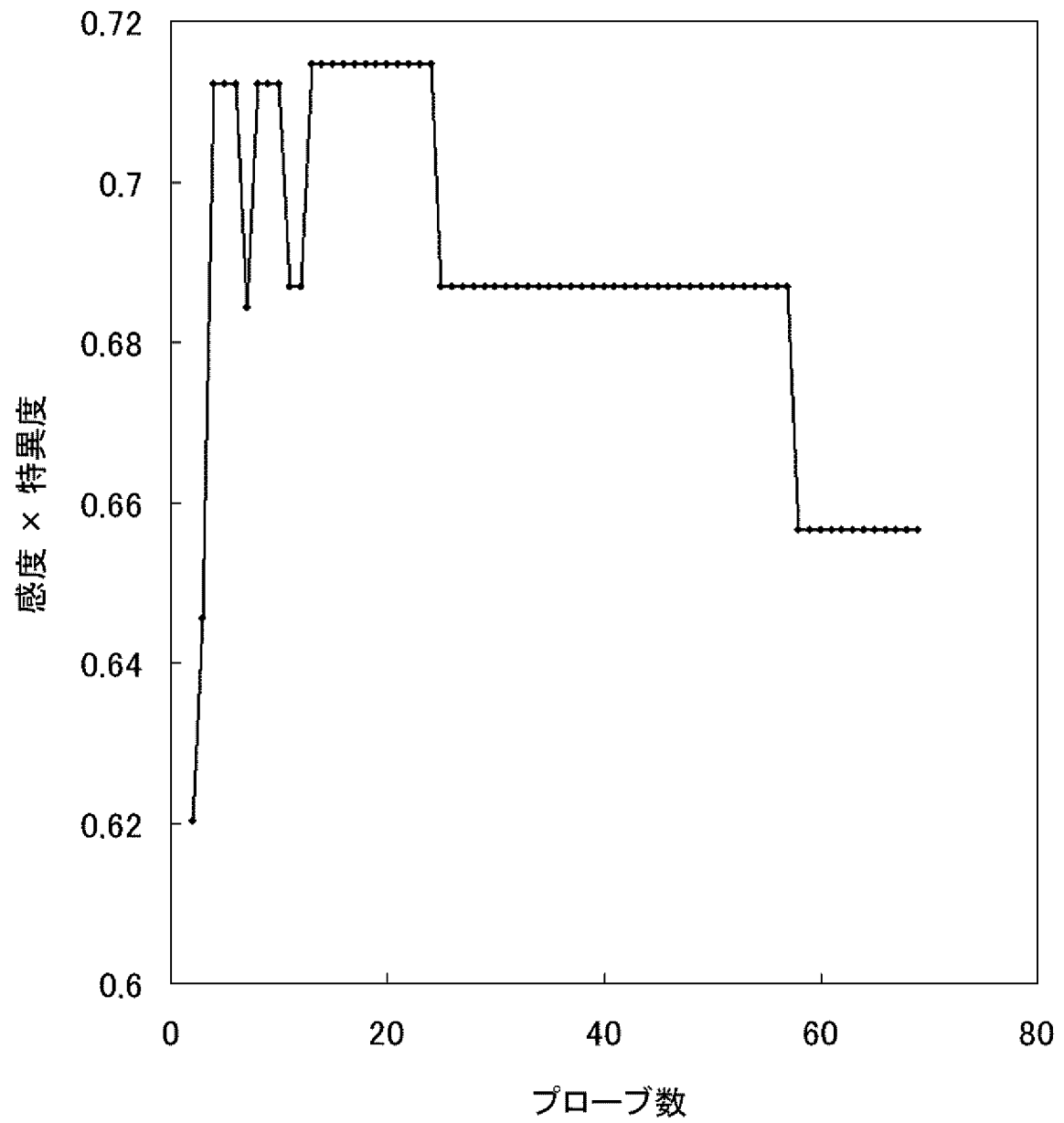




[図6]



[図7]



[図8]

		判別式による判定結果			
		npCR	pCR		
病理学の検査	npCR	23	12	特異度	65.7%
	pCR	0	15	感度	100.0%
		NPV	PPV		
		100.0%	55.6%		

[図9]

		判別式による判定結果			
		npCR	pCR		
病理学の検査	npCR	12	11	特異度	52.2%
	pCR	2	9	感度	81.8%
		NPV	PPV		
		85.7%	45.0%		

[図10]

		判別式による判定結果			
		npCR	pCR		
病理学の検査	npCR	23	12	特異度	65.7%
	pCR	0	15	感度	100.0%
		NPV	PPV		
		100.0%	55.6%		

[図11]

		判別式による判定結果			
		npCR	pCR		
病理学の検査	npCR	13	10	特異度	56.5%
	pCR	2	9	感度	81.8%
		NPV	PPV		
		86.7%	47.4%		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071258

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, G01N33/50, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-505256 A (Beilar Collage of Medisin), 16 February 2006 (16.02.2006), & US 2004/0018527 A1 & EP 1576177 A	1-9
Y	Koichi NAGASAKI et al., "Idenshi Hatsugen Profile ni Motozuita Nyugan ni Okeru Jutsumae Kagaku Ryoho Kanjusei Yosoku System no Kochiku", Dai 64 Kai Annual Meeting of the Japan Cancer Association, 2005, vol.64, page 158	1-9
Y	HESS K. et al., Pharmacogenomic Predictor of Sensitivity to Preoperative Chemotherapy With Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide in Breast Cancer, J. Clin. Oncol., 2006, Vol.24, No.26, P.4236-4244	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 February, 2011 (04.02.11)Date of mailing of the international search report  
15 February, 2011 (15.02.11)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/071258

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AYERS M. et al., Gene Expression Profiles Predict Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Chemotherapy in Breast Cancer, J. Clin. Oncol., 2004, Vol.22, No.12, P.2284-2293	1-9



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12Q1/68, G01N33/50, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-505256 A (バイラー カレッジ オブ メディスン) 2006.02.16, & US 2004/0018527 A1 & EP 1576177 A	1-9
Y	長崎光一 他, 遺伝子発現プロファイルに基づいた乳がんにおける 術前化学療法感受性予測システムの構築, 第64回日本癌学会学術総会, 2005, Vol.64, P.158	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの                  「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献                  「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 04.02.2011	国際調査報告の発送日 15.02.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 福間 信子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HESS K. et al., Pharmacogenomic Predictor of Sensitivity to Preoperative Chemotherapy With Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide in Breast Cancer, J. Clin. Oncol., 2006, Vol.24, No.26, P.4236-4244	1-9
Y	AYERS M. et al., Gene Expression Profiles Predict Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Chemotherapy in Breast Cancer, J. Clin. Oncol., 2004, Vol.22, No.12, P.2284-2293	1-9