

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4606879号
(P4606879)

(45) 発行日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(24) 登録日 平成22年10月15日(2010.10.15)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
	C 1 2 N 15/00 F

請求項の数 14 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2004-553847 (P2004-553847)	(73) 特許権者	504345126
(86) (22) 出願日	平成15年11月14日(2003.11.14)		ジェノミックヘルス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2006-506093 (P2006-506093A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94063, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 301
(43) 公表日	平成18年2月23日(2006.2.23)	(74) 代理人	100149294
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/036777		弁理士 内田 直人
(87) 国際公開番号	W02004/046386	(74) 代理人	100137512
(87) 国際公開日	平成16年6月3日(2004.6.3)		弁理士 奥原 康司
審査請求日	平成18年11月13日(2006.11.13)	(72) 発明者	ベーカー, ジョフレ ピー.
(31) 優先権主張番号	60/427,090		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94937, モンタラ, ピー.オー. ボックス 371212
(32) 優先日	平成14年11月15日(2002.11.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 EGF R陽性癌の遺伝子発現プロファイリング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト結腸癌患者が、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）のインヒビターでの治療により臨床的に有益な患者反応を示す尤度を予測する方法において、

a) 前記患者から得られたEGFR発現性の結腸癌細胞を含むサンプルにおけるEREG RNA転写物又はその対応する遺伝子産物の少なくとも1つの正規化されたレベルを測定する工程；

b) 前記EREG RNA転写物又はその対応する遺伝子産物の正規化されたレベルを分析する工程；及び

c) 前記EREG RNA転写物又はその対応する遺伝子産物の前記正規化されたレベルに基づいて、当該患者がEGFRインヒビターでの治療に対してよく反応する尤度を予測する工程を含み、

EREGあるいはその対応する遺伝子産物の正規化されたレベルの規定された閾値より上への増大が、EGFRインヒビターでの治療から利益を受け易いことを示す方法。

【請求項2】

前記サンプルが、組織サンプルである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記組織が、固定されてパラフィン包埋されているか、または新鮮であるか、または凍結されている、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記組織が、細針生検、コア生検、または他の型の生検に由来する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記患者が E G F R インヒビターによる処置によく反応する可能性があるかどうかの記述を含む報告を準備する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 R N A 転写物又はその対応する遺伝子産物の発現レベルが、アレイをベースとする方法により測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 R N A 転写物又はその対応する遺伝子産物が、固体表面に固定される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記 R N A 転写物の発現レベルが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子産物の発現レベルが、免疫組織化学によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記遺伝子産物の発現レベルが、プロテオミクス技術によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記 E R E G R N A 転写物又はその対応する遺伝子産物の測定が、キットの形態で提供されるアッセイで行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

(a) 前記固定されてパラフィン包埋された組織標本を、56 ~ 70 の温度で、溶解緩衝液中において、プロテアーゼ存在下で、予め脱蠟することなくインキュベートして、溶解溶液を作製する工程；

(b) 前記蠟が固化する温度まで、該溶解溶液を冷却する工程；および、

(c) 該溶解溶液から核酸を単離する工程、

を包含する手順によって、前記組織から R N A が単離される、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 13】

E G F R インヒビターが、低分子量有機分子、抗 E G F R 抗体、アンチセンス分子、又は低分子ペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

E G F R インヒビターが、Z D 1 8 3 9、O S 1 7 7 4、L F M - A 1 2、又はセツキシマブである、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

40

(発明の分野)

本発明は、E G F R 陽性の癌から得られた組織サンプルの遺伝子発現プロファイリングに関する。より具体的には、本発明は、E G F R 発現性の癌のパラフィン包埋された固定組織サンプルにおける、遺伝子発現の分子的特徴付けに基づく診断法、予後判定法および予測法を提供する。この方法は、患者が E G F R インヒビターによる処置によく反応する可能性があるかどうかを、医師が予測することを可能にする。加えて、本発明は、このような所見に基づく処置方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

(関連技術の記載)

50

癌専門医は、多くの、彼らに利用可能な処置の選択肢（「医療の標準」として特徴づけられる、化学療法薬の異なる組合せを含む）、および多くの、特定の癌に関して効能の表示（label claim）がないが、その癌における効能の証拠がある薬物を有する。よい処置結果の最大尤度は、患者が、最適な利用可能な癌の処置に割り当てられること、およびこの割り当てが、診断に続いて直ちに行われることを必要とする。

【0003】

現在、臨床的手法に使用される診断試験は、単一検体であり、したがって何十もの異なるマーカー間の公知の関係の潜在値を捕捉しない。さらに、診断試験は、しばしば免疫組織化学に頼り、定量的でない。この方法は、しばしば、異なる実験室において、異なる結果をもたらす。なぜなら、部分的には試薬が規格化されていないからであり、かつ部分的には、解釈が主観的であり、容易に定量化し得ないからである。RNAベースの試験は、時間に伴うRNAの分解のため、そして分析のため患者から新鮮な組織サンプルを得るのが困難という事実のため、それほど頻繁に使用されてこなかった。固定されパラフィン包埋された組織は、より容易に入手可能であり、そして固定された組織においてRNAを検出するための方法が確立されている。しかし、これらの方法は、代表的に、少量の材料由来の多数の遺伝子（DNAまたはRNA）の研究を可能にしない。したがって伝統的に、固定組織は、タンパク質の免疫組織化学的検出以外には、稀にしか使用されていなかった。

【0004】

近年、いくつかのグループが、マイクロアレイ遺伝子発現分析による種々の癌の型の分類に関連する研究を公開した（例えば、Golubら、Science 286:531-537（1999）；Bhattacharjara、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13790-13795（2001）；Chen-Hsiangら、Bioinformatics 17（Suppl. 1）:S316-S322（2001）；Ramasmamyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:15149-15154（2001）を参照のこと）。遺伝子の発現パターンに基づくヒト乳癌の特定の分類もまた、報告されている（Martinら、Cancer Res. 60:2232-2238（2000）；Westら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11462-11467（2001）；Sorlieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:10869-10874（2001）；Yanら、Cancer Res. 61:8375-8380（2001））。しかし、これらの研究は、種々の型の癌（乳癌を含む）の既に確立された分類を改善もしくは精緻化することに主に焦点を合わせており、一般的に、癌治療の臨床的結果を改善するための処置計画に対する知見に関連しない。

【0005】

現代の分子生物学および生化学は、その活性が、腫瘍細胞の挙動、分化の状態、ならびに特定の治療薬に対する感受性および抵抗性に影響する、100を超える遺伝子を明らかにしたが、いくつかの例外を除いて、これらの遺伝子の状態は、薬物処置についての臨床的決定を慣習的に行うという目的のために利用されてこなかった。一つの注目すべき例外は、乳癌におけるエストロゲンレセプター（ER）タンパク質発現を使用して、抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン）による処置へと患者を選択することである。別の例外的な例は、乳癌におけるErbB2（Her2）タンパク質発現を使用して、Her2アンタゴニスト薬Herceptin（登録商標）（Genentech, Inc., South San Francisco, CA）を用いる患者を選択することである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

近年の進歩にもかかわらず、癌処置についての挑戦は、依然として、病理学的に別個の腫瘍型に対する特異的処置レジメンを標的とし、かつ結果を最適化するために腫瘍処置を個別化することである。ゆえに、種々の処置の選択肢に対する患者の反応についての予測

10

20

30

40

50

的情報を同時に提供する試験に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、EGFRインヒビターによる処置によく反応したかまたは反応しなかった(抵抗性を示した)ヒト患者の、EGFR発現性の頭部癌および頸部癌または結腸癌から得られた組織サンプルにおける、遺伝子発現の第I相臨床研究の知見に基づく。

【0008】

このような知見に基づいて、一つの局面において、本発明は、EGFR発現性の癌と診断された患者がEGFRインヒビターによる処置に反応する尤度を、予測するための方法
10
に関し、この方法は、この患者から得られたEGFR発現性の癌細胞を含むサンプルにおける、一種以上の予後判定用RNA転写物もしくはそれらの産物の発現レベルを決定する工程を、包含する。ここで、この予後判定用転写物は、

【0009】

【化12】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17; CCND3; CD105;
CD44s; CD82; CD9; CGA;; CTSL; EGFRd27; ErbB3; EREG; GPC3; GUS; HGF; ID1;
IGFBP3; ITGB3; ITGB3; p27; P53; PTPD1; RB1; RPLPO; STK15; SURV; TERC; TGFBR2;
TIMP2; TITF1; XIAP; YB-1; A-カテニン; AKT1; AKT2; APC; Bax; B-カテニン; BTC; CA9;
20
CCNA2; CCNE1; CCNE2; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CD68; CDC25B; CEACAM6;
Chk2; cMet; COX2; cripto; DCR3; DIABLO; DPYD; DR5; EDN1 エンドセリン; EGFR; EIF4E;
ERBB4; ERK1; fas; FRP1; GRO1; HB-EGF; HER2; IGF1R; IRS1; ITGA3; KRT17; LAMC2;
MTA1; NMYC; P14ARF; PAI1; PDGFA; PDGFB; PGK1; PLAUR; PPARG; RANBP2;
RASSF1; RIZ1; SPRY2; Src; TFRC; TP53BP1;UPA; および VEGFC

からなる群から選択される一種以上の遺伝子の転写物であり、ここで、(a)この患者は、

【0010】

【化13】

A-カテニン; AKT1; AKT2; APC; Bax; B-カテニン; BTC; CA9; CCNA2; CCNE1;
CCNE2; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CD68; CDC25B; CEACAM6; Chk2; cMet;
COX2; cripto; DCR3; DIABLO; DPYD; DR5; EDN1 エンドセリン; EGFR; EIF4E; ERBB4;
ERK1; fas; FRP1; GRO1; HB-EGF; HER2; IGF1R; IRS1; ITGA3; KRT17; LAMC2; MTA1;
NMYC; P14ARF; PAI1; PDGFA; PDGFB; PGK1; PLAUR; PPARG; RANBP2; RASSF1;
RIZ1; SPRY2; Src; TFRC; TP53BP1; upa; VEGFC

もしくはその産物のいずれかの正規化されたレベルが、規定の閾値より上に上昇する場合
40
、EGFRインヒビターによる処置から利益を受ける可能性が低く、そして(b)この患者は、

【0011】

【化14】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17;
CCND3; CD105; CD44s; CD82; CD9; CGA;; CTSL; EGFRd27; ErbB3; EREG; GPC3; GUS;
HGF; ID1; IGFBP3; ITGB3; ITGB3; p27; P53; PTPD1; RB1; RPLPO; STK15; SURV; TERC;
TGFBR2; TIMP2; TITF1; XIAP; および YB-1

10

20

30

40

50

もしくはその産物のいずれかの正規化されたレベルが、規定の閾値より上に上昇する場合、EGFRインヒビターによる処置から利益を受ける可能性がある。

【0012】

別の局面において、本発明は、予後判定法に関し、この方法は、以下：

(a) 患者から得られたEGFR発現性癌細胞を含むサンプルを、CD44v3；CD44v6；DR5；GRO1；KRT17；およびLAMC2遺伝子からなる群から選択される、少なくとも一種の遺伝子のRNA転写物かまたはそれらの産物の発現レベルの定量分析に供する工程、ならびに、

(b) このような遺伝子もしくはそれらの産物の発現レベルが、規定の発現閾値より上に上昇した場合、EGFRインヒビターによる処置に抵抗性を示す可能性があるとして、該患者を同定する工程、

を包含する。特定の実施形態において、遺伝子はLAMC2である。

【0013】

なお別の局面において、本発明は、EGFR発現性の頭部癌および頸部癌と診断された患者がEGFRインヒビターによる処置に反応する尤度を、予測するための方法に関し、この方法は、このような患者から得られたEGFR発現性癌細胞を含むサンプルにおける、一種以上のRNA転写物もしくはそれらの産物の発現レベルを決定する工程を包含する。ここで、この予後判定用転写物は、

【0014】

【化15】

CD44；CD82；CGA；CTSL；EGFRd27；IGFBP3；p27；P53；RB1；TIMP2；YB-1；A-カテニン；AKT1；AKT2；APC；Bax；B-カテニン；BTC；CCNA2；CCNE1；CCNE2；CD105；CD44v3；CD44v6；CD68；CEACAM6；Chk2；cMet；COX2；cripto；DCR3；DIABLO；DPYD；DR5；EDN1 エンドセリン；EGFR；EIF4E；ERBB4；ERK1；fas；FRP1；GRO1；HB-EGF；HER2；IGF1R；IRS1；ITGA3；KRT17；LAMC2；MTA1；NMYC；PAI1；PDGFA；PGK1；PTPD1；RANBP2；SPRY2；TP53BP1；および VEGFC

からなる群から選択される、一種以上の遺伝子の転写物であり、ここで、(a)

【0015】

【化16】

A-カテニン；AKT1；AKT2；APC；Bax；B-カテニン；BTC；CCNA2；CCNE1；CCNE2；CD105；CD44v3；CD44v6；CD68；CEACAM6；Chk2；cMet；COX2；cripto；DCR3；DIABLO；DPYD；DR5；EDN1 エンドセリン；EGFR；EIF4E；ERBB4；ERK1；fas；FRP1；GRO1；HB-EGF；HER2；IGF1R；IRS1；ITGA3；KRT17；LAMC2；MTA1；NMYC；PAI1；PDGFA；PGK1；PTPD1；RANBP2；SPRY2；TP53BP1；VEGFC

もしくはその対応する遺伝子産物の一種以上の、規定された閾値発現レベルより上の正規化された発現は、この患者がEGFRインヒビターによる処置に抵抗性を示す可能性があることを表し、そして(b)

【0016】

【化17】

CD44s；CD82；CGA；CTSL；EGFRd27；IGFBP3；p27；P53；RB1；TIMP2；YB-1

もしくはその対応する遺伝子産物の一種以上の、規定された閾値発現レベルより上の発現は、この患者がEGFRインヒビターによる処置によく反応する可能性があることを表す。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、EGFR発現性結腸癌と診断された患者がEGFR

10

20

30

40

50

インヒビターによる処置に反応する尤度を予測する方法に関し、この方法は、この患者から得られた E G F R 発現性癌細胞を含むサンプルにおける、一種以上の予後判定用の R N A 転写物もしくはそれらの産物の発現レベルを決定する工程を包含し、ここで、この予後判定用転写物は、

【 0 0 1 8 】

【 化 1 8 】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17; CCND3; CCNE1; CCNE2; CD105; CD9; COX2; DIABLO; ErbB3; EREG; FRP1; GPC3; GUS; HER2; HGF; ID1; ITGB3; PTPD1; RPLPO; STK15; SURV; TERC; TGFBR2; TITF1; XIAP; CA9; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CDC25B; CGA; DR5; GRO1; KRT17; LAMC2; P14ARF; PDGFB; PLAUR; PPARG; RASSF1; RIZ1; Src; TFRC; および UPA

10

からなる群から選択される一種以上の遺伝子の転写物であり、ここで、

【 0 0 1 9 】

【 化 1 9 】

CA9; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CDC25B; CGA; DR5; GRO1; KRT17; LAMC2; P14ARF; PDGFB; PLAUR; PPARG; RASSF1; RIZ1; Src; TFRC; および UPA

もしくはその対応する遺伝子産物の一種以上の発現の、規定された閾値発現より上への上昇は、この患者が E G F R インヒビターによる処置に抵抗性を示す可能性があることを表し、そして、

20

【 0 0 2 0 】

【 化 2 0 】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17; CCND3; CCNE1; CCNE2; CD105; CD9; COX2; DIABLO; ErbB3; EREG; FRP1; GPC3; GUS; HER2; HGF; ID1; ITGB3; PTPD1; RPLPO; STK15; SURV; TERC; TGFBR2; TITF1; XIAP

もしくはその対応する遺伝子産物の一種以上の発現の、規定された閾値発現より上への上昇は、この患者が E G F R インヒビターによる処置によく反応する可能性があることを表す。

30

【 0 0 2 1 】

別の局面において、本発明は、 E G F R 発現性の癌と診断され、かつその癌において、

【 0 0 2 2 】

【 化 2 1 】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17; CCND3; CD105; CD44s; CD82; CD9; CGA;; CTSL; EGFRd27; ErbB3; EREG; GPC3; GUS; HGF; ID1; IGFBP3; ITGB3; ITGB3; p27; P53; PTPD1; RB1; RPLPO; STK15; SURV; TERC; TGFBR2; TIMP2; TITF1; XIAP; YB-1; A-カテニン; AKT1; AKT2; APC; Bax; B-カテニン; BTC; CA9; CCNA2; CCNE1; CCNE2; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CD68; CDC25B; CEACAM6; Chk2; cMet; COX2; cripto; DCR3; DIABLO; DPYD; DR5; EDN1 エンドセリン; EGFR; EIF4E; ERBB4; ERK1; fas; FRP1; GRO1; HB-EGF; HER2; IGF1R; IRS1; ITGA3; KRT17; LAMC2; MTA1; NMYC; P14ARF; PAI1; PDGFA; PDGFB; PGK1; PLAUR; PPARG; RANBP2; RASSF1; RIZ1; SPRY2; Src; TFRC; TP53BP1; UPA; および VEGFC

40

の R N A 転写物の一種以上もしくはその対応する遺伝子産物の、正規化された発現を上昇したと決定される患者を、有効量の E G F R インヒビターによって処置する工程を包含する方法に関する。ここで、 R N A 転写物レベルの増加は、規定の発現閾値によって規定さ

50

れる。

【 0 0 2 3 】

なお別の局面において、本発明は、EGFR発現性の頭部癌もしくは頸部癌と診断され、かつその癌において、

【 0 0 2 4 】

【 化 2 2 】

CD44 ; CD82; CGA; CTSL;

EGFRd27; IGFBP3; p27; P53; RB1; TIMP2; YB-1; A-カテニン; AKT1; AKT2; APC; Bax; B-カテニン; BTC; CCNA2; CCNE1; CCNE2; CD105; CD44v3; CD44v6; CD68; CEACAM6; Chk2; cMet; COX2; cripto; DCR3; DIABLO; DPYD; DR5; EDN1 エンドセリン; EGFR; EIF4E; ERBB4; ERK1; fas; FRP1; GRO1; HB-EGF; HER2; IGF1R; IRS1; ITGA3; KRT17; LAMC2; MTA1; NMYC; PAI1; PDGFA; PGK1; PTPD1; RANBP2; SPRY2; TP53BP1; VEGFC 遺伝子

10

のRNA転写物の一種以上もしくはその対応する遺伝子産物の、正規化された発現を上昇したと決定される患者を、有効量のEGFRインヒビターによって処置する工程を包含する方法に、関する。ここで、正規化されたRNA転写物レベルの上昇は、規定の発現閾値によって規定される。

【 0 0 2 5 】

さらなる局面において、本発明は、EGFR発現性の結腸癌と診断され、かつその癌において、

20

【 0 0 2 6 】

【 化 2 3 】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17; CCND3;

CCNE1; CCNE2; CD105; CD9; COX2; DIABLO; ErbB3; EREG; FRP1; GPC3; GUS; HER2; HGF; ID1; ITGB3; PTPD1; RPLPO; STK15; SURV; TERC; TGFBR2; TITF1; XIAP; CA9; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CDC25B; CGA; DR5; GRO1; KRT17; LAMC2; P14ARF; PDGFB; PLAUR; PPARG; RASSF1; RIZ1; Src; TFRC; UPA 遺伝子

30

のRNA転写物の一種以上かもしくはその対応する遺伝子産物の、正規化された発現を上昇したと決定される患者を、有効量のEGFRインヒビターによって処置する工程を包含する方法に、関する。ここで、正規化されたRNA転写物レベルの上昇は、規定の発現閾値によって規定される。

【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、(a)以下の遺伝子：

【 0 0 2 8 】

【 化 2 4 】

Bak; Bclx; BRAF; BRK; Cad17; CCND3; CD105; CD44s; CD82; CD9; CGA;;

CTSL; EGFRd27; ErbB3; EREG; GPC3; GUS; HGF; ID1; IGFBP3; ITGB3; ITGB3; p27; P53; PTPD1; RB1; RPLPO; STK15; SURV; TERC; TGFBR2; TIMP2; TITF1; XIAP; YB-1; A-カテニン; AKT1; AKT2; APC; Bax; B-カテニン; BTC; CA9; CCNA2; CCNE1; CCNE2; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CD68; CDC25B; CEACAM6; Chk2; cMet; COX2; cripto; DCR3; DIABLO; DPYD; DR5; EDN1 エンドセリン; EGFR; EIF4E; ERBB4; ERK1; fas; FRP1; GRO1; HB-EGF; HER2; IGF1R; IRS1; ITGA3; KRT17; LAMC2; MTA1; NMYC; P14ARF; PAI1; PDGFA; PDGFB; PGK1; PLAUR; PPARG; RANBP2; RASSF1; RIZ1; SPRY2; Src; TFRC; TP53BP1; UPA; VEGFC

40

50

に対してハイブリダイズされるポリヌクレオチドを含むアレイ；(b) 固体表面上に固定された、以下の遺伝子：CD44v3；CD44v6；GRO1；KRT17；およびLAMC2に対してハイブリダイズされるポリヌクレオチドを含むアレイ；(c) 固体表面上に固定された、以下の遺伝子：

【0029】

【化25】

CD44；

CD82；CGA；CTSL；EGFRd27；IGFBP3；p27；P53；RB1；TIMP2；YB-1；A-カテニン；AKT1；AKT2；APC；Bax；B-カテニン；BTC；CCNA2；CCNE1；CCNE2；CD105；CD44v3；CD44v6；CD68；CEACAM6；Chk2；cMet；COX2；cripto；DCR3；DIABLO；DPYD；DR5；EDN1 エンドセリン；EGFR；EIF4E；ERBB4；ERK1；fas；FRP1；GRO1；HB-EGF；HER2；IGF1R；IRS1；ITGA3；KRT17；LAMC2；MTA1；NMYC；PAI1；PDGFA；PGK1；PTPD1；RANBP2；SPRY2；TP53BP1；および VEGFC

10

に対してハイブリダイズされるポリヌクレオチドを含むアレイ；または(d) 固体表面上に固定化された、以下の遺伝子：

【0030】

【化26】

Bak；Bclx；BRAF；BRK；Cad17；CCND3；

CCNE1；CCNE2；CD105；CD9；COX2；DIABLO；ErbB3；EREG；FRP1；GPC3；GUS；HER2；HGF；ID1；ITGB3；PTPD1；RPLPO；STK15；SURV；TERC；TGFBR2；TITF1；XIAP；CA9；CD134；CD44E；CD44v3；CD44v6；CDC25B；CGA；DR5；GRO1；KRT17；LAMC2；P14ARF；PDGFB；PLAUR；PPARG；RASSF1；RIZ1；Src；TFRC；および UPA

20

に対してハイブリダイズされるポリヌクレオチドを含むアレイ、に関する。

【0031】

さらなる局面において、本発明は、固定され、パラフィン包埋された組織標本から、以下：

30

(a) この固定され、パラフィン包埋された組織標本を、約56～約70の温度で、溶解緩衝液中において、プロテアーゼ存在下で、予め脱蠟することなくインキュベートして、溶解溶液を作製する工程；

(b) 蠟が固化する温度まで、この溶解溶液を冷却する工程；および、

(c) この溶解溶液から核酸を単離する工程、を包含する手順によって、RNAが単離される方法に関する。

【0032】

異なる局面において、本発明は、本発明の遺伝子発現分析法を実施するのに適切な、(1) 抽出緩衝液/試薬、およびプロトコール；(2) 逆転写緩衝液/試薬、およびプロトコール；ならびに、(3) qPCR緩衝液/試薬、およびプロトコールの一つ以上を含むキットに関する。

40

【0033】

さらなる局面において、本発明は、表5Aおよび5Bに列挙されるアンプリコンならびに表6A-6Fに列挙される対応するプライマー-プローブセットを用いて、定量RT-PCR(qRT-PCR)反応によって、表5Aおよび5Bに列挙される遺伝子のmRNA産物のレベルを測定するための方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

50

(A. 定義)

他に定義されない場合、本明細書中において使用される技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版), J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、およびMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure (第4版), John Wiley & Sons (New York, NY 1992)は、当業者に、本出願に使用される用語に対する一般的な指針を提供する。

【0035】

当業者は、本明細書中において記載されるものと類似するかもしくは等価である多くの方法および材料（これらは、本発明の実施に使用され得る）を認識する。実際、本発明は、記載される方法および材料に決して限定されない。本発明の目的のため、以下の用語が、下記に規定される。

【0036】

用語「マイクロアレイ」とは、基材上における、ハイブリダイズ可能なアレイエレメント、好ましくはポリヌクレオチドプローブ、の規則正しい配列を指す。

【0037】

用語「ポリヌクレオチド」とは、単数もしくは複数で用いられる場合、一般的に、任意のポリリボヌクレオチドもしくはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。これらは、非改変のRNAもしくはDNA、または改変されたRNAもしくはDNAである。したがって、例えば、本明細書中に規定されるようなポリヌクレオチドとしては、一本鎖もしくは二本鎖DNA、一本鎖もしくは二本鎖領域を含むDNA、一本鎖もしくは二本鎖RNA、一本鎖もしくは二本鎖領域を含むRNA、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子（これらは、一本鎖であり得るか、またはより代表的に、二本鎖であり得るかもしくは一本鎖および二本鎖領域を含み得る）、が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。このような領域の鎖は、同じ分子に由来し得るかまたは異なる分子に由来し得る。この領域は、一以上の分子の全てを含み得るが、より代表的には、いくつかの分子の領域のみに関与する。三重らせん領域の分子の一つは、しばしばオリゴヌクレオチドである。用語「ポリヌクレオチド」とは、特にcDNAを含む。この用語は、一以上の改変された塩基を含むDNA（cDNAを含む）およびRNAを含む。したがって、安定性のためかもしくは他の理由のために改変された主鎖を有するDNAもしくはRNAは、本明細書中で意図される用語としての「ポリヌクレオチド」である。さらに、通常でない塩基（例えば、イノシン）、もしくは改変された塩基（例えば、トリチウム化された塩基）を含むDNAもしくはRNAは、本明細書中で規定されるような用語「ポリヌクレオチド」に含まれる。一般的に、用語「ポリヌクレオチド」は、未改変ポリヌクレオチドの、全ての化学的、酵素的および/または代謝的に改変された形態、ならびにウイルスおよび細胞（単純細胞および複雑細胞を含む）に特有の、DNAおよびRNAの化学的形態を包含する。

【0038】

用語「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短いポリヌクレオチド（単鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖もしくは二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド、および二本鎖DNAが挙げられるが、これらに限定されない）を指す。オリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチド）は、しばしば、化学的方法（例えば、市販の自動オリゴヌクレオチド合成装置）によって合成される。しかし、オリゴヌクレオチドは、種々の他の方法（インビトロ組み換えDNA介在性技術を含む）によって、および細胞および生体におけるDNAの発現によって行われ得る。

【0039】

用語「差次的に発現される遺伝子」、「差次的遺伝子発現」およびそれらの同義語は、

10

20

30

40

50

交換可能に使用されて、その発現が、疾患（特に癌、例えば、乳癌）に罹患する被験体において、正常もしくはコントロール被験体における発現に対してより高いかもしくはより低いレベルに活性化される遺伝子を指す。この用語はまた、その発現が、同じ疾患の異なる段階で、より高いかもしくはより低いレベルに活性化される遺伝子を含む。差次的に発現される遺伝子が、核酸レベルもしくはタンパク質レベルで、活性化されるかもしくは阻害されるかのいずれかであり得るか、または選択的スプライシングに供されて異なるポリヌクレオチド産物をもたらす得ることが、また理解される。このような差は、例えば、mRNAレベルの変化、ポリペプチドの表面発現、分泌もしくは他の分配によって証明され得る。差次的遺伝子発現は、2以上の遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物間での発現の比較、または二以上の遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物の発現の比率の比較、または、同じ遺伝子の、二種の差次的に処理された産物の比較（正常被験体と疾患（特に、癌）に罹患する被験体との間の差、もしくは同じ疾患の種々の段階の間）でさえも、含み得る。差次的発現としては、例えば、正常および疾患細胞の間か、または異なる疾患事象もしくは疾患段階を被っている細胞の間での、遺伝子またはその発現産物における、時間的または細胞の発現パターンの、量的および定性的な差が挙げられる。この発明の目的においては、正常および疾患被験体においてか、もしくは疾患被験体における疾患の進行の種々の段階において、所定の遺伝子の発現の間に、少なくとも約二倍、好ましくは少なくとも約4倍、より好ましくは少なくとも約6倍、最も好ましくは少なくとも約10倍の差が存在する場合、「差次的遺伝子発現」が存在するとみなされる。

10

【0040】

20

遺伝子転写物もしくは遺伝子発現産物に関する用語「正規化された」とは、基準遺伝子のセットの転写物/産物の平均レベルに対する転写物もしくは遺伝子発現産物のレベルを指す。ここで、基準遺伝子は、患者、組織、もしくは処置にわたるそれらの最小変動に基づいて選択される（「ハウスキーピング遺伝子」）か、または基準遺伝子は、試験された遺伝子の総計であるかのいずれかである。後者の場合、これは一般に「全体正規化（global normalization）」と呼ばれ、試験された遺伝子の総数が比較的大きいこと、好ましくは50より大きいことが、重要である。特に、RNA転写物に関する用語「正規化された」とは、基準遺伝子のセットの転写物レベルの平均に対する転写物のレベルを指す。より特別には、TaqMan（登録商標）RT-PCRによって測定されるようなRNA転写物の平均レベルとは、Ct値マイナス基準遺伝子転写物のセットの平均Ct値を指す。

30

【0041】

用語「発現閾値」および「規定された発現閾値」は、交換可能に使用されて、問題にされる遺伝子もしくは遺伝子産物のレベルを指し、この値以上では、遺伝子もしくは遺伝子産物は、薬物（この場合、EGFRインヒビター薬）に対する患者の反応もしくは抵抗性に関する予測マーカーとして働く。閾値は、以下の実施例1および2に記載されるような臨床研究から、実験的に規定される。発現閾値は、（例えば、薬物に対する全ての反応物を検出するための）最大感受性に関してか、または（例えば、薬物に対する唯一の反応物を検出するための）最大選択性に関してか、または最小誤差に関して選択され得る。

【0042】

40

用語「遺伝子増幅」とは、遺伝子もしくは遺伝子フラグメントの複数のコピーが、特定の細胞もしくは細胞株で形成されるプロセスを指す。複製領域（一続きの増幅されるDNA）は、しばしば、「アンプリコン」と呼ばれる。通常、生成されるメッセンジャーRNA（mRNA）の量（すなわち、遺伝子発現のレベル）はまた、発現される特定の遺伝子から作られるコピーの数に比例して増加する。

【0043】

用語「診断」は、分子のもしくは病理学的な状態（state）、疾患または状態（condition）を同定すること（例えば、頭部および頸部の癌、結腸癌、または他の型の癌の分子サブタイプの同定）を指すために、本明細書中で使用される。用語「予後判定」は、癌に起因する死もしくは新生物疾患（例えば、乳癌、もしくは頭部および頸部

50

の癌)の進行(再発、転移の広がり、および薬物抵抗性を含む)の尤度の予測を指すために、本明細書中で使用される。用語「予測」は、患者が、好適にかもしくは非好適にかのいずれかで、薬物もしくは薬物のセットに反応する尤度、そしてこれらの反応の程度、または原発性腫瘍の外科的除去および/もしくは化学療法に続いて、特定の期間、癌が再発することなく患者が生存する尤度を参照するために、本明細書中で使用される。本発明の予測法は、任意の特定の患者に対する最も適切な処置様式を選択することによって処置決定を行うために、臨床的に使用され得る。本発明の予測法は、患者が、処置レジメン(例えば、外科的介入、所定の薬物もしくは薬物の組み合わせによる化学療法、および/または放射線療法)に好適に反応する可能性があるかどうか、あるいは外科手術、および/または化学療法もしくは他の処置様式終了の後、患者の長期生存の可能性があるかどうかを予測する、有益な手段である。

10

【0044】

用語「長期生存」は、外科手術もしくは他の処置の後、少なくとも5年間、より好ましくは、少なくとも8年間、最も好ましくは、少なくとも10年間の生存を指すために、本明細書中で使用される。

【0045】

本発明に従って使用される場合、特定の薬物もしくは処置選択肢に対して「抵抗性が増大する」という用語は、標準用量の薬物または標準的処置プロトコールに対する反応が低下することを意味する。

【0046】

本発明に従って使用される場合、特定の薬物もしくは処置選択肢に対して「感受性が低下する」という用語は、標準用量の薬物または標準的処置プロトコールに対する反応が低下することを意味する。ここで、反応の低下は、薬物の用量または処置の強度を上昇させることによって(少なくとも部分的に)補償され得る。

20

【0047】

「患者の反応」は、患者に対する利点を示す任意の指標を用いて評価され得る。これらの指標としては、以下:(1)ある程度の、腫瘍増殖の阻害(増殖の鈍化および増殖の完全な停止を含む);(2)腫瘍細胞数の減少;(3)腫瘍の大きさの減少;(4)近接する末梢器官および/もしくは末梢組織への腫瘍細胞の浸潤の阻害(すなわち、減少、鈍化、もしくは完全な停止);(5)転移の阻害(すなわち、減少、鈍化、もしくは完全な停止);(6)抗腫瘍免疫応答の増強(腫瘍の退行もしくは排除が起こり得るが、必ずしもその必要はない);(7)腫瘍に関連する一以上の症状の、ある程度の軽減;(8)処置後の生存期間の延長;ならびに/または(9)処置後の所定の時点での死亡率の減少、が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0048】

用語「処置」とは、治療処置と予防的(prophylactic)もしくは予防的(preventative)措置との両方を指す。その目的は、標的される病的状態もしくは障害を、予防または低下(より軽く)させることである。処置の必要な人々としては、既にその障害を有する人々、およびその障害を有し易い人々またはその障害を予防されるべき人々が挙げられる。腫瘍(例えば、癌)の処置において、治療剤は、腫瘍細胞の病原性を直接的に減少し得るか、または腫瘍細胞を、他の治療剤による処置(例えば、放射線および/または化学療法)に対してより感受性にする。

40

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「腫瘍」とは、新生物細胞の成長および増殖の全て(悪性もしくは良性)、ならびに前癌性および癌性の細胞および組織の全てを指す。

【0050】

用語「癌」および「癌性」とは、代表的に、無秩序な細増増殖によって特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態を指すか、または説明する。癌の例としては、乳癌、結腸癌、肺がん、前立腺癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、甲状腺癌、腎臓癌、癌腫、黒色腫、頭部および頸部の癌、そして脳の癌が挙げられる

50

が、これらに限定されない。

【0051】

癌の「病態」としては、患者の健康を損ねる全ての現象が挙げられる。この病態としては、異常な、もしくは制御できない細胞増殖、転移、近接する細胞の正常機能の妨害、異常なレベルでのサイトカインもしくは他の分泌性産物の放出、炎症性反応もしくは免疫応答の抑制もしくは悪化、新生物形成、前癌状態、悪性腫瘍、周辺もしくは離れた組織もしくは器官（例えば、リンパ節など）への浸潤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0052】

本明細書中で使用される場合、用語「EGFRインヒビター」とは、ネイティブな上皮細胞成長因子（EGFR）の生物学的機能を阻害する能力を有する分子を指す。したがって、用語「インヒビター」は、EGFRの生物学的役割に関して定義される。本明細書における好ましいインヒビターは、EGFRと特異的に相互作用（例えば、結合）するが、EGFRシグナル伝達経路の他のメンバーと相互作用することによってEGFRの生物学的活性を阻害する分子もまた、特別にこの定義に含まれる。EGFRインヒビターによって阻害される好ましいEGFRの生物学的活性は、腫瘍の発生、増殖または伝播に関連する。

10

【0053】

用語「ハウスキーピング遺伝子」とは、その活性が細胞機能の維持に必須であるタンパク質をコードする遺伝子群である。これらの遺伝子は、代表的に、全ての細胞型で同様に発現される。ハウスキーピング遺伝子としては、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、Cyp1、アルブミン、アクチン（例えば、 α -アクチン）、チューブリン、シクロフィリン、ヒポキサンチン（hypoxanthine）、ホスホリボシルトランスフェラーゼ（phosphoribosyltransferase）（HRPT）、L32、28S、および18Sが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0054】

（B．詳細説明）

本発明の実行は、他に示されない限り、（組み換え技術を含む）分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学の従来技術を利用する。これらの技術は、当該分野の技術の範囲内である。このような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、以下である：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 第2版（Sambrookら、1989）；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait (編)、1984)；「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney (編)、1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Handbook of Experimental Immunology」, 第4版(D. M. Weir & C. C. Blackwell (編)、Blackwell Science Inc., 1987)；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(J. M. Miller & M. P. Calos (編)、1987)；「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubelら(編)、1987)；および「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullisら(編)、1994)。

30

40

【0055】

（1．遺伝子発現プロファイリング）

一般的に、遺伝子発現プロファイリングの方法は、二つの大きな群に分けられ得る：ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づく方法およびポリヌクレオチドの配列決定に基づく方法である。最も一般に使用される、サンプル中のmRNA発現の定量のための当該分野で公知の方法としては、ノーザンブロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーション(Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283 (1999))；RNAse保護ア

50

ッセイ (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)); および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) (Weisら, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)) が挙げられる。あるいは、特定の二重鎖 (DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖もしくはDNA-タンパク質二重鎖を含む) を認識し得る抗体が利用され得る。配列決定ベースの遺伝子発現分析の代表的な方法としては、遺伝子発現連続分析 (Serial Analysis of Gene Expression; SAGE)、および超並列配列情報決定 (massively parallel signature sequencing; MPSS) による遺伝子発現分析が挙げられる。

【0056】

(2. 逆転写酵素PCR (RT-PCR))

上記に列挙された技術のうち、最も感受性が高くかつ最も柔軟性のある定量法は、RT-PCRである。この方法は、異なるサンプル集団において、正常および腫瘍組織において、薬物処置の有無による、mRNAレベルの比較に使用されて、遺伝子発現のパターンを特徴付け得、近縁関係にあるmRNAを区別し得、そしてRNAの構造を分析し得る。

【0057】

第一の工程は、標的組織からのmRNAの単離である。この開始材料は、代表的に、ヒト腫瘍もしくは腫瘍細胞株およびそれらに対応する正常組織および細胞株からそれぞれ単離された、全RNAである。したがって、RNAは、乳、肺、結腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、甲状腺、精巣、卵巣、子宮、頭部および頸部等を含む種々の原発性腫瘍、腫瘍または腫瘍細胞株から、健康なドナー由来のプールされたDNAとともに単離され得る。mRNAの供給源が、原発性腫瘍である場合、mRNAは、例えば、凍結組織サンプルからか、またはパラフィン包埋されて固定された (例えば、ホルマリン固定された)、保管組織サンプルから抽出され得る。

【0058】

mRNA抽出のための一般的な方法は、当該分野で周知であり、分子生物学の標準的な教科書 (Ausubelら, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997) が挙げられる) に開示される。パラフィン包埋された組織からのRNA抽出法は、例えば、RuppおよびLocker, *Lab Invest.* 56:A67 (1987)、ならびに De Andresら, *Biotechniques* 18:42044 (1995) に開示される。特に、RNA単離は、製造企業 (例えば、キアゲン) からの精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを用いて、製造者の指示書に従って行われ得る。例えば、培養細胞からの全RNAは、Qiagen RNeasy ミニ-カラムを用いて単離され得る。他の市販のRNA単離キットとしては、MasterPureTM Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE (登録商標), Madison, WI)、および Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.) が挙げられる。組織サンプルからの全RNAは、RNA Stat-60 (Tel-Test) を用いて単離され得る。腫瘍から調製されたRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心法によって単離され得る。

【0059】

RNAはPCRの鋳型として働き得ないため、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングの第一の工程は、RNA鋳型のcDNAへの逆転写と、それに続くPCR反応におけるその指数関数的増幅である。二つの最も一般的に使用される逆転写酵素は、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV-RT) およびモロニーマウス白血球ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT) である。逆転写工程は、発現プロファイリングの環境および目的に依存して、代表的に、特異的プライマー、ランダムヘキサマーまたはオリゴdTプライマーを用いて準備する。例えば、抽出されたRNAは、GeneAmp RNA PCRキット (Perkin Elmer, CA, USA) を用いて、製造者の指示書に従っ

10

20

30

40

50

て逆転写され得る。次いで、得られたcDNAは、その後のPCR反応において鋳型として使用され得る。

【0060】

PCR工程は、種々の熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼを使用し得るが、代表的に、Taq DNAポリメラーゼを使用する。この酵素は、5' - 3'ヌクレアーゼ活性を有するが、3' - 5'ブルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠く。したがって、TaqMan（登録商標）PCRは、代表的に、TaqポリメラーゼもしくはTthポリメラーゼの5' - 3'ヌクレアーゼ活性を利用して、その標的アンプリコンに結合するハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、等価な5'ヌクレアーゼ活性を有するあらゆる酵素は使用され得ない。二つのオリゴヌクレオチドプライマーが、PCR反応に特有のアンプリコンを生成するために使用される。二つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するため、第三のオリゴヌクレオチドもしくはプローブが設計される。このプローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長されず、そしてレポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素によって標識される。レポーター色素からのあらゆるレーザー誘起放射は、二つの色素が、プローブ上にある場合のように共に近接して位置する場合、クエンチング色素によってクエンチされる。増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、鋳型依存性様式でプローブを切断する。得られたプローブフラグメントは、溶液中に解離して、放出されたレポーター色素からのシグナルは、第二のフルオロフォアのクエンチング作用から解放される。レポーター色素の一分子は、各々の新しい合成された分子ごとに遊離される。クエンチされないレポーター色素の検出は、データの定量的解釈の基礎を提供する。

【0061】

TaqMan（登録商標）RT-PCRは、市販の機器、例えば、ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM（Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）またはLightcycler（Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany）、などを用いて行われ得る。好ましい実施形態において、5'ヌクレアーゼ処理は、リアルタイム定量PCRデバイス上（例えば、ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM）で実行される。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子（CCD）、カメラおよびコンピュータから構成される。このシステムは、サーモサイクラー上で、96ウェル形式でサンプルを増幅する。増幅の間、レーザー誘起放射シグナルは、96ウェルすべてに関して、リアルタイムで光ファイバーケーブルを通じて集められ、そしてCCDで検出される。このシステムは、装置を作動させるため、およびデータを解析するためのソフトウェアを備える。

【0062】

5' - 3'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初にCtまたは閾値サイクルとして表される。上記で考察されるように、蛍光値は、各サイクルの間に記録され、増幅反応におけるその時点での増幅産物の量を表す。蛍光シグナルが最初に統計的に有意であるとして記録された時点が、閾値サイクル（Ct）である。

【0063】

誤差およびサンプル間の変動の効果を最小化するため、RT-PCRは、通常、内部標準を用いて実行される。理想的内部標準は、種々の組織の間で一定のレベルで発現され、外部処理によって影響されない。遺伝子発現パターンを正規化するために最も頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）およびβ-アクトチンのmRNAである。

【0064】

RT-PCR技術のより最近の変形は、リアルタイム定量PCRである。この技術は、二重標識蛍光性（fluorogenic）プローブ（すなわち、TaqMan（登録商標）プローブ）を通じて、PCR産物の蓄積を測定する。リアルタイムPCRは、定量競

10

20

30

40

50

合PCR（各標的配列に対する内部競合物を正規化のために使用する）と定量比較PCR（サンプル内に含まれる正規化用（normalizing）遺伝子もしくはRT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を用いる）との両方に適合する。さらなる詳細については、例えば、Heldら、Genome Research 6:986-994（1996）を参照のこと。

【0065】

本発明の一つの局面に従って、PCRプライマーおよびプローブは、増幅されるべき遺伝子中に存在するイントロン配列に基づいて設計される。この実施形態において、プライマー/プローブ設計における第一の工程は、遺伝子内でイントロン配列を描写することである。これは、Kent, W. J., Genome Res. 12(4):656-64（2002）によって開発されたDNA BLATのような公共で利用可能なソフトウェアによってかまたはBLASTソフトウェア（その変形を含む）によって行われ得る。その後の工程は、よく確立されたPCRプライマーおよびプローブ設計法に従う。

10

【0066】

非特異的シグナルを避けるため、プライマーおよびプローブを設計する際、イントロン内の反復配列をマスクすることが重要である。これは、Baylor College of Medicineを通じてオンラインで利用可能なRepeat Maskerプログラムを用いることによって、容易に達成され得る。このプログラムは、反復エレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、反復エレメントがマスクされる問題の配列を返す。次いで、マスクされるイントロン配列は、市販の、もしくは公共で利用可能なプライマー/プローブ設計パッケージ（例えば、Primer Express（Applied Biosystems）；MGB assay-by-design（Applied Biosystems）；Primer3（Steve RozenおよびHelen J. Skaletsky（2000）, Primer3（一般使用者および生物学者プログラマー用にWWW上にある）；Krawetz S, Misener S（編）Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp365-386））を用いて、プライマーおよびプローブを設計するために使用される。

20

【0067】

PCRプライマー設計において最も重要な因子としては、プライマー長、融解温度（ T_m ）、およびG/C含量（特に相補的プライマー配列および3'-末端配列）が挙げられる。一般に、最適なPCRプライマーは、一般的に17~30塩基長であり、約20%~約80%（例えば、約50%~約60%）のG+C塩基を含む。50~80の間の T_m （例えば、約50~70）が、代表的に好ましい。

30

【0068】

PCRプライマーおよびプローブの設計のためのさらなる指針に関しては、例えば、Dieffenbach, C. W.ら、「General Concepts for PCR Primer Design」: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; InnisおよびGelfand、「Optimization of PCRs」: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; ならびにPlasterer, T. N. Primers select: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520-527（1997）、を参照のこと。これらの開示の全ては、本明細書によって、明確に参考として援用される。

40

【0069】

（3. マイクロアレイ）

差次的遺伝子発現はまた、マイクロアレイ技術を用いて同定され得るかまたは確認され

50

得る。したがって、乳癌関連遺伝子の発現プロファイリングは、マイクロアレイ技術を用いて、新鮮腫瘍組織もしくはパラフィン包埋された腫瘍組織のいずれかにおいて測定され得る。この方法では、目的のポリヌクレオチド配列（cDNAおよびオリゴヌクレオチドを含む）は、マイクロチップ基材上に平板化されるか、またはアレイ化される。次いで、アレイ化された配列は、目的の細胞もしくは組織由来の特異的DNAプローブにハイブリダイズされる。RT-PCR法と同じく、mRNAの供給源は、代表的に、ヒト腫瘍もしくは腫瘍細胞株、およびそれらに対応する正常組織もしくは細胞株から単離された、全RNAである。したがって、RNAは、種々の原発性腫瘍もしくは腫瘍細胞株から単離され得る。mRNAの供給源が、原発性腫瘍である場合、mRNAは、例えば、毎日の臨床業務において慣習的に調製されて保存される、凍結組織サンプルからか、またはパラフィン包埋され、固定された（例えば、ホルマリン固定された）保管組織サンプルから抽出され得る。

10

【0070】

マイクロアレイ技術の特別な実施例において、cDNAクローンのPCR増幅されたインサートは、高密度アレイにおける基材に適用される。好ましくは、少なくとも10,000ヌクレオチド配列が、その基材に適用される。マイクロチップ上に各々10,000エレメントが固定化されるマイクロアレイ化された遺伝子は、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションに適する。蛍光標識されたcDNAプローブは、目的の組織から抽出されたRNAの逆転写による蛍光ヌクレオチドの取り込みを通じて作製され得る。チップに適用される標識されたcDNAプローブは、アレイ上の各DNAスポットに、特異的にハイブリダイズする。非特異的に結合したプローブを除去するためのストリンジェントな洗浄の後、このチップは、共焦点レーザー顕微鏡によってか、またはCCDカメラのような別の検出法によって走査される。各アレイ化されたエレメントのハイブリダイゼーションの定量化は、対応するmRNAの存在量を評価することを可能にする。二つのRNA供給源から作製されて、二色の蛍光を用いて別々に標識されたcDNAプローブは、一組になってアレイにハイブリダイズする。各特定された遺伝子に対応する二つの供給源由来の転写物の相対存在量は、同時に決定される。ハイブリダイゼーションの小規模化は、多数の遺伝子に関する発現パターンの簡易かつ迅速な評価をもたらす。このような方法が、細胞当たり数コピーで発現する数の少ない転写物の検出に要求される感度を有すること、および少なくとも約二倍の発現レベルの差を、再現性をもって検出することが示された（Schenara, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2): 106-149 (1996)）。マイクロアレイ分析は、市販の機器によって、製造者のプロトコールにしたがって実行され得る。例えば、AffymetrixのGenChip技術、またはIncyteのマイクロアレイ技術を用いることによって、実行され得る。

20

30

【0071】

遺伝子発現の大規模分析のためのマイクロアレイ法の開発は、癌分類の分子マーカーについての系統的な検索、および種々の癌の型における結果の予測を可能にする。

【0072】

(4. 遺伝子発現連続分析(SAGE))

遺伝子発現連続分析(SAGE)は、各転写物に対する個々のハイブリダイゼーションプローブを提供する必要なしに、多数の遺伝子転写物の同時かつ定量的な分析を可能にする。第一に、短い配列タグ(約10~14bp)が作製され、このタグは各転写物の独特な位置から得られる場合、転写物を一意的に同定するに十分な情報を含む。次いで、多くの転写物は、一緒に連結されて長い連続的分子を形成する。この分子は、配列決定され複数のタグの独自性(identity)を同時に示し得る。任意の転写物集団の発現パターンは、個々のタグの存在量を決定することによって、かつ各タグに対応する遺伝子を同定することによって、定量的に評価され得る。さらなる詳細は、例えば、Velculescuら、Science 270: 484-487(1995);およびVelculescuら、Cell 88: 243-51(1997)を参照のこと。

40

50

【 0 0 7 3 】

(5 . M a s s A R R A Y 技術)

M a s s A R R A Y (S e q u e n o m , S a n D i e g o , C a l i f o r n i a) 技術は、検出に質量分析計 (M S) を用いた、自動化されたハイスループットな遺伝子発現分析法である。この方法により、RNAの単離、逆転写およびPCR増幅に続いて、cDNAは、プライマー伸長に供される。cDNA由来のプライマー伸長産物は、精製され、MALTI - T O F M Sサンプル調製に必要な成分が予めローディングされたチップアレイ上に分配 (d i p e n s e) される。反応物中に存在する種々のcDNAは、得られた質量スペクトルのピーク領域を分析することによって定量化される。

【 0 0 7 4 】

(6 . 超並列配列情報決定 (M P S S) による遺伝子発現分析)

この方法 (B r e n n e r ら、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 8 : 6 3 0 - 6 3 4 (2 0 0 0) によって記載される) は、非ゲルベースの配列情報決定 (s i g n a t u r e s e q u e n c i n g) と個々の直径 $5 \mu\text{m}$ のマイクロビーズ上での数百万の鑄型のインビトロクロニングとを組み合わせた配列決定アプローチである。第一に、DNA鑄型のマイクロビーズライブラリが、インビトロクロニングによって構築される。続いて、フローセル中において、高密度で、鑄型を含むマイクロビーズの平面状アレイが組み立てられる (代表的に 3×10^6 マイクロビーズ / cm^2) 。各マイクロビーズ上のクローン化された鑄型の遊離端は、DNAフラグメントの分離を必要としない蛍光ベースの配列情報決定法を用いて、同時に分析される。この方法が、同時かつ正確に、一度の操作で、酵母DNAライブラリーから数十万の遺伝子の配列情報を提供することが示された。

【 0 0 7 5 】

(7 . 免疫組織化学)

免疫組織化学法もまた、本発明の病原マーカーの発現レベルの検出に適する。したがって、抗体もしくは抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、そして最も好ましくは各マーカーに特異的なモノクローナル抗体が、発現を検出するために使用される。抗体は、抗体自身の直接標識 (例えば、放射性標識、蛍光標識、ビオチンのようなハプテン標識、または西洋わさびペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼのような酵素) によって検出され得る。あるいは、非標識一次抗体が、標識二次抗体 (抗血清、ポリクローナル抗血清もしくは一次抗体に特異的なモノクローナル抗体) とともに使用される。免疫組織化学プロトコールおよびキットは、当該分野で周知であり、市販されている。

【 0 0 7 6 】

(8 . プロテオミクス)

用語「プロテオーム」は、ある時点でサンプル (例えば、組織、生体、もしくは細胞培養物) 中に存在するタンパク質全体として定義される。プロテオミクスとしては、とりわけ、サンプル中のタンパク質発現の全体的変化の研究が挙げられる (これはまた、発現プロテオミクスとも称される) 。プロテオミクスは、代表的に、以下の工程を包含する : (1) 2次元ゲル電気泳動によるサンプル中の個々のタンパク質の分離 (2 - D P A G E) ; (2) ゲルから回収された個々のタンパク質の同定 (例えば、質量分析もしくはN末端配列決定) 、および (3) バイオインフォマティクスを用いたデータ分析。プロテオミクス法は、他の遺伝子発現プロファイリング法の補完に役立ち、単独および他の方法と組み合わせ使用されて、本発明の病原マーカーの産生を検出し得る。

【 0 0 7 7 】

(9 . 保管組織標本からの核酸の単離に関する改良法)

本発明の方法の第一工程では、全RNAが、目的の供給源材料 (固定され、パラフィン包埋された標本を含む) から抽出され、酵素アッセイにおける基質として作用するに十分に精製される。全RNAの抽出は、当該分野で公知の任意の方法で行われ得る一方、特定の実施形態においては、本発明は、保管された (例えば、固定パラフィン包埋組織 (F P E T)) 標本からの核酸の単離のための改良法に頼る。

10

20

30

40

50

【0078】

mRNA種の測定レベルは、細胞および組織の生理学的もしくは病理学的状態を規定するために有用である。RT-PCR(上記で考察)は、この「遺伝子発現プロファイリング」のための、最も感度の高い、再現性のある、定量法の一つである。パラフィン包埋され、ホルマリン固定された組織は、このような研究のために最も広範に利用可能な材料である。いくつかの研究室は、固定パラフィン包埋組織(FPET)をRT-PCRのためのRNAの供給源としてうまく使用することが可能であることを示した(Stantaら、Biotechniques 11:304-308(1991);Stantaら、Methods Mol.Biol. 86:23-26(1998);Jacksonら、Lancet 1:1391(1989);Jacksonら、J.Clin.Pathol. 43:499-504(1999);Finkeら、Biotechniques 14:448-453(1993);Goldsworthyら、Mol.Carcinog 25:86-91(1999);StantaおよびBonin、Biotechniques 24:271-276(1998);Godfreyら、J.Mol.Diagnos 2:84(2000);Spechtら、J.Mol.Med. 78:B27(2000);Spechtら、Am.J.Pathol. 158:419-429(2001)。このことは、遺伝子発現プロファイリングが、最も一般的に利用可能なヒト生検標本の供給源で実行されること、したがって新しい価値ある診断情報および治療情報をもたらす得ることを可能にする。

10

【0079】

最も広範に使用されるプロトコルは、核酸(RNAおよび/もしくはDNA)抽出前に、パラフィンブロック中の組織を脱蠟するため、有害な有機溶媒、例えば、キシレン、もしくはオクタン(Finkeら、上記)を用いる。不可避的な有機溶媒除去工程(例えば、エタノールを用いる)および再水和工程が続くが、これは、複数の操作、およびプロトコルの実質的全時間の追加(数日までに及び得る)を必要とする。FPETからのRNA抽出のための市販のキットおよびプロトコル[MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit(EPICENTRE(登録商標),Madison,WI);Paraffin Block RNA Isolation Kit(Ambion,Inc.)およびRNeasy Mini kit(Qiagen,Chatsworth,CA)]は、脱パラフィン化にキシレンを使用する。この手順では、代表的に、キシレンによるインキュベーションに続いて、複数回の遠心分離およびエタノール緩衝液の交換、およびインキュベーションを必要とする。

20

30

【0080】

本発明で使用され得る方法は、遺伝子発現測定のために十分にインタクトな核酸、特にRNAを提供する、改良された核酸抽出プロトコルを提供する。この改良された核酸抽出プロトコルにおける重要な工程は、何らかの有機溶媒を使用しない脱蠟の実行である。これによって、有機溶媒の除去に関わる複数の操作の必要性がなくなり、プロトコルの全時間が実質的に減少する。改良法によると、蠟(例えば、パラフィン)は、組織を溶解させかつタンパク質を水和させる溶解緩衝液中で65~75でインキュベーションし、続いて冷却して蠟を凝固させることによって、蠟に包埋された組織サンプルから除去される。

40

【0081】

図2は、蠟を除去するためにキシレンを用いる代表的な市販品の方法と比較した、本明細書中で使用される改良された核酸抽出プロトコルのフローチャートである。これらのプロセスにおける個々の工程およびプロセス全体に必要な時間が図表に示される。示されるように、市販のプロセスは、本発明の方法を実行するのに使用される改良プロセスよりも、約50%多くの時間を必要とする。

【0082】

溶解緩衝液は、細胞溶解に関して公知の任意の緩衝液であり得る。しかし、本発明にお

50

いて、ポリアデニル化 mRNA を選択的に精製するオリゴ d T ベースの方法は、RNA を単離するために使用されないのが好ましい、なぜなら、mRNA 分子の大部分がフラグメント化されることが予測され、したがってインタクトなポリアデニル化末端を有さず、その後の分析アッセイのために回収されないかもしくは利用され得ないからである。他方、多くの標準的核酸精製スキームが使用され得る。これらとしては、カオトロープ (chaotrope) 抽出および有機溶媒抽出、ガラスビーズもしくはフィルターを用いた抽出、塩析および沈殿ベースの方法、または生物学的供給源から全 RNA もしくは全核酸を回収するための、当該分野で公知の任意の方法が挙げられる。

【0083】

溶解緩衝液は、例えば、Qiagen、Epicentre、もしくはAmbionから市販されている。好ましい溶解緩衝液の群は、代表的に、尿素、プロテイナーゼ K、もしくは他のプロテアーゼを含む。プロテイナーゼ K は、高品質の損傷のない DNA もしくは RNA の単離に非常に有用である。なぜなら、ほとんどの哺乳動物 DNase および RNase は、この酵素で、特に 0.5% ~ 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の存在下で、迅速に不活性化されるからである。これは、DNA よりも分解に感受性の高い RNA の場合に、特に重要である。DNase が、活性に金属イオンを必要とし、ゆえに EDTA のようなキレート剤によって容易に不活性化され得る一方、RNase には、同様の補助因子が存在しない。

【0084】

蠟の冷却と結果として起こる凝固は、全核酸からの蠟の分離を容易し、核酸は、例えばイソプロパノールによって、都合よく沈殿され得る。さらなる処理は、意図された目的に依存する。RNA 分析の提唱された方法が、抽出物中で DNA の汚染によって偏向される場合、この RNA 抽出物は、精製後、特異的に DNA を除去し一方で RNA を保存するために、例えば DNase によって、さらに処理され得る。例えば、目的が、その後の RT-PCR 増幅のための高品質の RNA を単離することである場合、核酸沈殿に続いて、DNA が、通常 DNase 処理によって、除去される。しかし、DNA は、核酸単離の種々の段階で、DNase もしくは当該分野で公知の他の技術によって除去され得る。

【0085】

上記で考察された改良された核酸抽出の利点が、保管された、パラフィン包埋された組織サンプルからの RNA 単離に関して最も明白である一方、有機溶媒の使用を包含しない本発明の蠟除去工程は、全核酸 (DNA および RNA) もしくは DNA のみの抽出のための任意の従来のプロトコールにも含まれ得る。

【0086】

加熱を用い、続いて冷却してパラフィンを除去することによって、この改良プロセスは、貴重な処理時間を節約し、かつ一連の操作をなくし、これらによって核酸の収量を増加させ得る。

【0087】

(10. 逆転写の 5' - 多重化遺伝子特異的プライミング)

RT-PCR は、第一の工程として、試験 RNA 集団の逆転写を必要とする。最も一般的に使用される逆転写用のプライマーは、オリゴ d T であり、これは RNA がインタクトである場合によく機能する。しかしこのプライマーは、FPE 組織での場合のように RNA が高度にフラグメント化される場合には、有効ではない。

【0088】

本発明は、遺伝子特異的プライマーの使用を包含する。このプライマーは、長さおよそ 20 塩基であり、約 58 と約 60 との間の最適 Tm を有する。これらのプライマーはまた、PCR の DNA 増幅を駆動する逆プライマーとして働く。

【0089】

代替のアプローチは、cDNA 合成のためのプライマーとしてのランダムヘキサマーの使用に基づく。しかし、発明者らは、遺伝子特異的プライマーの多重度を用いる方法が、ランダムヘキサマーを用いる公知のアプローチよりも優れていることを実験的に示した。

【 0 0 9 0 】

(1 1 . 正規化の方針)

本発明の重要な局面は、EGFR発現性の癌組織によるある遺伝子の発現の測定を使用して、患者がEGFRインヒビターによる処置に反応する可能性についての情報を提供することである。この目的のために、アッセイされたRNAの量の差および使用されたRNAの質の変動性を補正（正規化）することが必要である。したがって、アッセイは、代表的に、公知のハウスキーピング遺伝子（例えば、GAPDHおよびCyp1）を含む特定の正規化用遺伝子の発現を測定して、取り込む。あるいは、または加えて、正規化は、全てのアッセイされた遺伝子もしくはそれらの大部分の平均値または中央値（RT-PCRの場合、Ct）に基づき得る（全体正規化アプローチ）。遺伝子ごとの基準においては、測定され、正規化された患者の腫瘍mRNAの量は、同じ型の癌組織（例えば、頭部および頸部の癌、結腸癌など）の基準セットで見出される量と比較される。この基準セットの癌組織の数（N）は、異なる基準セットが、（全体として）確実に本質的に同じように挙動するよう十分に大きくあるべきである。この条件が満たされる場合、特定のセットに存在する個々の癌組織の独自性は、アッセイされた遺伝子の相対量に優位な影響を及ぼさない。通常、癌組織の基準セットは、少なくとも約30、好ましくは少なくとも約40の異なるFPE癌組織標本からなる。他に記述されない限り、各mRNA / 試験された腫瘍 / 患者についての正規化された発現レベルは、基準セットで測定された発現レベルのパーセンテージとして表現される。より具体的には、十分に大きな数（例えば、40）の腫瘍の基準セットは、各mRNA標本の正規化されたレベルの分布を生じる。分析されるべき特定の腫瘍サンプルで測定されたレベルは、この範囲のあるパーセンタイル（当該分野で公知の方法で決定され得る）に入る。これ以降、常に明示されるわけではないが、他に記述されない限り、遺伝子の発現レベルへの言及は、基準セットに対して正規化された発現とする。

10

20

【 0 0 9 1 】

(1 2 . EGFRインヒビター)

上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）ファミリー（EGFR、erb-B2、erb-B3およびerb-B4を含む）は、上皮性悪性腫瘍においてしばしば活性化される成長因子レセプターのファミリーである。したがって、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）は、いくつかの腫瘍型（例えば、卵巣癌、膵臓癌、非小細胞性肺癌、乳癌、結腸癌、ならびに頭部および頸部の癌を含む）において活性化されることが公知である。いくつかのEGFRインヒビター（例えば、ZD1839（ゲフィチニブ（gefitinib））またはイレッサとしても公知である）；およびOSI774（エルロチニブ（Erlotinib））、TarcevaTM）は、EGFR発現性の癌の処置のための有望な薬物候補である。

30

【 0 0 9 2 】

イレッサ、低分子量合成キナゾリンは、EGFRのATP結合部位、成長促進レセプターチロシンキナーゼを競合的に阻害し、非小細胞性肺癌の処置のための第III相臨床試験をされている。別のEGFRインヒビター、[agr]シアノ-[bgr]メチル-N-[（トリフルオロメトキシ）フェニル]-プロペンアミド（LFM-A12）は、EGFR陽性ヒト乳癌細胞の増殖および侵襲性を阻害することを示された。

40

【 0 0 9 3 】

セツキシマブ（Cetuximab）は、EGFRおよびEGFR-依存性細胞増殖をブロックするモノクローナル抗体である。これは、現在、治験の第III相で試験されている。

【 0 0 9 4 】

TarcevaTMは、進行性卵巣癌、ならびに非小細胞性肺癌ならびに頭部および頸部の癌を有する患者において、抗癌活性の有望な効能を示した。

【 0 0 9 5 】

本発明は、EGFR陽性腫瘍が、EGFRインヒビターによる処置に反応する可能性が

50

あるかどうかを予測するための価値のある手段を提供する。

【0096】

最近の刊行物は、胃腸（例えば、結腸）の癌におけるEGFRの関与、およびその発現と低い生存率との関連性をさらに確認する。例えば、Khoranara、Proc. Am. Soc. Clin. Oncol 22: 317 (2003)を参照のこと。

【0097】

列挙したEGFRインヒビターの例は低分子量有機分子であるが、本発明の知見は、他のEGFRインヒビター（抗EGFR抗体、アンチセンス分子、低分子ペプチドなどを含むが、限定ではない）に同様に適用可能である。

【0098】

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定的な実施例から明らかになる。

【実施例】

【0099】

（実施例1）

（頭部および頸部の腫瘍における遺伝子発現の第II相研究）

EGFRインヒビターによる処置に反応したかあるいは反応しなかった頭部癌および頸部癌の患者の、パラフィン包埋され、固定された組織サンプルにおける遺伝子発現を分子的に特徴付けることを主な目的として、遺伝子発現研究を計画し、実施した。結果は、5種類の異なるEGFRインヒビター薬の使用に基づく。

【0100】

研究計画

頭部癌および頸部癌と診断された14人の患者から得られた、パラフィン包埋されてホルマリン固定された頭部および頸部腫瘍組織において、分子アッセイを行った。適切な腫瘍組織の量を示した材料および方法の章に記載されるような組織病理学的評価を実施した場合のみ、患者を研究に含めた

（材料および方法）

各代表的な腫瘍ブロックを、標準的組織病理学によって、診断、組織の量の半定量的評価、および腫瘍の類別に関して特徴付けた。全部で6切片（各10ミクロン厚）を調製し、Costar Brand Microcentrifuge Tube（ポリプロピレン、1.7mLチューブ、透明；各チューブに3切片）に配置した。腫瘍が、全標本領域の30%未満を構成する場合、そのサンプルを、全体的な顕微解剖によって、病理学者がおおまかに切断し、その腫瘍組織をCostarチューブに直接投入した。

【0101】

外科的手技の一部として一つより多くの腫瘍ブロックを得た場合、全ての腫瘍ブロックを、上記の記載と同じ特徴付けに供し、病理を最も代表するブロックを分析に用いた。

【0102】

（遺伝子発現分析）

固定され、パラフィン包埋された組織サンプルからmRNAを抽出し、精製して、上記のように遺伝子発現分析のために調製した。

【0103】

定量的遺伝子発現の分子アッセイを、ABI PRISM 7900TM Sequence Detection System (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、RT-PCRによって行った。ABI PRISM 7900TMは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)、カメラおよびコンピュータから構成される。このシステムは、サーモサイクラー上で、384ウェル形式でサンプルを増幅する。増幅の間、レーザー誘起蛍光シグナルを、384ウェル全てについて、光ファイバーケーブルを通じてリアルタイムで集め、CCDカメラで検出する。このシステムは、装置の実行およびデータ分析のためのソフトウェアを備える。

【0104】

10

20

30

40

50

(分析および結果)

185個の癌関連遺伝子および7個の基準遺伝子について腫瘍組織を分析した。各患者についての閾値サイクル(Ct)値を、特定の患者に関する全ての遺伝子の平均に基づいて正規化した。臨床結果データは、全患者で利用可能であった。

【0105】

結果を、反応性もしくは無反応性のいずれかとして分類した。この結果を、二つの異なる基準(部分反応、臨床的利益)を用いて、2つの異なる方法で反応に関して分析した。後者の基準は、部分反応もしくは完全反応を安定疾患(最低3ヶ月)と組み合わせる。この研究では、完全反応はなく、部分反応の四つの症例および疾患安定化の二つの症例があった。

10

【0106】

発明者らは、遺伝子発現と部分反応との間の関係を、ロジスティック回帰によって評価し、そして以下の遺伝子を有意($p < 0.15$)と同定し、添付の表1に示した。ロジスティックモデルは、部分反応者かまたはそうでないかのいずれかであるとする、被験体の確率(Pr)を予測する手段を提供する。以下の方程式は、反応の発現閾値を規定する。
 $Pr(\text{反応}) = 1 / (1 + e^{\text{切片} + \text{傾き} \times \text{基準正規化 Ct}})$ 、および、
 $Pr(\text{無反応}) = 1 - Pr(\text{反応})$ 。

【0107】

表1において、用語「陰性」とは、遺伝子のより多くの発現が、EGFRインヒビターによる処置に反応する尤度を低下させることを示し、そして「陽性」とは、遺伝子の発現の上昇が、EGFRインヒビターへの反応の尤度を上昇させることを示す。臨床的利益基準を用いた、頭部癌および頸部癌の患者のデータからの結果を、表2に示す。

20

【0108】

全体的に、以下の遺伝子の発現の上昇は、EGFRインヒビター処置に対する頭部癌および頸部癌の抵抗性と関連した：

【0109】

【化27】

A-カテニン; AKT1; AKT2; APC; Bax; B-カテニン;

BTC; CCNA2; CCNE1; CCNE2; CD105; CD44v3; CD44v6; CD68; CEACAM6; Chk2; cMet;

COX2; cripto; DCR3; DIABLO; DPYD; DR5; EDN1 エンドセリン; EGFR; EIF4E; ERBB4;

ERK1; fas; FRP1; GRO1; HB-EGF; HER2; IGF1R; IRS1; ITGA3; KRT17; LAMC2; MTA1;

NMYC; PAI1; PDGFA; PGK1; PTPD1; RANBP2; SPRY2; TP53BP1; および VEGFC

30

;そして、以下の遺伝子の発現の増加は、EGFRインヒビター処置に対する頭部癌および頸部癌の反応と関連した：CD44; CD82; CGA; CTS L; EGFR d27; IGFBP3; p27; P53; RB1; TIMP2; および YB-1。

【0110】

(実施例2)

(結腸癌における遺伝子発現の第II相研究)

実施例1に記載した頭部癌および頸部癌の患者の研究と同様の研究において、EGFRインヒビターに対する結腸癌の反応の尤度の上昇および低下と関連する遺伝子発現マーカーを探索した。サンプル調製および取扱い、ならびに遺伝子発現およびデータの分析を、実施例1と同様に行った。

40

【0111】

192個の遺伝子のアッセイを用いて、23人の結腸腺癌患者を全て研究した。192個中188個の遺伝子は、検出限界を上回って発現した。病理学的および臨床的反応の両方を評価した。EGFRインヒビターによる処置に続いて、3人の患者を、部分反応を有すると決定し、5人を、安定疾患を有すると決定し、そして15人を、進行性疾患であると決定した。

50

【 0 1 1 2 】

表 3 は、部分反応基準を用いて得られた結果を示す。

【 0 1 1 3 】

臨床的利益基準を用いた結腸癌患者データの分析からの結果を表 4 に示す。

【 0 1 1 4 】

全体的に、以下の遺伝子の発現の増加は、E G F R インヒビター処置に対する結腸癌の抵抗性と関連した：

【 0 1 1 5 】

【 化 2 8 】

CA9; CD134; CD44E; CD44v3; CD44v6; CDC25B; CGA;

DR5; GRO1; KRT17; LAMC2; P14ARF; PDGFB; PLAUR; PPARG; RASSF1; RIZ1; Src;

TFRC; および UPA

10

そして、以下の遺伝子の発現の増加は、E G F R インヒビター処置に対する結腸癌の感受性と関連した：

CD44; CD82; CGA; CTSL; EGFRd27; IGFBP3; p27; P53; RB1; TIMP2; および YB-1。

【 0 1 1 6 】

最後に、以下の遺伝子の発現の増加が、頭部癌および頸部癌ならびに結腸癌の両方において、E G F R インヒビター処置に対する抵抗性と相関するという事は、注目に値する：
CD44v3; CD44v6; DR5; GRO1; KRT17; LAMC2。

20

【 0 1 1 7 】

同様の実験で、E G F R 陽性の頭部癌および頸部癌における L A M C 2、B - カテニン、Bax、GRO1、Fas、または I T G A 3 の発現の上昇を、E G F R インヒビターによる処置に対して患者が十分に反応する可能性がないという指標であると決定した。一方、E G F R 陽性の頭部癌および頸部癌における Y B - 1、P T E N、C T S L、P 5 3、S T A T 3、I T G B 3、I G F B P 3、R P L P O または p 2 7 の発現の上昇を、E G F R インヒビター処置に対して患者が反応する可能性があるという指標であることが見出された。

30

【 0 1 1 8 】

別のセットの同様の実験において、E G F R 発現性の結腸癌における以下の遺伝子の発現の上昇は、処置への陽性反応と関連した：B A K ; B C L 2 ; B R A F ; B R K ; C C N D 3 ; C D 9 ; E R 2 ; E R B B 4 ; E R E G ; E R K 1 ; F R P 1。E G F R 発現性の結腸癌における以下の遺伝子の発現の上昇は、処置への抵抗性と関連した：A P N ; C A 9 ; C C N D 1 ; C D C 2 5 B ; C D 1 3 4 ; L A M C 2 ; P D G F B ; C D 4 4 v 6 ; C Y P 1 ; D R 5 ; G A P D H ; I G F B P 2 ; P L A U R ; R A S S F 1 ; U P A。

【 0 1 1 9 】

本明細書を通じて引用された全ての参考文献は、本明細書において、明確に、参考として援用される。

40

【 0 1 2 0 】

本発明は、特定の実施例を参照して説明されるが、これは、限定ではない。改変および変更が、本発明の精神から逸脱することなく可能である。そのような改変および変更の全ては、当業者にとって明らかであり、明確に、本発明の範囲内である。本明細書において開示される特定の実施例は、頭部および頸部の癌ならびに結腸癌に関するが、本発明の方法は、一般的に、全ての E F G R 発現性の癌に適用可能でありかつ拡張され得る。そしてこのような全体的方法が、本発明の範囲内であることは、明確に意図される。

【 0 1 2 1 】

50

【表 1 - 1】

表 1: 頭部および頸部研究 についての部分反応遺伝子

遺伝子名	反応	ロジスティック判別関数		R2	尤度比検定
		切片	傾き		P 値
cMet	陰性	26.5168713	4.57143179	0.6662	0.0011
LAMC2	陰性	5.29706425	1.28137295	0.6155	0.0017
ITGA3	陰性	22.6008544	3.17707499	0.5063	0.0044
CD44v6	陰性	6.92255059	4.3069909	0.492	0.005
B-カテニン	陰性	7.85913706	2.52965454	0.4805	0.0055
PDGFA	陰性	6.0016358	1.10386463	0.4318	0.0085
GRO1	陰性	8.37646635	1.74815793	0.4146	0.0099
ERK1	陰性	6.14712633	1.64819007	0.4024	0.0111
CD44v3	陰性	5.95094528	3.36594473	0.3451	0.0186
Bax	陰性	5.34006632	1.19383253	0.3361	0.0202
CGA	陽性	-78.121148	-10.503757	0.3266	0.0221
fas	陰性	7.27491015	1.38464586	0.3251	0.0224
IGFBP3	陽性	-2.1529531	-2.7937517	0.3097	0.0258
MTA1	陰性	6.07167277	1.23786874	0.3072	0.0264
YB-1	陽性	1.73598983	-4.0859174	0.2814	0.0336
DR5	陰性	9.0550349	1.46349944	0.2703	0.0373
APC	陰性	5.775003	1.88324269	0.2512	0.0447
ERBB4	陰性	11.9466285	1.58606697	0.2357	0.0518
CD68	陰性	3.60605487	1.0645631	0.2319	0.0537
cripto	陰性	19.5004373	2.64909385	0.2251	0.0574
P53	陽性	-4.1976158	-1.5541169	0.2208	0.0598
VEGFC	陰性	6.33634489	0.90613473	0.2208	0.0598
A-カテニン	陰性	4.41215235	1.7591194	0.2199	0.0603
COX2	陰性	8.00968996	1.27597736	0.202	0.0718
CD82	陽性	-1.8999985	-1.171157	0.1946	0.0772
PAI1	陰性	2.94777884	0.97480364	0.1944	0.0774
AKT2	陰性	2.45598587	1.64608189	0.1889	0.0817
HER2	陰性	4.25059223	0.97748483	0.1845	0.0853
DIABLO	陰性	17.035069	2.93939741	0.1809	0.0884
p27	陽性	-1.9798519	-1.9041142	0.1792	0.09
RANBP2	陰性	2.85994976	0.41878666	0.1757	0.0931
EIF4E	陰性	2.91202768	0.56099402	0.1722	0.0965
EDN1 エンドセリン	陰性	6.06858911	0.87185553	0.1688	0.0998
IGF1R	陰性	6.14387144	1.68865744	0.1674	0.1012
AKT1	陰性	5.02676228	1.50585593	0.1659	0.1028
CCNA2	陰性	3.95684559	0.63089954	0.184	0.1033
HB-EGF	陰性	5.1019713	0.70368632	0.1627	0.1061
TIMP2	陽性	2.58975885	-1.0832648	0.1625	0.1064
EGFRd27	陽性	-38.789016	-5.2513587	0.1607	0.1083
Chk2	陰性	6.8797175	1.21671205	0.1581	0.1112

10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

【表 1 - 2】

遺伝子名	反応	ロジスティック判別関数		R2	尤度比検定
		切片	傾き		P 値
IRS1	陰性	12.0545078	1.59632708	0.1578	0.1115
FRP1	陰性	3.38233862	0.49053452	0.1569	0.1126
CCNE2	陰性	5.78828731	1.11609099	0.1566	0.1129
SPRY2	陰性	4.68447069	0.86747803	0.1552	0.1145
KRT17	陰性	0.34280253	0.412313	0.151	0.1195
DPYD	陰性	2.78071456	0.78918833	0.1504	0.1202
CD105	陰性	3.13613733	0.51406689	0.1391	0.1351
TP53BP1	陰性	3.18676588	0.58622276	0.1361	0.1395
PTPD1	陰性	5.85217342	1.08545385	0.1357	0.1401
CTSL	陽性	-2.2283797	-1.4833372	0.1354	0.1405

【 0 1 2 3 】

【表 2】

表 2: 頭部および頸部研究についての臨床的利益遺伝子

遺伝子名	反応	ロジスティック判別関数		尤度比検定	
		切片	傾き	R ²	P 値
cMet.2	陰性	23.583252	4.4082875	0.6444	0.0007
GRO1.2	陰性	10.10717	2.46904056	0.5388	0.0019
A- カテニン.2	陰性	5.13298651	2.60834812	0.3628	0.0107
AKT1.3	陽性	7.7652606	2.83068092	0.3044	0.0194
DCR3.3	陰性	10.2957141	1.85012996	0.293	0.0219
B- カテニン.3	陰性	4.21267279	1.5417788	0.2791	0.0252
EDN1 エンドセリン.1	陰性	6.83022814	1.14550062	0.2758	0.0261
CCNE1.1	陰性	7.43731399	1.21270723	0.2661	0.0289
LAMC2.2	陰性	1.79659862	0.56623898	0.2498	0.0342
CD44v6.1	陰性	2.55050577	1.87838162	0.2071	0.0539
DIABLO.1	陰性	16.5051841	2.99910512	0.2066	0.0542
CD44v3.2	陰性	3.02492619	2.05469571	0.2002	0.058
NMYC.2	陰性	23.2010327	3.20767305	0.1955	0.061
CD82.3	陽性	-2.7521937	-1.1692268	0.188	0.0662
RANBP2.3	陰性	2.02076788	0.42173233	0.1807	0.0718
RB1.1	陽性	-5.7352964	-1.7540651	0.1761	0.0754
HER2.3	陰性	3.87564158	1.11486016	0.1732	0.0779
MTA1.1	陰性	3.9020256	0.92255645	0.1628	0.0874
CGA.3	陽性	-41.909839	-5.5686182	0.1619	0.0883
CEACAM6.1	陰性	1.66596967	0.59307792	0.1602	0.0899
PTPD1.2	陰性	5.51242763	1.18616068	0.1601	0.0901
ERK1.3	陰性	2.4144706	0.72072834	0.154	0.0964
Bax.1	陰性	2.91338256	0.76334619	0.152	0.0987
STMY3.3	陽性	-0.9946728	-0.6053981	0.1483	0.1028
COX2.1	陰性	5.79279616	1.0312018	0.1478	0.1034
EIF4E.1	陰性	2.08005397	0.55985052	0.1468	0.1045
YB-1.2	陽性	0.45158771	-2.2935538	0.1426	0.1096
fas.1	陰性	4.05538424	0.8686042	0.1397	0.1134
PDGFA.3	陰性	2.43388275	0.53168307	0.1371	0.1168
FRP1.3	陰性	2.17320245	0.41529609	0.137	0.1169
PGK1.1	陰性	1.86416703	1.92395917	0.1338	0.1212
AKT2.3	陰性	1.45131206	1.43341036	0.1281	0.1294
BTC.3	陰性	12.1153734	1.67411928	0.1281	0.1294
APC.4	陰性	2.50791938	0.92506412	0.128	0.1296
CCNE2.2	陰性	3.98727145	0.89372321	0.1267	0.1315
OPN, オステオポンチン.3	陽性	-0.522697	-0.5069258	0.1225	0.1382
ITGA3.2	陰性	2.23381763	0.3800099	0.1203	0.1417
KRT17.2	陰性	-0.4861169	0.43917211	0.1184	0.1449
CD44s.1	陽性	-0.9768133	-0.8896223	0.118	0.1456
EGFR.2	陰性	0.43258354	0.46719029	0.1162	0.1487

10

20

30

40

【 0 1 2 4 】

【表 3】

表 3: 結腸 研究 についての部分反応遺伝子

遺伝子名	反応	ロジスティック判別関数		R ²	尤度比検定
		切片	傾き		P 値
Bclx_2	陽性	2.04896151	-2.1025144	0.172	0.0801
BRAF_2	陽性	-2.5305788	-3.0987684	0.2532	0.0337
BRK_2	陽性	-2.6096501	-1.577388	0.2998	0.0209
CA9_3	陰性	2.65287578	0.83720397	0.2758	0.0267
Cad17_1	陽性	-0.0419396	-1.8773242	0.2096	0.0533
CCND3_1	陽性	-1.014844	-5.1111617	0.348	0.0128
CCNE1_1	陽性	-6.5821701	-0.8939912	0.1914	0.0648
CCNE2_2	陽性	26.1675642	-1.0709109	0.1707	0.0812
CD105_1	陽性	5.85359096	-1.2349006	0.1302	0.1278
CD134_2	陰性	-5.9286576	1.51119518	0.1212	0.1418
CD44v3_2	陰性	-1.8184898	1.12771829	0.2064	0.0552
CDC25B_1	陰性	10.4351019	1.59196005	0.2455	0.0365
DR5_2	陰性	-1.7399226	1.60177588	0.1759	0.0767
ErbB3_1	陽性	3.65681435	-0.760436	0.1222	0.1401
EREG_1	陽性	-2.3409861	-1.1217612	0.2542	0.0333
GPC3_1	陽性	4.03889935	-1.9097648	0.3752	0.0097
GRO1.2	陰性	2.77545378	0.74734483	0.124	0.1359
GUS_1	陽性	8.29578416	-1.9015759	0.2105	0.0529
HGF_4	陽性	5.10609383	-1.1947949	0.2361	0.0403
ID1_1	陽性	10.6703203	-1.654146	0.216	0.0498
ITGB3_1	陽性	0.79232612	-0.827508	0.3321	0.015
KRT17_2	陰性	5.93738146	0.93514633	0.2133	0.0513
LAMC2_2	陰性	-0.3325052	1.41542034	0.2475	0.0357
P14ARF_1	陰性	4.36456658	4.10859002	0.2946	0.022
PDGFB_3	陰性	-4.7055966	1.96517114	0.3299	0.0154
PLAUR_3	陰性	7.51817646	0.6862142	0.1534	0.0983
PTPD1_2	陽性	-11.659761	-1.2559081	0.1247	0.1362
RASSF1_3	陰性	6.60631474	0.9862129	0.1708	0.0811
RIZ1_2	陰性	2.83817546	0.86281199	0.1255	0.1349
Src_2	陰性	4.91364145	1.96089745	0.1324	0.1247
TFRC_3	陰性	-4.0754666	3.03617052	0.19	0.0658
TITF1_1	陽性	-1.8849815	-2.1890987	0.1349	0.1211
upa_3	陰性	4.1059421	1.14053848	0.1491	0.1032
XIAP_1	陽性	-16.296951	-2.9502191	0.2661	0.0295

10

20

30

【 0 1 2 5 】

【表 4】

表 4: 結腸研究についての臨床的利益遺伝子

遺伝子名	反応	ロジスティック判別関数		R ²	尤度比検定
		切片	傾き		P 値
Bak	陽性	-1.347937	-0.993212	0.1189	0.0602
BRK	陽性	-3.237705	-1.1479379	0.2567	0.0057
CD134	陰性	9.9358537	1.68440149	0.1927	0.0167
CD44E	陰性	3.188991	0.59091622	0.0958	0.0916
CD44v6	陰性	5.7352464	1.77571293	0.2685	0.0047
CDC25B	陰性	2.0664209	0.67140598	0.0783	0.1272
CGA	陰性	2.7903424	0.43834476	0.1035	0.0794
COX2	陽性	-1.262804	-0.4741852	0.0733	0.1398
DIABLO	陽性	-2.514199	-1.0753148	0.1028	0.0805
FRP1	陽性	-0.401936	-0.3555899	0.0937	0.0952
GPC3	陽性	-7.875276	-1.7437079	0.3085	0.0025
HER2	陽性	0.1228609	-0.5549133	0.073	0.1408
ITGB3	陽性	-1.593092	-0.5249778	0.1352	0.045
PPARG	陰性	8.6479233	1.36115361	0.1049	0.0774
PTPD1	陽性	-3.203607	-1.2049773	0.1356	0.0447
RPLPO	陽性	3.5110353	-1.030518	0.0752	0.135
STK15	陽性	-0.664989	-0.5936475	0.0873	0.1072
SURV	陽性	-1.409619	-0.6214924	0.074	0.1381
TERC	陽性	1.7755749	-0.5180083	0.1073	0.0742
TGFBR2	陽性	1.5172396	-0.9288498	0.0934	0.0957

10

20

【 0 1 2 6 】

【表 5 A - 5 B - 1】

表 5A-5B

遺伝子	登録	配列	配列番号
A-カテニン	NM_001903	CGTTCCGATCCTCTACTGTCATCCAGGCATGCCTACAGCACCCCTGATGTCGCAGCCTATAAGGCCAACAGGGACCT	
AKT1	NM_005183	CGCTTCTATGGCGCTGAGATTGTGTCAAGCCCTGGACTACCTGCCTCGGAGAAAGCTGGTGTACCCGGGA	
AKT2	NM_001626	TCCTGCCACCCCTCAAACCTCAGGTCCAGTCCGAGGTCGACCAAGGTACTTCGATGATGAATTTACCGCC	
APC	NM_000038	GGACAGCAGGAATGTGTTTCTCCATACAGGTCACGGGGAGCCAAATGGTTTCAGAAAACAATCGAGTGGGT	
B-カテニン	NM_001904	GGCTCTGTGCGTACTGTCTTCGGGCTGGTGACAGGGAGACATCACTGAGCCTGCCATCTGTGCTCTTCGTCATCTGA	
Bak	NM_001188	CCATTCCACCATTCTACTCTGAGGCCAGGACGCTGGGGGTGGGGATTGGTGGGCTATGTTCCC	
Bax	NM_004324	CCGCCGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAA	
Bclx	NM_001191	CTTTTGTGGAACTCTATGGGAACAATGCAGCAGCCGAGAGCCGAAAGGGCCAGGAACCCCTCAACCCTG	
BRAF	NM_004333	CCTCCGACAGCAGATGAAGATCATCGAAATCAATTTGGGCAACGAGACCCTCATCAGCTCCCAATGTGCATATAAA	
BRK	NM_005975	GTCAGGAAAGGTTCCAAAATGTGGAGTGTCTCGGTCCAATACACGCGTGTGCTCTCTCTACTCCATCGTGTGTC	
BTC	NM_001729	AGGGAGATGCCCTTCGTGGTGGCCGACAGACGCCCTCCTGTGTGTGATGAAGGCTACATGGAGCAAGGTGTGAGAG	
CA9	NM_001216	ATCTAGCCCTGGTTTTTGGCCTCCTTTTGTCTGTCAACGAGCTCGCGTTCCCTGTGTCAGATGAGAAAGCCAG	
Cad17	NM_004083	GAAAGCCAAAGAACCGAGTCAAATTAATTCAGTTAAAGGCCAATCCTCCTGCTGTGACTTTTGAACCTAACTGGGA	
CCNA2	NM_001237	CCATACCTCAAGTATTTGCCATCAGTTATTGCTGGAGCTGCCCTTTCATTTAGCACTCTACACAGTCAAGGACAAAAGCT	
CCND3	NM_001780	CCTCTGTGCTACAGATATACCTTTGCCATGTACCCGCCATCCATGATCGCCACGGCAGCATTGGGGTGCAGTG	
CCNE1	NM_001238	AAAGAAGATGATGACCGGGTTTACCCAACTCAACGTGCAAGCCTCGGATTTTGCACCATCCAGAGGCTC	
CCNE2	NM_057749	ATGCTGTGGCTCCTCTCACTAACTGGGGCTTTCTTGACATGTAGGTTGCTTGGTAATAACCTTTTTGTATACCAATTTGGGT	
CD105	NM_000118	GCAGGTGTCAAGATGATCAAGAAATGAGCGGTGGTCAATATCCTGTCCAGCTATCACCACAGCGGAAAA	
CD134	NM_003327	CCCCAGTCCGAGAACAGGTCCAGCTTGATTCCTGCTCTGCACCTAAGCTGTTCTCCAGGTGCGTGTGATT	
CD44E	X58150	ATCACCGACAGCAGACAGAAATCCCTGTACCAATATGGACTCCAGTATAGTACAACGCTTCAGCCTACTGCAAAATCCAAACAGGT	
CD44s	M59040	GACGAAGACAGCTCCCTGATCACCGACAGCAGACAGAAATCCCTGCTACCAGAGACCAAGACATTCACCCAGCT	
CD44v3	AJ251595v3	CACACAAAACAGAACAGGACTGGACCCAGTGGAAACCAAGCCATTCAAATCCGGAAGTGTACTTTCAG	
CD44v6	AJ251595v6	CTCATACGACCATCCAATGCAAGGAAGGACACACCAACCCAGGACAGTTCCTCGACTGATTTCTTCAACCCAA	
CD68	NM_001251	TGGTTCACAGCCCTGTGTCCACCTCCAAAGCCAGATTTCAGATTCGAGTATACACAACCCAGGGTGGAGAG	
CD98	NM_002231	GTGAGGCTCAGGTGAAGTGTCTGGGCTGGGTCACTTACAACTGGACAGACACCGCTGAGCTCATGAATCCGCCCTGAGGTC	
CD9	NM_001769	GGGCGTGAACAGTTTATCTCAGACATCTGCCCAAGAGGACGTAAGTCTGAAACCTTCAACCGTG	
CDC25B	NM_021874	AAACGAGCAGTTTCCCATCAGACGCTCCAGTCTATGCGGGTGAAGGCTGCTGGGCCACAGCCCGTCTCGGAACATCACCAC	
CEACAM6	NM_002483	CACAGCCTCACTTAACTTCTGSAACCCACCCACCACTGCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCATTCAA	
CGA	NM_001275	CTGAAAGGCTCCAAGACTCGCTCTCCAAAGGCCCAAGGAGAGGGCAGATCAGCAAGAAACACAGCGTTTTG	
Chk2	NM_007194	ATGTGGAAACCCACCTACTTGGCGCTGAAGTCTTGTGTTCTGTTGGGACTGCTGGGTATAACCGTCTGTGGACTG	
cMet	NM_000245	GACATTTCCAGTCTCGACGTAATGCTCTGCTGCCACCCCTTTGTTCAAGTGTGGCTGGTCCACGACAAATGTGTGCGATCGAG	
COX2	NM_000963	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTATGTTGATCATGATGCTGTGGAGCTGTATCTGCTCCCTCTGGTAGAAAAGCCTCGGC	

30

40

【 0 1 2 7 】

50

【表 5 A - 5 B - 2】

cripto	NM_003212	GGGTCTGTGCCCCATGACACCTGGCTGCCAAGAAGTGTCCCTGTGTAATGCTGGCAGCGTCA
CTSL	NM_001912	GGGAGCCTTATCTCACTGAGTGAGCAGAATCTGGTAGACTGCTGGGCCCTCAAGGCAATGAAGGCTGCAATGG
DCR3	NM_016434	GACCAAGCTCCTGGAATGTCTGCAGCAGAAAGGTGATGGCATCCTGGAGAGCCCTACGGGTACAGGGAAGAC
DIABLO	NM_019887	CACAATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCTGTGCCGAGCGTAACTTCATTCTTCAGGTACAGACAGTGTGTGT
DPYD	NM_000110	AGGACGCAAGGAGGGTTGTCACTGGCAGACTCGAGACTGTAGGCACTGCCATGGCCCTGTGTCTCAGTAAAGCATCGGGGACATC
DR5	NM_003842	CTCTGAGACAGTGTCTGCATGACTTTGCAGACTTGGTGCCCTTTGACTCCTGGGAGCCGCTCATGAGGAAGTGGGCCCTCATGG
EDN1 エンドセリン	NM_001955	TGCCACCTGGACATCATTTGGGTCAACACTCCGAGCACGTTGTTCCGTATGGACTTGGAAAGCCCTAGGTCCA
EGFR	NM_005228	TGTCGATGGACTTCCAGAACCACCTGGGAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAAGCTGTCCCAAT
EGFRd27	EGFRd27	GAGTCGGGCTCTGGAGGAAAGAAAGTAAATTATGTGTGACAGATCACGGCTCGTGGCTCCGAGCCTGTGG
EIF4E	NM_001988	GATCTAAGATGGCGACTGTCCAAACCGGAAACACCCCTACTCCTAATCCCCGACTACAGAAAGGAGAAAAACCGGAATCTAA
ErbB3	NM_001982	CGGTATGTGATGCAGATACACACCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCCGGAAAGGACCCCTTCTTCAGTGGGTCTCAGTTC
ERBB4	NM_005235	TGGCTCTTAATCAGTTTCGTTACCTGCCCTCTGGAGAATTAACGCATTATCGTGGGACAAAACCTTATGAGGATCGATATGCCCTG
EREG	NM_001432	ATAACAAAGTGTAGCTCTGACATGAATGGCTATTGTTGATGGACAGTGCATCTATCTGGTGGACATGAGTCAAAACTACTGCAGGTGTG
ERK1	Z11896	ACGGATCACAGTGGAGGAGCGCTGGCTCACCCCTACCTGGAGCAGTACTATGACCCGACGGATGAG
fas	NM_000043	GGATTGCTCAACAACCATGCTGGGCATCTGGACCCCTCCTACCTGTGTTCTTACGTCTGTGTAGATTAJCTGTCCAAAAGTGTAAATGCC
FRP1	NM_003012	TGGTACCTGTGGGTTAGCATCAAGTTCCTCCCAAGGTAGAAATCAATCAGAGCTCCAGTTGCAATTTGGATGTG
GPC3	NM_004484	TGATCGGCTGGAAACAGTCCAGCAGGCAACTCCGAAAGGACAAAGATAAGCACCTTCAACAACCTCG
GRO1	NM_001511	CGAAAAGATGCTGAACAGTGAACAATCCAACTGACCAGAAAGGAGGAGGAAAGCTACTGGTGGCTTCTCTGTA
GUS	NM_000181	CCCACTCAGTAGCCAAAGTCAACAATGTTTGGAAAACAGCCCGTTTACTTGAGCAAGACTGATACCACCTGCCTG
HB-EGF	NM_001945	GACTCCTTCGTCGCCAGTTCGCGTCTAGGATTGGGCTCCCATAAITGCTTTCGCAAAATACAGAGCCTCAAGTGCCA
HER2	NM_004448	CGGTGTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGGAGCATTGGCAGAGG
HGF	M29145	CCGAAATCCAGATGATGCTCATGGACCCCTGGTACACCGGAAATCCACTCATCTCTGGG
ID1	NM_002165	AGAACCAGGAGTGGAGCAAGGTGGAGATTCCACGACGCTCATGACTACATCAGGGACCTTCAGTTGSA
IGF1R	NM_000875	GCATGGTAGCCGAAATTTACAGTCAAAATCGAGATTTGGTATGACCGCAGATATCTATGAGACAGACTATTACCGGAAA
IGFBP3	NM_000598	ACCCACCCGGTGTCTGATCCCAAGTCCACCCCTCCATTCAAAGATAATCATCATCAAGAAAGGGCA
IRS1	NM_006544	CCACAGCTCACCTTCTGTGAGTGTCCATCCAGCTCCAGCCAGCTCCAGAGAGGAAAGACTGGCACTGAGG
ITGA3	NM_002204	CCATGATCCTCACTCTGCTGGTGGACTATACACTCCAGACCTCGCTTAGCATGGTAATCACCGCTCAAAAGCTTC
ITGB3	NM_000212	ACCGGAGGCCCTACATGACCGAAAATACCTGCAACCGTTACTGGCGTACGAGATTGAGTCAAGTAAAGAGCTTAAAGG
KRT17	NM_000422	CGAGGATTGGTTCTTCAGCAAGACAGAGAACTGAACCCGCGAGGTGGCCCAACAAGTGAAGTGGTGGCAGAGT
LAMC2	NM_005682	ACTCAAGCCGAAATTAAGCAGATAGGTCTTATCAGCAGACTTCCGCTCCTGGATTCAAGTGTCTGGCTCAGGGAGT
MTA1	NM_004689	CCGCCCTCACCTGAAGAGAAACCGCTCCTTGGCGGACACTGGGGGAGGAGGAGAAAGCGGGCTAACTTATTCC
NMYC	NM_005378	TGAGCGTCCGAAACACCAACATCTCTGAGCGCCAGCCGCGCAAGCCTTGGTCCAGCTTCTCACGCTCAGGGA
p14ARF	NM_000077	CCCGGAAGTCCCTCAGACATCCCGATTGAAAGAACCCAGAGGGCTCTGAGAAACCTCGGAAACTTAGA
p27	NM_004084	CGGTGGACACCAAGAGTTAACCCGGGACTTGGAGAAGCACTGCAGAGACATGGAAGAGGCGAGCC
P53	NM_000546	CTTTGAACCCCTGCTTGCATAGGTGTGCTGCAGAAACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGG

10

20

【 0 1 2 8】

【表 5 A - 5 B - 3】

PAH1	NM_000602	CCGCAACGTGGTTTTCTCACCCATGSGGGTGGCCCTCGGTGTTGGCCATGCTCCAGCTGACAAACAGGAGGAAAACCCAGCA
PDGFA	NM_002607	TTGTTGGTGTGCCCTGGTGGCGTGGTGGCGGTCACTCCCTCTGCTGCCAGTGTGGACAGAACCCCA
PDGFB	NM_002608	ACTGAAGGAGACCCCTGGAGCCTAGGGGCACTGGCAGGAGAGTGTGGGCGAGGTTATTTA
PGK1	NM_000291	AGAGCCAGTTGCTGTGAACCTCAAATCTCTGCTGGCAAGGATGTTCTGTCTTGAAGGACTGTGTAGGCCAG
PLAUR	NM_002659	CCCATGGATGCTCCTCTGAGAGACTTTCTCATTGACTGCCGAGGCCCATGAATCAATGTCTGTGACCCAGG
PPARG	NM_005037	TGACTTTATGAGAGCCCAAGTTGAGTTTGTCTGTGAAGTCAATGCACTGGAATTAGATGACAGCGACTTGGC
PTPDI	NM_007039	CGCTTGCCTAAGTCACTTCTCCCGTTGACACTGATCCACGCGCGTGGCACTGGGACGTAAGTGGCCAGCTGAATGG
RANBP2	NM_006267	TGCTTACGCTTTCAACTGGCTCAGAAATGAAGTTGCATGACTTCTGGAAGTCAAGTGGGAAACAGGATTT
RASSF1	NM_007182	AGTGGGAGACCTGACCTTCTCAAGCTGAGATTGAGCAGAAAGTCAAGGAGTACAATGCCAGATCA
RB1	NM_000321	CGAAGCCCTTACAAGTTCTTAGTTCACCCCTTACGGATTCTGGAGGGAACATCTATATTTACCCCTGAAGAGTCC
RIZ1	NM_012231	CCAGACGAGCGATTAGAAGCGGCAGCTTCTGAGGTGAATGATTTGGGGAAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGA
RPLPO	NM_001002	CCATTCTATCATCAACGGGTACAACAGAGTCTGGCCCTTGTCTGTGGAGACGGATTACACCTTCCACTTGTCTGA
SPRY2	NM_005842	TGTGCAAGTGAAGTGAAGGAGTGCACCTACCCAAAGGCTTGGCCATCAGACTGGATCTGCGAC
Src	NM_004383	CCTGAACATGAAGGAGCTGAAGCTGTGCGACACCATCCGGGAGGGGAGTTCGGAGACGTGATG
STK15	NM_003600	CATCTTCCAGGAGGACCACTCTCTGTGGCACCCCTGGACTACCTGCCCTGAAATGATTGAAGTCCGGA
SURV	NM_001168	TGTTTTGATCCCGGGCTTACCAGGTGAGAAGTGAAGGAGGAAAGGCACTGTCCCTTTTGTAGAGCTGACAGCTTTG
TERC	U86046	AAGAGGAACGAGCGAGTCCCGCGCGCGCGATTCCCTGAGCTGTGGGACGTGCACCCAGGACTCGGCTCACACAT
TFRC	NM_003234	GCCAACTGTTTCAATTTGTGAGGGATCTGAACCAATACAGACAGACATAAAGGAAATGGCCCTGAGT
TGFBF2	NM_003242	AACACCAATGGGTTCCATCTTCTGGGCTCCTGATTGCTCAAGCACAGTTTGGCCTGATGAAGAGG
TIMP2	NM_003255	TCACCTCTGTGACTTCACTGTGCCCTGGGACACCCCTGAGCACCACCGAAGAGAGCTGAACCCACA
TITF1	NM_003317	CGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGTAGTCCCTGGAGGAAAGCTACAAGAAAGTGGCATGGAGGG
TP53BP1	NM_005657	TGCTGTTGCTGAGTCTGTTGCCAGTCCCAAGAACCAATGCTGTGTTGAGCTGTATCTGTGAAGCCAGGCAAG
upa	NM_002658	GTGGATGTGCCCTGAAGGACAAAGCCAGCGCTACACGAGTCTCACACTTCTTACCCCTGGATCCGCGAG
VEGFC	NM_005429	CCTCAGCAAGACGTTATTTGAAATACAGTGCCTCTCTCAAGGCCCAACACAGTAACAATCACTTTTGGCAATCACACTT
XIAP	NM_001167	GCAGTTGGAAAGACAGGAAAGTATCCCAAAATGCAAGTATATCAACGGCTTTTATCTTGAATAAGTGGCCACGCA
YB-1	NM_004559	AGACTGTGGAGTTTGTGTTTGAAGGAGAAAAGGTTGCGGAGGCAGCAAAATGTTACAGGCTCGTGGTGTGTTCC

30

40

【 0 1 2 9】

【表 6 A - 6 F - 1】

表 6A-6F

遺伝子	登録	名前	配列	長さ	配列番号
A-カテニン	NM_001903	S2138/A-Cate.f2	CGTCCGATCCTCTATACTGCAT	23	94
A-カテニン	NM_001903	S2139/A-Cate.r2	AGGTCCCTGTTGGCCTTATAGG	22	95
A-カテニン	NM_001903	S4725/A-Cate.p2	ATGCCTACAGCACCCCTGATGTCGCA	25	96
AKT1	NM_005163	S0010/AKT1.f3	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20	97
AKT1	NM_005163	S0012/AKT1.r3	TCCCGGTACACCACGTTCTT	20	98
AKT1	NM_005163	S4776/AKT1.p3	CAGCCCTGGACTACCTGCACTCGG	24	99
AKT2	NM_001626	S0828/AKT2.f3	TCCTGCCACCCCTTCAAACC	19	100
AKT2	NM_001626	S0829/AKT2.r3	GGCGGTAATTCATCATCGAA	21	101
AKT2	NM_001626	S4727/AKT2.p3	CAGGTACGTCGAGGTGACACA	24	102
APC	NM_000038	S0022/APC.f4	GGACAGCAGGAATGTGTTTC	20	103
APC	NM_000038	S0024/APC.r4	ACCCACTCGATTTGTTTCTG	20	104
APC	NM_000038	S4888/APC.p4	CATTGGCTCCCCGTGACCTGTA	22	105
B-カテニン	NM_001904	S2150/B-Cate.f3	GGCTCTGTGCGTACTGTCCCT	22	106
B-カテニン	NM_001904	S2151/B-Cate.r3	TCAGATGACGAAGAGCACAGATG	23	107
B-カテニン	NM_001904	S5046/B-Cate.p3	AGGCTCAGTGATGTCTTCCCTGTCAACCAG	29	108
Bak	NM_001188	S0037/Bak.f2	CCATCCCACCATTCTACCT	20	109
Bak	NM_001188	S0039/Bak.r2	GGGAACATAGACCCACCAAT	20	110
Bak	NM_001188	S4724/Bak.p2	ACACCCAGACGTCCCTGGCCT	21	111
Bax	NM_004324	S0040/Bax.f1	CCGCCGTGGACACAGACT	18	112
Bax	NM_004324	S0042/Bax.r1	TTGCCGTGAGAAAACATGTCA	21	113
Bax	NM_004324	S4897/Bax.p1	TGCCACTCGGAAAAGACCTCTCGG	25	114
Bclx	NM_001191	S0046/Bclx.f2	CTTTTGTGGAACCTCTATGGGAACA	24	115
Bclx	NM_001191	S0048/Bclx.r2	CAGCGGTTGAAGCGTTCCT	19	116
Bclx	NM_001191	S4898/Bclx.p2	TTCGGCTCTCGCTGCTGCA	20	117
BRAF	NM_004333	S3027/BRAF.f2	CCTCCGACCAGCAGATGAA	20	118
BRAF	NM_004333	S3028/BRAF.r2	TTTATATGCACATTGGGAGCTGAT	24	119
BRAF	NM_004333	S4818/BRAF.p2	CAATTTGGGCAACGAGACCGATCCT	25	120
BRK	NM_005975	S0678/BRK.f2	GTGCAGGAAAGGTTCAAAA	20	121
BRK	NM_005975	S0679/BRK.r2	GCACACACGATGGAGTAAGG	20	122
BRK	NM_005975	S4789/BRK.p2	AGTGTCTGCTCCAATACACGCGT	24	123
BTC	NM_001729	S1216/BTC.f3	AGGGAGATGCCGCTTCGT	18	124
BTC	NM_001729	S1217/BTC.r3	CTCTCACACCTTGCTCCAATGTA	23	125
BTC	NM_001729	S4844/BTC.p3	CCTTCATCACAGACACAGGAGGGCG	25	126
CA9	NM_001216	S1398/CA9.f3	ATCCTAGCCCTGGTTTTTGG	20	127
CA9	NM_001216	S1399/CA9.r3	CTGCCTTCTCATCTGCACAA	20	128
CA9	NM_001216	S4938/CA9.p3	TTTGCTGTCAACGCGTCCG	20	129
Cad17	NM_004063	S2186/Cad17.f1	GAAGGCCAAGAACCGAGTCA	20	130
Cad17	NM_004063	S2187/Cad17.r1	TCCCCAGTTAGTTCAAAAGTCACA	24	131
Cad17	NM_004063	S5038/Cad17.p1	TTATATTCCAGTTAAGGCCAATCCTC	27	132
CCNA2	NM_001237	S3039/CCNA2.f1	CCATACCTCAAGTATTTGCCATCAG	25	133
CCNA2	NM_001237	S3040/CCNA2.r1	AGCTTTGTCCCCTGACTGTGTA	22	134
CCNA2	NM_001237	S4820/CCNA2.p1	ATTGCTGGAGCTGCCTTTTCATTTAGCACT	29	135
CCND3	NM_001760	S2799/CCND3.f1	CCTCTGTGCTACAGATTATACCTTTGC	27	136
CCND3	NM_001760	S2800/CCND3.r1	CACTGCAGCCCCAATGCT	18	137
CCND3	NM_001760	S4966/CCND3.p1	TACCCGCCATCCATGATCGCCA	22	138
CCNE1	NM_001238	S1446/CCNE1.f1	AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC	24	139
CCNE1	NM_001238	S1447/CCNE1.r1	GAGCCTCTGGATGGTGCAAT	20	140

【 0 1 3 0 】

【表 6 A - 6 F - 2】

CCNE1	NM_001238	S4944/CCNE1.p1	CAAACCTCAACGTGCAAGCCTCGGA	24	141	
CCNE2	NM_057749	S1458/CCNE2.f2	ATGCTGTGGCTCCTTCCTAACT	22	142	
CCNE2	NM_057749	S1459/CCNE2.r2	ACCCAAATTGTGATATACAAAAAGTT	27	143	
CCNE2	NM_057749	S4945/CCNE2.p2	TACCAAGCAACCTACATGTCAAGAAAGCCC	30	144	
CD105	NM_000118	S1410/CD105.f1	GCAGGTGTCAGCAAGTATGATCAG	24	145	
CD105	NM_000118	S1411/CD105.r1	TTTTTCCGCTGTGGTGATGA	20	146	
CD105	NM_000118	S4940/CD105.p1	CGACAGGATATTGACCACCGCCTCATT	27	147	
CD134	NM_003327	S3138/CD134.f2	GCCCAGTGCCGAGAACAG	18	148	
CD134	NM_003327	S3139/CD134.r2	AATCACACGCACCTGGAGAAC	21	149	
CD134	NM_003327	S3241/CD134.p2	CCAGCTTGATTCTCGTCTCTGCACTTAAGC	30	150	
CD44E	X55150	S3267/CD44E.f1	ATCACCGACAGCACAGACA	19	151	10
CD44E	X55150	S3268/CD44E.r1	ACCTGTGTTTTGGATTTGCAG	20	152	
CD44E	X55150	S4767/CD44E.p1	CCCTGCTACCAATATGGACTCCAGTCA	27	153	
CD44s	M59040	S3102/CD44s.f1	GACGAAGACAGTCCCTGGAT	20	154	
CD44s	M59040	S3103/CD44s.r1	ACTGGGGTGGAAATGTGTCTT	20	155	
CD44s	M59040	S4826/CD44s.p1	CACCGACAGCACAGACAGAATCCC	24	156	
CD44v3	AJ251595v3	S2997/CD44v3.f2	CACACAAAACAGAACCAGGACT	22	157	
CD44v3	AJ251595v3	S2998/CD44v3.r2	CTGAAGTAGCACTTCCGGATT	21	157	
CD44v3	AJ251595v3	S4814/CD44v3.p2	ACCCAGTGGAAACCCCAAGCCATT	23	159	
CD44v6	AJ251595v6	S3003/CD44v6.f1	CTCATACCAGCCATCCAATG	20	160	
CD44v6	AJ251595v6	S3004/CD44v6.r1	TTGGGTTGAAGAAATCAGTCC	21	161	
CD44v6	AJ251595v6	S4815/CD44v6.p1	CACCAAGCCCAGAGGACAGTTCCT	24	162	
CD68	NM_001251	S0067/CD68.f2	TGGTTCAGCCCTGTGT	18	163	
CD68	NM_001251	S0069/CD68.r2	CTCCTCCACCCTGGGTTGT	19	164	20
CD68	NM_001251	S4734/CD68.p2	CTCCAAGCCCAGATTCAGATTCGAGTCA	28	165	
CD82	NM_002231	S0684/CD82.f3	GTGCAGGCTCAGGTGAAGTG	20	166	
CD82	NM_002231	S0685/CD82.r3	GACCTCAGGGCGATTTCATGA	20	167	
CD82	NM_002231	S4790/CD82.p3	TCAGCTTCTACAACCTGGACAGACAACGCTG	30	168	
CD9	NM_001769	S0686/CD9.f1	GGGCGTGGAACAGTTTATCT	20	168	
CD9	NM_001769	S0687/CD9.r1	CACGGTGAAGGTTTCGAGT	19	170	
CD9	NM_001769	S4792/CD9.p1	AGACATCTGCCCCAAGAAGGACGT	24	171	
CDC25B	NM_021874	S1160/CDC25B.f1	AAACGAGCAGTTTGCCATCAG	21	172	
CDC25B	NM_021874	S1161/CDC25B.r1	GTTGGTGATGTTCCGAAGCA	20	176	
CDC25B	NM_021874	S4842/CDC25B.p1	CCTCACCGGCATAGACTGGAAGCG	24	174	
CEACAM6	NM_002483	S3197/CEACAM.f1	CACAGCCTCACTTCTAACCTTCTG	24	175	
CEACAM6	NM_002483	S3198/CEACAM.r1	TTGAATGGCGTGGATTCAATAG	22	176	
CEACAM6	NM_002483	S3261/CEACAM.p1	ACCCACCCACCACTGCCAAGCTC	23	177	30
CGA	NM_001275	S3221/CGA.f3	CTGAAGGAGCTCCAAGACCT	20	178	
CGA	NM_001275	S3222/CGA.r3	CAAAACCGCTGTGTTTCTTC	20	179	
CGA	NM_001275	S3254/CGA.p3	TGCTGATGTGCCCTCTCCTTGG	22	180	
Chk2	NM_007194	S1434/Chk2.f3	ATGTGGAACCCCCACCTACTT	21	181	
Chk2	NM_007194	S1435/Chk2.r3	CAGTCCACAGCACGGTTATACC	22	182	
Chk2	NM_007194	S4942/Chk2.p3	AGTCCCAACAGAAACAAGAACTTCAGGCG	29	183	
cMet	NM_000245	S0082/cMet.f2	GACATTTCCAGTCTGCAGTCA	22	184	
cMet	NM_000245	S0084/cMet.r2	CTCCGATCGCACACATTTGT	20	185	
cMet	NM_000245	S4993/cMet.p2	TGCCTCTGTGCCCCACCCTTTGT	23	186	
COX2	NM_000963	S0088/COX2.f1	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTA	23	187	
COX2	NM_000963	S0090/COX2.r1	GCCGAGGCTTTTCTACCAGAA	21	188	
COX2	NM_000963	S4995/COX2.p1	CAGGATACAGCTCCACAGCATCGATGTC	28	189	
cripto	NM_003212	S3117/cripto.f1	GGGTCTGTGCCCCATGAC	18	190	40

【 0 1 3 1 】

【表 6 A - 6 F - 3】

cripto	NM_003212	S3118/cripto.r1	TGACCGTGCCAGCATTTACA	20	191	
cripto	NM_003212	S3237/cripto.p1	CCTGGCTGCCCAAGAAGTGTTCCCT	25	192	
CTSL	NM_001912	S1303/CTSL.f2	GGGAGGCTTATCTCACTGAGTGA	23	193	
CTSL	NM_001912	S1304/CTSL.r2	CCATTGCAGCCTTCATTGC	19	194	
CTSL	NM_001912	S4899/CTSL.p2	TTGAGGCCAGAGCAGTCTACCAGATTCT	29	195	
DCR3	NM_016434	S1786/DCR3.f3	GACCAAGGTCTGGAATGTC	20	196	
DCR3	NM_016434	S1787/DCR3.r3	GTCTTCCCTGTACCCGTAGG	20	197	
DCR3	NM_016434	S4982/DCR3.p3	CAGGATGCCATTACACCTTCTGCTG	24	198	
DIABLO	NM_019887	S0808/DIABLO.f1	CACAATGGCGGCTCTGAAG	19	199	
DIABLO	NM_019887	S0809/DIABLO.r1	ACACAAACACTGTCTGTACCTGAAGA	26	200	
DIABLO	NM_019887	S4813/DIABLO.p1	AAGTTACGCTGCGCGACAGCCAA	23	201	10
DPYD	NM_000110	S0100/DPYD.f2	AGGACGCAAGGAGGGTTTG	19	202	
DPYD	NM_000110	S0102/DPYD.r2	GATGTCCGCCGAGTCCTTACT	21	203	
DPYD	NM_000110	S4998/DPYD.p2	CAGTGCCACAGTCTCGAGTCTGCCAGTG	29	204	
DR5	NM_003842	S2551/DR5.f2	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACT	24	205	
DR5	NM_003842	S2552/DR5.r2	CCATGAGGCCCAACTTCCT	19	206	
DR5	NM_003842	S4979/DR5.p2	CAGACTTGGTGCCCTTTGACTCC	23	207	
EDN1						
エンドセリン	NM_001955	S0774/EDN1 e.f1	TGCCACCTGGACATCATTTG	20	208	
EDN1						
エンドセリン	NM_001955	S0775/EDN1 e.r1	TGGACCTAGGGCTTCCAAGTC	21	209	
EDN1						
エンドセリン	NM_001955	S4806/EDN1 e.p1	CACTCCCGAGCACGTTGTTCCGT	23	210	
EGFR	NM_005228	S0103/EGFR.f2	TGTCGATGGACTTCCAGAAC	20	211	20
EGFR	NM_005228	S0105/EGFR.r2	ATTGGGACAGCTTGGATCA	19	212	
EGFR	NM_005228	S4999/EGFR.p2	CACCTGGGCAGCTGCCAA	18	213	
EGFRd27	EGFRd27	S2484/EGFRd2.f2	GAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAG	22	214	
EGFRd27	EGFRd27	S2485/EGFRd2.r2	CCACAGGCTCGGACGCAC	18	215	
EGFRd27	EGFRd27	S4935/EGFRd2.p2	AGCCGTGATCTGTACCACATAATTACC	28	216	
EIF4E	NM_001968	S0106/EIF4E.f1	GATCTAAGATGGCGACTGTGCGAA	23	217	
EIF4E	NM_001968	S0108/EIF4E.r1	TTAGATTCCGTTTTCTCCTCTCTG	25	218	
EIF4E	NM_001968	S5000/EIF4E.p1	ACCACCCCTACTCCTAATCCCCCGACT	27	219	
ErbB3	NM_001982	S0112/ErbB3.f1	CGGTTATGTCATGCCAGATACAC	23	220	
ErbB3	NM_001982	S0114/ErbB3.r1	GAAGTGAAGCCACTGAAGAAAGG	24	221	
ErbB3	NM_001982	S5002/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCCGG	25	222	
ERBB4	NM_005235	S1231/ERBB4.f3	TGGCTCTTAATCAGTTTTCGTTACCT	25	223	
ERBB4	NM_005235	S1232/ERBB4.r3	CAAGGCATATCGATCCTCATAAAGT	25	224	
ERBB4	NM_005235	S4891/ERBB4.p3	TGTCCACGAATAATGCGTAAATTCTCCAG	30	225	30
EREG	NM_001432	S0670/EREG.f1	ATAACAAAGTGTAGCTCTGACATGAATG	28	226	
EREG	NM_001432	S0671/EREG.r1	CACACCTGCAGTAGTTTTGACTCA	24	227	
EREG	NM_001432	S4772/EREG.p1	TTGTTTGCATGGACAGTGCATCTATCTGGT	30	228	
ERK1	Z11696	S1560/ERK1.f3	ACGGATCACAGTGGAGGAAG	20	229	
ERK1	Z11696	S1561/ERK1.r3	CTCATCCGTCGGGTCATAGT	20	230	
ERK1	Z11696	S4882/ERK1.p3	CGCTGGCTACCCCTACCTG	20	231	
fas	NM_000043	S0118/fas.f1	GGATTGCTCAACAACCATGCT	21	232	
fas	NM_000043	S0120/fas.r1	GGCATTAAACACTTTTGGACGATAA	24	233	
fas	NM_000043	S5003/fas.p1	TCTGGACCCTCCTACCTCTGGTTCTTACGT	30	234	
FRP1	NM_003012	S1804/FRP1.f3	TTGGTACCTGTGGGTTAGCA	20	235	
FRP1	NM_003012	S1805/FRP1.r3	CACATCCAAATGCAAACCTGG	20	236	
FRP1	NM_003012	S4983/FRP1.p3	TCCCCAGGGTAGAATTCAATCAGAGC	26	237	
GPC3	NM_004484	S1835/GPC3.f1	TGATGCGCCTGGAAACAGT	19	238	40

【 0 1 3 2 】

【表 6 A - 6 F - 4】

GPC3	NM_004484	S1836/GPC3.r1	CGAGGTTGTGAAAGGTGCTTATC	23	239	
GPC3	NM_004484	S5036/GPC3.p1	AGCAGGCAACTCCGAAGGACAACG	24	240	
GRO1	NM_001511	S0133/GRO1.f2	CGAAAAGATGCTGAACAGTGACA	23	241	
GRO1	NM_001511	S0135/GRO1.r2	TCAGGAACAGCCACCAGTGA	20	242	
GRO1	NM_001511	S5006/GRO1.p2	CTTCCTCCTCCCTTCTGGTCAGTTGGAT	28	243	
GUS	NM_000181	S0139/GUS.f1	CCCCTCAGTAGCCAAGTCA	20	244	
GUS	NM_000181	S0141/GUS.r1	CACGCAGGTGGTATCAGTCT	20	245	
GUS	NM_000181	S4740/GUS.p1	TCAAGTAAACGGGCTGTTTTCCAAACA	27	246	
HB-EGF	NM_001945	S0662/HB-EGF.f1	GACTCCTCGTCCCCAGTTG	20	247	
HB-EGF	NM_001945	S0663/HB-EGF.r1	TGGCACTGAAGGCTCTGGTA	21	248	
HB-EGF	NM_001945	S4787/HB-EGF.p1	TTGGCCTCCCATAATTGCTTTGCC	25	249	10
HER2	NM_004448	S0142/HER2.f3	CGGTGTGAGAAGTGCAGCAA	20	250	
HER2	NM_004448	S0144/HER2.r3	CCTCTCGCAAGTGTCCAT	19	251	
HER2	NM_004448	S4729/HER2.p3	CCAGACCATAGCACACTCGGGCAC	24	242	
HGF	M29145	S1327/HGF.f4	CCGAAATCCAGATGATGATG	20	253	
HGF	M29145	S1328/HGF.r4	CCCAAGGAATGAGTGGATT	20	254	
HGF	M29145	S4901/HGF.p4	CTCATGGACCCTGGTGTACACG	23	255	
ID1	NM_002165	S0820/ID1.f1	AGAACCGC AAGGTGAGCAA	19	256	
ID1	NM_002165	S0821/ID1.r1	TCCAAGTGAAGGTCCCTGATG	21	257	
ID1	NM_002165	S4832/ID1.p1	TGGAGATTCTCCAGCACGTCCATCGAC	26	258	
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	GCATGGTAGCCGAAGATTCA	21	259	
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	TTTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30	260	
IGF1R	NM_000875	S4895/IGF1R.p3	CGCGTCATACCAAATCTCCGATTTTGA	28	261	
IGFBP3	NM_000598	S0157/IGFBP3.f3	ACGCACCGGGTGTCTGA	17	262	20
IGFBP3	NM_000598	S0159/IGFBP3.r3	TGCCCTTTCTTGATGATGATTATC	24	263	
IGFBP3	NM_000598	S5011/IGFBP3.p3	CCCAAGTCCACCCCTCCATTCA	24	264	
IRS1	NM_005544	S1943/IRS1.f3	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20	265	
IRS1	NM_005544	S1944/IRS1.r3	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20	266	
IRS1	NM_005544	S5050/IRS1.p3	TCCATCCCAGCTCCAGCCAG	20	267	
ITGA3	NM_002204	S2347/ITGA3.f2	CCATGATCCTCACTCTGCTG	20	268	
ITGA3	NM_002204	S2348/ITGA3.r2	GAAGCTTTGTAGCCGGTGAT	20	269	
ITGA3	NM_002204	S4852/ITGA3.p2	CACTCCAGACCTCGCTTAGCATGG	24	270	
ITGB3	NM_000212	S3126/ITGB3.f1	ACCGGGAGCCCTACATGAC	19	271	
ITGB3	NM_000212	S3127/ITGB3.r1	CCTTAAGCTCTTCACTGACTCAATCT	27	272	
ITGB3	NM_000212	S3243/ITGB3.p1	AAATACCTGCAACCGTTACTGCCGTGAC	28	273	
KRT17	NM_000422	S0172/KRT17.f2	CGAGGATTGGTTCTTCAGCAA	21	274	
KRT17	NM_000422	S0174/KRT17.r2	ACTCTGCACCAGCTCACTGTTG	22	275	30
KRT17	NM_000422	S5013/KRT17.p2	CACCTCGCGGTTCCAGTTCCTCTGT	24	276	
LAMC2	NM_005562	S2826/LAMC2.f2	ACTCAAGCGGAAATTGAAGCA	21	277	
LAMC2	NM_005562	S2827/LAMC2.r2	ACTCCCTGAAGCCGAGACACT	21	278	
LAMC2	NM_005562	S4969/LAMC2.p2	AGGTCTTATCAGCACAGTCTCCGCCCTCC	28	278	
MTA1	NM_004689	S2369/MTA1.f1	CCGCCCTCACCTGAAGAGA	19	280	
MTA1	NM_004689	S2370/MTA1.r1	GGAATAAGTTAGCCGCGCTTCT	22	281	
MTA1	NM_004689	S4855/MTA1.p1	CCCAGTGTCCGCCAAGGAGCG	21	282	
NMYC	NM_005378	S2884/NMYC.f2	TGAGCGTCGCAGAAACCA	18	283	
NMYC	NM_005378	S2885/NMYC.r2	TCCCTGAGCGTGAGAAAGCT	20	284	
NMYC	NM_005378	S4976/NMYC.p2	CCAGCGCCGCAACGACCTTC	20	285	
p14ARF	NM_000077	S0199/p14ARF.f3	GCGGAAGTCCCTCAGACA	19	286	
p14ARF	NM_000077	S0201/p14ARF.r3	TCTAAGTTTCCCGAGGTTTCTCA	23	297	
p14ARF	NM_000077	S5068/p14ARF.p3	CCCCGATTGAAAGAACCAGAGAGGCT	26	288	40

【 0 1 3 3 】

【表 6 A - 6 F - 5】

p27	NM_004064	S0205/p27.f3	CGGTGGACCACGAAGAGTTAA	21	289	
p27	NM_004064	S0207/p27.r3	GGCTCGCCTCTTCCATGTC	19	290	
p27	NM_004064	S4750/p27.p3	CCGGGACTTGGAGAAGCACTGCA	23	291	
P53	NM_000546	S0208/P53.f2	CTTTGAACCCCTTGCTTGCAA	20	292	
P53	NM_000546	S0210/P53.r2	CCCGGGACAAAGCAAATG	18	293	
P53	NM_000546	S5065/P53.p2	AAGTCCTGGGTGCTTCTGACGCACA	25	294	
PAI1	NM_000602	S0211/PAI1.f3	CCGCAACGTGGTTTTCTCA	19	295	
PAI1	NM_000602	S0213/PAI1.r3	TGCTGGGTTTTCTCCTCCTGTT	21	296	
PAI1	NM_000602	S5066/PAI1.p3	CTCGGTGTTGGCCATGCTCCAG	22	297	
PDGFA	NM_002607	S0214/PDGFA.f3	TTGTTGGTGTGCCCTGGTG	19	298	
PDGFA	NM_002607	S0216/PDGFA.r3	TGGGTCTGTCCAAACTGG	21	299	10
PDGFA	NM_002607	S5067/PDGFA.p3	TGGTGGCGGTCACTCCCTCTGC	22	300	
PDGFB	NM_002608	S0217/PDGFB.f3	ACTGAAGGAGACCCCTTGAG	20	301	
PDGFB	NM_002608	S0219/PDGFB.r3	TAAATAACCCCTGCCACACA	20	302	
PDGFB	NM_002608	S5014/PDGFB.p3	TCTCCTGCCGATGCCCTAGG	21	303	
PGK1	NM_000291	S0232/PGK1.f1	AGAGCCAGTTGCTGTAGAACTCAA	24	304	
PGK1	NM_000291	S0234/PGK1.r1	CTGGGCCTACACAGCTTCA	21	305	
PGK1	NM_000291	S5022/PGK1.p1	TCTGTGCTGGGCAAGGATGTTCTGTTC	27	306	
PLAUR	NM_002659	S1976/PLAUR.f3	CCCATGGATGCTCCTCTGAA	20	307	
PLAUR	NM_002659	S1977/PLAUR.r3	CCGGTGGCTACCAGACATTG	20	308	
PLAUR	NM_002659	S5054/PLAUR.p3	CATTGACTGCCGAGGCCCATG	22	309	
PPARG	NM_005037	S3090/PPARG.f3	TGACTTTATGGAGCCCAAGTT	21	310	
PPARG	NM_005037	S3091/PPARG.r3	GCCAAGTCGCTGTCATCTAA	20	311	
PPARG	NM_005037	S4824/PPARG.p3	TTCCAGTGCATTGAACTTCACAGCA	25	312	20
PTPD1	NM_007039	S3069/PTPD1.f2	CGCTTGCCCTAACTCATACTTTCC	23	313	
PTPD1	NM_007039	S3070/PTPD1.r2	CCATTGAGACTGCGCCACTT	20	314	
PTPD1	NM_007039	S4822/PTPD1.p2	TCCACGCAGCGTGGCACTG	19	315	
RANBP2	NM_006267	S3081/RANBP2.f3	TCCTTCAGCTTTTACACTGG	20	316	
RANBP2	NM_006267	S3082/RANBP2.r3	AAATCCTGTTCCCACCTGAC	20	317	
RANBP2	NM_006267	S4823/RANBP2.p3	TCCAGAAGAGTCATGCAACTTCATTTCTG	29	318	
RASSF1	NM_007182	S2393/RASSF1.f3	AGTGGGAGACACCTGACCTT	20	319	
RASSF1	NM_007182	S2394/RASSF1.r3	TGATCTGGGCATTGTACTCC	20	320	
RASSF1	NM_007182	S4909/RASSF1.p3	TTGATCTTCTGCTCAATCTCAGCTTGAGA	29	321	
RB1	NM_000321	S2700/RB1.f1	CGAAGCCCTTACAAGTTTCC	20	322	
RB1	NM_000321	S2701/RB1.r1	GGACTCTTCAGGGGTGAAAT	20	323	
RB1	NM_000321	S4765/RB1.p1	CCCTTACGGATTCTGGAGGGAAC	24	324	
RIZ1	NM_012231	S1320/RIZ1.f2	CCAGACGAGCGATTAGAAGC	20	325	30
RIZ1	NM_012231	S1321/RIZ1.r2	TCCTCCTCTTCTCCTCCTC	20	326	
RIZ1	NM_012231	S4761/RIZ1.p2	TGTGAGGTGAATGATTTGGGGGA	23	327	
RPLPO	NM_001002	S0256/RPLPO.f2	CCATTCTATCATCAACGGGTACAA	24	328	
RPLPO	NM_001002	S0258/RPLPO.r2	TCAGCAAGTGGGAAGGTGTAATC	23	329	
RPLPO	NM_001002	S4744/RPLPO.p2	TCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCG	25	330	
SPRY2	NM_005842	S2985/SPRY2.f2	TGTGGCAAGTGCAAATGTAA	20	331	
SPRY2	NM_005842	S2986/SPRY2.r2	GTCGCAGATCCAGTCTGATG	20	332	
SPRY2	NM_005842	S4811/SPRY2.p2	CAGAGGCCCTTGGGTAGGTGCACTC	24	333	
Src	NM_004383	S1820/Src.f2	CCTGAACATGAAGGAGCTGA	20	334	
Src	NM_004383	S1821/Src.r2	CATCACGTCTCCGAACTCC	19	335	
Src	NM_004383	S5034/Src.p2	TCCCGATGGTCTGCAGCAGCT	21	336	
STK15	NM_003600	S0794/STK15.f2	CATCTTCCAGGAGGACCACT	20	337	
STK15	NM_003600	S0795/STK15.r2	TCCGACCTCAATCATTTCA	20	338	40

【 0 1 3 4 】

【表 6 A - 6 F - 6】

STK15	NM_003800	S4745/STK15.p2	CTCTGTGGCACCCCTGGACTACCTG	24	339	
SURV	NM_001168	S0259/SURV.f2	TGTTTTGATTCGCCGGGCTTA	20	340	
SURV	NM_001168	S0261/SURV.r2	CAAAGCTGTCAGCTCTAGCAAAG	24	341	
SURV	NM_001168	S4747/SURV.p2	TGCCTTCTTCCTCCCTCACTTCTCACCT	28	342	
TERC	U86046	S2709/TERC.f2	AAGAGGAACGGAGCGAGTC	19	343	
TERC	U86046	S2710/TERC.r2	ATGTGTGAGCCGAGTCCTG	19	344	
TERC	U86046	S4958/TERC.p2	CACGTCCCACAGCTCAGGGAATC	23	345	
TFRC	NM_003234	S1352/TFRC.f3	GCCAACTGCTTTCATTTGTG	20	346	
TFRC	NM_003234	S1353/TFRC.r3	ACTCAGGCCCATTTCTTTA	20	347	
TFRC	NM_003234	S4748/TFRC.p3	AGGGATCTGAACCAATACAGAGCAGACA	28	348	
TGFBR2	NM_003242	S2422/TGFBR2.f3	AACACCAATGGGTTCCATCT	20	349	10
TGFBR2	NM_003242	S2423/TGFBR2.r3	CCTCTTCATCAGGCCAAACT	20	350	
TGFBR2	NM_003242	S4913/TGFBR2.p3	TTCTGGGCTCCTGATTGCTCAAGC	24	351	
TIMP2	NM_003255	S1680/TIMP2.f1	TCACCCTCTGTGACTTCATCGT	22	352	
TIMP2	NM_003255	S1681/TIMP2.r1	TGTGGTTCAGGCTCTTCTTCTG	22	353	
TIMP2	NM_003255	S4916/TIMP2.p1	CCCTGGGACACCCTGAGCACCA	22	354	
TITF1	NM_003317	S2224/TITF1.f1	CGACTCCGTTCTCAGTGTCTGA	22	355	
TITF1	NM_003317	S2225/TITF1.r1	CCCTCCATGCCCACTTTCT	19	356	
TITF1	NM_003317	S4829/TITF1.p1	ATCTTGAGTCCCCTGGAGGAAAGC	24	357	
TP53BP1	NM_005657	S1747/TP53BP.f2	TGCTGTTGCTGAGTCTGTTG	20	358	
TP53BP1	NM_005657	S1748/TP53BP.r2	CTTGCCTGGCTTCACAGATA	20	359	
TP53BP1	NM_005657	S4924/TP53BP.p2	CCAGTCCCCAGAAGACCATGTCTG	24	360	
upa	NM_002658	S0283/upa.f3	GTGGATGTGCCCTGAAGGA	19	361	
upa	NM_002658	S0285/upa.r3	CTGCGGATCCAGGGTAAGAA	20	362	20
upa	NM_002658	S4769/upa.p3	AAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCAC	28	363	
VEGFC	NM_005429	S2251/VEGFC.f1	CCTCAGCAAGACGTTATTTGAAATT	25	364	
VEGFC	NM_005429	S2252/VEGFC.r1	AAGTGTGATTGGCAAAACTGATTG	24	365	
VEGFC	NM_005429	S4758/VEGFC.p1	CCTCTCTCTCAAAGGCCCAAACCAGT	26	366	
XIAP	NM_001167	S0289/XIAP.f1	GCAGTTGGAAGACACAGGAAAGT	23	367	
XIAP	NM_001167	S0291/XIAP.r1	TGCGTGGCACTATTTCAAGA	21	368	
XIAP	NM_001167	S4752/XIAP.p1	TCCCCAAATTGCAGATTTATCAACGGC	27	369	
YB-1	NM_004559	S1194/YB-1.f2	AGACTGTGGAGTTTGATGTTGTTGA	25	370	
YB-1	NM_004559	S1195/YB-1.r2	GGAACACCACCAGGACCTGTAA	22	371	
YB-1	NM_004559	S4843/YB-1.p2	TTGCTGCCTCCGCACCCTTTTCT	23	372	

【図面の簡単な説明】

【0135】

30

【図1】図1は、遺伝子発現を測定するための本発明のプロセスの、作業の流れ全体を示す図表である。この図において、F P E Tは、「固定パラフィン包埋組織」を表し、そして「R T - P C R」は、「逆転写酵素PCR」を表す。RNA濃度は、市販のR i b o G r e e n ^{T M} RNA Quantitation試薬およびプロトコルを用いることによって、決定される。

【図2】図2は、代表的な市販品の方法のフローチャートと並行する、本発明に従うRNA抽出法の工程を示す、フローチャートである。

【 図 1 】

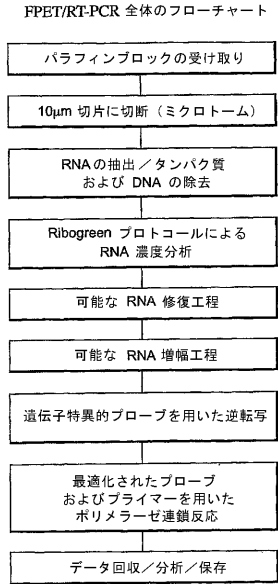


FIG. 1

【 配列表 】

0004606879000001.app

【 図 2 】

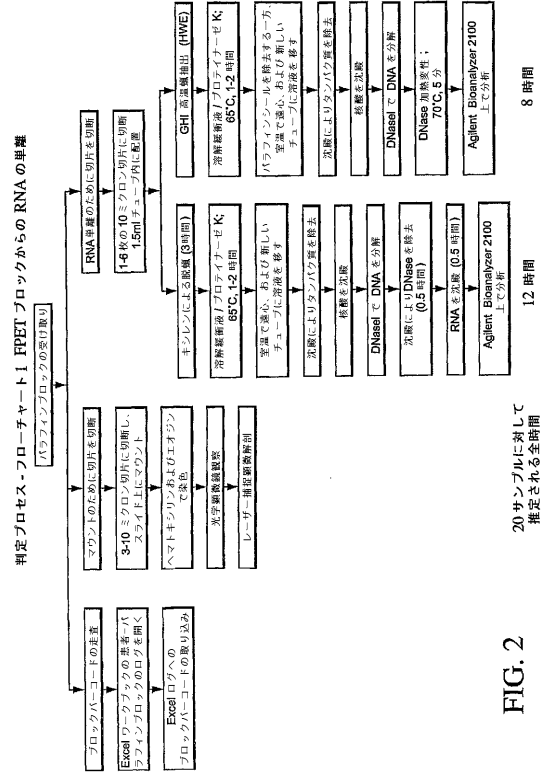


FIG. 2

フロントページの続き

- (72)発明者 クロニン, モーリーン ティー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94024, ロス アルトス, アンダーソン アベニュー
771
- (72)発明者 シャック, スティーブン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズボロ, フェアウェイ サークル 64
8
- (72)発明者 バセルガ, ホセ
スペイン国 08022 バルセロナ, ガンドウシエル 119

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 国際公開第01/012227 (WO, A1)
国際公開第02/044413 (WO, A1)
日本癌学会総会記事, 第61巻, 第166頁, 1057 (2002年8月)
World J. Gastroentero., vol. 6, pages 747-749 (2000)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 99, pages 1521-1526 (Feb. 2002)
Br. J. Cancer, vol. 86, pages 1157-1161 (Apr. 2002)
Clin. Cancer Res., vol. 8, pages 54-60 (Jan. 2002)
分子呼吸器病, 第6巻, 第359-367頁 (2002年9月)
Oncogene, vol. 21, pages 119-127 (Jan. 2002)
J. Clin. Oncol., vol. 19, pages 32S-40s (2001)
J. Biol. Chem., vol. 275, pages 6987-6995 (2000)
Oncologist, vol. 7, Suppl. 4, pages 16-24 (Aug. 2002)
Semin. Oncol., vol. 29, Suppl. 14, pages 55-60 (Oct. 2002)
Cancer Res., vol. 60, pages 6886-6889 (2000)
Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 292, pages 498-512 (Mar. 2002)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68
C12N 15/09
C12Q 1/04
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)