

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-509228

(P2016-509228A)

(43) 公表日 平成28年3月24日(2016.3.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	2GO45
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 P	4BO24
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4BO29
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4BO63
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-558546 (P2015-558546)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月19日 (2014. 2. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月29日 (2015. 9. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/050484
 (87) 国際公開番号 W02014/128460
 (87) 国際公開日 平成26年8月28日 (2014. 8. 28)
 (31) 優先権主張番号 1303078.8
 (32) 優先日 平成25年2月21日 (2013. 2. 21)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 501484851
 ケンブリッジ・エンタープライズ・リミテッド
 CAMBRIDGE ENTERPRIS
 E LIMITED
 英国シービー2・1ティエヌ、ケンブリッ
 ジシャー、ケンブリッジ、トリニティ・レ
 イン、ジ・オールド・スクールズ
 (71) 出願人 597166578
 メディカル リサーチ カウンシル
 イギリス国 スウィンドン ウィルトシャ
 ー エスエヌ2 1エフエル、ノース ス
 ター アベニュー、ポラリスハウス、デビ
 ッド フィリップス ビルディング、2階

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 方法

(57) 【要約】

本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、前記表面異常が、軽度異形成 (LGD)、高度異形成 (HGD)、無症候性食道腺癌 (OAC) 及び粘膜内癌 (IMC) からなる群から選択され、前記方法が、a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、前記対象の食道の表面から回収された細胞を含む、ステップと、b) 前記細胞を、(i) p53; (ii) c-Myc; (iii) AURKA又はPLK1、好ましくはAURKA; 並びに(iv) MyoD及びRunx3のメチル化から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップとを含み、前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出が、前記対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する、前記方法に関する。本発明は、ある種のキット、装置及び使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、前記表面異常が、軽度異形成（LGD）、高度異形成（HGD）、無症候性食道腺癌（OAC）及び粘膜内癌（IMC）からなる群から選択され、前記方法が、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、前記対象の食道の表面から回収された細胞を含む、ステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p53；

(ii) c - Myc；

(iii) AURKA又はPLK1、好ましくはAURKA；並びに

(iv) MyoD及びRunx3のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

を含み、

前記少なくとも2つのマーカーの異常レベルの検出が、前記対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する、前記方法。

【請求項 2】

ステップ(b)が、

(1) 細胞を、

(i) p53；

(ii) c - Myc；

(iii) AURKA又はPLK1、好ましくはAURKA；並びに

(iv) MyoD及びRunx3のメチル化

から選択される少なくとも第1の分子マーカーを検出するための試薬と接触させることと

(2) 前記細胞を、(i)～(iv)から選択される少なくとも第2の分子マーカーを検出するための試薬と接触させることと

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

マーカーのうち少なくとも3つの異常レベルがアッセイされる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

マーカーのうち少なくとも4つの異常レベルがアッセイされる、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

細胞を非定型性についてアッセイするステップをさらに含む、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

細胞が、食道の表面の不偏サンプリングにより回収される、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

細胞が、カプセルスポンジを用いて回収される、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

細胞が、分子マーカーを検出するための試薬と接触させる前に、(i)前記細胞を遠心分離によりペレットにするステップと、(ii)前記細胞を血漿に再懸濁するステップと、(iii)トロンピンを加え、血餅が形成されるまでインキュベーションするステップとにより調製される、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

血餅をホルマリン中でインキュベートし、処理してパラフィンブロックにし、顕微鏡検査に適切な切片に薄切するステップをさらに含む、請求項8に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

p 5 3 が、免疫組織化学により評価される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

p 5 3 が、1 又は 2 以上の p 5 3 変異の検出により評価される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

p 5 3 が、免疫組織化学により評価され、p 5 3 が、1 又は 2 以上の p 5 3 変異の検出によっても評価される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

c M y c が、免疫組織化学により評価される、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法 10

【請求項 14】

A U R K A が、免疫組織化学により評価される、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

M y o D / R u n x 3 のメチル化が、MethyLight 分析により評価される、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

非定型性が、ウィーンスケールに従って細胞をその形態についてスコア化することにより評価される、請求項 6 に記載の方法。 20

【請求項 17】

細胞を T F F 3 についてアッセイするステップが、方法のステップ (b) に先行する、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

処置レジメンを選択するためのアッセイであって、
 a) 対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、前記対象の食道の表面から回収された細胞を含む、ステップと、
 b) 前記細胞を、
 (i) p 5 3 ;
 (ii) c - M y c ; 30
 (iii) A U R K A ; 並びに
 (iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化
 から選択される少なくとも 2 つのマーカーについてアッセイするステップと
 を含み、
 前記少なくとも 2 つのマーカーの 2 つの異常レベルが検出された場合に、内視鏡検査及び生検の処置レジメンを選択する、前記アッセイ。

【請求項 19】

(a) 対象からの食道試料を分析するように構成される装置又はシステムであって、前記分析が、
 (b) 細胞を、 40
 (i) p 5 3 ;
 (ii) c - M y c ;
 (iii) A U R K A ; 並びに
 (iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化
 から選択される少なくとも 2 つのマーカーについてアッセイするステップ
 を含み、
 前記装置又はシステムが出力モジュールを含み、
 前記マーカーの少なくとも 2 つの異常レベルが検出された場合に、前記出力モジュールが、前記対象についての食道における表面異常の可能性が増加していることを示し、前記表面異常が、軽度異形成 (L G D)、高度異形成 (H G D)、無症候性食道腺癌 (O A C) 50

及び粘膜内癌（IMC）からなる群から選択される、前記装置又はシステム。

【請求項 20】

対象の食道の表面異常の検出の補助に関する用途のための、あるポリペプチド又はある核酸配列のメチル化を認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質の使用であって、前記表面異常が、軽度異形成（LGD）、高度異形成（HGD）、無症候性食道腺癌（OAC）及び粘膜内癌（IMC）からなる群から選択され、前記ポリペプチド及び/又は核酸配列が、請求項 1～16 のいずれかで定義するとおりである、前記使用。

【請求項 21】

物質のそれぞれが、ポリペプチド又は核酸配列の 1 又は 2 以上をそれぞれ認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質の組合せの、請求項 20 に記載の使用。

10

【請求項 22】

対象の食道の表面異常の検出の補助における使用のためのアッセイデバイスであって、前記表面異常が、軽度異形成（LGD）、高度異形成（HGD）、無症候性食道腺癌（OAC）及び粘膜内癌（IMC）からなる群から選択され、前記アッセイデバイスが、あるポリペプチド又はある核酸配列のメチル化を認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質を含有する場所を有する固体基材を含み、前記ポリペプチド及び/又は核酸配列が、請求項 1～16 のいずれかで定義するとおりである、前記アッセイデバイス。

【請求項 23】

生体試料中の

(i) p 53 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A

のそれぞれの発現レベルを決定するための試薬を含み、MyoD及びRunx3のメチル化を決定するための試薬をさらに含んでもよいキット。

20

【請求項 24】

対象の食道の表面異常の検出を補助するための方法であって、前記表面異常が、軽度異形成（LGD）、高度異形成（HGD）、無症候性食道腺癌（OAC）及び粘膜内癌（IMC）からなる群から選択され、前記方法が、前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、前記対象の食道の表面から回収された細胞を含む、ステップと、前記細胞をTFF3についてアッセイするステップとを含み、TFF3が前記試料の細胞において検出がされた場合には、請求項 1～16 のいずれかに記載の方法を行い、TFF3の検出に加えて少なくとも 1 つのマーカーの異常レベルの検出が、前記対象の前記食道の表面異常の可能性が増加していることを示す、前記方法。

30

【請求項 25】

TFF3の検出に加えて少なくとも 2 つのマーカー、好ましくはTFF3の検出に加えて少なくとも 3 つのマーカー、好ましくはTFF3の検出に加えて少なくとも 4 つのマーカー、好ましくはTFF3の検出に加えて 5 つ全てのマーカーの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを示す、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

細胞が、食道の表面の不偏サンプリングにより回収される、請求項 24 又は 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

細胞が、カプセルスポンジを用いて回収される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

対象の食道の表面異常の検出を補助するための方法であって、前記表面異常が、食道腺癌（OAC）であり、前記方法が、前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含む、ステップと、前記細胞をSMAD4についてアッセイするステップとを含み、

50

前記試料の細胞におけるS M A D 4の検出が、前記対象の前記食道の食道腺癌（O A C）の可能性が増加していることを示す、前記方法。

【請求項29】

本明細書に実質的に記載される方法。

【請求項30】

図面を参照して本明細書に実質的に記載される方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食道の表面異常を検査するか、又はその検出を補助する分野にある。

10

【背景技術】

【0002】

食道癌（O A C , oesophageal cancer）は、世界中で8番目に一般的なタイプの癌であり、過去30年間でその発生率はほぼ5倍上昇している。

【0003】

バレット食道は、O A Cに向かう経路の最初のステップであり、メタアナリシスは、バレット食道が1年あたり0.12~0.5%の腺癌への進行のリスクの増加をもたらすことを証明している。バレット食道は、正常食道細胞が腺細胞で置き換えられる場合に生じ、時間とともに軽度異形成（L G D , low-grade dysplasia）、高度異形成（H G D , high-grade dysplasia）、そして最後には腺癌に進行し得る。

20

【0004】

O A C及び/又はその前癌性前駆バレット食道の早期の診断は、患者管理及びO A Cの予後を改善できる。ある既知のアプローチでは、例えば国際公開第2011/058316号パンフレットで公開されているように、Cytosponge（商標）細胞回収デバイスが開発されている。

【0005】

さらに、T F F 3を分子マーカーとして用いる試験が、Fitzgerald et alにより、例えば米国特許出願公開第20120009597号明細書に公開されているように、バレット食道を検出するための臨床的スクリーニングツールとして開発されている。

30

【0006】

Cytosponge（商標）を用いた最初の研究（B E S T 1）（Kadri, S.R., Lao-Sirieix, P., O'Donovan, M., DeBiram, I., Das, M., Blazeby, J.M., Emery, J., Boussioutas, A., Morris, H., Walter, F.M., et al. (2010). Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study. *BMJ* 341, c4372）は、Cytosponge（商標）試験が、プライマリケアの環境においてバレット食道を診断するのに適する方法であることを証明した。

【0007】

現在のシステムでは、症候性の患者は内視鏡検査に送られる。内視鏡検査は、高度に訓練された臨床家を必要とする侵襲性の処置である。内視鏡検査は、患者にとっても不快な処置であり、鎮静を必要とすることがある。内視鏡検査に生検が伴う場合、この処置を受ける患者にもいくらかの危険が伴う。臨床的な環境では、これが、現在のところ、バレット食道及び/又はバレット食道を伴う異形成若しくは癌を検出する唯一の方法である。

40

【0008】

Rugge et al（Rugge, M., Fassan, M., Zaninotto, G., Pizzi, M., Giacomelli, L., Battaglia, G., Rizzetto, C., Parente, P., and Ancona, E. (2010). Aurora kinase A in Barrett's carcinogenesis. *Hum Pathol* 41, 1380-1386）は、バレット食道癌発生におけるオーロラキナーゼA（A U R K A）を開示している。T P 5 3変異がバレット食道腺癌のリスクの増加のマーカーとして認識されることが指摘された。食道の生検試料を、バレット食道の長セグメントから得た。10のバレット食道腺癌のうち9つが、A U R K

50

A免疫染色を示した。mRNA分析及びマイクロアレイ研究により、AURKA発現が調べられた。著者らは、バレット粘膜の癌への進行におけるAURKA過剰発現に著しい役割を帰することにより結論付けた。著者らは、より大きく前向きな研究において、バレット粘膜患者における可能性のある予後マーカーとしてAURKA IHC発現を検証するためのさらなる試みが必要であると結論付けた。

【0009】

Liu et al (2008 World Journal of Gastroenterology vol 14 pages 7199-7207) は、異なる腫瘍におけるTp53、C-myc、CCND1遺伝子過剰発現の組織アレイを開示している。7つの異なるタイプの腫瘍が調べられた。分析は、核酸ベースであった。用いた試料は、既知の腫瘍のものであった。検出方法は教示されていない。試料は、ホルマリンで固定された。

10

【0010】

Agnese et al (2007 European Society for Medical Oncology vol 8 Suppl 6 vi110-vi115) は、逆流関連円柱粘膜及びバレット食道の早期マーカーとしてのオーロラA過剰発現を開示している。著者らは、異形成及びp53陽性免疫染色あり又はなしの、バレット食道粘膜(円柱上皮で裏打ちされた食道(CLO, columnar lined oesophagus)及びバレット食道(BO, Barrett's oesophagus)の間のAURKA mRNA発現に、少しの、統計的に有意な量の差も見出すことができなかった。

【0011】

バレット食道に関連して、いくつかの分子マーカーが研究されている。これらのマーカーは、純粋に研究の背景で研究されている。これらの研究は、インビトロでの組織試料で行われている。これらのマーカーは、単独で研究されている。現在のところ、バレット食道関連異常についての臨床試験で用いられているそのような分子マーカーはない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第2011/058316号パンフレット

【特許文献2】米国特許出願公開第20120009597号明細書

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Kadri, S.R., Lao-Sirieix, P., O'Donovan, M., Debiram, I., Das, M., Blazeby, J.M., Emery, J., Boussioutas, A., Morris, H., Walter, F.M., et al. (2010). Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study. *BMJ* 341, c4372

30

【非特許文献2】Rugge, M., Fassan, M., Zaninotto, G., Pizzi, M., Giacomelli, L., Battaglia, G., Rizzetto, C., Parente, P., and Ancona, E. (2010). Aurorakinase A in Barrett's carcinogenesis. *Hum Pathol* 41, 1380-1386

【非特許文献3】Liu et al (2008 World Journal of Gastroenterology vol 14 pages 7199-7207)

【非特許文献4】Agnese et al (2007 European Society for Medical Oncology vol 8 Suppl 6 vi110-vi115)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

バレット食道関連異常の検出の改善が、当該技術において必要とされている。従来技術の試験は、高価で労働力を有し、侵襲性で、試験を受ける対象に対するリスクを伴う。

【0015】

本発明は、従来技術に関連する問題点を克服しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

50

ある (certain) 分子マーカーは、バレット食道関連異常に関連することが示されている。これらのマーカーは、組織生検で研究されている。組織生検に対して分子マーカーを用いることは、現在の臨床上的な代表的な存在である生検の形態学的検査に対してほとんど実質的な利点をもたらさない。これは、このような様式でマーカーを研究することが、生検を回収することをまだ必要とし、そのことにより、従来技術における侵襲的な処置に関連する問題点のそれぞれをまだ伴うからである。より重要なことには、研究の背景で研究された単独マーカーは、検出又は診断に貢献する堅固なマーカーとして認識されるには不適切な感度及び/又は不適切な特異性を示している。

【 0 0 1 7 】

本発明者らは、広範囲の候補マーカーを研究した。本発明者らは、これらのマーカーを異なる組合せでも研究した。本発明者らは、組合せで試験した場合に、臨床的に有用な感度及び特異性スコアを生じる小さく明確なパネルのマーカーに到達した。さらに、本発明者らは、表面サンプリング細胞においてこれらのマーカーの性能を研究した。例えば、これらのマーカーの組合せは、細胞回収デバイス、例えばCytosponge (商標) を用いて得られるような、食道の表面サンプリングから回収された細胞の分析に用いることができる。

10

【 0 0 1 8 】

本発明者らが教示する方法は、臨床試験において以前に用いられていないマーカーの新規な組合せに参与する。さらに、本発明者らは、これらのマーカーが、食道の表面サンプリングから得られた細胞に対して用いた場合に、用いることができ、信頼できる結果が生じることを実証する。加えて、本発明の方法のこれらの様々な特徴は、生検による侵襲的な組織回収の必要性を有利に回避しながら、堅固で臨床的に有用なリスク評価の利点を提供する。本発明のこれら及びさらなる利点は、以下により詳細に記載する。

20

【 0 0 1 9 】

よって、広い態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A 又は P L K 1、好ましくは A U R K A ;

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化 ; 並びに

(v) 非定型性

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

を含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する方法を提供する。

30

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、前記表面異常が、軽度異形成 (L G D)、高度異形成 (H G D)、無症候性食道腺癌 (O A C , oesophageal adenocarcinoma) 及び粘膜内癌 (I M C , intra-mucosal cancer) からなる群から選択され、前記方法が、

40

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A 又は P L K 1、好ましくは A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

50

を含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する方法に関する。

【0021】

より適切には、一態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p53 ;

(ii) c - Myc ;

(iii) AURKA 又は PLK1、好ましくは AURKA ; 並びに

(iv) MyoD 及び Runx3 のメチル化 ;

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

を含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する方法を提供する。

【0022】

本明細書に記載するマーカーは、各マーカーについての絶対的スコア化についての手引きとともに示される。このことは、既に分析されたスコア化システムに参照標準/比較段階を導入する利点を有する。しかし、所望により、本発明は、代わりに、例えば健常(食道異常を有さない)対象からの参照標準との比較により機能できる。よって、一態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p53 ;

(ii) c - Myc ;

(iii) AURKA ; 並びに

(iv) MyoD 及び Runx3 のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

を含み、

参照標準と比較した前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する方法を提供する。

【0023】

ステップ(b)は、

(1) 前記細胞を、

(i) p53 ;

(ii) c - Myc ;

(iii) AURKA ; 並びに

(iv) MyoD 及び Runx3 のメチル化

から選択される少なくとも第1の分子マーカーを検出するための試薬と接触させることと

、

(2) 前記細胞を、(i) ~ (iv) から選択される少なくとも第2の分子マーカーを検出し、及び/又は前記細胞を非定型性についてアッセイするための試薬と接触させることとを含んでいてもよい。

【0024】

より適切には、ステップ(b)は、

(1) 前記細胞を、

(i) p53 ;

10

20

30

40

50

(ii) c - M y c ;
 (iii) A U R K A ; 並びに
 (iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化
 から選択される少なくとも第 1 の分子マーカーを検出するための試薬と接触させることと
 、
 (2) 前記細胞を、(i) ~ (iv) から選択される少なくとも第 2 の分子マーカーを検出
 するための試薬と接触させることと
 を含む。

【 0 0 2 5 】

前記表面異常は、軽度異形成 (L G D)、高度異形成 (H G D)、無症候性食道腺癌 (O A C) 及び粘膜内癌 (I M C) からなる群から選択されていてもよい。これらは全て、「腺性」(「円柱状」)である特性を共有する。これらは全て、「バレット食道」のものである特性を共有する。これらは全て、異形成である。これらはいずれも、扁平上皮のものではない。

10

【 0 0 2 6 】

適切には、本発明は、扁平上皮異形成に関係しない。

【 0 0 2 7 】

適切には、本発明は、扁平上皮癌に関係しない。

【 0 0 2 8 】

適切には、表面異常は、扁平細胞異常に関係しない。

20

【 0 0 2 9 】

前記表面異常は、軽度異形成 (L G D)、高度異形成 (H G D) 及び粘膜内癌 (I M C) からなる群から選択されていてもよい。

【 0 0 3 0 】

前記表面異常は、軽度異形成 (L G D) 及び高度異形成 (H G D) からなる群から選択されていてもよい。

【 0 0 3 1 】

前記表面異常は、無症候性食道腺癌 (O A C) 及び粘膜内癌 (I M C) からなる群から選択されていてもよい。

【 0 0 3 2 】

前記表面異常は、軽度異形成 (L G D) であってもよい。

30

【 0 0 3 3 】

前記表面異常は、高度異形成 (H G D) であってもよい。

【 0 0 3 4 】

前記表面異常は、無症候性食道腺癌 (O A C) であってもよい。

【 0 0 3 5 】

前記表面異常は、粘膜内癌 (I M C) であってもよい。

【 0 0 3 6 】

前記マーカーのうち少なくとも 3 つの異常レベルをアッセイしてもよい。

【 0 0 3 7 】

前記マーカーのうち少なくとも 4 つの異常レベルをアッセイしてもよい。

40

【 0 0 3 8 】

前記マーカーのそれぞれの異常レベルをアッセイしてもよい。

【 0 0 3 9 】

前記細胞は、食道の表面の不偏サンプリングにより回収されていてもよい。

【 0 0 4 0 】

前記細胞は、カプセルスポンジを用いて回収されていてもよい。

【 0 0 4 1 】

細胞は、分子マーカーを検出するための試薬と接触させる前に、(i) 細胞を遠心分離によりペレットにするステップと、(ii) 細胞を血漿に再懸濁するステップと、(iii)

50

トロンピンを加え、血餅が形成されるまでインキュベーションするステップとにより調製されていてもよい。調製は、前記血餅をホルマリン中でインキュベートし、処理してパラフィンブロックにし、顕微鏡検査のために適切な切片に薄切するステップをさらに含んでいてもよい。

【0042】

p53は、免疫組織化学により評価されていてもよい。

【0043】

p53は、核酸レベルで評価されていてもよい。p53変異状態は、評価（例えば検出）されていてもよい。p53変異は、配列決定により評価（例えば検出）されていてもよい。適切には、p53が核酸レベルで検出される場合、「異常レベルの検出」は、p53変異の検出を意味する。言い換えると、p53変異の検出は、それ自体、異常p53又はp53の異常レベルと見なされる。核酸レベルでp53を評価することは、染色レベルを例えばp53についてのタンパク質レベルで評価する場合に存在し得る主観性を除去又は改善する利点を有する。

10

【0044】

適切には、p53遺伝子内のいずれかの場所のp53変異が検出される。このことは、変異が遺伝子を通して広がっている可能性があるため、有利である。より適切には、DNA結合ドメイン中の変異が検出される。これらは最も一般的な変異である。適切には、アッセイは、遺伝子を通しての変異を検出できる。さらなる手引きが必要である場合、さらなる詳細について実施例10を参照されたい。

20

【0045】

適切には、p53ナンセンス変異が検出される場合にp53変異が検出される。適切には、p53ミスセンス変異が検出される場合にp53変異が検出される。適切には、p53欠失変異が検出される場合にp53変異が検出される。適切には、p53インデル（INDEL）バリエーション変異が検出される場合にp53変異が検出される。

【0046】

適切には、p53変異は、実施例10で言及する1つである。

【0047】

適切には、p53変異は、p53のDNA結合ドメイン中の1つである。

【0048】

p53は、核酸及びタンパク質の両方のレベルにて評価されていてもよい。このことにより、タンパク質アッセイにより検出されないいずれの変異（例えば、p53発現/検出に影響しないp53変異）も捕らえられ、p53発現に影響するいずれの非p53変化（例えばp53以外の遺伝子における変異）も捕らえられる（すなわちタンパク質分析により）という利点を提供する。

30

【0049】

適切には、p53は、1又は2以上のp53変異の検出により評価される。

【0050】

適切には、p53は、免疫組織化学により評価され、p53は、1又は2以上のp53変異の検出によっても評価される。

40

【0051】

cMycは、免疫組織化学により評価されていてもよい。

【0052】

AURKAは、免疫組織化学により評価されていてもよい。

【0053】

AURKAが本発明の好ましいマーカーであることに注目すべきである。しかし、マーカーPLK1も良好な感度（91%）及び良好な特異性（88%）を有することが認識される。このバイオマーカーは、AURKAがよりよい感度（93%）及び特異性（94%）データを示したので（実施例を参照されたい）、AURKAに有利なように除外された。しかし、本発明者らは、AURKA又はPLK1の過剰発現が、本質的な同じ症例を検

50

出することを教示する。よって、本発明の実施形態では、P L K 1をA U R K Aの代わりに（又はA U R K Aに加えて）アッセイしてよい。よって、適切には、A U R K A又はP L K 1、好ましくはA U R K Aがアッセイされる。

【 0 0 5 4 】

M y o D / R u n x 3のメチル化が、MethyLight分析によりアッセイされていてもよい。

【 0 0 5 5 】

非定型性が、ウィーンスケールに従って細胞をその形態についてスコア化することにより評価されていてもよい。適切には、ウィーンスケールは、Schlemper et al 2007 Gut 2000;47:251-255に記載されるとおりである。

10

【 0 0 5 6 】

別の態様では、本発明は、前記細胞をT F F 3についてアッセイするステップが、前記方法のステップ（b）に先行する、上記の方法に関する。

【 0 0 5 7 】

別の態様では、本発明は、処置レジメンを選択するためのアッセイであって、前記アッセイが、

a）前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b）前記細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

を含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルが検出された場合、内視鏡検査及び生検の処置レジメンを選択するアッセイに関する。

20

【 0 0 5 8 】

別の態様では、本発明は、

(a) 対象からの食道試料を分析するように構成され、前記分析が、

(b) 前記細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップ

を含む装置又はシステムであって、

出力モジュールを含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルが検出された場合、前記出力モジュールが、前記対象についての食道における表面異常の可能性が増加していることを示す装置又はシステムに関する。

30

40

【 0 0 5 9 】

別の態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出の補助に関する用途のための、あるポリペプチド又はある核酸配列のメチル化を認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質の使用であって、ポリペプチド及び/又は核酸配列が、上で定義するとおり、例えばp 5 3、c - M y c、A U R K A、R u n x 3 / M y o D 1のメチル化である使用に関する。別の態様では、本発明は、それぞれが、前記ポリペプチド又は核酸配列の1又は2以上をそれぞれ認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質の組合せのそのような使用に関する。

【 0 0 6 0 】

50

別の態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出の補助において用いるためのアッセイデバイスであって、あるポリペプチド又はある核酸配列のメチル化を認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質を含有する場所を有する固体基材を含み、ポリペプチド及び/又は核酸配列が、上で定義するとおり、例えば p 5 3、c - M y c、A U R K A、R u n x 3 / M y o D 1 のメチル化であるアッセイデバイスに関する。

【0061】

別の態様では、本発明は、生体試料中の

- (i) p 5 3 ;
- (ii) c - M y c ;
- (iii) A U R K A

10

のそれぞれの発現レベルを決定するための試薬を含み、M y o D 及び R u n x 3 のメチル化を決定するための試薬をさらに含んでもよいキットに関する。

【0062】

別の態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、前記細胞を T F F 3 についてアッセイするステップであって、T F F 3 が試料の細胞において検出された場合、上記の方法を行うステップとを含み、T F F 3 の検出に加えて少なくとも1つのマーカーの異常レベルの検出が、前記対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを示す方法に関する。

20

【0063】

別の態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、

(a) 前記対象からの細胞の試料を提供し、前記細胞を T F F 3 についてアッセイするステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含み、T F F 3 が試料の細胞において検出された場合、以下のさらなるステップを行うステップと、

(b) 前記細胞を、

- (i) p 5 3 ;
- (ii) c - M y c ;
- (iii) A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップと

30

を含み、T F F 3 の検出に加えて少なくとも1つのマーカーの異常レベルの検出が、前記対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを示す方法に関する。T F F 3 の検出に加えて少なくとも2つのマーカー、好ましくはT F F 3 の検出に加えて少なくとも3つのマーカー、好ましくはT F F 3 の検出に加えて少なくとも4つのマーカー、好ましくはT F F 3 の検出に加えてマーカーのそれぞれの異常レベルの検出が、前記対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを示していてもよい。前記細胞は、食道の表面の不偏サンプリングにより回収されていてもよい。前記細胞は、カプセルスポンジを用いて回収されていてもよい。

【0064】

別の態様では、本発明は、上記のステップを行うことを含む、食道異常を検出するために有用な情報を収集する方法に関する。

40

【0065】

別の態様では、本発明は、上記のステップを行うことを含む、食道異常の診断を補助するために有用な情報を収集する方法に関する。

【0066】

別の態様では、本発明は、上記のステップを行うことを含む、食道異常の診断の方法に関する。

【0067】

別の態様では、本発明は、上記のステップを行うことを含む、食道異常の診断を補助する方法に関する。

50

【 0 0 6 8 】

別の態様では、本発明は、上記のステップを行うことを含む、複数の食道異常のリスクを評価する方法に関する。

【 0 0 6 9 】

別の態様では、本発明は、上記のステップを行うことを含む、1つの食道異常のリスクを評価する方法に関する。

【 0 0 7 0 】

前記異常は、異形成であってもよい。前記異常は、LGD、HGD、IMC又は無症候性OACであってもよい。

【 0 0 7 1 】

別の態様では、本発明は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、前記表面異常が、食道腺癌(OAC)であり、方法が、前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、前記細胞をSMAD4についてアッセイするステップとを含み、SMAD4が試料の細胞において検出された場合、前記対象の食道の食道腺癌(OAC)の可能性が増加していることが示される方法に関する。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 7 2 】

本発明は、異形成を有する対象のリスクの評価に特に応用される。現在のところ、異形成の評価は、対象から回収された生検に対してのみ行われる。本発明によると、対象を、本明細書に記載する方法により、異形成(例えばLGD、HGD、IMCの1又は2以上、無症候性OACを含んでいてもよい)を有するリスクについて評価できる。これらの方法は、生検を有利に回避する。本発明の方法は、適切に明白に生検を排除する。本発明の方法は、食道の表面サンプリング(又は食道の表面からのインビトロでの試料)のみを有利に必要とするので、生検及び/又は内視鏡検査を回避する。

【 0 0 7 3 】

よって、本発明の重要な部分は、マーカーのパネルを用いて、LGD、HGD又はIMCの1又は2以上のような異形成を有する対象のリスクを評価することである。

【 0 0 7 4 】

OACは、浸潤性型の疾患であるとより典型的に見なされ、典型的に、OACの患者は、症状を既に示し、典型的に、本発明の方法は、(例えば)OACの診断を表すよりもむしろ、スクリーニング又はサーベイランス用途及びリスク評価用途のために用いられる。浸潤性OACは、本発明の一部でない、異なるアルゴリズムを用いて典型的に診断される。しかし、無症候性OAC(又はより精密には、無症候性OACのリスクの上昇)は、LGD/HGD/IMC(又はより精密には、LGD/HGD/IMCのリスクの上昇)と同じ様式で本発明の方法により検出できる。このことは、本発明者らにより行われている。本発明を、本明細書に記載する様式で用いた。かかる方法を用いた結果は、その対象での異常/異形成のリスクがより高いことを示した。対象は、本発明に従ってリスクがより高いことが見出された結果として、内視鏡検査/生検を受けることを推奨された。内視鏡検査/生検は、無症候性OACを明らかにした。患者は、次いで、適当な処置に照会された。よって、本発明は、無症候性OACを含み得る異常/異形成のリスクの評価に用いることができるが、本発明は、OACの確定診断を与える診断ツールであることを意味しない。

【 0 0 7 5 】

対象/患者群

適切には、本発明の方法は、任意の対象に用いられる。適切には、本発明の方法は、バレット食道を有する疑いがある任意の対象に用いられる。これらの用途は、集団全体をスクリーニングするために有用であり得る。

【 0 0 7 6 】

より適切には、本発明の方法/パネルは、癌腫を有することがわかっていないが、バレ

10

20

30

40

50

ット食道についてモニタリング又はフォローアップしてもよい対象又は患者に応用される。

【0077】

より適切には、本発明の方法は、パレット食道を有する任意の対象に用いられる。

【0078】

本発明は、パレット食道を既に有する対象における進行のリスク又はLGD/HGD/IMCを有するリスクの評価を補助し、このことは、本発明の重要な利点である。

【0079】

本発明のパネルは、パレット食道の検出を意図しないが、異形成を有するリスクの評価を意図する。パレット食道を有することの評価は、パレット食道の確立されたTFF3マーカーを用いて典型的に行われるか、又はパレット食道の診断のための任意の適切な方法により行ってよい。

10

【0080】

パレット食道の重要なマーカーは、TFF3マーカーである。(すなわち例えばCytosponge(商標)のようなカプセルスポンジからの表面からサンプリングした細胞でのTFF3陽性。このような対象は、異形成を有さない、軽度異形成、高度異形成又は異形成について不確定であることが判明することがある。患者が診断未確定の表在性粘膜内癌腫を有し得ることも考えられる。しかし、本発明の主な利点は、パレット食道を既に有する開始点からの、異形成を有するリスクの評価にある。もちろん、本発明のパネル/方法は、無症候性対象についての全般的なスクリーニングツールとして用いることができるが、このことは、経済的でないと考えられる(このことが、もちろん非常に効果的であるとしても)。よって、経済的及び実際的な理由から、本発明は、異形成のリスクが既にある対象、すなわちパレット食道を既に有する患者のスクリーニングに最適に応用される。

20

【0081】

適切には、対象は、パレット食道を有する。

【0082】

適切には、対象は、表面サンプリングされた食道細胞のTFF3についての試験が陽性である。

【0083】

一実施形態では、TFF3についての試験が、本発明の試験(パネル)に先行してよい。これは、有用な内部対照として働く。対象がパレット食道を有することがわかっていた場合、その表面サンプリングされた細胞は、TFF3についての試験が陽性のはずである。よって、パレット食道を有することがわかっている対象の食道の表面試料のTFF3についての試験が陰性である場合、このことは、試料が不適切(例えば細胞が不十分、又は円柱細胞の欠如、又は何らかのその他の問題)であることを示し得る。対象の食道の表面から再サンプリングし、TFF3について再試験し、パレット食道を有する患者からの信頼できる/堅固な試料を示すTFF3についての陽性の結果が観察された場合にのみ本発明のパネルを用いる試験に進むことが推奨される。

30

【0084】

本発明者らは、中でも、1,000名の患者を採用することを目的として、多施設前向き症例対照研究であるBEST2を設計し、この試験は、内視鏡検査と比較して、パレット食道を診断するためのCytosponge(商標)の性能特性を試験するために行った。さらに、BEST2のうちで、リスク階層化バイオマーカーのパネルをCytosponge(商標)で評価して、異形成の内視鏡検査の程度に従って患者のリスクを階層化するそれらの能力を決定する。リスク階層化バイオマーカーのパネルは、4つの異なるバイオマーカー、すなわちp53タンパク質レベル、c-MYCタンパク質レベル、オーロラキナーゼA(AURKA)タンパク質レベル並びにRunt関連転写因子3(RUNX3)及び筋原性分化1(MYOD1)遺伝子のプロモーター領域のメチル化からなる。パネルは、第5マーカーである非定型性をさらに含んでいてもよい。

40

【0085】

50

試料及び試料の回収

適切には、試料は、関心のある対象からの細胞を含む。適切には、試料は、対象とする対象からの食道細胞を含む。適切には、試料は、内視鏡検査によらず、すなわち試料は、適切には、内視鏡を用いることなく得られる。

【0086】

内視鏡検査によるサンプリングは、侵襲的な技術である。さらに、内視鏡検査によるサンプリングは、生検を食道に沿って間隔を置いて採取するか、又はオペレータが損傷を視覚的に同定する標的化技術であり、特に生検を目標とする。

【0087】

適切には、本発明は、内視鏡検査による生検のような内視鏡検査による試料を含まない。

10

【0088】

本発明の重要な原理は、食道異常に特異的な試験を提供することである。試験は、正常扁平上皮食道又は胃噴門（胃）のような無関係の組織の細胞からの問題がある擬陽性のレベルをもたらさない意味において特異的である。よって、これらの特定の特徴を有する試験を提供することにより、本発明は、異常食道細胞の検出を目標とする試験を有利に提供する。このようにして、本発明は、標的化試料回収の必要性を有利に回避する。よって、本発明は、疑いのある損傷の領域（パレット食道）のみを標的にするよりもむしろ食道の表面全体をサンプリングするような非標的化試料回収により得られる試料を有利に含む。

【0089】

20

よって、適切には、試料は、内視鏡検査による生検を含まない。

【0090】

適切には、試料は、食道ブラッシング又は表面細胞を含んでよい。食道ブラッシングは、内視鏡又はその他の手段を用いて得ることができる。適切には、試料が食道ブラッシングを含む場合、食道ブラッシングは、内視鏡検査によらない手段により得られる。

【0091】

適切には、試料は、対象の上部腸管の表面からの細胞を含む。

【0092】

適切には、試料は、対象の上部腸管の表面からの細胞からなる。

【0093】

30

適切には、試料は、食道管腔全体からサンプリングした細胞を含んでよい。

【0094】

適切には、試料は、食道細胞及び非食道細胞の両方を含んでよい。

【0095】

適切には、試料は、胃噴門細胞と一緒に食道細胞を含んでよい。

【0096】

適切には、試料は、食道細胞からなってよい。

【0097】

適切には、試料は、対象の食道の表面からの細胞を含む。

【0098】

40

適切には、試料は、対象の食道の表面からの細胞からなる。

【0099】

最も適切には、試料は、カプセルスポンジ型サンプリング技術を用いて回収された細胞を含んでよい。

【0100】

特に適切なサンプリング技術を、実施例の項に記載する。

【0101】

適切な試料の例は、食道ブラッシング（内視鏡検査により又は内視鏡検査によらずに得られたものいずれか）、バルーン細胞診により得られた試料、カプセルスポンジサンプリングにより得られた試料を含む。最も適切には、試料は、カプセルスポンジサンプリング

50

により得られた細胞を含む。

【0102】

マーカーのパネルは、管腔表面細胞に関係する。このことは、分析される試料が、食道管腔の表面から回収されることのみを必要とすることを意味する。このことは、内視鏡生検のような生検の必要性を有利に回避する。さらに、このことは、分析される試料において組織構造を保存する必要性を有利に回避する。

【0103】

本発明のマーカーのさらなる利点は、これらのマーカーが胃粘膜（例えば胃噴門/胃）から回収された細胞により生じる擬陽性を回避するように選択されていることである。このことは、胃粘膜の細胞が試料に含まれているならば、パネルが食道異常の検出態様としてまだ機能できるという特定の利点を有する。これは、マーカーが胃粘膜細胞では見出されず、よって試料が胃粘膜の細胞を含んでいても擬陽性が生じないからである。

【0104】

よって、本発明者らによるパネルの中のマーカーの選択は、食道異常についてスクリーニングするためのいずれの従来技術のアプローチによってもまだ提供されていない程度の特異性をもたらすことが認識できる。本発明者らは、このような焦点を当てた識別ができるパネルを最初に能動的に探求し、もたらすことに成功した。

【0105】

以前の臨床研究（例えばUKでの参照番号：CI/2007/0053）で用いられた非内視鏡カプセルスポンジデバイスを試料回収のために用いてよい。予備的研究は、このデバイス（「Cytosponge（商標）」）が、患者に許容され、プライマリケアで用いることができたことを実証した。デバイスは、紐につながれ、ゼラチンカプセルに内包されたポリウレタンスポンジからなる。カプセルは嚥下され、胃の中で3～5分後に溶解する。

【0106】

適切には、回収された細胞診標本は、処理してペレットにし、ペレットを、次いで、パラフィンに包埋して、そのことにより組織構造を保存する。これは、次いで、組織診評価を受けることができ、さらに、複数の分子及び/又は形態マーカーを単一試料に対して用いてよい。よって、この態様の試料回収は、本発明で用いるために特に適切である。

【0107】

細胞は、嚥下可能な研磨性の材料を用いて食道の表面から適切にサンプリングされ、該材料を患者から回収し、そこからその後、マーカーの存在を決定するための分析のために細胞を分離する。

【0108】

好ましくは、食道の実質的に全表面、好ましくは全表面がサンプリングされる。

【0109】

研磨性とは、該材料が食道の内部表面から細胞を取り除くことができることを意味する。明らかに、これは対象の食道で用いることを意味するので、「研磨性」は、用途に鑑みて解釈されなければならない。本発明の関係では、用語「研磨性」は、上記の意味を有し、このことは、材料を適当な量/構成で食道を通過させ、細胞が食道から取り除かれたかを決定するために材料を調べることにより試験できる。

【0110】

回収デバイスで用いられる材料は、食道に存在するいずれの異形成細胞もサンプリングするために十分に研磨性でなければならない。好ましくは、材料は、存在するいずれのパレット食道又は異形成又は腺癌の細胞もサンプリングするために十分に研磨性である。最も好ましい実施形態では、好ましくは、材料は、食道全体をサンプリングできるように十分に研磨性であり、すなわち、そのことにより、いくらかの扁平上皮細胞が、存在し得る任意のパレット食道及び/又は円柱状及び/又は腺癌の細胞と一緒に回収される。このことは、扁平上皮細胞が異形成細胞よりも取り除くことが困難であるので、それらのサンプリングが、正常扁平上皮細胞が材料により取り除かれるならば、正常扁平上皮細胞よりも取り除くことが容易なパレット食道又は異形成細胞（存在するならば）のような対象とす

10

20

30

40

50

る細胞をサンプリングしなかった可能性が、よって、小さいという対照をオペレータにもたらずので、有利である。

【0111】

好ましくは、嚥下可能な研磨性の材料は、膨張可能である。この実施形態では、好ましくは、研磨性の材料は、取り出されるときよりも嚥下されるときのサイズがより小さい。膨張性の材料は、単に、圧縮から解放された場合に、ほぼ非圧縮サイズまで膨張して戻るように圧縮された弾力性の材料であってよい。代わりに、これは、例えば、その元のサイズを超える最終サイズまで水性流体を吸い上げることにより膨張する材料であってよい。

【0112】

言い換えると、好ましくは、デバイスの材料は、嚥下と取り出しとの間にサイズが膨張、膨潤、増長、又は増加する。好ましくは、デバイスは、自己膨張可能であり、すなわち、嚥下と膨張との間にさらなる介入を必要としない。好ましくは、デバイスは、増長可能でない。好ましくは、デバイスは、嚥下の後の拘束を取り除いた後に、折り畳みがほどこれるか、広がるか、巻かれたものがほどこれるか又はサイズが成長することにより膨張する。好ましくは、デバイスの材料は、圧縮性であり、嚥下の後にほぼ非圧縮サイズのサイズに戻る。好ましくは、デバイスは、解除可能なように圧縮状態に拘束されている圧縮材料で構成される。好ましくは、材料は、嚥下の後に拘束から解放されて、取り出し前にデバイス/材料の膨張を可能にする。

10

【0113】

好ましくは、デバイスは、カプセルの形に圧縮された圧縮性の材料を含む。好ましくは、圧縮性の材料は、スポンジ材料の形である。好ましくは、圧縮スポンジは、カプセル塗膜のような可溶性及び/又は消化性の塗膜で少なくとも部分的に囲まれている。好ましくは、スポンジは、不消化性である。好ましくは、カプセル塗膜は、少なくとも部分的にゼラチンで形成される。好ましくは、カプセル塗膜は、完全にゼラチンで形成される。

20

【0114】

一実施形態では、デバイスが対象の中で失われた場合の安全性を増すために、デバイス全体を消化性の材料で作ることが望ましいことがある。もちろん、研磨性の材料は、カプセルよりも遅い速度で消化されることが必要であり、紐は、同様に遅く消化されることが必要であると考えられる。好ましくは、研磨性の材料は、非消化性である。好ましくは、紐は、非消化性である。

30

【0115】

好ましくは、研磨性の材料は、ポリウレタン、好ましくはポリウレタンスポンジを含む。

【0116】

適切には、前記研磨性の材料は、圧縮性である。適切には、前記研磨性の材料は、網状ポリウレタンを含む。

【0117】

適切には、材料は、均一の形状を有する。

【0118】

適切には、材料は、均一の直径を有する。

40

【0119】

適切には、非圧縮形状は、球状のような円形である。

【0120】

適切には、非圧縮直径は、3 cmである。

【0121】

適切には、前記紐は、研磨性の材料の表面より下に配置された紐の輪により前記研磨性の材料につながれ、前記輪は、ひっかけ結びにより閉じられている。

【0122】

適切には、前記研磨性の材料は、圧縮され、ここで、前記研磨性の材料は、可溶性カプセルにより圧縮状態を保つ。

50

【0123】

適切には、前記可溶性カプセルは、ゼラチンカプセルを含む。

【0124】

適切には、前記カプセルは、溶解でき、圧縮性と研磨性の材料は、摂氏30度の水に浸漬した場合に5分以内に非圧縮サイズに戻ることができる。

【0125】

好ましくは、デバイスは、カプセルスポンジである。明細書から明らかなように、カプセルスポンジは、研磨性の材料として圧縮性のスポンジを含むデバイスであって、該スポンジが、カプセル形状に圧縮され、該カプセル形状圧縮スポンジが、好ましくは、ゼラチンのような可溶性及び/又は消化性の材料の少なくとも部分的な塗膜により圧縮状態に可逆的に拘束されているデバイスである。好ましくは、デバイスは、国際公開第2011/058316号パンフレットに記載されるようなカプセルスポンジである。

10

【0126】

好ましくは、試料は、内視鏡検査により回収された物質を含まない。好ましくは、試料は、内視鏡検査による生検を含まない。好ましくは、試料は、内視鏡検査によるブラッシングを含まない。

【0127】

サンプリングが、食道のいずれの特定の部分にも向けられず、例えば視覚的に向けられず、むしろスポンジが食道の表面全体に沿って掻き取り、管から細胞の不均質な試料を得ることが、本発明の特徴である。内視鏡検査による生検（表面のおよそ1%をサンプリングする）又は内視鏡検査によるブラッシングのような従来技術により達成されるよりも大きい割合の食道の表面がサンプリングされることが、本発明のさらなる利点である。

20

【0128】

好ましくは、食道表面の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%がサンプリングされる。最も好ましい実施形態では、好ましくは、実質的に食道全体がサンプリングされ、好ましくは、食道の内部管腔全体がサンプリングされる。このことは、例えば本発明の方法が試料の回収を含まないインビトロでの試料に対しても等しく当てはまる。

30

【0129】

適切には、試料は、インビトロでの試料である。

【0130】

適切には、試料は、体外試料である。

【0131】

適切には、食道のような上部腸管の細胞表面のサンプリングは、
(i) 食道の表面から細胞を回収できる研磨性の材料を含む嚥下可能なデバイスを対象に導入するステップと、
(ii) 前記デバイスを、食道を通して取り出すことにより取り戻すステップと、
(iii) デバイスから細胞を回収するステップと

40

【0132】

好ましくは、ステップ(i)は、食道の表面から細胞を回収できる研磨性の材料を含む嚥下可能なデバイスを対象の胃に導入することを含む。

【0133】

適切には、試料は、白人のヒト対象からである。

【0134】

適切には、試料は、逆流の履歴がある対象からである。

【0135】

適切には、試料は、男性対象からである。

50

【0136】

適切には、試料は、肥満対象からである。

【0137】

本発明の方法

一実施形態では、適切には、方法は、インビトロでの方法である。一実施形態では、適切には、方法は、体外法である。一実施形態では、適切には、細胞の実際のサンプリングは、本発明の方法の一部でない。適切には、方法は、細胞の回収を含まない。

【0138】

適切には、試料は、以前に回収された試料である。適切には、方法は、細胞がアッセイされる対象の存在を必要としない。適切には、試料は、インビトロでの試料である。適切には、方法は、狭義での実際の医療判断を含まない。このような狭義での判断は、典型的に、医師により行われる。

【0139】

適切には、本発明の方法は、インビトロで行われる。適切には、本発明の方法は、体外で行われる。

【0140】

本発明で用いられるマーカー

【0141】

【表 1】

マーカー	略称	受託番号/配列	コメント
トレフォイル因子3	TFF3	NM_003226.2	タンパク質
p53腫瘍抑制因子	p53	NM_000546	タンパク質
p53腫瘍抑制因子	p53	NM_000546 (最も適切には、以下に完全に示すバージョンNM_000546.5)	核酸
c-Myc癌遺伝子	c-Myc	NM_002467	タンパク質
オーロラキナーゼA	AURKA	NM_198434 最も適切には、AURKA受託番号/配列は、NP_003591.2であり、これは、用いた例示的抗体と結合しているAURKAに対応する(実施例を参照されたい)	タンパク質
セリン/トレオニン-プロテインキナーゼPLK1	PLK1	NP_005021.2	タンパク質
筋原性分化1	MyoD1	NM_002478 (標的を規定するプライマー配列について実施例を参照されたい)	核酸のメチル化
Runt関連転写因子3	Runx3	NM_001031680 (標的を規定するプライマー配列について実施例を参照されたい)	核酸のメチル化

10

20

30

40

【0142】

Genbank受託番号は、本出願の出願日、すなわち2013年2月21日の時点でのデータベースを参照して示す。いずれのさらなる補佐が必要な場合も、好ましくは、ここに示す受託番号は、2013年2月15日のGenbank公開番号194.0を参照するべきである。

【0143】

説明のために、例示的なp53配列を、GenBankから取得したとおりに以下に示す。

【0144】

ホモ・サピエンス (Homo sapiens) 腫瘍タンパク質 p53 (TP53)、転写バリエーション 1、mRNA

50

N C B I 参照配列 : N M _ 0 0 0 5 4 6 . 5

受託番号 N M _ 0 0 0 5 4 6

バージョン N M _ 0 0 0 5 4 6 . 5

起源

1 gatgggattg gggttttccc ctcccatgtg ctcaagactg gcgctaaaag ttttgagctt
61 ctcaaaagtc tagagccacc gtccagggag caggtagctg ctgggctccg gggacacttt
121 gcgttcgggc tgggagcgtg ctttccacga cggtgacacg cttccctgga ttggcagcca
181 gactgccctc cgggtcactg ccatggagga gccgcagtca gatcctagcg tcgagccccc
241 tctgagtcag gaaacatttt cagacctatg gaaactactt cctgaaaaca acgttctgtc
301 ccccttgccg tcccaagcaa tggatgattt gatgctgtcc ccggacgata ttgaacaatg
361 gttcactgaa gaccaggtc cagatgaagc tcccagaatg ccagaggctg ctccccccgt
421 ggcccctgca ccagcagctc ctacaccggc ggcccctgca ccagcccctt cctggcccct
481 gtcatcttct gtcccttccc agaaaacctt ccagggcagc tacggtttcc gtctgggctt
541 cttgatttct gggacagcca agtctgtgac ttgcacgtac tcccctgccc tcaacaagat
601 gttttgccaa ctggccaaga cctgccctgt gcagctgtgg gttgattcca ccccccgcc
661 cggcaccgcg gtccgcgcca tggccatcta caagcagtca cagcacatga cggaggttgt
721 gaggcgctgc ccccacatg agcgctgctc agatagcgat ggtctggccc ctctcagca
781 tcttatccga gtggaaggaa atttgcgtgt ggagtatttg gatgacagaa acacttttctg
841 acatagtggt gtggtgccct atgagccgcc tgaggttggc tctgactgta ccaccatcca
901 ctacaactac atgtgtaaca gttcctgcat gggcggcatg aaccggaggc ccatctcac
961 catcatcaca ctggaagact ccagtggtaa tctactggga cggaacagct ttgaggtgcg
1021 tgtttgtgcc tgtcctggga gagaccggcg cacagaggaa gagaatctcc gcaagaaagg
1081 ggagcctcac cagcagctgc ccccagggag cactaagcga gcactgccc acaacaccag
1141 ctctctctcc cagccaaaga agaaaccact ggatggagaa tatttcaccc ttcagatccg
1201 tgggcgtgag cgcttctgaga tgttccgaga gctgaatgag gccttggaac tcaaggatgc
1261 ccaggctggg aaggagccag gggggagcag ggctcactcc agccacctga agtccaaaaa
1321 gggtcagtct acctcccgcc ataaaaaact catgttcaag acagaagggc ctgactcaga
1381 ctgacattct ccacttcttg ttccccactg acagcctccc accccatct ctccctcccc
1441 tgccattttg ggttttgggt ctttgaacct ttgcttgcaa taggtgtgcg tcagaagcac
1501 ccaggacttc catttgcttt gtcccgggc tccactgaac aagtggcct gcactgggtg
1561 tttgtgtgg ggaggaggat ggggagtagg acataccagc ttagatttta aggtttttac
1621 tgtgagggat gtttgggaga tgaagaaat gttcttgag ttaagggtta gtttacaatc
1681 agccacattc taggtagggg cccacttcac cgtactaacc agggaagctg tccctcactg
1741 ttgaattttc tctaacttca aggccatat ctgtgaaatg ctggcatttg cacctacctc
1801 acagagtgca ttgtgagggt taatgaaata atgtacatct ggccctgaaa ccacctttta
1861 ttacatgggg tctagaactt gacccccttg aggggtgctg ttccctctcc ctgttggctg
1921 gtgggttgg agtttctaca gttgggcagc tggtaggta gagggagtig tcaagtctct
1981 gctggcccag ccaaaccctg tctgacaacc tcttggtgaa ccttagtacc taaaaggaaa
2041 tctcacccca tcccacacc tggaggattt catctcttgt atatgatgat ctggatccac
2101 caagacttgt tttatgctca gggcaattt ctttttctt ttttttttt ttttttctt
2161 ttctttgaga ctgggtctcg ctttgttgcc caggctggag tggagtggcg tgatcttggc
2221 ttactgcagc ctttgccctc ccggctcgag cagtccctgcc tcagccctcg gagtagctgg
2281 gaccacaggt tcatgccacc atggccagcc aacttttgca tgtttttag agatggggctc
2341 tcacagtgtt gccaggtctg gtctcaaaact cctgggctca ggcatccac ctgtctcagc
2401 ctcccagagt gctgggatta caattgtgag ccaccacgtc cagctggaag ggtcaacatc
2461 ttttacattc tgcaagcaca tctgcatttt caccaccacc ttcccctcct tctccctttt
2521 tataatccat tttatatacg atctcttatt ttacaataaa actttgctgc cacctgtgtg
2581 tctgaggggt g

10

20

30

40

【 0 1 4 5 】

非定型性

50

非定型性は、観察により評価される。

【0146】

適切には、細胞を観察の前に染色する。適切には、細胞は、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）染色を用いて染色する。このことは、慣習的で長く確立された組織診に従って細胞を互いに容易に区別する利点がある。

【0147】

標準的な組織診/細胞診を用いて、細胞を見分ける。

【0148】

スコア化は、ウィーンスケールに従って行う。

【0149】

本発明の関係では、異常は、ウィーンスケールに従って判断する。よって、本発明のマーカのパネルに加えて任意選択の余分のマーカとして非定型性をアッセイする場合に細胞のこれらの異常カテゴリーの1又は2以上を観察することは、その分析において非定型性マーカについて「異常」を見出したことが記録されたことを意味する。

【0150】

本発明のパネルの4つのマーカに加えて非定型性もアッセイしていてもよいことの利点は、感度及び/又は特異性の増加を得ることができることである。

【0151】

いずれのさらなる補佐が必要な場合も、Winifred GrayによるDiagnostic Cytopathology第2版のようなこの分野での標準的な参考書が参照される。さらに又は代わりに、Cecilia M. Fenoglio-Preiser、Amy E. Noffsinger、Grant N. Stemmermann、Patrick E. Lantz、Peter G. IsaacsonによるGastrointestinal Pathology An Atlas and Textbook第3版のような参考書を用いてよい。これらの参考書は、本明細書で言及する細胞型の特徴について示す項について、参照により本明細書に具体的に組み込まれている。任意のその他の慣習的な細胞診/組織診の手引きも、必要であれば用いてよい。

【0152】

ヘマトキシリン及びエオシン（H & E , hematoxylin & eosin）

ヘマトキシリン及びエオシン染色は、一方は核を染色し、他方は細胞質及び結合組織を染色する2つの別々の色素を用いる。ヘマトキシリンは、濃い紫がかった色素で、核内のクロマチン（核物質）を染色して、濃い紫がかった青にする。エオシンは、オレンジがかったピンク～赤の色素で、結合組織及びコラーゲンを含む細胞質物質を染色して、オレンジ-ピンクに対比染色する。この対比染色は、核の紫がかった青の核染色と鮮明な対比として作用して、細胞膜（境界）、赤血球及び体液のような組織中のその他の物体を同定する助けとなる。

【0153】

染色プロセスは、試料の水和（必要であれば）、核色素（ヘマトキシリン）での染色及びすすぎ、そして対比染色（エオシン）を含む。これらはすすがれ、必要であれば脱水され（例えば水、次いでアルコール、次いでキシレンで処理する）、例えばカバーガラスを加えることにより観察のための準備がなされる。

【0154】

進行的/退行的染色

H & E 染色を実行するための2つの方法がある。スライドをヘマトキシリン中に入れ、次いですすぎ、エオシン中に入れる進行的方法と、スライドをより強い型のヘマトキシリン中に入れ、次いで酸アルコール中で、核以外の全てからヘマトキシリンを取り出して区別し、次いでエオシン中に入れる退行的方法である。両方の型の染色では、青み付け溶液（スコットの水道水又はアンモニア水）を用いて、核を濃い紫がかった青色に染色してもよい。

【0155】

進行的染色では、より穏やかな形のヘマトキシリンを用い、これは、細胞の核のみを染色し、水ですすいだ場合に核物質をより濃い青にする。この方法を用いて、技術者は、単

10

20

30

40

50

純に染色し、すすぎ、次のステップに移ることができる。この方法の利点は、単純さ、ステップがより少ないこと、及び酸アルコール中での過剰/過少区別の可能性を回避することである。染色のレベル又は色は標準化されており、一貫している。進行的染色は、自動化がより容易であるという利点を有する。

【0156】

進行的染色のためのヘマトキシリン製品は、Sigma社（Sigma Aldrich社）からのように市販で入手可能であり、ギルの1号、ギルの2号、ギルの3号及びマイヤーのヘマトキシリンを含む。3つのギル染色の違いは、ヘマトキシリンの強度である。ギルの1号は、組織でなく体液懸濁物からの個別の細胞を染色するので、より弱いヘマトキシリンが適切である細胞診染色のために主に用いられる。ギルの2号及び3号は、より強く、組織診染色のために一般的に用いられる。これらは、組織構造のために開発されている。ギルの2号又は3号を用いるかの選択は、当業者の好みの問題である。

10

【0157】

退行的染色では、ハリスヘマトキシリンと呼ばれるより強い形のヘマトキシリンを用いる。ハリスヘマトキシリンは、スライド上の全てを染色し、すすいだ場合に組織に保持される。よって、染色及び水でのすすぎの後の次のステップは、区別するか又は核以外の全てから過剰のヘマトキシリンを取り出すことである。スライドを、穏やかな酸アルコール溶液中で攪拌すると、酸アルコール溶液が過剰のヘマトキシリンをゆっくりと取り除く。区別した後に、スライドをすすぎ、青み付け溶液（スコットの水道水又はアンモニア水）の中に入れ、このことにより、核が濃い紫がかかった青色になる。

20

【0158】

退行的染色のためのヘマトキシリン製品は、Sigma社（Sigma Aldrich社）からのように市販で入手可能であり、ハリスヘマトキシリンを含む。

【0159】

ヘマトキシリン染色後に、試料をすすぎ、エオシン中で染色する。必要であれば、これらを、強度に勾配をつけたアルコールを用いて脱水し、キシレン中で透明にし、最後に、例えばカバーガラス及び/又は永久標本用封入剤を用いて観察のための準備をしてよい。

【0160】

エオシン製品は、Sigma社（Sigma Aldrich社）からのように市販で入手可能であり、エオシンY、エオシンYアルコール性、エオシンY-フロキシンを含む。3種のギルの染色と同様に、エオシンは、その強度及び色の濃さで区別される。エオシンYは、3つのうちで最も弱く、細胞質及びコラーゲンをピンクに染色する。エオシンYアルコール性は、より強い染色であり、そのアルコール成分のために、より鮮やかなオレンジがかかった赤色を与える。エオシンY-フロキシンは、最も強い染色であり、フロキシンの添加により、圧倒的な赤色を有する。エオシンの選択は、当業者によるが、エオシンY-フロキシンは、標準的な組織診のためには赤すぎると一般的に考えられる。よって、適切には、用いるエオシンは、エオシンYアルコール性である。

30

【0161】

特定の細胞型についての分子マーカーの使用を回避できることが、ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色の利点である。

40

【0162】

参照標準

本発明は、あるマーカーの「異常」レベルの決定を必要とする。「異常」は、参照標準との比較により定義してよい。

【0163】

本発明の関係では、参照標準は、対象の試料中に存在する発現レベル/メチル化レベル/非定型性を比較できる、比較の対象として機能する。参照標準は、対象となる試料と並行して分析される健常対象からの試料を含んでよい。代わりに、前記参照標準は、比較するための前記バイオマーカーの発現レベルの値を与えるように健常対象から採取された試料から以前に決定された前記バイオマーカーについての発現レベルの値を含んでよい。こ

50

のことは、方法を行うごとに参照試料の並行した分析を行うことを必要としないという利点がある。適切には、健常者は、例えば年齢、性別、体重及び任意のその他の関連するパラメータのような人口統計学的特徴が考慮する対象と類似する個体である。

【0164】

参照標準は、経時的に決定された前記バイオマーカーについての平均としての発現レベルの値の組であってもよい。このことは、方法を実行するごとに別の個体からの試料を採取して測定する実際上の問題を排除するという利点を有する。適切には、経時的に決定された前記バイオマーカーについての平均としての発現レベルの値の前記組は、年齢、性別、体重などのような医療的特徴により分割された異なるカテゴリーに分割して、調べられる特定の対象についてのより直接的な比較できる値の組を提供できる。

10

【0165】

本発明のタンパク質マーカーについて、それらの染色は、本明細書に記載するようにしてスコア化される。スコア化システムは、正常/異常を既に考慮している。よって、染色をスコア化することによる絶対的な類別により、各分析についての直接的参照標準の必要性は、有利に任意選択となる。

【0166】

メチル化について、MethyLightスコアは、実施例の項に記載するような本明細書に記載するようにして評価した場合、異常と見なされる。

【0167】

用いるための例示的なメチル化カットオフは、0.02604である。これは、本発明を実行するオペレータによる必要性に応じて変動してよい。Methylightアッセイについて、例示的なカットオフ(メチル化カットオフ)は、0.01~0.31の範囲である。これもまた、本発明を実行するオペレータによる必要性に応じて変動してよい。

20

【0168】

参照配列

数値アドレスを用いて特定のアミノ酸残基に言及する場合、番号付けは、全長アミノ酸配列を参照配列として用いて行われる。対象となる残基を位置付けるために当該技術においてよく理解されていることと同様に、このことが行われる。このことは、常に厳密な計数を行うことではなく、文脈に注意すべきである。例えば、ヒトp53のような対象となるタンパク質がわずかに異なる長さのものである場合、特定の残基に対応するp53配列中の正しい残基の場所は、対象となる配列の同一の番号を有する残基を単に選ぶのではなくむしろ、配列を整列させ、等価又は対応する残基を選び出すことを必要とすることがある。このことは、十分に当業者の範囲内である。

30

【0169】

さらに、本発明の関係では、記載されるものに対応する特定のポリペプチド配列を検出することが重要である。このような検出のための技術及び/又は試薬は、広く入手可能であり、及び/又は入手若しくは作製することが容易である。例示的な材料及び技術は、実施例の項に示す。特定のポリペプチド、例えば特定の遺伝子のポリペプチド生成物の検出は、適切には、タンパク質検出のレベルで考慮される。これは、特定の又は精密に100%同一アミノ酸配列の決定ではなくむしろ、タンパク質の発現の問題である。例示的なアミノ酸配列を、検出されるポリペプチドについての手引きとして示し、これらの精密な全長100%同一アミノ酸配列のみの決定に本発明を制約することを意図しない。よって、対立遺伝子バリエーションのようなバリエーション、ポリペプチドの基本的な同一性を変更しない点突然変異又は短い付加若しくは欠失のような変異体、或いはスプライスバリエーション、切断又は成熟タンパク質のような断片、翻訳後修飾タンパク質或いはその他のこのような一般的な形は、開示している様々なバイオマーカータンパク質の存在/非存在又は発現レベルを決定する事項の範囲内であると考えられる。

40

【0170】

断片は、適切には少なくとも10アミノ酸の長さ、適切には少なくとも25アミノ酸、適切には少なくとも50アミノ酸、適切には少なくとも100アミノ酸、適切には少なく

50

とも200アミノ酸、適切には対象となるポリペプチドの大部分である。適切には、断片は、対象となるポリペプチドのモチーフ全体又はドメイン全体を含む。

【0171】

配列相同性 / 同一性

配列相同性は、機能的類似性（すなわち類似の化学的特性 / 機能を有するアミノ酸残基）の点で考慮することもできるが、本書面の関係では、相同性を配列同一性の点で表すことが好ましい。

【0172】

配列比較は、目で、又はより一般的には、容易に入手可能な配列比較プログラムの補助により行うことができる。これらの公共及び市販で入手可能なコンピュータプログラムは、2又は3以上の配列間のパーセント相同性（例えばパーセント同一性）を算出できる。

【0173】

パーセント同一性は、連続する配列にわたって算出してよく、すなわち、一方の配列を他方の配列と整列させ、一方の配列中の各アミノ酸を、他方の配列中の対応するアミノ酸と、1回に1残基ずつ直接比較する。このことは、「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。典型的に、このようなギャップなしアラインメントは、比較的短い数の残基（例えば50未満の連続するアミノ酸）にわたってのみ行われる。より長い配列にわたる比較について、ギャップスコア化を用いて、最適なアラインメントを得て、互いに対して挿入又は欠失を有する関連する配列における同一性レベルを正確に反映する。このようなアラインメントを行うための適切なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（University of Wisconsin, U.S.A; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387）である。配列比較を行うことができるその他のソフトウェアの例は、それらに限定されないが、BLASTパッケージ、FASTA（Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410）及び比較ツールのGENEWORKSスイートを含む。

【0174】

本書面の関係では、相同アミノ酸配列は、少なくとも40、50、60、70、80又は90%同一であるアミノ酸配列を含む。最も適切には、対象となるバイオマーカーに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを、そのバイオマーカーの存在を示すと見なし、より適切には、アミノ酸レベルで95%以上、又はより適切には98%同一であるポリペプチドを、そのバイオマーカーの存在を示すと見なす。適切には、前記比較は、対象となるバイオマーカーの存在又は非存在を決定するためにアッセイされるポリペプチド又は断片の少なくとも長さによって行われる。最も適切には、比較は、対象となるポリペプチドの全長にわたって行われる。核酸ヌクレオチド配列について、同じ考慮を当てはめる。

【0175】

利点

Rugge, M., Fassan, M., Zaninotto, G., Pizzi, M., Giacomelli, L., Battaglia, G., Rizzetto, C., Parente, P., and Ancona, E. (2010). Aurora kinase A in Barrett's carcinogenesis. Hum Pathol 41, 1380-1386の主な焦点であるようなmRNA研究は、「正常」レベルを確立することが困難である。カットオフ値を定義することは、挑戦的である。結果を信頼あるものにするためには、非常に大きい標本サイズが必要である。広い範囲の発現レベルが観察される。mRNA発現レベルは、タンパク質発現レベルと関連しないことがある。mRNAは、Cytospongeで回収された試料で分解し得る。タンパク質は、より安定である。Rugge et alは、パレット食道での異形成の診断のためのAURKAの使用について言及していない。プライマリケアの環境では、試料は、回収され、冷蔵庫に貯蔵され、郵便で送られ、やっと実験室に試験のために到着する。本発明の利点は、シグナルがこのような試料処理の間に損なわれないことである。Rugge et alは、IHCによりAKAを測定し、p53とも関連させている。Rugge et alでの主な欠点は、AKAを主要な細胞質染色として報告していることである。このことは、AKAが核内で機能し、よってRugge et alの細胞質染色が信頼できるように見えないので、非常に問題がある

10

20

30

40

50

。Rugge et alが用いる A b は、Epitomics社からであり、これは、非特異的で信頼できない結果が生じる可能性が高いと考えられる。対照的に、我々は、核染色を示す。例えば、本発明者らは、Millipore社からの抗体を用いる。本発明者らは、抗体の特異性について確認している。

【 0 1 7 6 】

適切には、m R N A は、本発明における分析のために用いない。

【 0 1 7 7 】

適切には、本発明で用いる抗体は、アッセイされるタンパク質に特異的である。

【 0 1 7 8 】

Liu et al 2008は、中国人患者からの癌のパネルを研究している。中国では、食道癌の > 9 0 % が扁平上皮細胞癌である。よって、著者らは、バレット食道から腺癌への進行とともにではなく、食道の扁平上皮細胞癌の p 5 3 の発現を実証している。

10

【 0 1 7 9 】

Agnese et al 2007は、オーロラキナーゼ A 及び p 5 3 が腸化生を有するバレット食道と胃化生を有するバレット食道との区別を補助できるかを評価しようとしている。要約での結論は、いずれの有意な結果を得るには研究が小さすぎると述べている。いずれにしても、対照的に、本発明は、例えばバレット食道における異形成 / 癌の検出に関し、これは、胃化生と腸化生とを区別しようとする Agnese et al の試みとは別問題である。Agnese et al は、R N A 転写産物レベルを測定し、オーロラキナーゼ A のタンパク質レベルを調べていない。R N A 転写産物レベルは、翻訳後修飾のために、必ずしもタンパク質と解釈され 20
ない。本発明者らは、R N A に依拠して、これが良好なタンパク質レベルバイオマーカーであるとは言わない。多数の候補マーカーがこの段階で落とされ、すなわち良好なタンパク質バイオマーカーを生じない。

20

【 0 1 8 0 】

本発明を、ここで、番号付けした段落により記載する。

【 0 1 8 1 】

i . 対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b) 前記細胞を、

30

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A 又は P L K 1、好ましくは A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

から選択される少なくとも 2 つのマーカーについてアッセイするステップと

を含み、

前記マーカーの少なくとも 2 つの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する方法。

【 0 1 8 2 】

ii . ステップ (b) が、

40

(1) 細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A 又は P L K 1、好ましくは A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

から選択される少なくとも第 1 の分子マーカーを検出するための試薬と接触させることと

、

(2) 前記細胞を、(i) ~ (iv) から選択される少なくとも第 2 の分子マーカーを検出するための試薬と接触させることと

を含む、段落 i に記載の方法。

50

【 0 1 8 3 】

iii. 表面異常が、軽度異形成 (L G D)、高度異形成 (H G D)、無症候性食道腺癌 (O A C) 及び粘膜内癌 (I M C) からなる群から選択される、段落 i 又は段落 iii に記載の方法。

【 0 1 8 4 】

iv. マーカーのうち少なくとも 3 つの異常レベルがアッセイされる、段落 i 又は段落 iii に記載の方法。

【 0 1 8 5 】

v. マーカーのうち少なくとも 4 つの異常レベルがアッセイされる、段落 i ~ iv のいずれかに記載の方法。

【 0 1 8 6 】

vi. 細胞を非定型性についてアッセイするステップをさらに含む、段落 i ~ v のいずれかに記載の方法。

【 0 1 8 7 】

vii. 細胞が、食道の表面の不偏サンプリングにより回収される、段落 i ~ vi のいずれかに記載の方法。

【 0 1 8 8 】

viii. 細胞が、カプセルスポンジを用いて回収される、段落 vii に記載の方法。

【 0 1 8 9 】

ix. 細胞が、分子マーカーを検出するための試薬と接触させる前に、(i) 細胞を遠心分離によりペレットにするステップと、(ii) 細胞を血漿に再懸濁するステップと、(iii) トロンピンを加え、血餅が形成されるまでインキュベーションするステップとにより調製される、段落 i ~ viii のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 0 】

x. 血餅をホルマリン中でインキュベートし、処理してパラフィンブロックにし、顕微鏡検査に適切な切片に薄切するステップをさらに含む、段落 ix に記載の方法。

【 0 1 9 1 】

xi. p 5 3 が、免疫組織化学により評価される、段落 i ~ x のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 2 】

xii. c M y c が、免疫組織化学により評価される、段落 i ~ xi のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 3 】

xiii. A U R K A が、免疫組織化学により評価される、段落 i ~ xii のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 4 】

xiv. M y o D / R u n x 3 のメチル化が、MethyLight 分析により評価される、段落 i ~ xiii のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 5 】

xv. 非定型性が、ウィーンスケールに従って細胞をその形態についてスコア化することにより評価される、段落 vi に記載の方法。

【 0 1 9 6 】

xvi. 細胞を T F F 3 についてアッセイするステップが、方法のステップ (b) に先行する、段落 i ~ xv のいずれかに記載の方法。

【 0 1 9 7 】

xvii. 処置レジメンを選択するためのアッセイであって、前記アッセイが、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A ; 並びに

10

20

30

40

50

(iv) MyoD及びRunx3のメチル化から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップとを含み、前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルが検出された場合、内視鏡検査及び生検の処置レジメンを選択するアッセイ。

【0198】

xviii. (a) 対象からの食道試料を分析するように構成され、前記分析が、

(b) 前記細胞を、

(i) p53；

(ii) c - Myc；

(iii) AURKA；並びに

(iv) MyoD及びRunx3のメチル化

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイするステップ

を含む装置又はシステムであって、

出力モジュールを含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルが検出された場合、前記出力モジュールが、

前記対象についての食道における表面異常の可能性が増加していることを示す装置又はシステム。

【0199】

xix. 対象の食道の表面異常の検出の補助に関する用途のための、あるポリペプチド又はある核酸配列のメチル化を認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質の使用であって、ポリペプチド及び/又は核酸配列が、段落i~xvのいずれかで定義するとおりである使用。

【0200】

xx. それぞれが、ポリペプチド又は核酸配列の1又は2以上をそれぞれ認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質の組合せの段落xixに記載の使用。

【0201】

xxi. 対象の食道の表面異常の検出の補助において用いるためのアッセイデバイスであって、あるポリペプチド又はある核酸配列のメチル化を認識するか、それに結合するか又は親和性を有する物質を含有する場所を有する固体基材を含み、ポリペプチド及び/又は核酸配列が、段落i~xvのいずれかで定義するとおりであるアッセイデバイス。

【0202】

xxii. 生体試料中の

(i) p53；

(ii) c - Myc；

(iii) AURKA

のそれぞれの発現レベルを決定するための試薬を含み、MyoD及びRunx3のメチル化を決定するための試薬をさらに含んでもよいキット。

【0203】

xxiii. 対象の食道の表面異常の検出を補助するための方法であって、前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含むステップと、前記細胞をTFF3についてアッセイするステップであって、TFF3が試料の細胞において検出された場合、段落i~xvのいずれかに記載の方法を行うステップとを含み、TFF3の検出に加えて少なくとも1つのマーカーの異常レベルの検出が、前記対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを示す方法。

【0204】

xxiv. TFF3の検出に加えて少なくとも2つのマーカー、好ましくはTFF3の検出に加えて少なくとも3つのマーカー、好ましくはTFF3の検出に加えて少なくとも4つのマーカー、好ましくはTFF3の検出に加えて5つ全てのマーカーの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを示す、段落xxiiiに記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 5 】

xxv. 細胞が、食道の表面の不偏サンプリングにより回収される、段落xxiii又は段落xxivに記載の方法。

【 0 2 0 6 】

xxvi. 細胞が、カプセルスポンジを用いて回収される、段落xxvに記載の方法。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 0 7 】

ここで、本発明の実施形態について、添付の図面を参照してさらに記載する。図面は以下のとおりである。

【 図 1 】 4つの異なる染色強度 (0、1、2、3) でのCytosponge (商標) から得られた細胞に対する c - M Y C 染色の例を示す。 10

【 図 2 】 写真及びグラフを示す。

【 図 3 】 フローチャートを示す。

【 図 4 】 フローチャートを示す。

【 図 5 】 フローチャートを示す。

【 図 6 】 写真を示す。

【 図 7 】 研究の概要を示すフローチャートを示す。各段階で用いた試料の数を示す。各研究相のために用いた方法は、左側に示す。E A C、食道腺癌、B E、バレット食道、H G D、高度異形成。

【 図 8 】 食道腺癌における変異を示す。上の棒グラフは、示した遺伝子についての異常を有する試料のパーセンテージを示す。太字の数字は、各遺伝子についての変異の総数を示す。我々の E A C 発見及び検証コホート (併せて合計で 1 1 2 名の患者) における 4 又は 5 以上の変異を有する遺伝子を含めた。ミスセンス、ナンセンス / スプライス及び i n d e l 変異の割合を示す。下の行列は、それぞれの可能性のある遺伝子の対について両方の遺伝子に変異を有する試料の数を示す。赤色で強調した箱は、有意に同時発生する変異を示す (ベンジャミーニ - ホッホバーグ調整 p 値 < 0 . 0 5) 。 20

【 図 9 】 T P 5 3 及び S M A D 4 変異が、癌に向かう進行の境界を正確に規定するが、他の変異は、独立した疾患段階で生じると見られることを示す。A . 2 6 遺伝子からなる我々のパネルにおいて少なくとも 1 つの変異を有する未異形成 B E (N D B E , never-dysplastic BE) 患者、高度異形成 (H G D) を有する B E 患者及び E A C 患者の数を示す棒グラフ。B . E A C 発見コホート及び E A C 検証コホートで同定された反復的に変異する遺伝子 (4 試料で変異している) での変異を有する未異形成 B E、H G D を有する B E 及び E A C 試料のパーセンテージ。T P 5 3 及び S M A D 4 だけが、その変異が未異形成と異形成 B E (T P 5 3) 又は癌 (S M A D 4) との間の境界を分ける (* p < 0 . 0 5) 遺伝子である。C . B E 癌発生における境界を規定する変異についての提案するモデル。細かく区切った箱は、生じる可能性があり、疾患の任意の段階にて選択的な利点を与え得る複数のその他の変異を示す。 30

【 図 1 0 】 T P 5 3 変異を用いてCytosponge (商標) において一般的な高度異形成を有する B E を診断できることを示す。A . 胃の頂部、食道の全長及び中咽頭からの細胞のCytosponge (商標) サンプリングの模式図。B . 診断用生検についての T P 5 3 配列決定により以前に同定された既知の T P 5 3 変異についての対立遺伝子分率。これらの 4 名の患者について、変異は、Cytosponge (商標) を用いて回収された物質中でも検出できる。患者 4 は、8 ヶ月離れた 2 回の異なる機会にわたってCytosponge (商標) を嚥下し、両方のCytosponge (商標) 試料についてのデータを示す。N / A = 試料を採取しなかったので該当なし、A F = 対立遺伝子分率。C . Cytosponge (商標) 試料で同定された T P 5 3 変異の対立遺伝子分率を、3 つの患者群、すなわち非 B E、異形成を有さない B E 及び高度異形成 (H G D) を有する B E について示す。D . Cytosponge (商標) 試料について同定された T P 5 3 変異の位置を、E A C 及び B E H G D 生検コホートにおいて見出されたものと比較して、遺伝子図の上に示す。遺伝子概要上の点線は、多重化 P C R アッセイによりカバーされない 2 つの小領域 (アミノ酸 1 ~ 2 7 及び 3 6 1 ~ 3 9 3) を示す。T A、転 40 50

写活性化ドメイン、OD、オリゴマー形成ドメイン。

【0208】

さらなる特定の好ましい態様を、添付の独立請求項及び従属請求項に示す。従属請求項の特徴は、適当であれば、特許請求の範囲に明示的に記載するもの以外の組合せで、独立請求項の特徴と組み合わせてよい。

【0209】

機能を提供するために操作可能であるとして装置の特徴が記載される場合、このことは、その機能を提供するか又はその機能を提供するように適合若しくは構成された装置の特徴を含むと認識される。

[実施例]

【実施例1】

【0210】

マーカーの選択

4つの分子リスク階層化バイオマーカー（と、場合によって5番目の非定型性マーカー）を選択するいくつかの理由があったが、その例を以下に示す。

【0211】

p53タンパク質蓄積は、p53が最もよく特徴決定された腫瘍抑制因子タンパク質の1つであり、バレット食道での異形成（Bian, Y.S., Osterheld, M.C., Bosman, F.T., Benhattar, J., and Fontolliet, C. (2001). p53 gene mutation and protein accumulation during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Mod Pathol* 14, 397-403）及びOACへの進行のリスクの増加（Kastelein, F., Biermann, K., Steyerberg, E.W., Verheij, J., Kalisvaart, M., Looijenga, L.H., Stoop, H.A., Walter, L., Kuipers, E.J., Spaander, M.C., et al. (2012). Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus. *Gut*; Sikkema, M., Kerkhof, M., Steyerberg, E.W., Kusters, J.G., van Strien, P.M., Looman, C.W., van Dekken, H., Siersema, P.D., and Kuipers, E.J. (2009). Aneuploidy and overexpression of Ki67 and p53 as markers for neoplastic progression in Barrett's esophagus: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 104, 2673-2680）と関連することが示されているので、バイオマーカーとして選択した。

【0212】

よく特徴決定された癌遺伝子であるc-MYCは、これがOACにおいて反復的に増幅され（Miller, C.T., Moy, J.R., Lin, L., Schipper, M., Normolle, D., Brenner, D.E., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., and Beer, D.G. (2003). Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res* 9, 4819-4825; Rygiel, A.M., Milano, F., Ten Kate, F.J., Schaap, A., Wang, K.K., Peppelenbosch, M.P., Bergman, J.J., and Krishnadath, K.K. (2008). Gains and amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 loci in the no dysplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 1380-1385）、我々の自前の遺伝子発現アレイにおいて高度異形成を有するバレット食道での遺伝子発現の増加を示すので、含めた。

【0213】

オーロラキナーゼA（AURKA）は、AURKA過剰発現、中心体複製及び異数性に関連することが示されているので、異数性の代用マーカーとして選択した。AURKAは、有糸分裂開始、中心体成熟及び紡錘体形成の重要な調節因子であり、AURKAの過剰発現は、中心体複製及び染色体不安定性を引き起こすことが示されている（Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, a neuploidy and transformation. *Nat Genet* 20, 189-193）。AURKAタンパク質発現は、高度異形成を有するバレット食道及びOACにおいて、異形成を有さないバレット食道と比較して、著しく上方制御されることも示されている（Rugge, M., Fassan, M., Zan

10

20

30

40

50

inotto, G., Pizzi, M., Giacomelli, L., Battaglia, G., Rizzetto, C., Parente, P., and Ancona, E. (2010). Aurora kinase A in Barrett's carcinogenesis. *Hum Pathol* 41, 1380-1386)。

【 0 2 1 4 】

メチル化バイオマーカーについて、異形成の度合の増加とともにメチル化されることが以前に示された5つの遺伝子を試験した。これらの遺伝子は、p16、ESR1、MYOD1、HPP1及びRUNX3であった(Eads, C.A., Lord, R.V., Wickramasinghe, K., Long, T.I., Kurumboor, S.K., Bernstein, L., Peters, J.H., DeMeester, S.R., DeMeester, T.R., Skinner, K.A., et al. (2001). Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 61, 3410-3418; Schulmann, K., Sterian, A., Berki, A., Yin, J., Sato, F., Xu, Y., Oлару, A., Wang, S., Mori, Y., Deacu, E., et al. (2005). Inactivation of p16, RUNX3, and HPP1 occurs early in Barrett's-associated neoplastic progression and predicts progression risk. *Oncogene* 24, 4138-4148)。最もよい2つを選択した(MYOD1及びRUNX3)。

【 実施例 2 】

【 0 2 1 5 】

マーカーの排除

Cytosponge (商標) で用いるために他の可能性のあるバイオマーカーを排除することについての堅固な理由がある。パネルの設計から排除したマーカーのいくつかの例について、以下に論じる。

【 0 2 1 6 】

11のその他の可能性のあるバイオマーカーを評価して、これらをCytosponge (商標) とともに用いて、異形成を有するバレット食道を検出できるかを決定した。11のバイオマーカーは、EGFR、CDNK2A、FGFR2、CCNA1、DDX21、MSLN、PLK1、HER2、DNMT1、MYHFD2及びVNN2であった。EGFR、HER2、CDNK2A、CCNA1及びFGFR2は、公開された文献から選択し、DDX21、MSLN、PLK1、DNMT1、MTHFD2及びVNN2は、自前の遺伝子発現アレイデータから選択した。VNN2は、このタンパク質についてホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)スライドを染色するために入手可能な抗体がないので、除外した。FGFR2及びCDKN2Aは、これらのタンパク質の発現がともにこれもまたCytosponge (商標) によってサンプリングされる胃腺組織で検出されたので、除外した。MTHFD2は、染色が細胞質だけであり、全体的に弱かったので、除外した。

【 0 2 1 7 】

CCNA1は、サイクリンAが発明者らの実験室においてバイオマーカーとしてうまく用いられていた(Lao-Sirieix, P., Brais, R., Lovat, L., Coleman, N., and Fitzgerald, R.C. (2004). Cell cycle phase abnormalities do not account for disordered proliferation in Barrett's carcinogenesis. *Neoplasia* 6, 751-760; Lao-Sirieix, P., Lovat, L., and Fitzgerald, R.C. (2007). Cyclin A immunocytology as a risk stratification tool for Barrett's esophagus surveillance. *Clin Cancer Res* 13, 659-665)、Cytosponge (商標) において直接、初期に試験した。残念なことに、CCNA1は、予備的分析においてCytosponge (商標) でうまく働かず(TFF3 + バレット食道のない陽性対照 = 26、NDBE = 44、異形成について不確定 = 12、LGD = 7、HGD = 7)、よって、BEST2研究を中止した。CCNA1がうまく働かなかったのは、正常組織内での増殖とCytosponge (商標) で回収された細胞の構造から区画特異的増殖(表面对より深い腺)を決定できないことによる可能性が最も高い。

【 0 2 1 8 】

HER2染色をいくつかのCytosponge (商標) 試料で試験したが、HER2は、高度異形成を有するバレット食道の約15%でのみ増幅又は過剰発現されることが知られているので、十分に感度が高いバイオマーカーになり得ないので、染色を中止した。

【 0 2 1 9 】

10

20

30

40

50

残りの5つのバイオマーカーは、十分に感度が高くないか又は特異的でないので除外した。表を参照されたい。

【0220】

表：我々の自前のTMAで染色されたが最終パネルまで残らなかった5つのバイオマーカーの感度及び特異性。TMAは、54の異形成を有さないバレット食道生検、32の軽度異形成を有するバレット食道生検及び18の高度異形成を有するバレット食道生検で構成された。

【0221】

【表2】

タンパク質バイオマーカー	感度(%)	特異性(%)
DDX21	77	84
DNMT1	41	98
EGFR	72	77
MSLN	61	45
PLK1	91	88

10

20

【0222】

MSLNは、異形成を有さないバレット食道で発現され、よって、異形成を有するバレット食道を検出するために十分特異的でないので、除外した。DNMT1は、非常に特異的(98%)であったので可能性があるように見えたが、我々が異なるDNMT1抗体を用いてデータを確証しようとした場合に、データは一致しなかった。よって、我々は、この抗体に対する信頼性を失ったので、バイオマーカーとしてのDNMT1を中止した。

【0223】

EGFRは、全体的な感度(72%)及び特異性(77%)が低すぎたので、除外した。DDX21は、感度及び特異性は許容できたが、低いDDX21発現を有する異形成を有さないバレット食道の症例が多く、我々は、染色に対して染色がないより明確なバイオマーカーを探していたので、除外した。PLK1は、良好な感度(91%)及び良好な特異性(88%)を有したが、このバイオマーカーは、AURKAがより良好な感度(93%)及び特異性(94%)データを示し、AURKA及びPLK1過剰発現が本質的に同じ症例を検出したので、除外し、我々は、マーカーのうち的一方のみを選択し、AURKAがより良好なデータを示したので、これを選択した。

30

【実施例3】

【0224】

試料の処理及び調製

カプセルスポンジ検体の処理

Cytosponge(商標)カプセルは、患者により嚥下され、次いで、さらなる処理まで4にて保存剤溶液に直ちに入れた。試料を十分にボルテックスし、激しく振とうして、スポンジ材料からいずれの細胞も取り除いた。細胞を含有する保存剤液を1000RPMで5分間遠心分離して、細胞をペレットにした。得られたペレットを500µLの血漿に再懸濁し、トロンピン(Diagnostic reagents社、Oxford、UK)を次いで、10µLの増加量で、血餅が形成されるまで加えた。血餅を、次いで、ホルマリンに24時間入れた後に、処理してパラフィンブロックにした。試料を3.5µmの切片に切断して、スライド1及び2に2つの切片を置いて、スライド1~15と命名される15枚のスライドを得た。

40

【実施例4】

【0225】

50

任意選択のさらなるマーカー、非定型性のアッセイ

Cytospongeに由来する試料での非定型性の評価を、顕微鏡検査及びスコア化により行う。

【0226】

2つの切片を含む最初のスライドをH&Eで染色し、非定型性を専門の病理学者(Dr Maria O'Donovan)が評価した。

【0227】

スコア化は、ウィーンスケールに従って行う。

【実施例5】

【0228】

マーカーのアッセイ、タンパク質バイオマーカー

Cytosponge(商標)を用いて得られた試料中の細胞上/中の3つのタンパク質バイオマーカーのそれぞれを、免疫組織化学的染色によりアッセイした。

【0229】

タンパク質バイオマーカーのそれぞれについて、1枚のスライドを免疫組織化学(IHC, immunohistochemistry)を用いて染色して、試料のそれぞれにおけるタンパク質発現を評価した。スライド4はp53のために用い、スライド8はc-MYCのために、スライド10はAURKAのために用いた。

【0230】

全てのスライドを、Leica Bondポリマー検出キットとともにBondMax自動染色機を用いて染色した。条件及び用いた抗体は、以下の表で見出すことができる。

【0231】

【表3】

表:IHC染色条件及び用いた抗体:

抗原	プロトコール	抗原性回復	抗体	抗体希釈
p53	プロトコールF	H1(30)	Novocastra(商標)マウスモノクローナル抗体 p53タンパク質(DO-7) 製品コード:NCL-p53-DO7	1:50
c-MYC	MRC+E*	H2(20)	Epitomics社c-MYC抗体、クローンY69、ウサギモノクローナル Cat #: 1472-1	1:50
AURKA	MRC+E	H2(30)	Millipore社抗オーロラA(C末端)、クローンEP1008Y、ウサギモノクローナル Cat #: 04-1037	1:1000

* c-MYC染色について、一次抗体と60分間インキュベートした。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 2 】

【 表 4 】

染色プロトコールMRC+E



プロトコール:MRC+E60

Bond-max及びBond-x

完全名称: MRC & Enh 60'

ID: 10033

バージョン: o(最新)

型: IHC染色

作成: BondPowerユーザ

作成日時: 28/11/2011 13:32

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
1 *過酸化水素ブロック			
ステップタイプ:試薬	インキュベーション時間:5分0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量
ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
2 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量
ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
3 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:自由
ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
4 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量
ステップ試薬		供給業者: 該当なし	
5 一次			
ステップタイプ:試薬	インキュベーション時間:60分0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量
ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
6 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量
ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
7 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量
ステップ試薬		供給業者: Leica Microsystems	
8 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択された容量

12/02/2014 11:23

Leica BOND™

1/4



プロトコール:**MRC+E6o**

Bond-max及び**Bond-x**

完全名称: MRC & Enh 6o'

ID: 10033

バージョン: o(最新)

型: IHC染色

作成: BondPowerユーザ

作成日時: 28/11/2011 13:32

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
9 *一次の後				
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時間: 8分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	10
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
10 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
11 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	20
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
12 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	20
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
13 *ポリマー				
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時間: 8分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
14 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	30
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
15 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬		供給業者:		
16 *脱イオン水				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	



プロトコール:**MRC+E6o**

Bond-max及び**Bond-x**

完全名称: MRC & Enh 6o'

ID: 10033

バージョン: o(最新)

型: IHC染色

作成: BondPowerユーザ

作成日時: 28/11/2011 13:32

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
17 *混合DAB精製				10
ステップタイプ:試薬	インキュベーション時 間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
18 *混合DAB精製				
ステップタイプ:試薬	インキュベーション時 間:10分0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	
ステップ試薬		供給業者:		
19 *脱イオン水				
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時 間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	20
ステップ試薬		供給業者:		
20 *脱イオン水				
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時 間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	20
ステップ試薬		供給業者:		
21 *脱イオン水				
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時 間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
22 *Bond DABエンハンサー				
ステップタイプ:試薬	インキュベーション時 間:10分0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	30
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
23 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時 間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>		
24 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ:洗浄	インキュベーション時 間:0秒	温度:周囲温度	分注タイプ:選択され た容量	



プロトコール:**MRC+E60**

Bond-max及び**Bond-x**

完全名称: MRC & Enh 60'

ID: 10033

バージョン: 0(最新)

型: IHC染色

作成: BondPowerユーザ

作成日時: 28/11/2011 13:32

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
25 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
26 *ヘマトキシリン			
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時 間: 5 分 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者:	
27 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
28 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者:	
29 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量

10

20

30

染色プロトコールF



プロトコール:*IHC F

Bond-max及びBond-x

完全名称: *IHCプロトコールF

ID: 242

バージョン: 5(最新)

型: IHC染色

作成: Leica

作成日時: 01/09/2010 14:13

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	10
1 *過酸化水素ブロック				
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時間: 5分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
2 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
3 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 自由	20
ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
4 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬			供給業者: 該当なし	
5 一次				
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時間: 15分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
6 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	30
ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
7 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	
ステップ試薬			供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
8 *Bond洗浄溶液				
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量	



プロトコール:*IHC F

Bond-max及びBond-x

完全名称: *IHCプロトコールF

ID: 242

バージョン: 5(最新)

型: IHC染色

作成: Leica

作成日時: 01/09/2010 14:13

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
9 *一次の後			
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時間: 8分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
10 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
11 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
12 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
13 *ポリマー			
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時間: 8分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
14 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
15 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 2分0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量
ステップ試薬		供給業者:	
16 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時間: 0秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択された容量



プロトコール:*IHC F

Bond-max及びBond-x

完全名称: *IHCプロトコールF

ID: 242

バージョン: 5(最新)

型: IHC染色

作成: Leica

作成日時: 01/09/2010 14:13

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
17 *混合DAB精製			
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
18 *混合DAB精製			
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時 間: 1 0 分 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者:	
19 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者:	
20 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者:	
21 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
22 *ヘマトキシリン			
ステップタイプ: 試薬	インキュベーション時 間: 5 分 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者:	
23 *脱イオン水			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量
ステップ試薬		供給業者: <i>Leica Microsystems</i>	
24 *Bond洗浄溶液			
ステップタイプ: 洗浄	インキュベーション時 間: 0 秒	温度: 周囲温度	分注タイプ: 選択され た容量



プロトコール:*IHC F

Bond-max及び**Bond-x**

完全名称: *IHCプロトコールF

ID: 242

バージョン: 5(最新)

型: IHC染色

作成: Leica

作成日時: 01/09/2010 14:13

施設: MRC

染色状態: 単独

ステップ試薬

供給業者:

25 *脱イオン水

ステップタイプ:洗浄

インキュベーション時 温度:周囲温度
間:0秒

分注タイプ:選択され
た容量

10

【 0 2 3 3 】

適切には、c M Y C は、M R C + E プロトコールを用いて染色されるが、抗体は、60分間インキュベートし、適切には、A U R K A は、M R C + E プロトコールを用いて染色されるが、一次抗体は、15分間だけインキュベートすることに注意すべきである。

【 0 2 3 4 】

免疫組織化学的染色のスコア化

p 5 3 は、0 ~ 3 (染色の強度)としてスコア化し、3は、著しい染色、0、1又は2は、著しくない染色と見なした。強い(強度 = 3) p 5 3 染色だけを、著しいと見なした。p 5 3 蓄積は、異形成を有するパレット食道と関連し、進行も予測することが示されている(Kaye, P.V., Haider, S.A., Ilyas, M., James, P.D., Soomro, I., Faisal, W., Catton, J., Parsons, S.L., and Ragunath, K. (2009). Barrett's dysplasia and the Vienna classification: reproducibility, prediction of progression and impact of consensus reporting and p53 immunohistochemistry. *Histopathology* 54, 699-712; Ska cel, M., Petras, R.E., Rybicki, L.A., Gramlich, T.L., Richter, J.E., Falk, G.W., and Goldblum, J.R. (2002). p53 expression in low grade dysplasia in Barrett's esophagus: correlation with interobserver agreement and disease progression. *Am J Gastroenterol* 97, 2508-2513)。パレット食道中の上皮細胞はp 5 3 について頻りに染色されないので、非存在パターン(Kaye, P.V., Haider, S.A., James, P.D., Soomro, I., Catton, J., Parsons, S.L., Ragunath, K., and Ilyas, M. (2010). Novel staining pattern of p53 in Barrett's dysplasia--the absent pattern. *Histopathology* 57, 933-935)は、著しいと見なさなかった。

20

30

【 0 2 3 5 】

c - M Y C は、0 ~ 3 (染色の強度)としてスコア化し、0及び1は、著しくない染色、2及び3は、著しい染色と見なした。このカットオフは、異形成を有さないパレット食道といずれかの異形成を有するパレット食道との間を最も有用に識別したので、このカットオフを選択した。異なる強度でのc - M Y C 染色の例は、図1で見出される。

40

【 0 2 3 6 】

A U R K A は、0又は1としてスコア化し、0は、染色がなく、1は、任意の陽性染色であった。染色なし及び陽性染色の例を、図2に示す。

【 0 2 3 7 】

適切には、A U R K A 染色は、核である。適切には、核染色のみをA U R K A のスコア化において評価する。適切には、細胞質染色(もしあれば)は、無視する。適切には、本発明によるA U R K A 染色は、細胞質でない。

【 0 2 3 8 】

3つのタンパク質バイオマーカーの初期試験

50

さらなるスクリーニングを行い、3つの可能性のあるタンパク質バイオマーカーが我々の手においてうまく機能することを確実にするために、p53、c-MYC及びAURKA染色を、我々の自前のパレット食道組織マイクロアレイ(TMA, tissue microarray)で行った。これらのTMAは、54の異形成を有さないパレット食道生検、32の軽度異形成を有するパレット食道生検及び18の高度異形成を有するパレット食道生検で構成された。これらのTMAは、パレット食道生検で構成されたので、Cytosponge(商標)がサンプリングすると考えられる細胞である表面染色だけをスコア化した。このデータセットでは、3つ全てのバイオマーカーは、以下の表から見ることで、良好に機能した。

【0239】

我々の自前のパレット食道TMAでのp53、c-MYC及びAURKAの感度及び特異性の表。TMAは、54の異形成を有さないパレット食道生検、32の軽度異形成を有するパレット食道生検及び18の高度異形成を有するパレット食道生検で構成された：

【0240】

【表5】

タンパク質バイオマーカー	感度(%)	特異性(%)
p53	54	100
c-MYC	79	96
AURKA	93	94

【0241】

よって、これらの確認されたマーカーを先に進めて、Cytosponge(商標)を用いて回収された細胞試料に対して評価した。

【実施例6】

【0242】

マーカーのアクセシ、メチル化マーカー

Cytosponge(商標)を用いて回収された細胞に対するメチル化分析は、以下のように行う。ゲノムDNAを、処理されたCytosponge(商標)FFPE血餅の8×10µm切片から、脱パラフィン緩衝液(Qiagen社製)及びQIAamp FFPE DNA組織キット(Qiagen社製)を用いて抽出した。プロトコールは、試料を、記載される1時間の代わりに56にて24時間インキュベートし、10µlの余剰のプロテイナーゼKを24時間のインキュベーションのほぼ半分が過ぎたところで試料に加えた以外は、製造業者により記載されるとおりに従った。抽出の後に、DNAを、Qubit(商標)dsDNA HSアクセシキット(Invitrogen社製)を用いて定量し、75ngを、EZ DNAメチル化-Gold(商標)キットを(製造業者に記載されるとおりに)用いてバイサルファイトに変換した。試料を25µlの水に溶出し、Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P.V., and Laird, P.W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28, E32に記載されるとおりにMethyLight反応あたり2µlを用いた。アクチンを内部対照として用いて、入力DNAの量を標準化した。用いたプライマー及びプローブの配列は、MYOD1フォワードプライマー: 5'-gagcgcgcgtagttagcg-3'、MYOD1リバースプライマー: 5'-tccgacacgccctttcc-3'、MYOD1プローブ: 5'-6FAM-ctccaacacccgactactatatccgcgaaa-TAMRA-3'、ACTBフォワードプライマー: 5'-tggtgatggaggaggttagtaagt-3'、ACTBリバースプライマー: 5'-aaccaataaaacctactcctcccttaa-3'、ACTBプローブ: 5'-6FAM-accaccaccaacacacaataacaaacaca-TAMRA-3'(Eads, C.A., Lord, R.V., Wickramasinghe, K., Long, T.I., Kurumboor, S.K., Bernstein, L., Peters, J.H., DeMeest

10

20

30

40

50

er, S.R., DeMeester, T.R., Skinner, K.A., et al. (2001). Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 61, 3410-3418から)、Me Itzer実験室からのRUNX3フォワードプライマー：5'-ggcttttgccgagtagtggtc-3'、RUNX3リバースプライマー：5'-acgaccgacgcgaacg-3'、RUNX3タンパク質：5'-6FAM-cgttttgagggttcgggtttcgtcgtt-TAMRA-3'であった。バイサルファイトに変換した普遍的メチル化DNA (D5010-1、Zymo Research社製)を用いて、プライマー及びプロセプトのそれぞれについて標準曲線を導き出し、校正物質を全ての実験で用いて、全ての試料におけるメチル化レベルの絶対的定量を可能にした。全ての反応について用いた増幅条件は、95にて10分、その後、95にて15秒及び60にて1分を50サイクルであった。

10

【0243】

各遺伝子のメチル化の程度は、以下の式を用いて算出した：

$$\% \text{メチル化} = (A / B) / (C / D)$$

A = 対象となる遺伝子のメチル化の値

B = 完全メチル化対照における対象となる遺伝子のメチル化の値

C = 試料における アクチンの増幅のレベル

D = 完全メチル化対照における アクチンの増幅のレベル

【0244】

2つの遺伝子の%メチル化を、次いで、一緒に加えて、メチル化の値を得た。

【0245】

20

メチル化領域の初期試験

113のCytosponge(商標)試料(15のTFF3+パレット食道を有さない対照、54の異形成を有さないパレット食道、20のLGDを有するパレット食道及び24のHGDを有するパレット食道)からなる予備的実験では、5つ全てのメチル化領域(p16、HPP1、RUNX3、ESR1及びMYOD1)を評価して、メチル化領域のどの部分集合が最も良好に機能し、Cytosponge(商標)で異形成を検出するための最良の感度及び特異性を有したかを、以下の表に示すデータを用いて評価した。

【0246】

5つの異なるメチル化バイオマーカーについての曲線下面積(AUC, area under the curve)を示す表。(15のTFF3+パレット食道を有さない対照、54の異形成を有さないパレット食道、20のLGDを有するパレット食道及び24のHGDを有するパレット食道)：

30

【0247】

【表6】

メチル化遺伝子	AUC
ESR1	0.739
HPP1	0.754
MYOD1	0.771
p16	0.673
RUNX3	0.754

40

50

【 0 2 4 8 】

R U N X 3 及び M Y O D 1 は一緒に、任意の異形成を異形成なしと比較した場合に最良の曲線下面積を示し、よって、これらを先に進めて、Cytosponge (商標) 試料においてさらに評価した。

【 実施例 7 】

【 0 2 4 9 】

表面異常の検出

本実施例では、我々は、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法を実証する。

【 0 2 5 0 】

対象からの細胞の試料を提供する。試料は、対象の食道の表面から回収された細胞を含む。本実施例では、研磨性細胞回収デバイスを嚥下及び取り戻すことにより細胞を回収した。本実施例では、デバイスは、Cytosponge (商標) である。よって、細胞は、対象の食道の表面からサンプリングされた。

10

【 0 2 5 1 】

細胞を、

(i) p 5 3 ;

(ii) c - M y c ;

(iii) A U R K A ; 並びに

(iv) M y o D 及び R u n x 3 のメチル化

20

から選択される少なくとも2つのマーカーについてアッセイする。

【 0 2 5 2 】

B E S T 2 Cytosponge (商標) 試料に対するリスク階層化バイオマーカーの性能を実証する。本実施例では、先の実施例でのように3つのタンパク質バイオマーカー及び2遺伝子メチル化パネルを選択した後に、5番目の非定型性マーカーも含んでもよい4つ全てのリスク階層化バイオマーカーを、B E S T 2 Cytosponge (商標) 試料に対して試験した。

【 0 2 5 3 】

本実施例に示すデータは、18名の対照患者、95名の異形成を有さないバレット食道患者、25名のLGDを有するバレット食道患者及び30名のHGDを有するバレット食道患者からである。

30

【 0 2 5 4 】

異形成を有さないバレット食道におけるp53、c-MYC及びAURKA染色の欠如と、異形成を有するバレット食道における著しく濃い染色とを図2に示す。図2は、Cytosponge (商標) を用いることによるような食道の表面から回収された試料にて異形成を検出するためのマーカーのパネルを示す。マーカーのパネルは、3つのタンパク質バイオマーカー (p 5 3 、 c - M Y C 及びオーロラキナーゼA) と、R U N X 3 及びM Y O D 1 からなる2遺伝子メチル化パネルとを含む。

【 0 2 5 5 】

異形成を有さないバレット食道をHGDを有するバレット食道と比較する場合、p53、c-MYC及びAURKAは、それぞれ57、60及び73%の感度と、それぞれ97、89及び85%の特異性を示す。一緒に加えた場合のR U N X 3 及びM Y O D 1 のメチル化のパーセンテージは、0.815の曲線下面積と、83%及び80%のそれぞれ感度及び特異性を与えたが、これは、「MethyLight」の下で表に示す。

40

【 0 2 5 6 】

高度異形成を有するバレット食道と異形成を有さないバレット食道とを比較した場合のリスク階層化マーカーのパネルについての感度及び特異性の値の表：

【 0 2 5 7 】

【表 7】

	p53	c-MYC	AURKA	MethyLight
感度	57	60	73	83
特異性	97	89	85	80

【0258】

10

リスク階層化マーカーのこのパネルがCytosponge（商標）試料において異形成を検出する能力を評価するために、少なくとも2つの陽性バイオマーカーのカットオフを用いた。これらの基準を用いて、高度異形成を有する患者の27/30（90%）を検出し、軽度異形成を有する患者の16/25（64%）を検出した（以下の表Aを参照されたい）。

【0259】

表Aは、リスク階層化バイオマーカーがそれぞれ個別にどのように機能するか、及びパネルを一緒に用いた場合に、Cytosponge（商標）において異形成を検出するかを示す：

【0260】

【表 8】

表A	# 患者	p53	c-MYC	AURKA	MethyLight	≥1バイオマーカー+	≥2バイオマーカー+
対照	16	0	1	4	0	6 (38%)	0 (0%)
NDBE	97	4	11	13	23	40 (41%)	16 (16%)
LGD	25	6	13	16	12	22 (88%)	16 (64%)
HGD/IMC	30	17	18	22	25	29 (97%)	27 (90%)

20

30

【0261】

これらのデータは、高度異形成を異形成なし（すなわち異形成を有さないバレット食道及び対照）と比較した場合に、87%の特異性を与えた。

【0262】

よって、前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出は、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味することが実証される。

【実施例 8】

【0263】

40

代替アプローチ、Cytospongeと単独マーカー

本実施例では、対象の食道の表面異常の検出を補助する方法であって、

a) 前記対象からの細胞の試料を提供するステップであって、前記試料が、対象の食道の表面から回収された細胞を含み、

細胞の前記試料が、対象の食道の表面をサンプリングするための嚥下可能な研磨性デバイス（例えばCytosponge（商標））を用いて回収されるステップと、

b) 前記細胞を、

(i) p53；

(ii) c-Myc；

(iii) AURKA；並びに

50

(iv) MyoD及びRunx3のメチル化

から選択される少なくとも1つのマーカーについてアッセイするステップとを含み、

前記マーカーの少なくとも2つの異常レベルの検出が、対象の食道の表面異常の可能性が増加していることを意味する方法。

【0264】

本実施例では、方法ステップは、実施例7のようにして行われるが、パネル中の1つのマーカーだけが異常であることが要求される。よって、このことは、研磨性デバイス/Cytospongeアプローチと開示しているマーカーのパネルとの組合せを代表する。

【0265】

基準を緩和して、1つの陽性バイオマーカーのカットオフを用いる場合、高度患者の29/30(97%)が検出され、軽度患者の23/35(92%)が検出された(上の表Aを参照されたい)。このカットオフでは、特異性は59%である。浸潤癌のリスクがある患者を見逃さないようにサーベイランスのために用いるバイオマーカーパネルには、高い感度が必須である。著しい割合の患者が不必要な内視鏡検査を免れるので、特異性が低くてもまだ有用である。

【実施例9】

【0266】

さらなる用途

これらのデータは、研磨性表面サンプリング(例えばCytosponge(商標)を用いる)とバイオマーカーのパネルとが一緒に、BE患者をリスク階層化するために用いることができることを示す。このことは、BE患者が必要とする内視鏡検査の数を減らすことができるという利点を有する。このことは、生検に伴うサンプリングの偏りを回避するという利点も有する。我々は、研磨性表面サンプリング(例えばCytosponge(商標)を用いる)試験とリスクバイオマーカーのパネルとが一緒に、現在の臨床プラクティスを変える(そして現在の臨床プラクティスを超える技術的利益をもたらす)と提案する(図3-持続性ディスペプシア又は逆流を有する患者についての現在の臨床的経路を示すフローチャート)。現在のところ、症候性であり持続性ディスペプシア又は逆流を経験する患者は、内視鏡検査を提案される。これらの患者がバレット食道を有すると同定された場合、複数の生検を病理検査のために採取する。診断に応じて、患者は、サーベイランスプログラムに入り、決定された時間間隔にて生検と一緒に内視鏡検査を提案される。高度異形成を有するバレット食道が検出された場合、患者は、処置を提案される。

【0267】

バレット食道を有する患者の大部分が全く進行せず、異形成を有するバレット食道に全く進展しないので、これらの患者は、進行のリスクがこれほど低いのに、2年ごとに内視鏡検査に耐えなければならない。

【0268】

我々は、本発明に従って、生検と結びついたこれらのサーベイランス内視鏡検査を、研磨性表面サンプリング(例えばCytosponge(商標)を用いる)試験と本明細書に記載するリスクバイオマーカーのパネルとを一緒に用いるサーベイランス計画で有利に置き換えることができることを提案する。例えば、このことは、図4を参照して説明する。

【0269】

図4は、研磨性表面サンプリング(例えばCytosponge(商標)を用いる)とバイオマーカーのパネルとを一緒に含む、提案する臨床的/スクリーニング経路を示すフローチャートを示す。本発明に従ってスクリーニング及び/又はリスク階層化ツールとしてCytosponge(商標)を用いることにより回避される内視鏡検査の数を示す模範的な数を含める。これらの数は、10,000名のスクリーニング集団に基づき、リスク集団にてこの6.5%がバレット食道を有すると仮定する。この数は、バレット食道を有する患者の10%が異形成を有すると仮定する。各段階での患者の数は、マーカーの正確さ(感度及び特異性)に依存する。

10

20

30

40

50

【0270】

図5は、研磨性表面サンプリング（例えばCytosponge（商標）を用いる）とバイオマーカーのパネルとを一緒に含む、提案するバレット食道サーベイランス経路を示すフローチャートを示す。Cytosponge（商標）をリスク階層化ツールとして用いることにより回避される内視鏡検査の数を示す模範的な数を含める。この数は、バレット食道を有する患者の10%が異形成を有すると仮定する。各段階での患者の数は、マーカーの正確さ（感度及び特異性）に依存する。

【0271】

図6は、p53染色強度の例を示す。

【0272】

バレット食道を有するリスクが高い患者（すなわち、持続性逆流又はディスペプシアの患者）は、スクリーニングプログラムの一部として、本明細書に記載する試験（例えば、Cytosponge（商標）を嚥下することによるような表面サンプリングによる）を受けることを提案される。

【0273】

一態様では、試料をマーカーTF F3について予め試験してよい。試験がTF F3（バレット食道バイオマーカー）について陰性である場合、患者は、規定された間隔にて予備試験を再び受けることを提案される。2回の陰性Cytosponges（商標）は、対象がバレット食道を有するリスクが極めて低く（およそ0.2%）、よって、患者が内視鏡検査を受ける臨床的な理由がないことを意味する。よって、この場合は、患者のCytosponge（商標）試料についてリスクバイオマーカー（すなわち本発明の試験/パネル）をアッセイしなくてもよい。患者は、将来、再試験を受けてよい。

【0274】

しかし、別の態様では、予備試験のいずれかがTF F3について陽性である場合、リスクバイオマーカーのパネルを、本発明に従って研磨性表面試料（例えばCytosponge（商標）を用いて得られた）を用いて行う（アッセイする）。記載するパネル中のリスクバイオマーカーのいずれも陽性でない場合、患者がいずれかの異形成を有する可能性は非常に低い（0.6%）ので、患者に、サーベイランスプログラムの一部として、2～5年の時間の間の再試験を提案してよい。バイオマーカーの1又は2以上が陽性である場合、患者が異形成を有する可能性はかなりより高く（11.3%、陽性バイオマーカーがない場合よりも19倍高い相対的リスク）、患者に、生検と結びついた内視鏡検査を提案してよい。これらの数は、研磨性表面サンプリング（例えばCytosponge（商標）を用いる）とリスクバイオマーカーのパネルとが一緒になると、56%（665/1184）の不必要な内視鏡検査を免れることを示す。

【0275】

よって、本発明は、本明細書に記載するように、多大な技術的及び経済的利益をもたらす。

【実施例10】

【0276】

食道癌発生の前浸潤性疾患段階における変異の順序付け

本実施例では、核酸レベルでのp53変異分析の使用を実証する。さらに、EACのマーカーとしてのSMAD4の使用を実証する。

【0277】

まとめ

癌ゲノム配列決定研究は、多数の推定駆動遺伝子を同定したが、癌発生における変異の相対的タイミングは、不明のままである。前癌性バレット食道（BE）から食道腺癌（EAC）までの緩やかな進行は、体細胞突然変異の順序付けを研究するための理想的なモデルを提供する。我々は、反復的に変異する遺伝子を同定し、112のEACの全ゲノム配列決定及びアンプリコン再配列決定を用いてクローン構造を評価した。我々は、次に、悪性病変の進展における2つの重要な移行点、すなわち良性化生未異形成バレット食道（N

10

20

30

40

50

D B E、 $n = 66$) 及び高度異形成 (H G D、 $n = 43$) からの 109 の生検のコホートをスクリーニングした。予期せぬことに、E A C において反復的に変異する遺伝子の大多数は、N D B E においても変異された。T P 5 3 及び S M A D 4 だけが段階特異的であり、それぞれ H G D 及び E A C に制限された。最後に、我々は、この知見を用いて、新規な非内視鏡試験において高リスク B E を同定した。結論として、E A C 駆動遺伝子における変異は、全般的に、疾患進展において例外的に早期に出現し、診断及び治療戦略と深いつながりを有する。

【0278】

導入

ほとんどの上皮癌は、前浸潤性病変から徐々に進展し、いくつかの場合では初期の化生転換後に進展する。癌のゲノムの眺望を特徴決定するための研究は、個別化された治療のためのバイオマーカーの開発を目的として、確立された浸潤性疾患に焦点を当てている (Chin, L., Andersen, J.N. & Futreal, P.A. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nat Med* 17, 297-303 (2011))。しかし、広範なゲノム不均質性が、進行癌の大多数に存在することが明らかになってきている (Gerlinger, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366, 883-92 (2012))。よって、最も適切な治療標的は疾患の進展の早期に生じ、結果としての悪性病変においてクローン性であるこれらの変異である。病変形成の早期に生じる原因変異の同定も、臨床的に有用なバイオマーカーを開発するために重要である。この関係では、疾患段階境界、例えば非異形成上皮から異形成、次いで癌への移行にて生じる変異が、最も情報を与えると考えられる。前癌性病変から癌への遺伝子的進化についての現在までの証拠は、変異の蓄積が段階的であることを示唆する (Jones, S. et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4283-8 (2008)、Nik-Zainal, S. et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell* 149, 994-1007 (2012)、Vogelstein, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-32 (1988))。腺腫 - 異形成 - 結腸直腸腺癌進行の順序の最もよく研究された例では、比較病変配列決定により限定された数の候補遺伝子についてタイミングを割り当てることが可能であった (Jones, S. et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4283-8 (2008))。より最近の研究では、統計的アルゴリズムを用いて、単一試料から腫瘍の生命史 (Nik-Zainal, S. et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell* 149, 994-1007 (2012)、Vogelstein, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-32 (1988)) を推論しようとしている。

【0279】

食道腺癌 (E A C) は、酸及び胆汁への曝露に次いで起こる慢性炎症の関係での化生バレット食道 (B E) から生じる (Goh, X.Y. et al. Integrative analysis of array-comparative genomic hybridisation and matched gene expression profiling data reveals novel genes with prognostic significance in oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 60, 1317-26 (2011)、Quante, M. et al. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell* 21, 36-51 (2012))。B E は、治療的介入前の臨床的サーベイランス中の粘膜の反復サンプリングにより、遺伝子進化の研究に非常に向いている (Greaves, M. & Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-13 (2012))。E A C 及び B E の以前の研究は、困難を伴うアプローチである組織診検査を補完するための臨床的バイオマーカーを同定することを目的として、候補遺伝子アプローチを全般的に用いている (Greaves, M. & Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-13 (2012)、Varghese, S., Lao-Sirieix, P. & Fitzgerald, R.C. Identification and clinical implementation of biomarkers for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 142, 435-441 e2 (2012))。高密度一塩基多型 (S N P, single nucleotide polymorphism) アレイ及びエキソーム配

10

20

30

40

50

列決定研究からのデータが、多くの異なる遺伝子で同定された多くの変異とともに、現在、蓄積されている (Dulak, A.M. et al. Gastrointestinal Adenocarcinomas of the Esophagus, Stomach, and Colon Exhibit Distinct Patterns of Genome Instability and Oncogenesis. *Cancer Res* (2012)、Dulak, A.M. et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet* 45, 478-86 (2013))。しかし、前癌性疾患の患者の大きいコホートでのこれらの変化の精密な順序付け及び関連する臨床的フォローアップデータに焦点を当てた研究は、まだほとんどない。

【0280】

最近、Agrawal et al.は、11のEAC試料及び癌に隣接するBEの2つの試料に対してエクソーム配列決定を行った。興味深いことに、変異の大多数は、結腸直腸腺癌での観察と同様に、明らかに正常なBEにさえ存在することが見出された (Agrawal, N. et al. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Discov* (2012))。このことにより、悪性病変への進行の前に、進行のリスクを予測する変異が、細胞診により良性の組織内で検出可能であり得る可能性が生じる。しかし、癌に進行していない患者からのBE組織においてどの程度同じ変異が存在し得るのかが不明である。この質問は、重要である。なぜなら、BEの患者の大多数は癌に進行せず、異形成の前に早期に生じる体細胞変化は、臨床的に識別性のバイオマーカーを与える可能性がないからである。この分野でのバイオマーカー研究は、重要である。なぜなら、現在の内視鏡サーベイランス戦略は、効果がないことがますます認識されるようになっており (Corley, D.A. et al. Impact of Endoscopic Surveillance on Mortality From Barrett's Esophagus-Associated Esophageal Adenocarcinomas. *Gastroenterology* 145, 312-319 e1 (2013))、よって、新規なアプローチが必要であるからである (Shaheen, N.J. & Hur, C. Garlic, Silver Bullets, and Surveillance Upper Endoscopy for Barrett's Esophagus. *Gastroenterology* 145, 273-6 (2013)、Hayes, D.F. et al. Breaking a vicious cycle. *Sci Transl Med* 5, 196cm6 (2013))。

【0281】

本研究の目的は、1) EACにおける候補の新規で反復的に変異する遺伝子のリストを同定し、2) 変異が生じる疾患の段階を正確に解明し、よって癌進行におけるこれらの反復変異の役割についての洞察を提供し、3) すなわち非浸潤性で内視鏡によらない細胞サンプリングデバイス、Cytosponge (商標) を用いる臨床用途でのそれらの有用性を試験することであった。

【0282】

結果

EACにおける高変異負荷及び通常でない変異サイン

発見コホート (WGSに供した22のEAC) は、雄性優勢 (M:F、4.5:1)、68歳の平均年齢 (53~82の範囲)、及び大多数が進行疾患 (81.8% (18/22) > ステージI) という疾患の既知の臨床人口統計学的特徴を反映した。22のうち17 (77.3%) の症例が、切除検体においてBEの証拠を有した (表1)。

【0283】

【表 9】

表1:患者コホートの人口統計学

	EACコホート		BEコホート		Cytosponge(商標)でのTP53 分析		
	発見	検証	未異形 成BE	HGDを 有する BE	BEなし 対照	未異形成 BE	HGDを 有する BE
数	22	90	40	39	23	44	22
年齢(歳)	68 (53-82)	66 (32-83)	63 (32-81)	71 (50-87)	53 (28-74)	61 (41-85)	66 (41-82)
性別(M:F)	5:1	5:1	2:1	12:1	1:2	4:1	10:1
ステージ (%)	I 4 (18.2)	14 (15.6)					
	II 6 (27.3)	14 (15.6)					
	III 11 (50.0)	49 (54.4)					
	IV 1 (4.5)	4 (4.4)					
	n/a 0 (0.0)	9(10.0)					
BE長(cm)			4.8 (1-9)	8.6 (2-16)		5.8 (1-12)	8.5 (4-16)
EAC診断から のフォローア ップ(ヶ月)	28.5 (5-63)	18 (1-134)					
全BEサーベイ ランス(ヶ月)			58 (4- 132)	1 (0-45)		56 (0-175)	24 (0-180)

*示すデータは、年齢及びBE長についての平均(範囲)、ステージについての数(パーセンテージ)並びにEAC診断からのフォローアップ及び全BEサーベイランスについての中央値(範囲)を反映する。性別の割合は、最も近い自然数に切り上げ(切り下げ)した。

【0284】

試料を、腫瘍及び正常試料においてそれぞれ63及び67倍の平均カバー率まで配列決定した。

【0285】

我々は、試料あたり16,994の体細胞SNV(範囲:4,518~56,528)及び994の小indel(範囲262~3,573)の中央値を同定した。この最終データセットから、合計で1,086のコード領域変異を、より大きいパイプラインベンチマーク評価研究の一部としての確証に供した。我々は、超深遠標的化再配列決定を用い、>13,000倍の中央値カバー率を達成し、体細胞として1,081(99.5%)を確認した。サンガー配列決定を用いて、23/25(92%)のindelが実際に体細胞として確証された。我々の研究を開始して以来の介在時間中にDulak et alにより観察されたように(Dulak, A.M. et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. Nat Genet 45, 478-86 (2013))、発見コホートにわたる最も頻繁な変異タイプは、T:A>G:C塩基転換であり、CTTトリヌクレオチドにて著しい濃縮があった。T:A>G:C塩基転換についてのこの濃縮は、乳癌、結腸直腸癌及び肝細胞癌(Nik-Zainal, S. et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. Cell 149, 79-93 (2012)、Fujimoto, A. et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chr

omatin regulators. *Nat Genet* 44, 760-4 (2012)、Bass, A.J. et al. Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nat Genet* 43, 964-8 (2011)) を含む WGS により研究された他の癌から EAC を区別する。

【0286】

EAC の検証コホートにおける標的化アンプリコン再配列決定

BE における EAC の進展に関与する新規遺伝子を同定するために、我々は、我々の発見コホート (n = 22 症例) において反復的に変異する標的を同定することを試みた。バックグラウンド率を超えて又は対象とする経路において著しく変異している 26 遺伝子の最終リストを選択し、より大きいコホート (90 のさらなる EAC、表 1) において、標的化アンプリコン再配列決定を用いて試験した。成果は、ARID1A のような SWI/SNF 複合体における反復変異の同定を含む、我々の発見コホート及び他者からの以前の研究 (Dulak, A.M. et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet* 45, 478-86 (2013)、Agrawal, N. et al. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Discov* (2012)、Streppel, M.M. et al. Next-generation sequencing of endoscopic biopsies identifies ARID1A as a tumor-suppressor gene in Barrett's esophagus. *Oncogene* (2013)) のものを確認して拡張した。298 のさらなる EAC のコホートにおける免疫組織化学による ARID1A タンパク質発現の喪失の分析は、41% (122 / 298) での発現の非存在又は減少を同定した。このことは、下方制御の代替の機構が存在し得ることを示唆するが、我々は、我々の発見コホートからの WGS データ内でいずれの大規模構造バリエーションも同定しなかった (データは示さず)。

【0287】

我々は、次に、発見及び検証コホートの両方からのデータを組み合わせ、4 又は 5 以上の試料で変異している 15 の遺伝子を同定した (図 8)。これらは、EAC 候補遺伝子として以前に同定されたものと、いくつかの新規な候補 MYO18B、SEMA5A 及び ABCB1 を含んだ。TP53 は、大多数の症例において変異されていた。しかし、症例の 31% は、TP53 について野生型である。我々は、我々のコホートにおいて互いに排他的な変異を検出するのに十分な能力を有さないが、我々は、著しく同時出現する変異を検出できる。SEMA5A 及び ABCB1 変異は、偶然により予期されるよりも一般的に同じ腫瘍において出現した (ベンジャミーニ - ホッホバーグ調整 p 値 = 0.0021) が、この関連性の理由は不明のままである。

【0288】

パレット食道疾患段階にわたる同様の変異頻度

変異の段階特異性は、BE 癌発生の別々の段階にある患者から導き出すことができる。疾患段階境界で出現する変異は、悪性進行の候補バイオマーカーであり得る。さらに、疾患の進展の早期に出現する変異は、自然史の早期のクローン性増大によるより進行した病変の細胞の大多数にそれらが存在するので、新規な治療介入についての理想的な標的であるはずである。よって、我々は、我々のパネルにおいて 26 遺伝子の変異状態を、内視鏡サーベイランスを受ける患者の前向きコホートから得られた BE 試料において同定することを試みた。これは、79 名の患者からの 109 の BE 生検を含んだ (図 7)。我々は、異形成又は悪性病変への進行の証拠がない (中央値フォローアップ時間 58 ヶ月、範囲 4 ~ 132) 40 名の BE 患者からの 66 の未異形成 BE 試料と、浸潤性 EAC の進展の直前の段階である病理組織学的に確認された高度異形成 (HGD) の 43 の BE 生検試料 (39 名の患者から) とを選択した (表 1)。我々は、軽度異形成を含めなかったが、これは、この病変の病理組織学的等級づけとの一致が乏しいからである (Wang, K. et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 43, 1219-23 (2011))。

【0289】

成果は、著しく、予期せぬものであった。未異形成 B E コホートについて、21 / 40 (53%) の患者がそれらの B E セグメント内で変異を有することが見出され (図 9 a)、いくつかの生検は、複数の変異を含んでいた。合計で、我々は、このコホート内で 29 の S N V 及び 7 の i n d e l を同定した。重要なことには、未異形成 B E で同定された変異は、S M A R C A 4、A R I D 1 A 及び C N T N A P 5 (図 9 b) を含む、E A C (Du lak, A.M. et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. Nat Genet 45, 478-86 (2013)、Curvers, W.L. et al. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus: over diagnosed and underestimated. Am J Gastroenterol 105, 1523-30 (2010)) 及びその他の癌 (Wang, K. et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. Nat Genet 43, 1219-23 (2011)、Jones, S. et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. Science 330, 228-31 (2010)) において駆動因子であると以前に同定されたいくつかの遺伝子において生じた。興味深いことに、これらの 29 の S N V のうちの 7 つは、T : A 塩基対での変異であった。これらのうち、5 / 7 (71%) は、T T ジヌクレオチド配列にて生じ、変異の関係は、E A C W G S データにおいて高く濃縮されることが同定された。よって、この変異プロセスは、疾患の最も早い段階にても活性であり得る。43 の H G D 生検試料のうち、39 (91%) は、合計で 67 の S N V 及び 7 の i n d e l を有する我々のパネルにおいて遺伝子の少なくとも 1 つの変異を有することが見出された。よって、所定の遺伝子中の変異の頻度が疾患段階にわたって増加するよりもむしろ、我々は、遺伝子の大多数について、変異頻度が未異形成 B E、H G D 及び E A C の間で優位に異ならなかったことを観察した (複数の試験についてベンジャミーニ - ホッホバーク補正を行うフィッシャーの正確検定、図 9 b)。T P 5 3 ($p < 0.0001$) 及び S M A D 4 ($p = 0.0061$) (図 9 b 及び c) だけが、疾患段階の間を区別する変異頻度を示し、よって、悪性病変に向かう進行を同定する。T P 5 3 は、H G D (72%) 及び E A C (69%) 試料の両方で反復的に変異することが見出されたが、未異形成 B E では単一の症例だけ (2.5%) であった。S M A D 4 は、より低い頻度 (13%) で変異され、興味深いことに、疾患の浸潤性の段階である E A C においてのみ見出された。

【0290】

反復的変異のクローン分析

疾患進展の最も早期の段階での変異の出現を同定して、我々は、次に、これらの変異が、22 の E A C の我々の元の発見コホートにおいて完全にクローン性又はサブクローン性であるかを同定することを試みた。我々の拡張コホートからの 4 の試料で変異する 15 の遺伝子のそれぞれについて、我々は、S N V の高深遠再配列決定とコピー数バリエーションデータと L O H 分析とを組み合わせ、変異を含有する腫瘍細胞の分率を決定した。変異が疾患進展の最も早期段階、悪性病変のクローン性増大の前に生じる場合、我々は、変異が腫瘍の全ての細胞に存在すると期待する。7 / 15 の遺伝子、S M A D 4、T P 5 3、A R I D 1 A、S M A R C A 4、T L R 4、C D K N 2 A 及び P N L I P R P 3 について、そうであった。その他の 8 つの遺伝子 (M Y O 1 8 B、T R I M 5 8、C N T N A P 5、A B C B 1、P C D H 9、U N C 1 3 C 及び C C D C 1 0 2 B) での変異は、主要なクローンに常に存在したわけではなく、これらの遺伝子の変異が、腫瘍形成の複数の段階にて選択され得ることを示唆した (図 9 d)。

【0291】

診断試験への変異の順序付けについての知見の適用

B E の患者についての現在の臨床的戦略は、腺癌への進行のリスクが高い異形成を有する患者を同定しようとするための定期的な内視鏡検査を含む。このアプローチは、異形成病変の正確な同定が本来的に困難であるので非常に物議を醸すものであり、最近のデータは、B E の内視鏡サーベイランスは有効でないことを示唆する (Corley, D.A. et al. Impact of Endoscopic Surveillance on Mortality From Barrett's Esophagus-Associated Esophageal Adenocarcinomas. Gastroenterology 145, 312-319 e1 (2013)、Reid, B.J.

, Li, X., Galipeau, P.C. & Vaughan, T.L. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat Rev Cancer* 10, 87-101 (2010))。BE についての内視鏡サーベイランスに関わる困難は、無作為生検プロトコールに固有であるサンプリングの偏りと、異形成の主観的で時間がかかる病理組織学的診断とを含む。よって、我々は、BEサーベイランスのこれらの制限を克服する可能性を有する新規なアプローチを開発した。戦略は、Cytosponge (商標) と呼ばれる内視鏡検査によらないデバイスを含み、これは、プライマリケアの環境で患者に提供できる。このデバイスは、食道粘膜全体から細胞を回収し、よって、サンプリングの偏りを回避し、診断のための客観的バイオマーカーと組み合わせることができる (Kadri, S.R. et al. Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study. *BMJ* 341, c4372 (2010)、Lao-Sirieix, P. et al. Non-endoscopic screening biomarkers for Barrett's oesophagus: from microarray analysis to the clinic. *Gut* 58, 1451-9 (2009))。現在までに、我々は、BEを診断するためのバイオマーカーに焦点を当ててきたが、ほとんどのBE患者はEACに進行しないので、このBEバイオマーカーを、高リスク異形成患者を同定するためのバイオマーカー (又はバイオマーカーのパネル) と組み合わせる必要がある。上記の配列決定データから、TP53変異が、良好なリスク階層化候補マーカーの基準に適合する。なぜなら、TP53変異は、治療介入の重要な点である高度異形成を有する患者と有さない患者との間を識別するからである。デバイスは異常組織をサンプリングするが、回収される細胞の大多数は、胃の頂部からの正常胃腺組織及び食道の正常扁平上皮領域からであるので、いずれの変異DNAも理論的には少数派であり、非常に感度が高いアッセイを必要とする (図10a)。この状況は、進行悪性疾患におけるバイオマーカーとしての血液中の腫瘍細胞フリーDNAの検出と類似する。感度が高いアッセイが、正常バックグラウンドに対して非常に低レベルの変異DNAを検出するために開発されている (ForsheW, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012)、Dawson, S.J. et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368, 1199-209 (2013))。よって、我々は、Cytosponge (商標) 物質における変異を検出するために類似のアプローチをとった。

【0292】

BE病変内の変異を、Cytosponge (商標) から回収した物質において検出できるかを決定するために、我々は、まず、内視鏡によるBE生検において以前に同定された変異を試験した。HGD異形成の4名の患者は、TP53変異を有し、Cytosponge (商標) も嚥下した (患者4は2回)。4名全ての患者について、特定のTP53変異が、0.04から0.24の間の対立遺伝子分率 (パリアントの読み取りの割合) で検出された (図10b)。

【0293】

次いで、我々は、臨床試験で要求されるので、Cytosponge (商標) を用いて回収された物質内で我々が未知のTP53変異を検出できるかを試験した。我々は、TP53のコード領域の大部分 (1019 / 1182 bp (86%)) を多重化PCRにより増幅し、増幅DNAを、大規模並行配列決定により配列決定した。TP53変異は、対照患者 (BEなし)、異形成を有さないBE患者及び高度異形成を有するBE患者からの試料に対するTAm-Seq (ForsheW, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012)) を用いて *de novo* と呼ばれた。我々が期待したように、TP53変異は、対照患者又は異形成を有さないBE患者からの試料において同定されず (図10c)、HGDを有する患者と異形成を有さない患者との区別において100%の特異性を実証した。対照的に、TP53変異は、19 / 22 (86%) のHGD患者で同定された。TP53変異の対立遺伝子分率は広く変動したが (0.006 ~ 0.357の間)、この範囲内のいずれもうまくコールでき、変異は、期待されたように、DNA結合ドメイン内にほと

10

20

30

40

50

んどクラスタリングされた (図 10 d)。

【0294】

考察

BE は、唯一の既知の EAC の前駆病変であり、*de novo* を示す症例の > 80% で同時出現する (Theisen, J. et al. Preoperative chemotherapy unmasks underlying Barrett's mucosa in patients with adenocarcinoma of the distal esophagus. *Surg Endosc* 16, 671-3 (2002)) が、BE 患者の大多数は、浸潤性疾患に決して進行しない (Bhat, S. et al. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst* 103, 1049-57 (2011))。よって、進行のリスクがある患者を同定できる、感度が高く特異的なバイオマーカーに対する必要性が存在する。ノウエル仮説ほど昔に、ゲノム変異の段階的選択が、癌の進展のために必要であると仮定された (Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-8 (1976))。体細胞ゲノムバリエーションは、よって、疾患段階の感度が高く、高度に特異的なマーカーであるはずである。反復的に変異する遺伝子の我々のパネルについて、異形成に進展したことがない BE の患者のコホートと、HGD を有する患者のコホートとにおいてスクリーニングすることにより、我々は、これらの疾患段階にわたる変異の段階的な蓄積を同定することを望んだ。驚くべきことに、我々は、未異形成 BE において検出可能な対立遺伝子分率 (> 10%) にて生じる多数の変異を同定した。興味深いことに、EAC における最も一般的な遺伝子変異も、癌関連遺伝子、例えば SWI / SNF 複合体のメンバーである ARID1A 及び SMARCA4 内での変異を含んで、BE 及び HGD 試料において同様の頻度で存在した。これらのデータは、完全に良性の病理組織学的外観を有する、悪性進行のリスクが非常に低い組織内にさえ存在し得る複雑な変異の眺望を証明する。疾患進展のこのような早期段階でのこれらの変異の厳密な役割は、不明のままである。しかし、クローン性増大が BE で頻繁に生じることが知られており、これらの変異が、上皮構造の破壊を導くことなく、又は浸潤のために必要な細胞特徴を提供することなく、クローンの適応度の増加をもたらすことが可能である。同様の観察結果が、子宮内膜癌で報告されている。正常集団では、およそ 35% の女性が子宮内膜組織内に PTEN 変異腺を有するが、子宮内膜癌の生涯リスクは、およそ 2.5% である (Mutter, G.L. et al. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res* 61, 4311-4 (2001))。

【0295】

我々の結果は、悪性病変の早期の診断のために変異の感度が高い検出を用いることを目的とする試験の特異性について実質的な意味を有する (Maley, C.C. et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet* 38, 468-73 (2006))。癌のリスクにある個体を予測するバイオマーカーは、癌に進展する者と癌に進展しない者とを区別する実質的な予測力を有する必要がある。我々の研究では、なかでも ABCB1、CNTNAP5、MYO18B を含む EAC において反復的に変異する遺伝子のほとんど全てが、進行リスクについてのサーベイランスツールとして用いることから除外される。TP53 及び SMAD4 における変異だけが、疾患状態の境界を正確に規定した。SMAD4 の変異が EAC でのみ見出されたという事実は、EAC と HGD との間の明確な遺伝子的違いを示す。しかし、SMAD4 変異の頻度の低さ (13%) により、これは、バイオマーカー開発のための候補として最適以下である。さらに、EAC ではなくむしろ HGD は、現在、内視鏡治療の到来により、理想的な臨床的介入点である。よって、我々は、原理の証明の Cytosponge (商標) 研究のために TP53 に焦点を当てた。配列決定技術は、現在、日常的な臨床使用のために導入されており、対象となる遺伝子は、迅速に、優れた感度で配列決定でき、定量的読み出しを与える (Forsheiw, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012))。我々は、単純で臨床的に用いることができる試験を用いて、86% の HGD Cytosponge (商標) 試料において変異を検出した。いずれの早期検出プログラムの感度も改善するために、検出可能な T

P 5 3 変異を有さない少数派の患者において H G D 及び E A C を駆動する遺伝子的又はエピジェネティックな変化を同定することも重要である。さらに、遺伝子多様性が B E への進行を予測することが示されているので、遺伝子のパネルにおいて変異の存在及び相対的割合の両方を見る体細胞変異試験を行って、高リスク疾患の患者を同定することも可能であり得る (Maley, C.C. et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. Nat Genet 38, 468-73 (2006))。

【 0 2 9 6 】

結論として、未異形成 B E は、E A C における反復的に変異する遺伝子に影響する頻繁な変異を有する。未異形成 B E における悪性疾患への進行の率が低いことに鑑みて、悪性病変への道のりにおけるこれらの変異の役割は、不明である。腫瘍において観察される変異が直線的進行で生じ、各ステップがクローンを浸潤性の終点に近づけることが、一般的に受け入れられている。悪性病変に進展しなかった患者の組織におけるほとんど全ての反復的に変異する遺伝子での変異の我々の観察は、癌に向かう進行におけるこれらの変異の主要な役割と相反する。それらの反復的な性質は、前癌性段階でのクローン増大における役割を示唆するが、これらは、悪性病変進行の可能性の長期間の増加をもたらすようには見受けられない。

【 0 2 9 7 】

臨床的視点から、E A C における反復的に変異する遺伝子の大多数が疾患の前癌性段階と悪性段階とを区別しないので、よって、これらは悪性病変進行のバイオマーカーとして、変異又は非変異という単純な 2 元試験に用いることができない。Cytosponge (商標) は、食道粘膜全体の代表的な試料を提供し、ハイスループット配列決定と結びつけることにより、H G D の高感度で客観的な検出ができる。このアプローチは、この疾患の遺伝子的基礎についての我々の理解が進むにつれて、容易に適応できる。さらに、前浸潤性疾患を浸潤性疾患から区別するステップに関わる重要な変異を同定するための我々の系統だった分子アプローチは、早期検出に従うその他の上皮癌に対して応用性がある。

【 0 2 9 8 】

方法

試料回収、病態検討及び抽出。

本研究は、施設倫理委員会 (R E C N 0 7 / H 0 3 0 5 / 5 2 及び 1 0 / H 0 3 0 5 / 1) により承認され、全ての患者から個別にインフォームドコンセントを得た。発見コホートについて、食道腺癌 (E A C) 患者を予測的に採用し、試料を、手術による切除又は超音波内視鏡 (E U S , endoscopic ultrasound) のいずれかから得た。血液又は腫瘍から少なくとも 5 c m 離れた正常扁平上皮食道試料を、生殖系列参照として用いた。全ての組織試料を、回収の直後に液体窒素中で直ちに凍結し、 -80°C にて貯蔵した。D N A 抽出の前に、各食道組織試料から 1 枚の切片を切り取り、H & E 染色を行った。癌試料は、2 名の熟練病理学者が腫瘍細胞充実性 7 0 % を確認する合意検討の後にのみ、D N A 抽出について適切であると考えた。血液が入手可能でない場合、同じ検討プロセスを正常食道試料に当てはめて、扁平上皮のみが存在することを確実にした。発見コホートについて、1 2 7 の症例を 2 つの施設 (ケンブリッジ及びサウサンプトン) からスクリーニングした。6 3 の症例は、I C G C 基準に合致するために要求される 7 0 % 細胞充実性を有し、これらのうち、2 2 の腫瘍：正常対は、抽出された D N A の十分な質及び量 (合計収量 $5 \mu\text{g}$) を有し、これらを全ゲノム配列決定に供した。利用可能な残りの 1 0 5 の症例から、9 0 は $> 5 0 \%$ 細胞充実性を有し、これらの全てはアンプリコン配列決定のために十分な D N A を有した。発見コホート及び検証コホートの全ての症例について、2 6 0 / 2 8 0 比率は 1 . 8 ~ 2 . 1 であった。前浸潤性疾患コホートについて、我々は、 $> 5 0 0$ 名患者の我々の 1 0 年予測パレット食道コホート全体をスクリーニングし、凍結物質が入手可能で、凍結切片の検討により、熟練者の組織病理学的検討後に均質グレードの異形成が明らかになった症例を選択した。Cytosponge (商標) 試料は全て、進行中の前向き症例対照研究 (B E S T 2) からの一時的分析の一部として利用可能なものであった。

【 0 2 9 9 】

DNAを、凍結食道組織からDNeasyキット(Qiagen社製)を用いて、そして血液試料から製造業者の使用説明に従ってNucleon(商標)ゲノム抽出キット(Gen-Probe社製)を用いて抽出した。検証のために、DNAを、製造業者の使用説明に従ってAllPrepDNA/RNAミニキット(Qiagen社製)を用いて抽出した。

【0300】

全ゲノム配列決定

各試料について単独ライブラリーを創出し、少なくとも8×カバー率まで既知のゲノムの94%が配列決定される少なくとも50×の典型的深度まで100bpペアエンド配列決定をIllumina社により契約の下で行い、マッピングした塩基の少なくとも80%について少なくとも30のPHREDクオリティを達成した。典型的に、HiSeq-2000(Illumina社製)フローセルの5つのレーンがこれを達成したが、試料を多重化しなかったため、いくつかはこれらの最小限の標準を大きい差で超えた。フィルタにかけた読み取り配列を、バローズ-ホイラーアラインメント(BWA, Burrows-Wheeler Alignment)(Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-60 (2009))を用いてヒト参照ゲノム(GRC h37)にマッピングし、Picard(<http://picard.sourceforge.net>)を用いて重複に印をつけた。広範な品質保証プロセスの一部として、レーンごとにQC測定基準及びアラインメント統計を計算した。各発見コホート試料についての統合したQCを決定した。QC後に取り除いたフローセル内のいずれのタイルの詳細も決定した。

10

【0301】

FastQCパッケージ(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)を用いて、配列決定読み取りのクオリティスコアの分布を評価し、配列決定の後半のサイクルにおけるクオリティの低下によりトリミングを必要とする3レーンの配列決定を同定できた。

20

【0302】

WGS変異コール

体細胞ヌクレオチドバリエーション(SNV, single nucleotide variant)を、以下のコマンドで作動するSomaticSniper V1.0.2(Larson, D.E. et al. SomaticSniper: identification of somatic point mutations in whole genome sequencing data. *Bioinformatics* 28, 311-7 (2012))を用いて予測した:

30

```
somaticsniper -q 1 -Q 15 -F vcf -J -r 0.001000 -T 0.850000 -N 2 -s 0.01 -f
```

【0303】

SomaticSniperからの出力を、次いで、SomaticSniper及びVarScan 2(Koboldt, D.C. et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22, 568-76 (2012))に適用した発見的フィルタの比較から導き出される以下の基準を用いてフィルタにかけ、Koboldt et al(Koboldt, D.C. et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22, 568-76 (2012))に示されるスクリプト及びカスタムスクリプト(ホモポリマーフィルタ)を用いて実行した。

40

1. 生殖系列及び腫瘍試料カバー率 10
2. 読み取りにおける平均バリエーション位置10位から90位の間
3. 各鎖からの支持読み取りのパーセンテージ 1%及び 99%
4. 全支持読み取り 4
5. 支持読み取りの有効3'端からのバリエーション塩基の平均距離 20bp
6. 参照支持読み取りとバリエーション支持読み取りとの間の平均マッピングクオリティの差 < 30
7. 参照読み取りとバリエーション読み取りとの間のトリミング配列の長さの平均の差 < 25bp
8. 参照読み取りとバリエーション読み取りとの間のミスマッチクオリティ合計の差 < 100

50

9 . 隣接ホモポリマー < 5 b p

10 . 最も近い i n d e l 40 b p

【0304】

さらに、全てのバリエーションを dbSNP 129 と比較し、予測される生殖系列 SNP とオーバーラップする場合、取り除いた。マッピング可能なゲノムの中央値 99.7% が、腫瘍及びマッチする生殖系列試料において少なくとも 10 倍のカバー率までカバーされたので、コール可能と定義された。

【0305】

候補体細胞 i n d e l を、SAMtools (Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-9 (2009)) と Pindel (Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics* 25, 2865-71 (2009)) との間のコンセンサスとして採用し、22 の試料 (非コンセンサス i n d e l コールを含む) のいずれかのマッチする正常ゲノムに存在する i n d e l を排除するためにフィルタにかけた。コード領域及びスプライス部位に入る i n d e l は、手動で点検して、コールの最終リストを作成した。バリエーションに、配列オントロジー用語で注釈をつけて、Ensembl 遺伝子注釈付けに対する結果及び位置を示した。SNV 及び i n d e l は、UniSNP におけるマッチするか又は最も近い特徴でも注釈をつけた。

【0306】

PCR によるインデル (i n d e l) バリエーションの確認

手動の検討により確認された合計で 25 のコーディング i n d e l を、確認のために無作為に選択した。プライマー (配列は、依頼に応じて入手可能である) を設計して、予測されるバリエーションの場所を増幅した。PCR は、腫瘍及び正常 DNA の両方に対して行い、得られた生成物をサンガー配列決定した。全ての痕跡を、Chromas lite 2.01 を用いて視覚化し、バリエーションの存在について手動で検討した。i n d e l が腫瘍痕跡にのみ存在する場合、その i n d e l を体細胞性に見なした。

【0307】

標的化再配列決定による一ヌクレオチドバリエーションの確認

我々の SNV コーリングパイプラインのより大きいベンチマーク評価の実行の一部として、我々は、2007 の SNV を確認するために選択した。これらの SNV は、フィルタを通らず、Illumina パイプライン、ELAND アラインメントと STRELKA を用いて予測されていたものを含んだ。これらのデータの完全な分析は進行中であり、全体的な目的は、我々の SNV コーリングパイプラインの感度を最適化することである。予備的分析及び ICGC ベンチマーク評価の実行の比較の後に、我々は、この予備的データセット (上で詳述する) について我々のフィルタの厳密さを増加することを選択した。この原稿における確認データは、これらのさらなるフィルタを通過する SNV についてのみである。推定非同義 SNV (合計で 1330) は、超高深度標的化配列決定を受けた。8 つの試料について、全ての非同義バリエーションを確認のために送った。残りの 14 の症例では、選択した SNV を、1 つを超える試料で変異する遺伝子における非同義バリエーションに限定した。アンプリコンを作製し、索引をつけ、プールし、Shah et al (Shah, S.P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486, 395-9 (2012)) に従ってライブラリーを構築した。試料は別々にプールし、HiSeq-2000 データの単独レーンをそれぞれについて作製し、13,855 のカバー率の典型的な深度 (アンプリコンについて IQR: 3,408 ~ 39,059) を導いた。これらのうち 1086 について、50 倍カバー率を、腫瘍及び正常の両方について作製した。バリエーション対立遺伝子頻度がマッチする正常において 1% であり、腫瘍において 2% である場合、SNV は体細胞性であることが確認され、1081 の SNV がこれらの基準に合致し、1081 / 1086 (99.5%) の確認率が得られた。

【0308】

独立した試料における変異の検証

変異の検証を、43の病理組織学的に確認されたHGDを有するBE生検及び66の異形成を有さない生検を含む、90のさらなるEAC及び109のBE生検のコホートにおいて行った。Access Array微量流体PCRプラットフォーム(Fluidigm社)と、ハイスループット配列決定(Illumina社)とを一緒に、標的化再配列決定のために用いた。

【0309】

中央値サイズ180bp(範囲100~200bp)を有するアンプリコンを、Fluidigm社製の自前のソフトウェア(プライマーは、依頼に応じて入手可能である)(Forshew, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012))を用いて設計した。プライマー設計を2回反復した後に、1つの遺伝子が適切なアンプリコンによりカバーされずに残り(DIRC3)、これをさらなる分析から取り除いた。よって、合計で26の遺伝子を選択した。全てのプライマーは、ユニバーサル配列(CS1及びCS2と称する)を5'端に添えて合成した。

【0310】

標的増幅及び試料へのバーコード付加は、製造業者の標準的な多重化プロトコール(Fluidigm社、Access Arrayユーザガイド)を用いて行った。プライマーを、1~12プライマー対の範囲の多重化プールに組み合わせた。Access Arrayシステムを用いて、PCR試薬(FastStart高忠実度PCRシステム、Roche社製)を47のDNA試料(50ng)+単独陰性対照及び48組の多重化プライマーと、2,304のユニーク35nL PCR反応液に組み合わせた。サーマルサイクルを次いで行って、PCRにより選択された全ての標的を増幅した。PCR後に、試料注入口を通して、後続の配列決定のために、採集試薬を用いて試料あたり48多重化反応の増幅生成物を回収した。Illumina配列決定アダプタ及び10bp試料特異的バーコードを、さらなる15サイクルのPCRにより結合させた。PCR生成物にバーコードを付加した後に、少数の試料からのPCR生成物及び水対照を、Agilent 2100 BioAnalyzerを用いて分析して、期待されるアンプリコンサイズが得られたこと及びPCR反応全体にわたって混入がないことを確実にした。これらを、次いで一緒にプールし、1.8:1.0のビーズ対アンプリコンの比率を用いて、AMPure XPビーズを用いて精製した。ライブラリーは、Agilent BioAnalyzerを用いて定量し、Illuminaクラスタ作製に供した。100~150bpのペアエンド配列決定を、製造業者の推奨に従って、読み取り1、読み取り2(索引読み取り)及び読み取り3の両方についてCS1及びCS2タグを標的にするカスタム配列決定プライマーを用いて、10塩基索引付加(バーコード)読み取りでaHiSeq 2000又はMiSeqで行った。

【0311】

TAm-Seqを用いて作製した標的化配列決定データの分析のために用いた方法は、以前に報告されている(Forshew, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012))。読み取りを、ゼロミスマッチを可能にするバーコードの既知のリストを用いて逆多重化した。各組の読み取りを、ペアエンドモード(Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-60 (2009))でBWAを用いてhg19参照ゲノムと独立して整列させた。期待されるゲノム位置を用いて、各組の整列させた読み取りを、その構成アンプリコンにさらに分離した。各アンプリコンについてSAMtools v1.17(Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-9 (2009))を用いてパイルアップを作製した。30の塩基クオリティ及びマッピングクオリティカットオフを用いて、全てのアンプリコン及びバーコードにわたるそれぞれ全ての配列決定した遺伝子座についての非参照対立遺伝子の観察された頻度を算出した。各遺伝子座及び塩基について、非参照バックグラウンド対立遺伝子頻度/読み取りの分布をモデル化し、読み取りの観察された頻度/数(又はそれより多く)を得る確率を算出した。推定置換を、0.9995の確率カットオフ(信頼区間の縁)に基づいて同定した。1000 Genomesプロジェク

ト、dbSNPバージョン135から得られた既知のSNP及び増幅プライマーをカバーする領域を廃棄した。>5%対立遺伝子頻度にて配列決定した試料の半分より多くで観察されるいずれの置換も廃棄した。配列の小さい挿入及び欠失は、GATKを用いて予測した。全ての残りの推定変異に、配列オントロジー用語で注釈をつけて、Ensembl遺伝子注釈付けに対する結果及び位置を示した。この最終リストでは、少なくとも100倍でカバーされた遺伝子座にて10%以上の対立遺伝子頻度を有する全てのナンセンス又はミスセンスエクソン変異及びスプライシング変異を保持した。

【0312】

全ての試料での乏しい配列カバー率のために、3つの遺伝子、TLR1、TLR7及びTLR9をこの段階で取り除いて、さらなる分析のために合計で23の遺伝子が残った。

10

【0313】

コールされた変異を確認するために、Fluidigm Access Array配列決定から同定した全ての非同義変異を、元の試料からの領域及びDNAを標的にするCS1タグ/CS2タグ付加プライマー対を用いて再増幅した。利用可能であれば、マッチする正常試料(血液、十二指腸又は正常扁平上皮)からのDNAも、同一のタグ付加プライマー対を用いて増幅した。増幅は、5µlの反応液(0.1Phusion(登録商標)高忠実度DNAポリメラーゼ(New England BioLabs社製)、1×Phusion緩衝液、4.5mM MgCl₂、5% DMSO、0.2mM dNTP、1µMフォワード及びリバースプライマー、25ngゲノムDNA中で行った。PCRサイクル条件は、以下のとおりであった。50にて2分、70にて20分、95にて10分、その後、95にて15秒、60にて30秒及び72にて1分を10サイクル、その後、95にて15秒、80にて30秒、60にて30秒及び72にて1分を2サイクル、その後、95にて15秒、60にて30秒及び72にて1分を8サイクル、その後、95にて15秒、80にて30秒、60にて30秒及び72にて1分を2サイクル、並びに95にて15秒、60にて30秒及び72にて1分を8サイクル、その後、95にて15秒、80にて30秒、60にて30秒及び72にて1分を5サイクル。増幅の後に、2µlの各PCR反応液を回収し、各プールにユニークアンプリコンだけが含まれるように12反応のバッチにプールした。その後、5µlのプールした反応ミックスを2µlのExoSAP-IT(登録商標)(Affymetrix社製)に加えた。試料を37にて15分、その後、80にて15分インキュベートした。得られた生成物を滅菌水中で1:100に希釈し、さらに15サイクルのPCR(0.1unitPhusion(登録商標)高忠実度DNAポリメラーゼ(New England BioLabs社製)、1×Phusion緩衝液、4.5mM MgCl₂、5% DMSO、0.2mM dNTP、1µMフォワード及びリバースプライマー、1µlのExoSAP-IT(登録商標)で処理したPCR生成物(1:100希釈)を用いて、Illumina配列決定アダプタ及び10bpのバーコードを各プールに結合させた。サイクル条件は、以下のとおりであった。95にて2分の熱活性化、その後、95にて15秒、60にて30秒及び72にて1分を15サイクル、その後、72にて3分の最終伸長ステップ。

20

30

【0314】

以前と同様に、バーコード付加の後のPCR生成物を、Agilent 2100 BioAnalyzerを用いてまず分析して、期待されるアンプリコンサイズが得られたことを確実にした。これらを、次いで一緒にプールし、1.8:1.0のビーズ対アンプリコンの比率を用いて、AMPure XPビーズを用いて精製した。ライブラリーは、Lightcycler(登録商標)480(Roche社製)でKAPA-ライブラリー定量キット(KAPA Biosystems社製)を用いて定量し、2nMに希釈し、Illuminaクラスタ作製及びIllumina MiSeq(150bpペアエンド)での配列決定に供した。読み取りを、ゼロミスマッチを可能にするバーコードの既知のリストを用いて逆多重化した。各組の読み取りを、ペアエンドモード(Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-60 (2009))でBWAを用いてhg19参照ゲノムと独立して整列させた。Samtools pileup v1.17(Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.

40

50

Bioinformatics 25, 2078-9 (2009)) を用いて、推定体細胞突然変異の位置にて各ヌクレオチドについてのカウントを得た。変異体対立遺伝子頻度 3% 及びカバー率の深度 50 の試料を、確認された変異と見なした。さらに、マッチする正常における変異体対立遺伝子頻度は、 $< 1\%$ であることが要求された。我々は、マッチする正常がない全ての変異をこれらの試料からさらに取り除いたが、これらは、配列決定されたマッチする正常を有する試料のコホートにおいて生殖系列であることが確認された。

【0315】

カプセルスポンジ検体の処理

Cytosponge (商標) カプセルは、患者により嚥下され、次いで、さらなる処理まで 4 にて保存剤溶液に直ちに入れた。試料を十分にボルテックスし、激しく振とうして、スポンジ材料からいずれの細胞も取り除いた。細胞を含有する保存剤液を 1000 RPM で 5 分間遠心分離して、細胞をペレットにした。得られたペレットを 500 μ L の血漿に再懸濁し、トロンピン (Diagnostic reagents社、Oxford、UK) を次いで、10 μ L の増加量で、血餅が形成されるまで加えた。血餅を、次いで、ホルマリンに 24 時間入れた後に、処理してパラフィンブロックにした。8 x 10 マイクロメートルの切片を切り出し、DNA 抽出のためにチューブに入れた。

10

【0316】

Cytosponge 試料からの DNA 抽出

ゲノム DNA を、処理された Cytosponge (商標) FFPE 血餅の 8 x 10 μ m 切片から、脱パラフィン緩衝液 (Qiagen社製) 及び QIAamp FFPE DNA 組織キット (Qiagen社製) を用いて抽出した。プロトコールは、試料を、記載される 1 時間の代わりに 56 にて 24 時間インキュベートし、10 μ L の余剰のプロテイナーゼ K を 24 時間のインキュベーションのほぼ半分が過ぎたところで試料に加えた以外は、製造業者により記載されるとおりに従った。抽出の後に、DNA を、Qubit (商標) dsDNA HS アッセイキット (Invitrogen社製) を用いて定量した。

20

【0317】

TP53 変異についての配列決定

多重化 TP53 PCR アッセイを用いて、TP53 遺伝子のコード領域を配列決定した。多重化は、14 プライマー対 (ForsheW, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci Transl Med 4, 136ra68 (2012)) からなり、これらの 14 プライマー対を 2 つの異なるプールに分割した。プライマーのそれぞれの配列、それらが増幅するゲノム領域 (座標は、ヒトゲノムの hg19 バージョンについて正しい) 及びそれらがどのプールの一部であるかを、表 12 及び 13 に記載する。

30

【0318】

全ての p53 多重化 PCR を、Q5 ホットスタート高忠実度 2 x マスターミックス (New England Biolabs社製) を用いて、二重に行った。TP53 遺伝子のコード領域を、1 x Q5 マスターミックス、5% DMSO、最終濃度 50 nM の各プライマー対及び Cytosponge 試料から抽出した最大 70 ng までの FFPE DNA からなる PCR ミックスを用いて、まず増幅した。PCR についてのサイクル条件は、95 にて 30 秒の初期変性、その後、95 にて 10 秒、60 にて 10 秒及び 72 にて 15 秒を 30 サイクルであった。72 にて 2 分の最終伸長も含めて、全ての PCR 生成物の伸長を確実にした。

40

【0319】

1 回目の PCR の後に、2.5 μ L のプール 1 及び 2.5 μ L のプール 2 を一緒にプールした。2 マイクロリットルの IllustraExostar 1-Step (GE Healthcare UK Ltd社製) を 5 μ L のプールした PCR 生成物に加え、Exostar 反応を行って (37 にて 15 分、その後、80 にて 15 分) 1 回目の反応からのプライマーを分解した。1 マイクロリットルのプールした Exostar 処理生成物を、次いで、バーコード PCR に加えて、ユニークバーコードを付加するとともに、PCR 生成物に配列決定プライマーを加えた。この 2 回目の PCR に用いたバーコードは、ForsheW et al (ForsheW, T. et al. Noninvasive iden

50

tification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012) から得て、バーコードプライマーのコア配列は、表 14 で見出すことができる。Fluidigmバーコードプライマーは最初の p53 プライマーに存在する CS1 及び CS2 配列並びに Illumina アダプタと結合する配列を含むので、これらのプライマーを用いた。バーコード PCR ミックスは、1 × Q5 マスターミックス、5% DMSO、最終濃度 400 nM の各バーコードプライマー対及び 1 u1 の未希釈 Exostar 処理 DNA からなった。PCR のサイクル条件は、98 にて 30 秒の初期変性、その後、98 にて 10 秒、60 にて 10 秒及び 72 にて 30 秒を 14 サイクルであった。72 にて 2 分の最終伸長も含めて、全ての PCR 生成物の伸長を確実にした。

10

【0320】

Cytosponge (商標) 試料で TP53 変異を検出するための TAM-seq SNV 及び indel コール

indel は、バックグラウンド変異率の遺伝子座特異的分布から異常値を選択することによりコールした。各試料における候補挿入及び欠失を、全てのその他の患者からの試料における同じ遺伝子座での挿入及び欠失率と比較して、z スコアによりスコア化した。10 以上の z スコア、少なくとも 200 × のカバー率及び少なくとも 5 つの支持読み取りを有する indel を保持した。

【0321】

実施例 10 の方法についての参考文献

20

1. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-60 (2009)
2. Larson, D.E. et al. SomaticSniper: identification of somatic point mutations in whole genome sequencing data. *Bioinformatics* 28, 311-7 (2012)
3. Koboldt, D.C. et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22, 568-76 (2012)
4. Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-9 (2009)
5. Ye, K., Schulz, M.H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics* 25, 2865-71 (2009)
6. Shah, S.P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486, 395-9 (2012)
7. Forshew, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012)

30

【0322】

実施例 10 についての参考文献

1. Chin, L., Andersen, J.N. & Futreal, P.A. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nat Med* 17, 297-303 (2011)
2. Gerlinger, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366, 883-92 (2012)
3. Jones, S. et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4283-8 (2008)
4. Nik-Zainal, S. et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell* 149, 994-1007 (2012)
5. Vogelstein, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-32 (1988)
6. Goh, X.Y. et al. Integrative analysis of array-comparative genomic hybridisation and matched gene expression profiling data reveals novel genes with prognostic significance in oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 60, 1317-26 (2011)

40

50

7. Quante, M. et al. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell* 21, 36-51 (2012)
8. Greaves, M. & Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-13 (2012)
9. Varghese, S., Lao-Sirieix, P. & Fitzgerald, R.C. Identification and clinical implementation of biomarkers for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 142, 435-441 e2 (2012)
10. Dulak, A.M. et al. Gastrointestinal Adenocarcinomas of the Esophagus, Stomach, and Colon Exhibit Distinct Patterns of Genome Instability and Oncogenesis. *Cancer Res* (2012) 10
11. Dulak, A.M. et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet* 45, 478-86 (2013)
12. Agrawal, N. et al. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Discov* (2012)
13. Corley, D.A. et al. Impact of Endoscopic Surveillance on Mortality From Barrett's Esophagus-Associated Esophageal Adenocarcinomas. *Gastroenterology* 145, 312-319 e1 (2013)
14. Shaheen, N.J. & Hur, C. Garlic, Silver Bullets, and Surveillance Upper Endoscopy for Barrett's Esophagus. *Gastroenterology* 145, 273-6 (2013) 20
15. Hayes, D.F. et al. Breaking a vicious cycle. *Sci Transl Med* 5, 196cm6 (2013)
16. Nik-Zainal, S. et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 149, 979-93 (2012)
17. Fujimoto, A. et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 44, 760-4 (2012)
18. Bass, A.J. et al. Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nat Genet* 43, 964-8 (2011)
19. Streppel, M.M. et al. Next-generation sequencing of endoscopic biopsies identifies ARID1A as a tumor-suppressor gene in Barrett's esophagus. *Oncogene* (2013) 30
20. Curvers, W.L. et al. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus: overdiagnosed and underestimated. *Am J Gastroenterol* 105, 1523-30 (2010)
21. Wang, K. et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 43, 1219-23 (2011)
22. Jones, S. et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330, 228-31 (2010)
23. Reid, B.J., Li, X., Galipeau, P.C. & Vaughan, T.L. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat Rev Cancer* 10, 87-101 (2010)
24. Kadri, S.R. et al. Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study. *BMJ* 341, c4372 (2010) 40
25. Lao-Sirieix, P. et al. Non-endoscopic screening biomarkers for Barrett's oesophagus: from microarray analysis to the clinic. *Gut* 58, 1451-9 (2009)
26. Forshew, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 4, 136ra68 (2012)
27. Dawson, S.J. et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368, 1199-209 (2013)
28. Theisen, J. et al. Preoperative chemotherapy unmasks underlying Barrett's mucosa in patients with adenocarcinoma of the distal esophagus. *Surg Endosc* 16, 67 50

1-3 (2002)

29. Bhat, S. et al. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. J Natl Cancer Inst 103, 1049-57 (2011)
30. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194, 23-8 (1976)
31. Mutter, G.L. et al. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. Cancer Res 61, 4311-4 (2001)
32. Kinde, I. et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. Sci Transl Med 5, 167ra4 (2013)
33. Maley, C.C. et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. Nat Genet 38, 468-73 (2006)

10

【実施例 1 1】

【0 3 2 3】

統計解析

ここに、我々は、感度及び特異性に対する異なるバイオマーカーの組合せの効果を示す統計解析を詳細に示す。データは非常に良好であるように見受けられ、4つのバイオマーカーをアッセイすることは、確実に有利である。2つの表が以下にあり、1つは高度異形成のみについてであり、1つは任意の異形成についてである。

【0 3 2 4】

20

任意の異形成（軽度、高度及び不確定）からの結果を示す表：

【0 3 2 5】

【表 10】

ID	説明	ナイーブ		
		特異性(平均)	特異性(SD)	感度(平均)
31	非定型性、p53、MYC、メチル化、 Aurka	0.8409	0.0532	0.7546
30	p53、MYC、メチル化、Aurka	0.8546	0.0459	0.7395
27	非定型性、p53、MYC、Aurka	0.8768	0.0542	0.7067
16	非定型性、p53、MYC	0.8169	0.0469	0.7583
10	p53、MYC	0.8702	0.0413	0.6966
29	非定型性、MYC、メチル化、Aurka	0.8303	0.0498	0.7301
7	非定型性、MYC	0.8385	0.0447	0.7213
28	非定型性、p53、メチル化、Aurka	0.8488	0.0509	0.7081
24	p53、メチル化、Aurka	0.8825	0.0525	0.6629
23	p53、MYC、Aurka	0.8469	0.0978	0.6923
22	p53、MYC、メチル化	0.8498	0.0829	0.6879
20	非定型性、MYC、Aurka	0.8523	0.0757	0.6843
26	非定型性、p53、MYC、メチル化	0.8630	0.0515	0.6706
6	非定型性、p53	0.9045	0.0362	0.6243
19	非定型性、MYC、メチル化	0.8460	0.0600	0.6784
12	非定型性、Aurka	0.7258	0.0544	0.7945
21	非定型性、メチル化、Aurka	0.8445	0.0484	0.6707
17	非定型性、p53、メチル化	0.8732	0.0924	0.6376
25	MYC、メチル化、Aurka	0.8568	0.0500	0.6509
18	非定型性、p53、Aurka	0.8615	0.1082	0.6447
11	p53、メチル化	0.7305	0.0549	0.7749
8	非定型性、メチル化	0.7041	0.0622	0.7903
13	MYC、メチル化	0.6966	0.0629	0.7953
14	MYC、Aurka	0.6802	0.0556	0.7760
9	非定型性、Aurka	0.6838	0.0588	0.7715

ナイーブ
スコア

感度(SD)

感度(平均)

特異性(SD)

特異性(平均)

10

20

30

40

5	Aurka	0.7372	0.0522	0.7179	0.1026	1.4550
1	非定型性	0.9365	0.0297	0.5097	0.1110	1.4462
3	MYC	0.8919	0.0383	0.5450	0.1156	1.4369
4	メチル化	0.7366	0.0549	0.6984	0.1038	1.4350
15	メチル化、 Aurka	0.6776	0.1117	0.7232	0.1621	1.4008
2	p53	0.9469	0.0218	0.4319	0.1172	1.3788

10

20

30

40

50

【 0 3 2 6 】

高度異形成のみからの結果を示す表：

【 0 3 2 7 】

【表 1 1】

ID	説明	特異性(平均)	特異性(SD)	感度(平均)	感度(SD)	ナイーブ スコア
31	非定型性、p53、MYC、メチル化、 Aurka	0.8918	0.0486	0.8061	0.1019	1.6979
27	非定型性、p53、MYC、Aurka	0.8894	0.0410	0.8010	0.0937	1.6904
28	非定型性、p53、メチル化、Aurka	0.8610	0.0416	0.8287	0.0930	1.6897
30	p53、MYC、メチル化、Aurka	0.8616	0.0355	0.8261	0.0894	1.6877
26	非定型性、p53、MYC、メチル化	0.8917	0.0379	0.7751	0.0882	1.6668
24	p53、メチル化、Aurka	0.8873	0.0327	0.7709	0.0840	1.6582
21	非定型性、メチル化、Aurka	0.8619	0.0417	0.7890	0.0809	1.6509
10	p53、MYC	0.8724	0.0338	0.7779	0.0866	1.6503
20	非定型性、MYC、Aurka	0.8846	0.0545	0.7641	0.0939	1.6487
23	p53、MYC、Aurka	0.8957	0.0658	0.7492	0.1036	1.6449
6	非定型性、p53	0.9047	0.0282	0.7333	0.0866	1.6379
29	非定型性、MYC、メチル化、Aurka	0.8388	0.0416	0.7967	0.0890	1.6355
22	p53、MYC、メチル化	0.8936	0.0662	0.7343	0.1019	1.6278
17	非定型性、p53、メチル化	0.9103	0.0557	0.7146	0.1042	1.6249
18	非定型性、p53、Aurka	0.9089	0.0469	0.7135	0.1052	1.6224
16	非定型性、p53、MYC	0.8559	0.0605	0.7641	0.1069	1.6199
7	非定型性、MYC	0.8423	0.0355	0.7714	0.0927	1.6137
19	非定型性、MYC、メチル化	0.8829	0.0510	0.7216	0.1014	1.6045
25	MYC、メチル化、Aurka	0.8609	0.0391	0.7353	0.0956	1.5962
11	p53、メチル化	0.7378	0.0623	0.8497	0.1186	1.5875
8	非定型性、メチル化	0.7403	0.0997	0.8355	0.1704	1.5759
1	非定型性	0.9352	0.0232	0.6293	0.0974	1.5646
4	メチル化	0.7392	0.0445	0.8227	0.0791	1.5619
12	非定型性、Aurka	0.7339	0.0681	0.8258	0.1230	1.5597
13	MYC、メチル化	0.7108	0.0609	0.8478	0.1263	1.5586

10

20

30

40

2	p53	0.9680	0.0169	0.5566	0.1017	1.5246
5	Aurka	0.7375	0.0416	0.7720	0.0858	1.5095
15	メチル化、 Aurka	0.8010	0.1103	0.7080	0.1336	1.5090
9	非定型性、 Aurka	0.7360	0.1153	0.7642	0.1472	1.5002
14	MYC、 Aurka	0.6855	0.0574	0.7861	0.1072	1.4715
3	MYC	0.8915	0.0302	0.5743	0.1029	1.4658

10

20

30

40

50

【0328】

最終欄のスコアは、感度と特異性との合計である。これらを別々に見て、分散を考慮することがまだ重要である。

【0329】

よって、マーカー組合せを選択して、特異性の喪失を最小限にしながら感度を最大限にすることができる。

【実施例12】

【0330】

本実施例では、我々は、Cytosponge（商標）で異形成を検出するリスク階層化バイオマーカーの性能を示す。

LGD = 軽度異形成 HGD / IMC = 高度異形成 / 粘膜内癌

【0331】

【表 1 2】

	#患者	非定型性	p53	c-MYC	AURKA	MethyLight	≥1バイオマーカー+	≥2バイオマーカー+
未異形成対照	144	7	4	38	38	32	68 (47%)	19 (13%)
LGD	32	11	5	17	17	15	28 (88%)	18 (56%)
HGD/IMC	42	26	25	34	34	34	40 (95%)	38 (90%)

	≥1	≥2
#バイオマーカー陽性	95	90
感度	53	87
特異性		

10

20

30

40

【実施例 1 3】

【0 3 3 2】

本実施例では、我々は、p 5 3 I H C 及び核酸（配列決定による）のデータを、別々又は一緒のいずれかで示す。

【0 3 3 3】

【表 1 3】

	#	検出された TP53変異	p53著しい染色(強度=3)	両方 (変異及び著しい染色)	変異/著 しい染 色/両方 のいず れか	なし(すな わち変異も 著しい染色 もなし)
NDBE	44	0	0	0	0	44
HGD	22	19 (86%)	14 (64%)	12 (55%)	21 (95%)	1 (5%)

10

20

30

40

50

【 0 3 3 4 】

本発明の説明的な実施形態を、添付の図面を参照にして本明細書に詳細に開示したが、本発明は、これらの精密な実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲及びその等価物により定義される本発明の範囲を逸脱することなく当業者が様々な変更及び改変を行うことができることが理解される。

【 0 3 3 5 】

参考文献

- Bian, Y.S., Osterheld, M.C., Bosman, F.T., Benhattar, J., and Fontolliet, C. (2001). p53 gene mutation and protein accumulation during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Mod Pathol* 14, 397-403 10
- Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P.V., and Laird, P.W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28, E32
- Eads, C.A., Lord, R.V., Wickramasinghe, K., Long, T.I., Kurumboor, S.K., Bernstein, L., Peters, J.H., DeMeester, S.R., DeMeester, T.R., Skinner, K.A., et al. (2001). Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 61, 3410-3418
- Kadri, S.R., Lao-Sirieix, P., O'Donovan, M., Debiram, I., Das, M., Blazeby, J.M., Emery, J., Boussioutas, A., Morris, H., Walter, F.M., et al. (2010). Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study. *BMJ* 341, c4372 20
- Kastelein, F., Biermann, K., Steyerberg, E.W., Verheij, J., Kalisvaart, M., Looijenga, L.H., Stoop, H.A., Walter, L., Kuipers, E.J., Spaander, M.C., et al. (2012). Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus. *Gut*
- Kaye, P.V., Haider, S.A., Ilyas, M., James, P.D., Soomro, I., Faisal, W., Catton, J., Parsons, S.L., and Ragunath, K. (2009). Barrett's dysplasia and the Vienna classification: reproducibility, prediction of progression and impact of consensus reporting and p53 immunohistochemistry. *Histopathology* 54, 699-712
- Kaye, P.V., Haider, S.A., James, P.D., Soomro, I., Catton, J., Parsons, S.L., Ragunath, K., and Ilyas, M. (2010). Novel staining pattern of p53 in Barrett's dysplasia--the absent pattern. *Histopathology* 57, 933-935 30
- Lao-Sirieix, P., Brais, R., Lovat, L., Coleman, N., and Fitzgerald, R.C. (2004). Cell cycle phase abnormalities do not account for disordered proliferation in Barrett's carcinogenesis. *Neoplasia* 6, 751-760
- Lao-Sirieix, P., Lovat, L., and Fitzgerald, R.C. (2007). Cyclin A immunocytology as a risk stratification tool for Barrett's esophagus surveillance. *Clin Cancer Res* 13, 659-665
- Miller, C.T., Moy, J.R., Lin, L., Schipper, M., Normolle, D., Brenner, D.E., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., and Beer, D.G. (2003). Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res* 9, 4819-4825 40
- Rugge, M., Fassan, M., Zaninotto, G., Pizzi, M., Giacomelli, L., Battaglia, G., Rizzetto, C., Parente, P., and Ancona, E. (2010). Aurora kinase A in Barrett's carcinogenesis. *Hum Pathol* 41, 1380-1386
- Rygiel, A.M., Milano, F., Ten Kate, F.J., Schaap, A., Wang, K.K., Peppelenbosch, M.P., Bergman, J.J., and Krishnadath, K.K. (2008). Gains and amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 loci in the no dysplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 1380-1385
- Schulmann, K., Sterian, A., Berki, A., Yin, J., Sato, F., Xu, Y., Olaru, A., Wan 50

g, S., Mori, Y., Deacu, E., et al. (2005). Inactivation of p16, RUNX3, and HPP1 occurs early in Barrett's-associated neoplastic progression and predicts progression risk. *Oncogene* 24, 4138-4148

Sikkema, M., Kerkhof, M., Steyerberg, E.W., Kusters, J.G., van Strien, P.M., Loo man, C.W., van Dekken, H., Siersema, P.D., and Kuipers, E.J. (2009). Aneuploidy and overexpression of Ki67 and p53 as markers for neoplastic progression in Barrett's esophagus: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 104, 2673-2680

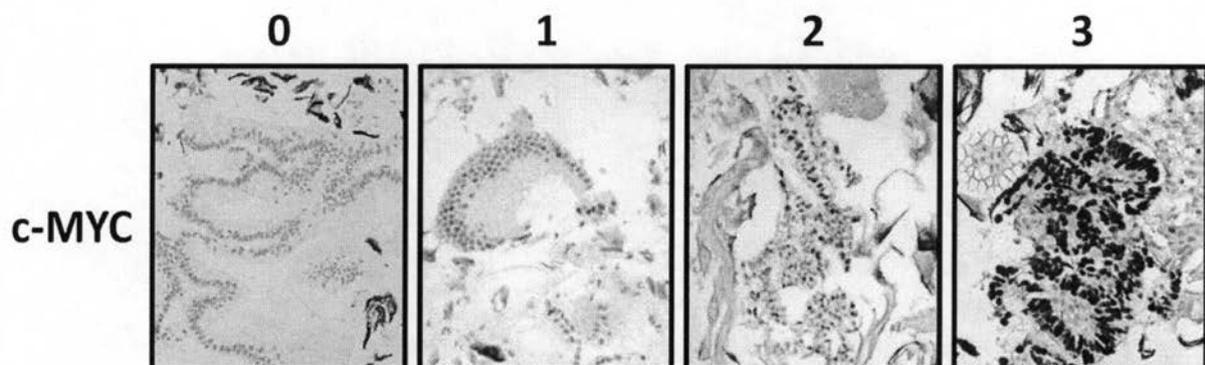
Skacel, M., Petras, R.E., Rybicki, L.A., Gramlich, T.L., Richter, J.E., Falk, G. W., and Goldblum, J.R. (2002). p53 expression in low grade dysplasia in Barrett's esophagus: correlation with interobserver agreement and disease progression. *Am J Gastroenterol* 97, 2508-2513

56 . Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20, 189-193

10

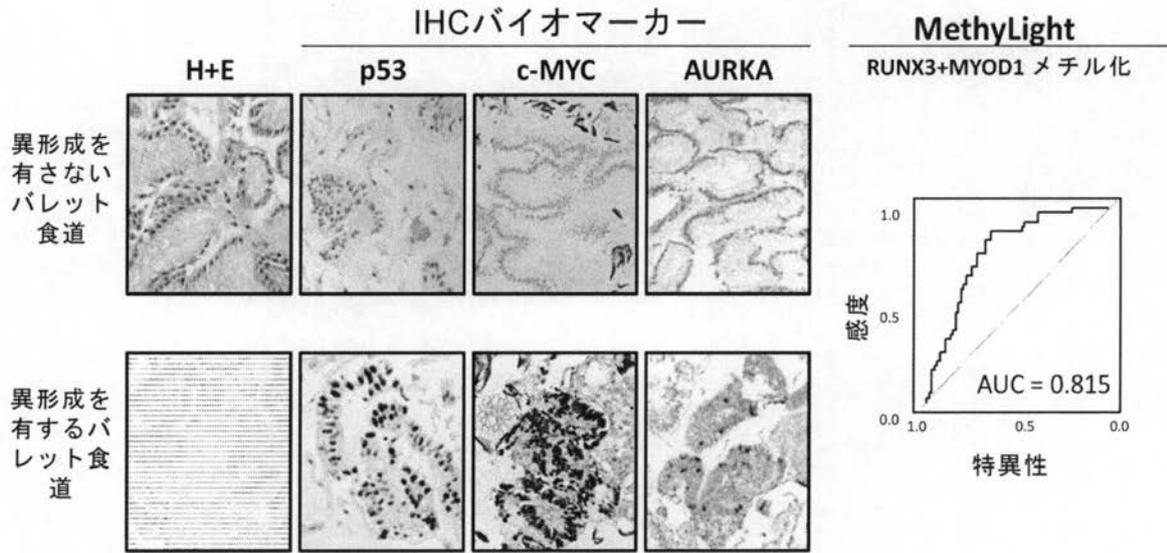
【 图 1 】

FIGURE 1



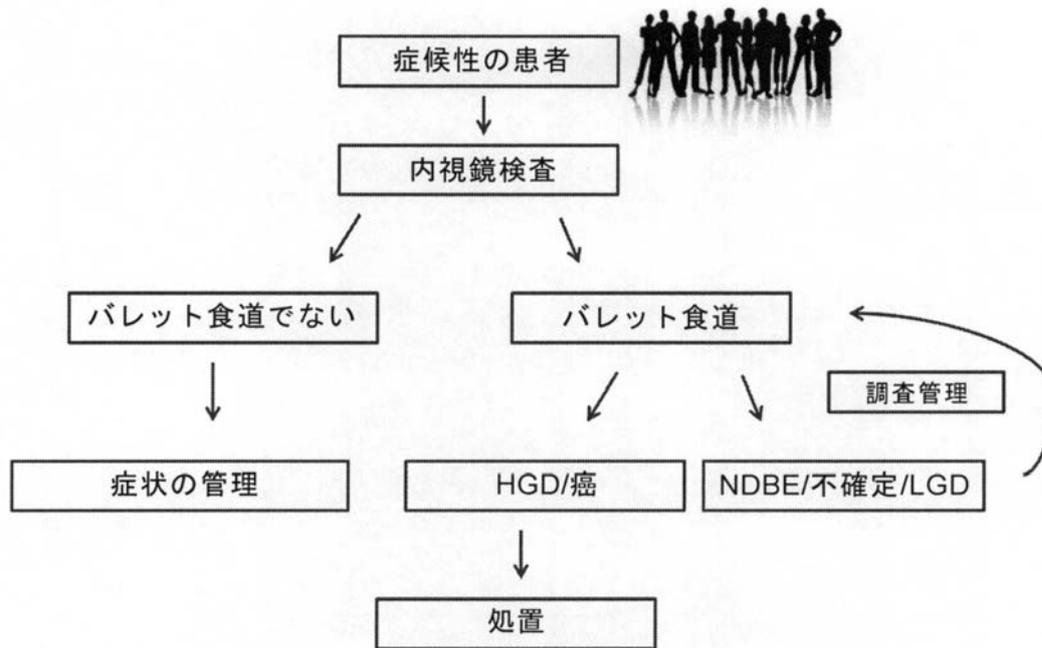
【図2】

FIGURE 2



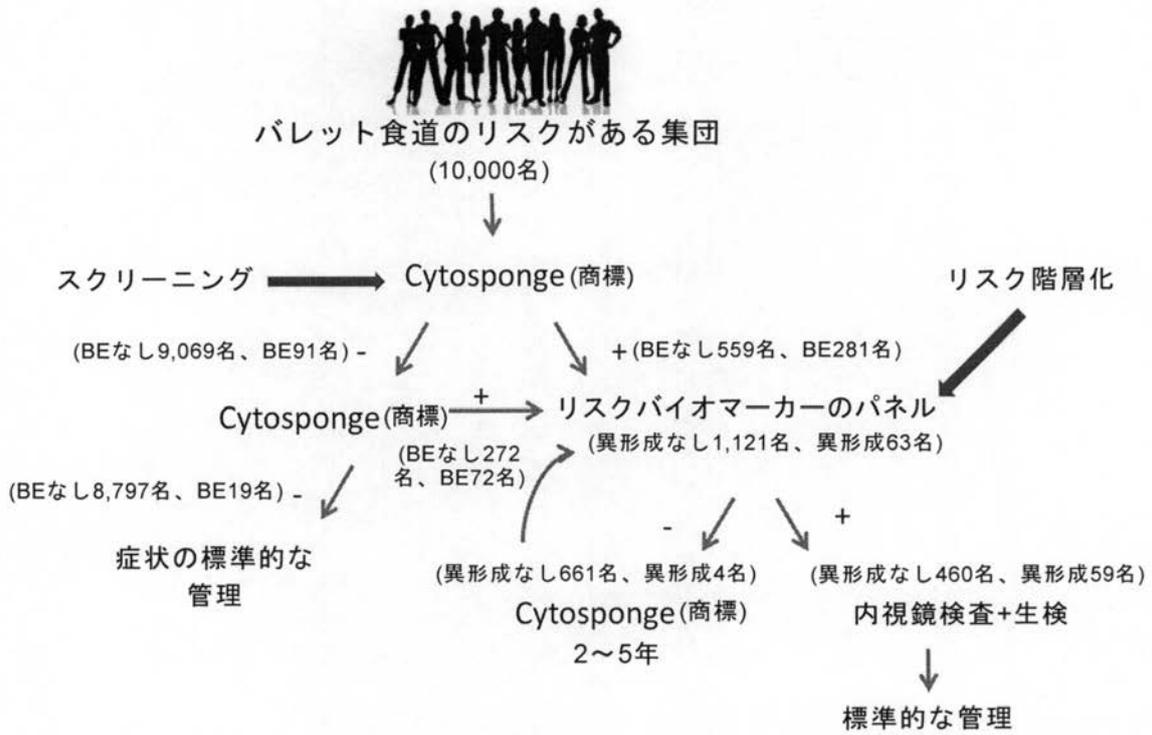
【図3】

FIGURE 3



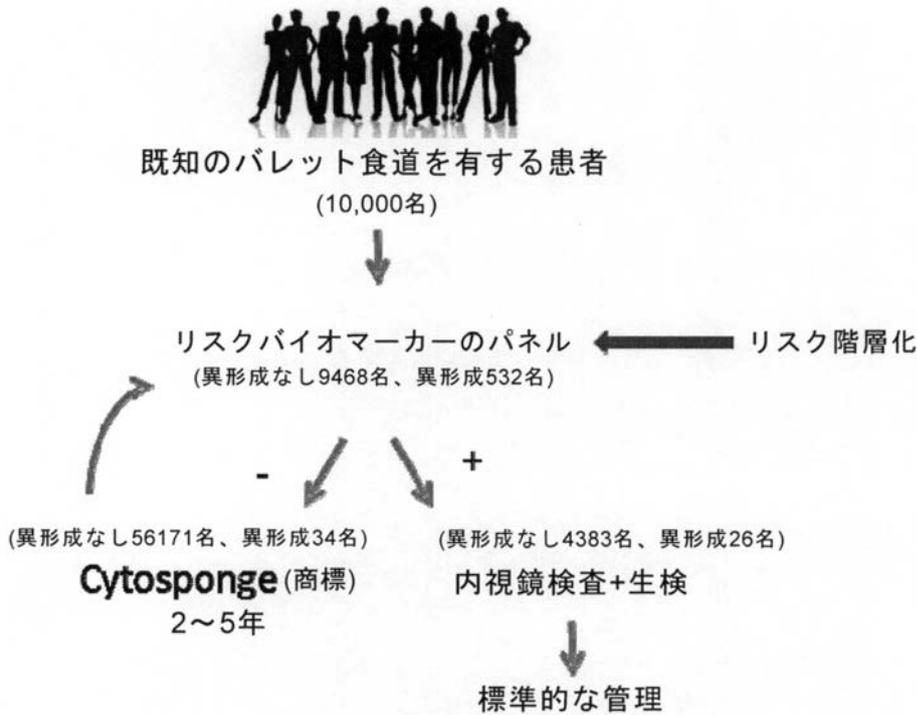
【 図 4 】

FIGURE 4



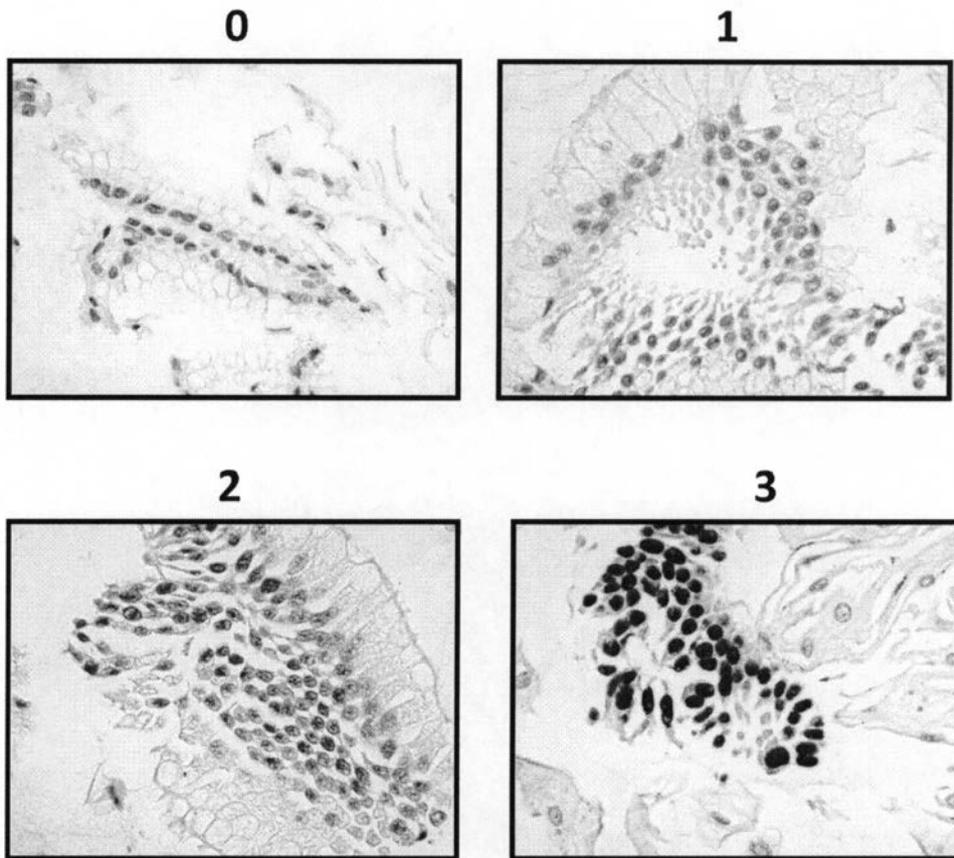
【 図 5 】

FIGURE 5



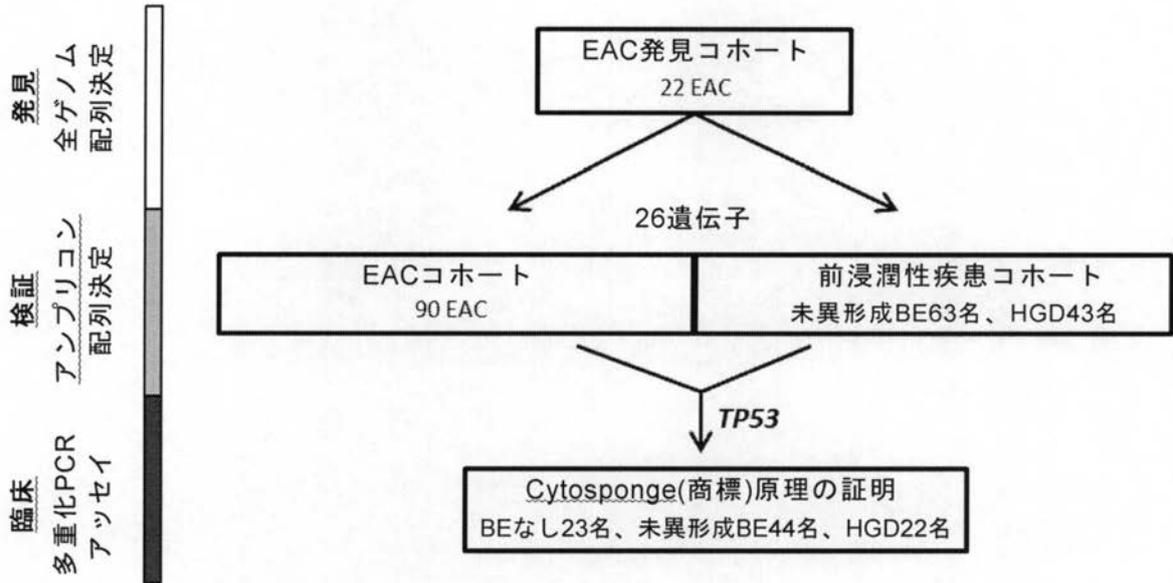
【 図 6 】

FIGURE 6



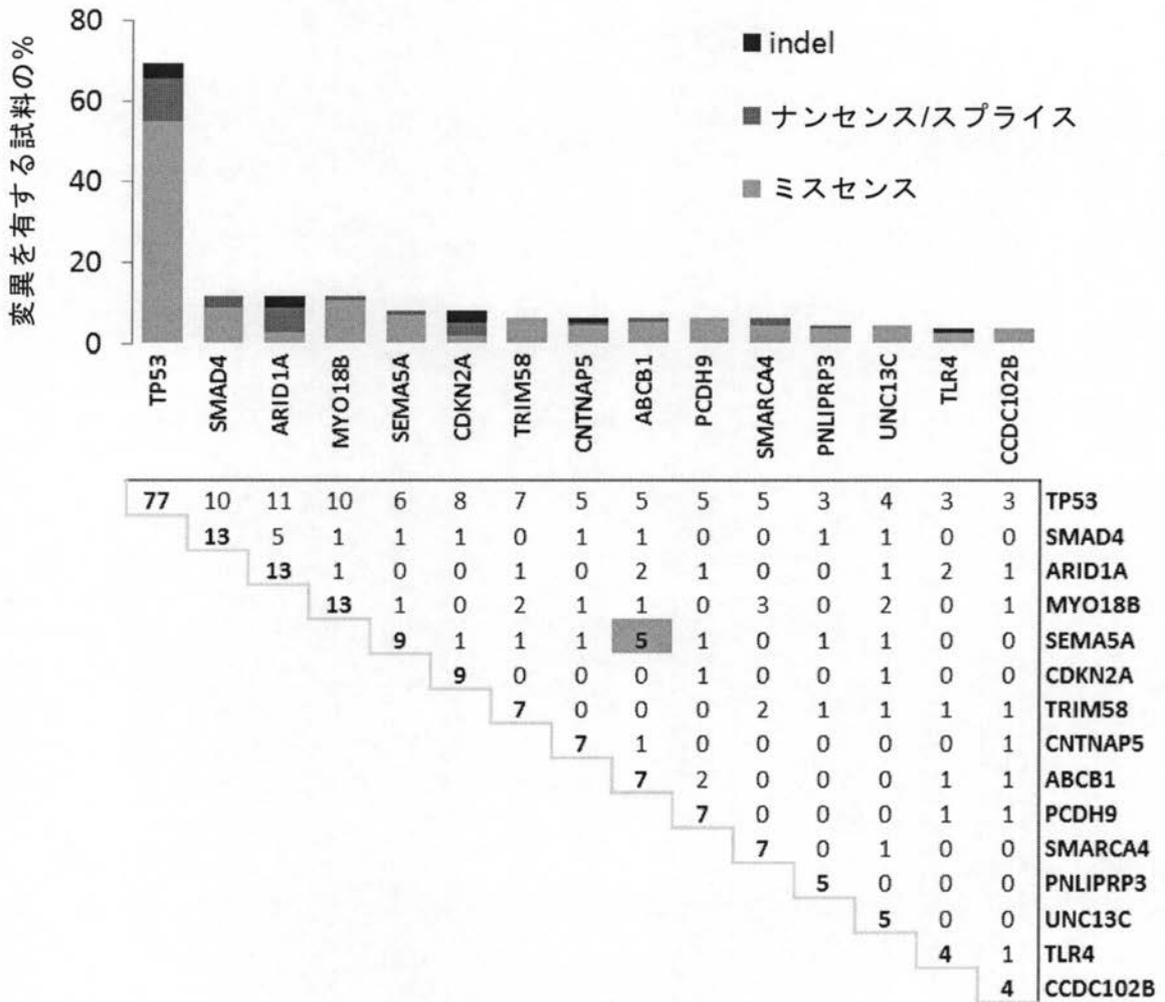
【図7】

Figure 7



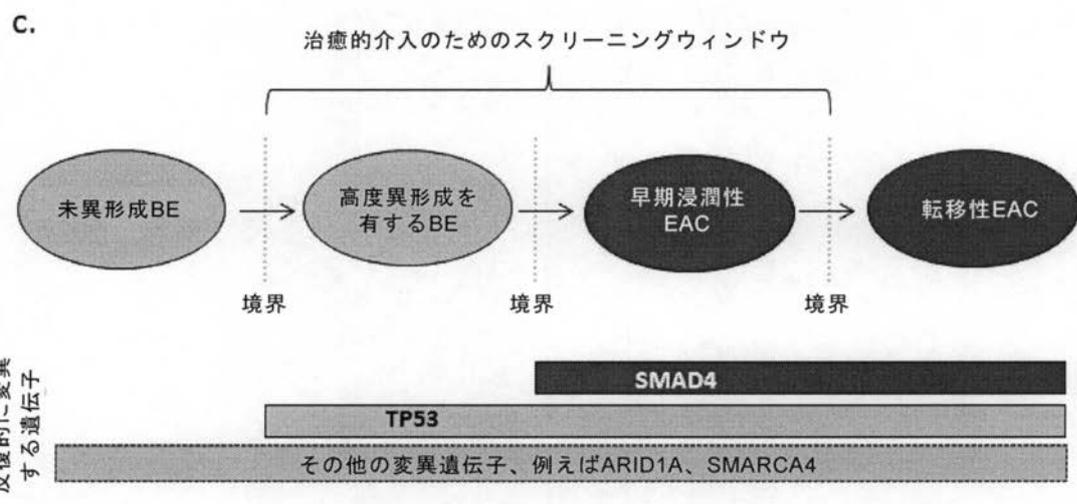
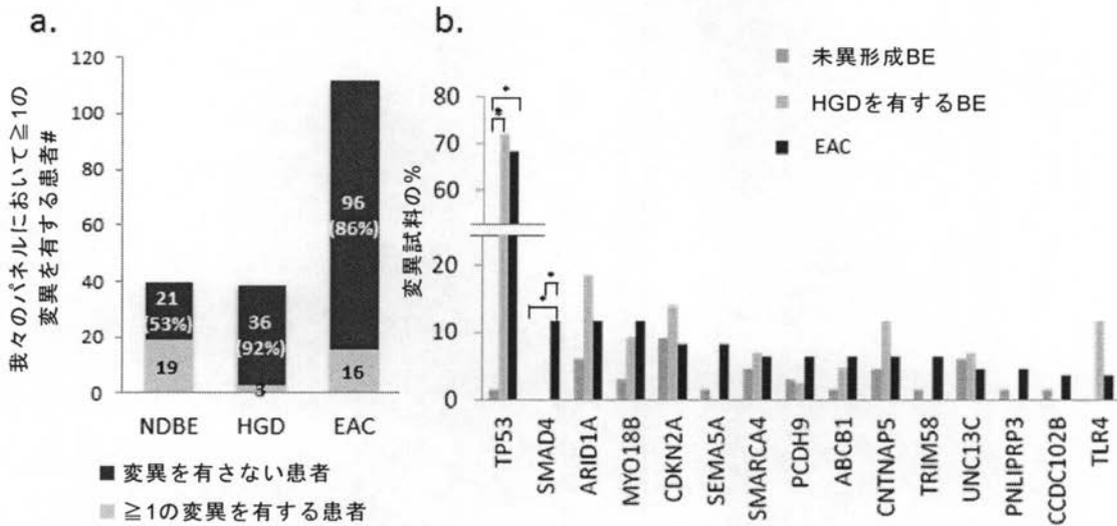
【 図 8 】

Figure 8



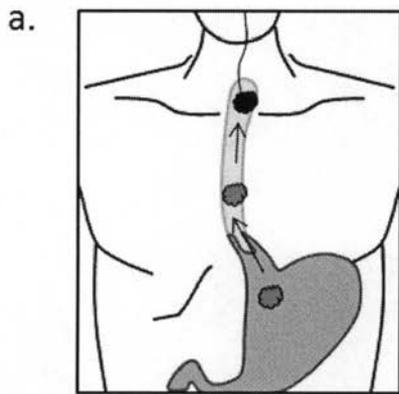
【 図 9 】

Figure 9



【 図 1 0 】

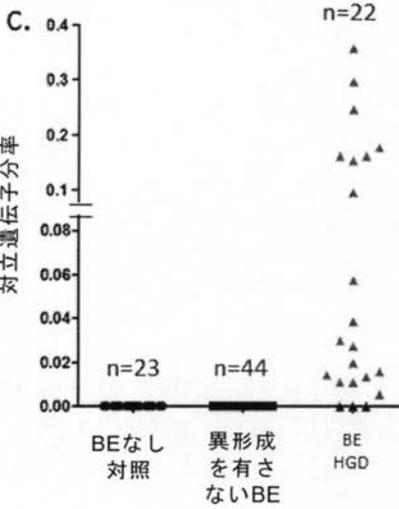
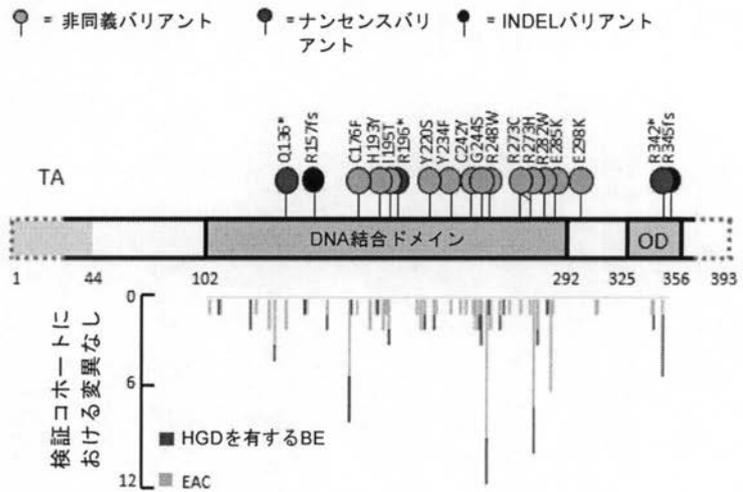
Figure 10



b.

患者	変異	生検での AF		Cytosponge(商標)での AF	
		#1	#2	#1	#2
HGD_01	Chr17: 7574003 G>A	0.35	N/A	0.04	N/A
HGD_40	Chr17: 7577538 C>T	0.23	0.52	0.10	N/A
HGD_03	Chr17: 7578406 C>T	0.51	0.72	0.06	N/A
HGD_04	Chr17: 7577551 C>T	0.19	N/A	0.14	0.24

d.



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/050484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHIN-ANN J ONG: "Biomarkers in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: Predictors of progression and prognosis", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 16, no. 45, 7 December 2010 (2010-12-07), page 5669, XP055118587, ISSN: 1007-9327, DOI: 10.3748/wjg.v16.i45.5669 the whole document	1-12, 16-27, 29,30
X	WO 2012/125807 A2 (CERNOSTICS INC [US]; THORNE REBECCA JANE [US]; CAMPBELL BRUCE B [US]) 20 September 2012 (2012-09-20)	1,2,5,6, 10-12, 18-23, 29,30
Y	examples; tab 1; p1-2; p28; claims 1-2, 4-6	1-12, 16-27, 29,30
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 May 2014		08/09/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rosin, Oliver

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/050484

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/009597 A1 (LAO-SIRIEIX PIERRE [GB] ET AL) 12 January 2012 (2012-01-12)	1-3, 5-12, 16-27
Y	par [0073], [0201], [0226], [0127], [0223]; claims 1,7	1-12, 16-27, 29,30
Y	----- LAO-SIRIEIX P ET AL: "Non-endoscopic screening biomarkers for Barrett's oesophagus: from microarray analysis to the clinic.", GUT NOV 2009, vol. 58, no. 11, November 2009 (2009-11), pages 1451-1459, XP009167512, ISSN: 1468-3288 the whole document	1-12, 16-27, 29,30
Y	----- S. R. KADRI ET AL: "Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study", BMJ, vol. 341, no. sep10 1, 25 January 2010 (2010-01-25), pages c4372-c4372, XP055118821, ISSN: 0959-8138, DOI: 10.1136/bmj.c4372 the whole document	1-12, 16-27, 29,30
Y	----- TOKUMITSU Y ET AL: "Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma.", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY OCT 1999, vol. 15, no. 4, October 1999 (1999-10), pages 687-692, XP008169491, ISSN: 1019-6439 the whole document	4
T	----- M. DI PIETRO ET AL: "The combination of autofluorescence endoscopy and molecular biomarkers is a novel diagnostic tool for dysplasia in Barrett's oesophagus", GUT, 10 April 2014 (2014-04-10), XP055118406, ISSN: 0017-5749, DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305975 the whole document	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/GB2014/050484**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12, 16-27, 29, 30(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2014/ 050484

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12, 16-27, 29, 30(all partially)

Methods, assays, apparatuses, uses, devices and kits for detecting surface abnormalities in the oesophagus, comprising p53.

2-6. claims: 1-27, 29, 30(all partially)

Methods, assays, apparatuses, uses, devices and kits for detecting surface abnormalities in the oesophagus, comprising c-Myc (invention 2), AUKRA (invention 3), PLK1 (invention 4), methylation of MyoD (invention 5) and methylation of Runx3 (invention 6), in as far as mentioned in the claims.

7. claim: 28

Method for aiding the detection of a surface abnormality in the oesophagus comprising detection of SMAD4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/050484

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012125807	A2	20-09-2012	
		AU 2012229102 A1	31-10-2013
		CA 2830501 A1	20-09-2012
		EP 2686688 A2	22-01-2014
		US 2014141988 A1	22-05-2014
		WO 2012125807 A2	20-09-2012

US 2012009597	A1	12-01-2012	NONE

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

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

(74) 代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀

(74) 代理人 100102255
弁理士 小澤 誠次

(74) 代理人 100096482
弁理士 東海 裕作

(74) 代理人 100188352
弁理士 松田 一弘

(74) 代理人 100131093
弁理士 堀内 真

(74) 代理人 100150902
弁理士 山内 正子

(74) 代理人 100141391
弁理士 園元 修一

(74) 代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕

(74) 代理人 100172797
弁理士 有馬 昌広

(72) 発明者 フィッツジェラルド レベッカ
イギリス国 シービー2 2 エックスセット ケンブリッジ ケンブリッジシャー ヒルズロード
エムアールシー キャンサー セル ユニット

(72) 発明者 ロス - イネス キャリン
イギリス国 シービー2 2 エックスセット ケンブリッジ ケンブリッジシャー ヒルズロード
エムアールシー キャンサー セル ユニット

F ターム (参考) 2G045 AA26 BB22 CB02 DA13 DA36 FA16 FB03
4B024 AA12 BA80 CA09 CA10 DA03 HA11
4B029 AA07 BB11 FA10 FA15
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ79 QR08 QR42 QR50 QR55 QR62
QR90 QS25 QS32 QX01