

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-523822

(P2008-523822A)

(43) 公表日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 6 3
G O 1 N 37/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-547020 (P2007-547020)	(71) 出願人	505060347
(86) (22) 出願日	平成17年12月19日 (2005.12.19)		ベリデックス・エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成19年8月15日 (2007.8.15)		Veridex, LLC
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/046100		アメリカ合衆国、07059 ニュージャ
(87) 国際公開番号	W02006/066240		ージー州、ウォレン、テクノロジー・ドラ
(87) 国際公開日	平成18年6月22日 (2006.6.22)		イブ 33
(31) 優先権主張番号	60/637, 265		33 Technology Drive
(32) 優先日	平成16年12月17日 (2004.12.17)		, Warren, NJ 07059, U.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		S. A.
(31) 優先権主張番号	60/670, 116	(74) 代理人	100088605
(32) 優先日	平成17年4月11日 (2005.4.11)		弁理士 加藤 公延
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100123434
(31) 優先権主張番号	60/741, 180		弁理士 田澤 英昭
(32) 優先日	平成17年12月1日 (2005.12.1)	(74) 代理人	100101133
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 濱田 初音
		最終頁に続く	

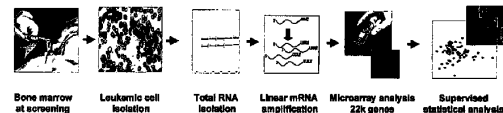
(54) 【発明の名称】 急性骨髄性白血病患者を評価するための方法

(57) 【要約】

【課題】急性骨髄性白血病 (AML) を有する患者の予後を予測すること。

【解決手段】癌、好ましくは、造血系悪性腫瘍患者を治療する方法は、患者の遺伝子発現プロファイルおよび/または分子マーカーを分析して患者の状態および/または予後を決定することを含む。本発明はまた、非再発性または非難治性患者がファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI)、および、場合によっては他の治療薬による治療に応答する可能性があるかどうか分析する方法も提供する。これらの方法はまた、患者の治療をモニタリングするため、かつ、治療過程を選択するためにも有用である。FTI処置に応答して変調される遺伝子が提供され、プロファイルの作成に用いられる。

【選択図】図13



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

急性骨髄性白血病（A M L）の状態を評価する方法において、
a．A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、
b．表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、A M L 状態の指標となる、
方法。

10

【請求項 2】

急性骨髄性白血病（A M L）患者の病期分類を行う方法において、
a．A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、
b．表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、A M L 生存の指標となる、
方法。

20

【請求項 3】

急性骨髄性白血病（A M L）患者の治療プロトコルを決定する方法において、
a．A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、
b．表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、医師が適切な治療法を提供するために推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、治療法に対する応答の十分な指標となる、
方法。

30

【請求項 4】

急性骨髄性白血病（A M L）患者を治療する方法において、
a．A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、
b．表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが治療法に対する応答の指標となる、ステップと、
c．前記患者が応答者プロフィールを有する場合に、患者にアジュバント療法を施すステップと、
を含む、方法。

40

【請求項 5】

急性骨髄性白血病（A M L）患者の死亡リスクが高いか低いかを決定する方法において、
a．A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、
b．表 3 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、医師が推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、死亡リスクの十分な指標となる、
方法。

50

【請求項 6】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
前記サンプル中で構成的に発現される少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを測定すること、
をさらに含む、方法。

【請求項 7】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
前記特異性は、少なくとも約 40 % である、方法。

【請求項 8】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
前記感受性は、少なくとも約 80 % である、方法。

10

【請求項 9】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
前記 p 値は、0.05 未満である、方法。

【請求項 10】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップで測定される、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、
前記マイクロアレイは、cDNA アレイ、または、オリゴヌクレオチドアレイである、
方法。

20

【請求項 12】

請求項 10 に記載の方法において、
前記マイクロアレイまたは遺伝子チップは、1 種類以上の内部対照試薬をさらに含む、
方法。

【請求項 13】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記サンプルから抽出された RNA のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)
によって行われる核酸増幅により決定される、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法において、
前記 PCR は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) である、方法。

30

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法において、
前記 RT-PCR は、1 種類以上の内部対照試薬をさらに含む、方法。

【請求項 16】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記遺伝子によりコードされているタンパク質を測定または検出することによって検出される、方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法において、
前記タンパク質は、前記タンパク質に特異的な抗体によって検出される、方法。

40

【請求項 18】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の方法において、
遺伝子発現は、前記遺伝子の特徴を測定することによって検出される、方法。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法において、
前記測定される特徴は、DNA 増幅、メチル化、突然変異、および、対立遺伝子変異からなる群から選択される、方法。

【請求項 20】

50

急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）予後患者レポートを作成する方法において、
請求項１～請求項５のいずれか一項に記載の結果を判定するステップと、
前記結果を表示したレポートを作成するステップと、
を含む、方法。

【請求項２１】

請求項２０に記載の方法において、
前記レポートは、患者の転帰の評価、および／または、患者集団に対するリスクの見込み、および／または、化学療法に対する可能性もしくは応答を含む、方法。

【請求項２２】

患者レポートにおいて、

10

請求項２１に記載の方法によって作成された、患者レポート。

【請求項２３】

生体サンプルで急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）予後を決定するアッセイを実施するためのキットにおいて、

前記生体サンプルは、表３、表４、表５、表７、表８、または、表９から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料、を含む、キット。

【請求項２４】

請求項２３に記載のキットにおいて、
マイクロアレイ分析を実施するための試薬、
をさらに含む、キット。

20

【請求項２５】

請求項２４に記載のキットにおいて、
媒体であって、この中で、前記核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部がアッセイされる、媒体、
をさらに含む、キット。

【請求項２６】

急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）の状態を評価するための製品において、
表３、表４、表５、表７、表８、または、表９から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料、
を含む、製品。

30

【請求項２７】

請求項２６に記載の製品において、
マイクロアレイ分析を実施するための試薬、
をさらに含む、製品。

【請求項２８】

請求項２７に記載の製品において、
媒体であって、この中で、前記核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部がアッセイされる、媒体、
をさらに含む、製品。

40

【請求項２９】

マイクロアレイまたは遺伝子チップにおいて、
請求項１～請求項５のいずれか一項に記載の方法を実施するための、マイクロアレイまたは遺伝子チップ。

【請求項３０】

請求項２９に記載のマイクロアレイにおいて、
表３、表４、表５、表７、表８、または、表９から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補

50

物、または、それらの一部、
を含む、マイクロアレイ。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載のマイクロアレイにおいて、
前記測定または同定が、少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現、または、1 . 5 分の 1 の過少
発現である、マイクロアレイ。

【請求項 3 2】

請求項 3 0 に記載のマイクロアレイにおいて、
前記測定は、統計学的に有意な p 値の過剰発現または過少発現を提供する、マイクロア
レイ。

10

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載のマイクロアレイにおいて、
前記 p 値が、0 . 0 5 未満である、マイクロアレイ。

【請求項 3 4】

請求項 3 0 に記載のマイクロアレイにおいて、
c D N A アレイ、または、オリゴヌクレオチドアレイ、
を含む、マイクロアレイ。

【請求項 3 5】

請求項 3 0 に記載のマイクロアレイにおいて、
1 種類以上の内部対照試薬、
をさらに含む、マイクロアレイ。

20

【請求項 3 6】

診断 / 予後ポートフォリオにおいて、
表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカ
ー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補
物、または、それらの一部、
を含む、診断 / 予後ポートフォリオ。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載のポートフォリオにおいて、
前記測定または同定が、少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現、または、1 . 5 分の 1 の過少
発現である、ポートフォリオ。

30

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載のポートフォリオにおいて、
前記測定は、統計学的に有意な p 値の過剰発現または過少発現を提供する、ポートフォ
リオ。

【請求項 3 9】

請求項 3 7 に記載のポートフォリオにおいて、
前記 p 値が、0 . 0 5 未満である、ポートフォリオ。

【発明の詳細な説明】

【開示の内容】

40

【0 0 0 1】

付録の「配列表 (Sequence Listing)」は、参照して本明細書に組み入れる。

【発明の背景】

本発明は、分子マーカーの検出、および / または、遺伝子発現分析に基づく、急性骨髄
性白血病 (A M L) の診断、予後、および、治療に関する。

【0 0 0 2】

現在は、核型分析 (karyotyping) が、予後値を得るのに有効であり、一方で、生物学
的に異なる A M L のサブタイプを同定するのに有用である。加えて、F L T 3、c - K
I T、A M L 1、G A T A 1、C E B P A、および、N - R A S などの遺伝子の突然変異
が、この疾患の病因に関与している。F L T 3 および C E B P A の突然変異のスクリーニ

50

ングにより、再発のリスクが異なる群に階層分類できることが明らかである。有効なリスクの階層分類により、同種幹細胞移植や他のアジュバント療法の適切な使用が可能となる。近年発表された2つの研究論文に、新たに診断された成人AML患者の遺伝子発現プロファイリング、および、臨床転帰を予測する上でのこのプロファイリングの使用が記載されている(布林ガーら(Bullinger et al.)(2004)、およびバルクラ(Valk et al.)(2004))。これらの研究には、遺伝子発現プロファイリングにより、いかにして臨床転帰予測をさらに改善できるかが示されている。

【0003】

バルクラ(Valk et al.)(2004)は、アフィメトリクス(Affymetrix)U133Aチップで285人の患者(骨髄または末梢血)を評価した。これらの患者のサンプルには、多様な細胞遺伝学的異常や分子異常が含まれていた。わずか16のクラスターが同定され、AMLが以前に考えられていたほどヘテロでないことが示された。複数のクラスターが、細胞遺伝学的および分子的に定義されたAMLのサブタイプによく一致するため、これらのクラスターをWHO分類システムに用いることができる。これらのクラスターはまた、Bullingerら(2004)および他のすでに発表されている、より小規模な研究でも見出されている(ショッホら(Schoch et al.)(2002); デベルナルディ(Debernardi et al.)(2003)、および、コールマンら(Kohlmann et al.)(2003))。驚くことではないが、これらのクラスターは、周知の予後の核型に関連していることから、予後に相関している。

【0004】

布林ガーら(Bullinger et al.)(2004)は、cDNAアレイを用いて116人の成人患者(65の抹消血と54の骨髄)の発現プロファイルを調べた。バルクラ(Valk et al.)(2004)による研究に加えて、布林ガーら(Bullinger et al.)は、全ての細胞遺伝学的リスク群の臨床転帰を予測するための133の遺伝子分類子も開発した。59サンプルのトレーニングセット(training set)および57サンプルの検査セットを用いて、布林ガーら(Bullinger et al.)は、133の遺伝子で患者を不良な転帰の群と良好な転帰の群に分類されることを示した($p = 0.006$ ログランク(log rank)、オッズ比: 10(odds ratio, 10)、95%CI、2.6 - 29.3)。

【0005】

これら両方の研究で同定された遺伝子は、小児白血病ですでに同定されている予測因子遺伝子と一部だけが重複することに留意されたい(ヤギら(Yagi et al.)(2003))。また、布林ガーら(Bullinger et al.)(2004)によって同定された予後遺伝子セットと、ティピファニブ(tipifarnib)に対する応答を予測する近年同定された3つの遺伝子は重複していない(米国特許出願第10/883,436号)。

【0006】

ファルネシルトランスフェラーゼ(FTase)酵素は、カーボンファルネシル部分のC末端CAA(X)(C:システイン、A:脂肪族残基、X:任意のアミノ酸)認識モチーフへの共有結合を媒介する(ライスら(Reiss et al.)(1990))。このようなファルネシル化は、さらに3個の末端アミノ酸(AAX)の切断およびC末端イソプレニル-システインのメチル化によってさらに処理される。タンパク質のファルネシル化を阻害すると、タンパク質機能に必要な正確な細胞内局在化が抑制される。当初は、発癌性Rasタンパク質が、癌生物学におけるFTIの増殖抑制作用の標的と考えられていた(ロイターら(Reuter et al.)(2000))。しかしながら、Rasファルネシル化の阻害ではティピファニブの全ての作用を説明できないことが示された。例えば、FTIは、抗腫瘍作用を生ずるために常に突然変異Rasタンパク質を必要とするわけではない(カープら(Karp et al.)(2001))。実際に、初期の臨床試験は、進行した結腸直腸癌および膵臓癌などの高頻度のras突然変異の集団に対してデザインされていたが、プラセボと比較した場合に応答率に有意差は見られなかった(ヴァン・カトセムら(Van Cutsem et al.)(2004)、ラオら(Rao et al.)(2004))。

【0007】

他の数種のファルネシル化タンパク質が、低分子量GTP加水分解酵素タンパク質Rho

10

20

30

40

50

o B、セントロメアタンパク質 CENP - E および CENP - F、タンパク質チロシンホスファターゼ PTP - C A A X、および、核膜構造ラミン A および B を含む F T I の腫瘍抑制作用を媒介できる候補標的として意味付けられている。これらのタンパク質のファルネシル化を阻害すると、F T I の抗増殖作用が生じ、また、T G F β R I I、M A P K / E R K、P I 3 K / A K T 2、F a s (C D 9 5)、N F - κ B、および、V E G F を含む数種の重要なシグナル伝達分子も関節的に調節する(アドナンら (Adnane et al.) (2000)、モーガンら (Morgan et al.) (2001)、チャンら (Jiang et al.) (2000)、ナラ (Na et al.) (2004)、タカダら (Takada et al.) (2004)、および、チャンら (Zhang et al.) (2002))。これらのシグナル伝達経路の調節により、細胞の成長、増殖、および、アポトーシスが調節される。従って、F T I は、数種の細胞事象、および、細胞経路に対して複雑な抑制作用を有すると思われる。

10

【 0 0 0 8 】

現在のところ、これらの患者の状態を決定する、または、全生存率を予測するための方法は存在しない。

【 0 0 0 9 】

〔 発明の概要 〕

本発明は、急性骨髄性白血病 (A M L) を伴う患者の予後を予測するために 1 以上の遺伝子シグネチャ (gene signatures) を使用する方法である。これらのシグネチャは、単独でか、または、薬剤治療の種類に応じた組合せで投与することができる。

【 0 0 1 0 】

本発明は、A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病 (A M L) の状態を評価する方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルが、A M L 状態の指標となる方法を提供する。

20

【 0 0 1 1 】

本発明は、A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病 (A M L) 患者の病期分類を行う方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルが、A M L 生存の指標となる方法を提供する。

30

【 0 0 1 2 】

本発明は、A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病 (A M L) 患者の治療プロトコルを決定する方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルが、医師が適切な治療法を提供するために推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、治療法に対する応答の十分な指標となる方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明は、A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルが、治療法に対する応答の指標となる、ステップと、患者が応答者プロフィール (responder profile) を有する場合に、患者にアジュバント療法を施すステップとによる、急性骨髄性白血病 (A M L) 患者を治療する方法を提供する。

40

【 0 0 1 4 】

本発明は、A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、表 3 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップにより、急性骨髄性白血病 (A M L) 患者の死亡リスクが高いか低いかを決定する方法であって、所

50

定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、医師が推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、死亡リスクの十分な指標となる、方法を提供する。

【0015】

本発明は、前述の方法のいずれか1つの結果を判定するステップと、結果および結果により作成されたレポートを表示したレポートを準備するステップとにより、急性骨髄性白血病 (AML) 予後患者レポートを作成する方法を提供する。

【0016】

本発明は、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物 (complements)、または、それらの一部を検出するための材料を含む生体サンプルで、急性骨髄性白血病 (AML) 予後を決定するアッセイを実施するためのキットを提供する。

10

【0017】

本発明は、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料を含む、急性骨髄性白血病 (AML) の状態を評価するための製品を提供する。

【0018】

本発明は、前述の方法を実施するためのマイクロアレイ、または、遺伝子チップを提供する。

20

【0019】

本発明は、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を含む、診断 / 予後ポートフォリオを提供する。

【0020】

〔図面の簡潔な説明〕

図1は、再発性および難治性AML患者のアンスーパーバイズドクラスタリング (Unsupervised clustering) を示す図である。このデンドグラムは、58人の再発性または難治性AML患者のアンスーパーバイズドk - 平均クラスタリングを示しており、各列は患者を表し、各行は遺伝子を表している。各遺伝子の発現率は、患者のその遺伝子の発現レベルを、他の全患者の平均で除して算出したものである。カラーバーは、変化倍率 ($\log_2$) を示している。赤色はアップレギュレーションを示し、青色はダウンレギュレーションを示している。白色は変化がないことを示している。6つの主なクラスターの存在が示されている。

30

【0021】

図2は、2つの遺伝子のリアルタイムRT - PCRを示す図である。AHRおよびAKAP13をリアルタイムRT - PCRで測定した。HPR TまたはPBG D対照遺伝子を用いて、遺伝子発現値を正規化した。エラーバーは、標準偏差である。得られた値を、対応するマイクロアレイデータに対してプロットし、線形回帰分析を行った。

40

【0022】

図3は、AKAP13遺伝子の予測値を示す図である。パネルAは、応答者 (R) および非応答者 (NR) に対する分類子としてAKAP13発現を用いて行ったLOOCVから作成した2 × 2表を示している。パネルBは、同じ58人の患者のAKAP13の発現値を示している。P値は、各応答群の平均値間の遺伝子発現の有意差を示している。パネルCは、AKAP13遺伝子によって応答者および非応答者に分類された患者から作成した Kaplan - Myer 曲線を示している。

【0023】

図4は、予測マーカーの最小セットを示す図である。パネルAでは、100%の感度を用いてLOOCVを行った。1 ~ 19の遺伝子を含む個々の分類子を試験した。得られた

50

誤り率をプロットした。パネルBは、応答者（R）および非応答者（NR）に対する分類子として3遺伝子シグネチャを用いて行ったLOOCVから作成した2×2表を示している。パネルCは、3遺伝子分類子から作成したスコアを示している。P値は、応答群間の遺伝子発現の有意差を示している。パネルDは、3遺伝子シグネチャによって応答者および非応答者に分類された患者から作成したカプラン-マイヤー曲線である。平均生存期間も示している。

【0024】

図5は、3遺伝子シグネチャによって応答者および非応答者に予測された患者に対して行ったカプラン-マイヤー分析を示す図である。臨床では非応答者であると決定されたが3遺伝子シグネチャを用いた場合には応答者であると分類された患者の生存曲線を示している。平均生存期間も示している。

10

【0025】

図6は、AML細胞系でのAKAP13の過剰発現を示す図である。細胞数は、対照の百分率を得るために薬剤を含まない培養物（-12 log単位として示している）に対して正規化した。エラーバーは、平均の標準誤差を示している。白抜きのデータ点は、高濃度の薬剤を探す第2の実験の結果を示している。

【0026】

図7は、再発性または難治性AMLにおけるFTI作用のモデルを示す図である。A．応答者では、IL3RA遺伝子およびAKAP13遺伝子の発現が低く、ras、RhoA、および、ラミンBの経路のそれぞれのダウンレギュレーションが可能である。RhoHのアプレギュレーションにより、細胞内形質転換経路の障害が大きくなる。これにより、FTI抗腫瘍形成の効果が増大する。B．非応答者では、反対の遺伝子発現プロフィールが見られ、代償経路の発現が可能である。

20

【0027】

図8は、ザルネストラ（Zarnestra）予測遺伝子シグネチャが、単独の予後遺伝子シグネチャよりも有用であることを示す図である。パネルAでは、列が再発性または難治性患者からのAMLサンプルを表し、行は、階層クラスタリングによって順番が決められたプリンガーら（Bullinger et al.）によって同定された133の予後遺伝子の内の103に相当する167のプローブセットを表している。パネルBは、クラスターにより定義された患者群のカプラン-マイヤー生存推定を示している。パネルCでは、3遺伝子分類子を用いて、ティピファニブの応答者をプリンガーシグネチャ（Bullinger signature）によって定義された良好な予後群と不良な予後群に区別した。カプラン-マイヤー生存曲線は、良好な予後群（Zn+、クラスター1）および不良な予後群（Zn+、クラスター2）のティピファニブに対する応答者として特定された患者を示している。各群の平均生存期間も示している。

30

【0028】

図9は、プリンガーら（Bullinger et al.）(2004)の遺伝子をアフィメトリクス（Affymetrix）U133Aチップ上の167のプローブセット（103個のユニークな遺伝子）にどのように一致させるかを示すフローチャートである。

【0029】

図10は、再発性または難治性AML患者における167のプローブセットシグネチャの有用性を示す図である。パネルAでは、列が再発性または難治性患者からのAMLサンプルを表し、行は、階層クラスタリングによって順番が決められたプリンガーら（Bullinger et al.）(2004)によって定義された133の予後遺伝子の内の103に相当する167のプローブセットを表している。パネルBは、クラスターにより定義された患者群のカプラン-マイヤー生存推定を示している。

40

【0030】

図11は、予後遺伝子シグネチャとザルネストラ（Zarnestra）予測遺伝子シグネチャとの比較を示す図である。パネルAは、プリンガーら（Bullinger et al.）(2004)の103の遺伝子のサブセットによって定義された良好な予後クラスターおよび不良な予後クラ

50

スターのカプラン - マイヤー生存曲線を示している。パネル B は、ザルネストラ (Zarnestra) に対する応答を予測する 3 遺伝子シグネチャによって定義された良好な予後クラスターと不良な予後クラスターのカプラン - マイヤー生存曲線を示している。パネル C は、3 遺伝子ザルネストラ (Zarnestra) シグネチャによってさらに階層分類されたパネル A の良好な予後クラスターと不良な予後クラスターのカプラン - マイヤー生存曲線を示している。パネル D は、残りの患者に対する、予後が不良でザルネストラ (Zarnestra) に応答しないと予測される患者のカプラン - マイヤー生存曲線を示している。

【 0 0 3 1 】

図 1 2 は、予測マーカーの最小セットの特定を示す図である。a) 感度 1 0 0 %、特異性 4 0 %、変化倍率が 2 倍を超える遺伝子を選択する L O O C V を実施した。A U C によって順位が付けられた 1 ~ 8 の遺伝子を含む個々の分類子を試験した。得られた誤り率をプロットした。b) 分類子として A K A P 1 3 を用いて、応答者 (R) および非応答者 (N R) に対して行った L O O C V から作成した 2 × 2 表を示している。c) A K A P 1 3 の遺伝子発現値を示している。P 値は、応答群間の遺伝子発現における有意差を示している。d) A K A P 1 3 によって応答者および非応答者として分類された患者から作成したカプラン - マイヤー曲線を示している。平均生存期間も示している。

10

【 0 0 3 2 】

図 1 3 は、遺伝子発現分析の概要を示す図である。

図 1 4 は、ティピファニブ処置の終了後、A M L サンプルは、F T I により媒介される全遺伝子発現を維持することを示す図である。

20

図 1 5 は、予測発現プロフィールおよび新たに診断された A M L での予測分類子の試験を示す図である。

図 1 6 は、6 遺伝子分類子は、新たに診断された A M L を階層分類することを示す図である。

【 0 0 3 3 】

〔発明の詳細な説明〕

以下、新たに診断された A M L で予後値を有すると前述されている遺伝子のサブセットが、分子標的療法 (ザルネストラ (Zarnestra)) で治療される再発性および難治性の A M L 患者に有用であることを示す。現在、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (ザルネストラ (Zarnestra) など) に対する応答を予測する方法はない。また、A M L 患者の予後を理解するための現在の方法は組織学的サブタイプおよび核型分析に限られ、どちらも臨床転帰 (clinical outcome) を決定するには理想的なマーカーとは言えない。現在のシグネチャは、予後リスクの高い患者と低い患者とに的確に階層分類できるため、これらの従来技術にまで及んでいる。

30

【 0 0 3 4 】

米国特許出願第 1 0 / 8 8 3 , 4 3 6 号では、3 遺伝子分類子 (A H R 、 A K A P 1 3 、および、M I N A 5 3 を含む) が、低い誤り率でティピファニブ (ザルネストラ (Zarnestra)) (登録商標)、R 1 1 5 7 7 7) に対する再発性および難治性 A M L 患者の応答を予測することが実証されている。これは、リーブ・ファイブ・アウトクロス確認 (leave-five-out cross validation) を行った際にも認められた。追加の遺伝子が加えられると誤り率が上昇するが、このことから追加の遺伝子が分類子にノイズを導入したと考えられる。3 遺伝子分類子の場合、L O O C V により、感度が 8 6 %、特異性が 7 0 %、全体の診断精度が 7 4 % であることが示された。カプラン - マイヤー分析でも、予測された応答者群と非応答者群との間で生存に有意差が示された。さらに、誤って分類された非応答者と正確に分類された非応答者を比較すると、誤って分類された非応答者の方が全体的に良好な生存が示された。

40

【 0 0 3 5 】

ザルネストラ (Zarnestra) (登録商標) は、生体外 (in vitro) および生体内 (in vivo) の両方で、様々なヒト腫瘍細胞系統の増殖を阻害することが示されている経口投与可能な非ペプチドミメティック競合的ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (F T I) で

50

ある(エンドら (End et al.) (2001)、コックスら (Cox et al.) (2002))。ティピファニブの第1相臨床試験で、再発性または難治性急性骨髄性白血病患者で32%の応答率を実証された(カープら (Karp et al.) (2001))。骨髄異形成症候群(MDS)(クルズロックら (Kurzrock et al.) (2004))、多発性骨髄腫(MM)(アルシーナら (Alsina et al.) (2003))、および、慢性骨髄性白血病(CML)(コルテスら (Cortes) (2003))の初期の臨床試験でも活性が確認されている。完全な緩解は、骨髄芽細胞が5%未満で、好中球数が $1000/\mu\text{L}$ 以上、血小板数が $100,000/\mu\text{L}$ 未満、そして髄外疾患(extramedullary disease)が存在しないものと定義された。タンパク質ファルネシル化の阻害によりFTIが機能することは明らかであるが、造血系悪性疾患におけるティピファニブの抗腫瘍作用にどの遺伝子が関与しているのかはまだ分かっていない。マイクロアレイ技術は、数千の遺伝子の定常状態のmRNAレベルの同時測定を可能とするため、FTI作用に相関する遺伝子および遺伝子経路の同定の強力なツールである。従って、再発性および難治性AMLにおけるティピファニブの第2相臨床試験で全遺伝子発現のモニタリングを行い、造血系悪性疾患におけるこのFTIに対する応答を予測する遺伝子を同定した。

【0036】

ゲノム内に、タンパク質またはペプチドを発現する能力を有する核酸配列(「遺伝子(genes)」)が単に存在するだけでは、ある細胞内であるタンパク質またはペプチドが発現するかどうかの決定因子にはならない。ある遺伝子がタンパク質もしくはペプチドを発現するか、または、RNAを転写することができるかどうか、また、そのような発現または転写がいったいどのような程度で起こるかは、様々な複雑な因子によって決定される。しかしながらやはり、遺伝子発現をアッセイすることで、薬剤または他の治療因子の導入などのある刺激に対する細胞応答についての有用な情報が得られる。遺伝子がどの程度活性化または不活性化するかという相対的な示唆は、このような遺伝子発現プロファイルで見出すことができる。ある場合には、分子マーカーに存在はそれ自体で、または遺伝子発現情報の使用を伴えば、治療の有効性についての有用な情報も得られる。本発明の遺伝子発現プロファイルおよび分子マーカーは、AML患者の同定および治療に使用される。

【0037】

造血系悪性疾患を含む癌は典型的には、様々な遺伝子の突然変異から起こる。同じ種類の癌は、同じ種類の癌を持つ別の患者の突然変異とは異なる1以上の突然変異の結果として起こるか、その1以上の突然変異に伴って起こり得る。同じ癌の基礎をなすものでも複数の分子機構が存在する場合が多いということは、ある治療がある患者には効くが、同じ種類の癌を持つ別の患者には必ずしも同じようには効かないことに一致している。さらに、診断の観点から、転座、欠失、または、SNPなどの特定の突然変異の存在は強力な関連性を有し得る。場合によっては、このような分子マーカーはそれ自体、診断、予後、または、治療応答の決定に有用な指標となる。分子の突然変異が特定の治療に対する応答に関連し得る場合には、まさにその通りである。

【0038】

バイオマーカーは、示されたマーカー遺伝子の発現レベルの任意の指標である。この指標は直接的なものでも間接的なものでもよく、生理学的パラメーターを与える遺伝子の過剰発現または過少発現を内部対照(internal control)、正常組織、または、別の癌腫と比較して数値化することができる。バイオマーカーは、限定されるものではないが、核酸(過剰発現および過少発現、また、直接的および間接的なものの双方)を含む。核酸をバイオマーカーとして用いる場合、限定されるものではないが、DNA増幅、RNA、マイクロRNA、異型接合性の消失(LOH)、一塩基多型(SNPs、ブルックス(Brookes) (1999))、マイクロサテライトDNA、DNA低メチル化、または、高メチル化の測定をはじめとする当分野で公知の任意の方法が挙げられる。タンパク質をバイオマーカーとして用いる場合、限定されるものではないが、量、活性、グリコシル化、リン酸化、ADP-リボシル化、ユビキチン化などの修飾の測定、免疫組織化学(imunohistochemistry)(IHC)をはじめとする当分野で公知の任意の方法が挙げられる。他のバイオマーカーとしては、イメージング、細胞数、および、アポトーシスマーカーが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

本明細書で提供される、標識された遺伝子 (indicated genes) は、特定の腫瘍、または、組織種に関連するものである。マーカー遺伝子は多くの癌種に関連していてもよく、その遺伝子の発現が、肺癌細胞に特異的であることが本明細書に記載されているアルゴリズムを用いて同定される、ある腫瘍または組織種と十分関連がある限り、その遺伝子を癌の状態および予後を判定するために、特許請求される本発明に使用することができる。1種類以上の癌に関連する多くの遺伝子は、当業者に知られている。本発明は、好ましいマーカー遺伝子、さらには、より好ましいマーカー遺伝子の組合せを提供する。これらの組合せは、本明細書に詳細に記載されている。

【 0 0 4 0 】

マーカー遺伝子は、このマーカー遺伝子とその配列を含む場合には、配列番号によって示される配列に相当する。遺伝子セグメントまたは断片は、このセグメントまたは断片をその遺伝子の配列であると識別するのに十分な、参照配列またはその相補物の一部を含む場合に、そのような遺伝子の配列に相当する。遺伝子発現産物は、そのRNA、mRNA、または、cDNAがこのような配列を有する組成物 (例えば、プローブ) とハイブリダイズする場合か、または、ペプチドもしくはタンパク質の場合であって、このペプチドもしくはタンパク質がこのようなmRNAによってコードされている場合には、そのような配列に相当する。遺伝子発現産物のセグメントまたは断片は、このセグメントまたは断片を遺伝子または遺伝子発現産物の配列であると識別するのに十分な、参照遺伝子発現産物またはその相補物の一部を含む場合に、そのような遺伝子または遺伝子発現産物の配列に相当する。

【 0 0 4 1 】

本明細書に記載および請求される本発明の方法、組成物、製品およびキットは1以上のマーカー遺伝子を含む。「マーカー」または「マーカー遺伝子」は、本明細書全体を通して、その過剰発現または過少発現がある腫瘍または組織種に関連しているいずれかの遺伝子に相当する遺伝子および遺伝子発現産物を表すために用いられる。好ましいマーカー遺伝子は、表8にさらに詳細に記載されている。

【 0 0 4 2 】

本発明は、AML患者から生体サンプルを採取するステップと、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病 (AML) の状態を評価する方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルがAML状態の指標となる、方法を提供する。

【 0 0 4 3 】

本発明は、AML患者から生体サンプルを採取するステップと、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の病期分類を行う方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルがAML生存の指標となる、方法を提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明は、AML患者から生体サンプルを採取するステップと、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の治療プロトコルを決定する方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルが、医師が適切な治療法を提供するために推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、治療法に対する応答の十分な指標となる、方法を提供する。

【 0 0 4 5 】

本発明は、AML患者から生体サンプルを採取するステップと、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイ

10

20

30

40

50

オマーカーを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低いマーカー遺伝子の発現レベルが治療に対する応答の指標となる、ステップと、患者が応答者プロフィールを有する場合に患者にアジュバント療法を施すステップとにより、急性骨髄性白血病（AML）患者を治療する方法を提供する。

【0046】

本発明は、AML患者から生体サンプルを採取するステップと、表3から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップとにより、急性骨髄性白血病（AML）患者の死亡リスクが高いか低いかを決定する方法であって、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、医師が奨励される治療法の程度および種類を決定することができるように、死亡リスクの十分な指標となる、方法を提供する。

10

【0047】

本発明は、サンプルに構成的に発現される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含むか、包含するか、または利用してもよい。好ましくは、本明細書で提供される方法で少なくとも約40%の特異性が得られる。好ましくは、本明細書で提供される方法で少なくとも約80%の感受性が得られる。好ましくは、本明細書で提供される方法で0.05未満のp値が得られる。

【0048】

本明細書で提供される方法は、マイクロアレイまたは遺伝子チップ上での遺伝子発現を測定することにより、実施することができる。このマイクロアレイは、cDNAアレイであってもオリゴヌクレオチドアレイであってもよく、1種類以上の内部対照試薬（internal control reagent）をさらに含んでもよい。

20

【0049】

本明細書で提供される方法は、サンプルから抽出されたRNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により実施される核酸増幅により遺伝子発現を判定することによって行うことができる。PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）であってもよく、1種類以上の内部対照試薬をさらに含んでもよい。

【0050】

本明細書で提供される方法は、遺伝子によりコードされているタンパク質を測定または検出することにより実施することができる。このタンパク質は、そのタンパク質に特異的な抗体により検出することができる。

30

【0051】

本明細書で提供される方法は、遺伝子の特徴を測定することにより実施することができる。特徴としては、限定されるものではないが、DNA増幅、メチル化、突然変異、および、対立遺伝子変異（allelic variation）が挙げられる。

【0052】

本発明は、前述の方法のいずれか1つの結果を判定し、結果および結果により作成されたレポートを表示したレポートを作成することにより、急性骨髄性白血病（AML）予後患者レポートを作成する方法を提供する。このレポートは、患者の転帰の評価、および/または、患者集団に対するリスクの見込み、および/または、化学療法に対する可能性もしくはは応答を含み得る。

40

【0053】

本発明は、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料を含む生体サンプルで、急性骨髄性白血病（AML）予後を決定するアッセイを実施するためのキットを提供する。このキットは、マイクロアレイ分析を実施するための試薬、および/または、媒体であって、この中で、前記核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部がアッセイされる媒体をさらに含んでもよい。

【0054】

50

本発明は、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料を含む急性骨髄性白血病 (AML) の状態を評価するための製品を提供する。これらの製品は、マイクロアレイ分析を実施するための試薬、および / または、媒体であって、この中で、前記核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部がアッセイされる媒体をさらに含んでもよい。

【 0 0 5 5 】

本発明は、前述の方法を実施するためのマイクロアレイ、または、遺伝子チップを提供する。このマイクロアレイは、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、またはそれらの一部を含み得る。好ましくは、このマイクロアレイは、少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現、または、1 . 5 分の 1 の過少発現 (1.5-fold under-expression) という測定値または特性決定を提供する。好ましくは、このマイクロアレイは統計学的に有意な p 値の過剰発現または過少発現を伴う測定値を提供する。より好ましくは、p 値は 0 . 0 5 未満である。このマイクロアレイは、限定されるものではないが、cDNA アレイまたはオリゴヌクレオチドアレイをはじめ当分野で公知のものであってよく、内部対照試薬をさらに含んでもよい。

10

【 0 0 5 6 】

本発明は、表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を含む、診断 / 予後ポートフォリオを提供する。好ましくは、測定または特性決定が、少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現、または、1 . 5 分の 1 の過少発現である。好ましくは、この測定は統計学的に有意な p 値の過剰発現または過少発現を提供する。より好ましくは、p 値は、0 . 0 5 未満である。

20

【 0 0 5 7 】

遺伝子発現プロファイルを作成するための好ましい方法は、タンパク質またはペプチドをコードし得る遺伝子により生成される RNA の量を決定することを含む。これは、逆転写 PCR (RT-PCR)、競合的 RT-PCR、リアルタイム RT-PCR、ディフференシャル・ディスプレイ RT-PCR (differential display RT-PCR)、ノーザンブロット解析、および、他の関連する試験により行われる。このような技術は個々の PCR 反応を用いて行うことが可能であるが、mRNA から生成された相補的 DNA (cDNA) または相補的 RNA (cRNA) を増幅させ、これをマイクロアレイで分析するのが最良である。いくつかの異なるアレイ構造および製造方法は当業者に周知であり、米国特許第 5,445,934 号、同第 5,532,128 号、同第 5,556,752 号、同第 5,242,974 号、同第 5,384,261 号、同第 5,405,783 号、同第 5,412,087 号、同第 5,424,186 号、同第 5,429,807 号、同第 5,436,327 号、同第 5,472,672 号、同第 5,527,681 号、同第 5,529,756 号、同第 5,545,531 号、同第 5,554,501 号、同第 5,561,071 号、同第 5,571,639 号、同第 5,593,839 号、同第 5,599,695 号、同第 5,624,711 号、同第 5,658,734 号、および、同第 5,700,637 号などの米国特許に記載されている。

30

40

【 0 0 5 8 】

マイクロアレイ法は、同時に数千の遺伝子の定常状態の mRNA レベルを測定できるため、制御を欠いた細胞増殖の開始、停止、または、変調などの作用を確認するための強力なツールとなる。現在、2つのマイクロアレイ法が広く用いられている。1つは cDNA アレイであり、もう1つはオリゴヌクレオチドアレイである。これらのチップの構成には違いがあるが、実質的に全ての下流データ解析、および、アウトプットは同じである。このような分析結果は、典型的には、マイクロアレイの既知の位置にある核酸配列にハイブリダイズするサンプルの cDNA 配列の検出に用いる標識プローブから受け取るシグナルの強度の測定値である。典型的には、シグナルの強度は、cDNA の量、従ってサンプル

50

の細胞で発現した mRNA の量に比例する。このような多数の方法が利用可能性であり、かつ、有用である。遺伝子発現を決定するための好ましい方法は、米国特許第 6, 271, 002 号、同第 6, 218, 122 号、同第 6, 218, 114 号、および、同第 6, 004, 755 号に見出すことができる。

【0059】

発現レベルの分析は、このようなシグナル強度を比較することで行われる。これは、対照サンプルにおける遺伝子の発現強度に対する試験サンプルの遺伝子の発現強度の比率マトリックスを作成することにより行うのが最良である。例えば、罹患組織の遺伝子発現強度を、同じ種類の良性または正常組織から生じた発現強度と比較することができる。このような発現強度の比率は、試験サンプルと対照サンプルとの間の遺伝子発現の変化倍率を示す。

10

【0060】

遺伝子発現プロフィールはまた、様々な方式で表示することができる。最も一般的な方法では、列が試験サンプルを示し、行が遺伝子を示すグラフィカルデンドグラム (graphic al dendogram) に、統計処理を加えていない蛍光強度 (raw fluoescence intensities)、または、比率マトリックスの行を配置する。データは、類似の発現プロフィールを有する遺伝子が互いに近接するように配置する。各遺伝子の発現比率をカラーで示すことができる。例えば、1 未満の比率 (ダウンレギュレーション) は、スペクトルの青い部分で現れ、一方で、1 を超える比率 (アップレギュレーションを示す) は、スペクトルの赤い部分のカラーで現れるようにすることができる。このようなデータを表示するには、シリコン・ジェネティクス社 (Silicon Genetics, Inc.) からの「GENSPRINT」およびバルテック社 (Partek, Inc.) からの「DISCOVER Y」およびバルテック社 (Partek, Inc.) からの「INFERR」を含む、市販のコンピュータソフトウェアプログラムが利用できる。

20

【0061】

遺伝子発現を測定するためにタンパク質レベルを測定する場合には、十分な特異性および感受性が得られる限り、当技術分野で公知のいずれの方法も適している。例えば、タンパク質レベルは、そのタンパク質に特異的な抗体または抗体フラグメントと結合させ、抗体結合タンパク質の量を測定することにより、測定することができる。検出を容易にするため、抗体を放射性試薬、蛍光試薬、または、他の検出可能な試薬で標識することができる。検出方法としては、限定されるものではないが、酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、および、免疫プロット法が挙げられる。

30

【0062】

本発明の方法に用いられる変調されるマーカーは、実施例に記載されている。示差的に発現する遺伝子は、様々な肺癌予後を有する患者において、アップレギュレーションされていたりダウンレギュレーションされていたりする。アップレギュレーション (up regulation) およびダウンレギュレーション (down regulation) は、何らかのベースラインに対して遺伝子の発現量に検出可能な差 (それを測定するために用いた系のノイズの関与を超える) が見出されるということの意味する、相対的な用語である。このような場合、このベースラインはアルゴリズムに基づいて測定される。そして、罹患細胞で着目する遺伝子は、同じ測定法を用いた場合、ベースラインレベルに対してアップレギュレーションされているかダウンレギュレーションされている。

40

【0063】

細胞の遺伝子発現の状態に関するアッセイでも、免疫組織化学分析 (IHC) などの技術を用いて、診断のために正常 / 異常組織の分布を測定することができる。当分野で公知の任意の方法を用いることができ、例えば、LBC オンコジーンの場合、LBC タンパク質に対する抗体を、IHC による試験のために調製した新鮮凍結した (fresh-frozen)、また、ホルマリン固定した、パラフィン包埋組織ブロックの両方とともに用いることができる。各組織ブロックは、50 mg の残留「微粉 (pulverized)」腫瘍から構成することができる。

50

【0064】

要するに、凍結切片は、室温で小さなプラスチックカプセル内のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で凍結粉碎腫瘍50mgを再水和し、粒子を遠心分離によりペレットとし、これらを粘稠な包埋剤（OCT）に再懸濁させ、カプセルを反転させて、再び遠心分離によりペレットとし、-70℃のイソペンタン中で急速凍結し、プラスチックカプセルを切断して、凍結した組織柱（cylinder of tissue）を取り出し、低温ミクロトームのチャック（cryostat microtome chuck）上にこの組織柱を固定し、無傷の腫瘍組織を含む25～50の連続切片にすることによって、調製することができる。

【0065】

永久切片も、サンプル50mgをプラスチック微量遠心管内で再水和させ、ペレットとし、10%ホルマリンに再懸濁させて4時間固定し、洗浄／ペレットとし、2.5%の温かい寒天に再懸濁させ、ペレットとし、氷水中で冷却して寒天を固化させ、組織／寒天ブロックを微量遠心管から取り出し、そのブロックをパラフィン中で浸潤および包埋し、最大50の連続永久切片にすることを含む、同様の方法で、調製することができる。

【0066】

IHCアッセイでは、これらの切片を、PBSまたは他の遮断試薬中3%のウシ血清アルブミン（BSA）を含有する遮断液で覆う。これらの遮断試薬は、非特異的血清または粉乳を含む。遮断は、室温で1時間進行させる。抗LBCタンパク質抗体を、3%BSA、0.1%Triton X（商標）-100、および、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（t-octylphenoxypolyethoxyethanol）を含有するPBS緩衝液で、1：100の比率で希釈する。通常、これらのサンプル切片を、4℃にて16時間、抗体溶液で覆う。このような時間および温度条件は、選択した抗体および供試材料によって異なる。最適な条件は、経験的に決定される。次いで、抗体で処理した切片に対してPBS中で各15分間の洗浄を3回行って、結合しなかった抗体を除去し、3%BSAおよび1：2000の希釈の二次抗体を含有するPBSで覆う。この二次抗体は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase）、アルカリホスファターゼ、フルオレセインイソチオシアネート、または、他の好適な酵素などの発色酵素に結合させることができる。別法として、二次抗体をビオチンに結合させて、これを発色団で標識したアビジンとともに使用してもよい。

【0067】

遺伝子の存在を検出する他の方法例として、インサイツハイブリダイゼーション（*in situ hybridization*）による方法がある。通常、インサイツハイブリダイゼーションは、次のような主要ステップを含む：（1）分析する組織または生体構造の固定、（2）標的DNAに接近しやすくし、かつ、非特異的結合を軽減するための生体構造のプレハイブリダイゼーション処理、（3）核酸混合物と生体構造または組織中の核酸とのハイブリダイゼーション、（4）ハイブリダイゼーションで結合しなかった核酸断片を除去するためのハイブリダイゼーション後の洗浄、（5）ハイブリダイズした核酸断片の検出。これらの各ステップで用いる試薬、および、用いる条件は、特定の適用に応じて異なる。

【0068】

この場合、遺伝子に（その染色体座で）ハイブリダイズ可能な少なくとも1種類の検出可能な核酸プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を、ハイブリダイゼーション条件下で細胞に接触させる。次いで、任意のハイブリダイゼーションを検出し、正常細胞または対照細胞の所定のハイブリダイゼーションパターンと比較する。プローブは、α動原体プローブ（alpha-centromeric probes）であるのが好ましい。このようなプローブは、いくつかの供給源（例えば、イリノイ州、ダウナーズ・グローブ所在のバイシス社（Visys Inc., Downers Grove, IL））から市販されている。好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーション溶液は、キメラを構成する配列の転座に相当する染色体上のある領域（例えば、15q24-25）に特異的な複数のプローブを含む。

【0069】

本発明の方法に適したハイブリダイゼーションプロトコールは、例えば、あるパートン

10

20

30

40

50

(Albertson) (1984); ピンケル (Pinkel) (1988); 欧州特許第 4 3 0 , 4 0 2 号; および、チュー編「インサイツ・ハイブリダイゼーション・プロトコルズ」、メソッズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、第 3 3 巻、ヒューマナ・プレス、トトワ、ニュージャージー州、1 9 9 4 年 (Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994)) などに記載されている。特に好ましい実施形態では、ピンケルら (Pinkel et al.) (1988) またはカリオニエミ (Kallioniemi) (1992) のハイブリダイゼーションプロトコルが用いられる。ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は周知である (例えば、チジェッセン著、「ハイブリダイゼーション・ウィズ・ヌクレイック・アシッド・プローブズ」、ラボラトリー・テクニクス・イン・バイオケミストリー・アンド・モレキュラー・バイオロジー、第 2 4 巻、エルゼビア、ニューヨーク、1 9 9 3 年 (Tijssen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Elsevier, NY) を参照されたい)。

10

【0070】

好適な実施形態では、バックグラウンドシグナルが、ハイブリダイゼーション中に界面活性剤 (例えば、C - T A B) または遮断試薬 (例えば、精子 DNA、c o t - 1 DNA など) を使用して特異的結合を減少させることで軽減される。ハイブリダイゼーションは、約 0 . 1 ~ 約 0 . 5 m g / m L の DNA (例えば、c o t - 1 DNA) の存在下で実施するのが好ましい。

【0071】

プローブは、合成または生物宿主での増殖を含む、当分野で公知のいずれの方法で調製してもよい。合成方法としては、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド合成、リボプローブ、および、P C R が挙げられる。

20

【0072】

プローブは、当分野で公知のいずれかの方法により、検出可能なマーカーで標識することができる。プローブを標識する方法としては、ランダムプライミング、エンドラベリング、P C R、および、ニックトランスレーションが挙げられる。酵素標識は、核酸ポリメラーゼ、3 種類の非標識ヌクレオチド、および、第 4 のヌクレオチドの存在下で行い、この第 4 のヌクレオチドは直接標識がされるか、標識を付着させるためのリンカーアームを含むか、あるいは、標識された結合分子が結合できるハプテンまたは他の分子に結合されている。好適な直接標識としては、 ^{32}P 、 ^3H 、および、 ^{35}S などの放射線標識、ならびに、フルオレセイン、テキサスレッド、A M C A ブルー、ルシファーイエロー、および、ローダミンなどの蛍光マーカー; 可視光で検出可能なシアニン色素、酵素などの非放射線標識が挙げられる。標識はまた、重亜硫酸塩媒介アミド基転移によって DNA プローブ内に化学的に組み込むか、あるいは、オリゴヌクレオチドの合成中に直接組み込むことができる。

30

【0073】

蛍光マーカーは、プローブ内に組み込まれた活性型のリンカーアームでヌクレオチドに容易に結合させることができる。プローブは、前述の開示されている方法により、ハプテン、または、ビオチンもしくはジゴキシゲニンなどの他の分子に対する標識抗体と、あるいはビオチンの場合には検出可能な標識とコンジュゲートしたアビジンと、サンドイッチハイブリダイゼーションを行うことにより、間接的に標識することができる。抗体およびアビジンは、蛍光マーカー、または、アルカリホスファターゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの酵素マーカーとコンジュゲートさせて検出可能とすることもできる。コンジュゲートしたアビジンおよび抗体は、カリフォルニア州バーリングゲーム所在のベクター・ラボラトリーズ社 (Vector Laboratories(Burlingame, CA))、および、インディアナ州インディアナポリス所在のベーリンガー・マンハイム社 (Boehringer Mannheim(Indianapolis, IN)) などの会社から市販されている。

40

【0074】

酵素は、酵素の基質を提供することにより、比色反応で検出することができる。様々な

50

基質が存在する場合、反応により種々の色が生じ、これらの色を可視化して複数のプローブを別々に検出することができる。当分野で公知の任意の基質が使用可能である。アルカリ性ホスファターゼの好ましい基質としては、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸 (BCIP)、および、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) が挙げられる。セイヨウワサビペルオキシダーゼの好ましい基質はジアミノ安息香酸 (diaminobenzoate) (DAB) である。

【0075】

本発明のインサイツハイブリダイゼーション法に使用するのに好適な蛍光標識プローブは、150 ~ 500ヌクレオチド長の範囲であるのが好ましい。プローブは、DNAであってもRNAであってもよいが、DNAが好ましい。

10

【0076】

検出可能なプローブと細胞のハイブリダイゼーションは、0.1 ~ 500 ng / μ L、好ましくは5 ~ 250 ng / μ Lのプローブ濃度で実施する。ハイブリダイゼーション混合物は、ホルムアミドなどの変性剤を含むのが好ましい。一般に、ハイブリダイゼーションは、25 ~ 45、より好ましくは32 ~ 40、最も好ましくは37 ~ 38で実施する。ハイブリダイゼーションに必要な時間は、約0.25 ~ 96時間、より好ましくは1 ~ 72時間、最も好ましくは4 ~ 24時間である。ハイブリダイゼーション時間は、プローブ濃度、ならびに、hnRNP結合タンパク質、トリアルキルアンモニウム塩、および、ラクタムなどの促進剤を含み得るハイブリダイゼーション溶液内容物に基づいて異なる。次いで、スライドガラスを、ホルムアミドなどの変性剤を含有し、塩化ナトリウム濃度を引き下げる溶液か、または、結合していないプローブおよび誤対合プローブ (mismatched probes) を除去する任意の溶液で洗浄する。

20

【0077】

温度および塩濃度は、所望のハイブリダイゼーションのストリンジェンシー (stringency) に応じて異なる。例えば、高ストリンジェンシー洗浄は、42 ~ 68で実施し、中ストリンジェンシーの洗浄は、37 ~ 55の範囲で実施することができ、低ストリンジェンシー洗浄は、30 ~ 37の範囲で実施することができる。高ストリンジェンシー洗浄の塩濃度は、0.5 ~ 1 $\times$ SSC (0.15 M NaCl、0.015 M クエン酸ナトリウム)、中ストリンジェンシー洗浄の塩濃度は、1 ~ 4 $\times$ SSC、低ストリンジェンシー洗浄の塩濃度は、2 ~ 6 $\times$ SSCとすることができる。

30

【0078】

必要であれば、検出インキュベーションステップは、23 ~ 42、より好ましくは25 ~ 38、最も好ましくは37 ~ 38の湿室で行うのが好ましい。標識した試薬は、BSAなどの遮断試薬または脱脂粉乳などを含有する溶液で希釈するのが好ましい。希釈率は、1 : 10 ~ 1 : 10,000、より好ましくは1 : 50 ~ 1 : 5,000、最も好ましくは1 : 100 ~ 1 : 1,000の範囲であり得る。スライドガラスまたは他の固相支持体は、各インキュベーションステップの間に洗浄して過剰な試薬を除去しなければならない。

【0079】

次いで、可視検出マーカーの場合は、スライドガラスを固定し (mounted)、顕微鏡で分析し、あるいは、放射性マーカーの場合は、スライドガラスをオートラジオグラフィフィルムに露光して分析する。蛍光マーカーの場合は、スライドガラスを、退色防止試薬を含む溶液中で固定し (mounted)、蛍光顕微鏡で分析するのが好ましい。検出精度を上げるためには、複数の核を検査すればよい。

40

【0080】

加えて、LBCオンコジーンの発現産物のアッセイを用いて、LBCオンコジーンの突然変異が起こったかどうかを決定することができる。このようなアッセイは、最も好ましくはイムノアッセイである。最も単純で直接的な意味合いのイムノアッセイは、結合アッセイである。特定の好ましいイムノアッセイは、当分野で公知の様々なタイプの酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、および、ラジオイムノアッセイ (RIA) である。組織切片

50

を用いる I H C 検出も、インサイツハイブリダイゼーション、および、酵素イムノアッセイに特に有用である。

【 0 0 8 1 】

一例示としての E L I S A では、タンパク質特異的抗体を、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルなどのタンパク質親和性を示す選択された表面に固定する。次いで、臨床サンプルなどの所望の抗原を含有する試験組成物を、ウェルに添加する。結合させ、かつ、洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗原を検出することができる。検出は通常、検出可能な標識に結合された、所望の抗原に特異的な別の抗体を添加することにより行う。このタイプの E L I S A は、単純な「サンドイッチ E L I S A ("sandwich ELISA") 」である。検出はまた、所望の抗原に特異的な第 2 の抗体を添加し、次いで、第 2 の抗体に対して結合親和性を有する、検出可能な標識に結合された第 3 の抗体を添加することにより行うことができる。

10

【 0 0 8 2 】

E L I S A 法のバリエーションは周知である。このようなバリエーションの 1 つでは、所望の抗原を含有するサンプルをウェルの表面に固定した後、本発明の抗体に接触させる。結合させ、適宜洗浄した後、結合した免疫複合体を検出する。初めの抗原特異的抗体を検出可能な標識に結合させた場合には、免疫複合体を直接検出することができる。ここでも、免疫複合体は、第 1 の抗原に特異的な抗体に結合親和性を有する、検出可能な標識に結合された第 2 の抗体を用いて検出することができる。

【 0 0 8 3 】

20

A M L の予後または状態を決定するために遺伝子発現を検出する本発明の実施形態では、遺伝子発現のポートフォリオを使用するのが最も好ましい。遺伝子のポートフォリオは、グループ分けされた遺伝子のセットであって、これらについて得た発現情報が、診断、予後、または、治療の選択などの臨床的に適切な判断を下す基礎となる。このような場合、遺伝子発現ポートフォリオは、A M L 患者に関する治療の判断に役立つように作成することができる。

【 0 0 8 4 】

本明細書において、罹患 (diseased) とは、制御を欠いた細胞増殖を伴って起こるような、身体機能の適切な性能を妨害もしくは障害するか、または、障害する可能性を有する身体状態の変異を指す。ある人の遺伝子型または表現型のいくつかの様相が疾病の存在と一致する場合、その人は疾病を有すると診断される。しかしながら、診断または予後を行うという行為は、再発の見込みの決定、治療法の種類の決定、および、治療のモニタリングなどの疾病 / 病状の問題の決定を含み得る。治療のモニタリングでは、経時的に遺伝子の発現を比較して、その遺伝子発現プロファイルが変化したかどうか、または、正常な組織とより一致するパターンに変化しているかどうかを決定することにより、所与の治療経過の効果に関して臨床的判断を下す。

30

【 0 0 8 5 】

遺伝子は、そのグループの遺伝子セットについて得られる情報が、診断、予後、または、治療選択などの臨床的に関連のある判断を下すための信頼できる基礎を提供するように、グループ分けすることができる。これらの遺伝子セットは、本発明のポートフォリオを構成する。ほとんどの診断マーカーの場合と同様に、正確な医学的判断を下すに十分な最少のマーカーを用いるのが望ましい場合が多い。これにより、さらなる分析を保留する処置の遅れ、その上、時間および資源の非生産的使用を防げる。

40

【 0 0 8 6 】

遺伝子発現ポートフォリオを確立する 1 つの方法は、株式ポートフォリオの確立に広く使用されている平均分散アルゴリズム (mean variance algorithm) などの最適化アルゴリズムの使用によるものである。この方法は米国特許公開第 2 0 0 3 0 1 9 4 7 3 4 号に詳細に記載されている。本質的に、この方法は、リターン (例えば、生成されるシグナル) を最適化するインプットセット (財務への応用 (financial application) における株式、すなわち、本明細書では強度により測定される発現) の確立を要求し、あるものは

50

ターンの変動性を最小化しつつ、使用のためのリターンを受け取る。このような操作を行うために、多くの市販のソフトウェアプログラムが利用できる。「ワグナー・アソシエイツ平均分散最適化アプリケーション (Wagner Associates Mean- Variance Optimization Application) 」(本明細書では「ワグナー・ソフトウェア (Wagner Software) 」と呼ばれる) が好ましい。このソフトウェアは、有効フロンティア (efficient frontier) を決定するために「ワグナー・アソシエイツ平均分散最適化ライブラリ (Wagner Associates Mean- Variance Optimization Library) 」の機能を用い、マーコウィッツ (Markowitz) 的意味における最適なポートフォリオが 1 つの選択肢となる。この種のソフトウェアの使用には、マイクロアレイデータが、そのソフトウェアが意図される財務分析の目的で用いられる場合に、株式収益 (stock return) 、および、リスク評価が用いられる方式で、インプットとして処理可能なように変換されることが必要である。

10

【 0 0 8 7 】

ポートフォリオを選択するプロセスはまた、ヒューリスティック・ルール (heuristic rules) の適用を含み得る。好ましくは、このようなルールは、生物学、および、臨床結果を得るために用いる技術についての理解に基づいて構成される。より好ましくは、このようなルールは最適化法からのアウトプットに適用される。例えば、このポートフォリオ選択の平均分散法は、癌患者に示差的に発現するいくつかの遺伝子のマイクロアレイデータに適用することができる。この方法からのアウトプットは、罹患組織だけでなく末梢血でも発現されるいくつかの遺伝子を含み得る、最適化された遺伝子セットである。この試験方法で用いるサンプルが末梢血から得られ、かつ、癌の場合に示差的に発現する特定の遺伝子が末梢血でもまた示差的に発現し得る場合、末梢血で示差的に発現するものを除外する有効フロンティアからポートフォリオが選択される、ヒューリスティック・ルールを適用することができる。もちろん、このルールは有効フロンティアの形成前に適用することができ、例えば、データの予備選択の際にこのルールを適用する。

20

【 0 0 8 8 】

対象とする生物学に必ずしも関連のない他のヒューリスティック・ルールを適用することもできる。例えば、指定された % のポートフォリオだけが特定の遺伝子または遺伝子群により表され得るルールを適用することができる。ワグナー・ソフトウェアなどの市販のソフトウェアは、これらのタイプのヒューリスティックに容易に適応する。これは、例えば、精度および正確性以外の因子 (例えば、予想されるライセンス料) が 1 以上の遺伝子を含むという望ましさに影響を及ぼす場合に有用であり得る。

30

【 0 0 8 9 】

本発明の遺伝子発現プロファイルはまた、癌の診断、予後、または、治療のモニタリングに有用な他の非遺伝的診断法と併用することもできる。例えば、場合によっては、遺伝子発現に基づく前述の方法の診断力と、血清タンパク質マーカー (例えば、癌抗原 27 . 29 (「C A 27 . 29」)) などの従来のマーカーからのデータとを組み合わせるのが有益である。C A 27 . 29 などの分析対象 (analyte) を含む、所与の範囲のこのようなマーカーが存在する。このような方法では、治療患者から定期的に採血し、その後、前述の血清マーカーの 1 つに関して酵素イムノアッセイを行う。マーカーの濃度が腫瘍の応答 (return) または治療の失敗を示唆する場合には、遺伝子発現分析に従うサンプル源が採取される。疑わしい組織塊が存在する場合には、微細針吸引 (FNA) を行い、次に、その組織塊から採取した細胞の遺伝子発現プロファイルを前述のように分析する。あるいは、組織サンプルは、事前に腫瘍が摘出された組織近傍の領域から採取してもよい。このアプローチは、他の試験の結果が不明瞭な場合に特に有用であり得る。

40

【 0 0 9 0 】

本発明に従って作成されたキットは、遺伝子発現プロファイルを決定するために形式化されたアッセイを含む。これらは、試薬および使用説明書、ならびに、バイオマーカーがアッセイされる媒体など、アッセイの実施に必要な材料の全てまたは一部を含み得る。

【 0 0 9 1 】

遺伝子発現プロファイル (関連の生体経路の解明に到達するために用いられるものを含

50

む)を作成するための好ましい方法は、タンパク質またはペプチドまたは転写RNAをコードし得る遺伝子により生成されるRNAの量を決定することを含む。これは、逆転写PCR(RT-PCR)、競合的RT-PCR、リアルタイムRT-PCR、ディファレンシャル・ディスプレイRT-PCR、ノーザンブロット解析、および他の関連試験により最良に行われる。このような技術は、個々のPCR反応を用いて行うことが可能であるが、mRNAから生成されたコピーDNA(cDNA)またはコピーRNA(cRNA)を増幅させ、これをマイクロアレイで分析するのが望ましい場合が多い。いくつかの異なるアレイ構造およびそれらの製造方法は当業者に周知であり、米国特許第5,445,934号、同第5,532,128号、同第5,556,752号、同第5,242,974号、同第5,384,261号、同第5,405,783号、同第5,412,087号、同第5,424,186号、同第5,429,807号、同第5,436,327号、同第5,472,672号、同第5,527,681号、同第5,529,756号、同第5,545,531号、同第5,554,501号、同第5,561,071号、同第5,571,639号、同第5,593,839号、同第5,599,695号、同第5,624,711号、同第5,658,734号、および、同第5,700,637号などの米国特許に記載されている。

10

【0092】

マイクロアレイ法は、同時に数千の遺伝子の定常状態のmRNAレベルを測定できるため、AML患者の遺伝子発現プロファイルを確認するための強力なツールとなる。現在、2つのマイクロアレイ法が広く用いられている。1つはcDNAアレイであり、もう1つはオリゴヌクレオチドアレイである。これらのチップの構成には違いがあるが、実質的に全ての下流データ解析、および、アウトプットは同じである。このような分析結果は典型的には、マイクロアレイの既知の位置にある核酸配列にハイブリダイズするサンプルからのcDNA配列の検出に用いる標識プローブから受け取るシグナルの強度の測定値である。典型的には、シグナル強度は、cDNA量、従って、サンプルの細胞で発現したmRNA量に比例する。このような多数の方法が利用可能性であり、かつ、有用である。好ましい方法は、米国特許第6,271,002号、同第6,218,122号、同第6,218,114号、および、同第6,004,755号に見出すことができる。

20

【0093】

発現レベルの分析は、このようなシグナル強度を比較することで行われる。これは、対照サンプルでの遺伝子の発現強度に対する試験サンプルの遺伝子の発現強度の比率マトリックスを作成することにより最良に行われる。例えば、薬剤で処理した組織の遺伝子発現強度を、薬剤で処理していない同じ組織から生じた発現強度と比較することができる。このような発現強度の比率は、試験サンプルと対照サンプルとの間の遺伝子発現の変化倍率を示す。

30

【0094】

遺伝子発現プロファイルは、様々な方式で表示することができる。一般的な方法では、列が試験サンプルを示し、行が遺伝子を示すグラフィカルデンドグラム(graphical dendrogram)に、比率マトリックスを配置する。データは、類似の発現プロファイルを有する遺伝子が互いに近接するように配置する。各遺伝子の発現比率をカラーで示すことができる。例えば、1未満の比率(ダウンレギュレーション)は、スペクトルの青い部分で現れ、一方で、1を超える比率(アップレギュレーションを示す)は、スペクトルの赤い部分のカラーで現れるようにすることができる。このようなデータを表示するには、シリコン・ジェネティクス社(Silicon Genetics, Inc.)からの「GENSPRINT」およびバルテック社(Partek, Inc.)からの「DISCOVER Y」およびバルテック社(Partek, Inc.)からの「INFERR」を含む、市販のコンピュータソフトウェアプログラムが利用できる。

40

【0095】

示差的に発現する遺伝子は、前述のような遺伝子発現の評価により推定した場合、罹患細胞では、アップレギュレーションされていたりダウンレギュレーションされていたりす

50

る。アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションは、何らかのベースラインに対して遺伝子の発現量に検出可能な差（それを測定するために用いた系のノイズの関与を超える）が見出されるということの意味する、相対的な用語である。このような場合、このベースラインは、正常細胞で測定された遺伝子発現である。そして、罹患細胞で着目する遺伝子は、同じ測定法を用いた場合、ベースラインレベルに対してアップレギュレーションされているかダウンレギュレーションされている。アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションのレベルは、ハイブリダイズしたマイクロアレイプローブの強度測定値の変化倍率に基づいて区別されるのが好ましい。このような区別を行うには1.5倍の差が好ましい。すなわち、処理細胞が、未処理細胞よりも少なくとも1.5倍を超える強度、または、1.5分の1未満の強度を生じることが確認されてはじめて、ある遺伝子が、未処理の罹患細胞よりも処理した罹患細胞で示差的に発現すると言える。遺伝子発現の測定値における差は、より好ましくは1.7倍であり、最も好ましくは2.0倍以上である。

10

20

30

40

50

【0096】

本発明のある方法では、様々な遺伝子の遺伝子発現プロファイルを比較して、患者が治療薬の使用に応答する可能性があるかどうかを決定することを含む。応答者と非応答者とを区別する遺伝子発現プロファイルを確立したら、この各遺伝子発現プロファイルを後述するコンピューター可読媒体などの媒体に保存する。次いで、罹患細胞（AMLの場合は造血芽細胞（hematopoietic blast cell）など）を含む患者サンプルを採取する。最も好ましくは、サンプルは骨髓であって、常法に従って患者の胸骨または腸骨稜から採取する。好ましくは、常法を用いて骨髓突刺液を処理して白血病芽細胞を富化する。その後、サンプルのRNAを患者の罹患細胞から採取して増幅させ、好ましくはマイクロアレイを用いて（大きな遺伝子ポートフォリオの場合）、好適なポートフォリオの遺伝子に関する遺伝子発現プロファイルを得る。次に、このサンプルの発現プロファイルを、予後転帰に関してすでに分析したものと比較する。3遺伝子プロファイルを用いる場合など、ポートフォリオに少数の遺伝子を用いる場合には、遺伝子調節を測定する最も好ましい方法は、単純な核酸増幅および検出法である。このような場合、PCR、NASBA、ローリングサークル、LCR、および、当業者に公知の他の増幅法を使用することができるが、PCRが最も好ましい。ポートフォリオが多数の遺伝子を含む場合、または、他の多数の遺伝子の発現を測定するのが望ましい場合は、前述したようにマイクロアレイの強度測定に基づいて発現パターンを評価するのが好ましい。

【0097】

同様の要領で、遺伝子発現プロファイル分析を行って治療応答をモニタリングすることができる。この方法の一態様では、治療過程の様々な期間に任意の好適な治療を受けた患者に対して前述したような遺伝子発現分析を行う。遺伝子発現パターンが肯定的な転帰と一致した場合は、その患者の治療を継続する。そうでない場合は、患者の治療法を別の治療法に変更するか、用量を変更するか、または、現行の治療を中止する。このような分析により、検出可能な臨床徴候の前、または、不明瞭な臨床徴候に直面した際に、介入および治療の調整が可能となる。

【0098】

本発明の分子マーカーに関しては、診断用に他のいくつかの形式およびアプローチを利用することができる。ゲノム領域のメチル化は、遺伝子発現レベルに影響を与え得る。例えば、遺伝子のプロモーター領域の高メチル化は、遺伝子発現を構成的にダウンレギュレーションし、一方、低メチル化は、定常状態のmRNAレベルに増大をもたらし得る。従って、薬剤応答、予後、または、状態を予測する遺伝子に関連したメチル化領域の検出を、遺伝子発現レベルを診断する別法として使用することができる。このような方法は、当業者に公知である。あるいは、プロモーター領域に存在する一塩基多型（SNP）も、遺伝子の転写活性に影響を及ぼし得る。従って、当業者に公知の方法によるこのようなSNPの検出を、異なる予後転帰で示差的に発現する遺伝子を検出するための診断として使用することもできる。

【 0 0 9 9 】

本発明の製品は、治療、診断、予後、病期分類、および、その他の疾患の評価に有用な遺伝子発現プロファイルの表現である。好ましくは、このような表現は、コンピューター可読媒体（磁気式および光学式など）などの自動的に読み取ることができる媒体に圧縮することができる。本製品は、このような媒体に記録された遺伝子発現プロファイルの評価するための使用説明書も含み得る。例えば、本製品は、前述の遺伝子のポートフォリオの遺伝子発現プロファイルを比較するためのコンピューター命令を有するCD-ROMを含み得る。本製品はまた、患者のサンプルから得た遺伝子発現データと比較できるように内部にデジタル形式で記録された遺伝子発現プロファイルも含み得る。あるいは、このようなプロファイルは、異なった表現形式で記録することができる。前述のパルテック社（Partek, Inc.）の「DISCOVERY」および「INFER」ソフトウェアに組み込まれているもののようなクラスタリングアルゴリズムは、このようなデータの可視化に最も役立つであろう。

10

【 0 1 0 0 】

本発明に従ったさらなる製品は、前述したアッセイを実施するためのキットである。このようなキットはそれぞれ、人間または機械が読み取ることができる形式の使用説明書、ならびに、前述したタイプのアッセイに典型的な試薬を含むのが好ましい。これらのキットは、例えば、本発明の遺伝子発現プロファイルを識別できるように構成された前述のような核酸アレイ（例えば、cDNAアレイ、または、オリゴヌクレオチドアレイ）を含むことができる。このようなキットはまた、核酸の増幅および検出を行うために用いる試薬を含むことができ、例えば、逆転写酵素、逆転写酵素プライマー、対応するPCRプライマーセット、Taqポリメラーゼなどの熱安定性DNAポリメラーゼ、および、限定されるものではないが、スコープオンプローブ、蛍光プローブアッセイ用プローブ、モレキュラービーコンプローブ、エチジウムブロマイドなどの二本鎖DNAに特異的な単一色素プライマーまたは蛍光色素などの好適な検出試薬が挙げられる。表面抗原を検出するためのキットは、染色物質を含むか、あるいは、バッファー、抗抗原性抗体（anti-antigenic antibody）、検出酵素、および、セイヨウワサビペルオキシダーゼもしくはビオチン-アピジン系試薬などの基質のような成分を含む抗体である。芽細胞を検出するためのキット成分は、通常、フローサイトメトリー、芽細胞接着アッセイ、および、他の一般的な芽細胞アッセイを行うための試薬を含む。

20

30

【 0 1 0 1 】

従来の抗癌剤としては、限定されるものではないが、チロシンキナーゼ阻害剤、MEKキナーゼ阻害剤、PI3Kキナーゼ阻害剤、MAPキナーゼ阻害剤、アポトーシス調節剤、および、これらの組合せが含まれる。これらの抗癌剤の中で最も好ましい例示的な薬剤としては、ノバルティス社（Novartis）の「GLEEVEC」チロシンキナーゼ阻害剤、U-0126 MAPキナーゼ阻害剤、PD-098059 MAPキナーゼ阻害剤、SB-203580 MAPキナーゼ阻害剤、アンチセンス、リボザイム、DNAzyme、Bcl-XL、および、抗アポトーシス剤が挙げられる。他の有用な薬剤の例としては、限定されるものではないが、米国特許第6,306,897号のカラノライド（calanolides）；米国特許第6,284,764号の置換二重環；米国特許第6,133,305号のインドリン；米国特許第6,271,210号のアンチセンスオリゴヌクレオチド；例えばシスプラチンまたはカルボプラチンなどの白金錯体；例えばパクリタキセルまたはドセタキセルなどのタキサン化合物；例えばイリノテカンまたはトボテカンなどのカンプトセシン化合物；例えばビンブラスチン、ビンクリスチンまたはビノレルビンなどの抗腫瘍ビンカアルカロイド；例えば5-フルオロウラシル、ゲムシタビンまたはカペシタビンなどの抗腫瘍ヌクレオシド誘導体；例えばシクロフォスファミド、クロラムブシル、カルムスチンまたはロムスチンなどのニトロジェンマスタードまたはニトロソウレアアルキル化剤（nitrosourea alkylating agents）；例えばダウノルビシン、ドキソルビシンまたはイダルビシンなどの抗腫瘍アントラサイクリン誘導体；例えばトラストズマブ（trastuzumab）などのHER2抗体；例えばエトボシドやテニボシドなどの抗腫瘍ポドフィロトキシン誘導

40

50

体；ならびにエストロゲン受容体拮抗薬または選択的エストロゲン受容体調節剤、好ましくは、タモキシフェン(tamoxifen)、あるいはまたトレミフェン、ドロロキシフェン(droloxifene)、ファスロデックス(faslodex)、および、ラロキシフェン(raloxifene)を含む抗エストロゲン薬、または、エキセメスタン(exemestane)、アナストロゾール(anastrozole)、レトラゾール(letrozole)、および、ボロゾール(vorozole)などのアロマターゼ阻害剤が挙げられる。

【0102】

抗癌剤には、遺伝子療法、アンチセンス療法、または、RNA干渉向けの治療薬も含まれ得る。このような治療薬としては、限定されるものではないが、細胞内に導入してmRNAの転写を阻害し、そのmRNAをコードする遺伝子の機能を遮断することができる、mRNA配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドも含まれる。オリゴヌクレオチドを使用した遺伝子発現の遮断は、例えば、ストラチャン、リード著、「ヒトの分子遺伝子学」、1996年(Strachan and Read, Human Molecular Genetics, 1996)に記載されている。このようなアンチセンス分子は、DNA、ホスホロチオエートまたはメチルホスホン酸などのDNAの安定誘導体、RNA、2'-O-アルキルRNAなどのRNAの安定誘導体、または、他のアンチセンスオリゴヌクレオチドミメティクスであり得る。アンチセンス分子は、マイクロインジェクション、リボソーム封入(liposome encapsulation)、または、アンチセンス配列を収容するベクターからの発現によって細胞内に導入することができる。

【0103】

遺伝子療法では、目的の遺伝子を、レシピエント宿主細胞の感染によって治療用DNAの導入を媒介するウイルスベクターに連結することができる。好適なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、および、ポリオウイルスなどが挙げられる。あるいは、治療用DNAを、リガンド-DNAコンジュゲートまたはアデノウイルス-リガンド-DNAコンジュゲートを用いた受容体媒介標的化DNA導入(receptor-mediated targeted DNA transfer)、リポフェクション膜融合(lipofection membrane fusion)、または、直接的マイクロインジェクションを含む、非ウイルス法により、遺伝子療法用の細胞に導入することができる。このような方法およびそのバリエーションは、生体外(ex vivo)ならびに生体内(in vivo)遺伝子療法に適している。遺伝子との併用に適した遺伝子療法の分子方法論のプロトコールが、ポール・D・ロビンス編、「遺伝子療法プロトコール」、ヒューマナ・プレス、トトワ、ニュージャージー州、1996年(Gene Therapy Protocols, edited by Paul D. Robbins, Human Press, Totowa NJ, 1996)に記載されている。

【0104】

本明細書に開示された方法に従って同定された化合物は、潜在的な毒性を最小にするとともに最適な阻害または活性を得るために、通常の試験で決定された適当な用量で単独使用することができる。さらに、他の薬剤との同時投与または逐次投与が望ましい場合もある。

【0105】

以下、本発明を非限定的な実施例によりさらに説明する。本明細書に引用されている参考文献は全て、参照することにより本明細書の一部とする。

【0106】

〔実施例〕

実施例 1

臨床評価および応答の定義

本試験は、再発性または難治性AML患者を各28日サイクルの最初の21日間の開始経口用量600mg(1日2回)のティピファニブで処置する、非盲検多施設非比較第2相臨床試験(open label, multicenter, non-comparative phase 2 clinical study)(ハローソーら(Harousseau et al.)(2003))の一部である。患者は、再発性AML患者群と難治性AML患者群の2群に分けた。合計252人の患者(再発性135人、難治性1

17人)を処置した。80人の患者を選択して、個々にインフォームド・コンセントが必要な骨髄サンプルをRNAマイクロアレイ分析のために採取した。本試験では全体的な応答率が比較的低かった。

【0107】

従って、遺伝子発現プロファイリングのために、ティピファニブに対する応答を、中央判定 (central review) によるか、または臨床状態によるかのいずれかで定義される、客観的応答 (完全緩解 (CR)、血小板の回復が不完全な完全緩解 (CRp)、または、部分的緩解 (PR)) のある患者、血液学的応答 (骨髄の白血病芽細胞の50%を超える減少) のある患者、または、中央判定および臨床状態の両方によって定義される安定疾患 (血液学的応答はないが疾患が進行していない) の患者に分けた。血小板の回復が不完全な完全緩解は、輸血を必要としないことを確実にするために100,000/μL未満の血小板数で十分であることを除いて、同様に定義した。部分的緩解は、骨髄芽細胞が少なくとも50%減少し、好中球 ($> 500 / \mu L$) および血小板数 ($> 50,000 / \mu L$) が部分的に回復した状態と定義した。応答は、初めの記録から少なくとも4週間後に確認しなければならなかった。

10

【0108】

サンプルの採取およびマイクロアレイ処理

骨髄サンプルを、ティピファニブ処置の前に患者から採取し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し、フィコール-ジアトリゾエート (Ficoll-diatrizoate) ($1.077 g/mL$) を用いて遠心分離した。白血球をPBSで2回洗浄し、10%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含むウシ胎児血清 (FBS) に再懸濁し、すぐに $-80^{\circ}C$ で保存した。細胞を解凍し、RNeasyキット (カリフォルニア州バレンシア所在、キアゲン社 (Qiagen, Valencia, CA)) を用い、細胞サンプルから全RNAを抽出した。RNAの質を、アジレント・バイオアナライザー (Agilent Bioanalyzer) を用いて確認した。アフィメトリクス社の (Affymetrix) (カリフォルニア州サンタクララ所在 (Santa Clara, CA)) プロトコールに従ってcDNAおよびcRNAの合成を行った。

20

【0109】

マイクロアレイ処理

1回の増幅では複数のサンプルのRNA収量がチップハイブリダイゼーションに用いる十分な標識cRNAを得るのに不十分であるため、2回の線形増幅を行った。ハイブリダイゼーションのために、 $11 \mu g$ のcRNAを、 $40 mM$ Tris 酢酸、 $pH 8.1$ 、 $100 mM$ 酢酸カリウム、および、 $30 mM$ 酢酸マグネシウム中で35分間、 $94^{\circ}C$ でインキュベートすることによりランダムに断片化した。断片化したcRNAを、 $60 rpm$ に設定したローティッセルリー・オープン (rotisserie oven) で16時間、 $45^{\circ}C$ でU133Aアレイにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、アレイを洗浄し (Trition X-100 (0.005%)) を含む $6 \times SSPE$ および $0.5 \times SSPE$ 、ストレプトアビジン-フィコエリトリン (SAPE; オレゴン州ユージーン所在、モレキュラー・プローブ社 (Molecular Probes, Eugene, OR)) で染色した。アジレント (Agilent) G2500A Gene Array スキャナー (カリフォルニア州パロアルト所在、アジレント・テクノロジー社 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)) を用いて結合した標識プローブの定量を行った。

30

40

【0110】

各アレイの合計蛍光強度を一定値600に対して尺度化した。チップの性能を、シグナル/ノイズ比 (平均シグナルの生値/ノイズ) を算出することにより定量化した。シグナル/ノイズ比が5未満の場合、それらのチップはさらなる解析から除外した。チップの少なくとも10%に「存在している」と言える遺伝子だけをさらなる解析に含めた。このカットオフの後に11,723のアフィメトリクス (Affymetrix) プローブセットが残った。遺伝子発現データの質は、主成分分析に基づいたアウトライアーの特定、および、遺伝子強度の正規分布の解析 (パルテック・プロ (Partek Pro) V5.1) により、さらに制御した。

50

【0111】

統計分析

高い感度の応答を予測する遺伝子を同定するために、パーセントイル解析を利用した。非応答者の少なくとも40%に比べて応答者の100%でアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされていた遺伝子が同定された。カイ二乗検定およびスチューデントのt検定を用いて、ras突然変異の状態および遺伝子発現を含む患者の応答と患者の共変量との相関の有意性を調べた。アンスーパーバイズドk平均法および階層クラスタリングをOmni vizで行った。次いで、選択された遺伝子の予測値を、リーブ・ワン・アウト(leave-one-out)およびリーブ・ファイブ・アウトクロス確認法(leave-five-out cross validation)により解析した。ここで、データセットから1つ(または5つ)のサンプルを取り出し、マーカーを11, 723の遺伝子から再選択した。その後、この遺伝子の予測値を、線形判別分析を用いて残りのサンプルに対して調べた。感度は、この試験により検出された真陽性の数を真陽性と偽陰性の合計数で除して算出した。特異性は、この試験により検出された真陰性の数を真陰性と偽陽性の合計数で除して算出した。陽性予測値は、真陽性の数を真陽性と偽陽性の合計数で除して算出した。陰性予測値は、真陰性の数を真陰性と偽陰性の合計数で除して算出した。治療に応答する患者の陽性尤度比は、感度を(1 - 特異性)で除したものである。受信者動作者曲線(receiver operator curve)(ROC)を用いて、100%の感度を必要とする各分類子について適切な閾値を選択した。このROC診断により、各パラメーターの感度および特異性が算出される。

【0112】

リアルタイムPT-PCRバリデーション

TaqMan(登録商標)リアルタイムRT-PCRを用いてAHR遺伝子およびAKAP13遺伝子のマイクロアレイの結果を検証した。各1μgのサンプルの増幅RNAから、製造者使用説明書(インビトロゲン社(Invitrogen))に従って、T7オリゴ(dT)プライマーおよびSuperscript II逆転写酵素を用いて、cDNAを作製した。AKAP13遺伝子および対照遺伝子PBGDのプライマーおよびMGBプローブを、プライマー・エクスプレス(Primer Express)(アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems))を用いて設計し、一方、AHR遺伝子および対照遺伝子HPRのプライマーおよびプローブは、ABIからアッセイズ・オン・デマンド(Assays-on-Demand)として市販されている。AKAP13のプライマー/プローブの配列は、AKAP13フォワード: 5'ggtcagatgtttgccaaaggaa3'(配列番号1)、AKAP13リバー: 5'tcttcagaaacacacactcccatc-3'(配列番号2)、AKAP13プローブ: 6FAM-tgaaacgggaagaaagccttgta-3'(配列番号3)であった。

【0113】

全てのプライマーおよびプローブは、90%を超える最適な増幅効率であるかどうか調べた。相対標準曲線は、Hela cDNA(大抵の場合は、25ng~2.5pgの範囲)の5つの希釈液(各10倍)から構成されている。RT-PCR増幅混合物(25μL)は、100ngの鋳型cDNA、2xTaqMan(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックス(12.5μL:アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems))、500nMフォワードプライマーおよびリバープライマー、ならびに、250nMプローブを含有していた。ABI PRISM 7900HT シークエンス・ディテクター(Sequence Detector)(アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems))上で反応させた。サイクル条件は、50℃で2分間のAmplifyaseUNGの活性化、95℃で10分間のポリメラーゼの活性化、および、95℃で15秒間とアニーリング温度(59℃または60℃)で60秒間のサイクルを50回であった。各アッセイでは、目的の遺伝子および対照遺伝子に対して標準曲線および非鋳型対照が鋳型cDNAとともに3反復で含まれていた。各遺伝子の相対量を標準曲線に基づいて算出し、対照遺伝子の量で正規化した。3反復のサンプルの平均変動率(算出した量に基づく)は8%であった。ストックから個々に希釈した鋳型を用いた反復実験間の相関は0.95を超えていた。

2回のTaqMan（登録商標）実験が再現性のある結果を示した場合は、サンプルをマイクロアレイデータと比較するだけにした。

【0114】

細胞系の培養およびAKAP13の過剰発現アッセイ

AKAP13ベクター、オンコLBC、プロトLBC、および、ベクター対照（pSRalpha-neo）を、デニス・トクソズ博士（Dr. Deniz Toksoz）から入手した（チエンら（Zheng et al.）（1995））。HL60細胞系をAmerican Tissue Culture Collectionから入手し、10%FBSを含むRPMI 1640中で増殖させた。細胞は、製造者の使用説明書に従い、Effectedene試薬（キアゲン社（Qiagen））を用い、各ベクターで一時的にトランスフェクトし、G418（600μg/mL）で7日間維持した。次いで、ティピファニブを様々な濃度（0、1.5、3.1、6.3、13、25、50、100、200、1000、および、10,000nM）2反復培養物（ 1.5×10^5 細胞/mL）に添加した。細胞数を6日目に計数した。細胞数を、薬剤を含まない培養物に対して正規化し、対照生細胞のパーセントを得た。

10

【0115】

結果

再発性および難治性AMLの発現プロファイリング

FTIsはもともと、FTase活性を特異的に阻害し、それにより、オンコジーンras経路を遮断するように設計されている。従って、ras突然変異の活性化について、再発性または難治性AML患者80人の骨髄からのDNAをまず分析し、ras突然変異とティピファニブ応答との間の可能性のある相関を調べた。AMLサンプルの26%がN-ras突然変異を含み、突然変異状態は客観的応答または全生存率とは相関していなかった（ハローソーら（Harousseau et al.（2003）））。従って、FTIティピファニブに対する応答の予測に用いることができる新規のシグネチャを特定するために遺伝子発現プロファイリングを行った。ティピファニブ処置の前に80人の患者から遺伝子発現分析のために骨髄サンプルを採取した。表1に、患者の情報が示されている。

20

【0116】

【表 1】

表 1 患者情報

患者ID	AMLの種類	性別	年齢	最も良い応答*	生存期間	応答
A30009	難治性	男性	70	CR	358	あり
A30011	再発性	男性	70	PR	154	あり
A30059	難治性	女性	62	SD	119	あり
A30095	難治性	男性	61	CR	380	あり
A30177	再発性	女性	63	SD	75	あり
A30192	再発性	男性	67	SD	266	あり
A30235	再発性	女性	58	CR	276	あり
A30246	難治性	男性	74	HI	213	あり
A30353	再発性	女性	36	HI	192	あり
A30355	再発性	女性	44	HI	87	あり
A30360	難治性	男性	80	HI	35	あり
A30364	再発性	女性	54	HI	67	あり
A30379	再発性	女性	63	SD	282	あり
A30380	難治性	女性	71	HI	71	あり
A30007	難治性	女性	54	NR	106	なし
A30008	難治性	男性	52	NR	27	なし
A30053	再発性	男性	51	NR	48	なし
A30057	難治性	男性	74	NR	102	なし
A30060	難治性	女性	33	NR	175	なし
A30096	難治性	男性	69	NR	182	なし
A30179	難治性	女性	70	NR	148	なし
A30182	難治性	男性	70	NR	92	なし
A30190	再発性	女性	54	NR	51	なし
A30191	再発性	女性	67	NR	78	なし
A30245	再発性	男性	63	NR	366	なし
A30300	再発性	男性	47	NR	414	なし
A30302	再発性	男性	62	NR	234	なし
A30308	再発性	男性	66	NR	71	なし
A30311	再発性	女性	61	NR	115	なし
A30377	再発性	男性	68	NR	364	なし
A30047	再発性	女性	63	NR	94	なし
A30055	再発性	女性	71	NR	56	なし
A30063	再発性	男性	46	NR	220	なし
A30090	難治性	女性	85	NR	56	なし
A30091	難治性	女性	67	NR	56	なし
A30092	難治性	女性	54	NR	40	なし
A30111	難治性	女性	71	NR	38	なし
A30112	再発性	女性	61	NR	12	なし
A30113	難治性	男性	75	NR	177	なし
A30119	難治性	男性	19	NR	36	なし
A30153	再発性	女性	68	NR	105	なし
A30176	難治性	男性	75	NR	54	なし
A30178	再発性	女性	70	NR	39	なし
A30180	難治性	男性	62	NR	72	なし
A30183	難治性	男性	63	NR	64	なし
A30244	再発性	女性	34	NR	35	なし
A30247	難治性	女性	72	NR	35	なし
A30248	再発性	男性	46	NR	61	なし
A30304	再発性	男性	65	NR	44	なし
A30306	再発性	女性	28	NR	74	なし
A30349	難治性	男性	58	NR	22	なし
A30354	難治性	女性	31	NR	103	なし
A30359	再発性	男性	65	NR	8	なし
A30363	再発性	男性	64	NR	37	なし
A30376	再発性	女性	24	NR	383	なし
A30378	再発性	女性	76	NR	184	なし
A30381	難治性	女性	70	NR	128	なし
A30395	難治性	男性	61	NR	83	なし

*第三者調査員によって確認された場合にのみ安定疾患（SD）が含まれる

HI＝血液学的改善

CR＝完全な応答

PR＝部分的な応答

NR＝応答なし

80 サンプルの内の58 サンプルが、RNA の質およびチップの性能を含む品質管理基準をパスした。年齢、性別、AML の種類（再発性または難治性）、細胞遺伝学的リスク因子、基準芽細胞数、応答、および、これらの58 人の患者と臨床試験集団の残りの患者（表2 では $N = 194$ ）との間の全生存率には有意差がなかった。

【0118】

【表2】

表2			
共変量	58 人のサブセット	残りの患者194人	p 値
応答	14	28	0.1237
男性	28	119	0.1055
平均年齢	60	56	0.1046
再発	31	104	0.8977
細胞遺伝学的リスク	34	5	0.1503
平均芽細胞	5.5%	5.0%	0.1629

10

【0119】

高い感度で応答者と非応答者とを区別できる遺伝子を同定するために、遺伝子発現データを臨床情報と統合してレトロスペクティブ分析を行った。示差的に発現する遺伝子を同定する前に、これらのデータを複数回フィルタリングした。まず、少なくとも10%のサンプルで発現していない遺伝子を排除した。これにより、遺伝子の数が約22,000 から11,723 遺伝子に減少した。アンスーパーバイズド分析の場合、データセット全体で発現の変動をほとんど示さない遺伝子（変動率がサンプル全体で45%未満）も排除し、残りの5,728 の遺伝子についてクォンタイル・ノーマライゼーション(quantile normalization)を行った。この段階で、アンスーパーバイズドk - 平均クラスタリング分析を実施して、全遺伝子発現プロファイルに基づいて患者間の任意の差を確認した。この方法で、患者の6つの主なクラスターを同定した。応答者と非応答者との間には差は見られなかった（図1）。ほんの一部の遺伝子がFTI の抗腫瘍効果に関連していると考えられ、例えば、FTI 生物学に關与する1つの遺伝子の示差的な発現が臨床応答に影響を与えるが、他の11,722 の遺伝子から導入されるノイズによってこの影響が隠されてしまう可能性がある。

20

【0120】

30

実施例2

応答者と非応答者との間で示差的に発現する遺伝子の同定

次に、全ての応答者と少なくとも40%の非応答者との間で示差的に発現する遺伝子を同定するために、遺伝子発現データを用いてスーパーバイズド解析を行った。このような基準は、可能な最高レベルの感度でティピファニブに対する応答を予測できる遺伝子を同定するために選択した。11,723 の遺伝子から、応答者と非応答者とを階層分類でき（詳細は表3 および表10）、t 検定で有意なP 値（ $P < 0.05$ ）が得られる、合計19 の遺伝子を同定した。これらの遺伝子には、シグナル伝達、アポトーシス、細胞増殖、発癌、および、場合によっては、FTI 生物学に關与するものも含まれている（ARRH、AKAP13、IL3RA）。

40

【0121】

【表 3】

表3 ティピファニブに対する応答を予測する上位19の遺伝子と解析結果

配列番号	遺伝子記号	特異性	P 値	機能の説明
151	AHR	0.52	0.00000255	アポトーシス、細胞周期、シグナル伝達
309	AKAP13	0.63	0.00006133	低分子量GTPase媒介シグナル伝達、発癌
488	MINA53	0.50	0.00006934	細胞増殖
411	IDS	0.50	0.00023964	グリコサミノグリカンの分解
632	OPN3	0.40	0.00064297	Gタンパク質共役受容体タンパク質シグナル伝達
280	GPR105	0.43	0.00087608	Gタンパク質共役受容体タンパク質シグナル伝達
582	TENC1	0.43	0.0010309	シグナル伝達
376	TNFSF13	0.40	0.00104219	細胞増殖
134	SVIL	0.45	0.00145723	細胞骨格の固着
272	IL3RA	0.40	0.00198392	受容体シグナル伝達
209	C6orf56	0.40	0.00261553	—
697	FRAG1	0.45	0.00298989	腫瘍抑制因子
476	GOSR1	0.45	0.01201057	内部ゴルジ輸送
204	KIAA1036	0.43	0.01262079	—
483	BTC3	0.47	0.01659402	細胞周期の調節
487	MAPK8IP3	0.40	0.01817428	JNKカスケードの調節
419	LILRB3	0.41	0.02374898	免疫応答
242	ARHH	0.40	0.02721922	低分子量GTPase媒介シグナル伝達
496	NPTX2	0.45	0.03346833	異種親和性細胞接着

10

20

【0122】

遺伝子マーカーのリアルタイムRT-PCRバリデーション

マイクロアレイ遺伝子発現データを検証するために、マイクロアレイハイブリダイゼーションに用いる標識標的cRNAの作製に用いたcDNAに対してTaqMan（登録商標）リアルタイムRT-PCRを実施した。遺伝子発現データを検証するために2つの遺伝子を選択した。AHR遺伝子およびAKAP13遺伝子が、応答者に対して最高レベルの特異性が得られたため選択した。相関率は、AHRが0.74、AKAP13が0.94であり、マイクロアレイ遺伝子発現データがPCRによって認証されたことを示す（図2）。

30

【0123】

耐性マーカーとしてのAKAP13遺伝子の同定

AKAP13が、ティピファニブに対して耐性のある患者で過剰発現した。この遺伝子の予測値を、リーブ・ワン・アウト・クロス確認法（LOOCV、図3A）を用い、58のサンプルについて算出した。AKAP13遺伝子の発現は、陰性予測値（NPV）96%で非応答、陽性予測値（PPV）43%で低発現レベル媒介応答を予測した（ $\chi^2 = 13.7$ 、 $P = 0.0022$ ）。全体的な診断精度は69%であり、応答の陽性尤度比は2.4であった。従って、AKAP13遺伝子発現に基づいたこの患者集団の階層分類により、応答率が全群の24%（14/58）から遺伝子発現率の低い患者群の43%（13/30）に上昇した。各患者におけるAKAP13遺伝子の発現値は図3Bに示されている。生存をカプラン・マイヤー分析で分析すると、この遺伝子の発現が低い患者の平均生存期間は、発現レベルが高い患者よりも90日長かった（ $P = 0.008$ 、図3C）。

40

【0124】

3つの遺伝子マーカーの最小セットの同定

AKAP13単独よりも優れた精度でティピファニブに対する応答を予測できる遺伝子マーカーの候補セットを同定するためにLOOCVを用いた。分類子を、t検定のP値に基づき遺伝子数を増加させて作成し、このような分類子の誤り率を、予測応答感度を100%に維持しつつ、LOOCVを用いて算出した（図4A）。

50

【0125】

3 遺伝子分類子は、低い誤り率で応答を予測できる（図4A）。これは、リーブ・ファイブ・アウト・クロス確認法を実施した際に確認された。遺伝子を追加すると誤り率が上昇する場合は、追加の遺伝子が分類子にノイズを導入することを示している。3 遺伝子分類子の場合、L O O C Vにより、NPVが94%、PPVが48%、全体的な診断精度が74%、かつ、陽性尤度比が2.9であることが示された（図4B）。各患者における3 遺伝子の発現値の組合せが、図4Cに示されている。従って、この遺伝子シグネチャを有する患者群の場合、ティピファニブに対する応答率は、この患者集団での24%（14/58）に比較して48%（12/25）であった。

【0126】

3 遺伝子シグネチャ（AHR、AKAP13、およびMINA53）を用いることにより、カプラン・マイヤー分析で、再度、予測された応答者群と非応答者群との間で生存に有意差が示された（図4D）。応答者として誤って分類された13人の患者は、非応答者として正しく分類された31人の患者よりも全体的な生存が良好であった（図5）。興味深いことに、非応答者として誤って分類された2人の患者は血液学的改善のみを示し、全生存期間が比較的短かった（71日と87日）。

【0127】

AKAP13の過剰発現はAMLのティピファニブに対する耐性を高める

AKAP13 遺伝子は、ティピファニブに対する耐性の最も強力なマーカーである。従って、HL60細胞系でこの遺伝子のオンコBC変異体およびプロトBC変異体を過剰発現させることにより、FTI生物学におけるその関与を調べた。次いで、一時的トランスフェクト体のティピファニブ感受性を調べた。このAML細胞系モデルにおける両方のAKAP13変異体の過剰発現により、対照細胞に比べティピファニブに対する耐性が約20倍増大した（図3）。LBCオンコジーンとプロトオンコジーン（proto-oncogene）の両方が、ティピファニブに対する耐性を同程度に増大させたのが、対照に比べて2以上のlog単位、死滅曲線の右方向へ平行移動していることで分かる。

【0128】

考察

近年、2つのグループが、臨床転帰の予測に有用な、新たに診断された成人AML患者の遺伝子発現プロファイルを確認した（プリンガーら（Bullinger et al.）（2004）、バルクラ（Valk et al.）（2004））。これらのプロファイルは、核型分析などの現在用いられている診断マーカーよりも強力であると思われる。さらに、発現プロファイルで、標準的な化学療法薬（チャンら（Chang et al.）（2003）；オクツら（Okutsu et al.）（2002）；およびチェオクラ（Cheok et al.）（2003））、および、新規の選択性抗癌剤を含む抗癌化合物に対する応答を予測できることが分かった（ホフマンら（Hofmann et al.）（2004）；および、マクリーンら（McLean et al.）（2004））。同様に、薬理遺伝学的プロファイルが、チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ（gefitinib）に対する患者の応答に相関することも分かった（パエスら（Paez et al.）（2004）およびリンチら（Lynch et al.）（2004））。この研究で、非小細胞肺癌患者の亜群が、標的治療に対する臨床応答に相関する標的上皮細胞成長因子受容体内で活性化型の突然変異を起こしていることが分かった。

【0129】

再発性および難治性AML患者の第2相試験で、新規のファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤であるティピファニブに対する応答を予測する遺伝子発現プロファイルを確認した。この種の化合物は、造血系悪性疾患（カープら（Karp et al.）（2001）；クルズロックら（Kurzrock et al.）ら（2004）；アルシーナら（Alsina et al.）（2003）；コルテスら（Cortes et al.）（2003）；およびトーマスら（Thomas et al.）（2001））、および、乳癌（ジョンストンら（Johnston et al.）（2003））、または、再発性神経膠腫（ブルナーら（Brunner et al.）（2003））などの充実性腫瘍（solid tumors）の治療に有望であることを示されている。しかしながら、臨床応答は実証されているが、薬剤に対して最も応答する可能性の高い患者、従って、治療の最適な候補者となる患者を特定することにより、患者に合っ

10

20

30

40

50

た治療の要望が大きくなっている。さらに、*r a s*がこの種の薬剤の主な標的と見なされているが、複数の臨床試験により、このような薬剤が、*r a s*突然変異の頻度が高い集団に必ずしも有効ではないことが示された(ヴァン・カトセムら (Van Cutsem et al.) (2004)およびラオら (Rao et al.) (2004))。

【 0 1 3 0 】

複数の遺伝子マーカーがティピファニブに対する応答を予測する可能性があることが確認された。これらのマーカーのサブセットは、薬剤応答を予測でき、かつ、F T I 生物学に關与する可能性もあると考えられる。マイクロアレイの試験により見出された上位候補の1つがリンパ芽細胞発症オンコジーン(lymphoid blast crisis oncogene) (オンコ L B C または A K A P 1 3) である。この遺伝子は、R h o タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子として機能し(チェンら (Zheng et al.) (1995))、かつ、タンパク質キナーゼ A アンカータンパク質としても機能する(カーら (Carr et al.) (1991))。A K A P 1 3 は、ラミン B と相互作用することが知られている α ラセンドメインに相同な領域を含む(Foisnerら(1991))。これに関連して、ラミン B がタンパク質キナーゼ A によって活性化され、これにより分裂活性が増大する。R h o B およびラミン B はともにファルネシル化され、F T I の候補標的である。A K A P 1 3 はまた、その 3' 末端 (3-prime end) の喪失により細胞の形質転換を引き起こすためプロトオンコジーンでもある(スターペッティら (Sterpetti et al.) (1999))。これは、慢性骨髄性白血病患者で初めに確認されたが、その発現は A M L では実証されていない。

【 0 1 3 1 】

F T I 生物学に關与している可能性がある複数の遺伝子 (A R H H 、 A K A P 1 3 、 I L 3 R A) の同定により、複数の経路の相互作用がこの A M L 患者集団で F T I がどのような機能するかに影響を与え得るという考えが支持される (図 7) 。これらの遺伝子は、*r a s*、*r h o*、および、場合によってはラミン B を含む複数のファルネシル化タンパク質と相互作用する。R h o タンパク質は、F T I の重要な抗腫瘍形成標的の可能性のある(サハイら (Sahai et al.) (2002)およびランセットら (Lancet et al.) (2003))。R h o B、R h o A、および、R h o C は、複数の種類の癌で過剰発現することが分かっている(サハイら (Sahai et al.) (2002))。加えて、R h o H (A R H H) は骨髄起源の腫瘍で頻繁に再編成され、これにより過剰発現することがある(パスカルッチら (Pasqualucci et al.) (2001))。これら R h o タンパク質のほとんどが、ゲラニルゲラニル化(geranygeranylated)されるが、互いに密接に相互作用し、ファルネシル化した *r a s*、R h o E、および、R h o B 低分子量 G T P a s e とともに相互作用する(サハイら (Sahai et al.) (2002)およびリーら (Li et al.) (2002))。さらに、R h o H、R h o B、および、R h o E が、R h o A および R h o G の形質転換能力に対して拮抗するように作用し得る(リーら (Li et al.) (2002))。R h o A、および、場合によっては他の関連する低分子量 G T P a s e の活性が、グアニンヌクレオチド交換因子リンパ性急性転化オンコジーン (guanine nucleotide exchange factor lymphoid blast crisis oncogene) (A K A P 1 3) によって増大する(スターペッティら (Sterpetti et al.) (1999)およびトクソスら (Toksoz et al.) (1994))。加えて、A K A P 1 3 は、タンパク質キナーゼ A によるラミン B の活性化によって分裂活性が増大し得る(フォイスナーFoisnerら(1991))。I L 3 受容体が *r a s* 経路を活性化させることもよく知られている(テストら (Testa et al.) (2004))。従って、図 7 に示されているように、I L 3 R A および A K A P 1 3 の活性の増大、および、R h o H の発現の減少により、形質転換の細胞プロファイルが増大し得る。これにより、白血病芽細胞が、代償経路 (compensatory pathway) によって F T I の抗腫瘍形成効果に打ち勝つことができる。これに対して、I L 3 R A および A K A P 1 3 の発現が過少になると、R h o H 活性が増大し、F T I がより効率的にこのような経路を遮断できる。

【 0 1 3 2 】

最後に、A K A P 1 3 (オンコ L B C 変異体およびプロト L B C 変異体の両方) の過剰発現により、H L 6 0 A M L 細胞系の I C ₅₀ が約 2 0 倍増大することを実証した。これ

は、A K A P 1 3 の過剰発現が耐性の適切なマーカーであり、ティピファニブに耐性のある患者の有用な代替薬物標的 (alternative drug target) となり得ることを示唆している。

【0133】

全体的にみて、本発明者らの発見により、ティピファニブに応答する可能性のある患者を特定する遺伝子発現に基づく診断アッセイを開発することが可能である。この情報を用いて、適切な患者集団をより良好に直接的に治療することができる。生存を判断基準 (gold standard) として用い、遺伝子シグネチャにより、従来の臨床応答基準の使用では予測できなかった治療に対する応答のレベルを予測することができる。あるいは、これにより、F T I 治療に対する応答を予測するための遺伝子シグネチャが F T I 療法に関係のない予後値を有するかどうかの問題が持ち上がる。従って、従来の化学療法で治療した、新たに診断された A M L 患者ですでに同定された予後シグネチャを評価した (プリンガーら (Bullinger et al.) (2004))。このシグネチャは、現在の患者集団に有用性を示したが、発明者らの 3 遺伝子シグネチャでは不良な予後群と良好な予後群にさらに階層分類することができ、この 3 遺伝子シグネチャが F T I に対する応答の予測因子であることを示している。

10

【0134】

実施例 3

A M L 予後遺伝子シグネチャの分析

この 3 遺伝子シグネチャは、薬剤治療の種類に関係なく予後を予測することができる。これを確認するために、まず従来の化学療法で治療した、新たに診断された A M L 患者で最近同定された遺伝子発現シグネチャを評価した (プリンガーら (Bullinger et al.) (2004))。このシグネチャは、c D N A アレイを用いて定義し、従って、まずこれらの遺伝子をアフィメトリクス (Affymetrix) 遺伝子チップ上にあるプローブに一致させた。プリンガーら (Bullinger et al.) によって同定された 1 3 3 の予測遺伝子のうち、1 6 7 のプローブセット (1 0 3 個のユニークな遺伝子に対応する) が、アフィメトリクス (Affymetrix) U 1 3 3 A チップに一致した。発明者らの本分析で同定されたこの 3 つの遺伝子は、プリンガーら (Bullinger et al.) の 1 3 3 遺伝子リスト (配列番号は表 4 に示されている) に含まれていない。これらの 1 6 7 のプローブセットを用いて、階層クラスタリングにより 2 つの主要な患者群を定義した (図 8 A)。カプラン - マイヤー分析により、これらのクラスターを良好な予後の患者と不良な予後の患者とに明確に階層分類されることが示された (図 8 B、 $p = 0.000003$)。従って、本発明者らのデータが、プリンガーら (Bullinger et al.) (2004) によって同定された 1 3 3 遺伝子の予後シグネチャのサブセットを、患者の再発性および難治性の集団に使用することも示している。従って、このことは、予後遺伝子プロファイルが、様々なマイクロアレイプラットフォーム、および、様々な種類の A M L に対して、驚くほど強力であることを示している。

20

30

【0135】

予後遺伝子シグネチャによって定義されたクラスターはいずれも、それほど多くの応答者を有していない。しかしながら、ティピファニブの 3 遺伝子シグネチャを良好な予後群と不良な予後群に適用する場合、ティピファニブに応答した患者を両方の予後群からさらに階層分類された (図 8 C)。従って、3 遺伝子シグネチャは、予後シグネチャとは別の有用性を有し、この 3 遺伝子シグネチャは、この患者集団の F T I 治療に特異的である。

40

【0136】

実施例 4

臨床評価および応答の定義

現行の試験は、A M L における各 2 8 日サイクルの最初の 2 1 日間の開始経口投与量 6 0 0 m g (1 日 2 回) で単一薬剤としてティピファニブが投与されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の有効性および安全性について調べる非盲検多施設非比較第 2 相試験 (open label, multicenter, non-comparative phase 2 study) であった。患者は、再発性 A M L と難治性 A M L の 2 つの集団に分けた。合計で 2 5 2 人の患者 (再発性 1 3 5 人

50

、難治性 117 人)を処置した。遺伝子発現プロファイリングのために、ティピファニブに対する応答を、事後の任意の時点で中央判定または臨床状態によって、客観的応答 (C R、C R p、または、P R) (前述の通り)のある患者、安定疾患であると確認された患者、または、血液学的応答 (白血球芽細胞の 50 %を超える減少)のある患者として定義した。

【0137】

サンプルの採取およびマイクロアレイ処理

全てのサンプルを、前述の処理および分析に同意した患者から採取した。骨髓サンプルを、ティピファニブ処置の前に患者から採取し、P B Sで希釈し、フィコール - ジアトリゾエート (Ficoll-diatrizoate) (1.077 g / mL)を用いて遠心分離した。白血球を P B Sで2回洗浄し、10 % D M S Oを含む F B Sに再懸濁し、すぐに - 80 で保存した。細胞を解凍し、R N e a s y キット (カリフォルニア州バレンシア所在、キアゲン社 (Qiagen, Valencia, CA))を用いて、細胞サンプルから全 R N Aを抽出した。R N Aの質を、アジレント・バイオアナライザー (Agilent Bioanalyzer)を用いて確認した。アフィメトリクス社の (Affymetrix) (カリフォルニア州サンタクララ所在 (Santa Clara, CA))プロトコルに従って c D N Aおよび c R N Aの合成を行った。1回の増幅では複数のサンプルの R N A収量がチップハイブリダイゼーションに用いる十分な標識 c R N Aを得るのに不十分であるため2回の線形増幅を行った。

10

【0138】

ハイブリダイゼーションのために、11 μ gの c R N Aを、40 mM T r i s 酢酸、p H 8.1、100 mM 酢酸カリウム、および、30 mM 酢酸マグネシウム中で35分間、94 でインキュベートすることによりランダムに断片化した。断片化した c R N Aを、60 r p mに設定したローティッセルリー・オープン (rotisserie oven)で16時間、45 で U 1 3 3 A アレイにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、アレイを洗浄し (T r i t o n X - 1 0 0 (0.005 %))を含む 6 x S S P E および 0.5 x S S P E)、ストレプトアビジン - フィコエリトリン (S A P E : オレゴン州ユージーン所在、モレキュラー・プローブ社 (Molecular Probes, Eugene, OR))で染色した。アジレント (Agilent) G 2 5 0 0 A G e n e A r r a y スキャナー (カリフォルニア州パロアルト所在、アジレント・テクノロジー社 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA))を用いて結合した標識プローブの定量を行った。

20

30

【0139】

各アレイの合計蛍光強度を一定値 600 に対して尺度化した。チップの性能を、シグナル / ノイズ比 (平均シグナルの生値 / ノイズ)を算出することにより定量化した。シグナル / ノイズ比が5未満の場合、それらのチップはさらなる解析から除外した。チップの少なくとも 10 %に「存在している」と言える遺伝子だけをさらなる解析に含めた。このカットオフの後に約 12,000 のアフィメトリクス (Affymetrix) プローブセットが残った。遺伝子発現データの質は、主成分分析に基づいたアウトライアーの特定、および、遺伝子強度の正規分布の解析 (パルテック・プロ (Partek Pro) V5.1)により、さらに制御した。

40

【0140】

統計分析

アンスーパーバイズド階層クラスタリング、および、クラスタリングを O m n i v i z にて実施した。S - P l u s を用いて、カプラン - マイヤー分析を実施した。

【0141】

実施例 5

新たな A M L で同定された予後シグネチャは再発性および難治性の患者に有用である

近年発表された2つの論文に、新たに診断された成人 A M L 患者の遺伝子発現のプロファイリング、および、このプロファイリングの臨床転帰の予測への使用が記載されている (ブリンガーら (Bullinger et al.) (2004)およびバルクら (Valk et al.) (2004))。アフィメトリクス (Affymetrix) U 1 3 3 A 遺伝子チップを用いて再発性および難治性の A

50

M L 患者 58 人のプロファイリングを行った。プリンガーら (Bullinger et al.) によって同定された 133 の予測遺伝子のうち、167 のプローブセット (103 個のユニークな遺伝子に対応する) が U133A チップで同定された (図 9) (プリンガーら (Bullinger et al.) (2004))。この 167 のプローブセットは、配列表に示され、表 4 に示される配列番号で呼ばれる。

【0142】

これらの 167 のプローブセットを用いて、階層クラスタリングにより患者を 2 つの主要な群に分類した (図 10A)。カプラン - マイヤー分析により、これらのクラスターを良好な予後の患者と不良な予後の患者に明確に階層分類されることが示された (図 10B、 $p = 0.0000219$)。従って、本発明者らのデータが、プリンガーら (Bullinger et al.) (2004) によって同定された 133 遺伝子の予後シグネチャの 103 の遺伝子サブセットを、患者の再発性および難治性の集団に使用できることを示している (表 4)。従って、このことが、予後遺伝子プロファイルが、様々なマイクロアレイプラットフォーム、様々な種類の AML、および、様々な処理アルゴリズムに対して驚くほど強力であることを示している。

10

【0143】

【表 4 - 1】

表 4

配列番号	クラスター 1 の平均	クラスター 2 の平均	比率	良好な予後群
44	2.101613636	0.980102944	2.144278466	上昇
51	1.574545244	0.899302214	1.750852182	上昇
52	2.459568465	1.161727897	2.117163987	上昇
55	1.752902097	0.968494897	1.809923937	上昇
56	2.395730325	0.72630844	3.298502667	上昇
68	1.319861385	1.36567127	0.96645614	低下
76	1.269874887	1.430330507	0.8878192	低下
90	0.986377684	1.432950683	0.688354244	低下
91	1.177005842	1.428309412	0.824055231	低下
93	1.095239589	0.99028255	1.105986962	上昇
104	1.798024918	0.806182842	2.230294202	上昇
108	5.041411016	0.60238936	8.369024013	上昇
111	1.159807609	1.639962342	0.707216001	低下
114	1.300310388	1.324114868	0.982022345	低下
115	1.342190037	2.306688065	0.581868896	低下
116	1.320735142	1.367135334	0.966060279	低下
118	3.891659096	1.14773151	3.390739962	上昇
119	1.519690498	1.219697115	1.245957278	上昇
120	1.328167684	1.250925424	1.061748094	上昇
124	4.052024058	0.844109372	4.800354307	上昇
128	2.091653255	0.964077201	2.169591038	上昇
129	1.991638259	1.045332875	1.905267027	上昇
130	2.231280889	0.889145566	2.509466362	上昇
131	1.815199475	0.992602441	1.828727596	上昇
142	1.3198052	1.283492456	1.028292136	上昇
143	2.222738653	0.801693589	2.772553857	上昇
144	1.591280353	1.037860182	1.533231913	上昇
147	1.050088807	1.267434876	0.828515	低下
148	1.07046517	1.621321185	0.660242511	低下
150	1.768390061	0.83169323	2.126252803	上昇
153	1.253048826	1.17309932	1.068152376	上昇
157	1.24240959	1.057597528	1.174747063	上昇
158	1.039468561	1.565715718	0.663893546	低下
159	0.897290104	2.462204436	0.364425509	低下
160	2.042794407	1.039120916	1.965887103	上昇
161	2.935364557	1.109613717	2.645393178	上昇
167	0.771931017	1.585630652	0.486829021	低下
174	1.206470925	1.279664724	0.942802363	低下
200	1.099482264	1.491611294	0.737110445	低下
207	4.901329448	0.871582063	5.623485909	上昇
208	2.346190152	0.930016604	2.522740069	上昇

10

20

30

40

【表 4 - 2】

211	0.774893647	2.117870914	0.365883323	低下
212	8.626480573	0.518118436	16.64963061	上昇
220	2.002466652	2.360710711	0.84824737	低下
221	1.031573096	1.410790966	0.731201943	低下
222	1.236611762	1.579356606	0.782984512	低下
224	4.252841813	1.038446727	4.095387566	上昇
227	2.330630017	0.740455045	3.147564506	上昇
229	1.271065192	1.275443314	0.996567372	低下
230	4.079291876	0.770236845	5.296152606	上昇
231	1.613398862	1.053542946	1.531403032	上昇
234	2.462533188	0.694618451	3.54515948	上昇
235	1.736866874	1.312450625	1.323376926	上昇
236	0.973964566	1.442647881	0.675122862	低下
237	2.146894817	1.117648799	1.920902898	上昇
238	1.121767102	1.496868758	0.749409122	低下
241	1.09122088	1.120796083	0.973612325	低下
243	1.563910635	1.102945516	1.417940063	上昇
244	1.473673649	1.474149259	0.999677367	低下
245	1.148794849	1.399237842	0.821014709	低下
246	1.350310245	1.327639719	1.017075812	上昇
249	1.44906906	1.424150806	1.017496921	上昇
256	1.790625889	1.255091645	1.426689354	上昇
260	1.423005429	1.45961841	0.97491606	低下
262	1.09603256	1.181485007	0.927673693	低下
263	1.125580943	1.178287994	0.955268108	低下
264	0.891946685	1.753005455	0.508809988	低下
265	1.2942793	2.776461422	0.466161456	低下
277	1.102290438	1.391074208	0.792402326	低下
278	1.186998217	2.302906551	0.515434817	低下
281	0.79821098	1.919103099	0.415929181	低下
288	1.236023874	1.187331666	1.041009778	上昇
301	1.087313678	1.212772631	0.896551959	低下
303	1.820970134	1.219911387	1.492706891	上昇
306	0.893432913	1.529980396	0.583950563	低下
310	1.076214323	1.702252048	0.632229713	低下
314	1.407137316	1.229815501	1.144185705	上昇
315	2.943883289	0.906317573	3.248180746	上昇
316	1.666394606	0.87032571	1.914679281	上昇
340	1.499937462	0.921725287	1.627315083	上昇
346	1.035229803	1.508152041	0.686422705	低下
347	1.317050838	1.350558887	0.975189495	低下
348	1.481608791	1.161107338	1.276030856	上昇

10

20

30

40

【表 4 - 3】

351	1. 177285398	1. 293627618	0. 910065139	低下
352	1. 328716012	1. 354505535	0. 980960194	低下
353	1. 245636653	1. 388354047	0. 897203891	低下
354	1. 057630522	1. 407147783	0. 751612968	低下
355	1. 394737541	1. 22633541	1. 137321429	上昇
356	1. 194410314	1. 007530697	1. 185482803	上昇
359	1. 653993358	1. 201194991	1. 37695659	上昇
361	1. 318561503	1. 233384342	1. 069059707	上昇
364	1. 045812959	1. 463795973	0. 714452682	低下
365	1. 721871636	1. 213128563	1. 419364517	上昇
366	1. 437978693	1. 211203408	1. 18723138	上昇
369	1. 480402866	1. 289306967	1. 148215983	上昇
373	1. 750186104	1. 199777316	1. 458759122	上昇
379	1. 987020453	2. 331667877	0. 852188458	低下
383	1. 419274906	1. 587359923	0. 894110331	低下
385	1. 412275401	1. 410313065	1. 001391419	上昇
387	1. 339345508	1. 331753924	1. 005700441	上昇
395	1. 747595879	1. 473302004	1. 186176272	上昇
401	1. 237925661	1. 240617377	0. 997830341	低下
404	1. 176676928	1. 14697739	1. 025893743	上昇
407	1. 256304659	1. 357899094	0. 925182633	低下
415	2. 013680769	0. 801461983	2. 512509405	上昇
418	1. 405740421	1. 158990553	1. 212900673	上昇
423	1. 346444485	1. 136343796	1. 184891835	上昇
426	9. 592759013	1. 560596128	6. 146855576	上昇
430	1. 768393033	1. 23257422	1. 434715252	上昇
437	1. 40453464	1. 860231401	0. 755032218	低下
438	1. 673447728	3. 930927905	0. 425713157	低下
445	1. 283792446	1. 501667999	0. 85491097	低下
446	1. 214492279	1. 091382628	1. 11280155	上昇
448	1. 561740275	1. 228333636	1. 271430033	上昇
450	1. 734251715	1. 844252606	0. 940354759	低下
452	1. 408580649	1. 582858413	0. 889896807	低下
453	1. 1383915	1. 741970797	0. 653507798	低下
454	1. 079716972	1. 450127515	0. 744566917	低下
457	1. 783529874	1. 314108612	1. 357216487	上昇
460	1. 136773942	1. 003606776	1. 132688588	上昇
462	1. 220645614	1. 113413039	1. 096309789	上昇
466	1. 183017496	1. 211183566	0. 976745003	低下
467	1. 113306085	1. 067417158	1. 042990621	上昇
469	1. 211346488	1. 1871952	1. 020343148	上昇
484	0. 998901987	1. 654269584	0. 60383265	低下

10

20

30

40

【表 4 - 4】

485	1.133736575	1.914231031	0.592267368	低下
489	1.412382921	1.384849519	1.019881873	上昇
493	3.988440713	0.965026485	4.132985753	上昇
495	1.187128423	1.462785203	0.81155348	低下
498	3.691405839	0.765303503	4.823453473	上昇
499	2.216130138	0.848821568	2.610831558	上昇
507	2.199861346	0.773086467	2.845556663	上昇
520	1.67633492	1.194585675	1.403277265	上昇
524	7.743976211	0.841225224	9.205592025	上昇
529	2.591731743	1.08342825	2.392158173	上昇
530	1.273363236	1.097292728	1.160459013	上昇
535	1.095879149	1.302490014	0.8413724	低下
546	0.987046127	2.124625445	0.464574181	低下
550	2.103990301	0.929475745	2.263631205	上昇
555	1.439273076	1.211738853	1.187774967	上昇
557	1.121983318	1.251788385	0.896304305	低下
559	1.197910138	1.34693432	0.889360468	低下
560	1.144102989	1.261720239	0.906780246	低下
565	1.078544278	1.162115183	0.928087244	低下
568	1.46401688	0.960152377	1.524775561	上昇
569	1.262437604	1.105379077	1.142085669	上昇
585	1.349621283	1.10729713	1.218842935	上昇
590	1.203037349	1.068047506	1.126389361	上昇
609	1.395352279	1.172354292	1.190213819	上昇
624	1.131210862	1.399636303	0.80821772	低下
630	0.859929427	1.37477642	0.625504929	低下
637	0.72293765	2.343345902	0.308506588	低下
641	1.340847351	1.601484153	0.837252962	低下
656	1.259818484	1.213892186	1.03783918	上昇
658	0.60640428	2.092078796	0.289857285	低下
659	1.099549227	1.166865002	0.942310572	低下
665	1.615399946	1.733324276	0.931966378	低下
684	0.734401434	2.496195783	0.294208267	低下
685	2.158835355	0.765517273	2.82010012	上昇
686	0.957971846	1.386779118	0.690789061	低下
687	0.982131268	1.162818279	0.844612856	低下
690	2.421692274	0.791473723	3.059725425	上昇
691	1.268020946	0.973474927	1.302571757	上昇
692	1.054213523	1.147045848	0.91906834	低下
693	1.251020003	1.271391137	0.983977288	低下
694	1.122443987	1.153661375	0.972940597	低下
696	1.301034813	1.029185966	1.264139675	上昇

10

20

30

40

予後シグネチャは、ティピファニブに対する応答を予測する3遺伝子シグネチャとは無関係である。

【0144】

本発明者らは、再発性および難治性のAML患者でのティピファニブに対する応答を予測する3遺伝子シグネチャ(AHR、AKAP13、MINA53)を同定した。これらの遺伝子は、良好な予後転帰群と不良な予後転帰群とに患者を階層分類できる(図11B

50

、 $p = 0.002$ ）。この遺伝子シグネチャがFTI治療に対する応答を予測するのか、あるいは、単に概ね良好な予後の患者を特定するに過ぎないのかという問題が持ち上がっている。この3遺伝子シグネチャを良好な予後群および不良な予後群に適用した場合、応答者は、この予後群からさらに階層分類された（図11C、 $p = 0.000003$ ）。両方の遺伝子シグネチャを適用した後、ティピファニブに応答せず、かつ、治療の種類に関係なく予後が不良な患者群の明確な階層分類が生じた（図11D、 $p = 0.0000005$ ）。従って、3遺伝子シグネチャは、この患者集団でのFTI治療に特異的で、すでに同定された予後シグネチャに無関係であるものと思われる。結果として、患者の治療のより良い管理のために、予後シグネチャを薬剤特異的シグネチャ（ティピファニブ予測プロフィールなど）と併用可能であることが示唆される。

10

【0145】

実施例6

応答者と非応答者（安定疾患の患者は含まない）との間で示差的に発現する遺伝子の同定
4人の患者が安定疾患であると分類されたが、これらの患者は応答者または非応答者に明確に区別できないため、分析から除外した。安定疾患の患者を分析に含めると、薬剤治療に無関係の予後に関連した遺伝子選択の分析が偏る場合がある。従って、10人の応答者を44人の非応答者と比較することにした。選択される遺伝子は、40%の特異性を有し、最小平均変化倍率が2.0倍である必要があった。このような基準は、可能な最高レベルの感度でティピファニブに対する応答を予測できる遺伝子を選択するために選択した。11,723の遺伝子から、応答者と非応答者とを階層分類でき（表5）、かつt検定で有意なP値（ $P < 0.05$ ）が得られた、合計8個の遺伝子を選択した。これらの遺伝子の中には、シグナル伝達、アポトーシス、細胞増殖、発癌、および、場合によってはFTI生物学に関与するものが含まれた。AKAP13は最も強力なマーカーである。

20

【0146】

次に、8つの選択された遺伝子から最適な診断精度が得られる最小の遺伝子のセットを同定することを目的とした。分類子は、ROC解析(receiver operator characteristic analysis)で得たAUC値に基づき、遺伝子の数を増加させて作成し、予測応答感度を100%に維持したまま、これらの分類子の誤り率をLOOCVを用いて算出した（図12a）。AKAP13遺伝子は、40%未満の最低の誤り率で応答を予測することができる（図12a）。3つ以上の遺伝子を選択子に用いた場合、誤り率は50%以上に増大した。AKAP13の場合、LOOCVにより、NPVが93%、PPVが31%、全診断精度が63%、かつ、陽性尤度比が2.0であることが示された（図12b）。各患者におけるAKAP13の発現値は、図12cに示されている。従って、AKAP13の発現率が低い患者群の場合、ティピファニブに対する応答率は、現在の患者集団の18%（10/54）に対して31%（8/26）であった。AKAP13遺伝子を用い、カプラン-マイヤー分析により、予測された応答者群と非応答者群との間で生存に有意差が示された（図12D）。

30

【0147】

【表 5】

表5 ティピファニブに対する応答を予測する上位8遺伝子の一覧

配列番号	遺伝子記号	AUC	変化倍率	P値	機能の説明
309	AKAP13	0.830	0.491	0.00007	細胞内シグナル伝達、発癌
151	AHR	0.807	0.446	0.00019	シグナル伝達、アポトーシス
222	SCAP2	0.777	0.431	0.00007	シグナル伝達
496	NPTX2	0.738	0.115	0.02934	細胞接着
451	BAT1	0.725	0.458	0.00097	細胞内生合成
272	IL3RA	0.705	0.375	0.00226	受容体シグナル伝達
411	IDS	0.645	0.395	0.00069	代謝
280	P2RY14	0.627	0.369	0.00145	シグナル伝達

10

AUC=ROC解析の曲線下面積

これは全診断精度を示す。

【0148】

実施例7

新たに診断された急性骨髄性白血病患者でのティピファニブ（ザルネストラ（ZARNESTRA）（登録商標）、R115777）応答を予測する遺伝子発現プロファイル

ティピファニブ（ザルネストラ（ZARNESTRA）（登録商標）、R115777）は、造血系疾患を有する患者での臨床応答が実証されている。タンパク質のファルネシル化の阻害は、主要な作用機序（MOA）であるが、ファルネシル阻害のレベルは、信頼性のある薬物動態マーカーではなく、どの遺伝子マーカーが応答を予測するのに使用可能かも明らかでない。この予測により設計された試験を行い、急性骨髄性白血病（AML）患者でのティピファニブに対する応答の予測因子の代わりとなり得る可能性のある遺伝子マーカーおよび発現シグネチャを同定した。新たに診断された低リスクのAML患者で、骨髄サンプルを採取し、ティピファニブに関するシングルアーム第2相臨床試験からの遺伝子発現プロファイルを解析した（ランセットら（Lancet et al.）（2004））。ティピファニブ処置前（ $n = 25$ ）、処置中（ $n = 30$ ）、および処置後（ $n = 24$ ）の、合計79サンプルのプロファイリングを行った。

20

【0149】

骨髄サンプルは、アフィメトリクス（Affymetrix）U133A GeneChip（登録商標）アレイを用いて分析した。全遺伝子発現シグネチャにより、ティピファニブ処置の結果としての遺伝子発現変化が、処置の終了後120日までの間維持されていたことが明らかになった。処置前サンプル対処置後サンプルにより、ファルネシル化に関連するいくつかの遺伝子（例えば、K-ras、FNTA）を含む、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害後の遺伝子発現に有意な変化を有する（False Discovery Rate（FDR） < 0.005 ）およそ500の遺伝子が同定された。これら変調された遺伝子の多くは、タンパク質の生合成、DNA複製、細胞内シグナル伝達、および、細胞周期経路に有意に関与するもの、従って、細胞増殖の阻害を反映するものであることが確認された。また、27遺伝子のサブセット（シグナル伝達および細胞周期に関連する遺伝子を含む）は、応答者と非応答者との間で示差的に変調されることも確認された（ $P < 0.01$ ）。再発性および難治性AMLでの第2層臨床試験からこれまでに同定されている遺伝子発現シグネチャも、それらの応答予測能を調べるために処置前サンプルで試験した（ラポーニら（Raponi et al.）（2004））。6つの遺伝子の組合せは、この独立したサンプルセットにおいて有意な予測精度を有していることが分かった（ $P = 0.05$ ）。これらの試験から同定された遺伝子は、ティピファニブ活性のバイオマーカーの代わりとして使用することができる。

30

40

【0150】

患者サンプル

第2相試験では、新たにAMLと診断された患者にザルネストラ（ZARNESTRA）（登録

50

商標) 600 mg (bid 21d Q4wks) を投与した。ザルネストラ (ZARNESTRA) (登録商標) 処置前、処置中、および、処置後に骨髓サンプルを採取した。単核細胞をフィコール - ハイパック密度勾配遠心分離 (Ficoll-Hypaque density centrifugation) により単離し、生きた状態で冷凍した。

【0151】

マイクロアレイ分析

メッセージRNAを患者の芽細胞から増幅し、約22,000遺伝子をプロービングできるアフィメトリクス (Affymetrix) U133Aチップとハイブリダイズさせた (図13)。チップデータにプレフィルタリングを行って質の悪いデータおよび患者サンプルの少なくとも10%でしか発現しなかった遺伝子を排除した。さらに、このデータセットで変化しなかった遺伝子も排除した (CV < 40%)。約8000の遺伝子がさらなる分析のために残った。合計79のチップが品質対照尺度をパスし、関連の臨床応答データも有していた。

10

【0152】

統計分析

分散分析 (ANOVA) およびt検定を用い、薬剤処置の効果と時間および各遺伝子の相互作用を調べた。false discovery rate (FDR) アルゴリズムを適用することにより、多重仮説検定を制御した。統計分析は全て、S-Plus 6.1 (インサイトフル社 (Insightful Corporation)) にて実施した。主成分分析は、バルテック・プロ (Partek Pro) にて実施した。階層クラスタリングは、相関メトリックと完全連関 (オムニビズ・プロ (OmniViz Pro) (商標)、マサチューセッツ州メイナード所在、オムニビズ社 (OmniViz, Maynard, MA)) を用いて実施した。経路分析は、ジーン・オントロジー (Gene Ontology) 機能分類を用いて行った。表6は、この分析の結果を示している。

20

【0153】

【表 6】

表 6 ティピファニブにより有意に変調される機能的な遺伝子クラス

G0 番号	G0 クラス	P 値
6886	細胞内タンパク質輸送	5.75E-05
6951	熱ショック応答	8.32E-05
6913	核細胞質輸送	1.18E-04
6207	新規ピリミジン塩基合成	1.58E-04
6809	一酸化窒素合成	1.58E-04
6376	mRNA スプライス部位選択	2.05E-04
245	スプライセオソームアセンブリ	2.05E-04
6259	DNA 代謝	4.86E-04
6371	mRNA スプライシング	4.86E-04
6607	NLS 担体核輸入 (NLS-bearing substrate-nucleus import)	5.64E-04
15031	タンパク質輸送	6.05E-04
6338	クロマチンリモデリング	9.87E-04
6397	mRNA プロセッシング	0.003201
7050	細胞周期の停止	0.003685
8380	RNA スプライシング	0.003992
6512	ユビキチンサイクル	0.004639
6396	RNA プロセッシング	0.005096
398	スプライセオソームによる核 mRNA スプライシング	0.007120
6916	抗アポトーシス	0.007395
6118	電子輸送	0.010004
7049	細胞周期	0.019631
6457	タンパク質フォールディング	0.021817
7264	低分子量 GTPase 媒介シグナル伝達	0.025281
8285	細胞増殖の負の調節	0.026482
6366	PoII プロモーターからの転写	0.048613

10

20

30

【0154】

約 8000 の遺伝子を、グローバル・アンスーパーバイズド・クラスタリング (global unsupervised clustering) に用いた。処置前サンプルは、処置中および処置後サンプルから離れてクラスタリングされた。処置後サンプルは、処置の終了後 120 日までの患者からのサンプルを含んだ。図 14 は、AML サンプルがティピファニブ処置の終了後、FTI により媒介される全遺伝子発現変化を維持することを示している。

【0155】

502 の遺伝子が、ティピファニブ処置後に示差的に発現することがわかった ($p < 0.005$)。これらの遺伝子は表 7A ~ 7C に挙げられ、表 9 に詳細に示されている。

40

【0156】

【表 7 - 1】

表 7 A

配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid
4	200002	47	201104	97	202029	165	203133	215	204158
5	200008	48	201118	98	202077	166	203138	216	204168
6	200010	49	201134	99	202078	168	203140	217	204170
7	200013	50	201163	100	202090	169	203142	219	204294
8	200017	53	201227	101	202110	170	203211	220	204351
9	200018	54	201244	102	202114	171	203213	223	204411
10	200025	57	201273	103	202141	172	203255	225	204528
11	200026	58	201277	105	202163	173	203262	226	204640
12	200041	59	201300	106	202187	175	203316	228	204652
14	200056	60	201305	107	202197	176	203332	232	204766
15	200061	61	201317	109	202231	177	203362	233	204767
16	200073	62	201324	110	202233	178	203371	239	204905
17	200086	63	201352	112	202275	179	203385	240	204923
18	200087	64	201381	113	202279	180	203396	247	205033
19	200091	65	201393	117	202298	181	203437	248	205087
20	200634	66	201403	121	202324	182	203460	250	205133
21	200640	67	201429	122	202325	183	203484	251	205176
22	200643	69	201455	123	202349	184	203514	252	205213
24	200718	70	201472	125	202423	185	203528	253	205270
25	200772	71	201483	126	202432	186	203531	254	205323
26	200780	72	201568	127	202442	187	203581	255	205335
27	200801	73	201588	132	202503	188	203610	257	205339
28	200834	74	201597	133	202544	189	203613	258	205361
29	200846	75	201620	135	202582	190	203621	259	205403
30	200853	77	201635	136	202591	191	203666	261	205467
31	200857	78	201665	137	202622	192	203667	266	205644
32	200858	79	201675	138	202642	193	203674	267	205671
33	200902	80	201699	139	202649	194	203743	268	205807
34	200925	81	201715	140	202673	195	203748	269	205849
35	200934	82	201716	141	202692	196	203761	270	205967
36	200949	83	201738	145	202735	197	203827	271	206066
37	200964	84	201754	146	202754	199	203882	273	206150
38	200971	86	201805	149	202761	201	203893	274	206177
39	200981	87	201812	152	202824	202	203922	275	206219
40	200991	88	201818	154	202841	203	203936	276	206245
41	200999	89	201890	155	202848	205	203960	279	206618
42	201019	92	201921	156	202854	206	203965	282	206723
43	201027	94	201938	162	202975	210	204067	283	206790
45	201049	95	201987	163	203044	213	204145	284	206868
46	201094	96	202001	164	203053	214	204146	285	206874

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表 7 B

配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid
286	206958	335	208919	398	210235	461	212571	518	214264
287	207072	337	208956	399	210283	463	212578	519	214288
289	207127	338	208966	400	210284	464	212583	522	214352
290	207163	339	208975	402	210448	465	212630	523	214377
291	207165	341	208981	403	210453	468	212757	525	214494
292	207266	342	209022	405	210563	470	212833	526	214499
293	207287	343	209063	406	210598	471	212860	527	214617
294	207335	344	209066	408	210633	472	212878	528	214661
295	207540	345	209089	409	210639	473	212907	531	214800
296	207551	349	209138	410	210649	474	212927	532	214820
297	207568	350	209172	412	210785	475	212964	534	215038
298	207571	357	209257	413	210786	477	213028	536	215096
299	207573	358	209258	414	210840	478	213047	537	215121
300	207777	360	209282	416	210859	479	213061	538	215127
302	207845	362	209295	417	210982	480	213062	539	215136
304	207974	363	209303	420	211430	481	213074	540	215147
305	208091	367	209362	421	211445	482	213129	541	215171
307	208270	368	209369	422	211487	486	213159	542	215227
308	208310	370	209377	424	211645	490	213253	543	215379
311	208420	371	209385	425	211730	491	213287	544	215380
312	208549	372	209411	427	211747	492	213311	545	215399
313	208598	374	209471	429	211858	494	213414	547	215493
317	208629	375	209492	431	211921	497	213502	548	215691
318	208633	377	209507	432	211932	500	213567	552	216207
319	208643	378	209520	433	211938	501	213599	553	216348
320	208656	380	209585	434	211976	502	213687	554	216384
321	208667	381	209628	435	211985	503	213700	556	216833
322	208672	382	209662	436	212007	504	213727	558	216977
323	208679	383	209679	439	212027	505	213754	561	217022
324	208695	384	209687	440	212181	506	213811	562	217106
325	208745	386	209734	441	212201	508	213867	563	217122
326	208746	388	209827	442	212248	509	213911	564	217249
327	208754	389	209838	443	212269	510	213941	566	217329
328	208808	390	209868	444	212277	511	214003	567	217336
329	208819	391	209907	447	212287	512	214051	570	217491
330	208831	392	210093	449	212311	513	214097	571	217749
331	208894	393	210097	455	212426	514	214124	572	217750
332	208900	394	210137	456	212451	515	214129	573	217754
333	208904	396	210180	458	212549	516	214143	574	217769
334	208905	397	210233	459	212561	517	214224	575	217773

10

20

30

【表 7 - 3】

表 7 C

配列 番号	psid	配列 番号	psid	配列 番号	psid
576	217801	621	218643	671	221509
577	217812	622	218660	672	221528
578	217825	623	218671	673	221577
579	217833	625	218830	674	221593
580	217838	626	218873	675	221599
581	217843	627	218936	676	221620
583	217860	628	218937	677	221669
584	217866	629	218946	688	222203
586	217877	631	219030	689	222280
587	218003	633	219056	695	37201
588	218039	634	219105	700	55692
589	218058	635	219110	701	59644
591	218103	636	219163	702	AFFX-HSAC07/X00351_3
592	218116	638	219286	703	AFFX-HSAC07/X00351_M
593	218117	639	219293	704	AFFX-HUMISGF3A/M97935_MB
594	218175	640	219347	705	AFFX-r2-Ec-bioB-3
595	218188	642	219506		
596	218213	643	219507		
597	218241	644	219546		
598	218256	645	219759		
599	218259	646	219765		
600	218274	647	219816		
601	218276	648	219819		
602	218280	649	219906		
603	218283	650	220001		
604	218288	651	220023		
605	218334	652	220052		
606	218339	653	220060		
607	218350	654	220155		
608	218367	655	2201 9		
610	218373	657	220404		
611	218395	661	220741		
612	218397	662	220755		
613	218447	663	220864		
614	218467	664	220942		
615	218482	666	221143		
616	218543	667	221253		
617	218563	668	221432		
618	218576	669	221434		
620	218605	670	221505		

10

20

30

40

【 0 1 5 7 】

AKT1、CENPF、KRAS、RAF1、STAT、および、ファルネシルトランスフェラーゼをはじめとするFTI生物学に関与する多くの遺伝子がこのリストに含まれていた。複数の遺伝子機能カテゴリーが、この遺伝子リストに有意に多いことが分かった（表 8）。

【 0 1 5 8 】

50

【表 8】

表 8 ティピファニブ処置後に応答者と非応答者との間で示差的に発現する遺伝子

配列番号	プローブセット ID	遺伝子機能 (GO)	RE プレ対 RE ポスト	PD プレ対 PD ポスト
13	200044	RNA スプライシング	上昇	差無し
23	200661	タンパク質	上昇	差無し
85	201804	タンパク質フォールディング	上昇	差無し
123	202349	タンパク質フォールディング	上昇	差無し
137	202622	核	上昇	差無し
149	202761	細胞骨格	上昇	差無し
198	203845	転写	低下	差無し
210	204067	電子輸送	上昇	差無し
218	204215	膜	低下	差無し
257	205339	細胞増殖	低下	差無し
266	205644	RNA スプライシング	低下	差無し
268	205807	骨の石灰化	低下	差無し
290	207163	シグナル伝達	上昇	差無し
329	208819	シグナル伝達	上昇	差無し
336	208927	RNA	上昇	差無し
362	209295	シグナル伝達	低下	差無し
428	211762	細胞周期	低下	差無し
470	212833	輸送	低下	低下 (PD で高い)
521	214298	細胞周期	上昇	上昇 (PC で高い)
549	215764	輸送	上昇	上昇 (PD で高い)
551	215905	RNA スプライシング	上昇	差無し
598	218256	輸送	低下	差無し
610	218373	アポトーシス	上昇	差無し
619	218603	細胞周期	低下	差無し
660	220671	転写	差無し	低下
698	44696	シグナル伝達	差無し	上昇
699	49485	転写	上昇	差無し

10

20

30

【0159】

本発明者らはこれまでに、再発性および難治性 AML でティピファニブ耐性の予測となった 8 つの遺伝子を確認している。このデータセットのうち最も予測性の高かった遺伝子は、AKAP-13 ($AUC = 0.83$) であった。

【0160】

これらの遺伝子の予測値を、新たに診断された AML サンプル (CTEP20) の現行セットで試験した。完全応答または進行性疾患の患者由来のサンプルを用いた。結果を図 15 に示す。

40

【0161】

予測分類子を、トレーニングセットで誤り率 50% 未満であったことから上位 6 遺伝子で構成した。この 6 遺伝子の分類子を表 9 に示し、新たに診断された AML の階層分類能を図 16 に示している。

【0162】

【表 9】

表 9

配列番号	psid	遺伝子記号	INT17AUC	GTEP20AUC
309	208325	AKAP13	0.830	0.464
151	202820	AHR	0.807	0.750
222	204362	SCAP2	0.777	0.893
496	213479	NPTX2	0.738	0.766
451	212384	BAT1	0.725	0.288
272	206148	IL3RA	0.705	0.714
411	210666	IDS	0.645	0.446
280	206637	P2RY14	0.627	0.589

10

【0163】

結果

- ・使用可能であったのは臨床骨髄サンプルの27%であり、サンプル採取の最適化が必要であることが示された。
- ・AML細胞の全遺伝子発現シグネチャは、FTI処置の結果、処置の終了後に安定な遺伝子発現変化がもたらされることを示した。
- ・約500の遺伝子($p < 0.005$)がティピファニブにより影響を受けたが、このことはFTIが標的とする複数の経路を示差している。これらにはこれまでにFTI生物学と関連づけられている多くの経路が含まれた。
- ・ティピファニブ処置後に応答者と非応答者との間で27の遺伝子の示差的発現が見られた(表8)。これらはPDマーカーの候補となる。
- ・再発性および難治性AMLで同定された6遺伝子の分類子は、新たに診断されたAMLで予測価値を有することが分かった。

20

【0164】

実施例 8

抗体(予言的)

ポリクローナル抗体の作製のために、LBCオンコジーン由来ペプチドを合成し、キーホールリンペットヘモシニアン(keyhole limpet hemocyanin)に結合し、これを用いてウサギを免疫化した。この血清が対応するペプチドに対して反応するかどうかをELISAで試験し、陽性のバッチをアフィニティー精製した。精製した抗体は、組織切片中にエピトープを有するペプチドを特異的に検出する。これは、対応するペプチドが抗体と同時に添加された場合にシグナルが完全に消滅することで確認できる。IHCで十分機能するこのポリクローナル抗体の他、本来の折りたたみ状態(in its natural fold)のタンパク質が生産されたことを検出できるモノクローナル抗体も作製する。モノクローナル抗体を作製するために、本来の折りたたみおよび翻訳後修飾を確保されるように哺乳動物細胞で産生された抗原を精製したものを得た。この抗原、すなわちLBCオンコタンパク質-IgG定常部分融合タンパク質(LBC onco protein-IgG constant part fusion protein)をマウス骨髄腫細胞で発現させ、Fc部分をおとり(bait)として用い、このタンパク質を精製した。精製された抗原はウエスタンブロットにて、C末端ポリクローナル抗体により認識される。この抗原を用いて、IgG定常部分の代わりにLBCペプチドに対して反応する抗体を産生する陽性クローンから選択することにより、LBCペプチドに対するマウスモノクローナル抗体を得た。LBCオンコジーンの臨床同定のためのキットを、これらの抗体または類似の抗体を用いて容易に作製することができる。このようなキットは、LBCペプチド(従ってLBCオンコジーン)同定用の抗体、適切な標識試薬(例えば、酵素およびラベルなど)、ならびに、このようなキットの臨床適用に有用な、希釈用バッファー、安定剤、および、このようなアッセイに典型的に用いられる他の材料などの他の試薬(任意選択による)を含むことができる。

30

40

【0165】

50

実施例 9

免疫組織化学（予言的）

LBC オンコジンの C 末端ペプチドに対する、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体を、IHC の検出および LBC オンコジンの局在化に用いた。ホルマリン固定してパラフィン包埋した正常組織および腫瘍組織から得た 4 μ m の切片を、3 - アミノプロピル - トリエトキシ - シラン (3-aminopropyl-triethoxy-silane) (APES、ミズーリ州セントルイス所在、シグマ社 (Sigma, St. Louis, MO)) がコーティングされたスライドガラスに載せた。これらの切片を、段階的濃度のエタノールで脱パラフィンおよび再水和し、室温で 30 分間、メタノールペルオキシド (methanolic peroxide) (無水メタノール中 0.5% 過酸化水素) で処理して、内因性のペルオキシダーゼ活性を遮断した。抗原の回収は、電子レンジで 5 分間 (650 W)、2 回行った。Elite ABC キット (Vectastain、カリフォルニア州バーリングゲーム所在、ベクター・ラボラトリーズ社 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)) を用いて、免疫ペルオキシダーゼ染色を行った。LBC ペプチド抗体は、1:2000 の最適希釈で使用する。ビオチン標識二次抗体およびペルオキシダーゼ標識アビジン - ビオチン複合体の両方を、これらの切片上で 30 分間インキュベートする。PBS (pH 7.2) で希釈液を作製し、全てのインキュベーションを室温の湿室で行う。各染色ステップ間には、スライドガラスを PBS で 3 回洗浄する。ペルオキシダーゼ染色は、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (3-amino-ethylcarbazo le) (シグマ社 (Sigma)) 溶液 (0.03% 過酸化水素を含有する 0.05 M 酢酸バッファー中 0.2 mg/mL、pH 5.0) を用いて室温で 15 分間、可視化する。最後に、これらの切片を、マイヤーヘマトキシリン (Mayer's hematoxylin) で軽く対比染色し、水溶性封入剤 (アクアマウント (Aquamount)、BDH 社) で封入する。対照実験では、一次抗体を正常なウサギの血清の IgG 断片に置き換えるか、または、一次抗体に LBC ペプチドを予め吸着させる。このような染色は、細胞のサブセットに LBC オンコジンが存在することを示す。

【0166】

以上、本発明を明瞭に理解できるように例証および実施例を示して用いて詳細に説明したが、このような説明および実施例は、本発明の範囲を限定するものではない。

【0167】

10

20

【表 10 - 1】

表 10 各配列の説明

配列番号	psid	説明	名称	受託番号
1		A K A P 1 3 フォワードプライマー		NM_007209
2		A K A P 1 3 リバースプライマー		NM_001494
3		A K A P 1 3 プローブ		NM_000975
4	200002	リボゾームタンパク質 L 3 5	RPL35	NM_007209
5	200008	G D P 解離阻害剤 2		NM_001494
6	200010	リボゾームタンパク質 L 1 1		NM_000975
7	200013	リボゾームタンパク質 L 2 4	RPL24	NM_000986
8	200017	リボゾームタンパク質 S 2 7 a	RPS27A	NM_002954
9	200018	リボゾームタンパク質 S 1 3	RPS13	NM_001017
10	200025	リボゾームタンパク質 L 2 7	RPL27	NM_000988
11	200026	リボゾームタンパク質 L 3 4	RPL34	NM_000995
12	200041	H L A - B 関連転写物 - 1	D6S81E	NM_004640
13	200044	スプライシング因子、アルギニンセリン - リッチ 9 (arginineserine-rich 9)	SFRS9	NM_003769
14	200056	インテグリン α - 7 に極めて類似	FLJ12486	AK022548
15	200061	リボゾームタンパク質 S 2 4 に類似		BC000523
16	200073	h n R N P - C 様タンパク質		M94630
17	200086	チトクロム c オキシダーゼサブユニット I V		AA854966
18	200087	F L J 2 1 3 2 3	FLJ21323	AK024976
19	200091	リボゾームタンパク質 S 2 5		AA888388
20	200634	プロフィリン 1	PFN1	NM_005022
21	200640	チロシン 3 - モノオキシゲナーゼトリプトファン 5 - モノ オキシゲナーゼ活性化タンパク質、 ϵ ポリペプチド	YWHAZ	NM_003406
22	200643	高密度リポタンパク質結合タンパク質	HDLBP	NM_005336
23	200661	β - ガラクトシダーゼに対する保護タンパク質	PPGB	NM_000308
24	200718	転写伸張因子 B (S I I I)、ポリペプチド 1 様 (polypep 1-like)		NM_003197
25	200772	プロチモシン、 α (遺伝子配列 2 8)		NM_002823
26	200780	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質)、 α 刺激活性ポリペプチド 1	GNAS1	NM_000516
27	200801	アクチン β	ACTB	NM_001101
28	200834	リボゾームタンパク質 S 2 1	RPS21	NM_001024
29	200846	タンパク質ホスファターゼ 1、触媒サブユニット、 α イソ型	PPP1CA	NM_002708
30	200853	H 2 A ヒストンファミリー、メンバー Z	H2AFZ	NM_002106
31	200857	核受容体コリプレッサー 1	NCOR1	NM_006311
32	200858	リボゾームタンパク質 S 8	RPS8	NM_001012
33	200902	1 5 k D α セレノタンパク質	SEP15	NM_004261
34	200925	チトクロム c オキシダーゼサブユニット V I α ポリペプチド 1	COX6A1	NM_004373
35	200934	D E K オンコジーン (DNA 結合)	DEK	NM_003472
36	200949	リボゾームタンパク質 S 2 0	RPS20	NM_001023
37	200964	ユビキチン活性化酵素 E 1	UBE1	NM_003334
38	200971	ストレス関連小胞体タンパク質 1	SERP1	NM_014445
39	200981	神経内分泌分泌性タンパク質 5 5	NESP55	NM_016592
40	200991	K I A A O O 6 4 遺伝子産物	K1AA0064	NM_014748
41	200999	膜貫通型タンパク質 (6 3 k D)、小胞体ゴルジ中間区画	P63	NM_006825
42	201019	真核生物翻訳開始因子 1 A	EIF1A	NM_001412
43	201027	K I A A O 7 4 1 遺伝子産物	IF2	NM_015904
44	201042	トランスグルタミナーゼ 2		AL031651
45	201049	リボゾームタンパク質 S 1 8	RPS18	NM_022551
46	201094	リボゾームタンパク質 S 2 9	RPS29	NM_001032
47	201104	D J 3 2 8 E 1 9、C 1、1		NM_015383
48	201118	ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼ	PGD	NM_002631
49	201134	チトクロム c オキシダーゼサブユニット V I I c	COX7C	NM_001867
50	201163	インスリン様成長因子結合タンパク質 7	IGFBP7	NM_001553
51	201195	L 型アミノ酸輸送体 1		NM_003486
52	201212	プロテアーゼ、システイン 1	legumain	NM_005606

【表 10 - 2】

53	201227	NADHデヒドロゲナーゼ1 β サブコンプレックス8	NDUFB8	NM_005004
54	201244	v-r a f -1マウス白血病ウイルスオンコジーンホモログ1 (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene hom 1)	RAF1	NM_002880
55	201249	溶質担体ファミリー2メンバー1	SLC2A1	NM_006516
56	201250	溶質担体ファミリー2メンバー1	SLC2A1	NM_006516
57	201273	シグナル認識粒子9 k D	SRP9	NM_003133
58	201277	異種核リボヌクレオタンパク質A B	HNRPAB	NM_004499
59	201300	プリオンタンパク質 (p 27-30)	PRNP	NM_000311
60	201305	ロイシンに富む酸性タンパク質		NM_006401
61	201317	プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット α タイプ 2 (proteasome (prosome, macropain) sub α type 2)	PSMA2	NM_002787
62	201324	上皮膜タンパク質1	EMP1	NM_001423
63	201352	YME1 (S. セレビシエ (S. cerevisiae) 様1	YME1L1	NM_014263
64	201381	カルシクリン (calcyclin) 結合タンパク質		NM_014412
65	201393	インスリン様成長因子2受容体	IGF2R	NM_000876
66	201403	ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ3	MGST3	NM_004528
67	201429	リボゾームタンパク質L 37 a	RPL37A	NM_000998
68	201445	カルポニン (calponin) 3、酸性	CNN3	NM_001839
69	201455	プロミシン (puromycin) 感受性アミノペプチダーゼ		NM_006310
70	201472	フォン・ヒッペル・リンドー (von Hippel-Lindau) 結合タンパク 質1	VBP1	NM_003372
71	201483	Ty (S. セレビシエ) 4ホモログ1のサブプレッサー		NM_003168
72	201568	低分子量ユビキノン結合タンパク質	QP-C	NM_014402
73	201588	チオレドキシン (thioredoxin) 様、32 k D	TXNL	NM_004786
74	201597	チトクロムcオキシダーゼサブユニットVIIaポリペプチド2	COX7A2	NM_001865
75	201620	膜結合転写因子プロテアーゼ、部位1	MBTPS1	NM_003791
76	201621	神経芽腫、腫瘍形成性1のサブプレッション	NBL1	NM_005380
77	201635	脆弱X精神遅滞、常染色体ホモログ1		U25165
78	201665	リボゾームタンパク質S17	RPS17	NM_001021
79	201675	Aキナーゼ (PKA) アンカータンパク質1	AKAP1	NM_003488
80	201699	プロテアソーム26SサブユニットATPase6	PSMC6	NM_002806
81	201715	KIAA0670	KIAA0670	NM_014977
82	201716	ソーティングネキシン (sorting nexin) 1	SNX1	NM_003099
83	201738	翻訳因子sui1ホモログ	GC20	NM_005875
84	201754	チトクロムcオキシダーゼサブユニットVIc	COX6C	NM_004374
85	201804	細胞骨格関連タンパク質1	CKAP1	NM_001281
86	201805	タンパク質キナーゼ、AMP活性化、 γ 1非触媒サブユニット	PRKAG1	NM_002733
87	201812	6.2 k dタンパク質	LOC54543	NM_019059
88	201818	仮説タンパク質 (hypothetical protein) FLJ12443	FLJ12443	NM_024830
89	201890	リボヌクレオチドレダクターゼM2ポリペプチド		NM_001034
90	201910	RhoGEF (ARHGEF) およびプレクストリン (pleckstrin) ドメインタンパク質1	FARP1	NM_005766
91	201911	RhoGEF (ARHGEF) およびプレクストリン (pleckstrin) ドメインタンパク質1	FARP1	NM_005766
92	201921	グアニンヌクレオチド結合タンパク質10	GNG10	NM_004125
93	201934	仮説タンパク質PRO2730		NM_025222
94	201938	口腔癌1で欠失	DOC1	NM_004642
95	201987	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質、240 k Dサブユニッ ト		NM_005121
96	202001	NADHデヒドロゲナーゼ1 α サブコンプレックス6	NDUFA6	NM_002490
97	202029	リボゾームタンパク質L38	RPL38	NM_000999
98	202077	NADHデヒドロゲナーゼ1 α β サブコンプレックス1	NDUFAB1	NM_005003
99	202078	COP9サブユニット3	COPS3	NM_003653
100	202090	ユビキノールチトクロムcレダクターゼ (6.4 kD) サブユニッ ト	UQCR	NM_006830
101	202110	チトクロムcオキシダーゼサブユニットVIIb	COX7B	NM_001866
102	202114	ソーティングネキシン (sorting nexin) 2	SNX2	NM_003100
103	202141	COP9ホモログ		NM_006710

10

20

30

40

【表 10 - 3】

104	202154	チューブリン β 4	TUBB4	NM_006086
105	202163	C C R 4-N O T 転写複合体サブユニット 8	CNOT8	NM_004779
106	202187	タンパク質ホスファターゼ 2 調節サブユニット B α イソ型	PPP2R5A	NM_006243
107	202197	ミオチューブラリン (myotubularin) 関連タンパク質 3	MTMR3	NM_021090
108	202219	溶質担体ファミリー 6、メンバー 8	SLC6A8	NM_005629
109	202231	樹状細胞タンパク質	GA17	NM_006360
110	202233	ユビキノール-チトクロム c レダクターゼヒンジタンパク質	UQCRH	NM_006004
111	202242	膜貫通型 4 スーパーファミリーメンバー 2	TM4SF2	NM_004615
112	202275	グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ	G6PD	NM_000402
113	202279	第 1 4 染色体オープンリーディングフレーム 2	C14ORF2	NM_004894
114	202285	腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー 2		NM_002353
115	202286	腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー 2		NM_002353
116	202287	腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー 2		NM_002353
117	202298	N A D H デヒドロゲナーゼ 1 α サブコンプレックス 1	NDUFA1	NM_004541
118	202310	I 型プロコラーゲンのプロ α 1 (I) 鎖		NM_000088
119	202311	I 型プロコラーゲンのプロ α 1 (I) 鎖		NM_000088
120	202312	コラーゲン、I 型、 α 1	COL1A1	NM_000088
121	202324	ゴルジ滞留タンパク質 G C P 6 0	GCP60	NM_022735
122	202325	A T P シンターゼ、H + 輸送、ミトコンドリア F O 複合体、サブユニット F 6	ATP5J	NM_001685
123	202349	失調症 1、捻転	DYT1	NM_000113
124	202411	インターフェロン α 誘導性タンパク質 2 7	IFI27	NM_005532
125	202423	ジンクフィンガータンパク質 2 2 0	ZNF220	NM_006766
126	202432	タンパク質ホスファターゼ 3 触媒サブユニット、 β イソ型	PPP3CB	NM_021132
127	202442	アダプター関連タンパク質複合体 3、 σ 1 サブユニット	AP3S1	NM_001284
128	202458	プロテアーゼ、セリン、2 3	SPUVE	NM_007173
129	202468	カテニン (catenin) α 様 1	CTNNAL1	NM_003798
130	202478	G S 3 9 5 5 タンパク質	GS3955	NM_021643
131	202481	短鎖デヒドロゲナーゼレダクターゼ 1	SDR1	NM_004753
132	202503	K I A A O 1 O 1	KIAA0101	NM_014736
133	202544	グリア成熟因子 β	GMFB	NM_004124
134	202565	スーパービリン (supervillin) 転写変異体 1	SVIL	NM_003174
135	202582	R A N 結合タンパク質 9	RANBPM	NM_005493
136	202591	一本鎖 DNA 結合タンパク質	SSBP	NM_003143
137	202622	脊髄小脳失調症 2	SCA2	NM_002973
138	202642	形質転換転写ドメイン関連タンパク質	TRRAP	NM_003496
139	202649	リボゾームタンパク質 S 1 9	RPS19	NM_001022
140	202673	ドリチルリン酸マンノシルトランスフェラーゼポリペプチド 1 触媒サブユニット	DPM1	NM_003859
141	202692	上流結合転写因子、RNA ポリメラーゼ I	UBTF	NM_014233
142	202712	クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア 1	CKMT1	NM_020990
143	202723	フォークヘッドボックス (forkhead box) O 1 A	FOXO1A	NM_002015
144	202724	フォークヘッドボックス (forkhead box) O 1 A	FOXO1A	NM_002015
145	202735	エモパミル (emopamil) 結合タンパク質	EBP	NM_006579
146	202754	K I A A O O 2 9 タンパク質	KIAA0029	NM_015361
147	202759	A キナーゼ (P P K A) アンカータンパク質 2	AKAP2	NM_007203
148	202760	A キナーゼ (P P K A) アンカータンパク質 2	AKAP2	NM_007203
149	202761	シナプス核発現遺伝子 2	KIAA1011	NM_015180
150	202789	ホスホリパーゼ C、 γ 1		NM_002660
151	202820	アリール炭化水素受容体	AHR	NM_001621
152	202824	転写伸張因子 B (S I I I) ポリペプチド 1	TCEB1	NM_005648
153	202834	セリン (またはシステイン) プロテイナーゼ阻害剤、クレード A メンバー 8	SERPINA8	NM_000029
154	202841	7-60 タンパク質	7-60	NM_007346
155	202848	G タンパク質共役受容体キナーゼ 6		NM_002082
156	202854	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1	HPRT1	NM_000194
157	202860	K I A A O 4 7 6 遺伝子産物	KIAA0476	NM_014856
158	202889	微小管関連タンパク質 7		NM_003980

10

20

30

40

【表 10 - 4】

159	202890	微小管関連タンパク質 7		NM_003980
160	202947	グリコフォリン(glycophorin) C、転写変異体 1	GYPC	NM_002101
161	202949	4 1/2 LIMドメイン 2	FHL2	NM_001450
162	202957	造血細胞特異的 Lyn 基質 1	HCLS1	NM_005335
163	203044	K I A A O 9 9 O タンパク質	K I A A O 9 9 O	NM_014918
164	203053	乳癌増幅配列 2	BCAS2	NM_005872
165	203133	タンパク質転流複合体 β	SEC61B	NM_006808
166	203138	ヒストンアセチルトランスフェラーゼ 1	HAT1	NM_003642
167	203139	細胞死関連タンパク質キナーゼ 1 (death-associated protein kinase 1)	DAPK1	NM_004938
168	203140	B 細胞 C L L リンパ腫 6	BCL6	NM_001706
169	203142	アダプター関連タンパク質複合体 3、 β 1 サブユニット	AP3B1	NM_003664
170	203211	K I A A 1 0 7 3 タンパク質	K I A A 1 0 7 3	NM_016156
171	203213	細胞分裂サイクル 2、G 1 ~ S および G 2 ~ M		NM_001786
172	203255	白斑関連タンパク質 V I T - 1	VIT1	NM_018693
173	203262	X 染色体 (ユニーク) 9 9 2 8 発現配列	DXS9928E	NM_004699
174	203287	ラジニン(ladinin) 1	LAD1	NM_005558
175	203316	低分子量核リボヌクレオタンパク質ポリペプチド E	SNRPE	NM_003094
176	203332	イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ、145 k D	INPP5D	NM_005541
177	203362	M A D 2 (有糸分裂休止欠陥、酵母、ホモログ) 様 1	MAD2L1	NM_002358
178	203371	N A D H デヒドロゲナーゼ 1 β サブコンプレックス 3	NDUFB3	NM_002491
179	203385	ジアシルグリセロールキナーゼ α	DGKA	NM_001345
180	203396	プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット α タイプ 4	PSMA4	NM_002789
181	203437	推定受容体タンパク質	PM1	NM_003876
182	203460	プレセニリン(presenilin) 1、転写変異体 I - 4 6 3	PSEN1	NM_007318
183	203484	S e c 6 1 γ	SEC61G	NM_014302
184	203514	ミトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 3		NM_002401
185	203528	セマドメイン、I g ドメイン、T M ドメインおよび短鎖細胞質ドメイン、4 D	SEMA4D	NM_006378
186	203531	クリン(cullin) 5		NM_003478
187	203581	R A B 4、メンバー R A S オンコジーンファミリー		NM_004578
188	203610	リングフィンガータンパク質 15		NM_006355
189	203613	N A D H デヒドロゲナーゼ 1 β サブコンプレックス 6	NDUFB6	NM_002493
190	203621	N A D H デヒドロゲナーゼ 1 β サブコンプレックス 5	NDUFB5	NM_002492
191	203666	ストロマ細胞由来因子 1	SDF1	NM_000609
192	203667	チューブリン特異的シャペロン a	TBCA	NM_004607
193	203674	K I A A O 0 5 4 遺伝子産物; ヘリカーゼ	K I A A O 0 5 4	NM_014877
194	203743	チミン-DNA グリコシラーゼ	TDG	NM_003211
195	203748	R N A 結合モチーフ、一本鎖相互作用タンパク質 1、転写変異体 M S S P - 2	RBMS1	NM_016839
196	203761	S r c 様アダプター	SLA	NM_006748
197	203827	仮説タンパク質 F L J 1 0 0 5 5	FLJ10055	NM_017983
198	203845	p 3 0 0 C B P 関連因子		NM_003884
199	203882	インターフェロン刺激転写因子 3 γ	ISGF3G	NM_006084
200	203886	フィбуリン(fibulin) 2	FBLN2	NM_001998
201	203893	副腎タンパク質 A D - 0 0 4	LOC51578	NM_016283
201	203922	チトクロム b - 2 4 5、 β ポリペプチド		NM_000397
203	203936	マトリックスメタノプロテイナーゼ 9	MMP9	NM_004994
204	203940	K I A A 1 0 3 6 タンパク質	K I A A 1 0 3 6	NM_014909
205	203960	H S P C O 3 4 タンパク質	LOC51668	NM_016126
206	203965	ユビキチン特異的プロテアーゼ 2 0	USP20	NM_006676
207	204014	二重特異性ホスファターゼ 4	DUSP4	NM_001394
208	204015	二重特異性ホスファターゼ 4	DUSP4	NM_001394
209	204049	K I A A O 6 8 0 遺伝子産物	K I A A O 6 8 0	NM_014721
210	204067	亜硫酸オキシダーゼ		NM_000456
211	204082	プレ B 細胞白血病転写因子 3	PBX3	NM_006195
212	204141	チューブリン、 β ポリペプチド	TUBB	NM_001069

10

20

30

40

【表 10 - 5】

213	204145	F S H D 領域遺伝子 1	FRG1	NM_004477
214	204146	R A D 5 1 相互作用タンパク質		NM_006479
215	204158	T 細胞免疫レギュレーター 1	TCIRG1	NM_006019
216	204168	ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ 2	MGST2	NM_002413
217	204170	C D C 2 8 タンパク質キナーゼ 2	CKS2	NM_001827
218	204215	仮説タンパク質MGC 4 1 7 5		NM_024315
219	204294	アミノメチルトランスフェラーゼ	AMT	NM_000481
220	204351	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質P	S100P	NM_005980
221	204361	S K A P 5 5 ホモログ	SKAP-Hom	NM_003930
222	204362	S K A P 5 5 ホモログ	SKAP-Hom	NM_003930
223	204411	K I A A O 4 4 9 タンパク質	KIAA0449	NM_017596
224	204416	アポリポタンパク質C-1	APOC1	NM_001645
225	204528	ヌクレオソームアセンブリタンパク質 1 様 1	NAP1L1	NM_004537
226	204640	スペックル型P O Z タンパク質	SPOP	NM_003563
227	204642	内皮分化、スフィンゴ脂質Gタンパク質共役受容体 1	EDG1	NM_001400
228	204652	核呼吸因子 1	NRF1	NM_005011
229	204694	α -フェトタンパク質	AFP	NM_001134
230	204698	インターフェロン刺激遺伝子	ISG20	NM_002201
231	204729	シンタキシン(syntaxin) 1 A	STX1A	NM_004603
232	204766	nudix 型モチーフ 1	NUDT1	NM_002452
233	204767	フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ 1		NM_004111
234	204777	T 細胞分化タンパク質転写変異体 a	MAL	NM_002371
235	204863	インターロイキン6シグナルトランスデューサー		NM_002184
236	204864	インターロイキン6シグナルトランスデューサー	IL6ST	NM_002184
237	204881	UDPグルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ	UGCG	NM_003358
238	204885	メソセリン(mesothelin)、転写変異体 1	MSLN	NM_005823
239	204905	真核生物翻訳伸張因子 1 ϵ 1	EEF1E1	NM_004280
240	204923	染色体X q 2 5 - 2 6, 1 上の 7 5 3 P 9		NM_018990
241	204950	K I A A O 9 5 5 タンパク質	KIAA0955	NM_014959
242	204951	r a s ホモログ遺伝子ファミリー、メンバーH	ARHH	NM_004310
243	204955	s u s h i リピート含有タンパク質、X染色体	SRPX	NM_006307
244	204966	脳特異的脈管形成阻害剤 2	BAI2	NM_001703
245	204989	インテグリン β 4	ITGB4	NM_000213
246	204990	インテグリン β 4	ITGB4	NM_000213
247	205033	デフェンシン(defensin) α 1、骨髄関連配列	DEFA1	NM_004084
248	205087	D K F Z P 5 6 6 K O 2 3 タンパク質		NM_015485
249	205108	アポリポタンパク質B	APOB	NM_000384
250	205133	熱ショック10kDタンパク質 1	HSPE1	NM_002157
251	205176	インテグリン β 3 結合タンパク質	ITGB3BP	NM_014288
252	205213	K I A A O 0 5 0 遺伝子産物	ACAP1	NM_014716
253	205270	リンパ球サイトソルタンパク質 2	LCP2	NM_005565
254	205323	金属調節転写因子 1	MTF1	NM_005955
255	205335	シグナル認識粒子19kD	SRP19	NM_003135
256	205336	パルブアルブミン(parvalbumin)	PVALB	NM_002854
257	205339	T A L 1 (S C L) 介在遺伝子座	SIL	NM_003035
258	205361	プレフォルジン(prefoldin) 4		U41816
259	205403	インターロイキン1受容体、タイプ I I	IL1R2	NM_004633
260	205453	ホメオボックスB 2	HOXB2	NM_002145
261	205467	カスパーゼ(caspase) 1 0	CASP10	NM_001230
262	205600	ホメオボックスB 5	HOXB5	NM_002147
263	205601	ホメオボックスB 5	HOXB5	NM_002147
264	205608	アンジオポイエチン 1		NM_001146
265	205609	アンジオポイエチン 1	ANGPT1	NM_001146
266	205644	低分子量核リボヌクレオタンパク質ポリペプチドG	SNRPG	NM_003096
267	205671	M H C、クラス I I D O β	HLA-DQB	NM_002120
268	205807	タフテリン(tuftelin) 1	TUFT1	NM_020127
269	205849	γ -アミノ酪酸A受容体 β 3 転写変異体 1	GABRB3	NM_006294

10

20

30

40

【表 10 - 6】

270	205967	H4ヒストンファミリー、メンバーG	H4FG	NM_003542
271	206066	RAD51 (S. セレビスエ) ホモログC	RAD51C	NM_002876
272	206148	インターロイキン3受容体 α	IL3RA	NM_002183
273	206150	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー7	TNFRSF7	NM_001242
274	206177	アルギナーゼ、肝臓	ARG1	NM_000045
275	206219	vav1オンコジーン	VAV1	NM_005428
276	206245	NS1結合タンパク質	NS1-BP	NM_006469
277	206289	ホメオボックスA4	HOXA4	NM_002141
278	206298	s23549および23762由来の仮説タンパク質	LOC58504	NM_021226
279	206618	インターロイキン18受容体1	IL18R1	NM_003855
280	206637	KIAA0001	KIAA0001	NM_014879
281	206674	fms関連チロシンキナーゼ3	FLT3	NM_004119
282	206723	Gタンパク質共役受容体Edg-4		AF233092
283	206790	NADHデヒドロゲナーゼ1 β サブコンプレックス1	NDUFB1	NM_004545
284	206868	KIAA0189遺伝子産物	KIAA0189	NM_014725
285	206874	Ste20関連セリントレオニンキナーゼ		NM_014720
286	206958	UPF3	UPF3	NM_023011
287	207072	インターロイキン18受容体アクセサリタンパク質	IL18RAP	NM_003853
288	207111	egf様モジュール含有、ムチン様、ホルモン受容体様配列1	EMR1	NM_001974
289	207127	異種核リボヌクレオタンパク質H3	HNRPH3	NM_021644
290	207163	vaktマウス胸腺腫ウイルスオンコジーンホモログ1	AKT1	NM_005163
291	207165	ヒアルロン酸媒介運動性受容体転写変異体2 (hyaluronan-mediated motility receptor trans var 2)	HMMR	NM_012485
292	207266	RNA結合モチーフ、一本鎖相互作用タンパク質1、転写変異体MSSP-3	RBMS1	NM_016837
293	207287	仮説タンパク質FLJ14107	FLJ14107	NM_025026
294	207335	溶質担体ファミリー1メンバー7	SLC1A7	NM_006671
295	207540	脾臓チロシンキナーゼ	SYK	NM_003177
296	207551	雄性特異的致死-3 (ショウジョウバエ(Drosophila)) 様1	MSL3L1	NM_006800
297	207568	コリン作動性受容体、ニコチン性、 α ポリペプチド6	CHRNA6	NM_004198
298	207571	基底膜誘導遺伝子	ICB-1	NM_004848
299	207573	ATPシンターゼ、H ⁺ 輸送、ミトコンドリアF1F0、サブユニットg	ATP5JG	NM_006476
300	207777	核顆粒タンパク質Sp140	SP140	NM_007237
301	207826	DNA結合阻害剤3、ドミナントネガティブヘリックスループヘリックスタンパク質	ID3	NM_002167
302	207845	分裂後期促進複合体10	APC10	NM_014885
303	207935	ケラチン13	KRT13	NM_002274
304	207974	S期キナーゼ関連タンパク質1A (p19A)	SKP1A	NM_006930
305	208091	仮説タンパク質DKFZp564K0822		NM_030796
306	208130	トロンボキサン(thromboxane) Aシンターゼ1	TBXAS1	NM_030984
307	208270	アルギニルアミノペプチダーゼ	RNPEP	NM_020216
308	208310	フォリスタチン(follistatin)様1	FSTL1	NM_007085
309	208325	リンパ性急性転化オンコジーン	LBC	NM_006738
310	208414	ホメオボックスB3	HOXB3	NM_002146
311	208420	Ty (S. セレビスエ) 6ホモログのサブレッサー	SUPT6H	NM_003170
312	208549	プロチモシン(prothymosin) a14	LOC51685	NM_016171
313	208598	上流調節要素結合タンパク質1	UREB1	NM_005703
314	208621	ビリン(villin) 2	ezrin	NM_003379
315	208622	ビリン(villin) 2	ezrin	NM_003379
316	208623	サイトビリン(Cytovillin) 2	VIL2	NM_003379
317	208629	ヒドロキシアシル-補酵素Aデヒドロゲナーゼ3-ケトアシル-補酵素Aチオラセエノイル-補酵素Aヒドラターゼ α サブユニット		U04627
318	208633	アクチン結合タンパク質; マクロフィン(macrophin)		AB029290
319	208643	K α 自己免疫抗原遺伝子		J04977
320	208656	サイクリン1	CYC1	AF135162
321	208667	推定腫瘍サブレッサーST13	ST13	U17714
322	208672	スプライシング因子、アルギニンセリン-リッチ3		BC000914

10

20

30

40

【表 10 - 7】

323	208679	P N A S - 1 3 9		AF279893
324	208695	リボゾームタンパク質 L 3 9	RPL39	BC001019
325	208745	A T P シンターゼ、H ⁺ 輸送、ミトコンドリア F 1 F O、サブユニット g		AA917672
326	208746	F 1 F O 型 A T P シンターゼサブユニット g		AF070655
327	208754	D K F Z p 7 6 2 G 1 0 6		AL162068
328	208808	高移動群タンパク質 2		BC000903
329	208819	m e l トランスフォーミングオンコジーン-R A B 8 ホモログ		BC002977
330	208831	K I A A O 1 6 2		D79984
331	208894	M H C クラス I I H L A - D R - α		M60334
332	208900	トボイソメラーゼ I		W025108
333	208904	リボゾームタンパク質 S 2 8	RPS28	BC000354
334	208905	チトクロム c		BC005299
335	208919	仮説タンパク質 F L J 1 3 0 5 2 と類似		BC001709
336	208927	スペックル型 P O Z タンパク質		BC001269
337	208956	デオキシウリジントリホスファターゼ	DUT	U62891
338	208966	インターフェロン γ 誘導タンパク質 1 6		AF208043
339	208975	インボーチン β サブユニット		L38951
340	208977	チューブリン β 2		BC004188
341	208981	血小板内皮細胞接着分子		NM_000442
342	209022	自己複製配列と高い類似	ARS	AK026678
343	209063	ポリアデニレート結合タンパク質相互作用タンパク質 1		BF248165
344	209066	ミトコンドリアユビキノン結合タンパク質		M26700
345	209089	R A B 5 A、メンバー R A S オンコジーンファミリー		BC001267
346	209119	核受容体サブファミリー 2、F 群、メンバー 2		AV703465
347	209120	核受容体サブファミリー 2、F 群、メンバー 2		AV703465
348	209122	脂肪分化関連タンパク質		NM_001122
349	209138	免疫グロブリン λ 遺伝子座		FLM87790
350	209172	動原体タンパク質 F		U30872
351	209191	チューブリン β 4 に類似		BC002654
352	209209	マイトジェン誘導遺伝子	mig-2	AW469573
353	209210	マイトジェン誘導遺伝子	mig-2	Z24725
354	209227	推定前立腺癌腫瘍サブレッサー		NM_006765
355	209228	推定前立腺癌腫瘍サブレッサー		NM_006765
356	209239	B 細胞 1 における κ 軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサー (kappa light polypeptide gene enhancer) の核因子	p105	M55643
357	209257	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 6	bamacan	NM_005445
358	209258	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 6	bamacan	NM_005445
359	209270	ラミニン S B 3 鎖	LAMB3	NM_000228
360	209282	タンパク質キナーゼ D 2		NM_016457
361	209289	核因子 I B		NM_005596
362	209295	T R A I L 受容体 2		AF016266
363	209303	N A D H デヒドロゲナーゼ F e - S タンパク質 4		NM_002495
364	209309	亜鉛 α 2 糖タンパク質		D90427
365	209324	網膜に豊富な G タンパク質シグナル伝達のレギュレーター 1 6	hRGS-r	NM_002928
366	209325	網膜に豊富な G タンパク質シグナル伝達のレギュレーター	hRGS-r	NM_002928
367	209362	R N A ポリメラーゼ B のサブレッサー、酵母ホモログ	SRB7	NM_004264
368	209369	1、2-サイクリックイノシトールリン酸ホスホジエス 2、テラーゼ	ANX3	NM_005139
369	209372	チューブリン、 β ポリペプチド		BC001352
370	209377	甲状腺ホルモン受容体相互作用因子 7		AF274949
371	209385	プロリンシンターゼ同時転写物		AL136616
372	209411	A D P リボシル化因子結合タンパク質 G G A 3		AF219139
373	209443	プロテイナーゼ阻害剤、クレード A メンバー 5		NM_000624
374	209471	ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ α サブユニット		NM_002027
375	209492	A T P シンターゼ、H ⁺ 輸送、ミトコンドリア F O 複合体、サブユニット e		BC003679
376	209500	腫瘍壊死因子スーパーファミリー、メンバー 1 3	TNSF13	NM_003808

10

20

30

40

【表 10 - 8】

377	209507	複製タンパク質 A 3		NM_002947
378	209520	核キャップ結合タンパク質サブユニット 1		NM_002486
379	209560	δ 様ホモログ		NM_003836
380	209585	マルチプルイノシトールポリリン酸ホスファターゼ		NM_004897
381	209628	仮説タンパク質 P 15-2		NM_018698
382	209662	セントリン (centrin)、EF-ハンドタンパク質 3		NM_004365
383	209679	643 由来の仮説タンパク質		NM_020467
384	209687	ストロマ細胞由来因子 1		U19495
385	209730	sema ドメイン、Ig、短鎖基本ドメイン、分泌、3F		U38276
386	209734	造血タンパク質 1		NM_005337
387	209810	肺表面活性物質関連タンパク質 B	SP-B	NM_000542
388	209827	インターロイキン 16	IL16	NM_004513
389	209838	甲状腺受容体相互作用タンパク質 15		AF212227
390	209868	RNA 結合モチーフ、一本鎖相互作用タンパク質 1	SCR2	NM_002897
391	209907	インターセクチン (intersectin) 2 長鎖イソ型	ITSN2	AF182198
392	210093	magonashi ホモログ、増殖関連		NM_002370
393	210097	レチノイン酸抑制タンパク質		AF130102
394	210137	dCMP デアミナーゼ		BC001286
395	210139	末梢ミエリンタンパク質 22	GAS3	L03203
396	210180	スプライシング因子、アルギニンセリン-リッチ 10		U87836
397	210233	インターロイキン 1 受容体アクセサリタンパク質	IL1RAP	AF167343
398	210235	LAR 相互作用タンパク質 1a		U22815
399	210283	Sim-ポリアデニレート結合タンパク質相互作用 1		BC005295
400	210284	TAK1 結合タンパク質 2		AF214230
401	210347	C2H2 型ジンクフィンガータンパク質		AF080216
402	210448	イオン向性 ATP 受容体 P2X5b		U49396
403	210453	DKFZ p566G013		AL050277
404	210510	可溶性ニューロピリン (neuropilin) - 1		AF145712
405	210563	FLICE 様阻害タンパク質短鎖型		U97075
406	210598			AF130051
407	210615	ニューロピリン (neuropilin) - 1 可溶性イソ型 11	NRP1	AF280547
408	210633	酸性セラチン - 10	KRT10	M19156
409	210639	アポトーシス関連タンパク質	APG5L	AF293841
410	210649	BRG1 関連因子 250a	BAF250a	AF231056
411	210666	イズロン酸 (iduronate) - 2-スルファターゼ	IDS	NM_000202
412	210785	基底膜誘導遺伝子	ICB-1beta	AB035482
413	210786	フレンド白血病ウイルス組み込み 1	FLI-1	M93255
414	210840	IQ モチーフコンティグ GTPase 活性化タンパク質 1 (IQ motif cont'g GTPase activating protein 1)		D29640
415	210854	GABA ノルアドレナリン輸送体		U17986
416	210859	CLN3 タンパク質	CLN3	AF077973
417	210982	MHC クラス II HLA-DRA	HLA-DRA	M60333
418	211000	関節リウマチ抗原ペプチド担持可溶性型の gp130	gp130-RAPS	AB015706
419	211133	白血球 Ig 様受容体サブファミリー B メンバー 3	LILRB3	NM_00864
420	211430	抗 A 型肝炎 IgG		M87789
421	211445	FKSG17	FKSG17	AF315951
422	211487	リボゾームタンパク質 S17		BC004886
423	211535	繊維芽増殖因子受容体	FGFR	M60485
424	211645	免疫グロブリン κ 鎖 VK-1	IgK	M85256
425	211730	ポリメラーゼ (RNA) II (DNA 向性) ポリペプチド L		BC005903
426	211743	プロテオグリカン 2、骨髄		BC005929
427	211747	U6 snRNA 関連 Sm 様タンパク質		BC005938
428	211762	カリオフェリン (karyopherin) α2		BC005978
429	211858	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 Gsα サブユニットイソ型 L2		AF088184
430	211915	β チューブリン	TUB4q	U83110
431	211921	胎児胸腺プロチモシン α		AF348514
432	211932	ラットらせん脱安定性タンパク質に類似の異種核タンパク質		BE867771

10

20

30

40

【表 10 - 9】

433	211938	仮説タンパク質PRO1843		BF247371
434	211976	FLJ21862 f i s		AK026168
435	211985	マトリックスGlaタンパク質		A1653730
436	212007	UBXドメイン含有1		D87684
437	212012	KIAA0230		AF200348
438	212013	KIAA0230		AF200348
439	212027	S164タンパク質		BE466128
440	212181	ジホスホイノシトールポリリン酸ホスホヒドロラーゼ2	NUDT4	AF191654
441	212201	KIAA0692タンパク質		AB014592
442	212248	FLJ20738 f i s		A1972475
443	212269	ミニ染色体維持欠陥3関連	GANP	AJ010089
444	212277	KIAA0647タンパク質		AB014547
445	212283	e s t : t g 4 9 b 0 4 . x 1		AF016903
446	212285	e s t : t g 4 9 b 0 4 . x 1		AF016903
447	212287	KIAA0160タンパク質		BF382924
448	212298	ニューロピリン1		NM_003873
449	212311	KIAA0746タンパク質		AB018289
450	212382	FLJ11918 f i s		AK021980
451	212384	HLA-B関連転写物-1		BG341380
452	212385	FLJ11918 f i s		AK021980
453	212386	FLJ11918 f i s		AK021980
454	212387	FLJ11918 f i s		AK021980
455	212426	チロシン3-モノオキシゲナーゼトリプトファン5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質、 θ ポリペプチド		BF033313
456	212451	KIAA0256		D87445
457	212531	リポカリン(lipocalin) 2	LCN2	NM_005564
458	212549	DKFZp586N1323		A1149535
459	212561	KIAA1091		AA349595
460	212570	KIAA0830		AL573201
461	212571	KIAA1564		U00955
462	212573	KIAA0830		AL573201
463	212578	リボゾームタンパク質S17		BF026595
464	212583	KIAA0560遺伝子産物		AB011132
465	212630	s e c 6 ホモログ		AF055006
466	212664	チューブリン β 5		NM_006087
467	212740	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、調節サブユニット4	p150	BF740111
468	212757	FLJ22656 f i s		BF111268
469	212771	DKFZp564A026		AU150943
470	212833	TB1遺伝子		M74089
471	212860	DKFZp667O2416		BG168720
472	212878	キネシン(kinesin) 2		AA284075
473	212907	n b c 6 4 7		A1972416
474	212927	KIAA0594		AB011166
475	212964	DKFZp434D1023		AB028943
476	213020	DKFZp566B213	GOSR1	NM_004871
477	213028	κ B結合タンパク質に関連する核因子		A1887378
478	213047	SET転流		A1278616
479	213061	KIAA0251		AA643304
480	213062	KIAA0251		AA643304
481	213074	DKFZp564D156		BG545769
482	213129	グリシン開裂系タンパク質H		BE908931
483	213134	BTGファミリー、メンバー3	BTG3	NM_006806
484	213147	ホメオボックスA10		NM_018951
485	213150	ホメオボックスA10		NM_018951
486	213159	KIAA0805		AB018348
487	213178		MAPK8IP3	NM_015133

10

20

30

40

【表 10 - 10】

488	213188	T 1 5 1 3 8 仮説タンパク質 T 2 8 F 2. 4 と若干類似		NM_032778
489	213231	筋緊張性異栄養症含有WDリピートモチーフ		L19267
490	213253	第2染色体酵母様1の構造維持	SMC2L1	AU154486
491	213287	酸性 (I 型) サイトケラチン 10 の遺伝子		X14487
492	213311	K I A A 1 0 4 9 タンパク質		BF000251
493	213338	D K F Z P 5 8 6 E 1 6 2 1		BF062629
494	213414	リボゾームタンパク質 S 1 9		BE259729
495	213423	推定前立腺癌腫瘍サプレッサー		A1884858
496	213479	ニューロンペントラキシン I I	NPTX2	NM_002523
497	213502	免疫グロブリンλ様ポリペプチド3		X03529
498	213539	CD3D抗原、δタンパク質 (T i T 3 複合体)	CD3D	NM_000732
499	213553	アポリボタンパク質 C - I		W79394
500	213567	2 3 7 2 8 配列		BF431965
501	213599	O p a 相互作用タンパク質 5		BF045993
502	213687	未同定視床下部タンパク質 H S M N P 1		BE968801
503	213700	仮説タンパク質 F L J 1 0 8 0 3		AA554945
504	213727	仮説タンパク質 F L J 1 1 5 8 5		A1743654
505	213754	ポリアデニレート結合タンパク質相互作用タンパク質 1		AW613203
506	213811	転写因子 3		BG393795
507	213843	アクセサリータンパク質 B A P 3 1 B A P 2 9		AW276522
508	213867	アクチンβ		AA809056
509	213911	H 2 A ヒストンファミリー、メンバー Z		BF718636
510	213941	リボゾームタンパク質 S 7		A1970731
511	214003	リボゾームタンパク質 S 2 0		BF184532
512	214051	チモシンβ		BF677486
513	214097	リボゾームタンパク質 S 2 1		AW024383
514	214124	D K F Z p 4 3 4 B 2 0 2 7		AL043487
515	214129	K I A A 0 4 7 7		A1821791
516	214143	リボゾームタンパク質 L 2 4		A1560573
517	214224	タンパク質 N I M A 相互作用 4	parvulin	BE674061
518	214264	e s t : t t 4 6 h 0 3		A1656610
519	214288	プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニットβ タイプ1		W86293
520	214292	インテグリンβ 4		AA808063
521	214298	セプチン(septin) 2		AL568374
522	214352	v - K i - r a s 2 カーステン (Kirsten) ラット肉腫2ウィ ルスオンコジーンホモログ		BF673699
523	214377	e s t : U I - H - B I 4 - a o p - e - 1 2 - 0 - U I . s 1		BF508685
524	214433	セレン結合タンパク質 1	SELENBP1	NM_003944
525	214494	細胞マトリックス接着レギュレーター	CMAR	NM_005200
526	214499	B c i - 2 関連転写因子短鎖型		AF249273
527	214617	パーフォリン(perforin) 1		A1445650
528	214661	仮説 S. pombe 遺伝子に対するホモログを有する 4 p 1 6. 3 上のHD付近 (near HD on 4p16.3 with hom to hyp S. pombe gene)		R06783
529	214696	2 4 6 5 9 配列		AF070569
530	214721	D K F Z p 7 6 2 L 1 0 6		AL162074
531	214800	塩基性転写因子 3		R83000
532	214820	転写単位 N 1 4 3		AJ002572
533	214905	E U R O I M A G E 4 6 8 6 6		AL109674
534	215038	ハンチントン相互作用タンパク質		AF049103
535	215073	核受容体サブファミリー2、F群、メンバー2		AL554245
536	215096	エステラーゼD-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ		AU145746
537	215121	免疫グロブリンλ遺伝子座		AA680302
538	215127	RNA結合モチーフ、一本鎖相互作用タンパク質 1		AL517946
539	215136	D K F Z p 5 6 4 C 0 4 8 2		AL050353
540	215147	2 3 7 1 2 配列		AF007147
541	215171	N T 2 R P 3 0 0 0 3 4 1		AK023063

10

20

30

40

【表 10 - 11】

542	215227	酸性ホスファターゼ 1、可溶性		BG035989
543	215379	免疫グロブリンλ連結 3		AV698647
544	215380	FLJ11717 f i s		AK021779
545	215399	骨肉腫において増幅		AI683900
546	215446	リシルオキシダーゼ	LOX	L16895
547	215493	ブチロフィリン(butyrophilin) 2 AをコードするBTN2A1 遺伝子の3末端		AL121936
548	215691	HSPCO34タンパク質		AV702994
549	215764	アダプター関連タンパク質複合体2、α2サブユニット		AA877641
550	215812	クレアチン輸送体	SLC6A10	U41163
551	215905	U5 snRNP特異的40kDaタンパク質		AL157420
552	216207	免疫グロブリンκ可変1-13		AW408194
553	216348	転写因子AP-2β		AL049693
554	216384	プロチモシンα	PTMA	AF257099
555	216641	ラジニン(ladinin)	LAD	U58994
556	216833	グリコフォリン(glycophorin) HeP2		U05255
557	216899	7p15-p21由来のPAC RP5-1139P1		AC003999
558	216977	U2 snRNP特異的Aタンパク質、選択的転写物3		AJ130972
559	217013	7q22-q31.1由来のPAC RP4-604G5		AC004522
560	217014	7q22-q31.1由来のPAC RP4-604G5		AC004522
561	217022	IgA1-A2λハイブリッドGAU重鎖		S55735
562	217106	推定ジメチルアデノシントランスフェラーゼ		AF091078
563	217122	マトリックスメタロプロテイナーゼ雌性生殖器官MIFR1 2 (Matrix Metalloproteinase Female Rep tract MIFR1 2)	MMP2122A	AL031282
564	217249	4由来のBAC CTB-162B4		AC004544
565	217293	アンジオポイエチン1		AF209975
566	217329	チトクロムcオキシダーゼサブユニットVIIb偽遺伝子	COX7BP1	AF042164
567	217336	第20染色体上のRP5-858M22		AL118510
568	217410	FLJ11524 f i s		AK021586
569	217419	FLJ11524 f i s		AK021586
570	217491	チトクロムcオキシダーゼサブユニットVIIc偽遺伝子	COX7CP1	AF042165
571	217749	コートタンパク質γ-cop	LOC51137	NM_016128
572	217750	仮説タンパク質FLJ13855		NM_023079
573	217754	推定核小体RNAヘリカーゼ	NOH61	NM_019082
574	217769	仮説タンパク質	HSPC014	NM_015932
575	217773	NADHデヒドロゲナーゼ1αサブコンプレックス4	NDUFA4	NM_002489
576	217801	ATPシンターゼ、H+輸送、ミトコンドリアF1複合体、εサブユニット	ATP5E	NM_006886
577	217812	高グルコース調節タンパク質8	HGRG8	NM_016258
578	217825	CGI-76タンパク質		AF151039
579	217833	NS1関連タンパク質1		NM_006372
580	217838	RNB6	RNB6	NM_016337
581	217843	HSPC126タンパク質	HSPC126	NM_014166
582	217853	テンシン(tensin)に類似の仮説タンパク質FLJ13732	TENC1	NM_022748
583	217860	NADHデヒドロゲナーゼ1αサブコンプレックス10	NDUFA10	NM_004544
584	217866	仮説タンパク質FLJ12529	FLJ12529	NM_024811
585	217875	膜貫通型、前立腺アンドロゲン誘導RNA	TMEPAI	NM_020182
586	217877	仮説タンパク質SP192	SP192	NM_021639
587	218003	FK506結合タンパク質3	FKBP3	NM_002013
588	218039	HQ0310 PRO0310p1	LOC51203	NM_016359
589	218058	CpG結合タンパク質	CGBP	NM_014593
590	218062	Cdc42エフェクタータンパク質4; Rho GTPase 4の結合剤	CEP4	NM_012121
591	218103	仮説タンパク質FLJ20062	FLJ20062	NM_017647
592	218116	肝細胞癌関連抗原59	LOC51759	NM_016520
593	218117	リングボックス1	RBX1	NM_014248
594	218175	仮説タンパク質FLJ22471	FLJ22471	NM_025140

10

20

30

40

【表 10 - 12】

595	218188	内部ミトコンドリア膜 13 (酵母) ホモログのトランスロカ ゼ	TIMM13B	NM_012458
596	218213	第 11 染色体オープンリーディングフレーム 10	C11orf10	NM_014206
597	218241	ゴルジ自己抗原、ゴルジンサブファミリー a5	GOLGA5	NM_005113
598	218256	ヌクレオポリン(nucleoporin) p54	NUP54	NM_017426
599	218259	KIAA1243 タンパク質	KIAA1243	NM_014048
600	218274	仮説タンパク質 FLJ10415	FLJ10415	NM_018089
601	218276	WWドメイン含有遺伝子	WW45	NM_021818
602	218280	H2A ヒストンファミリー、メンバー O	H2AF0	NM_003516
603	218283	kiaa1243 タンパク質	LOC51188	NM_016305
604	218288	仮説タンパク質 MDS025	MDS025	NM_021825
605	218334	仮説タンパク質 FLJ23445	FLJ23445	NM_025075
606	218339	HSPC158 タンパク質	HSPC158	NM_014180
607	218350	ゲミニン(geminin)	LOC51053	NM_015895
608	218367	ユビキチン特異的プロテアーゼ 21	USP21	NM_012475
609	218368	I 型膜貫通型タンパク質 FN14	FN14	NM_016639
610	218373	融合足指に類似の仮説タンパク質 FLJ13258	FLJ13258	NM_022476
611	218395	仮説タンパク質 FLJ13433	FLJ13433	NM_022496
612	218397	仮説タンパク質 FLJ10335	FLJ10335	NM_018062
613	218447	DC13 タンパク質	DC13	NM_020188
614	218467	x003 タンパク質	MDS003	NM_020232
615	218482	DC6 タンパク質	DC6	NM_020189
616	218543	仮説タンパク質 FLJ22693	FLJ22693	NM_022750
617	218563	NADHデヒドロゲナーゼ 1 α サブコンプレックス 3	NDUFA3	NM_004542
618	218576	二重特異性ホスファターゼ 12	DUSP12	NM_007240
619	218603	ショウジョウバエヘッドケース(Drosophila headcase)のホモ ログ	hHDC	NM_016217
620	218605	仮説タンパク質 FLJ23182	FLJ23182	NM_022366
621	218643	シナプス後タンパク質 CR1PT	CR1PT	NM_014171
622	218660	ジスフェルリン(dysferlin)、肢帯型筋ジストロフィー 2B	DYSF	NM_003494
623	218671	ATPasase 阻害剤前駆体	LOC51189	NM_016311
624	218801	UDP-グルコース：糖タンパク質グリコシルトランスフェ ラーゼ 2	FLJ10873	NM_020121
625	218830	リボゾームタンパク質 L26 ホモログ	LOC51121	NM_016093
626	218873	仮説タンパク質 FLJ20203	FLJ20203	NM_017710
627	218936	HSPC128 タンパク質	HSPC128	NM_014167
628	218937	仮説タンパク質 FLJ20417	FLJ20417	NM_017810
629	218946	HIRIP5 タンパク質	HIRIP5	NM_015700
630	219008	仮説タンパク質 FLJ21820	FLJ21820	NM_021925
631	219030	CGI-121 タンパク質	LOC51002	NM_016058
632	219032	オプシン(opsin) 3 (エンセファロプシン(encephalopsin))	OPN3	NM_014322
633	219056	仮説タンパク質 FLJ11712	FLJ11712	NM_024570
634	219105	起源認識複合体、サブユニット 6 様	ORC6L	NM_014321
635	219110	GAR1 タンパク質	GAR1	NM_018983
636	219163	仮説タンパク質 FLJ20079	FLJ20079	NM_017656
637	219218	仮説タンパク質 FLJ23058	FLJ23058	NM_024696
638	219286	仮説タンパク質 FLJ12479	FLJ12479	NM_022768
639	219293	仮説タンパク質	PTD004	NM_013341
640	219347	仮説タンパク質 FLJ10956	FLJ10956	NM_018283
641	219452	推定ジペプチダーゼ	LOC64174	NM_022355
642	219506	仮説タンパク質 FLJ23221	FLJ23221	NM_024579
643	219507	仮説タンパク質	LOC51319	NM_016625
644	219546	仮説タンパク質 DKFZp434P0116		NM_017593
645	219759	アミノペプチダーゼ	LOC64167	NM_022350
646	219765	仮説タンパク質 FLJ12586	FLJ12586	NM_024620
647	219816	仮説タンパク質 FLJ10482	FLJ10482	NM_018107
648	219819	HSPC007 タンパク質	HSPC007	NM_014018
649	219906	仮説タンパク質 FLJ10213	FLJ10213	NM_018029

10

20

30

40

【表 10 - 13】

650	220001	ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ、タイプV	PAD	NM_012387
651	220023	アポリポタンパク質B48受容体	AP0B48R	NM_018690
652	220052	TERF1 (TRF1) 相互作用核因子2	TINF2	NM_012461
653	220060	仮説タンパク質FLJ20641	FLJ20641	NM_017915
654	220155	仮説タンパク質FLJ13441	FLJ13441	NM_023924
655	220199	仮説タンパク質FLJ12806	FLJ12806	NM_022831
656	220386	第2染色体オープンリーディングフレーム2	C20RF2	NM_019063
657	220404	PRO0611タンパク質	PRO0611	NM_014076
658	220416	仮説タンパク質FLJ21472	FLJ21472	NM_024837
659	220558	全造血系発現	PHEMX	NM_005705
660	220671	炭素異化代謝産物抑制4様	CCRN4L	NM_012118
661	220741	無機ピロホスファターゼ	SID6-306	NM_006903
662	220755	G8タンパク質	G8	NM_016947
663	220864	CGI-39タンパク質; 細胞死調節タンパク質GRIM19	LOC51079	NM_015965
664	220942	仮説タンパク質、エストロジオール誘導	E2IG5	NM_014367
665	221009	PPAR (γ) アンジオポイエチン関連タンパク質	PGAR	NM_016109
666	221143	複製タンパク質A複合体 34kd サブユニットホモログ Rpa4	HSU24186	NM_013347
667	221253	仮説タンパク質MGC3178	MGC3178	NM_030810
668	221432	仮説タンパク質NPD016	NPD016	NM_031212
669	221434	仮説タンパク質DC50	DC50	NM_031210
670	221505	仮説タンパク質MGC5350		AW612574
671	221509	密度関連タンパク質	SMAP-3	AB014731
672	221528	仮説タンパク質FLJ11656に類似		BC000143
673	221577	前立腺分化因子		AF003934
674	221593	リボソームタンパク質L31に類似		BC001663
675	221599	PTD015タンパク質に類似		BC002752
676	221620	脳my025		AF061264
677	221669	アシル補酵素Aデヒドロゲナーゼファミリー、メンバー8		BC001964
678	221776	プロモドメイン含有7		A1885109
679	221791	仮説タンパク質		BG167522
680	221853	FLJ23491		N39536
681	221860	DKFZp434L2128		AL044078
682	221932	FLB4739		AA133341
683	221935	FLJ13078fis		AK023140
684	221942	sec61ホモログ		A1719730
685	222108	BACGS1-99H8		AC004010
686	222192	FLJ11610fis		AK021672
687	222193	FLJ11610fis		AK021672
688	222203	FLJ13563fis		AK023625
689	222280	ALUCと若干類似		BG491393
690	33304	HEM45		U88964
691	33768	59タンパク質		L19267
692	35666	セマフォリン (semaphorin) IIIファミリーホモログ		U38276
693	37004	肺表面活性物質関連タンパク質B	SP-B	J02761
694	37005	未知の産物		D28124
695	37201	PK-120		D38535
696	37996	筋緊張性ジストロフィーキナーゼ	DM kinase	L08835
697	41858	DKFZp564E053	FRAG1	NM_014489
698	44696	IMAGE-1473925		AA915989
699	49485	W22625: 71E5ホモ・サピエンスcDNA		W22625
700	55692	75H3/ (非指向性)		W22924
701	59644	IMAGE-2354728		A1735391
702	AFFX-HSAC07/X00351_3			X00351
703	AFFX-HSAC07/X00351_M		β-アクチン	X00351
704	AFFX-HUMISGF3A/M97935_MB		転写因子ISGF-3	M97935
705	AFFX-r2-Ec-bioB-3		大腸菌 (E. coli) bioB遺伝子ビオチンシンセターゼ	J04423

〔 参考文献 〕

- | | | |
|-----------|-----------|----|
| 5,242,974 | 5,561,071 | |
| 5,384,261 | 5,571,639 | |
| 5,405,783 | 5,593,839 | |
| 5,412,087 | 5,599,695 | |
| 5,424,186 | 5,624,711 | |
| 5,429,807 | 5,658,734 | |
| 5,436,327 | 5,700,637 | |
| 5,445,934 | 6,004,755 | |
| 5,472,672 | 6,133,305 | |
| 5,527,681 | 6,218,114 | 10 |
| 5,529,756 | 6,218,122 | |
| 5,532,128 | 6,271,002 | |
| 5,545,531 | 6,271,210 | |
| 5,554,501 | 6,284,764 | |
| 5,556,752 | 6,306,897 | |
- Adnane et al. (2000) "Inhibition of farnesyltransferase increases TGFbeta type II receptor expression and enhances the responsiveness of human cancer cells to TGFbeta" *Oncogene* 19:5525-5533
- Albertson (1984) *EMBO J.* 3:1227-1234
- Alsina et al. (2003) "Farnesyltransferase inhibitor FTI-R115777 is well tolerated, induces stabilization of disease, and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma" *Eur. J. Haematol.* 70:269
- Brunner et al. (2003) "Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations" *Cancer Res.* 63:5656-5668
- Bullinger et al. (2004) "Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia" *N. Engl. J. Med.* 350:1605-1616
- Carr et al. (1991) "Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif" *J. Biol. Chem.* 266:14188-14192
- Chang et al. (2003) "Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer" *Lancet* 362:362-369
- Cheok et al. (2003) "Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells" *Nat. Genet.* 34:85-90
- Cortes et al. (2003) "Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies" *Blood* 101:1692-1697
- Cox et al. (2002) "Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities" *Curr. Opin. Pharmacol.* 2:388-393
- Debernardi et al. (2003) "Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events" *Genes Chrom. Cancer* 37:149-158
- End et al. (2001) "Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro" *Cancer Res.* 61:131-137
- EP 430,402
- Esteva et al. (2003) "Phase III study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer" *J Clin Oncol.* 20:1800-1808.
- Foisner et al. (1991) "Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3812-3816
- Gene Therapy Protocols, edited by Paul D. Robbins, Human press, Totowa NJ, 1996
- 40

- Harousseau et al. (2003) "Zarnestra™ (R115777) in patients with relapsed or refractory acute myelogenous leukemia (AML): results of a multicenter phase 2 study" *Blood* 102:176a Abstract 614
- Hofmann et al. (2002) "Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor ST1571 and gene-expression profiles: a gene-expression study" *Lancet* 359:481-486
- Jensen et al. (2001) "Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15197-15202.
- Jiang et al. (2000) "The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis" *Mol. Cell. Biol.* 20:139-148
- Johnston et al. (2003) "Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer" *J. Clin. Oncol.* 21:2492-2499 10
- Kallioniemi (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5321-5325
- Karp et al. (2001) "Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial" *Blood* 97:3361-3369
- Kohlmann et al. (2003) "Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology" *Genes Chrom. Cancer Genes Chrom. Cancer* 37:396-405
- Kurzrock et al. (2004) "Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome" *J. Clin. Oncol.* 22:1287-1292
- Lancet et al. (2003) "Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy" *Blood* 102:3880-3889
- Lancet et al. (2004) "Tipifarnib (ZARNESTRA™) in Previously Untreated Poor-Risk AML of the Elderly: Updated Results of a Multicenter Phase 2 Trial" *Blood* 104:874a 20
- Li et al. (2002) "The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function" *Mol. Cell. Biol.* 22:1158-1171
- Lynch et al. (2004) "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib" *N. Engl. J. Med.* 350:2129-2139
- McLean et al. (2004) "Pharmacogenomic analysis of cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib" *Clin. Cancer Res.* 10:155-165
- Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In Situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994)
- Morgan et al. (2001) "Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling" *Blood* 97:1823-1834 30
- Na et al. (2004) "Inhibition of farnesyltransferase prevents collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory gene expression through suppression of p21(ras)-dependent NF-kappaB activation" *J Immunol.* 173:1276-1283.
- Okutsu et al. (2002) "Prediction of chemosensitivity for patients with acute myeloid leukemia, according to expression levels of 28 genes selected by genome-wide complementary DNA microarray analysis" *Mol. Cancer Ther.* 1:1035-1042
- Paez et al. (2004) "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib" *Science* 304:1497-1500
- Pasqualucci et al. (2001) "Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas" *Nature* 412:341-346 40
- Pinkel (1988) "Fluorescence in situ Hybridization with Human Chromosome-Specific Libraries: Detection of Trisomy 21 and Translocations of Chromosome 4" *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9138-9142
- Pinkel et al. (1998) "High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays" *Nature Genetics* 20:207-211

Rao et al. (2004) "Phase III Double-Blind Placebo-Controlled Study of Farnesyl Transferase Inhibitor R115777 in Patients With Refractory Advanced Colorectal Cancer" J Clin Oncol 22:3950-3957

Raponi, et al. (2004) "Identification of Molecular Predictors of Response to ZARNESTRA™ (Tipifarnib, R115777) in Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia" Blood 104:861a

Reiss et al. (1990) "Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys'AAX tetrapeptides" Cell 62:81-88

Reuter et al. (2000) "Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?" Blood 96:1655-1669

Sahai et al. (2002) "RHO-GTPases and cancer" Nat. Rev. Cancer 2:133-142

Schoch et al. (2002) "Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:10008-10013 10

Sterpetti et al. (1999) "Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting" Mol. Cell. Biol. 19:1334-1345

Strachan and Read, Human Molecular Genetics, 1996

Takada et al. (2004) "Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH 66336) abolishes NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis" J Biol Chem. 279:26287-26299.

Testa et al. (2004) "Interleukin-3 receptor in acute leukemia" Leukemia 18:219-226

Thomas et al. (2001) "R115777, a farnesyl transferase inhibitor (FTI), has significant anti-leukemia activity in patients with chronic myeloid leukemia (CML)" Blood 98

Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Elsevier, NY 20

Toksoz et al. (1994) "Novel human oncogene lbc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products" Oncogene 9:621-628

Valk et al. (2004) "Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia" N. Engl. J. Med. 350:1617-1628

Van Cutsem et al. (2004) "Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer" J. Clin. Oncol. 22:1430-1438

Yagi et al. (2003) "Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis" Blood 102:1849-1856

Zhang et al. (2002) "Farnesyltransferase inhibitors reverse Ras-mediated inhibition of Fas gene expression" Cancer Res. 62:450-458

Zheng et al. (1995) "Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in lbc oncogene function" J. Biol. Chem. 270:9031-9034 30

【 0 1 6 9 】

〔 実施の態様 〕

本発明の実施態様は以下の通りである。

(1) 急性骨髄性白血病 (A M L) の状態を評価する方法において、

a . A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、

b . 表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
を含み、 40

所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、A M L 状態の指標となる、
方法。

(2) 急性骨髄性白血病 (A M L) 患者の病期分類を行う方法において、

a . A M L 患者から生体サンプルを採取するステップと、

b . 表 3、表 4、表 5、表 7、表 8、または、表 9 から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
を含み、

所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、A M L 生存の指標となる、 50

方法。

- (3) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者の治療プロトコルを決定する方法において、
 a. AML 患者から生体サンプルを採取するステップと、
 b. 表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
 を含み、

所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、医師が適切な治療法を提供するために推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、治療法に対する応答の十分な指標となる、

方法。

10

- (4) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者を治療する方法において、
 a. AML 患者から生体サンプルを採取するステップと、
 b. 表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが治療法に対する応答の指標となる、ステップと、
 c. 前記患者が応答者プロフィール (responder profile) を有する場合に、患者にアジュバント療法を施すステップと、
 を含む、方法。

- (5) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者の死亡リスクが高いか低いかを決定する方法において、

20

- a. AML 患者から生体サンプルを採取するステップと、
 b. 表3から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子に関連するバイオマーカーを測定するステップと、
 を含み、

所定のカットオフレベルよりも高いかまたは低い前記マーカー遺伝子の発現レベルが、医師が推奨される治療法の程度および種類を決定することができるように、死亡リスクの十分な指標となる、

方法。

30

【0170】

- (6) 実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法において、
 前記サンプル中で構成的に発現される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを測定すること、
 をさらに含む、方法。

- (7) 実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法において、
 前記特異性は、少なくとも約40%である、方法。

- (8) 実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法において、
 前記感受性は、少なくとも約80%である、方法。

- (9) 実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法において、
 前記p値は、0.05未満である、方法。

40

- (10) 実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法において、
 遺伝子発現は、マイクロアレイまたは遺伝子チップで測定される、方法。

【0171】

- (11) 実施態様10に記載の方法において、
 前記マイクロアレイは、cDNAアレイ、または、オリゴヌクレオチドアレイである、方法。

- (12) 実施態様10に記載の方法において、
 前記マイクロアレイまたは遺伝子チップは、1種類以上の内部対照試薬 (internal control reagent) をさらに含む、方法。

- (13) 実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法において、

50

遺伝子発現は、前記サンプルから抽出されたRNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって行われる核酸増幅により決定される、方法。

（14）実施態様13に記載の方法において、

前記PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）である、方法。

（15）実施態様14に記載の方法において、

前記RT-PCRは、1種類以上の内部対照試薬をさらに含む、方法。

【0172】

（16）実施態様1～実施態様5のいずれか一に記載の方法において、

遺伝子発現は、前記遺伝子によりコードされているタンパク質を測定または検出することによって検出される、方法。

10

（17）実施態様16に記載の方法において、

前記タンパク質は、前記タンパク質に特異的な抗体によって検出される、方法。

（18）実施態様1～実施態様5のいずれか一に記載の方法において、

遺伝子発現は、前記遺伝子の特徴を測定することによって検出される、方法。

（19）実施態様18に記載の方法において、

前記測定される特徴は、DNA増幅、メチル化、突然変異、および、対立遺伝子変異からなる群から選択される、方法。

（20）急性骨髄性白血病（AML）予後患者レポートを作成する方法において、

実施態様1～実施態様5のいずれか一に記載の結果を判定するステップと、

前記結果を表示したレポートを作成するステップと、

を含む、方法。

20

【0173】

（21）実施態様20に記載の方法において、

前記レポートは、患者の転帰の評価、および/または、患者集団に対するリスクの見込み、および/または、化学療法に対する可能性もしくは応答を含む、方法。

（22）患者レポートにおいて、

実施態様21に記載の方法によって作成された、患者レポート。

（23）生体サンプルで急性骨髄性白血病（AML）予後を決定するアッセイを実施するためのキットにおいて、

前記生体サンプルは、表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料、を含む、キット。

30

（24）実施態様23に記載のキットにおいて、

マイクロアレイ分析を実施するための試薬、

をさらに含む、キット。

（25）実施態様24に記載のキットにおいて、

媒体であって、この中で、前記核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部がアッセイされる、媒体、

をさらに含む、キット。

40

【0174】

（26）急性骨髄性白血病（AML）の状態を評価するための製品において、

表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部を検出するための材料、を含む、製品。

（27）実施態様26に記載の製品において、

マイクロアレイ分析を実施するための試薬、

をさらに含む、製品。

（28）実施態様27に記載の製品において、

50

媒体であって、この中で、前記核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部がアッセイされる媒体、

をさらに含む、製品。

(29) マイクロアレイまたは遺伝子チップにおいて、

実施態様1～実施態様5のいずれかに記載の方法を実施するための、マイクロアレイまたは遺伝子チップ。

(30) 実施態様29に記載のマイクロアレイにおいて、

表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部、

を含む、マイクロアレイ。

10

【0175】

(31) 実施態様30に記載のマイクロアレイにおいて、

前記測定または同定が、少なくとも1.5倍の過剰発現、または、1.5分の1の過少発現である、マイクロアレイ。

(32) 実施態様30に記載のマイクロアレイにおいて、

前記測定は、統計学的に有意なp値の過剰発現または過少発現を提供する、マイクロアレイ。

(33) 実施態様32に記載のマイクロアレイにおいて、

前記p値が、0.05未満である、マイクロアレイ。

20

(34) 実施態様30に記載のマイクロアレイにおいて、

cDNAアレイ、または、オリゴヌクレオチドアレイを含む、マイクロアレイ。

(35) 実施態様30に記載のマイクロアレイにおいて、

1種類以上の内部対照試薬、

をさらに含む、マイクロアレイ。

【0176】

(36) 診断/予後ポートフォリオにおいて、

表3、表4、表5、表7、表8、または、表9から選択される遺伝子に相当するマーカー遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補物、または、それらの一部、

30

を含む、診断/予後ポートフォリオ。

(37) 実施態様36に記載のポートフォリオにおいて、

前記測定または同定が、少なくとも1.5倍の過剰発現、または、1.5分の1の過少発現である、ポートフォリオ。

(38) 実施態様37に記載のポートフォリオにおいて、

前記測定は、統計学的に有意なp値の過剰発現または過少発現を提供する、ポートフォリオ。

(39) 実施態様37に記載のポートフォリオにおいて、

前記p値が、0.05未満である、ポートフォリオ。

【図面の簡単な説明】

40

【0177】

【図1】再発性および難治性AML患者のアンスーパーバイズドクラスタリング(Unsupervised clustering)を示す図である。

【図2】2つの遺伝子のリアルタイムRT-PCRを示す図である。

【図3】AKAP13遺伝子の予測値を示す図である。

【図4】予測マーカーの最小セットを示す図である。

【図5】3遺伝子シグネチャによって応答者および非応答者に予測された患者に対して行った Kaplan-Meier 分析を示す図である。

【図6】AML細胞系でのAKAP13の過剰発現を示す図である。

【図7】再発性または難治性AMLにおけるFTI作用のモデルを示す図である。

50

【図 8】ザルネストラ (Zarnestra) 予測遺伝子シグネチャが、単独の予後遺伝子シグネチャよりも有用であることを示す図である。

【図 9】プリンガーら (Bullinger et al.) (2004) の遺伝子をアフィメトリクス (Affymetrix) U133A チップ上の 167 のプローブセット (103 個のユニークな遺伝子) にどのように一致させるかを示すフローチャートである。

【図 10】再発性または難治性 AML 患者における 167 のプローブセットシグネチャの有用性を示す図である。

【図 11】予後遺伝子シグネチャとザルネストラ (Zarnestra) 予測遺伝子シグネチャとの比較を示す図である。

【図 12】予測マーカーの最小セットの特定を示す図である。

【図 13】遺伝子発現分析の概要を示す図である。

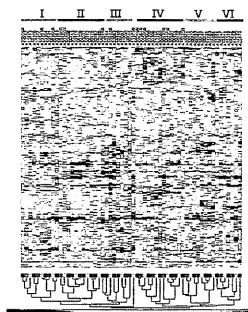
【図 14】ティピファニブ処置の終了後、AML サンプルは、FTI により媒介される全遺伝子発現を維持することを示す図である。

【図 15】予測発現プロファイルおよび新たに診断された AML での予測分類子の試験を示す図である。

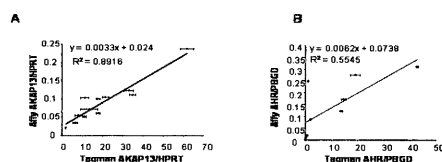
【図 16】6 遺伝子分類子は、新たに診断された AML を階層分類することを示す図である。

10

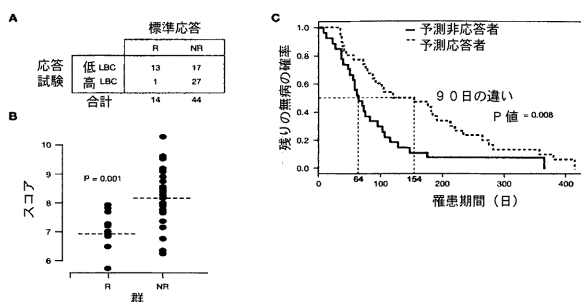
【図 1】



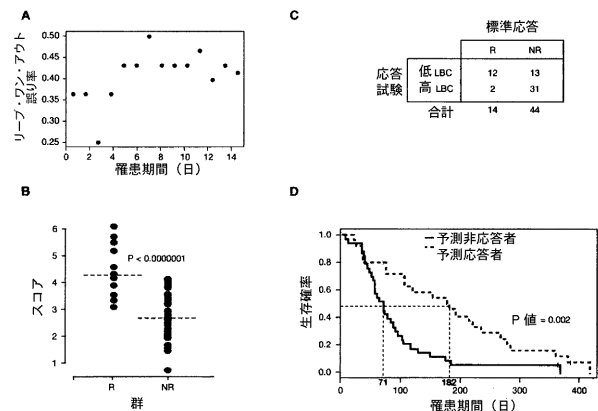
【図 2】



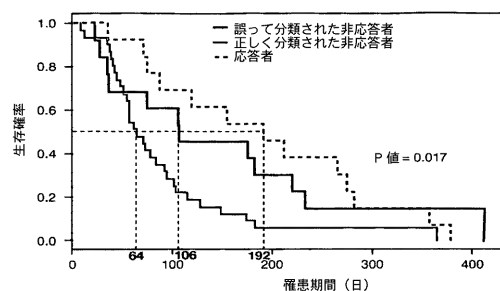
【図 3】



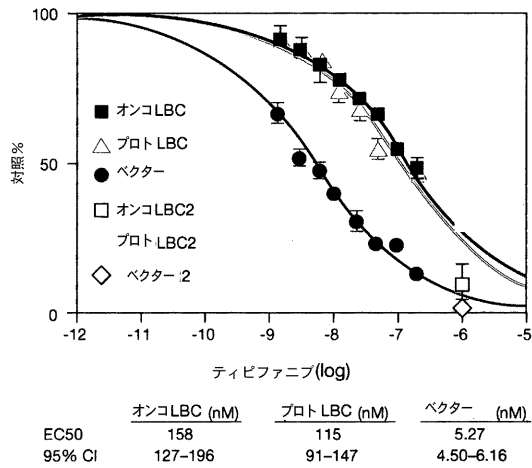
【図 4】



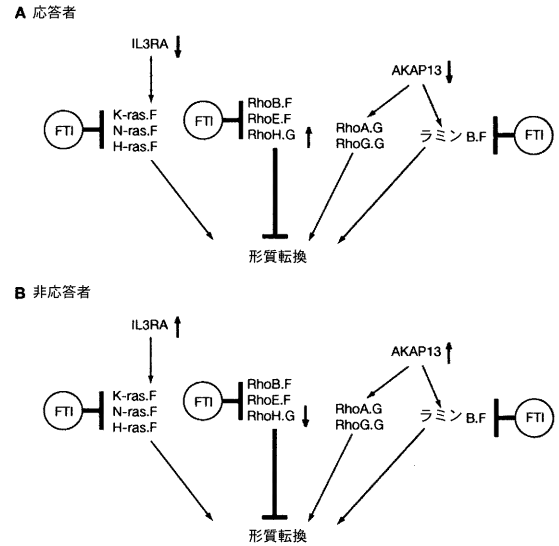
【図 5】



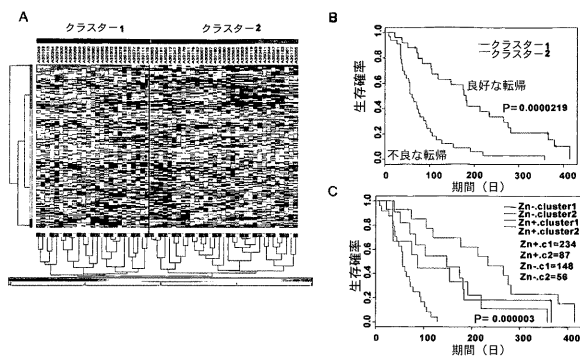
【図 6】



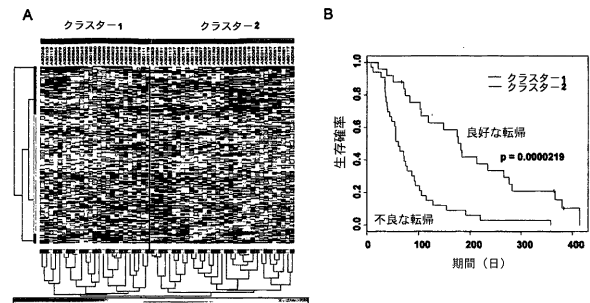
【図 7】



【図 8】



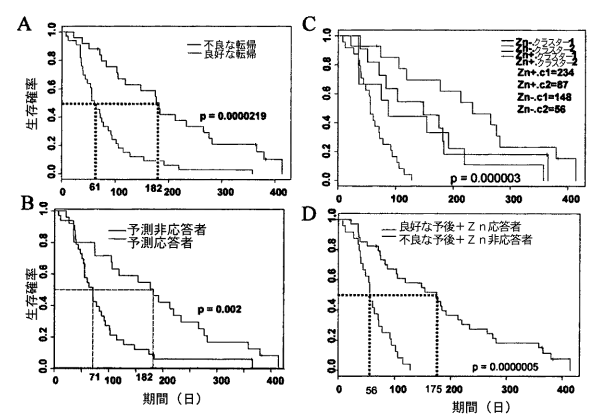
【図 10】



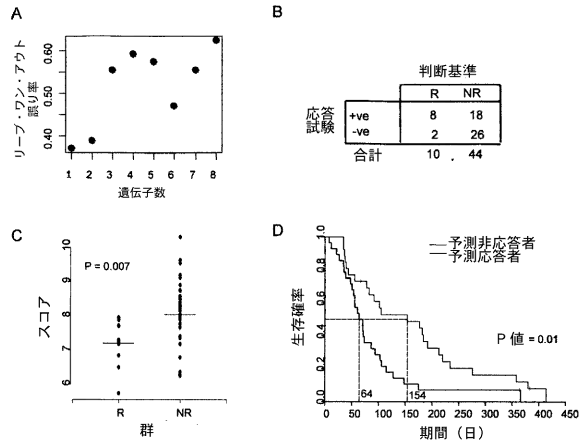
【図 9】

Bullinger 149 の画像 cDNA クローン
↓
U133A 由来の 201 p s i d s と一致
↓
U133A 由来のユニークな 167 p s i d s と一致
↓
103 のユニークな遺伝子と一致

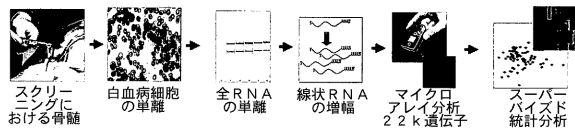
【図 11】



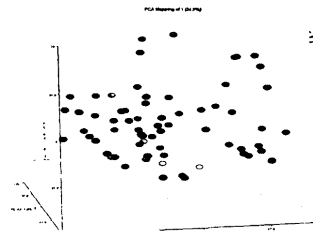
【図 1 2】



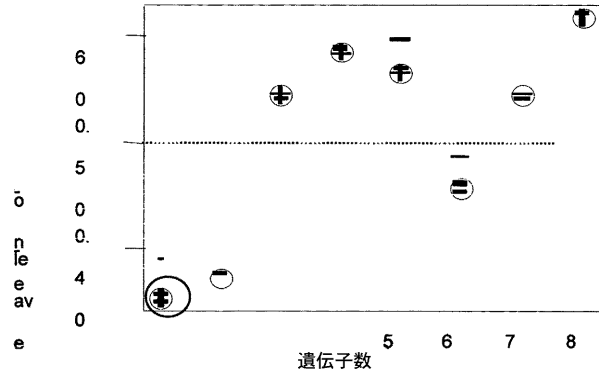
【図 1 3】



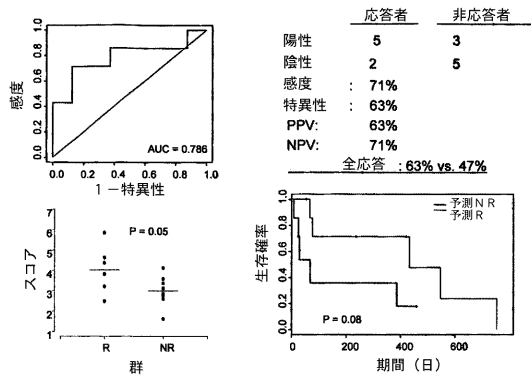
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



【配列表】

2008523822000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M

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

(72) 発明者 ラボニ・ミッチ
 アメリカ合衆国、 9 2 1 0 1 カリフォルニア州、 サン・ディエゴ、 ナンバー 4 0 8 ・ ケッテナー
 ・ ブルーバード 1 7 5 0

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA04 CA12 CA20 HA14
 4B029 AA07 AA23 BB11 BB20 CC01 CC08 FA15
 4B063 QA19 QQ08 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34

专利名称(译)	评估急性髓性白血病患者方法		
公开(公告)号	JP2008523822A	公开(公告)日	2008-07-10
申请号	JP2007547020	申请日	2005-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	维里德克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	贝里指数有限责任公司		
[标]发明人	ラポニミッチ		
发明人	ラポニ・ミッチ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 G01N37/00 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6809 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/154 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.F C12M1/00.A G01N37/00.102 G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
优先权	60/637265 2004-12-17 US 60/670116 2005-04-11 US 60/741180 2005-12-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

概率预测患有急性髓性白血病（AML）的患者的预后。 种类代码：A1治疗患者，优选造血系统恶性肿瘤患者的方法，包括分析患者的基因表达谱和/或分子标记物以确定患者的病症和/或预后。本发明还提供了分析非复发性或非难治性患者是否可能对用法呢基转移酶抑制剂（FTI）和可能的其它治疗剂治疗有反应的方法。这些方法也可用于监测患者的治疗 and 选择治疗过程。提供响应于FTI处理而调节的基因并用于生成谱。 .The 13

患者ID	AMLの種類	性別	年齢	最も悪い応答*	生存期間	応答
A3000009	難治性	男性	70	CR	3月8	あり
A3000111	再発性	男性	70	PR	1月4	あり
A3000599	難治性	女性	62	SD	1月9	あり
A300095	難治性	男性	61	CR	3月0	あり
A300177	再発性	女性	63	SD	2月6	あり
A300192	再発性	男性	67	SD	2月6	あり
A300238	再発性	女性	58	CR	2月7	あり
A300245	難治性	男性	74	HI	2月3	あり
A300353	再発性	女性	35	HI	1月2	あり
A300385	再発性	女性	44	HI	8月7	あり
A300360	難治性	男性	60	HI	3月6	あり
A300384	再発性	女性	44	HI	6月7	あり
A300379	再発性	女性	63	SD	2月2	あり
A300360	難治性	女性	71	HI	1月1	なし
A300008	難治性	男性	62	NR	1月7	なし
A300057	再発性	男性	51	NR	1月2	なし
A300057	再発性	男性	74	NR	1月2	なし
A300090	難治性	男性	33	NR	1月9	なし
A300095	難治性	男性	66	NR	1月2	なし
A300179	難治性	女性	70	NR	1月8	なし
A300182	難治性	男性	70	NR	1月2	なし
A300190	再発性	女性	64	NR	6月1	なし
A300191	再発性	女性	67	NR	3月7	なし
A300245	再発性	男性	63	NR	4月4	なし
A300300	再発性	男性	47	NR	2月4	なし
A300302	再発性	男性	62	NR	2月4	なし
A300308	再発性	男性	66	NR	7月1	なし
A300311	再発性	女性	65	NR	1月6	なし
A300377	再発性	女性	65	NR	3月5	なし
A300407	再発性	男性	63	NR	1月4	なし
A30065	再発性	女性	71	NR	2月0	なし
A30090	難治性	女性	46	NR	5月6	なし
A30091	難治性	女性	65	NR	6月0	なし
A30092	難治性	女性	67	NR	4月0	なし
A30092	難治性	女性	64	NR	4月0	なし
A30011	難治性	女性	71	NR	3月8	なし
A300113	難治性	男性	61	NR	1月7	なし
A300113	難治性	男性	75	NR	3月6	なし
A300153	再発性	女性	68	NR	1月5	なし
A300176	難治性	男性	75	NR	3月6	なし
A300178	再発性	女性	70	NR	3月9	なし
A300180	難治性	男性	62	NR	7月2	なし
A300183	難治性	男性	63	NR	6月4	なし
A300244	再発性	女性	34	NR	3月5	なし
A300247	難治性	女性	72	NR	3月5	なし
A300248	再発性	男性	46	NR	6月1	なし
A300304	再発性	男性	65	NR	4月4	なし
A300305	再発性	女性	28	NR	7月4	なし
A300349	難治性	男性	58	NR	2月2	なし
A300364	難治性	女性	31	NR	1月3	なし
A300365	再発性	男性	65	NR	3月7	なし
A300363	再発性	女性	24	NR	3月3	なし
A300376	再発性	女性	76	NR	1月4	なし
A300381	難治性	女性	70	NR	1月2	なし
A300395	難治性	男性	61	NR	8月5	なし

*第三者調査員によって確認された場合にのみ変換疾患（SD）が含まれる
 HI = 血液学的寛解
 CR = 完全な寛解
 PR = 部分的な寛解
 NR = 応答なし